

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der
Universität des Saarlandes
(Direktor: Prof. Dr. med. M. D. Menger)

**IN VITRO UND IN VIVO ANALYSE
DER ANTI-ANGIOGENEN WIRKUNG
VON 4-HYDROXYBENZYLALKOHOL**

Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

2014

Vorgelegt von Antonia E. Vorsterman van Oijen, geb. Gottschalk
Geboren am 06.06.1986 in Kaiserslautern

MEINER FAMILIE

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Zusammenfassung	1
2.	Summary	3
3.	Einleitung	5
3.1.	4-Hydroxybenzylalkohol (4-HBA)	5
3.2.	Entstehung von Blutgefäßen	7
3.3.	Endometriose	10
3.4.	Kolorektales Karzinom	13
4.	Ziel der Studie	17
5.	Material und Methodik	18
5.1.	<i>In vitro</i> Experimente	18
5.1.1.	Zelllinien	18
5.1.2.	Zellkultur	18
5.1.3.	Water-soluble tetrazolium (WST)-1-Assay	19
5.1.4.	Laktatdehydrogenase (LDH)-Release-Assay	19
5.1.5.	Migrationsassay	20
5.1.6.	Invasionsassay	21
5.1.7.	Phalloidin-Färbung	22
5.1.8.	Western Blot	23
5.1.9.	Aortenring-Assay	24
5.2.	<i>In vivo</i> Experimente	25
5.2.1.	Versuchstiere	25
5.2.2.	Modell der Rückenhautkammer	25
5.2.3.	Präparation der Rückenhautkammer	26
5.2.4.	Induktion von Endometrioseherden	29
5.2.4.1.	<i>Bestimmung des Zyklusstadiums</i>	29
5.2.4.2.	<i>Isolierung von Endometriumfragmenten</i>	30

5.2.4.3.	<i>Transplantation der Endometriumfragmente</i>	31
5.2.5.	Induktion kolorektaler Karzinome.....	31
5.2.5.1.	<i>Herstellung von Tumorsphäroiden</i>	31
5.2.5.2.	<i>Transplantation der Tumorsphäroide</i>	31
5.2.6.	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie.....	32
5.2.6.1.	<i>Transplantatgröße</i>	33
5.2.6.2.	<i>Funktionelle Kapillardichte</i>	34
5.2.6.3.	<i>Gefäßdurchmesser</i>	34
5.2.6.4.	<i>Blutzellgeschwindigkeit</i>	35
5.2.6.5.	<i>Blutvolumenfluss</i>	35
5.2.7.	Probenentnahme und Fixierung.....	35
5.2.8.	Histologie und Immunhistochemie.....	36
5.2.9.	Experimentelles Protokoll.....	36
5.2.9.1.	<i>Studienabschnitt 1</i>	37
5.2.9.2.	<i>Studienabschnitt 2</i>	39
5.3.	Statistik	40
6.	Ergebnisse	42
6.1.	Wirkung von 4-HBA auf Endothelzellen	42
6.1.1.	Zellvitalität und Zellmorphologie.....	42
6.1.2.	Zytotoxizität.....	43
6.1.3.	Zellmigration.....	44
6.1.4.	Organisation der Aktinfilamente.....	45
6.1.5.	Proteinexpression.....	45
6.1.6.	Aortenring-Assay.....	46
6.2.	Wirkung von 4-HBA auf Endometrioseherde	47
6.2.1.	Wachstum der Herde.....	47
6.2.2.	Entwicklung mikrovaskulärer Netzwerke.....	48
6.2.3.	Mikrohämodynamik.....	48
6.2.4.	Wirkung von 4-HBA auf bereits existierende Gefäße.....	49
6.2.5.	Histologie und Immunhistochemie.....	49
6.3.	Wirkung von 4-HBA auf Tumorzellen	50
6.3.1.	Zellvitalität und Zellmorphologie.....	50
6.3.2.	Zytotoxizität.....	51
6.3.3.	Zellmigration.....	51
6.3.4.	Zellinvasion.....	52

6.3.5.	Organisation der Aktinfilamente.....	53
6.3.6.	Proteinexpression.....	53
6.4.	Wirkung von 4-HBA auf Tumorzellsphäroide.....	54
6.4.1.	Wachstum der Tumore.....	54
6.4.2.	Entwicklung mikrovaskulärer Netzwerke.....	55
6.4.3.	Mikrohämodynamik.....	56
6.4.4.	Histologie und Immunhistochemie.....	56
6.5.	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	57
7.	Diskussion.....	59
7.1.	Diskussion der Methoden.....	59
7.1.1.	<i>In vitro</i> Angiogenese-Assays.....	59
7.1.2.	Aortenring-Assay.....	60
7.1.3.	<i>In vivo</i> Angiogenese-Modelle.....	61
7.1.4.	Endometriose-Modelle.....	63
7.1.5.	Kolonkarzinom-Modelle.....	64
7.2.	Diskussion der Ergebnisse.....	65
7.3.	Schlussfolgerungen und klinische Perspektiven.....	70
8.	Literaturverzeichnis.....	71
9.	Danksagung.....	86
10.	Lebenslauf.....	87
11.	Publikationen.....	88

1. ZUSAMMENFASSUNG

Die Angiogenese, d.h. die Entwicklung neuer Blutgefäße aus bereits vorhandenen Gefäßen, ist unter physiologischen Bedingungen, wie zum Beispiel bei der Embryonalentwicklung, aber auch unter pathologischen Bedingungen von entscheidender Bedeutung. Krankheiten, die mit Angiogenese einhergehen, sind beispielsweise Endometriose und Krebs. Folglich könnte eine zielgerichtete Therapie dieser Erkrankungen mit anti-angiogenen Substanzen erfolgen.

4-Hydroxybenzylalkohol (4-HBA) ist eine Substanz aus der im asiatischen Raum beheimateten Orchidee *Gastrodia elata* BLUME. Das Wurzelgeflecht dieser Pflanze wird seit vielen Jahren in der traditionellen chinesischen Medizin zur Behandlung von Kopfschmerzen, Epilepsie und Hypertonie eingesetzt. Neuere Untersuchungen zeigen, dass dessen Wirkung im Wesentlichen auf 4-HBA zurückzuführen ist und dass 4-HBA *in vitro* anti-inflammatorisch, anti-oxidativ und anti-angiogen wirkt. Genauere Analysen der Mechanismen, welche die anti-angiogene Wirkung von 4-HBA vermitteln, wurden bislang jedoch noch nicht durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die anti-angiogene Wirkung von 4-HBA mit Hilfe verschiedener *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen analysiert. *In vitro* Experimente an Endothel- und Tumorzellen zeigten, dass eine Behandlung der Zellen mit 4-HBA zu einer Reduktion der Zellvitalität und der Zellproliferation führt. Des Weiteren kam es durch eine Behandlung mit 4-HBA zu Veränderungen des Zytoskeletts, die mit einer Verklumpung der Aktinfilamente und einer signifikanten Einschränkung der Migrationsfähigkeit der Zellen einhergingen. Analysen des Proteingehalts der Zellen ergaben eine verringerte Expression pro-angiogener Faktoren wie *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) und Matrixmetalloproteinase 9 (MMP9) sowie eine erhöhte Apoptoserate. In einem Aortenring-Assay wurde durch 4-HBA die Aussprossung von neuen Mikrogefäßen komplett gehemmt. Somit konnte gezeigt werden, dass 4-HBA ein pleiotropes Wirkprofil hat und verschiedene Mechanismen der Angiogenese inhibiert.

Zur Untersuchung der Wirkung von 4-HBA auf die Angiogenese *in vivo* wurde das Rückenhautkammermodell eingesetzt, welches ein etabliertes Modell zur Untersuchung der Mikrozirkulation ist. In der vorliegenden Arbeit wurden Endometriumfragmente bzw. CT26-Tumorzellsphäroide in die Rückenhautkammern von Mäusen transplantiert. Die Tiere wurden über 14 Tage mit intraperitonealen Injektionen von 4-HBA behandelt und die Vaskularisierung der Transplantate und deren Wachstum repetitiv mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Diese Analysen konnten erstmals zeigen, dass 4-HBA die Angiogenese in Endometrioseherden und Tumorsphäroiden hemmt. Dies zeigte sich in einer signifikanten Reduktion der funktionellen Kapillardichte und einer Hemmung des

Wachstums der Transplantate. Dabei hatte die Behandlung der Tiere mit 4-HBA keine negativen Auswirkungen auf die ortständigen Blutgefäße in der Rückenhautkammer. Weiterhin waren über den 14-tägigen Untersuchungszeitraum bei den Tieren keine Nebenwirkungen erkennbar.

Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit geschlossen werden, dass 4-HBA ein neuer vielversprechender Wirkstoff zur zukünftigen adjuvanten Behandlung angiogener Krankheiten wie Endometriose und Krebs ist, der sich im langjährigen Einsatz in der traditionellen chinesischen Medizin bereits als sehr gut verträglich erwiesen hat.

2. SUMMARY

Angiogenesis, i.e. the formation of new blood vessels from existing ones, is a physiological process, which is important in embryogenesis and wound healing. It is also crucially involved in a variety of diseases such as endometriosis or malignancies. Hence, a targeted therapy of these diseases may be realized with anti-angiogenic substances.

4-Hydroxybenzyl alcohol (4-HBA) is a compound of the orchid *Gastrodia elata* BLUME, which is native to the Asian region and has been used in the therapy of headache, epilepsy and hypertension. Several studies conducted over the last few years could show that its effect is mainly due to the pharmacological action of 4-HBA. 4-HBA acts anti-inflammatory, anti-oxidative and anti-angiogenic *in vitro*. However, more detailed analyses focusing on the underlying mechanisms of its anti-angiogenic activity have not been carried out so far. Therefore, the aim of the present thesis was to study the anti-angiogenic action of 4-HBA in different *in vitro* and *in vivo* models.

In vitro experiments showed that treatment of endothelial and tumor cells with 4-HBA reduced their viability and proliferation. Moreover, phalloidin staining of 4-HBA-treated cells revealed a disorganisation of the cytoskeleton, which was associated with a decrease of the cellular migratory activity. In addition, the cells presented with a significantly decreased expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and matrix metalloproteinase 9 (MMP9) and an increased expression of the apoptosis marker cleaved caspase-3. Furthermore, 4-HBA reduced vascular sprouting in the aortic ring assay. This demonstrates that 4-HBA is a pleiotropic agent which inhibits several mechanisms of the angiogenic process.

To analyze the effect of 4-HBA on angiogenesis *in vivo*, we used the dorsal skinfold chamber, which is a well-established model to study the microcirculation. For this purpose, endometrial tissue fragments or CT26 cell spheroids were transplanted into the dorsal skinfold chamber of mice, which were daily treated with intraperitoneal injections of 4-HBA over 14 days. The vascularization and growth of the grafts were analyzed by means of repetitive intravital fluorescence microscopy. By this, it was found that 4-HBA effectively inhibits angiogenesis in endometriotic lesions and tumor spheroids, as indicated by a significantly reduced functional capillary density and growth rate. Importantly, the treatment with 4-HBA did not exert any toxic effects on host blood vessels of the dorsal skinfold chamber tissue. Furthermore, the treatment with 4-HBA over 14 days was not associated with any side effects.

Taken together, these novel findings indicate that 4-HBA represents a promising candidate for the establishment of adjuvant anti-angiogenic treatment strategies in

endometriosis and cancer therapy. Thereby, 4-HBA bears the advantage that it has been already used for many years in traditional Chinese medicine and has been proved to be well tolerated.

3. EINLEITUNG

3.1. 4-Hydroxybenzylalkhohol (4-HBA)

In der traditionellen chinesischen Medizin wird seit vielen Jahren die Pflanze *Gastrodia elata* BLUME eingesetzt, welche zur Familie der Orchideen gehört und in Südostasien beheimatet ist (Abb. 1A). Das Wurzelgeflecht (Rhizom) von *Gastrodia elata* BLUME wird auf Grund seiner analgetischen, sedierenden und antikonvulsiven Wirkung [HEO et al., 2007] als Phytotherapeutikum unter anderem zur Behandlung der Hypertonie und Arteriosklerose [LEE et al., 2009], Epilepsie [HSIEH et al., 2000] und Kopfschmerzen [ZENG et al., 2006] verwendet. Darüber hinaus ist es in China ein beliebtes Nahrungsmittel und wird sowohl roh als auch gekocht verzehrt [YANG et al., 2007]. Analysen des Rhizoms von *Gastrodia elata* BLUME ergaben, dass dieses mehrere phenolische Komponenten enthält: 4-Hydroxybenzylaldehyd, 4-HBA, Gastrodin, Parishin B und C, Gastrol und 4'-Dihydroxybenzylsulfoxid. Die Hauptbestandteile bilden jedoch 4-HBA (Abb. 1B) und sein Glykon Gastrodin [YANG et al., 2007].

Untersuchungen des Extraktes von *Gastrodia elata* BLUME konnten eine potente Wirkung gegen metastatisches Tumorwachstum durch eine Hemmung der Zellmigration, Invasion sowie der Entstehung neuer Blutgefäße zeigen [HEO et al., 2007]. Daneben führte das Extrakt zu einer verringerten Expression von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) in Endothelzellen [LEE et al., 2009]. MMPs sind proteolytische Enzyme, die von Endothelzellen und Makrophagen sezerniert werden und eine Degradation der Basalmembran und der extrazellulären Matrix bewirken. Ihre Expression wird genau reguliert und durch *Tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteinases* (TIMP) inhibiert. Bei Umbauvorgängen des Gewebes, wie zum Beispiel in der Embryonalentwicklung, der Wundheilung oder der Neubildung von Blutgefäßen, steigt die Expression der MMPs an. Sie werden jedoch auch für Entzündungsvorgänge des Endothels und atherosklerotische Veränderungen verantwortlich gemacht und sind in atherosklerotischen Plaques, bei Krebserkrankungen und Arthritis in hoher Konzentration vorhanden [BEAUDEUX et al., 2004].

Gastrodia elata BLUME-Extrakt hemmt weiterhin die Aktivierung von Mikrogliazellen, die wesentlich an der Neuroinflammation beteiligt sind. Dieser Effekt lässt sich auf eine Suppression pro-inflammatorischer Mediatoren wie *Nitric Oxide* (NO) und der *Cyclooxygenase-2* (COX-2) zurückführen. Auch die Expression von *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) und *Interleukin-1 β* (IL-1 β) kann durch eine Behandlung mit dem Extrakt reduziert werden. Ursächlich für die Suppression dieser Zytokine ist wahrscheinlich die Inhibition von *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of Activated B-cells* (NF- κ B) [KIM et al., 2012], der

bei inflammatorischen Prozessen für die Aktivierung weiterer pro-inflammatorischer Zytokine essentiell ist [LAWRENCE, 2009]. Im Vergleich zu den anderen aktiven Inhaltsstoffen von *Gastrodia elata* BLUME-Extrakt weist 4-HBA die stärkste anti-inflammatorische Aktivität auf [KIM et al., 2012].

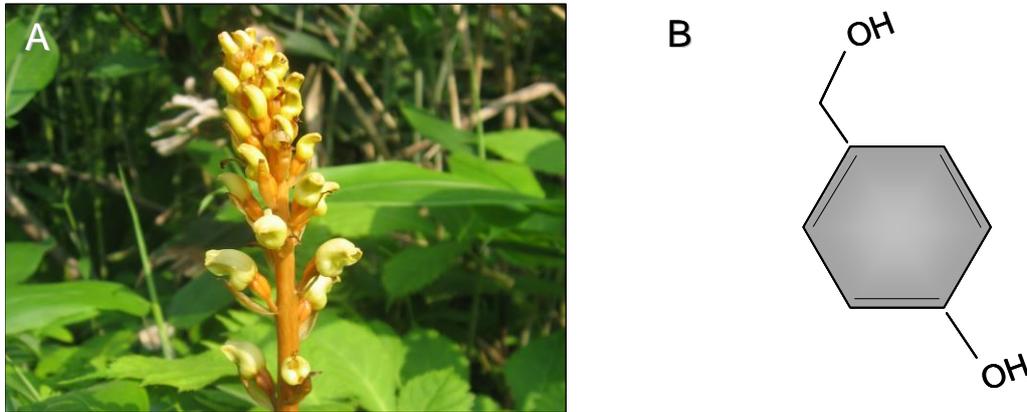


Abbildung 1: **A** *Gastrodia elata* BLUME gehört zur Familie der Orchideen und ist in Südostasien beheimatet. (Quelle: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gastrodia_elata_1.JPG) **B** Chemische Strukturformel von 4-HBA.

4-HBA ist eine in der Natur weit verbreitete Substanz und außer in *Gastrodia elata* BLUME [YU et al., 2005] zum Beispiel in der Wilden Möhre (*Daucus carota*) [KOBAYASHI et al., 2003] und *Gymnadenia conopsea* [CAI et al., 2006] enthalten. Studien konnten zeigen, dass 4-HBA eine pleiotrope Substanz ist und damit verschiedene Wirkungen auf zelluläre Mechanismen ausübt. So ist beschrieben, dass 4-HBA nach zerebraler Ischämie durch die gesteigerte Genexpression antioxidativer Proteine [YU et al., 2005] und durch die Hemmung der Apoptose [YU et al., 2010] neuroprotektiv wirkt. Des Weiteren weist 4-HBA analgetische [LIM et al., 2007] und durch Modulation am serotonergen Nervensystem auch anxiolytische Effekte auf [JUNG et al., 2006]. Als Radikalfänger wirkt 4-HBA antioxidativ, was sich in einer Hemmung der Lipidperoxidation und Proteinoxidation zeigt [DHIMAN et al., 2009]. So kann der zelluläre Gehalt reaktiver Sauerstoffspezies, welche zytotoxisch auf Zellen wirken und bei zahlreichen Erkrankungen in erhöhter Konzentration gefunden werden, durch eine Behandlung mit 4-HBA reduziert werden [LIM et al., 2007].

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass 4-HBA auch die Angiogenese, d.h. die Entstehung neuer Blutgefäße, im Chorionallantoismembran-Assay dosisabhängig hemmt [LIM et al., 2007]. Da die Angiogenese eine wesentliche Bedeutung in der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen hat, könnte somit diese Wirkung von 4-HBA zukünftig therapeutisch eingesetzt werden.

3.2. Entstehung von Blutgefäßen

Das Blutgefäßsystem des Körpers ist hoch organisiert und für den Transport von Sauerstoff, Nährstoffen sowie verschiedener Zelltypen verantwortlich. Blutgefäße sind aus einer das Lumen auskleidenden Endothelzellschicht, verschiedenen wandstabilisierenden Zellen wie Fibroblasten, Muskelzellen und Perizyten sowie einer extrazellulären Matrix aufgebaut. Sie verzweigen sich in einer hierarchischen Weise und sind entscheidend für die Entwicklung und Funktion von Geweben [JAIN, 2003]. Es sind drei verschiedene Mechanismen der Entstehung von Blutgefäßen bekannt: Vaskulogenese, Arteriogenese und Angiogenese [CARMELIET, 2000].

Als Vaskulogenese bezeichnet man die *de novo*-Entwicklung von Blutgefäßen aus dem Mesoderm während der Embryogenese. In der frühen Embryonalentwicklung findet zunächst eine Differenzierung der Zellen des Mesoderms zu Hämangioblasten statt, welche die Vorläuferzellen der hämatopoetischen Stammzellen und der endothelialen Vorläuferzellen (Angioblasten) sind. In der weiteren Entwicklung sammeln sich Angioblasten zu Konglomeraten (Blutinseln), durch deren Fusion ein primäres, unreifes Gefäßnetzwerk aus feinen Kapillaren entsteht [KARAMYSHEVA, 2008]. Neuere Studien zeigen, dass auch im adulten Organismus die Vaskulogenese von großer Bedeutung ist. Durch Gewebeischämie und Zytokine stimuliert, werden endotheliale Progenitorzellen aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf mobilisiert. Diese werden mit dem Blutstrom zum Ort der Gefäßneubildung transportiert und dort in das Gefäßendothel eingebaut, wo die eigentliche Differenzierung zu Endothelzellen erfolgt [LASCHKE et al., 2011].

Die Arteriogenese beschreibt die Umbauvorgänge und das Wachstum von bereits bestehenden kleinen Arteriolen und ihren Kollateralgefäßen zu einer großen, versorgenden Arterie. Dieser Prozess findet zum Beispiel nach dem Verschluss großer arterieller Gefäße statt [SCHAPER und SCHOLZ, 2003].

Als Angiogenese bezeichnet man die Aussprossung von Mikrogefäßen aus bereits bestehenden Gefäßen. Außer in der Embryonalentwicklung findet Angiogenese zum Beispiel auch bei der Wundheilung [KARAMYSHEVA, 2008], im weiblichen Reproduktionszyklus und in der Plazenta statt [CARMELIET, 2005]. Die Angiogenese ist ein komplexer Vorgang, der einer genauen Regulation bedarf. Unter physiologischen Bedingungen herrscht im Gewebe ein Äquilibrium zwischen dem Nährstoffbedarf von Zellen und der Ausbildung neuer Gefäße. Die Angiogenese ist also genau auf die Anforderungen vor Ort abgestimmt [JAIN, 2003] und unterliegt der Balance zahlreicher endogener pro- und anti-angiogener Faktoren (Tab. 1).

Pro-angiogene Faktoren	Anti-angiogene Faktoren
Angiogenin	Angiostatin
Angiopoetin-1, -2 (Ang-1, -2)	Antithrombin III
Acid Fibroblast Growth Factor (aFGF)	Arrestin
Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)	Canstatin
Cyclooxygenase-2 (COX-2)	Endostatin
Interleukin-3 (IL-3)	Endorepellin
Interleukin-8 (IL-8)	Fibulin
Hepatocyte Growth Factor (HGF)	Interferon- β (IFN- β)
Matrix Metalloproteinase (MMP)	Leukemia Inhibitory Factor (LIF)
Nitric Oxide (NO)	Platelet Factor 4 (PF-4)
Placental Growth factor (PLGF)	Prolactin Fragment
Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)	Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF)
Prostaglandin E ₂ (PGE ₂)	Thrombospondin-1, -2
Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)	Tissue Inhibitors of MMP (TIMP)
Transforming Growth Factor- α (TGF- α)	2-Methoxyestradiol (2-ME)
Transforming Growth Factor- β (TGF- β)	Troponin I
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	Vasostatin

Tabelle 1: Übersicht wichtiger endogener pro- und anti-angiogener Faktoren.

Ein wichtiger Stimulus der Angiogenese ist Hypoxie, welche zu einer Hochregulation des *Hypoxia-Inducible-Factors- α* (HIF- α) führt [PUGH und RATCLIFFE, 2003; FONG, 2009]. Dieser induziert eine vermehrte Expression pro-angiogener Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel VEGF und Ang-2, sowie der NO-Synthase. Die NO-Synthase produziert wiederum NO, welches eine Dilatation der Gefäße bewirkt. Das vermehrt gebildete VEGF führt zu einem Gefäßleck, durch welches Plasmaproteine aus dem Gefäß austreten und ein Gerüst für die später auswandernden Endothelzellen bilden. Pro-angiogene Zytokine aktivieren die Endothelzellen, welche proliferieren und MMPs produzieren. Diese führen zunächst zu einer Destabilisierung des Blutgefäßes und seiner Wandschichten, gefolgt von einer Degradation der Basalmembran und der extrazellulären Matrix mit einer weiteren Freisetzung von Angiogenese-fördernden Faktoren.

Die Endothelzellen migrieren nun aus dem Gefäß und bilden Gefäßsprossen aus. Diese sind bereits hoch organisiert und aus spezialisierten Endothelzellen an der Spitze der Sprossen (*Tip cells*) und den ihnen nachfolgenden Zellen (*Stalk cells*) aufgebaut [GERHARDT et al., 2003; HELLSTRÖM et al., 2007]. Die Wachstumsrichtung des Gefäßsprosses wird durch die „*Tip cells*“ entlang eines VEGF-Gradienten bestimmt [GERHARDT et al., 2003; KARAMYSHEVA, 2008]. Die Proliferationsaktivität der „*Stalk cells*“, welche durch VEGF

gefördert wird, führt zu einer Verlängerung des Gefäßsprosses und schließlich zur Aussiedlung eines Gefäßlumens [GERHARDT et al., 2003].

Schließlich finden Fusionen mit bereits existierenden Gefäßen statt. Die Anlagerung von Zellen, wie Perizyten und Fibroblasten, und die Produktion von extrazellulären Matrixkomponenten führen letztendlich zur Stabilisierung des neu gebildeten Gefäßes (Abb. 2).

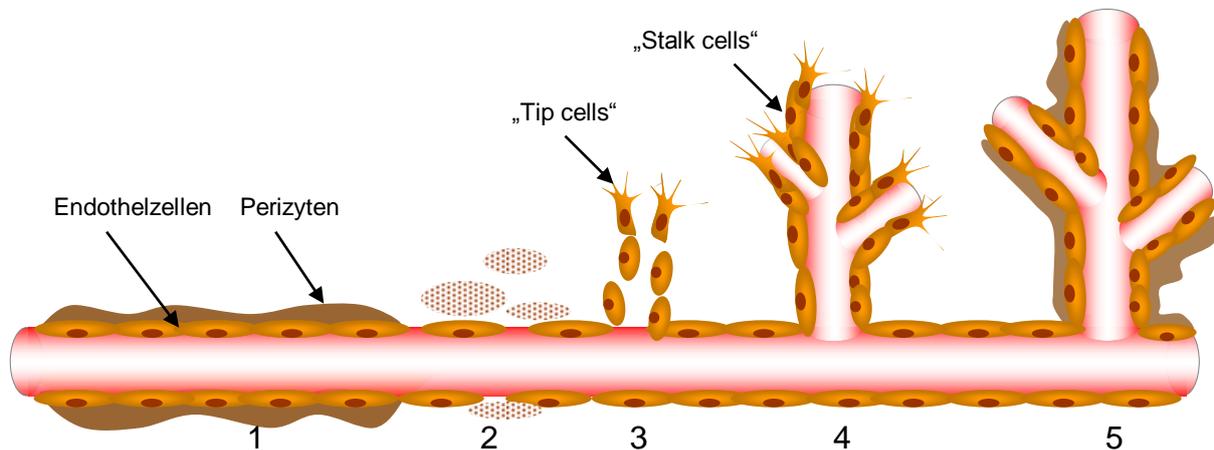


Abbildung 2: Ruhende Gefäße sind mit Wand-stabilisierenden Zellen (Perizyten) ummantelt (1). Beginn der Angiogenese mit Degradation der Wandschichten und der extrazellulären Matrix (2). „Tip cells“ an der Spitze des Gefäßsprosses geben die Wachstumsrichtung des Gefäßes vor (3). Durch die Proliferation von „Stalk cells“ wird das Gefäß verlängert und es bilden sich Gefäßlumen und Verzweigungen aus (4). Eine Anlagerung von Perizyten führt zur Stabilisierung des neu gebildeten Gefäßes (5).

Die Angiogenese ist ein komplexer Prozess, der einer genauen Regulation unterliegt. Die Auswirkungen, die eine Fehlsteuerung dieses Vorgangs auf den Organismus haben, zeigen sich bei zahlreichen Erkrankungen, die mit pathologischer Angiogenese einhergehen.

In arteriosklerotischen Gefäßen, die zu Erkrankungen wie der koronaren Herzkrankheit führen, zeigt sich eine Neovaskularisierung der Gefäßintima [DOYLE und CAPLICE, 2007]. Besonders in sogenannten vulnerablen Plaques, die mit einem hohen Rupturrisiko einhergehen, findet man vermehrt Angiogenese [VIRMANI et al., 2005; MICHEL et al., 2011]. Weitere Erkrankungen, bei denen die Angiogenese von Bedeutung ist, sind Krebs [FOLKMAN, 2002], Psoriasis [HEIDENREICH et al., 2009], diabetische Retinopathie [CRAWFORD et al., 2009] und Endometriose [LASCHKE und MENGER, 2007].

3.3. Endometriose

Die Endometriose ist eine der häufigsten gutartigen, gynäkologischen Erkrankungen der geschlechtsreifen Frau. Studien berichten eine Prävalenz von bis zu 10% in der weiblichen reproduktionsfähigen Bevölkerung [ESKENAZI und WARNER, 1997]. Bei infertilen Frauen findet sich diese Erkrankung sogar in 25-40% [OZKAN et al., 2008].

Die betroffenen Frauen leiden häufig unter Dysmenorrhoe, Dyspareunie, Dysurie, chronischen Unterbauchschmerzen sowie Infertilität. Eine Diagnosestellung findet jedoch oft erst mehrere Jahre nach Auftreten der ersten Symptome statt [HUSBY et al., 2003]. Dies führt zu einer körperlichen und psychischen Belastung und damit zu einer erheblichen Einschränkung der Lebensqualität der Frauen. Weiterhin verursachen häufige Krankenhausaufenthalte, Operationen und teure medikamentöse Therapien hohe Kosten [SIMOENS et al., 2007].

Die Endometriose ist durch das ektope Auftreten und Wachsen von Herden endometrialer Drüsen- und Stromazellen gekennzeichnet. Man unterscheidet je nach Lokalisation drei verschiedene Formen. Bei der *Endometriosis genitalis interna* befinden sich die Herde im Myometrium des Uterus. Die *Endometriosis genitalis externa*, die häufigste Form der Endometriose, ist charakterisiert durch das Auftreten von Herden im kleinen Becken, zum Beispiel am Ovar, an der Blase oder am Peritoneum. Eine weitere Form ist die *Endometriosis extragenitalis*, bei der hauptsächlich der Darm betroffen ist [LEWIS und NEZHAT, 2007]. Weitere, jedoch sehr seltene Manifestationsorte, sind zum Beispiel die Lunge [JELIHOVSKY und GRANT, 1968], das Herz [FELSON et al., 1960] oder das Gehirn [THIBODEAU et al., 1987].

Die Erkrankung wurde erstmals 1886 von Thomas Cullen beschrieben. Er konnte die typischen Symptome identifizieren und der Endometriose zuordnen [MAXWELL, 1931; BENAGIANO und BROSENS, 2011]. Zur Entstehung der Erkrankung wurden zu Beginn des letzten Jahrhunderts vier Theorien diskutiert. VON RECKLINGHAUSEN [1896] postulierte, dass die endometrialen Läsionen von embryonalen Zellresten abstammen, die sich zu Endometrium differenzieren. Die Zölon-Metaplasie-Theorie von MEYER [1919] besagt, dass die Endometriose durch eine Metaplasie des embryonalen Zölon-Epithels, aus welchem sich das Peritoneum entwickelt, entsteht. Beide Theorien, die den Ursprung der Erkrankung in der Embryonalentwicklung sehen, werden dadurch gestützt, dass Endometriose in seltenen Fällen auch bei Männern auftreten kann [MARTIN und HAUCK, 1985; GIANNARINI et al., 2006]. HALBAN [1924] nahm an, dass sich Endometriumzellen mit dem Blut- und Lymphgefäßsystem im Körper verbreiten können. Dies könnte erklären, dass Endometrioseherde beispielsweise in Lunge oder Gehirn gefunden wurden. Auch SAMPSON [1927b] unterstützte diese Theorie. Er beschrieb, dass durch das Einreißen von Kapillaren

während der Menstruationsblutung kleine Endometriumfragmente in das venöse Blutgefäßsystem gelangen und so im Körper disseminieren können. Zudem nahm er in seiner Implantationstheorie an, dass endometriale Zellen während der Menstruation retrograd durch die Tuben in die freie Bauchhöhle gelangen (Abb. 3A) und dort anwachsen können [SAMPSON, 1927a]. Die Implantationstheorie stellt die heute am meisten akzeptierte Theorie zur Entstehung der Endometriose dar. Gestützt wird sie durch Untersuchungen, die zeigen, dass retrograde Menstruation häufiger bei Endometriose-Patientinnen auftritt als bei gesunden Frauen [LIU und HITCHCOCK, 1986]. Allerdings ist noch völlig unklar, warum nicht alle Frauen mit retrograder Menstruation eine Endometriose entwickeln. In diesem Zusammenhang werden weitere genetische, immunologische und Umweltfaktoren diskutiert, die das Anwachsen der Herde begünstigen sollen [ZONDERVAN et al., 2001; KYAMA et al., 2003].

Damit die Endometriumfragmente dauerhaft in der Bauchhöhle überleben und wachsen können, benötigen sie eine adäquate Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen. Daher müssen sie nach der Adhäsion und Implantation am Peritoneum Anschluss an bestehende Blutgefäße finden (Abb. 3B). Die Angiogenese ist somit ein sehr bedeutender Schritt in der Manifestation einer Endometriose [GROOTHUIS et al., 2005; LASCHKE und MENGER, 2007].

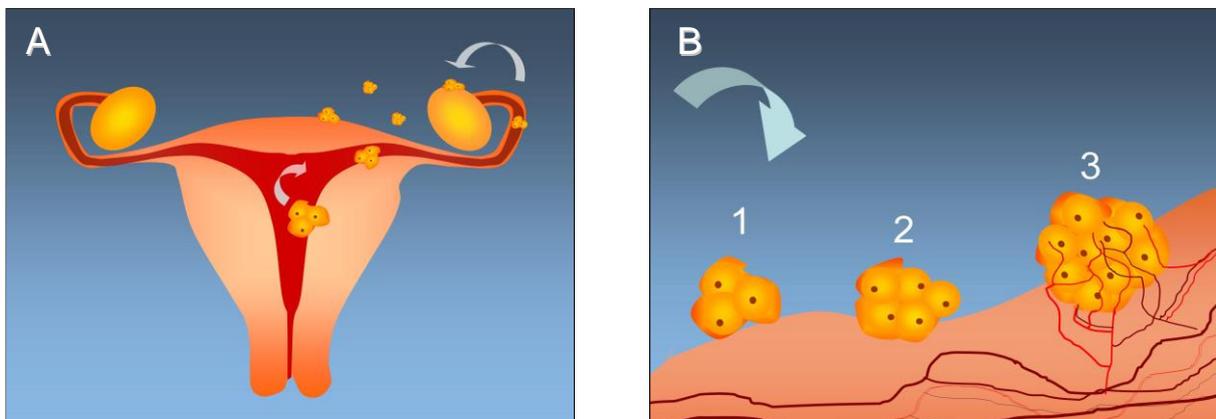


Abbildung 3: Implantationstheorie zur Entstehung einer Endometriose. Durch retrograde Menstruation gelangen Endometriumfragmente in die Tuben und von dort in die freie Bauchhöhle (A). Die Fragmente adhäreren am Peritoneum (B1), wachsen invasiv und destruierend in das Gewebe (B2) und finden Anschluss an das dort vorhandene Blutgefäßsystem (B3).

