

**Die Bedeutung der Glykokalix für die  
Rekrutierung von Leukozyten und  
Thrombozyten sowie die mikrovaskuläre  
Permeabilität und Angiogenese im  
Tiermodell des Mammakarzinoms**

von Constanze Isabel Braun

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der  
Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-  
Maximilians-Universität München

**Die Bedeutung der Glykokalix für die  
Rekrutierung von Leukozyten und  
Thrombozyten sowie die mikrovaskuläre  
Permeabilität und Angiogenese im  
Tiermodell des Mammakarzinoms**

von Constanze Isabel Braun

aus Stuttgart

München 2021

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen  
Department der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Physiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Thomas W. Göbel

Angefertigt an der Klinik und Poliklinik für Hals-  
Nasen-Ohrenheilkunde des Klinikums der  
Universität München

Mentor: Prof. Dr. med. Christoph Andreas Reichel

Mitbetreuung durch: Dr. med. Bernd Uhl

**Gedruckt mit der Genehmigung der  
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-  
Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Thomas W. Göbel

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger  
Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann  
Priv.-Doz. Dr. Matthias Eddicks  
Univ.-Prof. Dr. Markus Meißner

Tag der Promotion: 17. Juli 2021

*Meinen Eltern in tiefster Dankbarkeit für ihre  
grenzenlose Unterstützung und ihre  
unerschütterliche Zuversicht*

*„Wo ein Wille ist, da ist auch ein Weg.“*

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>I. EINLEITUNG</b> .....	1
1. Mammakarzinom .....	2
1.1. Epidemiologie .....	2
1.2. Pathophysiologie.....	3
1.3. Diagnostik.....	5
1.4. Therapie.....	6
1.4.1. Grundlagen.....	6
1.4.2. Operation.....	7
1.4.3. Strahlentherapie .....	8
1.4.4. Systemtherapie.....	9
1.4.4.1. Klassische Chemotherapie .....	10
1.4.4.2. Antihormontherapie .....	11
1.4.4.3. Zielgerichtete Therapien .....	11
1.4.4.3.1. Anti-HER2-Therapie .....	11
1.4.4.3.2. Angiogenesehemmung .....	12
1.4.4.3.3. Immuntherapie.....	12
2. Leukozyten .....	13
2.1. Myeloide Leukozyten .....	14
2.1.1. Granulozyten .....	14
2.1.1.1. Neutrophile Granulozyten .....	14
2.1.1.2. Eosinophile Granulozyten.....	16
2.1.1.3. Basophile Granulozyten.....	16
2.1.2. Monozyten .....	17
2.1.2.1. Klassische Monozyten .....	18
2.1.2.2. Nicht-klassische Monozyten .....	18

---

2.1.2.3. Intermediäre Monozyten .....	19
2.1.3. Makrophagen.....	19
2.1.4. Dentritische Zellen .....	22
2.1.5. Mastzellen .....	23
2.2. Lymphoide Leukozyten .....	23
2.2.1. T-Lymphozyten .....	23
2.2.1.1. CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten .....	24
2.2.1.2. CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten .....	24
2.2.1.3. Natürliche Killerzellen .....	25
2.2.2. B-Lymphozyten.....	25
2.3. Leukozytenrekrutierung .....	26
3. Thrombozyten.....	29
3.1. Thrombozytenrekrutierung.....	31
4. Gefäßpermeabilität .....	32
5. Angiogenese.....	33
6. Die Glykokalix.....	35
6.1. Aufbau.....	35
6.2. Physiologische Funktionen .....	37
6.3. Bedeutung unter pathophysiologischen Bedingungen .....	38
6.4. Bedeutung der Glykokalix bei Tumorerkrankungen und ihr Potenzial für neuartige Therapieformen .....	40
<b>II. ZIELSETZUNG .....</b>	<b>44</b>
<b>III. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>45</b>
1. Vorbemerkungen .....	45
2. Material.....	45
2.1. Reagenzien.....	45
2.1.1. Antikörper .....	45
2.1.2. Enzyme.....	46

---

2.1.3. Inhibitor.....	46
2.1.4. Lektin.....	47
2.1.5. Dextrane.....	47
2.2. Zelllinie.....	47
3. Methoden.....	48
3.1. Intravitalmikroskopie (IVM).....	48
3.1.1. Epifluoreszenzmikroskopie.....	48
3.1.2. 2-Photonen-Mikroskopie.....	49
3.2. Versuchstiere.....	50
3.2.1. Tierhaltung und Hygiene.....	51
3.2.2. Anästhesie.....	51
3.2.3. Schwanzvenenkatheter zur intravenösen Applikation von Substanzen.....	52
3.3. Heterotopes Tumormodell.....	53
3.3.1. Analyse der endothelialen Glykokalix.....	55
3.3.2. Analyse der Angiogenese in der Tumormikrozirkulation.....	56
3.3.3. Bestimmung der mikrovaskulären Permeabilität.....	57
3.3.4. Analyse der Leukozyten- und Thrombozytenrekrutierung.....	58
3.3.5. Systemische Zelldepletion.....	61
3.3.5.1. Depletion neutrophiler Granulozyten.....	61
3.3.5.2. Depletion klassischer Monozyten.....	62
3.3.5.3. Thrombozytendepletion.....	62
3.3.6. Tumorwachstum.....	63
4. Versuchsgruppen.....	63
5. Versuchsprotokolle.....	67
5.1. Analyse der endothelialen Glykokalix.....	67
5.2. Analyse der Angiogenese in der Tumormikrozirkulation.....	68
5.3. Bestimmung der mikrovaskulären Permeabilität.....	68
5.4. Analyse der Leukozyten-und Thrombozytenrekrutierung.....	69

---

5.5. Analyse der Rekrutierung myeloider Leukozyten und Thrombozyten nach Depletion.....	70
5.6. Therapeutische Protektion der Glykokalix.....	70
6. Statistik.....	72
<b>IV. ERGEBNISSE.....</b>	<b>73</b>
1. Expressionsanalyse der endothelialen Glykokalix in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms.....	73
2. Analyse der Angiogenese in der Tumormikrozirkulation des Mammakarzinoms	77
3. Analyse der mikrovaskulären Permeabilität im Mammakarzinom.....	80
4. Analyse der Rekrutierung von Thrombozyten und Leukozyten in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms.....	82
5. Analyse der Rekrutierung von Thrombozyten und myeloider Leukozytensubpopulationen in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms.....	84
6. Analyse der Lymphozytenrekrutierung in die Mikrozirkulation des Mammakarzinoms.....	89
7. Expressionsanalyse der endothelialen Glykokalix unter Modulation ihrer Struktur in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms.....	92
8. Analyse der Angiogenese in der Tumormikrozirkulation des Mammakarzinoms unter Modulation der Glykokalixstruktur.....	97
9. Einfluss der Glykokalix auf die mikrovaskuläre Permeabilität im Mammakarzinom unter Modulation der Glykokalixstruktur.....	102
10. Analyse der Rekrutierung von Thrombozyten und myeloiden Leukozytensubpopulationen in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms unter Modulation der Glykokalixstruktur.....	105
11. Analyse der Lymphozytenrekrutierung in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms unter Modulation der Glykokalixstruktur.....	109
12. Bedeutung der Glykokalix für das Wachstum des Mammakarzinoms.....	113

---

13. Analyse der Bedeutung einer Depletion von Thrombozyten und myeloiden Leukozyten für ihre Rekrutierung in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms nach systemischer Degradation der Glykokalix .....	115
14. Bedeutung der Glykokalix sowie myeloider Leukozyten und Thrombozyten für das Tumorwachstum .....	120
15. Expressionsanalyse der endothelialen Glykokalix im heterotopen Mammakarzinom der Ohrmuschel unter therapeutischer Protektion der Glykokalix .....	122
16. Lokales Tumorwachstum des Mammakarzinoms im heterotopen Ohrmodell unter therapeutischer Protektion der Glykokalix .....	125
<b>V. DISKUSSION</b> .....	127
1. Diskussion der Modelle .....	127
1.1. Wahl der Versuchstiere .....	127
1.4. Einsatz der intravitralen 2-Photonen-Mikroskopie .....	132
1.5. Versuchsprotokoll .....	133
2. Diskussion der Ergebnisse .....	134
2.1. Architektur der endothelialen Glykokalix in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms .....	136
2.2. Analyse der Angiogenese in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms .....	138
2.3. Analyse der mikrovaskulären Permeabilität im Mammakarzinom .....	140
2.4. Rekrutierung von Thrombozyten und myeloiden Leukozytensubpopulationen in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms .....	142
2.5. Rekrutierung unterschiedlicher Lymphozytensubpopulationen in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms .....	147
2.6. Expression der endothelialen Glykokalix in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms unter Modulation der Glykokalixstruktur .....	149
2.7. Analyse der Angiogenese in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms unter Modulation der Glykokalixstruktur .....	152

---

2.8. Bestimmung der mikrovaskulären Permeabilität in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms unter Modulation der Glykokalixstruktur .....	156
2.9. Rekrutierung von Thrombozyten, myeloiden und lymphoiden Leukozytensubpopulationen in der peri- und intratumoralen Mikrozirkulation des Mammakarzinoms unter Modulation der Glykokalixstruktur.....	159
2.10. Analyse des Einflusses einer Depletion von Thrombozyten oder spezifischen Leukozytensubpopulationen für ihre Rekrutierung von Thrombozyten und myeloiden Leukozyten in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms unter systemischer enzymatischer Glykokalixdegradation.. .....	160
2.11. Bedeutung von Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten und klassischen Monozyten für das lokale Tumorwachstum des Mammakarzinoms untersystemischer enzymatischer Glykokalixdegradation .....	167
2.12. Analyse des lokalen Tumorwachstums des Mammakarzinom unter Modulation der Glykokalixstruktur.....	170
2.13. Expression der endothelialen Glykokalix im Mammakarzinom unter therapeutischer Anwendung eines Heparanaseinhibitors.....	171
2.14. Analyse des lokalen Tumorwachstums des Mammakarzinoms unter therapeutischer Anwendung eines Heparanaseinhibitors.....	173
2.15. Schlussfolgerungen .....	174
<b>VI. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>176</b>
<b>VII. SUMMARY.....</b>	<b>179</b>
<b>VIII. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>181</b>
<b>IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>186</b>
<b>X. TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>192</b>
<b>XI. PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>193</b>
1. Aus dieser Dissertation hervorgehende Publikation .....	193
2. Weitere Publikationen.....	193

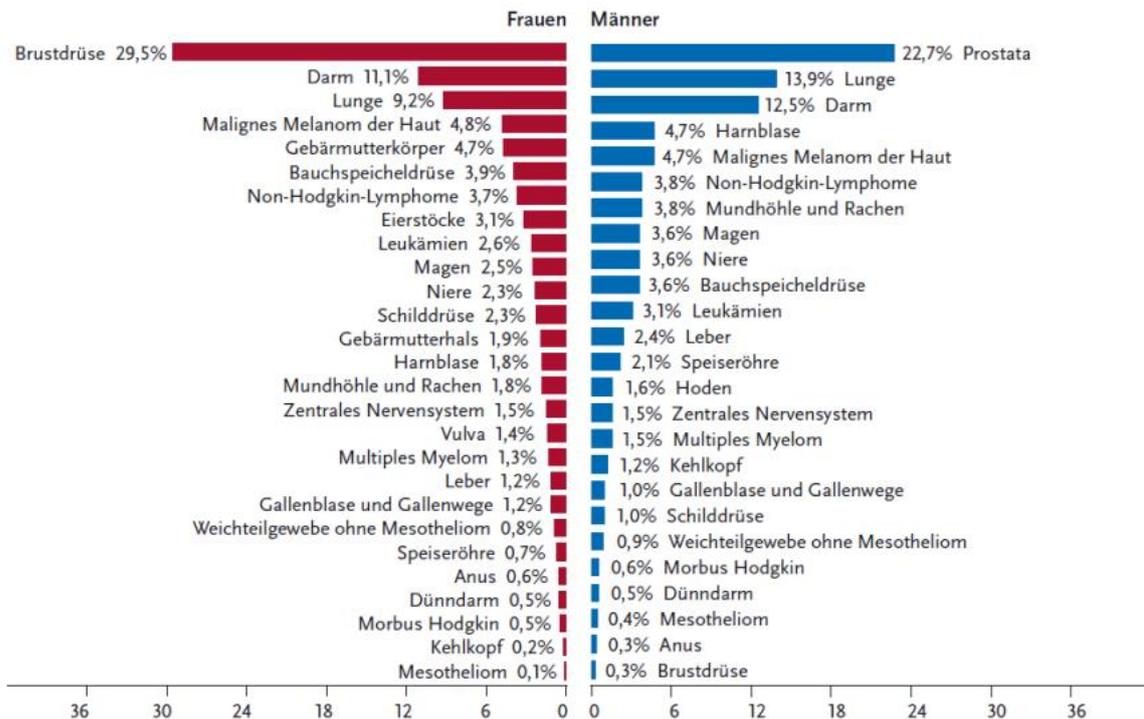
---

<b>XII. DANKSAGUNG .....</b>	<b>194</b>
<b>XIII. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>197</b>

## I. EINLEITUNG

Maligne Tumorerkrankungen stellen schwerwiegende Erkrankungen dar, welche ohne rasche und effektive Behandlung schnell fortschreiten und zum Tod führen können. Sie weisen weltweit sowohl hinsichtlich ihrer Inzidenz als auch ihrer Mortalität eine zunehmende Tendenz auf. In Industrienationen gelten sie nach Herz-Kreislaufkrankungen als die zweithäufigste Todesursache [1, 2]. Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) stieg die Anzahl maligner Tumorerkrankungen im Jahr 2018 weltweit auf 18,1 Millionen Neuerkrankungen mit 9,6 Millionen Todesfällen. Statistisch betrachtet erkrankt in Europa jede dritte Person im Laufe ihres Lebens an Krebs [1]. In Deutschland werden jedes Jahr bei durchschnittlich 500.000 Menschen maligne Läsionen diagnostiziert, wobei Frauen und Männer hinsichtlich der Anzahl ungefähr gleichermaßen betroffen sind [3]. Aber auch in einigen Entwicklungs- und Schwellenländern ist ein Anstieg von Krebserkrankungen durch die Übernahme eines ungesunden Lebenswandels zu beobachten [4]. Da sich das Erkrankungsrisiko mit ansteigendem Alter erhöht, ist anzunehmen, dass die Bedeutung von Tumorerkrankungen aufgrund der immer höheren Lebenserwartung der Bevölkerung weiter zunehmen wird.

Eine herausragende Stellung unter den Krebserkrankungen nimmt das Mammakarzinom ein, da es weltweit die am häufigsten diagnostizierte maligne Tumorerkrankung mit Todesfolge bei Frauen ist (**Abbildung (Abb.) 1**) [5].



**Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2016** (Entnommen aus „Krebs in Deutschland“ für 2015/2016, 12. Auflage. Mit freundlicher Genehmigung des Robert Koch-Instituts (Hrsg) und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), Berlin, 2019).

## 1. Mammakarzinom

### 1.1. Epidemiologie

Bösartige Neubildungen der Brustdrüse werden als Mammakarzinom oder Brustkrebs bezeichnet. Unter diesem Überbegriff werden genotypisch inhomogene Malignome der weiblichen Brust zusammengefasst, welche sich sowohl in ihren histologischen als auch ihren biologischen Eigenschaften sowie ihrer Aggressivität unterscheiden. In Deutschland erkranken laut aktueller Daten des Robert-Koch-Instituts jährlich ca. 70.000 Frauen an einem primären Mammakarzinom, wovon jährlich über 18.000 versterben (**Abb. 2**). Hinzu kommen mehr als 6.000 diagnostizierte *In-situ*-Karzinome [3]. Demnach erkrankt statistisch betrachtet ungefähr eine von acht Frauen im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. Die Erkrankung tritt hauptsächlich bei Frauen zwischen dem 45. und 70. Lebensjahr auf, wobei das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Diagnose 64

Jahre beträgt. 30 % der Patientinnen sind zu diesem Zeitpunkt jünger als 55 Jahre. Etwa 1 % aller Neuerkrankungen betrifft Männer. Trotz steigender Erkrankungszahlen konnte dank großer Fortschritte in Diagnostik und Therapie insgesamt ein Rückgang von Inzidenz und Mortalität erzielt werden. Derzeit beträgt die relative 5-Jahresüberlebensrate durchschnittlich 87 % [3].

Inzidenz	2015		2016		Prognose für 2020	
	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer
Neuerkrankungen	69.630	600	68.950	710	69.700	750
rohe Erkrankungsrate <sup>1</sup>	167,7	1,5	165,2	1,7	167,6	1,8
standardisierte Erkrankungsrate <sup>1,2</sup>	113,7	1,0	112,2	1,1	110,4	1,1
mittleres Erkrankungsalter <sup>3</sup>	64	72	64	72		
Mortalität	2015		2016		2017	
	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer
Sterbefälle	18.136	159	18.570	166	18.401	192
rohe Sterberate <sup>1</sup>	43,7	0,4	44,5	0,4	43,93	0,47
standardisierte Sterberate <sup>1,2</sup>	23,0	0,2	23,4	0,3	22,9	0,3
mittleres Sterbealter <sup>3</sup>	75	75	75	75	76	77
Prävalenz und Überlebensraten	5 Jahre		10 Jahre			
	Frauen	Männer	Frauen	Männer		
Prävalenz	313.500	2.600	584.900	4.200		
absolute Überlebensrate (2015–2016) <sup>4</sup>	79 (78–82)	62	66 (65–69)	46		
relative Überlebensrate (2015–2016) <sup>4</sup>	87 (86–90)	77	82 (81–86)	72		

<sup>1</sup> je 100.000 Personen <sup>2</sup> altersstandardisiert nach alter Europabevölkerung <sup>3</sup> Median <sup>4</sup> in Prozent (niedrigster und höchster Wert der einbezogenen Bundesländer)

**Abb. 2: Übersicht über die wichtigsten epidemiologischen Maßzahlen des Mammakarzinoms für Deutschland** (Entnommen aus „Krebs in Deutschland“ für 2015/2016, 12. Auflage. Mit freundlicher Genehmigung des Robert Koch-Instituts (Hrsg) und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), Berlin, 2019).

## 1.2. Pathophysiologie

Die Pathogenese von Brustkrebs ist im Detail bis heute noch nicht eindeutig geklärt. Aus epidemiologischen Studien geht jedoch hervor, dass sie auf ein multifaktorielles Geschehen zurückzuführen ist. Dabei scheinen sowohl genetische Faktoren als auch unterschiedliche Lebensgewohnheiten eine Rolle zu spielen [6] [7] [2]. Die Mehrheit aller Mammakarzinome tritt mit 95 % spontan auf, während nur ein geringer Anteil mit 5 % eindeutig auf eine hereditäre Ursache zurückzuführen ist. Es gibt zahlreiche Risikofaktoren, welche die Entstehung eines Mammakarzinoms begünstigen [3]. Der wichtigste Risikofaktor stellt dabei das

Lebensalter dar. So steigt mit zunehmendem Alter das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken. Aber auch hormonelle Faktoren (frühe Menarche, späte Menopause, postmenopausale Hormonersatztherapie, Nulliparität), ein ungesunder Lebensstil (Adipositas, Alkohol- und Nikotinkonsum, übermäßiger Fleisch- und Fettkonsum) und ionisierende Strahlung können die Entstehung von Brustkrebs begünstigen. Des Weiteren haben Frauen mit einer hohen mammographischen Dichte (mehr Drüsen- und Bindegewebe, weniger Fettgewebe) ein fünffach erhöhtes Erkrankungsrisiko. Hereditäre Mammakarzinome lassen sich auf eine Keimbahnmutation auf einem der beiden Tumorsuppressorgene *breast cancer gene 1* (BRCA-1; auf Chromosom 17q) oder BRCA-2 (auf Chromosom 13q) zurückführen. Frauen, die eine solche Mutation aufweisen, haben mit 80-90 % ein deutlich erhöhtes Erkrankungsrisiko [8].

Statistisch betrachtet ist die linke Brust häufiger betroffen als die rechte. Etwa 50 % der Mammakarzinome sind im oberen äußeren Quadranten der Brust lokalisiert, während 15 % sowohl im oberen inneren Quadranten als auch retromalleolär vorkommen. Ungefähr 10 % der Mammakarzinome treten im unteren äußeren Quadranten der Brust auf, wobei der untere innere Quadrant der Brust mit 5 % am seltensten betroffen ist.

Nach der WHO-Klassifizierung (1981) lässt sich das Mammakarzinom anhand seines histologischen Phänotyps in das duktales und das lobuläre Karzinom einteilen, welche nicht-invasiv (*in situ*) oder invasiv auftreten können [9]. Das duktales Karzinom entwickelt sich aus Zellen der Milchgänge, wohingegen das lobuläre Karzinom aus Zellen der Drüsenlobuli hervorgeht. Die nicht-invasive Form gilt als eine Vorstufe von Brustkrebs (Präkanzerose), bei welcher die Tumorzellen örtlich begrenzt sind und nicht in das umliegende Gewebe einwachsen. Sie wird unterteilt in das duktales Karzinom („duktales *Carcinoma in situ*, DCIS) und in das lobuläre Karzinom („lobuläres *Carcinoma in situ*“, LCIS oder „*Carcinoma lobulare in situ*“, CLIS). Diese Brustkrebsvorstufen können jedoch in eine invasive Form übergehen, wobei Tumorzellen die Basalmembran penetrieren, das umliegende Gewebe infiltrieren und nachfolgend lokal destruierend wachsen und Metastasen bilden können. Dabei besteht beim DCIS das höchste Risiko für die Entwicklung eines manifesten Karzinoms. Ähnlich wie die nicht-invasiven Veränderungen lassen sich invasive Mammakarzinome in das invasive Karzinom ohne speziellen Typ und in invasive Karzinome mit speziellem Typ unterteilen. Histopathologisch

gehört zum invasiven Karzinom ohne speziellen Typ das invasiv duktales Karzinom, welches etwa 75 % aller Mammakarzinome darstellt. Invasive Karzinome mit speziellem Typ stellen ungefähr 25 % aller Mammakarzinome dar. Diese umfassen unterschiedliche Subtypen, wozu mit etwa 15 % aller Mammakarzinome das invasiv lobuläre Karzinom zählt. Weitere Formen des invasiven Karzinoms mit spezieller Differenzierung sind das papilläre und das kribri-forme Karzinom sowie das muzinöse, das medulläre, das tubuläre, das adenoid-zystische, das sekretorische, das zystisch-hypersekretorische und das apokrine Karzinom. Daneben gibt es das metaplastische Karzinom mit endokriner Differenzierung sowie Sonderformen, wozu das inflammatorische Karzinom und der Morbus Paget der Mamille gehören [9] [10]. Die verschiedenen Subtypen unterscheiden sich dabei in Verlauf und Prognose sowie hinsichtlich ihrer Therapie. Grundsätzlich können invasive Mammakarzinome frühzeitig lymphogen in regionale Lymphknoten, insbesondere axilläre- und zervikale Lymphknoten, oder hämatogen in andere Körperregionen und Organe, vorwiegend Lunge, Leber, Gehirn und Knochen, metastasieren [11] [12], wodurch sich sowohl der Krankheitsverlauf als auch die Prognose erheblich verschlechtern [13] [14].

### 1.3. Diagnostik

Durch Fortschritte in der Brustkrebsdiagnostik konnten die Überlebenszeit und die Heilungschancen in den letzten Jahren bereits verbessert werden [15]. Mit Hilfe der Früherkennungsdiagnostik können beispielsweise zahlreiche klinisch inapparente Risikoläsionen erkannt und gezielt therapiert werden [16] [17]. Zur Früherkennungsdiagnostik gehört neben der gynäkologischen Routineuntersuchung mit Anamnese und klinischer Tastuntersuchung der Brust insbesondere das Mammographie-Screening, welches bei Frauen ab dem 50. Lebensjahr alle zwei Jahre durchgeführt werden sollte [16] [18]. So konnte die Brustkrebsmortalität in den letzten Jahrzehnten um etwa ein Drittel gesenkt werden [19] [20]. Bei unklarem oder auffälligem Befund, Präkanzerosen sowie Patientinnen mit einem manifesten Mammakarzinom, stehen weiterführende Methoden zur Sicherung einer genauen Diagnose zur Verfügung. Diese umfassen neben geeigneten bildgebenden Verfahren wie Sonographie, Computer- und Magnetresonanztomographie sowie Szintigraphie eine Reihe histopathologischer

Untersuchungsmethoden [21]. Hierzu zählen insbesondere minimal-invasive Biopsieverfahren wie die Stanz- und Vakuumbiopsie sowie die offene beziehungsweise operative Biopsie. Die entnommenen Gewebeproben werden hierbei auf verschiedene pathomorphologische Faktoren untersucht und geben Aufschluss über die Dignität und den genauen Tumortyp. Anhand der histopathologischen Untersuchung in Kombination mit klinischer und radiologischer Diagnostik werden der histologische Typ, das Grading, der TNM-Status (Tumorgroße, Lymphknotenbefall, Metastasen), die Multifokalität bzw. Multizentrität, die peritumorale (Lymph-)Gefäßinvasion und gegebenenfalls das Vorliegen eines assoziierten intraduktalen Karzinoms (DCIS) oder der (postoperativ histopathologisch analysierte) chirurgische Resektionsrand bestimmt [22] [23] [24]. Zusätzlich können anhand immunhistologischer Untersuchungen der Östrogen (ER)- und Progesteron (PR)-Status, der *human epidermal growth factor receptor* (HER)2-Status sowie der Ki-67-Proliferationsindex ermittelt werden [25] [26]. Als weitere prognostische Marker können die tumorassoziierten Proteolysefaktoren uPA (*urokinase-type plasminogen activator*) und PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor 1*) herangezogen werden [24]. Bei der Diagnose sind insbesondere Faktoren wie Tumorgroße [27], Aggressivität, Lymphknotenstatus [13] und das Vorhandensein von Fernmetastasen für die Prognose, aber auch für die Wahl der geeignetsten Therapie von entscheidender Bedeutung [14] [28].

## 1.4. Therapie

### 1.4.1. Grundlagen

Für die Therapie des Mammakarzinoms gibt es heutzutage eine Vielzahl von Möglichkeiten [29]. Da es sich beim Mammakarzinom um genotypisch inhomogene Malignome der weiblichen Brust handelt, welche sich sowohl histologisch als auch in ihren biologischen Eigenschaften, ihrer Aggressivität und demnach ihrem Therapieansprechen unterscheiden, erfolgt die Wahl der Behandlung auf Basis unterschiedlicher Faktoren wie beispielsweise der histologischen Entität und dem Stadium der Erkrankung [24] [30] [31]. In diesem Zusammenhang wird entsprechend den aktuellen Leitlinien [24] für jeden Patienten ein individuelles und risikoadaptiertes Therapiekonzept erstellt. Hierfür

werden verschiedene prognostische und prädikative Faktoren herangezogen [24] [32] [33] [34]. Prognostische Marker ermöglichen vor der Therapie eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit eines Rezidives und der Gesamtüberlebensrate [14] [35]. Zu diesen Faktoren gehören der histopathologisch bestimmte postoperative pTNM-Status (Tumorgröße, axillärer Lymphknotenbefall, Fernmetastasierung), der chirurgische Resektionsrand (R-Klassifikation) mit Sicherheitsabständen, histologischer Tumortyp, Grading, Lymph- und Gefäßeinbruch sowie das Alter des Patienten [23]. Prädikative Marker ermöglichen eine konkrete Angabe zum voraussichtlichen Ansprechen des Tumors auf eine spezifische therapeutische Intervention [23] [36]. Sie umfassen den Östrogen-/Progesteronrezeptorstatus, den Her2/neu-Status sowie den Menopausenstatus. Grundsätzlich wird zwischen einer kurativen und einer palliativen Therapie unterscheiden. Die kurative Therapie hat eine vollständige Heilung zum Ziel, der Tumor muss also vollständig entfernt oder zerstört werden. Dies ist in der Regel möglich, wenn die Erkrankung sehr früh erkannt und behandelt wird. Befindet sich die Erkrankung bereits in einem weit fortgeschrittenen Stadium, sind beispielsweise Fernmetastasen vorhanden, ist eine vollständige Heilung grundsätzlich nicht mehr möglich [24]. In diesem Fall steht eine palliative Therapie im Vordergrund, welche in erster Linie dazu dient, Beschwerden zu lindern und die Lebenszeit bei möglichst hoher Lebensqualität zu verlängern. Zu den drei grundlegenden Säulen der (kurativen) Krebstherapie gehören die Operation, die Strahlentherapie und die Systemtherapie, welche sowohl einzeln, aufeinanderfolgend als auch in Kombination angewendet werden [24].

#### 1.4.2. Operation

Die chirurgische Resektion stellt eine lokale Therapieform dar, bei welcher das Tumorgewebe und gegebenenfalls (befallene) regionale Lymphknoten (als erste Station der lymphatischen Metastasierung) chirurgisch entfernt werden. Durch die vollständige Entfernung von tumorös entartetem Gewebe mit Sicherheitsabstand im Gesunden sinkt das Rezidivrisiko deutlich und die Chance auf eine vollständige Heilung ist hoch [37] [38]. In 75 % der Fälle wird in diesem Zusammenhang eine brusterhaltende Operation (BET) durchgeführt, wobei nur der betroffene Anteil des Drüsengewebes entfernt wird [39] [40]. Eine Mastektomie, bei welcher die

gesamte Brust entfernt wird, kommt hingegen seltener zum Einsatz. Sie ist notwendig, wenn der Tumor eine gewisse Größe überschritten hat, mehrere Stellen der Brust oder das äußere Gewebe betroffen sind [41]. Im Rahmen einer neoadjuvanten Therapie können sehr große oder aggressive Mammakarzinome durch eine vorangeschaltete Therapie reduziert werden, wodurch bei der Operation weniger Gewebe entfernt werden muss [42] [43] [44] [45]. Bei der adjuvanten Therapie erfolgt im Anschluss an die Operation eine systemische Therapie und/oder Bestrahlung, wodurch das Risiko für Rezidive und das Auftreten von Metastasen verringert werden [46] [47] [47].

### 1.4.3. Strahlentherapie

Bei der Strahlentherapie (Radiotherapie), welche normalerweise als adjuvante oder palliative Krebstherapie eingesetzt wird, soll das (Tumor-)gewebe durch toxische freie Radikale, welche durch ionisierende Bestrahlung von Gewebe entstehen, zerstört werden [48]. Bei Brustkrebs wird diese Therapiemodalität hauptsächlich adjuvant nach brusterhaltender Operation angewendet [49]. Durch die direkte Bestrahlung der Brust und des ehemaligen Tumorbetts werden eventuell verbliebene Tumorzellen zerstört und dadurch das Rezidiv- und Metastasierungsrisiko gesenkt. Eine Bestrahlung beginnt in der Regel nach Abheilung der Operationswunden, aber spätestens acht Wochen nach der Operation. Dabei wird die betroffene Brust zumeist fünf Mal pro Woche über einen Zeitraum von mehreren Wochen für wenige Sekunden bestrahlt [50]. Erfolgt die Bestrahlung bereits intraoperativ, kann der nachfolgende Bestrahlungszeitraum um ein bis zwei Wochen verkürzt werden [51] [52]. Bei Patienten mit Knochenmetastasen kann der betroffene Knochen durch eine palliative Bestrahlung stabilisiert und Beschwerden gelindert werden [53] [54] [55]. Obwohl durch moderne Techniken in der Strahlentherapie der zu bestrahlende Bereich sehr präzise ausgewählt und umliegendes Gewebe dadurch geschont werden kann, kommt es im betroffenen Gewebe trotzdem zu Kollateralschäden [48]. Ebenso steigt das Risiko für ein tödliches kardiales Ereignis durch die Bestrahlung von linksseitigem Brustkrebs. Um dieses zu minimieren, kann durch die Bestrahlung bei tiefer Inspiration die Dosisbelastung am Herzen und damit auch die kardiovaskuläre Spättoxizität signifikant reduziert werden [56]. Da die

Bestrahlung aber insbesondere auch für die Haut sehr belastend ist, treten meist innerhalb weniger Wochen schmerzhafte Rötungen und Schwellungen im Brustbereich auf. Auch Kopfschmerzen, Müdigkeit und allgemeines Unwohlsein können akute Folgen einer Bestrahlung sein [57] [58] [59]. Zu den Spätfolgen können eine Verkleinerung der Brust, Verfestigungen des Unterhautfettgewebes sowie Hyperpigmentierungen und Varizen gehören [48] [60] [61] [62]. Diese lassen sich jedoch durch eine sorgfältige Planung der Strahlentherapie und einer genauen Dosierung der Bestrahlungsintensität verringern [63] [64] [65] [66].

#### 1.4.4. Systemtherapie

Die systemische (medikamentöse) Therapie des Mammakarzinoms kann neoadjuvant, adjuvant oder palliativ erfolgen [67] [68]. Dabei kommen verschiedenste Medikamente zum Einsatz, welche entweder einzeln oder in Kombination verabreicht werden. Diese Therapieform dient in erster Linie dazu, das Tumorwachstum zu hemmen, Beschwerden zu lindern und den Therapieerfolg in Kombination mit weiteren Behandlungsformen zu erhöhen, es kann im Idealfall aber auch eine Remission des Tumors erzielt werden [69]. Diese Therapieform kann bei lokalen und metastasierten Brustkrebsarten angewendet werden. Der Vorteil der systemischen Therapie besteht darin, dass im Körper verstreute Krebszellen erreicht werden können, welche bei einer lokalen Therapie nicht erfasst werden [70]. Allerdings können Krebszellen mit der Zeit gegen den Wirkmechanismus eines Medikamentes unempfindlich werden, wodurch sich der Therapieerfolg einstellt oder es zu Rezidiven oder erneutem Tumorprogress kommen kann [71]. Da bei dieser Therapieform meistens auch gesunde Körperzellen angegriffen werden, kann eine Reihe von zum Teil erheblichen Nebenwirkungen auftreten, welche sich je nach Art und Dosis des Wirkstoffs sowie der Behandlungsdauer unterscheiden. Diese können entweder unmittelbar nach Behandlungsbeginn eintreten, aber auch mit einer zeitlichen Verzögerung von Tagen, Wochen oder sogar Monaten [72].

#### 1.4.4.1. Klassische Chemotherapie

Bei der Chemotherapie werden klassischerweise sogenannte Zytostatika verabreicht, welche in die Zellteilung eingreifen und dadurch ihre Vermehrung hemmen [70]. Ihre Wirksamkeit ist besonders in schnell proliferierenden Zellen hoch. Da Tumorzellen eine hohe Mitoserate aufweisen, sind sie gegenüber Zytostatika oft deutlich empfindlicher als gesunde Körperzellen [73]. Allerdings werden auch gesunde Körperzellen mit einer hohen Teilungsrate, wie etwa hämatopoetische Stammzellen des Knochenmarks, Epithelien des Magen-Darm-Traktes und Haarwurzelnzellen beeinträchtigt, wodurch es zu unerwünschten Nebenwirkungen wie beispielweise Haarausfall, Übelkeit, Erbrechen und Immunsuppression kommt [74] [75]. Als Wirkmechanismus greifen viele Zytostatika in unterschiedliche Phasen des Zellzyklus ein. Zu den bewährten Vertretern gehören Wirkstoffe aus der Gruppe der Alkylanzien, Anthrazykline und Taxane. Der Hauptwirkungsmechanismus von Alkylanzien besteht im Einbau von Alkylgruppen in die Desoxyribonukleinsäuren (DNS) der (Tumor-)Zellen, wodurch sich DNS-Stränge vernetzen oder gespalten werden. Dies führt zur Hemmung der Zellteilung, wodurch die (Tumor-)Zelle letztendlich abstirbt [76]. Die wichtigsten Vertreter dieser Wirkstoffklasse sind Melphalan, Cyclophosphamid und Bendamustin [77]. Anthrazykline wirken der Tumorprogression einerseits durch eine Störung der DNS-Replikation, andererseits durch die Bildung freier Radikale sowie einer Erhöhung der Zellpermeabilität entgegen. Wichtige Vertreter sind beispielsweise Doxorubicin und Epirubicin [78]. Die zytostatische Wirkung der Taxane beruht auf der Hemmung des Abbaus des Spindelapparates, welcher für die Zellteilung wichtig ist, wodurch die weitere Mitose der (Krebs-)zellen verhindert wird. Zu den Hauptvertretern gehören Paclitaxel, Docetaxel und Cabazitaxel [79] [80]. Eine Behandlung mit Zytostatika dauert in der Regel zwischen 18 und 24 Wochen und ist in mehrere Zyklen eingeteilt, damit sich gesunde Körperzellen in den Behandlungspausen erholen können. Eine Chemotherapie kommt vor allem dann zum Einsatz, wenn das Rezidivrisiko hoch und/oder das Tumorstadium weit fortgeschritten ist [81]. Dies ist beim Mammakarzinom insbesondere der Fall, wenn der Tumor hormonunabhängig („hormonrezeptornegativ“) wächst und eine antihormonelle Therapie nicht wirksam ist, der Tumor besonders viele HER2-Rezeptoren und damit eine hohe Wachstumstendenz aufweist, bereits Lymphknoten befallen oder Fernmetastasen vorhanden sind [82] [83] [84] [85].

#### 1.4.4.2. Antihormontherapie

Etwa zwei Drittel aller Mammakarzinome sind „hormonrezeptorpositiv“ [86] [2]. Dies bedeutet, dass sie auf ihrer Zelloberfläche Östrogen (ER)- und Progesteron (PR)-Rezeptoren exprimieren und dadurch unter Einwirkung der Geschlechtshormone Östrogen und Progesteron wachsen [87]. Bei der Antihormontherapie können unterschiedliche Präparate zum Einsatz kommen, deren Wirkung im Allgemeinen darauf beruht, dass ein Hormon entweder nicht mehr gebildet oder der entsprechende Rezeptor (auch auf den Tumorzellen) dafür blockiert wird. Dies führt dazu, dass die Tumorzellen kein Wachstumssignal mehr erhalten und somit in ihrer Progression gehemmt werden [88]. Zu den Hauptwirkstoffklassen gehören GnRH-Analoga, Östrogenrezeptormodulatoren, Östrogenrezeptorantagonisten („Antiöstrogene“) und Aromatasehemmer, welche abhängig vom Tumorstadium und dem Geschlechtszyklus des Patienten eingesetzt werden [89] [90]. Da eine solche Therapie langsamer wirkt als eine Chemotherapie, erstreckt sich der Behandlungszeitraum mindestens über fünf Jahre [91] [92].

#### 1.4.4.3. Zielgerichtete Therapien

Zielgerichtete Therapien gehören in der Behandlung von Brustkrebs zu den neueren medikamentösen Verfahren, welche auf molekularer Ebene wirken und dabei durch Hemmung spezifischer Prozesse das Tumorstadium verlangsamen oder stoppen [93] [94]. Dadurch entfalten sie ihre Wirkung nicht im gesamten Körper, sondern bekämpfen deutlich gezielter die Krebszellen, wodurch Nebenwirkungen deutlich reduziert werden können [95].

##### 1.4.4.3.1. Anti-HER2-Therapie

Normale Körperzellen besitzen auf ihrer Oberfläche eine geringe Anzahl sogenannter HER2-Rezeptoren (auch erB2 oder HER2/neu), welche Wachstumssignale für die Zellteilung vermitteln [96]. Bei etwa 20 % der Brustkrebspatientinnen und -patienten weisen die Tumorzellen eine erhöhte Expression des HER2-Rezeptors auf (HER2-positiver Brustkrebs), wodurch eine unkontrollierte Zellproliferation gefördert wird [97]. Diese Brustkrebsentität ist

besonders aggressiv und mit einer hohen Wahrscheinlichkeit für ein Rezidiv assoziiert. Mit Hilfe spezifischer Antikörper können HER2-Rezeptoren gezielt blockiert und Krebszellen so in ihrem Wachstum gehemmt werden [85] [98] [99]. Zusätzlich werden die Tumorzellen für das körpereigene Immunsystem markiert, wodurch sie von Leukozyten besser erkannt und bekämpft werden [100]. Diese Therapieform hat sich im klinischen Alltag als sehr effektiv erwiesen und kann in den unterschiedlichsten Krebsstadien eingesetzt werden [97].

#### 1.4.4.3.2. Angiogenesehemmung

Der Begriff „Angiogenese“ beschreibt die Blutgefäßbildung im Körper. Im Rahmen der „Tumor-Angiogenese“ senden Tumorzellen Wachstumsfaktoren aus, um die Blutgefäßneubildung im Tumormikromilieu anzuregen und darüber ihren erhöhten Sauerstoff- und Nährstoffbedarf zu decken [101]. Von besonders großer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang der Wachstumsfaktor VEGF (*vascular endothelial growth factor*) [102] [103] [104] [105]. Mit Hilfe des spezifischen monoklonalen Antikörpers Bevacizumab kann man gezielt in diesen Prozess eingreifen [106] [107]. Er bindet VEGF, wodurch die Blutgefäß-neubildung vermindert und zusätzlich ein Rückgang bestehender Blutgefäße bewirkt wird [108] [109]. Der Angiogenese-Hemmer wird normalerweise in Kombination mit einer Chemotherapie eingesetzt, um so das Tumorwachstum auf zwei verschiedenen Ebenen zu hemmen [110] [111] [112].

#### 1.4.4.3.3. Immuntherapie

Während herkömmliche Krebstherapieformen Tumorzellen direkt angreifen, modulieren Immuntherapien das körpereigene Immunsystem, um die anti-tumorigene Aktivität zu erhöhen [113] [114] [115]. Der beim Mammakarzinom hauptsächlich eingesetzte Mechanismus zur Krebsimmuntherapie basiert auf der Blockade des ko-inhibitorischen Immuncheckpoints (PD-1/PD-L1), welcher unter physiologischen Bedingungen eine Überaktivierung des Immunsystems verhindern soll [116] [117] [118]. Der *programmed cell death ligand 1* (PD-L1) wird im Tumormikromilieu auf der Oberfläche von Mammakarzinomzellen und auf manchen anderen malignen Tumorzellen sowie auf Immunzellen stark exprimiert

[119] [120] [121]. Durch Interaktionen mit dem entsprechenden Rezeptor *programmed cell death protein 1* (PD-1) und B7.1/CD80 auf T-Lymphozyten wird die anti-tumorigene Aktivität dieser Immunzellen reduziert [122] [123] [124]. Über eine pharmakologische Hemmung dieser Interaktion kann gezielt in den pro-tumorigenen Prozess eingegriffen und dadurch maßgeblich zur Krebsbekämpfung beitragen werden [117] [125]. Diese neuartige Therapieform wird bereits bei Mammakarzinomen eingesetzt, die weder Hormonrezeptoren für Östrogen und Progesteron noch HER2-Rezeptoren besitzen (triple-negativ) [126] [127] [128]. Nebenwirkungen dieser Therapie bestehen hauptsächlich in einer Überaktivierung des Immunsystems mit nachfolgenden Autoimmunreaktionen [129].

## 2. Leukozyten

Unter dem Begriff „Leukozyten“ (weiße Blutkörperchen) wird eine heterogene Zellpopulation zusammengefasst, welche im Rahmen der Immunabwehr eine Vielzahl wichtiger Funktionen erfüllt. Nach ihrer Bildung und Reifung im Knochenmark sowie den lymphatischen Organen zirkulieren sie im Blut, bevor sie ins Gewebe auswandern, um dort den größten Teil ihrer Aufgaben zu erfüllen. Die reifen Zellen des Immunsystems werden entsprechend ihrer Vorläuferzelle entweder der myeloiden oder der lymphatischen Gruppe zugeordnet. Darüber hinaus werden diese Gruppen anhand morphologischer und funktioneller Charakteristika in unterschiedliche Leukozytensubpopulationen unterteilt [130]. Neben der Elimination belebter Noxen wie Bakterien, Viren, Parasiten und Pilzen, sind sie auch maßgeblich an der Abwehr unbelebter chemischer, physikalischer und mechanischer Noxen beteiligt. Zusätzlich bekämpfen sie auch körpereigene Zellen mit genetischen Mutationen, wodurch sie einer Tumorentstehung –und progression entgegenwirken können [131]. In den letzten Jahrzehnten hat sich jedoch herausgestellt, dass verschiedene Leukozytensubpopulationen durch unterschiedlichste Mechanismen die Tumorentstehung und - progression auch fördern können [132]. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass sich das tumor-spezifische Stroma neben Fibroblasten, Blut- und Lymphgefäßen, auch aus Zellen des Immunsystems zusammensetzt, welche sich in ihrer Art, Anzahl und Funktion stark unterscheiden [133]. In Abhängigkeit von Entität, Milieu/Mikroumgebung und Stadium eines Tumors, können sich diese „Tumor-assoziierten“ Leukozyten in

unterschiedliche Subpopulationen mit pro-tumoralen oder anti-tumoralen Eigenschaften differenzieren [132] [134] [135] [136-138]. Sowohl für die Prognose als auch für die Therapie sind tumorinfiltrierende Leukozyten aufgrund der Komplexität ihrer Funktionen von sehr großer Bedeutung [132] [134].

## 2.1. Myeloide Leukozyten

Alle Leukozyten myeloiden Ursprungs sind ein essentieller Bestandteil der unspezifischen Abwehr des Körpers und werden dem angeborenen Immunsystem zugeordnet. Sie werden in Abhängigkeit von ihrer Funktion und Morphologie in Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und Mastzellen unterteilt [131].

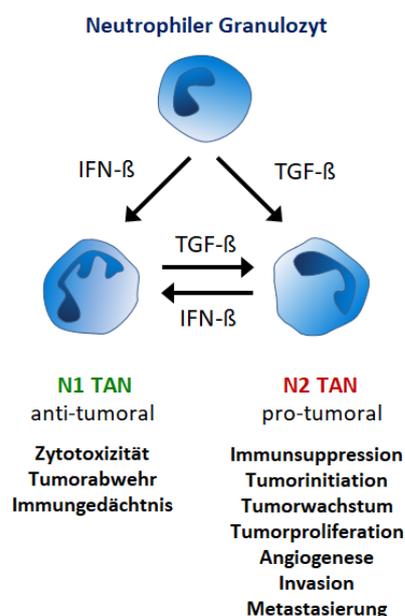
### 2.1.1. Granulozyten

Entlang spezifischer Differenzierungswege entwickeln sich im Knochenmark aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle (Myeloblast) neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten. Sie werden zu den polymorphkernigen Leukozyten gezählt und entsprechend der histochemischen Anfärbbarkeit ihrer spezifischen Granula eingeteilt. Ihre klassische Aufgabe besteht hauptsächlich in der Bekämpfung von Bakterien, Parasiten und Pilzen [131].

#### 2.1.1.1. Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten stellen mit 50-70 % aller zirkulierenden Leukozyten im humanen Organismus den größten Anteil dar und sind bei der Abwehr insbesondere von bakteriellen Infektionen von sehr großer Bedeutung [139]. Sie zeichnen sich durch ihr hohes Phagozytosepotenzial aus und besitzen darüber hinaus die Fähigkeit, Pathogene oder krankhafte Zellen mit Hilfe verschiedener proinflammatorischer Substanzen, proteolytischer und antimikrobieller Enzyme sowie Sauerstoffradikale/reaktiven Sauerstoffspezies zu zerstören. Bei akuten Entzündungen können sie ins Gewebe auswandern und dort dazu beitragen, die Ursache einer Gewebeschädigung zu bekämpfen und zur Regeneration beizutragen, jedoch bei einer überschießenden Immunantwort ihrerseits auch zusätzlich massive Gewebeschäden verursachen [140].

Zudem belegen neuere Studien, dass neutrophile Granulozyten auch an der Tumorentstehung beteiligt sind, beispielsweise im Rahmen chronischer Entzündungsprozesse [141]. Dabei können ihre spezifischen Eigenschaften zur Tumorentstehung und -progression, aber auch zur Angiogenese und Metastasierung beitragen [137, 142, 143] [144]. Darüber hinaus können sie sich unter dem Einfluss der Tumorumgebung phänotypisch verändern und verschiedene pro- oder anti-tumorale Eigenschaften annehmen. Bei diesen tumor-assoziierten neutrophilen Granulozyten (TANs) unterscheidet man zwischen anti-tumoralen (N1) und pro-tumoralen (N2) Phänotypen (**Abb. 3**) [134] [144]. N1-Phänotypen entstehen hauptsächlich unter Einwirkung von IFN- $\beta$  [145], wohingegen sich N2-Phänotypen unter Einfluss des transformierenden Wachstumsfaktors-beta (*transforming growth factor-beta*; TGF- $\beta$ ) differenzieren [136] [146]. Zudem können Tumor- und Stromazellen weitere TANs durch Sekretion der CXCR-Liganden CXCL1, CXCL2 und CXCL5 in das Tumorstroma rekrutieren [144]. Innerhalb des Tumormilieus fördern TANs durch die Freisetzung von VEGF, MMP9, reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und der neutrophilen Elastase die Tumorzellinvasion, Angiogenese und Proliferation [147]. Weiterhin können sie die Aktivität von T-Lymphozyten beispielsweise durch die Expression von PD-L1 inhibieren und dadurch die Tumorentstehung fördern [148].



**Abb. 3: Differenzierung neutrophiler Granulozyten in tumor-assoziierte Phänotypen mit unterschiedlichen Eigenschaften unter Einfluss der Tumorumgebung.**

### 2.1.1.2. Eosinophile Granulozyten

Eosinophile Granulozyten sind insbesondere bei der Bekämpfung von Parasiten von großer Bedeutung. Sie werden durch die Bindung von IgE-Antikörpern zu Sekretion basischer Proteine angeregt, welche neben der direkten Abwehr von Pathogenen auch zur sekundären Rekrutierung weiterer Immunzellen dienen. Zudem sind sie wesentlich an der Pathogenese von Allergien und Asthma sowie Autoimmunerkrankungen beteiligt [149] [150] [151].

Ihre Bedeutung bei Tumorerkrankungen wird derzeit kontrovers diskutiert. Neuere Studien belegen, dass zahlreiche Tumorarten eine erhöhte Anzahl eosinophiler Granulozyten aufweisen. Ob ihre Wirkung in diesem Zusammenhang einen positiven oder negativen Einfluss auf die Prognose hat, hängt neben der Tumorart auch von zahlreichen weiteren Faktoren ab, welche bis jetzt jedoch noch nicht eindeutig geklärt sind [152].

### 2.1.1.3. Basophile Granulozyten

Basophile Granulozyten repräsentieren mit ungefähr 1 % aller zirkulierenden Leukozyten quantitativ eine kleine Leukozytensubpopulation. Eine Aktivierung ihrer membranständigen IgE-Rezeptoren führt zur Freisetzung intrazellulär gespeicherter Granula. Diese bestehen neben vasoaktiven Substanzen wie Histamin und Serotonin auch aus gerinnungshemmendem Heparin sowie verschiedenen immunregulatorischen Zytokinen. Basophile Granulozyten besitzen funktionelle Relevanz bei der Pathogenese allergischer Reaktionen wie beispielsweise Asthma und Heufieber, aber auch bei Autoimmunerkrankungen [153]. Darüber hinaus kann eine systemische Aktivierung dieser Zellen zum anaphylaktischen Schock führen [154].

Ihre Bedeutung in der Tumorimmunologie ist noch wenig erforscht. Bislang ist eine kontroverse Rolle gezeigt worden. Einerseits scheinen sie das Tumorwachstum beispielsweise durch die Freisetzung proangiogenetischer Moleküle fördern zu können, andererseits aber auch zur Tumorchemmung, unter anderem über die Freisetzung von Granzym B, Tumornekrosefaktor (TNF) und Histamin, beitragen zu können [155] [156].

### 2.1.2. Monozyten

Monozyten bilden zusammen mit Makrophagen das mononukleäre Phagozytosesystem (MPS) [157]. Pluripotente Stammzellen des Knochenmarks, den sogenannten Monoblasten, entwickeln sich unter Einfluss des *colony-stimulating factors 1* (CSF-1) zu Promonozyten, welche sich anschließend zu Monozyten differenzieren [158] [159]. Nach weniger als einem Tag verlassen sie das Knochenmark und treten in den Blutstrom ein, wo sie sich für ungefähr ein bis zwei Tage aufhalten. Hier werden sie mit einem Anteil von jeweils ca. 50 % in einen zirkulierenden und einen marginalen Pool unterteilt [160]. Nach ihrem Austritt aus der Zirkulation wandern sie ins Bindegewebe, unterschiedliche Organe oder in Körperhöhlen ein und differenzieren sich dort beispielsweise zu Makrophagen oder Dendritischen Zellen [161].

Monozyten übernehmen als phagozytierende Effektorzellen wichtige Funktionen bei der Elimination von Pathogenen und Zelldebris. Darüber hinaus fungieren sie über ihre Fähigkeit, Antigene zu präsentieren und die Immunantwort durch Zytokinproduktion zu modulieren, als regulatorische Zellen [162].

Die im Blut zirkulierenden Monozyten werden anhand spezifischer Oberflächenmoleküle und Funktionen in verschiedene Untergruppen unterteilt [162] [163]. Beim Menschen werden aufgrund der Expression der Oberflächenmoleküle *cluster of differentiation* (CD) 14 und CD16 drei verschiedene Klassen unterschieden:

klassische/inflammatorische (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), intermediäre (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) und nicht-klassische/residente (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) Monozyten. Bei der Maus hingegen unterscheidet man zwei Subpopulationen. Die größere Untergruppe weist eine starke Expression des Oberflächenproteins Ly6C und des CC-Chemokin-Rezeptors 2 (CCR2) auf, wohingegen der Fraktalkinrezeptor (CX<sub>3</sub>C Chemokinrezeptor 1; CX<sub>3</sub>CR1) nur in geringem Maße auf ihrer Oberfläche exprimiert wird. Die Zellen dieser Population werden als klassische/inflammatorische Monozyten bezeichnet und entsprechen den klassischen Monozyten des Menschen. Die kleinere Untergruppe hingegen weist eine geringe Expression von Ly6C und CCR2 sowie eine hohe Expression von CX<sub>3</sub>CR-1 auf. Diese Immunzellen werden als nicht-klassische/

residente/patrouillierende Monozyten bezeichnet und stellen das Äquivalent der nicht-klassischen Monozyten des Menschen dar. Obwohl die humanen und murinen Subpopulationen nicht identisch sind, stimmen sie dennoch in ihrer immunologischen Funktion größtenteils überein [159].

### 2.1.2.1. Klassische Monozyten

Klassische bzw. inflammatorische Monozyten können bei einer Entzündung oder Infektion schnell zum Ort des Schadens rekrutiert werden. Sie besitzen einen proinflammatorischen Phänotyp, wobei sie neben der Fähigkeit zur gesteigerten Phagozytose auch nach Stimulation (z.B. durch LPS) zur Produktion und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie CCL2, TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und IL-10 sowie der Myeloperoxidase (MPO) in der Lage sind und dadurch den murinen Ly6C<sup>+</sup> inflammatorischen Monozyten sehr ähnlich sind [164]. Sie besitzen im Blut eine Halbwertszeit von ungefähr 20 Stunden [159].

In der Tumorumgebung können sie sich nach Extravasation ins Gewebe unter T<sub>H</sub>1-Stimuli wie IFN- $\gamma$ , TNF oder LPS zu sogenannten M1-Makrophagen differenzieren (Vgl. Abschnitt Makrophagen). Zudem wurde im Mammakarzinom der Maus nachgewiesen, dass klassische Monozyten auch Vorläufer von M2-Makrophagen sein können [160].

### 2.1.2.2. Nicht-klassische Monozyten

Nicht-klassische bzw. residente Monozyten patrouillieren sowohl unter stimulierten als auch unstimulierten Bedingungen entlang der luminalen Gefäßoberfläche und können mit den murinen residenten Monozyten verglichen werden. Sie besitzen eine Halbwertszeit in der Blutzirkulation von etwa fünf Tagen. Diese Subpopulation wirkt tendenziell eher abschwächend auf die Aktivität des Immunsystems. Darüber hinaus vermitteln sie im Rahmen von Entzündungen den Gewebeumbau und tragen dadurch zur Wundheilung bei [159] [165] [166].

Im Tumormilieu fördert eine erhöhte CXCL1-Expression die Rekrutierung von Blutmonozyten ins Tumorstroma, wo diese sich unter Einwirkung von IL-4, IL-10 und IL-13 in alternativ-aktivierte, entzündungshemmende M2-Makrophagen, oder

neueren Studien zufolge auch in M1-Makrophagen differenzieren können (Vgl. Abschnitt Makrophagen) [167].

### 2.1.2.3. Intermediäre Monozyten

Im Gegensatz zur Maus wird beim Menschen eine dritte Monozytensubpopulation beschrieben [168]. Diese sogenannten intermediären Monozyten repräsentieren die kleinste Monozytensubpopulation. Aufgrund ihres Genexpressionsprofils sind sie den proinflammatorischen, klassischen Monozyten am ähnlichsten [164]. Jedoch weisen intermediäre Monozyten eine signifikant höhere Expression des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*; MHC) auf, welcher für die Abwehr mikrobieller Pathogene sowie der Antigenprozessierung- und -präsentation eine wichtige Rolle spielt. Darüber hinaus können sie anhand ihrer selektiven Expression von CCR5 und CD143 klar von CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> und CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> abgegrenzt werden [169]. Nach einer Stimulation mit bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) sezernieren sie die proinflammatorischen Zytokine TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 in hohem Maß [170]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass sie eine Funktion bei der Angiogenese besitzen [171].

Bei krebserkrankten Patienten wurde eine hohe Migrationsrate in tumoröses Gewebe nachgewiesen, wobei intermediäre Monozyten sowohl pro-tumorale als auch anti-tumorale Eigenschaften aufweisen. In diesem Zusammenhang konnte beobachtet werden, dass insbesondere intermediäre Monozyten als Reaktion auf eine neoadjuvante Krebstherapie verstärkt ins Tumorgewebe migrieren, dort akkumulieren und die Resistenz beispielsweise gegen eine anti-angiogenetische Krebstherapie vermitteln [172].

### 2.1.3. Makrophagen

Als wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems stellen Makrophagen eine heterogene Zellpopulation dar, welche sich aus residenten und inflammatorischen Makrophagen zusammensetzt [173]. Sie zeichnen sich durch eine hohe funktionelle Diversität aus und sind im gesamten Organismus anzutreffen. Zu ihren Hauptaufgaben gehören die Phagozytose und intrazelluläre

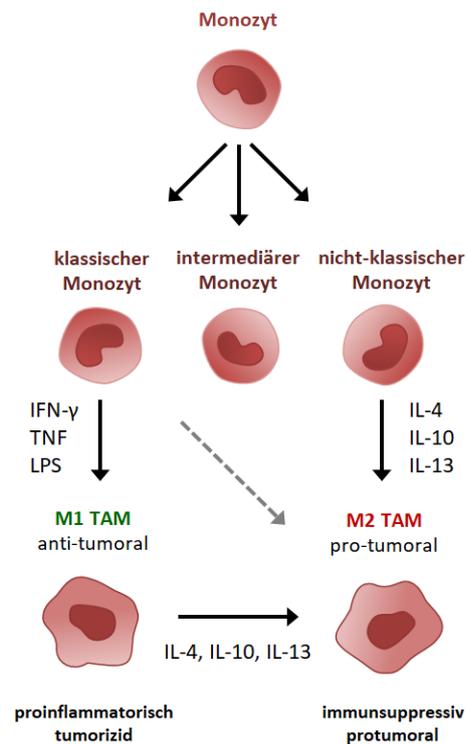
enzymatische Lyse unspezifischer Antigene sowie die T-Lymphozytenaktivierung durch Antigenpräsentation [162] [159]. Sie fungieren damit als Bindeglied zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem. Neben der Fähigkeit Pathogene zu eliminieren, sind sie auch an der Modulation von inflammatorischen oder degenerativen Erkrankungen wie beispielsweise Atherosklerose oder Morbus Alzheimer beteiligt [162]. Die Herkunft der residenten Gewebemakrophagen und der inflammatorischen Makrophagen unterscheidet sich [174]. Beim Menschen stammen sie in erster Linie aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks, welche sich über Zwischenstufen zu Monozyten entwickeln und sich nach ihrer Auswanderung aus dem Blutstrom in unterschiedlichen Geweben, Organen oder Körperhöhlen durch Stimulation des Mikromilieus zu ortsständigen Makrophagen differenzieren und dabei spezifische Aufgaben übernehmen. Die Untergruppen werden in Abhängigkeit ihrer Lokalisation beispielsweise in der Haut als Langerhans-Zellen, in der Leber als Kupffer-Zellen, in der Lunge als Alveolarmakrophagen, im Gehirn als Mikroglia und im Knochen als Osteoklasten bezeichnet [175]. Neuere Studien haben gezeigt, dass sich residente Makrophagen in der Haut, der Milz und im zentralen Nervensystem (ZNS) jedoch auch aus lokalen Vorläuferzellen und nicht nur aus einwandernden Monozyten differenzieren können [176] [177]. Bei der Maus stammen Gewebemakrophagen sowohl aus Vorläuferzellen, die bereits im Dottersack und der fötalen Leber gebildet werden, als auch aus Monozyten, welche im Knochenmark entstehen [178] [179].

Auch in der Tumorummunologie sind Makrophagen von sehr großer Bedeutung. Dabei weisen sie unter Signaleinflüssen des Tumormilieus eine hohe funktionelle Plastizität auf, wobei sie sich in unterschiedliche Subtypen mit sowohl pro-tumoralen (M2-Makrophagen) als auch anti-tumoralen (M1-Makrophagen) Effekten differenzieren können (**Abb. 4**). Dabei stellen diese sogenannten „Tumor-assoziierten Makrophagen“ (TAMs) mit 50 % aller tumor-infiltrierenden Leukozyten den Hauptanteil dar. In den meisten Krebsarten wird eine hohe Anzahl von TAM mit einer schlechten Prognose in Verbindung gebracht, da sie abhängig von ihrem spezifischen Phänotyp zur Tumorprogression beitragen können [135] [136] [180] [181] [162, 180]. Die treibende Kraft der Monozytenrekrutierung ins Tumorgewebe sind in erster Linie die Chemokin (C-C-Motiv) Liganden 2 (CCL-2) und 5 (CCL5),

welche hauptsächlich von Tumorzellen, aber auch von Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen innerhalb des Tumors sezerniert werden. Daneben sind auch der *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF), der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) sowie weitere CC-Chemokine am Rekrutierungsprozess beteiligt [180].

M1-Makrophagen entstehen in der Regel aus klassischen Monozyten unter Th1-Stimuli wie IFN- $\gamma$ , TNF oder LPS und weisen überwiegend proinflammatorische und tumorizide Eigenschaften auf [160]. Allerdings kann sich dieser Phänotyp im Verlauf der Tumorprogression unter Signaleinflüssen neoplastischer Zellen hin zu einem eher immunsuppressiven und tumorfördernden M2-Phänotypen differenzieren [136] [162] [180] [135]

M2-Makrophagen differenzieren sich tendenziell aus nicht-klassischen Monozyten oder aus M1-Makrophagen unter Einwirkung von IL-4, IL-10 und IL-13 und besitzen vorwiegend immunsuppressive und pro-tumorale Eigenschaften [136, 162]. Durch die Produktion von IL-10 supprimieren sie die Immunantwort auf Tumor-Neoantigene sowie die Aktivität benachbarter Makrophagen. Ferner fördern sie durch Sekretion von MMPs, Wachstumsfaktoren wie VEGF und Zytokinen wie IL-1, IL-6 und TNF die Tumorangiogenese sowie die Tumorzellinvasion und Metastasierung und tragen dadurch maßgeblich zur Tumorprogression bei [136] [142] [162] [180] [181] [182]. Zudem sind sie an der Rekrutierung von T<sub>H</sub>2-Helferzellen, regulatorischen T-Zellen (T<sub>Reg</sub>), eosinophilen und basophilen Granulozyten beteiligt, welche im Tumormilieu vorwiegend tumorfördernd wirken [183].



**Abb. 4: Differenzierung verschiedener Monozytensubpopulationen in „Tumor-assoziierte Makrophagen“ (TAMs) unter Einfluss der Tumorumgebung.**

#### 2.1.4. Dendritische Zellen

Dendritische Zellen fungieren als professionell antigenpräsentierende Zellen des Immunsystems und bilden damit ein Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunantwort. Sie entstehen aus lymphoiden oder monozytären Vorläuferzellen des Knochenmarks. Die noch unreifen dendritischen Zellen zirkulieren zunächst im Blut und wandern in nicht-lymphatisches Gewebe aus. Erst durch Antigenkontakt werden sie aktiviert, wodurch sie sich zu reifen dendritischen Zellen differenzieren und die Fähigkeit zur Phagozytose erlangen. Anschließend wandern sie zu sekundären lymphatischen Organen, wo sie durch Antigenpräsentation naive T-Zellen aktivieren und dadurch eine primäre Immunantwort induzieren [163].

Da diese Zellpopulation bei der Immunabwehr auch eine wichtige Funktion bei der Präsentation von Antigenen aufweist, trägt sie zur Elimination entarteter Körperzellen bei, wodurch sie für die Tumorbekämpfung von Bedeutung ist [184].

### 2.1.5. Mastzellen

Mastzellen gehören zu den Zellen des angeborenen Immunsystems und entstehen aus myelischen Stammzellen im Knochenmark. Sie befinden sich vorwiegend im interstitiellen Bindegewebe im gesamten Organismus und sind neben der physiologischen Aufgabe der Abwehr von Pathogenen wie Parasiten und Bakterien, insbesondere bei Allergien vom Typ I von großer Bedeutung. Auf ihrer Zelloberfläche befinden sich membranständige IgE-Rezeptoren, welche Antigene binden und erkennen können. Die Aktivierung von Mastzellen führt zur Freisetzung intrazellulär gespeicherter Mediatoren wie Histamin, Heparin, vasoaktiver Substanzen und Proteasen [154] [155].

Ihre Bedeutung für maligne Tumoren ist bislang noch nicht eindeutig erforscht. Es ist jedoch bekannt, dass sie in der Lage sind, verschiedenen Faktoren freizusetzen, welche unter anderem die Gefäßneubildung und das Tumorwachstum fördern [185].

## 2.2. Lymphoide Leukozyten

Lymphoide Leukozyten entstehen aus lymphoiden Vorläuferzellen des Knochenmarks. Sie sind ein wesentlicher Bestandteil des spezifischen, adaptiven Immunsystems und besitzen die Fähigkeit, zwischen „körpereigen“ und „-fremd“ zu unterscheiden. Nach ihrer Reifung in den primären lymphatischen Organen, Knochenmark und Thymus, findet ihre spezifische Differenzierung in den sekundären lymphatischen Geweben von Lymphknoten, Milz, Tonsillen und mukosa-assoziiertem lymphatischem Gewebe (MALT) statt [154].

### 2.2.1. T-Lymphozyten

Die Reifung der T-Lymphozyten findet im Thymus statt. Mit Hilfe von membranständigen T-Zell-Rezeptoren (TCR) können sie Antigene erkennen, welche durch MHC-Moleküle präsentiert werden. Anhand der Expression spezifischer Oberflächenmoleküle sowie unterschiedlicher Funktionen werden verschiedene T-lymphozytäre Subpopulationen unterschieden [131].

### 2.2.1.1. CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten

CD4-positive (CD4<sup>+</sup>) T-Lymphozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche CD4-Korezeptoren, welche mit MHC-II-Molekülen antigenpräsentierender Zellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen oder B-Lymphozyten interagieren. Die wichtigste Gruppe der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten sind die T-Helferzellen (T<sub>H</sub>-Zellen), welche anhand verschiedener Zytokinexpressionsmuster in unterschiedliche Effektor-Subpopulationen eingeteilt werden. Von größter Bedeutung sind hierbei einerseits T<sub>H1</sub>-Helferzellen, welche mit Hilfe der proinflammatorischen Zytokine IL-2, TNF und IFN- $\gamma$  eine zelluläre Immunantwort induzieren können, sowie T<sub>H2</sub>-Helferzellen, welche über die Sekretion von IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 primär die humorale Immunantwort verstärken. Neben regulatorischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen (T<sub>reg</sub>), welche funktionell die Aktivität einer Immunantwort eher inhibieren, werden weitere Subpopulationen von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten beschrieben (z.B. T<sub>H9</sub>, T<sub>H17</sub> und T<sub>H22</sub>), deren Funktion bisher nur teilweise charakterisiert worden ist [131] [186].

Bei Krebserkrankungen korreliert eine erhöhte Anzahl aktivierter CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten allgemein mit einer besseren Prognose. Dabei unterstützen insbesondere T<sub>H1</sub>-Zellen durch die Produktion von IFN- $\gamma$ , IL-2 und TNF die Aktivität zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, natürlicher Killerzellen und Makrophagen [134]. Im Gegensatz dazu unterdrücken insbesondere IL-17 produzierende T<sub>H17</sub>-Zellen sowie regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>) mit Hilfe von TGF- $\beta$  die Aktivität anderer Immunzellen und tragen dadurch aktiv zur Tumorprogression bei [135] [187].

### 2.2.1.2. CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten

Die wichtigste und größte Gruppe der CD8-positiven (CD8<sup>+</sup>) T-Lymphozyten sind die zytotoxischen T-Lymphozyten. Diese können mit Hilfe membrangebundener CD8-Korezeptoren Antigene erkennen, welche über MHC-I-Moleküle kernhaltiger Zellen präsentiert werden. Nach ihrer Aktivierung sezernieren sie Zytokine wie IFN- $\gamma$  und TNF sowie Perforine und Granzyme, wodurch einerseits weitere Immunzellen aktiviert, andererseits infizierte, körperfremde oder genetisch veränderte Zellen direkt zerstört werden. Damit bilden sie als Haupteffektorzellen den Kernbestandteil der zellulären anti-tumoralen Immunantwort [188] [132] [189].

Wie auch bei CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten wird bei CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten eine regulatorische Untergruppe beschrieben, welche als CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>T-Suppressor-Zellen bezeichnet werden [190]. Die molekularen Mechanismen dieser Zellpopulation sind ähnlich wie bei CD4<sup>+</sup>Treg vielfältig und noch nicht genau geklärt. Es wurde bislang gezeigt, dass sie direkt aktivierte Effektor-T-Zellen lysieren und negativ regulierende Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$  sezernieren können [191].

### 2.2.1.3. Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK) entstehen wie alle anderen Lymphozyten aus lymphoiden Vorläuferzellen des Knochenmarks. Ihre Hauptfunktion besteht in der Bekämpfung virusinfizierter oder neoplastischer Zellen. Im Gegensatz zu Lymphozyten besitzen sie jedoch keine antigenspezifischen Rezeptoren. Stattdessen können sie über spezielle Rezeptoren mit MHC-I-Molekülen kernhaltiger Zellen interagieren. Zellen mit einer verminderten oder fehlenden MHC-I-Expression werden von NK-Zellen erkannt und daraufhin durch die Freisetzung von Perforinen und Granzymen lysiert [192]. In malignen Tumoren führt dieser Mechanismus zur Tumorzellelimination, wodurch NK-Zellen eine anti-tumorale Rolle zugeschrieben wird [193].

### 2.2.2. B-Lymphozyten

B-Lymphozyten finden sich zirkulierend im Blut und in den sekundären lymphatischen Organen. Sie bilden das Fundament der spezifischen humoralen Immunantwort. Im Gegensatz zu T-Lymphozyten sind sie dazu fähig, Antigene selbständig aufzunehmen und auf MHC-II-Molekülen zu präsentieren, weshalb sie zu den professionellen antigenpräsentierenden Zellen gezählt werden. Zudem exprimieren sie auf ihrer Oberfläche Immunglobuline, wodurch sie in der Lage sind, freie Antigene zu erkennen. Nach ihrer Aktivierung können sie sich zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen oder B-Gedächtniszellen differenzieren und dadurch bei erneutem Antigenkontakt eine schnelle und spezifische Immunantwort einleiten [194] [195].

