

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für
Allgemeine Orthopädie und Tumororthopädie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Georg Gosheger -

**Etablierung eines Modells zur Kultivierung von
Riesenzelltumoren des Knochens auf der Chorio-Allantois-
Membran (CAM) von Hühnereiern**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Vorgelegt von:

Horter, Hannes Markus

aus Minden

2012

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz
1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jendrik Harges
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Bernhard Greitemann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2012

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Allgemeine Orthopädie und Tumororthopädie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Georg Gosheger -
Referent: Prof. Dr. med. Jendrik Harges
Koreferent: Prof. Dr. med. Bernhard Greitemann

Zusammenfassung

Etablierung eines Modells zur Kultivierung von Riesenzelltumoren des Knochens auf der Chorio-Allantois-Membran (CAM) von Hühnereiern

Hortner, Hannes Markus

Riesenzelltumoren des Knochens sind seltene Tumoren, die meist in den Epiphysen der langen Röhrenknochen zu finden sind. Obwohl sie als gutartig klassifiziert werden, weisen sie häufig ein lokal aggressives Wachstum, mit hoher Rezidivgefahr auf und bilden in seltenen Fällen sogar Lungenmetastasen. Histologisch zeichnen sie sich, neben den osteoklastischen Riesenzellen, durch Monozyten und mesenchymale Stromazellen aus. Bisher gab es zur Erforschung dieser Tumoren kein In-Vivo-Modell, und in Zellkulturen ließen sich langfristig nur die Stromazellen kultivieren.

Die Chorio-Allantois-Membran (CAM) ist ein wichtiges Organ des Hühnerembryos, das unter der Eierschale liegt und unter anderem dem Gasaustausch und der Calciumresorption dient. Sie wird seit hundert Jahren für verschiedene Versuche benutzt, unter anderem für die Anzucht von Viren, für das Studium der Angiogenese und für die Untersuchung verschiedener Tumoren. Die CAM ist mit einfachen Mitteln kostengünstig nutzbar und ermöglicht eine große Anzahl von Versuchen in relativ kurzer Zeit.

Wir verwendeten Tumorproben von 10 verschiedenen Patienten, gaben diese als Suspension auf die CAM von Hühnerembryonen am zehnten Entwicklungstag und dokumentierten die Veränderungen auf der CAM über sechs Tage mit Fotos. Die Größe der mutmaßlichen Tumoren wurde abgeschätzt und Proben für verschiedene histologische und immunhistologische Untersuchungen fixiert.

Von 125 mit Tumorgewebe beimpften Eiern zeigten 76% ein tumorartiges Gebilde. Von den 69 Eiern, die bis zum Ende des Beobachtungszeitraums am Leben gehalten werden konnten, waren es 87%. Die Tumoren wiesen, ähnlich wie die Originaltumoren, häufig eine gelbliche Färbung und Einblutungen auf. Die Masse des Tumorgewebes je Ei variierte erheblich zwischen den Versuchsgruppen; die Schätzwerte lagen zwischen $<0,1 \mu\text{l}$ und $15,4 \mu\text{l}$. Die Todesrate der beimpften Eier während des Beobachtungszeitraums war mit 45% deutlich größer als in den Kontrollen. Dort lagen sie bei 19%. In den histologischen Untersuchungen zeigten sich Riesenzellen, Monozyten und Stromazellen, wie bei den Originaltumoren. Die immunhistologischen Untersuchungen konnten die Identität der Zellen weiter bestätigen. Eine durchgeführte Interphasen-FISH zeigte, dass die Tumorzellen menschlichen Ursprungs waren und die eingesprossenen Gefäße vom Huhn stammten.

Die Ergebnisse belegen, dass es uns gelungen ist, vollwertige Riesenzelltumoren auf der Hühner-CAM zu kultivieren. Das Modell zeigte dabei Potential besonders zur Untersuchung der Angiogenese im Bereich der Tumoren und der Pathobiologie der Metastasierung.

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2012

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Etablierung eines Modells zur Kultivierung von Riesenzelltumoren des Knochens auf
der Chorio-Allantois-Membran (CAM) von Hühnereiern

in der/im (Klinik, Institut, Krankenhaus):

Universitätsklinikum Münster, Klinik und Poliklinik für Allgemeine Orthopädie und
Tumororthopädie

unter Anleitung von:

Prof. Dr. J. Harges

1. selbstständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeit angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

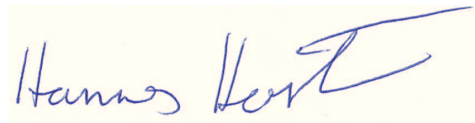
Anschrift:

Hannes Horter
Ahmser Straße 1
32052 Herford

Ort, Datum

Herford, 10.11.2011

Unterschrift



1	Einleitung	1
1.1	Riesenzelltumor des Knochens (Osteoklastom)	1
1.1.1	Allgemein	1
1.1.2	Epidemiologie	1
1.1.3	Ätiologie	1
1.1.4	Klinische Erscheinung.....	2
1.1.5	Einteilung	3
1.1.6	Diagnose.....	4
1.1.7	Besonderheiten.....	7
1.1.8	Malignität bei Riesenzelltumoren	8
1.1.9	Therapie.....	8
1.1.10	Prognose	10
1.2	Chorioallantoismembran (CAM).....	11
1.2.1	Allgemein	11
1.2.2	Bedeutung der CAM für den Hühnerembryo.....	11
1.2.3	Entwicklung der CAM.....	12
1.2.4	Morphologie der CAM	12
1.2.5	CAM-Modell	13
1.3	Zielsetzung der Arbeit	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Tumorproben	16
2.1.1	Kriterien der Probenauswahl.....	16
2.1.2	Aufbereiten der Tumorproben und Lagerung.....	16
2.1.3	Auftauen der Tumorproben und Vorbereitung für die Applikation	17
2.2	Chorioallantois-Membran-Modell des Huhnes	18
2.2.1	Vorbereiten der Probenringe.....	18
2.2.2	Zeitplan	19
2.2.3	Bebrüten der Eier.....	19
2.2.4	Vorbereitung der Eier.....	22
2.2.5	Auftragen der Tumorproben.....	25
2.3	Dokumentation und Analyse der Tumorentwicklung	27
2.3.1	Anmischen der Paraformaldehyd-Lösung.....	27

2.3.2	Fotodokumentation der Tumor-Entwicklung im Ei.....	27
2.3.3	Fixierung und abschließende Fotodokumentation der Tumoren .	28
2.3.4	Abschätzen und Auswerten des Tumorumens.....	29
2.3.5	Auswertung der Überlebensrate der Hühnerembryonen.....	31
2.4	Auswärtige Analysen exemplarischer Tumorproben.....	32
2.4.1	Histologie und Immunhistologie der Tumorproben.....	32
2.4.2	Interphase Fluoreszenz-In Situ-Hybridisierung (FISH).....	32
3	Ergebnisse.....	33
3.1	Patientenkollektiv.....	33
3.2	Entwicklung von Tumoren auf der CAM.....	34
3.3	Wachstumsverhalten der Tumoren.....	36
3.4	Einfluss der Tumortransplantation auf die Embryonen.....	39
3.5	Histologie der Tumoren.....	41
3.6	Immunhistologie und FISH der Tumoren.....	42
4	Diskussion.....	43
4.1	Etablierte Forschungsmethoden am Riesenzelltumor im Vergleich zum CAM Modell.....	43
4.2	Aussagekraft der Proben aus dem Patientenkollektiv.....	44
4.3	Entwicklung von Tumoren auf der CAM.....	44
4.4	Wachstumsverhalten der Tumoren.....	45
4.5	Einfluss der Tumortransplantation auf die Embryonen.....	45
4.6	Histologie der Tumoren.....	46
4.7	Immunhistologie und FISH der Tumoren.....	46
4.8	Mögliche Anwendungen des Modells.....	47
5	Literaturverzeichnis.....	49
6	Abbildungsverzeichnis.....	54
7	Tabellenverzeichnis.....	56
8	Diagrammverzeichnis.....	56
9	Danksagung.....	57
10	Lebenslauf.....	58
11	Anhang.....	I
11.1	Abkürzungen.....	I

1 Einleitung

1.1 Riesenzelltumor des Knochens (*Osteoklastom*)

1.1.1 Allgemein

Der Riesenzelltumor des Knochens wird in der „World Health Organisation Classification of Tumors“ als aggressiv wachsender, aber gutartiger, Tumor aus neoplastischen mononukleären Zellen und osteoklastenartigen Riesenzellen beschrieben [47]. Die mononukleären Zellen werden in Monozyten und mononukleäre Stromazellen eingeteilt [58].

Er weist jedoch auch für bösartige Wucherungen typische Eigenschaften auf, wie lokal aggressives Wachstum oder Rezidive in zuvor gesundem Gewebe. Sehr selten kommt es zu einer Metastasierung, diese erfolgt fast immer in die Lunge [12,25]. Eine maligne Entartung im Bereich eines zuvor diagnostizierten, gutartigen, Riesenzelltumors ist selten. Das trifft auch für Riesenzelltumoren zu, die bei der Erstdiagnose bereits entartete Anteile enthielten [2,11,13].

1.1.2 Epidemiologie

Etwa 4-5% aller Knochentumoren und 20% aller gutartigen Knochentumoren sind Riesenzelltumoren [47]. Die meisten treten zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr auf. Es wird nur von sehr wenigen Fällen berichtet, die vor dem 15. oder nach dem 60. Lebensjahr auftraten. Beide Geschlechter sind etwa gleichstark betroffen. In den herangezogenen Publikationen schwankte die Geschlechterverteilung weiblich zu männlich zwischen 55%:45% und 43%:57% [6,9,15,26-27].

1.1.3 Ätiologie

Trotz des Namens werden der gängigen wissenschaftlichen Meinung nach nicht die mehrkernigen Riesenzellen für den Ursprung des Tumors gehalten. Verschiedene Untersuchungen legen vielmehr nahe, dass die mesenchymalen Stromazellen das eigentliche neoplastische Element

sind [39,49,58]. Wülling et al. kultivierten Zelllinien aus Riesenzelltumoren und konnten dabei die mesenchymalen Zellen über mehrere Passagen erhalten, nicht jedoch die Monozyten und die Riesenzellen. Auch ließen sich dadurch viele Gemeinsamkeiten zu mesenchymalen Stammzellen nachweisen, einschließlich der Fähigkeit zur Differenzierung zu Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten [58].

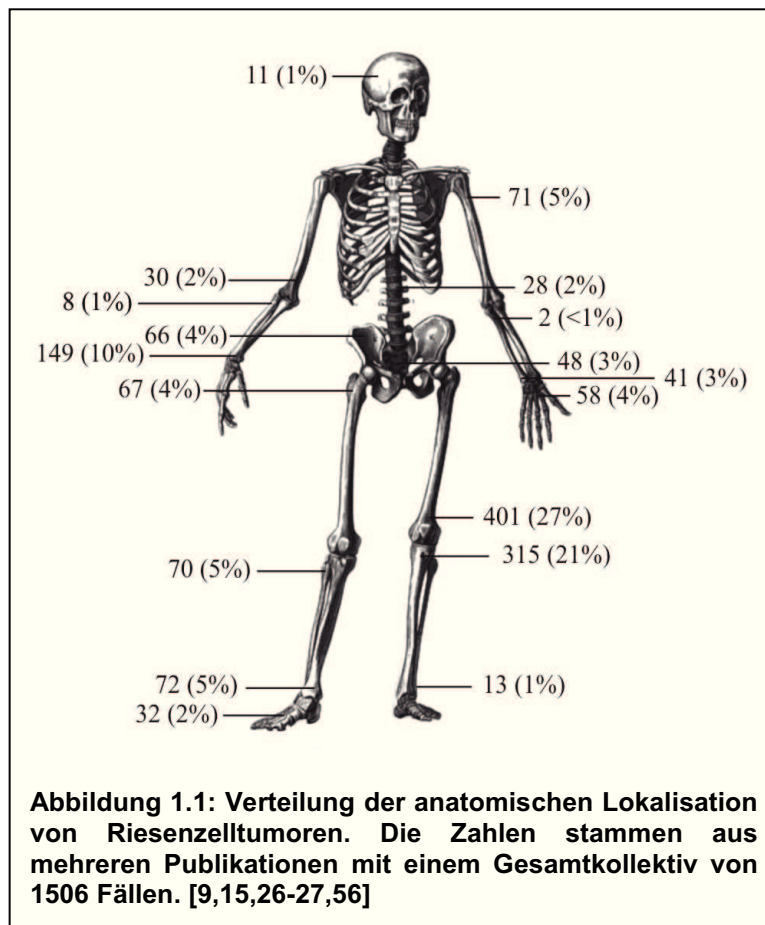
Morgan et al. wiesen mit ihren Versuchen nach, dass die osteoklastischen Riesenzellen unter der Beteiligung eines Rezeptor-Aktivators des NF- κ B Liganden (RANKL) durch die mesenchymalen Stromazellen rekrutiert werden. Da die RANKL Expression bei In-vitro-Kultivierung jedoch nachließ, scheint es noch weitere Faktoren hierfür zu geben [39].

Bei der Frage, ob es sich bei den Riesenzelltumoren um echte neoplastische Prozesse handelt oder um einen reaktiven Prozess, herrscht Uneinigkeit. Salerno et al. zeigten für die sonst als neoplastisches Element angesehenen mesenchymalen Stromazellen, dass diese bloß eine gering verlängerte Lebensdauer aufweisen. Auch deuteten seine Ergebnisse darauf hin, dass ein externer Stimulus notwendig ist, um diese zur Proliferation anzuregen [49]. Matsuo et al. zeigten hingegen mit einigen Versuchen, dass in den Stromazellen des Riesenzelltumors eine erhöhte Telomeraseaktivität zu finden ist, eine Eigenschaft, die für einen neoplastischen Prozess spricht [38].

1.1.4 Klinische Erscheinung

Die meisten Riesenzelltumoren werden aufgrund des Auftretens von Schmerzen, Schwellungen und Bewegungseinschränkungen diagnostiziert. Bei etwa 1 von 5 Patienten ist eine Raumforderung tastbar. Etwa 10% werden durch eine pathologische Fraktur auffällig [15,26-27,47].

Meist treten sie in den Epiphysen der langen Röhrenknochen auf und etwa 50% in der Nähe des Knies (27% distaler Femur, 21% proximale Tibia und 5% proximale Fibula). 64% treten an den unteren Extremitäten auf und 24% an den oberen Extremitäten (siehe Abbildung 1.1). Die Zahlen sind aus verschiedenen Publikationen zu einem Gesamtkollektiv von 1506 Fällen zusammengefasst [9,15,26-27,56].



Die meisten Tumoren befinden sich in der Metaphyse nahe dem Übergang zu der Epiphyse [15].

1.1.5 Einteilung

Bislang gibt es keine allgemeingültige Einteilung für Riesenzelltumoren. Häufig werden jedoch die Einteilungen von Campanacci oder Enneking als Basis verwendet.

Die Einteilung gutartiger Knochentumoren nach Enneking bezieht sich auf das biologische Verhalten [22]:

Grad I: Ruhende gutartige Neoplasien, die sich nicht verändern oder spontan abheilen.

Grad II: Aktive gutartige Neoplasien, die wachsen, aber bei Ihrer Ausbreitung die natürliche Grenzen einhalten.

Grad III: Gutartige Neoplasien, die lokal infiltrierend wachsen und sich nicht von den natürlichen Grenzen aufhalten lassen.

Die Einteilung von Campanacci bezieht sich ausschließlich auf die Auswertung von Röntgenbildern [15]:

Grad I: Die Tumorgrenzen sind von der Umgebung durch einen dünnen Rand aus reifen Knochen abgegrenzt. Die Kortikalis ist nicht betroffen oder leicht verdünnt. Sie ist nicht verformt oder durchbrochen.

Grad II: Immer noch recht klar definierte Grenzen, ohne deutlichen Rand aus reifem Knochen. Es gibt aber eine Grenze zwischen dem Tumor und dem umliegenden Weichteilgewebe.

Grad III: Tumor mit unscharfen Grenzen und Ausdehnung in das Weichteilgewebe.

Bei Grad II unterschied Campanacci zusätzlich nach Fällen mit und ohne pathologischen Frakturen.

1.1.6 Diagnose

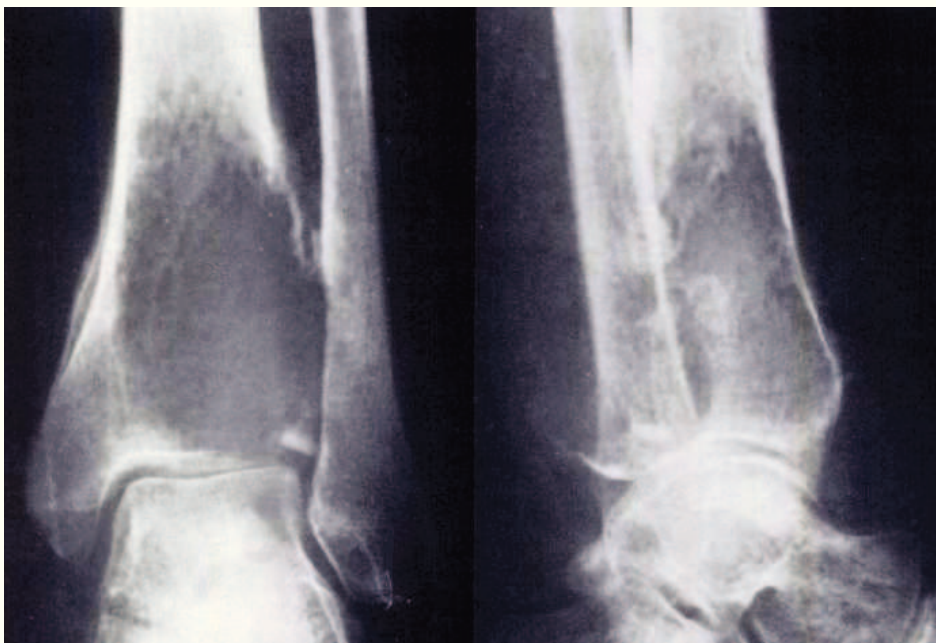
Radiologisch:

In konventionellen Röntgenaufnahmen zeigen sich Riesenzelltumoren typischerweise als exzentrische lytische Raumforderung im Bereich der metaphysennahen Epiphyse (siehe Abbildung 1.2). Im Verlauf breitet sich der Tumor oft in alle Richtungen innerhalb des Knochens aus, löst die angrenzende Kortikalis auf und infiltriert angrenzende Weichteile (siehe Abbildung 1.3). Dies ist die Basis der Stadieneinteilung nach Campanacci.

Durch die 3-dimensionale Darstellung im CT lässt sich vor allem die interessäre Ausbreitung genauer evaluieren, während das MRT bei der Abschätzung der Weichteilinfiltration klare Vorteile hat [15,47,51].