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass im Bauchraum von Patientinnen mit Endometriose ein Angiogenese-förderndes Milieu herrscht. So findet man in der Peritonealflüssigkeit dieser Frauen erhöhte Konzentrationen pro-angiogener Faktoren [OOSTERLYNCK et al., 1993] sowie aktivierter Makrophagen und deren Sekretionsprodukte [KONINCKX et al., 1998]. Die Makrophagen sezernieren unter anderem vermehrt VEGF [MCLAREN et al., 1996]. Dabei korreliert die Höhe der VEGF-Konzentration mit dem Schweregrad der Erkrankung. So weisen Frauen mit mittleren bis schweren Verlaufsformen

höhere VEGF-Konzentrationen auf als Frauen mit milderer Verläufen [SHIFREN et al., 1996; MAHNKE et al. 2000]. Des Weiteren findet man eine Erhöhung pro-angiogener und pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 [HO et al., 1997b], IL-6 [MAHNKE et al., 2000], IL-10 [HO et al., 1997a], TNF- α [RICHTER et al., 2005] sowie von Prostaglandinen [GAZVANI und TEMPLETON, 2002]. Die Endometriose ist also auch eine Erkrankung, bei der entzündliche Prozesse von wesentlicher Bedeutung sind. Es ist jedoch nicht gesichert, ob eine Entzündung die Ursache oder die Folge der Erkrankung ist.

Weiterhin ist die Endometriose eine östrogenabhängige Erkrankung. Endometrioseherde enthalten Östrogen- und Progesteronrezeptoren [BERGQVIST et al., 1993], die essentiell für das Überleben der Herde sind [DIZEREGA et al., 1980]. Im Gegensatz zum eutopen Endometrium wird in den Endometrioseherden das Enzym Aromatase exprimiert. Dieses wird durch Prostaglandin E₂ (PGE₂) stimuliert und führt zu einer lokalen Östrogenproduktion, welche unabhängig von der ovariellen Hormonsynthese ist. Eutopes Endometrium weist dagegen keine Aromataseaktivität und somit keine intrinsische Östrogenproduktion auf [BULUN et al., 1993]. Die lokal gebildeten Östrogene stimulieren wiederum die COX-2, welche durch die Produktion von weiteren Prostaglandinen die Entzündung unterhält [BULUN et al., 2002].

Zur Behandlung der Endometriose stellt derzeit die hormonelle Therapie, neben der chirurgischen Entfernung von Endometrioseherden, die Therapie der Wahl dar. Dafür werden Medikamente eingesetzt, welche die endogene Östrogenproduktion verringern. Hierzu zählen orale Kontrazeptiva, *Gonadotropin-releasing-Hormon-* (GnRH) Agonisten, Gestagene und Androgene [RICE, 2002]. Diese führen zu einer Verringerung der Herdgröße und auch zur Schmerzreduktion [TELIMAA et al., 1987; BERGQVIST et al., 1998]. Eine solche Behandlung kann jedoch die Fertilität der Frauen nicht verbessern. Ein weiteres Problem der bisher eingesetzten Medikamente sind die zum Teil sehr belastenden Nebenwirkungen wie Akne, Gewichtszunahme, Schweißausbrüche, Ödemneigung oder Osteoporose. Diese führen nicht nur zu einer reduzierten Compliance der Patientinnen, sondern limitieren auch die Langzeitanwendung der Medikamente [FERRERO et al., 2006]. Daneben ist sowohl die chirurgische als auch die medikamentöse Behandlung mit einer sehr hohen Rezidivrate von ca. 45% in den ersten 5 Jahren verbunden und führt somit nicht zur dauerhaften Heilung der Erkrankung [HAYASAKA et al., 2011].

Es besteht daher ein dringender Bedarf, neue, gut verträgliche Therapien zur Behandlung der Endometriose zu entwickeln. In diesem Zusammenhang sind in den letzten Jahren verschiedene anti-angiogene Wirkstoffe in den Fokus gerückt. Diese zeigten bereits in verschiedenen Endometriosemodellen vielversprechende Ergebnisse [FERRERO et al., 2006].

Obwohl die Endometriose eine gutartige Erkrankung ist, weist sie einige Gemeinsamkeiten mit malignen Neoplasien auf. Endometrioseherde können lokal ebenso wie mit multifokalen Absiedelungen auftreten [UEKI, 1991; VERCELLINI et al., 1993; THOMAS und CAMPBELL, 2000]. Die Endometriumzellen adhären am Peritoneum und wachsen invasiv und destruierend in das umliegende Gewebe ein. Dies geschieht durch Zelladhäsionsmoleküle und Enzyme, die im ektopen gegenüber eutopen Endometrium von Endometriose-Patientinnen um ein Vielfaches erhöht sind [KOBAYASHI, 2000]. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Endometrioseherde eine erhöhte Konzentration von MMPs aufweisen, welche durch die Degradation der Basalmembran und der extrazellulären Matrix das Einwachsen in das umliegende Gewebe ermöglichen [WENZL und HEINZL, 1998; COLLETTE et al., 2006; PITSOS und KANAKAS, 2009]. Eine weitere Gemeinsamkeit mit Tumoren ist die Fähigkeit der Endometrioseherde, die Entwicklung neuer Blutgefäße zu initiieren.

Trotz dieser Merkmale grenzt sich die Endometriose deutlich von malignen Erkrankungen ab. So ist sie eine häufige Erkrankung, die oft wenig Beschwerden verursacht und die keinen tödlichen Verlauf hat. Außerdem führt sie, im Gegensatz zu bösartigen Erkrankungen, nicht zu einem katabolen und schließlich terminalen Zustand der Patientinnen [THOMAS und CAMPBELL, 2000]. Trotzdem scheint eine gewisse Assoziation mit malignen Erkrankungen wie dem Ovarialkarzinom zu bestehen, wobei bisher nicht gesichert ist, ob die Endometriose tatsächlich als direkter Vorläufer zu sehen ist [MUNKSGAARD und BLAAKAER, 2012].

3.4. Kolorektales Karzinom

Das kolorektale Karzinom ist eine der häufigsten bösartigen Erkrankungen weltweit. Im Jahr 2008 waren in Europa mehr als 430.000 Menschen am kolorektalen Karzinom erkrankt und über 210.000 Todesfälle waren allein auf diese Erkrankung zurückzuführen [FERLAY et al., 2010]. In Deutschland stehen Krebserkrankungen, nach Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems, an zweiter Stelle der Todesursachen. Dabei stellt Darmkrebs bei beiden Geschlechtern die zweithäufigste maligne Erkrankung dar. Im Jahr 2010 erkrankten in Deutschland 33.800 Männer und 28.600 Frauen neu an Darmkrebs und ca. 26.000 Menschen verstarben daran [ZENTRUM FÜR KREBSREGISTERDATEN DES ROBERT-KOCH-INSTITUTS, 2014].

Die Risikofaktoren für die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms sind zum Teil stark vom Lebensstil abhängig und umfassen Nikotin- und Alkoholkonsum, fett- und fleischhaltige Ernährung sowie Übergewicht und körperliche Inaktivität. Diese Faktoren finden sich vor allem in westlich geprägten Ländern und erklären das dort gehäufte Auftreten des

kolorektalen Karzinoms [HAGGAR und BOUSHEY, 2009]. Studien an Immigranten, die von einem Land mit niedriger in ein Land mit höherer Prävalenz zogen, zeigten, dass ihr Erkrankungsrisiko anstieg und sich dem des Gastlandes anpasste [BOYLE und LANGMAN, 2000]. Weitere Risikofaktoren sind Lebensalter, Adenome im Intestinaltrakt, chronisch entzündliche Darmerkrankungen sowie eine familiäre Belastung.

Karzinome entstehen durch eine Akkumulation verschiedener Mutationen im Erbgut der Zellen. Bislang sind mehr als 6000 Gene bekannt, die für Mutationsanalysen bei humanen Karzinomen in Betracht kommen [ABDOLLAHI und FOLKMAN, 2010]. Obwohl die meisten kolorektalen Karzinome sporadisch auftreten, ist in ca. 5% der Fälle eine Keimbahnmutation ursächlich [KWAK und CHUNG, 2007]. Am häufigsten ist das hereditäre non-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC), welches auf der Inaktivierung von DNA-Reparaturgenen beruht, gefolgt von der familiären adenomatösen Polyposis (FAP). Bei der FAP führt ein Verlust des APC-Gens auf Chromosom 5q21 zu einer Dysregulation des Zellwachstums und somit zu einer malignen Transformation des Gewebes [KWAK und CHUNG, 2007].

Zuverlässige Symptome, mit Hilfe derer das kolorektale Karzinom in einem frühen Stadium diagnostiziert werden könnte, existieren leider nicht. Hinweisend auf die Erkrankung sind zum Beispiel Blutbeimengungen im Stuhl, eine Leistungsminderung oder Gewichtsverlust. Ileuserscheinungen, Stenosierungen und Infiltrationen in Nachbarorgane sind Spätsymptome, die mit einer schlechten Prognose für die Patienten verbunden sind. BURKE [1911] stellte schon vor über hundert Jahren fest, dass die frühzeitige Diagnose des Karzinoms lebensrettend für die Patienten ist, jedoch auf Grund der uncharakteristischen Frühsymptome selten gestellt werden kann. So beträgt die 5-Jahresüberlebensrate 90%, wenn das Karzinom in einem lokalisierten Stadium gefunden wird. Sind bereits Fernmetastasen vorhanden, reduziert sich diese Quote auf lediglich 10% [EDWARDS et al., 2010]. Dabei ist ein Hauptproblem das Auftreten von Rezidiven nach ursprünglich erfolgreicher Therapie, welche häufig zum Tode des Patienten führen. Für das rezidivfreie Überleben und die Prognose des Patienten sind vor allem die Infiltrationstiefe des Karzinoms in die Darmwand sowie das Ausmaß des Lymphknotenbefalls entscheidend [LABIANCA und MERELLI, 2010; MANILICH et al., 2011].

Das kolorektale Karzinom ist bezüglich seiner Entstehung sehr gut untersucht. So wird angenommen, dass es immer aus Präkanzerosen, d.h. aus Adenomen entsteht [MUTO et al., 1975]. Das Tumorprogressionsmodell nach FEARON und VOGELSTEIN [1990] beschreibt diesen dynamischen Prozess, der durch eine Akkumulation genetischer Veränderungen eine Umwandlung des Normalgewebes zum Adenom und schließlich zum Karzinom bewirkt. Hierbei sind verschiedene Mutationen bedeutend. Diese umfassen sowohl eine Aktivierung von Onkogenen als auch Inaktivierungen von Tumorsuppressorgenen. Dabei ist nicht die

Reihenfolge, sondern die Akkumulation der einzelnen Mutationen entscheidend, die schließlich zu einem unkontrollierten malignen Wachstum führt.

In den letzten Jahrzehnten ist durch zahlreiche Untersuchungen belegt worden, dass die Angiogenese für die Entwicklung und Metastasierung maligner Tumore essentiell ist. Unterbindet man die Vaskularisierung eines Tumors, stagniert sein Wachstum und er wird nekrotisch [GIMBRONE et al., 1972]. In der Initialphase der Tumorentwicklung ist dieser gewöhnlich noch nicht vaskularisiert. Der Tumor kann in dieser prävasculären Phase längere Zeit existieren. Dabei wird er jedoch selten größer als wenige Kubikmillimeter [FOLKMAN, 1975]. Die Versorgung der Tumorzellen erfolgt zunächst noch durch die Diffusion der Nährstoffe. Ab einer gewissen Größe und damit verlängerten Diffusionsstrecke ist dies jedoch nicht mehr ausreichend, um den Nährstoff- und Sauerstoffbedarf der Tumorzellen zu decken. Der Tumor ist auf die Entstehung neuer Blutgefäße angewiesen, weshalb es zur Ausprägung eines angiogenen Phänotyps einiger Tumorzellen kommt. Diese exprimieren eine Vielzahl von Stimulatoren der Angiogenese, wie zum Beispiel VEGF, FGF, Ang, IL-8 und MMPs [GUPTA und QIN, 2003]. VEGF wird in den meisten Tumoren, einschließlich des kolorektalen Karzinoms, überexprimiert und korreliert mit der Tumorgöße und der Prognose der Patienten [DVORAK, 2002]. Ist der Tumor erst von Kapillaren durchzogen, folgt meist innerhalb kürzester Zeit ein rapides Größenwachstum. Dieses ist nicht nur auf die verbesserte Perfusion des Tumors sondern auch auf die parakrine Stimulation der Tumorzellen durch die neugebildeten Endothelzellen zurückzuführen. Diese sezernieren Wachstumsfaktoren und fördern somit das Größenwachstum des Tumors [FOLKMAN, 1995]. Die Angiogenese stellt somit einen bedeutenden Schritt in der Tumorentwicklung dar [HANAHAH und WEINBERG, 2000].

Durch die Vaskularisierung des Tumors sind auch die strukturellen Voraussetzungen für die Metastasierung der Tumorzellen mit dem Blutstrom gegeben. Die neu gebildeten Kapillaren des Tumors sind desorganisiert, sehr heterogen und haben einen instabilen Wandaufbau mit einem chaotischen Blutfluss. Gefäßlecks mit erhöhter Permeabilität begünstigen wiederum das weitere Auswachsen von Gefäßen [MCDONALD und BALUK, 2002]. Teilweise sind auch Tumorzellen in die Gefäßwand integriert oder kleiden sogar ganze Gefäße aus (*vascular mimicry*) [FOLBERG und MANIOTIS, 2004].

Für die Entwicklung von Tumoren sind auch entzündliche Prozesse von Bedeutung. Die im Tumor vermehrt vorhandenen Entzündungszellen produzieren Zytokine, welche das Tumorstadium und die Angiogenese fördern. Weiterhin führen sie zu einer gesteigerten Produktion von Proteasen, welche eine Degradation der umliegenden Matrix verursachen und die Invasivität des Tumors erhöhen. Die pro-inflammatorische COX-2 wird ebenfalls durch diese Zytokine aktiviert. So konnte bereits in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass eine Hemmung der COX-2 durch nichtsteroidale Antiphlogistika zu einer verringerten

Inzidenz des kolorektalen Karzinoms führt. Dies unterstreicht die Bedeutung des inflammatorischen Milieus im Tumor [BALKWILL und MANTOVANI, 2001].

Die derzeitige Therapie des Kolonkarzinoms beinhaltet die chirurgische Entfernung des tumortragenden Darmabschnittes. In fortgeschritteneren Stadien mit Lymphknotenmetastasen wird zusätzlich eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt. Dabei haben sich in den letzten Jahren Therapien mit 5-Fluorouracil, Irinotecan und Oxaliplatin bewährt, die das progressionsfreie Überleben verlängern können [O'CONNELL et al., 1997].

Problematisch in der medikamentösen Tumorthherapie ist die genetische Instabilität der Tumorzellen, die oft durch eine einzige Mutation eine Resistenz gegenüber einem Chemotherapeutikum erlangen können. Bereits im Jahr 1972 postulierte FOLKMAN, dass anti-angiogene Wirkstoffe in der Tumorthherapie eingesetzt werden sollten. Heute werden in der Therapie des kolorektalen Karzinoms bereits anti-angiogene monoklonale, rekombinante Antikörper eingesetzt. Ein solcher Antikörper ist zum Beispiel Bevacizumab. Dieser bindet an VEGF und verhindert die Interaktion mit dem VEGF-Rezeptor. In klinischen Studien konnte bislang jedoch nur ein geringer Überlebensvorteil von wenigen Monaten für Patienten gezeigt werden, die eine Kombination von Bevacizumab mit einem konventionellen Chemotherapeutikum erhielten [TAPPENDEN et al., 2007; CHIBAUDEL et al., 2012]. Die immer noch hohen Rezidivraten und die damit verbundene Mortalität erfordern daher die Entwicklung neuer, effektiver Therapiestrategien zur Behandlung des kolorektalen Karzinoms.

4. ZIEL DER STUDIE

Das Ziel der vorliegenden experimentellen Arbeit war, die anti-angiogene Wirkung von 4-HBA in benignem und malignem Gewebe zu untersuchen. Hierfür wurde die Arbeit in zwei Studienabschnitte gegliedert:

Im ersten Abschnitt wurde die Wirkung von 4-HBA auf das Wachstum und die Angiogenese von benignem Gewebe untersucht. Dazu wurde zunächst *in vitro* die Wirkung von 4-HBA auf die Viabilität, das Zytoskelett, die Migration und die Proteinexpression von Endothelzellen analysiert. Weiterhin wurden die Effekte von 4-HBA auf die Vaskularisierung und das Wachstum von Endometrioseherden *in vivo* im Modell der Rückenhautkammer untersucht.

Das Ziel des zweiten Studienabschnitts war, die Wirkung von 4-HBA auf malignes Gewebe zu untersuchen. Dazu wurden zunächst Tumorzellen *in vitro* mit 4-HBA behandelt und die Auswirkungen auf deren Zytoskelett, Migrationsfähigkeit, Invasivität sowie Proteinexpression analysiert. In Hinblick auf einen zukünftigen Einsatz von 4-HBA in der Tumorthherapie wurde die Wirkung von 4-HBA auf das Wachstum und die Vaskularisierung von kolorektalen Tumorzellsphäroiden in der Rückenhautkammer untersucht.

Folgende Fragestellungen wurden in der nachfolgenden Arbeit näher analysiert:

1. Wie wirkt 4-HBA *in vitro* auf die Vitalität, Migrationsfähigkeit und Proteinexpression von Endothelzellen?
2. Hemmt 4-HBA das Wachstum und die Vaskularisierung von Endometrioseherden in der Rückenhautkammer?
3. Wirkt 4-HBA toxisch auf bereits bestehende Gefäße in der Rückenhautkammer?
4. Wie wirkt 4-HBA *in vitro* auf die Vitalität, Migrationsfähigkeit, Invasivität und Proteinexpression von Tumorzellen?
5. Hemmt 4-HBA das Wachstum und die Vaskularisierung kolorektaler Tumorzellsphäroide in der Rückenhautkammer?

5. MATERIAL UND METHODIK

5.1. *In vitro* Experimente

5.1.1. Zelllinien

Für die *in vitro* Experimente der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Zelllinien verwendet. Zum einen handelte es sich hierbei um endotheliale eEND2-Zellen, die ursprünglich aus einem Hämangiom der Maus stammen (freundliche Gabe der Abteilung für Chirurgie des Universitätsklinikums Malmö, Malmö, Schweden). Weiterhin wurde die immortalisierte Tumorzelllinie CT26 (ATCC CRL-2638; LGC Promochem GmbH, Wesel, Deutschland) eingesetzt. Diese stammt aus einem undifferenzierten Adenokarzinom des Kolons, welches experimentell durch die Gabe des Karzinogens N-Nitroso-N-Methylurethan in BALB/c-Mäusen induziert wurde [GRISWOLD und CORBETT, 1975].

5.1.2. Zellkultur

Die Kultivierung der eEND2-Zellen erfolgte in *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM; PAA, Cölbe, Deutschland). Die CT26-Tumorzellen wurden in RPMI-1640 Medium (PAA) kultiviert. Beide Nährmedien wurden jeweils mit 10% fetalem Kälberserum (FCS; PAA) angereichert, welches eine Vielzahl von Proteinen und Wachstumsfaktoren enthält und für das optimale Wachstum der Zellen erforderlich ist. Weiterhin wurden 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin (PAA) hinzugefügt. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37° C und 5% CO₂ kultiviert. Ein Wechsel des Nährmediums erfolgte an jedem zweiten Tag.

Bei einer Konfluenz von 80-90% wurden die Zellen passagiert. Dazu erfolgte nach einer Spülung der Zellen mit steriler, Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS; PAA) eine enzymatische Ablösung mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (Virolex; 0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA; PAA) vom Boden der Kulturschale. Anschließend wurden die Zellen in Subpopulationen aufgeteilt und nach erneuter Zugabe von frischem Nährmedium kultiviert. Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank (Mikroflow Biological Safety Cabinet; Nunc Intermed, Wiesbaden, Deutschland) durchgeführt.

5.1.3. Water-soluble tetrazolium (WST)-1-Assay

Um die Wirkung von 4-HBA auf die Vitalität der kultivierten Zellen zu untersuchen, wurde ein WST-1-Assay (Roche, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Dieser Test beruht auf dem Prinzip, dass mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen ein zugeführtes Tetrazoliumsalz zu Formazan umsetzen [HAMASAKI et al., 1996; ISHIYAMA et al., 1996]. Das in das Nährmedium abgesonderte Formazan führt zu einem Farbumschlag von Hellrot zu Dunkelrot. Durch die Bestimmung der Absorption bei 450 nm lässt sich somit die Menge der lebenden, stoffwechselaktiven Zellen quantifizieren. Dabei ist die gemessene Absorption proportional zu der Anzahl der metabolisch aktiven Zellen und ein indirektes Maß für ihre Proliferationsaktivität. Der WST-1-Assay wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Zunächst wurden die eEND2- und CT26-Zellen mit jeweils 1 mM, 5 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM und 100 mM 4-HBA (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) kultiviert. Als Positivkontrolle dienten eEND2-Zellen, die mit dem anti-angiogenen Wirkstoff TNP-470 (Sigma-Aldrich) in Konzentrationen von 1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM und 100 µM behandelt wurden [KRUGER und FIGG, 2000]. eEND2- und CT26-Zellen, die mit dem Vehikel Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma-Aldrich) kultiviert wurden, dienten als Negativkontrolle. Alle Versuche wurden in vierfacher Ausfertigung durchgeführt.

Nach 24-stündiger Inkubation mit den genannten Substanzen wurden 10 µl des WST-1-Reagenz pro 100 µl Medium in jedes Well gegeben. Nach weiteren 30 min bei 37° C wurde die Absorption bei 450 nm gemessen. Eine Referenzmessung erfolgte bei einer Wellenlänge von 620 nm.

Um die Reversibilität der Effekte von 4-HBA auf die Zellen zu untersuchen, wurden die eEND2-Zellen im Anschluss an den Versuch für weitere 7 Tage in 4-HBA-freiem DMEM kultiviert und der WST-1-Assay danach erneut durchgeführt.

5.1.4. Laktatdehydrogenase (LDH)-Release-Assay

Nährstoff- und Sauerstoffmangel sowie verschiedene toxische Substanzen können zu einer Schädigung von Zellen und schließlich zu deren Tod führen. Dies geht mit einer Zerstörung der Zellmembran und einer Freisetzung von zytoplasmatischen Bestandteilen, wie z. B. verschiedenen Enzymen, einher. Ein solches Enzym, das bei einem Verlust der Zellintegrität im Nährmedium nachgewiesen werden kann, ist die LDH.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Freisetzung der LDH mit Hilfe des LDH-Release-Assays (Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS}; Roche) nach einer Inkubation der Zellen mit 4-HBA gemessen. Der LDH-Release-Assay basiert auf der Umsetzung eines Formazansalzes durch die LDH, welches zu einer Rotfärbung des Mediums führt und photometrisch bestimmt

werden kann. Dabei ist die Intensität der Rotfärbung proportional zu der Zahl der beschädigten Zellen.

Vor dem Test wurden die eEND2- bzw. CT26-Zellen mit 1 mM, 5 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM und 100 mM 4-HBA oder dem Vehikel DMSO kultiviert. Als Positivkontrolle dienten eEND2-Zellen, die mit 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M und 100 μ M TNP-470 behandelt wurden. Die Experimente wurden in vierfacher Ausführung durchgeführt.

Nach 24-stündiger Inkubation wurden 100 μ l des Reagenz pro 100 μ l Medium in jedes Well gegeben. Nach 10 min bei Zimmertemperatur im Dunkeln erfolgte nach Zugabe von 50 μ l Stopplösung die Messung der Absorption bei 492 nm mit 620 nm als Referenzwert. Die Werte wurden als LDH-Freisetzung in Prozent der Kontrolle – 100 angegeben.

5.1.5. Migrationsassay

Die Migration von Zellen ist ein essentieller Vorgang in der Embryonalentwicklung und Voraussetzung für die Entstehung von neuen Blutgefäßen sowie für die Metastasierung von Tumorzellen [AUSPRUNK und FOLKMAN, 1977; LAUFFENBURGER und HORWITZ, 1996].

Um den Einfluss von 4-HBA auf die Migrationsfähigkeit der Endothel- bzw. Tumorzellen zu untersuchen, wurde ein Migrationsassay durchgeführt. Dieser besteht aus zwei Kammern, welche durch eine Filtermembran voneinander getrennt sind. Die zu untersuchenden Zellen werden in die obere Kammer des Versuchsaufbaus gegeben und wandern anschließend durch chemotaktische Stimulation durch die Poren der Filtermembran in die untere Kammer (Abb. 4).

Vor dem Versuch wurden die eEND2- und CT26-Zellen zunächst für 24 h mit 10 mM und 25 mM 4-HBA oder dem Vehikel DMSO (Kontrolle) inkubiert. Für den Test wurden 24-Well-Chemotaxis-Kammern mit Polyvinylpyrrolidon-beschichteten Polykarbonatfiltern mit 8 μ m Porengröße (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) verwendet.

In die oberen Kammern der Migrationsassays wurden 500 μ l einer Zellsuspension mit 2×10^5 4-HBA- oder Vehikel-behandelten Zellen (in DMEM für eEND2-Zellen bzw. RPMI-1640 für CT26-Zellen) pipettiert. Die unteren Kammern wurden mit 1% FCS angereichertem DMEM bzw. RPMI-1640 gefüllt. Danach erfolgte die Inkubation der Kammern für 5 h bei 37° C im Brutschrank.

Nach Ablauf der oben genannten Inkubationszeiten wurden die nicht migrierten Zellen von der oberen Filteroberfläche entfernt. Die Zellen, die durch die Filterporen gewandert waren, adhärten an der Unterseite der Membran. Diese wurden mit Methanol fixiert und mit Dade Diff-Quick (Dade Diagnostika GmbH, München, Deutschland) gefärbt. Unter Verwendung eines Lichtmikroskops (BX60; Olympus, Hamburg, Deutschland) wurden in mindestens 10 randomisiert gewählten Gesichtsfeldern (*Regions of Interest*, ROIs) in 20-

facher Vergrößerung die migrierten Zellen gezählt und als Zellen pro ROI angegeben. Alle Migrationsassays wurden in vierfacher Ausfertigung durchgeführt.

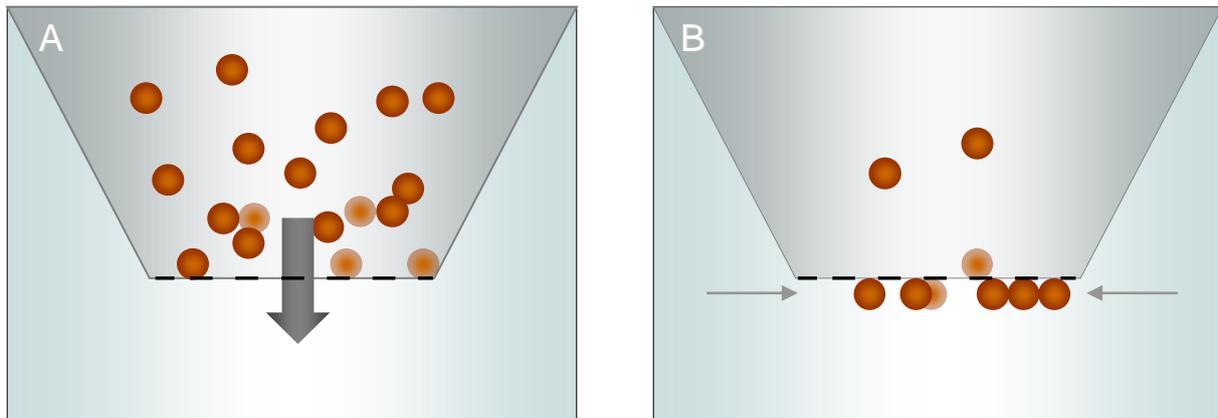


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus eines Migrationsassays. **A** Die zu untersuchenden Zellen werden in die obere Kammer pipettiert und migrieren in die untere Kammer durch Filterporen einer Membran. **B** Die an der Unterseite der Membran adhären Zellen (Pfeile) werden anschließend ausgezählt.

5.1.6. Invasionsassay

Da ein wesentliches Merkmal von malignem Gewebe die Invasion in das umliegende Gewebe ist, wurde zur Untersuchung der Invasivität von Tumorzellen ein Invasionsassay mit CT26-Zellen unter der Einwirkung von 4-HBA durchgeführt.

Vor dem Versuch wurden die CT26-Zellen zunächst für 24 h mit 10 mM und 25 mM 4-HBA oder dem Vehikel DMSO (Kontrolle) inkubiert. Für den Test wurden 24-Well-Chemotaxis-Kammern mit Polyvinylpyrrolidon-beschichteten Polycarbonatfiltern mit 8 µm Porengröße (BD Biosciences) verwendet. Die Chemotaxiskammern wurden zuvor mit Matrigel (30 µl/Well; 1 mg/ml Wachstumsfaktor-reduziertes BD Matrigel™ Matrix; BD Biosciences) beschichtet. Matrigel ist ein gelöstes Basalmembranextrakt, welches reich an extrazellulären Matrixproteinen wie Laminin, Kollagen IV, Heparansulfat-Proteoglykan und Wachstumsfaktoren ist. Bei Raumtemperatur polymerisiert das Matrigel und bildet eine biologisch aktive Matrix aus, die der natürlichen Basalmembran ähnelt.

Für den vorliegenden Versuch polymerisierte das Matrigel zunächst für 2 h bei 37° C. Dann wurden 500 µl der Zellsuspension mit 1×10^5 Zellen in RPMI-1640 Medium in die oberen Wells gegeben. Die unteren Wells wurden mit 10% FCS-haltigem RPMI-1640 gefüllt. Es erfolgte eine Inkubation der Kammern für 24 h im Brutschrank bei 37° C und 5% CO₂.

Anschließend wurden die nicht-invasiven Zellen von der oberen Filteroberfläche entfernt. Die Zellen, die durch das Matrigel und die Poren der Membran gewandert waren, adhärten an der Unterseite der Membran. Diese wurden mit Methanol fixiert und mit Dade Diff-Quick (Dade Diagnostika GmbH) gefärbt. Die Auswertung erfolgte mit einem Lichtmikroskop

(BX60; Olympus). In 20 randomisiert gewählten Gesichtsfeldern wurden in 20-facher Vergrößerung die invasiven Zellen gezählt und als Zellen pro ROI angegeben. Alle Invasionsassays wurden in vierfacher Ausfertigung durchgeführt.

5.1.7. Phalloidin-Färbung

Das Zytoskelett ist ein aus verschiedenen Proteinen aufgebautes dynamisches Netzwerk im Zytoplasma. Es besteht unter anderem aus Aktinfilamenten und Mikrotubuli und dient der mechanischen Stabilisierung und der aktiven Beweglichkeit der Zelle. Da die Reorganisation des Zytoskeletts bedeutend für die Zellmigration ist [LAUFFENBURGER und HORWITZ, 1996], wurden die Auswirkungen von 4-HBA auf die Aktinfilamente der eEND2- und CT26-Zellen untersucht. Dazu wurde eine Phalloidin-Färbung durchgeführt. Phalloidin ist ein Toxin des grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*) und bindet irreversibel an Aktinfilamente. Mit einem an Phalloidin gebundenen Fluoreszenzfarbstoff lassen sich somit mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops Aussagen über die Verteilung und die Morphologie der Aktinfilamente in der Zelle machen.

Zur Färbung wurden Aliquots der eEND2-Zellen auf eine 24-Well-Mikrotiterplatte (1×10^5 Zellen pro Well) gegeben und mit 10% FCS-haltigem DMEM für 24 h kultiviert. Die CT26-Zellen wurden analog für 24 h in 10% FCS-haltigem RPMI-1640 kultiviert. Nach einem Mediumwechsel wurde den Ansätzen 10 mM und 25 mM 4-HBA oder das Vehikel DMSO hinzugegeben. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in 4% Formaldehyd-PBS-Lösung fixiert (Rotifix; Roth, Karlsruhe, Deutschland). Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen für 5 min mit 0,2% Triton-x-100-PBS (Roth), um die Zellmembran zu permeabilisieren. Eine darauffolgende 30-minütige Inkubation mit 1% bovinem Serumalbumin (BSA)/PBS diente zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen. Die Zellen wurden erneut zweimal mit PBS gewaschen.

Nun erfolgte die eigentliche Färbung durch eine Inkubation mit Alexa-568 nm-gebundenem Phalloidin (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) in einer Konzentration von 1:100 in PBS für 30 min. Die Zellkerne wurden zusätzlich mit Bisbenzimid (1:500; Sigma) gefärbt. Die Eindeckung der Objektträger erfolgte mit Glyceringelatine (Kaisers Glyceringelatine; Merck, Darmstadt, Deutschland) und die anschließende Analyse der Zellen mittels eines BZ-8000 Mikroskops (Keyence, Osaka, Japan).

5.1.8. Western Blot

Mit Hilfe von Western Blots wurde die zelluläre Expression von VEGF, MMP9, PCNA und cleaved Caspase-3 unter dem Einfluss von 4-HBA analysiert.

VEGF ist ein Schlüsselprotein der Angiogenese, welches verschiedene Schritte, wie zum Beispiel die Destabilisierung der Gefäßwand, die Zellproliferation und die Zellmigration fördert. Matrixmetalloproteinasen, darunter die MMP9, führen zu einer Degradation der extrazellulären Matrix und ermöglichen dadurch die Zellmigration. Da die Zellproliferation ein grundlegender Schritt der Angiogenese ist, wurde die Expression von PCNA untersucht. PCNA ist ein Protein, das die Desoxyribonukleinsäure (DNS) während der Zellreplikation umgibt und dadurch deren Synthese ermöglicht. Es ist somit ein charakteristischer Marker der Zellteilung und zeigt die Proliferationsaktivität von Zellen an. Ebenfalls analysiert wurde die Expression der Cysteinprotease cleaved Caspase-3, welche ein Marker der Apoptose ist. Als Apoptose bezeichnet man den programmierten Zelltod, der entweder durch extrinsische Signale oder auf intrinsischem Weg durch zellulären Stress verursacht wird. Gemeinsame Endstrecke beider Pfade ist die Aktivierung der Caspase-3, die den Tod der Zelle auslöst [GRÜTTER, 2000].

Das Prinzip des Western Blots beruht auf der elektrophoretischen Auftrennung von Proben auf proteinbindenden Membranen. Diese werden zuvor mit Antikörpern, die spezifisch für die zu untersuchenden Proteine sind, inkubiert. Durch die Zugabe von enzymgekoppelten Sekundärantikörpern, die eine lichtemittierende Reaktion katalysieren, kann die Stärke der Proteinexpression auf einem Röntgenfilm dargestellt werden.

Für die Western Blot Analysen wurden die Zellen zunächst mit 10 mM und 25 mM 4-HBA oder dem Vehikel DMSO (Kontrolle) für 24 h inkubiert. Danach wurden diese mit Accutase (PAA) abgelöst und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zur Extraktion des Proteinanteils wurden die kryokonservierten Zellen für 30 min mit einem Lysepuffer (10 mM Tris, pH 7,5, 10 mM NaCl, 0,1 mM Ethylendiamintetraacetat (ETDA), 0,5% Triton-X 100, 0,02% NaN_3), einem Protease-Inhibitor-Cocktail (1:75 v/v; Sigma-Aldrich) und 0,2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen für 30 min auf Eis gegeben und danach für weitere 30 min bei 16.000 Umdrehungen pro Minute bei 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde als Gesamtproteinfraktion abpipettiert.