B-Lymphozyten spielen eine wichtige Rolle in der Tumorummunologie. Als zweithäufigste Lymphozytenpopulation in zahlreichen Tumorarten, können sie sowohl pro- als auch anti-tumorale Eigenschaften aufweisen. Durch die Produktion spezifischer anti-tumoraler Immunglobuline sowie durch die Aktivierung weiterer Immunzellen, beispielsweise von natürlichen Killerzellen, dendritischen Zellen, Makrophagen oder T-Lymphozyten, können sie zur anti-tumoralen Immunantwort beitragen. Andererseits können sie das Tumorwachstum durch die Produktion von Autoantikörpern und Wachstumsfaktoren fördern. Zudem vermindern sie die Aktivität der eher anti-tumoral agierenden  $T_H1$ - und zytotoxischen T-Lymphozyten durch die Freisetzung von TGF- $\beta$  und IL-10 [196] [197] [198].

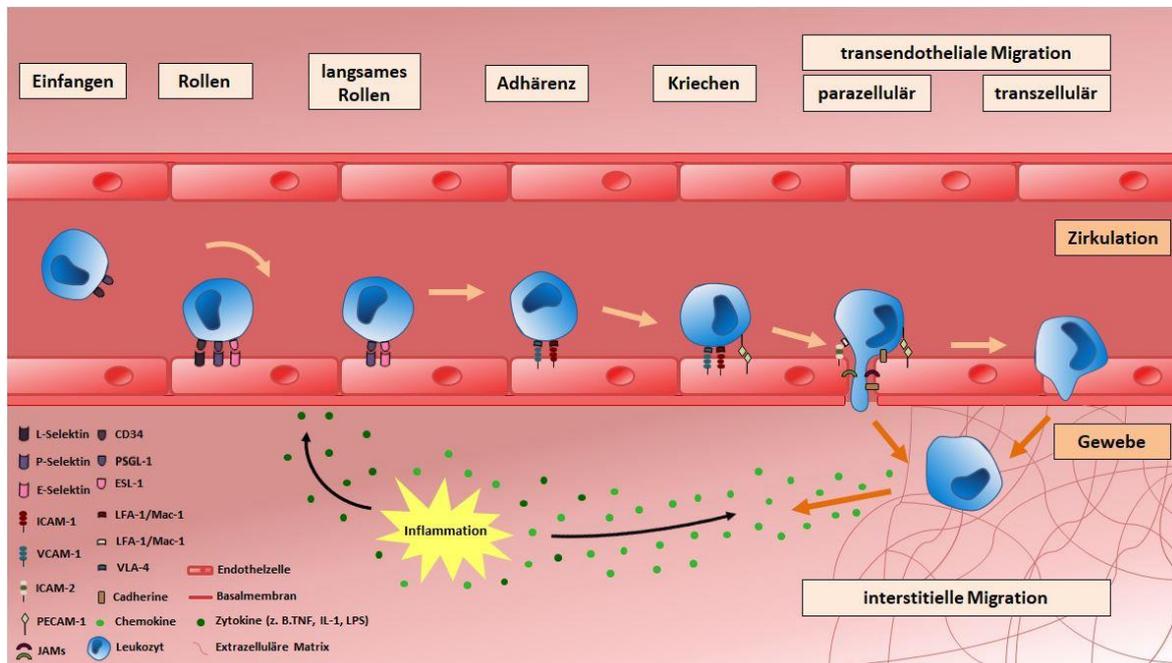
### 2.3. Leukozytenrekrutierung

Die Leukozytenrekrutierung beschreibt einen zentralen Prozess der Immunabwehr, bei welchem Leukozyten das Blutgefäßsystem verlassen und in geschädigtes bzw. entzündlich verändertes Gewebe einwandern, um dort ihre spezifischen Funktionen auszuüben. Die wesentlichen Schritte dieses fein abgestimmten und kaskadenartig verlaufenden Prozesses umfassen das Rollen, die feste Adhärenz und das Kriechen auf dem mikrovaskulären Endothel sowie die nachfolgende Migration durch die Schichten der Gefäßwand und im Interstitium hin zum Ort der Bestimmung (**Abb. 5**) [199] [200]. Ausgelöst wird der Prozess in der Regel durch die Aktivierung von (Immun-)Zellen, wie beispielsweise Makrophagen im Gewebe, welche über die Freisetzung verschiedener proinflammatorischer Faktoren (z. B. Zytokine und Chemokine) sekundär das Gefäßendothel der umliegenden Mikrozirkulation aktivieren. Als Reaktion darauf erhöht sich die Expression von Signal- und Adhäsionsmolekülen sowie die Menge an präsentierten Chemokinen auf der luminalen Seite des Endothels. Dies ermöglicht insbesondere in postkapillären Venolen eine Interaktion zirkulierender Leukozyten mit mikrovaskulären Endothelzellen. Dabei fangen Endothelzellen die Immunzellen durch lose Interaktionen von Selektinen auf ihrer luminalen Zellüberfläche mit niedrig-affinen Integrinen (z. B. *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1)) auf den Leukozyten ein und induzieren dadurch zunächst ihr Rollen entlang des Endothels. Für das Rollen sind hierbei insbesondere die Selektine L-Selektin/CD62L (primär auf Leukozyten) sowie P-Selektin/CD62P und E-

Selektin/CD62E (vorwiegend auf Endothelzellen) von großer Bedeutung. L-Selektin wird mit Ausnahme aktivierter lymphozytärer Gedächtniszellen konstitutiv auf allen Leukozyten exprimiert [201]. E-Selektin wird von Endothelzellen *de novo* synthetisiert, welche durch Entzündungsmediatoren wie TNF, IL-1 oder LPS aktiviert werden. P-Selektin wird in Weibel-Palade-Körperchen von Endothelzellen sowie in  $\alpha$ -Granula von Thrombozyten gespeichert und direkt nach Aktivierung dieser Zellen auf deren Oberfläche transloziert [202]. Der wichtigste Interaktionspartner aller drei Selektine stellt der von Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen exprimierte P-Selektin Glykoprotein Ligand 1 (PSGL-1) dar. Dies ermöglicht neben einer Leukozyten-Endothelzell-Interaktion auch eine Interaktion zwischen verschiedenen Leukozytenpopulationen [200] [203]. Bei diesem Prozess sind darüber hinaus die  $\beta$ 2-Integrine (z. B. Mac-1/CD11b und LFA-1/CD18) und  $\beta$ 1-Integrine (z. B. VLA-4/CD49d) der Leukozyten, welche mit endothelialen Molekülen interagieren können, essentiell [200]. Im Anschluss an das Rollen werden die Leukozyten durch verschiedene endothelial präsentierte Chemokine weiter aktiviert und ihre feste Adhärenz am Endothel eingeleitet. Dieses wird insbesondere durch die Interaktion leukozytärer Integrine (z.B. Mac-1/CD11b oder LFA-1/CD11a) mit endothelialen Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie (z.B. ICAM-1/CD54 oder VCAM-1/CD106) vermittelt. Hierbei interagiert ICAM-1 vorwiegend mit den leukozytären Integrinen LFA-1 und Mac-1, während VCAM-1 in erster Linie mit dem Integrin VLA-4 der Leukozyten interagiert [200] [203]. Durch die an diesem Prozess beteiligten Chemokine, welche von aktivierten Endothelzellen präsentiert werden, wird eine Affinitätsänderung der leukozytären Integrine induziert, wodurch sich die Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen intensiviert [130] [203]. Im Anschluss an die feste Adhärenz der Leukozyten am Endothel folgt das „Kriechen“ (Crawling) zum Ort der Transmigration. Dabei „kriechen“ die Leukozyten zu geeigneten Stellen am Endothel, durch welche sie ins paravaskuläre Gewebe transmigrieren können (Diapedese). Dieser Vorgang wird durch Mac-1 auf Leukozyten und seinem Liganden ICAM-1 auf Endothelzellen vermittelt [204]. Diese transendotheliale Migration kann entweder parazellulär zwischen benachbarten Endothelzellen hindurch oder transzellulär durch einen Endothelzellkörper erfolgen [205]. Der parazelluläre Transmigrationsweg verläuft mit etwa 90 Sekunden (s) sehr schnell und wird mit etwa 70-90 % durchschnittlich häufiger genutzt. Da Leukozyten bei

diesem Prozess interendotheliale Verbindungselemente, wie beispielsweise *tight junctions*, ebenso wie die Basalmembran durchbrechen müssen, werden unterschiedliche proteolytische Enzyme wie beispielsweise Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und Serinproteasen benötigt. Zudem sind bei dieser Form der Transmigration die Moleküle *platelet/endothelial-cell adhesion molecule 1* (PECAM-1), CD99, Mitglieder der *junctional adhesion molecules* (JAMs), *vascular-endothelial cadherin* (VE-Cadherin), *intercellular adhesion molecule-2* (ICAM-2) und *endothelial cell-selective adhesion molecule* (ESAM), von großer Bedeutung. Diese befinden sich auf der luminalen Seite der Endothelzellen und leiten die Leukozyten durch die parazellulären Räume hindurch [206]. Eine transzelluläre Migration findet vorzugsweise an Stellen statt, an welchen die Endothelzelle besonders dünn und der Transmigrationsweg somit verkürzt ist. Dabei verlassen Leukozyten das Blutgefäß durch das Zytoplasma von Endothelzellen. Bei diesem Prozess induziert die Bindung von LFA-1 an ICAM-1 in Endothelzellen die Bildung Mikro villi-artiger Fortsätze, welche den anheftenden Leukozyten umschließen [207]. Zusätzlich wurde an den Kontaktstellen eine Anreicherung der zytoplasmatischen Proteine Ezrin, Radixin und Moesin sowie der Zytoskelettproteine Actinin, Vinculin und *vasodilator-stimulated phosphoprotein* (VASP) beobachtet, welche auch bei der rezeptorvermittelten Phagozytose von großer Bedeutung sind [208] [209]. Es wird vermutet, dass die transzelluläre Diapedese über ähnliche Mechanismen wie die rezeptorvermittelte Phagozytose abläuft [210]. Diese Form der Transmigration benötigt jedoch mehrere Stunden und verläuft daher im Gegensatz zur parazellulären Migration wesentlich langsamer ab. Im Anschluss an den Durchtritt durch das Gefäßendothel sowie den weiteren Schichten des Gefäßes wie der Basalmembran und der Perizytenhülle folgt die interstitielle Migration der Leukozyten entweder gerichtet (Chemotaxis) oder ungerichtet (Chemokinese) hin zu ihrem Wirkungsort. Bei der chemotaktischen interstitiellen Migration erfolgt diese beispielsweise entlang eines IL-8-abhängigen Konzentrationsgradienten [199] [200] [203]. Darüber hinaus kann die Migration an Leitstrukturen gebunden sein, welche auf Zellen oder in der extrazellulären Matrix vorhanden sind. Dabei stellt die Haptotaxis eine gerichtete Bewegung dar, die aufgrund gebundener chemoaktiver Substanzen sowohl adhäsionsgebunden als auch - ungebunden sein kann. Die Haptokinese dagegen stellt eine ungerichtete Bewegung dar und verläuft entweder integrinabhängig über

Zelloberflächen, oder integrinunabhängig durch die von Strukturfasern gebildete räumliche Begrenzung im Gewebe [211].



**Abb. 5:** Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der Leukozytenrekruierungskaskade ins entzündete Gewebe.

### 3. Thrombozyten

Thrombozyten (Blutplättchen) sind kleine, kernlose Blutpartikel, welche aus Megakaryozyten durch Abschnürung von Zellkompartimenten im Knochenmark hervorgehen. Aus einem einzelnen murinen Megakaryozyt gehen bis zu seinem Zelluntergang zwischen 500 bis 1000 Thrombozyten hervor, wobei in der Maus pro Tag insgesamt etwa  $480 \times 10^6$  Thrombozyten gebildet werden. In der systemischen Zirkulation sind Thrombozyten in großer Anzahl vorhanden. Ihre Hauptfunktion stellt die primäre Hämostase (schnelle Thrombusbildung) dar, wobei sie sich als Reaktion auf eine Gefäßverletzung innerhalb weniger Sekunden an die geschädigte Gefäßwand anlagern und die Läsion versiegeln können. Darüber hinaus tragen sie zur Wundheilung bei und übernehmen wichtige Funktionen in der Entzündungsreaktion [212]. In neueren Untersuchungen hat sich ein wichtiges Zusammenspiel von Thrombozyten und Immunzellen herausgestellt, welche bei inflammatorischen Reaktionen von großer Relevanz ist [213] [214] [215]. Neutrophile Granulozyten suchen dabei das Endothel nach aktivierten

Thrombozyten ab, um daraufhin mit diesen durch eine Wechselwirkung von PSGL-1/CD162 auf der eigenen Zelloberfläche mit dem thrombozytären P-Selektin/CD62P zu interagieren [216]. Diese Interaktion ist bei pathologischen Prozessen wie beispielsweise der Entstehung eines akuten Lungenversagens von entscheidender Bedeutung [217]. Darüber hinaus können Immunzellen und Thrombozyten über eine CD40L und CD40-abhängige Interaktion weitere Immunzellen an den Ort einer Inflammation dirigieren und dadurch die Immunantwort verstärken [218] [219]. Auch starke Entzündungsreaktionen, wie beispielsweise eine systemische Entzündung hervorgerufen durch eine Endotoxämie oder Virämie können die mikrovaskuläre, thrombozyten-abhängige Thrombusbildung verstärken und dadurch eine Immunthrombose auslösen [220] [221].

Neuere Studien belegen zudem eine wichtige Funktion der Thrombozyten in der Krebsentstehung. Durch proinflammatorische Signale oder direkt durch Tumorzellen aktivierte Blutplättchen können durch Freisetzung ihrer Wachstumsfaktoren die Zytokinsekretion aus Leukozyten, Endothelzellen und Tumorzellen induzieren und dadurch sowohl die Immunabwehr im Sinne einer protumoralen Antwort modulieren als auch direkt zu Angiogenese, Tumorzellproliferation und Chemoresistenz beitragen [222] [214] [223]. Zudem können sie durch die Interaktion mit zirkulierenden Tumorzellen in der Blutzirkulation deren Adhäsion am Endothel einleiten und dadurch die Metastasierung fördern [224]. Neben diesen protumoralen Eigenschaften weisen Thrombozyten aber auch einige antitumorale Funktionen auf. So können sie durch Verbesserung der Antigenpräsentation dendritischer Zellen zytotoxische Mechanismen von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten unterstützen und dadurch zur Tumorzellelimination beitragen [214]. Zudem sind sie in der Lage, protumorale Eigenschaften von T<sub>H</sub>17-Zellen zu hemmen [225].

### 3.1. Thrombozytenrekrutierung

Die Thrombozytenrekrutierung wird klassischerweise in Folge einer endothelialen Schädigung zur Blutstillung eingeleitet. Sie stellt einen mehrstufigen und komplexen Prozess dar, bei welchem verschiedene Schritte aufeinanderfolgen und teilweise ineinander übergreifen [226]. Nach einer initialen Thrombozytenaktivierung werden diese in einer rollenden Bewegung von der verletzten Gefäßwand eingefangen und adhären innerhalb kürzester Zeit an der freigelegten subendothelialen Matrix. Eine lose Bindung erfolgt dabei zunächst über eine Interaktion des thrombozytären Glykoproteinrezeptor (GP) Ib-IX-V-Komplexes mit dem endothelialen von-Willebrand-Faktor (vWF), wodurch weitere endotheliale und thrombozytäre Integrine und Adhäsionsmoleküle aktiviert werden. Zu den wichtigsten thrombozytären Adhäsionsmolekülen, welche im Zellinneren der Thrombozyten in den sogenannten Alpha-Granula enthalten sind, gehören P-Selektin/CD62P, PECAM-1/CD31, GPIIb/IIIa (CD41/CD61), vWF, Vitronektin und Fibronektin. Diese sind neben der Anheftung an aktivierte Endothelzellen und die subendotheliale Matrix auch für interthrombozytäre Interaktionen von großer Bedeutung. Zudem ermöglicht die Expression von P-Selektin eine Interaktion der Thrombozyten mit Endothelzellen und Leukozyten, wie insbesondere neutrophile Granulozyten und Monozyten [214] [216] [227]. In Folge der Thrombozytenanheftung an die verletzte Gefäßwand wird in den Thrombozyten eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst, welche zur Degranulation verschiedenster thrombozytärer Mediatoren wie ADP, Thromboxan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>), Thrombin und Serotonin führt. [228]. Diese lösen wiederum eine Kaskade aus, welche neben einer festen Adhärenz der Thrombozyten am Endothel auch die Rekrutierung weiterer Thrombozyten aus der Zirkulation vermittelt. Neben den bereits genannten thrombozytären Mediatoren speichern Thrombozyten im Zellinneren auch Wachstumsfaktoren wie PDGF (platelet derived growth factor) und VEGF (vascular endothelial growth factor) sowie Lysosomen, welche Glykosidasen, Proteasen und Peptide mit bakterizider Wirkung enthalten. Eine Quervernetzung und Aggregation zahlreicher Thrombozyten untereinander erfolgt durch die Bindung von löslichem Fibrinogen aus dem Blutstrom an das aktivierte thrombozytäre Integrin GP-IIb/IIIa [229]. Erst durch eine thrombinvermittelte Spaltung von Fibrinogen in Fibrin kommt es zur Polymerisation einzelner Fibrinmoleküle. Dieser Vorgang, welcher im Rahmen der

humoralen Blutgerinnung stattfindet (sekundäre Hämostase), führt zur Ausbildung eines stabilen Aggregats aus Thrombozyten, Erythrozyten und Fibrin (Thrombus), welches das verletzte Gefäß abdichtet [230]. Durch den parallelen Ablauf der primären und sekundären Hämostase können diese sich gegenseitig ergänzen, sodass es zur Ausbildung eines stabilen Thrombus kommt und die Gefäßverletzung effizient abgedichtet werden kann [231] [232].

#### **4. Gefäßpermeabilität**

Die Gefäßpermeabilität beschreibt die Durchlässigkeit der Blutgefäße, insbesondere von Venolen und Kapillaren, für flüssige und feste Blutbestandteile. Die Integrität des Endothels spielt hierfür eine essentielle Rolle, da es eine physiologische Barriere zwischen der Blutzirkulation und dem umliegenden Gewebe darstellt und dadurch den Stoffaustausch selektiv reguliert [233] [234]. Im Rahmen von Entzündungsreaktionen sowie bei zahlreichen weiteren Pathologien kommt es zur Freisetzung verschiedenster proinflammatorischer Zytokine (z. B. IL-1, IL-6 oder TNF), Gewebshormonen (z. B. Histamin, Bradykinin oder Eicosanoide), Wachstumsfaktoren (z. B. VEGF) und Metaboliten (z. B. Sauerstoffradikale, Stickoxid), welche vielfältige Effekte auf das Gefäßsystem haben [235]. Dabei kommt es neben einer Aktivierung der humoralen und zellulären Immunabwehr einschließlich der Erhöhung der Expression von endothelialen Signal- und Adhäsionsmolekülen, auch zu einem verstärkten Blutfluss durch Vasodilatation sowie zur Aufhebung der Verbindung zwischen benachbarten Endothelzellen, wodurch die mikrovaskuläre Permeabilität erhöht wird. Neben einem verstärkten Flüssigkeits- und Plasmaproteineinstrom in den interstitiellen Raum mit nachfolgender Ödembildung wird auch die Leukozytenrekrutierung- und Infiltration gefördert und der Einstrom von Nährstoffen, Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren ins Gewebe erleichtert [234] [235]. Dadurch werden im Gewebe Prozesse, wie beispielsweise Immunreaktionen sowie Differenzierungs- und Wachstumsvorgänge, eingeleitet [233].

Da die mikrovaskuläre Permeabilität auch im Tumormikromilieu erhöht ist, haben die oben genannten Prozesse zugleich einen Einfluss auf die Tumorprogression.

Durch den verstärkten Einstrom von Sauerstoff und Nährstoffen sowie von tumorfördernden Wachstumsfaktoren (z. B. VEGFs) und Leukozyten (TAMs und TANs), oder immunsupprimierenden Faktoren (z. B. TGF- $\beta$ ) ins Tumorgewebe, wird die Bildung neuer Blutgefäße in den Tumor ebenso wie die Unterdrückung der Immunabwehr eingeleitet und dadurch das Tumorwachstum gefördert. Zudem begünstigt ein Verlust der Gefäßintegrität die Abschwemmung von Tumorzellen in den Blutstrom, wodurch diese in andere Körperregionen metastasieren [236].

## 5. Angiogenese

Die Angiogenese beschreibt die Neubildung von Blutgefäßen durch Sprossung von Kapillaren und geht im Gegensatz zur Vaskulogenese, der Gefäßneubildung während der Embryonalentwicklung, von bereits bestehenden Blutgefäßen aus [237] [238] [239]. Sie erfolgt durch Migration, Proliferation sowie dreidimensionaler Neuorganisation von Endothelzellen und wird durch eine Vielzahl pro- und anti-angiogener Faktoren gesteuert [240] [241]. Diese wesentlichen Schritte der angiogenen Kaskade beinhalten die Aktivierung und Ablösung der Endothelzellen von der Basalmembran durch enzymatischen Abbau der extrazellulären Matrix, die Migration der Endothelzellen zum Ort des angiogenen Stimulus mit anschließender Proliferation und Lumenbildung im neu entstandenen Zellspross sowie abschließender Stabilisierung und Reifung des Gefäßes [240] [237] [241]. Die pro-angiogenen Faktoren umfassen direkt und indirekt wirkende Faktoren. Direkt wirkende Angiogenesestimulatoren, wie insbesondere Mitglieder der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGFs) und Angiopoetine, wirken dabei direkt auf Endothelzellen, wohingegen Mitglieder der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF) weitere Zielzellen wie glatte Muskelzellen, Perizyten und Neuronen aktivieren [242] [243]. Indirekt wirkende Angiogenesestimulatoren entfalten ihre Wirkung, indem sie die Synthese und Sekretion direkt wirkender Angiogenesestimulatoren induzieren. Wichtige Vertreter dieser Gruppe sind TNF und TGF- $\beta$ . Sämtliche Angiogenesestimulatoren können von verschiedenen Gewebe- und Immunzellen gebildet werden, wobei Hypoxie und Hypoglykämie als Hauptauslöser gelten. Im gesunden Organismus ist jedoch ein Gleichgewicht zwischen pro- und anti-angiogenen Faktoren essentiell. Sobald eine ausreichende Blutversorgung durch die neugebildeten Gefäße gewährleistet ist, wird die VEGF-

Sekretion und damit die Gefäßneubildung durch physiologische, anti-angiogene Faktoren, wie etwa Angiostatin, Endostatin, Thrombospondin, IFN- $\alpha$  oder Plättchenfaktor-4, gehemmt [239] [244] [245].

Angiogenese findet unter physiologischen Bedingungen überwiegend in metabolisch aktiven Geweben statt. Dazu gehören insbesondere Plazenta und Milchdrüse während der Gravidität, Ovar und Uterus während des Zyklus und Haarfollikel in der aktiven Phase des Haarwachstums [246] [247] [248]. Unter pathophysiologischen Bedingungen ist sie insbesondere bei der Wundheilung von großer Bedeutung [244]. Eine pathologische Angiogenese tritt bei zahlreichen Erkrankungen, wie insbesondere chronisch entzündlichen Erkrankungen, beispielsweise bei Pathologien aus dem rheumatischen Formenkreis, oder bei benignen und malignen Neoplasien auf [249] [250] [251] [252].

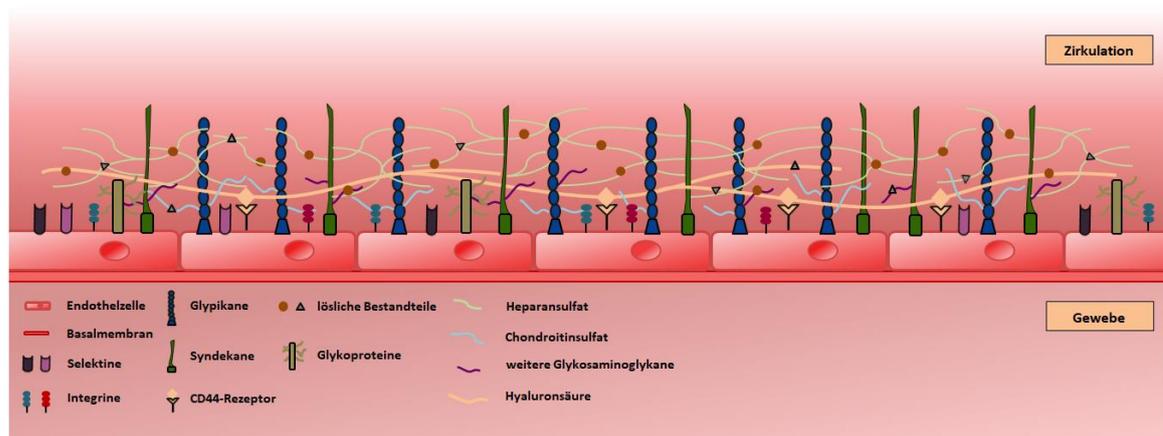
Die Tumorangiogenese bezeichnet die von Tumorzellen induzierte Neubildung tumorspezifischer Blutgefäße [249]. Da Tumorzellen eine hohe Proliferationsrate und damit einen erhöhten Sauerstoff- und Nährstoffbedarf aufweisen, ist eine ausreichende Versorgung durch Diffusion ab einem Durchmesser von etwa 2 Millimetern nicht mehr möglich [101]. Infolge einer Unterversorgung wird in Tumorzellen die Expression pro-angiogenetischer Faktoren ausgelöst [253]. Durch die Freisetzung von z.B. VEGF und MMP-9 sowie durch die Rekrutierung von Makrophagen und Thrombozyten, welche weitere pro-angiogenetische Faktoren freisetzen, entsteht im Tumor ein eigenes spezifisches Blutgefäßsystem [133] [182] [254] [255] [256]. Dieses weist im Gegensatz zu physiologisch gebildeten Gefäßen einige Besonderheiten auf. Neben einer unregelmäßigen Struktur, einem diskontinuierlichen Endothel und einer damit verbundenen erhöhten Permeabilität sowie zahlreichen Anastomosen, reifen die neugebildeten Tumorgefäße häufig nicht vollständig aus [257]. Zudem wurde in einigen Tumorarten, wie beispielsweise auch im Mammakarzinom, eine „vaskuläre Mimikry“ beobachtet, wobei nicht-endotheliale Zellen die Funktion von Endothelzellen übernehmen und sich dabei an der Blutgefäßbildung beteiligen [252]. Diese sogenannten „Mosaikgefäße“, welche vorwiegend aus Tumorzellen bestehen, begünstigen die hämatogene Ausbreitung des Tumors durch die Abschwemmung von Tumorzellen in die systemische Zirkulation.

## 6. Die Glykokalix

Die Glykokalix ist eine protein- und kohlenhydratreiche Schicht, welche die Oberfläche von allen (gesunden) Körperzellen bedeckt. Sie bildet ein poröses Netzwerk, welches im Wesentlichen aus verschiedenen transmembranösen und membrangebundenen Molekülen besteht, zu deren Hauptvertretern Glykosaminoglykane, Glykoproteine und Proteoglykane gehören. Sowohl die genaue Zusammensetzung als auch die Ausdehnung und Funktion der Glykokalix unterscheidet sich zwischen unterschiedlichen Zellarten [258] [259]. Obwohl diese Schicht auf verschiedensten Zellen nachgewiesen und analysiert wurde, standen bislang vor allem Endothelzellen, aber auch verschiedene Krebszellen im wissenschaftlichen Fokus [260] [261] [262] [263].

### 6.1. Aufbau

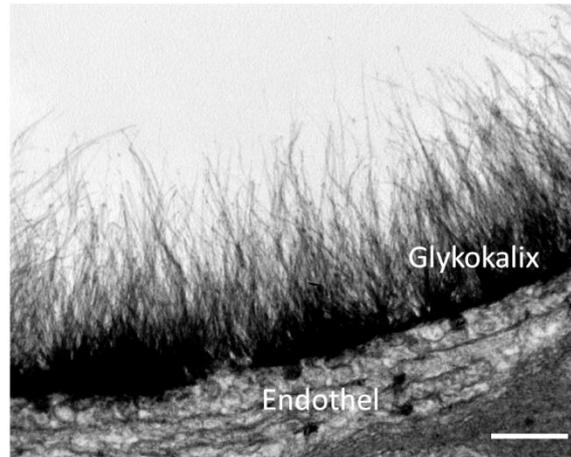
Die Glykokalix auf Endothelzellen („endotheliale Glykokalix“) bildet als innerste Schicht der Gefäßwand eine Barriere gegenüber Einflüssen aus der Zirkulation. Sie besteht aus einem Netzwerk von membrangebundenen Molekülen, in welches zahlreiche lösliche endotheliale oder plasmatische Bestandteile eingelagert sind (**Abb. 6**) [261].



**Abb. 6: Schematische Darstellung der endothelialen Glykokalix.**

Ihre Ausdehnung in das Gefäßlumen hinein variiert in Abhängigkeit vom Gefäßstyp und -durchmesser sowie den Umgebungseinflüssen zwischen 0,5  $\mu\text{m}$  in Muskelkapillaren (**Abb. 7**), 2 bis 3  $\mu\text{m}$  in Arteriolen und 4,5  $\mu\text{m}$  in großen Arterien bei Mäusen [264] [261]. Dabei besteht unter physiologischen Bedingungen ein

dynamisches Gleichgewicht zwischen Synthese und enzymatischem oder schubspannungsvermitteltem Abbau der einzelnen Glykokalixkomponenten [265] [260].



**Abb. 7: Elektronenmikroskopische Darstellung der koronaren Kapillare einer Ziege** (Anfärbung mit Alician blue; Maßstab 0,2 µm) modifiziert nach [441]. Mit freundlicher Genehmigung der Cambridge University Press und Herrn Bernard van den Berg, PhD.

Die Hauptbestandteile der endothelialen Glykokalix sind Proteoglykane und Glykoproteine [267]. Proteoglykane bilden als lange unverzweigte Seitenketten das Grundgerüst und bestehen aus einem Kernprotein, an welches über eine kovalente Bindung eine oder mehrere negativ geladene Glykosaminoglykanketten gebunden sind. Zu den wichtigsten Proteoglykanen gehören die Glypikane und Syndekane. Die unterschiedlichen Glykosaminoglykanarten umfassen das Heparan-, Chondroitin-, Dermatan- und Keratansulfat [261]. Im Gefäßsystem repräsentiert Heparansulfat, welches sich vorwiegend in den oberen, luminalen Anteilen der Glykokalix befindet, mit 50-90 % die größte Gruppe der Glykosaminoglykane [268] [269]. Ein weiteres wichtiges Glykosaminoglykan ist Hyaluronsäure, welches im Gegensatz zu den anderen Glykosaminoglykanen keine negative Ladung besitzt und deshalb nicht über eine kovalente Bindung an Proteine binden kann. Stattdessen ist es über den CD44-Rezeptor in die Glykokalix integriert [270]. Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat befinden sich im Gegensatz zu Heparansulfat überwiegend in der lumenfernen Zone der Glykokalix. Da die Glykosaminoglykanketten sowohl strukturelle Unterschiede als auch eine Vielzahl spezifischer Bindungen für Plasmaproteine aufweisen, führen

bereits kleine Veränderungen in der Kettenzusammensetzung zu großen funktionellen Unterschieden [261].

Im Gegensatz zu Proteoglykanen sind endotheliale Glykoproteine durch kurze, verzweigte Kohlenhydratseitenketten charakterisiert. Eine Vielzahl der Glykoproteine wird hierbei von Sialinsäuren bedeckt. Durch das Vorhandensein von mehr als 20 verschiedenen Sialyltransferasen, welche an der Biosynthese von sialylierten Glykoproteinen und Glykolipiden beteiligt sind, tragen Sialinsäuren sowohl zur Konformation als auch zu einer hohen Biodiversität von Glykoproteinen- und lipiden bei [271] [272]. Die wichtigste Sialinsäure der endothelialen Glykokalix ist die negativ geladene N-Acetylneuraminsäure [272]. Wichtige Vertreter der Glykoproteine sind neben Zelladhäsionsmolekülen (Selektine, Integrine und Immunglobuline) auch Bestandteile des Blutgerinnungs- und Fibrinolysesystems (z. B. vWF) [261] [265]. Dadurch verfügen sie über Bindungsstellen für Leukozyten, Wachstumsfaktoren (VGEF, FGF), den von-Willebrand-Faktor, gerinnungshemmende Mediatoren (Antithrombin III, Tissue-factor-pathway-inhibitor (TFPI), Thrombomodulin, Heparin Cofaktor II) und Bestandteile des Fibrinolysesystems (Plasminogen, gewebsspezifischer Plasminogenaktivator (*tissue plasminogen activator*, tPA), *urokinase-type plasminogen activator* (uPA)) [273]. Darüber hinaus bindet sie Enzyme, wie beispielsweise die extrazelluläre Superoxiddismutase, wodurch sie endothelschädigende Sauerstoffradiale inaktivieren kann [274] [275].

In das Netzwerk aus Proteoglykanen und Glykoproteinen sind zudem verschiedene lösliche, plasmatische oder endotheliale Bestandteile, wie beispielweise Albumin, Orosomucoid, Wachstumsfaktoren, Zytokine oder extrazelluläre Matrixbestandteile integriert [261].

## 6.2. Physiologische Funktionen

Als Barriere zwischen Gefäßlumen und Interstitium reguliert die endotheliale Glykokalix zusammen mit Endothelzellen und der darunterliegenden Basallamina einige wichtige physiologische Funktionen wie die Gefäßpermeabilität, die Mechanotransduktion sowie die Interaktion von Blutbestandteilen und -zellen mit der Gefäßwand [276] [277] [278] [279]. Darüber hinaus trägt sie durch die Synthese von Stickoxid (NO) zur Regulation des Gefäßtonus und damit auch des

Blutflusses bei. Eine intakte Glykokalix ist damit für den Erhalt der Gefäßintegrität essentiell [261] [258, 267] [280].

Durch ihren maschenförmigen Aufbau und die negative Ladung wirkt sie als molekulares Sieb, wobei sie semipermeabel für kleine Moleküle wie etwa Albumin ist, jedoch größere Blutbestandteile, wie Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten sowie negativ geladene und größere Moleküle ab etwa 70 kDa, abstößt [281]. Durch den Aufbau eines onkotischen Gradienten wirkt sie der Plasmaextravasation ins Gewebe entgegen und ist somit maßgeblich an der Regulation der Permeabilität beteiligt [282] [283] [284]. Dabei sind insbesondere negativ geladene Glykosaminoglykane wie Chondroitinsulfat und Heparansulfat von Bedeutung, wobei Heparansulfat auch maßgeblich zur Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität beiträgt.

Mit einer Ausdehnung von bis zu mehreren Mikrometern überragt sie die endothelialen Adhäsionsmoleküle, welche eine maximale Länge von ungefähr 90 Nanometern (nm; P-Selektin/CD62P) aufweisen [285]. Dadurch beeinflusst ihr Status sowohl Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen als auch die Blutgerinnung und Fibrinolyse [286] [287]. Die Fähigkeit gerinnungshemmende Mediatoren und Bestandteile des fibrinolytischen Systems zu binden, präsentieren und aktivieren zu können, schützt zudem vor einer inadäquaten Blutgerinnung bzw. Thrombusbildung [288]. Eine weitere Funktion der endothelialen Glykokalix besteht in der Regulation der Mechanotransduktion [289] [285]. So führen enzymatisch- oder scherflussbedingte Strukturveränderungen der endothelialen Glykokalix beispielsweise zur Freisetzung des vasoaktiven Stickoxids, wodurch Gefäße dilatieren und die Durchblutung zunimmt. Dieser Mechanismus besitzt jedoch auch einen vasoprotektiven Effekt, da sich der Strömungswiderstand infolge der Gefäßerweiterung reduziert [274] [288] [290].

### 6.3. Bedeutung unter pathophysiologischen Bedingungen

Als feines Netzwerk auf der Gefäßinnenseite ist die endotheliale Glykokalix empfindlich gegenüber Einflüssen aus der Umgebung. Insbesondere pathophysiologische Vorgänge in der Zirkulation verursachen eine Degradation der Glykokalix („Shedding“), wobei es zum Verlust ihrer gefäßprotektiven, anti-inflammatorischen und anti-koagulatorischen Eigenschaften kommt, was wiederum Auswirkungen auf den gesamten Organismus hat [274] [291]. Eine

zentrale Rolle spielen hierbei entzündlich assoziierte Erkrankungen des Gefäßsystems, wie beispielsweise Ischämie/Reperfusion, Hypertension, Hyperglykämie, Atherosklerose oder (systemische) Infektionen [292] [293] [294]. Diese können sowohl einen direkt schädigenden Effekt auf die Glykokalix ausüben als auch indirekt ihre Struktur beeinflussen, indem sie protektive Moleküle inaktivieren oder andere schädigende Mechanismen aktivieren [292]. Prinzipielle schädigende Faktoren sind oxidativer Stress, verursacht durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Stickoxide, sowie proinflammatorische Zytokine und andere körpereigene oder pathogene Entzündungsmediatoren (z. B. TNF, Lipopolysaccharide), aber auch MMPs sowie die Glykokalix-degradierenden Enzyme Heparanase, Hyaluronidase und Sialidasen. Jedoch können auch hämodynamische Veränderungen wie arterielle Hypertonie, ein hoher Strömungswiderstand oder Hypervolämie zum Abbau der endothelialen Glykokalix beitragen [295]. Die hierbei in den Blutstrom freigesetzten Glykokalixkomponenten (z. B. Heparansulfat, Hyaluronsäure, Syndecan-1 und Sialinsäuren) können als Biomarker sowohl in der Diagnostik als auch für die Prognose für verschiedene inflammatorische oder allgemein Gefäß-assoziiertes Erkrankungen herangezogen werden [296] [271] [297] [298] [294] [299]. In diesem Zusammenhang konnte beispielsweise bei Atherosklerose, Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie und sämtlichen damit einhergehenden Erkrankungen, beobachtet werden, dass diese oftmals im direkten Zusammenhang mit einer geschädigten Glykokalix standen [300] [292] [280] [296] [292] [301]. Darüber hinaus wurde eine quantitative Bestimmung der Glykokalixbestandteile Heparansulfat und Syndecan-1 im Blutplasma von gefäßchirurgischen Patienten mit globaler oder regionaler Ischämie und anschließender Reperfusion als Marker für das Ausmaß des operativ verursachten Gefäßschadens eingesetzt. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass auch die Dauer des intraoperativen Gefäßverschlusses mit der Konzentration der einzelnen Glykokalixkomponenten korrelierte [282] [302]. Im Bezug darauf konnte im Tiermodell nachgewiesen werden, dass durch die externe Zufuhr von Hydrokortison während ischämischen Zuständen mit konsekutiver Reperfusion die Protektion der Glykokalix das Ausmaß des Gefäßschadens abgeschwächt [303]. Ebenso konnte bei Patienten mit Diabetes mellitus durch die orale Applikation von Glykosaminoglykanbestandteilen, bestehend aus Heparan- und Dermatansulfat, bereits nach einer achtwöchigen Einnahme eine

erneute Zunahme der zuvor verminderten Dicke der Glykokalixdimension nachgewiesen werden, wodurch eine Reduktion der transkapillären Albuminpassage sowie eine Abnahme des Hyaluronsäure-katabolismus erzielt werden konnten [304].

Prinzipiell führt ein lokaler oder generalisierter Verlust der endothelialen Glykokalix letztendlich zur endothelialen Dysfunktion mit Hyperpermeabilität und nachfolgender Ödembildung im Parenchym sowie zur verstärkten Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten und Thrombozyten, welche ihrerseits entweder direkt durch die Freisetzung Glykokalix-degradierender Substanzen oder indirekt durch Aktivierung schädigender Mechanismen den Gefäßschaden zusätzlich verstärken können [300] [296] [305] [306].

Daraus ergibt sich sowohl aus der Protektion als auch aus der Wiederherstellung der endothelialen Glykokalix ein potentiell vielversprechender Ansatz in der Therapie von chronischen Erkrankungen mit vaskulärer Dysfunktion [301] [307].

#### 6.4. Bedeutung der Glykokalix bei Tumorerkrankungen und ihr Potenzial für neuartige Therapieformen

Maligne Tumorerkrankungen gehen bereits in frühen Stadien mit einer systemischen Entzündungsreaktion einher [308]. Bereits bekannt ist, dass inflammatorische Prozesse im Gefäßsystem die endotheliale Glykokalix schädigen. In verschiedenen Studien zu Tumorerkrankungen konnte nachgewiesen werden, dass zirkulierende Tumorzellen einerseits die Blutströmung verändern und andererseits auch Faktoren (z. B. VEGF) und Proteasen (z. B. Heparanase, Hyaluronidase) freisetzen, welche zum Abbau der Glykokalix beitragen [309] [310] [311] [312]. Eine geschädigte endotheliale Glykokalix trägt dabei einerseits zum Verlust der Gefäßwandintegrität und dadurch zur Erhöhung der Gefäßpermeabilität bei, wodurch einerseits die Tumorzelladhäsion - und migration erleichtert wird und andererseits Mediatoren, wie Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren welche von Tumorzellen sezerniert werden, an die endothelialen Rezeptoren binden und dadurch sowohl die Leukozyten- und Thrombozytenrekrutierung modulieren als auch die

Angiogenese und somit letztendlich ihr eigenes Wachstum fördern [236]. Die hohe Heparanaseexpression- und Aktivität bei Tumorzellen kann als Marker in der Tumordiagnostik eingesetzt werden. Eine hohe Heparansulfat-konzentrationen im Serum von Krebspatienten ist dabei sehr häufig mit einer schlechten Prognose assoziiert [312] [313]. Zudem korreliert in der Tumorbilogie eine hohe Heparanaseaktivität direkt mit einer hohen Tumorzellproliferation, Invasion und Metastasierung. Darüber hinaus trägt eine hohe Heparanaseaktivität auch zur Förderung der Tumorangiogenese und damit zur erhöhten Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr ins Tumorbett bei, wodurch das Tumorwachstum verstärkt wird [314] [315]. Weiterhin konnte in einer experimentellen Studien beispielsweise nachgewiesen werden, dass durch die Protektion der endothelialen Glykokalix mit dem Plasmaglykoprotein Orosomucoid nicht nur die mikrovaskuläre Permeabilität, sondern auch die Tumorzelladhäsion am Endothel reduziert werden konnte [304].

Die Glykokalix auf Tumorzellen weist sowohl strukturelle als auch funktionelle Unterschiede gegenüber der endothelialen Glykokalix auf. Im Gegensatz zur endothelialen Glykokalix, welche gegenüber äußeren Einflüssen sehr empfindlich ist, bildet die Tumorzellglykokalix durch eine Überexpression von Heparansulfat, Hyaluron und Glykoproteinen eine sehr robuste und stabile Schicht. Als Schutzbarriere macht sie Tumorzellen nicht nur unempfindlicher gegenüber der Immunabwehr und Chemotherapeutika, sondern trägt auch maßgeblich zur Tumorprogression und Metastasierung bei [316] [317] [262] [318] [309]. Dabei ermöglicht ihre einzigartige Syndekanexpression ebenso wie eine veränderte Glykosylierung tumorzellspezifischer Glykosaminoglykane eine Vielzahl molekularbiologischer Mechanismen, welche die Tumorprogression fördern [262]. Darüber hinaus können Tumorzellen durch die Expression unterschiedlicher Integrine (z. B.  $\alpha 6 \beta 4$ -Integrin,  $\alpha V / \beta 3$ -Integrin, Mucin-1), Selektine (z. B. E-Selektin-Liganden) und weiteren Adhäsionsmolekülen (z. B. CD44-Rezeptor) sowohl indirekt über die Bindung an Leukozyten und Thrombozyten als auch über die direkte Adhäsion an Hyaluronsäure der extrazellulären Matrix des Endothels ins Gewebe einwandern [318] [262]. Zudem vermitteln tumorspezifische Syndekane sowie der CD44-Rezeptor neben der Tumorzellmigration verschiedene Signalkaskaden, welche die Tumorzell-proliferation- und angiogenese stimulieren [309] [262, 319] [320].

Trotz großer Fortschritte in der Diagnostik und Therapie bleibt die Bedeutung von malignen Tumoren aufgrund der weltweiten Zunahme an Neuerkrankungen und der weiterhin hohen Mortalitätsraten sehr groß. Da etablierte Therapieformen eine unzureichende Wirkung hinsichtlich der Heilung von Krebserkrankungen aufweisen und oftmals mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden sind, ist die Entwicklung neuartiger Krebstherapeutika und Behandlungsformen ein wichtiges Ziel der medizinischen Forschung. In diesem Zusammenhang nimmt die Krebsimmuntherapie einen zunehmenden Stellenwert ein, da sie spezifisch in die Entstehungs- oder Bekämpfungsmechanismen von Tumorzellen durch körpereigene Mechanismen eingreift und somit nicht nur effektiver, sondern gleichzeitig auch potentiell nebenwirkungsärmer sein kann [321]. Um gezielt in die Tumorentstehung und -progression eingreifen zu können, ist jedoch ein genaues Verständnis der einzelnen Prozesse entscheidend.

In vorangegangenen Studien wurde bereits gezeigt, dass neben der Glykokalix auch unterschiedliche Leukozytensubpopulationen und Thrombozyten eine wichtige Bedeutung in der Tumorentstehung- und progression besitzen. Hierbei können Tumorzellen Leukozyten und Thrombozyten durch die Sekretion unterschiedlichster Zytokine und Chemokine wie beispielsweise IL-8, TGF- $\beta$ , dem *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) CCL-2 und den unterschiedlichen Chemokin (C-X-C Motiv) Liganden CXCL1, CXCL2 und CXCL5 ins Tumorstroma rekrutieren [132, 136, 322]. Die im Tumor akkumulierten Leukozyten können sich anschließend unter Einflüssen des Tumormikromilieus (z. B. TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-13) in Phänotypen mit pro-tumoralen Funktionen differenzieren. Dabei können diese pathophysiologische Prozesse sowohl direkt über die Sekretion von Wachstumsfaktoren (z. B. VEGF sowie und dem *epidermal growth factor* (EGF)) und Endothel- und Glykokalix-schädigenden MMPs (z. B. MMP-9), als auch indirekt durch die Sekretion immunsuppressiver Faktoren (z. B. TGF- $\beta$ , IL-10), welche die Aktivität anderer Leukozyten unterdrücken, die Tumorprogression durch eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität und der Stimulation der Angiogenese fördern [322]. Die dabei neugebildeten Blutgefäße im Tumorgewebe ermöglichen sowohl den verstärkten Einstrom von Sauerstoff und Nährstoffen in den Tumor, als auch die Infiltration weiterer tumorfördernder Wachstumsfaktoren (z. B.

VEGFs) und Leukozyten (TAMs und TANs), oder immunsupprimierenden Faktoren (z. B. TGF- $\beta$ ), welche wiederum die Bildung neuer Blutgefäße in den Tumor und die Unterdrückung der Immunabwehr verstärken [235] [253]. Darüber hinaus begünstigt ein Verlust der Gefäßintegrität beispielsweise durch einen Verlust der endothelialen Glykokalix die Abschwemmung von Tumorzellen in den Blutstrom, wodurch diese in andere Körperregionen metastasieren können [323].

Die genaue Bedeutung der Glykokalix im Mikrogefäßsystem maligner Tumore für das Wachstum, die Angiogenese, die Permeabilität und die Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten ebenso wie die Regulation ihrer Interaktion mit Endothelzellen, ist bislang jedoch nicht geklärt. Ein besseres Verständnis hierüber könnte zur Entwicklung neuartiger Strategien in der Krebstherapie beitragen, welche durch pharmakologische Modulation von Umbauprozessen der Glykokalix in malignen Tumoren hinsichtlich der anti-tumoralen Effekte wirksamer und gleichzeitig nebenwirkungsärmer als die aktuellen Therapieformen sein könnten. Zudem könnten derartige Erkenntnisse bereits der Tumorprogression im Frühstadium entgegenwirken und die Rezidivrate nach erfolgreicher Therapie reduzieren.

## **II. ZIELSETZUNG**

Als Ziel dieser Studie sollte die Bedeutung der Glykokalix für die Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten, die Permeabilität, Angiogenese und das Tumorwachstum im Mammakarzinom der Maus untersucht und charakterisiert werden.

### III. MATERIAL UND METHODEN

#### 1. Vorbemerkungen

Das vorliegende Tierversuchsvorhaben wurde mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern (ROB-55.2-2532.Vet\_02-20-156) gemäß § 7 des Deutschen Tierschutzgesetzes (Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 101 des Gesetzes vom 20. November 2019 (BGBl. I S. 1626) geändert worden ist am Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

#### 2. Material

##### 2.1. Reagenzien

##### 2.1.1. Antikörper

<u>Primärantikörper</u>	<u>Klon</u>	<u>Spezies/Isotyp</u>	<u>Fluorochrom</u>	<u>Hersteller</u>
<b>anti - Maus CD45</b>	30-F11	Ratte/IgG2a, <i>kappa</i>	Alexa Fluor 488	BioLegend
<b>anti - Maus Ly-6G/Ly-6C (Gr-1)</b>	RB-68C5	Ratte/IgG2a, <i>kappa</i>	Alexa Fluor 488	BioLegend
<b>anti - Maus CD115</b>	CSF-1R	Ratte/IgG2a, <i>kappa</i>	Alexa Fluor 594	BioLegend
<b>anti - Maus CD3</b>	17A2	Ratte/IgG2b, <i>kappa</i>	Brilliant Violet 421	BioLegend
<b>anti - Maus CD4</b>	RM4-5	Ratte/IgG2a, <i>kappa</i>	Alexa Fluor 488	BioLegend
<b>anti - Maus CD8a</b>	53-6.7	Ratte/IgG2a, <i>kappa</i>	Alexa Fluor 594	BioLegend
<b>anti - Maus CD19</b>	6D5	Ratte/IgG2a, <i>kappa</i>	Alexa Fluor 647	BioLegend
<b>anti - Maus GPIIb<math>\beta</math></b>	-	Ratte/IgG	DyLight649	Emfret Analytics

Tabelle 1: Monoklonale Antikörper (mAK) zur Differenzierung unterschiedlicher Leukozytensubpopulationen und Thrombozyten.

<u>Primärantikörper</u>	<u>Klon</u>	<u>Spezies/Isotyp</u>	<u>Hersteller</u>
<b>anti - Maus Ly6G</b>	1A8	Ratte/IgG2a, <i>kappa</i>	BioXcell
<b>anti - Maus CCR2</b>	MC21	Ratte/IgG2b	Prof. Matthias Mack (Universitätsklinikum Regensburg)
<b>anti - Maus GPIIb/CD42b</b>	Xia.B2	Ratte/IgG2a	Emfret Analytics

Tabelle 2: Antikörper zur spezifischen Depletion von Leukozytensubpopulationen.

## 2.1.2. Enzyme

<u>Enzym</u>	<u>Ursprung</u>	<u>Hersteller</u>
<b>Heparinase III</b>	Flavobacterium heparinum	Amsbio
<b>Hyaluronidase</b>	Streptomyces hyaluronolyticus nov. sp.	Sigma-Aldrich
<b>Neuraminidase</b>	Clostridium perfringens (C. welchii)	Sigma-Aldrich

Tabelle 3: Enzyme zur spezifischen Degradation von relevanten Glykokalixbestandteilen.

## 2.1.3. Inhibitor

<u>Heparanase-Inhibitor</u>	<u>Chemische Bezeichnung</u>	<u>Wirkung</u>	<u>Hersteller</u>
<b>OGT 2115</b>	2-[4-[[3-(4-Bromophenyl)-1-oxo-2-propenyl]amino]-3-fluorophenyl]-5-benzoxazoleacetic acid	Inhibition der Expression und Aktivität der Heparanase  anti-angiogenetisch	Tocris

Tabelle 4: Pharmakologischer Heparanaseinhibitor

### 2.1.4. Lektin

<u>Substanz</u>	<u>Fluorochrom</u>	<u>Zielstruktur</u>	<u>Hersteller</u>
<b>Weizenkeim-Agglutinin (WGA)</b>	Alexa Flour 488	Sialinsäuren N-Acetylglucosamine	Invitrogen

Tabelle 5: Weizenkeim-Agglutinin zur Visualisierung der Glykokalix

### 2.1.5. Dextrane

<u>Substanz</u>	<u>Fluorochrom</u>	<u>Molekulargewicht</u>	<u>Hersteller</u>
<b>Dextransulfat-Natriumsalz</b>	FITC	500.000 Dalton	Sigma-Aldrich
<b>Dextransulfat-Natriumsalz</b>	FITC	2.000.000 Dalton	Sigma-Aldrich

Tabelle 6: Dextran-Moleküle zur Analyse der Gefäßpermeabilität und Angiogenese

## 2.2. Zelllinie

Zur Induktion eines lokal wachsenden Tumors wurden Zellen des murinen Mammakarzinoms 4T1 verwendet. Diese Zelllinie stammt ursprünglich aus dem Brustdrüsengewebe von Balb/c Mäusen und entspricht dem Stadium IV des humanen Mammakarzinoms.

Die Zellen wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Kirsten Lauber (Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, LMU München, München, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Kultiviert wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen in RPMI 1640-Medium (Thermo fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), versetzt mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS) (Biochrom, Berlin, Deutschland) und 1 % HEPES (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) bei 37 Grad Celsius (°C) und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank.

### 3. Methoden

#### 3.1. Intravitalmikroskopie (IVM)

Die Maus eignet sich aufgrund ihrer geringen Größe und der dadurch bedingten guten Handhabbarkeit sehr gut als Versuchstier für intravitalmikroskopische Analysen. Die Intravitalmikroskopie umfasst eine Vielzahl mikroskopischer Untersuchungstechniken im lebenden Organismus. Dabei ist es möglich, komplexe physiologische oder pathophysiologische Prozesse und Strukturen auf zellulärer (und teilweise molekularer) Ebene in Echtzeit zu visualisieren und zu analysieren. Diese Untersuchungsmethoden werden eingesetzt, wenn eine Fragestellung durch die Analyse von fixiertem bzw. avitalem Gewebe nicht beantwortet werden kann.

##### 3.1.1. Epifluoreszenzmikroskopie

Die Epifluoreszenzmikroskopie ist eine spezielle Variante der Lichtmikroskopie. Sie beruht auf dem physikalischen Prinzip der Fluoreszenz, wobei fluoreszierende Moleküle (Fluorochrome) mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden und nach dessen partieller Absorption Licht mit einer längeren Wellenlänge emittieren. Die Fluoreszenzanregung erfolgt hierbei durch ein einzelnes Photon. Durch die Verwendung von passenden optischen Filtern können das Anregungs- und Emissionslicht im selben Strahlengang optisch getrennt werden, sodass letztendlich nur der emittierte Lichtanteil des verwendeten Fluorochroms sichtbar wird. Als Lichtquelle wird beispielsweise ein Laser oder eine LED verwendet, wobei das untersuchte Objekt über das Objektiv beleuchtet wird. Mit dieser Form der Mikroskopie können Eindringtiefen bis zu 50 Mikrometer ( $\mu\text{m}$ ) erreicht werden. Durch die Verwendung von Fluorochrom-konjugierten Substanzen, welche an spezifische Strukturen binden, können diese mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes sichtbar gemacht werden [324] [325].

Für *In-vivo*-Analysen der mikrovaskulären Permeabilität sowie der Leukozyten- und Thrombozytenrekrutierung im heterotopen Tumormodell der Ohrmuschel (siehe (s.) Kapitel (Kap.) III/3.3.3. und 3.3.4.) wurde ein AxioTech-Vario 100 Mikroskop (Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) eingesetzt,

welches mit einer Colibri 2 LED Lichtquelle (Zeiss MicroImaging GmbH) ausgestattet war. Alle Aufnahmen wurden mit einer AxioCam MRm Digitalkamera sowie einem QUAD Filterset (QUADDAPI/FITC/Cy3/Cy5 sbx HC filter set; AHF Analysetechnik AG) und einer 10- bzw. 20-fachen Wasserimmersions-Linse (0.5 NA (Numerische Aperatur), Zeiss MicroImaging GmbH) aufgenommen. Die Aufnahmen wurden anschließend mit der Axio Vision 4.6 Software (Zeiss MicroImaging GmbH) verarbeitet und daraufhin mit der Bildbearbeitungssoftware Fiji/Imagej [326] analysiert.

### 3.1.2. 2-Photonen-Mikroskopie

Die 2-Photonen-Mikroskopie ist eine Weiterentwicklung der klassischen Fluoreszenzmikroskopie und basiert grundsätzlich auf demselben Funktionsprinzip [327]. Die Besonderheit hierbei ist, dass durch den Einsatz eines gepulsten Infrarot-Lasers (680-1040 nm) sehr hohe Photonendichten erreicht werden, wodurch das Elektron eines Fluorochroms nicht durch die Energie eines einzelnen Photons angeregt wird, sondern durch die gleichzeitige Absorption zweier, energieärmerer Photonen und anschließend ein Photon mit einer höheren Energie emittiert (ungefähr der Hälfte der Wellenlängen der beiden anregenden Photonen) [328]. Dadurch sinkt einerseits die Phototoxizität für das Gewebe, andererseits bewirkt die hohe Photonendichte im Fokuspunkt nur dort eine Anregung des Fluorochroms, wodurch die Streustrahlung reduziert und ein Ausbleichen von umliegenden Bereichen reduziert wird [329]. Darüber hinaus ermöglicht die gezielte Anregung im Fokuspunkt eine Generierung von Schnittbildern und dadurch sekundär eine dreidimensionale (3D) *In-vivo*-Visualisierung unterschiedlicher Gewebe mit hoher Auflösung und hohem Kontrast über einen Zeitraum von bis zu mehreren Stunden [330].

Im Vergleich zur klassischen Fluoreszenzmikroskopie wird Licht mit höherer Wellenlänge genutzt, wodurch Eindringtiefen von bis zu 1000  $\mu\text{m}$  im Gewebe erreicht werden können, welche mit anderen bildgebenden Verfahren nicht möglich sind [331]. Weiterhin können durch die Erzeugung eines *second harmonic signals* geordnete oder symmetrische Strukturproteine – wie beispielsweise Kollagenfasern – dargestellt werden. Dabei wird durch den Einsatz von Lasern mit hohen Intensitäten die Energie von zwei Photonen in ein einzelnes Photon

umgewandelt, wodurch sich die Frequenz des eingestrahnten Lichts verdoppelt und die Wellenlänge somit halbiert [332].

In dieser Arbeit wurde für *In-vivo*-Analysen der endothelialen Glykokalix und der Angiogenese im heteroptopen Tumormodell der Ohrmuschel ein TriMScope Multiphotonen-Mikroskop (LaVisionBiotech, Bielefeld, Deutschland) verwendet. Dieses war mit einem Titan-Saphir (Ti:Sa) Laser (Chameleon Ultra Laser, Model: Verdi, Santa Clara, Kalifornien, USA) ausgestattet, welcher ein Wellenlängenspektrum von 690 - 1080 nm abdeckt. Die Aufnahmen wurden mit einem 20-fachen Wasserimmersions-Objektiv (0.95 NA, Olympus) aufgenommen, wodurch eine hohe Eindringtiefe bei gleichzeitig hoher Numerischer Aperatur (NA) und hoher Auflösung möglich war. Mit Hilfe einer speziellen Software (Inspector, LaVision Biotech, Bielefeld, Deutschland) wurden der Scanbereich, die Eindringtiefe, die Laserstärke, die Frequenz und die Wellenlänge eingestellt. Bei einer Anregungswellenlänge von 800 nm wurden 100 x 100 µm bzw. 500 x 500 µm große Bildausschnitte mit einer Pixelzahl von 966 x 966 bzw. 517 x 517 ausgewählt. Zur Darstellung von Gewebestrukturen wurde das Second Harmonic Signal (Kanal: 447/60 nm) detektiert. Die Expression der endothelialen Glykokalix wurde anhand des Fluoreszenzsignals des AF (Alexa Flour) 488 konjugierten WGAs (Kanal: 525/50 nm) bestimmt, wohingegen in anderen Experimenten Blutgefäße durch das Fluoreszenzsignal von systemisch appliziertem FITC (Fluorescein-Isothiocyanat) - Dextran mit einem Molekulargewicht von 2.000.000 Dalton (Da) (Kanal: 525/50 nm) visualisiert wurden. Durch die Anfertigung von horizontalen Schnittbildern durch das Gewebe wurde ein Stapel (z-stack) von Bildern erstellt, welche anschließend mittels der Bildverarbeitungssoftware Fiji zu einem dreidimensionalen Bild (3D) zusammengestellt und analysiert wurden.

### 3.2. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden weibliche Balb/c-Mäuse eingesetzt. Diese wurden im Alter von 8 bis 12 Wochen und mit einem Körpergewicht von 20 bis 25 Gramm (g) bei Charles River (Sulzfeld, Deutschland) zugekauft.

### 3.2.1. Tierhaltung und Hygiene

Die Unterbringung der Versuchstiere erfolgte in der Tierhaltung des Walter-Brendel-Zentrums für Experimentelle Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München. Nach dem Eintreffen der Mäuse in der Tierhaltung wurden diese erst nach einer Eingewöhnungszeit von mindestens sechs Tagen für einen Versuch herangezogen. Die Mäuse wurden in Gruppen zu je drei bis fünf Tieren in durchsichtigen, leicht zu reinigenden und sterilisierenden Makrolonkäfigen des Typ II (Ehret GmbH, Emmendingen, Deutschland) gehalten, wobei jedem Tier eine Fläche von min. 2-3 cm<sup>3</sup>/g Körpermasse zur Verfügung stand. Als Einstreu wurde entkeimtes und entstaubtes Weichholzgranulat (LIGNOCEL® BK 8 – 15, J. Rettenmaier & Söhne, Rosenberg, Deutschland) verwendet. Zusätzlich wurde zur Steigerung des Wohlbefindens der Mäuse Zellstoff als Beschäftigungs- und Nestbaumaterial eingesetzt. Als Rückzugsmöglichkeit dienten rote, transparente Häuser aus Polycarbonat (Mouse House, Techniplast, Hohenpeißenberg, Deutschland). Die Käfige wurden einmal wöchentlich gewechselt. Entsprechend der Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Versuchstierkunde wurde innerhalb der Käfige ein „Mikroklima“ mit einer Temperatur von 22 ± 2 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 60 - 70 % eingehalten. Mit Hilfe einer Beleuchtungsanlage wurde ein Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 h mit einer Lichtintensität von 50 bis 100 Lux eingestellt. Sauberes Leitungswasser und Standardfutter (Futter-Nr. 1324 Mausehaltungsdiät 10 mm Pellets, Altromin, Lage, Deutschland) wurde den Tieren *ad libitum* zur Verfügung gestellt.

### 3.2.2. Anästhesie

Für intravitalmikroskopische Untersuchungen sowie zur intradermalen Injektion der Tumorzellsuspension in die Ohrmuschel wurden die Versuchstiere mit einer Injektionsnarkose, bestehend aus einer Kombination von Ketamin und Xylazin anästheisiert. Die Applikation der in der Narkose enthaltenen Substanzen erfolgte intraperitoneal, wobei 100 mg/kg Ketamin (KETASET®, zoetis, Parsippany, New Jersey, USA) und 10 mg/kg Xylazin (Rompun® 2 %, Bayer, Leverkusen, Deutschland) verdünnt mit 1 ml 0,9 %-iger Kochsalzlösung (NaCl) (Natriumchlorid; Isotonische Kochsalzlösung, Injektionslösung, Fresenius Kabi, Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland) in einer Mischspritze verabreicht wurden. Diese

Narkosekombination wird in der Versuchstierforschung mit Mäusen weltweit sehr häufig eingesetzt, da sie bei geringem technischen Aufwand eine zuverlässige relaxierende, sedative und analgetische Wirkung auf chirurgischem Niveau mit großer Sicherheitsbreite und relativ geringen Nebenwirkungen ermöglicht [333-335]. Verabreicht wurde sie mittels intraperitonealer Injektion (i.p.). Bis zum Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums wurden die Versuchstiere in eine abgedunkelte Einschlafbox gelegt, um sie vor visuellen und akustischen Reizen abzuschirmen. Eine ausreichende Narkosetiefe vor und während des Versuchsverlaufes wurde in regelmäßigen Abständen von etwa 10 Minuten durch Überprüfung des Flexorreflexes und Beobachtung der Atmung kontrolliert. Nach Bedarf wurde die Narkose während des Versuchs durch repetitive Injektionen der Narkosemischung aufrechterhalten. Während der gesamten Anästhesiedauer wurde die Körpertemperatur mit einer Heizplatte oder einem Heizstrahler bei 37 °C konstant gehalten. Bei Bedarf wurde den Tieren Sauerstoff zugeführt. Um ein Austrocknen der Cornea zu verhindern, wurde zu Beginn der Narkose und, falls nötig, im weiteren Versuchsverlauf eine 5 %-ige Dexpathenol Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) aufgetragen. Nach Abschluss aller Eingriffe und Untersuchungen erwachten die Tiere aus der Narkose unter kontrollierten Bedingungen auf einer Heizplatte bei 37 °C mit kontinuierlicher Sauerstoffzufuhr, wobei in regelmäßigen Abständen von 10 Minuten Atmung, Herzschlag und Flexorreflexe überprüft wurden. Sobald die Tiere vollständig aus der Narkose erwacht waren, wurden sie in ihrem Käfig zurück in den Tierstall getragen. An Tag 14 wurden die Versuchstiere nach Abschluss der Untersuchungen in Allgemeinanästhesie mittels zervikaler Dislokation euthanasiert.

### 3.2.3. Schwanzvenenkatheter zur intravenösen Applikation von Substanzen

Die intravenöse Applikation unterschiedlicher Substanzen und Antikörper erfolgte über einen Schwanzvenenkatheter an einer der beiden lateral verlaufenden Venen (Venae coccygeae laterales). Dieser wurde für Injektionen sowohl am wachen als auch am narkotisierten Tier eingesetzt.

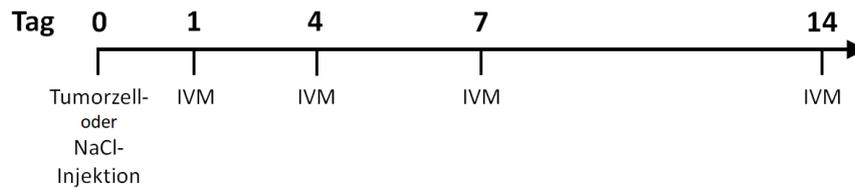
Hierfür wurde zunächst ein Katheter, bestehend aus einem ca. 10 cm langen Polyethylenschlauch (Fine Bore Polyethylene Tubing, 0,28 mm ID, 0,61 mm OD, Smiths Medical International Ltd., Hythe, UK) und zwei 30 G Kanülen (Sterican<sup>®</sup> Kanülen 30 Gauge (G) 0,3 x 12 mm, B. Braun, Melsungen, Deutschland) vorbereitet. Für das vordere Ende des Katheters wurde der Konus einer Kanüle entfernt und die Nadel retrograd in den Schlauch eingefädelt. Auf das hintere Ende des Schlauches wurde eine zweite, intakte Kanüle gesteckt. Um die Durchgängigkeit zu überprüfen, wurde anschließend eine 1 Milliliter (ml) Spritze (B. Braun, Melsungen, Deutschland) in die hintere Kanüle eingesetzt und der Katheter mit isotonischer Kochsalzlösung durchgespült. Um Luftembolien vorzubeugen, wurde darauf geachtet, dass sich weder im Schlauch noch im Konus der Kanüle Luftblasen befanden.

Zur Injektion an der wachen Maus wurde diese kurzfristig in einem Restraîner fixiert. Der freiliegende Schwanz wurde proximal an der Basis durch leichten Druck zwischen Zeige- und Mittelfinger gestaut und die Injektionsstelle desinfiziert (Octeniderm<sup>®</sup>, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland). Daraufhin wurde der Katheter mit Hilfe eines Nadelhalters in die Schwanzvene platziert. Nach erfolgter Injektion der zu applizierenden Substanzen wurde der Katheter wieder entfernt und etwaige Blutungen durch Kompression der Vene mit einem Tupfer (Pur-Zellin<sup>®</sup>, Paul Hartmann Ges. m. b. H. Wiener Neudorf, Österreich) zum Stillstand gebracht.

Die Injektion an der narkotisierten Maus erfolgte entsprechend. Anstelle eines Restrainers wurde das Tier hierfür jedoch in Seitenlage gebracht.

### 3.3. Heterotopes Tumormodell

Als Basismodell dieser Arbeit wurde das heterotope Tumormodell der Ohrmuschel angewendet, um die Expression der endothelialen Glykokalix sowie deren Bedeutung für das Tumorstadium, die Angiogenese, die Permeabilität und die Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten in der Tumormikrozirkulation und in gesundem Gewebe zu untersuchen. Die Untersuchungen mittels *In-vivo*-Epifluoreszenz- oder 2-Photonen-Mikroskopie (s. Kap. III/3.3.1. bis 3.3.5.) erfolgten hierbei an Tag 1, 4, 7 und 14 nach der Tumorzell- bzw. NaCl-Injektion (**Abb. 8**).

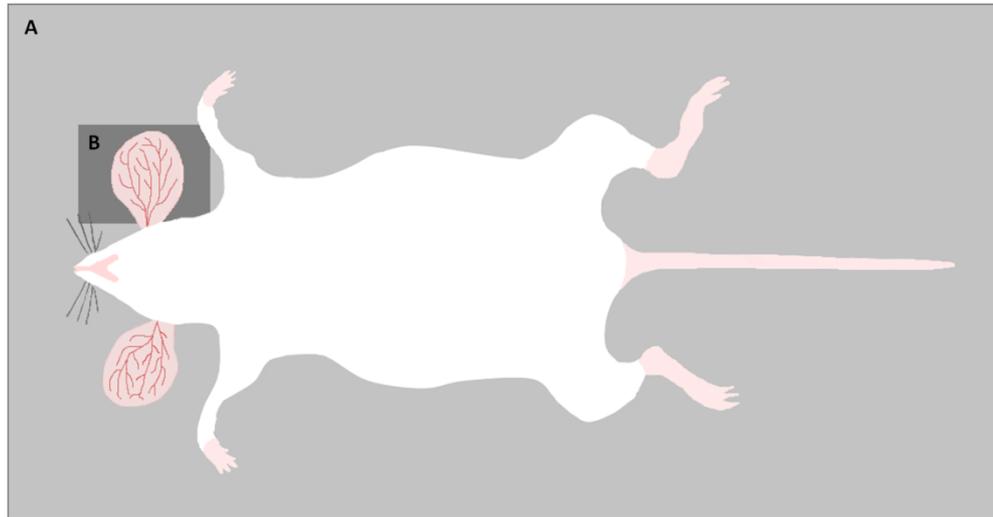


**Abb. 8: Versuchsprotokoll der intravitalmikroskopischen Analysen im heterotopen Tumormodell der Ohrmuschel.**

Zur Induktion eines lokalen Tumors durch Injektion von 4T1-Zellen wurde bei den Versuchstieren zunächst eine kurze Narkose eingeleitet (s. Kap. III/3.2.2.). Daraufhin wurden sie in Rückenlage auf einer Heizplatte abgelegt und die Ohrmuschel desinfiziert (Octeniderm®, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland). Anschließend wurde unter Verwendung eines Operationsmikroskops (Leitz, Wetzlar, Deutschland, 16-fache Vergrößerung) eine Tumorzellsuspension (4T1 Zellen,  $2 \times 10^5$  Zellen in 20  $\mu$ l 0,9%-igem NaCl) mit Hilfe eines Polyethylenkatheters (wie in Kap. III/ 3.2.3. beschrieben) subkutan in die mediale Fläche der Ohrmuschel injiziert. Bei der Kontrollgruppe wurde anstelle der Tumorzellsuspension ein äquivalentes Volumen 0,9 %-iges NaCl (20  $\mu$ l) injiziert. Sobald die Tiere vollständig aus der Narkose erwacht waren, wurden sie zurück in die Tierhaltung gebracht.