**Abbildung 1.2: Röntgenbild eines Riesenzelltumors der proximalen Tibia.
Grad II nach Campanacci [15]**



**Abbildung 1.3: Röntgenbild eines Riesenzelltumors der distalen Tibia.
Grad III nach Campanacci [15]**

Pathologisch:

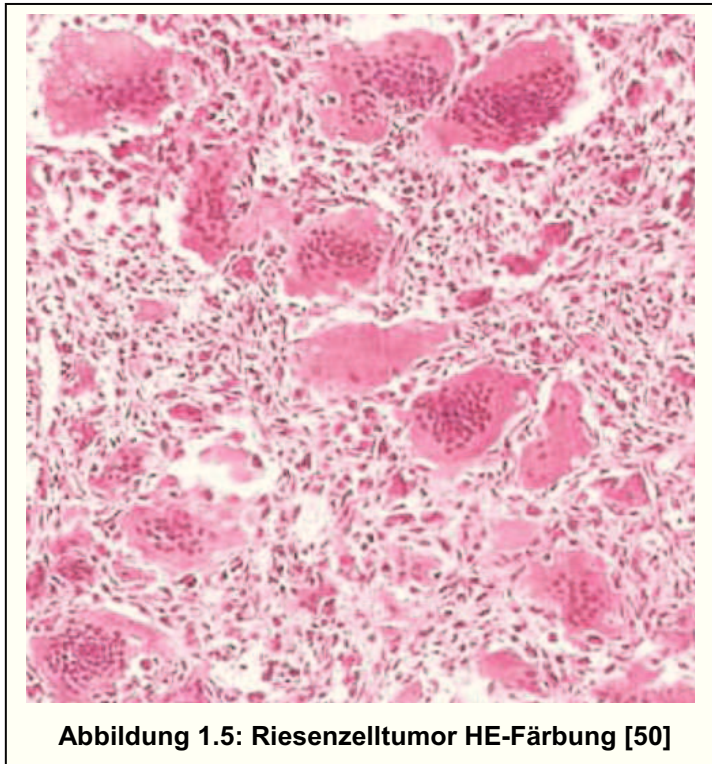
Makroskopisch zeigt sich der Riesenzelltumor mit einer klar begrenzten osteolytischen Zone, oft umgeben von einer dünnen Hülle jungen reaktiven



Knochens. Das Gewebe ist rotbraun und von weicher Konsistenz, es enthält teilweise gelbe, xanthomatös veränderte Areale oder festere weißliche Bereiche als Zeichen einer Fibrosierung (siehe Abbildung 1.4).

Histologisch zeigt sich der Riesenzelltumor mit mononukleären Zellen, die rund bis oval oder auch gestreckt sein können und osteoklastenartigen Riesenzellen mit 50 bis 100 Zellkernen. Oft sind auch einige Schaumzellen zu finden. Die Stromazellen enthalten wenig Kollagen und haben ein schlecht abgrenzbares Cytoplasma.

Die Anzahl der mitotisch aktiven Zellen ist sehr variabel und liegt zwischen 2% und 20% und die Mitose verläuft ohne Atypien [47].



1.1.7 Besonderheiten

Der Riesenzelltumor unterscheidet sich von typischen gutartigen Tumoren durch einige Besonderheiten, weshalb dieser auch als semimaligne bezeichnet wird. Hierzu zählen das lokal aggressive Wachstum mit Infiltration des Weichteilgewebes und das Auftreten von Rezidiven in zuvor gesunden Knochen. In den benachbarten Venen sind manchmal einzelne Riesenzellen oder auch Tumorthromben nachweisbar. A. Glauber bezeichnete dies als eine Art lokaler Metastasenbildung. [25]

Bei etwa 2% der Patienten mit Riesenzelltumoren treten Lungenmetastasen auf, die histologisch dem Knochentumor ähneln. Sie enthalten alle drei Zellarten. Es wird lediglich beschrieben, dass die Anzahl der Riesenzellen und die Tumorgroße eher geringer sind. Histologisch weisen sie keine Malignitätskriterien auf und haben nach chirurgischer Exzision eine geringe Rezidivrate. Die Häufigkeit der Metastasen ist bei Rezidiven deutlich erhöht im Vergleich zum Primärtumor. Bei weniger als 2% der Patienten werden

Riesenzelltumoren an verschiedenen Lokalisationen gefunden (multizentrische Tumoren). Diese können sowohl synchron als auch metachron auftreten [1,9,12,15,27].

1.1.8 Malignität bei Riesenzelltumoren

Riesenzelltumoren können zu einem hochmalignen Sarkom entarten. Nach der WHO Klassifikation wird von einem primär malignen Riesenzelltumor gesprochen, wenn das Sarkom direkt im Riesenzelltumor zu finden ist. Es wird als sekundär bezeichnet, wenn das Sarkom als Rezidiv im Gebiet eines entfernten Riesenzelltumors erscheint [14].

Die Entartungsmöglichkeit zu einem Sarkom unterstützt die These, dass das neoplastische Element des Riesenzelltumors mesenchymalen Ursprungs ist [13].

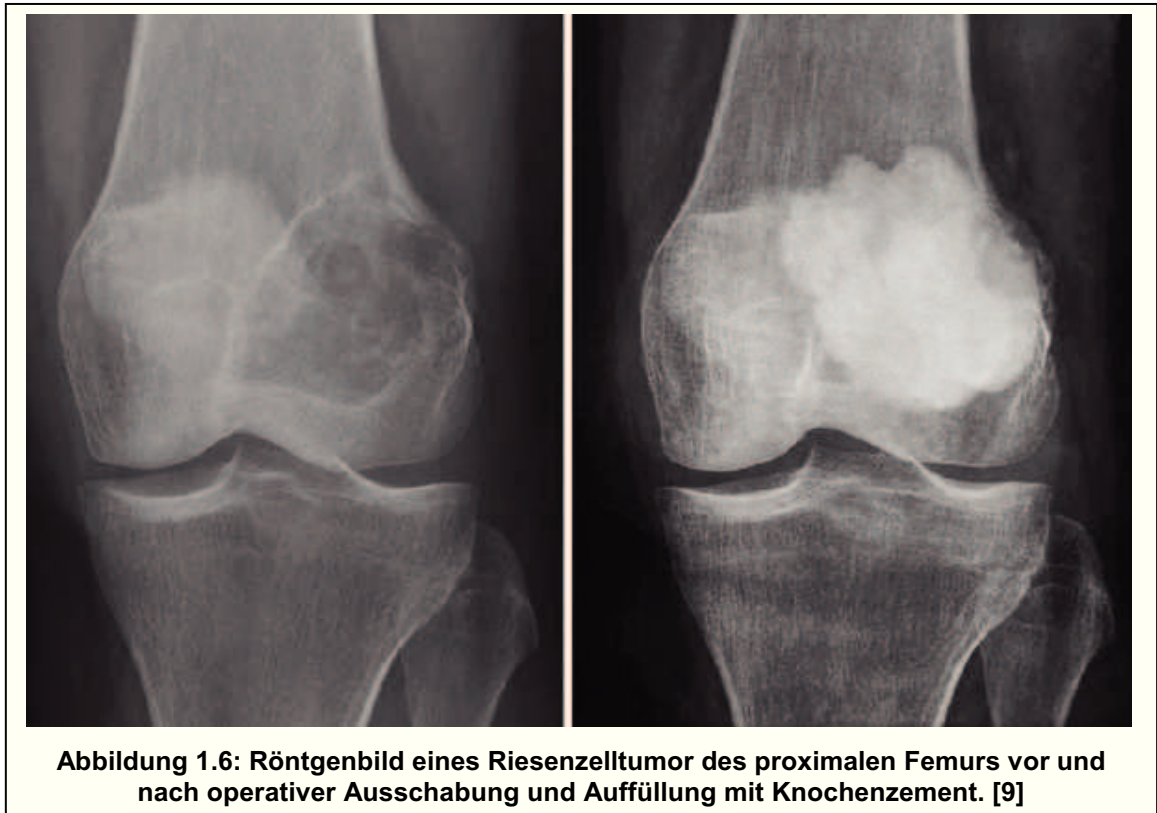
Nach einer Therapie mit Bestrahlung traten besonders häufig maligne Riesenzelltumorzidive auf. Die durch Bestrahlung hervorgerufenen Sarkome lassen sich nicht sicher von den normalen sekundär malignen Riesenzelltumoren unterscheiden [2,11].

Was das Outcome der malignen Riesenzelltumoren angeht, sind die Aussagen in verschiedenen Publikationen unterschiedlich. Da es jedoch nur wenige Fälle gibt, basieren viele Werte auf der Analyse älterer Daten, sodass das therapeutische Vorgehen in den einzelnen Fällen unterschiedlich ist [2,11,13,21].

1.1.9 Therapie

Eine operative Entfernung ist die Therapie der Wahl, wobei es von der Lokalisation und der Ausbreitung abhängt, wie radikal man vorgehen sollte. Das übliche chirurgische Vorgehen reicht von der intraläsionalen Ausschabung bis hin zur En-bloc-Resektion [9,15].

Gerade bei der intraläsionalen Entfernung, die den größten Funktionserhalt ermöglicht, ist der Einsatz einer oder mehrerer zusätzlicher Lokalbehandlungen nutzbringend. Dazu zählen der Einsatz von Hochgeschwindigkeitsfräsen, H₂O₂, Phenol oder PMMA-Knochenzement, der die größte alleinige Wirkung zu haben scheint. [9,15,31,55].



Der Einsatz von Chemotherapien ist wenig belegt und wird hauptsächlich in Ausnahmefällen, wie bei Lungenmetastasen, eingesetzt [9,12,26-27].

Bei nicht oder nur unvollständig resektablen Tumoren ist der ergänzende oder alleinige Einsatz einer Bestrahlung eine wichtige Option. Riesenzelltumoren sind strahlensensibel und lassen sich mit einer effektiven Strahlentherapie in 60-80% der Fälle kontrollieren. Große Tumoren > 8,5 cm sprechen schlechter an. Fragwürdig ist, ob die Sarkome, von denen in vielen älteren Fällen berichtet wurde, nach einer Bestrahlung auch mit den neuen, effektiveren Radiotherapieschemata noch ein Problem darstellen [11,16].

Heutzutage wird die Bestrahlung jedoch sehr zurückhaltend verwendet und sollte Sonderfällen vorbehalten bleiben. Ein weiterer Therapieansatz, wie er in der Orthopädie der Uniklinik Münster Anwendung findet, ist die serielle arterielle Embolisation des Tumors. Hierzu werden im Rahmen einer Angiographie die zum Tumor zuführenden Gefäße dargestellt und verschlossen, bis die Durchblutung des Tumors gestoppt ist. Dieser Vorgang kann je nach Erfolg im Verlauf wiederholt werden.

Einige moderne medikamentöse Therapieansätze werden zurzeit getestet. Hierzu gehört der Einsatz von Bisphosphonaten, die neben der Hemmung von Osteoklasten in vitro eine Apoptose in den Stromazellen von Riesenzelltumoren induzieren können [9,17].

Erste klinische Publikationen scheinen den Nutzen der Bisphosphonate zu bestätigen [7].

Vielversprechend scheint auch der Einsatz von Denosumab zu sein. Dieser monoklonale Antikörper gegen RANKL führt zu einer erheblichen Verringerung der Riesenzellen im Tumor und scheint damit den Progress aufhalten zu können. Die Aussagekraft der bisherigen Studien ist jedoch auf Grund der geringen Patientenzahlen und der kurzen Dauer der Nachkontrolle gering [39,53].

1.1.10 Prognose

Die Prognose ist von der Gründlichkeit der Entfernung des Tumors abhängig [15].

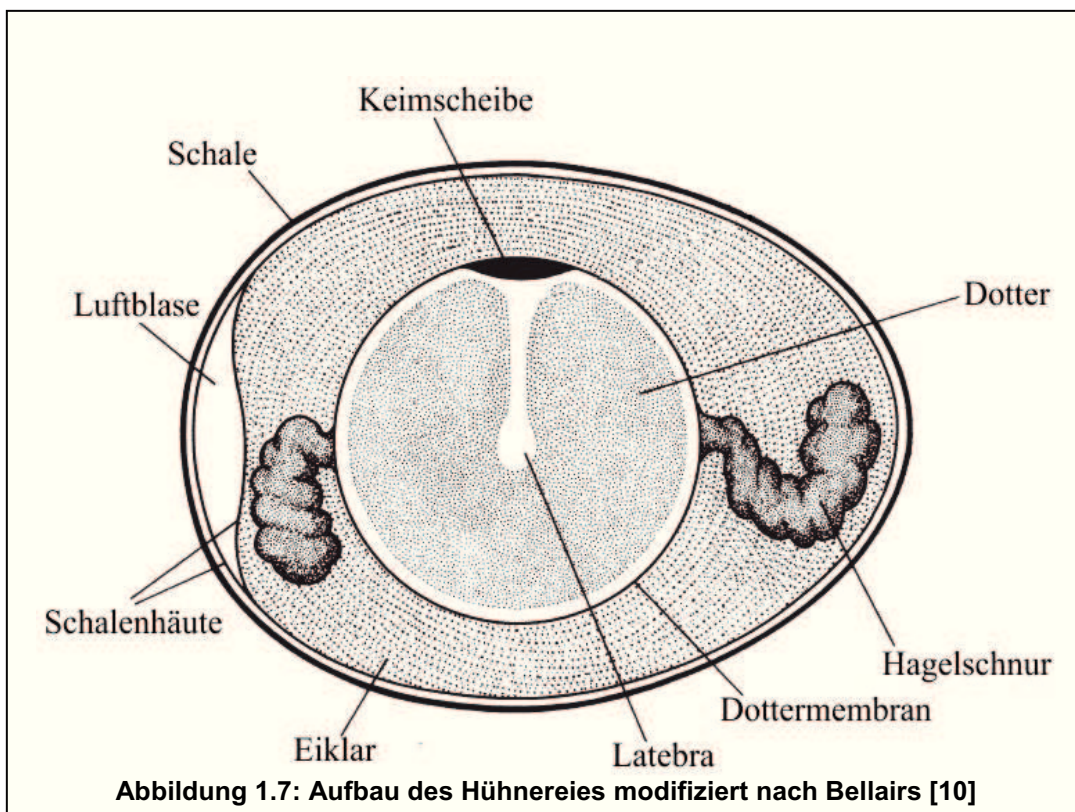
Bei den häufig eingesetzten intraläsionalen Kürettagen, wird die Prognose erheblich durch den Einsatz von lokalen Adjuvantien beeinflusst. Nach alleiniger Kürettage mit Spongiosafüllung liegt die Rezidivrate bei bis zu 50%. Hierbei scheint der Einsatz von PMMA Knochen-Zement die größte Bedeutung zu haben. Ergänzende Maßnahmen wie H₂O₂, Phenol oder Hochgeschwindigkeitsfräsen verbessern die Prognose noch weiter. Eine Kombination aus Kürettage, Hochgeschwindigkeitsfräse und PMMA Knochen-Zement erreicht Rezidivraten von unter 15%. Auch wenn bei der En-Bloc-Resektion geringere Rezidivraten erreicht werden, wird diese wegen des resultierenden Funktionsverlusts nur in Ausnahmefällen eingesetzt [9,31,55].

Die Aussagen zu der Prognose von malignen Riesenzelltumoren und den benignen Lungenmetastasen unterscheiden sich in verschiedenen Veröffentlichungen erheblich, sodass kein einheitlicher Konsens abzuleiten ist [2,11-13,21,58].

1.2 Chorioallantoismembran (CAM)

1.2.1 Allgemein

Die CAM ist ein lebenswichtiges Organ des Hühnerembryos. Sie entwickelt sich unterhalb der Schalenhaut aus dem Chorion und der Allantois. Durch ein dichtes Gefäßnetz wird die CAM stark durchblutet [20,23,36]. Seit dem Anfang des letzten Jahrhunderts findet die CAM bereits breite Anwendung in der Forschung.



1.2.2 Bedeutung der CAM für den Hühnerembryo

Die wichtigste Funktion der CAM ist der Gasaustausch. Auch wenn in der späteren Entwicklung des Embryos der Gasaustausch durch die Schale über der Luftblase an Bedeutung gewinnt, so ist der Gasaustausch über die CAM auch nach Beginn der Lungenatmung bis wenige Stunden vor dem Schlüpfen führend [5,46,54].

Außerdem ist die Resorption von Calcium aus der Schale eine wichtige Aufgabe der CAM, da die Reserven des Dottersackes nach dem zehnten

Entwicklungstag aufgebraucht sind. Auf diesem Wege können bis zu 50% der Masse der Kalkschale abgebaut werden [10].

Eine weitere Funktion der CAM ist die Lagerung von stickstoffhaltigen Stoffwechselprodukten des Embryos [10].

1.2.3 Entwicklung der CAM

Am 4. bis 5. Entwicklungstag beginnen das Chorion und die Allantois miteinander zu verschmelzen [10,20,23].

Zuvor besteht das Chorion aus einem ein- bis zweischichtigen Epithel. Unter diesem liegt Stützgewebe, das durch feine Fortsätze mit dem Chorion in Verbindung steht und nur durch eine Basalmembran von diesem getrennt wird [23].

Die Allantois besteht aus einem Lumen, das von einem einschichtigen Epithel umgeben wird. Dieses wird durch eine Basalmembran getrennt von Stützgewebe aus polygonalen Zellen umhüllt [23].

Bei der Fusion der beiden Schichten dünnt sich das Stützgewebe der Allantois zunächst aus und zwischen den Epithelien entwickelt sich ein flüssigkeitsreiches, vaskularisiertes Gewebe. Die einzelnen Schichten des Stützgewebes lassen sich später nicht mehr von einander unterscheiden [20,23].

Ab dem 10. Tag der Entwicklung ist die CAM soweit ausgebildet und stabil genug, dass man Tumoren oder Ähnliches aufgeben kann. Ab dem 18. Tag beginnt die Degeneration der CAM, ab dem 19.-21. Tag das Schlüpfen des Kükens. Aufgrund der Entwicklung der CAM steht somit für Versuche ein Zeitraum von sechs bis sieben Tagen zur Verfügung.

1.2.4 Morphologie der CAM

Nach der Verschmelzung von Chorion und Allantois besteht die neu entstandene CAM aus einem ein- bis zweischichtigen Epithel mit flachen Zellen.

Der Zwischenraum zwischen den Chorionzellen und der Schalenhaut wird zunehmend dünner. Die Kapillaren liegen am achten Entwicklungstag noch

unter dem Epithel, nähern sich aber der Schalenhaut an, sodass vor dem Schlüpfen das CAM-Epithel nicht mehr von Kapillarendothel zu unterscheiden ist und stellenweise mit der Schalenhaut eng verbunden ist [10,23].

