

Mikrozirkulation in vivo – ein neues Modell zur mikrozirkulatorischen Untersuchung verschiedener kindlicher Tumoren.

Ein neues Modell zur mikrozirkulatorischen Untersuchung kindlicher Tumoren wird seit kurzer Zeit an der Klinik für Kinderchirurgie im Dr. von Haunerschen Kinderspital mit freundlicher finanzieller Unterstützung der Mehr **LEBEN** für krebskranke Kinder – Bettina-Bräu-Stiftung etabliert. Die Arbeitsgruppe „Kinderchirurgische Onkologie“ (Leiter: Prof. Dr. Dietrich von Schweinitz, Durchführung: Dr. Jan Gödeke) untersucht dabei v.a. die Tumorneoangiogenese, deren Erforschung bei verschiedenen kindlichen Tumoren noch in den „Kinderschuhen“ steckt und vielversprechende therapeutische Ansätze verspricht.

Für das Tumorwachstum und auch für den Prozess der Tumorstreuung ist die Produktion eines ausreichenden Gefäßnetzwerks im Tumor selbst und in der angrenzenden Umgebung entscheidend. Tumoren, die kleiner als 1 mm im Durchmesser sind, erhalten Nährstoffe und Sauerstoff durch Diffusion. Je größer der Tumor wird, desto stärker hängt sein Wachstum von einer ausreichenden Gefäßneubildung ab. Die einsetzende Tumorangio-genese ist vom Zusammenspiel stimulatorischer und inhibitorischer Faktoren abhängig, die vom Tumor selbst und von seiner Umgebung produziert und ausgeschüttet werden. Nach Einleitung der Gefäßneubildung wächst ein Tumor dann exponentiell in unkontrollierter Weise.

Trotz moderner chirurgischer und internistisch onkologischer Therapieverfahren sterben immer noch eine Vielzahl an Kindern an Tumoren des kindlichen Alters. Für das Hepatoblastom, als häufigstem bösartigen kindlichen Lebertumor z.B. liegt die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate nur bei ca. 75% [1, 2].

Diesbezüglich kann die frühe antiangiogenetische Behandlung eine sinnvolle und wichtige Ergänzung zu den klassischen onkologischen Behandlungsansätzen, wie der chirurgischen Resektion, Chemotherapie oder Strahlentherapie darstellen. Die Frage nach zu erwartenden Nebenwirkungen durch angiogene Substanzen lässt sich aufgrund der vorliegenden präklinischen Daten nicht abschließend beantworten. Es ist jedoch zu hoffen, dass die Nebenwirkungen gering sein werden, da die Therapie hochselektiv auf sich teilende Gefäßendothelzellen im Bereich der Tumoren abzielt. Obwohl sicherlich noch eine ganze Reihe von Problemen im Rahmen der klinischen Entwicklung antiangiogener Therapien zu lösen sein wird, besteht Konsens, dass es sich hierbei um einen innovativen, vielversprechenden neuen Ansatz zur Therapie von Krebserkrankungen handelt [3].

Im ersten Schritt des Forschungsprojektes werden die Neoangiogenese und das Tumorwachstum des Hepatoblastoms an den 2 verschiedenen humanen Hepatoblastom-Zelllinien HepT1 und HUH6 mit dem Ziel der späteren Intervention untersucht. Im Anschluss sollen Untersuchungen mit Zelllinien des hepatozellulären Karzinoms sowie des Neuroblastoms folgen.

Als Versuchsmodell dient das von Endrich et al. 1980 [4] ursprünglich für den syrischen Goldhamster entwickelte Rückenhautkammermodell, welches mittlerweile international zur Beobachtung und Analyse der Mikrozirkulation bei verschiedenen Labortieren etabliert ist. Zwei Tage nach der Implantation der Rückenhautkammer bei Nacktmäusen erfolgt die Implantation der menschlichen Tumorzellen im Bereich des Kammerbeobachtungsareals in die genetisch immunsupprimierten Tiere. In Folge werden die Tumorgefäßneubildung sowie das Tumorwachstum **in vivo**, d.h. am lebenden Versuchstier, für einen Zeitraum von bis zu 4 Wochen fluoreszenzmikroskopisch beobachtet. Der Tumor wächst diesbezüglich zwar nicht in artgleichem Gewebe, verschiedene Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen mit dem Ziel der Bestimmung der histologischen Wachstumsstruktur nach subkutaner Tumorzellimplantation haben jedoch gezeigt, dass die verwendeten Zelllinien in zahlreichen Versuchstieren ein fast identisches histologisches Wachstumsmuster zum Original-Tumorgewebe zeigen [5, 6, 7, 8].