Alle intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurden in Allgemeinanästhesie durchgeführt (s. Kap.III/ 3.2.2.). Zuvor wurden den narkotisierten Versuchstieren die für die entsprechenden Untersuchungen benötigten fluoreszierenden Substanzen oder Antikörper über einen Schwanzvenenkatheter verabreicht. Anschließend wurden sie in Rückenlage auf einer Vorrichtung (*stage*) (**Abb. 9 A**), abgelegt und die Ohrmuschel auf einer speziell angefertigten Mikroskopierbühne (**Abb. 9 B**), ausgelagert, die Unterseite mit Silikon (Kurt Obermeier GmbH & Co. KG, Bad Berleburg, Deutschland) vorsichtig fixiert und die Oberseite mit Ultraschallgel (SONOSID® Ultraschall-Gel, ASID BONZ GmbH, Herrenberg, Deutschland) vollständig bedeckt. Die Stage mit der Maus wurde daraufhin vorsichtig zum Mikroskop getragen und die Ohrmuschel unter dem Objektiv platziert. Mit Hilfe eines Heizstrahlers wurde die Körpertemperatur während der mikroskopischen Analysen bei 37 °C konstant gehalten. Nach Beendigung des Versuches wurde die Ohrmuschel vorsichtig mit einem feuchten Tuch (Wypall®,

Kimberly-Clark, Koblenz, Deutschland) gesäubert. Im Anschluss erwachten die Tiere aus der Narkose (s. Kap.III/ 3.2.2.) und wurden anschließend zurück in den Tierstall gebracht. An Tag 14 wurden sie abschließend mittels zervikaler Dislokation in Allgemeinanästhesie euthanasiert.



**Abb. 9: Versuchsaufbau des heterotopen Ohrmuschelmodells**

Vorrichtung (*stage*) (A) mit einer Mikroskopierbühne (B) für intravitalmikroskopische Analysen an der Ohrmuschel einer narkotisierten Maus.

### 3.3.1. Analyse der endothelialen Glykokalix

Zur Visualisierung und Analyse der Struktur der endothelialen Glykokalix in der intakten Mikrozirkulation und in der Tumormikrozirkulation eines in der Mausohrmuschel heterotop implantierten Mammakarzinoms (Zelllinie 4T1), wurde die intravitale 2-Photonen-Mikroskopie (s. Kap.III/ 3.1.2.) eingesetzt. Hierfür wurde den anästhesierten Mäusen das Alexa Flour 488 konjugierte Weizenkeim-Agglutinin (WGA AF488; 200 µg gelöst in 200 µl NaCl, Invitrogen, Carlsbad, USA) intravenös über einen Schwanzvenenkatheter (s. Kap.III/ 3.2.3.) verabreicht. Anschließend wurden sie auf der Stage (s. **Abb. 9**, Kap.III/ 3.3) unter das Mikroskop gelegt, die Ohrmuschel unter dem Objektiv positioniert und dieses in Ultraschallgel eingetaucht. In einem nächsten Schritt wurden nacheinander geeignete Gefäße peritumorale und intratumorale Bereiche der Tumormikrozirkulation eingestellt. Daraufhin wurden pro Gefäßtyp horizontale Schnittbilder durch jeweils zwei zufällig ausgewählte und voneinander unabhängige Gefäße der ausgewählten Bereiche bei einer Anregungswellenlänge

von 800 nm angefertigt. Dabei wurde ein Bildausschnitt von 100 x 100 µm und einer Pixelanzahl von 966 x 966 gewählt. Nachdem aus den Aufnahmen ein dreidimensionales Bild erstellt wurde (s. Kap. III/3.1.2.), wurden diese mit der Bildverarbeitungssoftware Fiji analysiert. Die endotheliale Glykokalix wurde über das Fluoreszenzsignal des AF 488-konjugierten WGAs visualisiert. Dieses weist bei einem Absorptions-/Emissionsmaximum von ungefähr 495/519 nm eine helle, grüne Fluoreszenz auf und bindet neben Sialinsäuren und *N*-Acetylglucosaminen, vorzugsweise Heparansulfat und Hyaluron. In jedem Tier wurden sowohl in den peritumoralen Mikrogefäßen (Arteriolen, Kapillaren und Venolen) als auch in den intratumoralen Mikrogefäßen (Tumormikrogefäße) jeweils zwei verschiedene Gefäße pro Gefäßtyp ausgewertet. Dabei wurde die Extension und Dichte der endothelialen Glykokalix ermittelt. Die Extension wurde mittels eines Intensitätsprofils quer über die als auf der luminalen Seite des Endothels sichtbare „Linie“ des WGA-Fluoreszenzsignals in insgesamt sechs Bereiche pro Gefäßsegment bestimmt und diese zu einem Mittelwert zusammengefasst. Die Dichte wurde anhand der mittleren Intensität der endothelialen Glykokalix pro Gefäßsegment bestimmt. Aus den Mittelwerten eines Tieres wurde einem Gesamtmittelwert aller Versuchstiere errechnet und dieser in Graphiken dargestellt.

### 3.3.2. Analyse der Angiogenese in der Tumormikrozirkulation

Zur Analyse der peri- und intratumoralen Gefäßarchitektur wurde die intravitale 2-Photonen-Mikroskopie eingesetzt (s. Kap. III/3.1.2.). Um Gefäße zu visualisieren, wurde den anästhesierten Mäusen FITC-Dextran mit einer Molekülmasse von 2.000.000 Da (20 µg gelöst in 100 µl NaCl, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (s. Kap. III/2.1.5. Tab. 6) intravenös über einen Schwanzvenenkatheter verabreicht. Das Fluorochrom FITC weist mit einem Absorptionsmaximum bei 495 nm und einem Emissionsmaximum bei 519 nm eine helle, grüne Fluoreszenz auf. Gekoppelt an Proteine oder andere Makromoleküle wie beispielsweise Dextran, verbleibt es nach systemischer Applikation im Gefäßsystem und ermöglicht dadurch die Darstellung von Blutgefäßen in der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie. Nachdem die Ohrmuschel der Versuchstiere unter dem Mikroskop positioniert und die gewünschten Bereiche eingestellt worden sind, wurden Aufnahmen mit einem Bildausschnitt von 500 x 500 µm und einer

Pixelanzahl von 517 x 517 erstellt. Aus dem Stapel horizontaler Schnittbilder durch das Gewebe wurde mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware Fiji ein dreidimensionales Bild zusammengestellt. Anschließend wurde daraus mit dem sogenannten „Skeleton Plugin“ der Bildbearbeitungssoftware Fiji eine „skelettierte Karte“ des Gefäßnetzwerks erstellt und analysiert. Dabei wurde die Anzahl der Gefäße und der Gefäßverbindungen sowie die durchschnittliche Gefäßlänge ermittelt. Die Gefäßdichte wurde definiert als die Anzahl der Gefäße, multipliziert mit der durchschnittlichen Gefäßlänge, dividiert durch die untersuchte Fläche.

### 3.3.3. Bestimmung der mikrovaskulären Permeabilität

Durch Verwendung eines Epifluoreszenzmikroskopes (s. Kap. III/3.1.1.) und einer 10-fachen Wasserimmersions-Linse (0.5 NA, Zeiss MicroImaging GmbH) wurde die mikrovaskuläre Permeabilität in der peri- und intratumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Tumormodells analysiert. Als Maß für die mikrovaskuläre Permeabilität wurde die Extravasation des Makromoleküls FITC-Dextran mit einer Molekülmasse von 500.000 Da (2,5 %, 6 mg/kg Körpergewicht gelöst in 150 µl NaCl; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (s. Kap. III/2.1.5. Tab. 6) aus den Gefäßen quantifiziert. Nach Auslagerung der Ohrmuschel auf einer Mikroskopierbühne wurden je vier zufällig ausgewählte peri- und intratumorale Bereiche einschließlich einer postkapillären Venole mit einem Innendurchmesser von 20-30 µm ausgewählt. Von den entsprechenden Bereichen wurden Baseline-Aufnahmen erstellt, indem sie mit Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt und die Emission bei annähernd 519 nm mit einer CCD Kamera (Sensicam, PCO, Kehlheim, Deutschland) sowie einem passenden Emissionsfilter (LP 515) aufgenommen wurde. Daraufhin wurde den Versuchstieren FITC-Dextran intravenös verabreicht. 30 Minuten nach der Injektion wurden dieselben Gefäße einschließlich des umliegenden perivaskulären Gewebes der zuvor aufgenommenen Bereiche wie bereits beschrieben aufgenommen. Für die Quantifizierung der Extravasation von FITC-Dextran wurden anschließend die mittleren Grauwerte der Fluoreszenzintensität mit Hilfe der Auswertesoftware Fiji in je sechs zufällig gewählten Bildbereichen mit einer Fläche von 50 x 50 (2500 µm<sup>2</sup>) µm und einem Abstand von 50 µm zu postkapillären Venolen in den Aufnahmen bestimmt. Abschließend wurde der Mittelwert der Grauwerte aus der

Differenz der mittleren Grauwerte vor – und nach - der FITC-Injektion berechnet und dieser als Maß für die mikrovaskuläre Permeabilität definiert.

### 3.3.4. Analyse der Leukozyten- und Thrombozytenrekrutierung

Die intravaskuläre Rekrutierung von Leukozyten im Gesamten und ausgewählter Leukozytensubpopulationen sowie von Thrombozyten in der Mikrozirkulation wurde mittels *In-vivo*-Epifluoreszenzmikroskopie untersucht.

Die gesamte Leukozytenpopulation wurde durch intravenöse Applikation des folgenden Fluorochrom-markierten mAK (Vgl. Kap. III/2.1.1. Tab.1) visualisiert, wobei die Identifikation dem Oberflächenmolekül erfolgte:

<u>Gesamte Leukozytenpopulation</u>					
Oberflächenmolekül	Primärantikörper	Fluorochrom	Klon	Menge	Hersteller
<b>CD45<sup>+</sup></b>	anti-Maus CD45	AF488	30- F11	0,5 µg	BioLegend

**Tabelle 7: Experimentelles Protokoll zur Visualisierung und Differenzierung der gesamten Leukozytensubpopulation.**

Myeloide Leukozyten wurden durch intravenöse Applikation folgender Fluorochrom-markierter mAK, visualisiert (Vgl. Kap. III/2.1.1. Tab.1) und die unterschiedlichen Subpopulationen anhand ihrer spezifischen Oberflächenmoleküle identifiziert:

<u>Neutrophile Granulozyten</u>					
Oberflächenmoleküle	Primärantikörper	Fluorochrom	Klon	Menge	Hersteller
<b>Gr-1<sup>+</sup> CD115<sup>-</sup></b>	anti-Maus Ly-6G/Ly-6C (Gr-1)	AF488	RB6- 8C5	0,5 µg	BioLegend

<u>Klassische Monozyten</u>					
Oberflächenmoleküle	Primärantikörper	Fluorochrom	Klon	Menge	Hersteller
<b>Gr-1<sup>+</sup> CD115<sup>+</sup></b>	anti-Maus CD115	AF 594	CSF	0,5 µg 1-R	BioLegend
<u>Nicht-klassische Monozyten</u>					
Oberflächenmoleküle	Primärantikörper	Fluorochrom	Klon	Menge	Hersteller
<b>Gr-1<sup>-</sup> CD115<sup>+</sup></b>	anti-Maus CD115	AF 594	CSF	0,5 µg 1-R	BioLegend

**Tabelle 8: Experimentelles Protokoll zur Visualisierung und Differenzierung unterschiedlicher myeloider Leukozytensubpopulationen.**

Thrombozyten wurden mit Hilfe des folgenden Fluorochrom-markierten mAK, visualisiert (Vgl. Kap. III/2.1.1. Tab.2), welcher gegen die GPIIb $\beta$ -Untereinheit des murinen Thrombozyten/Megakaryozyten-spezifischen Glykoproteinrezeptor-Ib-IX-V-Komplex des von-Willebrand-Faktor-Rezeptors gerichtet ist:

<u>Thrombozyten</u>				
Primärantikörper	Fluorochrom	Klon	Menge	Hersteller
anti-Maus GPIIb $\beta$	DyLight649	RB6-8C5	0,5 µg	Emfret analytics

**Tabelle 9: Experimentelles Protokoll zur Visualisierung und Differenzierung unterschiedlicher myeloider Leukozytensubpopulationen.**

Gelöst in einem Gesamtvolumen von 100 µl NaCl wurde dieser Antikörper zusammen mit Antikörpern zur Visualisierung aller leukozytärer Zellen oder myeloider Leukozytensubpopulationen als Master-Mix verabreicht.

Lymphoide Leukozyten wurden durch intravenöse Applikation eines Master-Mixes (gelöst in 100 µl NaCl), bestehend aus den folgenden Fluorochrom-markierten mAK, visualisiert (s. Kap. III/2.1.1. Tab.1) und die unterschiedlichen Subpopulationen anhand ihrer spezifischen Oberflächenmoleküle identifiziert:

<u>T-Lymphozyten</u>					
Oberflächenmolekül	Primärantikörper	Fluorochrom	Klon	Menge	Hersteller
<b>CD3<sup>+</sup></b>	anti-Maus CD3	BV421	17A2	0,5 µg	BioLegend
<u>T-Helferzellen</u>					
Oberflächenmoleküle	Primärantikörper	Fluorochrom	Klon	Menge	Hersteller
<b>CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup></b>	anti-Maus CD4	AF 488	RM4-5	0,5 µg	BioLegend
<u>Zytotoxische Zellen</u>					
Oberflächenmoleküle	Primärantikörper	Fluorochrom	Klon	Menge	Hersteller
<b>CD3<sup>+</sup> CD8a<sup>+</sup></b>	anti-Maus CD8a	AF 594	53-6.7	0,5 µg	BioLegend
<u>B-Lymphozyten</u>					
Oberflächenmolekül	Primärantikörper	Fluorochrom	Klon	Menge	Hersteller
<b>CD19<sup>+</sup></b>	anti-Maus CD19	AF 647	6D5	0,5 µg	BioLegend

**Tabelle 10: Experimentelles Protokoll zur Visualisierung und Differenzierung unterschiedlicher lymphoider Leukozytensubpopulationen.**

In der peritumoralen Mikrozirkulation wurden von jedem Versuchstier intravitalmikroskopische Aufnahmen von jeweils zwei zufällig ausgewählten und voneinander unabhängigen postkapillären Venolen der Ohrmuschel über einen Zeitraum von 60 Sekunden (s) angefertigt. Intratumoral wurden äquivalent Aufnahmen von zwei Tumormikrogefäßen erstellt. Zur Analyse der Leukozyten- und Thrombozytenrekrutierung wurden in jedem Gefäß die Anzahl rollender Leukozyten bzw. Thrombozyten sowie die Anzahl fest adhärenter Leukozyten- bzw. Thrombozyten an der Gefäßwand über eine Strecke von 100 µm ermittelt. Als rollend wurden jene Zellen definiert, welche sich aufgrund von Margination und Endothelzellkontakt im Vergleich zum Blutfluss langsamer bewegten. Hierbei wurde die Anzahl der Zellen bestimmt, welche innerhalb von 60 s eine quer über das Gefäß gelegte Linie passierten. Als fest adhärent wurden jene Zellen definiert,

welche über einen Zeitraum von mindestens 30 Sekunden fest an der Gefäßwand hafteten. Die Anzahl der fest adhärennten Zellen wurde anschließend auf die luminale Gefäßoberfläche umgerechnet und als relative Anzahl pro  $10^4 \mu\text{m}^2$  Fläche angegeben.

### 3.3.5. Systemische Zelldepletion

Die Depletion beschreibt im Allgemeinen die Entfernung körpereigener Substanzen.

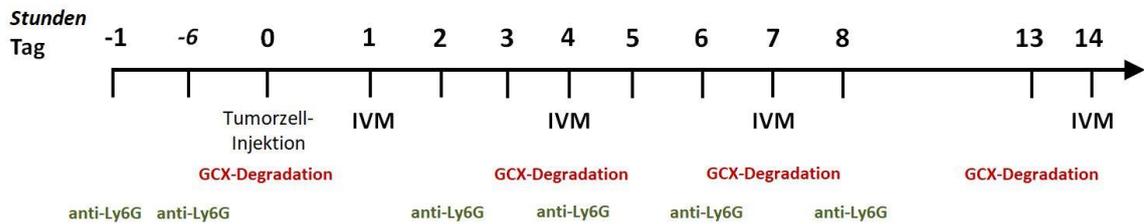
In dieser Arbeit wurde die Bedeutung von neutrophilen Granulozyten, klassischen Monozyten und Thrombozyten für das Tumorwachstum sowie für die Rekrutierung myeloider Leukozytensubpopulationen und Thrombozyten unter Modulation der Glykokalixstruktur in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms im heterotopen Tumormodell der Ohrmuschel durch Depletion der jeweiligen Leukozytensubpopulation bzw. durch Depletion der Thrombozyten untersucht.

In Vorversuchen wurde den Tieren im Zuge der Modelletablierung an den Tagen 1, 4, 7 und 14 nach Beendigung der intravitalmikroskopischen Analysen Blut über einen heparinisierten Schwanzvenenkatheter (2  $\mu\text{l}$  Heparin, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) (s. Kap. III/3.2.3.) zur Kontrolle der Depletion entnommen und dieses anschließend mit einem Blutanalysegerät (ProCyte Dx Hämatologie-Analysegerät, IDEXX, Westbrook, Maine, USA) auf das Vorliegen einer Neutropenie, Monozytopenie bzw. Thrombozytopenie untersucht.

#### 3.3.5.1. Depletion neutrophiler Granulozyten

Zur Depletion neutrophiler Granulozyten wurde ein spezifischer monoklonaler anti-Ly-6G Antikörper (Klon 1A8, Rat IgG2a, kappa; 50  $\mu\text{g}$  gelöst in 100  $\mu\text{l}$  NaCl; BioXcell, Lebanon, New Hampshire, USA) (s. Kap. III/2.1.1. Tab.2) intravenös über die Schwanzvene verabreicht. Da das Oberflächenprotein Ly-6G fast ausschließlich auf reifen Granulozyten exprimiert wird, werden andere leukozytäre Subpopulationen nicht (relevant) erfasst [336]. Die ersten beiden Injektionen erfolgten 24 Stunden (h) und 6 h vor der Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel. Alle

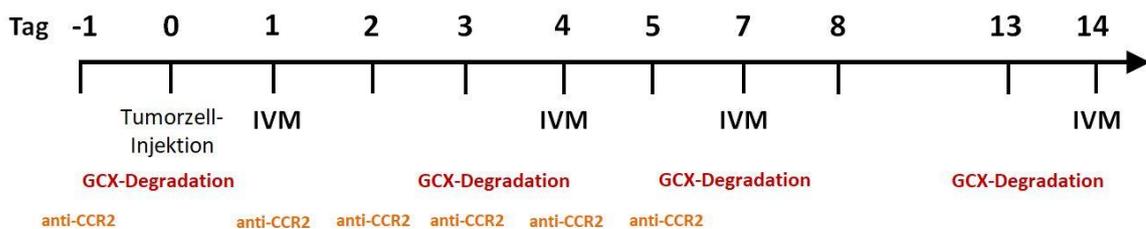
weiteren Injektionen wurden alle 48 h über einen Zeitraum von 8 Tagen fortgesetzt (**Abb. 10**).



**Abb. 10:** Versuchsprotokoll der intravitalmikroskopischen Analysen im heterotopen Tumormodell der Ohrmuschel nach Depletion neutrophiler Granulozyten.

### 3.3.5.2. Depletion klassischer Monozyten

Klassische Monozyten wurden mit Hilfe eines monoklonalen anti-CCR2 (C-C Chemokinrezeptor Typ 2) AK (Klon MC-21, 25 µg gelöst in 100 µl NaCl; Prof. M. Mack, Universitätsklinikum Regensburg, Deutschland) (s. Kap. III/2.1.1. Tab.2) depletiert. Hierbei erfolgte die erste Schwanzveneninjektion 24 h vor der Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel und wurde anschließend alle 24 h über einen Zeitraum von 5 Tagen fortgeführt (**Abb. 11**).

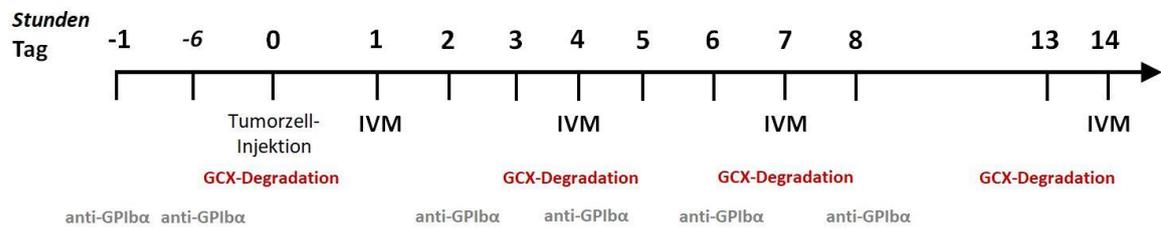


**Abb. 11:** Versuchsprotokoll der intravitalmikroskopischen Analysen im heterotopen Tumormodell der Ohrmuschel nach Depletion klassischer Monozyten.

### 3.3.5.3. Thrombozytendepletion

Thrombozyten wurden mit einem monoklonalen anti-GPIIb $\alpha$  (CD42b) AK (Klon Xia.B2; 25 µg gelöst in 100 µl NaCl; Emfret analytics, Eibelstadt, Deutschland) (s. Kap. III/ 2.1.1. Tab.2) depletiert. Die ersten beiden Injektionen erfolgten 24 h und 6 h vor der Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel, woraufhin alle weiteren

Injektionen im Abstand von jeweils 48 h über einen Zeitraum von 8 Tagen fortgesetzt wurden (**Abb. 12**).



**Abb. 12:** Versuchsprotokoll der intravitalmikroskopischen Analysen im heterotopen Tumormodell der Ohrmuschel nach Thrombozytendepletion.

### 3.3.6. Tumorwachstum

Um das Tumorwachstum *in vivo* zu analysieren, wurde die Tumorgröße im heterotopen Tumormodell der Ohrmuschel ermittelt.

Hierfür wurden sichtbare Tumore an Tag 1, 4, 7 und 14 nach der Tumorzellinjektion in zwei diagonalen Achsen mit einer Schieblehre vermessen. Die mittlere Tumorgröße wurde als Fläche (A) definiert und mit Hilfe folgender Formel (**Abb. 13**) berechnet:

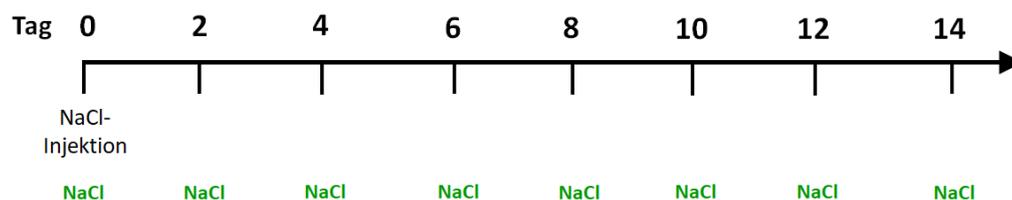
$$A = \frac{1}{2} a * \frac{1}{2} b * \pi \text{ [mm}^2\text{]} \quad a, b: \text{Länge der diagonalen Achsen}$$

**Abbildung 13:** Formel zur mathematischen Ermittlung der Tumorgröße (A) [mm<sup>2</sup>].

## 4. Versuchsgruppen

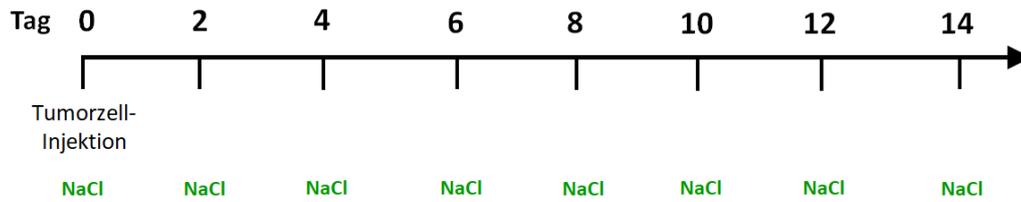
Um den Einfluss der Glykokalix sowohl auf das Tumorwachstum, die Angiogenese, die Permeabilität als auch auf die Rekrutierung aller leukozytärer Zellen sowie ausgewählter myeloider und lymphoider Leukozytensubpopulationen und auf Thrombozyten in der Mikrozirkulation eines Mammakarzinoms im heterotopen Tumormodell der Ohrmuschel zu analysieren, wurden grundsätzlich vier unterschiedliche Versuchsgruppen mit einer Anzahl von jeweils sechs

Versuchstieren ( $n = 6$ ) untersucht. Die Versuchsgruppen umfassten bei jeder Versuchsreihe eine Kontrollgruppe, eine unbehandelte Tumorgruppe (Vehikel) sowie zwei unterschiedlich behandelte Tumorgruppen. Der Kontrollgruppe wurde ein anstelle einer Tumorzellsuspension ein äquivalentes Volumen 0,9 %-iges NaCl (20  $\mu$ l) intradermal in die Ohrmuschel injiziert (**Abb. 14**). Den Tumorgruppen wurde auf dieselbe Weise eine Tumorzellsuspension (4T1 Zellen,  $2 \times 10^5$  Zellen in 20  $\mu$ l 0,9%-igem NaCl) injiziert (**Abb. 15**). Der Kontrollgruppe und der Vehikelgruppe wurden anschließend über einen Gesamtzeitraum von 14 Tagen im Abstand von 48 h 100  $\mu$ l NaCl i.v. über die Schwanzvene verabreicht (**Abb. 14 und 15**). Zur Protektion der Glykokalix wurde eine Tumorgruppe mit einem niedermolekularen Heparanaseinhibitor (OGT 2115; 50  $\mu$ g gelöst in 100  $\mu$ l NaCl i.v., alle 48 h über 14 Tage; Tocris, Bristol, UK) (s. Kap. III/2.1.3. Tab. 4) systemisch behandelt (**Abb. 16**). Eine weitere Tumorgruppe wurde zur systemischen Degradation der Glykokalix mit einer Enzym-Mischung aus Heparanase III aus *Flavobacterium heparinum*, Hyaluronidase aus *Streptomyces hyaluronicus* und Neuraminidase aus *Clostridium perfringens* (jeweils 1 Unit (U)/ml Gesamtblutvolumen einer Maus gelöst in 100  $\mu$ l NaCl i.v.) (s. Kap. III/2.1.2. Tab. 3) alle 4 Tage über 14 Tage behandelt. Zwischen diesen Injektionen wurden alle vier Tage 100  $\mu$ l NaCl i.v. über die Schwanzvene verabreicht, sodass die Schwanzveneninjektionen jeweils alle 48 h durchgeführt wurden (**Abb. 17**).



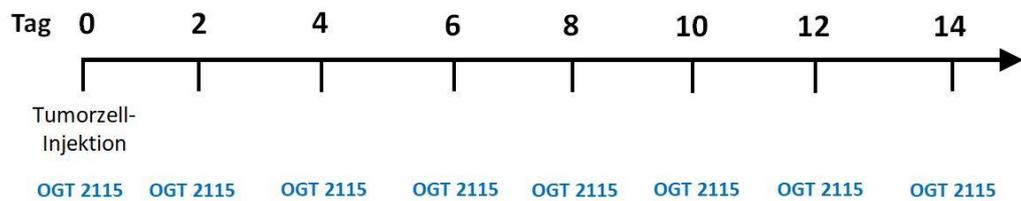
**Abb. 14: Versuchsprotokoll des heterotopen Ohrmuschelmodells der Kontrollgruppe.**

Im Anschluss an die intradermale NaCl-Injektion in die Ohrmuschel, wurden systemische NaCl-Injektionen alle 48 h über insgesamt 14 Tage durchgeführt.



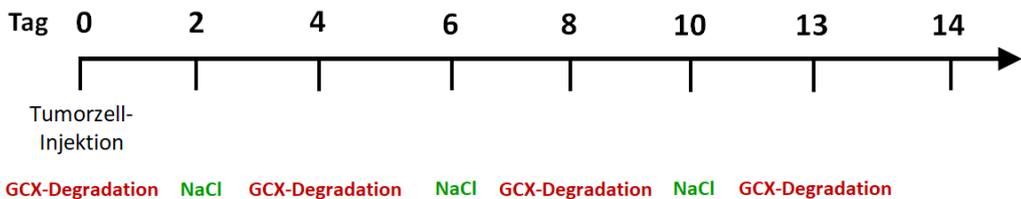
**Abb. 15: Versuchsprotokoll des heterotopen Tumormodells der Ohrmuschel der Vehikelgruppe.**

Im Anschluss an die intradermale Injektion der Tumorzellsuspension in die Ohrmuschel, wurden systemische NaCl-Injektionen alle 48 h über insgesamt 14 Tage durchgeführt.



**Abb. 16: Versuchsprotokoll des heterotopen Tumormodells der Ohrmuschel unter systemischer Protektion der Glykokalix.**

Im Anschluss an die intradermale Injektion der Tumorzellsuspension in die Ohrmuschel, wurde der niedermolekulare Heparanaseinhibitor OGT 2115 alle 48 h über insgesamt 14 Tage systemisch verabreicht.

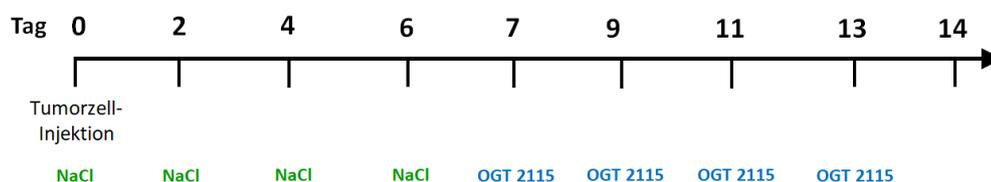


**Abb. 17: Versuchsprotokoll des heterotopen Tumormodells der Ohrmuschel unter systemischer Glykokalixdegradation.**

Im Anschluss an die intradermale Injektion der Tumorzellsuspension in die Ohrmuschel, wurde eine Enzym-Mischung aus Heparinase III (aus *Flavobacterium heparinum*), Hyaluronidase (aus *Streptomyces hyaluronicus*) und Neuraminidase aus *Clostridium perfringens* alle vier Tage über insgesamt 14 Tage systemisch verabreicht.

Um den Einfluss von neutrophilen Granulozyten, klassischen Monozyten und Thrombozyten auf das Tumorwachstum sowie auf die Rekrutierung myeloider Leukozytensubpopulationen und Thrombozyten unter Modulation der Glykokalixstruktur in der Mikrozirkulation eines Mammakarzinoms im heterotopen

Tumormodell der Ohrmuschel zu untersuchen, wurden Depletionsversuche (s. Kap. III/3.3.5.) durchgeführt. Hierfür wurden vier unterschiedliche Versuchsgruppen mit einer Anzahl von jeweils vier Versuchstieren ( $n = 4$ ) untersucht. Alle vier Gruppen wurden nach intradermaler Injektion einer Tumorzellsuspension (4T1 Zellen,  $2 \times 10^5$  Zellen in  $20 \mu\text{l}$  0,9%-igem NaCl) in die Ohrmuschel mit der bereits beschriebenen Enzym-Mischung zur Glykokalixdegradation (s.o.) über einen Zeitraum von 14 Tagen behandelt. Eine der Gruppen wurde als Vehikelgruppe festgelegt (Applikation von Kochsalzlösung), wohingegen bei den drei weiteren Gruppen entweder neutrophile Granulozyten, klassische Monozyten oder Thrombozyten depletiert wurden (**Abb. 10-12**). Zur Prüfung eines therapeutischen Ansatzes wurde in einer letzten Versuchsreihe zur Protektion der Glykokalix eine Versuchsgruppe erst sieben Tage nach intradermaler Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel mit dem oben erwähnten niedermolekularen Heparanaseinhibitor (OGT 2115;  $50 \mu\text{g}$  gelöst in  $100 \mu\text{l}$  NaCl i.v., alle 48 h über 8 Tage; Tocris, Bristol, UK) (s. Kap. III/2.1.3. Tab. 4) systemisch behandelt. Vor Beginn der therapeutischen Behandlung wurden  $100 \mu\text{l}$  NaCl i.v. alle 48 h über die Schwanzvene verabreicht (**Abb. 18**).



**Abb. 18: Versuchsprotokoll des heterotopen Tumormodells der Ohrmuschel unter therapeutischer Protektion der Glykokalix.**

Im Anschluss an die intradermale Injektion der Tumorzellsuspension in die Ohrmuschel, wurden zunächst über sechs Tage systemische NaCl-Injektionen im Abstand vom 48 h durchgeführt. Ab Tag 7 wurde anstelle von NaCl der niedermolekulare Heparanaseinhibitor OGT 2115 alle 48 h über 8 Tage systemisch verabreicht.

Grundsätzlich wurden die Tiere bei allen Versuchen den Gruppen nach dem Zufallsprinzip zugeordnet.

Mit Ausnahme der Versuchsreihe zur Untersuchung der Rekrutierung von CD45<sup>+</sup> Zellen und Thrombozyten in die Mikrozirkulation des Mammakarzinoms (s. Kap.

III/5.4) sowie bei den Untersuchungen zur therapeutischen Glykokalixprotektion (s. Kap. III/5.6.), wurden bei allen Versuchen in einer ersten Untersuchungsreihe zunächst die unbehandelte Tumorgruppe mit der Kontrollgruppe verglichen. Anschließend wurden dieselben Untersuchungen mit allen vier verschiedenen Gruppen durchgeführt und miteinander verglichen.

Die Untersuchungen zur Rekrutierung von CD45<sup>+</sup> Zellen und Thrombozyten in die Mikrozirkulation des Mammakarzinoms wurden ausschließlich mit einer unbehandelten Tumorgruppe durchgeführt.

Bei den Versuchen zur therapeutischen Protektion der Glykokalix, wurden eine Kontrollgruppe, eine unbehandelte Tumorgruppe und eine mit einem niedermolekularen Heparanaseinhibitor nach dem oben genannten Schema behandelten Tumorgruppe miteinander verglichen.

## **5. Versuchsprotokolle**

### **5.1. Analyse der endothelialen Glykokalix**

Das Versuchsprotokoll zur Analyse der endothelialen Glykokalix unter Modulation ihrer Struktur in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms im heterotopen Tumormodell umfasste einen Gesamtzeitraum von 14 Tagen. Hierbei wurden an den Tagen 1, 4, 7 und 14 nach intradermaler Tumorzell- bzw. NaCl-Injektion in die Ohrmuschel (s. Kap. III/3.3.) intravitalmikroskopische Analysen am 2-Photonen-Mikroskop (s. Kap. III/3.3.1.) an narkotisierten Versuchstieren (s. Kap. III/3.2.2.) der unterschiedlichen Versuchsgruppen (s. Kap. III/4.) durchgeführt. Die Aufnahmen wurden jeweils 20 Minuten nach intravenöser Applikation von WGA AF 488 über einen Zeitraum von maximal 90 min angefertigt (s. Kap. III/3.3.1.) Bei Kontrolltieren wurden hierbei jeweils zwei zufällig ausgewählte und voneinander unabhängige Kapillaren, Venolen und Arteriolen der intakten Mikrozirkulation aufgenommen. Bei Tumortieren wurden zunächst die peritumoralen und intratumoralen Bereiche mit einem Stift markiert, sodass diese unter dem Mikroskop identifiziert werden konnten. Anschließend wurden Aufnahmen von jeweils zwei zufällig ausgewählten und voneinander unabhängigen Kapillaren,

Venolen und Arteriolen peritumoraler Bereiche sowie von zwei zufällig ausgewählten und voneinander unabhängigen Mikrogefäßen innerhalb des Tumorgewebes erstellt. Anschließend wurde die Extension und die Dichte der endothelialen Glykokalix anhand des AF488 konjugierten WGA-Signals mit der Bildverarbeitungssoftware Fiji analysiert.

## 5.2. Analyse der Angiogenese in der Tumormikrozirkulation

Zur Analyse der Gefäßarchitektur in der peri- und intratumoralen Mikrozirkulation des Mammakarzinoms im heterotopen Tumormodell unter Modulation der Glykokalixstruktur wurden über einen Gesamtzeitraum von 14 Tagen an den Tagen 1, 4, 7 und 14 nach intradermaler Tumorzell- bzw. NaCl-Injektion in die Ohrmuschel (s. Kap. III/3.3) intravitalmikroskopische Aufnahmen am 2-Photonen-Mikroskop erstellt (s. Kap. III/3.3.2.). Hierfür wurde den narkotisierten Versuchstieren (s. Kap. III/3.2.2.) der unterschiedlichen Versuchsgruppen (s. Kap. III/4.) zunächst FITC-Dextran (2.000.000 Da) (s. Kap. III/2.1.5. Tab. 6) intravenös verabreicht (s. Kap. III/3.2.3.). Danach wurde bei Tieren der Vehikelgruppe jeweils zwei zufällig ausgewählte und voneinander unabhängige Bereiche in der Umgebung der NaCl-Injektion aufgenommen. Bei den Tumortieren wurden zunächst die peritumoralen und intratumoralen Bereiche mit einem Stift markiert, sodass diese unter dem Mikroskop identifiziert werden konnten. Anschließend wurden Aufnahmen von jeweils zwei zufällig ausgewählten und voneinander unabhängigen Bereichen der peritumoralen und der intratumoralen Mikrozirkulation angefertigt. Analysiert wurden anschließend die Anzahl der Gefäße und der Gefäßverbindungen, die durchschnittliche Gefäßlänge und die Gefäßdichte (s. Kap. III/ 3.3.2.).

## 5.3. Bestimmung der mikrovaskulären Permeabilität

Um die mikrovaskuläre Permeabilität in der peri- und intratumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Tumormodells unter Modulation der Glykokalixstruktur zu untersuchen, wurden über einen Gesamtzeitraum von 14 Tagen an den Tagen 1, 4, 7 und 14 nach intradermaler Tumorzell- bzw. NaCl-Injektion in die Ohrmuschel (s. Kap. III/3.3) intravitalmikroskopische Analysen mit

einem Epifluoreszenzmikroskop durchgeführt (s. Kap. III/3.3.3.). Nach Einleitung der Narkose (s. Kap. III/3.2.2.) und Positionierung der Ohrmuschel unter dem Mikroskop wurden zunächst bei Kontrolltieren Aufnahmen von je vier zufällig ausgewählten Bereichen einschließlich einer postkapillären Venole mit einem Innendurchmesser von 20-30  $\mu\text{m}$  in der Umgebung der NaCl-Injektion erstellt. Bei Tumortieren wurden zunächst die peritumoralen und intratumoralen Bereiche mit einem Stift markiert, sodass diese unter dem Mikroskop identifiziert werden konnten. Anschließend wurden äquivalent zu den Aufnahmen der Kontrolltiere peri- und intratumorale Bereiche aufgenommen (Baseline). Daraufhin wurde den Versuchstieren FITC-Dextran (500.000 Da) (s. Kap. III/2.1.5. Tab. 6) intravenös verabreicht (s. Kap. III/3.2.3.), woraufhin 30 Minuten später dieselben Bereiche zur Analyse der mikrovaskulären Permeabilität wiederholt aufgenommen wurden. Bei den Aufnahmen wurden zur Quantifizierung der Extravasation von FITC-Dextran die mittleren Grauwerte der Fluoreszenzintensität mit Hilfe der Auswertesoftware Fiji in je sechs zufällig gewählten Bildbereichen mit einer Fläche von  $50 \times 50$  ( $2500 \mu\text{m}^2$ )  $\mu\text{m}$  und einem Abstand von 50  $\mu\text{m}$  zu postkapillären Venolen bestimmt. Abschließend wurde als Maß für die mikrovaskuläre Permeabilität der Mittelwert der Grauwerte aus der Differenz der mittleren Grauwerte vor – und nach - der FITC-Injektion berechnet (s. Kap. III/3.3.3.).

#### 5.4. Analyse der Leukozyten-und Thrombozytenrekrutierung

Zur Untersuchung der intravaskulären Rekrutierung aller leukozytärer Zellen sowie ausgewählter myeloider und lymphoider Leukozytensubpopulationen und Thrombozyten in der Tumormikrozirkulation des Mammakarzinoms im heterotopen Tumormodell unter Modulation der Glykokalixstruktur wurden intravitalmikroskopische Analysen mit Hilfe eines Epifluoreszenzmikroskops an den Tagen 1, 4, 7 und 14 nach intradermaler NaCl- bzw. Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel (s. Kap. III/3.3.) durchgeführt (s. Kap. III/3.3.4.). Hierbei wurden nach Einleitung der Narkose (s. Kap. III/3.2.2.) und intravenöser Applikation (s. Kap. III/3.2.3.) verschiedener fluoreszierender Antikörper zur Differenzierung der Leukozytensubpopulationen und Thrombozyten (s. Kap. III/2.1.1. Tab.1), jeweils zwei zufällig ausgewählte und voneinander unabhängige postkapilläre Venolen bzw. Tumormikrogefäße der Ohrmuschel in der Umgebung der NaCl-Injektion

bzw. in der peri- und intratumoralen Mikrozirkulation über einen Zeitraum von 60 s aufgenommen und analysiert (s. Kap. III/3.3.4.). Um peritumorale und intratumorale Bereiche identifizieren zu können, wurden diese vor Erstellung der Aufnahmen mit einem Stift markiert.

## 5.5. Analyse der Rekrutierung myeloider Leukozyten und Thrombozyten nach Depletion

Um den Einfluss von neutrophilen Granulozyten, klassischen Monozyten und Thrombozyten sowohl auf das Tumorwachstum als auch auf die Rekrutierung myeloider Leukozytensubpopulationen und Thrombozyten in der Mikrozirkulation des Mammarkarzinoms im heterotopen Tumormodell der Ohrmuschel unter Modulation der Glykokalixstruktur zu untersuchen, wurden in unterschiedlichen Versuchsgruppen die oben genannten (o. g.) Zellen mit Hilfe spezifischer Antikörper (s. Kap. III/ 2.1.1. Tab. 2) entsprechend dem jeweiligen Versuchsprotokoll depletiert (s. Kap. III/3.3.5.) und die Zellrekrutierung am Epifluoreszenzmikroskop an den Tagen 1, 4, 7 und 14 analysiert. Dabei wurden den narkotisierten Versuchstieren (s. Kap. III/3.2.2.) zur Visualisierung der Zellpopulationen unterschiedliche fluoreszierende Antikörper (s. Kap. III/2.1.1. Tab.1) intravenös verabreicht (s. Kap. III/3.2.3.). Anschließend wurden jeweils zwei zufällig ausgewählte und voneinander unabhängige postkapilläre Venolen bzw. Tumormikrogefäße der Ohrmuschel in der Umgebung der NaCl-Injektion bzw. in der peri- und intratumoralen Mikrozirkulation über einen Zeitraum von 60 s aufgenommen und die Anzahl der rollenden und adhärenen Zellpopulationen bestimmt (s. Kap. III/3.3.4.). Nach Beendigung der intravitalmikroskopischen Aufnahmen wurden sichtbare Tumore vermessen und die Tumorgöße ermittelt (s. Kap. III/3.3.6.). Um peritumorale und intratumorale Bereiche identifizieren zu können, wurden diese vor Erstellung der Aufnahmen mit einem Stift markiert.

## 5.6. Therapeutische Protektion der Glykokalix

Eine Protektion der endothelialen Glykokalix, beispielsweise durch die Hemmung der Heparanaseaktivität, könnte einen pharmakologischen Ansatzpunkt in der Tumorthherapie darstellen [294, 312, 313]. Deshalb wurde in dieser Arbeit ein

niedermolekularer Heparanaseinhibitor eingesetzt, um zu untersuchen, ob die Protektion der Glykokalix eine therapeutische Wirkung beim Mammakarzinom aufweist. Dafür wurde den Versuchstieren der niedermolekularer Heparanaseinhibitor OGT 2115 (s. Kap. III/2.1.3 Tab. 4) 7 Tage nach intradermaler Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel alle 48 h über 8 Tage intravenös über die Schwanzvene verabreicht (s. Kap. III/ 4.). An den Tagen 1, 4, 7 und 14 nach intradermaler Tumorzell- bzw. NaCl-Injektion in die Ohrmuschel (s. 3.3.) wurden intravitalmikroskopische Analysen am 2-Photonen-Mikroskop (s. Kap. III/3.1.2.) an narkotisierten Versuchstieren (s. Kap. III/3.2.2.) der unterschiedlichen Versuchsgruppen (s. Kap. III/4.) durchgeführt. Jeweils 20 Minuten nach intravenöser Applikation von WGA AF 488 wurden Aufnahmen über einen Zeitraum von max. 90 min. angefertigt (s. Kap. III/3.3.1.) Dabei wurden bei Vehikeltieren jeweils zwei zufällig ausgewählte und voneinander unabhängige Kapillaren, Venolen und Arteriolen der intakten Mikrozirkulation aufgenommen. Bei Tumortieren wurden zunächst die peritumoralen und intratumoralen Bereiche mit einem Stift markiert, sodass diese unter dem Mikroskop identifiziert werden konnten. Anschließend wurden Aufnahmen von jeweils zwei zufällig ausgewählten und voneinander unabhängigen Kapillaren, Venolen und Arteriolen peritumoraler Bereiche sowie von zwei zufällig ausgewählten und voneinander unabhängigen Mikrogefäßen innerhalb des Tumorgewebes erstellt. Anschließend wurde die Extension und die Dichte der endothelialen Glykokalix analysiert. Nach Abschluss der intravitalmikroskopischen Analysen wurde die Tumorgröße ermittelt (s. Kap. III/3.3.6).

## 6. Statistik

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche erfolgte mit der Software GraphPad PRISM (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Um zwei normalverteilte Gruppen auf statistisch signifikante Unterschiede zu testen, wurde der ungepaarte students t-Test verwendet. Die Analyse von mehr als zwei normalverteilten Gruppen auf statistisch signifikante Unterschiede erfolgte mit Hilfe dem ONE-way ANOVA-Test, gefolgt vom Dunnett-Test oder Tukey-Test. Alle Versuchsergebnisse wurden als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Unterschiede mit einem p-Wert ( $p$ )  $< 0,05$  wurden als signifikant angesehen.

## IV. ERGEBNISSE

Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt auf der Bedeutung der Glykokalix für das Tumorstadium, die Angiogenese, die Permeabilität sowie die Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms im heterotopen Tumormodell der Ohrmuschel.

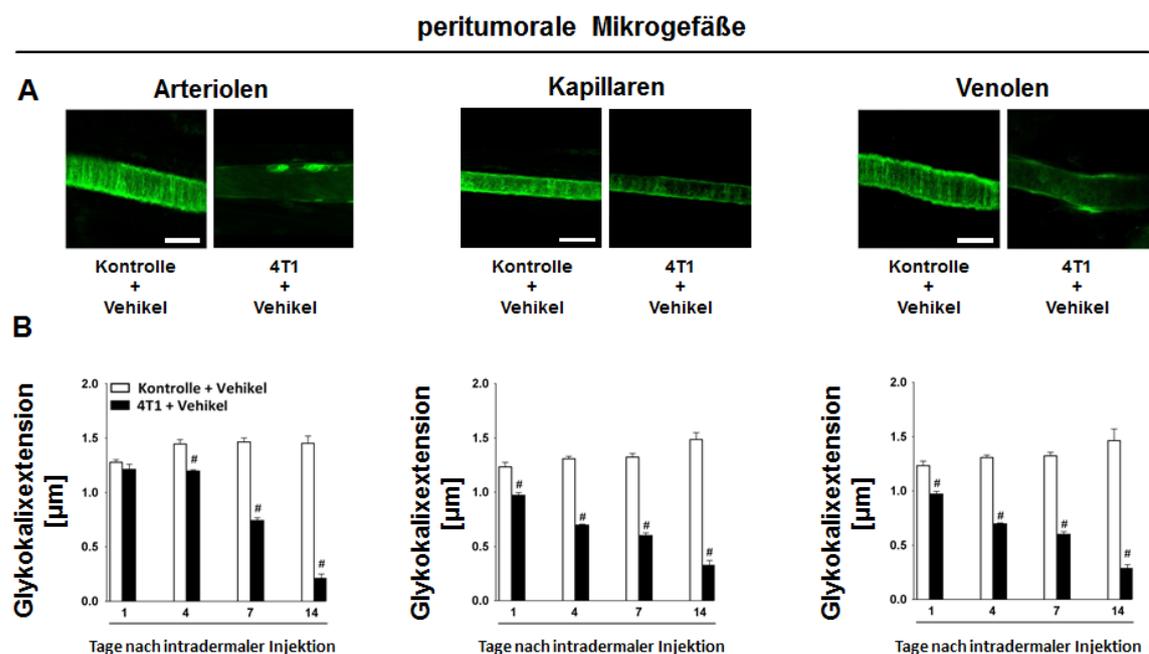
Alle Untersuchungen wurden an den Tagen 1, 4, 7 und 14 nach intradermaler Injektion der Tumorzellsuspension bzw. NaCl in die Ohrmuschel durchgeführt.

In einer ersten Versuchsreihe wurde eine unbehandelte Tumorgruppe (4T1+Vehikel) mit einer Kontrollgruppe (Kontrolle + Vehikel) verglichen. Nachfolgend wurden bei allen Versuchen mit Ausnahme der Versuchsreihe zur Untersuchung der CD45<sup>+</sup> Zellen und Thrombozyten zwei weitere unterschiedlich behandelte Tumorgruppen ergänzt, um die Effekte der Glykokalixmodulation bzw. ausgewählter myeloider Leukozytensubpopulationen und Thrombozyten zu analysieren. Hierfür wurde bei einer Tumorgruppe die Degradation der Glykokalix mit einem Enzym-Mix vermittelt (4T1 + GCX-Degradation), wohingegen bei der anderen Tumorgruppe die Glykokalix mit Hilfe eines niedermolekularen Heparanaseinhibitors protegiert wurde (4T1 + Heparanaseinhibitor).

### 1. Expressionsanalyse der endothelialen Glykokalix in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms

Inflammatorische Prozesse im Gefäßsystem verursachen eine Degradation der endothelialen Glykokalix, wodurch es zum Verlust ihrer gefäßprotektiven, anti-inflammatorischen und anti-koagulatorischen Eigenschaften kommt [267]. Dabei führen sowohl ein lokaler als auch ein generalisierter Verlust dieser Schutzbarriere zur endothelialen Dysfunktion, welche Auswirkungen auf den gesamten Organismus hat [294]. Da auch maligne Tumorerkrankungen bereits in frühen Stadien mit einer systemischen Entzündungsreaktion einhergehen [308], wurde die Expression der endothelialen Glykokalix in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms im heterotopen Tumormodell der Ohrmuschel in einer ersten Versuchsreihe untersucht. Unter Anwendung der intravitralen 2-

Photonenmikroskopie wurde die endotheliale Glykokalix über die Fluoreszenzintensität von systemisch appliziertem Alexa-Fluor-488-markiertem Weizenkeimagglutinin visualisiert. Hierfür wurde in einer ersten Gruppe von Experimenten zunächst die diese Expression der endothelialen Glykokalix in der intakten Mikrozirkulation der Ohrmuschel einer Kontrollgruppe analysiert. Zur Bestimmung der Expression der endothelialen Glykokalix wurde die Extension nach intraluminal (in  $\mu\text{m}$ ) die Dichte (mittlere Fluoreszenzintensität) in Arteriolen, Kapillaren und Venolen ermittelt. Die quantitative Auswertung ergab in allen drei gesunden Mikrogefäßtypen über den Untersuchungszeitraum eine robuste endotheliale Glykokalix von ungefähr 1 - 1,5  $\mu\text{m}$  Ausdehnung. Erwähnenswert ist, dass sich am ersten Tag nach Injektion des Vehikels - relativ zu den nachfolgenden Untersuchungstagen – eine hinsichtlich der Extension als auch der Dichte eine leicht reduzierte endotheliale Glykokalix fand (**Abb. 19 B** und **Abb. 20**).

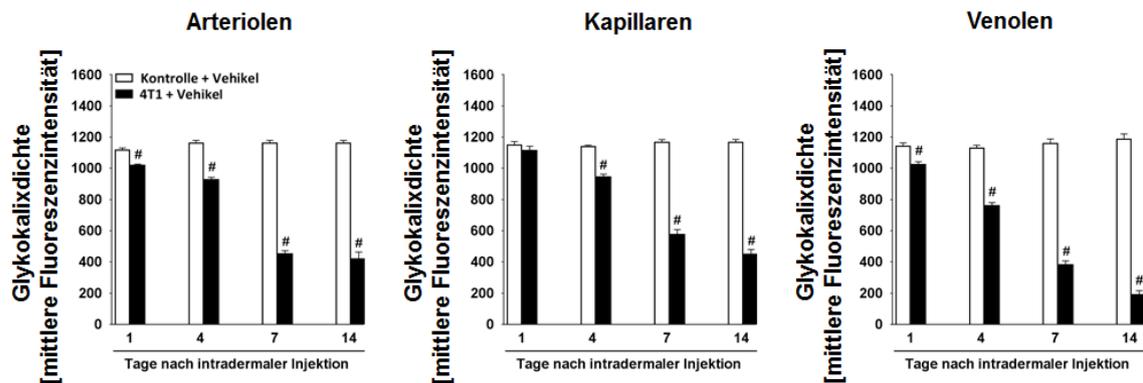


**Abb. 19: Expressionsanalyse der endothelialen Glykokalix in der peritumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.**

Repräsentative 2-Photonen-In-vivo-Mikroskopieaufnahmen der endothelialen Glykokalix (WGA Alexa Fluor 488) in Arteriolen, Kapillaren und Venolen der intakten Mikrozirkulation der Kontrollgruppe (Kontrolle + Vehikel) und der peritumoralen Mikrozirkulation der unbehandelten Tumorguppe (4T1 + Vehikel) 14 Tage nach intradermaler Tumorzell- bzw. NaCl-Injektion in die Ohrmuschel (Maßstabsbalken: 15  $\mu\text{m}$ ) (**A**). Die Graphen zeigen die quantitative Auswertung der endothelialen Glykokalixextension an Tag 1, 4, 7 und 14 (**B**; MW  $\pm$  SEM bei n=6 pro Gruppe; # p < 0,05 versus (vs.) Kontrolle + Vehikel desselben Untersuchungstages).

Anschließend wurde in weiteren Experimenten die endotheliale Glykokalix in Arteriolen, Kapillaren und Venolen der peritumoralen Mikrozirkulation sowie im Tumor gelegenen Tumormikrogefäßen (Heterotopes Tumormodell der Ohrmuschel; 4T1) analysiert. In allen drei Gefäßtypen der peritumoralen Mikrozirkulation konnte im Zeitverlauf von 14 Tagen eine kontinuierliche Reduktion sowohl der Extension als auch der Dichte der endothelialen Glykokalix beobachtet werden. In Arteriolen erwies sich die Glykokalix mit einer weniger ausgeprägten Reduktion im Vergleich zur Glykokalix in Kapillaren und Venolen an den Untersuchungstagen 1, 4 und 7 als verhältnismäßig stabiler. An Tag 14 hingegen zeigte sich die endotheliale Glykokalix in Arteriolen auf einem niedrigeren Niveau als in Kapillaren und Venolen, wobei sie in Kapillaren im Vergleich zu Arteriolen und Venolen stärker ausgebildet war (**Abb. 19 B** und **Abb. 20**). Dies verdeutlicht, dass die luminalen Anteile der endothelialen Glykokalix in Arteriolen zu Beginn einer Tumorerkrankung gegenüber Einflüssen aus der Zirkulation zunächst robuster sind, die gesamte Extension endothelialen Glykokalix letztendlich jedoch stärker geschädigt wird als in anderen Mikrogefäßtypen. Dagegen scheinen die luminalen Anteile der endothelialen Glykokalix in Venolen und Kapillaren fragiler zu sein, wohingegen die lumenfernen Anteile vergleichsweise robuster sind.

## peritumorale Mikrogefäße

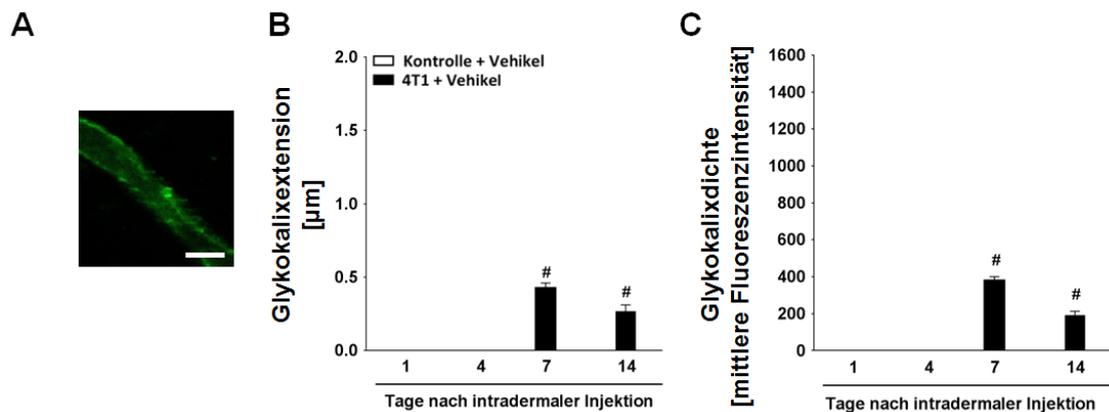


**Abb. 20: Expressionsanalyse der endothelialen Glykokalixdichte in der peritumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.**

Quantitative Auswertung der endothelialen Glykokalixdichte in intakten Mikrogefäßen der Kontrollgruppe (Kontrolle + Vehikel) und der peritumoralen Mikrozirkulation der unbehandelten Tumorgruppe (4T1 + Vehikel) 14 Tage nach intradermaler Tumorzell- bzw. NaCl-Injektion in die Ohrmuschel (MW  $\pm$  SEM bei n=6 pro Gruppe; # p < 0,05 vs. Kontrolle + Vehikel desselben Untersuchungstages).

Interessanterweise konnte in intratumoralen Tumormikrogefäßen erst ab Tag 7 überhaupt eine endotheliale Glykokalix detektiert werden. Dabei zeigte sich, dass diese im Vergleich zu peritumoralen Mikrogefäßen (**Abb. 19 B** und **Abb. 20**), sowohl in ihrer Extension (**Abb. 21 B**) als auch in ihrer Dichte (**Abb. 21 C**) an Tag 7 schwächer ausgebildet war, sich an Tag 14 jedoch auf einem ähnlichen Niveau befand wie in Kapillaren und Venolen der peritumoralen Mikrozirkulation 14 Tage nach Tumorimplantation. Daraus kann man schlussfolgern, dass die Ausreifung intratumoraler Mikrogefäße und somit auch die endotheliale Glykokalix etwa eine Woche dauert, die Struktur der endothelialen Glykokalix dabei jedoch einem ähnlichen Schädigungsprozess im Zuge inflammatorischer Prozesse in der Zirkulation unterliegt wie in peritumoralen Mikrogefäßen.

### intratumorale Mikrogefäße



**Abb. 21: Expressionsanalyse der endothelialen Glykokalix in der intratumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.**

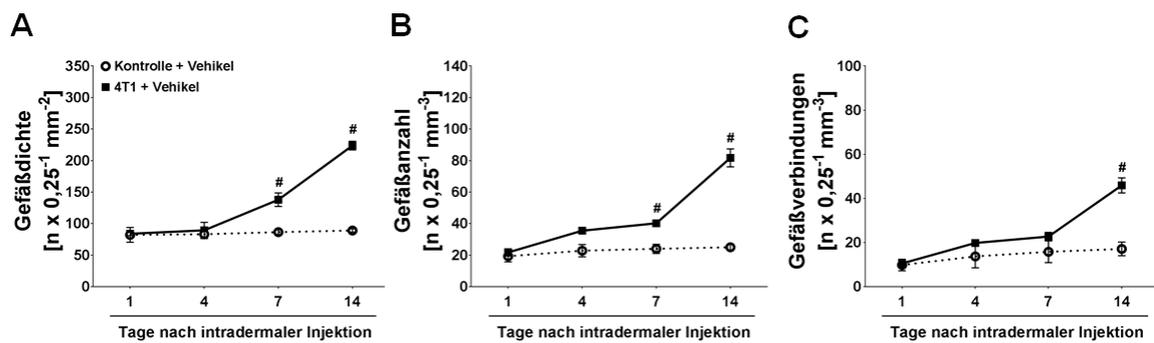
Repräsentative 2-Photonen-*In-vivo*-Mikroskopieaufnahme der endothelialen Glykokalix (WGA-Alexa-Fluor-488) in einem Tumormikrogefäß der unbehandelten Tumorgruppe 14 Tage nach intradermaler Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel (Maßstabsbalken: 10 µm) (A). Quantitative Auswertung der endothelialen Glykokalixextension (B) und -dichte (C) in Tumormikrogefäßen der unbehandelten Tumorgruppe (4T1 + Vehikel) 14 Tage nach intradermaler Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel (MW ± SEM bei n=6 pro Gruppe; # p < 0,05 vs. Tag 1).

## 2. Analyse der Angiogenese in der Tumormikrozirkulation des Mammakarzinoms

In der Tumorprogression stellt die Neoangiogenese einen entscheidenden Faktor dar. Jedoch weisen Tumorgefäße im Gegensatz zu physiologisch gebildeten Blutgefäßen sowohl in ihrem Aufbau als auch in ihrer Funktion einige Unterschiede auf. Daher wurde in einer weiteren Versuchsreihe die Gefäßarchitektur in der Tumormikrozirkulation des Mammakarzinoms mit einer intakten Mikrozirkulation verglichen. Zunächst wurde in einer Vehikelgruppe mit Hilfe der intravitralen 2-Photonenmikroskopie an den Tagen 1, 4, 7 und 14 nach intradermaler Vehikelinjektion (Kochsalzlösung) in die Ohrmuschel Übersichtsaufnahmen der intakten Mikrozirkulation erstellt. Als Parameter wurden die Anzahl der Gefäße und der Gefäßverbindungen sowie die durchschnittliche Gefäßlänge und -dichte (s. Kap. III./3.3.2.) erhoben. Um potentielle Unterschiede zwischen der Gefäßarchitektur einer gesunden, intakten Mikrozirkulation der Ohrmuschel sowie

der tumoralen Mikrozirkulation im heterotopen Tumormodell der Ohrmuschel aufzudecken, wurden in einer weiteren Versuchsgruppe Übersichtsaufnahmen der peritumoralen und intratumoralen Bereiche nach Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel erstellt (s. Kap. III/5.2.). Die quantitative Analyse ergab, dass sowohl die Gefäßdichte als auch die Anzahl der Gefäße und der Gefäßverbindungen bei der Kontrollgruppe während des gesamten Untersuchungszeitraumes konstant blieben (**Abb. 22 A, B und C**). Bei der unbehandelten Tumorgruppe waren an den Tagen 1 und 4 peritumoral zunächst keine signifikanten Veränderungen der Gefäßarchitektur im Vergleich zur intakten Mikrozirkulation der Ohrmuschel zu erkennen (**Abb. 22 A, B und C**). In der unmittelbaren Umgebung der Tumorzellinjektion wurden bis zu diesem Zeitpunkt noch keine Hinweise auf eine relevante Neoangiogenese gefunden. Die Auswertung ergab jedoch, dass die Anzahl der Gefäße und der Gefäßverbindungen sowie die Gefäßdichte in der peri- und intratumoralen Mikrozirkulation ab Tag 7 bis zum Ende der Untersuchungen an Tag 14 kontinuierlich und signifikant anstiegen (**Abb. 22 A, B, C und Abb. 23 D, E, F**), wohingegen die durchschnittliche Länge der unverzweigten Gefäßabschnitte abnahm (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise konnte zudem festgestellt werden, dass die Gefäßneubildung in der intratumoralen Mikrozirkulation im Vergleich zur peritumoralen Mikrozirkulation bis Tag 14 stärker ausgebildet war. Dies zeigte sich insbesondere an der stark zunehmenden intratumoralen Gefäßdichte, welche sich zwischen Tag 7 und Tag 14 nahezu verdoppelt hatte (**Abb. 23 D, E und F**). Diese Daten verdeutlichen, dass die Tumorneoangiogenese im Zuge der Tumorprogression innerhalb des Tumorgewebes stärker stimuliert wird als im umliegenden Tumorgewebe.

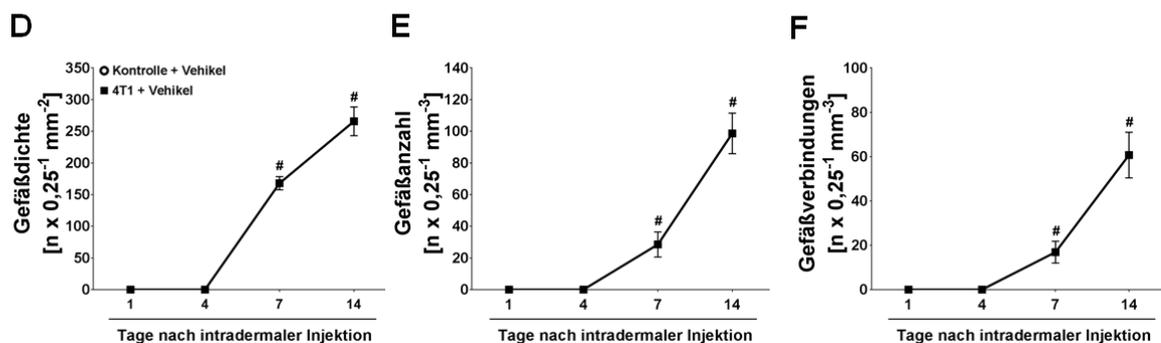
## peritumorale Mikrozirkulation



**Abb. 22: Analyse der Gefäßarchitektur in der peritumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.**

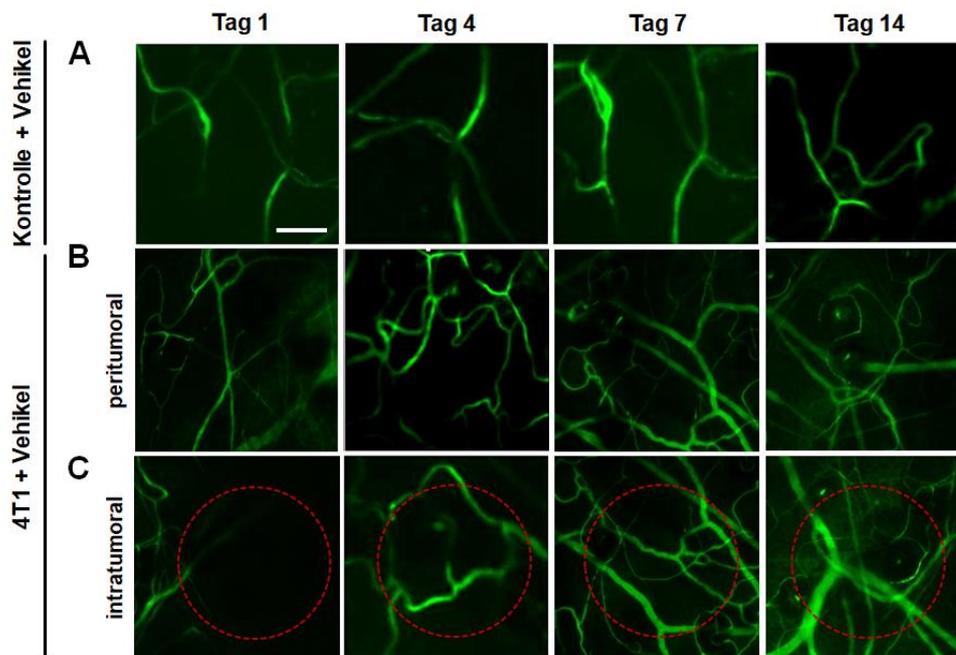
Quantitative Analyse der Gefäßarchitektur der intakten Mikrozirkulation der Ohrmuschel und der peritumoralen Mikrozirkulation des Mammakarzinoms im heterotopen Tumormodell der Ohrmuschel. Dargestellt ist die Gefäßdichte (A), die Gefäßanzahl (B) und die Anzahl der Gefäßverbindungen (C) der Kontrollgruppe (Kontrolle + Vehikel) und der unbehandelten Tumorgruppe (4T1 + Vehikel) an den Tagen 1, 4, 7 und 14 Tage nach intradermaler Tumorzell- bzw. NaCl-Injektion in die Ohrmuschel (MW  $\pm$  SEM bei n=6 pro Gruppe; #  $p < 0,05$  vs. Kontrolle + Vehikel desselben Untersuchungstages).

## intratumorale Mikrozirkulation



**Abb. 23: Analyse der Gefäßarchitektur in der intratumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.**

Quantitative Analyse der Gefäßarchitektur der intratumoralen Mikrozirkulation des Mammakarzinoms im heterotopen Tumormodell der Ohrmuschel. Dargestellt ist die Gefäßdichte (D), die Gefäßanzahl (E) und die Anzahl der Gefäßverbindungen (F) der unbehandelten Tumorgruppe (4T1+Vehikel) an den Tagen 1, 4, 7 und 14 Tage nach intradermaler Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel (MW  $\pm$  SEM bei einer Gruppengröße von n=6; #  $p < 0,05$  vs. Tag 1).



**Abb. 24: Repräsentative 2-Photonen *In-vivo*-Mikroskopieaufnahmen der Gefäßarchitektur der intakten Mikrozirkulation der Ohrmuschel und der Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.**

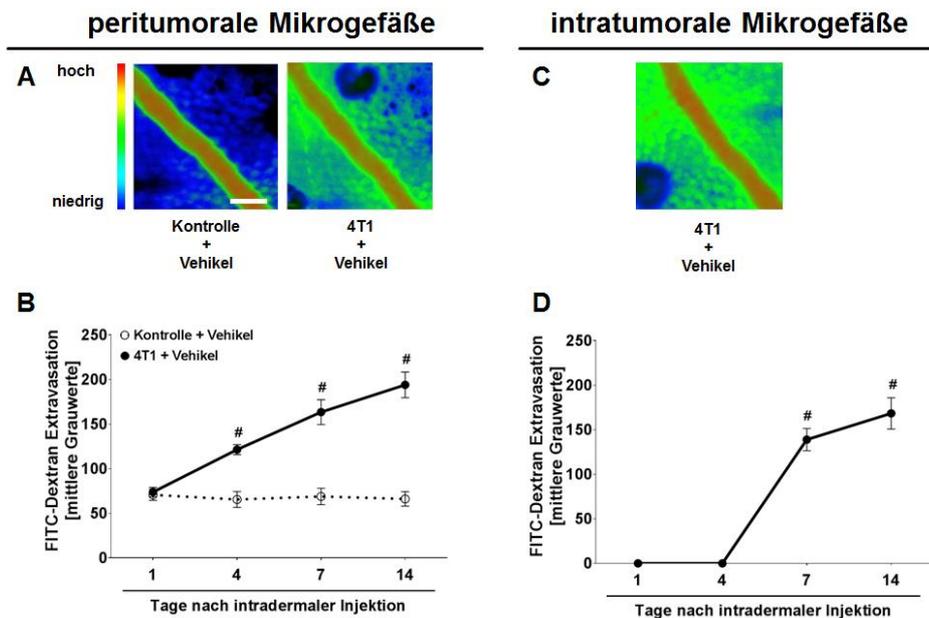
Repräsentative 2-Photonen-*In-vivo*-Mikroskopieaufnahmen der Gefäßarchitektur der intakten Mikrozirkulation der Ohrmuschel (A) sowie in der peritumoralen (B) und intratumoralen (C) Mikrozirkulation des Mammakarzinoms im heterotopen Mammakarzinommodell der Ohrmuschel (4T1 + Vehikel) an den Tagen 1, 4, 7 und 14 intradermaler Tumorzell- bzw. NaCl-Injektion in die Ohrmuschel (Maßstabsbalken: 100 µm). Die roten Kreise in den Aufnahmen der untersten Bildreihe (C) markieren den Bereich der Injektionsstelle.

