

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
im Zentrum Anatomie
(komm. Direktor: Prof. Dr. J. Wilting)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Effekte ionisierender Strahlung auf
das Blut- und Lymphgefäßsystem der
Chorioallantoismembran des Hühnerembryos**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Simone Caroline Lieberknecht

aus

Karlsruhe

Göttingen 2018

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H.K. Kroemer

Referent: Prof. Dr. Jörg Wilting

Ko-Referentin: Prof. Dr. Birgit Meller

Promotor: Prof. Dr. Martin Oppermann

Datum der mündlichen Prüfung: 19.03.2019

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel
"Effekte ionisierender Strahlung auf das Blut- und Lymphgefäßsystem
der Chorioallantoismembran des Hühnerembryos"
eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen
Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	4
Abkürzungsverzeichnis.....	6
1. Einleitung	7
1.1 Aufbau der Chorioallantoismembran.....	8
1.2 Effekte elektromagnetischer Strahlen auf Gewebe	13
1.3 Fragestellung.....	17
2 Material.....	19
2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	19
2.2 Chemikalien.....	20
2.3 Antikörper	21
2.3.1 Primärantikörper.....	21
2.3.2 Sekundärantikörper	21
2.4 Lösungen und Puffer	22
2.5 Tierisches Material.....	22
3 Methoden	23
3.1 Bebrütung und Bestrahlung der Hühnereier.....	23
3.2 Fixierung, Einbettung und Schnitthanfertigung.....	26
3.2.1 Fixierung mittels Paraformaldehyd-Lösung für Kryopräparate und Herstellung von Gefrierschnitten	26
3.2.2 Fixierung in Karnovsky-Lösung für Semi- und Ultradünnschnitte	26
3.3 Immunhistologische Färbungen.....	26
4 Ergebnisse.....	28
4.1 Einfluss der Variablen Strahlendosis und Bestrahlungszeitpunkt.....	28
4.2 Licht- und elektronenmikroskopische Studien	29
4.3 Immunhistologische Studien	39
4.3.1 Immunhistologischer Nachweis von Prox-1 und MEP-21	39
4.3.2 Nachweis von Lektinen mittels SNA-FITC.....	44
4.3.3 Färbung mit anti-gespaltene-Caspase-3-Antikörper	45

5	Diskussion	47
5.1.1	Bestrahlungsdosis und Bestrahlungszeitpunkt	47
5.1.2	Effekte auf das Blutgefäßsystem	48
5.1.3	Effekte auf das Lymphgefäßsystem	52
6	Zusammenfassung	54
7	Literaturverzeichnis.....	56
8	Abbildungsverzeichnis	61
9	Tabellenverzeichnis	61
	Danksagung	62
	Lebenslauf.....	63

Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	destilliertes Wasser
CAM	Chorioallantoismembran
CC	<i>capillary covering cell</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Gy	Gray
Ig	Immunglobulin
LYVE1	<i>lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor 1</i>
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
nm	Nanometer
Prox1	<i>prospero homeobox protein 1</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SNA	Sambucus Nigra Lectin
SPF	spezifiziert pathogen-frei
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TGF- β 1	<i>transforming growth factor-β1</i>
VC	<i>villus cavity cell</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
μ m	Mikrometer

1. Einleitung

Strahlung ist allgegenwärtig. Jedes Individuum ist ihr ausgesetzt, sei es durch kosmische Strahlung, nukleare Katastrophen, diagnostische Bildgebung in der Medizin oder im Rahmen therapeutischer Regime. Seit Entdeckung der Röntgenstrahlen im späten 19. Jahrhundert werden ihre Eigenschaften zur Therapie maligner Tumoren genutzt. Abhängig von Art, Lokalisation und Stadium der Neoplasie unterziehen sich heutzutage ca. zwei Drittel aller Krebspatienten einer Radiotherapie (Furdui 2014).

Die zerstörende Wirkung ionisierender Strahlung betrifft hauptsächlich unreife Gewebe mit hoher Proliferationsrate, während terminal differenzierte Zellen weitgehend strahlenresistent sind. Dies erklärt, weshalb sich die Radiotherapie besonders gut für schnell wachsende Neoplasmen eignet (Bergonié und Tribondeau 2003). Die Limitierung der Strahlentherapie liegt nicht in ihrer Fähigkeit, Tumorzellen zu eliminieren, sondern vielmehr in der Schädigung des gesunden angrenzenden Gewebes.

Schon seit einiger Zeit ist bekannt, dass elektromagnetische Wellen u. a. durch die Bildung von Sauerstoffradikalen Zellschäden hervorrufen können. Da das Wachstum solider Tumoren direkt mit der lokalen Angiogenese korreliert, ist auch der anti-angiogene Effekt ionisierender Strahlung in diesem Kontext von Nutzen (Hanahan und Weinberg 2011). In einigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass ionisierende Strahlung einen schädigenden Einfluss auf die Endothelzellen des Blutgefäßsystems besitzt (Karnabatidis et al. 2001; Kinoshita et al. 2014).

Die pathophysiologische Bedeutung des Lymphgefäßsystems bezüglich der Radiotherapie ist bisher nur wenig untersucht worden. Aufgrund seiner Relevanz für die Flüssigkeits-Homöostase im Gewebe ist jedoch zu vermuten, dass es bei der Genese von Nebenwirkungen der Strahlentherapie wie Lymphödeme oder Fibrosierung eine entscheidende Rolle spielen könnte. Ein besseres Verständnis strahleninduzierter Schäden würde dazu beitragen, therapeutische Maßnahmen zu optimieren bzw. zu entwickeln.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Effekte ionisierender Strahlung auf das Blut- und Lymphgefäßsystem am in-vivo-Modell der Chorioallantoismembran (CAM) sich entwickelnder Hühnerembryonen zu untersuchen.

1.1 Aufbau der Chorioallantoismembran

Die Chorioallantoismembran (CAM) ist ein relativ einfach strukturiertes, stark vaskularisiertes Gewebe. Diese Eigenschaften und die einfache Zugänglichkeit machen sie zu einer attraktiven Alternative zum Tierversuch. Die CAM entspricht im Wesentlichen der Plazenta der Mammalia und dient dem Vogelembryo als Gasaustauschfläche. Sie erfüllt aber noch weitere Aufgaben wie zum Beispiel den Kalziumtransport von der Eischale zu den ossifizierenden Knochen des Embryos (Coleman et al. 1970) und die Aufrechterhaltung des Säure-Basen-Haushaltes (Narbaitz et al. 1995).

Die CAM entsteht am fünften Entwicklungstag durch die Verschmelzung von Chorion und Allantois (Dimitropoulou et al. 1998). Sie enthält Anteile aller drei Keimblätter. Die Allantois geht aus einer Ausstülpung des Enddarmes hervor. Als sogenannter Harnsack nimmt sie die renalen Ausscheidungen des Embryos auf. Als Darmderivat besteht sie aus einem Epithel entodermalen Ursprungs sowie aus Gefäßen und Bindegewebe mesodermalen Ursprungs. Das Chorion entsteht aus dem extraembryonalen Ektoderm und schmiegt sich mit seiner epithelialen Seite der inneren Schalenhaut an. Sein mesodermaler Anteil ist der ebenfalls mesodermalen Seite des Allantoisgewebes zugewandt und fusioniert – bedingt durch die starke Expansion des Allantoissacks – zwischen dem 4. und 5. Tag der Inkubation mit diesem.

Somit besteht die CAM aus zwei Epithelschichten mit einem dazwischenliegenden Stroma (Abbildung 1: Chorioallantoismembran (CAM)). Das Allantoisepithel bildet eine semi-permeable Barriere gegen die Allantoisflüssigkeit. Es lassen sich drei Zelltypen nachweisen, die untereinander durch zahlreiche Zellkontakte verbunden sind: Basalzellen, mitochondrienreiche Zellen und granuläre Zellen (Abbildung 2: Allantoisepithel). Die genaue Funktion dieser Zelltypen ist zurzeit noch Gegenstand der Forschung. Die Gruppe um die italienischen Biochemikerinnen Maria Gabriella Gabrielli und Daniela Accili lieferten 2010 in ihrer Arbeit „The Chick Chorioallantoic Membrane“ einige Hypothesen. So sollen die mitochondrienreichen Zellen durch apikale Protonen- und Bicarbonatsekretion in den Säure-Basen-Haushalt involviert sein, während die reich granulierten Zellen der Verteidigung gegen toxische luminale Bestandteile dienen (Gabrielli et al. 2010).

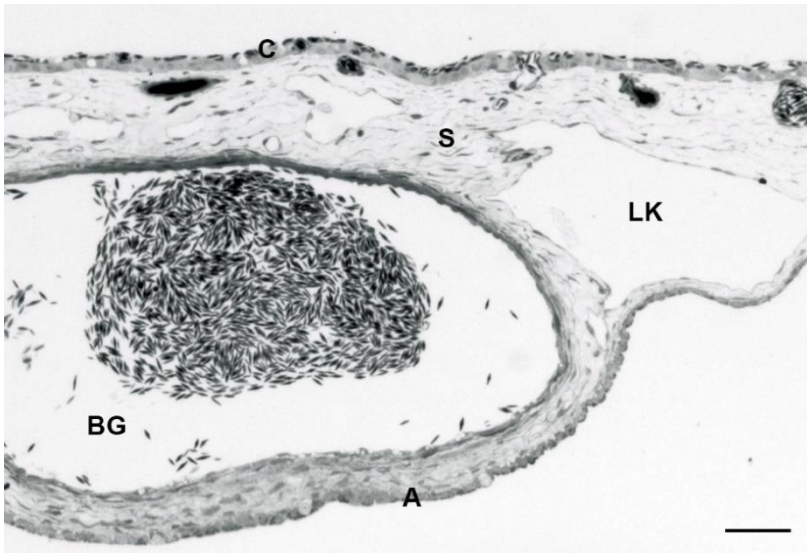


Abbildung 1: Chorioallantois-
membran (CAM)

Lichtmikroskopische Abbildung der Chorioallantoismembran mit ihren drei Schichten Chorionepithel (C), Allantoisepithel (A) und dazwischenliegendem Stroma (S). Weiterhin sichtbar sind ein größeres Blutgefäß (BG) sowie dieses umgebende Lymphkapillaren (LK). Balken = 45 µm.

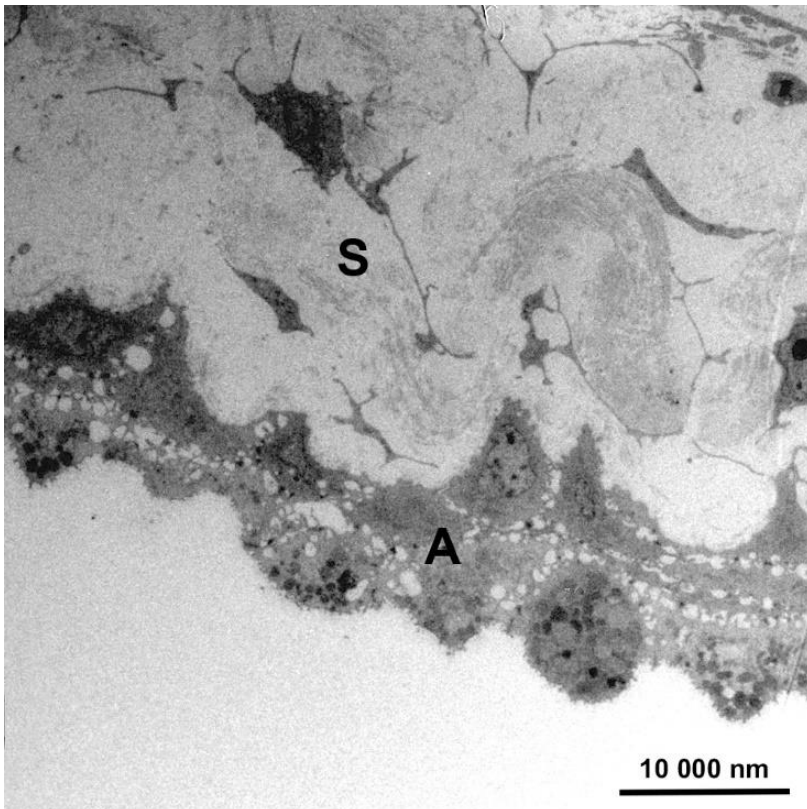


Abbildung 2: Allantoisepithel

Elektronenmikroskopische Abbildung des Allantoisepithels (A) mit angrenzendem Stroma (S). Balken = 10.000 nm.

Auch das Chorionepithel weist verschiedene Zelltypen auf. Zu diesen zählen die sogenannten *villus cavity cells* (VC) und die *capillary covering cells* (CC) (

Abbildung 3: Chorionepithel). Die *villus cavity cells* sind etwa am 12. Entwicklungstag vollständig ausdifferenziert und lassen sich elektronenmikroskopisch durch ihr elektronendichtes, mitochondrienreiches Zytoplasma und einen apikalen Mikrovillibus identifizieren. An ihrem apikalen Pol ist eine H⁺-ATPase lokalisiert, über die von einer intrazellulären Carboanhydrase generierte Protonen in Richtung Eischale ausgeschleust werden (Gabrielli et al. 2001). Ähnlich den Typ-A-Schaltzellen der Nieren können sie regulierend in den Säure-Basen-Haushalt eingreifen. Des Weiteren soll das so geschaffene azide Milieu dabei helfen, Kalzium aus der Eischale herauszulösen (Gabrielli et al. 2010).

Für den Transport des für das Knochenwachstum benötigten Kalziums sind die *capillary covering cells* verantwortlich. Sie stellen den größten Teil der CAM-Oberfläche. Mit langen zytoplasmatischen Ausläufern umhüllen sie den in der Chorionmembran gelegenen intraepithelialen Kapillarplexus (

Abbildung 3: Chorionepithel). Begleitend können auch Zellen mit intensiver Vakuolisierung, geschwollenen Mitochondrien und pyknotischen Nuklei beobachtet werden. Ihr Vorkommen wird mit apoptotischen Prozessen in Verbindung gebracht, die physiologischerweise im Rahmen der Differenzierung von Organen zu sehen sind (Gabrielli et al. 2010).

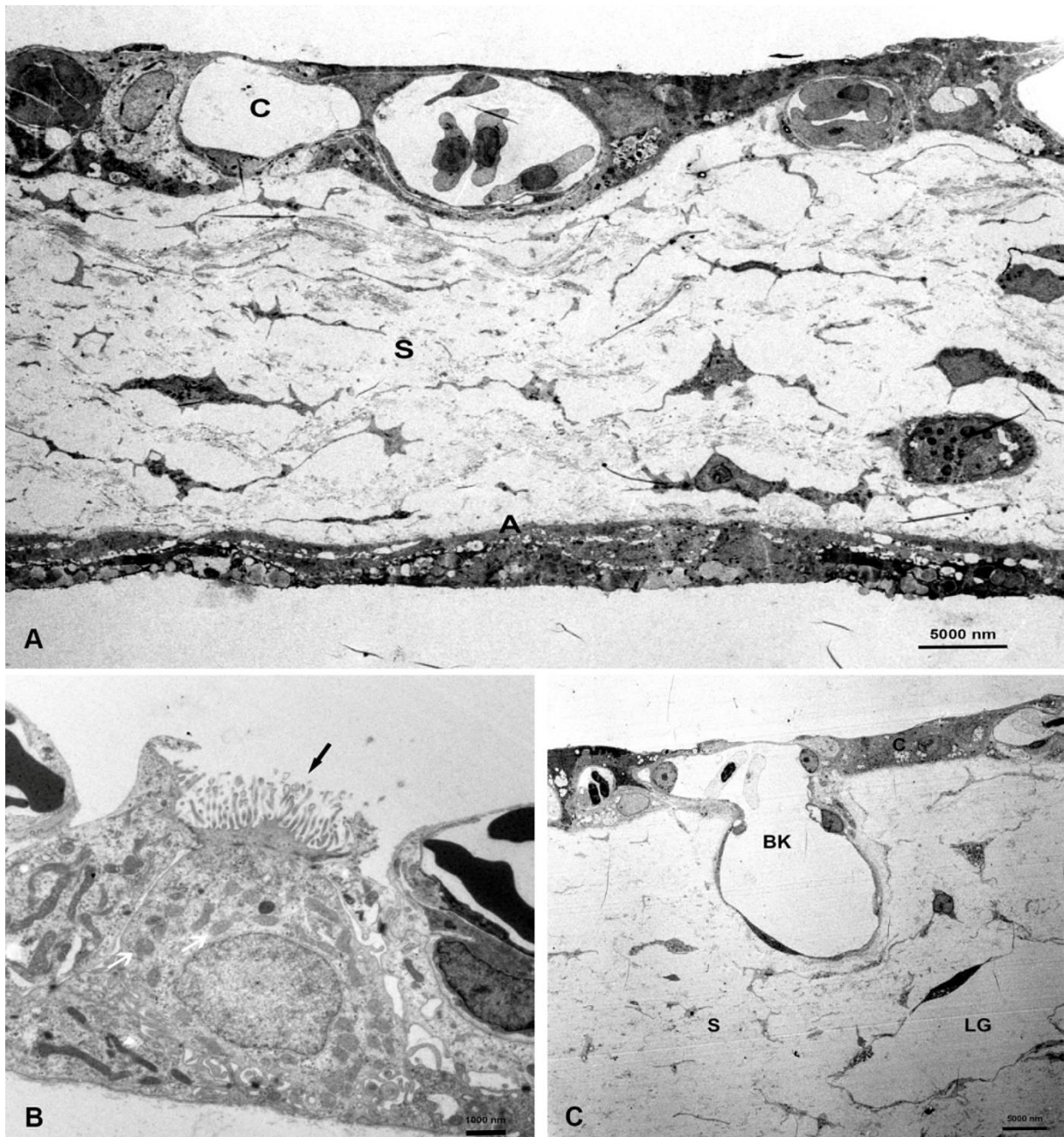


Abbildung 3: Chorionepithel

(A) Elektronenmikroskopische Abbildung der Chorioallantoismembran. C, Kapillare in Chorionepithel; S, Stroma. Balken = 5.000 nm. (B) Elektronenmikroskopische Abbildung einer *villus cavity cell* mit Mikrovillibesatz (schwarzer Pfeil) und zahlreichen Mitochondrien (weißer Pfeil). Balken = 1000 nm. (C) Elektronenmikroskopische Abbildung des Chorionepithels mit Kapillarplexus bzw. postkapillären Venolen (BK) und Anschnitt eines Lymphgefäßes (LG). Balken = 5.000 nm.

Entsprechend ihrer Funktion als respiratorisches Organ ist die CAM reich vaskularisiert. Ab dem 4. Bebrütungstag entwickelt sich ein zunächst primitives Netzwerk aus unregelmäßig im Mesoderm lokalisierten Gefäßen (Melkonian et al. 2002). Zwischen Tag 5 und 10 findet die Differenzierung in Kapillaren, Arteriolen und Venolen statt. Einige Kapillaren sprießen in das Chorionepithel aus, wo sie bis zum 12. Entwicklungstag ein dichtes Netzwerk bilden, welches über die poröse Eischale mit dem atmosphärischen Gasmilieu in Verbindung steht (Schlatter et al. 1997). In ihrer licht- und elektronenmikroskopischen morphologischen Studie postulierte die Arbeitsgruppe um Dianna H. Ausprunk, dass das Endothel der Chorioallantoismembran in den ersten 11 Tagen aus sich schnell teilenden, relativ undifferenzierten Zellen besteht. Ab Tag 11 hingegen soll die Proliferationsrate abnehmen und die Differenzierung im Vordergrund stehen (Ausprunk et al. 1974). Über die Nabelarterien gelangen CO₂ und Stoffwechselendprodukte in die CAM. Der durch die Eischale diffundierte Sauerstoff wird dem Embryo über die Nabelvene zugeführt.