Nun erfolgte eine Inkubation der Membranen mit den verschiedenen Primärantikörpern für 2 h. Verwendet wurden ein monoklonaler Maus-anti-PCNA-Antikörper (1:20.000; DAKO, Hamburg, Deutschland) sowie folgende polyklonale Kaninchen-Antikörper: ein anti-VEGF-Antikörper (1:100; Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland), ein anti-MMP9-Antikörper (1:300; Abcam, Cambridge, UK) und ein anti-cleaved-Caspase-3-Antikörper (1:300; Cell Signaling, Frankfurt, Deutschland). Anschließend wurden sekundäre, an Meerrettichperoxidase-

gekoppelte Antikörper (HRP, 1:5000; GE Healthcare Amersham, Freiburg, Deutschland) hinzugegeben.

Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte durch die Luminol-verstärkte Chemilumineszenz-Methode. Hierbei katalysiert die Meerrettichperoxidase nach Zugabe von Luminol eine Reaktion, bei der elektromagnetische Strahlung im Bereich des sichtbaren, blauen Lichts emittiert wird. Die Membranen wurden mit einem Blaulicht-sensiblen Autoradiographie-Film belichtet (Hyperfilm ECL; GE Healthcare Amersham) und die Banden auf diese Weise detektiert. Die Messung der Signalstärken erfolgte anschließend densitometrisch (Geldoc, Quantity one software; BioRad Laboratories, München, Deutschland).

5.1.9. Aortenring-Assay

Kultiviert man Aortenringe aus der Ratte in einer dreidimensionalen pro-angiogenen Matrix, führt dies zum Auswachsen von Gefäßsprossen aus der Aortenwand. Dieser sogenannte Aortenring-Assay stellt ein etabliertes *ex vivo* Modell zur Untersuchung der pro- oder anti-angiogenen Wirkung von Testsubstanzen dar. Dabei gleichen die neugebildeten Gefäßsprossen vom Aufbau denen, die auch unter *in vivo* Bedingungen gebildet werden [GOODWIN, 2007].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von 4-HBA und TNP-470 auf die Ausbildung von Gefäßsprossen mit Hilfe des Aortenring-Assays untersucht. Dazu wurde zunächst die thorakale Aorta von zwei männlichen Sprague-Dawley-Ratten (250 g Körpergewicht) entnommen. Diese wurden in eine Petrischale mit sterilem DMEM transferiert und von den umgebenden Bindegewebsresten gesäubert. Jede Aorta wurde anschließend in Ringe von circa 1 mm Größe geschnitten. Diese wurden in je 200 µl Matrigel (BD Matrigel™ Matrix; BD Biosciences) in einer 48-Well-Mikrotiterplatte eingebettet.

Für den Versuch polymerisierte das Matrigel zunächst 20 min bei 37° C im Brutschrank. Anschließend wurden die Wells, die nun Aortenringe und Matrigel enthielten, mit 800 µl DMEM (10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin), welches zusätzlich 10 mM oder 25 mM 4-HBA bzw. 10 µM oder 25 µM TNP-470 bzw. das Vehikel (DMSO) enthielt, überschichtet. Die Assays erfolgten jeweils in 6-facher Ausführung.

Nun wurden die Aortenringe für 6 Tage im Brutschrank mit einem Mediumwechsel an Tag 3 kultiviert. Nach 6 Tagen wurde das Aussprossen neuer Gefäße aus den Ringen unter einem Phasenkontrastmikroskop (BZ-8000; Keyence) untersucht.

Die quantitative Auswertung der mikroskopischen Bilder erfolgte mit dem Softwareprogramm CapImage (Version 8.5; Zeintl, Heidelberg, Deutschland). Hierbei wurden

die Gesamtfläche [mm²] und die maximale Länge [µm] der äußeren Gefäßsprossen jedes Aortenrings bestimmt (Abb. 5).

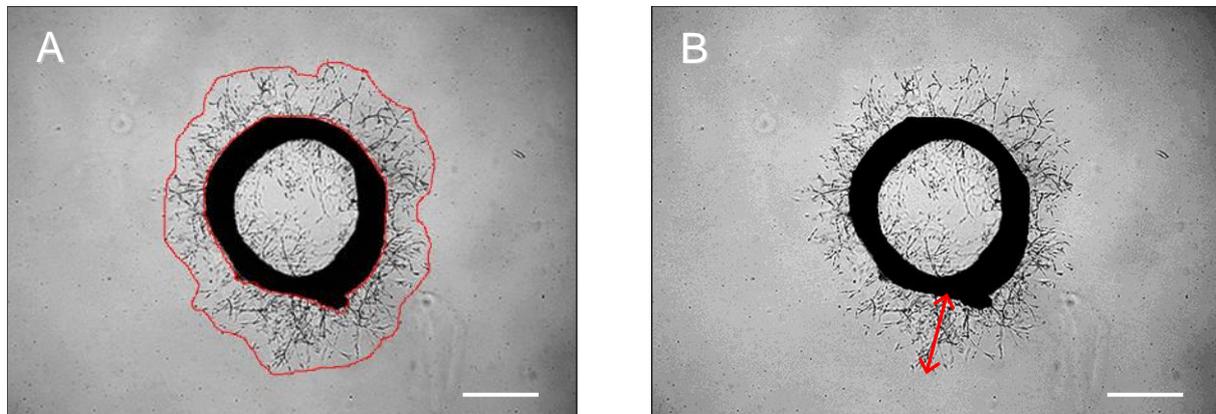


Abbildung 5: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen eines Aortenrings der Ratte. **A** Bestimmung der Gesamtfläche, die mit neugebildeten Gefäßsprossen bedeckt ist (Grenze mit roter Linie markiert). **B** Messung der maximalen Länge eines Gefäßsprosses (Doppelpfeil). Maßstab: A, B = 890 µm.

5.2. *In vivo* Experimente

5.2.1. Versuchstiere

Die *in vivo* Experimente wurden an C57BL/6- und BALB/c-Mäusen durchgeführt. Für die Versuche wurden nur weibliche Tiere mit einem Gewicht von 22-25 g ausgewählt. Die Haltung der Mäuse erfolgte in Einzelkäfigen mit Zugang zu Trinkwasser und Standardlaborfutter (Altromin, Lage, Deutschland) *ad libitum* in der Versuchstierhaltung des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes. Die Tiere waren in klimatisierten Räumen mit einem 12-stündigen Tag/Nachtrhythmus untergebracht. Es erfolgte eine tägliche Inspektion der Tiere in Hinblick auf ihre Aktivität, das Fress- und Putzverhalten sowie Kontrollen des Körpergewichts.

Alle Tierversuche wurden durch das Landesamt für Gesundheit und Verbraucherschutz, Saarbrücken, genehmigt und erfolgten in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz.

5.2.2. Modell der Rückenhautkammer

Die Rückenhautkammer ist ein chronisches *in vivo* Modell zur Untersuchung der Mikrozirkulation. Sie besteht aus zwei symmetrischen Titanrahmen mit einem Beobachtungsfenster (Abb. 6A), durch welches man direkt die Blutgefäße des zuvor freipräparierten Hautmuskels (*M. panniculus carnosus*) eines Versuchstieres beobachten kann (Abb. 6B). Die Rückenhautkammer kann auf den Rücken von Mäusen [CARDON et al., 1970], Hamstern [ENDRICH et al., 1980] oder Ratten [PAPENFUSS et al., 1979] implantiert werden. Das

Beobachtungsfenster lässt sich ohne direkte Traumatisierung des Gewebes wiederholt öffnen, sodass Zellsuspensionen, verschiedene Gewebefragmente oder Biomaterialien in die Kammer platziert werden können. Danach ist es möglich, über einen Zeitraum von 2-3 Wochen die angiogene und inflammatorische Reaktion des Kammergewebes auf die Transplantate bzw. Implantate wiederholt *in vivo* zu analysieren.

Weiterhin kann dieses Modell zur Untersuchung der Gewebepерfusion nach Ischämie [MENGER et al. 1989], Gewebetrauma [YAMAUCHI et al., 1999] oder Entzündung [WESTERMANN et al., 1999] eingesetzt werden. Die Rückenhautkammer ist außerdem ein etabliertes Modell zur Untersuchung von Tumorwachstum und -vaskularisierung [KOLLMAR et al., 2007; KOLLMAR et al., 2010].

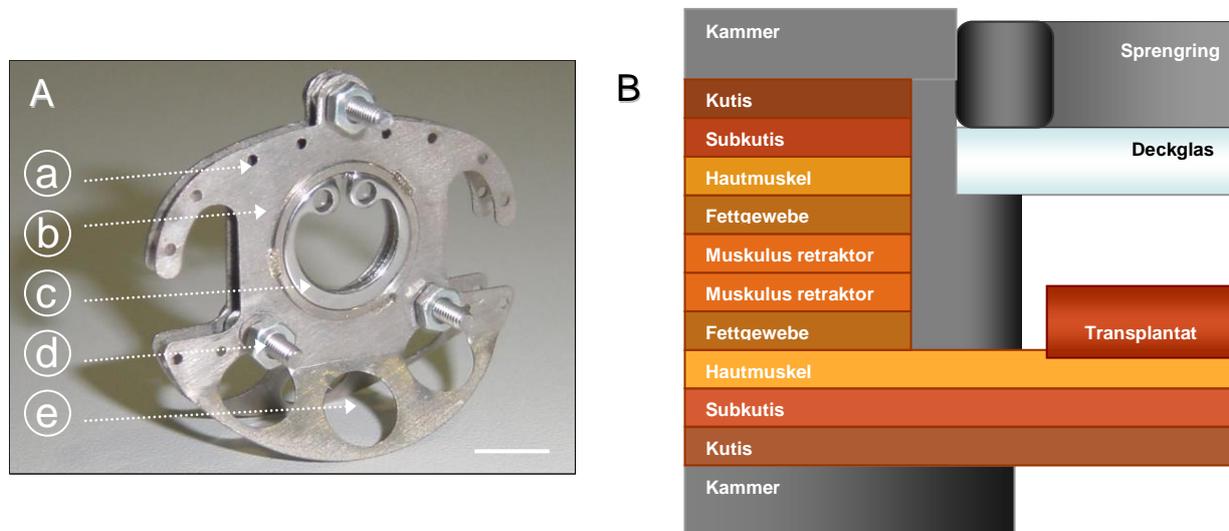


Abbildung 6: **A** Ansicht einer Rückenhautkammer mit: **a** Bohrungen zur Fixierung der Haut mittels Nähten, **b** Kammerrahmen aus Titan, **c** Sprengring, der das Deckglas fixiert, **d** Verbindungsschrauben zur Verbindung beider Kammerhälften und **e** Materialaussparungen zur Gewichtsreduktion. **B** Schnitt durch die Rückenhautkammer mit Ansicht der verschiedenen Hautschichten. Maßstab: A = 7,5 mm.

5.2.3. Präparation der Rückenhautkammer

Die Präparation der Rückenhautkammer erfolgte in tiefer Narkose der Mäuse durch intraperitoneale (i.p.) Gabe von 15 mg/kg Xylazin (Rompun®; Bayer HealthCare, Leverkusen, Deutschland) und 75 mg/kg Ketamin-Hydrochlorid (Ursotamin®; Serumwerk, Bernburg, Deutschland). Die Narkosetiefe ließ sich mit Hilfe des Zwischenzehenreflex beurteilen, welcher bei adäquater Betäubung der Tiere nicht mehr auslösbar war. Zum Schutz der Augen der Tiere wurde während der Narkose eine Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe; Bayer Health Care) aufgetragen.

Vor der Operation erfolgte zur Enthaarung der Tiere eine Rasur der Rückenpartie (Elektra II GH204; Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) und anschließend die Auftragung chemischer Depilationscreme (Elca® med Creme; Asid Bonz, Herrenberg, Deutschland). Um Rückstände der Creme zu entfernen, wurde die Haut anschließend sorgfältig mit Wasser

gereinigt und mit alkoholischer Lösung (Softasept®; Braun, Melsungen, Deutschland) desinfiziert.

Die Tiere wurden in Bauchlage quer zum Operateur positioniert und die Rückenhaut an der Mittellinie angehoben. In der so entstandenen Hautduplikatur ließen sich mit einer Kaltlichtquelle (KL1500 LCD; Zeiss, Jena, Deutschland) unter Gegenlicht jeweils kranial und kaudal zwei Hauptgefäßstämme identifizieren, die zur Deckung gebracht wurden. Diese sind für die Blutversorgung der Rückenhaut essentiell. Es wurde daher darauf geachtet, dass diese Gefäße während der Präparation nicht verletzt wurden. Die Hautfalte wurde dann mit einem kranialen und kaudalen Haltefaden an ihrer Oberkante aufgespannt (*Abb. 7A*).

Der rückwärtige Kammerteil ließ sich nun an den dafür vorgesehenen Öffnungen mit 5.0 Seidefäden am oberen Hautfaltenrand annähen. Mit Hilfe zweier kleiner Inzisionen an der Hautfaltenbasis konnten die zwei unteren Verbindungsschrauben durch die Hautschichten geführt werden. Daraufhin wurde unter Gegenlichtkontrolle die durchscheinende Kammeröffnung für das spätere Beobachtungsfenster mit einem wasserfesten Stift angezeichnet (*Abb. 7B*).

Nach dem Entfernen der Haltefäden erfolgte die Lagerung der Maus in Seitenlage. Alle weiteren Arbeiten wurden unter einem Stereo-Operationsmikroskop (Leica M651; Wetzlar, Deutschland) durchgeführt. Es erfolgte die Resektion der Haut inklusive Subkutis und Hautmuskel innerhalb des Bereiches des Beobachtungsfensters mit einer mikrochirurgischen Schere (*Abb. 7C*). Durch die Entfernung der *Mm. retractores* wurde die Hautmuskelschicht der hinteren Hautfalte freigelegt (*Abb. 7D*). Um die Kammer vor dem Austrocknen zu schützen, erfolgten während der gesamten Präparation wiederholte Spülungen mit steriler Kochsalzlösung (NaCl 0,9%; Braun).

Nach kompletter Entfernung aller sich auf dem Hautmuskel befindlichen Gewebeschichten (*Abb. 7E*) wurde der vordere Titanrahmen der Kammer auf die Schrauben des rückwärtigen Rahmens gesetzt und beide Rahmen mit Hilfe von Muttern aneinander fixiert. Anschließend erfolgte der Verschluss der Kammer mit einem Deckglas, welches in die Vertiefung des Beobachtungsfensters gesetzt wurde. Die überschüssige Flüssigkeit wurde mit Hilfe von Kompressen am Rand des Deckglases sorgfältig entfernt. Dabei wurde darauf geachtet, dass am Ende der Präparation keine Luft unter dem Deckglas eingeschlossen wurde.

Das Deckglas wurde in der Kammeröffnung mit Hilfe eines Sprenglings fixiert. Eine anschließende Kürzung der überstehenden Schrauben diente der zusätzlichen Gewichtsreduktion sowie der Reduktion der Verletzungsgefahr für die Tiere. Nun erfolgte eine abschließende Qualitätskontrolle der Kammerpräparation unter Gegenlicht, um zu prüfen, ob diese frei von Einblutungen und Lufteinschlüssen war (*Abb. 7F*).

Zum Ausgleich von Flüssigkeitsverlusten während der Operation und in der frühen postoperativen Phase erhielten die Mäuse eine subkutane Injektion von 1 ml steriler Kochsalzlösung. Schließlich wurden die Tiere in ihren Käfigen vor eine Wärmelampe gelegt, um eine Auskühlung während der postoperativen Phase zu vermeiden. Bereits kurze Zeit nach dem Eingriff wiesen die Tiere wieder eine normale Aktivität und Nahrungsaufnahme auf.

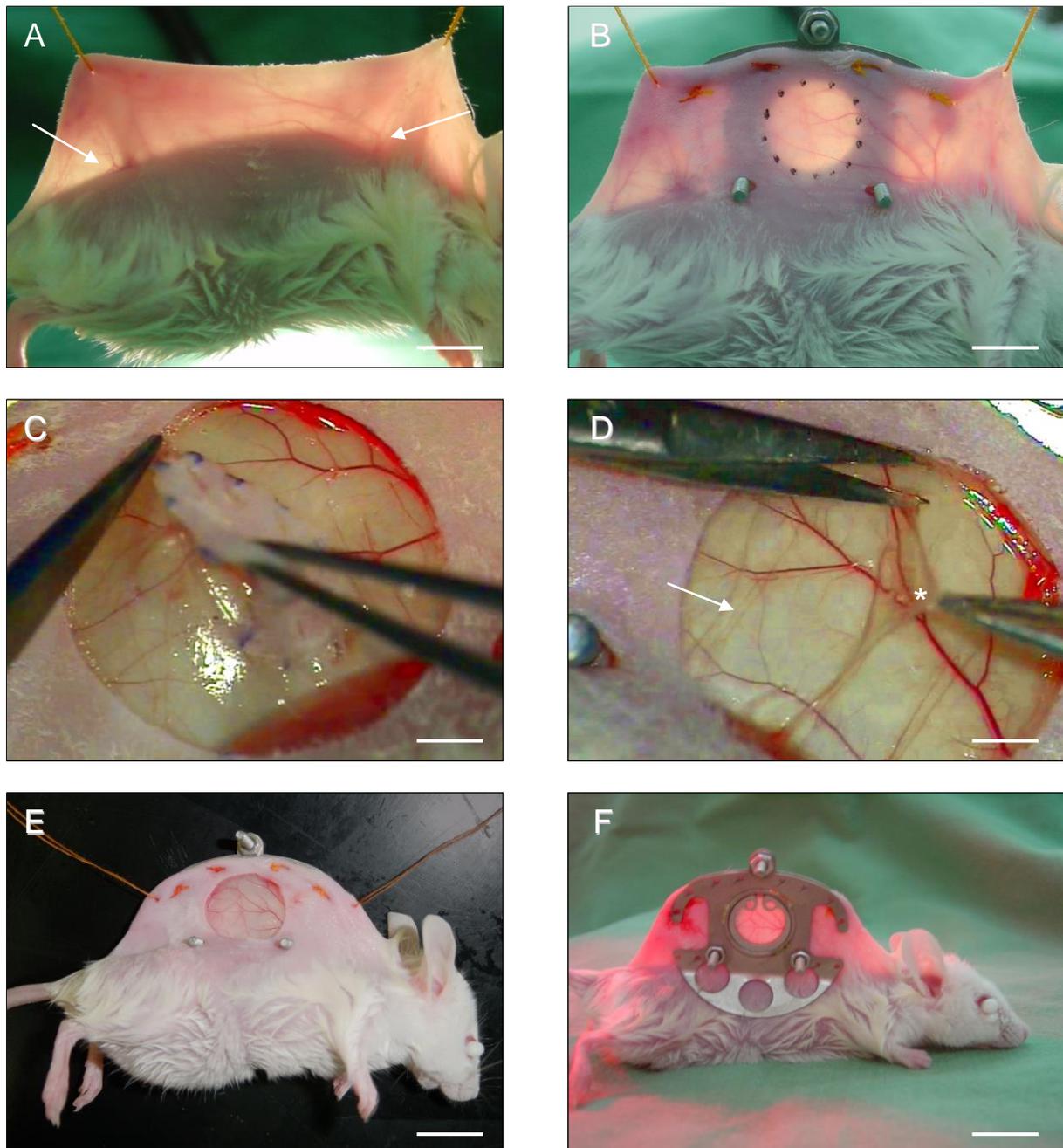


Abbildung 7: **A** Anheben der Rückenhaut mit Darstellung der Rückenhautgefäße (Pfeile) unter Gegenlicht. **B** Einzeichnung des späteren Beobachtungsfensters unter Gegenlicht. Durch Inzisionen an der Hautfaltenbasis werden die Verbindungsschrauben nach vorne geführt. **C** Resektion der Haut. **D** Entfernung der *Mm. retractores* (Stern) und Sicht auf die darunterliegende Hautmuskelschicht (Pfeil). **E** Kammerpräparation vor Anbringen des vorderen Titanrahmens. **F** Fixierung des vorderen Titanrahmens am hinteren Rahmen mittels Verbindungsschrauben. Verschluss der Kammeröffnung mit Deckglas und Sprengring. Maßstab: A = 0,8 cm; B = 0,75 cm; C, D = 0,25 cm; E = 1,3 cm; F = 1,25 cm.

5.2.4. Induktion von Endometrioseherden

Zur Untersuchung der Wirkung von 4-HBA auf die Angiogenese in benignem Gewebe wurden Endometrioseherde in der Rückenhautkammer induziert. Hierzu wurde Endometrium aus Spendertieren isoliert und auf die quergestreifte Hautmuskulatur der Kammerpräparation transplantiert.

Die Induktion von Endometrioseherden in der Rückenhautkammer von Hamstern erfolgte bereits in verschiedenen Studien [LASCHKE et al., 2005; LASCHKE und MENGER, 2007]. Dabei zeigte sich, dass die Herde in der Rückenhautkammer ein dichtes Gefäßnetzwerk ausbilden, dessen Angioarchitektur und Mikrohämodynamik mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie analysiert werden kann. Weiterhin ist es möglich, die Wirkung anti-angiogener Substanzen auf die Entwicklung neuer Blutgefäße in den Herden systematisch zu untersuchen.

5.2.4.1. Bestimmung des Zyklusstadiums

Da Endometrioseherde ein östrogenabhängiges Wachstum aufweisen [LASCHKE et al., 2005], wurden für die Versuche nur Tiere ausgewählt, die im gleichen Zyklusstadium waren. Dadurch ließen sich Unterschiede durch verschiedene Hormonspiegel der Tiere ausschließen.

Der Zyklus der Maus dauert in der Regel vier Tage und durchläuft in dieser Zeit vier Stadien: Proöstrus, Östrus, Metöstrus und Diöstrus. Diese gehen mit charakteristischen zellulären Veränderungen des Vaginalepithels einher, welches aus verschiedenen Zellschichten aufgebaut ist. Aus den runden, basophilen Zellen der Basalzellschicht erfolgt die Regeneration des Epithels. Diese werden von Parabasalzellen bedeckt, die ebenfalls basophil und rund sind. Die nächste Schicht bilden die polygonalen Intermediärzellen, welche im Zyklusverlauf ihre Zellkerne verlieren und zu kernlosen Superficialzellen werden.

Der Proöstrus ist gekennzeichnet durch das gehäufte Auftreten von Intermediärzellen in der Zytologie. Im Östrus prägen dagegen abgeplattete, große Superficialzellen das Zellbild. Parabasal- und Intermediärzellen sind kaum zu finden. Der Metöstrus ist durch ein zelluläres Mischbild mit zahlreichen Leukozyten gekennzeichnet. Im darauffolgenden Diöstrus dominieren die Leukozyten das Zellbild.

Zur Bestimmung des Zyklusstadiums wurden zunächst circa 20 µl 0,9% NaCl (Braun) mit Hilfe einer Pipette in die Vagina der wachen Mäuse eingebracht und diese nach wenigen Sekunden wieder abpipettiert. Die so gewonnene Zellsuspension wurde auf Objektträger pipettiert und das Zellbild unter einem Mikroskop (CH-2; Olympus) analysiert.

5.2.4.2. Isolierung von Endometriumfragmenten

Zunächst erfolgte eine Selektion der Spendermäuse mittels Vaginalzytologie, welche sich zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme im Diöstrus befinden mussten. Dies entsprach dem aktuellen Zyklusstadium der 2 Tage zuvor präparierten Rückenhautkammertiere, wodurch hormonelle Unterschiede zwischen Spender- und Empfängertieren verhindert wurden.

Nach der Anästhesie und Desinfektion der Tiere wurde unter Verwendung eines Operationsmikroskopes (Leica M651; Wetzlar) eine mediane Laparotomie durchgeführt. Der Uterus, welcher bei Mäusen aus zwei Uterushörnern besteht, wurde dargestellt. Nun wurden beide Uterushörner entfernt und in eine mit sterilem Kork ausgelegte Petrischale mit 37° C warmen DMEM transferiert. Dem Medium wurde zuvor der Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid (Sigma) zugegeben, welcher durch eine Anlagerung an die DNS die Zellkerne markiert. Diese Markierung ermöglicht so das Auffinden der Herde in der späteren fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung.

Die nachfolgende Isolierung einzelner Endometriumfragmente erfolgte ebenfalls unter dem Operationsmikroskop. Hierzu wurden die Uterushörner zunächst längs aufgeschnitten und mit 4 Kanülen vorsichtig auf den Kork aufgespannt (*Abb. 8A*). Dies ermöglichte den direkten Zugriff auf das Endometrium, welches nun mit einer Mikroschere von der darunterliegenden Muskelschicht abpräpariert wurde. Dabei wurde besonders auf atraumatisches Arbeiten geachtet, um das leicht verletzbare Gewebe nicht zu beschädigen (*Abb. 8B*). Die so gewonnenen Endometriumfragmente, welche noch nicht die gewünschte Endgröße hatten, wurden in eine neue, mit DMEM gefüllte Petrischale transferiert. Nun wurde eine Schablone, welche mit schwarzen Punkten bedruckt war, unter die transparente Schale gelegt. Mit Hilfe dieser Schablone erfolgte die Präparation von runden Endometriumfragmenten mit einer standardisierten Initialgröße von 0,6-0,7mm².

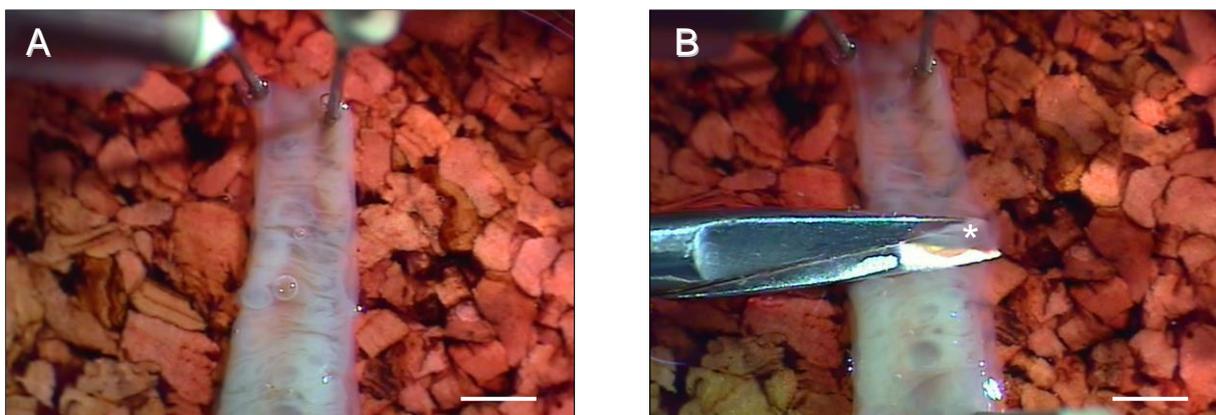


Abbildung 8: **A** Aufspannen eines longitudinal eröffneten Uterushorns in einer mit Kork ausgelegten und DMEM gefüllten Petrischale. **B** Präparation eines Endometriumfragmentes (Stern) mit einer Mikroschere vom darunterliegenden Myometrium des Uterus. Maßstab: A, B = 3,1 mm.

5.2.4.3. *Transplantation der Endometriumfragmente*

Zur Transplantation der Endometriumfragmente wurde das Beobachtungsfenster der Rückenhautkammer narkotisierter Empfängertiere durch Entfernung des Sprenglings und des Deckglases geöffnet. Um mögliche Verunreinigungen zu beseitigen, erfolgte zunächst eine Spülung der Kammer mit steriler Kochsalzlösung (Braun). Nun wurden jeweils drei Endometriumfragmente mit ausreichendem Abstand zueinander und zum Rand des Beobachtungsfensters in das Zentrum der Kammer transplantiert. Anschließend erfolgte der Verschluss der Rückenhautkammer mit einem neuen Deckglas, welches erneut mit einem Sprengling fixiert wurde.

5.2.5. Induktion kolorektaler Karzinome

In einem weiteren Versuchsabschnitt wurde die Wirkung von 4-HBA auf malignes Gewebe untersucht. Zu diesem Zweck erfolgte die Transplantation kolorektaler Karzinome in Form von Tumorzellsphäroiden in die Rückenhautkammer von BALB/c-Mäusen. Die schon bereits in den *in vitro* Versuchen verwendete Tumorzelllinie CT26 ist ein chemisch induziertes Adenokarzinom der BALB/c-Maus, weshalb diese Mauslinie für die folgenden *in vivo* Versuche verwendet wurde.

5.2.5.1. *Herstellung von Tumorsphäroiden*

Die Tumorsphäroide wurden aus CT26-Zellen mit Hilfe der „Liquid-overlay“-Technik hergestellt. Hierzu wurde zunächst eine 96-Well-Platte mit jeweils 30 µl eines 1% Agarosegels (Sigma-Aldrich) pro Well beschichtet. Das Gel polymerisierte anschließend für 2 h bei Raumtemperatur. Nun wurden pro Well 5×10^4 CT26-Zellen ausgesät und in RPMI-1640 (10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin) im Brutschrank kultiviert. Da die Tumorzellen nicht an dem Agarosegel adhären, sinken sie in die muldenförmigen Vertiefungen der Wells und aggregieren zu Tumorzellsphäroiden.

Nach 3 Tagen im Brutschrank wurden die Sphäroide mit PBS gewaschen und mit 2 µg/ml Bisbenzimid (Sigma) für 10 min gefärbt (*Abb. 9A*). Die Sphäroide wurden daraufhin erneut gewaschen und danach in die Rückenhautkammer der Empfängertiere transplantiert.

5.2.5.2. *Transplantation der Tumorsphäroide*

Auf Grund des aggressiveren Wachstums von malignem Gewebe wurde in diesem Versuchsabschnitt nur ein Tumorsphäroid pro Rückenhautkammer transplantiert. Hierzu wurden die Empfängertiere zunächst narkotisiert, das Deckglas der Rückenhautkammer entfernt und die Kammer mit steriler Kochsalzlösung gespült. Die Sphäroide wurden mit Hilfe von Kanülen vorsichtig aus dem Medium entnommen und in das Zentrum des präparierten

Beobachtungsfeldes der Kammer platziert (Abb. 9C, D). Anschließend erfolgte der Verschluss der Kammer mittels eines neuen Deckglases und Sprenglings.

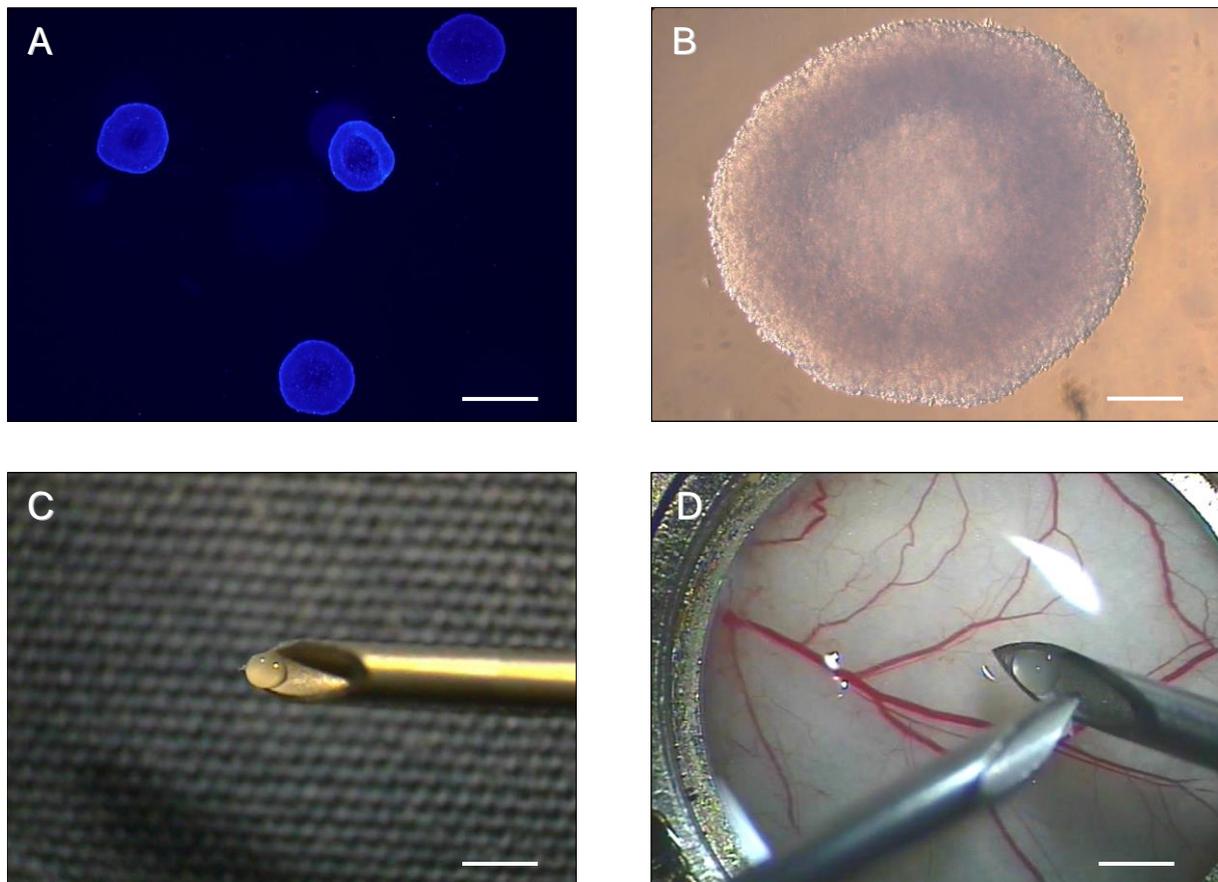


Abbildung 9: **A** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme Bisbenzimid-gefärbter CT26-Tumorsphäroide im UV-Filter. **B** Lichtmikroskopische Aufnahme eines CT26-Tumorsphäroids. **C** Transfer eines CT26-Tumorsphäroids mit Hilfe einer Kanüle. **D** Platzierung des Sphäroids im Zentrum des Beobachtungsfeldes der Rückenhautkammer. Maßstab: A = 1 mm; B = 180 µm; C = 2 mm; D = 1,6 mm.

5.2.6. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe der intravitale Fluoreszenzmikroskopie lässt sich die gesamte Mikrozirkulation der Rückenhautkammer sowie die Vaskularisierung und das Wachstum der darin befindlichen Transplantate repetitiv untersuchen. Durch die intravenöse Gabe des Fluoreszenzfarbstoffes Fluoreszein-Isotiozyanat (FITC)-Dextran (5%; Molekulargewicht: 150.000 Da; Fluka Biochemika, Ulm, Deutschland), der auf Grund seines hohen Molekulargewichts im Intravasalraum verbleibt, wird das Blutplasma angefärbt. Somit können die Gefäße in der Rückenhautkammer visualisiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie mit einem Axiotech Mikroskop (Zeiss) durchgeführt. Dieses war mit einer 100 W Quecksilber-Lichtquelle (HBO 100W OFR; Osram, Augsburg, Deutschland) und einem Filterblock für blaues (450-490 nm), grünes (530-560 nm) und ultraviolettes (330-390 nm) Licht

ausgestattet. Durch die Wahl des ultravioletten Filters konnten die mit Bisbenzimid gefärbten Transplantate dargestellt werden (Abb. 10A). Im Blaulicht-Filter wurden die FITC-markierten Blutgefäße visualisiert (Abb. 10B). Unter der Verwendung von 4x, 5x, 10x und 20x Objektiven (Zeiss) mit langem Arbeitsabstand wurden Vergrößerungen von 92x, 115x, 230x und 460x auf einem 14 Zoll Monitor (KV-14CT1E; Sony, Tokyo, Japan) erzielt.