### 3. Analyse der mikrovaskulären Permeabilität im Mammakarzinom

Eine erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität stellt ein entscheidendes pathophysiologisches Ereignis bei inflammatorischen Prozessen wie sie beispielsweise im Zuge einer malignen Tumorerkrankung auftreten, dar. Dabei kommt es zum verstärkten Flüssigkeits- und Plasmaproteineinstrom in den interstitiellen Raum mit nachfolgender Ödembildung, Leukozytenrekrutierung- und Infiltration sowie dem Einstrom von Nährstoffen, Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren ins Gewebe, welche Immunreaktionen, aber auch Wachstums- und Differenzierungsprozesse in Gang setzten [337]. Um die mikrovaskuläre Permeabilität im der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms zu

untersuchen, wurde mittels *In-vivo*-Epifluoreszenzmikroskopie die Extravasation des Makromoleküls FITC-Dextran (500.000 Da) (s. Kap. III/2.1.5. Tab. 6) in das perivaskuläre Gewebe der Ohrmuschel einer Kontrollgruppe und einer unbehandelten Tumorgruppe an den Tagen 1, 4, 7 und 14 nach intradermaler NaCl- bzw. Tumorzellinjektion in der Ohrmuschel analysiert (s. Kap. III/3.3.3.; 5.3.). Wasser und lösliche Plasmaproteine die größer als 70 kDa sind, werden unter physiologischen Bedingungen durch die intakte endotheliale Glykokalix, welche einen onkotischen Gradient aufbaut, abgestoßen, sodass diese in der Zirkulation verbleiben [278]. Da 70 % aller Plasmaproteine ein Molekulargewicht von etwa 40 bis 200 kDa aufweisen [56], kann FITC-Dextran mit einem Molekulargewicht von 500 kDa erst nach einer Schädigung der endothelialen Glykokalix und dem Verlust der Gefäßintegrität aus dem Blutstrom ins Gewebe übertreten.

In dieser Versuchsreihe kam es im Verlauf des Untersuchungszeitraumes bei der Tumorvehikelgruppe in der peritumoralen Mikrozirkulation des Mammakarzinoms zu einem kontinuierlichen und signifikanten Anstieg der mikrovaskulären Permeabilität (**Abb. 25 D und E**), welches sich durch die Menge an extravasiertem FITC-Dextran in das perivaskuläre Gewebe darstellte, wohingegen die Extravasation von FITC-Dextran bei der Kontrollgruppe zu allen Untersuchungszeitpunkten auf einem konstant niedrigen Niveau verblieb (**Abb. 25**). Innerhalb der Tumormikrozirkulation hingegen konnte ab Tag 7 ein sprunghafter Anstieg der FITC-Dextran-Extravasation ins perivaskuläre Gewebe der Ohrmuschel festgestellt werden, welches zeitlich mit dem ersten Nachweis von intratumoralen Mikrogefäßen zusammenfällt (Vergleich (Vgl.) Kap. IV/2. **Abb. 22**). Die FITC-Dextran-Extravasation in Tumormikrogefäßen war an den Tagen 7 und 14 im Vergleich zu Tag 1 signifikant erhöht (**Abb. 25B**). Zusammenfassend wird anhand dieser Ergebnisse deutlich, dass sich die mikrovaskuläre Permeabilität im Zuge der Mammakarzinomprogression und der damit verbundenen Tumorangio-genese kontinuierlich erhöht, wobei diese in intratumoralen Mikrogefäßen noch stärker ausgeprägt ist als in peritumoralen Mikrogefäßen.



**Abb. 25: Analyse der Gefäßpermeabilität in der Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.**

Repräsentative *In-vivo*-Epifluoreszenzmikroskopiebilder der FITC-Dextran Extravasation aus peritumoralen (A) und intratumoralen (C) Mikrogefäßen im heterotopen Mammakarzinommodell der Ohrmuschel der unbehandelten Tumorgruppe (4T1+Vehikel) sowie in der intakten Mikrozirkulation der Kontrollgruppe (Kontrolle+Vehikel) 14 Tage nach intradermaler Tumorzell- bzw. NaCl-Injektion in die Ohrmuschel (Maßstabsbalken links oben: 15 µm). Die Intensitätsskala rechts definiert die relative Fluoreszenzintensität von FITC als Maß für die FITC-Dextranextravasation (rot=hohe Extravasationsmenge; blau=niedrige Extravasation). Die Graphen zeigen die FITC-Dextran-Extravasation aus peritumoralen (B) und intratumoralen (D) Mikrogefäßen im Vergleich zur intakten Mikrozirkulation der Ohrmuschel an den Tagen 1, 4, 7 und 14 Tage nach intradermaler Tumorzell- bzw. NaCl-Injektion in die Ohrmuschel (MW ± SEM bei n=6 pro Gruppe; # p < 0,05 vs. Kontrolle + Vehikel desselben Untersuchungstages in B; # p < 0,05 vs. Tag 1 in D).

#### 4. Analyse der Rekrutierung von Thrombozyten und Leukozyten in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms

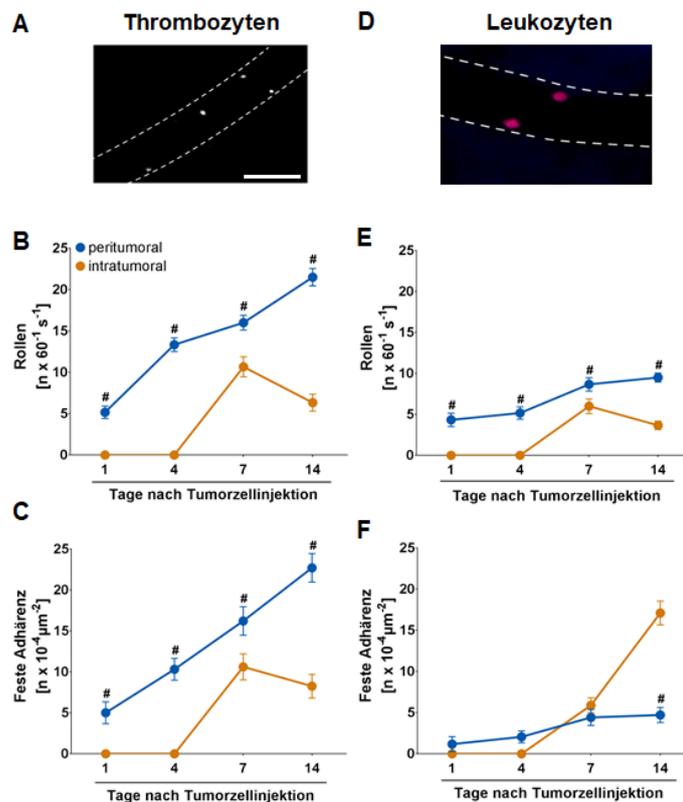
Da aus vorangegangenen Studien bereits bekannt ist, dass unterschiedliche Leukozytensubpopulationen und Thrombozyten von großer Bedeutung für die Progression maligner Tumoren sind [134] [223] und die Glykokalix das Trafficking von Leukozyten und Thrombozyten unter inflammatorischen Bedingungen beeinflussen kann, wurden in dieser Versuchsreihe zunächst intravaskuläre Schritte der Rekrutierung von Leukozyten (CD45<sup>+</sup> Zellen) und Thrombozyten in die peri- und intratumorale Mikrozirkulation des Mammakarzinoms im heterotopen

Tumormodell der Ohrmuschel an den Tagen 1, 4, 7 und 14 nach intradermaler Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel mittels *In-vivo*-Epifluoreszenzmikroskopie analysiert (s. Kap. III./ 3.3.4.; 5.4.).

Die quantitative Analyse ergab, dass es in der peritumoralen Mikrozirkulation ab Tag 1 zu einem annähernd linearen Anstieg des intravaskulären Rollens und festen Adhärenz von Thrombozyten kam. Die Anzahl der rollenden und fest adhärenen Thrombozyten war dabei im Vergleich zur intratumoralen Thrombozytenrekrutierung des jeweils gleichen Untersuchungstages signifikant erhöht (**Abb. 26 B** und **C**). Eine intratumorale Thrombozytenrekrutierung konnte erst 7 Tage nach intradermaler Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel beobachtet werden, welches, vergleichbar zur mikrovaskulären Permeabilität, zeitlich mit dem Auftreten intratumoraler Mikrogefäße assoziiert ist (Vgl. Kap. IV/2. **Abb. 22**). Die Anzahl der rollenden und fest adhärenen Thrombozyten stieg zunächst sprunghaft an, fiel dann jedoch bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes wieder ab (**Abb. 26 B** und **C**).

Im Vergleich zur Thrombozytenrekrutierung zeigte sich in der peritumoralen Mikrozirkulation ab Tag 1 ein zeitlich verzögerter, schwächerer Anstieg der Anzahl intravaskulär rollender und fest adhärenen CD45<sup>+</sup> Leukozyten. Vergleichbar zur Thrombozytenrekrutierung konnte eine intratumorale Leukozytenrekrutierung erst ab Tag 7 beobachtet werden. Dabei stieg die Anzahl der rollenden Leukozyten zunächst auf ein ähnliches Niveau wie in der peritumoralen Mikrozirkulation und fiel anschließend bis Tag 14 wieder ab. Im Gegensatz dazu stieg die intratumorale Anzahl der fest adhärenen Leukozyten ab Tag 7 exponentiell an (**Abb. 26 E** und **F**).

Zusammenfassend wurde in dieser Versuchsreihe deutlich, dass die intravaskuläre Rekrutierung von Thrombozyten und Leukozyten im experimentellen Mammakarzinom zeitabhängig zunimmt. Die Zellrekrutierung konnte dabei in der peritumoralen Mikrozirkulation bereits ab Tag 1 beobachtet werden, wohingegen innerhalb der Tumormikrozirkulation erst 7 Tage nach intradermaler Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel rollende und fest adhärenen Zellen detektiert werden konnten.



**Abb. 26: Analyse der Rekrutierung von Thrombozyten und Leukozyten in der Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.**

Repräsentative *In-vivo*-Epifluoreszenzmikroskopieaufnahmen der Rekrutierung von Thrombozyten (A) und Leukozyten (D) in peritumoralen Venolen und intratumoralen Mikrogefäßen des Mammakarzinoms (Maßstabsbalken: 20 μm). Die Graphen zeigen die Anzahl intravaskulär rollender Thrombozyten (B) und Leukozyten (E) sowie die Anzahl fest adhärenter Thrombozyten (C) und Leukozyten (F) in peritumoralen Venolen und intratumoralen Mikrogefäßen des Mammakarzinoms 1, 4, 7 und 14 Tage nach intradermaler Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel (MW ± SEM bei n=6 pro Gruppe; # p < 0,05 vs. intratumoral desselben Untersuchungstages).

## 5. Analyse der Rekrutierung von Thrombozyten und myeloider Leukozytensubpopulationen in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms

Ähnlich wie bei akuten Entzündungsreaktionen, werden auch bei Krebserkrankungen Thrombozyten und unterschiedliche Leukozytensubpopulationen im Rahmen einer chronischen Entzündungsreaktion in die Tumormikrozirkulation rekrutiert [338] [339]. Aufgrund ihrer hohen funktionellen

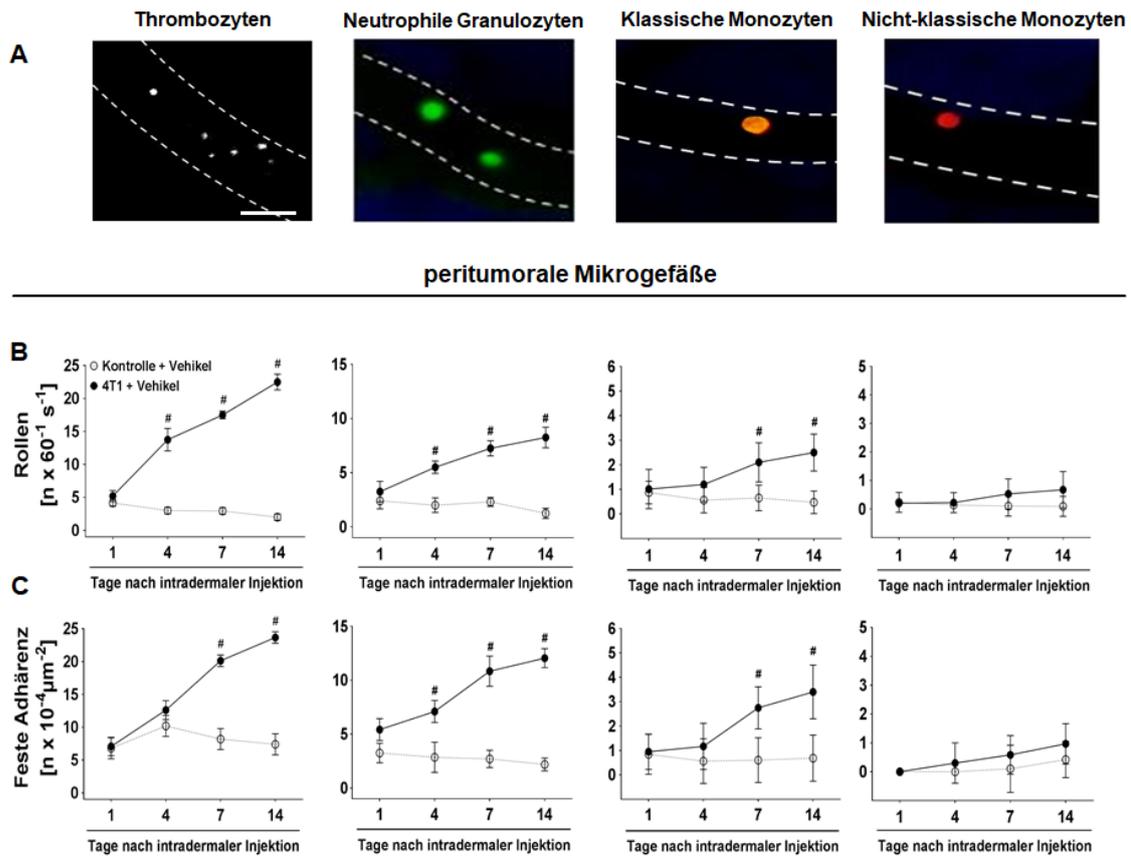
Plastizität sind sie jedoch nicht ausschließlich an der Elimination neoplastischer Zellen beteiligt, sondern tragen ihrerseits unter Einfluss der Tumorumgebung zur Tumorprogression bei [223].

Auf Basis der vorangegangenen Ergebnisse zur Rekrutierung von Thrombozyten und Leukozyten in die Mikrozirkulation des Mammakarzinoms im Ohrmodell (s.Kap. IV./ 4.), welche verdeutlichen, dass dieser intravaskuläre Prozess sowohl in der peritumoralen als auch in der intratumoralen Mikrozirkulation stattfindet, wurde in weiteren Versuchen die Rekrutierung von Thrombozyten sowie von myeloiden und lymphozytären Leukozytensubpopulationen über die Zeit genauer untersucht. Da aktuelle Studien sowohl für Thrombozyten als auch für neutrophile Granulozyten und unterschiedliche Monozytensubpopulationen eine bedeutende Rolle in der Tumorprogression nachweisen konnten [138] [136], erfolgte in einer ersten Versuchsreihe die Aufschlüsselung myeloider Leukozytensubpopulationen. Dabei wurden neutrophile Granulozyten sowie klassische und nicht-klassische Monozyten genauer betrachtet.

Bei den Analysen der intakten Ohrmuschelmikrozirkulation der Kontrollgruppe konnte an Tag 1 nach intradermaler NaCl-Injektion in die Ohrmuschel sowohl bei Thrombozyten als auch bei allen drei untersuchten myeloiden Leukozytensubpopulationen initial ein leichtes Rollen festgestellt werden, das quantitativ mit den Ergebnissen der unbehandelten Tumorguppe an Tag 1 vergleichbar war. In den Kontrolltieren verringerte sich die Anzahl der rollenden Thrombozyten und myeloiden Leukozyten im weiteren Untersuchungsverlauf über 14 Tage hinweg geringfügig (**Abb. 27 B**), wohingegen bei den unbehandelten Tumortieren ein kontinuierlicher Anstieg der untersuchten Zellpopulationen über den gesamten Untersuchungszeitraum beobachtet werden konnte (**Abb. 27 C**). Die Anzahl der fest adhärennten Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten sowie klassischen und nicht-klassischen Monozyten am Endothel der Kontrollgruppe war an Tag 1 mit der unbehandelten Tumorguppe vergleichbar (**Abb. 27 B**). Diese reduzierte sich jedoch bei allen drei myeloiden Leukozytensubpopulationen bis zu Tag 14 auf ein niedriges und annähernd konstantes Niveau (**Abb. 27 C**). Interessanterweise konnte festgestellt werden, dass die Anzahl der fest adhärennten Thrombozyten im Gegensatz zu den myeloiden Leukozyten in der

Kontrollgruppe noch bis Tag 4 auf ein ähnliches Niveau wie bei der unbehandelten Tumorguppe anstieg, sich erst anschließend bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes an Tag 14 wieder stetig verringerte (**Abb. 27 C**).

Die genauere Betrachtung der Ergebnisse der unbehandelten Tumorguppe ergab, dass neutrophile Granulozyten sowohl in der peritumoralen als auch in der intratumoralen Mikrozirkulation den Hauptanteil der intravaskulär rekrutierten myeloiden Leukozytenpopulation ausmachten, wohingegen klassische Monozyten einen kleineren Anteil und nicht-klassische Monozyten den kleinsten Anteil repräsentierten (**Abb. 27 B** und **C**). Die Ergebnisse der Thrombozytenrekrutierung stimmten mit den Ergebnissen aus der vorherigen Versuchsreihe (s. IV./ 4.) im Wesentlichen überein (**Abb. 27 B** und **C**). Bei der sequenziellen Ermittlung des intravaskulären Rollens (**Abb. 27 B**) und der festen Adhärenz (**Abb. 26 C**) in der peritumoralen Mikrozirkulation über einen Gesamtuntersuchungszeitraum von 14 Tagen zeigte sich bei allen drei Leukozytensubpopulationen ebenso wie bei Thrombozyten ein kontinuierlicher - und mit Ausnahme der nicht-klassischen Monozyten - signifikanter Anstieg, welcher an Tag 14 den Höhepunkt erreichte (**Abb. 26 B** und **C**). Die Reaktion der klassischen und nicht-klassischen Monozyten erfolgte im Vergleich zur Rekrutierung von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten langsamer. Diese zeitlich verzögerte Reaktion auf einen Entzündungsreiz ist bereits aus anderen Studien bekannt [340].



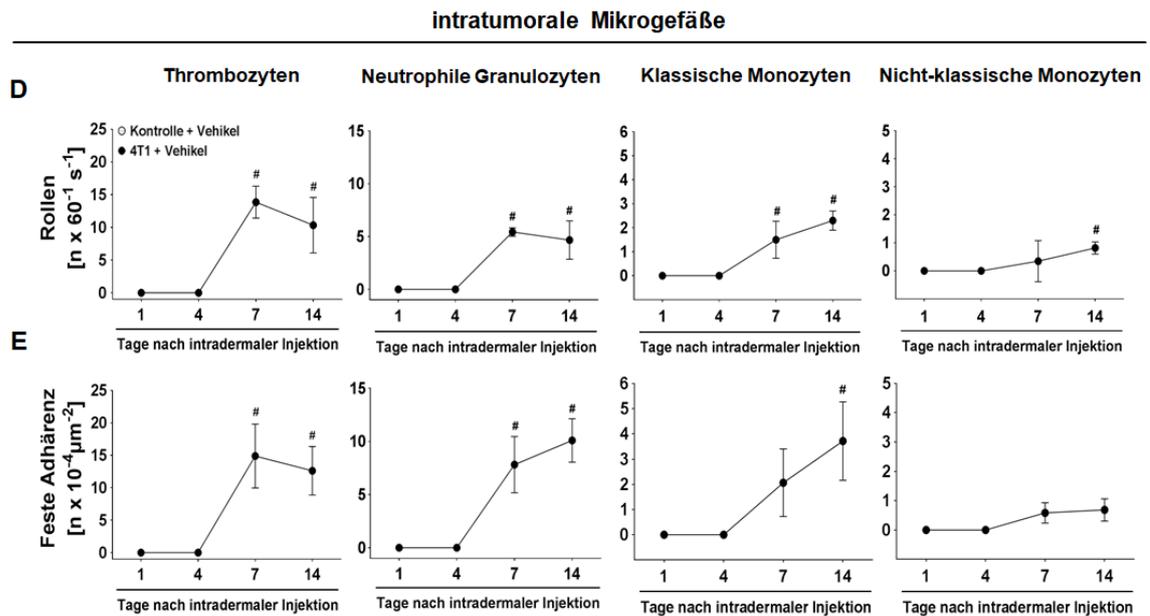
**Abb. 27: Analyse der Rekrutierung von Thrombozyten und myeloiden Leukozytensubpopulationen in der peritumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.**

Repräsentative *In-vivo*-Epifluoreszenzmikroskopieaufnahmen der Rekrutierung von Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten, klassischen Monozyten und nicht-klassischen Monozyten in der intakten Mikrozirkulation der Ohrmuschel sowie in peritumoralen Mikrogefäßen des Mammakarzinoms (Maßstabsbalken: 20 μm) (**A**). Die Graphen zeigen die Anzahl intravaskulär rollender (**B**) und fest adhärenter (**C**) Thrombozyten, neutrophiler Granulozyten, klassischer Monozyten und nicht-klassischer Monozyten in der intakten Mikrozirkulation der Ohrmuschel der Kontrollgruppe (Kontrolle + Vehikel) sowie in peritumoralen Mikrogefäßen des Mammakarzinoms 1, 4, 7 und 14 Tage nach intradermaler NaCl- bzw. Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel (MW ± SEM bei n=6 pro Gruppe; # p < 0,05 vs. Kontrolle + Vehikel desselben Untersuchungstages).

Innerhalb der Tumormikrozirkulation konnte bei Tumortieren eine intravaskuläre Rekrutierung von Thrombozyten, neutrophiler Granulozyten sowie klassischer und nicht-klassischer Monozyten erst ab Tag 7 detektiert werden (**Abb. 28 D und E**). Dabei zeigte sich, dass die Anzahl der rollenden neutrophilen Granulozyten von Tag 7 bis Tag 14 auf einem ähnlich hohen Niveau bleibt (**Abb. 28 D**). Die Anzahl der fest adhärenter neutrophiler Granulozyten dagegen stieg bis Tag 14

kontinuierlich an, wobei ihre Anzahl am Ende der Untersuchungen fast doppelt so hoch war wie die der rollenden neutrophilen Granulozyten (**Abb. 28 D** und **E**). Bei klassischen Monozyten konnte ein stetiger Anstieg sowohl der rollenden als auch der fest adhärenen Zellen beobachtet werden, wobei die Anzahl der fest adhärenen Zellen am Tag 14 höher war als die der rollenden Zellen dieser Leukozytensubpopulation (**Abb. 28 E**). Bei der Rekrutierung von nicht-klassischen Monozyten konnte insgesamt nur ein sehr schwacher Effekt hinsichtlich des Rollens an Tag 14 ohne signifikante Veränderung der festen Adhärenz im Rahmen des Untersuchungszeitraums festgestellt werden (**Abb. 28 D** und **E**).

Insgesamt verdeutlicht diese Versuchsreihe, dass Thrombozyten, neutrophile Granulozyten sowie klassische und nicht-klassische Monozyten über die Zeit hinweg zunehmend in die Tumorumgebung rekrutiert werden. Dabei werden Thrombozyten quantitativ am stärksten in die peritumorale und intratumorale Mikrozirkulation rekrutiert. Den Hauptanteil der intravaskulär rekrutierten myeloiden Leukozytenpopulation sowohl in der peritumoralen als auch in der intratumoralen Mikrozirkulation stellen neutrophile Granulozyten dar, wohingegen klassische Monozyten einen kleineren Anteil und nicht-klassische Monozyten den kleinsten Anteil repräsentierten (**Abb. 28 B** und **C**).



**Abb. 28: Analyse der Rekrutierung von Thrombozyten und myeloiden Leukozytensubpopulationen in der intratumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.**

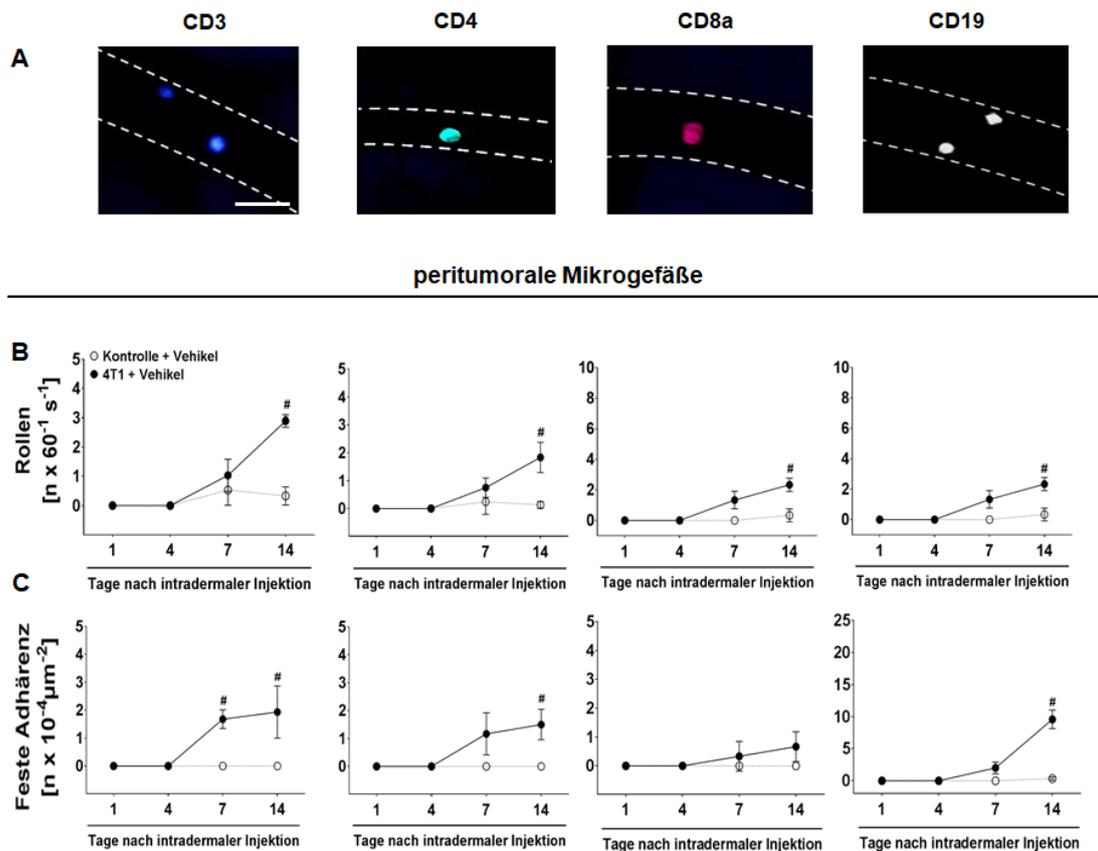
Die Graphen zeigen die Anzahl intravaskulär rollender (D) und fest adhärenter (E) Thrombozyten, neutrophiler Granulozyten, klassischer Monozyten und nicht-klassischer Monozyten in intratumoralen Mikrogefäßen des Mammakarzinoms 1, 4, 7 und 14 Tage nach intradermaler Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel (MW  $\pm$  SEM bei n=6 pro Gruppe; # p < 0,05 vs. Tag 1).

## 6. Analyse der Lymphozytenrekrutierung in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms

Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass neben myeloiden Leukozyten auch lymphozytäre Leukozyten relevant für die Entstehung und Progression von malignen Tumoren sind [341] [342]. Deshalb wurde ergänzend zur Analyse der Rekrutierung myeloider Leukozytensubpopulationen (s. Kap. IV./ 5.) in einer nachfolgenden Versuchsreihe die intravaskuläre Rekrutierung relevanter Lymphozytensubpopulationen in der Tumormikrozirkulation des Mammakarzinoms im Ohrmodell sowie in der intakten Mikrozirkulation der Ohrmuschel untersucht. Folgende Lymphozytenuntergruppen wurden differenziert: B-Lymphozyten (CD19<sup>+</sup> Lymphozyten) sowie T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten) und zytotoxische T-Zellen (CD8a<sup>+</sup> T-Lymphozyten) als die zwei wichtigsten Untergruppen von T-Lymphozyten (CD3<sup>+</sup> Lymphozyten).

In der Umgebung der intradermalen NaCl-Injektion der Kontrollgruppe zeigten sich über den gesamten Untersuchungszeitraum nur vereinzelt intravaskulär rollende oder fest adhärenen Lymphozyten (**Abb. 29 B** und **C**). Bei der unbehandelten Tumorgruppe stieg die Anzahl aller intravaskulär rollenden Lymphozyten in der peritumoralen Mikrozirkulation ab Tag 7 bis Tag 14 kontinuierlich, aber nicht signifikant an. Interessanterweise findet sich an Tag 14 jedoch ein starker Anstieg der Anzahl der fest adhärenen CD19<sup>+</sup> B-Lymphozyten in den peritumoralen Mikrogefäßen (**Abb. 29 C**).

Bei der unbehandelten Tumorgruppe konnte beobachtet werden, dass die lymphozytäre Leukozytenrekrutierung sowohl in der peritumoralen als auch in der intratumoralen Mikrozirkulation erst ab Tag 14 – und somit deutlich später als die Rekrutierung myeloider Leukozyten und Thrombozyten – signifikant anstieg (Vgl. Kap. IV/ 5.). Es ist jedoch bereits bekannt, dass die initiale Rekrutierung von Lymphozyten aufgrund ihrer Zugehörigkeit zum spezifischen, adaptiven Immunsystem prinzipiell länger dauert als die Aktivierung von myeloiden Leukozyten des unspezifischen, angeborenen Immunsystems [154].

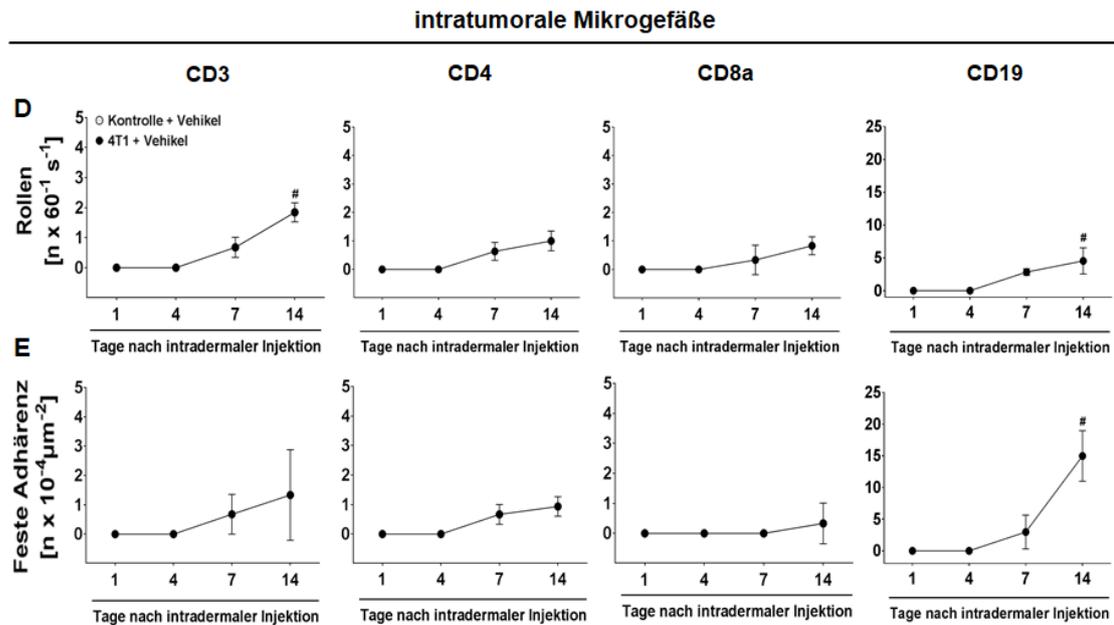


**Abb. 29: Analyse der Lymphozytenrekrutierung in der peritumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.**

Repräsentative *In-vivo*-Epifluoreszenzmikroskopieaufnahmen der Rekrutierung von CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8a<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup> Lymphozyten in der intakten Mikrozirkulation der Ohrmuschel sowie in peritumoralen Mikrogefäßen des Mammakarzinoms (Maßstabsbalken: 20  $\mu\text{m}$ ) (**A**). Die Graphen zeigen die Anzahl rollender (**B**) und fest adhärenter (**C**) CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8a<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup> Lymphozyten in der intakten Mikrozirkulation der Ohrmuschel der Kontrollgruppe (Kontrolle + Vehikel) sowie in peritumoralen Mikrogefäße des Mammakarzinoms 1, 4, 7 und 14 Tage nach intradermaler NaCl- bzw. Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel (MW  $\pm$  SEM bei n=6 pro Gruppe; # p < 0,05 vs. Kontrolle + Vehikel desselben Untersuchungstages).

Auch innerhalb der Tumormikrozirkulation setzte die Lymphozytenrekrutierung erst ab Tag 7 ein. Die Anzahl aller rollender und fest adhärenter Lymphozyten stieg dabei geringfügig, aber kontinuierlich bis Tag 14 an (**Abb. 29 D** und **E**). Die Ausnahme stellten CD19<sup>+</sup> B-Lymphozyten dar, welche vergleichbar zur peritumoralen Mikrozirkulation, hinsichtlich des intravaskulären Rollens, aber insbesondere bezüglich der intravaskulären festen Adhärenz an Tag 14 eine signifikante Erhöhung zeigten (**Abb. 29 E**). Die Anzahl fest adhärenter B-Lymphozyten in intratumoralen Mikrogefäßen war jedoch fast 50 % höher als in der peritumoralen Mikrozirkulation (**Abb. 28 C** und **E**).

Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass eine Rekrutierung lymphozytärer Leukozytensubpopulationen sowohl in die peritumorale als auch in die intratumorale Mikrozirkulation erfolgt, wobei diese im Vergleich zu myeloiden Leukozytensubpopulationen erst nach etwa einer Woche und in geringerer Anzahl rekrutiert werden.



**Abb. 30: Analyse der Lymphozytenrekrutierung in der intratumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.**

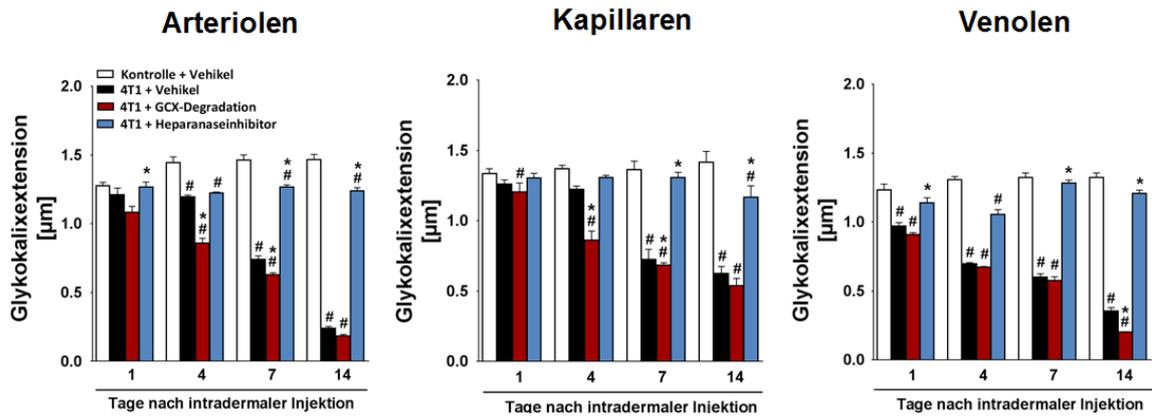
Die Graphen zeigen die Anzahl intravaskulär rollender (D) und fest adhärenter (E) CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8a<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup> Lymphozyten in intratumoralen MikrogefäÙen des Mammakarzinoms 1, 4, 7 und 14 Tage nach intradermaler Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel (MW ± SEM bei n=6 pro Gruppe; # p < 0,05 vs. Tag 1).

## 7. Expressionsanalyse der endothelialen Glykokalix unter Modulation ihrer Struktur in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms

Als feines Netzwerk auf der innersten Schicht der GefäÙwand bildet die Glykokalix auf Endothelzellen eine Schutzbarriere und fungiert darüber hinaus als Regulator der GefäÙintegrität [261] [278]. Dabei ist sie aufgrund ihrer fragilen Struktur jedoch sehr empfindlich gegenüber Einflüssen aus der Umgebung, wobei

inflammatorische Prozesse wie beispielsweise im Rahmen maligner Tumorerkrankungen ihre Struktur schädigen und somit zu ihrem Funktionsverlust führen [291]. Um die Expression der endothelialen Glykokalix unter Modulation ihrer Struktur in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms im heterotopen Tumormodell der Ohrmuschel zu analysieren, wurde diese im Anschluss an die Analyse der endothelialen Glykokalix in der intakten Mikrozirkulation der Ohrmuschel sowie in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms im heterotopen Tumormodell der Ohrmuschel in einer nächsten Versuchsreihe bei zwei unterschiedlich behandelten Tumorgruppen untersucht. Hierfür wurde eine Tumorgruppe zur Protektion der Glykokalix über 14 Tage systemisch mit einem niedermolekularen Heparanaseinhibitor behandelt, wohingegen eine andere Tumorgruppe zur Förderung der Glykokalixdegradationen über denselben Zeitraum systemisch mit einer Enzym-Mischung aus Heparinase III, Hyaluronidase und Neuraminidase behandelt wurde. Dabei zeigte sich bei der Tumorgruppe, welche zur Protektion der Glykokalix alle zwei Tage mit einem niedermolekularen Heparanaseinhibitor behandelt wurde, dass die Extension der endothelialen Glykokalix in Arteriolen, Kapillaren und Venolen der peritumoralen Mikroirkulation mit geringen Schwankungen über den gesamten Untersuchungszeitraum von 14 Tagen ähnlich wie bei der Kontrollgruppe auf einem konstanten Niveau blieb (**Abb. 31**). Bei der Tumorgruppe, welche alle vier Tage systemisch mit einem Enzym-Mix zur Förderung der Glykokalixdegradation behandelt wurde, zeigte sich im Verlauf von 14 Tagen insgesamt eine kontinuierliche Reduktion der endothelialen Glykokalixextension. Die Reduktion war hierbei in Venolen und auch im Vergleich zu den drei anderen untersuchten Gruppen am stärksten (**Abb. 31**). In Kapillaren erwies sich die endotheliale Glykokalix an Tag 14 sowohl hinsichtlich ihrer Extension als auch ihrer Dichte insgesamt am stabilsten (**Abb. 31** und **32**). Die Expression der endothelialen Glykokalixextension der Kontroll- und der unbehandelten Tumorvehikelgruppe war mit geringfügigen Varianzen vergleichbar mit den Werten der ersten Versuchsreihe (Vgl. Kap. IV/ 1.).

## peritumorale Mikrogefäße

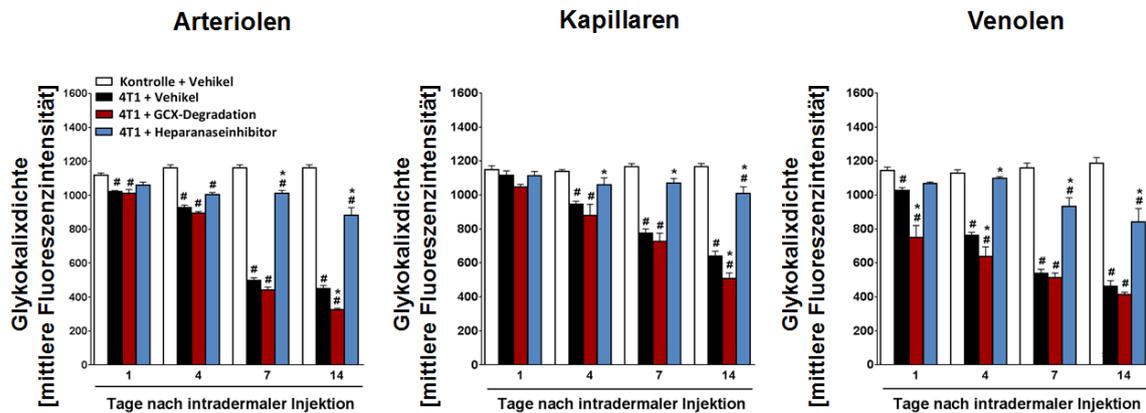


**Abb. 31: Expressionsanalyse der endothelialen Glykokalixextension unter Modulation ihrer Struktur in der peritumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.**

Die Graphen zeigen die Expression der endothelialen Glykokalixextension in peritumoralen Mikrogefäßen der Kontrollgruppe (Kontrolle + Vehikel), der unbehandelten Tumorguppe (4T1 + Vehikel), der Tumorguppe mit spezifischer Förderung der systemischen Glykokalixdegradation (4T1 + GCX-Degradation) und der Tumorguppe mit systemischer Glykokalixprotektion (4T1 + Heparanaseinhibitor) 1, 4, 7 und 14 Tage nach intradermaler Tumorzell- bzw. NaCl-Injektion in die Ohrmuschel (MW  $\pm$  SEM bei n=6 pro Gruppe; # p < 0,05 vs. Kontrolle + Vehikel desselben Untersuchungstages; \* p < 0,05 vs. 4T1 + Vehikel desselben Untersuchungstages).

In der Kontrollgruppe zeigte sich über den Untersuchungszeitraum von 14 Tagen eine stabile endotheliale Glykokalix auch hinsichtlich der Expressionsdichte der endothelialen Glykokalix in Arteriolen, Kapillaren und Venolen. Dagegen wurde bei der unbehandelten Tumorguppe in allen drei Gefäßtypen eine kontinuierliche Reduktion sowohl bezüglich der Extension als auch der Dichte der endothelialen Glykokalix festgestellt. Durch die Verabreichung des Glykokalix-degradierenden Enzym-Mixes konnte in allen Gefäßen auch im Vergleich zur unbehandelten Tumorguppe insgesamt eine zusätzliche Reduktion der Glykokalixdichte auf dem Endothel induziert werden (**Abb. 32**). Interessanterweise blieb die Expressionsdichte der endothelialen Glykokalix durch die systemische Verabreichung des Heparanaseinhibitors über den gesamten Untersuchungszeitraum von 14 Tagen in allen drei Gefäßarten, insbesondere in Kapillaren, im Vergleich zur Expressionsdichte der Glykokalix in der Kontrollgruppe insgesamt stabil (**Abb. 32**).

## peritumorale Mikrogefäße

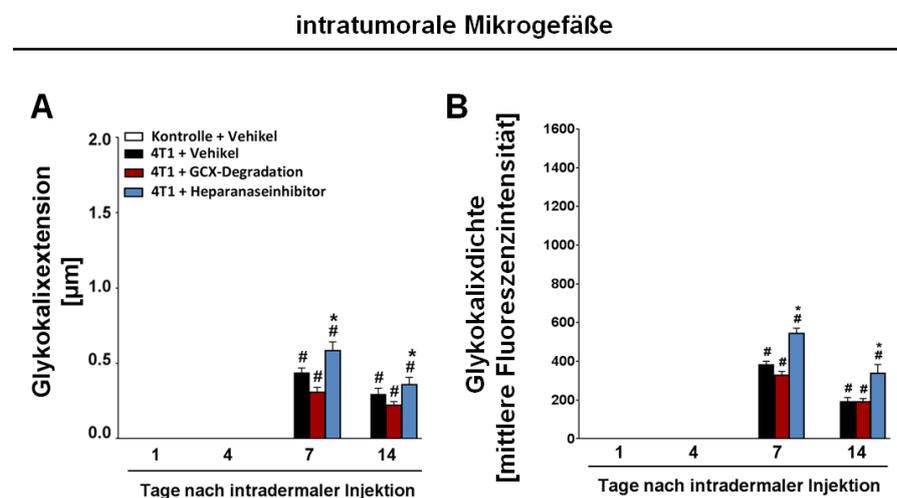


**Abb. 32: Expressionsanalyse der endothelialen Glykokalixdichte unter Modulation ihrer Struktur in der peritumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.**

Die Graphen zeigen die Expression der endothelialen Glykokalixdichte in peritumoralen Mikrogefäßen der Kontrollgruppe (Kontrolle + Vehikel), der unbehandelten Tumorgruppe (4T1 + Vehikel), der Tumorgruppe mit spezifischer Förderung der systemischen Glykokalixdegradation (4T1 + GCX-Degradation) und der Tumorgruppe mit systemischer Glykokalixprotektion (4T1 + Heparanaseinhibitor) 1, 4, 7 und 14 Tage nach intradermaler Tumorzell- bzw. NaCl-Injektion in die Ohrmuschel (MW  $\pm$  SEM bei n=6 pro Gruppe; # p < 0,05 vs. Kontrolle + Vehikel desselben Untersuchungstages; \* p < 0,05 vs. 4T1 + Vehikel desselben Untersuchungstages).

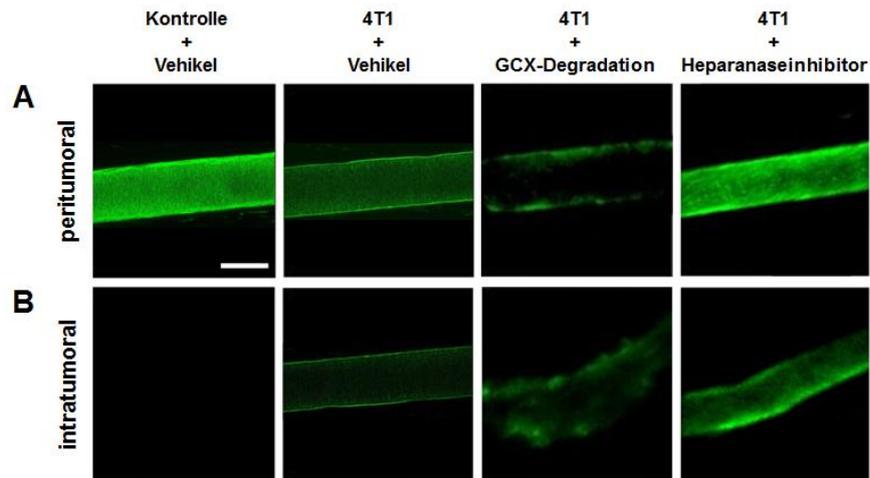
Eine endotheliale Glykokalix konnte in intratumoralen Mikrogefäßen, vergleichbar wie in der Versuchsreihe zur Expression der endothelialen Glykokalix in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms (s. Kap.IV/1.) erst ab Tag 7 detektiert werden (**Abb. 33**). Diese war sowohl hinsichtlich ihrer Expression (**Abb. 33 A**) als auch ihrer Dichte (**Abb. 33 B**) bei der Tumorgruppe, welche mit dem Heparanaseinhibitor behandelt wurde, am stärksten ausgebildet. Bei der Tumorgruppe, welche mit der Glykokalix-degradierenden Enzym-Mischung behandelt wurde, konnte man an Tag 7 erkennen, dass sich diese im Vergleich zu den beiden anderen Tumorgruppen langsamer entwickelte, die Dichte der endothelialen Glykokalix an Tag 14 jedoch dasselbe Niveau wie die unbehandelte Tumorvehikelgruppe erreichte (**Abb. 33 B**). Die Extension der endothelialen Glykokalix konnte durch die Verabreichung der Enzym-Mischung im Vergleich zu beiden anderen Tumorgruppen nicht nur verlangsamt, sondern auch reduziert werden (**Abb. 33 A**).

Zusammenfassend konnte in dieser Versuchsreihe festgestellt werden, dass sich die endotheliale Glykokalix sowohl in der peritumoralen als auch in der intratumoralen Mikrozirkulation des experimentellen Mammakarzinoms modulieren lässt. Durch die spezifische Förderung der systemischen Glykokalixdegradation konnte sowohl die Extension als auch die Dichte der endothelialen Glykokalix in peritumoralen Mikrogefäßen im Vergleich zur unbehandelten Tumorvehikelgruppe über den gesamten Untersuchungszeitraum kontinuierlich verstärkt werden, wobei dieser Effekt in Venolen am stärksten ausgeprägt war. In intratumoralen Gefäßen bewirkte die repetitive systemische Verabreichung des Enzym-Mixes eine Verlangsamung der Bildung einer endothelialen Glykokalix. Durch die pharmakologische Protektion der Glykokalix konnte die mammarkarzinom-induzierte Reduktion der endothelialen Glykokalix in peritumoralen Mikrogefäßen im Vergleich zur unbehandelten Tumorvehikelgruppe sowie der Tumorgruppe mit spezifischer Förderung der systemischen Glykokalixdegradation nahezu verhindert werden, wobei der Effekt in Kapillaren am deutlichsten ausgeprägt war. In intratumoralen Gefäßen konnte sogar eine Syntheseförderung der endothelialen Glykokalix beobachtet werden.



**Abb. 33: Expressionsanalyse der endothelialen Glykokalix unter Modulation ihrer Struktur in der intratumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.**

Die Graphen zeigen die Expression der endothelialen Glykokalixextension (A) und -dichte (B) in Tumormikrogefäßen der unbehandelten Tumorgruppe (4T1 + Vehikel), der Tumorgruppe mit spezifischer Förderung der systemischen Glykokalixdegradation (4T1 + GCX-Degradation) und der Tumorgruppe mit systemischer Glykokalixprotektion (4T1 + Heparanaseinhibitor) 1, 4, 7 und 14 Tage nach intradermaler Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel (MW  $\pm$  SEM bei n=6 pro Gruppe; # p < 0,05 vs. Tag 1; \* p < 0,05 vs. 4T1 + Vehikel desselben Untersuchungstages).



**Abb. 34: Repräsentative 2-Photonen *In-vivo*-Mikroskopieaufnahmen der endothelialen Glykokalixexpression unter Modulation ihrer Struktur in der Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.**

Repräsentative 2-Photonen-*In-vivo*-Mikroskopieaufnahmen der Expression der endothelialen Glykokalix in peritumoralen Venolen (**A**) und, falls vorhanden, intratumoralen Mikrogefäßen (**B**) der Kontrollgruppe (Kontrolle + Vehikel), der unbehandelten Tumorvehikelgruppe (4T1 + Vehikel), der Tumorgruppe mit spezifischer Förderung der systemischen Glykokalixdegradation (4T1 + GCX-Degradation) und der Tumorgruppe mit systemischer Glykokalixprotektion (4T1 + Heparanaseinhibitor) 14 Tage nach intradermaler Tumorzell- bzw. NaCl-Injektion in die Ohrmuschel (Maßstabsbalken: 15 µm).

## **8. Analyse der Angiogenese in der Tumormikrozirkulation des Mammakarzinoms unter Modulation der Glykokalixstruktur**

Die Glykokalix auf Endothelzellen reguliert als essentieller Bestandteil der Gefäßintegrität zahlreiche Wachstumsprozesse im Gewebe wie beispielsweise die Bildung neuer Blutgefäße [289] [278]. Um die Bedeutung der Glykokalix für die Angiogenese in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms zu untersuchen, wurden, analog zu den in Kapitel IV./2. beschriebenen Versuchen, Analysen unter Modulation der Glykokalixstruktur durchgeführt. In Ergänzung zu einer Kontrollgruppe und einer unbehandelten Tumorvehikelgruppe wurde hierfür die Entwicklung der Gefäßarchitektur an den Tagen 1, 4, 7 und 14 nach intradermaler Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel bei einer Tumorgruppe unter Protektion der Glykokalix und einer Tumorgruppe unter Förderung der Glykokalixdegradation analysiert.

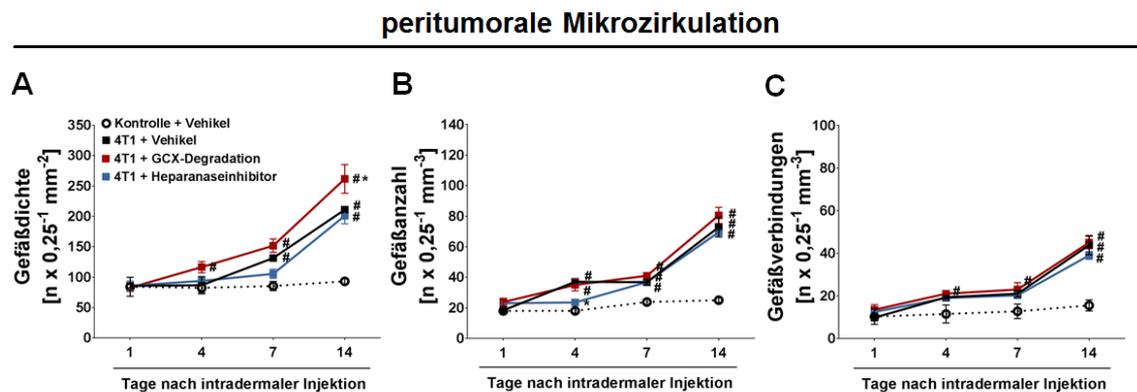
Zunächst wurde die Gefäßarchitektur der Ohrmuschel einer Kontrollgruppe analysiert, wobei die quantitative Analyse ergab, dass sowohl die Gefäßdichte als auch die Anzahl der Gefäße und der Gefäßverbindungen bei der Kontrollgruppe während des gesamten Untersuchungszeitraumes konstant blieben (**Abb. 35 A, B und C**). Bei der unbehandelten Tumorvehikelgruppe waren an den Tagen 1 und 4 peritumoral zunächst keine signifikanten Veränderungen der Gefäßarchitektur im Vergleich zur intakten Mikrozirkulation der Ohrmuschel zu erkennen. In der unmittelbaren Umgebung der Tumorzellinjektion wurden bis zu diesem Zeitpunkt noch keine Hinweise auf eine relevante Neoangiogenese gefunden. Die Auswertung ergab jedoch, dass die Anzahl der Gefäße und der Gefäßverbindungen sowie die Gefäßdichte in der peri- und intratumoralen Mikrozirkulation ab Tag 7 bis zum Ende der Untersuchungen an Tag 14 kontinuierlich und signifikant anstiegen, wohingegen die durchschnittliche Länge der unverzweigten Gefäßabschnitte abnahm (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise konnte zudem festgestellt werden, dass die Gefäßneubildung in der intratumoralen Mikrozirkulation im Vergleich zur peritumoralen Mikrozirkulation bis Tag 14 stärker ausgebildet war. Dies zeigte sich insbesondere an der stark zunehmenden intratumoralen Gefäßdichte, welche sich zwischen Tag 7 und Tag 14 nahezu verdoppelt hatte (**Abb. 36 D, E und F**). Diese Daten verdeutlichen, dass die Tumorneoangiogenese im Zuge der Tumorprogression innerhalb des Tumorgewebes stärker stimuliert wird als im umliegenden Tumorgewebe.

Im Gegensatz zur unbehandelten Tumorvehikelgruppe war bei der Tumorgruppe mit spezifischer Förderung der systemischen Glykokalixdegradation bereits an Tag 4 in der peritumoralen Mikrozirkulation eine Zunahme der Gefäßdichte erkennbar. Dieser Effekt setzte sich mit einer signifikanten Zunahme der Gefäßdichte bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes an Tag 14 fort (**Abb. 35 A**). Eine Zunahme der Gefäßanzahl hingegen war im Vergleich zur unbehandelten Tumorvehikelgruppe erst an Tag 14 sichtbar (**Abb. 35 B**).

Bei der Tumorgruppe mit systemischer Glykokalixprotektion konnte die Zunahme der Gefäßdichte- und -anzahl im Vergleich zur unbehandelten Tumorgruppe und der Tumorgruppe mit spezifischer Förderung der systemischen Glykokalixdegradation in der ersten Untersuchungswoche geringfügig verlangsamt werden. Diese Verlangsamung war an Tag 14 jedoch nur noch im

Vergleich zur Tumorgruppe unter Glykokalixdegradation nennenswert vorhanden und im Vergleich zur unbehandelten Tumorvehikelgruppe praktisch vollständig aufgehoben (**Abb. 35 A und B**).

Die Anzahl der Gefäßverbindungen zwischen allen drei Tumorgruppen ergab keine wesentlichen Unterschiede (**Abb. 35 C**). Im Gegensatz zur Kontrollgruppe nahm die Anzahl der Gefäßverbindungen jedoch bei allen drei Tumorgruppen über den gesamten Untersuchungszeitraum kontinuierlich ab (**Abb. 35 C**).



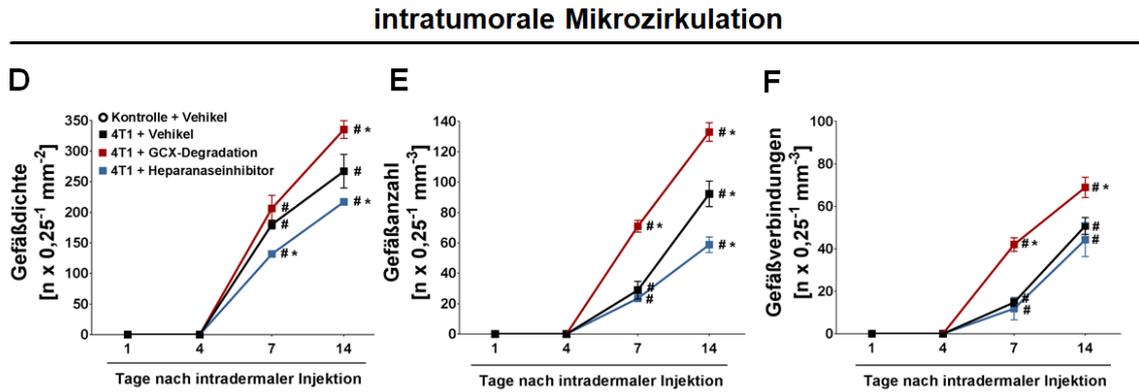
**Abb. 35: Analyse der Gefäßarchitektur unter Modulation der Glykokalixstruktur in der peritumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.**

Die Graphen zeigen die Gefäßarchitektur der intakten Mikrozirkulation der Ohrmuschel und der peritumoralen Mikrozirkulation des Mammakarzinoms im heterotopen Tumormodell der Ohrmuschel. Dargestellt ist die Gefäßdichte (**A**), die Gefäßanzahl (**B**) und die Anzahl der Gefäßverbindungen (**C**) der Kontrollgruppe (Kontrolle + Vehikel), der unbehandelten Tumorgruppe (4T1 + Vehikel), der Tumorgruppe mit spezifischer Förderung der systemischen Glykokalixdegradation (4T1 + GCX-Degradation) und der Tumorgruppe mit systemischer Glykokalixprotektion (4T1 + Heparanaseinhibitor) an den Tagen 1, 4, 7 und 14 Tage nach intradermaler Tumorzell- bzw. NaCl-Injektion in die Ohrmuschel (MW  $\pm$  SEM bei n=6 pro Gruppe; # p < 0,05 vs. Kontrolle + Vehikel desselben Untersuchungstages; \* p < 0,05 vs. 4T1 + Vehikel desselben Untersuchungstages).

Intratumorale Gefäße waren bei allen drei Tumorgruppen erstmals ab Tag 7 nach intradermaler Tumorzellinjektion detektierbar. Zu diesem Zeitpunkt konnte man jedoch bereits zwischen allen drei Tumorgruppen Unterschiede in der Gefäßdichte erkennen (**Abb. 36 D**). Bei der Tumorgruppe unter Förderung der Glykokalixdegradation nahm die Gefäßdichte bis zum Ende der Untersuchungen kontinuierlich zu und war an Tag 14 im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen signifikant erhöht (**Abb. 36 D**). Bei der Tumorgruppe unter

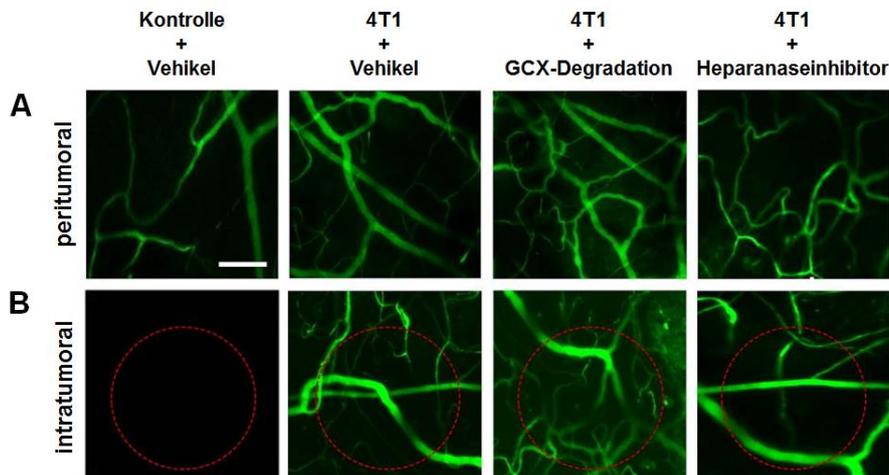
Protektion der Glykokalix nahm die Gefäßdichte wie bei allen untersuchten Tumorgruppen kontinuierlich zu. Die Protektion der Glykokalix führte im Vergleich zur unbehandelten Tumorgruppe jedoch zu einer signifikanten Reduktion der Gefäßdichte. Unterschiede in der Anzahl der Gefäße waren besonders deutlich bei der Tumorgruppe unter Förderung der Glykokalixdegradation nachzuvollziehen (**Abb. 36 E**). Bei dieser Versuchsgruppe war die repetitive enzymatische Degradation der Glykokalix mit einer nahezu linearen Zunahme der Gefäßanzahl assoziiert, wobei diese im Vergleich zu den beiden anderen Tumorgruppen über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg signifikant erhöht war. Ein Unterschied in der Gefäßanzahl war durch Protektion der Glykokalix im Vergleich zur unbehandelten Tumorgruppe erst an Tag 14 vorhanden, welche zu diesem Zeitpunkt jedoch signifikant niedriger war (**Abb. 36 E**). Unterschiede in der Anzahl der Gefäßverbindungen waren zwischen der unbehandelten Tumorgruppe und der Tumorgruppe unter Glykokalixprotektion an allen Untersuchungstagen sehr gering, wobei die Glykokalixprotektion nur eine geringfügige Reduktion bewirkte (**Abb. 36 F**). Dagegen wurde durch die Förderung der Glykokalixdegradation eine deutliche und signifikante Zunahme der Anzahl der Gefäßverbindungen induziert, welche bereits an Tag 7 ein ähnliches Niveau erreichte wie das der beiden anderen Tumorgruppen an Tag 14. Am Ende der Untersuchungen war erkennbar, dass die Förderung der Glykokalixdegradation fast eine Verdopplung der Gefäßdichte im Vergleich zur Gruppe mit Glykokalixprotektion bewirkte (**Abb. 36 F**).

Zusammenfassend führte die Degradation der Glykokalix insgesamt zu einer Zunahme der Gefäßneubildung in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms, wohingegen die Protektion der Glykokalix die Neubildung von Gefäßen in der Tumormikrozirkulation im Vergleich zur unbehandelten Tumorgruppe und zur Kontrollgruppe insgesamt reduzierte. Dieser Effekt war in der intratumoralen Mikrozirkulation deutlicher ausgeprägt als in der peritumoralen Mikrozirkulation (**Abb. 35 und 36**).



**Abb. 36: Analyse der Gefäßarchitektur unter Modulation der Glykokalixstruktur in der intratumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.**

Die Graphen zeigen die Gefäßarchitektur der intratumoralen Mikrozirkulation des Mammakarzinoms im heterotopen Tumormodell der Ohrmuschel. Dargestellt ist die Gefäßdichte (D), die Gefäßanzahl (E) und die Anzahl der Gefäßverbindungen (F) der unbehandelten Tumorvehikelgruppe (4T1 + Vehikel), der Tumorgruppe mit spezifischer Förderung der systemischen Glykokalixdegradation (4T1 + GCX-Degradation) und der Tumorgruppe mit systemischer Glykokalixprotektion (4T1 + Heparanaseinhibitor) an den Tagen 1, 4, 7 und 14 Tage nach intradermaler Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel (MW  $\pm$  SEM bei n=6 pro Gruppe; # p < 0,05 vs. Tag 1; \* p < 0,05 vs. 4T1 + Vehikel desselben Untersuchungstages).



**Abb. 37: Repräsentative 2-Photonen *In-vivo*-Mikroskopieaufnahmen der Gefäßarchitektur in der Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms unter Modulation der Glykokalixstruktur.**

Repräsentative 2-Photonen *In-vivo*-Mikroskopieaufnahmen der Gefäßarchitektur der peritumoralen (A) und intratumoralen (B) Mikrozirkulation des Mammakarzinoms im heterotopen Tumormodell der Ohrmuschel der Kontrollgruppe (Kontrolle + Vehikel), der unbehandelten Tumorvehikelgruppe (4T1 + Vehikel), der Tumorgruppe mit spezifischer Förderung der systemischen

Glykokalixdegradation (4T1 + GCX-Degradation) und der Tumorgruppe mit systemischer Glykokalixprotektion (4T1 + Heparanaseinhibitor) 14 Tage nach intradermaler Tumorzell- bzw. NaCl-Injektion in die Ohrmuschel (Maßstabsbalken: 100 µm). Die roten Kreise in den Aufnahmen der untersten Bildreihe (**B**) markieren den Bereich der Injektionsstelle.

## 9. Einfluss der Glykokalix auf die mikrovaskuläre Permeabilität im Mammakarzinom unter Modulation der Glykokalixstruktur

Da eine intakte Glykokalixstruktur auf Endothelzellen postkapillärer Venolen ein wesentlicher Faktor für den Erhalt der mikrovaskulären Integrität ist, führt eine Veränderung ihrer Struktur gleichzeitig auch zu einer veränderten mikrovaskulären Permeabilität [278]. Folglich wurde in dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass eine Modulation der Glykokalixstruktur in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms auch die mikrovaskuläre Permeabilität im Tumorgewebe beeinflusst. Daher wurde aufbauend auf die Experimente zur mikrovaskulären Permeabilität im Mammakarzinom (s. Kap. IV./3.), in einer weiteren Versuchsreihe untersucht, welchen Einfluss die systemische Modulation der Glykokalixstruktur auf die mikrovaskuläre Permeabilität im Mammakarzinom ausübt. Dabei wurde bei einer Tumorgruppe der Effekt einer Förderung der systemischen Degradation der Glykokalix und in einer weiteren Tumorgruppe der Effekt einer systemischen Protektion der Glykokalix über einen Heparanaseinhibitor auf die Extravasation des Makromoleküls FITC-Dextran (200.000 Da) in das perivaskuläre Gewebe der peri- und intratumoralen Mikrozirkulation des Mammakarzinoms im heterotopen Ohrmodell an den Tagen 1, 4, 7 und 14 nach intradermaler Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel untersucht (s. Kap. III./ 3.3.3.; 5.3.).

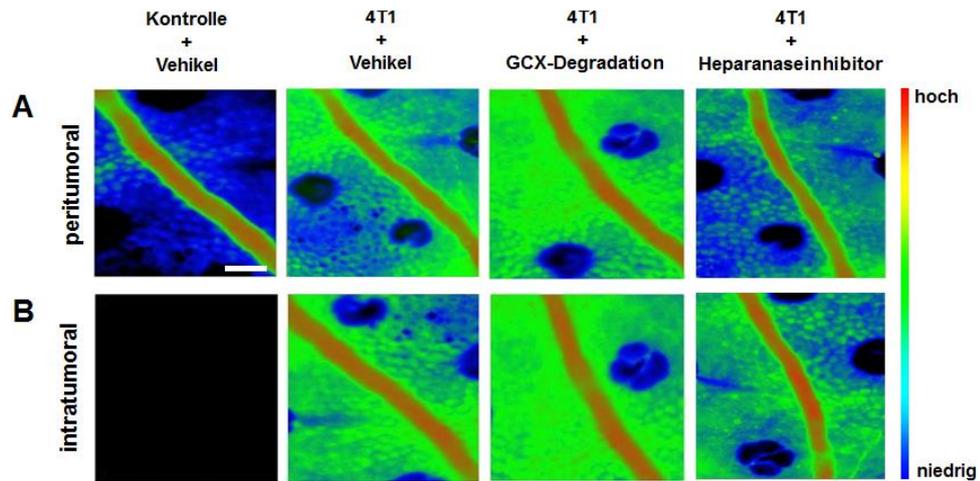
Die quantitative Analyse ergab, dass sich die mikrovaskuläre Permeabilität in der peritumoralen Mikrozirkulation durch Förderung der systemischen Degradation der Glykokalix bereits ab Tag 1 im Vergleich zur unbehandelten Tumervehikelgruppe und zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte. An den nachfolgenden Untersuchungstagen nahm diese kontinuierlich zu und erreichte an Tag 14 einen fast 2,5-fach höheren Wert als die unbehandelte Tumorgruppe (**Abb. 39 D**). Eine relevante mikrovaskuläre Permeabilität innerhalb der Tumormikrozirkulation konnte dagegen erst ab Tag 7 festgestellt werden. Zu diesem Zeitpunkt war diese jedoch bereits fast doppelt so hoch wie bei der

unbehandelten Tumorvehikelgruppe und erreichte am Tag 14 ein vergleichbares Niveau wie in der peritumoralen Mikrozirkulation (**Abb. 39 E**).

Durch die systemische Protektion der Glykokalix konnte im Vergleich zur unbehandelten Tumorvehikelgruppe und zur Tumorgruppe unter Förderung der systemischen Degradation der Glykokalix sowohl in der peritumoralen als auch in der intratumoralen Mikrozirkulation eine Reduktion der mikrovaskulären Permeabilität erzielt werden. Diese war in der peritumoralen Mikrozirkulation an Tag 1 signifikant niedriger als bei der Kontrollgruppe und den beiden anderen Tumorgruppen. An den Tagen 7 und 14 konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe schließlich eine höhere mikrovaskuläre Permeabilität festgestellt werden, sie war jedoch bis zum Ende der Untersuchungen an Tag 14 durchgehend und signifikant niedriger als bei den beiden anderen Tumorgruppen (**Abb. 39 D**). Innerhalb der Tumormikrozirkulation konnte eine mikrovaskuläre Permeabilität erst ab Tag 7 festgestellt werden, wobei diese bis Tag 14 niedriger war als bei der unbehandelten Tumorvehikelgruppe und der Tumorgruppe unter systemischer Förderung der Glykokalixdegradation (**Abb. 39 E**).

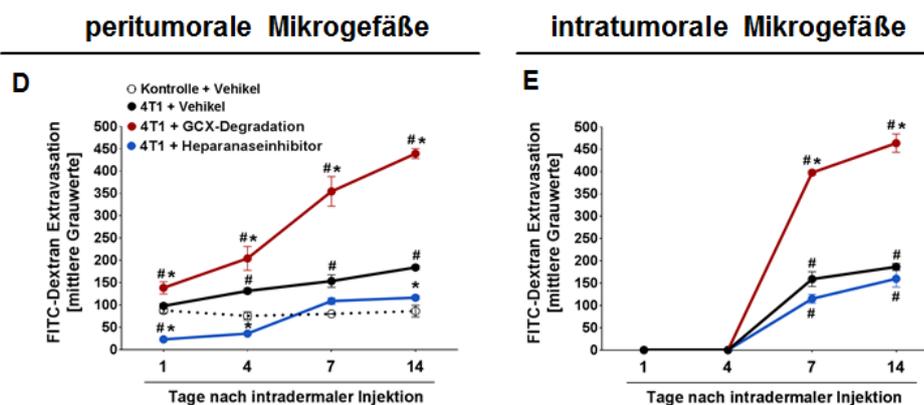
Die Analysen zur mikrovaskulären Permeabilität im Mammakarzinom in Abhängigkeit der Glykokalix bei der unbehandelten Tumorvehikelgruppe und bei der Kontrollgruppe der ersten Versuchsreihe (s. IV./ 3.) ergaben keine nennenswerten Unterschiede zu den Ergebnissen dieser Versuchsreihe.

Zusammenfassend wurde in dieser Versuchsreihe deutlich, dass eine systemische Modulation der Glykokalixstruktur im experimentellen Mammakarzinom die mikrovaskuläre Permeabilität sowohl in der peritumoralen als auch in der intratumoralen Mikrozirkulation beeinflusst.