Des Weiteren verfügt die CAM über ein voll ausgebildetes lymphatisches System. Die Lymphangiogenese beginnt an Tag 4 nach Befruchtung mittels mesenchymaler Lymphangioblasten (Papoutsi et al. 2001) und orientiert sich entlang des initialen Blutgefäßsystems. Die Lymphgefäße der CAM gleichen in Struktur und Funktion denen des Menschen und sind hervorragend als in-vivo Forschungsmodell geeignet.

An Tag 4 verbindet sich die CAM mit der inneren Schalenmembran. Aus diesem Grund sollte, falls eine direkte Manipulation der Membran vonnöten ist, die Fenestrierung des Eis an Tag 3 erfolgen. Wachstum und Fusion der Chorioallantoismembran sind am 13. Bebrütungstag abgeschlossen. Sie bedeckt nun die gesamte innere Oberfläche der Eischale (Leeson und Leeson 1963). Erste Zeichen der Degenerierung der CAM finden sich ab Tag 18 nach Befruchtung, der Vogel schlüpft an Tag 21 (Makanya et al. 2016).

1.2 Effekte elektromagnetischer Strahlen auf Gewebe

Das erste Röntgenbild entstand im Jahre 1895, als Wilhelm C. Röntgen die Röntgenstrahlen entdeckte. Er selbst taufte sie X-Strahlen und gewann mit ihnen 1901 den ersten Nobelpreis für Physik. Damals arbeitete er mit einer klassischen Kathodenstrahlröhre, nach deren Grundprinzip auch die heutigen Röntgenröhren funktionieren. An einem Heizdraht emittierte Elektronen treten aus der Kathode der Röntgenröhre aus und werden in Richtung Anode beschleunigt. Bei ihrem Auftreffen auf das Anodenmaterial entstehen Röntgenquanten durch zwei verschiedene Mechanismen: die Bremsstrahlung und die charakteristische Strahlung.

Bremsstrahlung entsteht, wenn ein von der Kathode emittiertes Elektron in die Nähe eines Atomkerns des Anodenmaterials gelangt. Es wird vom positiv geladenen Atomkern angezogen und bei diesem Vorgang abgebremst. Hierbei wird ein kleiner Teil der kinetischen Energie in Röntgenstrahlen umgewandelt, während der Rest als Hitze verloren geht (Zink 1997). Charakteristische Strahlung ist abhängig von der Ordnungszahl des Anodenmaterials. Durch ein in hoher Geschwindigkeit auf die Anode treffendes Elektron wird ein Elektron aus einem dem Atomkern nahe gelegenen Bahniveau, z. B. der K-Schale, herausgeschlagen. Um die entstandene Leerstelle wieder zu besetzen, fällt ein Elektron aus einer höher energetischen, weiter vom Atomkern entfernten Schale hinunter auf das K-Schalen-Niveau. Die Energiedifferenz zwischen den beiden Schalen wird in Form von charakteristischer Röntgenstrahlung frei (Zink 1997).

Der Interaktion von Röntgenstrahlung mit biologischem Gewebe widmet sich das Feld der Strahlenbiologie. Röntgenstrahlen besitzen die Fähigkeit, Elektronen aus Atomen zu entfernen und bilden somit eine Untergruppe der ionisierenden Strahlung. Ionisierende Strahlung kann biologisches Gewebe durch direkte oder indirekte Mechanismen schädigen.

Bei den direkten Interaktionen werden Makromoleküle des Organismus direkt durch die ionisierende Strahlung angegriffen. Können diese Alterationen an Proteinen oder DNA nicht durch zelleigene Reparaturmechanismen beseitigt werden, führt dies zum Zelltod oder zu Mutationen. Bedingt durch ihre hohen Mitoseraten ist häufig ein Verlust lokaler Stammzellen zu beobachten. Dadurch werden auch Reparaturprozesse dauerhaft beeinträchtigt. (Reisz et al. 2014).

Durch strahlungsinduzierte Genese von reaktiven Sauerstoff- oder Stickstoffspezies wird biologisches Gewebe indirekt beschädigt. Hierbei handelt es sich um toxische Formen des Sauerstoffs oder Stickstoffs, die über oxidativen Stress zu Zellschädigungen führen können. Reaktive Sauerstoffspezies werden vom Körper auch unter physiologischen Bedingungen gebildet. Sie fallen zum Beispiel als Nebenprodukt in der mitochondrialen Atmungskette an. Auch bei der Abwehr von Pathogenen sind sie involviert. Durch den sogenannten *oxidativen Burst* sind Makrophagen und neutrophile Granulozyten zur Verdauung phagozytierter Fremdkörper befähigt. Intrazelluläre Enzyme wie die NADPH-Oxidase katalysieren die Reaktion von molekularem Sauerstoff zum Hyperoxidanion. Aus Hyperoxidanionen können wiederum andere hochreaktive Stoffe synthetisiert werden, darunter das Hydroxyl-Radikal und Wasserstoffperoxid (Forman und Torres 2002).

Vor allem Zellen mit hohen Mitoseraten fallen der frühen Strahlenreaktion zum Opfer, welche auf einer inflammatorischen Reaktion des Gewebes mit einem massiven Zelluntergang basiert. Sie tritt bereits während oder kurz nach der Bestrahlung auf und klingt innerhalb von Tagen bis Wochen nach Exposition wieder ab. Dabei muss ab einer Strahlendosis von 0,5 Gy beim Menschen mit klinischen Symptomen gerechnet werden. Zu diesen sogenannten deterministischen Effekten zählen hämatologische Symptome wie Panzytopenien mit Folgen wie Blutungen, Anämie oder erhöhte Infektanfälligkeit. Auch Erytheme, Haarausfall und gastrointestinale Beschwerden werden häufig beobachtet. Ab einer Dosis von 2 Gy können Diarrhoe, Dehydratation, Übelkeit und Erbrechen auftreten (Bolos 2001).

Radiotherapie und Tumoren

Überschreitet die Strahlendosis einen gewissen Schwellenwert nicht, treten zwar keine Strahlenfrühschäden auf, spätere stochastische Schäden sind jedoch nicht ausgeschlossen. Klassisches Beispiel einer stochastischen Strahlenwirkung sind Krebserkrankungen, die sich oft erst Jahrzehnte nach Exposition manifestieren und deren Auftretenswahrscheinlichkeit von der Strahlendosis abhängt (Hamada und Fujimichi 2014).

Optimal wäre eine Radiotherapie, die zur Vernichtung von Tumorzellen bei gleichzeitigem Erhalt des gesunden Gewebes führt. Die Schädigung des normalen angrenzenden Gewebes limitiert die Strahlendosis und somit den Therapieeffekt. Dabei gilt zu beachten, dass die unterschiedlichen Gewebearten auch verschieden auf ionisierende Strahlung reagieren.

Bereits 1906 postulierten Bergonié und Tribondeau, dass unreife Zellen mit hohen Mitoseraten radiosensibler sind als differenzierte, sich nicht aktiv teilende Zellen (Bergonié und Tribondeau 2003). Von den vier Phasen der Mitose wird die M-Phase, in welcher sich die Chromosomen kondensieren und zu Paaren zusammenfinden, als die empfindlichste erachtet. Dies wird dadurch begründet, dass während der M-Phase in der Zelle verhältnismäßig am meisten DNA pro Fläche vorhanden ist (Chapman et al. 1999). Zu den Geweben mit hohem Zellumsatz gehören vor allem die Mukosa des Gastrointestinaltraktes, die basale Zellschicht der Haut und das Knochenmark.

Ab welcher Strahlendosis es zur Schädigung eines Organismus kommt, ist noch nicht abschließend geklärt. Es gibt viele verschiedene Dosis-Wirkung Modelle, um die Folgen der Strahlenexposition vorherzusagen. Gemeinsam ist allen Theorien, dass mit steigender Strahlendosis auch die Gewebeschäden zunehmen. Das *linear-threshold model* beruht auf der Annahme, dass erst ab Überschreiten einer bestimmten Schwelle negative Effekte auftreten. Im *linear no-threshold model* wird davon ausgegangen, dass jegliche noch so kleine Strahlenexposition karzinogen wirken kann. In einem weiteren Modell wird angenommen, dass in niedrigen Bereichen die Beziehung zwischen Dosis und Wirkung linear, in hohen Bereichen die Wirkung sogar quadratisch ist (Bolus 2001).

Neben den Eigenschaften des Zielgewebes und der Strahlendosis ist der schädigende Einfluss ionisierender Strahlen auch abhängig von dem gewählten Bestrahlungsmodus. Man geht davon aus, dass eine höher fraktionierte Exposition im Vergleich mit weniger fraktionierten Protokollen die akuten Schäden im gesunden Gewebe reduzieren kann. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass fraktionierte Regime gravierendere Strahlenspätreaktionen hervorrufen könnten. Kahori Kinoshita und seine Arbeitsgruppe aus Tokyo widmeten sich dieser Fragestellung und untersuchten die Kurz- und Langzeiteffekte ionisierender Strahlung nach Einzelbestrahlung im Vergleich zu fraktionierter Dosis. Dazu bestrahlten sie die gesunde Haut von Mäusen mit einer 10-Gy-Einzeldosis beziehungsweise mit zwei fraktionierten Dosen von 5 Gy. Sie konnten beobachten, dass eine hohe Einzeldosis schwerere Akutreaktionen auf das melanozytäre System der Haut mit Folgen wie Haarergrauung hervorruft. Im Langzeitverlauf jedoch erwies sich die fraktionierte Exposition als schädigender. Sie rief eine deutlichere Hautatrophie und Kapillarreduktion hervor, was eine stärkere Dezimierung von Stamm- und Endothelzellen nahelegt (Kinoshita et al. 2014).

Das Verständnis der verschiedenen pathogenetischen Prozesse hat die Entwicklung neuer Therapiestrategien ermöglicht. Medikamente, die hemmend in die TGF- β - oder TNF- α -Signalwege eingreifen, konnten laut einiger Studien zu einer deutlichen Abschwächung strahleninduzierter Schäden führen. Exemplarisch soll hier das ursprünglich gegen Sklerodermie entwickelte Pflanzenalkaloid Halofuginone Erwähnung finden. Das Medikament führt neben einer Hemmung von T-Helferzellen zu einer Hemmung des TGF- β -Signalweges. US-amerikanische Forscher konnten im Mausmodell eine geringere Fibrosierungsrate nach Bestrahlung beobachten (Xavier et al. 2004). Des Weiteren gibt es Therapiestrategien, die sich die pleiotropen Effekte von Statinen, die anti-inflammatorischen Cyclooxygenaseinhibitoren oder die antioxidativen Wirkungen von Vitamin E zunutze machen wollen (Kim et al. 2014).

1.3 Fragestellung

Der diagnostische und therapeutische Nutzen ionisierender Strahlung ist unumstritten und ihr ubiquitärer Einsatz ist aus der modernen Medizin nicht mehr wegzudenken. Dennoch gilt es, sie aufgrund ihrer nachweislich toxischen Wirkung so restriktiv wie möglich zu verwenden. Die durch ionisierende Strahlung hervorgerufenen Schädigungen sind einerseits durch direkte physikalische und chemische Noxen bedingt, entstehen andererseits aber auch durch die Reaktionen des Körpers auf die Bestrahlung.

Wie bereits einleitend erwähnt, konnte in einigen Studien die destruktive Wirkung elektromagnetischer Strahlung auf das Blutgefäßsystem nachgewiesen werden. Der Effekt von Röntgenstrahlen auf das Lymphgefäßsystem hingegen ist bisher nur wenig untersucht worden. Die hohe Prävalenz von Lymphödemen bei bestrahlten Tumorpatienten legt jedoch eine Alteration des Lymphgefäßsystems nahe.

Die häufigste Ursache für sekundäre Lymphödeme ist das Malignom und seine Behandlung. Die Angaben über die Anzahl der Krebspatienten, die ein Lymphödem erleiden, schwanken stark (Morgan und Moffat 2006). Durch verfeinerte Operationstechniken hat sich die Situation in den letzten Jahren aber offensichtlich gebessert. Für gynäkologische Tumoren wird nach Lymphknotenentfernung eine Lymphödeminzidenz von ca. 20% angegeben (Todo et al. 2015; Yamazaki et al. 2015). Es gibt jedoch auch Untersuchungen, die nach bestimmten gynäkologischen Eingriffen Werte von 47% (Ryan et al. 2003) und 60% ermittelt haben (Carlson et al. 2008).

Eine Studie von L. Rebegea et al. befasst sich mit der Detektion von Risikofaktoren für die Entwicklung von Lymphödemem nach Mammakarzinom-Therapie. Aus der Analyse von 305 Brustkrebs-Patientinnen traten die adjuvante Strahlentherapie und die axilläre Lymphknotendisektion als unabhängige Risikofaktoren hervor. Parameter wie adjuvante Chemotherapie, Hormontherapie, hohe Blutdruckwerte oder Diabetes mellitus zeigten keinen Einfluss auf die Inzidenz von Lymphödemem (Rebegea et al. 2015).

Um ein besseres Verständnis strahleninduzierter Schäden am Gefäßsystem zu entwickeln, sollte in dieser Arbeit der Einfluss ionisierender Strahlung auf das Blut- und Lymphgefäßsystem der Chorioallantoismembran von Hühnerembryonen untersucht und folgende Fragen beantwortet werden.

- (1) Lassen sich die in der Literatur beschriebenen Effekte ionisierender Strahlung auf das Blutgefäßsystem am in-vivo Modell der Chorioallantoismembran reproduzieren?
Wie genau sehen diese Effekte morphologisch aus?
- (2) Wird auch das Lymphgefäßsystem durch ionisierende Strahlung geschädigt?
- (3) In welchem Entwicklungsstadium reagiert die Chorioallantoismembran am empfindlichsten auf Röntgenstrahlung? Welchen Einfluss hat hierbei die Strahlendosis?

2 Material

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Geräte und Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Ehret-Brutschrank BSS	Grumbach
Deckgläser 20 x 60 mm	Menzel
Einmalhandschuhe	Hartmann
Epifluoreszenz-Mikroskop (Zeiss Axiomager Z1)	Zeiss
- 80 °C Gefrierschrank	Ewald GmbH
Kryotom (Leica CM 30505)	Leica Biosystems
Kühlschrank	Liebherr
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen	Eppendorf
Röntgenapparat (XStrahl RS225)	Gulmay
Superfrost-Objekträger	Menzel
Transmissionselektronenmikroskop (Leo 906E)	Zeiss
Zentrifuge 5417R	Eppendorf

2.2 Chemikalien

Tabelle 2: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Aqua dest.	Seradest, Veolia Water Solutions
Bovines Serumalbumin	Applichem
Dapi	Invitrogen
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
DMP-30 [2,4,6-Trisdimethylamino-methylphenol]	Serva
Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid [DDSA]	Serva
Ethanol	Chemie-Vertrieb Hannover
Fluoromount-G	Southern Biotechnology
Glutaraldehyd	Serva
Glycidether 100	Serva
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Methylnadinsäureandhydrid [MNA]	Serva
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Osmiumtetroxid	Roth
Paraformaldehyd	Merck
Propylenoxid	Sigma-Aldrich
Saccharose	Roth
Tissue Tek	Sakura Finetek Europe B.V.

2.3 Antikörper

2.3.1 Primärantikörper

Tabelle 3: Primärantikörper

Primäre Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Prox-1 (<i>rabbit-anti-human</i>)	1:500	Reliatech
Mep-21 (<i>mouse-anti-chicken</i>)	1:500	Ablab
Fluorescein-conjugated Elderberry Bark Lectin (<i>SNA-Fitc</i>)	1:500	Vector Laboratories
Cleaved-Caspase-3 (<i>rabbit-anti-human</i>)	1:500	Cell Signaling Technology

2.3.2 Sekundärantikörper

Tabelle 4: Sekundärantikörper

Gekoppelte Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Alexa-594 (<i>goat-anti-rabbit-IgG</i>)	1:200	Molecular Probes
Alexa-488 (<i>goat-anti-mouse-IgG</i>)	1:200	Molecular Probes

2.4 Lösungen und Puffer

Tabelle 5: Lösungen und Puffer

Lösung oder Puffer	Inhalt
0,01M PBS-Lösung, pH 7,2	6,789 g Natriumchlorid; 1,48 g Dinatriumhydrogenphosphat; 0,43 g Kaliumdihydrogenphosphat; gelöst in 1 Liter Aqua dest.
0,15 M Phosphat-Puffer	50% 0,3 M Sörensen-Puffer, 50% Aqua dest.
15% Saccharose-Lösung	15 g Saccharose in 100 ml KPP
30% Saccharose-Lösung	30 g Saccharose in 100 ml KPP
4% PFA-Lösung	4% Paraformaldehyd, PBS
BSA-Lösung	1 g Bovines Serumalbumin gelöst in 100 ml PBS
Epon Einbett-Lösung	45,2% Glycidether 100; 28% DDSA; 25% MNA; 1,8% DMP-30
Karnovsky-Lösung	12% Glutaraldehyd (25%); 58% Sörensen Puffer (0,3 M); 30% Paraformaldehyd (10%)
Sörensen-Puffer	744 mg Kaliumdihydrogenphosphat; 3,48 g Dinatriumhydrogenphosphat, Aqua dest.

2.5 Tierisches Material

Für meine Untersuchungen benutzte ich spezifiziert pathogen-freie (SPF) befruchtete Hühnereier (Weißes Leghorn), die wir von der Firma Valo Biomedica aus Osterholz-Scharmbeck, Deutschland, bezogen. Die Bestrahlung der CAM im Ei fällt nicht unter das Tierschutzgesetz.

3 Methoden

3.1 Bebrütung und Bestrahlung der Hühnereier

Für die Versuche wurden SPF-Hühnereier der Firma Valo bezogen. Die Bebrütung der befruchteten Eier erfolgte in horizontaler Lage bei 37,8 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 90% in einem Ehret-Inkubator der Firma Grumbach. Als Tag 0 wurde der Tag der Einlage der Eier in den Brutschrank definiert. Um eine Adhäsion der Keimscheibe an der Schaleninnenseite zu verhindern, wurden die Eier während der ersten Stunden einige Male manuell gewendet.

Insgesamt habe ich 9 Experimental- und 2 Kontrollgruppen untersucht und dabei sowohl die Strahlendosis als auch den Bestrahlungszeitpunkt variiert (Tabelle 6). Vor der Bestrahlung wurden durch Schieren unbefruchtete Eier identifiziert und eliminiert und die korrekte Lagerung der Eier im Strahlengang sichergestellt. Eine Versuchsreihe bestand aus je 6 - 10 Eiern. Um einen Einfluss der Eischale als Störfaktor im Strahlengang ausschließen zu können, fenestrierte ich einen Teil der Eier unter aseptischen Bedingungen an Tag 3 ihrer Entwicklung. Die ca. 1 x 1 cm messende Öffnung wurde sofort mit Leukosilk Rollenpflaster abgedeckt. Zur Bestrahlung der Eier wurden Röntgenstrahlen verwendet. Erzeugt wurden sie in dem Gerät XStrahl RS225 der Firma Gulmay. Die Stromstärke betrug 15 mA, die Spannung 200 kV. Bei einem Abstand der Röntgenröhre zu den Eiern von 285 mm ergab sich daraus eine Dosisleistung von 2,5 Gy pro Minute.