Letztlich besteht die CAM aus drei Schichten, einer ektodermalen Schicht vom Chorion, einer mesodermalen Schicht von den mesodermalen Anteilen von Chorion und Allantois und einer endodermalen von der Allantois [10].

1.2.5 CAM-Modell

Die Verwendung der CAM als Modell für wissenschaftliche Versuche hat eine lange Geschichte.

1911 nutzten Murphy und Rous die CAM von Hühnern und anderen Vögeln, um dort Zellen von Hühnersarkomen anzuzüchten. Aus dem Vergleich von Versuchsergebnissen, die an ausgewachsenen Tieren gewonnen wurden mit denen die an Embryonen erhoben wurden, zogen sie Schlussfolgerungen auf die Entwicklung des Immunsystems [41].

Etwas später nutzte Murphy das Modell für Zellen von Säugetieren und zwar für Sarkomzellen von Ratten [40].

Danchakoff transplantierte zur Untersuchung der Milzentwicklung adultes Milzgewebe auf die CAM [19]. Woodruff und Goodpasture nutzten zu Beginn der 30er Jahre die CAM zum Anzüchten von Geflügelpocken [57].

Bis heute sind die Einsatzbereiche des CAM-Modells ständig erweitert worden. Es diente zum Beispiel der Erforschung von Ionentransportern [18], zur Untersuchung von Tumormetastasierung [3,43] und der Angiogenese unter normalen Bedingungen, bei Entzündung, während der Tumorentwicklung oder dem Einfluss löslicher Wachstumsfaktoren [4,24,48,52].

Wegen der einfachen Verfügbarkeit, der geringen Kosten und der geringen technischen Anforderungen ist es unter einfachen Bedingungen möglich schnell eine große Anzahl von Versuchen durchzuführen. Auch kann man, je nach Versuchsaufbau, die Entwicklung unter dem Mikroskop regelmäßig kontrollieren ohne den Versuch an diesem Punkt stoppen zu

müssen [4,24,48]. Es handelt sich zwar um ein In-vivo-Modell, es fällt jedoch nicht unter das Tierversuchsgesetz.

Nachteilhaft sind das kurze Intervall, über das die Versuche durchgeführt werden können und die starken Veränderungen, die die CAM durchläuft [4,10,20,32,34,52]. Auch reagiert sie auf unspezifische Reize, wie mechanische Verletzung, Partikel der Schale sowie auf Lösungen mit anderer Osmolarität oder mit anderen pH-Werten [24].

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die vorhergehenden Ausführungen belegen, dass für eine effektive Behandlung eines Riesenzelltumors wegen seiner besonderen Merkmale noch weitere Grundlagen erforscht werden müssen.

Auch wenn die Prognose bei kleinen gut erreichbaren Tumoren gut ist, so gibt es doch einige Fälle, in denen aufgrund der chirurgisch nicht erreichbaren Lokalisation, wegen Metastasen oder aufgrund von aggressiven Rezidiven keine zufrieden stellende Therapieoption besteht.

In Zellkulturen sind bislang nur die mesenchymalen Stromazellen über mehrere Passagen hinweg zu kultivieren. Für die Pathogenese ist aber die Interaktion zwischen den verschiedenen Zellarten des Riesenzelltumors von entscheidender Bedeutung.

Ein etabliertes in-vivo-Modell gibt es bis dato nicht. Um mehr über die Funktionsweise des Riesenzelltumors, sowie mögliche Therapieoptionen zu erfahren, wäre ein Modell jedoch Voraussetzung.

Durch die Adaptation des CAM-Modells soll ein einfaches, kostengünstiges Modell zur Untersuchung des Riesenzelltumors entwickelt werden. Mit diesem Modell könnte es in Zukunft möglich sein, neue medikamentöse Behandlungsmethoden zu erproben oder deren Auswirkung auf den Tumor zu verfolgen. Sollten zukünftig verschiedene medikamentöse Therapien für inoperable Situationen zur Verfügung stehen, so wäre es denkbar mit diesem Modell, die Wirksamkeit auf den individuellen Tumor im Vorfeld mit einer Probe zu testen.

2 Material und Methoden

2.1 Tumorproben

2.1.1 Kriterien der Probenauswahl

Die verwendeten Tumorproben stammten von Patienten, bei denen bereits vor der Operation ein Riesenzelltumor sicher diagnostiziert werden konnte. Die Diagnose wurde im Rahmen der interdisziplinären Tumorkonferenz an der Uniklinik Münster gestellt unter Berücksichtigung der pathologischen Befundung einer Probe und entsprechender Röntgenbilder.

Es wurden nur Proben von Patienten verwendet, die sich nach einer eingehenden Aufklärung freiwillig bereit erklärten Teile ihres Tumors für unsere Versuche zur Verfügung zu stellen. Eine Genehmigung für die Arbeit mit dem Patientenmaterial wurde durch die Ethikkommission der Ärztekammer Westfalen-Lippe und der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität erteilt (Aktenzeichen 2008-279-f-S).

Die Proben wurden mit einem Code beschriftet, der aus den Anfangsbuchstaben von Vor- und Nachname und dem Geburtsjahr bestand. Insgesamt wurden Proben von 10 Patienten verwendet. Neben Alter und Geschlecht wurde auch die Lokalisation der Tumoren erfasst und ob es sich um einen Primärtumor oder ein Rezidiv handelt.

2.1.2 Aufbereiten der Tumorproben und Lagerung

Um Proben der soliden Riesenzelltumoren in einer möglichst einheitlichen Form applizieren und über einen längeren Zeitraum lagern zu können, wurden diese in eine Suspension überführt.

2.1.2.1 Material

- RPMI 1640 (PAA, Schweiz)
- Frische Riesenzelltumorprobe
- DNase (22 kU/ml - Sigma-Aldrich, Deutschland)
- Collagenase Typ2 (500 U/ml - PAA, Schweiz)

- Sterile Petrischalen
- Sterile BD Falcon™ Tubes
- CryoMaxx S Einfriermedium (PAA, Schweiz)
- CryoTubes™ (Nunc, Deutschland)
- Einfriercontainer (NALGENE® Labware, Hereford, Vereinigtes Königreich)

2.1.2.2 Vorgehen

Zeitnah nach der Exzision wurden die Tumorproben unter sterilen Bedingungen in einer Petrischale mit einem Skalpell zerkleinert. Hiernach wurden diese mit RPMI und 5-10 / ml DNase sowie der gleichen Menge an Collagenase bei 37°C inkubiert. Je nach Konsistenz des Tumorgewebes dauerte es zwischen 3 und 8 Stunden bis das Material gelöst war; danach wurde es in sterile Falcon™ Tubes umgefüllt und bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und der Bodensatz in 5-10 ml des Kulturmediums resuspendiert.

Das Zentrifugieren und Resuspendieren wurde 4-mal wiederholt. Im letzten Schritt wurde der Bodensatz in dem Einfriermedium suspendiert, 1ml Medium auf 50µl-200 µl der Zell-Probe, und dann für ca. 12 h bei -70°C in einem Einfriercontainer gelagert. Die langfristige Lagerung wurde in flüssigem Stickstoff durchgeführt.

2.1.3 Auftauen der Tumorproben und Vorbereitung für die Applikation

Die Zellen mussten vor der Applikation wieder vom Einfriermedium getrennt und in eine Suspension mit dem Kulturmedium überführt werden.

2.1.3.1 Material

- CryoTube™ mit Riesenzelltumorprobe
- RPMI 1640 (PAA, Schweiz)
- Sterile BD Falcon™ Tubes

2.1.3.2 Vorgehen

50 ml des Kulturmediums wurden in einem Falcon™ Tube auf 37°C vorgewärmt und die Tumorproben in einem Wasserbad bei ebenfalls 37°C aufgetaut. Die Zellen wurden dann in die Falcon™ Tubes pipettiert und bei 1200 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Bodensatz in 4 weiteren Zentrifugations- / Resuspensionsschritten mit jeweils 5-10 ml RPMI gewaschen, wobei im letzten Schritt der Bodensatz mit einer geringeren RPMI Menge gelöst wurde, um eine noch leicht dickflüssige Suspension zu erhalten. Davon wurden je Ei 20 µl verwendet.

2.2 Chorioallantois-Membran-Modell des Huhnes

2.2.1 Vorbereiten der Probenringe

Um die Tumorsuspension auf einem beobachtbaren Bereich auf der CAM zu halten, wurden einfache Kunststoffringe verwendet, die sich nach dem Auflegen der Membran eng anschmiegen und ein Verlaufen der Probensuspension verhinderten.

2.2.1.1 Material

- Thermanox Deckgläschen rund (13 mm Durchmesser)
- LötKolben mit dünner Spitze (Abbildung 2.2.a)
- Pinzette

2.2.1.2 Vorgehen

Nach Vorheizen des LötKolbens, entnahm man die Thermanox Deckgläschen einzeln mit einer Pinzette und brannte vorsichtig die Mitte heraus, um einen schmalen Ring zu erhalten. Die fertigen Ringe (Abbildung 2.2.b) wurden anschließend in die Verpackung zurückgelegt.

2.2.2 Zeitplan

Da durch die Entwicklung der Eier ein relativ enges Zeitfenster vorgegeben wurde, war es nötig vor jedem Versuch einen Zeitplan, abgestimmt auf die tumororthopädischen Operationspläne, aufzustellen, um einen reibungslosen Ablauf zu gewährleisten. Die Eier konnten nur an 2 Tagen der Woche geliefert werden und mussten dann gekühlt gelagert werden. Die Tumorproben mussten möglichst frisch aufbereitet werden.

2.2.3 Bebrüten der Eier

Um eine normale Entwicklung der Eier zu gewährleisten, war es notwendig diese unter kontrollierten Bedingungen zu bebrüten.

2.2.3.1 Material

- Befruchtete Eier des Weißen Leghorn Huhnes (*G. g. domesticus*), von der Lohmann Tierzucht GmbH in Cuxhaven
- Eierkartons
- Weinkühler (Abbildung 2.2.c)
- Brutschrank EHRET, Type BSS 160, Emmendingen (Abbildung 2.2.d)

2.2.3.2 Vorgehen

Die Eier wurden bei 37,5 bis 38°C und einer Luftfeuchtigkeit von 70 bis 80% im Brutschrank in Seitenlage auf den Eierkartons inkubiert. Um die Entwicklung an den Zeitplan anzupassen (Abbildung 2.1) war es notwendig die Eier zuvor im Weinkühler bei 12 bis 15°C und einer Luftfeuchtigkeit von 70 bis 80% zu lagern. Damit wurde ihre Entwicklung bis zu 10 Tage lang angehalten.

Zeitplan CAM-Versuch Riesenzelltumor

21.01.09	Mittwoch		
22.01.09	Donnerstag	Lieferung der Eier und Beginn der Kühlung	
23.01.09	Freitag		
24.01.09	Samstag		Brutttag
25.01.09	Sonntag	Beginn der Bebrütung	Tag 0
26.01.09	Montag		Tag 1
27.01.09	Dienstag		Tag 2
28.01.09	Mittwoch	Öffnen der Eier	Tag 3
29.01.09	Donnerstag		Tag 4
30.01.09	Freitag		Tag 5
31.01.09	Samstag		Tag 6
01.02.09	Sonntag		Tag 7
02.02.09	Montag		Tag 8
03.02.09	Dienstag	Ausweichtermin für die Probenapplikation	Tag 9
04.02.09	Mittwoch	Applikation der Tumorproben	Tag 10
05.02.09	Donnerstag		Tag 11
06.02.09	Freitag	Möglicher Termin für Zwischendokumentation	Tag 12
07.02.09	Samstag	Möglicher Termin für Zwischendokumentation	Tag 13
08.02.09	Sonntag	Möglicher Termin für Zwischendokumentation	Tag 14
09.02.09	Montag		Tag 15
10.02.09	Dienstag	Fotodokumentation und Fixierung	Tag 16
11.02.09	Mittwoch		Tag 17
12.02.09	Donnerstag	Degeneration der CAM	Tag 18
13.02.09	Freitag	Beginn des Schlüpfens	Tag 19

Abbildung 2.1 Beispiel eines Zeitplanes

Bildtafel 2.2: Material CAM Model



Abbildung 2.2.a: LötKolben mit feiner Spitze

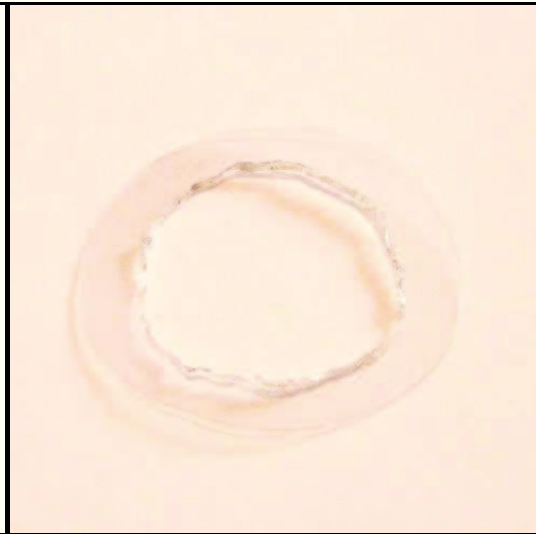


Abbildung 2.2.b: Fertiger Probenring (Durchmesser ca. 13 mm)



Abbildung 2.2.c: Weinkühler



Abbildung 2.2.d: Brutschrank

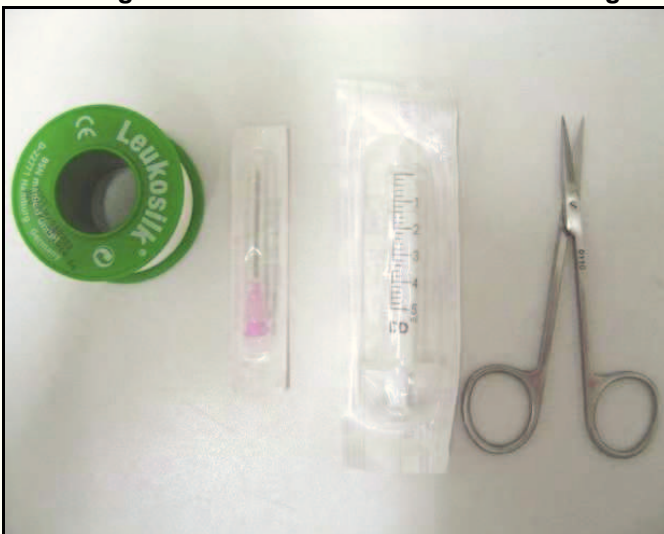


Abbildung 2.2.e: Werkzeuge zur Eierbearbeitung



Abbildung 2.2.f: Stereomikroskop

2.2.4 Vorbereitung der Eier

Zur Applikation der Probensuspension auf die CAM und zur Beobachtung war es notwendig ein Fenster in die Eierschale zu schneiden. Da die CAM sich ab einem bestimmten Punkt der Entwicklung nicht mehr von der Eierschale ablöst, musste dies eine Woche vor dem Einbringen der Tumorproben geschehen. Um einen Einblick in die Entwicklung des Eies zu erhalten, geschah dies am 2. oder 3. Tag der Inkubation.

2.2.4.1 Material (Abbildung 2.2.e)

- Ring als stabiler Ständer für die Eier
- Keimarmes saugfähiges Papier
- BSN MEDICAL GmbH Leukosilk® 2,5 cm
- Spritzen, zum Beispiel 5mm BD Discardit™ II Spritzen
- Kanülen, zum Beispiel 1,2x40 mm BD Microlance™
- Feine Schere
- Olympus SZX7Stereomikroskop (Abbildung 2.2.f)

2.2.4.2 Vorgehen

Die Eier wurden einzeln aus dem Brutschrank entnommen, ohne ihre Seitenlage zu verändern und auf dem Ständer platziert. Dann bohrten wir an der oben liegenden Seite des Eies, etwa 1 cm oberhalb des unteren (flachen) Pol des Eies, mit der Schere ein Loch mit einem Durchmesser von ca. 1-2 mm in die Schale (Abbildung 2.3.a). Durch dieses Loch wurde eine Kanüle durch die Luftblase bis auf die Unterseite des Eies vorgeschoben und dann etwa 3 ml Eiweiß mit einer Spritze abgezogen (Abbildung 2.3.b). Das Loch wurde mit etwas Papier getrocknet und mit einem Stück Leukosilk® verschlossen. Hierdurch senkte sich der Inhalt des Eis mitsamt Embryo und CAM von der Eischale ab und gab oben unter der Schale etwas Raum frei.

Dann wurde, um ein Weiterbrechen der Schale zu verhindern, ein quadratisches Stück Leukosilk® auf die Mitte der oben liegenden Ei-Seite geklebt. Durch das Leukosilk® wurde mit der Schere ein Loch in die Schale

gebohrt, das als Ausgangspunkt für das Herausschneiden eines Loches mit dem Durchmesser von 2 cm diente (Abbildung 2.3.c).

Durch diese Öffnung ließ sich mit dem Stereomikroskop die Embryonalentwicklung beobachten (Abbildung 2.3.d). Eier ohne Embryonalanlage wurden aus der Versuchsreihe genommen. Das entnommene Eiweiß wurde randständig in das Ei zurückgegeben (Abbildung 2.3.e) und das „Fenster“ mit einem weiteren Leukosilk® Stück verschlossen, das auf den bestehenden Leukosilk®-„Rahmen“ geklebt wurde (Abbildung 2.3.f).

Die präparierten Eier wurden unmittelbar nach dem Eingriff wieder in den Brutschrank gelegt, um ein zu starkes Auskühlen zu verhindern.