**Abb. 38: Repräsentative *In-vivo*-Epifluoreszenzmikroskopiebilder der Gefäßpermeabilität in der Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms unter Modulation der Glykokalixstruktur.**

Repräsentative *In-vivo*-Epifluoreszenzmikroskopiebilder der FITC-Dextran Extravasation aus peritumoralen (A) und intratumoralen (B) Mikrogefäßen im heterotopen Mammakarzinommodell der Ohrmuschel der Kontrollgruppe (Kontrolle + Vehikel), der unbehandelten Tumorvehikelgruppe (4T1 + Vehikel), der Tumorgruppe mit spezifischer Förderung der systemischen Glykokalixdegradation (4T1 + GCX-Degradation) und der Tumorgruppe mit systemischer Glykokalixprotektion (4T1 + Heparanaseinhibitor) 14 Tage nach intradermaler Tumorzell- bzw. NaCl-Injektion in die Ohrmuschel (Maßstabsbalken links oben: 15 µm). Die Intensitätsskala rechts definiert die Fluoreszenzintensität von FITC bzw. das Ausmaß der FITC-Dextran Extravasation (rot = hohe Extravasationsmenge; blau = niedrige Extravasationsmenge).



**Abb. 39: Analyse der Gefäßpermeabilität unter Modulation der Glykokalixstruktur in der peritumoralen und intratumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.**

Die Graphen illustrieren die quantitative Auswertung der FITC-Dextran Extravasation aus peritumoralen (D) und intratumoralen (E) Mikrogefäßen im heterotopen Mammakarzinommodell der Ohrmuschel der unbehandelten Tumorgruppe (4T1 + Vehikel), der Tumorgruppe mit spezifischer Förderung der systemischen Glykokalixdegradation (4T1 + GCX-Degradation) und der

Tumorgruppe mit systemischer Glykokalixprotektion (4T1 + Heparanaseinhibitor) 1, 4, 7 und 14 Tage nach intradermaler Tumorzell- bzw. NaCl-Injektion in die Ohrmuschel (MW  $\pm$  SEM bei n=6 pro Gruppe; # p < 0,05 vs. Kontrolle + Vehikel desselben Untersuchungstages in **D**; \* p < 0,05 vs. 4T1 + Vehikel desselben Untersuchungstages in **D**; # p < 0,05 vs. Tag 1 in **E**; \* p < 0,05 vs. 4T1 + Vehikel desselben Untersuchungstages in **E**).

## **10. Analyse der Rekrutierung von Thrombozyten und myeloiden Leukozytensubpopulationen in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms unter Modulation der Glykokalixstruktur**

Strukturschädigungen der endothelialen Glykokalix infolge inflammatorischer Prozesse im Gefäßsystem führen einerseits zur Exposition der endothelialen Adhäsionsmoleküle- und receptoren, welche die Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten regulieren und andererseits zur Freisetzung der Glykokalix-gebundenen Wachstumsfaktoren, Zytokine, extrazellulären Matrixbestandteile sowie anderer plasmatischer und endothelialer Moleküle, welche ihrerseits die Rekrutierung von Thrombozyten und Leukozyten verstärken [285] [294] [293].

Da in den vorangegangenen Versuchen zur Expression der endothelialen Glykokalix in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms sowie in den Versuchen zur Thrombozyten- und Leukozytenrekrutierung in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms deutlich wurde, dass die Struktur der endothelialen Glykokalix analog zu inflammatorischen Prozessen im Gefäßsystem auch in der Tumormikrozirkulation geschädigt und damit der Rekrutierungsprozess beeinflusst wird, wurde aufbauend auf die Untersuchungen zur intravaskulären Rekrutierung von Thrombozyten und myeloiden Leukozytensubpopulationen in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms im heterotopen Ohrmodell sowie in der intakten Mikrozirkulation der Ohrmuschel (s. Kap. IV/ 5.), in dieser Versuchsreihe die Bedeutung einer Modulation der Glykokalixstruktur für den Rekrutierungsprozess sowie die Interaktion von Thrombozyten und myeloiden Leukozyten mit dem Endothel genauer analysiert. Dabei wurde mittels intravitale Epifluoreszenzmikroskopie die intravaskuläre Rollen und die feste Adhärenz am Endothel von Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten sowie von klassischen und nicht-klassischen Monozyten in die peritumorale und intratumorale

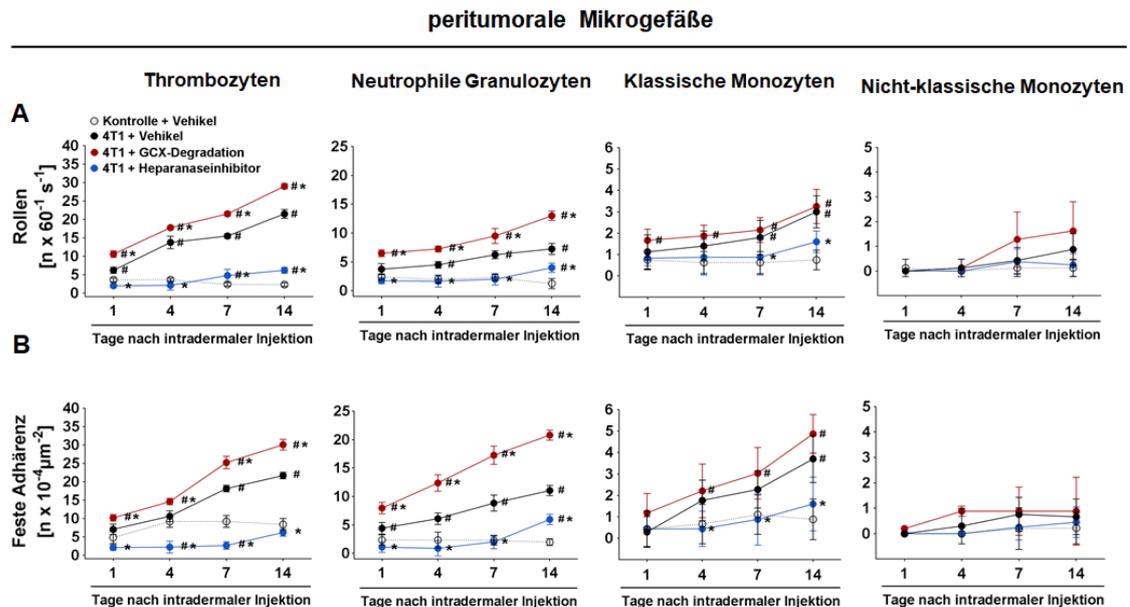
Mikrozirkulation des Mammakarzinoms im heterotopen Ohrmodell an den Tagen 1, 4, 7 und 14 nach intradermaler Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel unter spezifischer Protektion bzw. Degradationsförderung relevanter Glykokalixbestandteile untersucht.

In der intakten Mikrozirkulation der Ohrmuschel der Kontrollgruppe konnten insbesondere in der ersten Woche der Untersuchungen vereinzelt intravaskulär rollende und fest adhärenente Thrombozyten, neutrophile Granulozyten sowie von klassische und nicht-klassische Monozyten beobachtet werden (**Abb. 40 A** und **B**).

Dagegen stieg die Anzahl aller intravaskulär rollender und fest adhärenenter Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten sowie von klassischer und nicht-klassischer Monozyten bei der unbehandelten Tumorvehikelgruppe über den gesamten Untersuchungszeitraum in peritumoralen Mikrogefäßen kontinuierlich an, wobei insbesondere Thrombozyten und neutrophile Granulozyten am stärksten in die Tumormikrozirkulation rekrutiert wurden. Auch in intratumoralen Mikrogefäßen konnte eine kontinuierliche Zunahme dieses Rekrutierungsprozesses – jedoch erst ab Tag 7 - beobachtet werden (**Abb. 40 A, B** und **Abb. 41 B** und **C**).

Auch die systemische Degradation relevanter Glykokalixbestandteile ging in der peritumoralen Mikrozirkulation mit einer kontinuierlichen Zunahme von rollenden Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten und klassischen Monozyten im Verlauf des Untersuchungszeitraumes einher, wobei die Anzahl dieser intravaskulär rollenden und fest adhärenenten Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu unbehandelten Tumorvehikeltieren signifikant verstärkt war (**Abb. 40 A**). Bei rollenden und fest adhärenenten nicht-klassischen Monozyten konnte keine signifikante Zunahme des intravaskulären Rollens beobachten werden. Dagegen führte die systemische Inhibition der Heparanase im Sinne einer Glykokalixprotektion im Vergleich zur unbehandelten Tumorvehikelgruppe und der Tumorgruppe mit systemischer Förderung der Glykokalixdegradation nahezu zu einer Aufhebung der gesteigerten Anzahl rollender und fest adhärenenter Thrombozyten und myeloiden Leukozyten in peritumoralen Mikrogefäßen.

Interessanterweise war die Anzahl fest adhärenter Thrombozyten in der Tumorgruppe unter Glykokalixprotektion sogar niedriger als bei der Kontrollgruppe (**Abb. 40 B**). Vergleichbar zur Glykokalixdegradation veränderte auch die Glykokalixprotektion die Anzahl fest adhärenter nicht-klassischer Monozyten in der peritumoralen Mikrozirkulation innerhalb des Untersuchungszeitraumes von 14 Tagen nicht signifikant.



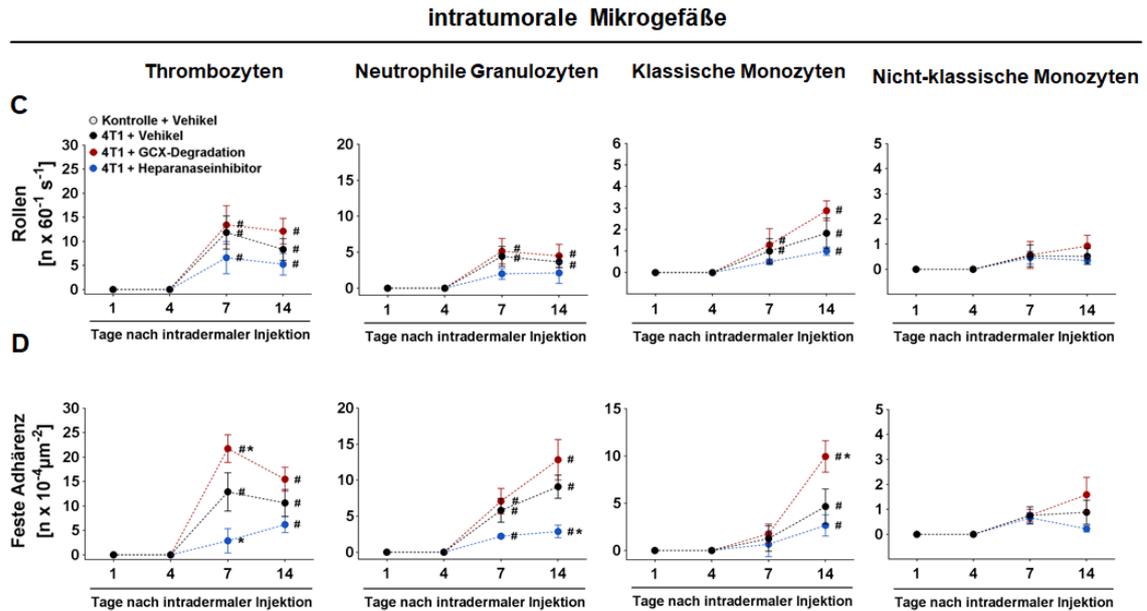
**Abb. 40: Analyse der Rekrutierung von Thrombozyten und myeloiden Leukozytensubpopulationen in der peritumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms unter Modulation der Glykokalixstruktur.**

Die Graphen zeigen die Anzahl intravaskulär rollender (A) und fest adhärenter (B) Thrombozyten, neutrophiler Granulozyten, klassischer Monozyten und nicht-klassischer Monozyten in der intakten Mikrozirkulation der Ohrmuschel sowie in peritumoralen Mikrogefäßen des heterotopen Mammakarzinommodells der Ohrmuschel Kontrollgruppe (Kontrolle + Vehikel), der unbehandelten Tumorvehikelgruppe (4T1 + Vehikel), der Tumorgruppe mit spezifischer Förderung der systemischen Glykokalixdegradation (4T1 + GCX-Degradation) und der Tumorgruppe mit systemischer Glykokalixprotektion (4T1 + Heparanaseinhibitor) 1, 4, 7 und 14 Tage nach intradermaler NaCl- bzw. Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel (MW  $\pm$  SEM bei n=6 pro Gruppe; # p < 0,05 vs. Kontrolle + Vehikel desselben Untersuchungstages; \* p < 0,05 vs. 4T1 + Vehikel desselben Untersuchungstages).

Wie bereits in den vorangegangenen Versuchen, konnte die Rekrutierung von Thrombozyten und leukozytären Zellen myeloiden Ursprungs Zellen in der

intratumoralen Mikrozirkulation bei allen Tumorgruppen erst 7 Tage nach intradermaler Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel beobachtet werden. Vergleichbar zur peritumoralen Mikrozirkulation führte die systemische Degradation relevanter Glykokalixbestandteile ebenfalls zur signifikanten Zunahme sowohl intravaskulär rollender als auch fest adhärenter Thrombozyten, neutrophiler Granulozyten und klassischer Monozyten (**Abb. 41 C** und **D**). Besonders deutlich war dieser Effekt bei fest adhärennten Thrombozyten an Tag 7 und bei neutrophilen Granulozyten und klassischen Monozyten an Tag 14 (**Abb. 41 D**). Im Gegensatz zur peritumoralen Mikrozirkulation ergaben die Experimente der vorliegenden Arbeit, dass die Anzahl rollender und fest adhärenter Thrombozyten bei der unbehandelten Tumorvehikelgruppe und der Tumorgruppe mit spezifischer Degradation relevanter Glykokalixbestandteile an Tag 7 den Höhepunkt erreichte und bis Tag 14 wieder abfiel (**Abb. 40 D**). Durch die Protektion der Glykokalix konnte innerhalb der Tumormikrozirkulation, ähnlich wie in der peritumoralen Mikrozirkulation, eine Reduktion der im Tumor verstärkten Rekrutierung von Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten und klassischen Monozyten beobachtet werden (**Abb. 41 C** und **D**), wobei sich dieser Effekt insbesondere bei fest adhärennten Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten sehr deutlich zeigte (**Abb. 41 D**).

Zusammenfassend konnte in dieser Versuchsreihe festgestellt werden, dass die Glykokalix eine regulierende Wirkung auf den Rekrutierungsprozess von Thrombozyten und spezifische Leukozytensubpopulationen myeloiden Ursprungs ausübt. Dabei ging die enzymatische Degradation der Glykokalix mit einer Akkumulation insbesondere von Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten und klassischen Monozyten sowohl in der peritumoralen als auch in der intratumoralen Mikrozirkulation einher, wohingegen die spezifische Protektion der Glykokalix diesen Prozess im Vergleich zum unbehandelten Mammakarzinom abschwächte.



**Abb. 41: Analyse der Rekrutierung von Thrombozyten und myeloiden Leukozytensubpopulationen in der intratumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms unter Modulation der Glykokalixstruktur.**

Die Graphen zeigen die Anzahl intravaskulär rollender (**C**) und fest adhärenter (**D**) Thrombozyten, neutrophiler Granulozyten, klassischer Monozyten und nicht-klassischer Monozyten in intratumoralen Mikrogefäßen des heterotopen Mammakarzinommodells der Ohrmuschel der unbehandelten Tumorvehikelgruppe (4T1 + Vehikel), der Tumorgruppe mit spezifischer Förderung der systemischen Glykokalixdegradation (4T1 + GCX-Degradation) und der Tumorgruppe mit systemischer Glykokalixprotektion (4T1 + Heparanaseinhibitor) 1, 4, 7 und 14 Tage nach intradermaler NaCl- bzw. Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel (MW  $\pm$  SEM bei n=6 pro Gruppe; # p < 0,05 vs. Tag 1; \* p < 0,05 vs. 4T1 + Vehikel desselben Untersuchungstages).

## 11. Analyse der Lymphozytenrekrutierung in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms unter Modulation der Glykokalixstruktur

In dieser Versuchsreihe wurde die Bedeutung einer Modulation der Glykokalixstruktur auf die Lymphozytenrekrutierung in der Mikrozirkulation des experimentellen Mammakarzinoms in Ergänzung zur Analyse der intravaskulären Lymphozytenrekrutierung in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms im heterotopen Ohrmodell sowie in der intakten Mikrozirkulation der Ohrmuschel (s. Kap. IV/ 6.) untersucht. Hierbei wurde analog zur Analyse der intravaskulären Rekrutierung myeloider Leukozytensubpopulationen und Thrombozyten in der

Mikrozirkulation des Mammakarzinoms (s. Kap. IV/ 11.) mit Hilfe der intravitalen Epifluoreszenzmikroskopie das intravaskuläre Rollen und die feste Adhärenz am Endothel von B-Lymphozyten (CD19<sup>+</sup>) und T-Lymphozyten (CD3<sup>+</sup>) in der peritumoralen und intratumoralen Mikrozirkulation des Mammakarzinoms im heterotopen Ohrmodell an den Tagen 1, 4, 7 und 14 nach intradermaler Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel unter spezifischer Protektion bzw. Degradationsförderung relevanter Glykokalixbestandteile untersucht. Die Rekrutierung von T-Lymphozyten wurde zusätzlich nach CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen und CD8a<sup>+</sup> zytotoxischen T-Lymphozyten differenziert analysiert.

Bei der Kontrollgruppe konnten in der Umgebung der NaCl-Injektion ab Tag 7 bis zum Ende des gesamten Untersuchungszeitraums nur vereinzelt intravaskuläre rollende oder fest adhärenente Lymphozytensubpopulationen beobachtet werden (**Abb. 42 A und B**).

Dagegen stieg die Anzahl aller intravaskulär rollenden Lymphozytensubpopulationen in der peritumoralen und intratumoralen Mikrozirkulation der unbehandelten Tumorgruppe ab Tag 7 bis Tag 14 kontinuierlich, aber nicht signifikant an. An Tag 14 konnte jedoch ein starker Anstieg der Anzahl der fest adhärenenten CD19<sup>+</sup> B-Lymphozyten in peritumoralen und intratumoralen Mikrogefäßen festgestellt werden (**Abb. 42 A, B und Abb. 43 C und D**), wobei ihre Anzahl in intratumoralen Mikrogefäßen fast doppelt so hoch war wie in peritumoralen Mikrogefäßen (**Abb. 43 B und D**).

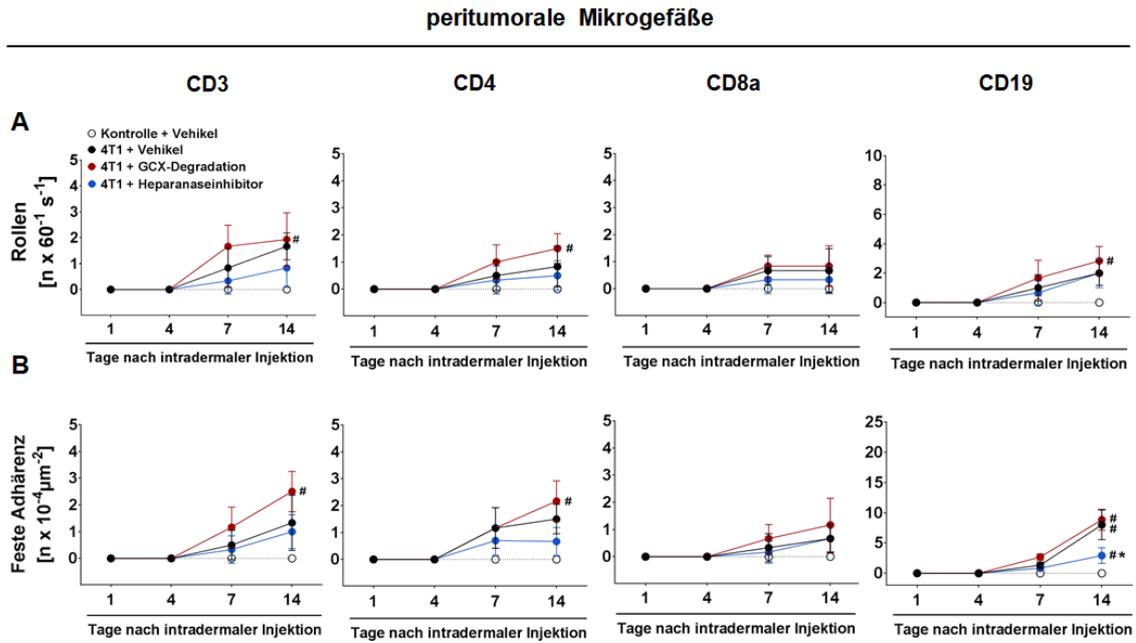
Bei der Tumorgruppe mit spezifischer Förderung der systemischen Glykokalixdegradation zeigte sich, dass die intravaskuläre Lymphozytenrekrutierung sowohl in peritumoralen als auch in intratumoralen Mikrogefäßen ab Tag 7 einsetzte, wobei CD19<sup>+</sup> B-Lymphozyten, gemessen an der Zellanzahl, die größte der hier untersuchten Lymphozytensubpopulationen darstellte (**Abb. 42 A, B und Abb. 43 C und D**). Insgesamt zeigte sich, dass der Rekrutierungsprozess bezüglich des intravaskulären Rollens und der festen Adhärenz durch die systemische enzymatische Degradation relevanter Glykokalixkomponenten im Vergleich zur unbehandelten Tumorgruppe verstärkt wurde, wobei dieser Effekt insbesondere bei CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten und in der Subpopulationsanalyse

insbesondere bei CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten erkennbar war (**Abb. 42 A, B** und **Abb. 43 C** und **D**).

Durch die spezifische pharmakologische Protektion der Glykokalix mit Hilfe des Heparanaseinhibitors OGT 2115 (s. Kap.III/2.1.3.) wurde die Anzahl intravaskulär rollender und fest adhärenter Lymphozyten im Vergleich zur unbehandelten Tumorgruppe abgeschwächt. Dieser Effekt war vor allem an Tag 14 peritumoral und intratumoral bei fest adhärenenten CD19<sup>+</sup> B-Lymphozyten erkennbar und bei CD4<sup>+</sup> und CD8a<sup>+</sup> T-Lymphozyten noch deutlicher ausgeprägt, wobei die feste Adhärenz dieser Zellen nahezu komplett inhibiert wurde (**Abb. 42 A, B** und **Abb. 43 C** und **D**).

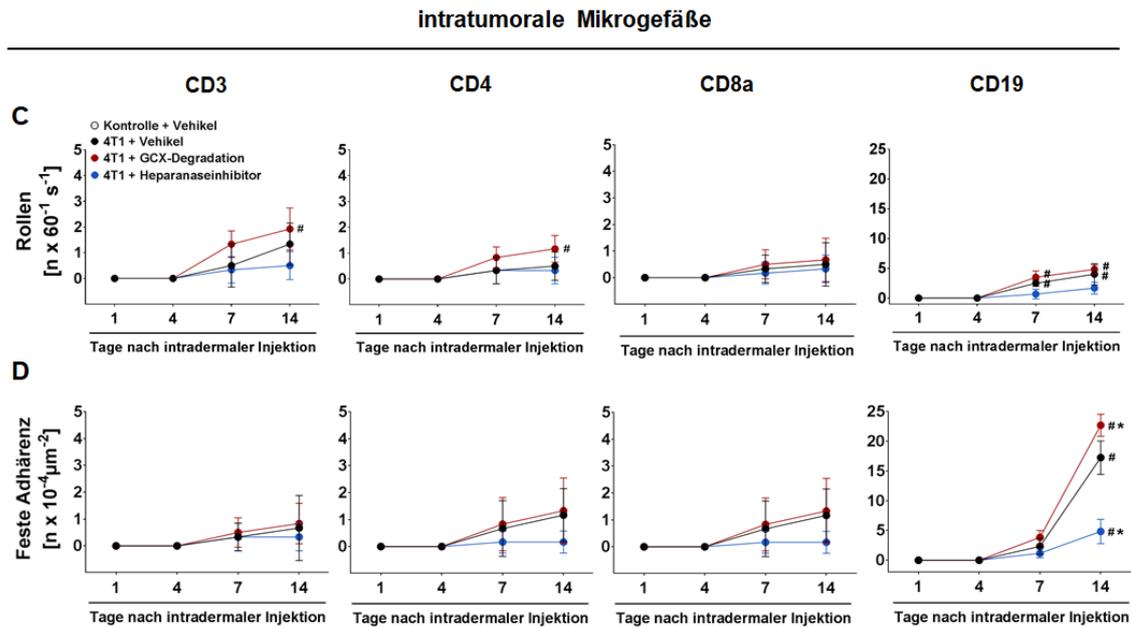
Zusammenfassend konnte in dieser Versuchsreihe festgestellt werden, dass die Glykokalix in der Mikrozirkulation des experimentellen Mammakarzinoms nur eine sehr schwach regulierende Wirkung auf den Rekrutierungsprozess von lymphozytären Leukozytensubpopulationen sowohl in peritumorale als auch in intratumorale Mikrogefäße ausübt. Die enzymatische Degradation der Glykokalix hat dabei zu einer schwachen Verstärkung der Rekrutierung von CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten und in der Subpopulationsanalyse insbesondere von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten geführt. Durch die pharmakologische Inhibition der Heparanase konnte der Rekrutierungsprozess peritumoral und intratumoral insgesamt geringfügig abgeschwächt werden, wobei der Effekt intratumoral bei fest adhärenenten CD19<sup>+</sup> B-Lymphozyten sowie bei fest adhärenenten CD4<sup>+</sup> und CD8a<sup>+</sup> T-Lymphozyten am deutlichsten erkennbar war.

Insgesamt verdeutlichen die Ergebnisse dieser Versuchsreihe, dass die Modulation der Glykokalixstruktur in der Mikrozirkulation des experimentellen Mammakarzinoms den Rekrutierungsprozess lymphoider Leukozyten im Gegensatz zu myeloiden Leukozyten und Thrombozyten (s. Kap. IV/11.) kaum beeinflusst.



**Abb. 42: Analyse der Lymphozytenrekretierung in der peritumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammarkarzinoms unter Modulation der Glykokalixstruktur.**

Die Graphen zeigen die Anzahl intravaskulär rollender (A) und fest adhärenter (B) CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8a<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup> Lymphozyten in der intakten Mikrozirkulation der Ohrmuschel sowie in peritumoralen Mikrogefäße des heterotopen Mammarkarzinommodells der Ohrmuschel der Kontrollgruppe (Kontrolle + Vehikel), der unbehandelten Tumorvehikelgruppe (4T1 + Vehikel), der Tumorgruppe mit spezifischer Förderung der systemischen Glykokalixdegradation (4T1 + GCX-Degradation) und der Tumorgruppe mit systemischer Glykokalixprotektion (4T1 + Heparanaseinhibitor) 1, 4, 7 und 14 Tage nach intradermaler NaCl- bzw. Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel (MW ± SEM bei n=6 pro Gruppe; # p < 0,05 vs. Kontrolle + Vehikel desselben Untersuchungstages; \* p < 0,05 vs. 4T1 + Vehikel desselben Untersuchungstages).



**Abb. 43: Analyse der Lymphozytenrekritierung in der intratumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms unter Modulation der Glykokalixstruktur.**

Die Graphen zeigen die Anzahl intravaskulär rollender (C) und fest adhärenter (D) CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8a<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup> Lymphozyten in intratumoralen Mikrogefäße des heterotopen Mammakarzinommodells der Ohrmuschel der unbehandelten Tumorvehikelgruppe (4T1 + Vehikel), der Tumorgruppe mit spezifischer Förderung der systemischen Glykokalixdegradation (4T1 + GCX-Degradation) und der Tumorgruppe mit systemischer Glykokalixprotektion (4T1 + Heparanaseinhibitor) 1, 4, 7 und 14 Tage nach intradermaler NaCl- bzw. Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel (MW  $\pm$  SEM bei n=6 pro Gruppe; # p < 0,05 vs. Tag 1; \* p < 0,05 vs. 4T1 + Vehikel desselben Untersuchungstages).

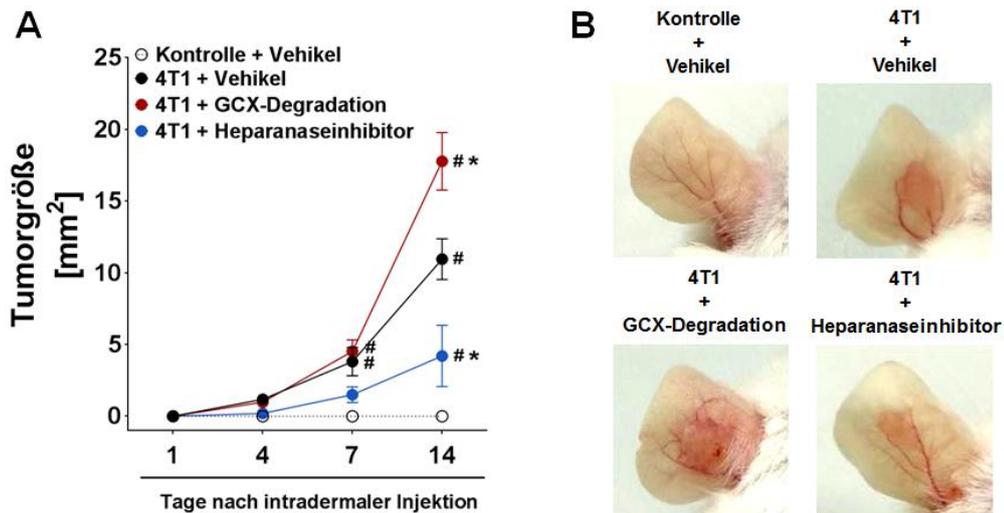
## 12. Bedeutung der Glykokalix für das Wachstum des Mammakarzinoms

Als Schutzbarriere auf allen Körperzellen und Regulator der Integrität von Zellverbänden stellt die Glykokalix einen wichtigen Angriffspunkt für die Entstehung und das Wachstum von Tumorzellen dar [294]. Um die Bedeutung der Glykokalix für das lokale Wachstum des Mammakarzinoms *in vivo* zu untersuchen, wurde die Tumorgöße im heterotopen Tumormodell der Ohrmuschel bei der unbehandelten Tumorvehikelgruppe sowie bei der Tumorgruppe mit systemischer Glykokalix-Protektion und der Tumorgruppe mit systemischer Förderung der Glykokalixdegradation ermittelt (s. Kap. III/ 3.3.6.). Hierfür wurden sichtbare

Tumore an den Tagen 1, 4, 7 und 14 nach intradermaler Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel mit einer Schieblehre vermessen und die mittlere TumorgroÙe mit Hilfe der in Kapitel III/ 3.3.6. (**Abb. 13**) genannten Formel berechnet.

Ein makroskopisches Tumorwachstum konnte erst ab Tag 4 beobachtet werden, wobei zu diesem Zeitpunkt noch keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen vorhanden waren. Erst ab Tag 7 war ein signifikanter Unterschied bei der unbehandelten Tumorvehikelgruppe (4T1 + Vehikel) und der Tumorgruppe mit systemischer Degradation der Glykokalix (4T1 + GCX-Degradation) im Vergleich zur Kontrollgruppe erkennbar. Interessanterweise war das Tumorwachstum bei der Tumorgruppe mit systemischer Protektion der Glykokalix (4T1 + Heparanaseinhibitor) hingegen im Vergleich zu den beiden anderen Tumorgruppen zum selben Zeitpunkt etwa um die Halfte – jedoch nicht signifikant – reduziert. Der Unterschied zwischen den drei unterschiedlich behandelten Tumorgruppen wurde am Ende des Untersuchungszeitraumes an Tag 14 sehr deutlich. Dabei zeigte sich, dass sich das Tumorwachstum der Gruppe mit systemischer Degradation der Glykokalix im Vergleich zur unbehandelten Tumorvehikelgruppe um nahezu 200 % signifikant verdoppelte. Dagegen war das Tumorwachstum bei der Gruppe mit systemischer Protektion der Glykokalix im Vergleich zur unbehandelten Tumorgruppe signifikant auf nahezu die Halfte reduziert (**Abb. 44 A**).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass sie Glykokalix das Tumorwachstum entscheidend reguliert.



**Abb. 44: Analyse des Mammakarzinomwachstums im heterotopen Ohrmuschelmodell unter Modulation der Glykokalixstruktur.**

Der Graph zeigt die quantitative Auswertung des Wachstums des heterotopen Mammakarzinoms der unbehandelten Tumorvehikelgruppe (4T1 + Vehikel), der Tumorgruppe mit spezifischer Förderung der systemischen Glykokalixdegradation (4T1 + GCX-Degradation) und der Tumorgruppe mit systemischer Glykokalixprotektion (4T1 + Heparanaseinhibitor) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kontrolle + Vehikel) an den Tagen 1, 4, 7 und 14 Tage nach intradermaler Tumorzell- bzw. NaCl-Injektion in die Ohrmuschel (A) (MW  $\pm$  SEM bei n=6 pro Gruppe; # p < 0,05 vs. Kontrolle + Vehikel desselben Untersuchungstages; \* p < 0,05 vs. 4T1 + Vehikel desselben Untersuchungstages). Repräsentative photographische Aufnahmen von Ohrmuscheln der Versuchstiere zur Darstellung des Wachstums des heterotopen Mammakarzinoms der unbehandelten Tumorvehikelgruppe (4T1 + Vehikel), der Tumorgruppe mit spezifischer Förderung der systemischen Glykokalixdegradation (4T1 + GCX-Degradation) und der Tumorgruppe mit systemischer Glykokalixprotektion (4T1 + Heparanaseinhibitor) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kontrolle + Vehikel) 14 Tage nach intradermaler Tumorzell- bzw. NaCl-Injektion in die Ohrmuschel (B).

### 13. Analyse der Bedeutung einer Depletion von Thrombozyten und myeloiden Leukozyten für ihre Rekrutierung in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms nach systemischer Degradation der Glykokalix

In vorangegangenen Experimenten dieser Studie konnte gezeigt werden, dass im heterotopen Mammakarzinom eine sich gegenseitig fördernde Wechselwirkung zwischen lokaler Tumorprogression und dadurch bedingter endothelialen

Glykokalixdegradation besteht. Zusätzlich fördert die systemische Degradation der endothelialen Glykokalix in der Tumormikrozirkulation die Rekrutierung von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten sowie in einem geringeren Maß auch von klassischen Monozyten bereits in der Initialphase der Tumorentstehung. Da bekannt ist, dass Thrombozyten, neutrophile Granulozyten und klassische Monozyten das Wachstum maligner Tumore verstärken können [338], wurde in dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass die Glykokalix ebenso wie das systemische Fehlen einer einzelnen Zellpopulationen den Rekrutierungsprozess der jeweils anderen Zellpopulation und damit auch die Tumorprogression beeinflusst. Deshalb soll in weiteren Versuchsgruppen untersucht werden, welche Bedeutung die bei degradierte (endothelialer) Glykokalix in der Tumormikrozirkulation rekrutierten Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten und klassischen Monozyten einzeln für das Wachstum des Mammakarzinoms sowie die Rekrutierung von Thrombozyten und myeloiden Leukozytensubpopulationen besitzen. Um diese Frage zu beantworten, wurden in unterschiedlichen Versuchsgruppen Thrombozyten, neutrophile Granulozyten und klassische Monozyten mittels spezifischer Antikörper aus dem Organismus der Versuchstiere depletiert (s. Kap. III/ 3.3.5.). Sodann wurde das Tumorwachstum sowie die Zellrekrutierung im heterotopen Tumormodell der Ohrmuschel mit Hilfe der intravitalen Epifluoreszenzmikroskopie an den Tagen 1, 4, 7 und 14 nach intradermaler Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel in Tieren analysiert, die über den Untersuchungszeitraum repetitiv alle vier Tage systemisch mit einem Glykokalix- degradierenden Enzym-Mix behandelt wurden. (s. Kap. IV/ 6.).

Da aus den Versuchsreihen zur Analyse der Lymphozytenrekrutierung in die Mikrozirkulation des Mammakarzinoms (s. Kap. IV./ 11.) sowie der Analyse der Lymphozytenrekrutierung in die Mikrozirkulation des Mammakarzinoms unter Modulation der Glykokalixstruktur (s. Kap. III/ 5.5) hervorging, dass diese Immunzellen erst zu einem sehr späten Zeitpunkt der Tumorentstehung rekrutiert werden und in dieser Arbeit insbesondere die Initialphase der Tumorentstehung des experimentellen Mammakarzinoms untersucht wurde, wurden Depletionen von Lymphozyten nicht durchgeführt.

In dieser Versuchsreihe zeigte sich bei der Analyse der Thrombozytenrekrutierung bei der Isotypkontrollgruppe unter systemischer enzymatischer Degradation der Glykokalix während des Gesamtuntersuchungszeitraumes von 14 Tagen eine nahezu lineare Zunahme der Anzahl rollender und fest adhärenter Thrombozyten im Mikrogefäßsystem des experimentellen Mammakarzinoms (**Abb. 45 A und B**).

Durch Depletion neutrophiler Granulozyten konnte festgestellt werden, dass die Anzahl rollender Thrombozyten bereits ab Tag 4 im Vergleich zur Isotypkontrollgruppe signifikant reduziert war (**Abb. 45 A**). An Tag 7 konnte eine zusätzliche Verringerung der Anzahl rollender Thrombozyten beobachtet werden. Obwohl die Anzahl rollender Thrombozyten anschließend bis Tag 14 anstieg, war ihre Anzahl im Vergleich zur Isotypkontrollgruppe auf etwa die Hälfte signifikant reduziert. Ein ähnlicher Effekt zeigte sich bei fest adhärenter Thrombozyten am Endothel. Die Anzahl fest adhärenter Thrombozyten war insgesamt im Vergleich zur Isotypkontrollgruppe an den einzelnen Untersuchungstagen jeweils um etwa die Hälfte reduziert, erreichte an Tag 7 einen Tiefpunkt und stieg anschließend bis Tag 14 geringfügig an. Dieser Anstieg war im Vergleich zu den rollenden Thrombozyten jedoch sehr schwach ausgeprägt (**Abb. 45 B**).

Nach Depletion klassischer Monozyten zeigte sich während des Gesamtuntersuchungszeitraumes eine kontinuierliche Zunahme sowohl der rollenden als auch der fest adhärenter Thrombozyten, wobei diese jedoch im Vergleich zur Isotypkontrollgruppe an den Tagen 4, 7 und 14 jeweils signifikant reduziert waren (**Abb. 45 A und B**).

Die Anzahl rollender und fest adhärenter neutrophiler Granulozyten im Mikrogefäßsystem des Mammakarzinoms im heterotopen Ohrmodell nahm im Verlauf des Untersuchungszeitraumes bei der Isotypkontrollgruppe kontinuierlich zu (**Abb. 45 C und D**).

Dagegen konnte festgestellt werden, dass die Depletion von Thrombozyten die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten ins experimentelle Mammakarzinom im Vergleich zur Isotypkontrollgruppe insgesamt deutlich reduzierte. Dabei zeigte sich bei rollenden neutrophilen Granulozyten an den Tagen 7 und 14 eine Reduktion

um etwa jeweils die Hälfte (**Abb. 45 C**), wohingegen die Anzahl fest adhärenter neutrophiler Granulozyten an denselben Untersuchungstagen auf etwa ein Viertel verringert war (**Abb. 45 D**).

Durch die Depletion von klassischen Monozyten war die Anzahl rollender neutrophiler Granulozyten im Vergleich zur Isotypkontrollgruppe nur an den Tagen 1 und 4 signifikant reduziert (**Abb. 45 C**). Dagegen zeigte sich an denselben Untersuchungstagen, dass ein Fehlen von klassischen Monozyten die feste Adhärenz von neutrophilen Granulozyten praktisch komplett aufhob (**Abb. 45 D**). An den nachfolgenden Untersuchungstagen nahm die Anzahl der fest adhärenter neutrophiler Granulozyten jedoch deutlich zu, sodass diese an Tag 14 im Vergleich zur Isotypkontrollgruppe um nur noch etwa 25 % geringer war (**Abb. 45 D**).

Bei der Isotypkontrollgruppe zeigte sich im Verlauf des gesamten Untersuchungszeitraumes unter Degradation der Glykokalix eine langsame und kontinuierliche Zunahme der rollenden und fest adhärenter klassischen Monozyten (**Abb. 45 E und F**), wobei diese Zellpopulation im Vergleich zu Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten bezüglich der Anzahl einen wesentlich geringen Anteil aller rekrutierter Zellen darstellten (**Abb. 45**).

Bei der Thrombozytendepletionsgruppe verringerte sich die Anzahl rollender und fest adhärenter klassischer Monozyten ab Tag 7 im Vergleich zur Isotypkontrollgruppe kontinuierlich, wobei an Tag 14 eine Reduktion auf etwa 50 % festgestellt wurde (**Abb. 45 E und F**).

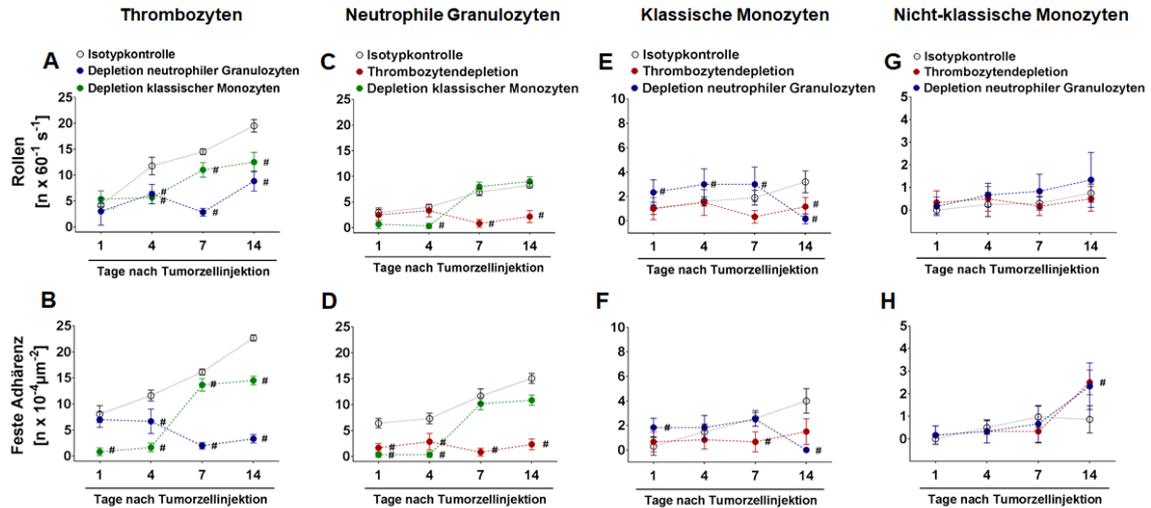
Im Vergleich zur Isotypkontrollgruppe zeigte sich dagegen durch Depletion der neutrophilen Granulozyten an den Tagen 1, 4 und 7 zunächst eine geringfügige, jedoch signifikante Zunahme der rollenden klassischen Monozyten, an Tag 14 war ihre Anzahl jedoch im Vergleich zur Isotypkontrollgruppe signifikant reduziert (**Abb. 45 E**). Die Anzahl der fest adhärenter klassischen Monozyten war an Tag 1 anfangs signifikant erhöht, reduzierte sich anschließend an den Tagen 4 und 7 auf denselben Wert und war an Tag 14 signifikant geringer als in der Isotypkontrollgruppe (**Abb. 45 F**).

Den geringsten Anteil aller ins Mammakarzinom rekrutierter Zellen stellten nicht-klassische Monozyten dar. Bei der Isotypkontrollgruppe konnte bis Tag 14 ein geringfügiger Anstieg der rollenden Zellen beobachtet werden, wohingegen die Anzahl der fest adhärenenten, nicht-klassischen Monozyten ab Tag 7 auf einem nahezu konstanten Niveau blieb (**Abb. 45 E** und **F**).

Die Thrombozytendepletion hatte keinen Einfluss auf die Anzahl der rollenden nicht-klassischen Monozyten (**Abb. 45 E**), wohingegen bei fest adhärenenten Zellen zwischen Tag 7 und 14 ein Anstieg im Vergleich zur Isotypkontrollgruppe beobachtet werden konnte (**Abb. 45 F**).

Die Depletion neutrophiler Granulozyten führte ab Tag 4 zu einer langsamen Zunahme der rollenden nicht-klassischen Monozyten (**Abb. 45 E**). Dagegen konnte bei fest adhärenenten nicht-klassischen Monozyten – wie bei der Thrombozytendepletionsgruppe – derselbe Anstieg zwischen Tag 7 und 14 festgestellt werden (**Abb. 45 F**).

Zusammenfassend wird anhand dieser Ergebnisse deutlich, dass nicht nur eine Wechselwirkung zwischen lokaler Tumorprogression, der dadurch bedingten endothelialen Glykokalixdegradation in Verbindung mit einer zunehmenden Leukozytenrekrutierung besteht, sondern auch einzelne Zellpopulationen wie insbesondere Thrombozyten und neutrophile Granulozyten sowie in einem geringeren Maß klassische Monozyten den Rekrutierungsprozess von Leukozytensubpopulationen in die Tumormikrozirkulation beeinflussen.



**Abb. 45: Analyse der Bedeutung einer Depletion von Thrombozyten und myeloiden Leukozyten auf ihre Rekrutierung in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms nach systemischer Glykokalixdegradation.**

Die Graphen zeigen die Anzahl intravaskulär rollender (A) und fest adhärenter (B) Thrombozyten, intravaskulär rollender (C) und fest adhärenter (D) neutrophiler Granulozyten, intravaskulär rollender (E) und fest adhärenter (F) klassischer Monozyten sowie intravaskulär rollender (G) und fest adhärenter (H) nicht-klassischer Monozyten in Mikrogefäßen des heterotopen Mammakarzinommodells der Ohrmuschel 1, 4, 7 und 14 Tage nach intradermaler Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel in Tieren, welche mit Antikörpern zur Depletion von Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten, klassischen Monozyten oder den entsprechenden Isotypkontrollantikörpern behandelt wurden (MW  $\pm$  SEM bei n=4 pro Gruppe; # p < 0,05 vs. Isotypkontrolle).

## 14. Bedeutung der Glykokalix sowie myeloider Leukozyten und Thrombozyten für das Tumorwachstum

Aus den vorangegangenen Experimenten dieser Arbeit ging hervor, dass eine sich gegenseitig fördernde Wechselwirkung zwischen lokaler Tumorprogression und dadurch bedingter endothelialer Glykokalixdegradation in Verbindung mit einer Regulation der Thrombozyten- und Leukozytenrekrutierung besteht. Um den Effekt der Depletion von Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten und klassischen Monozyten auf das Wachstum des experimentellen Mammakarzinoms unter systemischer Glykokalixdegradation zu untersuchen, wurde analog zur Ermittlung des Tumorwachstums des Mammakarzinoms im heterotopen Ohrmodell unter Modulation der Glykokalix (s. IV./ 7.), die

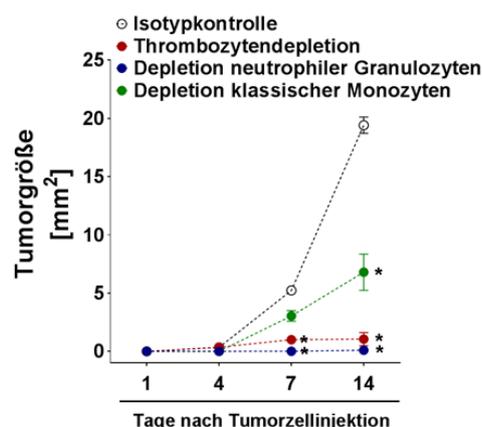
Tumorgröße an den Tagen 1, 4, 7 und 14 nach intradermaler Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel ermittelt.

Dabei zeigte sich, dass das lokale Tumorwachstum durch die Depletion von Thrombozyten signifikant verringert wurde (**Abb. 46**).

Die Reduktion des Tumorwachstums war infolge einer Depletion neutrophiler Granulozyten noch deutlicher ausgeprägt, wobei sogar das Wachstum eines makroskopisch sichtbaren Tumors verhindert wurde (**Abb. 46**).

Auch die Depletion klassischer Monozyten führte zu einer signifikanten Reduktion des lokalen Tumorwachstums. Der Effekt war jedoch im Vergleich zur Depletion von Thrombozyten oder neutrophilen Granulozyten schwächer ausgeprägt (**Abb. 46**).

Zusammenfassend wurde in dieser Versuchsreihe deutlich, dass insbesondere Thrombozyten und neutrophile Granulozyten in Verbindung mit einer systemischen Glykokalixdegradation das lokale Wachstum des Mammakarzinoms im heterotopen Ohrmodell steuern. Auch klassische Monozyten scheinen an der Regulation des lokalen Tumorwachstums beteiligt zu sein, wobei ihre Aktivität einen schwächeren Einfluss ausübt als Thrombozyten und neutrophile Granulozyten.



**Abb. 46: Lokales Tumorwachstum des experimentellen Mammakarzinoms im heterotopen Ohrmodell nach Depletion von Thrombozyten und myeloiden Leukozyten in Verbindung mit einer systemischen Glykokalixdegradation.**

Graphische Darstellung des Tumorwachstums des experimentellen Mammakarzinoms im heterotopen Ohrmodell an den Tagen 1, 4, 7 und 14 nach intradermaler Tumorzellinjektion in die

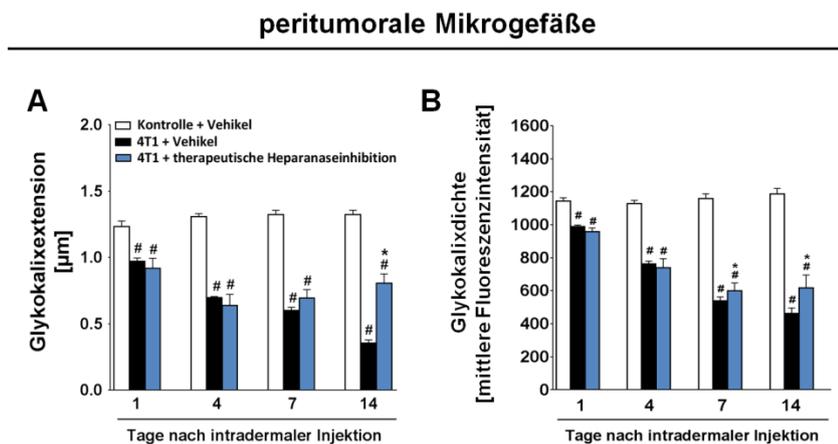
Ohrmuschel in Tieren, welche mit Antikörpern zur Depletion von Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten, klassischen Monozyten oder den entsprechenden Isotypkontrollantikörpern behandelt wurden (MW  $\pm$  SEM bei n=4 pro Gruppe; # p < 0,05 vs. Isotypkontrolle) in Verbindung mit einer systemischen Glykokalixdegradation.

### **15. Expressionsanalyse der endothelialen Glykokalix im heterotopen Mammakarzinom der Ohrmuschel unter therapeutischer Protektion der Glykokalix**

Nachdem in vorangegangenen Untersuchungen dieser Arbeit festgestellt werden konnte, dass die repetitive systemische Injektion eines pharmakologischen Heparanaseinhibitors ab intradermaler Injektion der Mammakarzinomzellen bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes eine Glykokalixprotektive Wirkung in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms besitzt und dadurch sowohl die Interaktion von Leukozyten und Thrombozyten mit dem Endothel signifikant vermindert, als auch das lokale Tumorstadium relevant verlangsamt, sollte in einer zusätzlichen Versuchsreihe nun der Effekt der systemischen Protektion von Heparansulfat im Sinne einer therapeutischen Anwendung im heterotopen Mammakarzinommodell untersucht werden. Dabei wurde analysiert, ob die systemische Heparanaseinhibition die Regeneration einer bereits geschädigten endothelialen Glykokalix in peritumoralen Mikrogefäßen des Mammakarzinoms bzw. ihre Neubildung in intratumoralen Mikrogefäßen fördert.

Dafür wurde einer Versuchstiergruppe 7 Tage nach intradermaler Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel über 8 Tage alle 48 h ein niedermolekularer Heparanaseinhibitor (s. Kap. III/2.1.3 und Tab. 4) intravenös über die Schwanzvene verabreicht (s. Kap III/ 4.). Zusätzlich wurden eine unbehandelte Tumorgruppe und eine Kontrollgruppe (s. Kap III/ 4.) in die Analysen miteinbezogen. An den Tagen 1, 4, 7 und 14 nach intradermaler Tumorzell- bzw. NaCl-Injektion in die Ohrmuschel (s. Kap. III/3.3.) wurden analog zur Expressionsanalyse der endothelialen Glykokalix (s. Kap. III/ 3.3.1. und 5.1.) intravitalmikroskopische Untersuchungen am 2-Photonen-Mikroskop durchgeführt, um die endotheliale Glykokalixexpression in der Tumormikrozirkulation bestimmen zu können.

An den Tagen 1 und 4 konnte bei beiden Tumorgruppen in peritumoralen Mikrogefäßen im Vergleich zur Kontrollgruppe zunächst, wie erwartet, eine signifikante Reduktion der endothelialen Glykokalix sowohl in ihrer Extension als auch ihrer Dichte festgestellt werden, wobei die durchschnittlich ermittelten Werte beider Tumorgruppen miteinander vergleichbar waren (**Abb. 47 A und B**). An den Tagen 7 und 14 zeigte sich bei der unbehandelten Tumorvehikelgruppe eine weitere kontinuierliche und signifikante Verringerung der endothelialen Glykokalixextension und -dichte. Dagegen konnte bei der therapeutisch behandelten Tumorgruppe ab Tag 7 bis Tag 14 eine kontinuierliche Regeneration der endothelialen Glykokalix festgestellt werden (**Abb. 47 A und B**). Diese Regeneration der endothelialen Glykokalix war bezüglich der Extension im Vergleich zur unbehandelten Tumorgruppe besonders an Tag 14 deutlich ausgeprägt (**Abb. 47 A**).



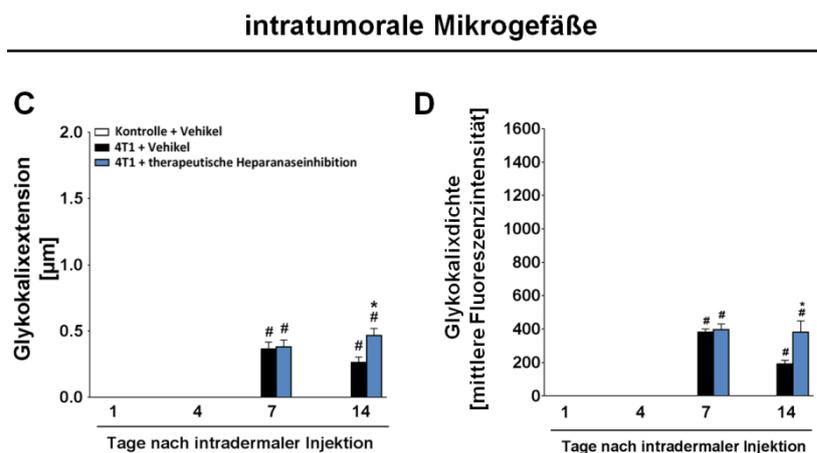
**Abb. 47: Expressionsanalyse der endothelialen Glykokalix unter therapeutischer Protektion ihrer Struktur in peritumoralen Mikrogefäßen.**

Die Graphen zeigen die Expressionsanalyse der endothelialen Glykokalix in peritumoralen Mikrogefäßen. Dargestellt ist die Glykokalixextension (**A**) und die Glykokalixdichte (**B**) der Kontrollgruppe (Kontrolle + Vehikel), der unbehandelten Tumorvehikelgruppe (4T1 + Vehikel) und der Tumorgruppe unter therapeutischer Protektion der Glykokalix (4T1 + therapeutische Heparanaseinhibition) 1, 4, 7 und 14 Tage nach intradermaler NaCl- bzw. Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel (MW  $\pm$  SEM bei n=4 pro Gruppe; # p < 0,05 vs. Kontrolle + Vehikel desselben Untersuchungstages; \* p < 0,05 vs. 4T1 + Vehikel desselben Untersuchungstages).

Vergleichbar zu den vorangegangenen Versuchsreihen, konnte auch in dieser Versuchsreihe erst ab Tag 7 eine endotheliale Glykokalix innerhalb der intratumoralen Mikrozirkulation des Mammakarzinoms im heterotopen Ohrmodell detektiert werden. Zu diesem Zeitpunkt waren zwischen beiden Tumorgruppen

noch keine signifikanten Unterschiede vorhanden (**Abb. 48 C** und **D**). An Tag 14 hingegen konnte bei der therapeutisch behandelten Tumorgruppe ein signifikanter Aufbau der endothelialen Glykokalixextension und -dichte sowohl im Vergleich zum vorherigen Untersuchungszeitpunkt als auch im Vergleich zur unbehandelten Tumorvehikelgruppe festgestellt werden (**Abb. 48 C** und **D**).

Insgesamt wird anhand der Ergebnisse dieser Versuchsreihe deutlich, dass eine therapeutische Protektion einer bereits geschädigten endothelialen Glykokalix in der Mikrozirkulation eines experimentellen Mammakarzioms möglich ist. Dabei kann durch eine systemische pharmakologische Inhibition der Heparanase eine Regeneration sowohl der Extension als auch der Dichte der endothelialen Glykokalix in peritumoralen Mikrogefäßen erzielt und in intratumoralen Mikrogefäßen ihre Synthese gefördert werden.



**Abb. 48: Expressionsanalyse der endothelialen Glykokalix unter therapeutischer Protektion ihrer Struktur in intratumoralen Mikrogefäßen.**

Graphische Darstellung der Expressionsanalyse der endothelialen Glykokalix in intratumoralen Mikrogefäßen. Dargestellt ist die Glykokalixextension (**C**) und die Glykokalixdichte (**D**) der Kontrollgruppe (Kontrolle + Vehikel), der unbehandelten Tumorvehikelgruppe (4T1 + Vehikel) und der Tumorgruppe mit therapeutischer Protektion der Glykokalix (4T1 + therapeutische Heparanaseinhibition) 1, 4, 7 und 14 Tage nach intradermaler NaCl- bzw. Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel (MW  $\pm$  SEM bei n=4 pro Gruppe; # p < 0,05 vs. Tag 1; \* p < 0,05 vs. 4T1 + Vehikel desselben Untersuchungstages).

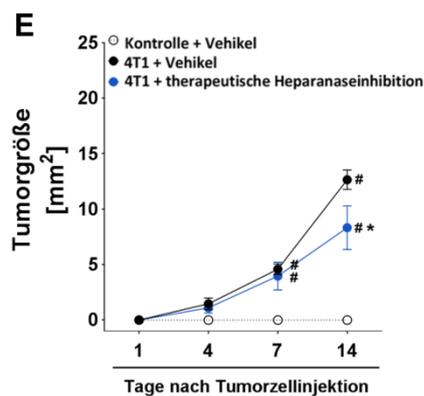
## 16. Lokales Tumorwachstum des Mammakarzinoms im heterotopen Ohrmodell unter therapeutischer Protektion der Glykokalix

Um den Effekt einer systemischen Heparanaseinhibition im Sinne einer therapeutischen Protektion auf die lokale Progression eines frühen Mammakarzinomstadiums zu untersuchen, wurde ergänzend zur Analyse der Expression der endothelialen Glykokalix in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms im heterotopen Ohrmodell unter therapeutischer Protektion der Glykokalix (s. Kap. IV/ 15.) als weiterer Parameter das lokale Tumorwachstum untersucht.

Analog zu den beiden unterschiedlichen Versuchsreihen zur Ermittlung des Tumorwachstums des Mammakarzinoms im heterotopen Ohrmodell (s. Kap. IV/ 7. und 14.) wurde die Tumorgröße an den Tagen 1, 4, 7 und 14 nach intradermaler Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel ermittelt (s. Kap. III/ 3.3.7.).

Bei beiden Tumorgruppen konnte hierbei über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg eine lineare Zunahme der Tumorgröße festgestellt werden, wobei sich bis Tag 7 keine Unterschiede ergaben (**Abb. 49**). Erst an Tag 14 konnte bei der therapeutisch behandelten Tumorgruppe im Vergleich zur unbehandelten Tumorvehikelgruppe eine signifikant verringerte Tumorgröße festgestellt werden.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass eine therapeutische Glykokalixprotektion durch systemische pharmakologische Inhibition der Heparanase das lokale Wachstum eines experimentellen Mammakarzinoms im heterotopen Tumormodell der Ohrmuschel abschwächen, jedoch nicht vollständig aufhalten kann.



**Abb. 49: Lokales Tumorwachstum des experimentellen Mammakarzinoms im heterotopen Ohrmodell unter therapeutischer Protektion der Glykokalixstruktur.**

Graphische Darstellung des Wachstums des Mammakarzinoms unter therapeutischer Glykokalixprotektion. Dargestellt ist das lokale Tumorwachstum des Mammakarzinoms im heterotopen Ohrmodell der Kontrollgruppe (Kontrolle + Vehikel), der unbehandelten Tumorvehikelgruppe (4T1 + Vehikel) und der Tumorgruppe mit therapeutischer Protektion der Glykokalix (4T1 + therapeutische Heparanaseinhibition) 1, 4, 7 und 14 Tage nach intradermaler NaCl- bzw. Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel (MW  $\pm$  SEM bei n=4 pro Gruppe; # p < 0,05 vs. Kontrolle + Vehikel desselben Untersuchungstages; \* p < 0,05 vs. 4T1 + Vehikel desselben Untersuchungstages).

## V. DISKUSSION

Die endotheliale Glykokalix reguliert als innerste Schicht der Gefäßwand zusammen mit den darunterliegenden Endothelzellen, der Basalmembran und den Perizyten als Barriere zwischen Gefäßlumen und Interstitium wichtige physiologische Prozesse wie die Gefäßpermeabilität, die Umwandlung physikalischer Signale auf der Zelloberfläche in intrazelluläre molekulare Prozesse sowie die Interaktion von Blutbestandteilen und -zellen mit der Gefäßwand [260]. Als maschenförmiges Netzwerk, bestehend aus unterschiedlichen membrangebunden Proteinen und löslichen Molekülen ist die endotheliale Glykokalix auf der Gefäßinnenseite sehr empfindlich gegenüber Einflüssen aus der Umgebung. Insbesondere inflammatorische Prozesse in den Blutgefäßen, wie sie beispielsweise auch im Rahmen einer Krebserkrankung vorkommen, schädigen ihre Struktur. Dadurch kommt es zum Verlust ihrer gefäßprotektiven, anti-inflammatorischen und anti-koagulatorischen Eigenschaften, was wiederum Auswirkungen auf den gesamten Organismus hat [274] [291]. Welche Bedeutung die Glykokalix im Mikrogefäßsystem maligner Tumore für das Wachstum, die Angiogenese, die Permeabilität und die Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten ebenso wie die Regulation ihrer Interaktion mit Endothelzellen besitzt, ist bislang jedoch noch nicht geklärt. Die in dieser Arbeit neu gewonnenen Erkenntnisse könnten zur Entwicklung moderner systemischer Strategien in der Krebstherapie beitragen, welche durch die pharmakologische Modulation von Umbauprozessen in der Glykokalix maligner Tumore Entstehung, Wachstum und Metastasierung dieser bösartigen Neubildungen wirksamer und gleichzeitig nebenwirkungsärmer als gegenwärtige Therapieformen bekämpfen.

### 1. Diskussion der Modelle

#### 1.1. Wahl der Versuchstiere

Die Entstehung und Progression von malignen Tumoren unterliegt einem hochkomplexen Zusammenspiel aus unterschiedlichsten exogenen Einflüssen und endogenen Mechanismen. Dabei können beispielsweise körpereigene

Bestandteile und Prozesse in der Tumormikrozirkulation nicht nur zur Abwehr, sondern auch zum Fortschreiten dieser Erkrankung beitragen [343] [338] [344]. Da derartige Prozesse von einem Gesamtorganismus abhängig sind, können einzelne hierzu beitragende Faktoren am besten mit Hilfe eines Tiermodells charakterisiert werden.

Die Maus wurde in dieser Arbeit als Versuchstier gewählt, da sie sich biologisch mit dem Menschen aufgrund ihrer genetischen Übereinstimmung von etwa 95 % gut vergleichen lässt und auch pathophysiologische Prozesse im murinen und humanen Organismus größtenteils sehr ähnlich ablaufen [345] [346]. Darüber hinaus haben viele Erkrankungen von Mäusen und Menschen dieselbe genetische Ursache, sodass sich zahlreiche Krankheiten, wie beispielsweise Krebs- und Stoffwechselerkrankungen, sehr gut im Mausmodell untersuchen lassen [347]. Weiterhin ist die Maus von allen für Tierversuche eingesetzten Spezies am besten immunologisch charakterisiert. Dadurch ist das Spektrum der verfügbaren Substanzen zur experimentellen Modulation immunologischer und zellbiologischer Abläufe, wie beispielsweise durch Antikörper oder pharmakologische Inhibitoren und Mediatoren, am breitesten [348]. Die Wahl der Maus als Versuchstier begründet sich des Weiteren auch durch die Vielzahl an genetisch veränderten Tierstämmen, welche für Tierexperimente zur Verfügung stehen und einen Zugang zur selektiven Untersuchung von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen ermöglichen [349]. Zudem gibt es für Tierexperimente in der Maus ein großes Spektrum an Tumorzelllinien, welche in immunkompetenten Mauslinien eingesetzt werden können [350].

Im Speziellen stellen das Tumorwachstum ebenso wie die Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten aus den mikrovaskulären Stromgebieten in das perivaskuläre Gewebe hochkomplexe, kaskadenartig verlaufende Prozesse dar, welche durch Interaktionen zwischen Blutzellen, Gefäßwandelementen und dem Gewebe vermittelt werden. Diese Interaktionen werden durch die Einwirkung zahlreicher Faktoren, wie z. B. hämodynamische Eigenschaften der Zirkulation, aber auch durch die Freisetzung von Chemokinen, Zytokinen, Sauerstoff- und Stickstoffradikalen und Proteasen in Blut und Gewebe beeinflusst. Folglich sind die zu untersuchenden Reaktionsabläufe von einem intakten Gesamtorganismus

abhängig, wodurch die Erreichbarkeit des Studienziels der vorliegenden Arbeit nur mit Hilfe von In-vivo-Versuchen möglich ist.

Ferner erweist sich die Maus aufgrund der einfachen Haltung bedingt durch ihren geringen Platzanspruch und der damit verbundenen niedrigen Haltungskosten sowie der einfachen Handhabung infolge ihrer geringen Körpergröße als ideales Versuchstier.

Um die Bedeutung pathophysiologischer Prozesse der Glykokalix in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms zu analysieren, wurden zur Durchführung sämtlicher Experimente dieser Arbeit Balb/c-Mäuse verwendet. Da murine 4T1 Mammakarzinomzellen ursprünglich aus dieser Mauslinie stammen, können sie zur Etablierung eines Tumormodells ausschließlich in immunkompetenten Balb/c-Mäusen verwendet werden. Zudem eignet sich dieser Mausstamm aufgrund seiner unpigmetierten Ohrmuscheln sehr gut für intravitalmikroskopische Untersuchungen, da diese eine gute Sichtbarkeit von Blutzellen, Gefäßen sowie Gefäßwandelementen wie insbesondere der endothelialen Glykokalix ohne eine vorherige chirurgische Präparation ermöglichen. Dadurch wird sowohl die Belastung der Tiere während des Versuchs deutlich reduziert als auch die Gefahr einer chirurgisch induzierten Entzündungsreaktion im Gewebe vermindert, welche die Versuchsergebnisse beeinflussen können.

## 1.2. Verwendung des heterotopen Tumormodells an der Ohrmuschel

Als Basis aller Untersuchungen dieser Arbeit wurde ein heterotopes Tumormodell an der Ohrmuschel von Mäusen gewählt, welches ursprünglich von Ng und Kollegen [351] sowie Roediger und Kollegen [352] etabliert worden ist. Es ist hervorragend dafür geeignet, Prozesse in der Mikrozirkulation in gesundem, entzündetem und - nach Implantation von Tumoren – tumorös verändertem Gewebe *in vivo* zu analysieren [353] [354]. Durch den einfachen Zugang zur Ohrmuschel und den oberflächlich liegenden Gefäßen, bedingt durch die geringe Tiefenausdehnung des Ohrmuschelgewebes, müssen für die mikroskopischen Analysen ihrer Mikrozirkulation regelhaft keine invasiven chirurgischen

Präparationen durchgeführt werden. Dadurch kann eine sterile Entzündungsreaktion im Gewebe - hervorgerufen durch ein chirurgisches Trauma - vermieden werden [355] [356] [357], sodass eine Verfälschung der Ergebnisse unwahrscheinlich ist. Darüber hinaus können wiederholte *In-vivo*-Analysen relativ unproblematisch durchgeführt werden. Ebenso kann durch dieses nicht-invasive Modell die Belastung der Versuchstiere im Gegensatz zu anderen Modellen zur Analyse der Mikrozirkulation, wie beispielsweise dem Kremastermuskel- oder dem Rückenhautkammer-Modell, sehr gering gehalten werden. Ein weiterer Vorteil des heterotopen Tumormodells an der Ohrmuschel besteht darin, dass stabile Mikroskopieaufnahmen von der Mikrozirkulation der Ohrmuschel erstellt werden können, da das Ohr frei von Bewegungsartefakten ist, welche z. B. durch die Atmung oder die Pulswelle verursacht werden.

Über den Einsatz des heterotopen Tumormodells an der Ohrmuschel wurde in dieser Arbeit die Expression der endothelialen Glykokalix sowie deren Bedeutung für das Tumorwachstum, die Angiogenese, die Gefäßpermeabilität und die Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten in der Tumormikrozirkulation sowie im gesunden Gewebe *in vivo* untersucht.

Zur Induktion eines lokal wachsenden Tumors wurden Zellen des murinen Mammakarzinoms 4T1 verwendet. Diese Zelllinie stammt ursprünglich aus dem Brustdrüsengewebe von Balb/c Mäusen und wird sehr häufig in unterschiedlichen Tumormodellen zur Erforschung des humanen Brustkrebes eingesetzt. Sie weisen eine hohe Metastasierungsrate auf, wobei ihre Malignität mit humanen Mammakarzinomzellen im Endstadium der Erkrankung (Stadium IV gemäß TNM-Klassifikation) vergleichbar sind. Darüber hinaus werden murine 4T1-Zellen als hochimmunogene Tumorzellen beschrieben [358]. Dies bedeutet, dass sie in der Lage sind Immunreaktionen auszulösen, sodass immunologische Mechanismen der Tumorentstehung- und progression im heterotopen Tumormodell genauer analysiert werden können.

### 1.3. Einsatz der intravitralen Epifluoreszenzmikroskopie

Durch die Einführung der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie wurde es möglich, eine dynamische Analyse mikrovaskulärer Prozesse, beispielsweise der einzelnen Schritte des leukozytären und thrombozytären Rekrutierungsprozesses, am lebenden Organismus durchzuführen. Die intravaskuläre Rolle und die feste Adhärenz von Leukozyten und Thrombozyten am Gefäßendothel können mit dieser Methode hervorragend quantitativ analysiert werden. Darüber hinaus bietet diese Form der Mikroskopie die Möglichkeit, Blutbestandteile mit Hilfe spezifischer Fluoreszenzfarbstoffe selektiv zu visualisieren, wodurch beispielsweise unterschiedliche Zellpopulationen differenziert und dynamische Wechselwirkungen lebender Zellen in der Mikrozirkulation analysiert werden können. Einschränkend muss hinzugefügt werden, dass in verschiedenen Untersuchungen für einige Fluoreszenzfarbstoffe wie z. B. *Rhodamin 6G* oder *Acridin orange* in Kombination mit energiereichem Licht ein phototoxischer Effekt erzeugt wird, welcher die Bildung verschiedener ROS fördert. Diese können einerseits strukturelle Veränderungen der Zelle bis hin zum Zelltod verursachen und andererseits die Leukozyten- und Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion beeinflussen [359] [360]. Dieser phototoxische Effekt ist jedoch abhängig von der Wellenlänge des verwendeten Lichts, der Expositionszeit und der Menge des eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffes. Um phototoxische Effekte zu verhindern oder zumindest zu minimieren, wurden verschiedene Maßnahmen ergriffen: Die Auswertung sämtlicher intravitalmikroskopischer Parameter wurde erst im Anschluss an die Untersuchungen mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware Fiji durchgeführt, um die Beobachtungszeit möglichst kurz zu halten. Darüber hinaus wurden fluoreszierenden Substanzen mit möglichst geringem phototoxischem Effekt und davon nur die minimal benötigte Menge eingesetzt. Durch diese Maßnahmen konnte sowohl die Belastung der Versuchstiere während des gesamten Untersuchungszeitraumes reduziert als auch möglichst valide Ergebnisse generiert werden.