In den ersten beiden Versuchsreihen wurden die Eier an Tag 3 gefenestert, an Tag 11 bestrahlt und bis Tag 15 reinkubiert. Versuchsreihe 1 wurde mit 2,5 Gy, die Gruppe 2 mit 10 Gy bestrahlt (Tabelle 6). Die folgenden beiden Versuchsreihen wurden nicht gefenestert, am 13. Entwicklungstag bestrahlt und am 17. Tag geerntet, wobei auch hier die Chargen mit 2,5 bzw. 10 Gy bestrahlt wurden. Um die Ausdehnung etwaiger Strahlenschäden im Gewebe zu untersuchen, wurde bei diesen beiden Versuchsreihen eine Hälfte des Eies bestrahlt, während die andere Seite mit einer 1 cm dicken Bleiplatte von der Strahlung abgeschirmt wurde (Abbildung 4: Versuchsaufbau). Die Experimentalreihen 5 – 7 wurden an Tag 3 gefenestert, an Tag 13 mit 15 Gy bestrahlt und am 17. Entwicklungstag eingebettet (Tabelle 6). Um einen Einfluss der Eischale auf das Ergebnis zu evaluieren, wurde in Versuchsreihe 6 das angefertigte Fenster wieder mit Schale bedeckt. Die letzten beiden Versuchsreihen wurden an Tag 3 gefenestert, an Tag 9 mit 2,5 bzw. 10 Gy bestrahlt und bis Tag 13 reinkubiert. Als Kontrollen dienten an Tag 13 sowie an Tag 16 eingebettete unbestrahlte Eier.

Zusammenfassend wurden demnach vier Chargen 9 bzw. 11 Tage lang inkubiert und mit 2,5 bzw. 10 Gy bestrahlt. Somit fiel der Bestrahlungszeitpunkt in eine Entwicklungsphase, in der das Gefäßnetz der CAM sein Proliferationsmaximum erreicht (Ausprunk et al. 1974). Um eine etwaige Divergenz bezüglich der Strahlenempfindlichkeit der CAM je nach Stadium feststellen zu können, bestrahlte ich fünf weitere Chargen am 13. Entwicklungstag mit 2,5, 10 bzw. 15 Gy.

Zur Untersuchung der Fragestellung, wie scharf sich der schädigende Einfluss ionisierender Strahlung im Gewebe abgrenzen lässt, wurde in 2 Versuchsreihen nur eine Eihälfte bestrahlt. Die andere Seite des Eies wurde mit einer 1 cm dicken Bleiplatte von der Strahlung abgeschirmt. Für dieses Experiment wählte ich Tag 13 als Bestrahlungstag, da die CAM zu diesem Zeitpunkt relativ stabil ist und nicht mehr expandiert. So konnte ich einen gleichbleibend scharfen Verlauf der Bestrahlungsgrenze sicherstellen.

Tabelle 6: Versuchs- und Kontrollreihen

	Bestrahlungstag	Bestrahlungsdosis (Gy)	Einbettungstag	Charakteristika
Versuchsreihe 1	11	2,5	15	gefenstert
Versuchsreihe 2	11	10	15	gefenstert
Versuchsreihe 3	13	2,5	17	ungefenstert Hälfte mit Bleiplatte abgedeckt
Versuchsreihe 4	13	10	17	ungefenstert Hälfte mit Bleiplatte abgedeckt
Versuchsreihe 5	13	15	17	gefenstert
Versuchsreihe 6	13	15	17	gefenstert
Versuchsreihe 7	13	15	17	gefenstert, danach wieder mit Eischale bedeckt
Versuchsreihe 8	9	2,5	14	gefenstert
Versuchsreihe 9	9	10	14	gefenstert
Kontrolle 1		unbestrahlt	16	ungefenstert
Kontrolle 2		unbestrahlt	13	gefenstert

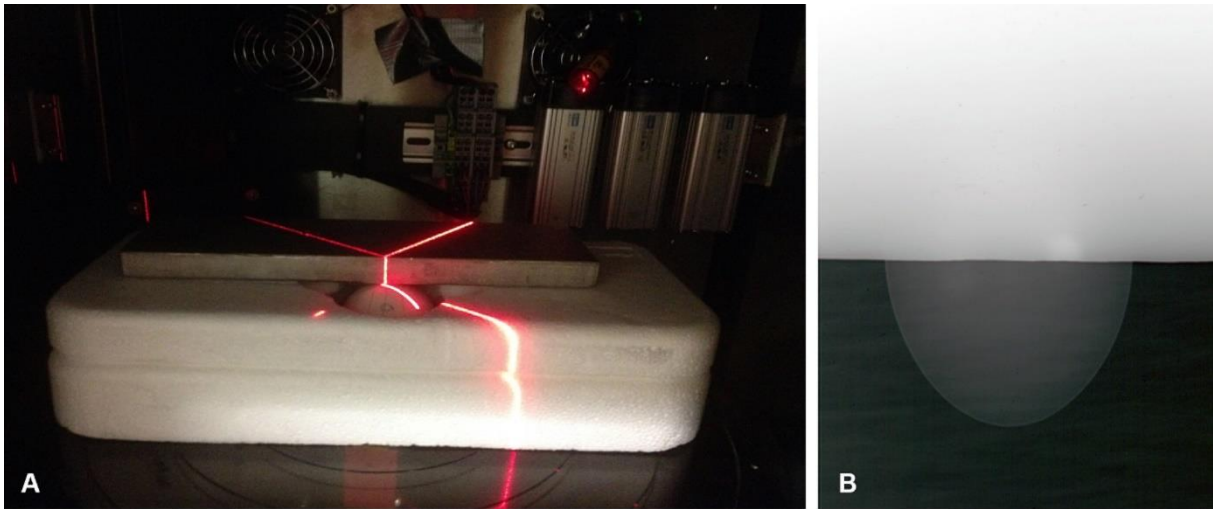


Abbildung 4: Versuchsaufbau

(A) Versuchsreihen 2 und 3: Bestrahlung an Tag 13 mit 2,5 bzw. 10 Gy. Abschirmung einer Hälfte des Eies mit Hilfe einer Bleiplatte. **(B)** Verifizierung der Strahlenprotektion durch Unterlegen eines Röntgenfilms.

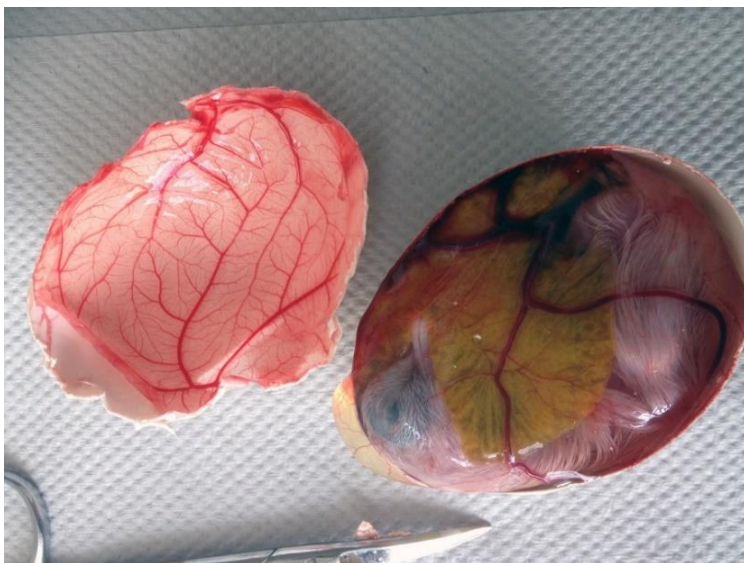


Abbildung 5: Makroskopische Ansicht der CAM

Sicht auf die Chorioallantoismembran (links) nach Eröffnung des Eies am 17. Entwicklungstag.

3.2 Fixierung, Einbettung und Schnitthanfertigung

3.2.1 Fixierung mittels Paraformaldehyd-Lösung für Kryopräparate und Herstellung von Gefrierschnitten

Die CAM-Gewebeproben wurden 20 min in 4% PFA-Lösung fixiert und anschließend 3x mit Kaliumphosphatpuffer gewaschen. Es folgte eine 120-minütige Inkubation in 15% Saccharose-Lösung bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte eine Inkubation über Nacht in 30% Saccharose-Lösung und die Einbettung in Tissue-Tek-Medium mit nachfolgender Aushärtung im Gefrierschrank bei -80 °C. Mit dem Kryomikrotom wurden 14 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Superfrost-Objektträger transferiert. Gelagert wurden die Gewebeschnitte bei -20 °C in Einfrierboxen.

3.2.2 Fixierung in Karnovsky-Lösung für Semi- und Ultradünnschnitte

Für die Anfertigung von Semi- und Ultradünnschnitten wurden CAM-Proben zur Fixierung für eine Dauer von 2 Stunden in eine Aldehydlösung nach Karnovsky gegeben. Nach einer zehnmütigen Spülung in 0,15 M Phosphatpuffer wurden die Proben in eine Osmiumtetroxid-Lösung gegeben und dort für 2 Stunden bei 4 °C inkubiert. Es schloss sich ein abermaliger Waschschrift in 0,15 M Phosphatpuffer und eine Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 90%, 100%) an. Anschließend wurden die Präparate zweimalig für jeweils 10 Minuten in 100% Propylenoxid inkubiert. Schließlich wurden sie für 1 Stunde in 50% Propylenoxid und 50% Epon inkubiert, danach in 25% Propylenoxid und 75% Epon transferiert und dort bei 4 °C über Nacht belassen. Zuletzt erfolgte die Einbettung des Gewebes in Epon-Lösung für 24 Stunden bei 60 °C.

Die eingebetteten Proben wurden mit einem UltracutE Mikrotom zu Schnitten mit 90 nm Dicke verarbeitet und auf TEM Grids mit Formvarfilm aufgezogen. Kontrastiert wurden die Schnitte mit Uranylazetat/Bleizitrat, die Analyse erfolgte mit dem Transmissionselektronenmikroskop Leo 906E.

3.3 Immunhistologische Färbungen

Für immunhistologische Färbungen wurden die in 3.2.1. beschriebenen CAM-Präparate verwendet. Zunächst wurden die Schnitte für eine Stunde luftgetrocknet und danach in eine feuchte Kammer überführt. Dort wurden sie zur Blockierung unspezifischer Epitope mit 1% BSA-Lösung (Bovines-Serum-Albumin; in PBS) behandelt. Anschließend erfolgte eine Inkubation über Nacht mit einem bzw. zwei verschiedenen Primärantikörpern. Die Eigenschaften und Verdünnungen der Antikörper sind in 2.3.1 und 2.3.2 aufgeführt. Zur Säuberung des Gewebes von ungebundenen Antikörpern wurde es zweimal mit PBS gewaschen.

Daran schloss sich eine einstündige Inkubation mit einem bzw. zwei an Fluorochrome gekoppelten sekundären Antikörpern sowie mit in PBS verdünntem Dapi (1: 10.000) an. Abschließend wurden die Präparate zweimal mit PBS gewaschen und mit Fluoromount-G eingedeckelt. Ausgewertet wurden die Präparate mit dem Epifluoreszenz-Mikroskop Zeiss Axiomager Z1.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss der Variablen Strahlendosis und Bestrahlungszeitpunkt

Einige Embryonen starben bereits während der frühen Inkubationstage und wurden verworfen, weitere verstarben nach der Bestrahlung und konnten somit nicht für Gewebeschnitte verwendet werden. Anhand der langjährigen Erfahrung des Institutes für Anatomie und Zellbiologie in Göttingen ist bei 13-17 Tagen bebrüteten unfenestrierten Eiern mit einer Mortalität von ca. 3% zu rechnen. Bei fenestrierten Eiern liegt die Mortalitätsrate mit ca. 10-15% etwas höher. In den gefenesterten Versuchsreihen, die mit 2,5 Gy bestrahlt wurden, verzeichnete ich einen Verlust von 33% (4 von 6 überlebende Eier in Versuchsgruppe 8) und in den mit 10 Gy bestrahlten einen Verlust von 50% (3 von 6 überlebende Eier in Versuchsgruppe 9). Bei den mit 15 Gy bestrahlten Embryonen betrug die Mortalität 82,25% (insgesamt 13 von 16 in Versuchsgruppen 6 und 7). Die aus dem überlebenden Material angefertigten Proben wiesen unterschiedlich starke morphologische Veränderungen auf. Die Chorioallantoismembran (CAM) der mit 2,5 Gy bestrahlten Embryonen präsentierte ein weniger stark ausgeprägtes Schädigungsmuster als die mit 10 und 15 Gy bestrahlten Gewebe. Damit scheint eine Strahlendosis von 10 Gy am geeignetsten zur Evaluierung des Effekts ionisierender Strahlung auf das Gefäßsystem der CAM zu sein. In dieser Dosierung sind die Veränderungen am Endothel maximal, ohne die Viabilität der Embryonen zu stark zu beeinflussen.

Nicht nur die Strahlendosis, sondern auch der Bestrahlungszeitpunkt erwies sich als bedeutende Variable. Eine Bestrahlung am 9. Tag der Entwicklung führte zu deutlichen Schäden an der CAM. Erfolgte die Bestrahlung am 13. Entwicklungstag, konnten keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden.

Im Gegensatz zu Bestrahlungszeitpunkt und Dosis konnte ich keinen Einfluss der Eischale auf die Ergebnisse beobachten. Es ließ sich kein Unterschied zwischen fenestrierten Chargen und Versuchsreihen mit intakter Schale feststellen. Die kalkhaltige Eierschale scheint also keinen Störfaktor darzustellen. Damit wird in künftigen Studien Zugunsten der Praktikabilität und der Asepsis auf eine Fenestrierung der Eier verzichtet werden können.

Bezüglich der Fragestellung, wie scharf sich der schädigende Einfluss ionisierender Strahlung im Gewebe abgrenzt, ließ sich keine genaue Aussage treffen. Morphologisch konnte kein Unterschied zwischen der mit Blei abgedeckten und der exponierten CAM-Hälfte festgestellt werden. Da diese Eier jedoch am Tag 13 bestrahlt worden sind, an dem die Effekte generell

deutlich geringer ausfielen als an Tag 9, könnte diese Beobachtung auch dem Bestrahlungszeitpunkt geschuldet sein.

4.2 Licht- und elektronenmikroskopische Studien

Bei Betrachtung der am Tag 9 bestrahlten Proben unter dem Lichtmikroskop wurde eine deutliche Verbreiterung der Chorioallantoismembran im Vergleich zur Kontrollgruppe augenscheinlich (Abbildung 6: Ödem und Rundzellen). Das ödematös aufgequollene Stroma war zudem von zahlreichen Rundzellen infiltriert. Die Rundzellen ließen sich auch gehäuft im Gefäßsystem nachweisen und bei der Diapedese ins Interstitium beobachten (Abbildung 7: Gefäßwandständige Rundzellen).

Konkordant zu den lichtmikroskopischen Befunden bestand auch unter elektronenmikroskopischer Betrachtung ein steriles, von Rundzellen dominiertes entzündliches Infiltrat. Ein Großteil dieser Zellen wies einen in zwei Teile segmentierten Zellkern auf, weshalb es sich wahrscheinlich um den Subtyp der heterophilen Granulozyten handelt. Wie bei den Mammalia werden beim Vogel drei Granulozyten-Subtypen unterschieden. Die 10-12 µm messenden eosinophilen und basophilen Granulozyten der Vögel sind im Wesentlichen mit denen des Menschen vergleichbar. Analogon der neutrophilen Granulozyten sind die heterophilen Leukozyten. Ihr Kern ist meist in zwei Segmente gegliedert, die polständig lokalisiert sind (Mohd et al. 2016).

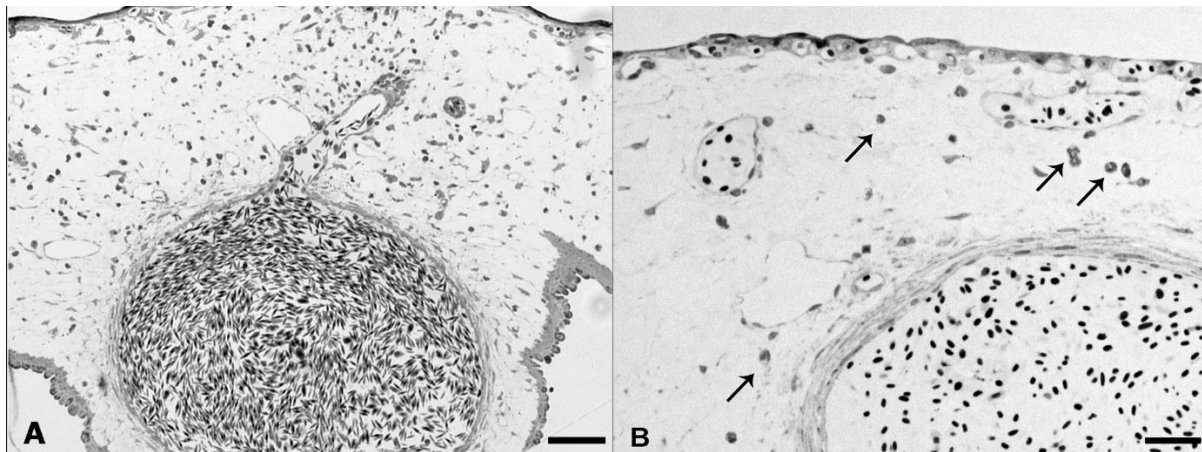


Abbildung 6: Ödem und Rundzellen

Versuchsreihe 2: Bestrahlung mit 10 Gy am 9. Entwicklungstag, Reinkubation für 6 Tage. Lichtmikroskopische Abbildung der ödematös verbreiterten CAM mit einem Infiltrat aus Rundzellen (exemplarisch mit Pfeilen markiert). **(A)** Balken = 45 µm. **(B)** Balken = 60 µm.

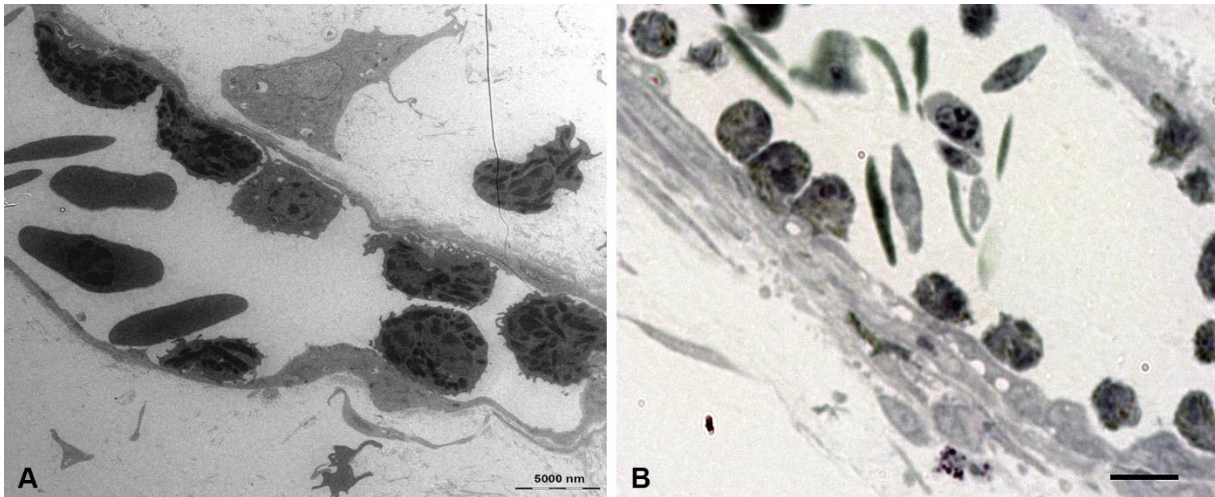


Abbildung 7: Gefäßwandständige Rundzellen

Versuchsreihe 2: Bestrahlung mit 10 Gy am 9. Entwicklungstag, Reinkubation für 6 Tage. **(A)** Elektronenmikroskopische Abbildung eines Gefäßes mit zahlreichen Rundzellen nach Bestrahlung mit 10 Gy. Balken = 5000 nm. **(B)** Lichtmikroskopische Abbildung von Rundzellen im Lumen eines mit 10 Gy bestrahlten Gefäßes. Balken = 15 µm.