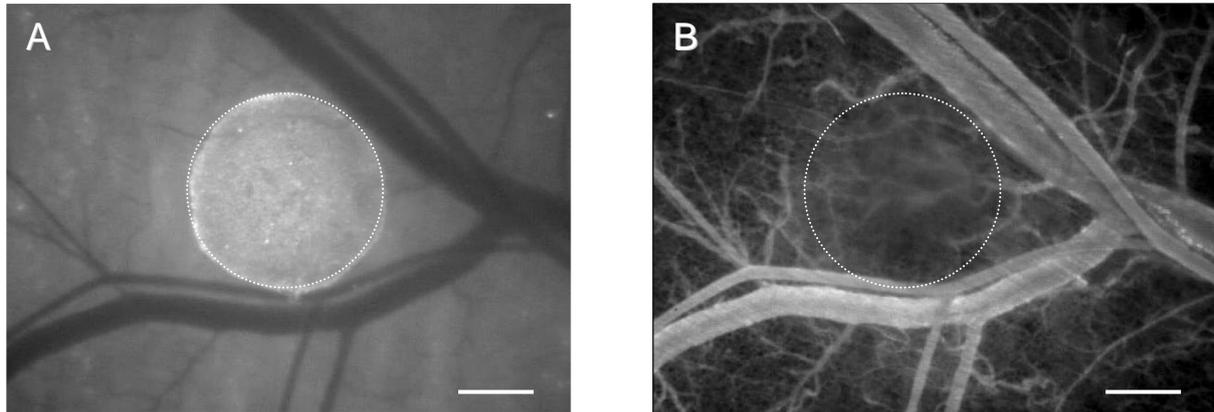


Abbildung 10: **A** Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Bisbenzimid-gefärbten CT26-Tumorsphäroids im UV-Filter (Grenze mit gestrichelter Linie markiert). **B** Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines CT26-Tumorsphäroids (Grenze mit gestrichelter Linie markiert) mit Darstellung der umliegenden Blutgefäße (Kontrastverstärkung mit FITC-Dextran in Blaulicht-Epi-Illumination). Maßstab: A, B = 350 μ m.

Vor jeder intravitalmikroskopischen Untersuchung wurden die narkotisierten Tiere zunächst in Seitenlage auf einer Plexiglasbühne gelagert und an den Verbindungsschrauben der Kammer fixiert. Nun erfolgte die Injektion von 0,1 ml FITC-Dextran in den retrobulbären Venenplexus. Die Rückenhautkammer und die darin befindlichen Transplantate wurden jetzt systematisch mit Hilfe der verschiedenen Filter und Objektive mikroskopiert. Die mikroskopischen Bildsequenzen wurden mit Hilfe einer *charge-coupled device* (CCD)-Videokamera (FK6990; Pieper, Schwerte, Deutschland) erfasst, auf einen Bildschirm (KV-14CT1E; Sony) übertragen und mit einem DVD-Rekorder (DVD R121; Samsung Electronics GmbH, Schwalbach, Deutschland) aufgenommen.

Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte anschließend *off-line* mit Hilfe des computer-assistierte Bildanalysesystems CapImage (Version 8.5; Zeintl). Dabei erfolgte zu jedem Untersuchungszeitpunkt die Auswertung folgender Parameter:

5.2.6.1. Transplantatgröße

Zur Bestimmung der Transplantatgröße wurde eine Übersichtsaufnahme der Transplantate erstellt (Abb. 11A) und daran die Grenzen der Transplantate eingezeichnet (Abb. 11B). Durch die Bestimmung aller markierten Bildpunkte innerhalb des markierten Bereichs der Transplantate konnte die Fläche in mm^2 gemessen werden. Zur einfachen Detektion der

Transplantate in der Kammer wurden diese zuvor mit Bisbenzimid gefärbt. Dieser Farbstoff fluoresziert im UV-Filter und zeigt so die Lokalisation der Transplantate an (Abb. 10A). Neben der Transplantatgröße wurde für jeden Untersuchungszeitpunkt das prozentuale Wachstum der Endometrioseherde bzw. Tumore in Relation zu ihrer Initialgröße am Tag der Transplantation berechnet und in % angegeben.

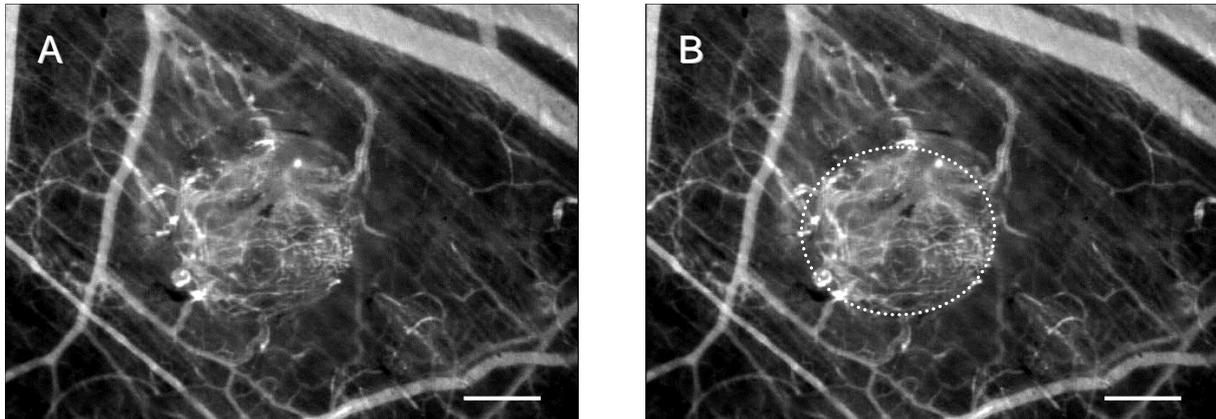


Abbildung 11: **A** Intravitalfluoreszenzmikroskopische Darstellung eines Transplantates in der Übersichtsaufnahme. **B** Umrandung der Transplantatgrenzen (Grenze mit gestrichelter Linie markiert) und computerassistierte Bestimmung der Herdgröße in mm^2 (Kontrastverstärkung mit FITC-Dextran in Blaulicht-Epi-Illumination). Maßstab: A, B = $350 \mu\text{m}$.

5.2.6.2. Funktionelle Kapillardichte

Die funktionelle Kapillardichte gibt die Dichte der bereits mit Blut perfundierten Kapillaren eines Transplantates an und wurde in 10x Vergrößerung eines repräsentativen Ausschnittes des Transplantates bestimmt.

Zur Bestimmung der funktionellen Kapillardichte wurden die FITC-Dextran markierten Gefäße im Standbild nachgezeichnet. Anschließend wurde der Quotient aus der Gesamtlänge der perfundierten Gefäße und der Fläche des Beobachtungsareals bestimmt und die funktionelle Kapillardichte in cm/cm^2 angegeben.

5.2.6.3. Gefäßdurchmesser

Die Durchmesser neugebildeter Gefäße wurden für 10 Gefäße pro Transplantat in 20x Vergrößerung gemessen und aus den Einzelwerten das arithmetische Mittel bestimmt. Um eine randomisierte Auswahl der Gefäße zu gewährleisten, wurde hierfür eine transparente Folie auf den Auswertungsmonitor aufgelegt, die ein Achsenkreuz enthielt. Nur Gefäße, die dieses Achsenkreuz in der Horizontalen oder Vertikalen schnitten, wurden in die Auswertung einbezogen. Die Messung der Durchmesser, welche in μm angegeben wurden, erfolgte durch das Anlegen einer senkrecht zur Gefäßwand verlaufenden Strecke.

5.2.6.4. Blutzellgeschwindigkeit

Die Blutzellgeschwindigkeit wurde an den identischen Gefäßen, in denen zuvor die Gefäßdurchmesser gemessen wurden, in 20x Vergrößerung bestimmt. Zur Messung wurde die Computer-assistierte Line-Shift-Diagramm-Methode verwendet [KLYSCZ et al., 1997]. Hierbei wird eine Linie in der Gefäßmitte parallel zur Flussrichtung eingezeichnet und die Aufnahme anschließend für 10 s in Echtzeit abgespielt. Dabei werden die Grauwerte aufgezeichnet, welche durch das Vorbeifließen von Blutzellen entlang der Messlinie entstehen. Aus dem Grauwertprofil wird ein Line-Shift-Diagramm erstellt, welches abwechselnd aus hellen (Plasma) und dunklen (ungefärbte Erythrozyten) Linien besteht. Aus der Steigung dieser Linien lässt sich die Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten in $\mu\text{m/s}$ errechnen.

5.2.6.5. Blutvolumenfluss

Der Blutvolumenfluss für die einzelnen Gefäße wurde aus dem Durchmesser der Gefäße (d), der Fließgeschwindigkeit (v) sowie dem Korrekturfaktor K nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Blutvolumenfluss} = \pi \times (d/2)^2 \times v/K$$

Der Blutstrom in Mikrogefäßen ist laminar, das heißt, dass sich die Blutzellen parallel zur Gefäßwand bewegen. Da die Geschwindigkeit in der Gefäßmitte jedoch höher ist als in den Randbereichen der Gefäße (paraboles Geschwindigkeitsprofil), wird bei der Berechnung des Blutvolumenflusses ein Korrekturfaktor angewendet. Dieser sogenannte Baker-Wayland-Faktor [BAKER und WAYLAND, 1974] korrigiert den Unterschied zwischen der gemessenen Blutzellgeschwindigkeit im Zentrum der Gefäße und der durchschnittlichen Blutzellgeschwindigkeit. Auf Grund der gemessenen Gefäßdurchmesser wurde als Korrekturfaktor $K=1,3$ eingesetzt. Der Blutvolumenfluss wurde in pl/s angegeben.

5.2.7. Probenentnahme und Fixierung

Am letzten Untersuchungstag erfolgte im Anschluss an die intravitale Fluoreszenzmikroskopie die Entnahme des Kammergewebes zur weiteren histologischen Aufarbeitung. Nach dem Entfernen der Kammerrahmen wurde die Rückenhaut am oberen Rand der Hautduplikatur mit Kanülen auf einer Korkplatte aufgespannt. Der Transplantattragende Gewebeanteil wurde mit einem Skalpell exzidiert und die so gewonnenen Präparate in 4% Formaldehydlösung (Roti-Histofix 4%; Roth, Karlsruhe, Deutschland) fixiert. Nach deren Entwässerung erfolgte eine Einbettung in Paraffin. Anschließend wurden mit

einem Mikrotom (Leica SM 2000R; Leica) 4 µm dicke Serien-Gewebeschnitte angefertigt und diese anschließend mit verschiedenen Techniken gefärbt.

5.2.8. Histologie und Immunhistochemie

Serienschnitte der Präparate wurden zunächst mit Hämatoxylin-Eosin (HE) nach Mayer gefärbt. Hämatoxylin färbt basophile Strukturen blau. Hierzu zählen vor allem die Zellkerne mit der darin enthaltenen DNS und das raue endoplasmatische Retikulum. Eosin färbt azidophile Zellbestandteile (Proteine im Zytoplasma) rot. Die HE-Färbung wurde nach Standardprotokoll durchgeführt. Im Anschluss daran erfolgte eine lichtmikroskopische Analyse der Schnitte (BX60; Olympus) und die Auswahl der Transplantat-enthaltenen Schnitte für weitere immunhistochemische Färbungen.

Der Nachweis apoptotischer Zellen in den Transplantaten erfolgte mittels immunhistochemischer Detektion des Apoptosemarkers cleaved Caspase-3. Dafür wurde ein polyklonaler Kaninchen-anti-Maus-cleaved-Caspase-3-Antikörper (1:100; New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) verwendet. Nachfolgend wurde als Sekundärantikörper ein Ziege-anti-Kaninchen-Peroxidase-gekoppelter Antikörper (1:200; Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) und 3,3-Diaminobenzidin als Chromogen hinzugegeben. Eine Gegenfärbung der Kerne erfolgte mit Hämalaun.

Zur Analyse der Kapillardichte in den Transplantaten erfolgte der immunhistochemische Nachweis des Endothelzellmarkers CD31. Hierfür wurden die in Paraffin eingebetteten Schnitte mit einem Ratte-anti-Maus-CD31-Antikörper, welcher an einen Ziege-anti-Ratte Cy3-Antikörper (1:50; Dianova GmbH) gekoppelt war, gefärbt. Eine Markierung der Zellkerne erfolgte mit Bisbenzimid. Anschließend wurden die immunhistochemischen Schnitte mittels eines BZ-8000 Mikroskops (Keyence) analysiert. Dafür wurde der größte Querschnitt jedes Tumors in einer Übersichtsaufnahme dargestellt und alle rot gefärbten Mikrogefäße im Tumor gezählt. Anschließend wurde die Herdgröße mittels Umrandung der äußeren Begrenzung ermittelt und die Gefäßdichte der Herde in Gefäße pro mm² angegeben.

5.2.9. Experimentelles Protokoll

Zwei Tage nach der Präparation der Rückenhautkammer wurden die Tiere narkotisiert und die Endometriumfragmente bzw. Tumorsphäroide transplantiert. Im Anschluss wurden zunächst auflicht- und durchlichtmikroskopische Aufnahmen am Operationsmikroskop (Leica M651) in 16x, 25x und 40x Vergrößerung erstellt. Nach intravenöser Gabe von FITC-Dextran erfolgte die erste intravitalfluoreszenzmikroskopische Untersuchung.

Die Tiere wurden randomisiert einer Behandlungsgruppe und einer Kontrollgruppe zugeteilt. Nach dem Erwachen aus der Narkose erhielten die Tiere der Behandlungsgruppe die erste i.p.-Injektion von 4-HBA, während die Kontrollgruppe mit dem Vehikel DMSO behandelt wurde. Danach erfolgte die tägliche Behandlung mit 4-HBA bzw. dem Vehikel bis zum Ende des 14-tägigen Untersuchungszeitraums.

An Tag 3, 6, 10 und 14 wurden die Kammern erneut licht- und intravitalfluoreszenzmikroskopisch analysiert (Abb. 12).

Nach der letzten Mikroskopie wurden die Rückenhautkammerpräparationen zur weiteren histologischen Aufarbeitung exzidiert. Danach wurden die Tiere mit einer Überdosis Pentobarbital (200mg/kg i.p.; Narcoren; Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) euthanasiert.

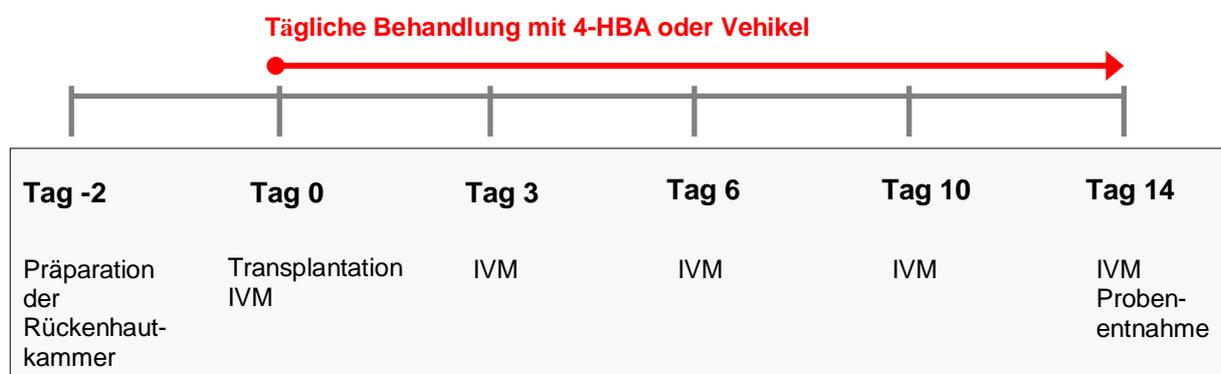


Abbildung 12: Experimentelles Protokoll: Präparation der Rückenhautkammer an Tag -2. Transplantation der Endometriumfragmente bzw. CT26-Tumorsphäroide an Tag 0, gefolgt von der ersten intravitalfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung (IVM) und Beginn der Behandlung der Tiere mit 4-HBA oder Vehikel. Erneute IVM am 3., 6., 10. und 14. Tag. An Tag 14 Entnahme des Kammergewebes für histologische und immunhistochemische Untersuchungen.

5.2.9.1. Studienabschnitt 1

Zur Behandlung der in der Rückenhautkammer induzierten Endometrioseherde erhielten die Tiere eine tägliche i.p. Injektion von 100 mg/kg 4-HBA, welches in 25 µl DMSO (100%; Sigma-Aldrich) gelöst wurde. Diese Dosis wurde gewählt, da in vorangehenden Studien gezeigt werden konnte, dass sie effektiv entzündliche Prozesse und Schmerzempfindung in Mäusen reduziert [LIM et al., 2007]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass 4-HBA bis zu einer Dosis von 200 mg/kg verabreicht werden kann, ohne neurotoxische Nebenwirkungen zu verursachen [DESCAMPS et al., 2009]. Die Kontrollgruppe erhielt täglich eine i.p. Injektion von 25 µl DMSO.

Zur Untersuchung der Wirkung von 4-HBA auf die ortständigen Gefäße der Rückenhautkammer, wurde eine weitere Gruppe analysiert. In diese Tiere wurden ebenfalls

Rückenhautkammern implantiert, in die jedoch kein Gewebe transplantiert wurde. Die Untersuchung erfolgte analog nach obigem Schema (*Abb. 12*).

Entsprechend ergaben sich für diesen Studienabschnitt die drei nachfolgenden Gruppen:

Behandlungsgruppe (4-HBA): 8 Tiere wurden nach der Transplantation von jeweils 3 Endometriumfragmenten täglich mit 100 mg/kg 4-HBA i.p. behandelt.

Kontrollgruppe (Vehikel): 7 Tiere wurden nach der Transplantation von jeweils 3 Endometriumfragmenten täglich mit dem Vehikel DMSO i.p. behandelt.

Leere Kammer: 4 Tiere wurden ohne eine zuvor erfolgte Transplantation täglich mit 100 mg/kg 4-HBA i.p. behandelt.

Die intravitalmikroskopischen Untersuchungen der Behandlungs- und Kontrollgruppe erfolgten zu den oben genannten Untersuchungszeitpunkten. An allen Untersuchungstagen wurde in 5x Vergrößerung die Transplantatgröße bestimmt. Die funktionelle Kapillardichte der Endometrioseherde wurde in 10x Vergrößerung gemessen und die Durchmesser und Fließgeschwindigkeit für je 10 Gefäße jedes Transplantates in 20x Vergrößerung bestimmt. Nach der Probeentnahme an Tag 14 erfolgten die HE-Färbung der Serienschritte der Kontroll- und Behandlungsgruppe sowie eine immunhistochemische Färbung zur Detektion von cleaved Caspase-3 positiven Zellen.

In der Gruppe „Leere Kammer“ wurde die erste intravitalfluoreszenzmikroskopische Untersuchung an Tag 0 vor der ersten 4-HBA-Gabe durchgeführt, um die unbeeinflusste Morphologie und Mikrohämodynamik der Kammergefäße analysieren zu können. Diese Messung diente als Referenzwert für die nachfolgenden Untersuchungen, welche an Tag 3, 6, 10 und 14 erfolgten. In der ersten intravitalfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung wurden pro Kammer 5 charakteristische Gesichtsfelder ausgewählt, welche jeweils eine Venole und eine Arteriole enthielten (*Abb. 13A*). Diese Beobachtungsfelder wurden zu jedem Untersuchungszeitpunkt mit Hilfe von Bildausdrucken erneut aufgesucht. In den Feldern wurde zunächst in 20x Vergrößerung der Durchmesser und die Blutzellgeschwindigkeit der Arteriole und Venole gemessen (*Abb. 13B*). Durch eine Änderung der Fokusebene wurden im selben Beobachtungsfeld die Kapillaren dargestellt und in 20x Vergrößerung die funktionelle Kapillardichte bestimmt (*Abb. 13C, D*).

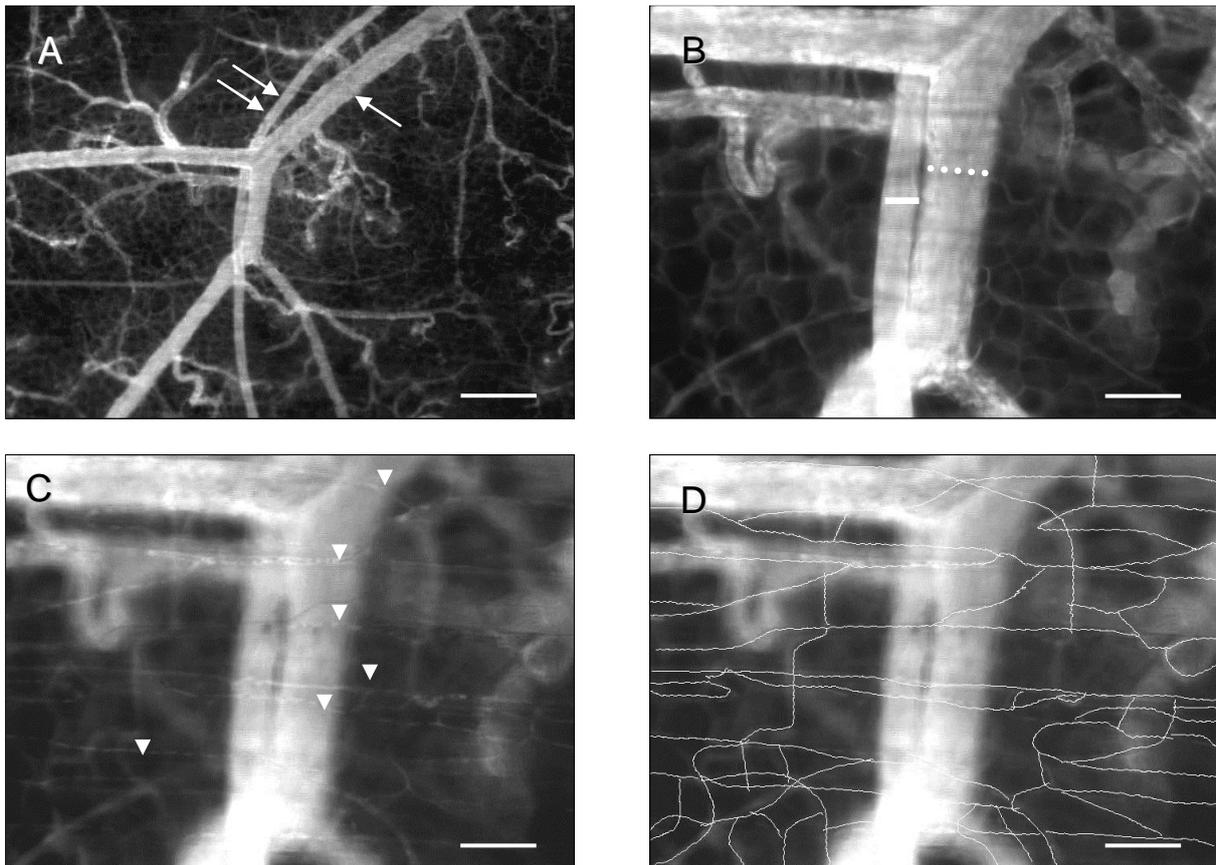


Abbildung 13: **A** Intravitalfluoreszenzmikroskopische Darstellung der Gefäße der Hautmuskelschicht der Rückenhautkammer mit einer Arteriole (Doppelpfeil) und einer Venole (Pfeil). **B** Bestimmung des Durchmessers [μm] der Arteriole (durchgezogene Linie) und Venole (gestrichelte Linie) in 20x Vergrößerung durch Anlage einer orthogonal zur Gefäßwand verlaufenden Strecke. **C** Darstellung der Kapillaren (Pfeilspitzen) durch Änderung der Fokusebene. **D** Bestimmung der funktionellen Kapillardichte [cm/cm^2] durch Nachzeichnen des Kapillarnetzes. (Kontrastverstärkung mit FITC-Dextran in Blaulicht-Epi-Illumination). Maßstab: A = 350 μm ; B - D = 100 μm .

5.2.9.2. Studienabschnitt 2

Zur Behandlung der in der Rückenhautkammer induzierten Tumorsphäroide erhielten die Tiere eine tägliche i.p. Injektion von 200 mg/kg 4-HBA, welches in 25 μl DMSO (100%; Sigma-Aldrich) gelöst wurde. Die Dosisverdopplung im Vergleich zu Studienabschnitt 1 wurde vorgenommen, weil ein maligner Tumor ein naturgemäß aggressiveres Wachstumsverhalten zeigt. Die Kontrollgruppe erhielt täglich eine i.p. Injektion von 25 μl DMSO.

Entsprechend ergaben sich für diesen Studienabschnitt die beiden nachfolgenden Gruppen:

Behandlungsgruppe (4-HBA): 7 Tiere wurden nach der Transplantation von je einem Tumorsphäroid täglich mit 200 mg/kg 4-HBA i.p. behandelt.

Kontrollgruppe (Vehikel): 7 Tiere wurden nach der Transplantation von je einem Tumorsphäroid täglich mit 25 μl DMSO i.p. behandelt.

Die intravitalmikroskopischen Untersuchungen der Tumorsphäroide sowie deren Vaskularisierung erfolgten zu den oben genannten Untersuchungszeitpunkten.

An allen Untersuchungstagen wurde in 4x Vergrößerung die Sphäroidgröße bestimmt. Da der Tumor auf Grund seines starken Wachstums in 10x Vergrößerung nicht komplett darstellbar war, wurde die funktionelle Kapillardichte zunächst in 10x Vergrößerung für das erste Gesichtsfeld am linken Rand des Tumorsphäroids bestimmt. Anschließend wurden auf einer horizontalen Linie durch den Tumor die funktionellen Kapillardichten der nachfolgenden Gesichtsfelder bestimmt, bis der Tumor so in zwei bzw. drei Einstellungen komplett durchfahren war (*Abb. 14*). Aus den so bestimmten Kapillardichten wurde das arithmetische Mittel gebildet. Somit erreichte man einen repräsentativen Wert, der sowohl die Randbereiche als auch das Zentrum des Tumorsphäroids berücksichtigte. Die Durchmesser und die Fließgeschwindigkeit der neu gebildeten Gefäße der Sphäroide wurden in 20x Vergrößerung für je 10 Gefäße bestimmt.

Nach der Probenentnahme an Tag 14 erfolgten eine HE-Färbung der Serienschritte sowie eine immunhistochemische Färbung zur Detektion CD31-positiver Zellen des Gefäßendothels. In 7 Schnitten der Behandlungs- und Kontrollgruppe wurden die Fläche des Tumors [mm^2] und die Anzahl der CD31-positiven Gefäße bestimmt. Diese wurden in Gefäße pro mm^2 angegeben.

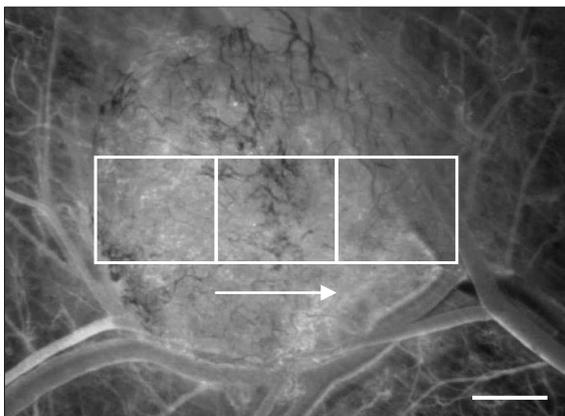


Abbildung 14: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Darstellung eines CT26-Tumorsphäroids in Übersichtsaufnahme. Bestimmung der funktionellen Kapillardichten in den einzelnen Gesichtsfeldern (weiß umrahmte Rechtecke), bis der Tumor auf einer horizontalen Linie durchfahren ist (weißer Pfeil). (Kontrastverstärkung mit FITC-Dextran in Blaulicht-Epi-Illumination). Maßstab: 500 μm .

5.3. Statistik

Die im Ergebnisteil gezeigten Daten sind als Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Sämtliche statistischen Tests wurden mit Hilfe des Statistik-Programms SigmaPlot 11.0 (Jandel Scientific, San Rafael, USA) durchgeführt.

Zunächst erfolgte eine Prüfung der Daten auf Normalverteilung und Gleichheit der Varianzen. Bei Vorliegen einer Normalverteilung der Werte wurde zum Vergleich zweier

Gruppen der *Student's t-Test* für den unverbundenen Paarvergleich angewandt. Bei nicht parametrischen Daten wurde ein *Mann-Whitney-U-Test* für unverbundene Stichproben durchgeführt.

Der Vergleich mehrerer Gruppen erfolgte mit einer *One way analysis of variance* (ANOVA) gefolgt von einem post hoc-Test nach *Bonferroni*. Um wiederholte Messungen in einer Gruppe zu vergleichen, wurde eine ANOVA für wiederholte Messungen gefolgt vom *Student-Newman-Keuls-Test* durchgeführt.

Als statistisch signifikant wurden Unterschiede der Messwerte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ angesehen.

6. ERGEBNISSE

6.1. Wirkung von 4-HBA auf Endothelzellen

6.1.1. Zellvitalität und Zellmorphologie

Zur Untersuchung der Wirkung von 4-HBA bzw. TNP-470 auf die Vitalität von eEND2-Zellen wurden diese mit 1-100 mM 4-HBA bzw. 1-100 μ M TNP-470 inkubiert und ein WST-1-Assay durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass mit zunehmender Konzentration von 4-HBA die Vitalität der Endothelzellen abnahm, wobei sich signifikante Unterschiede zur Vehikel-behandelten Kontrolle ab einer Dosierung von 25 mM 4-HBA ergaben. Die Dosis, bei der die Zellvitalität auf 50% absank (LD_{50}), lag bei 50 mM 4-HBA. Bei den mit TNP-470 inkubierten Zellen war eine vergleichbare Abnahme der Vitalität nachweisbar, wobei die benötigten Dosen jedoch um den Faktor 1000 niedriger waren. Beide Substanzen übten also ähnliche Effekte auf die Vitalität von eEND2-Zellen aus, ihr Wirkspektrum lag jedoch in einem anderen Dosisbereich (Abb. 15).

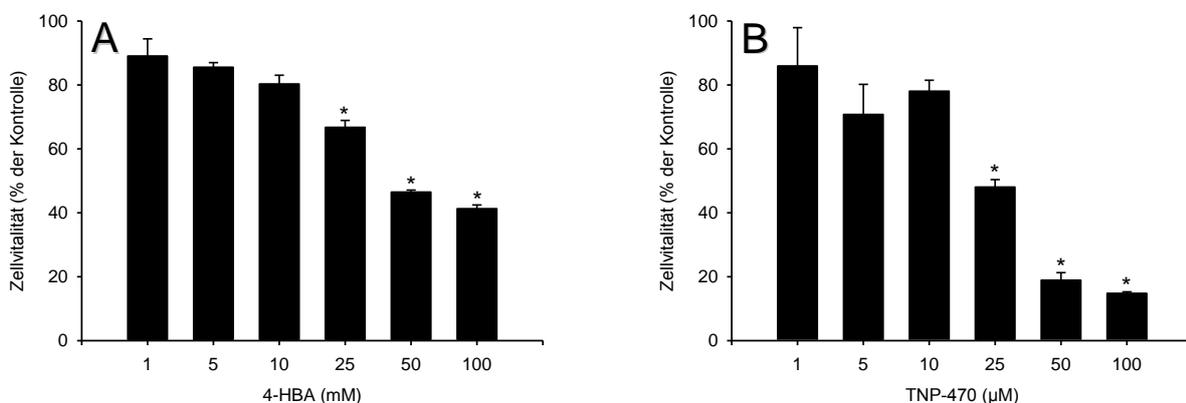


Abbildung 15: **A** Zellvitalität (% der Kontrolle) von eEND2-Zellen im WST-1-Assay, welche 24 h mit verschiedenen 4-HBA Konzentrationen (1-100 mM) inkubiert wurden. **B** Zellvitalität (% der Kontrolle) von eEND2-Zellen im WST-1-Assay, welche 24 h mit verschiedenen TNP-470 Konzentrationen (1-100 μ M) inkubiert wurden. Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0.05$ vs. Kontrolle.

Zur Testung der Reversibilität der Wirkung von 4-HBA wurden die Zellen nach Durchführung des WST-1-Assays für weitere 7 Tage in 4-HBA-freiem DMEM kultiviert. Hier zeigte sich, dass es zu einer kompletten Erholung der Zellen kam, die schließlich wieder eine normale Stoffwechselaktivität aufwiesen.

Außer den Auswirkungen auf die mitochondrialen Stoffwechselvorgänge wiesen die Zellen nach Inkubation mit 4-HBA auch Veränderungen ihrer Morphologie auf. Die Zellen, die

mit 10 mM 4-HBA inkubiert worden waren (*Abb. 16B*), hatten im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Zellen (*Abb. 16A*) einen vergrößerten, geschwollenen Zellkörper. Zudem wiesen sie zahlreiche Zellausläufer auf (*Abb. 16B*). Dagegen waren die Zellen, die mit 25 mM 4-HBA behandelt wurden, länglich und spindelförmig (*Abb. 16C*).

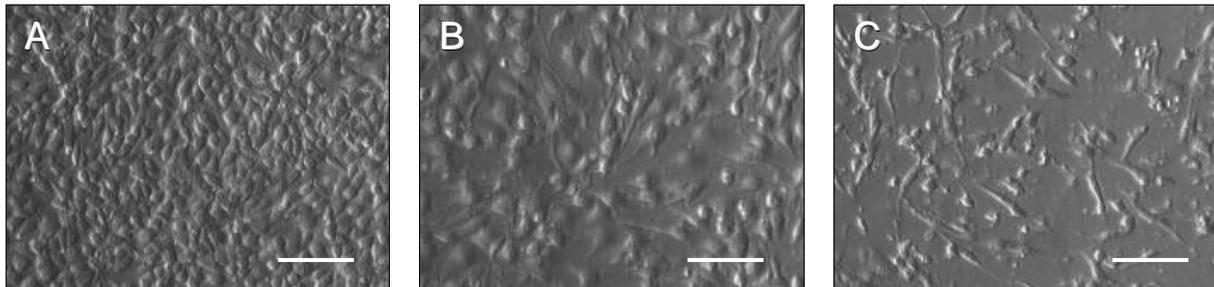


Abbildung 16: Mikroskopische Aufnahmen von eEND2-Zellen, die 24 h in DMEM kultiviert wurden, welches mit Vehikel (**A**, Kontrolle), 10 mM (**B**) oder 25 mM (**C**) 4-HBA angereichert war. Maßstab: A-C = 100 µm.

6.1.2. Zytotoxizität

Um die Zytotoxizität von 4-HBA bzw. TNP-470 auf eEND2-Zellen zu untersuchen, wurde ein LDH-Release-Assay durchgeführt. Hier zeigte sich mit steigender 4-HBA- bzw. TNP-470-Konzentration ein LDH-Anstieg im Nährmedium (*Abb. 17*). Im Vergleich zu 4-HBA traten auch diese Effekte schon bei einer um das 1000-fach niedrigeren TNP-470-Dosierung auf. Konzentrationen von 1 mM und 5 mM 4-HBA hatten dabei keine signifikanten Effekte auf die Zellintegrität der eEND2-Zellen. Bei 50 mM und 100 mM 4-HBA zeigte sich im Vergleich zu den Zellen der Kontrollgruppe eine um mehr als 60% erhöhte LDH-Freisetzung.