## 1.4. Einsatz der intravitralen 2-Photonen-Mikroskopie

Die 2-Photonen-Mikroskopie ist eine Weiterentwicklung der herkömmlichen 1-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie und basiert grundsätzlich auf demselben Funktionsprinzip [327]. Die Besonderheit dieser Mikroskopiertechnik ist, dass durch den Einsatz eines gepulsten Infrarot-Lasers (680-1040 nm) sehr hohe Photonendichten erreicht werden, wodurch das Elektron eines Fluorochroms nicht durch die Energie eines einzelnen Photons angeregt wird, sondern durch die gleichzeitige Absorption zweier, energieärmerer Photonen. Anschließend wird ein Photon mit einer doppelt so hohen Energie emittiert [328]. Dadurch sinkt einerseits die Phototoxizität für das Gewebe, andererseits bewirkt die hohe Photonendichte im Fokuspunkt nur dort eine Anregung des Fluorochroms, wodurch die Streustrahlung reduziert und ein Ausbleichen von umliegenden Bereichen verhindert wird [329]. Dies ist insbesondere im Hinblick auf die Empfindlichkeit der endothelialen Glykokalix von großem Vorteil, da das Risiko der Schädigung oder der unerwünschten Beeinflussung ihrer Struktur minimiert werden kann, um möglichst valide Versuchsergebnisse zu erhalten.

Ein weiterer Vorteil der gezielten Fluorochromanregung im Fokuspunkt ist die Möglichkeit zur Generierung von Schnittbildern und dadurch sekundär von einer 3D *In-vivo*-Visualisierung des Gewebes mit hoher Auflösung und hohem Kontrast über einen längeren Zeitraum [330]. Dies war in diesem Projekt insbesondere für die Untersuchungen zur Angiogenese von Vorteil, da mit Hilfe der Erstellung von 3D-Aufnahmen die Gefäßarchitektur in allen Schichten des Ohrgewebes erfasst und analysiert werden konnte.

Zudem konnten durch den Einsatz der 2-Photonen-Mikroskopie auch tiefer liegende Gefäße innerhalb des Tumorgewebes erreicht und visualisiert werden, da diese im Vergleich zur klassischen Fluoreszenzmikroskopie Licht mit höherer Wellenlänge nutzt, wodurch Eindringtiefen von bis zu 1000 µm im Gewebe erreicht werden können, was mit konventionellen Fluoreszenzmikroskopie-verfahren nicht möglich ist [331].

## 1.5. Versuchsprotokoll

Um ein Versuchsmodell zu etablieren, welches die Möglichkeit bietet, Veränderungen sowohl in der intakten Mikrozirkulation als auch in der Tumormikrozirkulation hinsichtlich der endothelialen Glykokalix, der Gefäßarchitektur, der Permeabilität und der unterschiedlichen Schritte des intravaskulären Rekrutierungsprozesses von Thrombozyten und Leukozyten in die Tumormikrozirkulation im zeitlichen Verlauf von 14 Tagen zu analysieren, wurde das heterotope Ohrmuschelmodell gewählt. Dabei wurden sowohl an der gesunden Ohrmuschel als auch im heterotopen Tumormodell der Ohrmuschel der Maus systematische Untersuchungen an den Tagen 1, 4, 7 und 14 Tagen nach intradermaler NaCl- bzw. Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel durchgeführt. Die Auswahl der jeweiligen Zeitpunkte für die Untersuchungen orientierte sich sowohl an den bereits bekannten, unterschiedlichen Zeitpunkten des Einsetzens von molekularen und zellulären pathophysiologischen Prozessen innerhalb der Tumorumgebung als auch an den unterschiedlichen Rekrutierungszeitpunkten von Thrombozyten und Leukozyten des angeborenen und des erworbenen Immunsystems [361] [362]. Dabei bieten die über 14 Tage regelmäßig aufgeteilten Untersuchungen einen Kompromiss zwischen dem Ziel, Veränderungen zu erfassen, und dem gleichrangigen Ziel, die Belastung der Versuchstiere so gering wie möglich zu halten.

Die Auswahl der Enzyme Heparinase III aus *Flavobacterium heparinum*, Hyaluronidase aus *Streptomyces hyaluronicus* und Neuraminidase aus *Clostridium perfringens* zur spezifischen Degradation der Glykokalix sowie ihre verabreichte Konzentration zu je 1 U/ml Gesamtblutvolumen einer Maus, erfolgte auf Grundlage bisher publizierter Studien zur Rolle der Glykokalix in der Mikrozirkulation [363] [282] [364] [272] [365]. Da aus Vorversuchen zu dieser Arbeit hervorging, dass eine signifikante systemische Reduktion der endothelialen Glykokalix durch die systemische Verbreitung der o. g. Enzyme im Abstand von 4 Tagen konstant aufrechterhalten werden konnte, wurde dieses Intervall für den gesamten Untersuchungszeitraum von 14 Tagen beibehalten.

Ebenso erfolgte die Auswahl des niedermolekularen Heparanaseinhibitors OGT 2115 sowie seine verabreichte Menge zur systemischen Protektion der Glykokalix auf Basis bereits veröffentlichter Studien [366] [313] [367] [312]. In diesen Studien

wurde gezeigt, dass Heparansulfat sowohl eine sehr wichtige Komponente als auch einen sehr großen Anteil in der endothelialen Glykokalix darstellt. Weiterhin konnte in einer experimentellen *In-vitro*-Studie zum Mammakarzinom mit Hilfe eines ELISA-Tests nachgewiesen werden, dass der Inhibitor effektiv die Heparanaseaktivität inhibiert [368].

## 2. Diskussion der Ergebnisse

Das Mammakarzinom gilt weltweit als die am häufigsten diagnostizierte maligne Tumorerkrankung mit Todesfolge bei Frauen [5]. Obwohl dank großer Fortschritte in der Brustkrebsdiagnostik- und therapie die Überlebenszeit und die Heilungschancen in den letzten Jahren trotz steigender Erkrankungszahlen bereits verbessert werden konnten [15], ist die Mortalität insbesondere im fortgeschrittenen Tumorstadium noch immer sehr hoch [440]. Ein umfassenderes Verständnis über die Pathogenese von Brustkrebs könnte als Basis für eine weitere Optimierung von Diagnostik und Therapie dieser Erkrankung darstellen. Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass die Ursache maligner Tumorerkrankungen häufig auf ein multifaktorielles Geschehen zurückzuführen ist, wobei inflammatorische Prozesse wie die Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten in den Tumor sowie die Angiogenese und Gefäßpermeabilität für die Tumorprogression eine wichtige Rolle spielen [183] [369] [370]. Hierbei kann eine chronische Entzündung ein Auslöser für die Entartung von Zellen darstellen, welche ihrerseits selbst bereits in sehr frühen Tumorstadien eine akute systemische Entzündungsreaktion induzieren können [308]. Dabei werden verschiedene Prozesse in der Mikrozirkulation, wie beispielsweise die Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten in den Tumor, die Erhöhung der Gefäßpermeabilität und Umbauprozesse im Gewebe eingeleitet, welche einerseits zur Tumorabwehr beitragen, andererseits aber auch die Initiation und Progression von Krebs fördern können [254]. In diesem Zusammenhang ist es auch interessant, dass es im Zuge akuter und chronischer inflammatorischer Prozesse in der Mikrozirkulation, wie beispielsweise bei einem Ischämie-Reperfusionsschaden, bei Atherosklerose oder bei Sepsis [293] [299], zur Degradation der endothelialen Glykokalix kommt, welche unter physiologischen Bedingungen auf der Gefäßinnenseite als Schutzbarriere gegenüber Einflüssen

aus der Umgebung fungiert [294] [295] [267]. Dabei führt ein lokaler oder generalisierter Verlust der endothelialen Glykokalix letztendlich zur endothelialen Dysfunktion mit Hyperpermeabilität und nachfolgender Ödembildung im Parenchym sowie zur verstärkten Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten und Thrombozyten [296] [295] [279]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass verschiedene Leukozytensubpopulationen myeloiden und lymphoiden Ursprungs aufgrund ihrer unterschiedlichen Funktionen nicht nur an der Tumorabwehr beteiligt sind, sondern auch maßgeblich zur Entstehung, Progression und Metastasierung maligner Tumore beitragen können. Die Aktivierung anti-tumoraler oder pro-tumoraler Mechanismen wird dabei durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Zellen des Tumorstromas, welches neben Tumorzellen aus Fibroblasten, Endothelzellen, Perizyten und Leukozyten besteht, gesteuert. Aber auch Thrombozyten können im Gefäßsystem in diesen Prozess eingreifen und dadurch sowohl zur Tumoringhibition als auch zur Tumorprogression beitragen. Von entscheidender Bedeutung ist jedoch, dass sowohl Leukozyten als auch Thrombozyten zunächst in die Tumormikrozirkulation rekrutiert werden und Leukozyten anschließend die Gefäßbarriere überwinden und ins Tumorgewebe einwandern. Da in der Tumormikrozirkulation maligner Tumore ebenfalls inflammatorische Bedingungen vorherrschen, könnten die o. g. Prozesse auch beim Mammakarzinom durch die Aktivierung pro-tumoraler Mechanismen zur Tumorprogression und Metastasierung beitragen [300] [258].

Als vielversprechender neuartiger Ansatz wurden deshalb in den letzten Jahren bereits verschiedene Heparanaseinhibitoren auf ihre Wirkung als Krebstherapeutikum überprüft. Die meisten davon wurden entweder erst *in vitro* getestet oder befinden sich derzeit noch in der präklinischen Phase, wobei anti-angiogenetische Effekte in unterschiedlichem Ausmaß festgestellt werden konnten [312]. Aktuell wurde lediglich das Heparanase-inhibierende Mannan-sulfonierte Oligosaccharid *PI-88* in einer klinischen Studie erprobt, wobei eine vielversprechende Wirkung hinsichtlich der Verminderung der Heparanaseaktivität und der Bindung von Wachstumsfaktoren festgestellt werden konnte [313].

Bislang ist die Glykokalix im Mikrogefäßsystem maligner Tumore jedoch noch nicht systematisch untersucht worden. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die endotheliale Glykokalix und ihre Rolle für das Wachstum, die Angiogenese, die Gefäßpermeabilität und die Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten in die Tumormikrozirkulation ebenso wie die Regulation ihrer Interaktion mit Endothelzellen untersucht. Ein besseres Verständnis hierüber könnte zur Entwicklung neuartiger Strategien in der Krebstherapie beitragen, welche durch pharmakologische Modulation von Umbauprozessen der Glykokalix in malignen Tumoren hinsichtlich der anti-tumoralen Effekte wirksamer und gleichzeitig nebenwirkungsärmer als die aktuellen Therapieformen sein könnten.

## 2.1. Architektur der endothelialen Glykokalix in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms

Aus vorangegangenen Untersuchungen zur endothelialen Glykokalix ist bekannt, dass diese Struktur der Gefäßwand physiologisch einem kontinuierlichen Auf- und Abbau unterlegen ist. Des Weiteren konnte bereits nachgewiesen werden, dass akute und chronische inflammatorische Prozesse im Gefäßsystem, beispielsweise bei einem Ischämie-Reperfusionsschaden, bei Atherosklerose oder bei Sepsis [293] [299], zur Degradation der endothelialen Glykokalix führen. Dadurch kommt es zum Verlust ihrer gefäßprotektiven, anti-inflammatorischen und anti-koagulatorischen Eigenschaften. Sowohl ein lokaler als auch ein generalisierter Verlust dieser Schutzbarriere führt zur endothelialen Dysfunktion mit Hyperpermeabilität und nachfolgender Ödembildung im Parenchym sowie zur verstärkten Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten und Thrombozyten in die Mikrozirkulation. Aktivierte Leukozyten und Thrombozyten können ihrerseits entweder direkt durch die Freisetzung Glykokalix-degradierender Substanzen oder indirekt durch Aktivierung schädigender Mechanismen einen Gefäßschaden zusätzlich verstärken [296] [305] [306] [291, 294, 300]. Darüber hinaus ist bekannt, dass auch Tumorzellen durch die Sekretion unterschiedlichster Zytokine, Chemokine, Proteasen und Wachstumsfaktoren eine systemische Entzündungsreaktion induzieren und diese auch modulieren können. Dieser Prozess kann wiederum die Tumorprogression maßgeblich beeinflussen [370] [371] [372] [373] [362]. Beispielsweise konnte bei unterschiedlichen

Krebserkrankungen eine erhöhte Heparanaseaktivität im Blutplasma der Patienten nachgewiesen werden, welches zur Degradation der endothelialen Glykokalix beiträgt [309] [310] [311] [312]. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass Tumorzellen bereits in frühen Stadien die Fähigkeit zur Produktion und Freisetzung Glykokalix-degradierender Enzyme aufweisen [374]. Über diese Prozesse könnten maligne Tumoren sekundär eine inflammatorische Antwort und damit ihre Progression oder Metastasierung verstärken.

Aufgrund der vielfältigen physiologischen und pathophysiologischen Funktionen sowie der Heterogenität der Expression der endothelialen Glykokalix im Gefäßsystem wurde als Grundlage dieser Studie zunächst in einer ersten Versuchsreihe mit Hilfe der intravitalem 2-Photonenmikroskopie die Architektur der endothelialen Glykokalix in Arteriolen, Kapillaren und Venolen der intakten Mikrozirkulation sowie im peri- und intratumoralen Mikrogefäßsystem des heterotopen Mammakarziommodells an der Ohrmuschel analysiert. In allen Gefäßtypen der intakten Mikrozirkulation konnte sowohl hinsichtlich ihrer Extension in das Gefäßlumen hinein als auch ihrer Dichte über den gesamten Untersuchungszeitraum eine stabile Expression festgestellt werden, welche sich nur am ersten Tag nach intradermaler Injektion der Kochsalzlösung geringgradig und nicht signifikant verringert darstellte. Da sich die Expression jedoch im Verlauf des Untersuchungszeitraums regenerierte und dabei auf ein stabiles Niveau einpendelte, lässt sich der vorübergehende Rückgang mutmaßlich auf die Injektion zurückführen, welche mit einer kurzfristigen Belastung und teilweise einer geringfügigen traumatischen Schädigung des umliegenden Gewebes verbunden ist. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Studien, welche bereits gezeigt haben, dass ein chirurgisches Gewebetrauma zum partiellen, temporären Verlust der endothelialen Glykokalix in der Mikrozirkulation führt [345] [266]. In der peritumoralen Mikrozirkulation hingegen fand sich eine kontinuierliche Reduktion sowohl der Extension als auch der Dichte der endothelialen Glykokalix im Verlauf von 14 Tagen, welche sich infolge der Tumorprogression und den damit verbundenen fortschreitenden inflammatorischen Prozessen erklären lässt [370]. Eine endotheliale Glykokalix innerhalb der Tumormikrozirkulation konnte erst sieben Tage nach intradermaler Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel detektiert werden. Während des Untersuchungszeitraums bis 14 Tagen war diese jedoch

deutlich schwächer ausgebildet als in gesunden Mikrogefäßen und leicht reduziert im Vergleich zu Mikrogefäßen der peritumoralen Mikrozirkulation desselben Untersuchungstages. Dies lässt sich anhand der bereits vorhandenen Erkenntnisse zur Tumorbiologie erklären, welche belegen, dass eine Neubildung zusätzlicher Blutgefäße zur Deckung des erhöhten Sauerstoff- und Nährstoffbedarfs erst ab einem Tumordurchmesser von etwa 2 mm erfolgt. Die neugebildeten tumorspezifischen Gefäße reifen jedoch oftmals nicht vollständig aus, weshalb sie eine andere Gefäßarchitektur aufweisen als physiologische Blutgefäße. Die Ergebnisse dieser Versuchreihe deuten an, dass diese Unterschiede zwischen intakten Blutgefäßen und Tumorblutgefäßen auch hinsichtlich der Entwicklung der Glykokalix bestehen [101] [253].

## 2.2. Analyse der Angiogenese in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms

Für die Tumorprogression stellt die Neubildung von Blutgefäßen, die sogenannte Tumorangiogenese, einen entscheidenden Faktor dar [253] [249]. Bis zu einem Durchmesser von etwa 2 mm können Tumore von umliegenden Gefäßen ausreichend mit Sauerstoff- und Nährstoffen versorgt werden. Um weiterwachsen und potenziell metastasieren zu können, sind sie jedoch ab einem Durchmesser von 2 mm auf zusätzliche Blutgefäße angewiesen. Infolge einer Sauerstoff- und Nährstoffunterversorgung können Tumorzellen durch die Freisetzung von Molekülen wie Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF) oder Matrixmetalloproteasen die Neubildung eines eigenen Gefäßsystems induzieren. Zusätzlich wird die Tumorangiogenese durch die von Tumorzellen ins Tumorstroma rekrutierten Immunzellen, wie Monozyten oder neutrophilen Granulozyten, welche dort ihrerseits ebenfalls pro-angiogenetische Faktoren freisetzen und dadurch die Aussprossung neuer Gefäßäste aus bereits vorhandenen peritumoralen Gefäßen induzieren können, weiter stimuliert [136]. Die pharmakologische Angiogenese-Inhibition (z. B. durch VEGF-Inhibition), welche diesen kritischen Prozess der Tumorbiologie direkt beeinflusst, wird bereits heute in der klinischen Tumorthherapie (z.B. beim Mamma-, Ovarial- und Nierenzellkarzinom) erfolgreich eingesetzt [104] [105]. Es ist jedoch nur unzureichend untersucht, welche Bedeutung die endotheliale Glykokalix im Mammakarzinom für die Tumorangiogenese besitzt. Da bereits beschrieben wurde, dass die endotheliale

Glykokalix zahlreiche Wachstumsprozesse wie beispielsweise auch die Bildung neuer Blutgefäße reguliert, wurde in dieser Studie als Grundlage für die nachfolgenden Untersuchungen die Gefäßarchitektur in der peri- und intratumoralen Mikrozirkulation des Mammakarzinoms im heterotopen Tumormodell an der Ohrmuschel sowie in der intakten Mikrozirkulation der Ohrmuschel mit Hilfe der intravitralen 2-Photonenmikroskopie analysiert. In diesen Experimenten konnten bei gesunden Versuchstieren erwartungsgemäß eine regelrechte Ohrmuschelgefäßarchitektur mit Arteriolen, Kapillaren und Venolen während des Gesamtuntersuchungszeitraums von 14 Tagen identifiziert werden. In der peritumoralen Mikrozirkulation des Mammakarzinoms im heterotopen Tumormodell der Ohrmuschel waren an den Untersuchungstagen 1 und 4 nach intradermaler Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel keine signifikanten Unterschiede zur intakten Mikrozirkulation tumorfreier Ohrmuscheln vorhanden. Dagegen konnte ab Tag 7 bis zum Ende der Untersuchungen eine kontinuierliche Zunahme sowohl der Gefäßdichte als auch der Anzahl der Gefäße und der Gefäßverbindungen in der peritumoralen Mikrozirkulation beobachtet werden. Diese Daten entsprechen den Ergebnissen, welche in vergleichbaren Untersuchungen zur Angiogenese im Tumormodell des Mammakarzinoms gefunden wurden [221] [106] [217]. Im Tumor selbst konnten Gefäße anhand der hier angewendeten Methode erst ab Tag 7 detektiert werden. Es zeigte sich jedoch ab diesem Zeitpunkt bis zum Ende der Untersuchungen, dass sowohl die Gefäßdichte wie auch die Anzahl der Gefäße und der Gefäßverbindungen in der intratumoralen Mikrozirkulation kontinuierlich und signifikant zunahm. Die intratumorale Gefäßarchitektur war an Tag 14 schließlich quantitativ stärker ausgebildet als in der gesunden sowie auch in der peritumoralen Mikrozirkulation. Die kontinuierliche Zunahme der peritumoralen Gefäßarchitektur deutet darauf hin, dass der auf Basis der injizierten 4T1-Zellen entstandene Tumor, welcher bereits als hochimmunogener Tumor beschrieben wurde [358], pro-angiogenetische Prozesse in der Tumormikroumgebung entweder durch direkte oder indirekte Mechanismen initiiert hat. Beispielsweise wurde in der Literatur beschrieben, dass 4T1-Tumoren eine peritumorale Entzündungsreaktion initiieren, wodurch neutrophile Granulozyten und Monozyten in den Tumor rekrutiert werden und diese dort durch die Freisetzung pro-angiogenetischer Faktoren die Aussprossung neuer Gefäßausläufer aus bereits vorhandenen peritumoralen Gefäßen

stimulieren [375] [376] [358]. Die intratumoral entstandene Mikrozirkulation, welche sich erst zu einem späteren Zeitpunkt entwickelte als im peritumoralen Gewebe, könnte dadurch entstanden sein, dass die Tumorzellen sich nach ihrer Injektion in die Ohrmuschel zunächst im Gewebe vermehren und zu einem zusammenhängenden Gewebeverband organisieren müssen, sodass eine ausreichende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung über die Diffusion aus der Umgebung noch bis zu einem Tumordurchmesser von ungefähr 2 mm gewährleistet war („avaskuläre Phase“) [101]. Weiterhin lassen sich die Beobachtungen zu den intratumoralen Mikrogefäßen dadurch erklären, dass infolge der Tumorprogression und der daraus resultierenden Hypoxie innerhalb des Tumorgewebes die Sekretion pro-angiogenetischer Faktoren aus Tumorzellen die Bildung sowie das kontinuierliche Wachstum eines eigenen Tumorgefäßnetzwerks ausgelöst hat („vaskuläre Phase“) [253]. Der plötzliche schnelle Anstieg der intratumoralen Gefäßdichte könnte auf der sogenannten Tumorverdopplungszeit beruhen, welche die zeitabhängige Volumenzunahme solider Tumore idealisiert in einer Exponentialfunktion beschreibt [377].

### 2.3. Analyse der mikrovaskulären Permeabilität im Mammakarzinom

Die endotheliale Glykokalix ist zusammen mit Endothelzellen und der darunterliegenden Basallamina maßgeblich an der Regulation der Gefäßpermeabilität beteiligt [278]. In der Tumormikrozirkulation stellt die Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität ein Schlüsselereignis für die Tumorprogression dar [183] [378]. So konnte bereits nachgewiesen werden, dass im Rahmen einer von Tumorzellen induzierten Entzündungsreaktion interendotheliale Zellverbindungen durch verschiedenste Proteasen, Zytokine und ROS aufgebrochen und Umbauprozesse in der Basalmembran eingeleitet werden. Damit verbunden ist neben einem verstärkten Flüssigkeits-, Sauerstoff- und Nährstoffeinstrom auch der Übertritt von tumorfördernden Wachstumsfaktoren (z. B. VEGFs) und Leukozyten (TAMs und TANs) oder immunsupprimierenden Faktoren (z. B. TGF- $\beta$ ) ins Tumorgewebe [379]. Als Folge davon wird die Aussprossung neuer Blutgefäße im Tumor ebenso wie die Unterdrückung der anti-tumoralen Immunabwehr eingeleitet, wodurch sekundär das Tumorwachstum

gefördert wird [337]. Das Gefäßbett eines Tumors weist dabei jedoch im Vergleich zu physiologischen Blutgefäßen einige Unterschiede und Besonderheiten auf, wobei in Tumorgefäßen unter anderem die normalerweise flächige endotheliale Auskleidung stellenweise unterbrochen ist und diese Gefäße ein ungleiches, aber insgesamt erhöhtes Maß an Fenestrationen sowie transzellulären und interzellulären Lücken aufweisen. Neben der dadurch erhöhten mikrovaskulären Permeabilität, begünstigt der Gefäßintegritätsverlust die Abschwemmung von Tumorzellen in den Blutstrom, wodurch diese in anderen Körperregionen Metastasen bilden können [323] [380]. Aufgrund der Funktion der endothelialen Glykokalix als wichtiger Regulator der Gefäßpermeabilität und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, welche zeigen, dass die Glykokalix in der peri- und intratumoralen Mikrozirkulation des Mammakarzinoms im Vergleich zu intakten Mikrogefäßen vermindert ausgebildet ist, wurde in dieser Arbeit untersucht, inwiefern diese wichtige endotheliale Struktur die Gefäßpermeabilität im Mammakarzinom beeinflusst. Mit Hilfe der intravitralen Epifluoreszenz-mikroskopie konnte im heterotopen Tumormodell der Ohrmuschel festgestellt werden, dass es in der peritumoralen Mikrozirkulation im Verlauf der Untersuchungen über 14 Tage hinweg zu einem kontinuierlichen und signifikanten Anstieg der mikrovaskulären Permeabilität kam, wohingegen bei gesunden Tieren keine Erhöhung der Gefäßpermeabilität beobachtet werden konnte. Diese Befunde decken sich mit den bereits vorhandenen Daten zur mikrovaskulären Gefäßpermeabilitätserhöhung in Folge einer Tumorprogression. Auch in der perivaskulären Mikrozirkulation innerhalb des Tumorgewebes konnte 7 Tage nach der Tumorzellinjektion eine kontinuierliche und signifikante Erhöhung der Gefäßpermeabilität festgestellt werden. Da in der unmittelbaren Umgebung der Tumorzellinjektion Gefäße erst in Folge der Tumorprogression neu gebildet wurden, ist es nachvollziehbar, dass intratumoral eine mikrovaskuläre Permeabilität erst zu einem späteren Zeitpunkt nachgewiesen werden konnte als in weiter entfernten Injektionsbereichen des Ohrmuschelgewebes.

## 2.4. Rekrutierung von Thrombozyten und myeloiden Leukozytensubpopulationen in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms

Das Vorhandensein einer ungewöhnlich hohen Leukozytenanzahl im Tumorgewebe wurde erstmalig 1863 von Rudolf Virchow beobachtet [381] [369]. Zu diesem Zeitpunkt postulierte er, dass Krebs an Orten chronischer Entzündungen entsteht. Im Rahmen akuter Entzündungen dient die Leukozytenrekrutierung zum Ort der Schädigung primär der Pathogenabwehr- und -elimination. Dagegen ist inzwischen bekannt, dass es beim Persistieren eines Inflammationsstimulus im Rahmen chronisch entzündlicher Bedingungen, welche auch bei Krebserkrankungen vorherrschen, zur Rekrutierung von Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems kommt und diese in malignen Läsionen neben der Ausübung anti-tumoraler Funktionen, beispielsweise über die direkte Elimination neoplastischer Zellen, unter Einfluss des Tumormilieus auch pro-tumorale Funktionen ausüben können [134]. Dabei können diese Immunzellen durch unterschiedliche Mechanismen, beispielsweise über die Produktion und Freisetzung von ROS, Proteasen, pro-angiogenetischen oder T-Zell-supprimierenden Zytokinen maßgeblich zur Tumorentstehung- und -progression beitragen [362] [373] [382].

Auch die Progression des Mammakarzinoms ist durch eine signifikante Zunahme der Infiltration sowohl angeborener als auch adaptiver Immunzellen im betroffenen Gewebe gekennzeichnet, wobei Makrophagen, neben B- und T-Lymphozyten, die häufigste Leukozytensubpopulation im neoplastischen Stroma darstellt [338]. Interessanterweise konnte in diesem Zusammenhang beobachtet werden, dass die Bedeutung der einzelnen Leukozytensubpopulationen für den Krankheitsverlauf von verschiedenen Karzinomen nicht immer unmittelbar mit ihrer Gesamtanzahl im Tumorgewebe korreliert. Beispielsweise konnten Gentles et al. im Jahr 2015 im Mammakarzinom und anderen soliden Tumoren nachweisen, dass neutrophile Granulozyten im Vergleich zu Monozyten nur einen geringen Anteil aller im Tumorstroma vorhandenen Leukozyten darstellen. Trotzdem konnte hierbei festgestellt werden, dass die Anwesenheit von neutrophilen Granulozyten in diesen Neoplasien mit einer signifikant schlechteren Prognose assoziiert war [383]. Im Gegensatz zur verhältnismäßig geringen Anzahl neutrophiler Granulozyten innerhalb des Tumorgewebes wurde bei verschiedenen

Krebserkrankungen bereits eine starke Neutrophilie im Blut nachgewiesen, welche ebenfalls mit einer signifikant verringerten die Überlebensrate korrelierte [384] [385].

In den letzten Jahren wurden bereits unterschiedliche Mechanismen der intravaskulären Leukozyten- und Thrombozytenrekrutierung in die Tumormikrozirkulation, das Vorhandensein unterschiedlicher Leukozyten-subpopulationen im Tumorgewebe sowie das komplexe Zusammenspiel von Tumorzellen, Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen und der damit verbundenen unterschiedlichen Einflüsse auf den Fortschritt verschiedener Tumorerkrankungen einschließlich dem Mammakarzinom untersucht. Jedoch ist sowohl die zeitliche Abfolge als auch die gegenseitige Abhängigkeit der intravaskulären Leukozyten- und Thrombozytenrekrutierung im Mammakarzinom im Zusammenhang mit der Tumorprogression bislang nur sehr unzureichend erforscht.

Sowohl bei akuten als auch bei chronischen inflammatorischen Prozessen in der Mikrozirkulation werden Endothelzellen am Ort der Läsion durch Zytokine aus Makrophagen und weiteren gewebsständigen Zellen aktiviert. Aktivierte Endothelzellen exprimieren daraufhin Signal- und Adhäsionsmoleküle auf ihrer Zelloberfläche und setzen ihrerseits weitere chemotaktische Substanzen zur Einleitung der Thrombozyten- und Leukozytenrekrutierung in die Mikrozirkulation frei [200] [130]. Zusätzlich wird die Rekrutierungskaskade durch Chemokine und Zytokine aus aktivierten Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten, Monozyten und anderen zirkulierenden Immunzellen sowie bei Krebserkrankungen von Tumorzellen selbst verstärkt [214] [216] [386] [387]. Hierbei stellen das Rollen und die Adhärenz von aktivierten Leukozyten auf aktivierten Endothelzellen wesentliche Schritte der Leukozytenrekrutierungskaskade dar, welche für die Migration dieser Immunzellen ins geschädigte Gewebe zur Elimination von Pathogenen essentiell sind [388] [389]. In diesem Zusammenhang konnte in Mäusen nachgewiesen werden, dass auch aktivierte Thrombozyten, unter anderem über die Freisetzung von Serotonin, die Leukozytenadhäsion verstärken können [390]. Auch in Studien zu Tumorerkrankungen wurden einige wichtige Mechanismen in der Interaktion von Tumorzellen mit Leukozyten und

Thrombozyten aufgeschlüsselt, welche für die Tumorprogression von Bedeutung sind. Beispielsweise wird beschrieben, dass neben Leukozyten und Thrombozyten auch Tumorzellen entweder direkt über das von ihnen exprimierte  $\alpha V/\beta 3$ -Integrin an ICAM-1 von Endothelzellen adhären können, oder aber indirekt über parakrine Mechanismen, wie durch die Sekretion von IL-8, CCL2, CXCL1, CXCL2, CXCL5, MMPs oder Thrombin sowohl Thrombozyten als auch neutrophile Granulozyten und Monozyten aktivieren und anschließend über GPIIb/IIIa und P-Selektin an Thrombozyten oder über  $\alpha V/\beta 3$ -Integrin und ICAM-1 an neutrophile Granulozyten binden und dadurch ihre Adhäsion am Endothel initiieren. Diese Adhärenz wiederum ist die Grundlage für die Ausbildung von hämatogenen Metastasen im Körper [231]. Interessanterweise konnte in einer Studie zur Adhäsion und Metastasierung von Tumorzellen durch die systemische Verabreichung von Heparin die indirekte Adhärenz von Melanomzellen an Endothelzellen über die Bindung an Thrombozyten inhibiert und dadurch ihre Metastasierung verhindert werden [232] [308]. Als Erklärung werden hierbei sowohl die antikoagulatorischen Eigenschaften von Heparin als auch seine Fähigkeit Glykokalix-degradierende Enzyme - wie insbesondere die Heparanase - binden und inaktivieren zu können, von entscheidender Bedeutung zu sein.

Die zeitliche Abfolge und gegenseitige Abhängigkeit der intravaskulären Leukozyten- und Thrombozytenrekrutierung im Mammakarzinom im Zusammenhang mit der Tumorprogression ist bislang nur sehr unzureichend erforscht.

In dieser Versuchsreihe zur Rekrutierung von Thrombozyten und myeloiden Leukozytensubpopulationen in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms konnte interessanterweise zum ersten Mal gezeigt werden, dass Thrombozyten und neutrophile Granulozyten in peritumoralen Mikrogefäßen nicht nur schneller als klassische und nicht-klassische Monozyten (s. IV./5. und 11.) sowie T- und B-Lymphozyten (s. IV./6. und 12.) in Folge der tumor-assoziierten Entzündungsreaktion rekrutiert werden, sondern dass diese insgesamt über den gesamten Untersuchungszeitraum von 14 Tagen auch den größten Anteil aller intravaskulär mit dem mikrovaskulären Endothel interagierenden Immunzellen darstellten. Im Verlauf dieser Zeitspanne konnte eine kontinuierliche Zunahme sowohl rollender als auch fest adhärenter Thrombozyten und zeitlich leicht versetzt

von neutrophilen Granulozyten in der peritumoralen Mikrozirkulation beobachtet werden. Die Rekrutierung klassischer bzw. inflammatorischer Monozyten hingegen begann erst später ab Tag 7. Insgesamt nahm die Anzahl der intravaskulär rekrutierten Zellen aller Subpopulationen bis zum Ende der Untersuchungen an Tag 14, potentiell aufgrund des persistierenden, sich verstärkenden Entzündungsstimulus, kontinuierlich zu. Bei nicht-klassischen bzw. residenten Monozyten konnte über 14 Tage nur eine geringfügige, nicht-signifikante Zunahme der intravaskulär rekrutierten Zellen beobachtet werden. Dieses sequentielle Rekrutierungsmuster ist grob vergleichbar zur Thrombozyten- und Leukozytenrekrutierung unter anderen entzündlichen Bedingungen [391]. Es ist bereits bekannt, dass zirkulierende Thrombozyten innerhalb weniger Sekunden nach Auftreten eines Entzündungsstimulus (z. B. durch Prostaglandine, ADP oder Thrombin) aktiviert und rekrutiert werden [212, 213]. Die Aktivierung und Rekrutierung zirkulierender neutrophiler Granulozyten als zelluläre Akteure der unspezifischen Immunabwehr gegen Pathogene im entzündeten Gewebe erfolgt nach Stimulation mit pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF oder IL-1 $\beta$  dagegen erst nach wenigen Minuten [392]. Die in diesen Versuchen im Mammakarzinommodell beobachtete, im Vergleich zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten langsamere bzw. verzögerte Reaktion von Monozyten ist bereits bei anderen sterilen inflammatorischen Prozessen wie beispielsweise bei Ischämie/Reperfusion und Atherosklerose gezeigt worden [340] [393]. In diesem Zusammenhang wird einerseits beschrieben, dass klassische Monozyten im Vergleich zu nicht-klassischen Monozyten aufgrund ihrer vorwiegend pro-inflammatorischen Funktionen stärker und vergleichsweise schneller rekrutiert werden [161] [162], wohingegen andere Studien beschreiben, dass nicht-klassische Monozyten konstant an der Gefäßwand entlang patrouillieren und daher schneller zum Entzündungsgeschehen rekrutiert werden als klassische Monozyten [180]. Interessanterweise wurde beim humanen Dickdarmkrebs im Mausmodell, beobachtet, dass die Rekrutierung von nicht-klassischen Monozyten in Folge einer erhöhten CX3CL1-Expression auf Endothelzellen vorwiegend in perivaskuläre Tumorregionen verstärkt wird. Dagegen wurden in dieser Studie klassische Monozyten zu einem größeren Anteil in hypoxische intratumorale und zu einem geringeren Anteil in perivaskuläre Tumorregionen rekrutiert [167]. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe bestätigen hinsichtlich der

Rekrutierungsdynamik eine zeitlich primäre Rekrutierung klassischer Monozyten in der Tumormikrozirkulation des Mammakarzinoms. Hierbei konnte im Detail festgestellt werden, dass klassische Monozyten in der intra- und peritumoralen Mikrozirkulation bevorzugend zu nicht-klassischen Monozyten rekrutiert werden. Insbesondere in intratumoralen Mikrogefäßen wurden sogar deutlich mehr klassische Monozyten als nicht-klassische Monozyten rekrutiert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass klassische Monozyten in den ersten 14 Tagen des Wachstums eines Mammakarzinoms von größerer Bedeutung als nicht-klassische Monozyten.

Da sich in diesen Experimenten bis Tag 4 noch kein makroskopisch deutlich sichtbares Tumorgewebe und auch keine nachweisbaren Tumorgefäße gebildet hatten, konnte die Rekrutierung von Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten und klassischen Monozyten in intratumoralen Mikrogefäßen folglich erst ab dem nächsten Untersuchungszeitpunkt (Tag 7) beobachtet werden. Interessanterweise entsprach das Rekrutierungsmuster von Thrombozyten und myeloiden Leukozytenpopulationen in intratumoralen Mikrogefäßen grob dem der peritumoralen Mikrozirkulation, was darauf hindeutet, dass diese Blutzellen in beiden Kompartimenten der Tumormikrozirkulation eine wichtige Bedeutung haben.

Bei tumorfreien Kontrolltieren zeigte sich nur am ersten Tag nach intradermaler NaCl-Injektion eine geringgradige Rekrutierung von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten in der Mikrozirkulation des Injektionsgebietes, welche jedoch bereits ab Tag 4 nicht mehr erkennbar war. Diese temporäre Thrombozyten- und Leukozytenantwort lässt sich durch eine kurzfristig induzierte Entzündungsreaktion - ausgelöst durch den Vorgang der Injektion, welcher einen sterilen Inflammationsstimulus darstellt - erklären [357]. Die vorliegenden Ergebnisse deuten zudem an, dass keine persistierende Entzündung ausgelöst wurde, welche eine länger anhaltende Thrombozyten- und Leukozytenrekrutierung hätte induzieren können, wie es beispielsweise durch das Einbringen von Pathogenen ins Ohrmuschelgewebe und eine damit einhergehende Infektion geschehen wäre [357] [154]. Somit unterstützen diese Daten die Qualität des hier eingesetzten Modells.

Insgesamt konnte in dieser Versuchsreihe beobachtet werden, dass Thrombozyten und verschiedenen Leukozytensubpopulationen im Verlauf der Entstehung und des Wachstums eines Mammakarzinoms sequentiell in der intra- und peritumoralen Mikrozirkulation rekrutiert werden. Dabei stellen Thrombozyten und neutrophile Granulozyten im Zeitraum von 14 Tagen hinsichtlich der Anzahl den Hauptanteil aller intravaskulär rekrutierten Leukozyten im heterotopen Tumormodell der Ohrmuschel dar, wohingegen klassische Monozyten in geringerer Anzahl rekrutiert wurden und sich die Rekrutierung nicht-klassischer Monozyten nicht signifikant veränderte. Interessanterweise konnte intratumoral für klassische Monozyten im Gegensatz zu Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten bis zum Ende der Untersuchungen an Tag 14 eine kontinuierliche Zunahme sowohl rollender als auch fest adhärenter Zellen festgestellt werden, während sich die Zunahme der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten leicht abschwächte und für Thrombozyten ein Plateau erreichte.

## 2.5. Rekrutierung unterschiedlicher Lymphozytensubpopulationen in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms

Neben Tumorzellen, Fibroblasten, Perizyten, Endothelzellen sowie einer großen Anzahl an myeloiden Leukozyten enthält das Mammakarzinomgewebe auch viele unterschiedliche Lymphozytenpopulationen. Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass im Tumorgewebe in frühen Brustkrebsstadien vorwiegend B-Lymphozyten zu finden sind, wohingegen T-Lymphozyten – sowohl CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten (T-Helferzellen) als auch CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten (Zytotoxische T-Lymphozyten) – insbesondere in späteren und fortgeschritteneren Tumorstadien überwiegen [133]. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Funktionen können die einzelnen Lymphozyten-subpopulationen die Tumorprogression sowohl fördern als auch hemmen [362]. Die Aktivierung lymphozytärer anti-tumoraler oder pro-tumoraler Mechanismen wird hierbei durch das Zusammenspiel der verschiedenen Zellen des Tumorstromas gesteuert. Diese können sowohl durch direkten Kontakt miteinander kommunizieren als auch über autokrine oder parakrine Zytokin- und Chemokinsignale. Das Überwiegen oder Fehlen einzelner

Zellarten sowie ihr Aktivierungsstatus ist hierbei maßgeblich für die Balance zwischen Tumorchemmung- und -förderung [132] [394]. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1-Helferzellen und NK-Zellen der Tumorentstehung und -progression eher entgegenwirken, wohingegen die Aktivierung und Akkumulation von CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>2-Helferzellen, T<sub>reg</sub>-Lymphozyten, IL-17-produzierende T<sub>H</sub>17-Lymphozyten und B-Lymphozyten innerhalb des Tumorstromas das Tumorwachstum maßgeblich fördern und die Prognose verschlechtern [338].

Vergleichbar zu myeloiden Leukozyten und Thrombozyten ist noch unklar, zu welchem Zeitpunkt und in welcher Reihenfolge die verschiedenen Lymphozytensubpopulationen in der intra- und peritumoralen Mikrozirkulation rekrutiert werden. Daher wurde in dieser Studie die intravaskuläre Rekrutierung von B-Lymphozyten sowie CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten sequenziell über einen Zeitraum von 14 Tagen in der perivaskulären und in der intratumoralen Mikrozirkulation eines heterotopen Mammakarzinommodells analysiert. Dabei konnte eine relevante, signifikant erhöhte intravaskuläre Rekrutierung von B- und T-Lymphozyten sowohl in der peritumoralen als auch in der intratumoralen Mikrozirkulation erst ab Tag 14 nach Tumorzellinjektion und somit deutlich später als myeloide Leukozyten und Thrombozyten beobachtet werden. Diese im Gegensatz zu myeloiden Leukozyten verzögerte Aktivierung von Lymphozyten, welche erst zwischen 4 bis 5 Tagen nach Einwirken eines neuen Antigens einsetzt und deren Höhepunkt erst 7 und 14 Tage nach dem primären Antigenkontakt erreicht wird, ist bereits in verschiedenen Studien zum zeitlichen Ablauf der Immunantwort vorbeschrieben [395] [396] [397]. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Anzahl der rollenden und fest adhärenenten T- und B-Lymphozyten zwischen Tag 7 und Tag 14 in der peri- und intratumoralen Mikrozirkulation kontinuierlich zunahm, wobei fest adhärenente B-Lymphozyten mit einem sprunghaften Anstieg an Tag 14 den Hauptanteil aller Lymphozyten in der peri- und intratumoralen Mikrozirkulation darstellten. Dieser Effekt war besonders in den intratumoralen Mikrogefäßen sehr deutlich ausgeprägt. Bei der tumorfreien Kontrollgruppe zeigte sich an Tag 7 nach intradermaler NaCl-Injektion in die Ohrmuschel eine geringfügige Zunahme rollender T-Lymphozyten, welche an Tag 14 jedoch nur noch in einer sehr geringen Anzahl sichtbar waren. Es kann

angenommen werden, dass dieser kurzfristige Anstieg, vergleichbar zu den Ergebnissen für Thrombozyten und myeloiden Leukozyten, durch eine vorübergehende Aktivierung des Immunsystems – bedingt durch die mechanische Reizung des Ohrmuschelgewebes in Folge der NaCl-Injektion – ausgelöst wurde [357].

Zusammenfassend verdeutlichen die Ergebnisse dieser Untersuchungen, dass Lymphozyten im Vergleich zu Thrombozyten oder den myeloiden Leukozyten erst zeitlich versetzt in die Tumormikrozirkulation rekrutiert werden. Zudem scheinen B-Lymphozyten zum Zeitpunkt von 14 Tagen nach Tumorzellinjektion in der Tumormikrozirkulation vor den T-Lymphozytensubpopulationen zu akkumulieren.

## 2.6. Expression der endothelialen Glykokalix in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms unter Modulation der Glykokalixstruktur

Im Blutplasma von Krebspatienten können vermehrt Glykokalixabbauprodukte nachgewiesen werden, was sich beispielsweise durch eine Degradation im Rahmen einer systemischen Tumor-assoziierten Entzündungsreaktion erklären lässt [312] [313]. Aus *In-vitro*-Studien ist bekannt, dass auch Tumorzellen zur Produktion und Sekretion von Enzymen, wie beispielweise der Heparanase und Hyaluronidase in der Lage sind, welche die Glykokalix und damit ihre Schutzfunktion auf Endothelzellen schädigen und dadurch die Tumorprogression begünstigt wird [299] [294] [309]. In diesem Zusammenhang konnte in einer experimentellen Studie nachgewiesen werden, dass eine Protektion der endothelialen Glykokalix mit dem Plasmaglykoprotein Orosomuroid nicht nur die mikrovaskuläre Permeabilität, sondern auch die Tumorzelladhäsion am Gefäßendothel vermindert [304]. Wie alle Körperzellen besitzen auch Tumorzellen auf ihrer Oberfläche eine Glykokalix. Diese weist gegenüber der endothelialen Glykokalix jedoch sowohl strukturelle als auch funktionelle Unterschiede auf und ist im Gegensatz zur endothelialen Glykokalix durch die Überexpression von Heparansulfat, Hyaluronsäure und Glykoproteinen sehr robust gegenüber äußeren Einflüssen. Dies macht Tumorzellen nicht nur unempfindlich gegenüber Chemotherapeutika und der Immunabwehr, sondern fördert auch die

Tumorprogression und Metastasierung [398]. Daneben ermöglicht eine einzigartige Syndekanexpression ebenso wie eine veränderte Glykosilierung tumorzellspezifischer Glykosaminoglykane eine Vielzahl molekularbiologischer Mechanismen, welche die Tumorprogression fördern kann [262].

In vorangegangenen Experimenten der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig die Expression der endothelialen Glykokalix in der Mikrozirkulation des Mammakarzioms genauer charakterisiert werden. In einer weiteren Reihe an Experimenten wurde in Ergänzung dazu der Einfluss einer Modulation der Glykokalixstruktur auf die Tumorprogression analysiert. Diese Versuche wurden an eine vorangegangene Studie angelehnt, bei welcher durch die systemische Verabreichung der Glykokalix-degradierenden Enzyme Heparinase III, Hyaluronidase und Neuraminidase eine signifikante Reduktion der endothelialen Glykokalix in Arteriolen, Kapillaren und Venolen des Kremastermuskels von C57BL/6N-Mäusen erreicht wurde [399]. Um den Effekt einer systemischen pharmakologischen Glykokalixdegradation zu untersuchen, wurde deshalb die Expression der endothelialen Glykokalix in der peritumoralen und intratumoralen Mikrozirkulation eines experimentellen Mammakarzinoms über 14 Tage bei repetitiver systemischer Applikation dieser drei Enzyme analysiert.

Die quantitative Auswertung ergab, dass diese repetetive systemische Verabreichung der Enzymmischung die bereits vom Tumor induzierte Degradation der endothelialen Glykokalix sowohl in ihrer Extension als auch in ihrer Dichte in allen Gefäßsegmenten (Arteriolen, Kapillaren und Venolen) der peritumoralen Mikrozirkulation im Vergleich zur Mikrozirkulation unbehandelter Tumortiere kontinuierlich verstärkte. Dabei erwies sich die endotheliale Glykokalix in Venolen relativ zu Arteriolen und Kapillaren als besonders fragil, da sie hinsichtlich ihrer Extension und Dichte den stärksten Abbau unter der Enzymbehandlung zeigte. Dieses Phänomen konnte auch in der eingangs erwähnten Studie zum Einfluss einer enzymatischen Degradation der endothelialen Glykokalix in verschiedenen Gefäßabschnitten des Kremastermuskels der Maus beobachtet werden, in der die venuläre endotheliale Glykokalix im Rahmen entzündlicher Prozesse relativ am stärksten degradiert wurde [399]. Die vorliegenden Ergebnisse verdeutlichen, dass die Degradation der endothelialen Glykokalix in Mikrogefäßen des

Mammakarzinoms spezifisch über eine enzymatische Degradation verstärkt werden kann.

In intratumoralen Gefäßen konnte beobachtet werden, dass die repetitive systemische Verabreichung der drei Enzyme die Ausbildung der in Tumormikrogefäßen von unbehandelten Tieren im Vergleich zu gesunden Mikrogefäßen bereits reduzierten endothelialen Glykokalix weiter verlangsamte.

Zusätzlich wurde in einem umgekehrten Ansatz der Einfluss einer systemischen pharmakologischen Glykokalixprotektion mittels eines Heparanaseinhibitors auf die Ausbildung der endothelialen Glykokalix in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms untersucht. Interessanterweise ergaben diese Versuche, dass repetitive systemische Applikationen des niedermolekularen Heparanaseinhibitors OGT 2115 über den gesamten Untersuchungszeitraum die Mammakarzinom-induzierte Reduktion der endothelialen Glykokalix in peritumoralen Mikrogefäßen nahezu vollständig verhinderte. Obwohl dieser Effekt in intratumoralen Mikrogefäßen wesentlich schwächer ausgeprägt war, bewirkte die Inhibition der Heparanase im Vergleich zur Vehikelbehandlung ebenfalls eine Erhöhung der endothelialen Glykokalixausbildung. Eine Erklärung für den in intratumoralen Mikrogefäßen schwächer ausgeprägten Effekt des Inhibitors auf die endotheliale Glykokalix im Vergleich zu peritumoralen Mikrogefäßen könnte aus den Ergebnissen zur Analyse der Expression der endothelialen Glykokalix in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms abgeleitet werden (s. IV./ 1.). Aus diesen geht hervor, dass die endotheliale Glykokalix in intratumoralen Tumorgefäßen, welche nicht im Sinne von intakten Mikrogefäßen entwickelt sind, bereits schwächer ausgebildet ist, weshalb eine Protektion ihrer Struktur auch zu einem entsprechend schwächeren Effekt in den Tumorgefäßen führt.

Zusammenfassend verdeutlichen die Ergebnisse dieser Versuchsreihe, dass der Abbau der endothelialen Glykokalix sowohl in peri- als auch in intratumoralen Mikrogefäßen des Mammakarzinoms durch Heparanase vermittelt wird. Darüber hinaus zeigen diese Ergebnisse, dass die endotheliale Glykokalix sowohl in der peritumoralen als auch in der intratumoralen Mikrozirkulation pharmakologisch modulieren lässt.

## 2.7. Analyse der Angiogenese in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms unter Modulation der Glykokalixstruktur

Wie in vorherigen Abschnitten bereits ausgeführt, ist die endotheliale Glykokalix neben der Regulation von Interaktionen zwischen Thrombozyten und Leukozyten mit dem Gefäßendothel auch essentiell für die Aufrechterhaltung der mikrovaskulären Gefäßintegrität [260]. Im intakten Zustand überragt die endotheliale Glykokalix sämtliche eingebettete Zelladhäsionsmoleküle und Rezeptoren auf dem Endothel, wodurch sie deren Zugänglichkeit reguliert und darüber neben der Interaktion von Blutbestandteilen mit Endothelzellen auch Wachstumsprozesse – wie beispielsweise die Neubildung von Blutgefäßen im Gewebe – steuert [278] [279]. In diesem Zusammenhang sind insbesondere VEGF-Rezeptoren, welche eine wichtige Rolle in der Vaskulogenese, Angiogenese und Lymphangiogenese spielen [261] [311], von sehr großer Bedeutung. Neben den Struktur molekülen, aus denen die Glykokalix aufgebaut ist, beherbergt diese Schicht verschiedene lösliche Moleküle plasmatischen oder endothelialen Ursprungs, wie beispielsweise Proteine der VEGF-Familie, welche mit VEGF-Rezeptoren interagieren können [261] [311]. Neben inflammatorischen Prozessen führt auch eine erhöhte Schubspannung im Gefäßsystem wie beispielsweise durch zirkulierende Tumorzellen zur Schädigung der endothelialen Glykokalix, wodurch endotheliale Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren zugänglicher und eingelagerte Moleküle – wie auch das von Endothelzellen exprimierte VEGF – in den Blutstrom freigesetzt werden [265] [285] [400]. Erhöhte Serumkonzentrationen von VEGF bei Patienten mit unterschiedlichsten Tumorarten – wie auch bei Brustkrebs – sind dabei durch eine verstärkte Angiogenese und Metastasierung mit einer schlechten Prognose assoziiert [401] [402] [112] [403] [236] [337]. Darüber hinaus ist bekannt, dass auch Tumorzellen im Verlauf der Tumorprogression ihrerseits in Folge einer Sauerstoffunterversorgung VEGF freisetzen, wodurch sie direkt die Proliferation und Migration von Endothelzellen und somit die Neubildung von Tumorgefäßen fördern [404] [405] [406]. Zusätzlich werden TAM-Vorläuferzellen im Zuge einer Tumor-assoziierten Entzündungsreaktion ins Tumorgewebe rekrutiert, welche ihrerseits VEGF sezernieren und damit die Tumorangiogenese unterstützen [322] [132].

Bekannt ist auch, dass maligne Tumorzellen selbst Glykokalix-modifizierende Moleküle produzieren, welche potentiell die oben beschriebenen Mechanismen verstärken. Beispielsweise zeigen Brustkrebszellen und zahlreiche weitere maligne Tumoren eine Heparanase-Überexpression, welche direkt mit Prozessen der Tumorprogression, wie beispielsweise der Tumorzellinvasion, Angiogenese und Metastasierung, korreliert [314] [315] [380]. Dieses Enzym führt zur Freisetzung von Heparansulfat-gebundenen pro-angiogenetischen Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel VEGF und FGF, aus der extrazellulären Matrix, wodurch indirekt die Endothelzellmigration und -proliferation sowie die Tumorprogression gefördert werden [313]. In einer anderen Studie wurde beobachtet, dass Tumore mit einer erhöhten Heparanase-Expression eine signifikant höhere Mikrogefäßdichte aufweisen als Tumore mit einer niedrigen Heparanase-Expression, wobei die Inhibition dieses Enzyms zur Reduktion der Gefäßdichte führte und damit einen Zusammenhang nahelegt [312].

Bislang unbekannt ist jedoch die Bedeutung einer Modulation der Glykokalixstruktur in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms für die Angiogenese. Daher wurde in einem weiteren Abschnitt dieser Studie die Bedeutung der endothelialen Glykokalix für die Tumorangiogenese in der peri- und intratumoralen Mikrozirkulation des Mammakarzinoms im heterotopen Ohrmodell untersucht. Dabei ergaben die Analysen in der peritumoralen Mikrozirkulation des Mammakarzinoms, dass eine Förderung der Glykokalix-degradation durch die repetitive systemische Verabreichung der Enzyme Heparinase III, Hyaluronidase und Neuraminidase die Gefäßdichte im Vergleich zur unbehandelten Tumorgruppe nicht nur erhöhte, sondern ihre Entwicklung auch beschleunigte. Dieser Effekt lässt sich durch den oben beschriebenen Prozess des verstärkten enzymatischen Verbaus der Glykokalix erklären, welcher potentiell zur vermehrten Freisetzung von Glykokalix-gebundenen pro-angiogenetischen Wachstumsfaktoren und Zytokinen in die Zirkulation führte und dadurch die Gefäßneubildung förderte [265] [285] [400]. In Bezug auf die Anzahl der Gefäßverbindungen ergaben sich durch enzymatisch induzierte Glykokalixdegradation jedoch keine Unterschiede zur unbehandelten Tumorgruppe. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass im Zeitraum der

Untersuchungen zunächst nur neue Gefäßäste gebildet wurden, diese aber noch keine verstärkte Quervernetzung untereinander aufgebaut haben.

Im Gegensatz dazu führte die systemische Protektion der Glykokalix durch den Heparanaseinhibitor OGT 2115 an Tag 4 in der peritumoralen Mikrozirkulation zunächst zu einer geringeren Gefäßanzahl sowie an Tag 7 zu einer Verlangsamung der Gefäßdichtezunahme im Vergleich zur unbehandelten Tumorgruppe. Diese Unterschiede waren jedoch bis zum Ende der Untersuchungen an Tag 14 nicht mehr signifikant nachweisbar. Dieser moderate Protektionseffekt auf die Gefäßneubildung in der peritumoralen Mikrozirkulation könnte mit der peritumoral insgesamt schwach ausgeprägten Gefäßneubildung zusammenhängen, sodass der systemisch verabreichte Heparanaseinhibitor OGT 2115 diesen Parameter nur bedingt beeinflussen kann. Aus den Analysen zur Expression der endothelialen Glykokalix in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms unter Modulation der Glykokalixstruktur (s. IV./ 8.) ging hervor, dass die endotheliale Glykokalix in der peritumoralen Mikrozirkulation durch den Heparanaseinhibitor OGT 2115 sehr gut geschützt wird. Die pharmakologisch geschützte Glykokalix könnte dementsprechend die Progression der peritumoralen Gefäßneubildung verlangsamen.

Intratumorale Gefäße konnten bei allen Tumorgruppen erst ab Tag 7 nach intradermaler Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel detektiert werden. Zu diesem Zeitpunkt waren zwischen den unterschiedlich behandelten Tumorgruppen jedoch bereits Unterschiede in der Gefäßarchitektur zu erkennen. Die Förderung der Glykokalixdegradation durch systemische Applikation der Enzymmischung bewirkte eine kontinuierliche und nahezu lineare Zunahme der Gefäße über den Gesamtuntersuchungszeitraum, wobei bereits an Tag 7 ein sehr deutlicher und signifikanter Unterschied zur unbehandelten Tumorgruppe und der Tumorgruppe unter systemischer Glykokalixprotektion vorhanden war. An Tag 14 wurde schließlich eine signifikante Zunahme der Gefäßdichte mit einer signifikanten Zunahme der Anzahl der Gefäßäste und -verbindungen deutlich. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die enzymatische Glykokalixdegradation die Tumorangiogenese im Verlauf der Tumorprogression maßgeblich verstärken kann.

Die systemische Heparanaseinhibition führte dagegen zu einer signifikanten Verlangsamung der intratumoralen Gefäßneubildung. Dieser Effekt war insbesondere an Tag 14 bezüglich der Gefäßanzahl und -dichte erkennbar. Der Einfluss auf die Anzahl der Gefäßverbindungen dagegen war im Vergleich zur unbehandelten Tumorgruppe nur sehr schwach ausgeprägt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Protektion der Glykokalix durch Hemmung der Heparanase die Bildung neuer Gefäßäste innerhalb des Tumorgewebes vermindern kann.

Zusammenfassend verdeutlichen diese Versuchsergebnisse, dass die Integrität der Glykokalixstruktur die Angiogenese im experimentellen Mammakarzinom intratumoral und peritumoral signifikant beeinflusst, wobei durch die systemische Protektion von Heparansulfat die Gefäßneubildung verlangsamt und durch die systemische Förderung der spezifischen Glykokalixdegradation die Gefäßneubildung verstärkt werden konnte. Entsprechend zum stärkeren intratumoralen Gefäßwachstum zeigt die Glykokalixmodifikation in diesem Bereich ebenfalls stärkere Effekte. Es kann angenommen werden, dass die systemische Protektion von Heparansulfat – als Hauptbestandteil der Glykokalix - zur verminderten Exposition der endothelialen VEGF-Rezeptoren geführt hat [407], welche die Neubildung von Blutgefäßen steuern und unter physiologischen Bedingungen von der intakten endothelialen Glykokalix bedeckt werden [261] [285]. Zusätzlich wird durch die Protektion der endothelialen Glykokalix die Freisetzung verschiedener löslicher Moleküle plasmatischen oder endothelialen Ursprungs, wie beispielsweise Proteine der VEGF-Familie, welche mit VEGF-Rezeptoren interagieren können [337] [408], vermindert. Eine Förderung der Glykokalixdegradation führt dementsprechend zu einer verstärkten Exposition endothelialer VEGF-Rezeptoren sowie zu einer verstärkten Freisetzung von VEGF, wodurch die Angiogenese im Gewebe induziert wird.

## 2.8. Bestimmung der mikrovaskulären Permeabilität in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms unter Modulation der Glykokalixstruktur

Eine intakte endotheliale Glykokalixstruktur ist ein wesentlicher Faktor für die Aufrechterhaltung der mikrovaskulären Integrität. In diesem Kontext ist die Glykokalix auch entscheidend an der Regulation der mikrovaskulären Permeabilität beteiligt [281]. Im intakten Zustand wirkt sie durch den Aufbau eines onkotischen Gradienten der Plasmaextravasation ins Gewebe entgegen, wofür unter anderem auch negativ geladene Glykosaminoglykane, wie beispielsweise Chondroitinsulfat und Heparansulfat oder Sialinsäuren eine große Rolle spielen, da sie die bei physiologischem pH-Wert ebenfalls negativ geladenen Blutplasmae Proteine abstoßen. Darüber hinaus trägt Heparansulfat auch maßgeblich zur Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität der Glykokalix und folglich der Regulation der Gefäßpermeabilität bei [273].

Inflammatorische Prozesse in der Zirkulation führen über die Freisetzung von MMPs, der Heparanase oder Hyaluronidase sowie von Zytokinen, Histamin, ROS und VEGF aus Leukozyten, Thrombozyten oder bei Krebserkrankungen auch aus Tumorzellen einerseits zur Schädigung der endothelialen Glykokalix, andererseits zum Aufbrechen inter-endothelialer Verbindungen, wodurch es zum verstärkten Einstrom von Flüssigkeit und Blutbestandteilen wie Sauerstoff, Nährstoffen und Leukozyten sowie zirkulierenden Tumorzellen ins umliegende Gewebe kommt [296] [379]. Inzwischen gibt es Hinweise aus *In-vitro*- und *Ex-vivo*-Untersuchungen, welche darauf hindeuten, dass einzelne Glykokalixkomponenten in unterschiedlichem Ausmaß die Gefäßpermeabilität regulieren [284] [295] [407] [409]. Neuesten Erkenntnissen zufolge wird insbesondere Sialinsäuren eine entscheidende Rolle in der Regulation der Gefäßpermeabilität zugeschrieben [272]. In einer Studie konnte in Ratten nachgewiesen werden, dass der enzymatische Verdau von Sialinsäuren nach Neuraminidase-Perfusion die Ausdehnung der endothelialen Glykokalix signifikant reduzierte und gleichzeitig die mikrovaskuläre Permeabilität für Albumin und Wasser in denselben Gefäßen zeitabhängig erhöhte [272]. Dagegen bewirkte die Protektion der endothelialen Glykokalix mit dem Plasmaglykoprotein Orosomuroid in einer experimentellen Studie sowohl eine Reduktion der mikrovaskulären Permeabilität als auch der Tumorzelladhäsion am Endothel [304]. Ebenso konnte bei Patienten mit Diabetes

mellitus Typ II durch die orale Verabreichung von Sulodexide, einer Mischung aus Glykosaminoglykanen, niedermolekularem Heparin und Dermatansulfat, die Plasmaaktivität der Hyaluronidase gesenkt und gleichzeitig die Extension der endothelialen Glykokalix in sublingualen und retinalen Blutgefäßen erhöht werden. Zusätzlich konnte eine Reduktion der vaskulären Permeabilität in Verbindung mit geringeren transkapillären Albuminverlusten festgestellt werden [304].

Unbekannt ist jedoch, welche Bedeutung die Struktur der endothelialen Glykokalix für die mikrovaskuläre Permeabilität in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms besitzt und inwiefern die Modulation ihrer Struktur die Tumorprogression beeinflusst. Um diese Fragestellung genauer zu untersuchen, wurde in dieser Studie die mikrovaskuläre Permeabilität im heterotopen Mammakarzinommodell an der Ohrmuschel unter enzymatischer Glykokalix-degradation durch die systemische Applikation der Enzymen Heparinase III, Hyaluronidase und Neuraminidase sowie unter systemischer Glykokalix-protektion durch einen Heparanaseinhibitor sequenziell über 14 Tage analysiert. Dabei wurde die Extravasation des Makromoleküls FITC-Dextran in das perivaskuläre Gewebe der peri- und intratumoralen Mikrozirkulation an definierten Zeitpunkten über 14 Tage bestimmt. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigen, dass die mikrovaskuläre Permeabilität in der peritumoralen Mikrozirkulation durch die systemische Verabreichung der Glykokalix-degradierenden Enzyme Heparinase III, Hyaluronidase und Neuraminidase bereits einen Tag nach der intradermalen Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel im Vergleich zur unbehandelten Tumorgruppe und der Kontrollgruppe signifikant erhöht werden konnte. An den darauffolgenden Untersuchungstagen konnte eine kontinuierliche Permeabilitätssteigerung festgestellt werden, welche bei den abschließenden Untersuchungen an Tag 14 im Vergleich zur unbehandelten Tumorgruppe einen fast 2,5-fach höheren Wert aufwies.

In Folge der systemischen Glykokalixprotektion durch Inhibition der Heparanase konnte die mikrovaskuläre Permeabilität in der peritumoralen Mikrozirkulation dagegen insgesamt über den gesamten Untersuchungszeitraum im Vergleich zur unbehandelten Tumorgruppe sowie im Vergleich zur Tumorgruppe mit systemischer Degradation relevanter Glykokalixbestandteile – mit Ausnahme von

Tag 7 – signifikant verringert werden. Dabei konnte an den Tagen 1 und 4 im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Tumor sogar eine geringere mikrovaskuläre Permeabilität festgestellt werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die endotheliale Glykokalix in der peritumoralen Mikrozirkulation zur Regulation der mikrovaskulären Permeabilität beiträgt und diese maßgeblich beeinflussen kann.

Innerhalb der Tumormikrozirkulation konnte bei allen drei Tumorgruppen erst ab Tag 7 eine Extravasation von FITC-Dextran detektiert werden. Zu diesem Zeitpunkt konnte bei der Tumorgruppe unter systemischer, enzymatischer Glykokalixdegradation im Vergleich zur Tumorgruppe mit systemischer Glykokalixprotektion ein vierfach höherer Extravasationswert festgestellt werden. An Tag 14 war dieser sogar intratumoral höher als in der peritumoralen Mikrozirkulation.

Die systemische Protektion der Glykokalix bewirkte – verglichen mit der unbehandelten Tumorgruppe – eine schwache Reduktion der mikrovaskulären Permeabilität. In vorangegangenen Versuchen zur Analyse der Expression der endothelialen Glykokalix in Tumormikrogefäßen (s. V/2.1.), konnten gezeigt werden, dass diese nicht dieselbe Extension und Dichte wie in physiologischen Mikrogefäßen erreicht. Dies entspricht den Beobachtungen aus anderen Studien, dass die im Rahmen der Tumorangio-genese neugebildeten Gefäße nicht vollständig ausreifen. Dadurch weisen sie grundsätzlich eine höhere mikrovaskuläre Permeabilität auf [253]. Die auch unter pharmakologischer Protektion nur unvollständig ausgebildete endotheliale Glykokalix in unreifen Tumormikrogefäßen könnte damit auch erklären, weshalb diese pharmakologische Intervention die Permeabilität intratumoral im Gegensatz extratumoral nur partiell vermindern kann.

Zusammengefasst verdeutlichen die vorliegenden Ergebnisse, dass die endotheliale Glykokalix in der Tumormikrozirkulation die mikrovaskuläre Permeabilität reguliert, wobei ihre Bedeutung in intratumoralen Gefäßen, wahrscheinlich aufgrund der unreifen Gefäßstruktur, weniger stark ausgeprägt ist als in peritumoralen Gefäßen.

## 2.9. Rekrutierung von Thrombozyten, myeloiden und lymphoiden Leukozytensubpopulationen in der peri- und intratumoralen Mikrozirkulation des Mammakarzinoms unter Modulation der Glykokalixstruktur

Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass Schädigungen der endothelialen Glykokalixstruktur, zum Beispiel nach Ischämie-Reperfusion, mit einer verstärkten Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion einhergehen [282] [293]. Die Degradation der endothelialen Glykokalix führt dabei einerseits zur Exposition der endothelialen Adhäsionsmoleküle und -rezeptoren, welche unter anderem die Interaktion von Leukozyten und Thrombozyten regulieren, und andererseits zur Freisetzung von Glykokalix-gebundener Wachstumsfaktoren, Zytokinen, extrazellulärer Matrixbestandteilen sowie anderer plasmatischer und endothelialer Moleküle, welche ihrerseits die Rekrutierung von Thrombozyten und Leukozyten beeinflussen können [305] [293] [279] [292].

Entsprechend dazu konnte die Vorbehandlung isolierter Meerschweinchenherzen mit Hydrocortison oder Antithrombin III die Ischämie-induzierte Degradation der endothelialen Glykokalix vermindern und dabei gleichzeitig die Thrombozytenadhäsion am Endothel signifikant reduzieren [303]. Ebenso führte eine glykokalixprotektive Vorbehandlung mit Sevofluran zu einer signifikanten Adhäsionsreduktion intrakoronar verabreichter, isolierter neutrophiler Granulozyten und Thrombozyten [410].

Die Bedeutung der Glykokalix für die Rekrutierung von Thrombozyten, myeloiden und lymphoiden Leukozytensubpopulationen in die Mikrozirkulation des Mammakarzinoms ist jedoch weiterhin ungeklärt. Auf Basis der bisherigen Erkenntnisse zur Glykokalix-abhängigen Thrombozyten- und Leukozytenrekrutierung wurde in diesem Studienabschnitt die Hypothese aufgestellt, dass die endotheliale Glykokalix auch in Krebs-assoziierten Mikrogefäßen die Rekrutierung von Thrombozyten, myeloiden und lymphoiden Leukozytensubpopulationen in der Tumormikrozirkulation kontrolliert. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde die Rekrutierung von Thrombozyten sowie von unterschiedlichen myeloiden und lymphoiden Leukozytensubpopulationen in der peri- und intratumoralen Mikrozirkulation des heterotopen

Mammakarzinommodells der Ohrmuschel nach systemischer Applikation von Enzymen zur Degradation relevanter Glykokalixbestandteile oder dem entsprechenden Vehikel sequenziell über 14 Tage analysiert. Zugleich wurde als therapeutischer Ansatz der Einfluss einer pharmakologischen Protektion der Glykokalix mittels eines Heparanaseinhibitors untersucht. Im Vergleich zu Tumorgefäßen von Vehikel-behandelten Tumorgefäßen konnte festgestellt werden, dass eine zusätzliche enzymatische Förderung der Degradation von Heparansulfat, Hyaluronsäure und Sialinsäuren die in der Tumormikrozirkulation des Mammakarzinoms bereits bestehende Rekrutierung von Thrombozyten, sowie myeloiden und lymphoiden Leukozytensubpopulationen, insbesondere neutrophile Granulozyten, klassische Monozyten und B-Lymphozyten, verstärkt. Im Gegensatz dazu führte die pharmakologische Protektion der Glykokalix zu einer signifikanten Verminderung der Rekrutierung o. g. Zellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Glykokalix in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms tatsächlich einen regulierenden Einfluss auf die Rekrutierung von Thrombozyten sowie unterschiedlicher myeloider und lymphoider Leukozytensubpopulationen ausübt. Es ist anzunehmen, dass die spezifische enzymatische Degradationsförderung der Glykokalix in Tumorgefäßen zur vermehrten Exposition leukozytärer und thrombozytärer Adhäsions- und Signalmolekülen führt, wodurch der Rekrutierungsprozess verstärkt wird [279] [306].

## 2.10. Analyse des Einflusses einer Depletion von Thrombozyten oder spezifischen Leukozytensubpopulationen auf die Rekrutierung von Thrombozyten und myeloiden Leukozyten in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms unter systemischer enzymatischer Glykokalixdegradation

In zahlreichen Studien wurde bereits nachgewiesen, dass unterschiedliche myeloide Leukozytensubpopulationen, Thrombozyten und Endothelzellen bei akuten und chronischen inflammatorischen Prozessen miteinander interagieren und sich dabei gegenseitig in ihrer Aktivität und Funktion beeinflussen [411] [391] [214] [412]. Auch bei Krebserkrankungen können diese Zellen sowohl durch direkte als auch durch indirekte Interaktionen die Immunantwort modulieren und

dabei in unterschiedlichen Tumorstadien entweder zur Tumorbekämpfung oder -progression beitragen [223] [338] [182] [362]. Dabei ist das Überwiegen oder Fehlen einzelner Zellarten sowie deren Aktivierungsstatus maßgeblich für das Gleichgewicht zwischen Tumorchemmung und -förderung [413] [414].