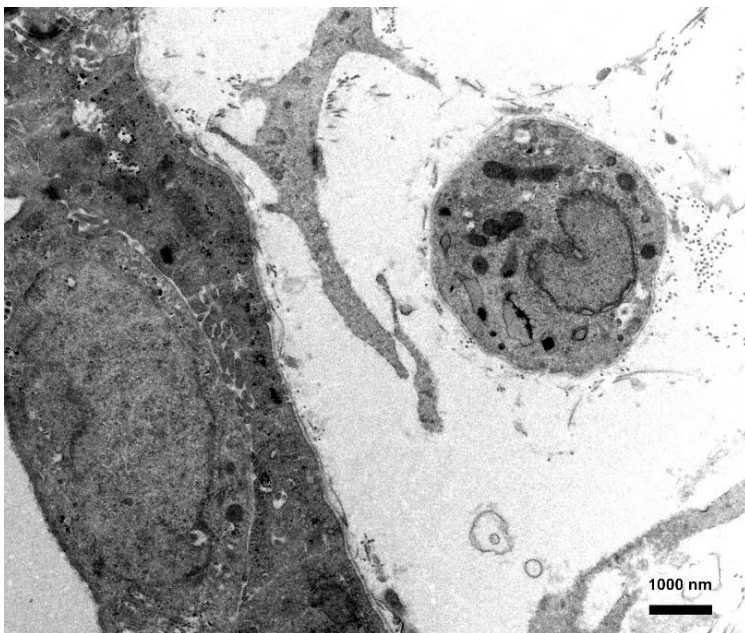


Abbildung 8: Heterophiler Granulozyt

Versuchsreihe 7: Bestrahlung mit 15 Gy am 13. Entwicklungstag, Reinkubation für 4 Tage. Elektronenmikroskopische Abbildung einer Rundzelle im Stroma einer mit bestrahlten Chorioallantoismembran (CAM). Balken = 1000 nm.

Zur Betrachtung des Gefäßsystems ist es zunächst hilfreich, sich die Morphologie der aviären Erythrozyten vor Augen zu führen. Im Gegensatz zu menschlichen Erythrozyten, die nur bis zur Fetalzeit Nuklei enthalten, sind die roten Blutkörperchen von Vögeln kernhaltig und besitzen eine diskusartige, ovale Form.

Die Intima scheint der strahlensensibelste Bereich des Blutgefäßsystems zu sein. Bereits lichtmikroskopisch war zu erkennen, dass variierende Anteile des Zytoplasmas der normalerweise glatten Endothelzellen (Abbildung 9) nach Bestrahlung in Vakuolen segregiert waren. An einigen Stellen wölbte sich das Endothel in das Gefäßlumen vor. Auffällig war, dass sich diese Veränderungen der Intima vor allem an der strahlenzugewandten, also chorionnahen Seite, präsentierten, während die strahlenabgewandte Seite praktisch keine oder nur geringe Veränderungen aufwies (Abbildung 10: Gradient Gefäßschaden bei 2,5 Gy und Abbildung 11: Gradient Gefäßschaden bei 10 Gy).

Die elektronenmikroskopische Betrachtung des bestrahlten Gewebes erlaubte eine genauere Differenzierung der strahleninduzierten Schäden. Die stark vakuolisierte Intima von Arteriolen und Venolen war im TEM deutlich zu erkennen. In einem Großteil der Gefäße folgte die Vakuolisierung einem Gradienten dergestalt, dass sie in der von der Strahlung abgewandten Seite am geringsten ausgeprägt war (Abbildung 12: Vakuolisierung bei 2,5 Gy). Die meisten dieser Regionen segregierten Zytoplasmas waren von einer einschichtigen Membran umhüllt. Ihr Inhalt imponierte zum Großteil elektronen-luzent. Stellenweise befanden sich Strukturen variierender Morphologie in den Vakuolen (Abbildung 13: Vakuolisiertes Endothel mit intrazellulären Einschlüssen). Das übrige Zytoplasma dieser Endothelzellen wölbte sich ins Gefäßlumen vor. An einigen Stellen konnte ich beobachten, dass sich die Endothelzellen von der Basalmembran ablösten (Abbildung 14: Ablösung des Endothels von der Basalmembran). Weiterhin kam es stellenweise zu Auffälligkeiten der Media. Wie die Endothelzellen zeigten auch vereinzelte Myozyten Vakuolen. Teilweise kam zur Ausbildung von Lücken im Zellverband und zum Verlust der typischen spindelartigen Form glatter Muskelzellen (Abbildung 15: Auffällige Gefäßwandung nach Bestrahlung).

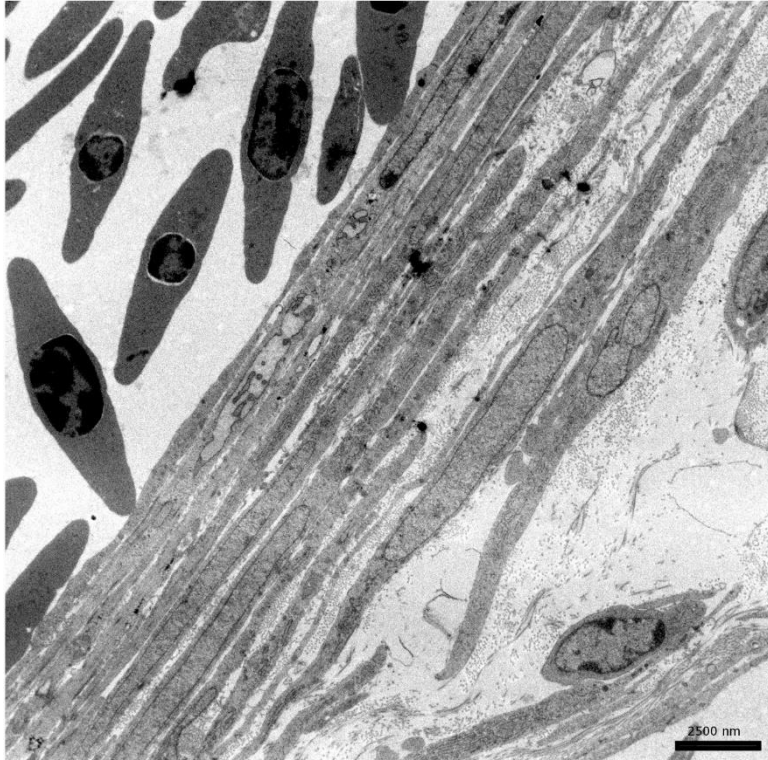


Abbildung 9: Normales Endothel
Glatt anmutende Endothelzellschicht
einer unbestrahlten CAM am 13.
Entwicklungstag. Balken = 2500 nm.

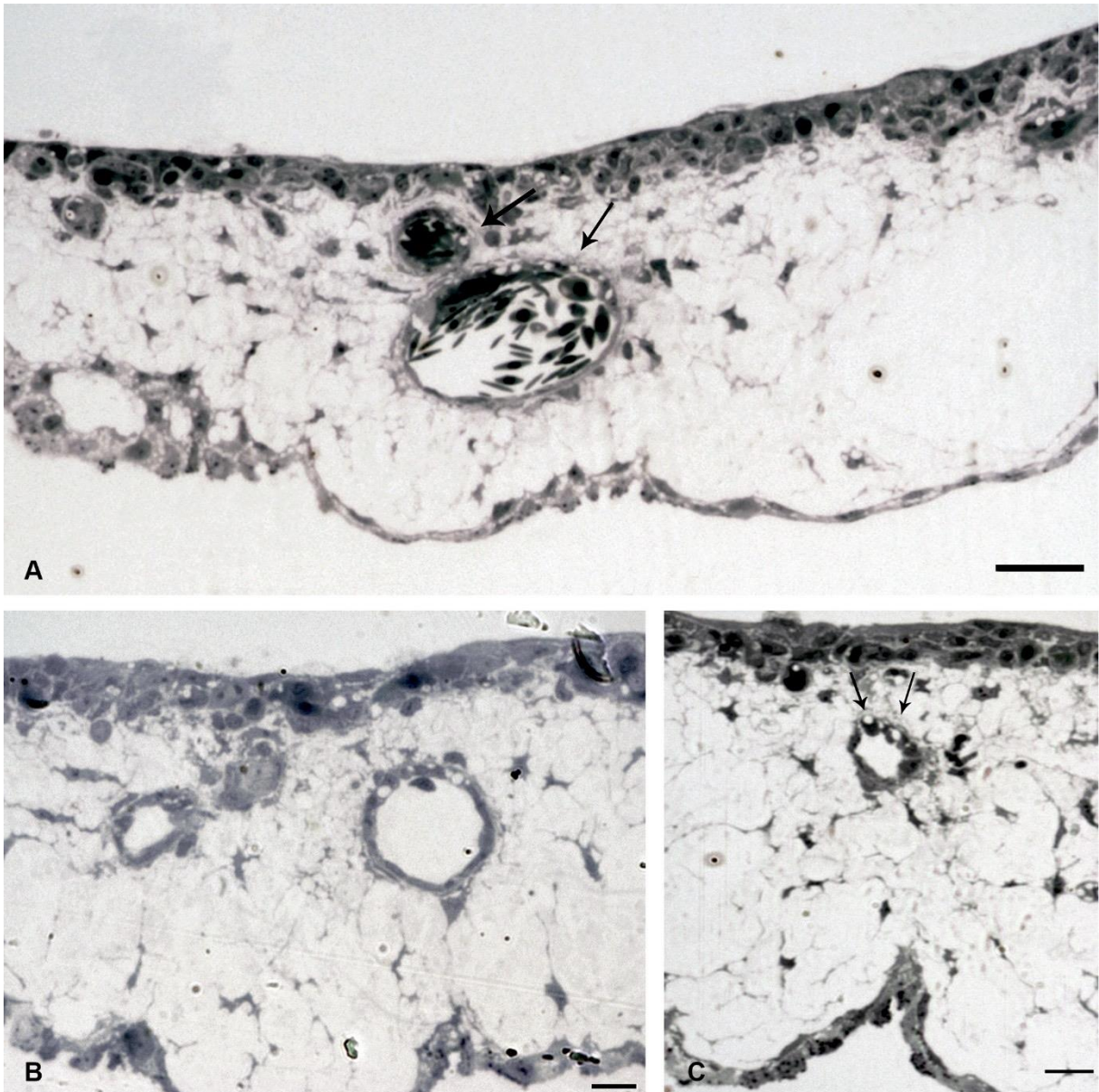


Abbildung 10: Gradient Gefäßschaden bei 2,5 Gy

Versuchsreihe 8: Bestrahlung mit 2,5 Gy am 9. Entwicklungstag, Reinkubation für 4 Tage. Lichtmikroskopische Abbildungen der bestrahlten CAM zur Veranschaulichung des Gradienten der Gefäßschädigung (mit Pfeilen markiert). **(A)** Balken = 35 μm . **(B)** Balken = 25 μm . **(C)** Balken = 30 μm .

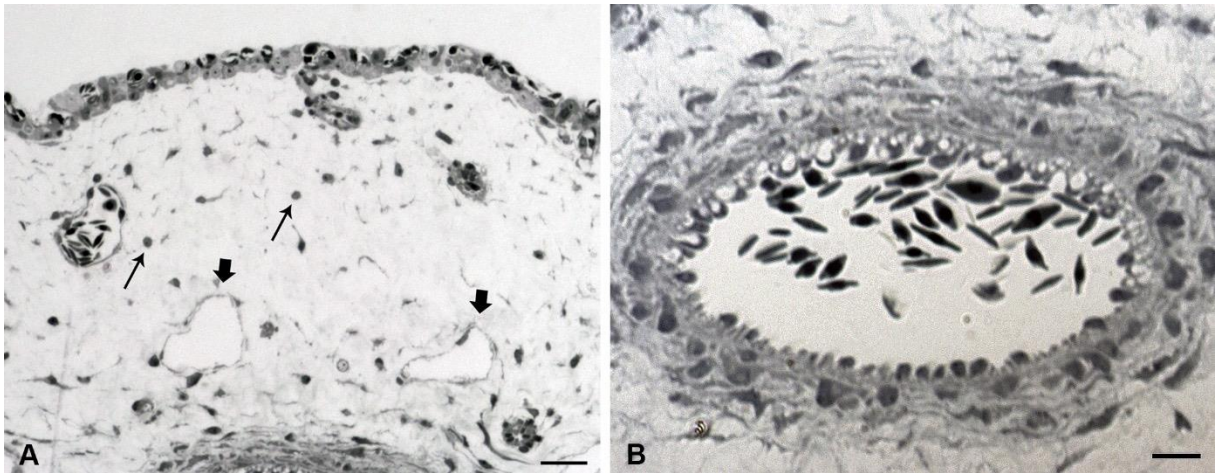


Abbildung 11: Gradient Gefäßschaden bei 10 Gy

Versuchsreihe 9: Bestrahlung mit 10 Gy am 9. Entwicklungstag, Reinkubation für 4 Tage. Lichtmikroskopische Abbildung einer bestrahlten CAM. **(A)** Am unteren Bildrand ist ein Anschnitt des in **(B)** gezeigten Gefäßes, dessen umgebendes Stroma mit Rundzellen infiltriert ist (dünne Pfeile). Die benachbarten Lymphgefäße (dicke Pfeile) erscheinen weitgehend unauffällig. Balken = 25 μm . **(B)** Geschädigtes Blutgefäß mit ausgeprägter Vakuolisierung auf der strahlenzugewandten Seite. Balken = 10 μm .

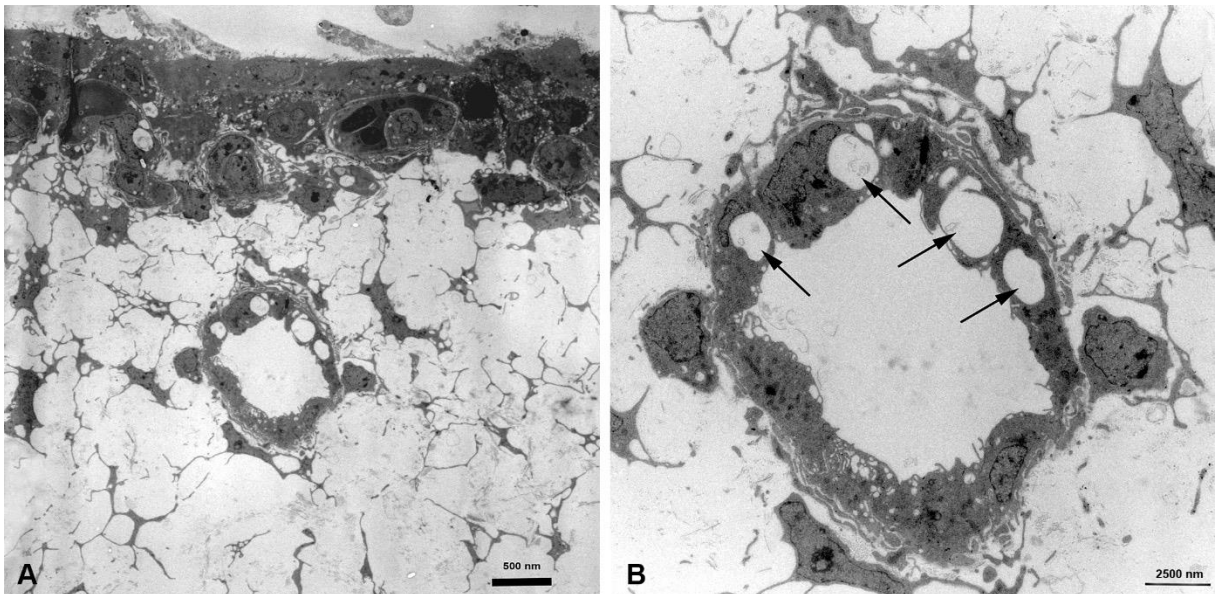


Abbildung 12: Vakuolisierung bei 2,5 Gy

Versuchsreihe 8: Bestrahlung mit 2,5 Gy am 9. Entwicklungstag, Reinkubation für 4 Tage. Elektronenmikroskopische Abbildung einer bestrahlten CAM. Deutlich sichtbar ist die Vakuolisierung des strahlenzugewandten Endothels (Pfeile). **(A)** Balken = 500 nm. **(B)** Balken = 2500 nm.

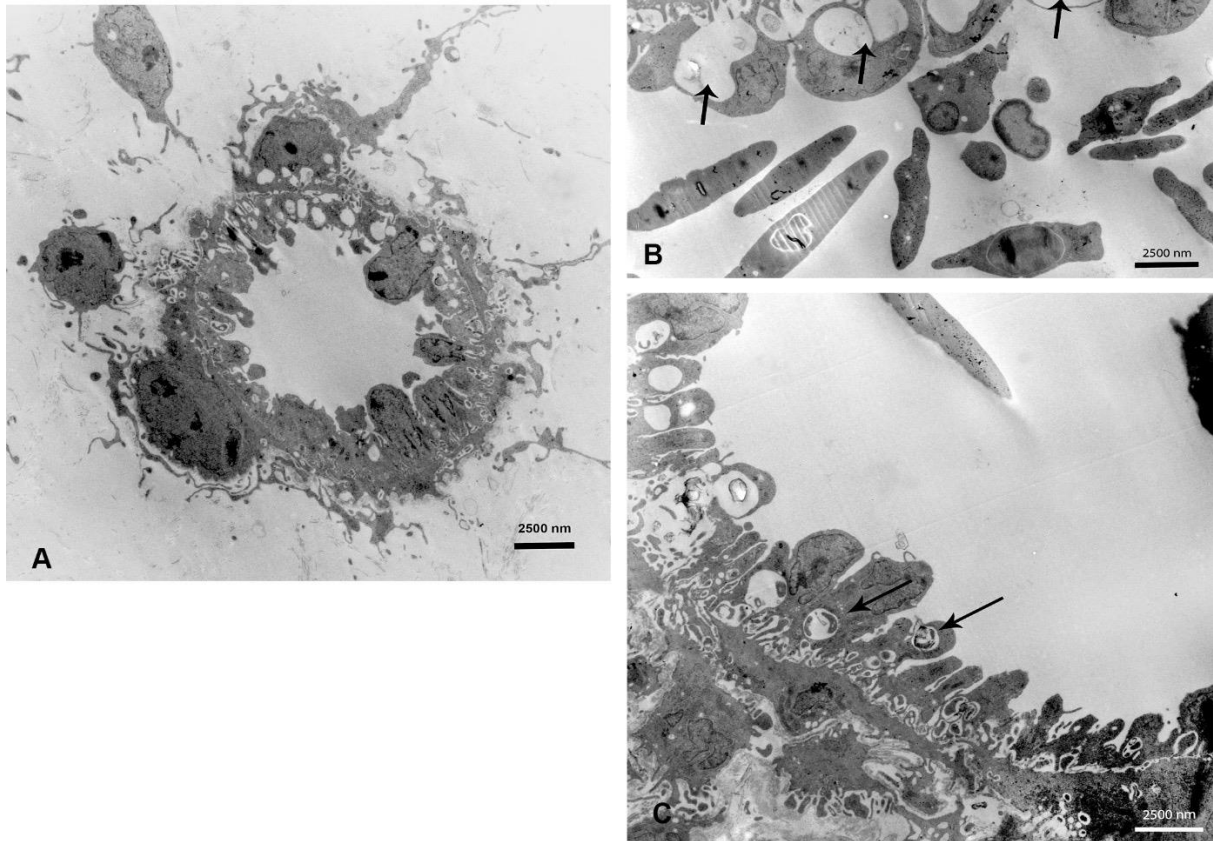


Abbildung 13: Vakuolisiertes Endothel mit intrazellulären Einschlüssen

Versuchsreihe 9: Bestrahlung mit 10 Gy am 9. Entwicklungstag, Reinkubation für 4 Tage. Elektronenmikroskopische Abbildung einer bestrahlten CAM. Balken = 2500 nm. **(A)** Sicht auf das gesamte Gefäß. **(B)** Vakuolen auf der strahlzugewandten Gefäßseite (Pfeile). **(C)** Vakuolen mit elektronen-dichten Einschlüssen (Pfeile).