Bildtafel 2.3: Vorbereitung der Eier

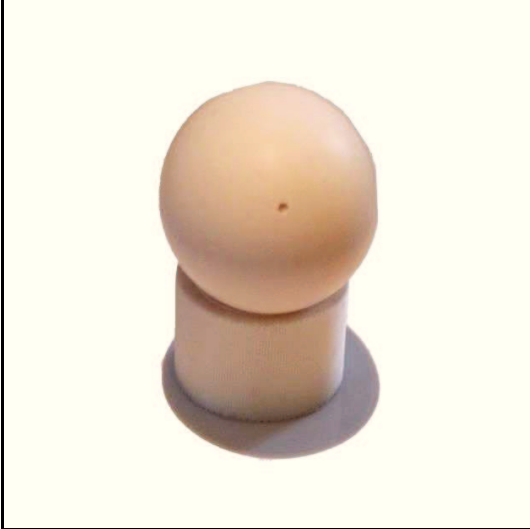


Abbildung 2.3.a: Ei mit Loch zur Eiklarentnahme



Abbildung 2.3.b: Die Spritze wird steil durch die Luftblase eingeführt



Abbildung 2.3.c: Das Pflaster verhindert ein Weiterbrechen der Eierschale

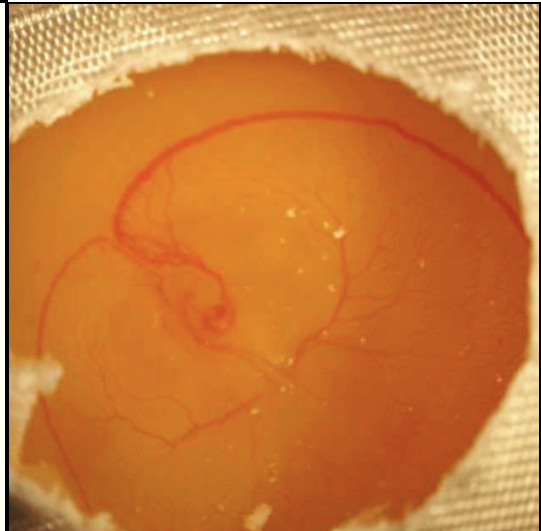


Abbildung 2.3.d: Normalentwickeltes Ei an Tag 3 der Entwicklung

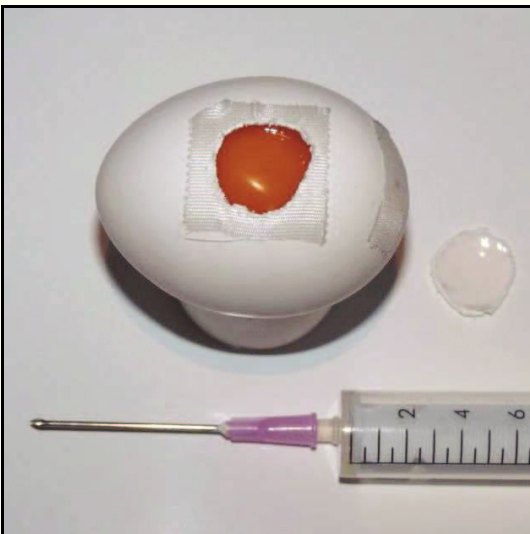


Abbildung 2.3.e: Vor dem Wiederverschluss wird das Eiweiß zurückgegeben



Abbildung 2.3.f: Für den Brutschrank fertiges Ei

2.2.5 Auftragen der Tumorproben

2.2.5.1 Material

- Ring als stabiler Ständer für die Eier
- Olympus SZX7 Stereomikroskop
- Probenringe aus Thermanox™ Deckgläschen (siehe Abbildung 2.2.b)
- Feine Pinzette
- Sterile Skalpellklingen
- Tumorsuspension
- RPMI 1640 (PAA, Schweiz)
- Pipette für 20 µl
- Bleistift
- BSN MEDICAL GmbH Leukosilk® 2,5 cm

2.2.5.2 Vorgehen

Am zehnten Tag der Bebrütung der Eier wurden diese aus dem Brutschrank geholt und der Leukosilkverschluss des Fensters entfernt. Unter dem Stereomikroskop wurde die Entwicklung des Eies überprüft (Abbildung 2.4.a). Eier mit einem Entwicklungsstand, der der Normalentwicklung nicht entsprach, wurden aussortiert. Nun wurde auf jedem Ei mit einer Pinzette ein Probenring platziert. Dabei wurde darauf geachtet, dass man den Inhalt des Probenringes durch das Schalenfenster gut einsehen konnte.

Um den Tumorzellen das Anwachsen zu vereinfachen, ritzen wir die CAM innerhalb des Probenring mit Hilfe einer Skalpellklinge an und zwar gerade soviel, dass ein geringgradiger Blutaustritt aus den Gefäßen zu erkennen war (Abbildung 2.4.b, 2.4c).

Danach wurde das Tumorgewebe auf die CAM der zuvor mit einem Bleistift beschrifteten Eier aufgebracht. Hierzu wurden 20 µl der Tumorsuspension in das Innere des Probenringes pipettiert. Bei den Kontrollen wurden nur 20 µl RPMI verwendet. Das Fenster wurde mit einem kleinen Leukosilk®-Stück verschlossen bevor die Eier wieder in den Brutschrank gelegt wurden.

Bildtafel 2.4: Aufbringen der Tumorproben

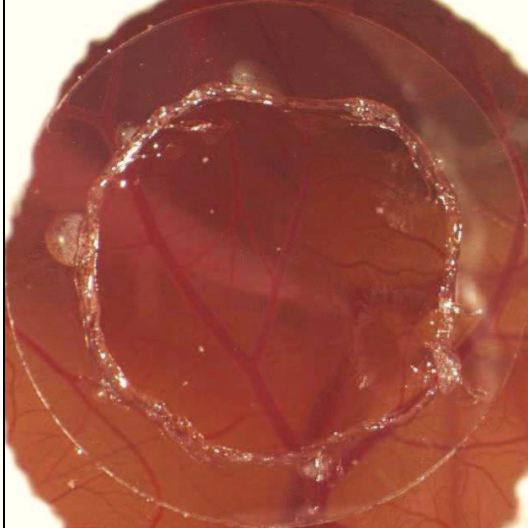


Abbildung 2.4.a: Regular entwickeltes Ei am Tag 10 der Entwicklung nach Aufbringen des Thermanox Ringes

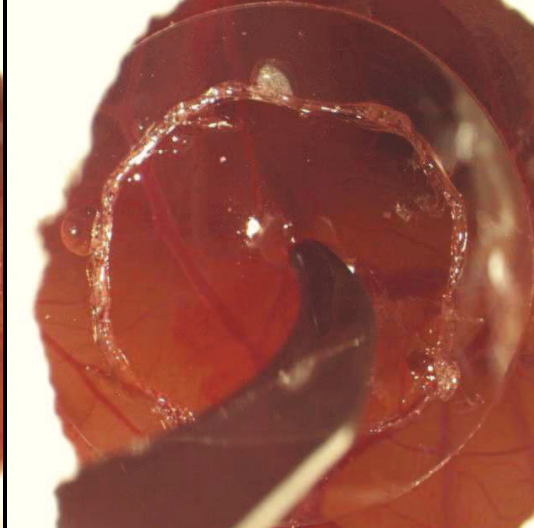


Abbildung 2.4.b: Mit einer Skalpellklinge werden die Gefäße angeritzt

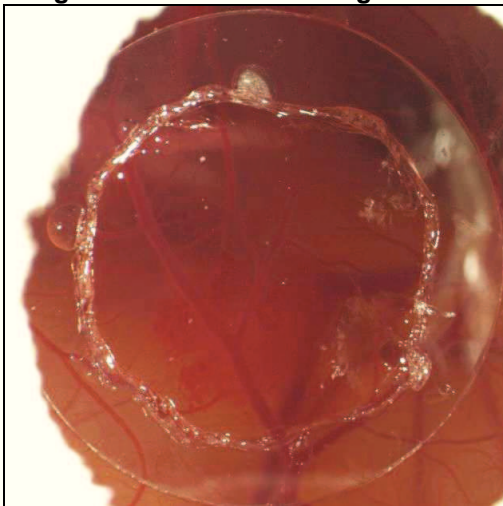


Abbildung 2.4.c: Leichter Blutaustritt aus den Gefäßen nach dem Ritzen erkennbar.

Bildtafel 2.5: Fotodokumentation der Tumorentwicklung



Abbildung 2.5.a: Tumor nach 72 h

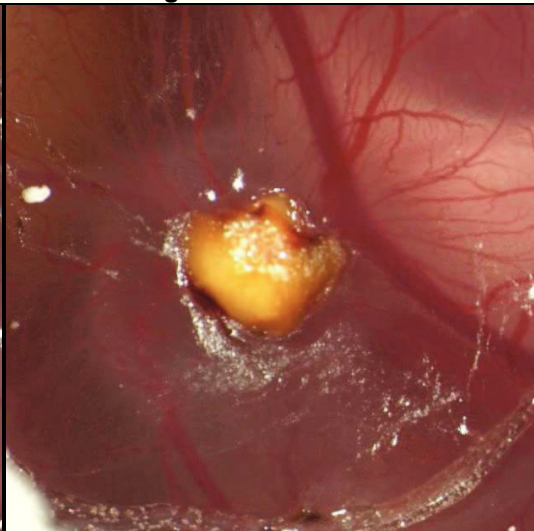


Abbildung 2.5.b: Tumor nach 144 h

2.3 Dokumentation und Analyse der Tumorentwicklung

2.3.1 Anmischen der Paraformaldehyd-Lösung

2.3.1.1 Material

- Paraformaldehyd-Pulver (reinst.)
- 0,1 M PBS pH 7,4

2.3.1.2 Vorgehen

In 100 ml der PBS Lösung wurden bei 70°C 4 g des Paraformaldehyd-Pulvers gelöst.

2.3.2 Fotodokumentation der Tumor-Entwicklung im Ei

2.3.2.1 Material

- Olympus SZX7 Stereomikroskop
- Olympus E-330 Digitale Spiegelreflexkamera
- BSN MEDICAL GmbH Leukosilk® 2,5 cm

2.3.2.2 Vorgehen

Zur Beurteilung der Entwicklung wurden unter dem Stereomikroskop Fotos gemacht. Dies geschah am 10. Bebrütungstag vor der Applikation der Tumorsuspension, am 16. vor der Fixierung der möglichen Tumoren (Abbildung 2.5.b) sowie an mindestens einem Tag zwischen dem 10. und dem 16. Bebrütungstag (Abbildung 2.5.a). Um trotz der Bewegungen des Embryos ein scharfes Bild zu erhalten, wurden je Ei und Vergrößerung Serien von drei Aufnahmen gemacht. Es wurde zunächst eine Bildserie als Übersicht gemacht auf der möglichst der gesamte Probenring zu sehen war. Danach wurden besonders interessant erscheinende Strukturen zusätzlich noch unter höherer Vergrößerung fotografiert.

Alle Eier deren Embryo vor dem 16. Tag verstarb wurden nach der Fotodokumentation entfernt und aus den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

Auch wurde auf mögliche Tumoren geachtet und dokumentiert welche Eier tumorverdächtige Strukturen aufwiesen und welche nicht.

Außer am Tag 16, an dem wir die Tumoren entfernten und fixierten, wurden die Eier anschließend mit einem Leukosilk® Stück wiederverschlossen und weiter bebrütet.

2.3.3 Fixierung und abschließende Fotodokumentation der Tumoren

2.3.3.1 Material

- Olympus SZX7Stereomikroskop
- Olympus E-330 Digitale Spiegelreflexkamera
- Paraformaldehyd-Lösung 4%ig
- Feine Schere
- Feine Pinzette
- Petrischalen
- BD Falcon™ Tubes

2.3.3.2 Vorgehen

Nach dem Fotografieren der beobachteten CAM-Areale wurden am 16. Bebrütungstag die CAMs mit einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung für 20 bis 30 Minuten bedeckt. Nach dem Abgießen der Lösung wurde das Fenster im Ei vergrößert und dann wurde mit Schere und Pinzette der CAM-Bereich mit dem Probering herausgeschnitten. Der Probenring wurde abgelöst und der CAM-Bereich in einer Petrischale ausgebreitet. Zur Verbesserung des Kontrastes wurden vor einem weißen und vor einem schwarzen Untergrund Fotos durch das Stereomikroskop gemacht. Auch hier wurde zunächst eine Übersichtsaufnahme angefertigt. Danach wurden unter höherer Vergrößerung interessant erscheinende Bereiche fotografiert. Abschließend wurden die Teile, von denen vermutet wurde, dass sie Tumorgewebe enthielten, ausgeschnitten und einzeln in mit Paraformaldehydlösung gefüllte Falcon™ Tubes gelegt.

2.3.4 Abschätzen und Auswerten des Tumorummens

Um die Entwicklung der potentiellen Tumoren besser vergleichen zu können, bestimmten wir annäherungsweise das Tumorummen

2.3.4.1 Material

- Windows® kompatibler Computer
- CorelDRAW® X5
- Bilddateien
- SPSS®

2.3.4.2 Vorgehen

Je Ei wurde aus den Übersichtsaufnahmen ein scharfes Bild ausgewählt und mit CorelDRAW® geöffnet. Mit dem Hilfsmittel „Parallele Bemaßung“ wurde der Außendurchmesser des Probenringes vermessen (Abbildung 2.6.a). In den Optionen der Software wurde der Messwert dann zur Skalierung verwendet und mit 13 mm, dem realen Durchmesser, gleichgesetzt. Unter Zuhilfenahme der Detailaufnahmen und der Fotografien der bereits fixierten CAM wurden die mutmaßlichen Tumoren identifiziert und deren 2-dimensionale Ausbreitung abgeschätzt (siehe Abbildung 2.6.b). Länge und Breite der Areale wurde dann mit dem Werkzeug „Parallele Bemaßung“ vermessen und die Werte in einer Tabelle erfasst.

Um aus den Längen und Breiten der 2-dimensionalen Abbildungen der Tumoren ein Volumen abzuschätzen, wurde die Ähnlichkeit der Tumorform zu einem Rotationsellipsoid benutzt (Abbildung 2.6.c). Bei dieser Sonderform des Ellipsoids sind zwei von drei Achsen gleichlang, sodass sich das Volumen anhand zweier Radien errechnen lässt. Die Formel für die Volumensberechnung lautete somit $V = 4/3 \times \pi \times (1/2 \times a)^2 \times (1/2 \times b)$. Bei sehr lang gestreckten Tumoren erschien die Tiefe des Tumors eher der kleineren Achse zu entsprechen, sodass für a das kleinere Maß genommen wurde.

Bildtafel 2.6: Abschätzen des Tumervolumens

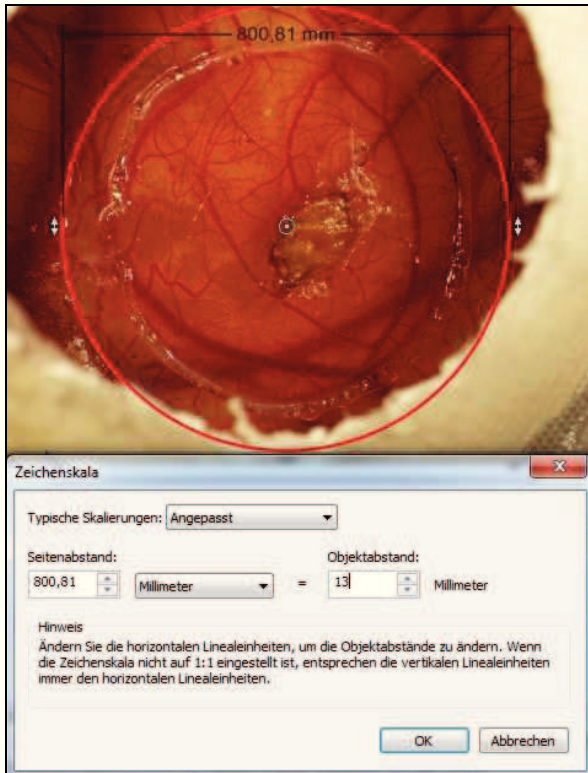


Abbildung 2.6.a: Der äußere Durchmesser der Probenringe (rot markiert) dient als Maßstab zur Tumormessung im Bild.

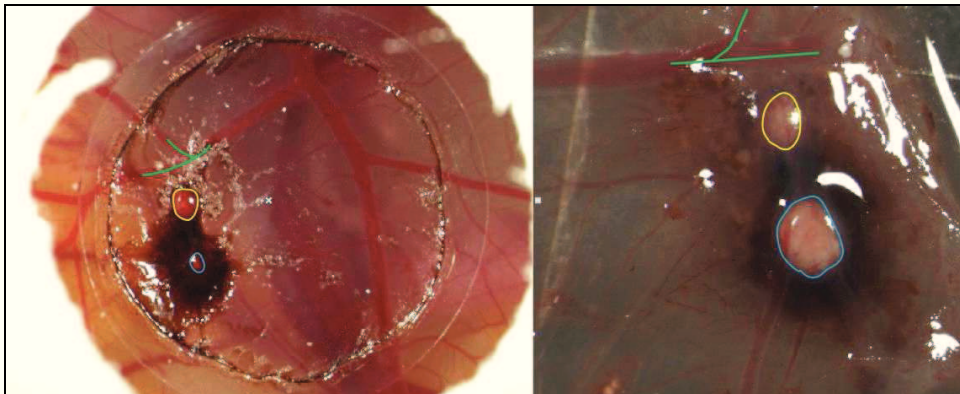


Abbildung 2.6.b: Der Vergleich mit den Bildern der fixierten CAM von unten (rechts) zeigt die Größe des blau umrandeten Tumors, die hier durch eine Einblutung verborgen ist. Der Verlauf der Gefäße dient dabei als Orientierungshilfe (grüne Linien).

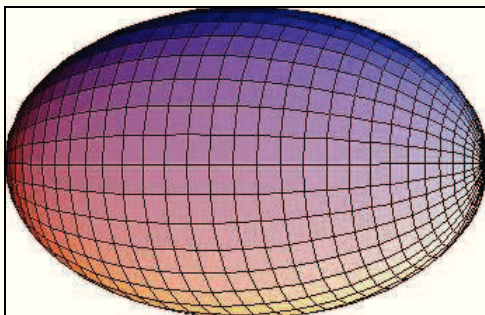


Abbildung 2.6.c: Darstellung eines Rotationsellipsoids

Die Daten wurden in SPSS® übertragen und die Mittelwerte der verschiedenen Versuchsreihen gegenübergestellt. Um die Signifikanz der Varianz beurteilen zu können, wurde eine „analysis of variance“ (ANOVA) durchgeführt.

2.3.5 Auswertung der Überlebensrate der Hühnerembryonen

Auch ohne Eingriff in die Entwicklung der Eier verstarben einige vor dem 16. Entwicklungstag. Um die Auswirkungen der Tumorbeimpfung auf die Eier zu analysieren, wurde das Überleben der Eier mit Tumorbeimpfung mit der Kontrollgruppe, die nur RPMI erhielt, verglichen.

2.3.5.1 Material

- Versuchsprotokoll
- Windows® kompatibler PC
- SPSS®

2.3.5.2 Vorgehen

Zunächst wurde eine SPSS®-Datenbank mit allen Eiern erstellt, die am Tag 10 noch lebten. Neben dem Code des verwendeten Tumorgewebes wurde auch der Zustand an Tag 16 eingetragen: ein Ja für lebendig an Tag 16 und ein Nein, wenn die Embryonen zwischen dem 10. und 16. Tag verstarben. Zunächst wurden die verschiedenen Tumorproben in einer Kontingenztafel dargestellt, dann wurde mithilfe des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson und dem Maximum-Likelihood-Quotienten die Wahrscheinlichkeit berechnet mit der das Überleben unabhängig von der Probe ist.