Sämtliche operativen Eingriffe werden in vollständig antagonistischer Anästhesie durchgeführt. Die anschließenden Untersuchungen sind ohne Analgesie oder Sedierung möglich. Die Tiere zeigen während der gesamten Zeit erfahrungsgemäß keinerlei Einschränkungen in ihrem physiologischen Verhalten. Die Untersuchungen sind durch die Bezirksregierung Oberbayern als ethisch vertretbar anerkannt und genehmigt worden und werden durch diese stetig kontrolliert. Die für das Verständnis der Pathogenese mit dem Ziel der therapeutischen Intervention so wichtigen in vivo mikrozirkulatorischen Untersuchungen sind, wenn sie nicht direkt am Menschen durchgeführt werden können, nur mit einem etablierten Tiermodell durchführbar. Daher sind Tierversuche diesbezüglich unverzichtbar.

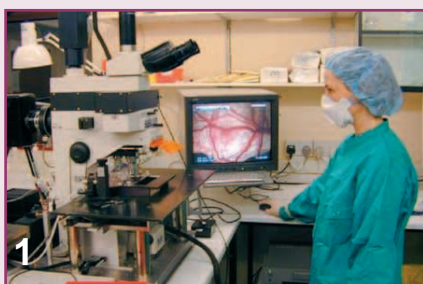


Abb. 1: Versuchsaufbau Mikrozirkulationslabor (Gray Cancer Institute, UK [9])

Wörterklärungen

in vivo	am lebenden Objekt
Neoangiogenese	Gefäßneubildung
inhibitorisch	hemmend
antiangiogen	hemmend auf die Gefäßneubildung
Gefäßendothelzellen	Zellen, welche die Blutgefäße von innen auskleiden
subkutane Tumorzellimplantation	Tumorzellimplantation in das Unterhautgewebe
vollständig antagonisierbare Anästhesie	vollständig, durch entsprechende Medikamente wieder aufhebbar
Anästhesie	Anästhesie
Analgesie	Aufhebung der Schmerzempfindung
Mesenterialmikrozirkulation	Untersuchung der Dünndarmmikrozirkulation
intrahepatisch	innerhalb der Leber
Pathogenese	Entstehung eines Krankheitszustandes

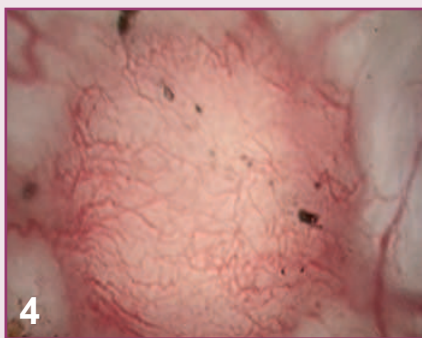
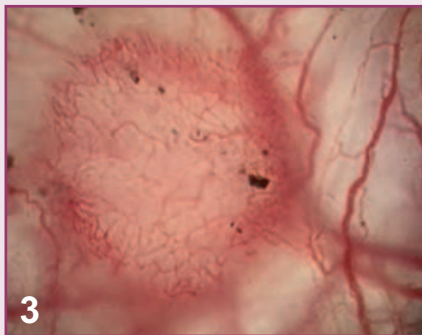
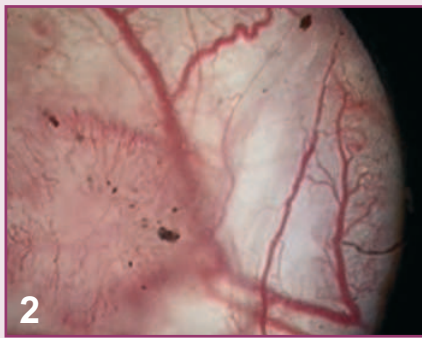


Abb. 2, 3, 4:
Zunehmende Neoangiogenese eines Tumors in der Rückenhamerkammer an den Tagen 6, 7 und 8 nach Tumorimplantation (Gray Cancer Institute, UK [9])