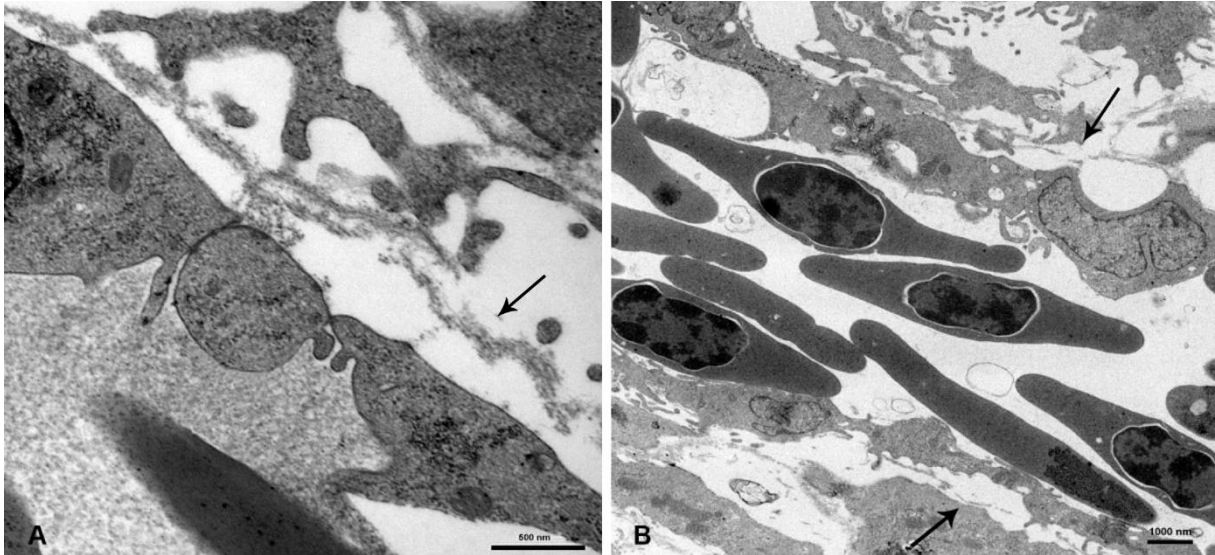


Abbildung 14: Ablösung des Endothels von der Basalmembran

Versuchsreihe 8: Bestrahlung mit 2,5 Gy am 9. Entwicklungstag, Reinkubation für 4 Tage. Elektronenmikroskopische Abbildung einer bestrahlten CAM. Das Gefäßendothel hebt sich teilweise von der Basalmembran ab (Pfeile). **(A)** Balken = 500 nm. **(B)** Balken = 1000 nm.

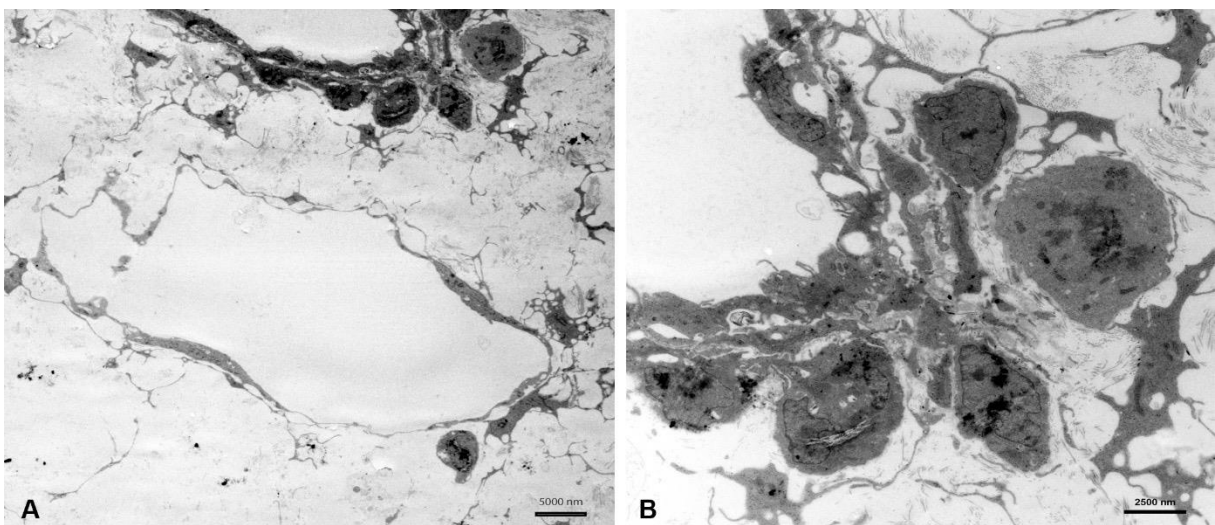


Abbildung 15: Auffällige Gefäßwandung nach Bestrahlung

Versuchsreihe 8: Bestrahlung mit 2,5 Gy am 9. Entwicklungstag, Reinkubation für 4 Tage. **(A)** Elektronenmikroskopische Abbildung einer bestrahlten CAM. Zu sehen ist der Anschnitt eines auffälligen Gefäßes am oberen Bildrand sowie ein darunterliegendes, weitgehend normal erscheinendes Lymphgefäß. Balken = 5000 nm. **(B)** Detailansicht des in (A) angeschnittenen Blutgefäßes. Abgebildet sind das vakuolisierte Endothel sowie Veränderungen der umgebenden Schicht glatter Muskelzellen. Balken = 2500 nm.

Im Gegensatz zu den Blutgefäßen wies das Endothel der Lymphgefäße im Lichtmikroskop kaum auffällige Veränderungen wie z. B. abnorme Vakuolisierungen auf (Abbildung 11: Gradient Gefäßschaden bei 10 Gy). Auch im TEM wirkte die Morphologie der Lymphgefäße zum überwiegenden Teil unverändert (Abbildung 16: Unauffällige Lymphgefäße). Dennoch konnte ich vereinzelt diskrete morphologische Veränderungen bei den am 9. Entwicklungstag bestrahlten CAMs beobachten. Einige der Lymphendothelzellen wiesen verwaschene Zellgrenzen auf und ihre Ausläufer schienen fragmentiert. Teilweise gingen die Zonulae adherentes verloren, wodurch klaffende Lücken in den wellig imponierenden Lymphkapillaren entstanden. Auch das umgebende Netz aus Kollagenfasern erschien stellenweise ungeordnet (Abbildung 17: Auffällige Lymphgefäße).

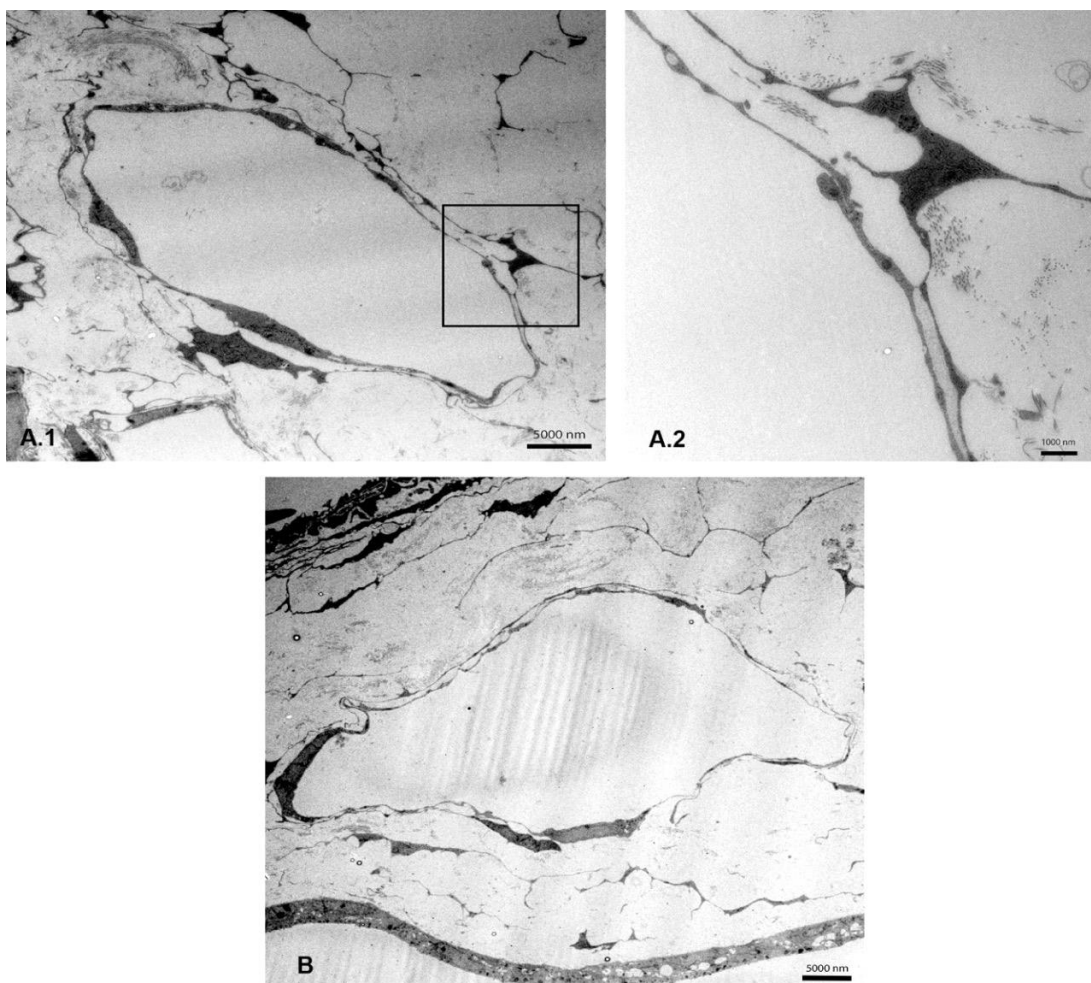


Abbildung 16: Unauffällige Lymphgefäße

(A) Versuchsreihe 8: Bestrahlung mit 2,5 Gy am 9. Entwicklungstag, Reinkubation für 4 Tage.

(A.1) Elektronenmikroskopisches Bild eines bestrahlten Lymphgefäßes normaler Morphologie. Balken = 5000 nm.

(A.2) Vergrößerter Ausschnitt eines klappenartigen Zellkontaktes (*overlapping junction*) des in (A.1) dargestellten Lymphgefäßes. Balken = 1000 nm.

(B) Elektronenmikroskopisches Bild eines normalen Lymphgefäßes einer unbestrahlten CAM am 13. Entwicklungstag zum Vergleich.

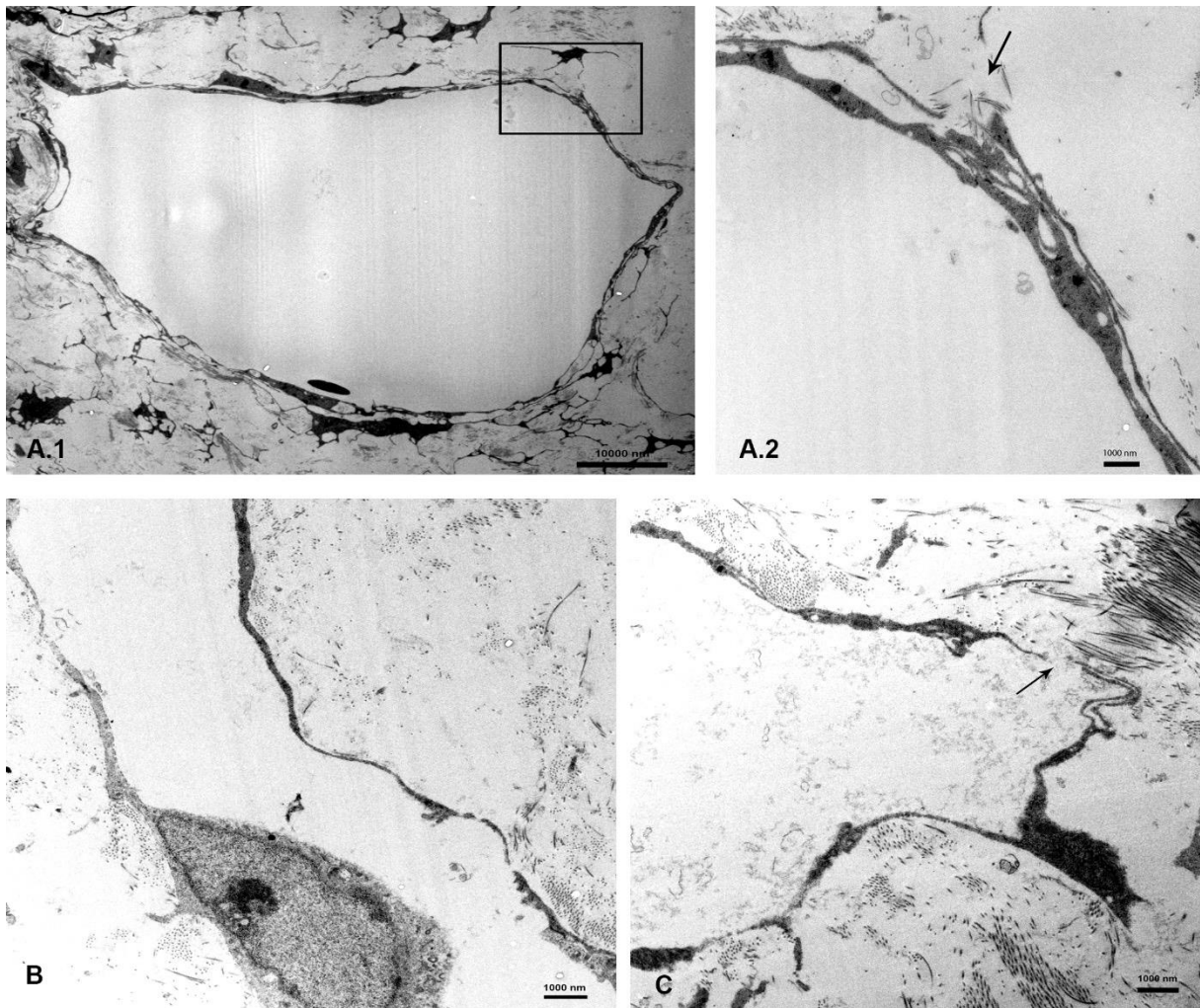


Abbildung 17: Auffällige Lymphgefäße

(A) Versuchsreihe 8: Bestrahlung mit 2,5 Gy am 9. Entwicklungstag, Reinkubation für 4 Tage.

(A.1) Elektronenmikroskopisches Bild eines bestrahlten Lymphgefäßes. Balken = 10.000 nm.

(A.2) Vergrößerung eines komplexen Zellkontaktes des in (A.1) gezeigten Gefäßes. Balken = 1000 nm.

(B) Versuchsreihe 7: Bestrahlung mit 15 Gy am 13. Entwicklungstag, Reinkubation für 4 Tage. Elektronenmikroskopische Abbildung eines mit 15 Gy bestrahlten Lymphgefäßes. Deutlich sichtbar sind mehrere Lücken im Endothel sowie verwaschene Zellgrenzen. Balken = 1000 nm.

(C) Elektronenmikroskopische Abbildung eines mit 15 Gy bestrahlten Lymphgefäßes mit Kontinuitätsunterbrechungen im Endothel (mit einem Pfeil markiert). Balken = 1000 nm.

4.3 Immunhistologische Studien

Zur genaueren Differenzierung und Charakterisierung von Blut- und Lymphgefäßen wurden immunhistologische Färbungen mit Antikörpern gegen Prox-1 und MEP-21 durchgeführt. Um eine bessere Übersicht über Zellgrenzen, Zellkontakte und apoptotische Prozesse zu erhalten, fanden zudem Antikörper gegen SNA-FITC und Caspase 3 Verwendung. Jeder Färbung wurde der Kernfarbstoff 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) zugesetzt. DAPI bindet bevorzugt an AT-reiche Regionen der DNA und emittiert blaues Licht (Kapuscinski 1995).

4.3.1 Immunhistologischer Nachweis von Prox-1 und MEP-21

Allein anhand ihrer Morphologie sind Lymphkapillaren nicht immer sicher von dünnwandigen Venen zu unterscheiden. Lymphgefäße sind in der CAM dem Arterien- und Venensystem parallelgeschaltet und nehmen ihren Ursprung im interstitiellen Bindegewebe (Papoutsi et al. 2001). Die darin enthaltenen kollagenen und elastischen Fasern können dem Flüssigkeitsstrom als Leitstrukturen in Richtung der Lymphkapillaren dienen. Lymphkapillaren beginnen blind und bilden ein mehr oder weniger feinmaschiges Kapillarnetz. Mit einem Durchmesser von 50-70 µm sind sie meist deutlich weiter und unregelmäßiger geformt als korrespondierende Blutkapillaren. Sie bestehen aus einer Lage Lymphendothelzellen, einer unvollständigen Basalmembran und einem subendothelialen Netz aus Kollagen. Im Gegensatz zu Blutkapillaren findet sich keine Ummantelung durch Perizyten. Das Kapillarlumen wird durch Ankerfilamente stabilisiert, welche die Endothelzellen mit den elastischen und kollagenen Fasern des Interstitiums verbinden (Ohtani und Ohtani 2012).

Die eichenblattartigen Ausläufer benachbarter Lymphendothelzellen überlappen sich dachziegelartig. Zellkontakte in Form von Zonulae adherentes und occludentes finden sich lediglich an der Basis dieser Fortsätze. Somit bleiben die Spitzen der Zellausläufer frei beweglich und können bei erhöhtem interstitiellen Druck geöffnet werden (Baluk et al. 2007). Durch diese bis zu 5 µm breiten interendothelialen Klappen können nun Flüssigkeit, Zellen und Makromoleküle in die Lymphkapillaren eindringen (Cueni und Detmar 2008). Trotz dieses im Vergleich zu Blutgefäßen unterschiedlichen Wandaufbaus gelingt morphologisch nicht immer eine zweifelsfreie Zuordnung. Deshalb empfiehlt sich eine Identifizierung mit für Lymphendothelzellen spezifischen immunohistochemischen Markern wie z. B. Prox-1, LYVE-1 oder dem VEGF-Rezeptor 3 (Wilting et al. 2002).

Bei Prox-1 handelt es sich um einen Homeobox-Transkriptionsfaktor, welcher für die Differenzierung von Endothelzellen in einen lymphatischen Phänotyp verantwortlich ist (Wilting et al. 2002). Homeobox-Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren, welche den Entwicklungsweg einer Zelle festlegen, indem sie die Aktivität funktionell zusammenhängender Gene regulieren. In Maus- und Vogelembryos wird Prox-1 in den Nuklei von Lymphendothelzellen und einigen nichtendothelialen Zelltypen exprimiert, nicht aber von Blutendothelzellen (Rodriguez-Niedenführ et al. 2001). Ich habe den anti-Prox-1-Antikörper mit einem rot fluoreszierenden sekundären Antikörper (Alexa 594) dargestellt.

Zum Nachweis aviärer Blutendothelzellen verwendete ich den anti-MEP-21-Antikörper (MEP = megakaryozytär erythrozytäre Progenitorzellen). Er bindet an das zur CD34 Familie gehörige Sialomuzin MEP-21, welches von einigen Autoren auch als Podocalyxin bezeichnet wird. Exprimiert wird MEP-21 unter anderem an der Oberfläche von Podozyten der Niere, Mesothelzellen, hämatopoetischen Progenitorzellen und blutvaskulären Endothelzellen (Doyonnas et al. 2005; Sasseti et al. 1998). Durch Kopplung an den Sekundärantikörper Alexa 488 erscheint MEP-21 in meinen Schnitten grün und fungiert als Blutendothelzellmarker.