Für den Vergleich mit der Kontrollgruppe wurden, wegen der zum Teil sehr geringen Versuchszahlen bei einigen Tumorproben, die Werte aller Tumorproben aufaddiert und dann gegen die der Kontrollgruppe mit RPMI 1640 in eine Vierfeldertafel aufgetragen. Wegen zum Teil kleiner Zahlen und weil es sich hier um eine Vierfeldertafel handelt wurde ein Fisher-Yates-Test herangezogen.

2.4 Auswärtige Analysen exemplarischer Tumorproben

Um die Beschaffenheit der mutmaßlichen Tumoren genauer in Erfahrung zu bringen, wurden einzelne Tumorproben von Kooperationspartnern untersucht. Die durchgeführten Techniken sind hier nur grob umrissen.

2.4.1 Histologie und Immunhistologie der Tumorproben

Die histologische Untersuchung erfolgte im Institut für Pathologie Prof. Dr. med. H. Bürger in Paderborn.

Die zuvor in Paraformaldehydlösung fixierten Tumorproben wurden in Paraffin eingebettet und in 10 µm dicke Scheiben geschnitten.

Zur histologischen Beurteilung wurde eine einfache Hämatoxylin-Eosin-Färbung durchgeführt. Zur genaueren Identifizierung der Art der Zellen folgten weitere Färbungen durch indirekte Immunhistochemie mit Antikörpern gegen CD68 als Marker für Riesenzellen [45] und gegen den Proliferationsmarker Ki67.

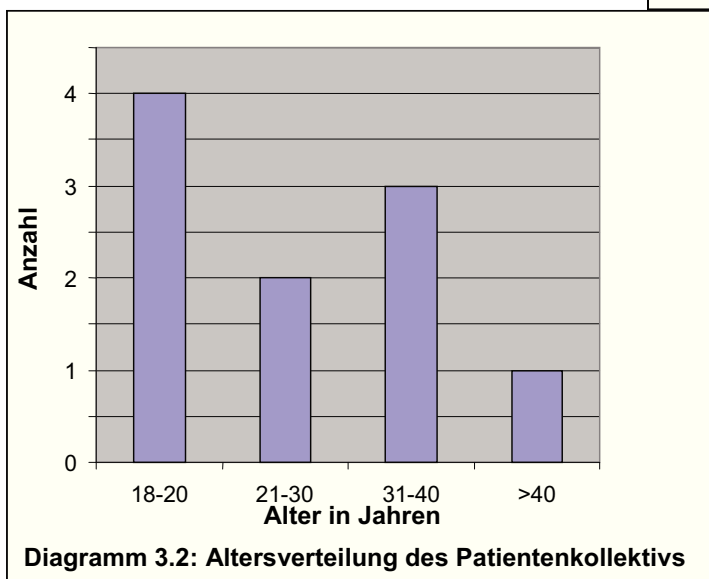
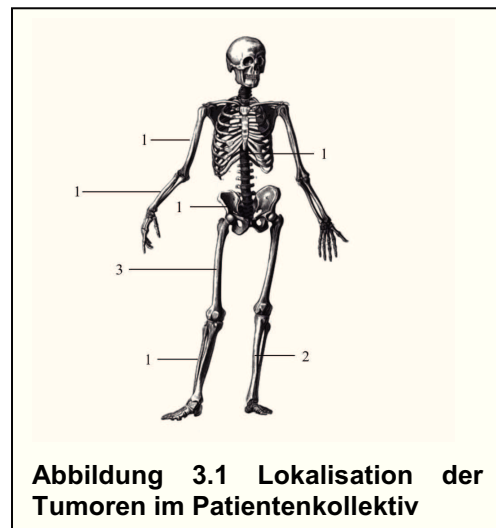
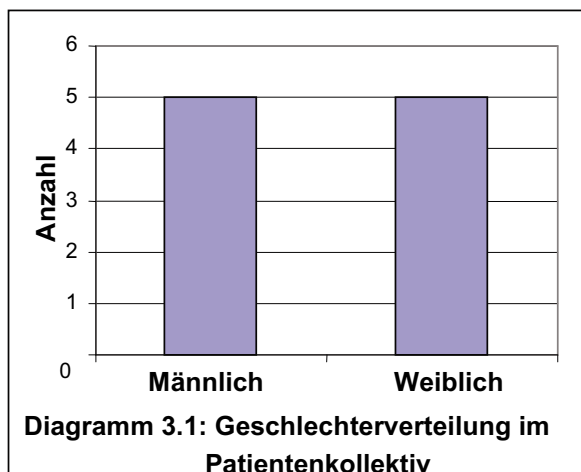
2.4.2 Interphase Fluoreszenz-In Situ-Hybridisierung (FISH)

Um zu unterscheiden welche Zellen vom Menschen und welche vom Huhn stammten, wurde von Professor Károly Szuhai am „Department of Molecular Cell Biology“ in Leiden (Niederlande) eine Interphase FISH einer Tumorprobe durchgeführt. Hierbei wurden Sonden gegen die Zentromere der menschlichen Chromosomen 1 mit einem grünen Farbstoff und gegen die Zentromere der menschlichen Chromosomen 15 mit einem roten Farbstoff verwendet [44]. Alle Zellen wurden mit DAPI gegen gefärbt, welches blau fluoresziert.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Die Proben stammten von 5 männlichen und 5 weiblichen Patienten (Diagramm 3.1). Der jüngste Patient war 18 Jahre alt, der älteste 70. Die Altersverteilung wird in Diagramm 3.2 dargestellt. 6 Tumoren stammten von den unteren Extremitäten, 3 Tumoren vom Femur, 2 von der Tibia, einer von der Fibula. 2 stammten von den oberen Extremitäten, 1 vom Humerus, 1 vom Radius. Die letzten beiden Tumore stammten vom Becken und der Brustwirbelsäule (siehe Abbildung 3.1). 6 der Tumorproben stammten von Primärtumoren, die restlichen 4 von Tumorrezidiven.



3.2 Entwicklung von Tumoren auf der CAM

Bei der Begutachtung der CAM unter dem Stereomikroskop entdeckt man bei den meisten lebenden Eiern bereits 24 Stunden nach dem Aufbringen der Tumorsuspension Anzeichen der Entwicklung einer oder mehrerer tumorartiger Raumforderungen. Von insgesamt 125 beimpften Eiern zeigten 95 (76%), unabhängig von der Dauer ihres Überlebens, im Verlauf der Entwicklung ein tumorartiges Gebilde. Bei den Eiern, deren Embryonen am 6. Tag nach der Beimpfung noch lebten, waren es sogar 87% (60 von insgesamt 69, siehe Tabelle 3.1).

Probe	Eier beimpft	Eier mit Tumor	Tod innerhalb 48 h	Tod nach 48 h	Lebendig an Tag 6	Tumor an Tag 6
SM71	12	12	0	6	6	6
HS84	10	9	1	4	5	5
RS81	4	2	2	1	1	1
SO76	19	14	5	4	10	10
WS88	13	11	2	3	8	6
SM90	22	15	7	5	10	8
PM88	8	5	3	3	2	2
MB39	10	9	1	0	9	8
ES90	14	10	4	2	8	6
CS77	13	8	2	1	10	8

Bei den Kontrollen finden sich keine tumorartigen Raumforderungen. Der Vergleich zwischen einer Kontrolle und einem Versuch mit einem kleinen Tumor ist ein Bildtafel 3.2 dargestellt.

Die Tumoren variieren in Größe, Farbe und Form. Viele erinnern mit ihrer gelblichen Färbung und den Einblutungen an Operationspräparate von Riesenzelltumoren. Die Bildtafel 3.3 zeigt einige Beispiele.

Bildtafel 3.2: Vergleich Kontrolle mit kleinem Tumor.

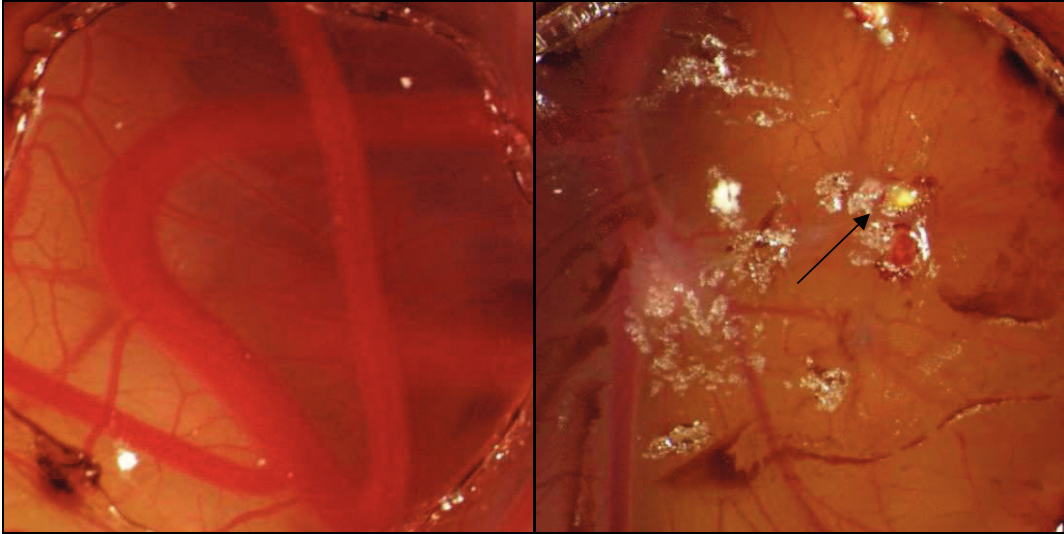


Abbildung 3.2.a: Kontrolle nach 96 h, keinerlei Raumforderung erkennbar

Abbildung 3.2.b: Kleiner gelber Tumor nach 72 h

Bildtafel 3.3: Beispiele von Tumoren auf der CAM

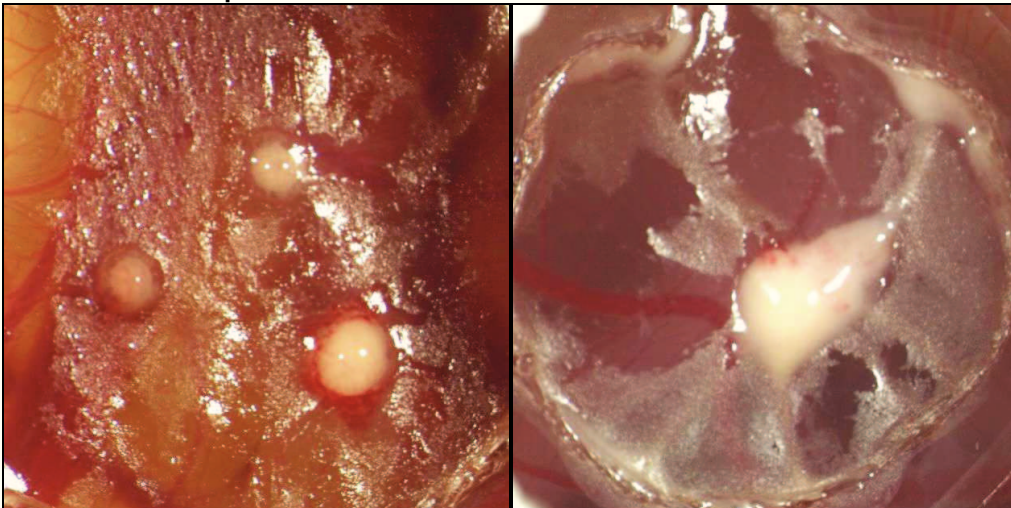


Abbildung 3.3.a: 3 Tumoren nach 120 h

Abbildung 3.3.b: Größerer Tumor nach 72 h

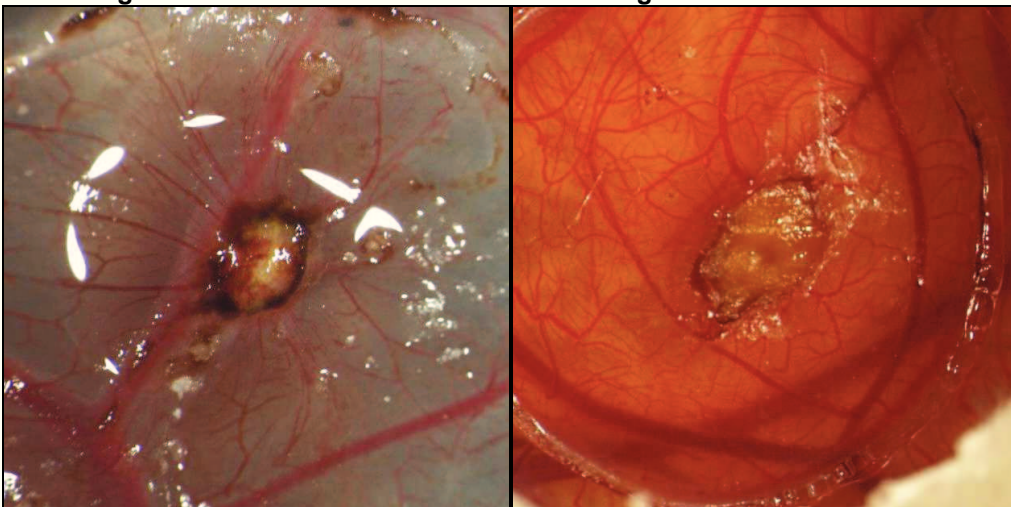


Abbildung 3.3.c: Tumor mit Einblutung

Abbildung 3.3.d: Tumor nach 144 h

3.3 Wachstumsverhalten der Tumoren

Die Tumoren wachsen vor allem in der ersten Hälfte des Versuchszeitraumes, in der zweiten ist ein geringes Wachstum erkennbar (Bildtafel 3.4). In Diagramm 3.3 ist dies an dem Beispiel einer Versuchsgruppe dargestellt. Das Gefäßnetz proliferiert hingegen über den gesamten Entwicklungszeitraum des Tumors, dies wird in Abbildung 3.5 verdeutlicht.

Das erreichte Tumolvolumen der verschiedenen Versuchsgruppen unterscheidet sich erheblich und die Schätzwerte reichen von $<0,1 \mu\text{l}$ bis $15,4 \mu\text{l}$. Das Diagramm 3.4 zeigt die Verteilung der Tumorumfänge in den verschiedenen Versuchsgruppen.

Die ANOVA zeigt eine Wahrscheinlichkeit von 0,006, dass die unterschiedliche Verteilung der Tumorumfänge der einzelnen Vergleichsgruppen auf Zufall beruht (Tabelle 3.2).

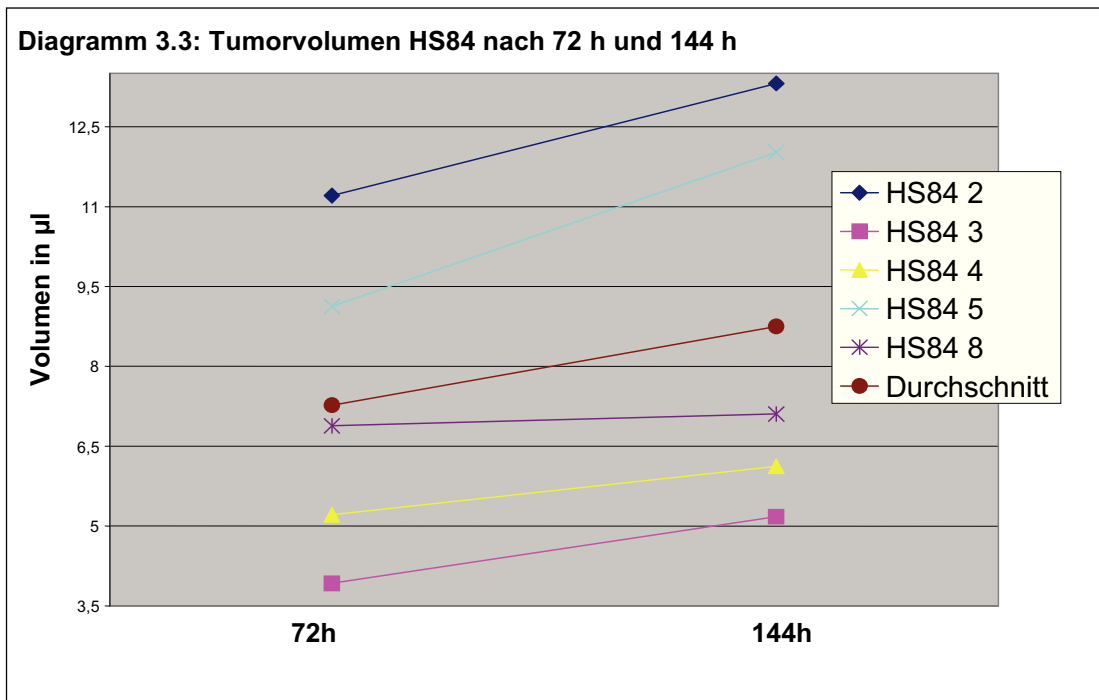


Tabelle 3.2: Einfaktorielle ANOVA der Tumorumfänge der verschiedenen Proben.