Der Vorteil des hier verwendeten Tumormodells liegt darin, dass der Einfluss des chirurgischen Traumas sowie von Narkotika auf die Mikrozirkulation im Gegensatz zu den „akuten“ mikrozirkulatorischen Modellen minimiert werden kann. Gleichzeitig ist die Tumorneoangiogenese **in vivo** über einen Zeitraum von bis zu 4 Wochen auf einfache Weise beobachtbar und verfolgbar. Die sog. „akuten Modelle“, wie die Untersuchung der Mesenterialmikrozirkulation, erlauben nur eine kurzzeitige Beobachtung der Mikrozirkulation über max. mehrere Stunden unter dem Einfluss des akuten chirurgischen Operationstraumas. So kann auch der chronische Einfluss z.B. bestimmter antiangiogener Substanzen untersucht werden. Beobachtungen über einen noch längeren Zeitraum sind in der Regel nicht möglich, da der wachsende Tumor dann meist das Beobachtungsareal überwuchert und definitive Aussagen über das Tumorstadium nicht mehr möglich sind.

Langfristig ist es das Ziel, mit den gewonnenen mikrozirkulatorischen Erkenntnissen organbezogene mikrozirkulatorische Modelle, wie z.B. ein intrahepatisches Tumormodell des Hepatoblastoms zu entwickeln und zu etablieren.

Wir bedanken uns bei allen Förderern der Mehr **LEBEN** für krebskranke Kinder – Bettina-Bräu-Stiftung für die Unterstützung bei unserem Bemühen, die Heilungschancen krebskranker Kinder in der Zukunft zu verbessern.

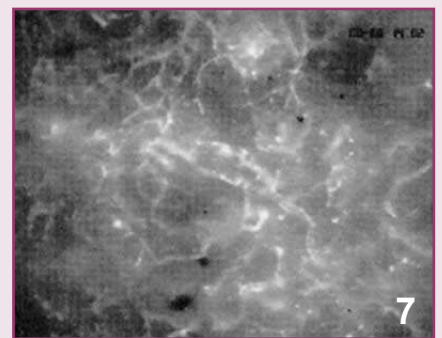
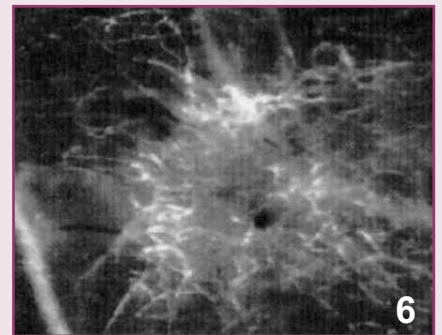


Abb. 5, 6, 7:
Verschiedene fluoreszenzmikroskopische Übersichtsdarstellungen der Tumorneoangiogenese in der Rückenhamerkammer [10]

Literatur:

- Riede, Schaefer. Allgemeine und spezielle Pathologie, Thieme Verlag, 4. Auflage, S. 774
- Speer, Gahr. Pädiatrie, Springer Verlag, S. 726
- Marmé, D. (2001): Tumoriangiogenese: Neue Ansätze zur Krebstherapie Onkologie; 24 (suppl 1):1-5.
- Endrich B., Asaishi K., Goetz A., Messmer K. (1980): Technical report a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. Res. Exp. Med. Berl. 177: 125-134.
- Fuchs J, Wenderoth M, von Schweinitz D, Haindl J, Leuschner I (1998): Comparative activity of cisplatin, ifosfamide, doxorubicin, carboplatin, and etoposide in heterotransplanted hepatoblastoma. Cancer 83: 2400-2407.
- Pietsch, T., Fonatsch, C., Albrecht, S., Maschek, H., Wolf, H.K., von Schweinitz D. (1996): Characterization of the continuous cell line HepT1 derived from a human hepatoblastoma. Lab. Invest. 74(4):809-818.
- Yang, Y., Lv, Q.J., Du, Q.Y., Yang, B.H., Lin, R.X., Wang, S.Q. (2005): Combined effects of Cantide and chemotherapeutic drugs on inhibition of tumor cells' growth in vitro and in vivo. World J. Gastroenterol. 28; 11(16):2491-2496.
- Pietsch, T., Gottert, E., Meese, E., Blin, N., Feickert, H.J., Riehm, H., Kovacs, G. (1988): Characterisation of a continuous cell line (MHH-NB-11) derived from advanced neuroblastoma. Anticancer Res. 8(6):1329-1333.
- Gray Cancer Institute: www.graylab.ac.uk
- Vajkoczny, P. et al (1998): Characterization of angiogenesis and microcirculation of highgrade glioma: an intravital multicolor fluorescence microscopic approach in the athymic nude mouse. J Cereb Blood Flow Metab. 18(5):510-20.