Sowohl im unbestrahlten als auch im bestrahlten Gewebe ließen sich zahlreiche dünnwandige Gefäße mit Prox-1 positiven Endothelzellkernen nachweisen. Diese befanden sich hauptsächlich im Stroma der CAM, nicht jedoch in den angrenzenden Epithelschichten. Aufgrund der großen Variabilität von Vaskularisierungsmuster und Morphologie zwischen den verschiedenen CAM-Schnitten ließ sich die Quantität der Prox-1-positiven Gefäße nicht exakt vergleichen. In der Nachbarschaft großer Blutgefäße befinden sich viele Lymphgefäße, im Stroma aber nur unregelmäßig wenige Lymphkapillaren. Dennoch gewann ich nicht den Eindruck, dass in bestrahlten Eiern weniger Prox-1 positive Zellen anzutreffen waren (Abbildung 18: Prox-1- und MEP-21-Kontrolle, Abbildung 19: Prox-1 und MEP-21 bei 2,5 Gy, Abbildung 20: Prox-1 und MEP-21 bei 10 Gy).

Mit Hilfe des anti-MEP-21-Antikörpers konnte ich Blutendothelzellen identifizieren. Im Chorionepithel nicht bestrahlter Kontrollschnitte imponierte ein dichtes Kapillarnetz und im Interstitium fanden sich zahlreiche Arteriolen und Venolen. Nach Strahlenexposition konnte ich keine Reduktion der Anzahl MEP-21-positiver Zellen beobachten (Abbildung 18: Prox-1- und MEP-21-Kontrolle, Abbildung 19: Prox-1 und MEP-21 bei 2,5 Gy, Abbildung 20: Prox-1 und MEP-21 bei 10 Gy).

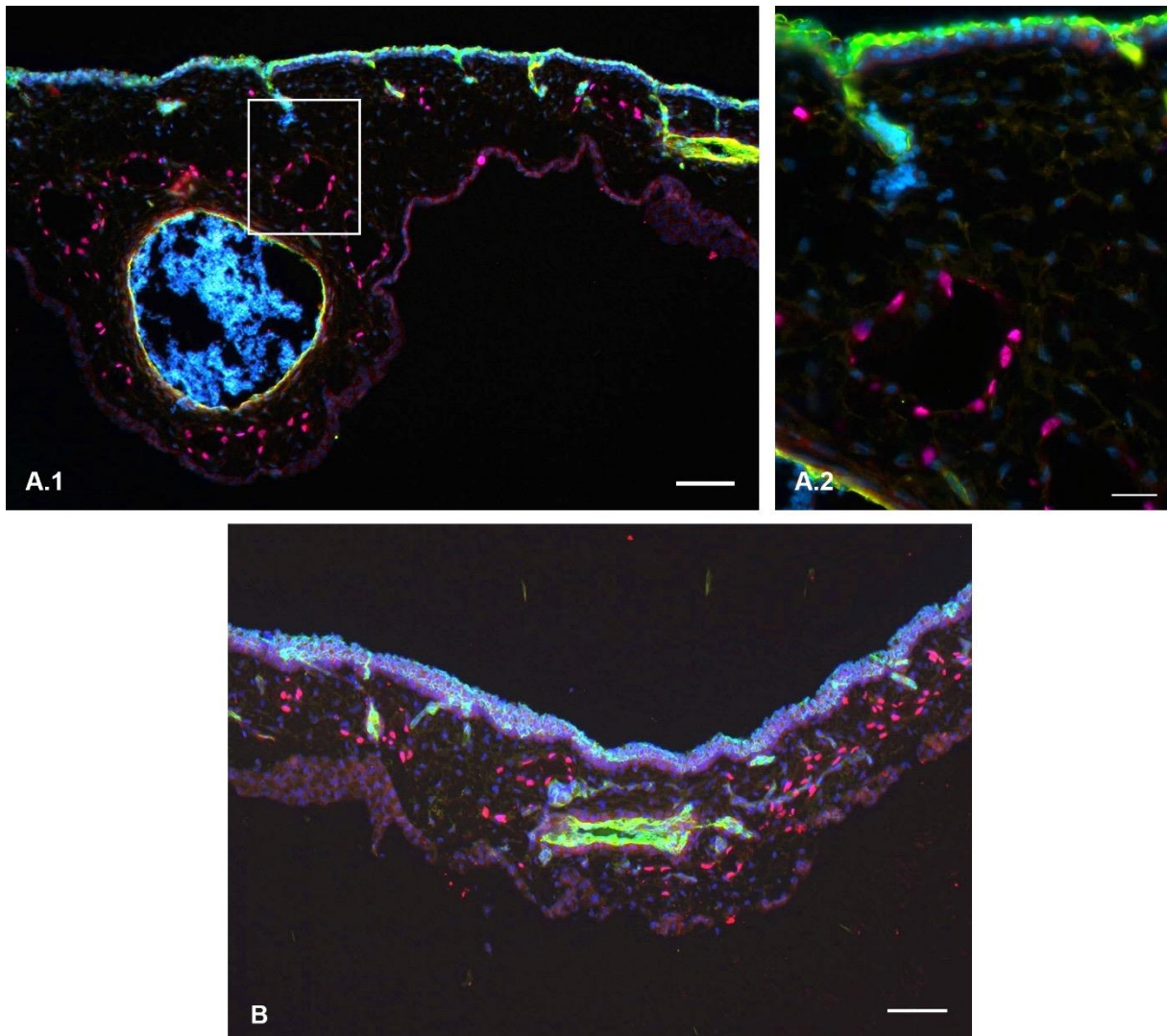


Abbildung 18: Prox-1- und MEP-21-Kontrolle

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer nicht bestrahlten, bis Tag 16 bebrüteten CAM. Gefärbt wurde mit den Antikörpern anti-Prox-1 (rot) und anti-Mep-21 (grün). **(A.1)** Balken = 60 μm . **(A.2)** Vergrößerter Ausschnitt aus (A.1). Balken = 35 μm . **(B)** Balken = 50 μm .

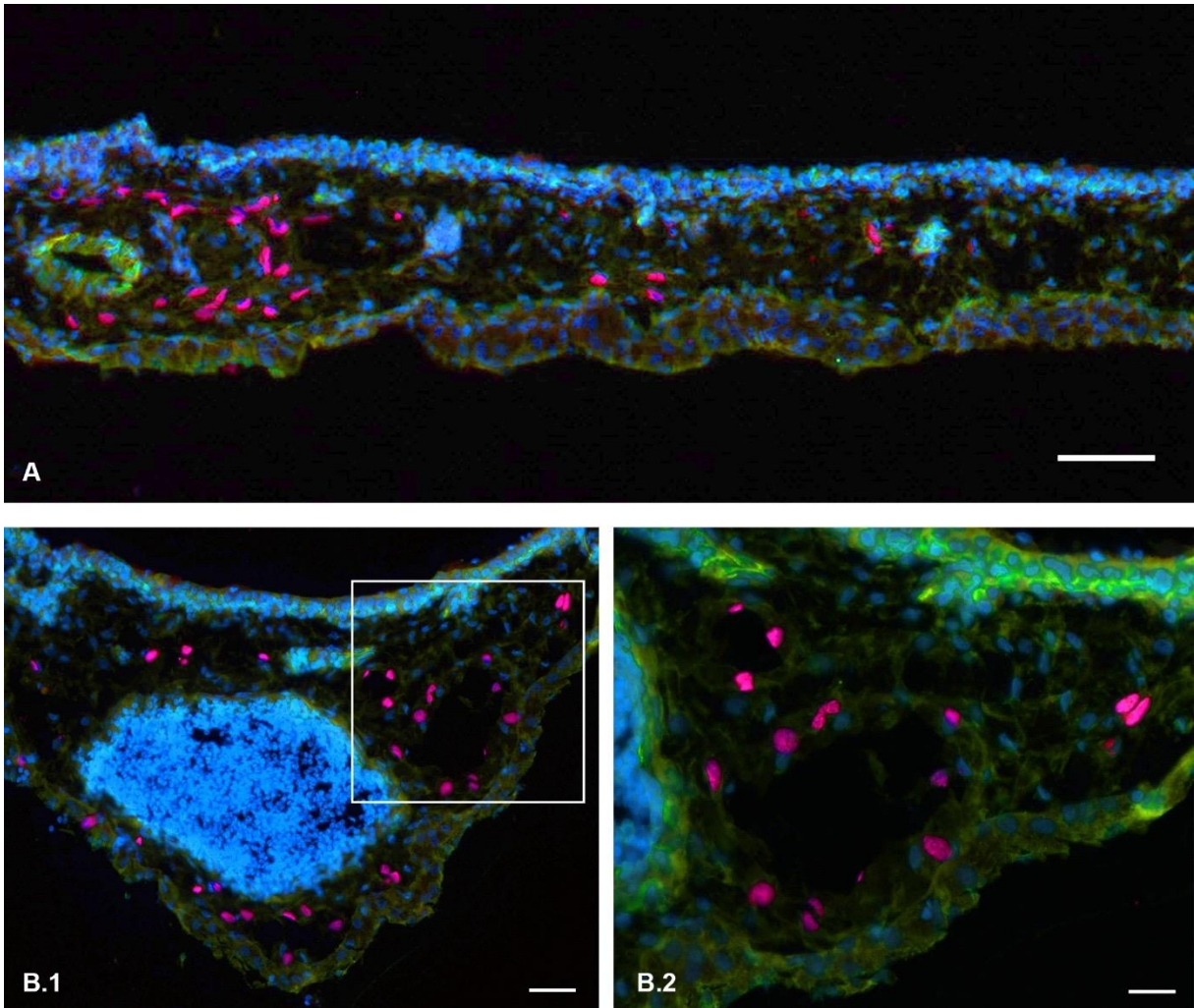


Abbildung 19: Prox-1 und MEP-21 bei 2,5 Gy

Versuchsreihe 8: Bestrahlung mit 2,5 Gy am 9. Entwicklungstag, Reinkubation für 4 Tage. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer bestrahlten CAM. Lymphendothelzellen wurden mit dem Antikörper Prox-1 (rot) und Blutendothelzellen mit dem Antikörper MEP-21 (grün) gefärbt. **(A)** Balken = 60 μm . **(B.1)** Balken = 50 μm . **(B.2)** Vergrößerter Ausschnitt aus (B.1). Balken = 30 μm .

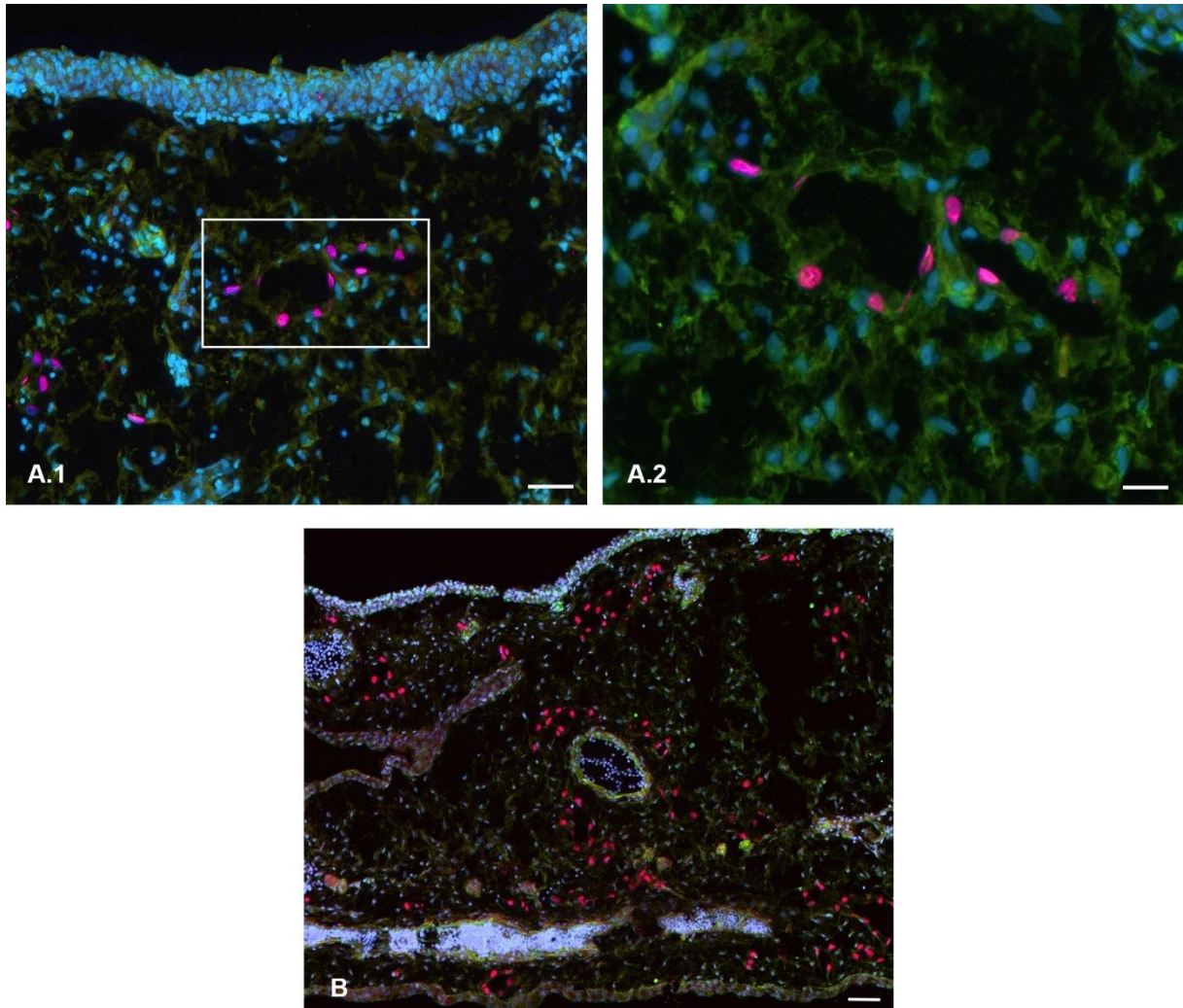


Abbildung 20: Prox-1 und MEP-21 bei 10 Gy

Versuchsreihe 9: Bestrahlung mit 10 Gy am 9. Entwicklungstag, Reinkubation für 4 Tage. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer bestrahlten Chorioallantoismembran. Gefärbt wurde mit den Antikörpern anti-Prox-1 (rot) und anti-Mep-21 (grün). **(A.1)** Balken = 50 μm . **(A.2)** Vergrößerter Ausschnitt aus (A.1). Balken = 30 μm . **(B)** Balken = 60 μm .

4.3.2 Nachweis von Lektinen mittels SNA-FITC

Lektine sind Proteine, welche eine Affinität zu spezifischen Kohlenhydratstrukturen aufweisen. Das aus dem schwarzen Holunder isolierte Sambucus-nigra-Lektin (SNA) bindet bevorzugt N-acetyl-Galactosamin. Über seine primären Aminreste wird SNA an den Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt. SNA-FITC eignet sich zur Visualisierung des Gefäßnetzes der CAM. Auch einige Rundzellen (Leukozyten) zeichnen sich durch eine positive Reaktion mit dem Sambucus-nigra-Lektin aus.

Die Färbung erlaubte eine Darstellung von Form und Kontur der Gefäße der CAM. In einigen Schnitten kombinierte ich SNA-FITC und Prox-1-Antikörper-Färbungen, womit ich die dargestellten Gefäße eindeutig dem Lymph- bzw. Blutgefäßsystem zuordnen konnte. Durch Bestrahlung konnte ich teilweise Veränderungen im Blutgefäßsystem wie Kontinuitätsunterbrechungen in der Gefäßwandung beobachten (Abbildung 21: Lektin-Nachweis mit SNA-FITC).

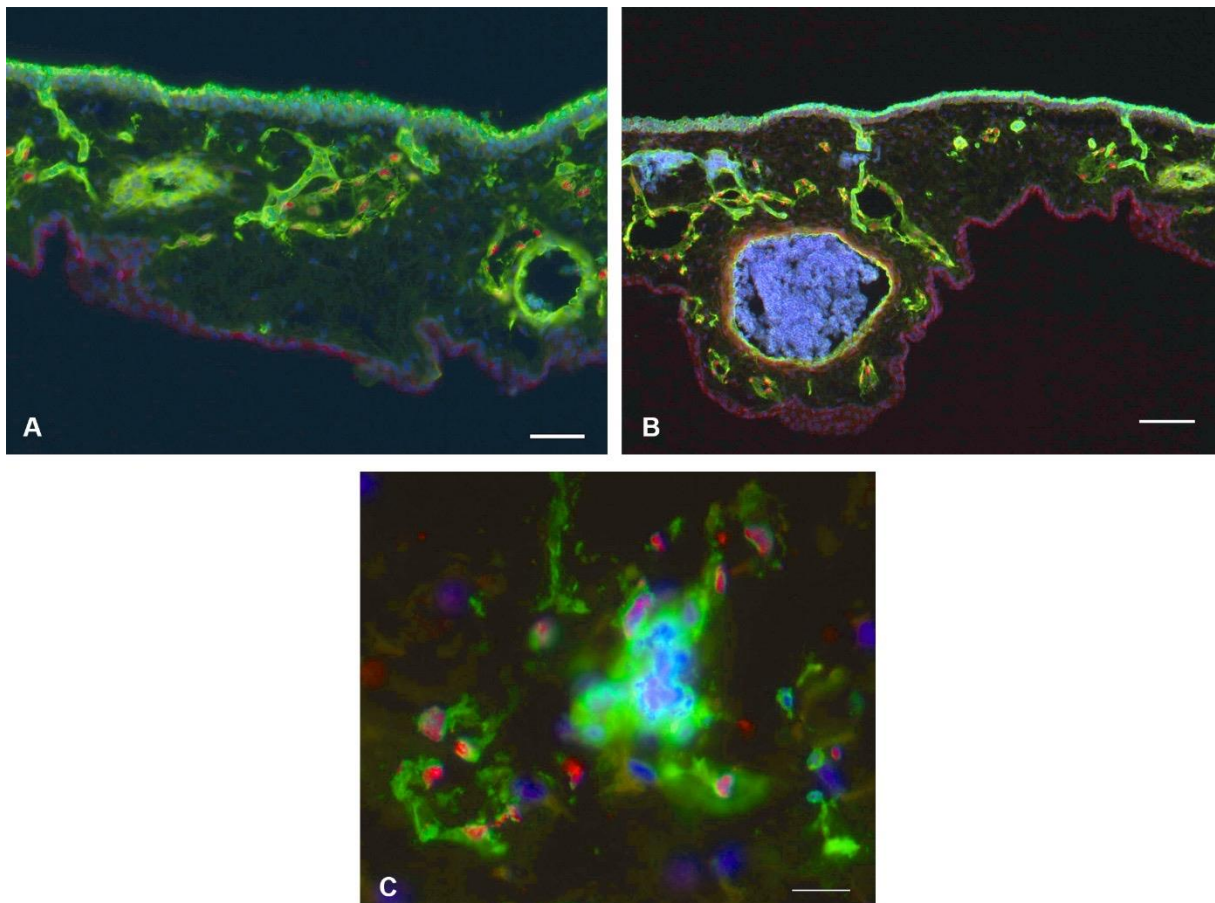


Abbildung 21: Lektin-Nachweis mit SNA-FITC

Färbungen mit Sambucus-nigra-Lektin (grün) und anti-Prox-1-Antikörpern (rot). **(A)** Nicht bestrahlte Kontrolle am 16. Entwicklungstag. Balken = 50 µm. **(B)** Nicht bestrahlte Kontrolle. Balken = 70 µm. **(C)** Fragmentiertes Blutgefäß nach Bestrahlung mit 10 Gy an Tag 13 (Versuchsreihe 4). Balken = 30 µm.