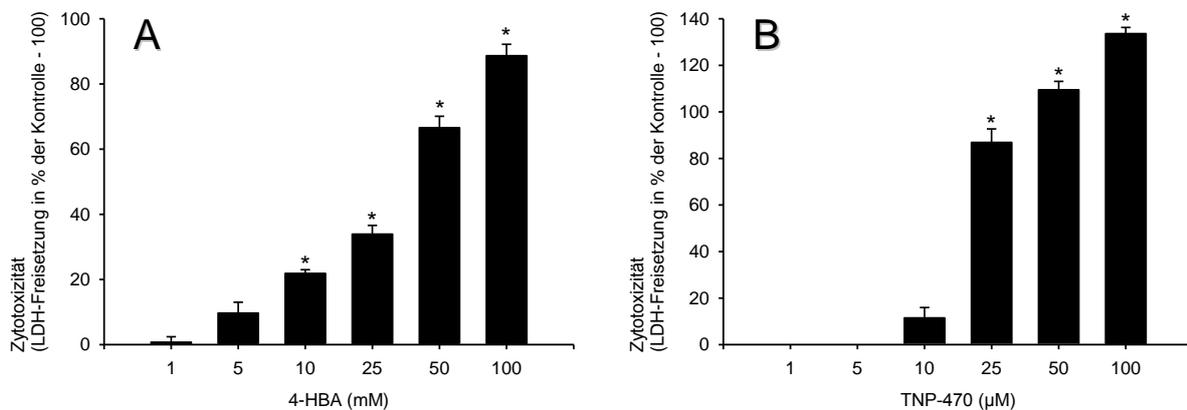


Abbildung 17: **A** Zytotoxische Wirkung von 4-HBA (LDH-Freisetzung in Prozent der Kontrolle – 100) auf eEND2-Zellen im LDH-Release-Assay, welche 24 h mit verschiedenen 4-HBA-Konzentrationen (1-100 mM) inkubiert wurden. **B** Zytotoxische Wirkung von TNP-470 (LDH-Freisetzung in Prozent der Kontrolle – 100) auf eEND2-Zellen im LDH-Release-Assay, welche 24 h mit verschiedenen TNP-470-Konzentrationen (1-100 µM) inkubiert wurden. Mittelwerte ± SEM. *P<0.05 vs. Kontrolle.

Auf Grund der Ergebnisse des WST-1- und LDH-Release-Assays wurden für die folgenden Untersuchungen 4-HBA-Konzentrationen von 10 mM und 25 mM verwendet. In diesem Dosisbereich zeigten die Zellen im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Reduktion der Vitalität auf 80% bzw. 67% bei weitgehend erhaltener Zellintegrität.

6.1.3. Zellmigration

Die Untersuchung der Migration von eEND2-Zellen nach Einwirkung von 4-HBA erfolgte mit einem Transwell-Migrationsassay. In der Vehikel-behandelten Kontrollgruppe migrierten durchschnittlich $113,1 \pm 2,0$ Zellen pro ROI durch die Poren der Filtermembran. Eine Behandlung der Zellen mit 4-HBA führte zu einem signifikanten Rückgang der Zellmigration. Nach einer Inkubation mit 10 mM 4-HBA migrierten nur noch $77,6 \pm 5,2$ Zellen pro ROI. In den mit 25 mM 4-HBA behandelten Ansätzen migrierten durchschnittlich $95,2 \pm 5,3$ Zellen pro ROI durch die Filterporen (Abb. 18).

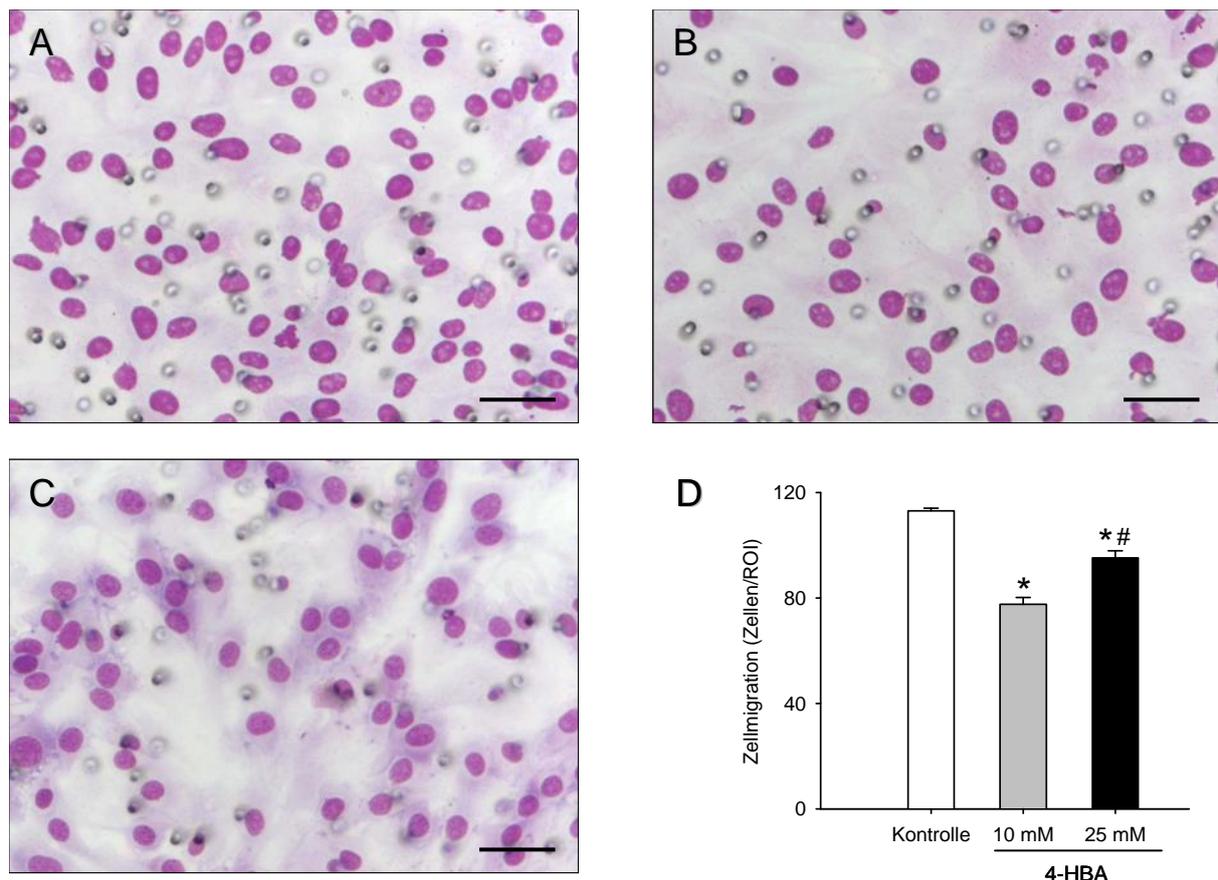


Abbildung 18: A-C Lichtmikroskopische Aufnahmen von eEND2-Zellen, welche im Migrationsassay durch die 8 µm Poren des Polykarbonatfilters gewandert sind. Die Zellen wurden 24 h in DMEM inkubiert, welches mit Vehikel (A, Kontrolle), 10 mM 4-HBA (B) oder 25 mM 4-HBA (C) angereichert war. D Zellmigration (Zellen/ROI) von eEND2-Zellen im Migrationsassay, die 24 h in DMEM inkubiert wurden, welches mit Vehikel (weißer Balken, Kontrolle), 10 mM 4-HBA (grauer Balken) oder 25 mM 4-HBA (schwarzer Balken) angereichert war. Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0.05$ vs. Kontrolle; # $P < 0.05$ vs. 10 mM 4-HBA. Maßstab: A-C = 80 µm.

Interessanterweise zeigten also die Zellen, die mit 25 mM 4-HBA behandelt wurden, im Vergleich zu den Zellen, die mit 10 mM 4-HBA behandelten wurden, eine signifikant höhere Migration. Dies könnte auf die durch 4-HBA induzierte Vergrößerung der Zellkörper zurückzuführen sein (*Abb. 16B, C*), welche nach der Behandlung mit 10 mM 4-HBA stärker ausgeprägt war, als nach der Behandlung mit 25 mM 4-HBA.

6.1.4. Organisation der Aktinfilamente

Zur Analyse der Effekte von 4-HBA auf das Zytoskelett der eEND2-Zellen wurde eine Phalloidin-Färbung durchgeführt. Hier zeigte sich, dass Vehikel-behandelte Zellen ein physiologisches, regulär angeordnetes Zytoskelett aufwiesen (*Abb. 19A*).

Eine Inkubation mit 4-HBA führte dagegen zu einer veränderten Morphologie und Verteilung der Aktinfilamente. So wiesen die Zellen, die mit 10 mM 4-HBA behandelt wurden, eine massive perinukleäre Aggregation des Aktins auf (*Abb. 19B*). Es zeigten sich Verklumpungen und ein Verlust der ursprünglich retikulären Form der Aktinfilamente.

In den Zellen, die mit 25 mM 4-HBA behandelt wurden, war die Morphologie des Aktins vergleichbar. Die Zellkörper waren jedoch im Vergleich zu den Zellen, die mit 10 mM 4-HBA behandelten wurden, auffallend kleiner (*Abb. 19C*).

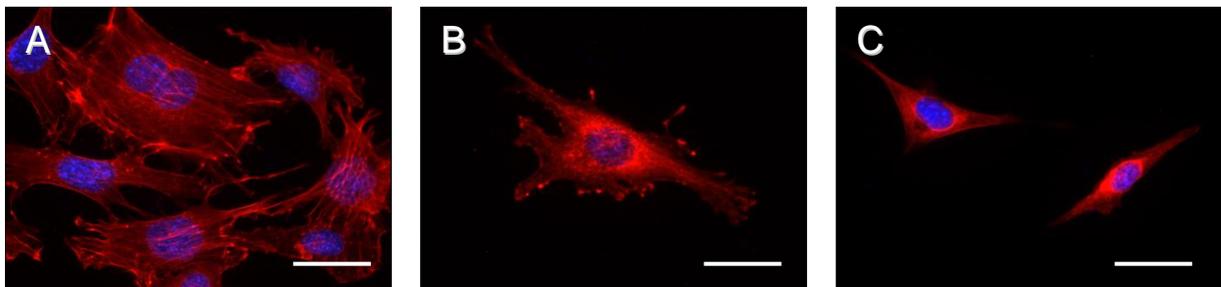


Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von eEND2-Zellen, die 24 h in DMEM inkubiert wurden, welches mit Vehikel (**A**, Kontrolle), 10 mM 4-HBA (**B**) oder 25 mM 4-HBA (**C**) angereichert war. Die Zellen wurden mit Alexa-568 nm-konjugiertem Phalloidin gefärbt (rot) und die Zellkerne mit Bisbenzimid markiert (blau). Maßstab: A-C = 45 μ m.

6.1.5. Proteinexpression

Die Effekte von 4-HBA auf die Proteinexpression von eEND2-Zellen wurden mit Western Blot Analysen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass eine Inkubation der Zellen mit 4-HBA im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer signifikant reduzierten Expression der pro-angiogenen Faktoren VEGF und MMP9 führte. Weiterhin wurde in den 4-HBA-behandelten Zellen PCNA, ein Marker der Zellproliferation, signifikant verringert exprimiert (*Abb. 20*). Signifikante

Unterschiede von 10 mM bzw. 25 mM 4-HBA in Bezug auf die Proteinexpression der Zellen zeigten sich dabei nicht.

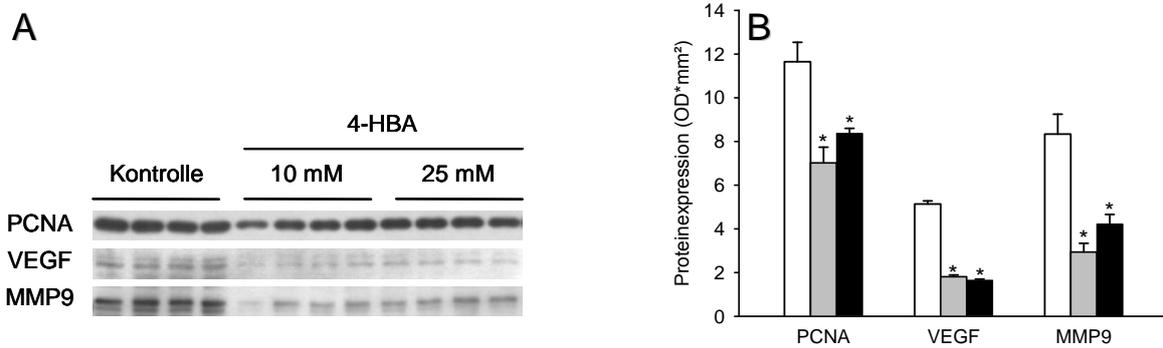


Abbildung 20: **A** Western Blot Analysen der PCNA-, VEGF- und MMP9-Expression von eEND2-Zellen, die 24 h in DMEM inkubiert wurden, welches mit Vehikel (Kontrolle), 10 mM oder 25 mM 4-HBA angereichert war. **B** Proteinexpression (optische Dichte (OD)*mm²) von PCNA, VEGF und MMP9 in eEND2-Zellen, die 24 h in DMEM inkubiert wurden, welches mit Vehikel (Kontrolle, weiße Balken), 10 mM (graue Balken) oder 25 mM (schwarze Balken) 4-HBA angereichert war. Mittelwerte ± SEM. *P<0.05 vs. Kontrolle.

6.1.6. Aortenring-Assay

Um die Wirkung von 4-HBA bzw. TNP-470 auf das Aussprossen von Gefäßen zu untersuchen, wurde der Aortenring-Assay der Ratte durchgeführt.

Die Aortenringe, die mit dem Vehikel DMSO inkubiert wurden, zeigten nach 6 Tagen ein dichtes Netzwerk von Gefäßen (Abb. 21A). Die Fläche, die durch die Gefäßsprossen bedeckt wurde, betrug 7,0 ± 0,7 mm². Die maximale Länge der Gefäßsprossen war 1210 ± 65 µm. Dagegen kam es in den Aortenringen, die mit 10 µM (Abb. 21B) bzw. 25 µM TNP-470 behandelt wurden, zu einer Reduktion der mit Gefäßsprossen bedeckten Fläche (2,6 ± 0,3 mm² bzw. 2,3 ± 0,3 mm²) und der maximalen Länge der Gefäße (735 ± 86 µm bzw. 755 ± 58 µm). Die Behandlung der Aortenringe mit 10 mM (Abb. 21C) oder 25 mM 4-HBA führte zu einer kompletten Inhibition der Ausbildung neuer Mikrogefäße (P<0,05).

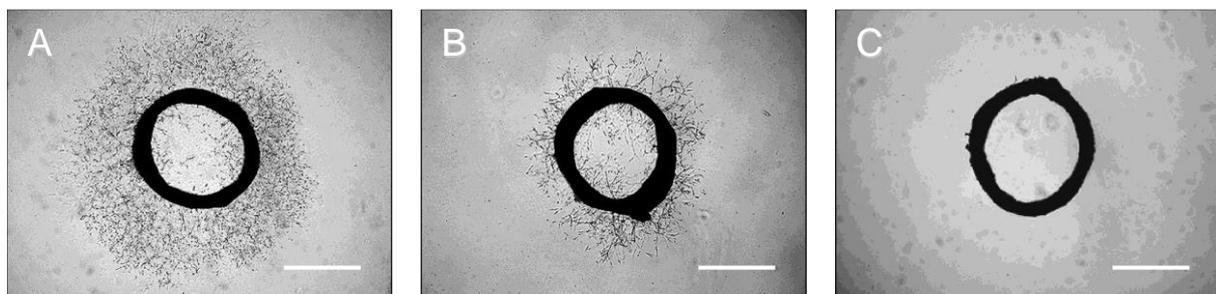


Abbildung 21: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von Aortenringen der Ratte, die 6 Tage in DMEM inkubiert wurden, welches mit Vehikel (**A**, Kontrolle), 10 µM TNP-470 (**B**) oder 10 mM 4-HBA (**C**) angereichert war. Maßstab: A-C = 1250 µm.

6.2. Wirkung von 4-HBA auf Endometrioseherde

6.2.1. Wachstum der Herde

Um die Wirkung von 4-HBA auf das Wachstum von sich entwickelnden Endometrioseherden *in vivo* zu untersuchen, wurden Endometriumfragmente in Rückenhautkammern transplantiert und zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Die Behandlung der Tiere mit 4-HBA führte zu einem signifikant verringerten Wachstum der Endometrioseherde. An Tag 14 maßen die Herde der Behandlungsgruppe durchschnittlich 89% ihrer Initialgröße (Abb. 22B, C), sodass 4-HBA nicht nur zu einer Wachstumsverzögerung, sondern zu einer Verkleinerung der Herde führte. Dagegen zeigten die Herde der Kontrollgruppe an Tag 14 nahezu eine Verdopplung ihrer Initialgröße (Abb. 22A, C).

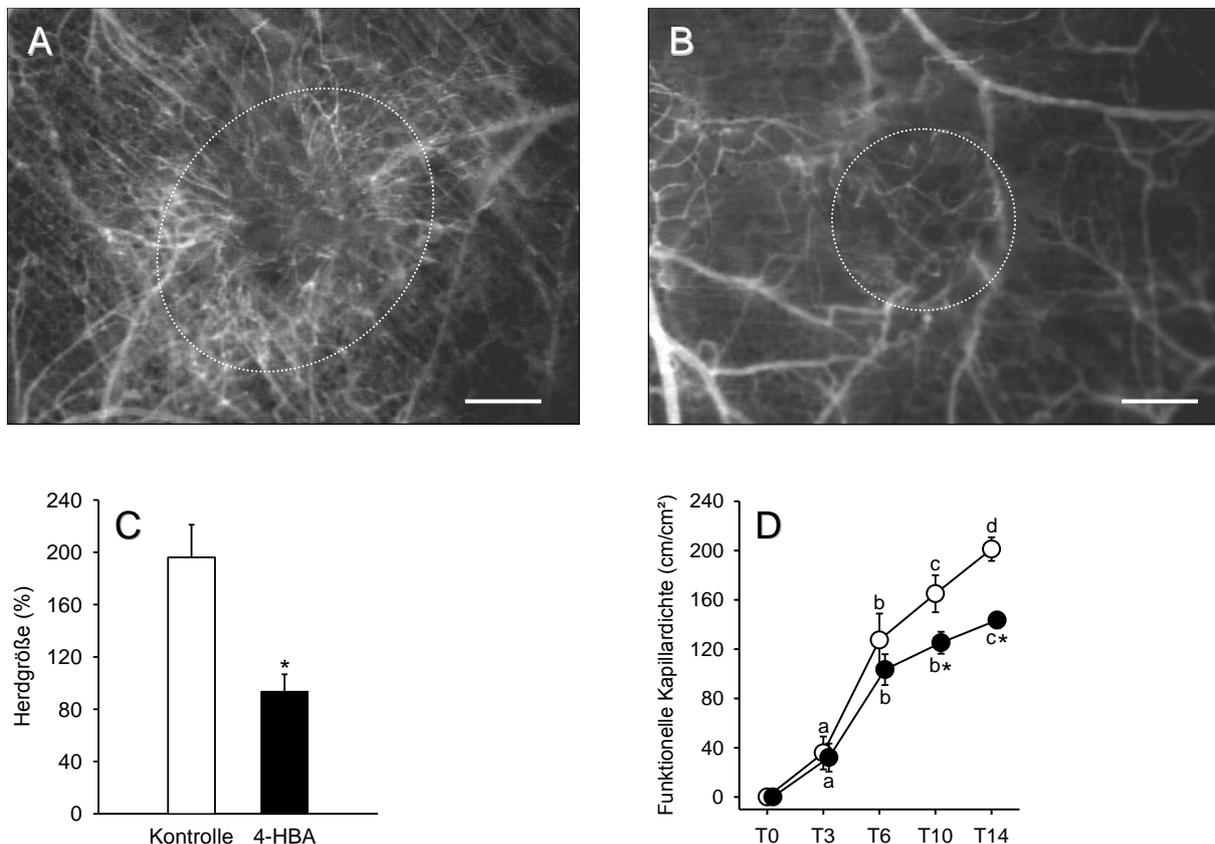


Abbildung 22: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Endometrioseherden (Grenze mit gestrichelter Linie markiert) an Tag 14 nach Transplantation von Endometriumfragmenten in die Rückenhautkammer einer Vehikel-behandelten (A) und einer 4-HBA-behandelten (B) Maus. Der mit 4-HBA behandelte Endometrioseherd zeigt eine deutlich verringerte funktionelle Kapillardichte und Herdgröße (B) (Kontrastverstärkung mit FITC-Dextran in Blaulicht-Epi-Illumination). C Herdgröße (%) von Endometrioseherden in der Rückenhautkammer Vehikel-behandelter Kontrolltiere und 4-HBA-behandelter C57BL/6-Mäuse an Tag 14. D Funktionelle Kapillardichte (cm/cm²) von Endometrioseherden in der Rückenhautkammer Vehikel-behandelter Kontrolltiere (weiße Kreise) und 4-HBA-behandelter C57BL/6-Mäuse (schwarze Kreise) über den 14-tägigen Untersuchungszeitraum. Mittelwerte ± SEM. ^aP<0.05 vs. Tag 0 innerhalb einer Gruppe; ^bP<0.05 vs. Tag 0 und 3 innerhalb einer Gruppe; ^cP<0.05 vs. Tag 0, 3 und 6 innerhalb einer Gruppe; ^dP<0.05 vs. Tag 0, 3, 6 und 10 innerhalb einer Gruppe. *P<0.05 vs. Kontrolle. Maßstab: A, B = 350 µm.

6.2.2. Entwicklung mikrovaskulärer Netzwerke

In den sich entwickelnden Endometrioseherden der Kontroll- und Behandlungsgruppe konnten die ersten neugebildeten Gefäße schon am 3. Tag nach Transplantation der Endometriumfragmente in die Rückenhautkammer nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf bildete sich mit steigender Vaskularisierung der Herde ein Glomerulum-ähnliches Gefäßnetzwerk aus. Die Herde der Kontrollgruppe wiesen dabei dichtere Gefäßnetzwerke auf. Ein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe war an Tag 10 und Tag 14 zu verzeichnen. Die Herde der Kontrollgruppe zeigten an Tag 10 eine funktionelle Kapillardichte von 165 cm/cm² bzw. von 200 cm/cm² an Tag 14 (Abb. 22A, D). Unter 4-HBA-Einwirkung kam es zu einer signifikanten Reduktion der funktionellen Kapillardichte von 125 cm/cm² an Tag 10 bzw. 140 cm/cm² an Tag 14 (Abb. 22B, D).

6.2.3. Mikrohämodynamik

Bei der Auswertung der mikrohämodynamischen Parameter zeigten sich in den Endometrioseherden der Behandlungs- und Kontrollgruppe nur geringfügige Unterschiede (Tab. 2).

Die Kapillardurchmesser der Behandlungsgruppe waren an Tag 3 signifikant geringer, was jedoch im weiteren Verlauf nicht mehr nachzuweisen war. In beiden Gruppen war die Blutzellgeschwindigkeit an Tag 3 am niedrigsten und stieg im Zeitverlauf an. Unterschiede der Blutzellgeschwindigkeit zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe waren nicht vorhanden. Der Blutvolumenfluss zeigte in der Behandlungsgruppe niedrigere Werte, die jedoch ebenfalls nicht signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe waren.

	T3	T6	T10	T14
Kapillardurchmesser (μm)				
4-HBA	12,1 \pm 0,6*	14,8 \pm 0,7	13,1 \pm 0,4	13,9 \pm 1,0
Kontrolle	14,8 \pm 0,6	15,0 \pm 0,8	14,7 \pm 0,7	15,0 \pm 1,0
Blutzellgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)				
4-HBA	133 \pm 39	291 \pm 35	350 \pm 42 ^a	362 \pm 9 ^a
Kontrolle	194 \pm 56	367 \pm 57	377 \pm 22 ^a	368 \pm 22
Blutvolumenfluss (pl/s)				
4-HBA	11 \pm 4	8 \pm 5	38 \pm 6	44 \pm 8 ^a
Kontrolle	26 \pm 8	54 \pm 14	51 \pm 5	53 \pm 8

Tabelle 2: Mikrohämodynamische Parameter von Gefäßen in Endometrioseherden der Behandlungs- und Kontrollgruppe zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten. Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. Kontrolle. ^a $P < 0,05$ vs. Tag 3 innerhalb einer Gruppe.

6.2.4. Wirkung von 4-HBA auf bereits existierende Gefäße

Die Untersuchung der Rückenhautkammern, in welche keine Gewebetransplantation erfolgte, zeigte, dass 4-HBA auf bereits existierende Blutgefäße keine toxischen Effekte ausübt.

Als Referenzwerte dienten die mikrohämodynamischen Parameter an Tag 0, welche vor der ersten Gabe von 4-HBA gemessen wurden. Im Vergleich zu diesen zeigte sich über den gesamten 14-tägigen Untersuchungszeitraum eine unauffällige Mikrohämodynamik der Arteriolen und Venolen. Des Weiteren war auch die funktionelle Kapillardichte der quergestreiften Muskulatur der Rückenhautkammer konstant (Tab. 3).

	T0	T3	T6	T10	T14
Durchmesser (μm)					
Arteriole	45,3 \pm 1,4	47,8 \pm 3,0	50,7 \pm 6,0	58,3 \pm 5,3	53,9 \pm 4,4
Venole	67,0 \pm 7,1	60,1 \pm 12,1	62,6 \pm 14,6	64,1 \pm 12,9	50,5 \pm 5,1
Blutzellgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)					
Arteriole	1092 \pm 117	1113 \pm 141	1165 \pm 62	1170 \pm 26	892 \pm 89
Venole	497 \pm 167	696 \pm 179	669 \pm 132	832 \pm 74	547 \pm 139
Kapillardichte (cm/cm^2)					
	192 \pm 2	188 \pm 5	184 \pm 3	186 \pm 1	190 \pm 2

Tabelle 3: Mikrohämodynamische Parameter der ortständigen Gefäße der Rückenhautkammer von 4-HBA-behandelten Mäusen ($n=4$) zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten. Mittelwerte \pm SEM.

6.2.5. Histologie und Immunhistochemie

Die histologische Untersuchung der HE-gefärbten Transplantate an Tag 14 zeigte, dass sich sowohl in der Kontroll- als auch in der Behandlungsgruppe aus den isolierten Endometriumfragmenten typische Endometrioseherde entwickelt hatten. Diese setzten sich aus endometrialem Drüsengewebe sowie vaskularisiertem endometrialem Stroma zusammen (Abb. 23A, B).

In den Stroma- und Drüsenzellen der 4-HBA-behandelten Endometrioseherde (Abb. 23D) zeigte sich eine vermehrte Expression des Apoptosemarkers cleaved Caspase-3 im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Herden der Kontrollgruppe (Abb. 23C).

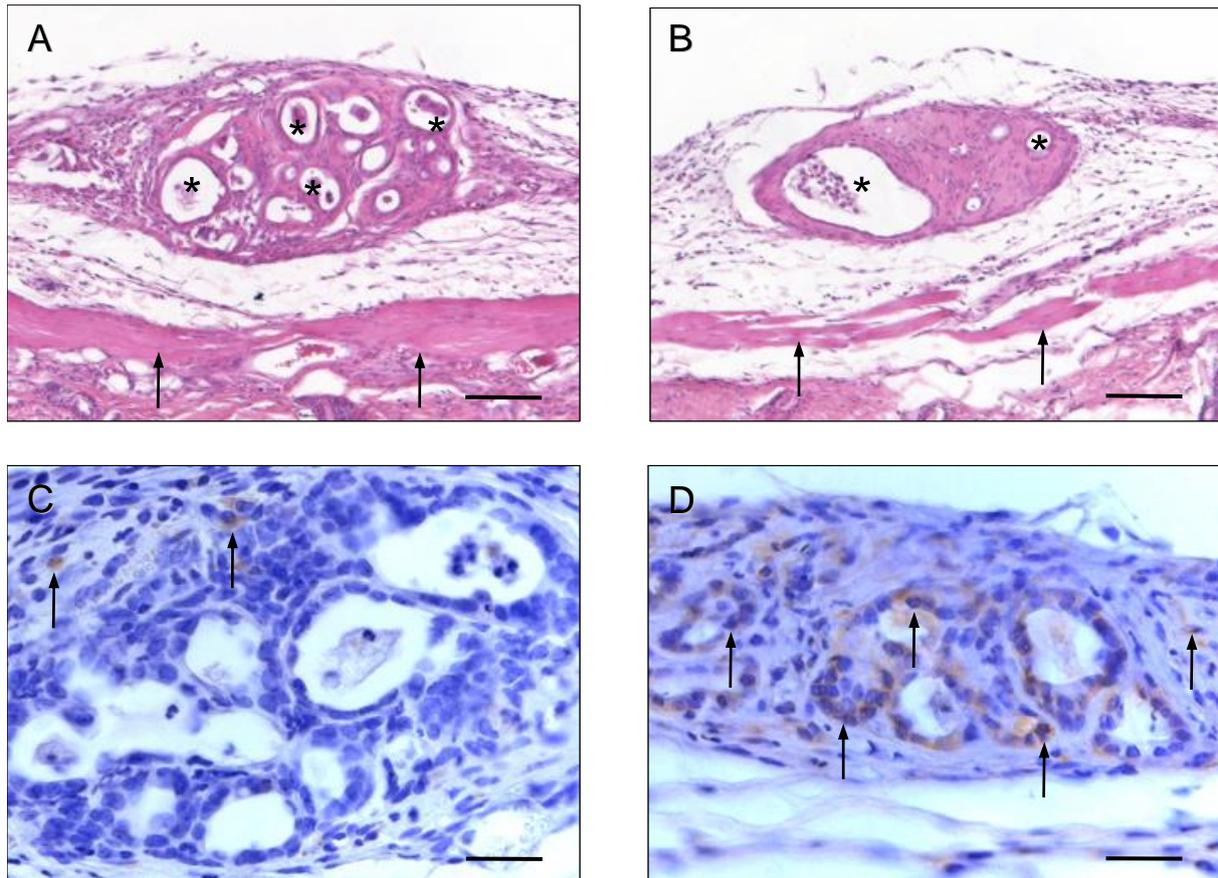


Abbildung 23: **A, B** HE-Färbung der Endometriumfragmente an Tag 14 nach Transplantation auf den quergestreiften Hautmuskel (Pfeile) der Rückenhautkammer einer Vehikel-behandelten (**A**) und einer 4-HBA-behandelten Maus (**B**). Beide Fragmente haben sich zu typischen Endometrioseherden entwickelt, die durch dilatierte endometriale Drüsen (Sterne) gekennzeichnet sind, welche von vaskularisiertem endometrialem Stroma umgeben sind. **C, D** Immunhistochemische cleaved Caspase-3-Färbung (Pfeile) der Endometrioseherde einer Vehikel-behandelten (**C**) und einer 4-HBA-behandelten Maus (**D**). In dem 4-HBA-behandelten Herd zeigt sich eine vermehrte Apoptose der Drüsen- und Stromazellen im Vergleich zur Kontrolle. Maßstab: A, B = 90 μ m; C, D = 25 μ m.

6.3. Wirkung von 4-HBA auf Tumorzellen

6.3.1. Zellvitalität und Zellmorphologie

Zur Untersuchung der Wirkung von 4-HBA auf die Vitalität von CT26-Zellen wurden diese mit 1-100 mM 4-HBA inkubiert und ein WST-1-Assay durchgeführt. Hier zeigte sich mit steigender Konzentration von 4-HBA eine zunehmende Reduktion der Zellvitalität. Bei einer Konzentration von 25 mM 4-HBA war die Zellvitalität im Vergleich zur Vehikel-behandelten Kontrollgruppe signifikant um 40% reduziert (*Abb. 24D*).

Weiterhin fanden sich unter der Einwirkung von 4-HBA morphologische Veränderungen der CT26-Zellen. So wiesen die Zellen der Kontrollgruppe eine kleine, rundliche Form auf, während es nach Inkubation mit 4-HBA zu einer Vergrößerung der Zellkörper und zur Ausbildung zahlreicher Zellfortsätze kam (*Abb. 24A-C*).

6.3.2. Zytotoxizität

Um die Zytotoxizität von 4-HBA auf CT26-Zellen zu untersuchen, wurde ein LDH-Release-Assay durchgeführt. Hier zeigte sich im niedrigen Dosisbereich (1-25 mM 4-HBA) eine erhaltene Zellintegrität. Ein signifikanter zytotoxischer Effekt von 4-HBA auf die CT26-Zellen war erst bei einer Konzentration von 50 mM und 100 mM 4-HBA nachweisbar (Abb. 24E).

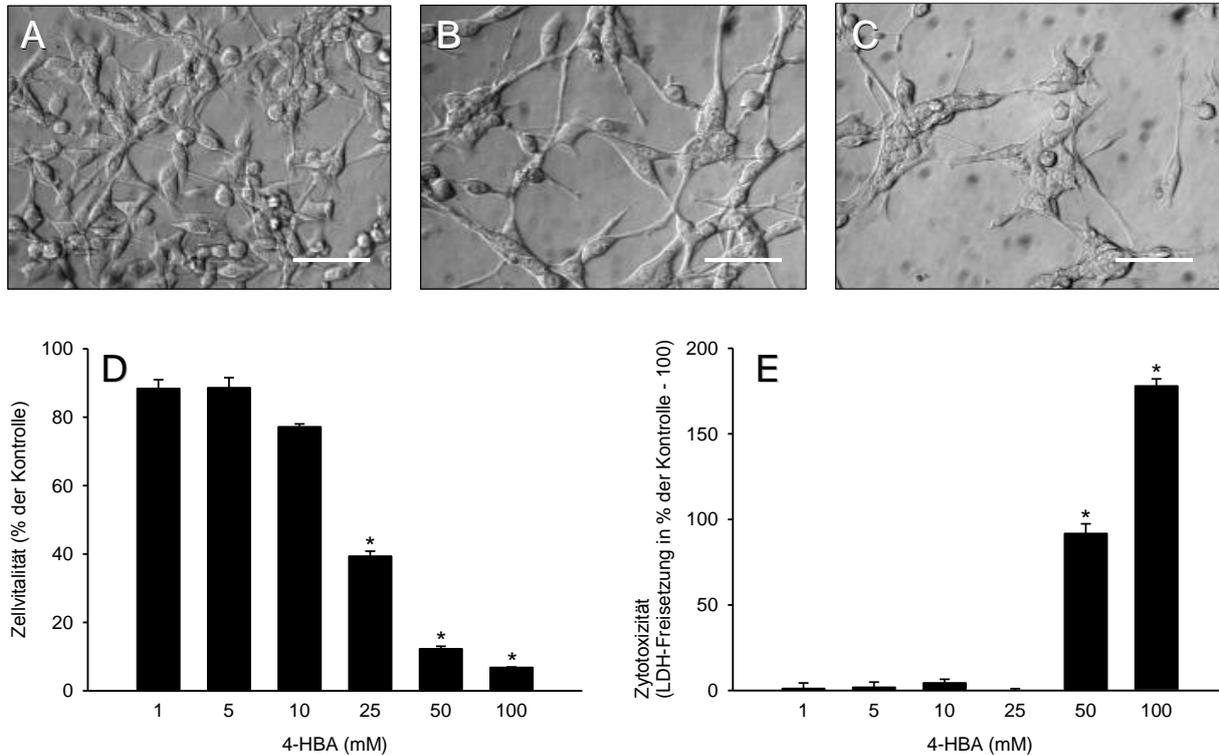


Abbildung 24: A-C Mikroskopische Aufnahmen von CT26-Zellen, die 24 h in RPMI-1640 kultiviert wurden, welches mit Vehikel (A, Kontrolle), 10 mM (B) oder 25 mM (C) 4-HBA angereichert war. D Zellvitalität (% der Kontrolle) der CT26-Zellen im WST-1-Assay, welche 24 h mit verschiedenen 4-HBA-Konzentrationen (1-100 mM) inkubiert wurden. E Zytotoxische Wirkung von 4-HBA (LDH-Freisetzung in Prozent der Kontrolle - 100) auf CT26-Zellen im LDH-Release-Assay, welche 24 h mit verschiedenen 4-HBA-Konzentrationen (1-100 mM) inkubiert wurden. Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0.05$ vs. Kontrolle. Maßstab: A-C = 85 μ m.