	Quadratsumme	Anzahl von Freiheitsgraden	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	270,332	9	30,037	3,127	0,006
Innerhalb der Gruppen	413,027	43	9,605		
Gesamt	683,359	52			

Bildtafel 3.4: Tumorentwicklung über 6 Tage

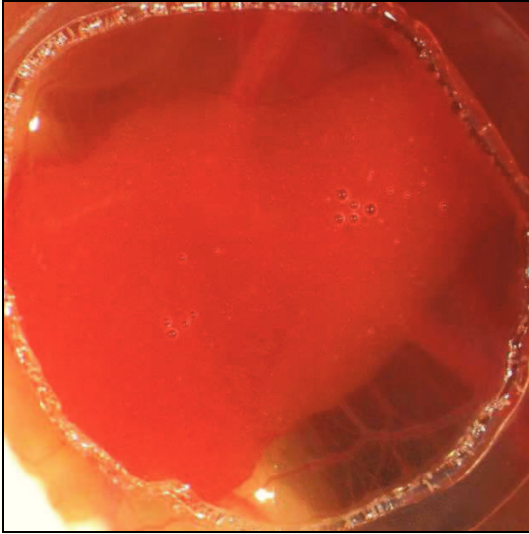


Abbildung 3.4.a: CAM mit Tumorsuspension

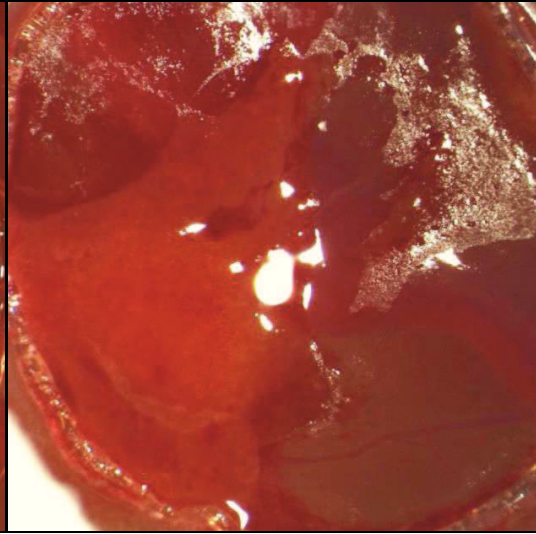


Abbildung 3.4.b: Tumor nach 24 h

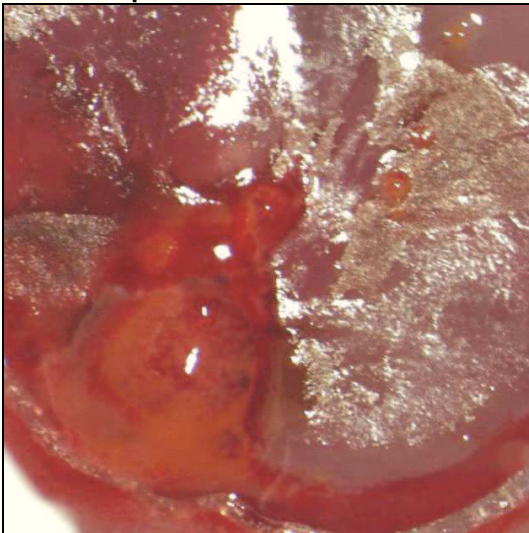


Abbildung 3.4.c: Tumor nach 72 h

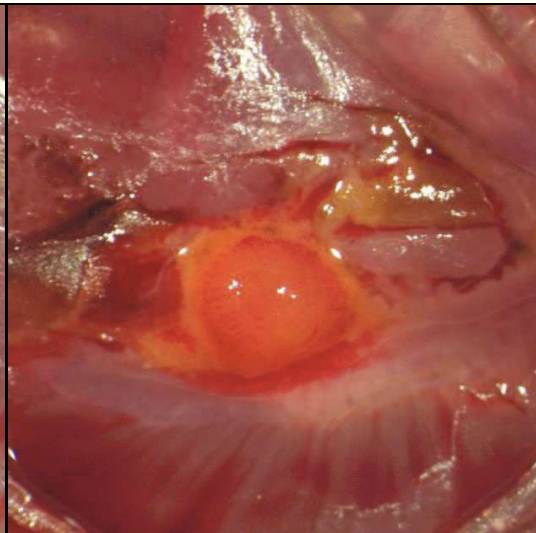


Abbildung 3.4.d: Tumor nach 120 h

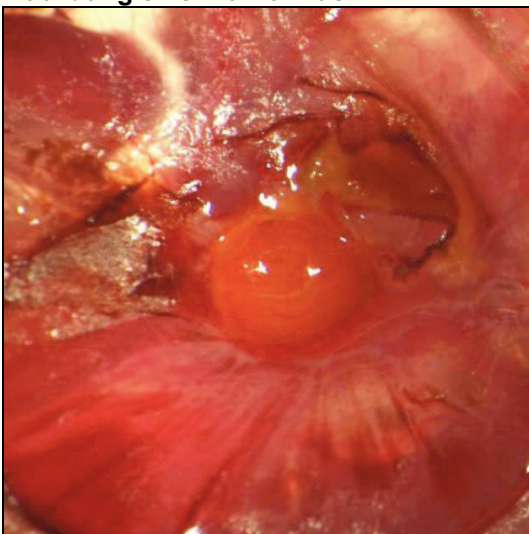


Abbildung 3.4.e: Tumor nach 144 h

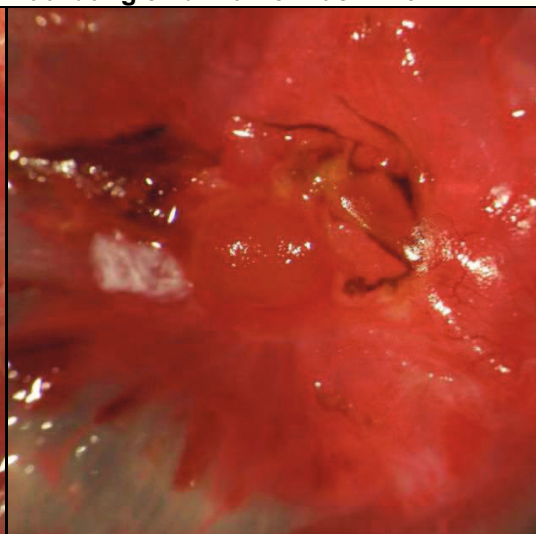


Abbildung 3.4.f: Tumor nach Fixierung

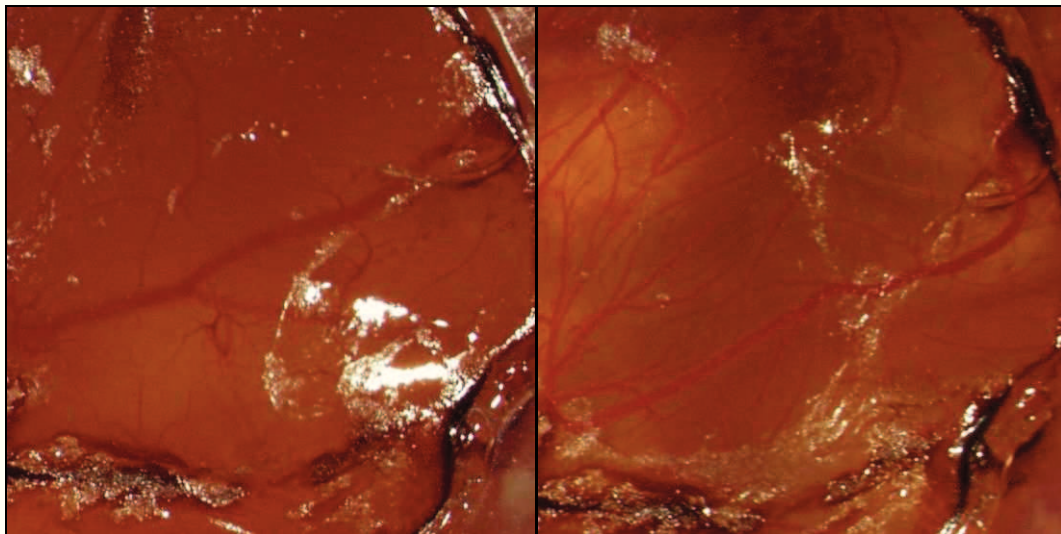
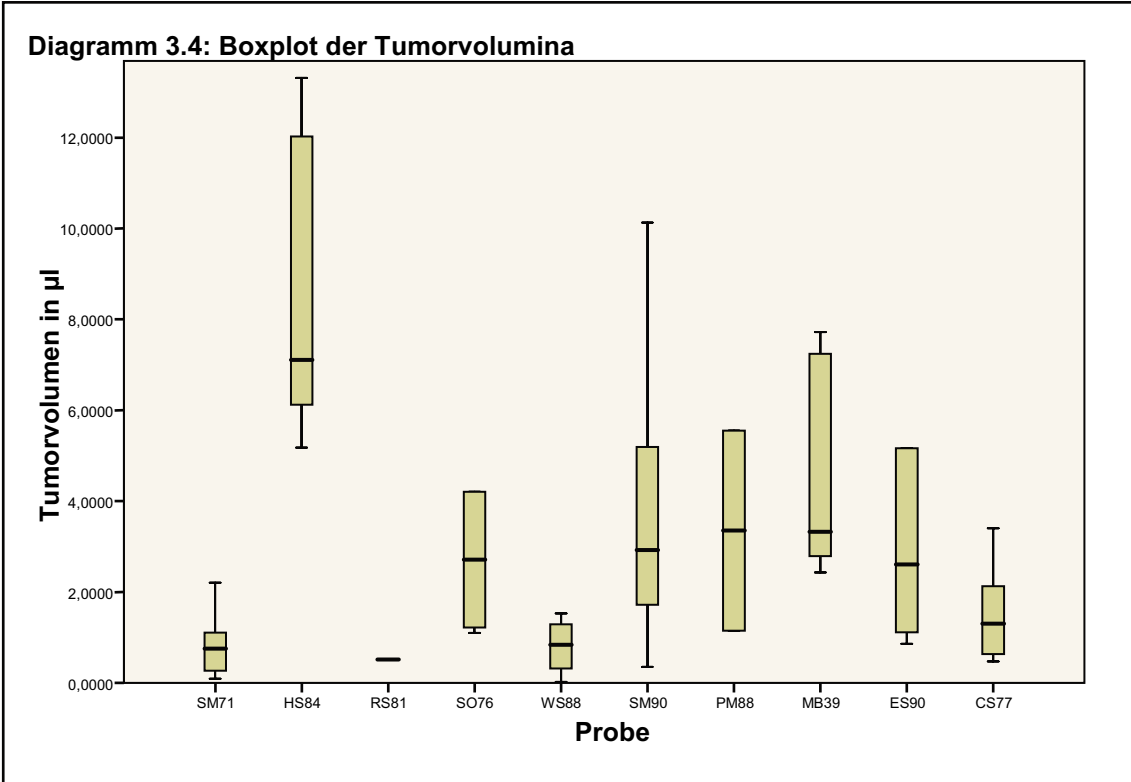


Abbildung 3.5: Gefäßversorgung im Vergleich: Links am 13. Entwicklungstag des Eis, rechts am 16. Entwicklungstag. Die Anzahl der Gefäßabzweigungen hat sich in diesen 72 h vervielfacht.

3.4 Einfluss der Tumortransplantation auf die Embryonen

In den 6 beobachteten Tagen nach Tumorapplikation zeigt sich ein klarer Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den Eiern, die mit der Tumorsuspension inkubiert wurden. In der Kontrollgruppe starben etwa 19% (5 von 26), bei den Tumorgruppen ca. 45% (56 von 125 siehe Tabelle 3.3, Diagramm 3.5). Der Unterschied ist mit einem p-Wert von 0,007 (nach dem Fisher-Yates-Test) signifikant (siehe Tabelle 3.4).

Tabelle 3.3: Vergleich Überleben in Kontroll- und Versuchsgruppe

	Überleben		Gesamt
	Ja	Nein	
Kontrollgruppe	21	4	25
Versuchsgruppe	69	56	125
Gesamt	90	60	150

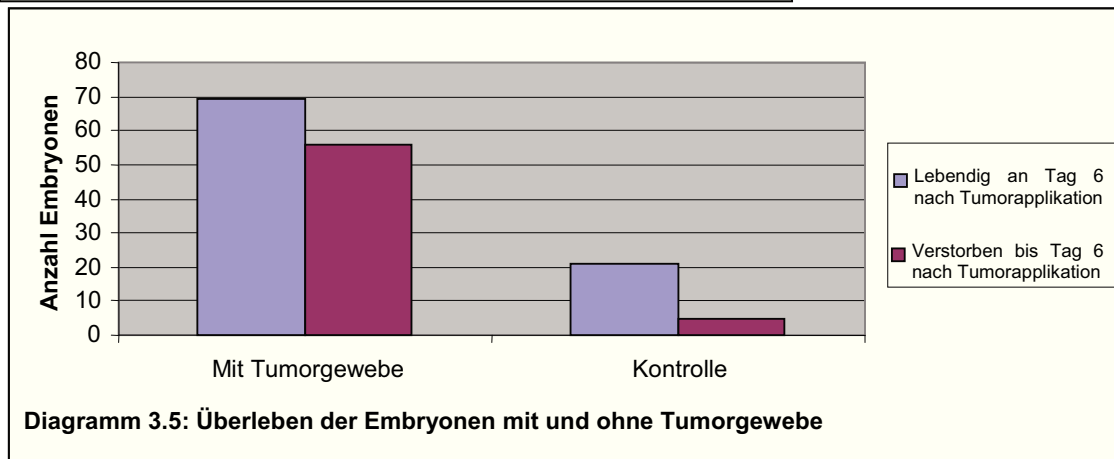


Tabelle 3.4: Signifikanz der Unterschiede der Überlebensrate zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe

	Wert	Anzahl von Freiheitsgraden	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	7,200(b)	1	0,007		
Kontinuitätskorrektur(a)	6,050	1	0,014		
Likelihood-Quotient	7,988	1	0,005		
Exakter Test nach Fisher				0,007	0,005
Anzahl der gültigen Fälle	150				

Ein Vergleich der Todesraten der Embryonen bei den einzelnen Tumorproben untereinander (Tabelle 3.5) mit Hilfe eines Chi-Quadrat-Tests nach Pearson ergibt keinen signifikanten Unterschied ($p=0,155$, siehe Tabelle 3.6).

Tabelle 3.5: Überleben in den verschiedenen Versuchsgruppen

		Überleben bis Tag 16		Gesamt
		Ja	Nein	
Probe	CS77	10	3	13
	ES90	8	6	14
	HS84	5	5	10
	MB39	9	1	10
	PM88	2	6	8
	RS81	1	3	4
	SM71	6	6	12
	SM90	10	12	22
	SO76	10	9	19
	WS88	8	5	13
Gesamt		69	56	125

Tabelle 3.6: Signifikanz der Unterschiede der Überlebensrate zwischen den Versuchsgruppen

	Wert	Anzahl von Freiheitsgraden	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	13,172(a)	9	0,155
Likelihood-Quotient	14,343	9	0,111
Anzahl der gültigen Fälle	125		

3.5 Histologie der Tumoren

Die HE gefärbten Schnitte der Tumoren ähneln unter dem Mikroskop normalen Riesenzelltumoren. Es finden sich neben mehrkernigen Riesenzellen auch verschiedene mononukleäre Zellen. Im Vergleich zu typischen Riesenzelltumoren findet man weniger Riesenzellen mit weniger Zellkernen (Siehe Abbildung 3.6). Es ist keine Infiltration der CAM zu erkennen. Das Tumorgewebe scheint von entzündlichen Infiltraten durchsetzt zu sein.

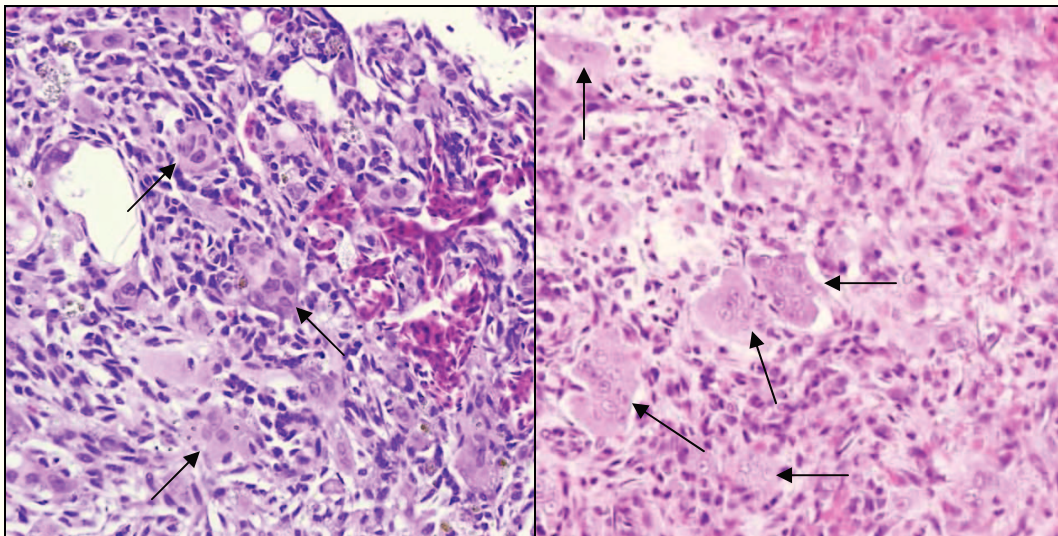
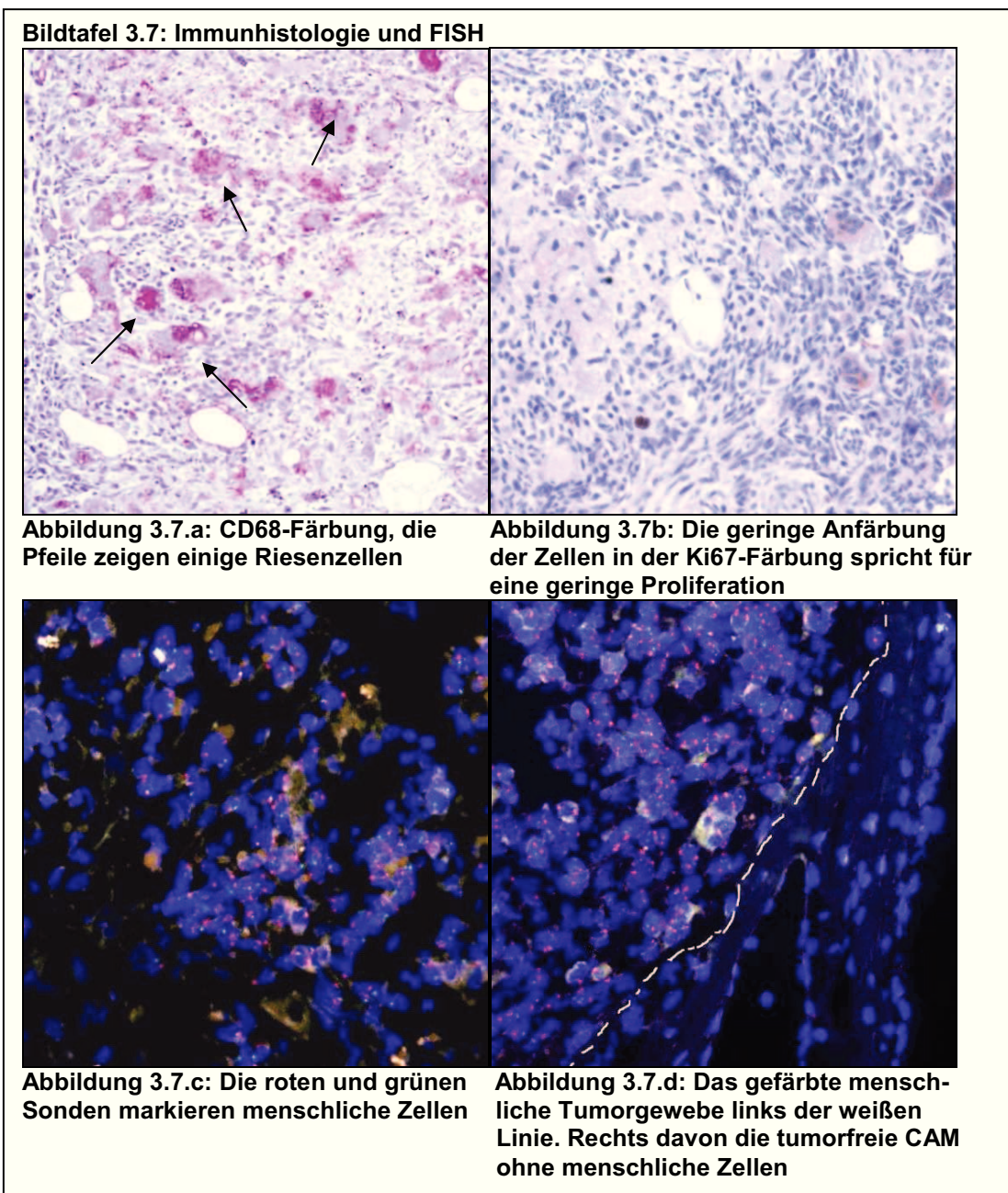


Abbildung 3.6: Tumoren in HE-Färbung im Vergleich: Links das Präparat von der CAM, rechts der Primärtumor. Die Pfeile markieren Riesenzellen. Man beachte die größeren Riesenzellen mit mehr Kernen im Originalpräparat.