4.3.3 Färbung mit anti-gespaltene-Caspase-3-Antikörper

Caspasen (*cysteine aspartic acid proteases*) sind eine Gruppe von Proteasen, welche als zentrale Exekutive des Apoptoseprozesses fungieren. Sie exprimieren in ihrem katalytisch aktiven Zentrum die Aminosäuren Cystein und Histidin und spalten ihre Substrate C-terminal nach Asparaginsäure-Resten. Eingeteilt werden sie in Initiator- und Effektor-Caspasen. Initiator-Caspasen aktivieren Effektor-Caspasen durch limitierte Proteolyse, während letztere die Apoptose ausführen (Li und Yuan 2008). Eine besondere Stellung unter den Effektor-Caspasen nimmt hierbei die Caspase 3 ein, da sie sowohl die Funktionalität der Caspasen 6 und 7 beeinflusst als auch direkt an der Spaltung von Signalproteinen und Bestandteilen des Zytoskeletts beteiligt ist (Elmore 2007). Die Caspase 3 wird als inaktives Zymogen synthetisiert und durch Proteolyse in zwei aktive Fragmente von 12 bzw. 17 kDa gespalten (Li und Yuan 2008).

Der von mir verwendete Antikörper detektiert spezifisch das große Fragment der gespaltenen Caspase, während das komplette Enzym oder andere Spaltprodukte nicht erkannt werden. Nach Röntgenstrahlen-Exposition wies die CAM der Hühnerembryonen im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle vermehrt Apoptosefiguren auf. Diese fanden sich hauptsächlich im Bereich des Kapillarplexus des Chorionepithels und in den größeren Blutgefäßen des Stromas. Im Lymphgefäßsystem ließ sich hingegen keine vermehrte Apoptose nachweisen (Abbildung 22: Apoptose-Marker Caspase 3).

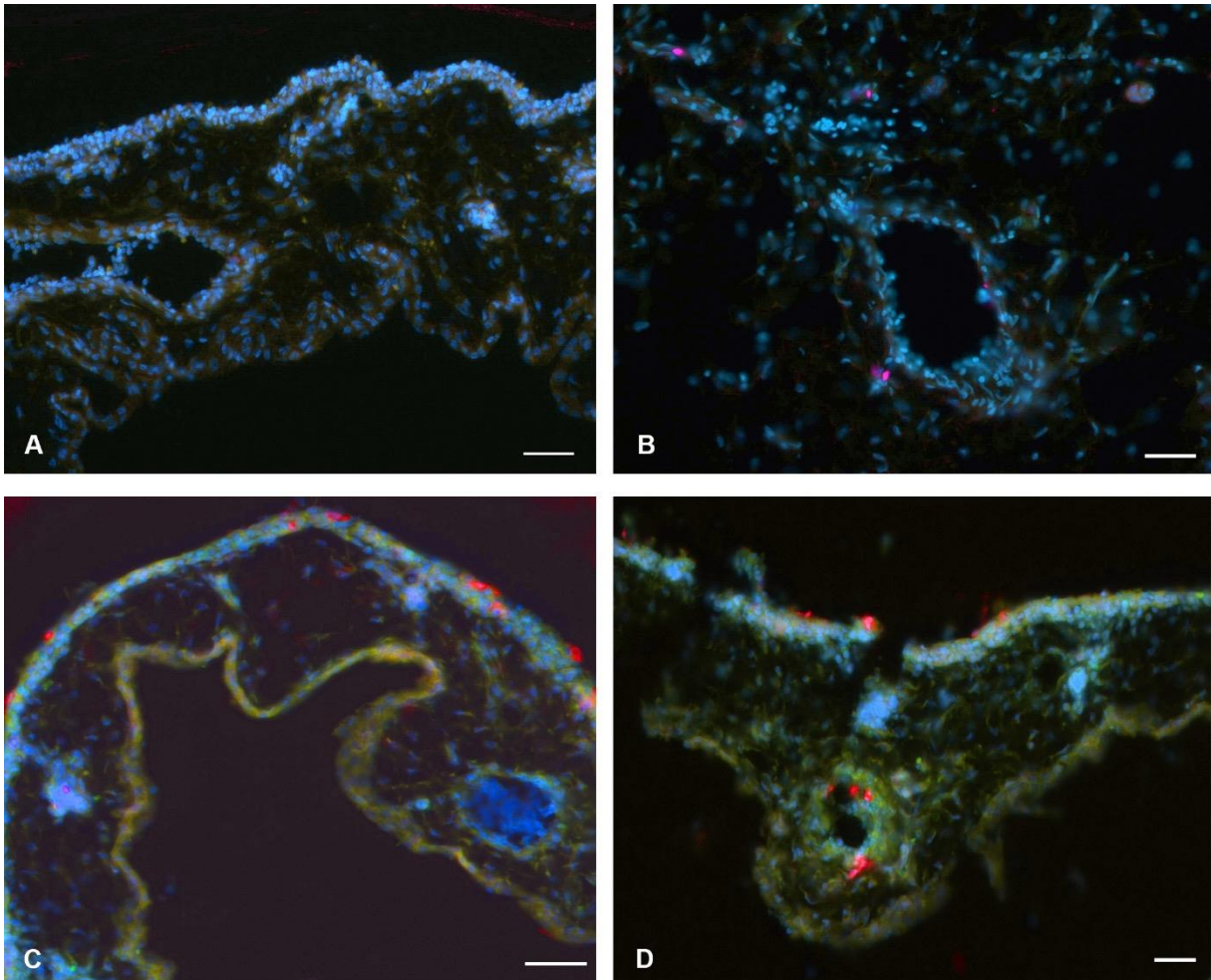


Abbildung 22: Apoptose-Marker Caspase 3

Immunhistologische Färbung mit dem Apoptose-Marker *cleaved* Caspase 3 (rot). **(A)** Nicht bestrahlte Kontrolle am 16. Entwicklungstag. Balken = 60 μm . **(B)** Apoptosefiguren (rot) einer an Tag 9 mit 10 Gy bestrahlten Chorioallantoismembran (Versuchsreihe 9). Balken = 30 μm . **(C)** Caspase 3 positive Zellen (rot) im Chorionepithel nach Bestrahlung mit 2,5 Gy am 9. Entwicklungstag (Versuchsreihe 8). Balken = 35 μm . **(D)** Caspase 3 positive Zellen (rot) im Chorionepithel und in einem größeren Gefäß nach Bestrahlung mit 2,5 Gy (Versuchsreihe 8). Balken = 30 μm .

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit beschreibe ich mit Hilfe immunhistologischer, licht- und elektronenmikroskopischer Methoden die Effekte ionisierender Strahlung auf das Blut- und Lymphgefäßsystem der Chorioallantoismembran (CAM) des Hühnerembryos. Die durch Röntgenstrahlung provozierten physikochemischen und molekularen Veränderungen sind Gegenstand vieler in-vitro und in-vivo Studien. Um möglichst akkurate Ergebnisse zu erzielen und um den Einfluss der extrazellulären Matrix zu berücksichtigen, bevorzugte ich für die Versuche ein in-vivo Modell am sich entwickelnden Hühnerembryo. Durch Veränderung der Parameter Strahlendosis und Bestrahlungszeitpunkt unter Konstanz der übrigen Variablen wurde die Dosis-Wirkungsbeziehung einerseits und der Einfluss des Entwicklungsstadiums andererseits untersucht.

5.1.1 Bestrahlungsdosis und Bestrahlungszeitpunkt

Es scheint, als sei eine einzelne Strahlendosis von 10 Gy optimal zur Evaluierung der Effekte von Röntgenstrahlung auf das Gefäßsystem der CAM. In dieser Dosierung sind die Veränderungen am Endothel maximal, ohne die Viabilität der Embryonen zu stark zu dezimieren. Des Weiteren konnte ich beobachten, dass eine Bestrahlung am 9. Entwicklungstag signifikante morphologische Schäden am Gefäßendothel hervorruft, während sich in der Mikrovaskulatur der an Tag 13 bestrahlten Hühnerembryonen kaum Veränderungen nachweisen ließen. Diese Beobachtungen sind konsistent mit den Ergebnissen anderer Forschungsarbeiten (Karnabatidis et al. 2001). Die Gruppe um D. Karnabatidis zum Beispiel untersuchte den Einfluss ionisierender Strahlung auf Hühnerembryonen mit Hilfe angiographischer Bildgebung. Durch Quantifizierung der totalen vaskulären Fläche der CAM konnten sie zeigen, dass der antiangiogene Effekt größer war, wenn der Bestrahlungszeitpunkt auf Tag 9 im Vergleich zu Tag 14 fiel (Karnabatidis et al. 2001). Um diesen Sachverhalt zu erklären, erscheint es sinnvoll sich vor Augen zu führen, dass bestrahlungsinduzierter Zelltod vor allem dann auftritt, wenn sich bestrahlte Zellen teilen. Am 9. Entwicklungstag weist das Endothel der CAM eine hohe Mitoserate auf. Die Proliferationsrate reduziert sich ab Tag 11 zugunsten der Zelldifferenzierung und nähert sich an Tag 13 einem relativ stabilen niedrigen Wert an (Ausprunk et al. 1974).

5.1.2 Effekte auf das Blutgefäßsystem

Mehrere Tage nach dem Bestrahlungszeitpunkt untersuchte ich die histologischen Veränderungen an der CAM sowohl lichtmikroskopisch an Semidünnschnitten als auch elektronen-mikroskopisch an Ultradünnschnitten. Die Histologie lässt vermuten, dass Stunden bis Tage nach Bestrahlung die Permeabilität der Gefäßwände erhöht ist, da die Schnitte im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen deutlich ödematös imponierten. Diese Beobachtung in Zusammenschau mit dem von Rundzellen infiltrierten Stroma lässt den Schluss zu, dass es sich bei der akuten Strahlenreaktion um eine Form der aseptischen Endzündungsreaktion handelt.

Mit Hilfe des Markers Caspase 3 ließen sich nach Bestrahlung vermehrt Apoptosefiguren detektieren. Die sich in Apoptose befindenden Zellen waren vor allem im Blutgefäßsystem anzutreffen, während die Lymphendothelien weitgehend unbeeinflusst blieben. Die strahlensensibelste Einheit des Blutgefäßsystems scheint die Intima zu sein, da diese die offensichtlichsten Veränderungen aufwies. Diese manifestierten sich in einer Vakuolisierung und Schwellung der Endothelzellen. Auffällig war zudem, dass diese Segregierung des Zytoplasmas vor allem an der strahlenzugewandten Seite anzutreffen war, während die strahlenabgewandte Intima weitgehend intakt imponierte. Da einige der Vakuolen intrazelluläre, elektronendichte Einschlüsse aufwiesen, lässt sich eine artifizielle Genese meiner Beobachtungen weitgehend ausschließen. Über die Pathogenese dieses Phänomens lässt sich vorerst nur spekulieren. An der Ausbildung des Gradienten könnte eine physikalische Abschwächung des Röntgenstrahls bei zunehmender Infiltrationstiefe verantwortlich sein. Auch biochemische Mechanismen oder aber eine eventuelle Polarität der Gefäße selbst könnten beteiligt sein.

Röntgenstrahlen gehören zu den elektromagnetischen Wellen und liegen mit Wellenlängen zwischen 1 pm und 0,25 nm im Spektrum zwischen der Gammastrahlung und dem ultravioletten Licht. Beim Durchtritt durch Materie verliert der Röntgenstrahl entsprechend dem Lambert-Beerschen Gesetz an Intensität. Die Abschwächung der Strahlung ist dabei anhängig vom Absorptionskoeffizienten, von der Schichtdicke und der Dichte des absorbierenden Materials (Bolus 2001). Die Wechselwirkung zwischen Röntgenstrahlung und Materie erfolgt hauptsächlich durch Photoabsorption, kohärente Streuung und Compton-Streuung (Chen et al. 2011).

Photoabsorption ist ein Prozess, bei dem ein Röntgenquant seine gesamte Energie auf Hüllelektronen eines Atoms überträgt und zur Ejektion eines Elektrons aus diesem Atom führt. Das Photon wird während dieses Prozesses vollständig absorbiert. Die Wahrscheinlichkeit hierfür steigt mit der Dichte und der Ordnungszahl des durchquerten Mediums.

Bei der Streuung interagiert das Photon mit einem Atom und erfährt dadurch einen Richtungswechsel. Es gibt zwei Typen der Streuung, kohärente Streuung und inkohärente Streuung (Compton-Streuung). Bei der kohärenten Streuung verliert der Röntgenstrahl im Gegensatz zur Compton-Streuung bei der Richtungsänderung nicht an Energie. Unter letzterer versteht man die Streuung von Röntgenquanten an Elektronen der äußeren Atomhülle. Das Elektron wird dabei emittiert, und das Photon verliert einen Teil seiner Energie und setzt seinen Weg mit größerer Wellenlänge und veränderter Richtung fort (Chen et al. 2011).

Mit einer Dicke der CAM von nur ca. 90 - 200 μm erscheint allerdings die Abschwächung der Strahlenintensität durch Absorption oder Streuung eher unwahrscheinlich. Dagegen spricht weiterhin, dass der Vakuolisierungsgradient der Gefäße in unterschiedlichen Ebenen der CAM beobachtbar ist. Auch eine Abschwächung durch das Blut selbst scheint wenig plausibel, da Blut und Interstitium ähnliche Dichtewerte aufweisen. Zudem muss berücksichtigt werden, dass die Effekte sowohl bei einer Strahlendosis von 2,5 Gy als auch bei einer Dosis von 10 Gy auftraten. Ab Erreichen eines bestimmten Schwellenwerts scheint es also zur Ausbildung des Phänomens zu kommen. Diese Überlegungen lenken die Suche nach möglichen Erklärungsansätzen auf biochemische Prozesse.

Ionisierende Strahlung kann direkt Makromoleküle einer Zelle, wie z.B. die DNA, Fette oder Proteine schädigen. DNA-Schäden entstehen durch Strangbrüche, Basenschädigungen oder Zerstörung von Wasserstoffbrückenbindungen. Dies kann zum Zelltod oder bei ausbleibender Reparatur zu Mutationen der entsprechenden Zelle führen. Durch ähnliche Prozesse werden auch die in Fettsäuren enthaltenen Doppelbindungen aufgespalten. Da Fettsäuren maßgeblicher Bestandteil von Zellmembranen sind, führt dies zu einer gesteigerten Permeabilität von Zellen und deren Organellen (Kim et al. 2014). Eine weitere Art der Interaktion ist die nicht enzymatische Reaktion mit Gewebewasser. Durch Radiolyse von Wasser entstehen Protonen und Hydroxidionen, welche sich zu weiteren sehr reaktiven Molekülen wie Wasserstoffperoxid oder Superoxid rekombinieren. Die somit entstandenen freien Radikale können wiederum Makromoleküle angreifen und deren Funktion beeinträchtigen (Bolus 2001). Schließlich führt auch die durch die Bestrahlung induzierte Entzündungsreaktion zur enzymatischen Produktion von reaktiven Sauerstoff- oder Stickstoffspezies durch Leukozyten.

Entscheidend ist zudem die durch ROS induzierte Freisetzung einer Kaskade von Chemokinen und Zytokinen. Nach Bestrahlung sind erhöhte Spiegel von TGF- β , TNF- α , IL-1 und IL-6 nachweisbar (Kim et al. 2014). Der Transforming Growth Factor- β (TGF- β) ist ein Zytokin mit pleiotropem Wirkungsmuster. Über seine Bindung an Serin/Threonin-Rezeptorkinasen und die Aktivierung von Smad Proteinen kommt es zur Induktion von Heilungsprozessen, Fibrose und Apoptose. Wegen seines Einflusses auf die Zellproliferation wird TGF- β als einer der Hauptmediatoren strahleninduzierter Fibrose angesehen (Martin et al. 2000). Der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) ist, oft synergistisch mit Interleukin-1 (IL-1), ebenfalls an einer Vielzahl inflammatorischer Prozesse beteiligt. Beide Faktoren werden hauptsächlich von Phagozyten synthetisiert und führen zu zahlreichen pro-inflammatorischen Effekten, wie beispielsweise einer erhöhten Phagozytosebereitschaft von Makrophagen oder der Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten. Es gibt Hinweise darauf, dass diese beiden Zytokine an der Genese der akuten Strahlenreaktion, hauptsächlich der Radiodermatitis, beteiligt sind (Janko et al. 2012).

Da eine exzessive ROS-Synthese zu schweren Gewebsschäden führen kann, besitzt der Organismus eine Reihe von Abwehrmechanismen. Dazu gehören Enzyme wie die in den Erythrozyten lokalisierte Glutathionperoxidase, welche H_2O_2 zu Wasser reduziert, sowie nicht enzymatische Moleküle wie Harnsäure oder die fettlöslichen Vitamine Ascorbinsäure und Tocopherol (Kim et al. 2014). Der unter Radiotherapie massive Anfall reaktiver Sauerstoffspezies kann jedoch durch die körpereigenen Verteidigungsmechanismen nicht bewältigt werden. Es kommt zu Zellfunktionsstörungen, Mutationen oder dem Tod der entsprechenden Zellen.

Womöglich ist die Antwort des von mir beobachteten Phänomens in den antioxidativen Eigenschaften des Blutes zu finden. Erythrozyten enthalten reichlich Enzyme wie die Glutathionperoxidase, welche die durch die Röntgenstrahlen induzierten Radikale unschädlich machen und somit die basale Endothelzellschicht schützen könnten. Ungeklärt bliebe aber, weshalb dieser Schutz nicht auch die strahlenzugewandte Endothelzellschicht miteinbezieht. Weiterhin denkbar wäre, dass es nicht zum Schutz des strahlenabgewandten Endothels durch Antioxidantien des Blutes kommt, sondern zur Schädigung der strahlennahen Seite durch Blutbestandteile. Möglicherweise kommt es durch die vergleichsweise hohe Sauerstoffkonzentration im Blut zur vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und damit zur Schädigung des Endothels.

Zur abschließenden Klärung besteht der Bedarf weiterführender Forschungsarbeiten. Um zum Beispiel Lagerungsbedingte Effekte ausschließen zu können, müsste in einer aufbauenden Versuchsreihe die gegenüberliegende Seite der CAM analysiert werden. In meinen Experimenten wurde ausschließlich die der Strahlungsquelle zugewandte Seite der Chorioallantoismembran entnommen. Bei Betrachtung des Teils der CAM, auf dem das Ei aufliegt, wäre der Strahlengang in Bezug auf das Gefäßsystem invertiert. Sollte sich nun ebenfalls eine stärkere Vakuolisierung auf der strahlenzugewandten Seite des Endothels zeigen, könnten lagerungsbedingte Effekte, Einflüsse der Schwerkraft und eine etwaige intrinsische Polarität des Gefäßsystems weitgehend ausgeschlossen werden.