6.3.3. Zellmigration

Die Migrationsfähigkeit von 4-HBA-behandelten CT26-Zellen wurde mit einem Transwell-Migrationsassay analysiert. Bei den Zellen der Kontrollgruppe (Abb. 25A) migrierten durchschnittlich $28,8 \pm 1,9$ Zellen pro ROI. Eine Inkubation der Zellen mit 4-HBA führte zu einer signifikanten Reduktion der Zellmigration. So war durch die Behandlung mit 10 mM 4-HBA eine Migration von lediglich $4,9 \pm 0,3$ Zellen pro ROI nachweisbar (Abb. 25B). Bei den mit 25 mM 4-HBA inkubierten Zellen fand sich eine leicht vermehrte Migration von $4 \pm 1,4$ Zellen pro ROI (Abb. 25C).

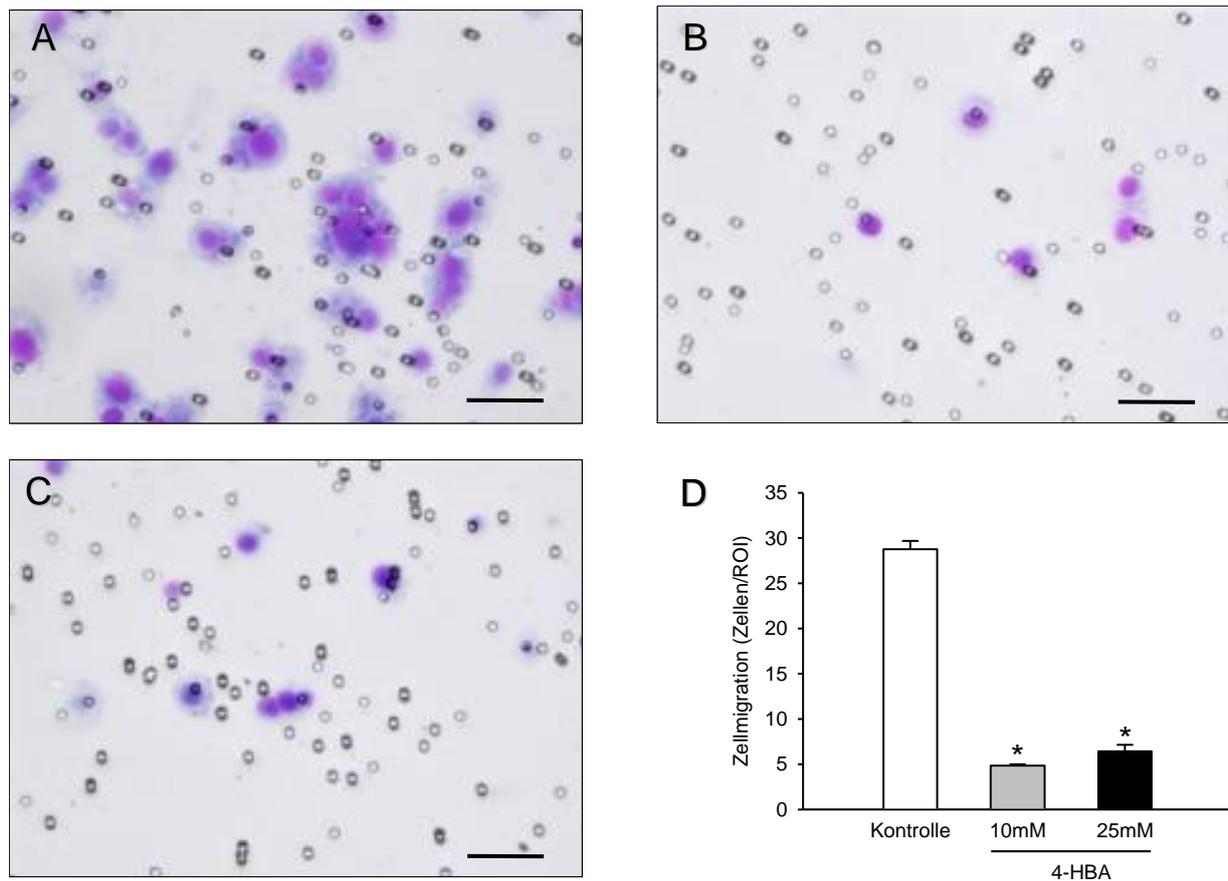


Abbildung 25: A-C Lichtmikroskopische Aufnahmen von CT26-Zellen, welche im Migrationsassay durch die 8 µm Poren des Polykarbonatfilters gewandert sind. Die Zellen wurden 24 h in RPMI-1640 kultiviert, welches mit Vehikel (A, Kontrolle), 10 mM 4-HBA (B) oder 25 mM 4-HBA (C) angereichert war. D Zellmigration (Zellen pro ROI) von CT26-Zellen, die 24 h in RPMI-1640 inkubiert wurden, welches mit Vehikel (weißer Balken, Kontrolle), 10 mM (grauer Balken) oder 25 mM 4-HBA (schwarzer Balken) angereichert war. Mittelwerte ± SEM. *P<0.05 vs. Kontrolle. Maßstab: A-C = 42 µm.

6.3.4. Zellinvasion

Im Invasionsassay wiesen 4-HBA-behandelte Tumorzellen im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Zellen eine signifikant verringerte Invasion in das Matrigel auf. Bei den Zellen der Kontrollgruppe invadierten $72,7 \pm 1,8$ Zellen/ROI die extrazelluläre Matrix. Eine Inkubation der Zellen mit 10 mM bzw. 25 mM 4-HBA führte zu einer reduzierten Invasion von $49,9 \pm 8,0$ Zellen/ROI bzw. $46,5 \pm 6,2$ Zellen /ROI (Abb. 26).

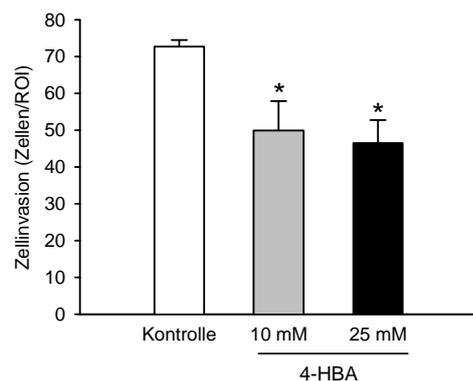


Abbildung 26: Zellinvasion (Zellen/ROI) von CT26-Zellen, die 24 h in RPMI-1640 inkubiert wurden, welches mit Vehikel (weißer Balken, Kontrolle), 10 mM (grauer Balken) oder 25 mM 4-HBA (schwarzer Balken) angereichert war. Mittelwerte ± SEM. *P<0.05 vs. Kontrolle.

6.3.5. Organisation der Aktinfilamente

Die Untersuchung des Zytoskeletts der CT26-Zellen mittels Phalloidin-Färbung zeigte, dass die Aktinfilamente der Vehikel-behandelten Zellen homogen um den Zellkern verteilt waren (Abb. 27A). Die Tumorzellen, die mit 10 mM (Abb. 27B) oder 25 mM (Abb. 27C) 4-HBA inkubiert wurden, wiesen dagegen ein desorganisiertes Zytoskelett mit Aggregationen der Aktinfilamente auf. Des Weiteren waren ihre Zellkörper deutlich vergrößert und hatten zahlreiche zelluläre Fortsätze.

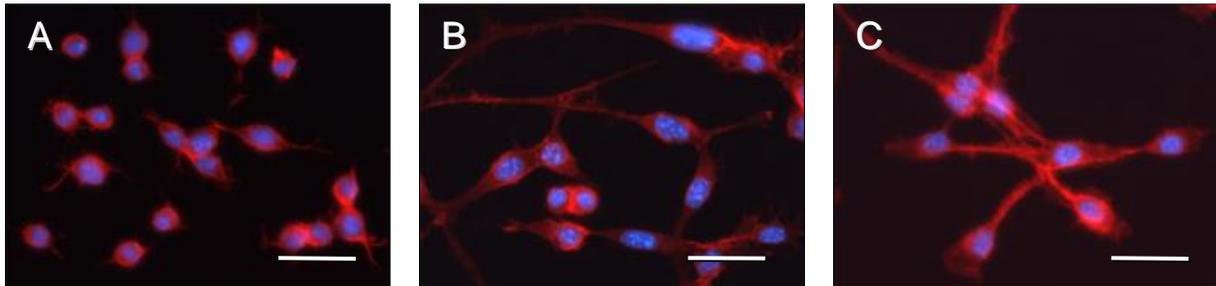


Abbildung 27: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von CT26-Zellen, die 24 h in RPMI-1640 inkubiert wurden, welches mit Vehikel (A, Kontrolle), 10 mM (B) oder 25 mM 4-HBA (C) angereichert war. Die Zellen wurden mit Alexa-568 nm-konjugiertem Phalloidin gefärbt (rot) und die Zellkerne mit Bisbenzimid markiert (blau). Maßstab: A-C = 40 µm.

6.3.6. Proteinexpression

Die Western Blot Analysen der CT26-Zellen zeigten, dass 4-HBA in Tumorzellen Apoptose induziert. Die CT26-Zellen, die 10 mM oder 25 mM 4-HBA ausgesetzt waren, zeigten eine signifikant gesteigerte Expression der cleaved Caspase-3. Weiterhin war die Expression wichtiger regulatorischer Proteine der Angiogenese, wie VEGF precursor, VEGF und MMP9, im Vergleich zu den Zellen der Kontrollgruppe signifikant reduziert (Abb. 28).

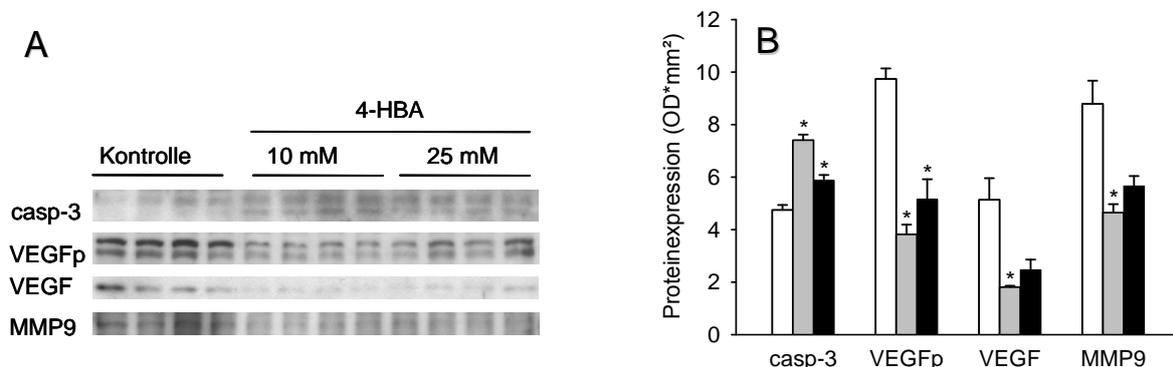


Abbildung 28: A Western Blot Analysen der Expression von cleaved Caspase-3 (casp-3), VEGF precursor (VEGFp), VEGF und MMP9 in CT26-Zellen, die 24 h in RPMI-1640-Medium inkubiert wurden, welches mit Vehikel (Kontrolle), 10 mM oder 25 mM 4-HBA angereichert war. B Proteinexpression (optische Dichte) von casp-3, VEGFp, VEGF und MMP9 in CT26-Zellen, die 24 h in RPMI-1640 inkubiert wurden, welches mit Vehikel (Kontrolle, weiße Balken), 10 mM (graue Balken) oder 25 mM 4-HBA (schwarze Balken) angereichert war. Mittelwerte ± SEM. *P<0.05 vs. Kontrolle.

6.4. Wirkung von 4-HBA auf Tumorzellsphäroide

6.4.1. Wachstum der Tumore

Um die Wirkung von 4-HBA auf das Wachstum von malignem Gewebe zu untersuchen, wurden CT26-Tumorzellsphäroide in die Rückenhautkammer von BALB/c-Mäusen transplantiert. In der Behandlungs- und Kontrollgruppe wiesen die Sphäroide eine vergleichbare initiale Größe von $1,1 \pm 0,1 \text{ mm}^2$ bzw. $1,3 \pm 0,1 \text{ mm}^2$ auf, wodurch im weiteren Versuchsablauf größenabhängige Unterschiede der Tumorentwicklung ausgeschlossen werden konnten. Die Tumore der 4-HBA-behandelten Tiere zeigten schon ab Tag 3 eine signifikante Wachstumsverzögerung, welche über den gesamten Untersuchungszeitraum nachweisbar war. Dennoch war auch unter Einfluss von 4-HBA an Tag 14 eine Verdreifachung der initialen Tumorgöße zu verzeichnen. Die Tumore der Kontrollgruppe zeigten dagegen an Tag 14 eine Verfünffachung ihrer initialen Größe (Abb. 29A, C).

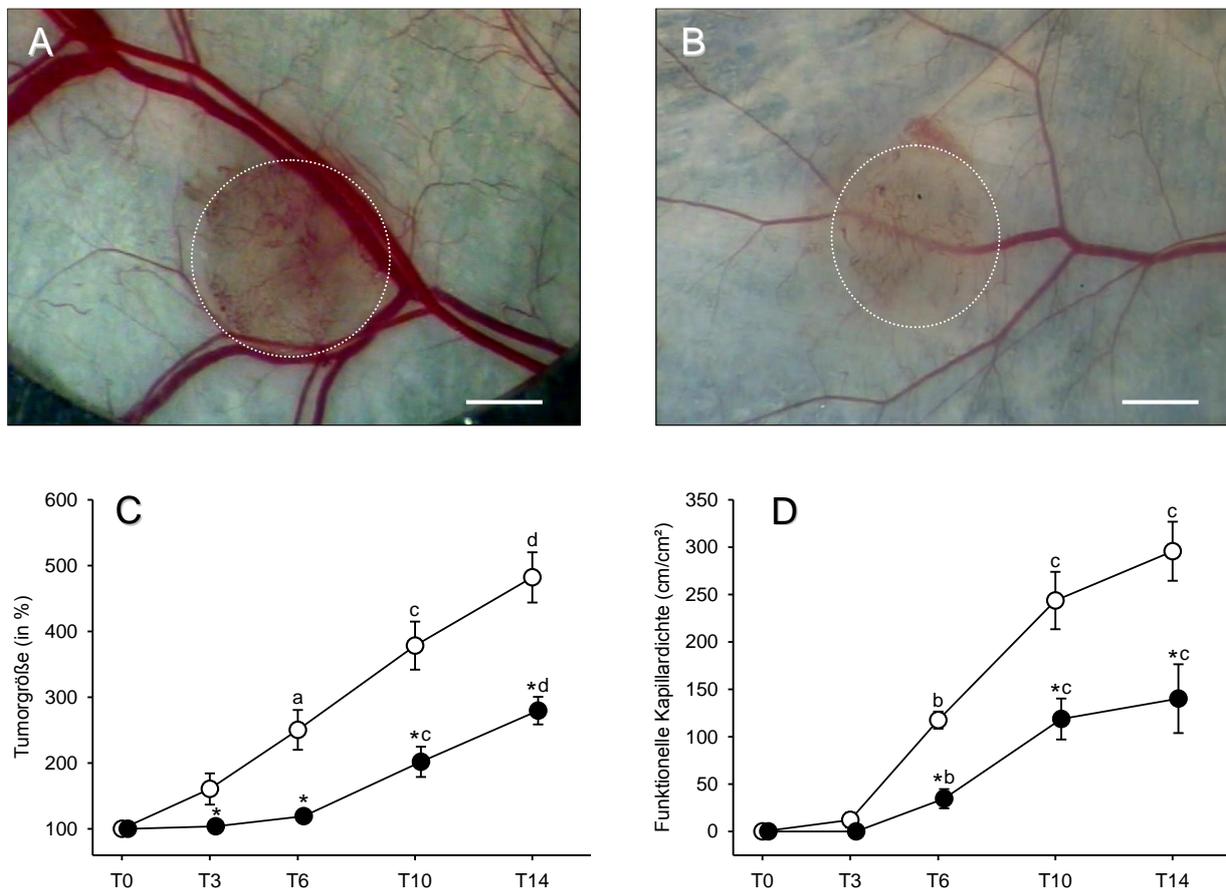


Abbildung 29: **A, B** Auflichtmikroskopische Aufnahme eines CT26-Tumors an Tag 14 nach Transplantation eines Tumorzellsphäroids in die Rückenhautkammer einer Vehikel-behandelten (**A**) und einer 4-HBA-behandelten BALB/c-Maus (**B**). **C** Tumorgöße (%) von Sphäroiden in der Rückenhautkammer Vehikel-behandelter Kontrolltiere (weiße Kreise) und 4-HBA-behandelter BALB/c-Mäuse (schwarze Kreise). **D** Funktionelle Kapillardichte (cm/cm²) von Tumorsphäroiden in der Rückenhautkammer Vehikel-behandelter Kontrolltiere (weiße Kreise) und 4-HBA-behandelter BALB/c-Mäuse (schwarze Kreise). Mittelwerte \pm SEM. ^a $P < 0.05$ vs. Tag 0 innerhalb der Gruppe; ^b $P < 0.05$ vs. Tag 0 und 3 innerhalb einer Gruppe; ^c $P < 0.05$ vs. Tag 0, 3 und 6 innerhalb einer Gruppe; ^d $P < 0.05$ vs. Tag 0, 3, 6 und 10 innerhalb einer Gruppe; * $P < 0.05$ vs. Kontrolle. Maßstab: A, B = 1000 μm .

6.4.2. Entwicklung mikrovaskulärer Netzwerke

Die ersten neugebildeten Gefäße waren in den Tumorsphäroiden der Kontrollgruppe schon am 3. Tag nach Transplantation nachweisbar. Im weiteren Verlauf bildete sich in diesen Tumoren ein dichtes Gefäßnetzwerk aus, welches schließlich eine funktionelle Kapillardichte von 300 cm/cm^2 an Tag 14 aufwies.

In den Tieren, die mit 4-HBA behandelt wurden, zeigte sich eine deutliche Hemmung der Angiogenese. Hier entwickelten sich die ersten Gefäße in den Tumoren erst am 6. Tag. Im weiteren Verlauf kam es auch in diesen Tumoren zur Ausbildung von Gefäßnetzwerken, welche aber eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduzierte funktionelle Kapillardichte von 140 cm/cm^2 an Tag 14 aufwiesen (*Abb. 29D; Abb. 30*).

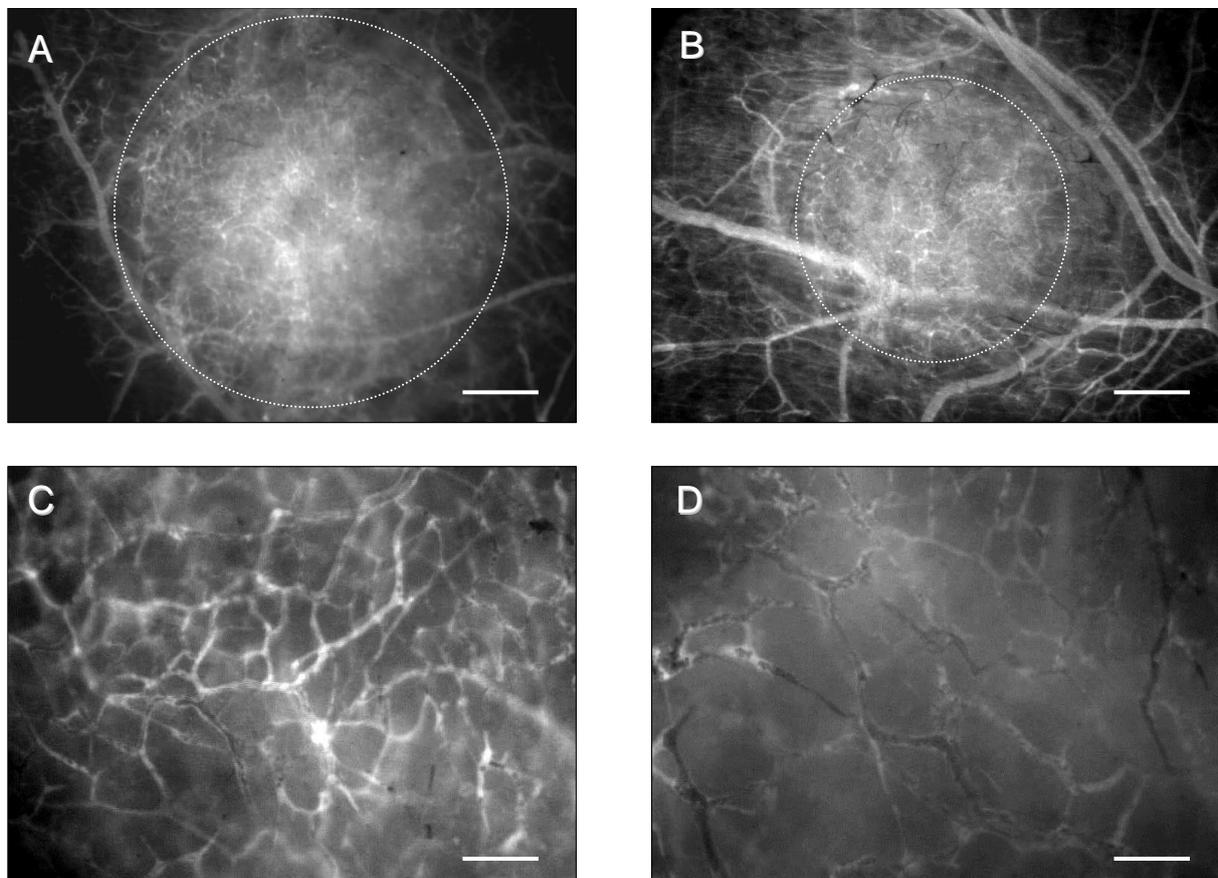


Abbildung 30: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Tumoren (Grenze mit gestrichelter Linie markiert) an Tag 14 nach Transplantation von CT26-Tumorzellsphäroiden in die Rückenhautkammer einer Vehikel-behandelten (**A, C**) und einer 4-HBA-behandelten Maus (**B, D**). Der mit 4-HBA behandelte Tumor zeigt eine deutlich verringerte funktionelle Kapillardichte (**D**) und Herdgröße (**B**). (Kontrastverstärkung mit FITC-Dextran in Blaulicht-Epi-Illumination). Maßstab: A, B = 500 μm ; C, D = 100 μm .

6.4.3. Mikrohämodynamik

Zu allen Untersuchungszeitpunkten wurden die Kapillardurchmesser, die Blutzellgeschwindigkeit und der Blutvolumenfluss in den Tumoren gemessen (Tab. 4). Hierbei zeigte sich sowohl in der Kontroll- als auch in der Behandlungsgruppe eine leichte Abnahme der Gefäßdurchmesser im Zeitverlauf. Bei nahezu konstanten Blutzellgeschwindigkeiten kam es folglich zu einer Abnahme des Blutvolumenflusses während des Beobachtungszeitraumes.

Signifikante Unterschiede der mikrohämodynamischen Parameter zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe konnten jedoch nicht nachgewiesen werden.

	T3	T6	T10	T14
Kapillardurchmesser (μm)				
4-HBA	-	14,9 \pm 1,0	13,8 \pm 0,9	11,5 \pm 0,7
Vehikel	23,7 \pm 0	17,2 \pm 0,7 ^a	13,0 \pm 0,7 ^b	11,5 \pm 0,6 ^b
Blutzellgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$)				
4-HBA	-	80 \pm 18	100 \pm 10	81 \pm 14
Vehikel	93 \pm 0	90 \pm 12	134 \pm 27	122 \pm 27
Blutvolumenfluss (pl/s)				
4-HBA	-	10 \pm 2	12 \pm 2	7 \pm 2
Vehikel	32 \pm 0	17 \pm 3 ^a	13 \pm 2 ^a	10 \pm 3 ^b

Tabelle 4: Mikrohämodynamische Parameter von Gefäßen in Tumoren der Behandlungs- und Kontrollgruppe zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten. Mittelwerte \pm SEM. ^aP<0.05 vs. Tag 3 innerhalb einer Gruppe; ^bP<0.05 vs. Tag 3 und 6 innerhalb einer Gruppe.

6.4.4. Histologie und Immunhistochemie

Die histologische Aufarbeitung der an Tag 14 entnommenen Tumorsphäroide bestätigte die intravitalmikroskopischen Ergebnisse. Die Tumore der Tiere, die mit 4-HBA behandelt wurden, wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant verringerte Tumorgöße auf (Abb. 31 A, B).

Die immunhistochemische Detektion von CD31-positiven Endothelzellen in den Tumorsphäroiden zeigte eine signifikant verringerte Gefäßdichte in der 4-HBA-behandelten Gruppe. Durchschnittlich waren hier 252 \pm 42 Gefäße pro mm² nachweisbar (Abb. 31D). Die Tumorsphäroide der Kontrollgruppe wiesen im Vergleich dazu 463 \pm 35 Gefäße pro mm² auf (Abb. 31C).

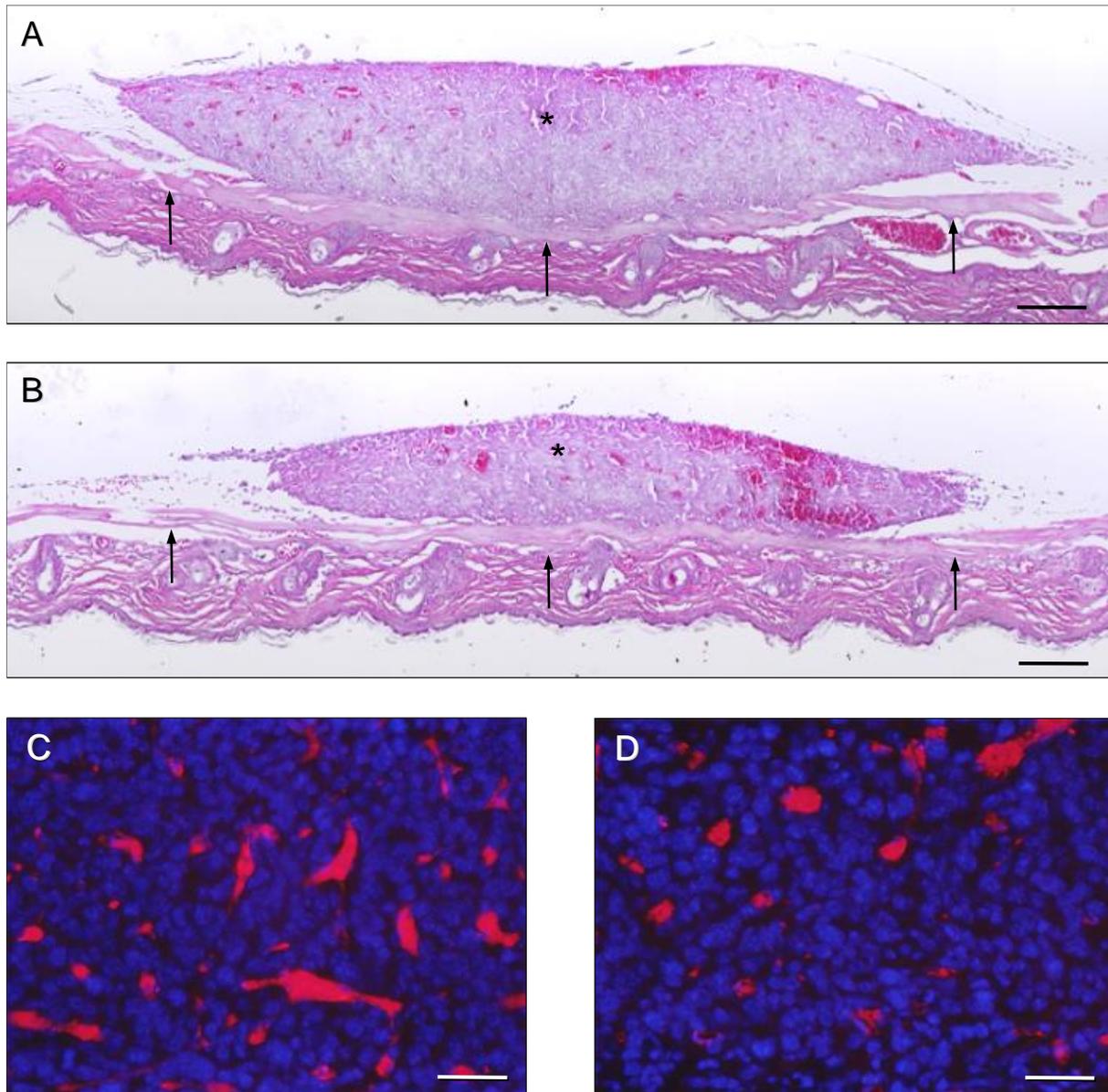


Abbildung 31: **A, B** HE-Färbung von Tumoren (Stern) an Tag 14 nach Transplantation eines CT26-Tumorsphäroids auf den quergestreiften Hautmuskel (Pfeil) der Rückenhautkammer einer Vehikel-behandelten Maus (**A**) und einer 4-HBA-behandelten Maus (**B**). **C, D** Immunhistochemische CD31-Färbung neugebildeter Gefäße (rot) in einem Tumor an Tag 14 nach Transplantation eines CT26-Tumorsphäroids in die Rückenhautkammer einer Vehikel-behandelten Maus (**C**) und einer 4-HBA-behandelten Maus (**D**). Zur Detektion der Zellkerne wurden die Schnitte mit Bisbenzimid (blau) gefärbt. Maßstab: A, B = 135 µm; C, D = 40 µm.

6.5. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Studie wurde die anti-angiogene Wirkung von 4-HBA *in vitro* und *in vivo* untersucht. Folgende Ergebnisse konnten dabei erzielt werden:

1. 4-HBA führt *in vitro* zu einer reversiblen, dosisabhängigen Reduktion der Zellvitalität und

Proliferationsaktivität von eEND2-Zellen. Direkte zytotoxische Effekte sind dabei erst mit steigender 4-HBA-Dosierung nachweisbar. Endothelzellen, die mit 4-HBA inkubiert werden, haben eine auffällige Zellmorphologie mit vergrößerten, geschwollenen Zellkörpern und zahlreichen zellulären Fortsätzen. Diese morphologischen Veränderungen zeigen sich auch in der Phalloidin-Färbung des Zytoskeletts mit massiven Verlängerungen und Verklumpungen der Aktinfilamente. Weiterhin hemmt 4-HBA die Migration von eEND2-Zellen. In Western Blot Analysen zeigt sich eine verringerte Expression der pro-angiogenen Marker PCNA, MMP9 und VEGF in 4-HBA-behandelten Zellen. Im Aortenring-Assay der Ratte kann die Ausbildung neuer Gefäßsprossen durch eine Inkubation mit 10 bzw. 25 mM 4-HBA vollständig inhibiert werden.

2. Endometrioseherde, welche in Rückenhautkammern von C57BL/6-Mäusen induziert werden, weisen durch eine Behandlung mit 4-HBA ein signifikant verringertes Größenwachstum auf. Ebenso hemmt 4-HBA die Angiogenese, was sich in einer verringerten funktionellen Kapillardichte der Herde widerspiegelt.
3. 4-HBA hat keinen negativen Einfluss auf ortsständige Gefäße in der Rückenhautkammer. Die Fließgeschwindigkeiten und Durchmesser der Arteriolen und Venolen sowie die Kapillardichte werden durch eine Behandlung mit 4-HBA nicht beeinflusst.
4. Eine Behandlung von CT26-Zellen mit 4-HBA führt zu einer dosisabhängigen Reduktion der Zellvitalität und -proliferation. Dabei zeigen sich Schädigungen der Zellintegrität erst bei einer hohen 4-HBA-Dosis von 50 bzw. 100 mM. 4-HBA führt in CT26-Zellen zu Veränderungen der Zellmorphologie mit Vergrößerung der Zellkörper und Ausbildung von zellulären Fortsätzen. In der Phalloidin-Färbung zeigen sich Verlängerungen und Verklumpungen der Aktinfilamente. Auch die Migrations- und Invasionsfähigkeit der Tumorzellen wird durch eine Behandlung mit 4-HBA signifikant gehemmt. Western Blot Analysen zeigen eine vermehrte Expression der cleaved Caspase-3 und somit eine gesteigerte Induktion der Apoptose durch 4-HBA. Die Expression pro-angiogener Faktoren wie VEGFp, VEGF und MMP9 ist dagegen in 4-HBA-behandelten Tumorzellen reduziert.
5. Tumorzellsphäroide, welche in die Rückenhautkammern von BALB/c-Mäusen transplantiert werden, weisen unter einer Behandlung mit 4-HBA ein signifikant verringertes Wachstum auf. Weiterhin hemmt 4-HBA die Tumorangiogenese, was sich in einer deutlich verringerten funktionellen Kapillardichte der 4-HBA-behandelten Tumore zeigt.

7. DISKUSSION

7.1. Diskussion der Methoden

Angiogenese, d.h. die Entwicklung neuer Blutgefäße aus bereits existierenden Gefäßen, ist ein physiologischer Vorgang, welcher zum Beispiel in der Embryonalentwicklung und im weiblichen Reproduktionszyklus von großer Bedeutung ist. Weiterhin spielt die Angiogenese auch in der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen wie der Endometriose oder Krebs eine wesentliche Rolle.

Zur Testung neuer anti-angiogener Substanzen, die zukünftig in der Therapie solcher Erkrankungen eingesetzt werden könnten, stehen zahlreiche Assays zur Verfügung. Dabei ist die Kombination einzelner Assays oft sinnvoll, um detaillierte Aussagen über das anti-angiogene Wirkprofil einer Testsubstanz treffen zu können. Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, eine Substanz *in vitro* an kultivierten Zellen, *ex vivo*, d.h. an explantierten Geweben, oder *in vivo* im lebenden Organismus zu testen.