3.6 Immunhistologie und FISH der Tumoren

Die Immunhistologie zeigt CD68 positive Riesenzelle, was mit Osteoklasten vereinbar ist (Abbildung 3.7.a). Des Weiteren zeigt die Ki67-Färbung eine geringe Proliferation des Tumors (Abbildung 3.7.b).

Die durchgeführten Interphase-FISH belegt, dass die Zellen des Tumorgewebes vom Menschen stammen und nicht vom Huhn (siehe Abbildung 3.7.c), während die Gefäße aus Hühnerzellen bestehen (Abbildung 3.7.d).



4 Diskussion

Riesenzelltumoren stellen trotz moderner Operationstechniken immer noch ein therapeutisches Problem dar. Die Neigung zu Rezidiven und das zum Teil maligne Verhalten der Tumoren machen teilweise große Operationen mit entsprechenden Funktionseinschränkungen in der Folge notwendig [9]. Auch wenn verschiedene medikamentöse Therapien zur Ergänzung der Operation erforscht wurden, wie der Einsatz von Bisphosphonaten [7,17] oder Denosumab [39,53], gibt es bislang kein medikamentöses Therapiekonzept, das eine Operation ersetzt [9,17,30,53]. Gerade bei inoperablen Lungenmetastasen fehlen die Therapieoptionen zur Operation.

Dabei sind Grundlagen, die den Riesenzelltumor betreffen, noch nicht geklärt. So ist die Pathogenese unbekannt. Es wird sogar spekuliert, dass es sich hierbei nicht um eine Neoplasie handelt, sondern eher um einen reaktiven Prozess [39,49].

4.1 Etablierte Forschungsmethoden am Riesenzelltumor im Vergleich zum CAM Modell

Bislang gibt es wenig etablierte Forschungsmethoden für die Arbeit mit Riesenzelltumoren. Es gibt kein etabliertes Tiermodell und in Zellkulturen halten sich bislang nur die mesenchymalen Stromazellen über viele Passagen [29,58]. Auch wenn diese für die neoplastische Komponente gehalten werden, scheint die Interaktion der verschiedenen Zellen entscheidend für die Pathogenese zu sein [39,49]. Medikamente, wie Bisphosphonate, die häufig eingesetzt werden, wirken primär auf die Riesenzellen und lassen sich hiermit schlecht untersuchen [42].

Unsere Versuche mit der CAM von Hühnereiern eröffnen hier eine neue Möglichkeit, denn die histologischen und immunhistologischen Untersuchungen zeigen, dass es uns gelungen ist, Riesenzelltumoren zu kultivieren und zwar mit allen Zellbestandteilen.

Das CAM Modell ist mit einfachen Methoden durchführbar, kosteneffektiv und ethisch weniger problematisch als Tierversuche [4]. Die CAM findet bereits jetzt breite Anwendung bei der Untersuchung der Angiogenese [24]. Auch bei der Untersuchung maligner Tumoren, wie Glioblastomen und Pankreaskarzinomen erwies sich das CAM-Modell als praxistauglich [28,33,35].

Über den Einsatz der CAM zur Untersuchung von Knochtumoren wird nur wenig berichtet. Im Rahmen der Vorarbeit für diese Studie wurde bereits gezeigt, dass sich Osteosarkomzellen effektiv auf dem CAM-Modell anzüchten und untersuchen lassen [8].

Auch wenn der zu untersuchende Zeitraum kurz ist, so laufen in ihm einige entscheidende Schritte ab. Das aufgetragene Tumorgewebe findet Anschluss an die Gefäßversorgung und organisiert sich zu einem neuen Tumor. Durch die Beobachtung und Analyse dieser Vorgänge können einige neue Erkenntnisse über die Abläufe bei der Metastasierung und bei der Rezidiventwicklung erworben werden.

4.2 Aussagekraft der Proben aus dem Patientenkollektiv

Die Geschlechterverteilung unseres Patientenkollektivs von 50%:50% entspricht weitgehend der Literatur, diese schwankt zwischen ♀: ♂ 55%:45% und 43%:57% [6,9,15,26-27]. Die Lokalisation der Tumoren in unserem Patientenkollektiv spiegelt zwar keine repräsentative Verteilung wider, aber mit den Tumoren an Femur und Tibia haben wir die typischen Erscheinungsorte abgedeckt. Die Verteilung der restlichen Tumore deckt, in Anbetracht der geringen Versuchszahl, ein relativ großes Spektrum ab.

4.3 Entwicklung von Tumoren auf der CAM

In unseren Versuchen zeigte sich insgesamt eine sehr hohe Erfolgsrate bei der Tumorimplantation. 76% (95 von 125) der beimpften Eier entwickelten einen Tumor. Bei den Eiern, die den Versuchszeitraum überlebten, waren es sogar 87% (60 von 69). Dabei verwendeten wir in unseren Versuchen neben frischen Tumorproben auch Proben, die zuvor eingefroren worden waren. Dies zeigt, dass das Einfrieren der Tumorproben problemlos möglich ist und vereinfacht

die Arbeit erheblich. Auch können so Proben über große Strecken hinweg zwischen verschiedenen Forschungsgruppen ausgetauscht werden.

Die Diskrepanz zwischen der Gesamterfolgsrate und der Erfolgsrate der überlebenden Eier spiegelt wieder, dass einige nach der Beimpfung mit dem Tumorgewebe nicht lang genug überlebten, um einen Tumor zu entwickeln.

4.4 Wachstumsverhalten der Tumoren

Bei der Betrachtung der Tumoren fällt auf, dass sich die verschiedenen Versuchsgruppen zum Teil erheblich unterscheiden. Die Tumorumfängen in unseren Versuchen zeigten eine starke Streuung. Die durchgeführte ANOVA ergab, dass die Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen kein Zufall sind ($p=0,006$). Als Ursache hierfür kommen neben der Aggressivität des Tumorgewebes auch Schwankungen der Zusammensetzung des Tumorpräparates in Frage. So zeigten sich bereits beim Zerkleinern der Operationspräparate erhebliche Unterschiede in der Konsistenz des Gewebes. Wenn diese Unterschiede nicht durch die Eigenschaften des Originaltumors zustande kommen, ließen sich die Unterschiede möglicherweise verringern, zum Beispiel durch gezielte Auswahl bestimmter Tumorbereiche zur Aufbereitung oder eine genauere Anpassung der Anzahl der Zellen in der Tumorsuspension.

4.5 Einfluss der Tumortransplantation auf die Embryonen

Dass die Beimpfung mit dem Tumorgewebe die Entwicklung des Huhnes erheblich beeinträchtigt, zeigt der Vergleich mit der Kontrolle. Während etwa 81% der Kontrollgruppe den Beobachtungszeitraum überlebten, waren es nur 55% in der Versuchsgruppe.

Über die hohe Todesrate der Embryonen nach Beimpfung lässt sich nur spekulieren. Eine Möglichkeit wäre, dass vom Tumor an das Blut abgegebene Faktoren die Entwicklung des Huhnes stören, zum Beispiel durch die Förderung der Blutgerinnung. Eine andere Möglichkeit könnte sein, dass Tumorzellen die Gefäße infiltriert haben und, ähnlich wie beim Menschen beschrieben, als Embolie gestreut werden.

Eine ausführliche Autopsie der Embryonen hätte hierüber vielleicht genauere Informationen gegeben, wurde aber nicht durchgeführt.

4.6 Histologie der Tumoren

Die histologischen Proben der auf der CAM angezüchteten Tumoren weisen klare Merkmale der normalen Riesenzelltumoren auf. Neben den osteoklastischen Riesenzellen finden sich Monozyten und Stromazellen.

Im direkten Vergleich fällt auf, dass die Menge der Riesenzellen und deren Kernzahl in den gezüchteten Tumoren geringer ist.

Dies könnte Folge der geringen Versuchsdauer sein; schließlich ist der nutzbare Zeitrahmen der CAM begrenzt. Auch ist das Milieu auf der CAM ein anderes als im Knochen.

Es wird aber auch eine geringere Anzahl von Riesenzellen bei den Lungenmetastasen beschrieben. Die von uns kultivierten Tumoren zeigten in der Histologie ein nicht infiltratives Wachstum und eine starke Durchblutung, auch dies ist bei den Lungenmetastasen beschrieben [1].

Möglicherweise eignet sich das Modell gerade für die Erforschung der Pathobiologie der Lungenmetastasen, einem der nicht geklärten Aspekte der Riesenzelltumoren. Auch könnten in diesem kurzen Zeitraum mögliche medikamentöse Therapien zur Verhinderung von Rezidiven nach Operationen getestet werden.

4.7 Immunhistologie und FISH der Tumoren

Die durchgeführte Interphase-FISH-Untersuchung ermöglicht Einsichten in die Abläufe der Tumorentstehung in unserem Modell.

Sie belegt deutlich, dass der Tumor auf der CAM aus humanen Zellen besteht, die sich aus den Zellen des Ursprungstumors entwickelt haben. Die Abgrenzung zu den von dem Hühnerembryo stammenden Gefäßen lässt sich leicht durchführen. Trotz der kurzen Entwicklungszeit scheint der neu entstehende Tumor die Angiogenese in seiner Umgebung zu beeinflussen.

Die Ki67-Färbung zeigte eine geringe Proliferationsrate des Tumors auf der CAM. Dies ist für die primären Riesenzelltumoren untypisch.

Dies könnte ein Resultat der kurzen Entwicklungszeit sein, aber auch eine Folge suboptimaler Bedingungen auf dem Hühnerei, zum Beispiel durch mangelnde Nährstoffversorgung. Ein zunehmender Nährstoffmangel könnte auch das Stagnieren des Tumorwachstum im Verlauf erklären.

4.8 *Mögliche Anwendungen des Modells*

Die möglichen Anwendungsgebiete des CAM-Modells für Riesenzelltumoren sind vielfältig. So könnte man es nutzen, um die Pathobiologie der Tumoren zu erforschen. Besonders im Bezug auf die Metastasenentwicklung scheint dies viel versprechend.

Ein anderer Zweig ist die Testung möglicher tumorstatistischer Medikamente, ob zur Monotherapie oder als Adjuvanz zur Operation. Gerade für die Untersuchung des Einflusses einer Substanz auf den sich neu formierenden Tumor, wie bei Metastasierung oder Rezidiv, scheint es geeignet.

Durch die bereits etablierte Verwendung als Angiogenese-Modell bieten sich Untersuchungen mit Substanzen an, die hier ansetzen. Hierbei könnte sich jedoch die Anfälligkeit des Embryos als limitierender Faktor herausstellen. Denn gerade bei der Testung von Angiogenesehemmern wäre es zu erwarten, dass diese auf den Hühnerembryo stärker toxisch wirken als auf einen ausgewachsenen Menschen.

Solange genug Tumormaterial vorliegt, kann man schnell und günstig große Versuchsreihen untersuchen. Die Entwicklung der Tumoren lässt sich im Verlauf dokumentieren ohne die Versuche dafür stoppen zu müssen.

Eine Vielzahl von Ergebnisvariablen lässt sich dabei dokumentieren. Besonders geeignet erscheinen dabei die Zahl der sich entwickelnden Tumoren, ihre Gefäßentwicklung und die histologische Zusammensetzung der Tumoren.

Weniger aussagekräftig scheint hingegen das Wachstum der Tumoren und die Größe zu sein. Wegen der großen Schwankungsbreite in unseren Versuchen kann man dies nur innerhalb einer Versuchsgruppe durchführen.

Sollten weitere Versuche relevante Unterschiede im Verhalten verschiedener Riesenzelltumoren auf der CAM zeigen, könnte das Modell durch seine kurze Dauer und seine geringen Kosten standardmäßig zur Hilfe bei der Therapiewahl

eingesetzt werden. Das durch eine Probenentnahme gewonnene Material würde dann im Hinblick auf das Wachstumsverhalten oder seine Sensibilität für bestimmte Medikamente getestet. Je nach Aggressivität des Tumors könnten dann die Resektionsgrenzen angepasst oder je nach Resistenz des Tumors die am besten wirkenden Medikamente verwendet werden. Bereits eine Woche nach Probenentnahme könnten die ersten Ergebnisse vorliegen.

Bislang findet das CAM-Modell wenig Anwendung zur Kultivierung von Tumoren, im Gegensatz zu einigen Tiermodellen. Es gibt Berichte von der Anwendung zur Untersuchung von Melanomen [37], Glioblastomen [28] oder Prostatacarzinomen [33]. Im Rahmen der Vorarbeit zu dieser Studie wurden auch erfolgreich Versuche mit Osteosarkom-Zelllinien durchgeführt [8].

Vielleicht tragen diese Versuche mit dazu bei, dass dieses Modell in Zukunft in einem größeren Maße eingesetzt wird.

5 Literaturverzeichnis

1. Alberghini, M., Kliskey, K., Krenacs, T., Picci, P., Kindblom, L., Forsyth, R., and Athanasou, N.A., *Morphological and immunophenotypic features of primary and metastatic giant cell tumour of bone*. *Virchows Archiv*, 2010. **456**: p. 97-103.
2. Anract, P., De Pinieux, G., Cottias, P., Pouillart, P., Forest, M., and Tomeno, B., *Malignant giant-cell tumours of bone*. *International Orthopaedics*, 1998. **22**: p. 19-26.
3. Armstrong, P.B., Quigley, J.P., and Sidebottom, E., *Transepithelial Invasion and Intramesenchymal Infiltration of the Chick Embryo Chorioallantois by Tumor Cell Lines*. *CANCER RESEARCH*, 1982. **42**: p. 1826-1837.
4. Auerbach, R., Lewis, R., Shinnars, B., Kubai, L., and Akhtar, N., *Angiogenesis Assays: A Critical Overview*. *Clinical Chemistry*, 2003. **49**: p. 32-40.
5. Ausprunk, D.H., Knighton, D.R., and Folkman, J., *Differentiation of Vascular Endothelium in the Chick Chorioallantois: A Structural and Autoradiographic Study*. *DEVELOPMENTAL BIOLOGY*, 1974. **38**: p. 237-248.
6. Baena-Ocampo, L.C., Ramirez-Perez, E., Linares-Gonzalez, L.M., and Delgado-Chavez, R., *Epidemiology of bone tumors in Mexico City: retrospective clinicopathologic study of 566 patients at a referral institution*. *Annals of Diagnostic Pathology*, 2009. **13**: p. 16-21.
7. Balke, M., Campanacci, L., Gebert, C., Picci, P., Gibbons, M., Taylor, R., Hogendoorn, P., Kroep, J., Wass, J., and Athanasou, N., *Bisphosphonate treatment of aggressive primary, recurrent and metastatic Giant Cell Tumour of Bone*. *BMC Cancer*, 2010. **10**(462).
8. Balke, M., Neumann, A., Kersting, C., Agelopoulos, K., Gebert, C., Gosheger, G., Buerger, H., and Hagedorn, M., *Morphologic characterization of osteosarcoma growth on the chick chorioallantoic membrane*. *BMC Research Notes* 2010. **3**(58).
9. Balke, M., Schremper, L., Gebert, C., Ahrens, H., Streitbuerger, A., Koehler, G., Harges, J., and Gosheger, G., *Giant cell tumor of bone: treatment and outcome of 214 cases*. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2008. **134**: p. 969–978.
10. Bellairs, R. and Osmond, M., *The Atlas of Chick Development*. 2005, London: ElsevierAcademic Press.
11. Bertoni, F., Bacchini, P., and Staals, E.L., *Malignancy in Giant Cell Tumor of Bone*. *Cancer*, 2003. **97**: p. 2520-2529.
12. Bertoni, F., Present, D., and Enneking, W.F., *Giant-cell tumor of bone with pulmonary metastases*. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 1985. **67**: p. 890-900.
13. Brien, E.W., Mirra, J.M., Kessler, S., Suen, M., Ho, J.K.S., and Yang, W.T., *Benign giant cell tumor of bone with osteosarcomatous transformation ("dedifferentiated" primary malignant GCT): report of two cases*. *Skeletal Radiology*, 1997. **26**: p. 246-255.