In den oben diskutierten Versuchsgruppen zur Leukozyten- und Thrombozytenrekrutierung in die Mikrozirkulation des Mammakarzinoms nach pharmakologischer Modulation der Glykokalix wurde deutlich, dass diese spezielle Schicht in Abhängigkeit ihrer Struktur die Rekrutierung dieser Zellen oder Zellpartikel in der Mikrozirkulation des experimentellen Mammakarzinoms reguliert. In darauf aufbauenden Versuchen sollte nun untersucht werden, inwiefern neutrophile Granulozyten, klassische Monozyten und Thrombozyten nach systemischer enzymatischer Degradation der Glykokalix ihre Rekrutierung in Mikrogefäßen des Mammakarzinoms wechselseitig beeinflussen. Dazu wurden die einzelnen Zellpopulationen mittels spezifischer Antikörper bereits vor der Tumorinduktion systemisch depletiert. Zusätzlich wurde die systemische Degradation relevanter Glykokalixbestandteile durch die Verabreichung einer Enzym-Mischung induziert. Analysiert wurden bei den jeweils nicht depletierten Zellpopulationen die intravaskuläre Rolle und die intravaskuläre Adhärenz an Endothel von Tumormikrogefäßen an definierten Tagen über einen Gesamtzeitraum von 14 Tagen.

Thrombozyten wurden durch die systemische Verabreichung eines spezifischen Antikörpers in Intervallen von 48 h bis einschließlich Tag 8 nach intradermaler Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel depletiert. Die quantitative Analyse ergab, dass insbesondere die intravaskuläre Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Tumormikrozirkulation über den gesamten Untersuchungszeitraum im Vergleich zur Isotypkontrollgruppe signifikant verringert war. Ebenso verringerte sich die Anzahl der intravaskulär rekrutierten klassischen Monozyten insgesamt im Vergleich zur Isotypkontrollgruppe. Dabei erwies sich die Anzahl der rollenden und fest adhärenen klassischen Monozyten an Tag 7 am niedrigsten. Bei nicht-klassischen Monozyten konnte im Vergleich zur Isotypkontrollgruppe kein nennenswerter Unterschied festgestellt werden.

Der beobachtete Effekt einer verringerten Anzahl intravaskulär rekrutierter neutrophiler Granulozyten und klassischer Monozyten in die Tumormikrogefäße beim Fehlen von Thrombozyten deckt sich mit Beobachtungen bereits publizierter Studien ohne Degradation der Glykokalix. Diese belegen, dass Thrombozyten die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten sowohl bei akuten inflammatorischen Prozessen als auch bei chronischen Erkrankungen, wie beispielsweise auch Krebserkrankungen, verstärken und ihre Effektorfunktionen modulieren [415] [223] [214]. In diesem Zusammenhang konnte in einer Studie zur Bedeutung von Thrombozyten bei Krebserkrankungen festgestellt werden, dass diese durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren sowie durch Hochregulierung der Zytokinfreisetzung aus Leukozyten, Endothelzellen und Tumorzellen die Tumorzellproliferation, -angiogenese und -chemoresistenz sowie die Rekrutierung weiterer Leukozyten fördern können [223]. Dabei wird im entzündeten Gewebe zunächst das mikrovaskuläre Endothel durch Zytokine aktiviert, woraufhin sich die Expression von Signal- und Adhäsionsmolekülen sowie die Menge an präsentierten Chemokinen auf der luminalen Seite des Endothels erhöht. Dies ermöglicht insbesondere in postkapillären Venolen eine Interaktion zirkulierender Leukozyten und Thrombozyten mit mikrovaskulären Endothelzellen. Dabei fangen Endothelzellen Leukozyten und Thrombozyten durch lose Interaktionen von Selektinen auf ihrer luminalen Zelloberfläche mit niedrig-affinen Integrinen (z. B. *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1)) auf den Leukozyten bzw. auf Thrombozyten ein und induzieren dadurch zunächst ihr Rollen entlang des Endothels. Durch die lose Bindung werden weitere endotheliale und thrombozytäre Integrine und Adhäsionsmoleküle aktiviert. Zu den wichtigsten thrombozytären Adhäsionsmolekülen, welche im Zellinneren der Thrombozyten in den sogenannten Alpha-Granula enthalten sind, gehören P-Selektin/CD62P, PECAM-1/CD31, GPIIb/IIIa (CD41/CD61), vWF, Vitronektin und Fibronektin. Diese sind neben der Anheftung an aktivierte Endothelzellen und die subendotheliale Matrix auch für interthrombozytäre Interaktionen von großer Bedeutung. Zudem ermöglicht die Expression von P-Selektin eine Interaktion der Thrombozyten mit Endothelzellen und Leukozyten, wie insbesondere neutrophile Granulozyten und Monozyten [216] [214] [227] [416]. Interessanterweise modulieren diese Blutbestandteile und -zellen wiederum durch Interaktionen die Rekrutierung der anderen Populationen in die Mikrozirkulation. Beispielsweise

sind am Endothel fest adhärenente Thrombozyten in der Lage, neutrophile Granulozyten über eine CD40-CD40L/CD154-abhängige Bindung einzufangen und diese so zum Ort der Entzündung zu navigieren [391]. Zusammen können diese intravaskulär fest adhärenenten Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten sekundär beispielsweise über eine CD40-, CD40L/CD154- und L-Selektin/CD62L-vermittelte Interaktion die Rekrutierung klassischer Monozyten einleiten, sodass Monozyten nach neutrophilen Granulozyten als eine zweite leukozytäre Welle in der Entzündungsantwort folgen [218] [415] [215] [391]. Darüber hinaus wurde bei Mäusen nachgewiesen, dass aktivierte Thrombozyten über die Freisetzung von Serotonin auch die Leukozytenadhäsion zusätzlich fördern [390].

Die gesteigerte Anzahl von neutrophilen Granulozyten und klassischen Monozyten ab etwa einer Woche nach intradermaler Tumorzellinjektion lässt vermuten, dass Thrombozyten in der frühen Entzündungsphase einen stärkeren Einfluss auf neutrophile Granulozyten und klassische Monozyten ausüben als in der späten Entzündungsphase.

Neutrophile Granulozyten wurden im Intervall von 48 h bis einschließlich Tag 8 nach intradermaler Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel mittels eines spezifischen Antikörpers depletiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich die Anzahl der intravaskulär rekrutierten Thrombozyten in der Tumormikrozirkulation im Vergleich zur Isotypkontrollgruppe über den gesamten Untersuchungszeitraum signifikant verringerte. Obwohl an Tag 14 ein geringfügiger Anstieg rollender und fest adhärenenter Thrombozyten beobachtet werden konnte, blieb die Gesamtanzahl der intravaskulären Thrombozyten im Vergleich zur Isotypkontrollgruppe deutlich niedriger. Bei der Anzahl intravaskulär rollenden und fest adhärenenten klassischen Monozyten konnte bis Tag 7 zuerst eine geringfügige Zunahme beobachtet werden. Bis Tag 14 fand sich dann jedoch eine signifikante Reduktion aller intravaskulären klassischen Monozyten. Bei nicht-klassischen Monozyten zeigten sich im Vergleich zur Isotypkontrollgruppe keine wesentlichen Unterschiede.

In einer Studie zur Bedeutung der Interaktion von neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten für Entstehung und Progression chronischer Entzündungen, konnte festgestellt werden, dass MPO aus aktivierten neutrophilen Granulozyten ein wesentlicher Faktor für die Thrombozytenaktivierung darstellt [417]. Dieser

Mechanismus könnte auch in der Tumormikrozirkulation, welche mit einer chronischen Entzündungsreaktion assoziiert ist, von Bedeutung sein, sodass die in dieser Versuchsreihe beobachtete deutlich verminderte Thrombozytenrekrutierung in die Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms durch die Depletion neutrophiler Granulozyten und der dadurch fehlenden Freisetzung unterschiedlicher Zytokine und insbesondere MPO aus neutrophilen Granulozyten induziert wurde. Darüber hinaus wurde kürzlich nachgewiesen, dass neben Signal- und Adhäsionsmolekülen auch sogenannte *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs), einem Netzwerk extrazellulärer DNS und daran gebundenen Histonen, Proteasen sowie anderen antimikrobiellen Substanzen, welche von aktivierten neutrophilen Granulozyten freigesetzt werden, für die Aktivierung von Thrombozyten von sehr großer Bedeutung sind [220] [418]. Zusätzlich ist bekannt, dass intravaskulär fest adhärenente neutrophile Granulozyten in der Lage sind, Thrombozyten zu bestimmten Stellen in der Mikrozirkulation von entzündetem Gewebe zu navigieren [419]. Somit zeigen diese Daten, dass die durch eine degradierte endotheliale Glykokalix in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms rollenden oder fest adhärenenten Thrombozyten und neutrophile Granulozyten ihre Rekrutierung wechselseitig verstärken.

Vergleichbar dazu könnte die Depletion von neutrophilen Granulozyten und der daraus resultierenden fehlenden Freisetzung Monozyten-aktivierender Zytokine aus diesen Immunzellen, welche diese bei Aktivierung unter entzündlichen Bedingungen produzieren, zu einer signifikant verminderten Rekrutierung klassischer Monozyten in Tumormikrogefäßen des heterotopen Mammakarzinoms an Tag 14 geführt haben. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass aktivierte neutrophile Granulozyten Chemokine wie beispielsweise CCL3 und CCL4 produzieren, welche über die Bindung an CCR1 vorrangig klassische Monozyten rekrutieren [420] [421]. Die hier aufgestellte Hypothese wird durch weitere Publikationen unterstützt, welche nach Depletion neutrophiler Granulozyten unter anderem im Atherosklerose-Mausmodell insgesamt eine verminderte Rekrutierung klassischer Monozyten beobachten konnten, die jedoch durch die lokale Gabe von Überständen neutrophiler Granulozyten fast vollständig rückgängig gemacht werden konnte [422] [423]. In einer anderen Studie wurde nachgewiesen, dass die Depletion neutrophiler Granulozyten die Monozyten und Makrophagen-Infiltration in das nach LPS-Stimulation entzündete Lungengewebe

stark verringerte [424]. Passend zu den Daten im Mammakarzinommodell der vorliegenden Arbeit, die erst sieben Tage nach Tumorzellinjektion einen signifikanten Einfluss von neutrophilen Granulozyten auf die Rekrutierung klassischer Monozyten in die Tumormikrozirkulation zeigen, wird auch in einer weiteren Publikation beschrieben, dass neutrophile Granulozyten bei der sterilen Inflammation insbesondere in der späten Phase der Entzündung eine wichtige Rolle für die Monozytenrekrutierung spielen [425] [426]. Dabei konnte festgestellt werden, dass ein Fehlen von neutrophilen Granulozyten anfangs zu einer vorübergehenden Zunahme intravaskulärer Monozyten führte, diese jedoch nicht ins entzündete Gewebe migrierten. Klassische und nicht-klassische Monozyten wurden hierbei jedoch nicht differenziert [427] [428]. Als Ursache für diesen Effekt auf Monozyten, wird ebenfalls die fehlende Zytokin- und Chemokinfreisetzung durch neutrophile Granulozyten vermutet. Die Ergebnisse hinsichtlich des Einflusses der neutrophilen Granulozytendepletion auf nicht-klassische Monozyten deuten darauf hin, dass neutrophile Granulozyten keinen wesentlichen Einfluss auf die Rekrutierung dieser Monozytensubpopulation, zumindest unter den untersuchten Bedingungen, ausüben.

Als dritte Leukozytenpopulation wurden klassische Monozyten mittels eines spezifischen Antikörpers depletiert. Im Gegensatz zu Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten wurde der Antikörper jedoch alle 24 h bis einschließlich Tag 5 nach intradermaler Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel systemisch verabreicht.

Die Untersuchungen zum Einfluss der Depletion klassischer Monozyten auf die Rekrutierung von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten in der Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms unter systemischer Degradationsförderung relevanter Glykokalixbestandteile zeigen, dass die Rekrutierung beider Blutzellarten in den ersten 4 Tagen nach intradermaler Tumorzellinjektion insgesamt signifikant verringert wurde. Ab Tag 7 war dieser Effekt nur noch schwach ausgeprägt, wobei die Anzahl der intravaskulär rollenden neutrophilen Granulozyten zur Isotypkontrollgruppe keinen Unterschied mehr aufwies. Diese Ergebnisse decken sich einerseits mit Daten zur effektiven Depletion klassischer Monozyten [429] [430] und deuten andererseits darauf hin, dass auch klassische Monozyten in den ersten Tagen nach Tumorzellinjektion

einen Einfluss auf die Rekrutierung von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten in der Tumormikrozirkulation ausüben [223] [136]. Bekannt ist, dass klassische Monozyten zumindest nach LPS-Stimulation pro-inflammatorische Zytokine, wie CCL2, TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und IL-10 sowie MPO freisetzen, welche zur Aktivierung von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten beitragen [431]. Daher kann man annehmen, dass ein Fehlen klassischer Monozyten zur verminderten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und anderer Substanzen aus diesen Immunzellen führt, welche den Rekrutierungsprozess unter entzündlichen Bedingungen fördern. Dabei verdeutlichen die Ergebnisse dieser Versuchsreihe, dass die Wirkung auf Thrombozyten stärker ist als auf neutrophile Granulozyten.

Insgesamt ergaben die Untersuchungen, dass Thrombozyten die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und klassischen Monozyten in die Tumormikrozirkulation zeitabhängig verstärken. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Depletion von Thrombozyten nach systemischer enzymatischer Degradation der Glykokalix insbesondere die intravaskuläre Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und - im Vergleich zu dieser Zellpopulation schwächerem Ausmaß - auch bei klassischen Monozyten über den gesamten Untersuchungszeitraum im Vergleich zur Isotypkontrollgruppe signifikant verringerte. Ein signifikanter Einfluss der Thrombozytendepletion systemischer enzymatischer Degradation der Glykokalix auf die Rekrutierung von nicht-klassischen Monozyten im Vergleich zur Isotypkontrollgruppe, konnte hingegen nicht festgestellt werden.

Anhand der Depletion von neutrophilen Granulozyten nach systemischer enzymatischer Degradation der Glykokalix konnte festgestellt werden, dass diese myeloide Leukozytensubpopulation die intravaskuläre Rekrutierung von Thrombozyten in die Mikrozirkulation des Mammakarzinoms über den gesamten Untersuchungszeitraum beeinflusst, wobei ein Fehlen von neutrophilen Granulozyten die intravaskuläre Rekrutierung von Thrombozyten stark und signifikant verringert. Dagegen wurde deutlich, dass neutrophile Granulozyten die intravaskuläre Rekrutierung von klassischen Monozyten erst eine Woche nach der Tumorinduktion beeinflussen, wobei ein die Depletion von neutrophilen Granulozyten die intravaskuläre Rekrutierung von klassischen Monozyten

signifikant verringert. Ein signifikanter Einfluss der Neutrophilendepletion systemischer enzymatischer Degradation der Glykokalix auf die Rekrutierung von nicht-klassischen Monozyten im Vergleich zur Isotypkontrollgruppe, konnte hingegen nicht festgestellt werden.

Durch die Depletion von klassischen Monozyten konnte festgestellt werden, dass die intravaskuläre Rekrutierung von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten in die Tumormikrozirkulation in der Initialphase der Entstehung des experimentellen Mammakarzinoms von klassischen Monozyten beeinflusst werden, wobei ihr Fehlen die intravaskuläre Rekrutierung von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten vermindert. Dagegen konnte festgestellt werden, dass nicht-klassische Monozyten von klassischen Monozyten nicht beeinflusst werden.

## 2.11. Bedeutung von Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten und klassischen Monozyten für das lokale Tumorwachstum des Mammakarzinoms unter systemischer enzymatischer Glykokalixdegradation

Die Tumorprogression wird von zahlreichen Einflüssen sowohl aus dem Organismus als auch aus dem Tumormikromilieu selbst beeinflusst. In diesem Zusammenhang spielen auch Thrombozyten und verschiedene Leukozytensubpopulationen eine Rolle, da sie über zahlreiche Mechanismen die Tumorprogression fördern oder hemmen können [432] [373] [254] [136] [254] [433] [223] [183]. Da die endotheliale Glykokalix in der Mikrozirkulation eine wichtige regulatorische Funktion bei der Interaktion von Leukozyten und Thrombozyten mit Endothelzellen besitzt [279], wurde in vorangegangenen Versuchsreihen dieser [Arbeit die Thrombozyten- und Leukozytenrekrutierung in die Mikrozirkulation des Mammakarzinoms unter Modulation der Glykokalixstruktur (s. Kap. IV./11. und IV./12.) analysiert. Daraus ging hervor, dass die Degradation der Glykokalix die Rekrutierung von Thrombozyten und verschiedenen Leukozytenpopulationen zeitabhängig in die Tumormikrozirkulation fördert. Zusätzlich konnte in der Versuchsreihe zur Analyse des Einflusses einer Depletion von Thrombozyten oder spezifischen Leukozytensubpopulationen auf die Rekrutierung von Thrombozyten und myeloiden Leukozytensubpopulationen in die Mikrozirkulation des Mammakarzinoms unter systemischer enzymatischer Glykokalixdegradation (s.

Kap. IV./13.) festgestellt werden, dass insbesondere Thrombozyten und neutrophile Granulozyten - und in schwächerem Ausmaß auch klassische Monozyten - sich in der Initialphase der Tumorenstehung unter systemischer enzymatischer Glykokalixdegradation wechselseitig beeinflussen. Auf Basis dieser Erkenntnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass Thrombozyten, neutrophile Granulozyten und klassische Monozyten unter systemischer enzymatischer Glykokalixdegradation relevant für die Tumorprogression im frühen Stadium sein könnten. Um nun zu untersuchen, ob Thrombozyten, neutrophile Granulozyten und klassische Monozyten eine Rolle für das lokale Wachstum des Mammakarzinoms in der Initialphase der Tumorentstehung spielen, wurde im heterotopen Mammakarzinommodell der Maus gleichzeitig die Glykokalixdegradation mittels systemisch verabreichten Enzymen induziert und jeweils einzeln Thrombozyten, neutrophile Granulozyten oder klassische Monozyten vor der Tumorinduktion depletiert. Das Tumorwachstum wurde hierbei sequenziell über einen Zeitraum von 14 Tagen ermittelt. Es konnte festgestellt werden, dass das Wachstum eines experimentellen Mammakarzinoms durch eine Thrombozytendepletion unter enzymatisch induzierter Glykokalixdegradation innerhalb der 14 Tage deutlich reduziert wurde. Die Ergebnisse decken sich hierbei mit anderen Studien, die grundsätzlich gezeigt haben, dass Thrombozyten eine Brustkrebsprogression maßgeblich fördern können, indem sie nach ihrer Aktivierung MMPs sowie zahlreiche unterschiedliche Wachstumsfaktoren freisetzen, welche zum Abbau der Extrazellulären Matrix beitragen, pro-tumorale Leukozyten ins Tumorstroma rekrutieren und die Tumorangiogenese fördern [434]. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen verdeutlichen, dass eine Glykokalixdegradation in der Tumormikrozirkulation zur Rekrutierung von Thrombozyten führt, welche bereits in sehr frühen Tumorstadien die Tumorprogression maßgeblich fördern.

Eine noch ausgeprägtere Hemmung des Tumorwachstums im heterotopen Mammakarzinommodell fand sich nach der Depletion neutrophiler Granulozyten. Hier ergaben die Experimente, dass unter enzymatisch induzierter Glykokalixdegradation die Depletion neutrophiler Granulozyten bereits zu Beginn der Tumorinduktion ein sichtbares Tumorwachstum nahezu vollständig verhinderte. Auch in anderen Studien konnte festgestellt werden, dass die

Depletion neutrophiler Granulozyten das Tumorstadium, insbesondere zu Beginn der Tumorentstehung, drastisch reduziert. Interessanterweise scheint die Depletion dieser Immunzellen im fortgeschrittenen Tumorstadium das Tumorstadium dagegen weniger stark zu beeinflussen [219] [141] [435]. Es wird auch beschrieben, dass neutrophile Granulozyten sich in frühen Tumorstadien ausschließlich in der Tumorperipherie befinden und erst in späteren Tumorstadien das Tumorgewebe zu infiltrieren [136]. Gesteuert wird dieser Prozess unter anderem von Tumorzellen, welche CXCL Chemokine – wie insbesondere CXCL1, CXCL2 und CXCL5 – freisetzen und dadurch neutrophile Granulozyten ins Tumorstroma rekrutieren. Diese differenzieren sich anschließend unter Einfluss von TGF- $\beta$  zu einem pro-tumoralen, sogenannten N2-Phänotyp. Durch die Freisetzung von VEGF, MMP-9, ROS und der neutrophilen Elastase fördern diese TANs den Abbau der extrazellulären Matrix und damit die Tumorzellinvasion, Angiogenese und Proliferation. Da erst die Adhäsion am Endothel Leukozyten ermöglicht ins Tumorgewebe zu migrieren, kann zusammen mit den Ergebnissen dieser Versuchreihe angenommen werden, dass die endotheliale Glykokalix in der Tumormikrozirkulation der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten damit der Tumorprogression von Beginn an entgegenwirkt.

Die Depletion klassischer Monozyten unter enzymatisch induzierter Degradation relevanter Glykokalixbestandteile bewirkte im Vergleich zur Isotypkontrollgruppe eine Reduktion des experimentellen Mammakarzinomwachstums um etwa 60 %. Im Gegensatz zu den Versuchsgruppen nach Depletion von Thrombozyten bzw. neutrophilen Granulozyten war der Reduktionseffekt auf das Tumorstadium jedoch schwächer ausgeprägt [339] [436]. Ähnlich wie neutrophile Granulozyten können im Blut zirkulierende Monozyten insbesondere durch CCL2 ins Tumorstroma rekrutiert werden, wo sie sich nach ihrer Emigration ins Tumorgewebe unter dem Einfluss des Wachstumsfaktors M-CSF in nicht-aktivierte M-CSF-Makrophagen differenzieren [340] [162]. Diese können in Abhängigkeit der Signaleinflüsse aktiviert werden und sich entweder in Phänotypen mit anti-tumoralen oder pro-tumoralen Funktionen differenzieren [180] [162] [136]. In einem murinen Mammakarzinommodell wurde nachgewiesen, dass zirkulierende CCR2<sup>+</sup> bzw. klassische Monozyten von Tumorzellen und Endothelzellen in die Tumormikrozirkulation rekrutiert werden, wo sie sich nach Übertritt ins

Tumorgewebe sowohl in anti-tumorale M1-Phänotypen als auch in Vorläufer pro-tumoraler M2-Phänotypen differenzieren können [180]. Dabei korreliert eine hohe Anzahl von TAMs mit einer schlechten Prognose und insgesamt mit einer geringen Gesamtüberlebensrate [136] [437]. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigen, dass die Depletion klassischer Monozyten unter enzymatischer Glykokalixdegradation die Tumorprogression verlangsamt, jedoch nicht vollständig verhindern kann. Dabei kann vermutet werden, dass eine intakte Glykokalix auf Endothelzellen der Rekrutierung von CCR2<sup>+</sup> Monozyten und potentiell sekundär ihrer Differenzierung in pro-tumorale M2-Phänotypen und dadurch der Tumorprogression entgegenwirkt.

## 2.12. Analyse des lokalen Tumorwachstums des Mammakarzinom unter Modulation der Glykokalixstruktur

Im Gegensatz zu gesunden Körperzellen weisen neoplastische Zellen infolge von Genmutationen eine wesentlich höhere Proliferationsrate auf [438]. Damit verbunden ist ein erhöhter Sauerstoff- und Nährstoffbedarf, welcher bis zu einem Tumordurchmesser von etwa 2 mm durch die Diffusion aus der Umgebung gewährleistet ist. Im Zuge der Tumorprogression kommt es jedoch zunehmend zu einer Sauerstoff- und Nährstoffunterversorgung der Tumorzellen, weshalb diese unterschiedlichste Proteasen zum Abbau der extrazellulären Matrix und Wachstumsfaktoren freisetzen, welche die Bildung neuer Blutgefäße induzieren [249]. Unterstützt wird dieser Prozess durch die Rekrutierung von Thrombozyten und verschiedenen Leukozyten in die Tumormikrozirkulation, welche ihrerseits die Tumorangio-genese unterstützen [223] [183]. Ein kritischer Faktor bei diesem Prozess stellt die Gefäßintegrität dar, welche maßgeblich durch die Struktur der endothelialen Glykokalix reguliert wird [439]. In vorangegangenen Versuchen dieser Arbeit zeigte sich, dass eine Schädigung dieser Schutzbarriere auf der Gefäßwand zur Permeabilitätssteigerung führt und damit zum erhöhten Einstrom von Sauerstoff, Nährstoffen, Wachstumsfaktoren sowie zahlreichen anderen Blutbestandteilen und -zellen in das perivaskuläre (Tumor-)gewebe, welche das Tumorwachstum regulieren [295] [300].

In einer weiteren Gruppe an Experimenten sollte nun die Hypothese überprüft werden, ob die Integrität der Glykokalix nicht nur mikrovaskuläre Prozesse kontrolliert, sondern auch das Tumorwachstum reguliert. Dafür wurde das lokale Tumorwachstum im heterotopen Ohrmodell unter Modulation der Glykokalixstruktur sequenziell über 14 Tage analysiert. Eine Woche nach der intradermalen Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel konnte festgestellt werden, dass das Tumorwachstum unter systemischer enzymatischer Glykokalixdegradation im Vergleich zur unbehandelten Tumorgruppe relevant verstärkt war, welches sich deutlich anhand doppelt so großer Tumoren am Ende der Untersuchungszeit von 14 Tagen zeigte. Dieses Ergebnis impliziert, dass der Abbau der Glykokalix das Tumorwachstum im experimentellen Mammakarzinom tatsächlich maßgeblich fördert. Entsprechend dazu zeigte sich unter systemischer Protektion der Glykokalix über den Heparanaseinhibitor eine signifikante Verlangsamung des Tumorwachstums und damit eine Reduktion der Tumorgöße nach 14 Tagen auf nahezu 50 % im Vergleich zur unbehandelten Tumorgruppe. Diese Beobachtungen bestätigen, dass die pharmakologische Protektion der Glykokalix zu einer Verminderung des lokalen Tumorwachstums führt. Somit unterstützen die Ergebnisse dieser Versuchsreihe die Hypothese, dass die Modulation der Glykokalixstruktur einen potentiell vielversprechenden Ansatz in der Krebstherapie des Mammakarzinoms darstellt.

### 2.13. Expression der endothelialen Glykokalix im Mammakarzinom bei therapeutischer Anwendung eines Heparanaseinhibitors

Der Aufbau und die Funktionsweise der endothelialen Glykokalix unter physiologischen und teilweise auch unter pathophysiologischen Bedingungen werden bereits seit Jahren erforscht [260] [277]. Dabei erwies sich diese spezielle Schutzbarriere auf der Gefäßwand aufgrund ihrer vaskuloprotektiven Eigenschaften als potenzielle und vielversprechende Zielstruktur für neuartige Therapiekonzepte, welche einerseits zum Erhalt der bestehenden Glykokalix und/oder andererseits zur Regeneration einer bereits geschädigten Glykokalixstruktur führen sollen [301] [307]. So konnte im Tiermodell beispielsweise als vielversprechende Therapiestrategie bei Sepsis II

nachgewiesen werden, dass durch die externe Zufuhr von Hydrokortison während ischämischen Zuständen mit konsekutiver Reperfusion durch die damit einhergehende Protektion der Glykokalix das Ausmaß des Gefäßschadens abgeschwächt wurde [303]. Auch bei Patienten mit Diabetes mellitus konnte durch die orale Applikation von Glykosaminoglykanbestandteilen, bestehend aus Heparan- und Dermatansulfat, bereits nach einer achtwöchigen Einnahme eine Regeneration der zuvor verminderten Dicke der Glykokalixdimension nachgewiesen werden, wodurch eine Verminderung der transkapillären Albuminpassage sowie eine Abnahme des Hyaluronsäurekatabolismus erzielt werden konnten [296] [304]. In Anbetracht der Glykokalix-protaktiven Effekte, welche in den beiden Studien festgestellt wurden, erscheint ein Erhalt oder auch eine Wiederherstellung der Glykokalix, insbesondere auf dem Endothel, als eine vielversprechende Zielstruktur für die Therapie vaskulärer Dysfunktionen mit bereits bestehender Schädigung der Mikrozirkulation.

In einer vorangegangenen Versuchsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass eine bereits während der Injektion von Tumorzellen begonnene pharmakologische Glykokalixprotektion durch einen Heparanaseinhibitor das Tumorwachstum in einem heterotopen Mammakarzinommodell deutlich reduziert (s. IV./ 12.). Bis jetzt noch unbekannt ist jedoch die potentielle Bedeutung einer pharmakologischen Glykokalixprotektion im Mammakarzinommodell im Sinne eines therapeutischen Ansatzes bei bereits bestehendem Tumor. Daher wurde in diesem Versuchsabschnitt zunächst untersucht, ob eine pharmakologisch induzierte Regeneration der endothelialen Glykokalix in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms möglich ist. Dazu wurde Mäusen mit einem heterotopen Mammakarzinom der Ohrmuschel der niedermolekulare Heparanaseinhibitor OGT 2115 ab Tag 7 nach der intradermalen Tumorzellinjektion alle zwei Tage bis Tag 14 systemisch verabreicht. In diesen Tieren wurde mittels intravitaler 2-Photonenmikroskopie die Extension und Dichte der endothelialen Glykokalix in der peritumoralen und intratumoralen Mikrozirkulation analysiert. Die quantitative Auswertung ergab, dass sowohl die Extension als auch die Dichte der endothelialen Glykokalix in der peritumoralen Mikrozirkulation nach Beginn der therapeutischen Verabreichung des niedermolekularen Heparanaseinhibitors OGT 2115 ab Tag 7 im Vergleich zur unbehandelten Tumorgruppe zunahm.

Dieser Effekt erwies sich an Tag 14 mit einer annähernden Verdopplung der Extension und der Dichte der Glykokalix – verglichen mit der unbehandelten Tumorgruppe – als besonders deutlich. Obwohl der in dieser Versuchsreihe beobachtete Regenerationseffekt in intratumoralen Mikrogefäßen schwächer ausgeprägt war als in peritumoralen Mikrogefäßen, konnte an Tag 14 eine signifikante Erhöhung der Extension und Intensität der endothelialen Glykokalix im Vergleich zur unbehandelten Tumorgruppe festgestellt werden.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigen, dass eine pharmakologisch induzierte partielle Regeneration der Glykokalix, bezogen auf gesunde Mikrogefäße, bei einer bereits geschädigten endothelialen Glykokalix in der Mikrozirkulation eines experimentellen Mammakarzinoms möglich ist. Die unterschiedliche Ausprägung des Protektions- bzw. Regenerationseffektes zwischen peri- und intratumoralen Mikrogefäßen steht im Einklang mit den Ergebnissen der Versuchsreihe zur Expression der endothelialen Glykokalix in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms unter Modulation der Glykokalixstruktur (s. IV./ 8.), welche in intratumoralen Mikrogefäßen ebenfalls einen schwächer ausgeprägten Glykokalix-protectiven Effekt des Heparanase-inhibitors als in peritumoralen Mikrogefäßen zeigte.

Diese Daten zeigen, dass die systemische pharmakologische Glykokalixprotektion potentiell ein sehr vielversprechender Therapieansatz für Mammakarzinome darstellt. Da ein Erhalt der endothelialen Glykokalixintegrität jedoch auch anti-tumorale Prozesse, wie insbesondere die Infiltration anti-tumoraler Lymphozyten ins Tumorgewebe verhindert, sind weitere Analysen zum spezifischen Aufbau und der Funktion der endothelialen Glykokalix in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms notwendig.

## 2.14. Analyse des lokalen Tumorwachstums des Mammakarzinoms bei therapeutischer Anwendung eines Heparanaseinhibitors

In den vorangegangenen Untersuchungen dieser Studie hat sich die systemische Inhibition der Heparanase im experimentellen Mammakarziom als vielversprechender Therapieansatz für eine pharmakologische Glykokalixprotektion erwiesen. In weiteren Experimenten sollte deshalb der

Einfluss einer pharmakologischen Glykokalixprotektion mittels Heparanaseinhibitor auf das lokale Tumorwachstum bei bereits bestehendem Tumor untersucht werden. Hierbei konnte festgestellt werden, dass das lokale Tumorwachstum der Versuchsgruppe, welcher der niedermolekulare Heparanaseinhibitor OGT 2115 ab Tag 7 nach der intradermalen Tumorzellinjektion in die Ohrmuschel alle zwei Tage bis Tag 14 systemisch verabreicht wurde, eine geringere TumorgroÙe aufwies als die unbehandelte Tumorgruppe. Ein signifikanter Protektionseffekt auf das lokale Tumorwachstum zeigte sich nach einer einwöchigen Behandlung an Tag 14 nach Tumorzellinjektion. Diese Ergebnisse bestätigen, dass eine „therapeutische Glykokalixprotektion“ durch systemische Inhibition der Heparanase das lokale Tumorwachstums eines bereits vorhandenen experimentellen Mammakarzinoms abschwächen kann.

## 2.15. Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit konnte im heterotopen Tumormodell in der Ohrmuschel der Maus gezeigt werden, dass MikrogefäÙe im experimentellen Mammakarzinom im Vergleich zu GefäÙen der intakten Mikrozirkulation eine deutlich reduzierte endotheliale Glykokalix aufweisen. Der Verlust der endothelialen Glykokalix korreliert dabei sowohl in peritumoralen als auch in intratumoralen MikrogefäÙen mit der Tumorprogression. Dieser Zustand wiederum ist assoziiert mit einer GefäÙdichtezunahme, einer gesteigerten mikrovaskulären Permeabilität sowie der intravaskulären Akkumulation von Thrombozyten, myeloiden Leukozyten und lymphoiden Leukozyten in der peri- und intratumoralen Mikrozirkulation. Es konnte festgestellt werden, dass diese pathophysiologischen Prozesse durch eine zusätzliche systemische enzymatische Degradation der Glykokalixkomponenten Heparansulfat, Hyaluronsäure und Sialinsäure verstärkt werden und gleichzeitig in einer Zunahme des lokalen Tumorwachstums resultieren. Das infolge einer enzymatischen Glykokalixdegradation verstärkte Tumorwachstum konnte durch die Depletion von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten sehr deutlich vermindert werden. Eine systemische pharmakologische Protektion der Glykokalix durch die Inhibition der Heparanase mit dem niedermolekularen Heparanaseinhibitor OGT 2115 zu Beginn der Tumorinduktion führte zu einer signifikanten Verminderung der mikrovaskulären Permeabilität, der

Tumorangiogenese, der intravaskulären Akkumulation von Thrombozyten, myeloiden und lymphoiden Leukozyten sowie zu einer signifikanten Reduktion des lokalen Tumorwachstums. Wurde der niedermolekulare Heparanaseinhibitor OGT 2115 im Sinne einer therapeutischen Glykokalixprotektion erst eine Woche nach Induktion eines lokalen Mammakarzinoms systemisch verabreicht, konnte festgestellt werden, dass dadurch nicht nur der progressive Verlust der endothelialen Glykokalix aufgehalten, sondern auch eine kontinuierliche Regeneration der endothelialen Glykokalix in Gefäßen der Tumormikrozirkulation bewirkt werden konnte, wodurch sich gleichzeitig das lokale Tumorwachstum verlangsamte.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Integrität der endothelialen Glykokalix in der Tumormikrozirkulation durch Steuerung unterschiedlicher pathophysiologischer Prozesse in der Tumormikrozirkulation für die lokale Progression des Mammakarzinoms von großer Bedeutung sind. Eine pharmakologische Protektion der endothelialen Glykokalix - insbesondere in sehr frühen Tumorstadien - erweist sich daher als potentiell vielversprechende Zielstruktur für neuartige Therapiestrategien des Mammakarzinoms, welche beispielsweise als Rezidiv- oder Metastasierungsprävention sowie als unterstützende Maßnahme in Kombination mit anderen Behandlungsformen eingesetzt werden könnte. Allerdings sind weitere spezifische Analysen notwendig, um die Funktion der einzelnen Glykokalixkomponenten sowohl für die mikrovaskulären Prozesse im Detail als auch für die Entstehung und die Progression des Mammakarzinoms näher zu charakterisieren, um gezielt und effektiv in die Tumorpathogenese eingreifen und unerwünschte Nebenwirkungen reduzieren zu können.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

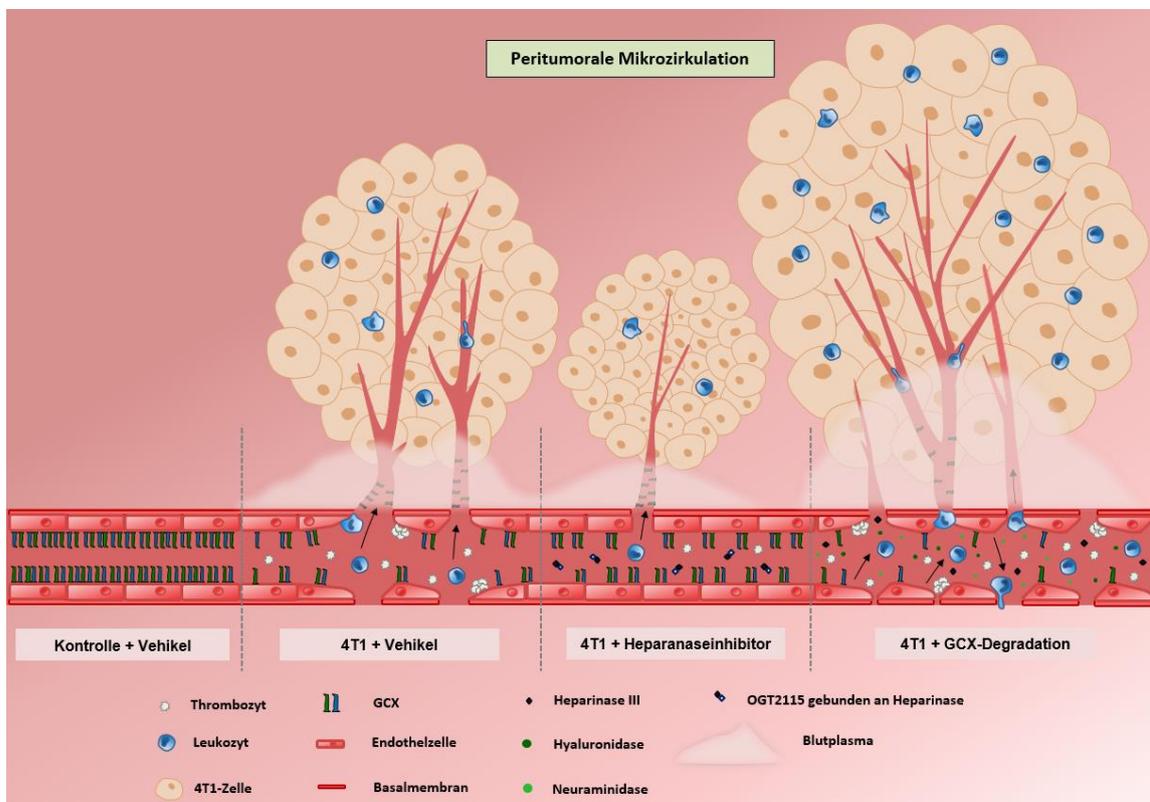
In der hier vorliegenden Arbeit wurde im heterotopen Tumormodell der Mausohrmuschel *in vivo* die Bedeutung der Glykokalix für die Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten in der Tumormikrozirkulation sowie die Angiogenese und Permeabilität in der Mikrozirkulation des murinen 4T1-Mammakarzinoms untersucht.

Zusammenfassend haben die *In-vivo*-Daten gezeigt, dass es im Zuge der Mammakarzinomprogression in der peritumoralen Mikrozirkulation bereits zu Beginn der Tumorinduktion zu einer kontinuierlichen und signifikanten Reduktion der endothelialen Glykokalixexpression kommt. Diese Reduktion war wiederum assoziiert mit einer kontinuierlichen Zunahme der Gefäßdichte, einer Steigerung der mikrovaskulären Gefäßpermeabilität sowie einer kontinuierlich verstärkten intravaskulären Rekrutierung von Thrombozyten, myeloiden und lymphoiden Leukozytensubpopulationen in alle Tumor-assoziierten Mikrogefäße. Hierbei zeigte sich, dass insbesondere Thrombozyten und neutrophile Granulozyten bereits in sehr frühen Tumorstadien verstärkt in die Tumormikrozirkulation rekrutiert werden, wohingegen klassische und nicht-klassische Monozyten nur einen geringen Anteil der intravaskulär rekrutierten myeloiden Leukozyten darstellen. Die intravaskuläre Rekrutierung von T- und B-Lymphozyten setzte dagegen erst 14 Tage nach der Tumorinduktion ein, wobei CD19<sup>+</sup> Lymphozyten den Hauptanteil aller intravaskulären lymphoiden Leukozytensubpopulationen repräsentierten. Diese mikrovaskulären Prozesse konnten in vergleichbarer Weise auch in der intratumoralen Mikrozirkulation beobachtet werden, allerdings mit einem verzögerten Einsetzen von einer Woche nach der Tumorinduktion.

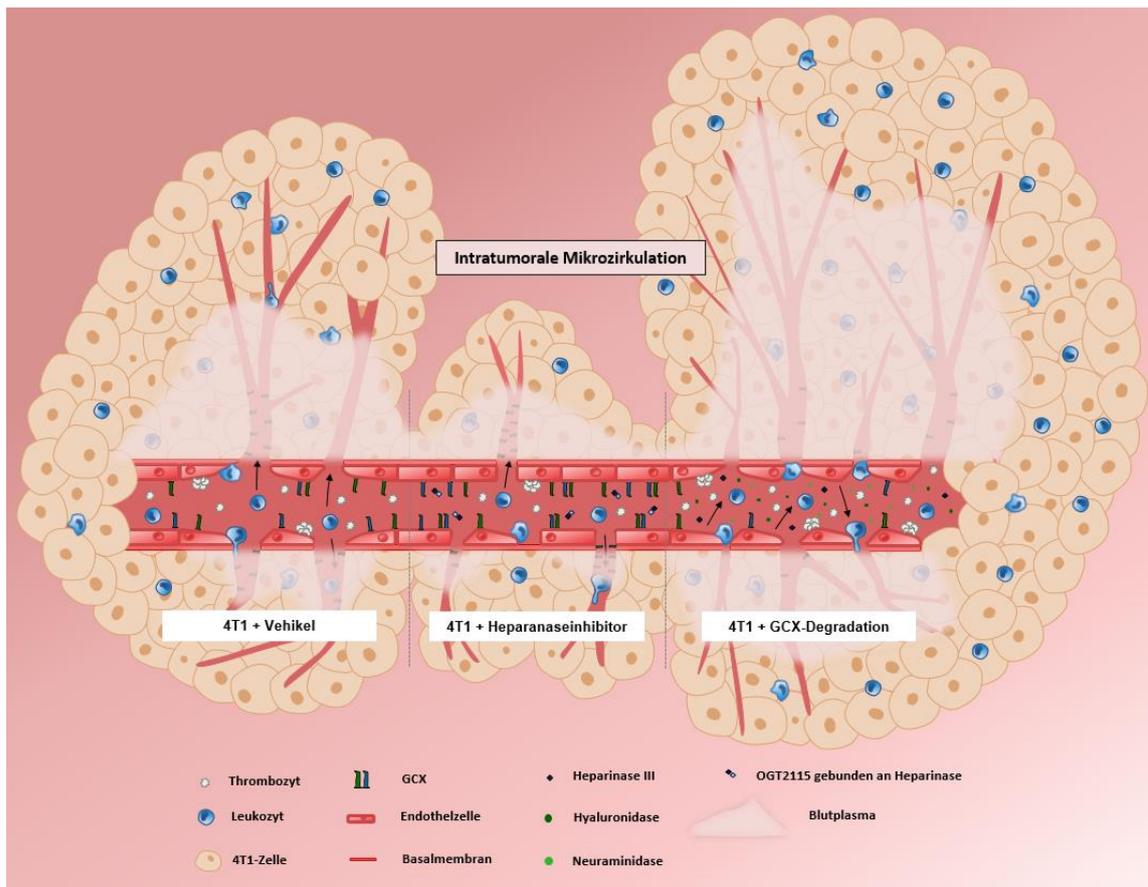
Durch die wiederholte systemische enzymatische Degradation der Glykokalix mit den Enzymen Heparinase III, Hyaluronidase und Neuraminidase konnten die vorgenannten mikrovaskulären Prozesse verstärkt werden, wohingegen die wiederholte systemische pharmakologische Protektion der Glykokalix durch Applikation des Heparanaseinhibitors OGT 2115 zu einer Abschwächung der Mammakarzinom-induzierten Prozesse in der Tumormikrozirkulation führte.

In Ergänzung dazu wurde der Einfluss einer Depletion von Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten und klassischen Monozyten bei enzymatisch degradierter Glykokalix auf die intravaskuläre Rekrutierung von Thrombozyten und myeloiden Leukozytensubpopulationen sowie das Tumorwachstum analysiert. Hierbei wurde deutlich, dass die intravaskuläre Rekrutierung von Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten sowie klassischen Monozyten nicht nur durch die Glykokalixstruktur, sondern auch wechselseitig durch diese Thrombozyten und myeloiden Leukozyten entscheidend reguliert wird. Gleichzeitig konnte festgestellt werden, dass insbesondere ein Fehlen von neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten das Tumorwachstum nahezu verhinderte.

Bei der Ermittlung des lokalen Wachstums des heterotopen Mammakarzinoms unter systemischer Modulation der Glykokalixstruktur konnte im Vergleich zu einem unbehandelten heterotopen Mammakarzinom festgestellt werden, dass ein Verlust der Glykokalix das Tumorwachstum fördert, wohingegen die pharmakologische Protektion der Glykokalix zu einer Reduktion des Tumorwachstums beiträgt.



**Abbildung 50:** Schematische Darstellung der Bedeutung der Glykokalix für die Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten sowie die mikrovaskuläre Permeabilität und Angiogenese in der peritumoralen Mikrozirkulation des murinen 4T1-Mammakarzinoms.



**Abbildung 51: Schematische Darstellung der Bedeutung der Glykokalix für die Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten sowie die mikrovaskuläre Permeabilität und Angiogenese in der intratumoralen Mikrozirkulation des murinen 4T1-Mammakarzinoms.**

Interessant ist, dass selbst die therapeutische Applikation des Heparanase-Inhibitors bei Tieren mit bereits etablierten Tumoren und fortgeschrittenen Krankheitsstadien ab sieben Tagen nach Tumorinduktion das lokale Wachstum des Tumors effektiv reduzierte. In Bezug auf die Glykokalix-Expression in der peri- und intratumoralen Mikrozirkulation führte diese pharmakologische Glykokalix-Protektion nicht nur zu einem Rückgang des tumorbedingten Verlustes der endothelialen Glykokalix, sondern unterstützte sogar deren kontinuierliche Regeneration.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit im Tiermodell des Mammakarzinoms gezeigt werden, dass die Glykokalix in der Tumormikrozirkulation relevante mikrovaskuläre Prozesse wie die Angiogenese, die Permeabilität, die Rekrutierung von Thrombozyten, myeloiden und lymphoiden Leukozyten sowie die Tumorprogression reguliert.

## VII. SUMMARY

### **The role of the glycocalyx for trafficking of leukocytes and platelets as well as microvascular permeability and angiogenesis in experimental breast cancer**

In this study, the relevance of the glycocalyx was analyzed *in vivo* with respect to the recruitment of leukocytes and platelets as well as angiogenesis and permeability in the tumor microcirculation employing a heterotopic 4T1 breast cancer model in the mouse ear.

The *in vivo* data demonstrates a continuous and significant reduction of the endothelial glycocalyx expression in the peritumoral microcirculation correlating with the course of breast carcinoma progression, which starts already at the onset of tumor induction. This glycocalyx reduction was, in turn, associated with a constant increase in vascular density, an increase in microvascular permeability, and a continuously enhanced intravascular recruitment of platelets as well as myeloid and lymphoid leukocyte subpopulations in all tumor-associated microvessels. In this context, the data reveals that particularly high numbers of platelets and neutrophils are recruited in the tumor microcirculation already in very early tumor stages, whereas classical and non-classical monocytes represent only a small fraction of the intravascularly recruited myeloid leukocytes. Against this, intravascular recruitment of T and B lymphocytes did not start until 14 days after tumor induction with CD19<sup>+</sup> lymphocytes representing the major fraction of all intravascularly recruited lymphoid leukocytes. These microvascular processes were also observed in a comparable manner in the intratumoral microcirculation, however, with a delayed onset of one week after tumor induction.

Repeated systemic enzymatic degradation of the glycocalyx *via* the enzymes heparinase III, hyaluronidase, and neuraminidase enhanced the aforementioned microvascular tumor-induced processes, whereas systemic pharmacological protection of the glycocalyx *via* the repeated application of the heparanase inhibitor OGT 2115 resulted in an attenuation of these mammary carcinoma-induced processes in the tumor microcirculation.

In additional experiments, the effect of a specific depletion of platelets, neutrophils, and classical monocytes after enzymatic degradation of the glycocalyx was

investigated regarding intravascular recruitment of platelets and myeloid leukocyte subpopulations as well as tumor growth. The results show that the intravascular recruitment of platelets, neutrophils, and classical monocytes is not only decisively regulated by the glycocalyx structure, but also reciprocally by interactions of these platelets and myeloid leukocytes. Interestingly, these experiments additionally revealed that absence of platelets and neutrophils almost prevented tumor growth.

By determining the local growth of heterotopic breast cancer under systemic modulation of the glycocalyx structure, it was found that an enzymatically enhanced degradation of the glycocalyx promoted tumor growth, whereas pharmacological protection of the glycocalyx led to a reduction of tumor growth as compared to vehicle-treated tumor bearing animals.

Most interestingly, even therapeutic application of the heparanase inhibitor to animals with already established tumors and advanced stages of disease starting seven days after tumor induction effectively interfered with local growth of the tumor. With respect to the glycocalyx expression in the peri- and intratumoral microcirculation, this pharmacological glycocalyx protection did not only lead to a decrease in the tumor-induced loss of the endothelial glycocalyx, but even supported its continuous regeneration.

In summary, employing an experimental mouse model of breast cancer, this study demonstrates that the glycocalyx in the tumor microcirculation regulates critical microvascular processes such as angiogenesis, permeability and recruitment of platelets, myeloid leukocytes, and lymphoid leukocyte as well as tumor progression.

## VIII. ABBKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AF	Alexa Fluor
BET	Brusterhaltende Therapie
BRCA-1	BReast-CAnker-1 (Synonym: BRCA-1-Gen, Brustkrebsgen-1)
BRCA-2	BReast-CAnker-1 (Synonym: BRCA-1-Gen, Brustkrebsgen-1)
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of Differentiation
CLIS	Carcinoma Lobulare <i>in situ</i>
CCL-2; 3; 4	Chemokin Ligand 2; 3, 4
CCR1; 2	C-C Chemokinrezeptor Typ 1; 2
CSF-1	Colony-Stimulating Factor 1
CXCL	Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand
CX <sub>3</sub> CR1	CX <sub>3</sub> C Chemokinrezeptor 1 (Fraktalkinrezeptor)
Da	Dalton
DCIS	Duktales Carcinoma <i>in situ</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
FGF	Fibroblast Growth Factor (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum

---

ESAM	Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule
G	Gauge (Maßeinheit für den Außendurchmesser von Kanülen oder Schläuchen)
g	Gramm
GCX	Glykokalix (englisch: glycocalix)
GP	Glykoprotein
h	Stunden
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (Synonym: HER2/neu oder erbB2)
IC <sub>50</sub>	Mittlere Inhibitorische Konzentration
ICAM-1	Inter-Cellular Adhesion Molecule-1 (intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1)
ICAM-2	Inter-Cellular Adhesion Molecule-2 (intrazelluläres Adhäsionsmolekül-2)
IFN- $\gamma$	Interferon-Gamma
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IVM	Intravitalmikroskopie
JAMs	Junctional Adhesion Molecules
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LFA-1	Lymphocyte Function-Associated Antigen-1
LPS	Lipopolysaccharid
Mac-1	Macrophage-1 Antigen
AK	Monoklonaler Antikörper

---

MALT	Mucosa Associated Lymphoid Tissue (Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe)
MCP-1	monocyte Chemoattractant Protein-1
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min.	Minuten
mind.	mindestens
MMP	Matrix-Metalloproteinase
ml	Milliliter
MPO	Myeloperoxidase
MPS	Mononukleäres Phagozytensystem
MW	Mittelwert
NA	Numerische Aperatur
NaCl	Natriumchlorid
NETs	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
nm	Nanometer
NO	Stickoxid
o.g.	oben genannt
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor 1
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PD-L1	Programmed Cell Death Ligand 1
PECAM-1	Platelet/Endothelial-Cell Adhesion Molecule 1
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand 1

---

pTNM	postoperative histopathologische Erweiterung der internationalen Tumor-Klassifikation mit Beschreibung von Primärtumor (P), Lymphknotenbefall (N) und Fernmetastasen (M)
ROS	Reactive Oxygen Species
S	Sekunden
s.	siehe
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TFPI	Tissue-Factor-Pathway-Inhibitor
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor-beta (transformierender Wachstumsfaktor-Beta)
T <sub>H</sub> -Zelle	T-Helferzelle
Ti:Sa	Titanum:Sapphire
TNF	Tumornekrosefaktor
tPA	tissue-type Plasminogen Activator (gewebsspezifischer Plasminogenaktivator)
T <sub>Reg</sub> -Zelle	Regulatorische T-Zellen
TxA2	Thromboxan A2
U	Unit (Maßeinheit der Enzymaktivität)
uPA	Urokinase-Type Plasminogen Activator
VASP	<i>Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein</i>
VCAM-1	Vascular Cell-Adhesion Molecule 1
VE-Cadherin	Vascular-Endothelial Cadherin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
Vgl.	Vergleich

---

VLA-4	Very Late Antigen 4
VVO	Vesikulo-Vakuoläre Organellen
vWF	von-Willebrand-Faktor
vs.	versus
WGA	Weizenkeim-Agglutinin
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
3D	Dreidimensional

## IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2016.....	2
Abbildung 2: Übersicht über die wichtigsten epidemiologischen Maßzahlen des Mammakarzinoms für Deutschland.....	3
Abbildung 3: Differenzierung neutrophiler Granulozyten in tumor-assoziierte Phänotypen mit unterschiedlichen Eigenschaften unter Einfluss der Tumorumgebung.....	16
Abbildung 4: Differenzierung verschiedener Monozytensubpopulationen in „Tumor-assoziierte Makrophagen“ (TAMs) unter Einfluss der Tumorumgebung.....	22
Abbildung 5: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der Leukozytenrekrutierungskaskade ins entzündete Gewebe.....	29
Abbildung 6: Schematische Darstellung der endothelialen Glykokalix.....	35
Abbildung 7: Elektronenmikroskopische Darstellung der koronaren Kapillare einer Ziege.....	36
Abbildung 8: Versuchprotokoll der intravitalmikroskopischen Analysen im heterotopen Tumormodell der Ohrmuschel.....	54
Abbildung 9: Versuchsaufbau des heterotopen Ohrmuschelmodells.....	55
Abbildung 10: Versuchsprotokoll der intravitalmikroskopischen Analysen im heterotopen Tumormodell der Ohrmuschel nach Depletion neutrophiler Granulozyten.....	62

---

Abbildung 11: Versuchsprotokoll der intravitalmikroskopischen Analysen im heterotopen Tumormodell der Ohrmuschel nach Depletion klassischer Monozyten.....	62
Abbildung 12: Versuchsprotokoll der intravitalmikroskopischen Analysen im heterotopen Tumormodell der Ohrmuschel nach Thrombozytendepletion.....	63
Abbildung 13: Formel zur mathematischen Ermittlung der TumorgroÙe.....	63
Abbildung 14: Versuchsprotokoll des heterotopen Ohrmuschelmodells der Kontrollgruppe.....	64
Abbildung 15: Versuchsprotokoll des heterotopen Tumormodells der Ohrmuschel der Vehikelgruppe.....	65
Abbildung 16: Versuchsprotokoll des heterotopen Tumormodells der Ohrmuschel unter systemischer Protektion der Glykokalix.....	65
Abbildung 17: Versuchsprotokoll des heterotopen Tumormodells der Ohrmuschel unter systemischer Glykokalixdegradation.....	65
Abbildung 18: Versuchsprotokoll des heterotopen Tumormodells der Ohrmuschel unter therapeutischer Protektion der Glykokalix.....	66
Abbildung 19: Expressionsanalyse der endothelialen Glykokalix in der peritumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.....	74
Abbildung 20: Expressionsanalyse der endothelialen Glykokalixdichte in der peritumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.....	76

---

Abbildung 21: Expressionsanalyse der endothelialen Glykokalix in der intratumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.....	77
Abbildung 22: Analyse der Gefäßarchitektur in der peritumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.....	79
Abbildung 23: Analyse der Gefäßarchitektur in der intratumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.....	79
Abbildung 24: Repräsentative 2-Photonen In-vivo-Mikroskopieaufnahmen der Gefäßarchitektur der intakten Mikrozirkulation der Ohrmuschel und der Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.....	80
Abbildung 25: Analyse der Gefäßpermeabilität in der Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.....	82
Abbildung 26: Analyse der Rekrutierung von Thrombozyten und Leukozyten in der Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.....	84
Abbildung 27: Analyse der Rekrutierung von Thrombozyten und myeloiden Leukozytensubpopulationen in der peritumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.....	87
Abbildung 28: Analyse der Rekrutierung von Thrombozyten und myeloiden Leukozytensubpopulationen in der intratumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.....	89
Abbildung 29: Analyse der Lymphozytenrekrutierung in der peritumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.....	91
Abbildung 30: Analyse der Lymphozytenrekrutierung in der intratumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.....	92

- Abbildung 31: Expressionsanalyse der endothelialen Glykokalixextension unter Modulation ihrer Struktur in der peritumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.....94
- Abbildung 32: Expressionsanalyse der endothelialen Glykokalixdichte unter Modulation ihrer Struktur in der peritumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.....95
- Abbildung 33: Expressionsanalyse der endothelialen Glykokalix unter Modulation ihrer Struktur in der intratumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.....96
- Abbildung 34: Repräsentative 2-Photonen In-vivo-Mikroskopieaufnahmen der endothelialen Glykokalixexpression unter Modulation ihrer Struktur in der Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.....97
- Abbildung 35: Analyse der Gefäßarchitektur unter Modulation der Glykokalixstruktur in der peritumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.....99
- Abbildung 36: Analyse der Gefäßarchitektur unter Modulation der Glykokalixstruktur in der intratumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.....101
- Abbildung 37: Repräsentative 2-Photonen In-vivo-Mikroskopieaufnahmen der Gefäßarchitektur in der Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms unter Modulation der Glykokalixstruktur.....101
- Abbildung 38: Repräsentative In-vivo-Epifluoreszenzmikroskopiebilder der Gefäßpermeabilität in der Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms unter Modulation der Glykokalixstruktur.....104

- Abbildung 39: Analyse der Gefäßpermeabilität unter Modulation der Glykokalixstruktur in der peritumoralen und intratumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms.....104
- Abbildung 40: Analyse der Rekrutierung von Thrombozyten und myeloiden Leukozytensubpopulationen in der peritumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms unter Modulation der Glykokalixstruktur.....107
- Abbildung 41: Analyse der Rekrutierung von Thrombozyten und myeloiden Leukozytensubpopulationen in der intratumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms unter Modulation der Glykokalixstruktur.....109
- Abbildung 42: Analyse der Lymphozytenrekrutierung in der peritumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms unter Modulation der Glykokalixstruktur.....112
- Abbildung 43: Analyse der Lymphozytenrekrutierung in der intratumoralen Mikrozirkulation des heterotopen Mammakarzinoms unter Modulation der Glykokalixstruktur.....113
- Abbildung 44: Analyse des Mammakarzinomwachstums im heterotopen Ohrmuschelmodell unter Modulation der Glykokalixstruktur.....115
- Abbildung 45: Analyse der Bedeutung einer Depletion von Thrombozyten und myeloiden Leukozyten auf ihre Rekrutierung in der Mikrozirkulation des Mammakarzinoms nach systemischer Glykokalixdegradation.....120
- Abbildung 46: Lokales Tumorwachstum des experimentellen Mammakarzinoms im heterotopen Ohrmodell nach Depletion von Thrombozyten und myeloiden Leukozyten in Verbindung mit einer systemischen Glykokalixdegradation.....121

- Abbildung 47: Expressionsanalyse der endothelialen Glykokalix unter  
therapeutischer Protektion ihrer Struktur in peritumoralen  
Mikrogefäßen.....123
- Abbildung 48: Expressionsanalyse der endothelialen Glykokalix unter  
therapeutischer Protektion ihrer Struktur in intratumoralen  
Mikrogefäßen.....124
- Abbildung 49: Lokales Tumorwachstum des experimentellen Mammakarzinoms  
im heterotopen Ohrmodell unter therapeutischer Protektion der  
Glykokalixstruktur.....126
- Abbildung 50: Schematische Darstellung der Bedeutung der Glykokalix für  
die Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten  
sowie die mikrovaskuläre Permeabilität und Angiogenese in  
der peritumoralen Mikrozirkulation des murinen  
4T1-Mammakarzinoms.....177
- Abbildung 51: Schematische Darstellung der Bedeutung der Glykokalix für  
die Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten  
sowie die mikrovaskuläre Permeabilität und Angiogenese in  
der intratumoralen Mikrozirkulation des murinen 4T1-  
Mammakarzinoms.....178

## X. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Monoklonale Antikörper (mAK) zur Differenzierung unterschiedlicher Leukozytensubpopulationen und Thrombozyten...	45
Tabelle 2: Antikörper zur spezifischen Depletion von Leukozytensubpopulationen.....	46
Tabelle 3: Enzyme zur spezifischen Degradation von relevanten Glykokalixbestandteilen.....	46
Tabelle 4: Pharmakologischer Heparanaseinhibitor.....	46
Tabelle 5: Weizenkeim-Agglutinin zur Visualisierung der Glykokalix.....	47
Tabelle 6: Dextran-Moleküle zur Analyse der Gefäßpermeabilität und Angiogenese.....	47
Tabelle 7: Experimentelles Protokoll zur Visualisierung und Differenzierung der gesamten Leukozytensubpopulation.....	58
Tabelle 8: Experimentelles Protokoll zur Visualisierung und Differenzierung unterschiedlicher myeloider Leukozytensubpopulationen.....	58/59
Tabelle 9: Experimentelles Protokoll zur Visualisierung und Differenzierung unterschiedlicher myeloider Leukozytensubpopulationen.....	59
Tabelle 10: Experimentelles Protokoll zur Visualisierung und Differenzierung unterschiedlicher lymphoider Leukozytensubpopulationen.....	60

## XI. PUBLIKATIONEN

### 1. Aus dieser Dissertation hervorgehende Publikation

1. **Braun, C.**, Uhl, B., Reichel, C. A. et al. *The endothelial glycocalyx controls breast cancer progression via regulation of microvascular inflammatory and angiogenetic processes.*  
**Manuskript in Vorbereitung**

### 2. Weitere Publikationen

1. Uhl, B., **Braun, C.**, Dominik, J., Luft, J., Canis, M., Reichel, C. A. *A novel experimental approach for in vivo analyses of the salivary gland microvasculature.* **Front Immunol. 2021.**
2. Uhl, B., Mitmann, L., Dominik, J., **Braun, C.**, Reichel, C. A., et al. *Heteromerization of uPA and PAI-1 promotes advanced stages of breast cancer by attracting pro-tumorigenic neutrophils.* **EMBO Mol Med. 2021**
3. Schaubächer, J., Haring, F., **Braun, C.**, Mittmann, L., Zuchtriegel, G., Lauber, K., Uhl, B., Reichel, C. A. *Platelets contribute to immune evasion in breast cancer by misguiding immune cell responses.*  
**Manuskript in Vorbereitung**

## **XII. DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die bei der Entstehung dieser Arbeit beteiligt waren.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Christoph Reichel und Herrn Dr. med. Bernd Uhl für die sehr freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, für ihre einzigartige Betreuung und Unterstützung sowie für ihr großes Engagement bei der Beantragung und Finanzierung meiner Arbeitsstelle und dem damit verbundenen Einstieg in die experimentelle Medizin bedanken.

Herrn Dr. med. Christoph Reichel danke ausdrücklich für seine absolute Zuverlässigkeit und seine einzigartige Schnelligkeit bei der Korrektur meiner Doktorarbeit!

Mein ausdrücklicher Dank gilt Herrn Dr. med. Bernd Uhl, der mir dieses hochinteressante Thema überlassen hat und damit die Möglichkeit gab, die vorliegende Arbeit am Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin des Klinikums Großhadern anfertigen zu dürfen. Mit seiner fachlichen Kompetenz und seiner Begeisterungsfähigkeit hat er mir das wissenschaftliche Arbeiten, von der Planung und Durchführung der Experimente bis hin zur Interpretation, Diskussion und Präsentation der Ergebnisse gelehrt. Dabei haben seine hervorragenden Ideen sowie seine freundlichen Anregungen und Ratschläge entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Und auch ihm danke ich für sein Engagement bei der kritischen Korrektur meiner Doktorarbeit.

Ein weiterer ganz herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. vet. Thomas Göbel für die Übernahme der Betreuung, der außerordentlich schnellen und zuverlässigen Durchsicht, sowie der Korrektur und der Einreichung der vorliegenden Dissertation an der Tiermedizinischen Fakultät der LMU München.

Dem Vorstand der Integrated Research Training Group des Sonderforschungsbereiches (SFB) 914 „Trafficking of Immune Cells in Inflammation, Development and Disease“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danke ich für die freundliche Aufnahme in das Graduiertenkolleg. Die regelmäßigen Seminare und intensiven Diskussionen mit

Kollegen aus einem interdisziplinären und internationalen Team haben maßgeblich zur Erweiterung meines wissenschaftlichen Horizontes beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Matthias Mack vom Universitätsklinikum Regensburg danke ich für die freundliche Bereitstellung des anti-CCR2 (MC21) Depletionsantikörpers.

Mein großer Dank gilt auch Claudia Fahney, die mich während meiner gesamten Zeit am Institut mit ihrer fachlichen Kompetenz sowohl bei medizinisch-technischen Fragen als auch durch die Bereitstellung von Tumorzellen, der Erstellung von Gewebeschnitten sowie durch und ihre professionelle und geduldige Hilfe in der Zellkultur sehr unterstützt hat.

Herrn Horst Eberl-Tschernik und Herrn Dr. Jürgen Peters danke ich sehr für ihre freundliche und kompetente Hilfe bei technischen Problemen mit meinem Computer, welcher mich nicht selten an den Rand der Verzweiflung gebracht hat.

Herrn Dr. Steffen Dietzel danke ich für seine fachliche Unterstützung sowie die Einweisung in die Funktionen des 2-Photonenmikroskopes.

Meinen großen Dank schulde ich auch meinen Kollegen Julian, Florian, Bernd, Michael, Ben, Lena und nicht zuletzt Bojan für ihre einzigartige Unterstützung, die hervorragende Zusammenarbeit, die harmonische Atmosphäre, die interessanten Gespräche sowie für sehr viel Spaß und gute Laune am Arbeitsplatz. Sie haben es nicht nur geschafft aussichtslose Momente erträglich zu machen, mich immer wieder aufzubauen und neu zu motivieren, sondern auch, dass mir die gemeinsame Zeit als ein sehr bereichernder und ausgesprochen schöner Lebensabschnitt in Erinnerung bleibt. Vielen Dank!!

Mein tiefster Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder, auf die ich mich zu jeder Zeit verlassen konnte. Ohne ihre grenzenlose und bedingungslose Unterstützung und Fürsorge in allen Lebenslagen sowie das unermüdliche Vertrauen, das sie in mich gesetzt haben, wären weder das Studium noch die Promotion in dieser Form möglich gewesen. Meiner Mutter bin ich unheimlich dankbar, dass sie mir unglaublich viel beigebracht hat und dass sie es mir ermöglicht hat, sehr wichtige und wertvolle Erfahrungen sammeln zu können, die mich sehr geprägt haben und von welchen ich mein Leben lang profitieren kann. Als sehr starkes Vorbild hat sie mir gezeigt, dass Aufgeben keine Option ist. Meinem Vater verdanke ich die

Fähigkeit, das Emotionale vom Rationalen zu trennen, ohne dabei die Menschlichkeit aus den Augen zu verlieren, pragmatisch zu denken und zu handeln sowie in schwierigen Situationen den Überblick zu bewahren. Mit seiner Ruhe und Gelassenheit hat er mich immer wieder in die richtige Bahn gelenkt. Während meiner Promotionszeit hat er keine Strapazen gescheut, um für meine regelmäßige Entspannung und Regeneration an den oberbayrischen Seen zu sorgen. Von meinem Bruder, der für mich ein großes Vorbild ist, konnte ich sehr viel Wertvolles lernen und nicht zuletzt hat er mir gezeigt, dass man gelegentlich auch mal einen Gang zurückschalten kann, um trotzdem ans Ziel zu kommen.

### XIII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(6): p. 394-424.
2. Torre, L.A., et al., *Global cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(2): p. 87-108.
3. Koch-Institut, R. and G.d.e.K.i.D. e.V., *Krebs in Deutschland 2015/2016*. 2019.
4. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(2): p. 69-90.
5. Bray, F., P. McCarron, and D.M. Parkin, *The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality*. Breast Cancer Res, 2004. **6**(6): p. 229-39.
6. Jemal, A., et al., *Global Patterns of Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends*. Cancer Epidemiol Biomark Prev, 2010. **19**(8): p. 1893-1907.
7. Youlden, D.R., et al., *The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality*. Cancer Epidemiol, 2012. **36**(3): p. 237-48.
8. Colditz, G.A., *Epidemiology and prevention of breast cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005. **14**(4): p. 768-72.
9. World Health, O., *Histological typing of breast tumours, 1981*, World Health Organization: Geneva.
10. Sinn, H.-P. and H. Kreipe, *A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition*. Breast care (Basel, Switzerland), 2013. **8**(2): p. 149-154.
11. Weigelt, B., J.L. Peterse, and L.J. van't Veer, *Breast cancer metastasis: markers and models*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(8): p. 591-602.
12. Scully, O.J., et al., *Breast Cancer Metastasis*. Cancer Genomics - Proteomics, 2012. **9**(5): p. 311-320.
13. Lauria, R., et al., *The prognostic value of lymphatic and blood vessel invasion in operable breast cancer*. Cancer, 1995. **76**(10): p. 1772-8.
14. Carter, C.L., C. Allen, and D.E. Henson, *Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases*. Cancer, 1989. **63**(1): p. 181-187.
15. Perry, N., E. Puthaar, and C. Protection, *European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis, 2013*. p. 1-160.
16. Mangasarian, O.L., W.N. Street, and W.H. Wolberg, *Breast Cancer Diagnosis and Prognosis Via Linear Programming*. Oper Res, 1995. **43**(4): p. 570-577.
17. Fletcher, S.W. and J.G. Elmore, *Mammographic Screening for Breast Cancer*. New Engl J Med, 2003. **348**(17): p. 1672-1680.
18. Heywang-Kobrunner, S.H., J. Nahrig, and A. Hacker, *[Mammography screening. Concept, quality assurance and interdisciplinary cooperation]*. Pathologie, 2008. **29 Suppl 2**: p. 163-7.
19. Malek, D. and V. Kaab-Sanyal, *Implementation of the German Mammography Screening Program (German MSP) and First Results for Initial Examinations, 2005-2009*. Breast Care (Basel), 2016. **11**(3): p. 183-7.
20. Katalinic, A., et al., *Breast cancer incidence and mortality before and after implementation of the German mammography screening program*. Int J Cancer, 2019.
21. Berg, W.A., et al., *Diagnostic Accuracy of Mammography, Clinical Examination, US, and MR Imaging in Preoperative Assessment of Breast Cancer*. Radiology, 2004. **233**(3): p. 830-849.
22. Giuliano, A.E., S.B. Edge, and G.N. Hortobagyi, *Eighth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Breast Cancer*. Ann Surg Oncol, 2018. **25**(7): p. 1783-1785.
23. Rakha, E.A., et al., *Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade*. Breast Cancer Res, 2010. **12**(4): p. 207.
24. Kreienberg, R., et al., *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms*. Senologie - Zeitschrift für Mammadiagnostik und -therapie, 2013. **10**(03): p. 164-192.