7.1.1. *In vitro* Angiogenese-Assays

In vitro Angiogenese-Assays basieren meist auf der Untersuchung von isolierten und kultivierten Endothelzellen. Sie stellen ein kostengünstiges Verfahren im Vergleich zu *in vivo* Assays dar und können somit für Screening-Untersuchungen verwendet werden.

Der Fokus von *in vitro* Assays liegt auf der Untersuchung der Proliferation, Migration oder Differenzierung von Endothelzellen. Physiologisch vorkommende Interaktionen mit anderen Zellen (z.B. mit glatten Muskelzellen oder Perizyten), der extrazellulären Matrix und dem zirkulierenden Blut werden hierbei vernachlässigt. Gerade interzelluläre Wechselbeziehungen sind jedoch für die Angiogenese von großer Bedeutung. Perizyten stabilisieren beispielsweise die Gefäßwand, kontrollieren die Endothelzellproliferation und dadurch das Wachstum neuer Blutgefäße. Störungen der Perizyten-Endothelzell-Interaktion finden sich beispielsweise in Tumoren und bei der diabetischen Retinopathie, d.h. bei Erkrankungen, die mit vermehrter Angiogenese einhergehen [ARMULIK et al., 2005; RIBATTI et al., 2011].

Ein weiterer Nachteil von *in vitro* Assays ist die Anzucht von Endothelzellen, die für solche Untersuchungen Voraussetzung ist. Während die Mehrzahl der Endothelzellen unter physiologischen Bedingungen im adulten Organismus ruhend ist, befinden sich kultivierte Zellen in einem proliferierenden Zustand. Untersuchungen konnten zeigen, dass dieser künstlich erzeugte Proliferationszustand der Endothelzellen in *in vitro* Assays dazu führt, dass die Zellen ihren spezifischen Phänotyp verlieren, andere Oberflächenmoleküle

exprimieren und sich somit ihre physiologischen Eigenschaften verändern [STATON et al., 2009]. Aus diesem Grund ist bei der Durchführung solcher Assays darauf zu achten, dass die Zellen nur wenige Male passagiert werden [STATON et al., 2009].

Eine weitere Einschränkung von *in vitro* Angiogenese-Assays ist die Tatsache, dass im menschlichen Organismus nicht eine spezifische Endothelzellart existiert. Je nach Organ und somit unterschiedlichem Milieu, aus dem die Zellen isoliert werden, weisen Endothelzellen durchaus große strukturelle und funktionelle Unterschiede auf. So unterscheiden sie sich nicht nur in ihrer Größe, Form und Anordnung des Zellkerns, sondern auch in ihrer Proteinexpression und Reaktion auf verschiedene zelluläre Signale [TO et al., 1996; AIRD, 2003]. Entsprechend führt allein die Isolierung von Endothelzellen aus Arterien versus Venen [LAWSON und WEINSTEIN, 2002] oder aus Makro- versus Mikrogefäßen [JACKSON und NGUYEN, 1997] zu deutlichen Unterschieden auf molekularer Ebene.

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass die Ergebnisse reiner Endothelzellversuche mit Vorsicht zu interpretieren sind, da sie unter nicht physiologischen Bedingungen gewonnen werden und den komplexen Prozess der Angiogenese nicht vollständig abbilden können. Andererseits können *in vitro* Assays kostengünstig zum schnellen Screening potentieller anti-angiogener Substanzen eingesetzt werden und zu einem besseren Verständnis einzelner Wirkmechanismen der Substanzen beitragen.

7.1.2. Aortenring-Assay

Der Aortenring-Assay ist ein sogenannter *ex vivo* Angiogenese-Assay, bei dem die Aorta aus Ratten oder Mäusen entnommen und in dünne Ringe geschnitten wird. Diese werden dann in einer pro-angiogenen, dreidimensionalen Matrix kultiviert und das Wachstum von Gefäßsprossen aus den Präparaten über einen definierten Zeitraum untersucht. Durch die Zugabe verschiedener Substanzen in das Nährmedium bietet sich dieses Verfahren auch zur Testung anti-angiogener Therapeutika an [NICOSIA und OTTINETTI, 1990].

Der Aortenring-Assay wurde 1982 von NICOSIA entwickelt. In der ursprünglichen Version wurden hierfür Aortae der Ratte verwendet. Eine neuere Entwicklung ist der Einsatz von Aortenringen der Maus. Dabei ermöglicht die Verwendung transgener Mäuse, die Auswirkungen bestimmter genetischer Defekte auf die Angiogenese zu untersuchen [MASSON et al., 2002]. Ratten als Spendertiere bieten dagegen den Vorteil, dass die Präparation auf Grund des größeren Gefäßdurchmessers einfacher ist. Weiterhin können aus einer Rattenaorta ca. 20-30 Aortenringe gewonnen werden. Somit ist im Vergleich zur Maus eine geringere Anzahl von Spendertieren notwendig.

Eine weitere Modifikation des Aortenring-Assays ist die Verwendung von Explantaten, die sowohl Vena cava als auch Aorta enthalten. Bei diesem Ansatz wird berücksichtigt, dass im

Organismus arterielle und venöse Gefäße immer paarweise verlaufen und somit Interaktionen untereinander stattfinden. Des Weiteren ist typischerweise das venöse Gefäßbett Ausgangspunkt für die Angiogenese [FOLKMANN, 1982].

Die Angiogenese beginnt *in vivo* normalerweise in Mikrogefäßen. Für den Aortenring-Assay werden jedoch Makrogefäße eingesetzt, in welchen sich die Endothelzellen auf molekularer Ebene von Mikrogefäßen unterscheiden. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse des Aortenring-Assays in Hinblick auf die tatsächliche anti-angiogene Wirkung eines Therapeutikums ist somit nur eingeschränkt möglich.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die im Aortenring-Assay verwendeten Gefäßringe, die neben den Endothelzellen auch die umgebenden Zellen und extrazelluläre Matrix enthalten, das Zusammenspiel einzelner zellulärer Komponenten bei der Angiogenese in besserer Weise abbilden als Untersuchungen an isolierten Endothelzellen. Auch Veränderungen der Zellen durch Isolierung, Kultivierung und Passagierung unterbleiben. Da die aus den Aortenringen neugebildeten Gefäße Perizyten und glatte Muskelzellen in ihre Gefäßwand rekrutieren, gleichen sie vom Aufbau *in vivo* gebildeten Gefäßen [AUERBACH et al., 2003]. Somit schließt der Aortenring-Assay idealerweise die Lücke zwischen *in vitro* und *in vivo* Assays.

7.1.3. *In vivo* Angiogenese-Modelle

Potenzielle anti-angiogene Therapeutika müssen vor ihrem klinischen Einsatz auch *in vivo* getestet werden. Hierzu ist die Visualisierung der Mikrozirkulation erforderlich, was durch verschiedene Verfahren und in unterschiedlichen Modellen möglich ist. Grundsätzlich unterscheidet man akute Modelle von chronischen Modellen.

Akute Modelle erlauben eine einmalige Untersuchung der Mikrozirkulation. Hierzu zählt zum Beispiel das Mesenterialfenstermodell, bei dem nach einer Laparotomie des Versuchstiers das Mesenterium exponiert wird und dessen Kapillarbett untersucht werden kann [ZWEIFACH, 1973]. Ein weiteres Modell ist das Backentaschenmodell des Hamsters [DULING, 1973] sowie die Präparation des Kremastermuskels der Ratte [BAEZ, 1973] oder der Maus [BAGHER und SEGAL, 2011]. Diese Modelle werden häufig zur Beobachtung der direkten Auswirkung einer pharmakologischen Substanz auf die Mikrozirkulation genutzt. Sie haben den Vorteil, dass die zu untersuchenden Gewebe leicht zugänglich sind und die Präparation somit einfach ist. Ein Nachteil dieser Modelle ist jedoch, dass sie nur einen begrenzten Untersuchungszeitraum von wenigen Stunden zulassen. Wiederholte Untersuchungen über mehrere Tage sind somit nicht möglich. Des Weiteren ist auch der Einfluss des akuten chirurgischen Traumas auf die Messergebnisse zu berücksichtigen [MENGER et al., 2002].

Da die Angiogenese ein dynamischer, chronischer Prozess ist, erfordert dies die Analyse der Mikrozirkulation im Zeitverlauf. Aus diesem Grund sind akute Modelle auch nicht zur Untersuchung der anti-angiogenen Wirkung von Substanzen geeignet.

Zur chronischen Untersuchung der Mikrozirkulation wurden bereits im Jahr 1924 von SANDISON [1928] transparente Beobachtungskammern an Hasenohren eingeführt. Dieses Modell wurde von ALGIRE [1943] weiterentwickelt und an Mäuse adaptiert, um das Wachstum und die Vaskularisierung von Tumoren beobachten zu können. Der Nachteil dieser frühen Verfahren war, dass das mikroskopisch untersuchte Gewebe hauptsächlich aus Granulationsgewebe bestand und die Ergebnisse daher durch Wundheilungsprozesse beeinflusst wurden.

In den letzten Jahrzehnten wurde das Kammermodell stetig weiterentwickelt und erlaubt heute Untersuchungen, die weder von der Kammer selbst, noch von Wundheilungsprozessen beeinflusst werden. Die heutigen Rückenhautkammern können in Mäusen, Ratten oder Hamstern implantiert werden. Die Kammer besteht dabei aus einer leichten Doppelrahmenkonstruktion, die an der Rückenhautfalte der Tiere fixiert wird. Sie wird von den Tieren gut toleriert, was sich in einer normalen Nahrungsaufnahme sowie in einem unauffälligen Verhalten zeigt.

Das transparente Beobachtungsfenster der Rückenhautkammer erlaubt die direkte Visualisierung der Mikrozirkulation des Hautmuskels und der darunter liegenden Subkutis. Weiterhin können verschiedene Gewebe oder Biomaterialien in das Beobachtungsfeld platziert und deren Vaskularisierung mit Hilfe der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden. Dabei erfolgt die Analyse verschiedener mikrozirkulatorischer Parameter wie Gefäßdichte, Gefäßdurchmesser und Blutzellgeschwindigkeit über einen Beobachtungszeitraum von 2-3 Wochen [MENGER et al., 2002].

Die intravitale Mikroskopie hat sich im Laufe der Zeit kontinuierlich weiterentwickelt. Durch die hohe optische Auflösung moderner Mikroskope ist eine bis zu 1000-fache Vergrößerung und somit eine detaillierte Analyse der Mikrozirkulation möglich [MENGER und LEHR, 1993]. Die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe, die während der Mikroskopie eingesetzt werden, dienen der Untersuchung verschiedener zellulärer und molekularer Prozesse. Rhodamin 6G und Acridin Orange färben beispielsweise zirkulierende Blutzellen, wie Leukozyten oder Thrombozyten, direkt *in situ* an [VAJKOCZY et al., 2000]. Dadurch ist die Analyse von Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen möglich. Die Endothelintegrität kann durch den Einsatz von FITC-Dextran, welches als großmolekulares Molekül unter physiologischen Bedingungen im Intravasalraum verbleibt, visualisiert werden. So zeigt sich nach einer postischämischen Reperfusionphase eine erhöhte Gefäßpermeabilität mit Extravasation des Fluoreszenzfarbstoffs [MENGER et al., 1992].

Der Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen ist jedoch durch die Bildung freier Sauerstoffradikale und somit potenzieller Phototoxizität auf das untersuchte Gewebe eingeschränkt [PENNING und DUBBELMAN, 1994]. Zeichen phototoxischer Effekte können Gefäßspasmen, vermehrte Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen [SAETZLER et al., 1997] oder eine Blutplättchenaktivierung mit Thrombusbildung [POVLISHOCK et al., 1983] sein. STEINBAUER et al. [2000] konnten jedoch zeigen, dass die für diese Effekte benötigte Dosis weit über der Dosis liegt, die bei Standarduntersuchungen verwendet wird. Dennoch sollte bei der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie auf eine kurze Untersuchungszeit geachtet werden, um phototoxische Effekte weitgehend zu vermeiden. Da die eigentliche Auswertung der Daten nach Beendigung der *in vivo* Versuche *off-line*, d.h. an den aufgezeichneten DVDs mittels Computerprogramm, erfolgt, kann die Untersuchungszeit auf ein Minimum reduziert werden.

7.1.4. Endometriose-Modelle

Die spontane Ausbildung einer Endometriose ist nur bei Menschen und Primaten jedoch nicht bei Nagern zu beobachten, da die Erkrankung menstruationsabhängig auftritt [GRÜMMER, 2006]. Aus ethischen Gründen sind Versuche an Primaten umstritten. Weiterhin sind sie extrem kostenintensiv und aufwendig, sodass viele Endometriose-Studien an Nagetieren durchgeführt werden. Dabei werden Endometrioseherde durch Transplantation von Endometrium an unterschiedliche Stellen des Körpers induziert.

Ein gängiges Verfahren ist die Transplantation von Endometriumfragmenten in die Peritonealhöhle. Dabei kann nicht nur Endometrium der gleichen Spezies, sondern z.B. auch humanes Endometrium oder Endometriose-Gewebe in immuninkompetente Mäuse transplantiert werden. Ein Nachteil des Modells der peritonealen Endometriose ist jedoch, dass zur kontinuierlichen Analyse der Endometrioseherde wiederholte Laparotomien der Tiere erforderlich sind. Aus diesem Grund erfolgt eine Untersuchung der Herde häufig erst am Ende der Experimente durch Gewebeentnahme mit anschließenden histologischen oder immunhistochemischen Untersuchungen.

Der Einsatz von hochauflösendem Ultraschall ermöglicht eine wiederholte nicht-invasive Untersuchung der Entwicklung von Endometrioseherden und deren Morphologie [LASCHKE et al., 2010]. Weiterhin kann auch die Wirkung von Therapeutika auf das Wachstum von Endometrioseherden repetitiv analysiert werden. Eine direkte Visualisierung und Analyse der Angiogenese in Endometrioseherden ist jedoch auch hiermit nicht möglich.

In den letzten Jahren wurde daher das Rückenhautkammermodell zur Analyse von Endometrioseherden eingeführt. Dieses Modell ermöglicht die wiederholte, nicht-invasive Untersuchung von Endometrioseherden und eine direkte Visualisierung der Angiogenese

[LASCHKE et al., 2005]. Hierfür werden Endometriumfragmente in das Beobachtungsfenster der Rückenhautkammer transplantiert. Das Wachstum der Herde sowie die Entwicklung von Gefäßnetzwerken können anschließend über einen Zeitraum von 2-3 Wochen bei geringer Belastung der Tiere repetitiv analysiert werden. In verschiedenen Studien konnte so bereits gezeigt werden, dass eine systemische Behandlung der Tiere mit verschiedenen Therapeutika die Angiogenese in Endometrioseherden beeinflusst. So hemmen selektive COX-2-Hemmer [LASCHKE et al., 2007] oder Rapamycin [LASCHKE et al., 2006] die Vaskularisierung der Herde, was schließlich zu deren Regression führt.

Inwieweit sich das Milieu in der Rückenhautkammer von der peritonealen Flüssigkeit beispielsweise in Bezug auf Wachstumsfaktoren unterscheidet, ist unklar. Weiterhin können Interaktionen von Endometrioseherden und dem Peritoneum in diesem Modell nicht abgebildet werden. Dennoch bietet sich das Rückenhautkammermodell zur repetitiven Analyse der Mikrozirkulation über einen längeren Untersuchungszeitraum und somit zur Untersuchung anti-angiogener Wirkstoffe *in vivo* an [LASCHKE und MENGER, 2007].

7.1.5. Kolonkarzinom-Modelle

Tierexperimentelle Studien an spontan auftretenden kolorektalen Karzinomen sind auf Grund ihrer geringen Inzidenz nicht möglich. In Mäusen tritt das kolorektale Karzinom beispielsweise in weniger als 1% der Tiere auf [ANISIMOV et al., 2001; HEIJSTEK et al., 2005]. Aus diesem Grund wurden verschiedene Verfahren zur Tumorinduktion entwickelt. Dies ist durch eine Behandlung der Tiere mit verschiedenen chemischen Karzinogenen möglich [KOBÆK-LARSEN et al., 2000]. Häufig eingesetzte Substanzen sind zum Beispiel Dimethylhydrazin, Azoxymethan oder N-methyl-N-nitro-N-Nitrosoguanidin [HEIJSTEK et al., 2005]. Ein weiterer Ansatz macht sich die genetische Pathogenese des kolorektalen Karzinoms zunutze, welche zum Beispiel Veränderungen in Tumorsuppressorgenen, Proto-Onkogenen oder Zellreparaturmechanismen beinhaltet [FEARON und VOGELSTEIN, 1990]. Mittlerweile gibt es verschiedene Karzinommodelle, in denen genetisch modifizierte Mäuse mit Mutationen in oben genannten Genen eingesetzt werden [KOBÆK-LARSEN et al., 2000; HINOI et al., 2007]. Da jedoch nur wenige transgene Tumormodelle zu einer hohen Prävalenz des Karzinoms führen, sind diese Modelle für Medikamentenstudien ebenfalls ungeeignet [ROSENBERG und BORTNER, 1999].

Eine weitere Möglichkeit der Tumorinduktion ist die Transplantation humaner oder muriner Tumorzelllinien oder Tumorgewebe. Diese können orthotop durch intrarektale oder intrazökale Injektion in die Darmwand transplantiert werden. Weiterhin ist eine ektopische Transplantation in die Subkutis der Empfängertiere möglich. Die orthotope Tumortransplantation hat den Vorteil, dass sich der Tumor in seiner physiologischen

Umgebung entwickelt. Studien konnten zeigen, dass das umgebende Milieu die Empfindlichkeit der Tumore auf Chemotherapeutika beeinflusst. So reagiert z.B. ein subkutan gewachsenes Kolonkarzinom empfindlicher auf Doxorubicin als ein im Zökum von Mäusen gewachsener Tumor [WILMANN et al., 1992].

Eine wiederholte Untersuchung der Tumorangiogenese, welche zur Analyse anti-angiogener Wirkstoffe wichtig ist, ist bei den orthotop transplantierten sowie den subkutanen Tumoren nicht möglich. Auch hierfür stellt das Modell der Rückenhautkammer ein etabliertes Verfahren zur Untersuchung des Tumorwachstums und der Tumorangiogenese dar. Mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie lassen sich unterschiedliche Tumor-relevante Parameter wie Wachstum und Regression, Angiogenese, Infiltration von Immunzellen und Tumorzellmigration untersuchen. Die Rückenhautkammer kann über einen Zeitraum von 2-3 Wochen wiederholt untersucht werden, sodass sie sich vor allem zur Untersuchung schnell wachsender Tumore eignet. Das organspezifische Milieu, welches beispielsweise durch die Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren das Tumorwachstum beeinflusst, kann jedoch nicht imitiert werden. Insgesamt stellt die Rückenhautkammer ein etabliertes Modell dar, welches sich sowohl zur Analyse der Karzinogenese als auch für therapeutische Studien eignet [TORRES FILHO et al., 1995; KOLLMAR et al., 2007; KOLLMAR et al., 2010; BARON et al., 2011].

7.2. Diskussion der Ergebnisse

In der traditionellen chinesischen Medizin werden seit Jahrhunderten 4-HBA-haltige Extrakte der *Gastrodia elata* BLUME zur Behandlung verschiedener Erkrankungen eingesetzt. Weiterhin konnten inzwischen experimentelle Untersuchungen zeigen, dass 4-HBA ein pleiotroper Wirkstoff mit einer anti-oxidativen [YU et al., 2005], anti-apoptotischen [YU et al., 2010] und analgetischen Wirkung [LIM et al., 2007] ist und im Modell der Chorioallantoismembran die Entstehung neuer Blutgefäße hemmt [LIM et al., 2007]. 4-HBA ist somit ein vielversprechender Wirkstoff, der in der Therapie verschiedener angiogener Erkrankungen eingesetzt werden könnte.

Zur systematischen Analyse der anti-angiogenen Wirkung von 4-HBA und der zu Grunde liegenden Wirkmechanismen wurden im ersten Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit zunächst verschiedene *in vitro* Experimente an der murinen Endothelzelllinie eEND2 durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass eine Inkubation der Endothelzellen mit 4-HBA die Stoffwechselaktivität und die Proliferation der Zellen hemmt. Dies geht mit einer verminderten Expression des Proliferationsmarkers PCNA einher. Weiterhin führt die Behandlung mit 4-HBA zu einer verringerten Expression von VEGF in den Endothelzellen.

VEGF ist ein Schlüsselprotein der Angiogenese und fördert unter anderem die Migration von „*Tip cells*“ sowie die Proliferation von „*Stalk cells*“ in Gefäßsprossen [GERHARDT et al., 2003]. Die Expression der MMP9, die für die Degradation der Basalmembran bei der Angiogenese wesentlich ist, wurde durch eine Behandlung der Zellen mit 4-HBA ebenfalls vermindert.

Im Migrationsassay zeigte sich eine verminderte Zellmigration 4-HBA-behandelter Zellen. Dabei führte die Behandlung mit 10 mM 4-HBA zu einer stärkeren Hemmung der Zellmigration als die Behandlung mit 25 mM 4-HBA. Da die Migration der Endothelzellen Voraussetzung für die Ausbildung neuer Gefäßsprossen ist, könnte diese Wirkung von 4-HBA ein wichtiger anti-angiogener Wirkmechanismus sein.

Die Phalloidin-Färbung der zellulären Aktinfilamente zeigte weiterhin, dass die Zellkörper der Endothelzellen nach Inkubation mit 4-HBA vergrößert waren. Diese Vergrößerung war bei einer Dosis von 10 mM 4-HBA stärker ausgeprägt als bei 25 mM 4-HBA. Möglicherweise war somit die geringere Zellgröße der mit 25 mM 4-HBA-behandelten Zellen ursächlich für die verbesserte Migration der Zellen durch die 8 µm großen Poren des Migrationsassays. Ebenso zeigte die Phalloidin-Färbung eine Verklumpung der Aktinfilamente mit perinukleären Aggregationen. 4-HBA hemmt daher die Zellmigration möglicherweise nicht nur mechanisch durch die Vergrößerung der Zellkörper, sondern auch durch direkte Veränderungen am Zytoskelett der Endothelzellen. Im Aortenring-Assay der Ratte zeigte sich durch eine Inkubation der Aortenringe mit 10 und 25 mM 4-HBA eine komplette Hemmung der Gefäßsprossung.

Diese vielversprechenden *in vitro* Ergebnisse weisen daraufhin, dass 4-HBA in der Behandlung angiogener Erkrankungen erfolgreich eingesetzt werden könnte. Aus diesem Grund wurde in einem weiteren Studienabschnitt der vorliegenden Arbeit der Einfluss von 4-HBA auf die Entwicklung von Endometrioseherden untersucht.

Die Endometriose ist eine gutartige Erkrankung und durch das ektope Auftreten von endometrialem Gewebe gekennzeichnet. Da das Wachstum und Überleben von Endometrioseherden entscheidend von einer ausreichenden Vaskularisierung abhängig ist [LASCHKE und MENGER, 2007], wurden bereits in früheren Studien anti-angiogene Substanzen aus der Tumorthherapie zur Behandlung der Endometriose getestet.

Der im Zusammenhang mit Endometriose am besten untersuchte angiogene Wachstumsfaktor ist VEGF. RICCI et al. [2011] konnten kürzlich zeigen, dass eine Behandlung mit dem VEGF-Antikörper Bevacizumab zu einer Regression chirurgisch induzierter Endometrioseherde in BALB/c-Mäusen führt. Auf Grund der schweren Nebenwirkungen von Bevacizumab ist jedoch nicht zu erwarten, dass diese Substanz je in der Therapie der Endometriose eingesetzt werden kann [LASCHKE und MENGER, 2012]. Ein weiterer anti-angiogener Wirkstoff zur Therapie der Endometriose ist Endostatin. Endostatin

ist ein endogener, anti-angiogener Faktor, welcher die Proliferation und Migration von Endothelzellen hemmt und Apoptose induziert [DHANABAL et al., 1999]. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass eine Behandlung mit Endostatin zu einer Reduktion der Vaskularisierung von Endometrioseherden führt. Weiterhin ist die Substanz gut verträglich und ohne toxische Nebenwirkungen. Die Herstellung von Endostatin in größeren Mengen ist jedoch problematisch, sodass ein Einsatz in der Therapie der Endometriose derzeit noch nicht möglich ist [LASCHKE und MENGER, 2012].

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Untersuchung der anti-angiogenen Wirkung von 4-HBA Endometrioseherde in der Rückenhautkammer von Mäusen induziert. Dabei erfolgte eine Behandlung der Tiere mit einer Dosis von 100 mg/kg 4-HBA über den 14-tägigen Untersuchungszeitraum. Diese Dosis entsprach bezogen auf das Verteilungsvolumen einer Maus etwa einer Konzentration von 13 mM 4-HBA, was nahezu mit der *in vitro* verwendeten Dosis von 10 mM übereinstimmte.

Die *in vivo* Experimente zeigten, dass sich aus den transplantierten Endometriumfragmenten vaskularisierte Endometrioseherde mit Stroma- und Drüsenanteilen entwickelten. Eine Behandlung der Tiere mit 4-HBA führte zu einer signifikant verringerten funktionellen Kapillardichte der Endometrioseherde im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die verringerte Durchblutung ging mit einer reduzierten Herdgröße und einer gesteigerten Apoptose in Stroma- und Drüsenzellen einher. Somit führte die durch 4-HBA induzierte Hemmung der Angiogenese zu einer Wachstumsverzögerung und einem verminderten Überleben der Endometrioseherde.

Im Gegensatz zu den *in vitro* Experimenten zeigte sich *in vivo* ein vergleichsweise geringer Effekt von 4-HBA auf die Angiogenese. Ob dies an der gewählten Applikationsart liegt, konnte nicht geklärt werden. Bislang gibt es noch keine ausreichenden Untersuchungen zur Aufnahme und Bioverfügbarkeit von 4-HBA. Möglicherweise ist nur ein Teil der Substanz in die systemische Zirkulation gelangt, sodass in der Rückenhautkammer nur eine geringe Konzentration erreicht wurde. Um die optimale Dosis und Darreichungsform von 4-HBA zu finden, sind somit noch weitere Studien nötig.

Interessanterweise hatte 4-HBA keine Auswirkungen auf die ortsständigen Gefäße in der Rückenhautkammer. Diese wiesen über den gesamten Untersuchungszeitraum eine unveränderte Mikrohämodynamik sowie eine konstante funktionelle Kapillardichte auf. Die selektive Wirkung von 4-HBA auf Endometrioseherde spricht für eine gute Verträglichkeit des Wirkstoffs.

Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass bei Endometriose-Patientinnen vermehrt retrograde Menstruation auftritt. Dadurch gelangen pro-oxidative Faktoren wie freies Eisen, Häm sowie apoptotische Endometriumzellen in die Peritonealhöhle und führen zu oxidativem Stress. Dieser trägt zu chronischen Entzündungsprozessen in der

Peritonealhöhle bei [LOUSSE et al., 2012]. Entsprechend zeigt die Analyse der peritonealen Flüssigkeit erkrankter Frauen eine höhere Konzentration von inflammatorischen Zytokinen und aktivierten Makrophagen als bei gesunden Frauen [KONINCKX et al., 1998; AUGOULEA et al., 2012]. Diese Makrophagen produzieren Prostaglandine, welche wiederum die Aktivität der Aromatase in den Endometrioseherden steigern. Die Aromatase, die zu einer lokalen Östrogenproduktion führt, stimuliert die Prostaglandinsynthese [GAZVANI und TEMPLETON, 2002]. So entsteht ein *circulus vitiosus*, der sowohl die Entzündung als auch die Östrogenproduktion unterhält. Eine weitere Folge der Prostaglandinsynthese ist eine erhöhte Apoptose-Resistenz, was sich im ektopen wie auch im eutopen Endometrium von erkrankten Frauen zeigt [EBERT et al., 2005]. Eine Inhibition des Prostaglandinstoffwechsels wirkt sich somit positiv auf die Endometriose aus. In verschiedenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass eine Hemmung der COX-2 *in vivo* zu einer Regression von Endometrioseherden, einer verminderten Vaskularisierung und einer verminderten Expression von VEGF führt [LASCHKE et al., 2007, MACHADO et al., 2010]. Folglich ist das pleiotrope Wirkprofil von 4-HBA, das auch anti-inflammatorische und anti-oxidative Komponenten umfasst, in der Therapie der Endometriose möglicherweise einem reinen anti-angiogenen Wirkstoff überlegen.

In einem weiteren Studienabschnitt wurde die Wirkung von 4-HBA auf die kolorektale Zelllinie CT26 *in vitro* und *in vivo* analysiert. In den *in vitro* Versuchen zeigten sich in Analogie zu den Endothelzellversuchen aus dem ersten Studienabschnitt eine Reduktion der Zellvitalität und Proliferation sowie eine vermehrte Apoptose 4-HBA-behandelter Zellen. Die Expression der pro-angiogenen Faktoren VEGF und MMP9 war ebenfalls erniedrigt. Weiterhin reduzierte 4-HBA die Migrationsfähigkeit und Invasivität der Tumorzellen, welche essentielle Mechanismen für die Metastasierung von Tumoren sind. Interessanterweise führte 10 mM 4-HBA erneut zu einer stärkeren Hemmung der Zellmigration als 25 mM 4-HBA. Die Phalloidin-Färbung zeigte eine starke Verklumpung der Aktinfilamente der Zellen nach Einwirkung von 4-HBA.

Da 4-HBA die Proliferation, Migration und Invasivität von Tumorzellen hemmt, könnte dies zu einer Einschränkung der malignen Potenz von Tumoren führen. Um die genauen zellulären Angriffspunkte der anti-tumorösen Wirkung von 4-HBA zu untersuchen, sind jedoch weitere Studien nötig. Potenzielle Angriffspunkte von 4-HBA könnten beispielsweise Regulatoren der Apoptose wie die *Tumor Necrosis Factor* Rezeptoren Fas und TRAIL, Proteine der Bcl-2 Familie, *Apoptotic peptidase activating factor-1*, Cytochrom c und p53 sein, die alle die Caspase-Kaskade aktivieren können [OUYANG et al., 2012]. Die Destabilisierung des Zytoskeletts könnte durch Interaktionen von 4-HBA mit GTPasen der

Rho-Familie hervorgerufen werden, welche bedeutsam für die Regulation der Aktinpolymerisation sind [BRAVO-CORDERO et al., 2012].

Um die anti-tumoröse Wirkung von 4-HBA *in vivo* zu testen, wurden CT26-Tumorzellsphäroide in Rückenhautkammern von Mäusen transplantiert. Die Verwendung von Sphäroiden hatte den Vorteil, dass das Risiko einer Zellverschleppung während der Transplantation minimiert wurde. Weiterhin wiesen die Tumore eine vergleichbare, homogene Initialgröße auf, sodass durch diese standardisierten Bedingungen größenabhängige Unterschiede der Tumorentwicklung vermieden wurden. Ein weiterer Vorteil von Sphäroiden ist, dass sich die Tumorzellen in den Sphäroiden in einer dreidimensionalen Umgebung mit gut entwickelten zellulären Verbindungen befinden. Dies spiegelt am ehesten die Bedingungen in einem sich natürlich entwickelnden Tumor wider [ELLIOTT und YUAN, 2011].

In der vorliegenden Studie wurden die Tiere zur Untersuchung der anti-tumorösen Wirkung von 4-HBA mit einer Dosis von 200 mg/kg behandelt. Die Steigerung der Dosierung im Vergleich zu den Endometrioseversuchen des ersten Studienabschnitts dieser Arbeit erfolgte auf Grund des im Vergleich zur Endometriose aggressiver wachsenden Tumorgewebes. In einer früheren Studie wurde diese Dosis bereits ohne toxische Nebenwirkungen *in vivo* eingesetzt [DESCAMPS et al., 2009]. Auch in der vorliegenden Untersuchung wurde diese Dosis von den Tieren gut toleriert und es waren keine Auffälligkeiten im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisbar.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung der Tiere mit 4-HBA zu einer eingeschränkten Vaskularisierung der CT26-Tumorzellsphäroide führte. Die funktionelle Kapillardichte der Tumore, die mit 4-HBA behandelt wurden, war im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Diese Hemmung der Angiogenese führte auch zu einer deutlichen Reduktion des Tumorstadiums in der Behandlungsgruppe.

Diese Ergebnisse zeigen, dass 4-HBA auch zur Behandlung von Tumoren eine vielversprechende Substanz darstellt. Dabei könnte das pleiotrope Wirkprofil von 4-HBA gegenüber Substanzen, die nur einen Schritt der Angiogenese inhibieren, von Vorteil sein. So entwickeln Tumore zur Sicherung ihrer Blutversorgung *escape*-Mechanismen, mit denen sie einzelne Signalwege umgehen können und Resistenzen erlangen [BERGERS und HANAHAN, 2008]. Insbesondere könnte sich die anti-inflammatorische Wirkkomponente von 4-HBA als günstig erweisen. Das in den Tumoren bestehende inflammatorische Milieu begünstigt nicht nur das Tumorstadium, die Angiogenese und die Metastasierung. Es ist auch mitverantwortlich für das Erlangen von Resistenzen gegenüber Therapeutika und beteiligt an der genetischen Instabilität der Tumore [COLOTTA et al., 2009].

Inwieweit die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit an tierischen Zellen auf menschliche Karzinome übertragbar sind, muss durch weiterführende Studien untersucht werden. Die Tumorzelllinie CT26 stellt jedoch eine etablierte Zelllinie zur Untersuchung von Tumor-Stroma-Interaktionen [KUBOTA et al., 2004], immunologischen *escape*-Mechanismen [GRIMM et al., 2010] und pathologischer Angiogenese [LEE et al., 2010] dar. Weiterhin wird sie häufig zur Testung potenzieller Therapeutika eingesetzt [BELICHA-VILLANUEVA et al., 2012].

Zusammenfassend ist 4-HBA eine vielversprechende Substanz, die durch ihr pleiotropes Wirkprofil mit einer anti-angiogenen, anti-inflammatorischen und anti-oxidativen Wirkung einem reinen anti-angiogenen Wirkstoff in der Therapie der Endometriose und des kolorektalen Karzinoms überlegen sein könnte.

7.3. Schlussfolgerungen und klinische Perspektiven

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der pflanzliche Wirkstoff 4-HBA die Angiogenese in benignen und malignen Geweben inhibiert. 4-HBA hemmt verschiedene Schritte der Angiogenese wie Zellproliferation, Zellmigration und -invasion und induziert Apoptose. Neben der anti-angiogenen Komponente ist 4-HBA auch durch eine anti-inflammatorische und anti-oxidative Wirkung gekennzeichnet. Dies könnte sich in der Therapie zahlreicher Erkrankungen als effektiv erweisen und auch der Erlangung von Resistenzen in der Tumorthherapie vorbeugen.

Die zielgerichtete Inhibition der Angiogenese stellt eine mögliche Überlegenheit von 4-HBA gegenüber konventionellen Chemotherapeutika in der Tumorthherapie dar. Die derzeit eingesetzten Substanzen wirken meistens auf alle proliferierenden Gewebe, sodass sie oft mit starken Nebenwirkungen verbunden sind.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass 4-HBA keine toxischen Effekte auf schon bestehende Blutgefäße hat. Weiterhin zeigten sich durch die Behandlung mit 4-HBA keine Nebenwirkungen, was insbesondere in der Behandlung der Endometriose, aber auch in der Tumorthherapie bedeutend ist. Vor einem klinischen Einsatz ist jedoch noch eine umfassende Analyse von Langzeitnebenwirkungen erforderlich.