14. Bullough, P.G. and Bansal, M., *Malignancy in giant cell tumor*, in *World health organization classification of tumours. Pathology and genetics. Tumours of soft tissue and bone*, Fletcher, C.D.M., Unni, K.K., and Mertens, F., Editors. 2003, IARC Press: Lyon. p. 313.
15. Campanacci, M., Baldini, N., Boriani, S., and Sudanese, A., *Giant-Cell Tumor of Bone*. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 1987. **69**: p. 106-114.
16. Caudell, J.J., Ballo, M.T., Zagars, G.K., Lewis, V.O., Weber, K.L., Lin, P.P., Marco, R.A., El-Naggar, A.K., Benjamin, R.S., and Yasko, A.W., *Radiotherapy in the management of giant cell tumor of bone*. *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics*, 2003. **57**: p. 158-165.
17. Cheng, Y.Y., Huang, L., Lee, K.M., Xu, J.K., Zheng, M.H., and Kumta, S.M., *Bisphosphonates Induce Apoptosis of Stromal Tumor Cells in Giant Cell Tumor of Bone*. *Calcified Tissue International*, 2004 **75**: p. 71-77.
18. COLEMAN, J.R. and TEREPA, A.R., *ELECTRON PROBE ANALYSIS OF THE CALCIUM DISTRIBUTION IN CELLS OF THE EMBRYONIC CHICK CHORIOALLANTOIC MEMBRANE I. A CRITICAL EVALUATION OF TECHNIQUES*. *J. Histochem. Cytochem.*, 1972. **20**: p. 401-413.
19. Danchakoff, V., *Equivalence of different hematopoietic anlagen. (By method of stimulation of their stem cells). I. Spleen*. *American Journal of Anatomy*, 1916. **20**: p. 255-327.
20. DeFouw, D.O., Rizzo, V.J., Steinfeld, R., and Feinberg, R.N., *Mapping of the microcirculation in the chick chorioallantoic membrane during normal angiogenesis*. *Microvascular Research*, 1989. **38**: p. 136-147.
21. Domovitev, S.V. and Healey, J.H., *Primary Malignant Giant-Cell Tumor of Bone Has High Survival Rate*. *Annals of Surgical Oncology*, 2010. **17**: p. 694-701.
22. Enneking, W.F., *Staging musculoskeletal tumors*, in *Musculoskeletal tumor surgery*, Enneking, W.F., Editor. 1983, Churchill Livingstone: New York. p. 87-88.
23. Fitze-Gschwind, V.D., *Zur Entwicklung der Chorioallantoismembran des Hühnchens*, in *Philosophische Fakultät II der Universität Zürich*. 1973, Zürich: Zürich.
24. Folkman, J., *Angiogenesis: initiation and control*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1982. **401**: p. 212 - 226.
25. Glauber, A., Csató, Z., and Aszódi, K., *Die lokalen Ausbreitungsarten des Riesenzelltumors*. *Archives of Orthopaedic and Traumatic Surgery*, 1979. **95**: p. 199-207.
26. Goldenberg, R.R., Campbell, C.J., and Bonfiglio, M., *Giant-Cell Tumor of Bone: AN ANALYSIS OF TWO HUNDRED AND EIGHTEEN CASES*. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 1970. **52**: p. 619-664.
27. Gupta, R., Seethalakshmi, V., Jambhekar, N.A., Prabhudesai, S., Merchant, N., Puri, A., and Agarwal, M., *Clinicopathologic profile of 470 giant cell tumors of bone from a cancer hospital in western India*. *Annals of Diagnostic Pathology*, 2008. **12**: p. 239-248.
28. Hagedorn, M., Javerzat, S., Gilges, D., Meyre, A., De Lafarge, B., Eichmann, A., and Bikfalvi, A., *Accessing key steps of human tumor progression in vivo by using an avian embryo model*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005. **102**.

29. Huang, T.-S.W., Green, A.D., Beattie, C.W., and Das Gupta, T.K., *Establishment of a cell line from a human giant cell tumor of bone*. *Cancer*, 1993. **71**: p. 1751-1760.
30. Kaban, L.B., Troulis, M.J., Wilkinson, M.S., Ebb, D., and Dodson, T.B., *Adjuvant Antiangiogenic Therapy for Giant Cell Tumors of the Jaws*. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2007. **65**: p. 2018-2024.
31. Kivioja, A.H., Blomqvist, C., Hietaniemi, K., Trovik, C., Walloe, A., Bauer, H.C.F., Jorgensen, P.H., Bergh, P., and Follerås, G., *Cement is recommended in intralesional surgery of giant cell tumors: a Scandinavian Sarcoma Group study of 294 patients followed for a median time of 5 years*. *Acta Orthopaedica*, 2008. **79**: p. 86-93.
32. Knighton, D., Ausprunk, D., Tapper, D., and Folkman, J., *Avascular and vascular phases of tumour growth in the chick embryo*. *British Journal of Cancer*, 1977. **35**: p. 347-356.
33. KUNZI-RAPP, K., GENZE, F., KÜFER, R., REICH, E., HAUTMANN, R.E., and GSCHWEND, J.E., *Chorioallantoic membrane assay: vascularized 3-dimensional cell culture system for human prostate cancer cells as an animal substitute model*. *The Journal of Urology*, 2001. **166**: p. 1502-1507.
34. Kurz, H., Ambrosy, S., Wilting, J., Marmé, D., and Christ, B., *Proliferation pattern of capillary endothelial cells in chorioallantoic membrane development indicates local growth control, which is counteracted by vascular endothelial growth factor application*. *Developmental Dynamics* 1995. **203**: p. 174-186.
35. Laklai, H., Laval, S., Dumartin, L., Rochaix, P., Hagedorn, M., Bikfalvi, A., Le Guellec, S., Delisle, M.-B., Schally, A.V., Susini, C., Pyronnet, S., and Bousquet, C., *Thrombospondin-1 is a critical effector of oncosuppressive activity of sst2 somatostatin receptor on pancreatic cancer*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009. **106**(42): p. 17769-17774.
36. Leeson, T.S. and Leeson, C.R., *The chorio-allantois of the chick. Light and electron microscopic observations at various times of incubation*. *Journal of Anatomy* 1963. **97**: p. 585-595.
37. MACDONALD, I.C., SCHMIDT, E.E., MORRIS, V.L., CHAMBERS, A.F., and GROOM, A.C., *Intravital videomicroscopy of the chorioallantoic microcirculation: a model system for studying metastasis*. *Microvascular Research*, 1992. **44**: p. 185-199.
38. Matsuo, T., Hiyama, E., Sugita, T., Shimose, S., Kubo, T., Mochizuki, Y., Adachi, N., Kojima, K., Sharman, P., and M., O., *Telomerase Activity in Giant Cell Tumors of Bone*. *Annals of Surgical Oncology*, 2007. **14**: p. 2896-2902.
39. Morgan, T., Atkins, G.J., Trivett, M.K., Johnson, S.A., Kansara, M., Schlicht, S.L., Slavin, J.L., Simmons, P., Dickinson, I., Powell, G., Choong, P.F., Holloway, A.J., and Thomas, D.M., *Molecular profiling of giant cell tumor of bone and the osteoclastic localization of ligand for receptor activator of nuclear factor kappaB*. *The American Journal of Pathology*, 2005. **167**: p. 117-128.
40. Murphy, J.B., *TRANSPLANTABILITY OF TISSUES TO THE EMBRYO OF FOREIGN SPECIES: ITS BEARING ON QUESTIONS OF TISSUE SPECIFICITY AND TUMOR IMMUNITY*. *Journal of Experimental Medicine*, 1913. **17**: p. 482-493.

41. Murphy, J.B. and Rous, P., *THE BEHAVIOR OF CHICKEN SARCOMA IMPLANTED IN THE DEVELOPING EMBRYO*. Journal of Experimental Medicine, 1912. **15**: p. 119-132.
42. Nancollas, G.H., Tang, R., Phipps, R.J., Henneman, Z., Gulde, S., Wu, W., Mangood, A., Russell, R.G.G., and Ebetino, F.H., *Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: Differences in interactions with hydroxyapatite*. Bone, 2006 **38**: p. 617–627.
43. Ossowski, L. and Reich, E., *Experimental Model for Quantitative Study of Metastasis*. Cancer Research, 1980. **40**: p. 2300-2309.
44. Pajor, L., Szuhai, K., Mehes, G., Kosztolanyi, G., Jakso, P., Lendvai, G., Szanyi, I., and Kajtar, P., *Combined Metaphase, Interphase Cytogenetic, and Flow Cytometric Analysis of DNA Content of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia*. Cytometry, 1998. **34**: p. 87–94.
45. Quinn, J., Athanasou, N., and McGee, J., *Extracellular matrix receptor and platelet antigens on osteoclasts and foreign body giant cells*. Histochemistry and Cell Biology, 1991. **96**: p. 169-76.
46. Rahn, H., Paganelli, C.V., and Ar, A., *The avian egg: air-cell gas tension, metabolism and incubation time*. Respiration Physiology, 1974. **22**: p. 297-309.
47. Reid, R., Banerjee, S.S., and Sciote, R., *Giant cell tumor*, in *World health organization classification of tumours. Pathology and genetics. Tumours of soft tissue and bone*, Fletcher, C.D.M., Unni, K.K., and Mertens, F., Editors. 2003, IARC Press: Lyon. p. 310-312.
48. RIBATTI, D., VACCA, A., RONCALI, L., and FRANCO, D., *The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis*. International Journal of Developmental Biology, 1996. **40**: p. 1189-1197.
49. Salerno, M., Avnet, S., Alberghini, M., Giunti, A., and Baldini, N., *Histogenetic Characterization of Giant Cell Tumor of Bone*. Clinical Orthopaedic Related Research, 2008 **466**: p. 2081–2091.
50. Schajowicz, F., *Histological Typing of Bone Tumors*. 1993, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg New York. p. 85-90.
51. Schajowicz, F., *Histological Typing of Bone Tumors*. 1993, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg New York. p. 20-22.
52. Schlatter, P., König, M.F., Karlsson, L.M., and Burri, P.H., *Quantitative Study of Intussusceptive Capillary Growth in the Chorioallantoic Membrane (CAM) of the Chicken Embryo*. Microvascular Research, 1997. **54**: p. 65-73.
53. Thomas, D., Henshaw, R., Skubitz, K., Chawla, S., Staddon, A., Blay, J.Y., Roudier, M., Smith, J., Ye, Z., Sohn, W., Dansey, R., and Jun, S., *Denosumab in patients with giant-cell tumour of bone: an open-label, phase 2 study* The Lancet Oncology, 2010. **11**: p. 275-280.
54. Visschedijk, A.H.J., *The air space and embryonic respiration. I. The pattern of gaseous exchange in the fertile egg during the closing stages of incubation*. British Poultry Science, 1968. **9**: p. 173-184.
55. Vult von Steyern, F., Bauer, H.C.F., Trovik, C., Kivioja, A., Bergh, P., Holmberg Jörgensen, P., Follerås, G., and Rydholm, A., *Treatment of local recurrences of giant cell tumour in long bones after curettage and cementing. A Scandinavian Sarcoma Group study*. The Journal of Bone and Joint Surgery, 2006. **88-B**: p. 531-535.

56. Werner, M., *Giant cell tumour of bone: morphological, biological and histogenetical aspects*. International Orthopedics, 2006. **30**: p. 484-489.
57. Woodruff, A.M. and Goodpasture, E.W., *The Susceptibility of the Chorio-Allantoic Membrane of Chick Embryos to Infection with the Fowl-Pox Virus*. American Journal of Pathology, 1931. **7**: p. 209-222.
58. Wüiling, M., Delling, G., and Kaiser, E., *The origin of the neoplastic stromal cell in giant cell tumor of bone*. Human Pathology, 2003. **34**: p. 983-993.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Verteilung der anatomischen Lokalisation von Riesenzelltumoren. Die Zahlen stammen aus mehreren Publikationen mit einem Gesamtkollektiv von 1506 Fällen....	3
Abbildung 1.2:	Röntgenbild eines Riesenzelltumors der proximalen Tibia. Grad II nach Campanacci.....	5
Abbildung 1.3:	Röntgenbild eines Riesenzelltumors der distalen Tibia Grad III nach Campanacci.....	5
Abbildung 1.4:	Riesenzelltumor des proximalen Humerus mit großflächigen Einblutungen.....	6
Abbildung 1.5:	Riesenzelltumor HE-Färbung.....	7
Abbildung 1.6:	Röntgenbild eines Riesenzelltumor des proximalen Femurs vor und nach operativer Ausschabung und Auffüllung mit Knochenzement.....	9
Abbildung 1.7	Aufbau des Hühnereies modifiziert nach Bellairs	11
Abbildung 2.1	Beispiel eines Zeitplanes	20
Bildtafel 2.2	Material CAM Model.....	21
Abbildung 2.2.a:	LötKolben mit feiner Spitze.....	21
Abbildung 2.2.b:	Fertiger Probenring (Durchmesser ca. 13 mm).....	21
Abbildung 2.2.c:	Weinkühler.....	21
Abbildung 2.2.d:	Brutschrank.....	21
Abbildung 2.2.e:	Werkzeuge zur Eierbearbeitung.....	21
Abbildung 2.2.f:	Stereomikroskop.....	21
Bildtafel 2.3:	Vorbereitung der Eier.....	24
Abbildung 2.3.a:	Ei mit Loch zur Eiklarentnahme.....	24
Abbildung 2.3.b:	Die Spritze wird steil durch die Luftblase eingeführt.....	24
Abbildung 2.3.c:	Das Pflaster verhindert ein Weiterbrechen der Eierschale.....	24
Abbildung 2.3.d:	Normalentwickeltes Ei an Tag 3 der Entwicklung.....	24
Abbildung 2.3.e:	Vor dem Wiederverschluss wird das Eiweiß zurückgegeben.....	24
Abbildung 2.3.f:	Für den Brutschrank fertiges Ei.....	24
Bildtafel 2.4:	Aufbringen der Tumorproben.....	26
Abbildung 2.4.a:	Regulär entwickeltes Ei am Tag 10 der Entwicklung nach Aufbringen des Thermanox Ringes	26

Abbildung 2.4.b:	Mit einer Skalpellklinge werden die Gefäße angeritzt....	26
Abbildung 2.4.c:	Leichter Blutaustritt aus den Gefäßen nach dem Ritzen erkennbar.....	26
Bildtafel 2.5:	Fotodokumentation der Tumorentwicklung.....	26
Abbildung 2.5.a:	Tumor nach 72 h.....	26
Abbildung 2.5.b:	Tumor nach 144 h.....	26
Bildtafel 2.6:	Abschätzen des Tumolvolumens.....	30
Abbildung 2.6.a:	Der äußere Durchmesser der Probenringe (rot markiert) dient als Maßstab zur Tumormessung im Bild.....	30
Abbildung 2.6.b:	Der Vergleich mit den Bildern der fixierten CAM von unten (rechts) zeigt die Größe des blau umrandeten Tumors, die hier durch eine Einblutung verborgen ist. Der Verlauf der Gefäße dient dabei als Orientierungshilfe (grüne Linien).....	30
Abbildung 2.6.c:	Darstellung eines Rotationsellipsoids.....	30
Abbildung 3.1	Lokalisation der Tumoren im Patientenkollektiv.....	33
Bildtafel 3.2:	Vergleich Kontrolle mit kleinem Tumor.....	35
Abbildung 3.2.a:	Kontrolle nach 96 h, keinerlei Raumforderung erkennbar.....	35
Abbildung 3.2.b:	Kleiner gelber Tumor nach 72 h.....	35
Bildtafel 3.3:	Beispiele von Tumoren auf der CAM.....	35
Abbildung 3.3.a:	3 Tumoren nach 120 h.....	35
Abbildung 3.3.b:	Größerer Tumor nach 72 h.....	35
Abbildung 3.3.c:	Tumor mit Einblutung.....	35
Abbildung 3.3.d:	Tumor nach 144 h.....	35
Bildtafel 3.4:	Tumorentwicklung über 6 Tage.....	37
Abbildung 3.4.a:	CAM mit Tumorsuspension.....	37
Abbildung 3.4.b:	Tumor nach 24 h.....	37
Abbildung 3.4.c:	Tumor nach 72 h.....	37
Abbildung 3.4.d:	Tumor nach 120 h.....	37
Abbildung 3.4.e:	Tumor nach 144 h.....	37
Abbildung 3.4.f:	Tumor nach Fixierung.....	37
Abbildung 3.5:	Gefäßversorgung im Vergleich: Links am 13. Entwicklungstag des Eis, rechts am 16. Entwicklungstag. Die Anzahl der Gefäßabzweigungen hat sich in diesen 72h vervielfacht.....	38

Abbildung 3.6:	Tumoren in HE-Färbung im Vergleich: Links das Präparat von der CAM, rechts der Originaltumor. Die Pfeile markieren Riesenzellen. Man beachte die größeren Riesenzellen mit mehr Kernen im Originalpräparat.....	41
Bildtafel 3.7:	Immunhistologie und FISH.....	42
Abbildung 3.7.a:	CD68-Färbung, die Pfeile zeigen einige der Riesenzellen.....	42
Abbildung 3.7.b:	Die geringe Anfärbung der Zellen in der Ki67-Färbung spricht für eine geringe Proliferation.....	42
Abbildung 3.7.c:	Die roten und grünen Sonden markieren menschliche Zellen.....	42
Abbildung 3.7.d:	Das gefärbte menschliche Tumorgewebe links der weißen Linie. Rechts davon die tumorfremde CAM ohne menschliche Zellen.....	42

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1:	Überleben der Eier nach Beimpfung.....	34
Tabelle 3.2:	Einfaktorielle ANOVA der Tumorumfänge der verschiedenen Proben.....	36
Tabelle 3.3:	Vergleich Überleben in Kontroll- und Versuchsgruppe..	39
Tabelle 3.4:	Signifikanz der Unterschiede der Überlebensrate zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe.....	39
Tabelle 3.5:	in den verschiedenen Versuchsgruppen.....	40
Tabelle 3.6:	Signifikanz der Unterschiede der Überlebensrate zwischen den Versuchsgruppen.....	40

8 Diagrammverzeichnis

Diagramm 3.1:	Geschlechterverteilung im Patientenkollektiv.....	33
Diagramm 3.2:	Altersverteilung des Patientenkollektivs.....	33
Diagramm 3.3:	Tumorumfang HS84 nach 72 h und 144 h.....	36
Diagramm 3.4:	Boxplot der Tumorumfänge.....	38
Diagramm 3.5:	Überleben der Embryonen mit und ohne Tumorgewebe.....	39

9 Danksagung

Ich möchte diese Gelegenheit nutzen, um allen meinen Dank auszusprechen, die mich auf die ein oder andere Art und Weise bei dem Anfertigen dieser Arbeit unterstützt haben.

Zunächst danke ich Prof. Dr. J. Harges für die Überlassung des Themas und Prof. Dr. G. Köhler für die Möglichkeit der Nutzung der Räumlichkeiten im Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie.

Dr. Maurice Balke danke ich für die hervorragende Betreuung und Förderung im Rahmen dieses Projektes, oft weit außerhalb normaler Arbeitszeiten.

Ich möchte mich bei dem Team im Gerhard-Domagk-Institut bedanken, ganz besonders Frau Anna Neumann, für die vielfältige und freundliche Unterstützung.

Auch danke ich Prof. Dr. H. Bürger für die histologische Untersuchung der Proben und Prof. Dr. K. Szuhai für die FISH-Untersuchungen.

Zuletzt sei meinen Eltern gedankt, Ingeborg und Manfred Horter, für die Hilfe bei der Fehlersuche und meiner verlobten Stephanie Schwaf für die moralische Unterstützung.

Diese Aufzählung hat keinen Anspruch auf Vollständigkeit, ich bitte all jene, die ich hier nicht namentlich genannt habe mir dies zu verzeihen.

10 Lebenslauf

11 Anhang: Abkürzungen

11.1 Abkürzungen

ANOVA	analysis of variance
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAM	Chorio-Allantois-Membran
CD	Cluster of differentiation
CT	Computertomografie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Dr.	Doktor
et al.	et alii bzw. et aliae bzw. et alia
FISH	Fluoreszenz-In Situ-Hybridisierung
G. g. domesticus	Gallus gallus domesticus
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HE	Hämatoxylin-Eosin
MRT	Magnetresonanztomographie
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
p	probability
PBS	phosphate buffered saline
PMMA	Polymethylmethacrylat
Prof.	Professor
RANKL	receptor activator of NF-κB ligand
Rpm	Revolutions per minute
WHO	world health organisation