25. Yarden, Y., *Biology of HER2 and Its Importance in Breast Cancer*. *Oncol*, 2001. **61(suppl 2)**(Suppl. 2): p. 1-13.
26. Reubi, J.-C. and J. Torhorst, *The relationship between somatostatin, epidermal growth factor, and steroid hormone receptors in breast cancer*. *Cancer*, 1989. **64**(6): p. 1254-1260.
27. Hwang, R.F., et al., *Clinicopathologic Factors Predicting Involvement of Nonsentinel Axillary Nodes in Women With Breast Cancer*. *Ann Surg Oncol*, 2003. **10**(3): p. 248-254.
28. Staradub, V.L., et al., *Changes in breast cancer therapy because of pathology second opinions*. *Ann Surg Oncol*, 2002. **9**(10): p. 982-987.
29. Cardoso, F., et al., *1st International consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC 1)*. *The Breast*, 2012. **21**(3): p. 242-252.
30. Elmore, J.G., et al., *Screening for Breast Cancer*. *JAMA*, 2005. **293**(10): p. 1245-1256.
31. DeVita, V.T., *Breast Cancer Therapy: Exercising All Our Options*. *New Engl J Med*, 1989. **320**(8): p. 527-529.
32. Noguchi, M., et al., *Clinical and pathologic factors predicting axillary lymph node involvement in breast cancer*. *Breast Cancer*, 2000. **7**(2): p. 114.
33. Harris, L.N., et al., *Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline*. *J Clin Oncol*, 2016. **34**(10): p. 1134-1150.
34. Sabatier, R., et al., *Prognostic and predictive value of PDL1 expression in breast cancer*. *Oncotarget*, 2015. **6**(7): p. 5449-5464.
35. McGuire, W.L., *Breast cancer prognostic factors: evaluation guidelines*. *J Natl Cancer Inst*. 1991 Feb 6;83(3):154-5. doi: 10.1093/jnci/83.3.154.
36. Payne, S.J., et al., *Predictive markers in breast cancer--the present*. *Histopathology*, 2008. **52**(1): p. 82-90.
37. Nissen, M.J., et al., *Quality of life after breast carcinoma surgery*. *Cancer*, 2001. **91**(7): p. 1238-1246.
38. Mustakallio, S., *Conservative treatment of breast carcinoma--review of 25 years follow up*. *Clin Radiol*, 1972. **23**(1): p. 110-6.
39. Heindrichs, U., T. Kupec, and N. Maass, *Brusterhaltende Karzinomchirurgie*. *Der Gynäkologe*, 2012. **45**(11): p. 859-864.
40. Schütz, F. and C. Sohn, *Brusterhaltende Operation* *Operation, brusterhaltende*, in *Erste Hilfe bei Brustkrebs: Universitätsfrauenklinik Heidelberg*, F. Schütz and C. Sohn, Editors. 2018, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 31-33.
41. Carbine, N.E., et al., *Risk-reducing mastectomy for the prevention of primary breast cancer*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2018. **4**(4): p. CD002748-CD002748.
42. Liu, S.V., et al., *Neoadjuvant therapy for breast cancer*. *J Surg Oncol*, 2010. **101**(4): p. 283-291.
43. Luengo-Gil, G., et al., *Effects of conventional neoadjuvant chemotherapy for breast cancer on tumor angiogenesis*. *Breast Cancer Res Treat*, 2015. **151**(3): p. 577-87.
44. Teshome, M. and K.K. Hunt, *Neoadjuvant Therapy in the Treatment of Breast Cancer*. *Surgical Oncology Clinics*, 2014. **23**(3): p. 505-523.
45. Untch, M., et al., *Current and future role of neoadjuvant therapy for breast cancer*. *The Breast*, 2014. **23**(5): p. 526-537.
46. Berry, D.A., et al., *Effect of Screening and Adjuvant Therapy on Mortality from Breast Cancer*. *New Engl J Med*, 2005. **353**(17): p. 1784-1792.
47. Panel, N.I.o.H.C.D., *National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Adjuvant Therapy for Breast Cancer, November 1-3, 2000*. *JNCI Monographs*, 2001. **2001**(30): p. 5-15.
48. Formenti, S.C. and S. Demaria, *Systemic effects of local radiotherapy*. *Lancet Oncol*, 2009. **10**(7): p. 718-726.
49. Ragaz, J., et al., *Adjuvant Radiotherapy and Chemotherapy in Node-Positive Premenopausal Women with Breast Cancer*. *New Engl J Med*, 1997. **337**(14): p. 956-962.

50. Abdel-Rahman, O., *Impact of timeliness of adjuvant chemotherapy and radiotherapy on the outcomes of breast cancer; a pooled analysis of three clinical trials*. *The Breast*, 2018. **38**: p. 175-180.
51. Vaidya, J.S., et al., *Intraoperative radiotherapy for breast cancer*. *Lancet Oncol*, 2004. **5**(3): p. 165-173.
52. Reitsamer, R., et al., *Concepts and techniques of intraoperative radiotherapy (IORT) for breast cancer*. *Breast Cancer*, 2008. **15**(1): p. 40-6.
53. Souchon, R., et al., *DEGRO Practice Guidelines for Palliative Radiotherapy of Metastatic Breast Cancer*. *Strahlentherapie und Onkologie*, 2009. **185**(7): p. 417-424.
54. Danielson, B., et al., *Palliative Radiotherapy for Women with Breast Cancer*. *Clin Oncol*, 2008. **20**(7): p. 506-512.
55. Lutz, S., et al., *Palliative Radiotherapy for Bone Metastases: An ASTRO Evidence-Based Guideline*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2011. **79**(4): p. 965-976.
56. Reitz, D., et al., *Stability and reproducibility of 6013 deep inspiration breath-holds in left-sided breast cancer*. *Radiat oncol (London, England)*, 2020. **15**(1): p. 121-121.
57. Twardella, D., et al., *Personal characteristics, therapy modalities and individual DNA repair capacity as predictive factors of acute skin toxicity in an unselected cohort of breast cancer patients receiving radiotherapy*. *Radiother Oncol*, 2003. **69**(2): p. 145-53.
58. Johansson, S., H. Svensson, and J. Denekamp, *Dose response and latency for radiation-induced fibrosis, edema, and neuropathy in breast cancer patients*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2002. **52**(5): p. 1207-19.
59. Yi, A., et al., *Radiation-Induced Complications after Breast Cancer Radiation Therapy: a Pictorial Review of Multimodality Imaging Findings*. *Korean J Radiol*, 2009. **10**(5): p. 496-507.
60. Sjövall, K., et al., *Adjuvant radiotherapy of women with breast cancer – Information, support and side-effects*. *Europ J Oncoly Nurs*, 2010. **14**(2): p. 147-153.
61. Lilla, C., et al., *Predictive factors for late normal tissue complications following radiotherapy for breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2007. **106**(1): p. 143-150.
62. Borger, J.H., et al., *Dose and volume effects on fibrosis after breast conservation therapy*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1994. **30**(5): p. 1073-81.
63. Withers, H.R., *The Four R's of Radiotherapy*, in *Advances in Radiation Biology*, J.T. Lett and H. Adler, Editors. 1975, Elsevier. p. 241-271.
64. Begg, A.C., F.A. Stewart, and C. Vens, *Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs*. *Nature Reviews Cancer*, 2011. **11**(4): p. 239-253.
65. Vicini, F.A., et al., *Optimizing breast cancer treatment efficacy with intensity-modulated radiotherapy*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2002. **54**(5): p. 1336-1344.
66. Maunu A. Pitkänen, K.A.H.A.T.O.P.L., *Quality Assurance in Radiotherapy of Breast Cancer Variability in Planning Target Volume Delineation*. *Acta Oncologica*, 2001. **40**(1): p. 50-55.
67. Sachelarie, I., et al., *Primary Systemic Therapy of Breast Cancer*. *Oncol*, 2006. **11**(6): p. 574-589.
68. Gralow, J.R., et al., *Preoperative Therapy in Invasive Breast Cancer: Pathologic Assessment and Systemic Therapy Issues in Operable Disease*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(5): p. 814-819.
69. Anderson, E.D.C., et al., *Primary systemic therapy for operable breast cancer*. *Br J Cancer*, 1991. **63**(4): p. 561-566.
70. Honig, S.F., *Treatment of metastatic disease. Hormonal therapy and chemotherapy*. *Diseases of the Breast*, 1996: p. 669-734.
71. Gonzalez-Angulo, A.M., F. Morales-Vasquez, and G.N. Hortobagyi, *Overview of Resistance to Systemic Therapy in Patients with Breast Cancer*, in *Breast Cancer Chemosensitivity*, D. Yu and M.-C. Hung, Editors. 2007, Springer New York: New York, NY. p. 1-22.
72. Langballe, R., et al., *Systemic therapy for breast cancer and risk of subsequent contralateral breast cancer in the WECARE Study*. *Breast Cancer Res*, 2016. **18**(1): p. 65-65.
73. DeVita, V.T. and E. Chu, *A History of Cancer Chemotherapy*. *Cancer Res*, 2008. **68**(21): p. 8643-8653.

74. Love, R.R., et al., *Side effects and emotional distress during cancer chemotherapy*. *Cancer*, 1989. **63**(3): p. 604-612.
75. Coates, A., et al., *On the receiving end—patient perception of the side-effects of cancer chemotherapy*. *Europ J Cancer and Clin Oncol*, 1983. **19**(2): p. 203-208.
76. Lu, X., et al., *Alkylating agent melphalan augments the efficacy of adoptive immunotherapy using tumor-specific CD4+ T cells*. *J Immunol*, 2015. **194**(4): p. 2011-21.
77. Fisusi, F.A. and E.O. Akala, *Drug Combinations in Breast Cancer Therapy*. *Pharm Nanotechnol*, 2019. **7**(1): p. 3-23.
78. Shah, A.N. and W.J. Gradishar, *Adjuvant Anthracyclines in Breast Cancer: What Is Their Role?* *Oncol*, 2018. **23**(10): p. 1153-1161.
79. Yamashita, T., et al., *Trastuzumab, pertuzumab, and eribulin mesylate versus trastuzumab, pertuzumab, and a taxane as a first-line or second-line treatment for HER2-positive, locally advanced or metastatic breast cancer: study protocol for a randomized controlled, non-inferiority, phase III trial in Japan (JBCRG-M06/EMERALD)*. *Trials*, 2020. **21**(1).
80. Leinmüller, R., *Taxane und Mammakarzinom: Effizienz in frühen Stadien wird geprüft*. *Dtsch Arztebl International*, 2001. **98**(11): p. 708-.
81. Gennari, A., et al., *Duration of chemotherapy for metastatic breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials*. *J Clin Oncol*, 2011. **29**(16): p. 2144-9.
82. Piccart-Gebhart, M.J., et al., *Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer*. *New Engl J Med*, 2005. **353**(16): p. 1659-1672.
83. Romond, E.H., et al., *Trastuzumab plus Adjuvant Chemotherapy for Operable HER2-Positive Breast Cancer*. *New Engl J Med*, 2005. **353**(16): p. 1673-1684.
84. Li, X., et al., *Intrinsic Resistance of Tumorigenic Breast Cancer Cells to Chemotherapy*. *JNCI: J Natl Cancer Inst*, 2008. **100**(9): p. 672-679.
85. Slamon, D.J., et al., *Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2*. *New Engl J Med*, 2001. **344**(11): p. 783-792.
86. van de Water, W., et al., *Association Between Age at Diagnosis and Disease-Specific Mortality Among Postmenopausal Women With Hormone Receptor-Positive Breast Cancer*. *JAMA*, 2012. **307**(6): p. 590-597.
87. Wittliff, J.L., *Steroid-hormone receptors in breast cancer*. *Cancer*, 1984. **53**(S3): p. 630-643.
88. McGuire, W.L., *Steroid Hormone Receptors in Breast Cancer Treatment Strategy*, in *Proceedings of the 1979 Laurentian Hormone Conference*, R.O. Greep, Editor. 1980, Academic Press: Boston. p. 135-156.
89. Blok, E.J., et al., *Relevant factors for the optimal duration of extended endocrine therapy in early breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2018. **168**(2): p. 413-420.
90. Burstein, H.J., et al., *Adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: american society of clinical oncology clinical practice guideline focused update*. *J Clin Oncol*, 2014. **32**(21): p. 2255-2269.
91. Cuzick, J., et al., *Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial*. *Lancet Oncol*, 2010. **11**(12): p. 1135-41.
92. Blok, E.J., et al., *Optimal Duration of Extended Adjuvant Endocrine Therapy for Early Breast Cancer; Results of the IDEAL Trial (BOOG 2006-05)*. *J Natl Cancer Inst*, 2018. **110**(1).
93. Stagg, J., F. Andre, and S. Loi, *Immunomodulation via Chemotherapy and Targeted Therapy: A New Paradigm in Breast Cancer Therapy?* *Breast care (Basel, Switzerland)*, 2012. **7**(4): p. 267-272.
94. Sharma, P., et al., *Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next steps*. *Nat Rev Cancer*, 2011. **11**(11): p. 805-12.
95. Serrano-del Valle, A., et al., *Novel Forms of Immunomodulation for Cancer Therapy*. *Trends Cancer*, 2020. **6**(6): p. 518-532.
96. Rubin, I. and Y. Yarden, *The basic biology of HER2*. *Annals Oncol*, 2001. **12**: p. S3-S8.

97. Nahta, R., G.N. Hortobágyi, and F.J. Esteva, *Growth Factor Receptors in Breast Cancer: Potential for Therapeutic Intervention*. *Oncol*, 2003. **8**(1): p. 5-17.
98. Cobleigh, M.A., et al., *Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease*. *J Clin Oncol*, 1999. **17**(9): p. 2639-48.
99. Nahta, R., M.-C. Hung, and F.J. Esteva, *The HER-2-Targeting Antibodies Trastuzumab and Pertuzumab Synergistically Inhibit the Survival of Breast Cancer Cells*. *Cancer Res*, 2004. **64**(7): p. 2343.
100. Arnould, L., et al., *Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism?* *Br J Cancer*, 2006. **94**(2): p. 259-267.
101. Kerbel, R.S., *Tumor angiogenesis*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(19): p. 2039-2049.
102. Folkman, J. and D. Ingber, *Inhibition of angiogenesis*. *Semin Cancer Biol*, 1992. **3**(2): p. 89-96.
103. Toi, M., et al., *Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer*. *Jpn J Cancer Res*, 1994. **85**(10): p. 1045-9.
104. Zhang, J., et al., *Suppression of breast cancer metastasis through the inhibition of VEGF-mediated tumor angiogenesis*. *Cancer Ther*, 2007. **5**: p. 273-286.
105. Teleanu, R.I., et al., *Tumor Angiogenesis and Anti-Angiogenic Strategies for Cancer Treatment*. *J Clin Med*, 2019. **9**(1).
106. Tredan, O., et al., *Angiogenesis and tumor microenvironment: bevacizumab in the breast cancer model*. *Target Oncol*, 2015. **10**(2): p. 189-98.
107. Willett, C.G., et al., *Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer*. *Nat Med*, 2004. **10**(2): p. 145-147.
108. Zhai, Y., et al., *Inhibition of angiogenesis and breast cancer xenograft tumor growth by VEGI, a novel cytokine of the TNF superfamily*. *Int J Cancer*, 1999. **82**(1): p. 131-6.
109. Wedam, S.B., et al., *Antiangiogenic and Antitumor Effects of Bevacizumab in Patients With Inflammatory and Locally Advanced Breast Cancer*. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(5): p. 769-777.
110. Bear, H.D., et al., *Bevacizumab Added to Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer*. *New Engl J Med*, 2012. **366**(4): p. 310-320.
111. Zhu, S., et al., *Tumor angiogenesis therapy using targeted delivery of Paclitaxel to the vasculature of breast cancer metastases*. *J Drug Deliv*, 2014. **2014**: p. 865732.
112. Folkman, J., *Tumor angiogenesis in women with node-positive breast cancer*. *Cancer J Sci Am*, 1995. **1**(2): p. 106-8.
113. Couzin-Frankel, J., *Cancer Immunotherapy*. *Science*, 2013. **342**(6165): p. 1432-1433.
114. Chester, C., et al., *Immunotherapeutic approaches to ovarian cancer treatment*. *J Immunother Cancer*, 2015. **3**: p. 7.
115. Dougan, M. and G. Dranoff, *Immunotherapy of Cancer*, in *Innate Immune Regulation and Cancer Immunotherapy*, R. Wang, Editor. 2012, Springer New York: New York, NY. p. 391-414.
116. Hadden, J.W., *Review Article The immunology and immunotherapy of breast cancer: an update*. *Int J Immunopharm*, 1999. **21**(2): p. 79-101.
117. Gong, J., et al., *Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: a comprehensive review of registration trials and future considerations*. *J Immunother Cancer*, 2018. **6**(1): p. 8.
118. Pardoll, D.M., *The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy*. *Nat Rev Cancer*, 2012. **12**(4): p. 252-264.
119. Muenst, S., et al., *Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2014. **146**(1): p. 15-24.
120. Mazel, M., et al., *Frequent expression of PD-L1 on circulating breast cancer cells*. *Mol Oncol*, 2015. **9**(9): p. 1773-82.

121. Gatalica, Z., et al., *Programmed Cell Death 1 (PD-1) and Its Ligand (PD-L1) in Common Cancers and Their Correlation with Molecular Cancer Type*. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*, 2014. **23**(12): p. 2965.
122. Butte, M.J., et al., *Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses*. *Immunity*, 2007. **27**(1): p. 111-22.
123. Lau, J., et al., *Tumour and host cell PD-L1 is required to mediate suppression of anti-tumour immunity in mice*. *Nat Commun*, 2017. **8**(1): p. 14572.
124. Gibbons Johnson, R.M. and H. Dong, *Functional Expression of Programmed Death-Ligand 1 (B7-H1) by Immune Cells and Tumor Cells*. *Front Immunol*, 2017. **8**(961).
125. Vanneman, M. and G. Dranoff, *Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment*. *Nat Rev Cancer*, 2012. **12**(4): p. 237-251.
126. Marra, A., G. Viale, and G. Curigliano, *Recent advances in triple negative breast cancer: the immunotherapy era*. *BMC Med*, 2019. **17**(1): p. 90-90.
127. Katz, H. and M. Alsharedi, *Immunotherapy in triple-negative breast cancer*. *Med Oncol*, 2017. **35**(1): p. 017-1071.
128. Mittendorf, E.A., et al., *PD-L1 Expression in Triple-Negative Breast Cancer*. *Cancer Immunol Res*, 2014. **2**(4): p. 361.
129. Jia, H., et al., *Immunotherapy for triple-negative breast cancer: Existing challenges and exciting prospects*. *Drug Resist Updat*, 2017. **32**: p. 1-15.
130. Ono, S.J., et al., *Chemokines: roles in leukocyte development, trafficking, and effector function*. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. **111**(6): p. 1185-99; quiz 1200.
131. Delves P.J., R.I.M., *The immune system. First of two parts*. *N. Engl. J. Med.*, 2000: p. 343.
132. Grivennikov, S.I., F.R. Greten, and M. Karin, *Immunity, inflammation, and cancer*. *Cell*, 2010. **140**(6): p. 883-99.
133. Wong, P.Y., et al., *Functional analysis of tumor-infiltrating leukocytes in breast cancer patients*. *J Surg Res*, 1998. **76**(1): p. 95-103.
134. Lança, T. and B. Silva-Santos, *The split nature of tumor-infiltrating leukocytes: Implications for cancer surveillance and immunotherapy*. *Oncoimmunology*, 2012. **1**(5): p. 717-725.
135. Flavell, R.A., et al., *The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(8): p. 554-67.
136. Kim, J. and J.S. Bae, *Tumor-Associated Macrophages and Neutrophils in Tumor Microenvironment*. *Mediators Inflamm*, 2016. **2016**: p. 6058147.
137. Mishalian, I., Z. Granot, and Z.G. Fridlender, *The diversity of circulating neutrophils in cancer*. *Immunobiol*, 2017. **222**(1): p. 82-88.
138. Soto-Perez-de-Celis, E., et al., *Tumor-Associated Neutrophils in Breast Cancer Subtypes*. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2017. **18**(10): p. 2689-2693.
139. Borregaard, N., *The human neutrophil. Function and dysfunction*. *Eur J Haematol*, 1988. **41**(5): p. 401-13.
140. Jaillon, S., et al., *Neutrophils in innate and adaptive immunity*. *Semin Immunopathol*, 2013. **35**(4): p. 377-94.
141. Ocana, A., et al., *Neutrophils in cancer: prognostic role and therapeutic strategies*. *Mol Cancer*, 2017. **16**(1): p. 137.
142. Albin, A., et al., *Contribution to Tumor Angiogenesis From Innate Immune Cells Within the Tumor Microenvironment: Implications for Immunotherapy*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 527.
143. Hager, M., J.B. Cowland, and N. Borregaard, *Neutrophil granules in health and disease*. *J Intern Med*, 2010. **268**(1): p. 25-34.
144. Hurt, B., et al., *Cancer-promoting mechanisms of tumor-associated neutrophils*. *Am J Surg*, 2017. **214**(5): p. 938-944.
145. Andzinski, L., et al., *Type I IFNs induce anti-tumor polarization of tumor associated neutrophils in mice and human*. *Int J Cancer*, 2016. **138**(8): p. 1982-1993.
146. Flavell, R.A., et al., *The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFβ*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(8): p. 554-567.

147. Mishalian, I., et al., *Tumor-associated neutrophils (TAN) develop pro-tumorigenic properties during tumor progression*. *Cancer Immunol, Immunother*, 2013. **62**(11): p. 1745-1756.
148. Shaul, M.E., et al., *Tumor-associated neutrophils display a distinct N1 profile following TGF $\beta$  modulation: A transcriptomics analysis of pro- vs. antitumor TANs*. *Oncoimmunol*, 2016. **5**(11): p. e1232221.
149. Berek, C., *Eosinophils: important players in humoral immunity*. *Clin Exp Immunol*, 2016. **183**(1): p. 57-64.
150. Diny, N.L., N.R. Rose, and D. Cihakova, *Eosinophils in Autoimmune Diseases*. *Front Immunol*, 2017. **8**: p. 484.
151. Rothenberg, M.E. and S.P. Hogan, *The eosinophil*. *Annu Rev Immunol*, 2006. **24**: p. 147-74.
152. Davis, B.P. and M.E. Rothenberg, *Eosinophils and cancer*. *Cancer Immunol Res*, 2014. **2**(1): p. 1-8.
153. Sharma, M. and J. Bayry, *Basophils in autoimmune and inflammatory diseases*. *Nat Rev Rheumatol*, 2015. **11**(3): p. 129-131.
154. Janeway CA Jr, T.P., Walport M, et al., *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition*. New York: Garland Science;, 2001.
155. Rigoni, A., M.P. Colombo, and C. Pucillo, *Mast cells, basophils and eosinophils: From allergy to cancer*. *Semin Immunol*, 2018. **35**: p. 29-34.
156. Marone, G., et al., *Basophils in Tumor Microenvironment and Surroundings*, in *Tumor Microenvironment: Hematopoietic Cells – Part A*, A. Birbrair, Editor. 2020, Springer International Publishing: Cham. p. 21-34.
157. Gordon, S. and P.R. Taylor, *Monocyte and macrophage heterogeneity*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(12): p. 953-64.
158. Karlmark, K.R., F. Tacke, and I.R. Dunay, *Monocytes in health and disease - Minireview*. *Europ J microbiol Immunol*, 2012. **2**(2): p. 97-102.
159. Ginhoux, F. and S. Jung, *Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis*. *Nat Rev Immunol*, 2014. **14**(6): p. 392-404.
160. Williams, M., A. Mildner, and S. Yona, *Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes*. *Immunity*, 2018. **49**(4): p. 595-613.
161. Taylor, P.R. and S. Gordon, *Monocyte heterogeneity and innate immunity*. *Immunity*, 2003. **19**(1): p. 2-4.
162. Olingy, C.E., H.Q. Dinh, and C.C. Hedrick, *Monocyte heterogeneity and functions in cancer*. *J leukoc biol*, 2019. **106**(2): p. 309-322.
163. Ziegler-Heitbrock, L., et al., *Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood*. *Blood*, 2010. **116**(16): p. e74-80.
164. Ziegler-Heitbrock, L., *The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation*. *J leukoc biol*, 2007. **81**(3): p. 584-92.
165. Olingy, C.E., et al., *Non-classical monocytes are biased progenitors of wound healing macrophages during soft tissue injury*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 447.
166. Thomas, G., et al., *Nonclassical patrolling monocyte function in the vasculature*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015. **35**(6): p. 1306-1316.
167. Bharat, A., A.C. McQuattie-Pimentel, and G.R.S. Budinger, *Non-classical monocytes in tissue injury and cancer*. *Oncotarget*, 2017. **8**(63): p. 106171-106172.
168. Passlick, B., D. Flieger, and H.W. Ziegler-Heitbrock, *Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood*. *Blood*, 1989. **74**(7): p. 2527-34.
169. Wong, K.L., et al., *Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets*. *Blood*, 2011. **118**(5): p. e16-e31.
170. Gómez-Olarte, S., et al., *Intermediate Monocytes and Cytokine Production Associated With Severe Forms of Chagas Disease*. *Front Immunol*, 2019. **10**(1671).
171. Wildgruber, M., et al., *The "Intermediate" CD14(++)CD16(+) monocyte subset increases in severe peripheral artery disease in humans*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 39483-39483.

172. Schauer, D., et al., *Chemotherapy of colorectal liver metastases induces a rapid rise in intermediate blood monocytes which predicts treatment response*. *Oncoimmunol*, 2016. **5**(6): p. e1160185-e1160185.
173. Zhao, Y., W. Zou, and J. Du, *The origins and homeostasis of monocytes and tissue-resident macrophages in physiological situation*. *J Cell Physiol*, 2018. **233**(10): p. 6425-6439.
174. Wynn, T.A., A. Chawla, and J.W. Pollard, *Macrophage biology in development, homeostasis and disease*. *Nat*, 2013. **496**(7446): p. 445-55.
175. Gordon, S. and A. Plüddemann, *Tissue macrophages: heterogeneity and functions*. *BMC Biol*, 2017. **15**(1): p. 53-53.
176. Epelman, S., K.J. Lavine, and G.J. Randolph, *Origin and functions of tissue macrophages*. *Immun*, 2014. **41**(1): p. 21-35.
177. Hume, D.A., et al., *The mononuclear phagocyte system revisited*. *J leukoc Biol*, 2002. **72**(4): p. 621-7.
178. Kierdorf, K., et al., *Development and function of tissue resident macrophages in mice*. *Semin Immunol*, 2015. **27**(6): p. 369-378.
179. Gordon, S. and L. Martinez-Pomares, *Physiological roles of macrophages*. *Pflugers Arch*, 2017. **469**(3-4): p. 365-374.
180. Lee, H.W., et al., *Recruitment of monocytes/macrophages in different tumor microenvironments*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1835**(2): p. 170-9.
181. Jackaman, C., et al., *Aging and cancer: The role of macrophages and neutrophils*. *Ageing Res Rev*, 2017. **36**: p. 105-116.
182. Qian, B.-Z. and J.W. Pollard, *Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis*. *Cell*, 2010. **141**(1): p. 39-51.
183. Galdiero, M.R., G. Marone, and A. Mantovani, *Cancer Inflammation and Cytokines*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018. **10**(8).
184. Solano-Gálvez, S.G., et al., *Human Dendritic Cells: Ontogeny and Their Subsets in Health and Disease*. *Med scienc (Basel, Switzerland)*, 2018. **6**(4): p. 88.
185. Maciel, T.T., I.C. Moura, and O. Hermine, *The role of mast cells in cancers*. *F1000Prime Rep*, 2015. **7**: p. 09.
186. Caza, T. and S. Landas, *Functional and Phenotypic Plasticity of CD4(+) T Cell Subsets*. *Biomed Res Int*, 2015. **521957**(10): p. 25.
187. Du, J.W., et al., *Interleukin-17, produced by lymphocytes, promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of breast cancer*. *Mol Med Rep*, 2012. **6**(5): p. 1099-102.
188. Delves P.J., R.I.M., *The immune system. First of tow parts*. *N. Engl. J. Med.*, 2000: p. 343, 37-49.
189. He, Q.F., et al., *CD8+ T-cell exhaustion in cancer: mechanisms and new area for cancer immunotherapy*. *Brief Funct Genomics*, 2019. **18**(2): p. 99-106.
190. Yu, Y., et al., *Recent advances in CD8(+) regulatory T cell research*. *Oncol Lett*, 2018. **15**(6): p. 8187-8194.
191. Najafian, N., et al., *Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model*. *J Clin Invest*, 2003. **112**(7): p. 1037-1048.
192. Abel, A.M., et al., *Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization*. *Front Immunol*, 2018. **9**(1869).
193. Wu, Y., Z. Tian, and H. Wei, *Developmental and Functional Control of Natural Killer Cells by Cytokines*. *Front Immunol*, 2017. **8**(930).
194. Mauri, C. and A. Bosma, *Immune Regulatory Function of B Cells*. *Annu Rev Immunol*, 2012. **30**(1): p. 221-241.
195. Kurosaki, T., K. Kometani, and W. Ise, *Memory B cells*. *Nat Rev Immunol*, 2015. **15**(3): p. 149-159.
196. Shen, M., et al., *Positive and negative functions of B lymphocytes in tumors*. *Oncotarget*, 2016. **7**(34): p. 55828-55839.
197. Rossetti, R.A.M., et al., *B lymphocytes can be activated to act as antigen presenting cells to promote anti-tumor responses*. *PLOS ONE*, 2018. **13**(7).

198. Dushyanthen, S., et al., *Relevance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer*. BMC Med, 2015. **13**(202): p. 015-0431.
199. Butcher, E.C., *Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity*. Cell, 1991. **67**(6): p. 1033-6.
200. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-689.
201. Ivetic, A., H.L. Hoskins Green, and S.J. Hart, *L-selectin: A Major Regulator of Leukocyte Adhesion, Migration and Signaling*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1068-1068.
202. Miyasaka, M., *Selectins (CD62-E/L/P)*, in *Encyclopedia of Immunology (Second Edition)*, P.J. Delves, Editor. 1998, Elsevier: Oxford. p. 2158-2161.
203. Springer, T.A., *Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration*. Annu Rev Physiol, 1995. **57**: p. 827-72.
204. Pick, R., D. Brechtefeld, and B. Walzog, *Intraluminal crawling versus interstitial neutrophil migration during inflammation*. Mol Immunol, 2013. **55**(1): p. 70-75.
205. Woodfin, A., M.-B. Voisin, and S. Nourshargh, *Recent developments and complexities in neutrophil transmigration*. Curr Opin Hematol, 2010. **17**(1): p. 9-17.
206. Vestweber, D., *Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium*. Immunol Rev, 2007. **218**(1): p. 178-196.
207. Yang, L., et al., *ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF- $\alpha$ -activated vascular endothelium under flow*. Blood, 2005. **106**(2): p. 584-592.
208. Carman, C.V. and T.A. Springer, *Trans-cellular migration: cell-cell contacts get intimate*. Curr Opin Cell Biol, 2008. **20**(5): p. 533-540.
209. Mamdouh, Z., A. Mikhailov, and W.A. Muller, *Transcellular migration of leukocytes is mediated by the endothelial lateral border recycling compartment*. J Exp Med, 2009. **206**(12): p. 2795-2808.
210. Hordijk, P.L., *Endothelial signalling events during leukocyte transmigration*. FEBS J, 2006. **273**(19): p. 4408-4415.
211. Nourshargh, S. and R. Alon, *Leukocyte Migration into Inflamed Tissues*. Immunity, 2014. **41**(5): p. 694-707.
212. Semple, J.W., J.E. Italiano, Jr., and J. Freedman, *Platelets and the immune continuum*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(4): p. 264-74.
213. Jenne, C.N., R. Urrutia, and P. Kubes, *Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity*. Int J Lab Hematol, 2013. **35**(3): p. 254-61.
214. Kral, J.B., et al., *Platelet Interaction with Innate Immune Cells*. Transfus Med Hemother, 2016. **43**(2): p. 78-88.
215. Zarbock, A., R.K. Polanowska-Grabowska, and K. Ley, *Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation*. Blood Rev, 2007. **21**(2): p. 99-111.
216. Rendu, F. and B. Brohard-Bohn, *The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions*. Platelets, 2001. **12**(5): p. 261-73.
217. Longatto Filho, A., J.M. Lopes, and F.C. Schmitt, *Angiogenesis and Breast Cancer*. J Oncol, 2010. **2010**: p. 576384.
218. Zuchtriegel, G., et al., *Platelets Guide Leukocytes to Their Sites of Extravasation*. PLoS Biol, 2016. **14**(5).
219. Pekarek, L.A., et al., *Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes*. J Exp Med, 1995. **181**(1): p. 435-40.
220. McDonald, B., et al., *Platelets and neutrophil extracellular traps collaborate to promote intravascular coagulation during sepsis in mice*. Blood, 2017. **129**(10): p. 1357-1367.
221. Weigand, A., et al., *[Development of an Innovative Cell Isolation Method for the Investigation of Breast Cancer Pathogenesis and Angiogenesis for Experimental In Vitro And In Vivo Assays]*. Handchirurgie, Mikrochirurgie, plastische Chirurgie: Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft fur Handchirurgie: Organ der Deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft fur Mikrochirurgie der Peripheren Nerven und Gefasse: Organ der V.. 2017. **49**(2): p. 111-122.

222. Kerr, B.A., et al., *Comparison of tumor and microenvironment secretomes in plasma and in platelets during prostate cancer growth in a xenograft model*. Neoplasia (New York, N.Y.), 2010. **12**(5): p. 388-396.
223. Stoiber, D. and A. Assinger, *Platelet-Leukocyte Interplay in Cancer Development and Progression*. Cells, 2020. **9**(4).
224. Uppal, A., et al., *Investigation of the essential role of platelet-tumor cell interactions in metastasis progression using an agent-based model*. Theor Biol Med Model, 2014. **11**(17): p. 1742-4682.
225. Asadzadeh, Z., et al., *The paradox of Th17 cell functions in tumor immunity*. Cell Immunol, 2017. **322**: p. 15-25.
226. Tran, R., et al., *Biomechanics of haemostasis and thrombosis in health and disease: from the macro- to molecular scale*. J Cell Mol Med, 2013. **17**(5): p. 579-596.
227. Ahn, K.C., et al., *Preferential binding of platelets to monocytes over neutrophils under flow*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **329**(1): p. 345-55.
228. Ruggeri, Z.M., *Role of von Willebrand factor in platelet thrombus formation*. Ann Med, 2000. **1**: p. 2-9.
229. Freedman, J.E., *Molecular regulation of platelet-dependent thrombosis*. Circulation, 2005. **112**(17): p. 2725-34.
230. Furie, B. and B.C. Furie, *Mechanisms of Thrombus Formation*. New Engl J Med, 2008. **359**(9): p. 938-949.
231. Bendas, G. and L. Borsig, *Cancer Cell Adhesion and Metastasis: Selectins, Integrins, and the Inhibitory Potential of Heparins*. Int J Cell Biol, 2012. **2012**: p. 676731.
232. Casu, B., A. Naggi, and G. Torri, *Heparin-derived heparan sulfate mimics to modulate heparan sulfate-protein interaction in inflammation and cancer*. Matrix Biol, 2010. **29**(6): p. 442-452.
233. Claesson-Welsh, L., *Vascular permeability - The essentials*. UPS J Med Sci, 2015. **120**: p. 135-143.
234. Aghajanian, A., et al., *Endothelial cell junctions and the regulation of vascular permeability and leukocyte transmigration*. J Thromb Haemost, 2008. **6**(9): p. 1453-1460.
235. Kumar, P., et al., *Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation*. Exp rev mol med, 2009. **11**: p. e19-e19.
236. Fu, B.M., *Tumor Metastasis in the Microcirculation*, in *Molecular, Cellular, and Tissue Engineering of the Vascular System*, B.M. Fu and N.T. Wright, Editors. 2018, Springer International Publishing: Cham. p. 201-218.
237. Lamalice, L., F. Le Boeuf, and J. Huot, *Endothelial cell migration during angiogenesis*. Circ Res, 2007. **100**(6): p. 782-94.
238. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis*. Nat, 2011. **473**(7347): p. 298-307.
239. Klagsbrun, M. and J. Folkman, *Angiogenesis*, in *Peptide Growth Factors and Their Receptors II*, M.B. Sporn and A.B. Roberts, Editors. 1990, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 549-586.
240. Karamysheva, A.F., *Mechanisms of angiogenesis*. Biochemistry, 2008. **73**(7): p. 751-62.
241. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis*. Nat, 1997. **386**(6626): p. 671-4.
242. Demene, C., et al., *3-D Longitudinal Imaging of Tumor Angiogenesis in Mice in Vivo Using Ultrafast Doppler Tomography*. Ultrasound Med Biol, 2019. **45**(5): p. 1284-1296.
243. Annese, T., et al., *Erythropoietin in tumor angiogenesis*. Exp Cell Res, 2019. **374**(2): p. 266-273.
244. Arnold, F. and D.C. West, *Angiogenesis in wound healing*. Pharmacol Ther, 1991. **52**(3): p. 407-422.
245. Folkman, J. and Y. Shing, *Control of Angiogenesis by Heparin and Other Sulfated Polysaccharides*, in *Heparin and Related Polysaccharides*, D.A. Lane, I. Björk, and U. Lindahl, Editors. 1992, Springer US: Boston, MA. p. 355-364.

246. Plendl, J., *Angiogenesis and Vascular Regression in the Ovary* \*. Anatomia, histologia, embryologia, 2000. **29**: p. 257-66.
247. Reynolds, L.P., A.T. Grazul-Bilska, and D.A. Redmer, *Angiogenesis in the female reproductive organs: pathological implications*. Int J Exp Pathol, 2002. **83**(4): p. 151-164.
248. Jaffe, R.B., *Importance of angiogenesis in reproductive physiology*. Semin Perinatol, 2000. **24**(1): p. 79-81.
249. Nishida, N., et al., *Angiogenesis in cancer*. Vasc health risk manag, 2006. **2**(3): p. 213-219.
250. Elshabrawy, H.A., et al., *The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis*. Angiogenesis, 2015. **18**(4): p. 433-48.
251. D'Amore, P.A. and M. Klagsbrun, *Angiogenesis*, in *The Pathobiology of Neoplasia*, A.E. Sirica, Editor. 1989, Springer US: Boston, MA. p. 513-531.
252. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases*. Nat, 2000. **407**(6801): p. 249-57.
253. Lugano, R., M. Ramachandran, and A. Dimberg, *Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities*. Cell Mol Life Sci, 2019.
254. Tan, T.T. and L.M. Coussens, *Humoral immunity, inflammation and cancer*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(2): p. 209-16.
255. Rahma, O.E. and F.S. Hodi, *The Intersection between Tumor Angiogenesis and Immune Suppression*. Clin Cancer Res, 2019. **25**(18): p. 5449-5457.
256. Lin, L., et al., *CCL18 from tumor-associated macrophages promotes angiogenesis in breast cancer*. Oncotarget, 2015. **6**(33): p. 34758-73.
257. Hashizume, H., et al., *Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness*. Am J Pathol, 2000. **156**(4): p. 1363-80.
258. Tarbell, J.M. and L.M. Cancel, *The glycocalyx and its significance in human medicine*. J Intern Med, 2016. **280**(1): p. 97-113.
259. Martinez-Seara Monne, H., et al., *Structure of Glycocalyx*. Biophys J, 2013. **104**(2): p. 251a.
260. Pries, A.R., T.W. Secomb, and P. Gaehtgens, *The endothelial surface layer*. Pflügers Archiv, 2000. **440**(5): p. 653-666.
261. Reitsma, S., et al., *The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization*. Pflugers Arch, 2007. **454**(3): p. 345-59.
262. Kang, H., et al., *Cancer Cell Glycocalyx and Its Significance in Cancer Progression*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(9): p. 2484.
263. Kuo, J.C.-H., et al., *Physical biology of the cancer cell glycocalyx*. Nat Phys, 2018. **14**(7): p. 658-669.
264. Megens, R.T., et al., *Two-photon microscopy of vital murine elastic and muscular arteries. Combined structural and functional imaging with subcellular resolution*. J Vasc Res, 2007. **44**(2): p. 87-98.
265. Curry, F.-R.E., *The Molecular Structure of the Endothelial Glycocalyx Layer (EGL) and Surface Layers (ESL) Modulation of Transvascular Exchange*, in *Molecular, Cellular, and Tissue Engineering of the Vascular System*, B.M. Fu and N.T. Wright, Editors. 2018, Springer International Publishing: Cham. p. 29-49.
266. van Golen, R.F., et al., *The Mechanisms and Physiological Relevance of Glycocalyx Degradation in Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury*. Antioxid Redox Signal, 2013. **21**(7): p. 1098-1118.
267. Nieuwdorp, M., et al., *The endothelial glycocalyx: a potential barrier between health and vascular disease*. Curr Opin Lipidol, 2005. **16**(5): p. 507-11.
268. Ihrcke, N.S., et al., *Role of heparan sulfate in immune system-blood vessel interactions*. Immunol Today, 1993. **14**(10): p. 500-5.
269. Oohira, A., T.N. Wight, and P. Bornstein, *Sulfated proteoglycans synthesized by vascular endothelial cells in culture*. J Biol Chem, 1983. **258**(3): p. 2014-21.
270. Culty, M., et al., *The hyaluronate receptor is a member of the CD44 (H-CAM) family of cell surface glycoproteins*. J Cell Biol, 1990. **111**(6 Pt 1): p. 2765-74.
271. Narayanan, S., *Sialic acid as a tumor marker*. Ann Clin Lab Sci, 1994. **24**(4): p. 376-84.

272. Betteridge, K.B., et al., *Sialic acids regulate microvessel permeability, revealed by novel in vivo studies of endothelial glycocalyx structure and function*. J physiol, 2017. **595**(15): p. 5015-5035.
273. Becker, B.F., D. Chappell, and M. Jacob, *Endothelial glycocalyx and coronary vascular permeability: the fringe benefit*. Basic Res Cardiol, 2010. **105**(6): p. 687-701.
274. Kolářová, H., et al., *Modulation of Endothelial Glycocalyx Structure under Inflammatory Conditions*. Mediators Inflamm, 2014. **2014**: p. 694312.
275. Bode, L., et al., *Heparan sulfate depletion amplifies TNF-alpha-induced protein leakage in an in vitro model of protein-losing enteropathy*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005. **288**(5): p. 16.
276. Tarbell, J.M. and M.Y. Pahakis, *Mechanotransduction and the glycocalyx*. J Intern Med, 2006. **259**(4): p. 339-50.
277. Weinbaum, S., J.M. Tarbell, and E.R. Damiano, *The structure and function of the endothelial glycocalyx layer*. Annu Rev Biomed Eng, 2007. **9**: p. 121-67.
278. Curry, F.E. and R.H. Adamson, *Endothelial glycocalyx: permeability barrier and mechanosensor*. Ann Biomed Eng, 2012. **40**(4): p. 828-39.
279. Mulivor, A.W. and H.H. Lipowsky, *Role of glycocalyx in leukocyte-endothelial cell adhesion*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**(4): p. H1282-H1291.
280. Nieuwdorp, M., et al., *Loss of endothelial glycocalyx during acute hyperglycemia coincides with endothelial dysfunction and coagulation activation in vivo*. Diabetes, 2006. **55**(2): p. 480-6.
281. Vink, H. and B.R. Duling, *Capillary endothelial surface layer selectively reduces plasma solute distribution volume*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **278**(1).
282. Rehm, M., et al., *Shedding of the endothelial glycocalyx in patients undergoing major vascular surgery with global and regional ischemia*. Circulation, 2007. **116**(17): p. 1896-906.
283. Rehm, M., et al., *Endothelial glycocalyx as an additional barrier determining extravasation of 6% hydroxyethyl starch or 5% albumin solutions in the coronary vascular bed*. Anesthesiol, 2004. **100**(5): p. 1211-23.
284. Singh, A., et al., *Glomerular endothelial glycocalyx constitutes a barrier to protein permeability*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(11): p. 2885-93.
285. Pahakis, M.Y., et al., *The role of endothelial glycocalyx components in mechanotransduction of fluid shear stress*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **355**(1): p. 228-233.
286. Chappell, D., et al., *GLYCOCALYX PROTECTION REDUCES LEUKOCYTE ADHESION AFTER ISCHEMIA/REPERFUSION*. Shock, 2010. **34**(2): p. 133-139.
287. Gao, L. and H.H. Lipowsky, *Composition of the endothelial glycocalyx and its relation to its thickness and diffusion of small solutes*. Microvasc Res, 2010. **80**(3): p. 394-401.
288. Ait-Oufella, H., et al., *The endothelium: physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis*. Intensive Care Med, 2010. **36**(8): p. 1286-98.
289. Weinbaum, S., et al., *Mechanotransduction and flow across the endothelial glycocalyx*. P Natl A Sci, 2003. **100**(13): p. 7988-7995.
290. Wang, G., et al., *Shear Stress Regulation of Endothelial Glycocalyx Structure Is Determined by Glucobiosynthesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2020. **40**(2): p. 350-364.
291. Schött, U., et al., *The endothelial glycocalyx and its disruption, protection and regeneration: a narrative review*. Scand J Trauma, Resusc Emerg Med, 2016. **24**(1): p. 48.
292. Sieve, I., A.K. Munster-Kuhnel, and D. Hilfiker-Kleiner, *Regulation and function of endothelial glycocalyx layer in vascular diseases*. Vascul Pharmacol, 2018. **100**: p. 26-33.
293. Abassi, Z., Z. Armaly, and S.N. Heyman, *Glycocalyx Degradation in Ischemia-Reperfusion Injury*. Am J Pathol, 2020. **190**(4): p. 752-767.
294. Ushiyama, A., H. Kataoka, and T. Iijima, *Glycocalyx and its involvement in clinical pathophysiologicals*. J Intensive Care, 2016. **4**(1): p. 016-0182.
295. Salmon, A.H.J., et al., *Loss of the endothelial glycocalyx links albuminuria and vascular dysfunction*. J Am Soc Nephrol : JASN, 2012. **23**(8): p. 1339-1350.

296. Salmon, A.H. and S.C. Satchell, *Endothelial glycocalyx dysfunction in disease: albuminuria and increased microvascular permeability*. J Pathol, 2012. **226**(4): p. 562-574.
297. Johansson, P.I., et al., *A High Admission Syndecan-1 Level, A Marker of Endothelial Glycocalyx Degradation, Is Associated With Inflammation, Protein C Depletion, Fibrinolysis, and Increased Mortality in Trauma Patients*. Annals Surg, 2011. **254**(2): p. 194-200.
298. Nelson, A., I. Berkestedt, and M. Bodelsson, *Circulating glycosaminoglycan species in septic shock*. Acta Anaesthesiol Scand, 2014. **58**(1): p. 36-43.
299. Becker, B.F., et al., *Degradation of the endothelial glycocalyx in clinical settings: searching for the sheddases*. Br J Clin Pharmacol, 2015. **80**(3): p. 389-402.
300. Yilmaz, O., et al., *The role of endothelial glycocalyx in health and disease*. Clin Kidney J, 2019. **12**(5): p. 611-619.
301. Cao, R.-N., et al., *Endothelial glycocalyx as a potential therapeutic target in organ injuries*. Chin med J, 2019. **132**(8): p. 963-975.
302. Wang, J., A. Wu, and Y. Wu, *Endothelial Glycocalyx Layer: A Possible Therapeutic Target for Acute Lung Injury during Lung Resection*. Biomed Res Int, 2017. **2017**: p. 5969657-5969657.
303. Chappell, D., et al., *Hydrocortisone preserves the vascular barrier by protecting the endothelial glycocalyx*. Anesthesiol, 2007. **107**(5): p. 776-84.
304. Broekhuizen, L.N., et al., *Effect of sulodexide on endothelial glycocalyx and vascular permeability in patients with type 2 diabetes mellitus*. Diabetologia, 2010. **53**(12): p. 2646-2655.
305. Chappell, D., et al., *Protection of glycocalyx decreases platelet adhesion after ischaemia/reperfusion: an animal study*. Eur J Anaesthesiol, 2014. **31**(9): p. 474-81.
306. Chappell, D., et al., *Glycocalyx protection reduces leukocyte adhesion after ischemia/reperfusion*. Shock, 2010. **34**(2): p. 133-9.
307. Becker, B.F., et al., *Therapeutic strategies targeting the endothelial glycocalyx: acute deficits, but great potential*. Cardiovasc Res, 2010. **87**(2): p. 300-10.
308. Zhang, C., et al., *Modified heparins inhibit integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 mediated adhesion of melanoma cells to platelets in vitro and in vivo*. Int J Cancer, 2009. **125**(9): p. 2058-2065.
309. Mitchell, M.J. and M.R. King, *Physical biology in cancer. 3. The role of cell glycocalyx in vascular transport of circulating tumor cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2014. **306**(2): p. 16.
310. Rai, S., et al., *Loss of the endothelial glycocalyx is associated with increased E-selectin mediated adhesion of lung tumour cells to the brain microvascular endothelium*. J Exp Clin Cancer Res, 2015. **34**(1): p. 105.
311. Cai, B., et al., *Adhesion of malignant mammary tumor cells MDA-MB-231 to microvessel wall increases microvascular permeability via degradation of endothelial surface glycocalyx*. J Appl Physiol, 2012. **113**(7): p. 1141-1153.
312. Heyman, B. and Y. Yang, *Mechanisms of heparanase inhibitors in cancer therapy*. Exp Hematol, 2016. **44**(11): p. 1002-1012.
313. McKenzie, E.A., *Heparanase: a target for drug discovery in cancer and inflammation*. Br J Pharmacol, 2007. **151**(1): p. 1-14.
314. Cohen, I., et al., *Heparanase promotes growth, angiogenesis and survival of primary breast tumors*. Int J Cancer, 2006. **118**(7): p. 1609-1617.
315. Masola, V., et al., *Role of heparanase in tumor progression: Molecular aspects and therapeutic options*. Semin Cancer Biol, 2020. **62**: p. 86-98.
316. Paszek, M.J., et al., *The cancer glycocalyx mechanically primes integrin-mediated growth and survival*. Nat, 2014. **511**(7509): p. 319-25.
317. Woods, E.C., et al., *A bulky glycocalyx fosters metastasis formation by promoting G1 cell cycle progression*. Elife, 2017. **21**(6): p. 25752.
318. Horm, T.M. and J.A. Schroeder, *MUC1 and metastatic cancer: expression, function and therapeutic targeting*. Cell Adh Migr, 2013. **7**(2): p. 187-98.
319. Yang, Y., et al., *Soluble syndecan-1 promotes growth of myeloma tumors in vivo*. Blood, 2002. **100**(2): p. 610-7.

320. Nakatsura, T., et al., *Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **306**(1): p. 16-25.
321. Oiseth, S.J. and M.S. Aziz, *Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead*. J Cancer Metastasis Treat, 2017. **3**: p. 250-261.
322. Gonzalez, H., C. Hagerling, and Z. Werb, *Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression*. Genes Dev, 2018. **32**(19-20): p. 1267-1284.
323. Fu, B.M., *Tumor Metastasis in the Microcirculation*. Adv Exp Med Biol, 2018: p. 96445-4\_11.
324. Jameson, D.M., J.C. Croney, and P.D. Moens, *Fluorescence: basic concepts, practical aspects, and some anecdotes*. Methods Enzymol, 2003. **360**: p. 1-43.
325. Ishikawa-Ankerhold, H.C., R. Ankerhold, and G.P. Drummen, *Advanced fluorescence microscopy techniques--FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM*. Molecules, 2012. **17**(4): p. 4047-132.
326. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. Nat Methods, 2012. **9**(7): p. 676-82.
327. Drobizhev, M., et al., *Two-photon absorption properties of fluorescent proteins*. Nat Methods, 2011. **8**(5): p. 393-9.
328. Svoboda, K. and R. Yasuda, *Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience*. Neuron, 2006. **50**(6): p. 823-39.
329. Grzybowski, A. and K. Pietrzak, *Maria Goepfert-Mayer (1906–1972): two-photon effect on dermatology*. Clin Dermatol, 2013. **31**(2): p. 221-5.
330. Denk, W., J.H. Strickler, and W.W. Webb, *Two-photon laser scanning fluorescence microscopy*. Science, 1990. **248**(4951): p. 73-6.
331. Helmchen, F. and W. Denk, *Deep tissue two-photon microscopy*. Nat Methods, 2005. **2**(12): p. 932-40.
332. Zipfel, W.R., et al., *Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation*. Proc Natl Acad Sci, 2003. **100**(12): p. 7075-7080.
333. Hart, C.Y.T., J. John C. Burnett, and M.M. Redfield, *Effects of avertin versus xylazine-ketamine anesthesia on cardiac function in normal mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **281**(5): p. H1938-H1945.
334. Erhardt, W., et al., *A comparative study with various anesthetics in mice (pentobarbitone, ketamine-xylazine, carfentanyl-etomidate)*. Res Exp Med, 1984. **184**(3): p. 159-69.
335. Heard, D.J., *Principles and techniques of anesthesia and analgesia for exotic practice*. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 1993. **23**(6): p. 1301-27.
336. Daley, J.M., et al., *Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice*. J leukoc biol, 2008. **83**(1): p. 64-70.
337. Dvorak, H.F., et al., *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis*. Am J Pathol, 1995. **146**(5): p. 1029-39.
338. Coussens, L.M. and J.W. Pollard, *Leukocytes in mammary development and cancer*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(3).
339. Lal, I., K. Dittus, and C.E. Holmes, *Platelets, coagulation and fibrinolysis in breast cancer progression*. Breast Cancer Res, 2013. **15**(4): p. 207.
340. Shi, C. and E.G. Pamer, *Monocyte recruitment during infection and inflammation*. Nature Rev Immunol, 2011. **11**(11): p. 762-774.
341. Gooden, M.J.M., et al., *The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis*. Br J Cancer, 2011. **105**(1): p. 93-103.
342. Ruffell, B., et al., *Lymphocytes in cancer development: Polarization towards pro-tumor immunity*. Cytokine & Growth Factor Rev, 2010. **21**(1): p. 3-10.
343. Liccardi, G. and F. Pentimalli, *Cancer, immunity and inflammation. Report from the CDD Cambridge Conferences 2018 and 2019*. Cell Death Dis, 2019. **10**(11): p. 798.
344. Shalapour, S. and M. Karin, *Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil*. J Clin Invest, 2015. **125**(9): p. 3347-55.

345. Zhu, F., et al., *Humanising the mouse genome piece by piece*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 1845.
346. Moriwaki, T., et al., *Transchromosomal technology for genomically humanized animals*. Exp Cell Res, 2020. **390**(2): p. 111914.
347. Teng, M.W.L., et al., *From mice to humans: developments in cancer immunoediting*. J Clin Invest, 2015. **125**(9): p. 3338-3346.
348. Bockamp, E., et al., *Of mice and models: improved animal models for biomedical research*. Physiol Genomics, 2002. **11**(3): p. 115-132.
349. Shultz, L.D., F. Ishikawa, and D.L. Greiner, *Humanized mice in translational biomedical research*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(2): p. 118-130.
350. Moolgavkar, S.H. and A.G. Knudson, *Mutation and Cancer: A Model for Human Carcinogenesis*. JNCI: J Natl Cancer Inst, 1981. **66**(6): p. 1037-1052.
351. Ng, L.G., et al., *Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites*. PLoS Pathog, 2008. **4**(11): p. 28.
352. Roediger, B., et al., *Visualizing dendritic cell migration within the skin*. Histochem Cell Biol, 2008. **130**(6): p. 1131-46.
353. Li, J.L., et al., *Intravital multiphoton imaging of immune responses in the mouse ear skin*. Nat Protoc, 2012. **7**(2): p. 221-234.
354. Ellenbroek, S.I.J. and J. van Rheenen, *Imaging hallmarks of cancer in living mice*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(6): p. 406-418.
355. Kato, M., et al., *Elevated plasma levels of interleukin-6, interleukin-8, and granulocyte colony-stimulating factor during and after major abdominal surgery*. J Clin Anesth, 1997. **9**(4): p. 293-8.
356. Cruickshank, A.M., et al., *Response of serum interleukin-6 in patients undergoing elective surgery of varying severity*. Clin Sci, 1990. **79**(2): p. 161-5.
357. Rock, K.L., et al., *The Sterile Inflammatory Response*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**(1): p. 321-342.
358. Lechner, M.G., et al., *Immunogenicity of murine solid tumor models as a defining feature of in vivo behavior and response to immunotherapy*. J Immunother, 2013. **36**(9): p. 477-89.
359. Magidson, V. and A. Khodjakov, *Circumventing photodamage in live-cell microscopy*. Methods in cell biol, 2013. **114**: p. 545-560.
360. Icha, J., et al., *Phototoxicity in live fluorescence microscopy, and how to avoid it*. Bioessays, 2017. **39**(8): p. 201700003.
361. Bombonati, A. and D.C. Sgroi, *The molecular pathology of breast cancer progression*. J Pathol, 2011. **223**(2): p. 308-318.
362. DeNardo, D.G. and L.M. Coussens, *Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression*. Breast Cancer Res, 2007. **9**(4): p. 212.
363. Daniel, C., et al., *Heparinase selectively sheds heparan sulphate from the endothelial glycocalyx*. Biol Chem, 2008. **389**(1): p. 79-82.
364. Zeng, Y., et al., *The Structural Stability of the Endothelial Glycocalyx after Enzymatic Removal of Glycosaminoglycans*. PLOS ONE, 2012. **7**(8): p. e43168.
365. Huxley, V.H. and D.A. Williams, *Role of a glycocalyx on coronary arteriole permeability to proteins: evidence from enzyme treatments*. American Journal of Physiology-Heart and Circ Physiol, 2000. **278**(4): p. H1177-H1185.
366. Quayle, L.A., et al., *Anti-angiogenic drugs: direct anti-cancer agents with mitochondrial mechanisms of action*. Oncotarget, 2017. **8**(51): p. 88670-88688.
367. Li, Y., et al., *[Effects of cisplatin combined with heparanase inhibitor on proliferation and invasion of human nasopharyngeal carcinoma cells]*. Yao Xue Bao, 2013. **48**(4): p. 609-14.
368. Li, Y., et al., *Suppression of endoplasmic reticulum stress-induced invasion and migration of breast cancer cells through the downregulation of heparanase*. Int J Mol Med, 2013. **31**(5): p. 1234-42.

369. Balkwill, F. and A. Mantovani, *Inflammation and cancer: back to Virchow?* The Lancet, 2001. **357**(9255): p. 539-545.
370. Diakos, C.I., et al., *Cancer-related inflammation and treatment effectiveness.* The Lancet Oncol, 2014. **15**(11): p. e493-e503.
371. Lippitz, B.E., *Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review.* The Lancet Oncol, 2013. **14**(6): p. e218-e228.
372. Nie, W., et al., *Tumor-promoting effect of IL-23 in mammary cancer mediated by infiltration of M2 macrophages and neutrophils in tumor microenvironment.* Biochem Biophys Res Commun, 2017. **482**(4): p. 1400-1406.
373. Singh, R., M.K. Mishra, and H. Aggarwal, *Inflammation, Immunity, and Cancer.* Mediators Inflamm, 2017. **2017**: p. 6027305.
374. Luo, H., et al., *Systemic Inflammation Biomarkers Predict Survival in Patients of Early Stage Non-Small Cell Lung Cancer Treated With Stereotactic Ablative Radiotherapy - A Single Center Experience.* J Cancer, 2018. **9**(1): p. 182-188.
375. Madera, L., et al., *4T1 Murine Mammary Carcinoma Cells Enhance Macrophage-Mediated Innate Inflammatory Responses.* PLOS ONE, 2015. **10**(7): p. e0133385.
376. Rodrigues Viana, C.T., et al., *Differential Contribution of Acute and Chronic Inflammation to the Development of Murine Mammary 4T1 Tumors.* PLOS ONE, 2015. **10**(7): p. e0130809.
377. Mehrara, E., et al., *Specific growth rate versus doubling time for quantitative characterization of tumor growth rate.* Cancer Res, 2007. **67**(8): p. 3970-5.
378. McAllister, S.S. and R.A. Weinberg, *The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis.* Nat Cell Biol, 2014. **16**(8): p. 717-727.
379. Senger, D.R., et al., *Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid.* Science, 1983. **219**(4587): p. 983-5.
380. Fu, B.M. and Y. Liu, *Microvascular Transport and Tumor Cell Adhesion in the Microcirculation.* Ann Biomed Eng, 2012. **40**(11): p. 2442-2455.
381. Virchow, R., *Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI--Atheromatous affection of arteries. 1858.* Nutr Rev, 1989. **47**(1): p. 23-5.
382. Talmadge, J.E., M. Donkor, and E. Scholar, *Inflammatory cell infiltration of tumors: Jekyll or Hyde.* Cancer Metastasis Rev, 2007. **26**(3-4): p. 373-400.
383. Gentles, A.J., et al., *The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers.* Nat Med, 2015. **21**(8): p. 938-945.
384. Atzpodien, J. and M. Reitz, *Peripheral Blood Neutrophils as Independent Immunologic Predictor of Response and Long-Term Survival upon Immunotherapy in Metastatic Renal-Cell Carcinoma.* Cancer Biother Radiopharm, 2008. **23**(1): p. 129-134.
385. Schmidt, H., et al., *Elevated neutrophil and monocyte counts in peripheral blood are associated with poor survival in patients with metastatic melanoma: a prognostic model.* Br J Cancer, 2005. **93**(3): p. 273-278.
386. Cassatella, M.A., et al., *Biological Roles of Neutrophil-Derived Granule Proteins and Cytokines.* Trends Immunol, 2019. **40**(7): p. 648-664.
387. Faurischou, M. and N. Borregaard, *Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation.* Microbes Infect, 2003. **5**(14): p. 1317-27.
388. Chavakis, E., E.Y. Choi, and T. Chavakis, *Novel aspects in the regulation of the leukocyte adhesion cascade.* Thromb Haemost, 2009. **102**(2): p. 191-7.
389. Malik, A.B., *Endothelial cell interactions and integrins.* New Horiz, 1993. **1**(1): p. 37-51.
390. Duerschmied, D., et al., *Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice.* Blood, 2013. **121**(6): p. 1008-15.
391. Rossaint, J. and A. Zarbock, *Platelets in leucocyte recruitment and function.* Cardiovasc Res, 2015. **107**(3): p. 386-395.
392. Nicolas-Avila, J.A., J.M. Adrover, and A. Hidalgo, *Neutrophils in Homeostasis, Immunity, and Cancer.* Immunity, 2017. **46**(1): p. 15-28.
393. Spahn, J.H. and D. Kreisel, *Monocytes in Sterile Inflammation: Recruitment and Functional Consequences.* Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2014. **62**(3): p. 187-194.

394. Kazma, R., et al., *Association of the innate immunity and inflammation pathway with advanced prostate cancer risk*. PLOS ONE, 2012. **7**(12): p. e51680.
395. Hoffmann, J. and S. Akira, *Innate immunity*. Curr Opin Immunol, 2013. **25**(1): p. 1-3.
396. Chaplin, D.D., *Overview of the immune response*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S3-S23.
397. Han, D., et al., *A cascade reaction network mimicking the basic functional steps of adaptive immune response*. Nat Chem, 2015. **7**(10): p. 835-841.
398. Kang, H., et al., *Cancer Cell Glycocalyx and Its Significance in Cancer Progression*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(9).
399. Uhl, B., et al., *The Endothelial Glycocalyx Controls Interactions of Quantum Dots with the Endothelium and Their Translocation across the Blood-Tissue Border*. ACS Nano, 2017. **11**(2): p. 1498-1508.
400. Dabagh, M. and A. Randles, *Role of deformable cancer cells on wall shear stress-associated-VEGF secretion by endothelium in microvasculature*. PLOS ONE, 2019. **14**(2).
401. Salven, P., et al., *High pre-treatment serum level of vascular endothelial growth factor (VEGF) is associated with poor outcome in small-cell lung cancer*. Int J Cancer, 1998. **79**(2): p. 144-146.
402. Kurebayashi, J., et al., *Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Family Members in Breast Cancer*. Jpn J Cancer Res, 1999. **90**(9): p. 977-981.
403. Hsieh, H.L. and M.M. Tsai, *Tumor progression-dependent angiogenesis in gastric cancer and its potential application*. World J Gastrointest Oncol, 2019. **11**(9): p. 686-704.
404. Petrillo, M., et al., *Hypoxia and tumor angiogenesis in the era of hepatocellular carcinoma transarterial loco-regional treatments*. Future Oncol, 2018. **14**(28): p. 2957-2967.
405. Pradeep, C.R., E.S. Sunila, and G. Kuttan, *Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in tumor angiogenesis and malignancies*. Integr Cancer Ther, 2005. **4**(4): p. 315-21.
406. Ziyad, S. and M.L. Iruela-Arispe, *Molecular mechanisms of tumor angiogenesis*. Genes Cancer, 2011. **2**(12): p. 1085-96.
407. Florian, J.A., et al., *Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells*. Circ Res, 2003. **93**(10): p. 16.
408. Holmes, D.I.R. and I. Zachary, *The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease*. Genome Biol, 2005. **6**(2): p. 209-209.
409. Jeansson, M. and B. Haraldsson, *Glomerular Size and Charge Selectivity in the Mouse after Exposure to Glucosaminoglycan-Degrading Enzymes*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(7): p. 1756.
410. Annecke, T., et al., *Sevoflurane preserves the endothelial glycocalyx against ischaemia&#x2013;reperfusion injury*. Brit J Anaesth, 2010. **104**(4): p. 414-421.
411. Dziedzic, A. and M. Bijak, *Interactions between platelets and leukocytes in pathogenesis of multiple sclerosis*. Adv Clin Exp Med, 2019. **28**(2): p. 277-285.
412. Li, Z. and S.S. Smyth, *16 - Interactions Between Platelets, Leukocytes, and the Endothelium, in Platelets (Fourth Edition)*, A.D. Michelson, Editor. 2019, Academic Press. p. 295-310.
413. Pachynski, R., J. Nazha, and H. Kohrt, *Leukocyte trafficking: Can we bring the fight to the tumor?* Discov Med, 2016. **21**(115): p. 205-12.
414. Millrud, C.R., et al., *The activation pattern of blood leukocytes in head and neck squamous cell carcinoma is correlated to survival*. PLOS ONE, 2012. **7**(12): p. 10.
415. Rossaint, J., A. Margraf, and A. Zarbock, *Role of Platelets in Leukocyte Recruitment and Resolution of Inflammation*. Front Immunol, 2018. **9**(2712).
416. Higashiyama, M., et al., *P-selectin-dependent monocyte recruitment through platelet interaction in intestinal microvessels of LPS-treated mice*. Microcirculation, 2008. **15**(5): p. 441-50.
417. Kolarova, H., et al., *Myeloperoxidase induces the priming of platelets*. Free Radic Biol Med, 2013. **61**: p. 357-369.

418. Kim, S.J. and C.N. Jenne, *Role of platelets in neutrophil extracellular trap (NET) production and tissue injury*. Semin Immunol, 2016. **28**(6): p. 546-554.
419. Pühr-Westerheide, D., et al., *Neutrophils promote venular thrombosis by shaping the rheological environment for platelet aggregation*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 019-52041.
420. Soehnlein, O., et al., *Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes*. Blood, 2008. **112**(4): p. 1461-71.
421. Soehnlein, O., et al., *Distinct functions of chemokine receptor axes in the atherogenic mobilization and recruitment of classical monocytes*. EMBO Mol Med, 2013. **5**(3): p. 471-481.
422. Soehnlein, O., L. Lindbom, and C. Weber, *Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment*. Blood, 2009. **114**(21): p. 4613-4623.
423. Soehnlein, O., et al., *Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes*. Blood, 2008. **112**: p. 1461-71.
424. Janardhan, K.S., S.K. Sandhu, and B. Singh, *Neutrophil depletion inhibits early and late monocyte/macrophage increase in lung inflammation*. Front Biosci, 2006. **11**: p. 1569-76.
425. Maugeri, N., et al., *Platelet-leukocyte deregulated interactions foster sterile inflammation and tissue damage in immune-mediated vessel diseases*. Thromb Res, 2012. **129**(3): p. 267-273.
426. Prame Kumar, K., A.J. Nicholls, and C.H.Y. Wong, *Partners in crime: neutrophils and monocytes/macrophages in inflammation and disease*. Cell Tissue Res, 2018. **371**(3): p. 551-565.
427. Peng, Z.-P., et al., *Glycolytic activation of monocytes regulates the accumulation and function of neutrophils in human hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 2020. **73**(4): p. 906-917.
428. Kreisel, D., et al., *In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(42): p. 18073-8.
429. Brühl, H., et al., *Targeting of Gr-1+, CCR2+ monocytes in collagen-induced arthritis*. Arthritis Rheum, 2007. **56**(9): p. 2975-85.
430. Laterza, C., et al., *Monocyte depletion early after stroke promotes neurogenesis from endogenous neural stem cells in adult brain*. Exp Neurol, 2017. **297**: p. 129-137.
431. Idzkowska, E., et al., *The Role of Different Monocyte Subsets in the Pathogenesis of Atherosclerosis and Acute Coronary Syndromes*. Scand J Immunol, 2015. **82**(3): p. 163-173.
432. Wong, P.Y., et al., *Functional Analysis of Tumor-Infiltrating Leukocytes in Breast Cancer Patients*. J Surg Res, 1998. **76**(1): p. 95-103.
433. Nadir, Y., *Decreasing Tumor Growth and Angiogenesis by Inhibition of Coagulation*. Semin Thromb Hemost, 2019. **45**(6): p. 622-628.
434. Andrade, S.S., et al., *Interface between breast cancer cells and the tumor microenvironment using platelet-rich plasma to promote tumor angiogenesis - influence of platelets and fibrin bundles on the behavior of breast tumor cells*. Oncotarget, 2017. **8**(10): p. 16851-16874.
435. Galdiero, M.R., et al., *Roles of neutrophils in cancer growth and progression*. J leukoc biol, 2018. **103**(3): p. 457-464.
436. Lu, Y.-J., et al., *Prognostic values of platelet-associated indicators in advanced breast cancer*. Transl Cancer Res, 2019. **8**(4): p. 1326-1335.
437. Ngambenjawong, C., H.H. Gustafson, and S.H. Pun, *Progress in tumor-associated macrophage (TAM)-targeted therapeutics*. Adv drug del rev, 2017. **114**: p. 206-221.
438. Tubiana, M., *Tumor Cell Proliferation Kinetics and Tumor Growth Rate*. Acta Oncol, 1989. **28**(1): p. 113-121.
439. Mongiat, M., et al., *Extracellular matrix: the gatekeeper of tumor angiogenesis*. Biochem Soc Trans, 2019. **47**(5): p. 1543-1555.
440. Mettlin, C., *Global breast cancer mortality statistics*. CA Cancer J Clin, 1999. **49**(3): p. 138-44.

441. van den Berg BM, Nieuwdorp M, Stroes ESG, Vink H., *Endothelial luminal glycocalyx: Protective barrier between endothelial cells and flowing blood*. Aird WC, editor. *Endothelial Biomedicine*. Cambridge U Press. 2007, Part II: Endothelial cell as input-output device, coupling. P 689-695.