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass 4-HBA ein vielversprechender, pleiotroper anti-angiogener Wirkstoff ist. In der Therapie von angiogenen Erkrankungen, wie beispielsweise Endometriose und Tumoren, könnte 4-HBA zukünftig ein wichtiger Therapiebestandteil werden.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. **ABDOLLAHI A, FOLKMAN J.** Evading tumor evasion: current concepts and perspectives of anti-angiogenic cancer therapy. *Drug Resist Updat* 2010; 13:16-28.
2. **AIRD WC.** Endothelial cell heterogeneity. *Crit Care Med* 2003; 31:221-230.
3. **ALGIRE GH.** An adaptation of the transparent chamber technique to the mouse. *J Nat Cancer Inst* 1943; 4:1-11.
4. **ANISIMOV VN, ZABEZHINSKI MA, ROSSOLINI G, ZAIA A, PIANTANELLI A, BASSO A, PIANTANELLI L.** Long-live euthymic BALB/c-nu mice. II: spontaneous tumors and other pathologies. *Mech Ageing Dev* 2001; 122:477-489.
5. **ARMULIK A, ABRAMSSON A, BETSHOLTZ C.** Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* 2005; 97:512-523.
6. **AUERBACH R, LEWIS R, SHINNERS B, KUBAI L, AKHTAR N.** Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin Chem* 2003; 49:32-40.
7. **AUGOULEA A, ALEXANDROU A, CREATSA M, VRACHNIS N, LAMBRINOUDAKI I.** Pathogenesis of endometriosis: the role of genetics, inflammation and oxidative stress. *Arch Gynecol Obstet* 2012; 286:99-103.
8. **AUSPRUNK DH, FOLKMAN J.** Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res* 1977; 14:53-65.
9. **BAEZ S.** An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. *Microvasc Res* 1973; 5:384-394.
10. **BAGHER P, SEGAL SS.** The mouse cremaster muscle preparation for intravital imaging of the microcirculation. *J Vis Exp* 2011; pii: 2874.
11. **BAKER M, WAYLAND H.** Online volume flow rate and velocity profile measurement for blood in microvessels. *Microvasc Res* 1974; 7:131-143.
12. **BALKWILL F, MANTOVANI A.** Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001; 357:539-545.

13. **BARON VT, WELSH J, ABEDINPOUR P, BORGSTRÖM P.** Intravital microscopy in the mouse dorsal chamber model for the study of solid tumors. *Am J Cancer Res* 2011; 1:674-686.
14. **BEAUDEUX JL, GIRAL P, BRUCKERT E, FOGLIETTI MJ, CHAPMAN MJ.** Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42:121-131.
15. **BELICHA-VILLANUEVA A, RIDDELL J, BANGIA N, GOLLNICK SO.** The effect of photodynamic therapy on tumor cell expression of major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class I-related molecules. *Lasers Surg Med* 2012; 44:60-68.
16. **BENAGIANO G, BROSENS I.** Who identified endometriosis? *Fertil Steril* 2011; 95:13-16.
17. **BERGERS G, HANAHAN D.** Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 2008; 8:592-603.
18. **BERGQVIST A, LJUNGBERG O, SKOOG L.** Immunohistochemical analysis of oestrogen and progesterone receptors in endometriotic tissue and endometrium. *Hum Reprod* 1993; 8:1915-1922.
19. **BERGQVIST A, BERGH T, HOGSTRÖM L, MATTSSON S, NORDENSKJÖLD F, Rasmussen C.** Effects of triptorelin versus placebo on the symptoms of endometriosis. *Fertil Steril* 1998; 69:702-708.
20. **BOYLE P, LANGMAN JS.** ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *BMJ* 2000; 321:805-808.
21. **BRAVO-CORDERO JJ, HODGSON L, CONDEELIS J.** Directed cell invasion and migration during metastasis. *Curr Opin Cell Biol* 2012; 24:277-283.
22. **BULUN SE, MAHENDROO MS, SIMPSON ER.** Polymerase chain reaction amplification fails to detect aromatase cytochrome P450 transcripts in normal human endometrium or decidua. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76:1458-1463.
23. **BULUN SE, GURATES B, FANG Z, TAMURA M, SEBASTIAN S, ZHOU J, AMIN S, YANG S.** Mechanisms of excessive estrogen formation in endometriosis. *J Reprod Immunol* 2002; 55:21-33.
24. **BURKE J.** Early Diagnosis of Carcinoma of the Colon. *Ann Surg* 1911; 54:818-830.
25. **CAI M, ZHOU Y, GESANG S, BIANBA C, DING LS.** Chemical fingerprint analysis of rhizomes of *Gymnadenia conopsea* by HPLC-DAD-MSn. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006; 844:301-307.

26. **CARDON SZ, OESTERMEYER CF, BLOCH EH.** Effect of oxygen on cyclic red blood cell flow in unanesthetized mammalian striated muscle as determined by microscopy. *Microvasc Res* 1970; 2:67-76.
27. **CARMELIET P.** Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6:389-395.
28. **CARMELIET P.** Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005; 438:932-936.
29. **CHIBAUDEL B, TOURNIGAND C, ANDRÉ T, DE GRAMONT A.** Therapeutic strategy in unresectable metastatic colorectal cancer. *Ther Adv Med Oncol* 2012; 4:75-89.
30. **COLLETTE T, MAHEUX R, MAILLOUX J, AKOUM A.** Increased expression of matrix metalloproteinase-9 in the eutopic endometrial tissue of women with endometriosis. *Hum Reprod* 2006; 21:3059-3067.
31. **COLOTTA F, ALLAVENA P, SICA A, GARLANDA C, MANTOVANI A.** Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 2009; 30:1073-1081.
32. **CRAWFORD TN, ALFARO DV 3RD, KERRISON JB, JABLON EP.** Diabetic retinopathy and angiogenesis. *Curr Diabetes Rev* 2009; 5:8-13.
33. **DESCAMPS E, PETRAULT-LAPRAIS M, MAUROIS P, PAGES N, BAC P, BORDET R, VAMECQ J.** Experimental stroke protection induced by 4-hydroxybenzyl alcohol is cancelled by bacitracin. *Neurosci Res* 2009; 64:137-42.
34. **DHANABAL M, RAMCHANDRAN R, WATERMAN MJ, LU H, KNEBELMANN B, SEGAL M, SUKHATME VP.** Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem* 1999; 274:11721-11726.
35. **DHIMAN SB, KAMAT JP, NAIK DB.** Antioxidant activity and free radical scavenging reactions of hydroxybenzyl alcohols. Biochemical and pulse radiolysis studies. *Chem Biol Interact* 2009; 182:119-127.
36. **DIZEREGA GS, BARBER DL, HODGEN GD.** Endometriosis: role of ovarian steroids in initiation, maintenance, and suppression. *Fertil Steril* 1980; 33:649-653.
37. **DOYLE B, CAPLICE N.** Plaque neovascularization and antiangiogenic therapy for atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49:2073-2080.
38. **DULING BR.** The preparation and use of the hamster cheek pouch for studies of the microcirculation. *Microvasc Res* 1973; 5:423-439.

39. **DVORAK HF.** Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 2002; 20:4368-4380.
40. **EBERT AD, BARTLEY J, DAVID M.** Aromatase inhibitors and cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors in endometriosis: new questions - old answers? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005; 122:144-150.
41. **EDWARDS BK, WARD E, KOHLER BA, EHEMAN C, ZAUBER AG, ANDERSON RN, JEMAL A, SCHYMURA MJ, LANSDORP-VOGELAAR I, SEEFF LC, VAN BALLEGOIJEN M, GOEDE SL, RIES LA.** Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer* 2010; 116:544-573.
42. **ELLIOTT NT, YUAN F.** A review of three-dimensional in vitro tissue models for drug discovery and transport studies. *J Pharm Sci* 2011; 100:59-74.
43. **ENDRICH B, ASAISHI K, GÖTZ A, MESSMER K.** Technical report - a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med* 1980; 177:125-134.
44. **ESKENAZI B, WARNER ML.** Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1997; 24:235-258.
45. **FEARON ER, VOGELSTEIN B.** A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61:759-767.
46. **FELSON H, MCGUIRE J, WASSERMAN P.** Stromal endometriosis involving the heart. *Am J Med* 1960; 29:1072-1076.
47. **FERLAY J, PARKIN DM, STELIAROVA-FOUCHER E.** Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 2010; 46:765-781.
48. **FERRERO S, RAGNI N, REMORGIDA V.** Antiangiogenic therapies in endometriosis. *Br J Pharmacol* 2006; 149:133-135.
49. **FOLBERG R, MANIOTIS AJ.** Vasculogenic mimicry. *APMIS* 2004; 112:508-525.
50. **FOLKMAN J.** Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 1972; 175:409-416.

51. **FOLKMAN J.** Tumor angiogenesis: a possible control point in tumor growth. *Ann Intern Med* 1975; 82:96-100.
52. **FOLKMAN J.** Angiogenesis: initiation and control. *Ann N Y Acad Sci* 1982; 401:212-227.
53. **FOLKMAN J.** Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1:27-31.
54. **FOLKMAN J.** Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002; 29:15-18.
55. **FONG GH.** Regulation of angiogenesis by oxygen sensing mechanisms. *J Mol Med (Berl)* 2009; 87:549-560.
56. **GAZVANI R, TEMPLETON A.** Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. *Reproduction* 2002; 123:217-226.
57. **GERHARDT H, GOLDING M, FRUTTIGER M, RUHRBERG C, LUNDKVIST A, ABRAMSSON A, JELTSCH M, MITCHELL C, ALITALO K, SHIMA D, BETSHOLTZ C.** VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 2003; 161:1163-1177.
58. **GIANNARINI G, SCOTT CA, MORO U, GROSSETTI B, POMARA G, SELLI C.** Cystic endometriosis of the epididymis. *Urology* 2006; 68:203.e1-3.
59. **GIMBRONE MA JR, LEAPMAN SB, COTRAN RS, FOLKMAN J.** Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med* 1972; 136:261-276.
60. **GOODWIN AM.** In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. *Microvasc Res* 2007; 74:172-183.
61. **GRIMM M, GASSER M, BUETER M, STREHL J, WANG J, NICHIPORUK E, MEYER D, GERMER CT, WAAGA-GASSER AM, THALHEIMER A.** Evaluation of immunological escape mechanisms in a mouse model of colorectal liver metastases. *BMC Cancer* 2010; 10:82.
62. **GRISWOLD DP, CORBETT TH.** A colon tumor model for anticancer agent evaluation. *Cancer* 1975; 36:2441-2441.
63. **GROOTHUIS PG, NAP AW, WINTERHAGER E, GRÜMMER R.** Vascular development in endometriosis. *Angiogenesis* 2005; 8:147-156.
64. **GRÜMMER R.** Animal models in endometriosis research. *Hum Reprod Update* 2006; 12:641-649.

65. **GRÜTTER MG.** Caspases: key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol* 2000; 10:649-655.
66. **GUPTA MK, QIN RY.** Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World J Gastroenterol* 2003; 9:1144-1155.
67. **HAGGAR FA, BOUSHEY RP.** Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg* 2009; 22:191-197.
68. **HALBAN J.** Hysteroadenosis metaplastica. *Wien Klin Wochenschr* 1924; 37:1205-1206.
69. **HAMASAKI K, KOGURE K, OHWADA K.** A biological method for the quantitative measurement of tetrodotoxin (TTX): tissue culture bioassay in combination with a water-soluble tetrazolium salt. *Toxicon* 1996; 34:490-495.
70. **HANAHAN D, WEINBERG RA.** The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57-70.
71. **HAYASAKA S, UGAJIN T, FUJII O, NABESHIMA H, UTSUNOMIYA H, YOKOMIZO R, YUKI H, TERADA Y, MURAKAMI T, YAEGASHI N.** Risk factors for recurrence and re-recurrence of ovarian endometriomas after laparoscopic excision. *J Obstet Gynaecol Res* 2011; 37:581-585.
72. **HEIDENREICH R, RÖCKEN M, GHORESCHI K.** Angiogenesis drives psoriasis pathogenesis. *Int J Exp Pathol* 2009; 90:232-248.
73. **HEIJSTEK MW, KRANENBURG O, BOREL RINKES IH.** Mouse models of colorectal cancer and liver metastases. *Dig Surg* 2005; 22:16-25.
74. **HELLSTRÖM M, PHNG LK, GERHARDT H.** VEGF and Notch signaling: the yin and yang of angiogenic sprouting. *Cell Adh Migr* 2007; 1:133-136.
75. **HEO JC, Woo SU, SON M, PARK JY, CHOI WS, CHANG KT, KIM SU, YOON EK, KIM YH, SHIN HM, LEE SH.** Anti-tumor activity of *Gastrodia elata* Blume is closely associated with a GTP-Ras-dependent pathway. *Oncol Rep* 2007; 18:849-853.
76. **HINOI T, AKYOL A, THEISEN BK, FERGUSON DO, GREENSON JK, WILLIAMS BO, CHO KR, FEARON ER.** Mouse model of colonic adenoma-carcinoma progression based on somatic *Apc* inactivation. *Cancer Res* 2007; 67:9721-9730.
77. **HO HN, WU MY, CHAO KH, CHEN CD, CHEN SU, YANG YS.** Peritoneal interleukin-10 increases with decrease in activated CD4+ T lymphocytes in women with endometriosis. *Hum Reprod* 1997a; 12:2528-2533.

78. **HO HN, WU MY, YANG YS.** Peritoneal cellular immunity and endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 1997b; 38:400-412.
79. **HSIEH CL, CHANG CH, CHIANG SY, LI TC, TANG NY, PON CZ, HSIEH CT, LIN JG.** Anticonvulsive and free radical scavenging activities of vanillyl alcohol in ferric chloride-induced epileptic seizures in Sprague-Dawley rats. *Life Sci* 2000; 67:1185-1195.
80. **HUSBY GK, HAUGEN RS, MOEN MH.** Diagnostic delay in women with pain and endometriosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003; 82:649-653.
81. **ISHIYAMA M, TOMINAGA H, SHIGA M, SASAMOTO K, OHKURA Y, UENO K.** A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol Pharm Bull* 1996; 19:1518-1520.
82. **JACKSON CJ, NGUYEN M.** Human microvascular endothelial cells differ from macrovascular endothelial cells in their expression of matrix metalloproteinases. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29:1167-1177.
83. **JAIN RK.** Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 2003; 9:685-693.
84. **JELIHOVSKY T, GRANT AF.** Endometriosis of the lung. *Thorax* 1968; 23:434-437.
85. **JUNG JW, YOON BH, OH HR, AHN JH, KIM SY, PARK SY, RYU JH.** Anxiolytic-like effects of *Gastrodia elata* and its phenolic constituents in mice. *Biol Pharm Bull* 2006; 29:261-265.
86. **KARAMYSHEVA AF.** Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 2008; 73:751-762.
87. **KIM BW, KOPPULA S, KIM JW, LIM HW, HWANG JW, KIM IS, PARK PJ, CHOI DK.** Modulation of LPS-stimulated neuroinflammation in BV-2 microglia by *Gastrodia elata*: 4-hydroxybenzyl alcohol is the bioactive candidate. *J Ethnopharmacol* 2012; 139:549-557.
88. **KLYSCZ T, JÜNGER M, JUNG F, ZEINTL H.** Cap image: a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy. *Biomed Tech* 1997; 42:168-175.
89. **KOBAEK-LARSEN M, THORUP I, DIEDERICHSEN A, FENGER C, HOITINGA MR.** Review of colorectal cancer and its metastases in rodent models: comparative aspects with those in humans. *Comp Med* 2000; 50:16-26.
90. **KOBAYASHI H.** Invasive capacity of heterotopic endometrium. *Gynecol Obstet Invest* 2000; 1:26-32.

91. **KOBAYASHI T, HIGASHI K, KAMADA H.** 4-Hydroxybenzyl alcohol accumulates in flowers and developing fruits of carrot and inhibits seed formation. *J Plant Physiol* 2003; 160:713-716.
92. **KOLLMAR O, JUNKER B, RUPERTUS K, MENGER MD, SCHILLING MK.** Studies on MIP-2 and CXCR2 expression in a mouse model of extrahepatic colorectal metastasis. *Eur J Surg Oncol* 2007; 33:803-811.
93. **KOLLMAR O, RUPERTUS K, SCHEUER C, NICKELS RM, HABERL GC, TILTON B, MENGER MD, SCHILLING MK.** CXCR4 and CXCR7 regulate angiogenesis and CT26.WT tumor growth independent from SDF-1. *Int J Cancer* 2010; 126:1302-1315.
94. **KONINCKX PR, KENNEDY SH, BARLOW DH.** Endometriotic disease: the role of peritoneal fluid. *Hum Reprod Update* 1998; 4:741-751.
95. **KRUGER EA, FIGG WD.** TNP-470: an angiogenesis inhibitor in clinical development for cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2000; 9:1383-1396.
96. **KUBOTA T, FUJIWARA H, AMAIKE H, TAKASHIMA K, INADA S, ATSUJI K, YOSHIMURA M, MATSUMOTO K, NAKAMURA T, YAMAGISHI H.** Reduced HGF expression in subcutaneous CT26 tumor genetically modified to secrete NK4 and its possible relation with antitumor effects. *Cancer Sci* 2004; 95:321-327.
97. **KWAK EL, CHUNG DC.** Hereditary colorectal cancer syndromes: an overview. *Clin Colorectal Cancer* 2007; 6:340-344.
98. **KYAMA CM, DEBROCK S, MWENDA JM, D'HOOGHE TM.** Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1:123.
99. **LABIANCA R, MERELLI B.** Screening and diagnosis for colorectal cancer: present and future. *Tumori* 2010; 96:889-901.
100. **LASCHKE MW, ELITZSCH A, VOLLMAR B, MENGER MD.** In vivo analysis of angiogenesis in endometriosis-like lesions by intravital fluorescence microscopy. *Fertil Steril* 2005; 84:1199-1209.
101. **LASCHKE MW, ELITZSCH A, SCHEUER C, HOLSTEIN JH, VOLLMAR B, MENGER MD.** Rapamycin induces regression of endometriotic lesions by inhibiting neovascularization and cell proliferation. *Br J Pharmacol* 2006; 149:137-144.

102. **LASCHKE MW, ELITZSCH A, SCHEUER C, VOLLMAR B, MENGER MD.** Selective cyclo-oxygenase-2 inhibition induces regression of autologous endometrial grafts by down-regulation of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis and stimulation of caspase-3-dependent apoptosis. *Fertil Steril* 2007; 87:163-171.
103. **LASCHKE MW, MENGER MD.** In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis. *Hum Reprod Update* 2007; 13:331-342.
104. **LASCHKE MW, KÖRBEL C, RUDZITIS-AUTH J, GASHAW I, REINHARDT M, HAUFF P, ZOLLNER TM, MENGER MD.** High-resolution ultrasound imaging. A novel technique for the noninvasive in vivo analysis of endometriotic lesion and cyst formation in small animal models. *Am J Pathol* 2010; 176:585-593.
105. **LASCHKE MW, GIEBELS C, MENGER MD.** Vasculogenesis: a new piece of the endometriosis puzzle. *Hum Reprod Update* 2011; 17:628-636.
106. **LASCHKE MW, MENGER MD.** Anti-angiogenic treatment strategies for the therapy of endometriosis. *Hum Reprod Update* 2012; 18:682-702.
107. **LAUFFENBURGER DA, HORWITZ AF.** Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 1996; 84:359-369.
108. **LAWRENCE T.** The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; 1:a001651.
109. **LAWSON ND, WEINSTEIN BM.** Arteries and veins: making a difference with zebrafish. *Nat Rev Genet* 2002; 3:674-682.
110. **LEE YJ, HWANG SM, KANG DG, KIM JS, LEE HS.** Effect of *Gastrodia elata* on tumor necrosis factor-alpha-induced matrix metalloproteinase activity in endothelial cells. *J Nat Med* 2009; 63:463-467.
111. **LEE YJ, KARL DL, MADUEKWE UN, ROTHROCK C, RYEOM S, D'AMORE PA, YOON SS.** Differential effects of VEGFR-1 and VEGFR-2 inhibition on tumor metastases based on host organ environment. *Cancer Res* 2010; 70:8357-8367.
112. **LEWIS LA, NEZHAT C.** Laparoscopic treatment of bowel endometriosis. *Surg Technol Int* 2007; 16:137-141.
113. **LIM EJ, KANG HJ, JUNG HJ, PARK EH.** Anti-angiogenic, anti-inflammatory and anti-nociceptive activity of 4-hydroxybenzyl alcohol. *J Pharm Pharmacol* 2007; 59:1235-1240.

114. **LIU DT, HITCHCOCK A.** Endometriosis: its association with retrograde menstruation, dysmenorrhoea and tubal pathology. *Br J Obstet Gynaecol* 1986; 93:859-862.
115. **LOUSSE JC, VAN LANGENDONCKT A, DEFRERE S, RAMOS RG, COLETTE S, DONNEZ J.** Peritoneal endometriosis is an inflammatory disease. *Front Biosci (Elite Ed)* 2012; 4:23-40.
116. **MACHADO DE, BERARDO PT, LANDGRAF RG, FERNANDES PD, PALMERO C, ALVES LM, ABRAO MS, NASCIUTTI LE.** A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses the growth of endometriosis with an antiangiogenic effect in a rat model. *Fertil Steril* 2010; 93:2674-2679.
117. **MAHNKE JL, DAWOOD MY, HUANG JC.** Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertil Steril* 2000; 73:166-170.
118. **MANILICH EA, KIRAN RP, RADIVOYEVITCH T, LAVERY I, FAZIO VW, REMZI FH.** A novel data-driven prognostic model for staging of colorectal cancer. *J Am Coll Surg* 2011; 213:579-588.
119. **MARTIN JD JR, HAUCK AE.** Endometriosis in the male. *Am Surg* 1985; 51:426-430.
120. **MASSON V, DEVY L, GRIGNET-DEBRUS C, BERNT S, BAJOU K, BLACHER S, ROLAND G, CHANG Y, FONG T, CARMELIET P, FOIDART JM, NOËL A.** Mouse Aortic Ring Assay: A New Approach of the Molecular Genetics of Angiogenesis. *Biol Proced Online* 2002; 4:24-31.
121. **MAXWELL AF.** Endometriosis. *Cal West Med* 1931; 34:337-340.
122. **MCDONALD DM, BALUK P.** Significance of blood vessel leakiness in cancer. *Cancer Res* 2002; 62:5381-5385.
123. **MCLAREN J, PRENTICE A, CHARNOCK-JONES DS, MILLICAN SA, MÜLLER KH, SHARKEY AM, SMITH SK.** Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. *J Clin Invest* 1996; 98:482-489.
124. **MENGER MD, SACK FU, HAMMERSEN F, MESSMER K.** Tissue oxygenation after prolonged ischemia in skeletal muscle: therapeutic effect of prophylactic isovolemic hemodilution. *Adv Exp Med Biol* 1989; 248:387-395.
125. **MENGER MD, PELIKAN S, STEINER D, MESSMER K.** Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox". *Am J Physiol* 1992; 263:1901-1906.
126. **MENGER MD, LEHR HA.** Scope and perspectives of intravital microscopy - bridge over from in vitro to in vivo. *Immunol Today* 1993; 14:519-522.

127. **MENGER MD, LASCHKE MW, VOLLMAR B.** Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *Eur Surg Res* 2002; 34:83-91.
128. **MEYER R.** The status of adenomyosis and adenomyoma, with a discussion of seroepithelial adenomyosis and sarcomatose adeno-myometritis. *Zel Gynaecol* 1919; 43:745-750.
129. **MICHEL JB, VIRMANI R, ARBUSTINI E, PASTERKAMP G.** Intraplaque haemorrhages as the trigger of plaque vulnerability. *Eur Heart J* 2011; 32:1977-1985.
130. **MUNKSGAARD PS, BLAAKAER J.** The association between endometriosis and ovarian cancer: a review of histological, genetic and molecular alterations. *Gynecol Oncol* 2012; 124:164-169.
131. **MUTO T, BUSSEY HJ, MORSON BC.** The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 1975; 36:2251-2270.
132. **NICOSIA RF, TCHAO R, LEIGHTON J.** Histotypic angiogenesis in vitro: light microscopic, ultrastructural, and radioautographic studies. *In Vitro* 1982; 18:538-549.
133. **NICOSIA RF, OTTINETTI A.** Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. A quantitative assay of angiogenesis in vitro. *Lab Invest* 1990; 63:115-122.
134. **O'CONNELL MJ, MAILLIARD JA, KAHN MJ, MACDONALD JS, HALLER DG, MAYER RJ, WIEAND HS.** Controlled trial of fluorouracil and low-dose leucovorin given for 6 months as postoperative adjuvant therapy for colon cancer. *J Clin Oncol* 1997; 15:246-250.
135. **OOSTERLYNCK DJ, MEULEMAN C, SOBIS H, VANDEPUTTE M, KONINCKX PR.** Angiogenic activity of peritoneal fluid from women with endometriosis. *Fertil Steril* 1993; 59:778-782.
136. **OUYANG L, SHI Z, ZHAO S, WANG FT, ZHOU TT, LIU B ET AL.** Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif* 2012; 45:487-498.
137. **OZKAN S, MURK W, ARICI A.** Endometriosis and infertility: epidemiology and evidence-based treatments. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1127:92-100.
138. **PAPENFUSS HD, GROSS JF, INTAGLIETTA M, TREESE FA.** A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold. *Microvasc Res* 1979; 18:311-318.

139. **PENNING LC, DUBBELMAN TM.** Fundamentals of photodynamic therapy: cellular and biochemical aspects. *Anticancer Drugs* 1994; 5:139-146.
140. **PITSOS M, KANAKAS N.** The role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of endometriosis. *Reprod Sci* 2009; 16:717-726.
141. **POVLISHOCK JT, ROSENBLUM WI, SHOLLEY MM, WEI EP.** An ultrastructural analysis of endothelial change paralleling platelet aggregation in a light/dye model of microvascular insult. *Am J Pathol* 1983; 110:148-160.
142. **PUGH CW, RATCLIFFE PJ.** Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 2003; 9:677-684.
143. **RIBATTI D, NICO B, CRIVELLATO E.** The role of pericytes in angiogenesis. *Int J Dev Biol* 2011; 55:261-268.
144. **RICCI AG, OLIVARES CN, BILOTAS MA, MERESMAN GF, BARAÑO RI.** Effect of vascular endothelial growth factor inhibition on endometrial implant development in a murine model of endometriosis. *Reprod Sci* 2011; 18:614-622.
145. **RICE VM.** Conventional medical therapies for endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 955:343-352.
146. **RICHTER ON, DORN C, RÖSING B, FLASKAMP C, ULRICH U.** Tumor necrosis factor alpha secretion by peritoneal macrophages in patients with endometriosis. *Arch Gynecol Obstet* 2005; 271:143-147.
147. **ROSENBERG MP, BORTNER D.** Why transgenic and knockout animal models should be used (for drug efficacy studies in cancer). *Cancer Metastasis Rev* 1999; 17:295-299.
148. **SAETZLER RK, JALLO J, LEHR HA, PHILIPS CM, VASTHARE U, ARFORS KE, TUMA RF.** Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *J Histochem Cytochem* 1997; 45:505-513.
149. **SAMPSON JA.** Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissues into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1927a; 14:422-469.
150. **SAMPSON JA.** Metastatic or embolic endometriosis, due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the venous circulation. *Am J Pathol* 1927b; 3:93-110.

151. **SANDISON JC.** The transparent chamber of the rabbit's ear giving a complete description of improved techniques of construction and introduction and general account of growth and behavior of living cells and tissues seen with the microscope. *Am J Anat* 1928; 41:447-472.
152. **SCHAPER W, SCHOLZ D.** Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:1143-1151.
153. **SHIFREN JL, TSENG JF, ZALOUDEK CJ, RYAN IP, MENG YG, FERRARA N, JAFFE RB, TAYLOR RN.** Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:3112-3118.
154. **SIMOENS S, HUMMELSHOJ L, D'HOOGE T.** Endometriosis: cost estimates and methodological perspective. *Hum Reprod Update* 2007; 13:395-404.
155. **STATON CA, REED MW, BROWN NJ.** A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *Int J Exp Pathol* 2009; 90:195-221.
156. **STEINBAUER M, HARRIS AG, ABELS C, MESSMER K.** Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks Arch Surg* 2000; 385:290-298.
157. **TAPPENDEN P, JONES R, PAISLEY S, CARROLL C.** Systematic review and economic evaluation of bevacizumab and cetuximab for the treatment of metastatic colorectal cancer. *Health Technol Assess* 2007; 11:1-128.
158. **TELIMAA S, RÖNNBERG L, KAUPPILA A.** Placebo-controlled comparison of danazol and high-dose medroxyprogesterone acetate in the treatment of endometriosis after conservative surgery. *Gynecol Endocrinol* 1987; 1:363-371.
159. **THIBODEAU LL, PRIOLEAU GR, MANUELIDIS EE, MERINO MJ, HEAFNER MD.** Cerebral endometriosis. Case report. *J Neurosurg* 1987; 66:609-610.
160. **THOMAS EJ, CAMPBELL IG.** Evidence that endometriosis behaves in a malignant manner. *Gynecol Obstet Invest* 2000; 1:2-10.
161. **TO SS, NEWMAN PM, HYLAND VJ, ROBINSON BG, SCHRIEBER L.** Regulation of adhesion molecule expression by human synovial microvascular endothelial cells in vitro. *Arthritis Rheum* 1996; 39:467-477.

162. **TORRES FILHO IP, HARTLEY-ASP B, BORGSTRÖM P.** Quantitative angiogenesis in a syngeneic tumor spheroid model. *Microvasc Res* 1995; 49:212-226.
163. **UEKI M.** Histologic study of endometriosis and examination of lymphatic drainage in and from the uterus. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165:201-209.
164. **VAJKOCZY P, ULLRICH A, MENGER MD.** Intravital fluorescence videomicroscopy to study tumor angiogenesis and microcirculation. *Neoplasia* 2000; 2:53-61.
165. **VERCELLINI P, VENDOLA N, PRESTI M, BOLIS G.** Multifocal endometriosis. A case report. *J Reprod Med* 1993; 38:815-819.
166. **VIRMANI R, KOLODIE FD, BURKE AP, FINN AV, GOLD HK, TULENKO TN, WRENN SP, NARULA J.** Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:2054-2061.
167. **VON RECKLINGHAUSEN F.** Adenomyomas and cystadenomas of the wall of the uterus and tube: Their origin as remnants of the wolffian body. *Wien Klin Wochenschr* 1896; 8:530.
168. **WENZL RJ, HEINZL H.** Localization of matrix metalloproteinase-2 in uterine endometrium and ectopic implants. *Gynecol Obstet Invest* 1998; 45:253-257.
169. **WESTERMANN S, VOLLMAR B, THORLACIUS H, MENGER MD.** Surface cooling inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced microvascular perfusion failure, leukocyte adhesion, and apoptosis in the striated muscle. *Surgery* 1999; 126:881-889.
170. **WILMANNS C, FAN D, O'BRIAN CA, BUCANA CD, FIDLER IJ.** Orthotopic and ectopic organ environments differentially influence the sensitivity of murine colon carcinoma cells to doxorubicin and 5-fluorouracil. *Int J Cancer* 1992; 52:98-104.
171. **YAMAUCHI JI, VOLLMAR B, WOLF B, MENGER MD.** Role of TNF-alpha in local surgical trauma-induced microvascular dysfunction. *Dig Surg* 1999; 16:400-406.
172. **YANG XD, ZHU J, YANG R, LIU JP, LI L, ZHANG HB.** Phenolic constituents from the rhizomes of *Gastrodia elata*. *Nat Prod Res* 2007; 21:180-186.
173. **YU SJ, KIM JR, LEE CK, HAN JE, LEE JH, KIM HS, HONG JH, KANG SG.** *Gastrodia elata* blume and an active component, p-hydroxybenzyl alcohol reduce focal ischemic brain injury through antioxidant related gene expressions. *Biol Pharm Bull* 2005; 28:1016-1020.

174. **YU SS, ZHAO J, ZHENG WP, ZHAO Y.** Neuroprotective effect of 4-hydroxybenzyl alcohol against transient focal cerebral ischemia via anti-apoptosis in rats. *Brain Res* 2010; 1308:167-175.
175. **ZENG X, ZHANG S, ZHANG L, ZHANG K, ZHENG X.** A study of the neuroprotective effect of the phenolic glucoside gastrodin during cerebral ischemia in vivo and in vitro. *Planta Med* 2006; 72:1359-1365.
176. **ZENTRUM FÜR KREBSREGISTERDATEN DES ROBERT-KOCH-INSTITUTS,** www.rki.de, Stand: 12.04.2014
177. **ZONDERVAN KT, CARDON LR, KENNEDY SH.** The genetic basis of endometriosis. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2001; 13:309-314
178. **ZWEIFACH BW.** The microcirculation in the intestinal mesentery. *Microvasc Res* 1973; 5:363-367.

9. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Menger für die Überlassung des Themas, die konstruktive Kritik und Vorschläge zur vorliegenden Arbeit und die Möglichkeit, am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie in Homburg tätig zu sein.

Herrn PD Dr. Laschke danke ich ganz herzlich für seine Unterstützung in der Wahl des Themas, seine persönliche Anleitung im Erlernen der verschiedenen chirurgischen Techniken und in der Durchführung der Experimente. Seine allzeit unkomplizierten Hilfestellungen, Beratung und Kritik haben ganz wesentlich zum Gelingen der Studien und der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Den Mitarbeitern der Experimentellen Chirurgie in Homburg möchte ich für die gute Arbeitsatmosphäre am Institut danken. Insbesondere möchte ich mich bei Frau Dr. Scheuer, die mir in der Erstellung der Laboranalysen hilfreich zur Seite stand, sowie bei Frau Dr. Körbel für ihre freundschaftliche Unterstützung und Motivation während der gesamten Zeit bedanken.

Weiterhin danke ich allen, die mich durch fachliche Diskussion bereichert und weitergebracht haben.

Meiner Familie, die mich immer wieder motiviert und unterstützt hat, danke ich von ganzem Herzen.

11. PUBLIKATIONEN

Originalarbeiten

LASCHKE MW, **VORSTERMAN VAN OIJEN AE**, SCHEUER C, MENGER MD. In vitro and in vivo evaluation of the anti-angiogenic actions of 4-hydroxybenzyl alcohol. *Br J Pharmacol* 2011; 163:835-844.

LASCHKE MW, **VORSTERMAN VAN OIJEN AE**, KÖRBEL C, SCHEUER C, MENGER MD. 4-Hydroxybenzyl alcohol: A novel inhibitor of tumor angiogenesis and growth. *Life Sci* 2013; 93:44-50.

Zitierfähige Abstracts

VORSTERMAN VAN OIJEN AE, KÖRBEL C, SCHEUER C, MENGER MD, LASCHKE MW. In vitro and in vivo anti-angiogenic actions of 4-hydroxybenzyl alcohol (HBA) in extrahepatic colorectal metastasis. *Langenbecks Arch Surg* 2012; 397:649.