5.1.3 Effekte auf das Lymphgefäßsystem

Obwohl die Strahlentherapie ein bekannter Risikofaktor für die Entstehung von Lymphödemen ist, bleiben die zugrundeliegenden Mechanismen bisher noch weitgehend unklar (Ryan et al. 2003; Rebegea et al. 2015; Yamazaki et al. 2015). Um spezifische Präventionsmaßnahmen oder Therapien zu entwickeln, gilt es jedoch zur Verbesserung von Lebensqualität und Morbidität vieler Tumorpatienten diese Wissenslücke zu schließen. Zu den durch Lymphödeme verschuldeten Symptomen gehören Infektionen, Schmerzen, Bewegungseinschränkungen und Kraftverlust. Auch psychologische Morbiditäten wie Depressionen oder Angststörungen sind mit diesem Leiden assoziiert (Ahmed et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit demonstriere ich die Effekte ionisierender Strahlung auf das Lymphgefäßsystem der Chorioallantoismembran. Im Vergleich zum Blutgefäßsystem waren die Effekte deutlich weniger imposant ausgeprägt. Lichtmikroskopisch konnten keine Veränderungen der Lymphgefäße festgestellt werden. Auch immunhistologisch fand sich keine Reduktion Prox-1-positiver Zellen. Zudem kam es im Gegensatz zu den Zellen der Blutgefäße nicht zu einem vermehrten Vorkommen apoptotischer Figuren. Lediglich bei Betrachtung der Lymphgefäße unter dem Elektronenmikroskop konnten diskrete Veränderungen wie ein teilweiser Verlust der Zonulae adherentes beobachtet werden. Vereinzelt imponierten die Zellgrenzen unscharf, und es waren Lücken im wellig anmutenden Lymphendothel zu sehen. Auffällig war weiterhin die die Gefäße umgebende extrazelluläre Matrix, deren kollagene Fasern stellenweise aufgelockert und ungeordnet wirkten. Ähnliche Ergebnisse lieferten Experimente der koreanischen Forschungsgruppe von Sung und Mitarbeitern. Untersucht wurde der Einfluss ionisierender Strahlung auf das Endothel von Blut- und Lymphgefäßen des Dünndarms. Es zeigte sich, dass die Lymphendothelzellen strahlenresistent waren, während die Endothelzellen des Blutgefäßsystems sehr sensibel auf die Bestrahlung reagierten (Sung et al. 2006).

Worauf aber beruht die beobachtete geringere Strahlenempfindlichkeit der Lymphgefäße? Eine denkbare Ursache wären Differenzen in Struktur, Zellbeschaffenheit und Aufbau der beiden Gefäßsysteme. Ebenfalls in Betracht gezogen werden müssen Unterschiede des Blutes und der Lymphflüssigkeit selbst. Die periphere pränodale Lymphflüssigkeit wird im interstitiellen perikapillären Raum gebildet und ist das Resultat eines durch den hydrostatischen Druck in den Kapillaren bedingten Filtrationsprozesses. Obwohl damit die Lymphflüssigkeit gewissermaßen einem Ultrafiltrat des Plasmas entspricht, konnten in den letzten Jahren Unterschiede in der Proteinzusammensetzung der beiden Flüssigkeiten aufgedeckt werden (Clement et al. 2013).

Die Lymphe steht im Kontakt mit Bindegewebe und parenchymatösen Organen und enthält damit nicht nur Plasmaproteine, sondern auch Proteine aus dem Metabolismus dieser Organe und aus dem Lymphendothel selbst (Clement et al. 2010). Komparative Analysen zwischen Lymphe und Plasma zeigten, dass das Lymphproteom teilweise Proteine enthält, die im Plasma nicht oder nur in geringerer Konzentration vorhanden sind. Dazu zählten unter anderem Immunglobuline, Laktoferrin, Apolipoprotein A-1, alpha-1-Antitrypsin, Annexin A1, Cystatin A, Desmoglein-1 und Glutathion S-Transferase (Interewicz et al. 2004; Clement et al. 2013).

Neben einer anderen Proteinzusammensetzung könnte auch eine Differenz des Sauerstoffgehaltes zwischen Blut und Lymphe relevant sein. Schon seit Beginn des 20. Jahrhunderts ist bekannt, dass Sauerstoff einen Einfluss auf die Radiosensibilität von Geweben hat (Liu et al. 2015). Molekularer Sauerstoff (O₂) ist ein in hohem Maße elektronenaffines Molekül und führt über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zu den bereits genannten Schäden an DNA, Proteinen und Membranen (Alexander und Charlesby 1954). Zellen, welche sich während der Bestrahlung in anoxischem Zustand befinden, sind etwa 3x so strahlenresistent wie gut oxygenierte Zellen (Rockwell et al. 2009).

Der vierte Tag nach Strahlenexposition, an welchem ich die Chorioallantoismembran entnahm, fällt in die Phase der akuten Strahlenreaktion. Limitiert durch das Modell des Hühnerembryos, konnte keine Analyse der späten Strahlenschäden erfolgen. Möglicherweise liegt die nur diskret veränderte Morphologie der Lymphgefäße darin begründet, dass der Hauptschaden erst im Rahmen der Spätreaktion durch fibrotische Prozesse entsteht. Es ist bekannt, dass ionisierende Strahlung, vermittelt durch Zytokine wie TGF-β1, zu einer Aktivierung von Myofibroblasten und damit zur Gewebefibrosierung führt (Avraham et al. 2010) Martin et al. 2000). Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix fibrotischer Gewebe unterscheidet sich durch die Dominanz dicker Kollagenfaserbündel von gesunder Matrix und vermindert dadurch deren Compliance (Wernicke et al. 2013). Denkbar wäre deshalb eine Einschränkung des lymphatischen Transports durch fibrotisch erhöhte Gewebedrucke. Eine negative Korrelation des Fibrosegrades und der lymphatischen Transportkapazität konnte bereits nachgewiesen werden (Lynch et al. 2015; Avraham et al. 2010).

Ebenfalls möglich wäre ein sekundärer Untergang großer Lymphgefäße als Folge der Schäden am Blutgefäßsystem. Lymphkolektoren werden von einem dichten Netz aus *Vasa vasorum* mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt (Aglianò et al. 1997). Durch den von mir beobachteten toxischen Einfluss ionisierender Strahlung auf Blutgefäße, könnte es durch eine Dezimierung der *Vasa vasorum* zum Verlust größerer lymphatischer Gefäße kommen.

6 Zusammenfassung

Das Thema der vorliegenden Dissertation ist die Beschreibung der Effekte ionisierender Strahlung auf das Blut- und Lymphgefäßsystem. Ziel ist ein besseres Verständnis strahleninduzierter Schäden als Grundlage für die Entwicklung präventiver und therapeutischer Maßnahmen gegen die zahlreichen mit Strahlentherapie assoziierten Morbiditäten. Als in-vivo Modell wurde die stark vaskularisierte Chorioallantoismembran (CAM) von Hühnerembryonen genutzt. Diese wurde am 9. bzw. 13. Entwicklungstag Röntgenstrahlen einer Dosis von 2,5, 10 und 15 Gy exponiert und daraufhin 4 Tage reinkubiert. Zur morphologischen Analyse wurden Semi- und Ultradünnschnitte angefertigt und diese licht- bzw. elektronenmikroskopisch untersucht. Zur genaueren Unterscheidung zwischen Lymph- und Blutgefäßen wurden immunhistologische Färbungen mit Antikörpern gegen Prox-1 und MEP-21 durchgeführt. Um eine bessere Übersicht über Zellgrenzen, Zellkontakte und apoptotische Prozesse zu erhalten, wurden zudem das Lektin SNA-FITC und Antikörper gegen *cleaved* Caspase 3 verwendet.

Wie erwartet präsentierte sich das am Tag 9 der Entwicklung bestrahlte Gewebe strahlensensibler als die am 13. Tag bestrahlten Eier, was ich auf die zum früheren Zeitpunkt erhöhte Mitoserate der CAM-Mikrovaskulatur zurückführe. Bezüglich der Strahlendosis zeigten sich bereits ab 2,5 Gy histologische Veränderungen, obgleich diese etwas geringer ausgeprägt waren als bei den mit 10 und 15 Gy bestrahlten Geweben. Aus der Auswertung der verschiedenen Versuchsreihen geht hervor, dass sich eine Strahlendosis von 10 Gy sowie ein Expositionszeitpunkt am 9. Entwicklungstag am besten für das Studium strahleninduzierter Effekte auf die Gefäße der CAM eignet. In dieser Konstellation sind die Veränderungen am Endothel maximal, ohne die Viabilität der Embryonen zu stark zu dezimieren.

Bei licht- und elektronenmikroskopischer Betrachtung am Tag 4 nach Bestrahlung zeigte sich ein ödematös verbreitertes, mit zahlreichen Rundzellen infiltrierte Stroma als Korrelat einer aseptischen Entzündungsreaktion. Die Strahlenschäden am Blutgefäßsystem manifestieren sich überwiegend in Form von Vakuolisierungen und Schwellungen der Endothelzellen. Hierbei war auffällig, dass die Veränderungen einem Gradienten folgend vor allem an der Intimaseite anzutreffen waren, welche der Strahlenquelle zugewandt war.

Im Vergleich mit den Blutgefäßen waren die Effekte im Lymphsystem deutlich weniger imposant ausgeprägt. Lediglich unter elektronenmikroskopischer Betrachtung konnten vereinzelte Auffälligkeiten der Lymphgefäße festgestellt werden. Auch immunhistologisch fand sich keine Reduktion Prox1-positiver Zellen. Mit Hilfe des Apoptosemarkers *cleaved* Casepase-3 konnten vermehrt Apoptosefiguren im Bereich der Blutgefäße, jedoch nicht im Bereich der Lymphgefäße, detektiert werden.

Damit scheint das Endothel der Blutgefäße die strahlensensibelste Einheit der CAM zu sein. Worauf die von mir beobachtete differierende Empfindlichkeit zurückzuführen ist, lässt sich vorerst nur spekulieren. Mögliche Erklärungsansätze umfassen intrinsische Unterschiede zwischen Lymph- und Blutendothelien selbst oder aber schädigende bzw. protektive Eigenschaften der beiden Flüssigkeiten. Lymphe und Blut unterscheiden sich sowohl in ihrer Zell- und Proteinzusammensetzung als auch in ihrem Gasgehalt. Denkbar wäre demnach zum Beispiel eine geringere Radikalbildung im Lymphgefäßsystem durch die dort herrschenden niedrigeren Sauerstoffkonzentrationen.

Aufgrund der Tatsache, dass die häufigste Ursache sekundärer Lymphödeme die Radiotherapie von Tumorpatienten ist, liegt eine durch sie induzierte Schädigung des Lymphgefäßsystems nahe. Im Rahmen der von mir untersuchten Akutreaktion konnten jedoch nur minimale Veränderungen der Lymphgefäße festgestellt werden. Möglicherweise entsteht der Schaden am Lymphgefäßsystem sekundär im Rahmen der erst im Verlauf einsetzenden Fibrosierungsreaktion. Alternativ könnte auch ein Untergang der Lymphkollektoren durch eine Destruktion der sie versorgenden *Vasa vasorum* pathogenetische Relevanz besitzen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die akute Strahlenreaktion vor allem im Bereich des Blutgefäßsystems manifestiert, während das Lymphgefäßsystem primär weitgehend intakt erscheint. Zur pathogenetischen Klärung dieses Phänomens wäre die Durchführung darauf aufbauender Forschungsarbeiten wünschenswert.

7 Literaturverzeichnis

- Aglianò M, Sacchi G, Weber E, Pucci AM, Comparini L (1997): Vasa vasorum of superficial collecting lymphatics of human thigh. *Lymphology* 30, 116–121
- Ahmed RL, Prizment A, Lazovich D, Schmitz KH, Folsom AR (2008): Lymphedema and Quality of Life in Breast Cancer Survivors: The Iowa Women's Health Study. *J Clin Oncol* 26, 5689–5696
- Alexander P, Charlesby A (1954): Energy transfer in macromolecules exposed to ionizing radiations. *Nature* 173, 578–579
- Ausprunk DH, Knighton DR, Folkman J (1974): Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois: a structural and autoradiographic study. *Dev Biol* 38, 237–248
- Avraham T, Yan A, Zampell JC, Daluvoy SV, Haimovitz-Friedman A, Cordeiro AP, Mehrara BJ (2010): Radiation therapy causes loss of dermal lymphatic vessels and interferes with lymphatic function by TGF- β 1-mediated tissue fibrosis. *Am J Physiol - Cell Physiol* 299, C589–C605
- Baluk P, Fuxe J, Hashizume H, Romano T, Lashnits E, Butz S, Vestweber D, Corada M, Molendini C, Dejana E, McDonald DM (2007): Functionally specialized junctions between endothelial cells of lymphatic vessels. *J Exp Med* 204, 2349–2362
- Bergonié J, Tribondeau L (2003): Interpretation of some results from radiotherapy and an attempt to determine a rational treatment technique. 1906. *Yale J Biol Med* 76, 181–182
- Bolus NE (2001): Basic review of radiation biology and terminology. *J Nucl Med Technol* 29, 67-73; test 76-77
- Carlson JW, Kauderer J, Walker JL, Gold MA, O'Malley D, Tuller E, Clarke-Pearson DL, Gynecologic Oncology Group (2008): A randomized phase III trial of VH fibrin sealant to reduce lymphedema after inguinal lymph node dissection: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 110, 76–82
- Chapman JD, Stobbe CC, Gales T, Das IJ, Zellmer DL, Biade S, Matsumoto Y (1999): Condensed chromatin and cell inactivation by single-hit kinetics. *Radiat Res* 151, 433–441
- Chen H, He X, Sheng C, Ma Y, Nie H, Xia W, Ying W (2011): Interactions between synchrotron radiation X-ray and biological tissues — theoretical and clinical significance. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 3, 243–248
- Clement CC, Cannizzo ES, Nastke M-D, Sahu R, Olszewski W, Miller NE, Stern LJ, Santambrogio L (2010): An expanded self-antigen peptidome is carried by the human lymph as compared to the plasma. *PLoS One* 5, e9863
- Clement CC, Aphkhasava D, Nieves E, Callaway M, Olszewski W, Rotzschke O, Santambrogio L (2013): Protein expression profiles of human lymph and plasma mapped by 2D-DIGE and 1D SDS-PAGE coupled with nanoLC-ESI-MS/MS bottom-up proteomics. *J Proteomics* 78, 172–187

- Coleman JR, DeWitt SM, Batt P, Terepka AR (1970): Electron probe analysis of calcium distribution during active transport in chick chorioallantoic membrane. *Exp Cell Res* 63, 216–220
- Cueni LN, Detmar M (2008): The Lymphatic System in Health and Disease. *Lymphat Res Biol* 6, 109–122
- Dimitropoulou C, Malkusch W, Fait E, Maragoudakis ME, Konerding MA (1998): The vascular architecture of the chick chorioallantoic membrane: sequential quantitative evaluation using corrosion casting. *Angiogenesis* 2, 255–263
- Doyonnas R, Nielsen JS, Chelliah S, Drew E, Hara T, Miyajima A, McNagny KM (2005): Podocalyxin is a CD34-related marker of murine hematopoietic stem cells and embryonic erythroid cells. *Blood* 105, 4170–4178
- Elmore S (2007): Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, 495–516
- Forman HJ, Torres M (2002): Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Respir Crit Care Med* 166, S4-8
- Furdui CM (2014): Ionizing Radiation: Mechanisms and Therapeutics. *Antioxid Redox Signal* 21, 218–220
- Gabrielli MG, MATERAZZI G, COX JV, MENGHI G (2001): Specialised cell types in the chorioallantoic membrane express carbonic anhydrase during chick embryogenesis. *J Anat* 198, 229–238
- Gabrielli MG, Accili D, Gabrielli MG, Accili D (2010): The Chick Chorioallantoic Membrane: A Model of Molecular, Structural, and Functional Adaptation to Transepithelial Ion Transport and Barrier Function during Embryonic Development, The Chick Chorioallantoic Membrane: A Model of Molecular, Structural, and Functional Adaptation to Transepithelial Ion Transport and Barrier Function during Embryonic Development. *BioMed Res Int BioMed Res Int* 2010, 2010, e940741
- Hamada N, Fujimichi Y (2014): Classification of radiation effects for dose limitation purposes: history, current situation and future prospects. *J Radiat Res (Tokyo)* 55, 629–640
- Hanahan D, Weinberg RA (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674
- Interewicz B, Olszewski WL, Leak LV, Petricoin EF, Liotta LA (2004): Profiling of normal human leg lymph proteins using the 2-D electrophoresis and SELDI-TOF mass spectrophotometry approach. *Lymphology* 37, 65–72
- Janko M, Ontiveros F, Fitzgerald TJ, Deng A, DeCicco M, Rock KL (2012): IL-1 generated subsequent to radiation-induced tissue injury contributes to the pathogenesis of radiodermatitis. *Radiat Res* 178, 166–172
- Kapuscinski J (1995): DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem Off Publ Biol Stain Comm* 70, 220–233
- Karnabatidis D, Dimopoulos JCA, Siablis D, Papazafiroopoulos D, Kalogeropoulou CP, Nikiforidis G (2001): Quantification of the Ionising Radiation Effect Over Angiogenesis in the Chick Embryo and Its Chorioallantoic Membrane by Computerised Analysis of Angiographic Images. *Acta Radiol* 42, 333–338

- Kim JH, Jenrow KA, Brown SL (2014a): Mechanisms of radiation-induced normal tissue toxicity and implications for future clinical trials. *Radiat Oncol J* 32, 103–115
- Kinoshita K, Ishimine H, Shiraishi K, Kato H, Doi K, Kuno S, Kanayama K, Mineda K, Mashiko T, Feng J, et al. (2014): Cell and Tissue Damage after Skin Exposure to Ionizing Radiation: Short- and Long-Term Effects after a Single and Fractional Doses. *Cells Tissues Organs* 200, 240–252
- Leeson TS, Leeson CR (1963): The chorio-allantois of the chick. Light and electron microscopic observations at various times of incubation. *J Anat* 97, 585–595
- Li J, Yuan J (2008): Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 27, 6194–6206
- Liu C, Lin Q, Yun Z (2015): Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Oxygen-Dependent Radiosensitivity. *Radiat Res* 183, 487–496
- Lynch LL, Mendez U, Waller AB, Gillette AA, Guillory RJ, Goldman J (2015): Fibrosis worsens chronic lymphedema in rodent tissues. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol* 308, H1229–H1236
- Makanya AN, Dimova I, Koller T, Styp-Rekowska B, Djonov V (2016): Dynamics of the Developing Chick Chorioallantoic Membrane Assessed by Stereology, Allometry, Immunohistochemistry and Molecular Analysis. *PLoS ONE* 11, e0152821
- Martin M, Lefaix J-L, Delanian S (2000): TGF- β 1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? *Int J Radiat Oncol* 47, 277–290
- Melkonian G, Munoz N, Chung J, Tong C, Marr R, Talbot P (2002): Capillary plexus development in the day five to day six chick chorioallantoic membrane is inhibited by cytochalasin D and suramin. *J Exp Zool* 292, 241–254
- Mohd KI, Mrigesh M, Singh B, Singh I (2016): Ultrastructural study on the granulocytes of Uttara fowl (*Gallus domesticus*). *Vet World* 9, 320–325
- Morgan PA, Moffat CJ (2006): International consensus on managing lymphoedema. *Nurs Times* 102, 42, 44
- Narbaitz R, Bastani B, Galvin NJ, Kapal VK, Levine DZ (1995): Ultrastructural and immunocytochemical evidence for the presence of polarised plasma membrane H(+)-ATPase in two specialised cell types in the chick embryo chorioallantoic membrane. *J Anat* 186, 245–252
- Ohtani O, Ohtani Y (2012): Recent Developments in Morphology of Lymphatic Vessels and Lymph Nodes. *Ann Vasc Dis* 5, 145–150
- Papoutsis M, Tomarev SI, Eichmann A, Pröls F, Christ B, Wilting J (2001): Endogenous origin of the lymphatics in the avian chorioallantoic membrane. *Dev Dyn* 222, 238–251
- Rebegea L, Firescu D, Dumitru M, Anghel R (2015): The incidence and risk factors for occurrence of arm lymphedema after treatment of breast cancer. *Chir Buchar Rom* 1990 110, 33–37
- Reisz JA, Bansal N, Qian J, Zhao W, Furdui CM (2014): Effects of Ionizing Radiation on Biological Molecules—Mechanisms of Damage and Emerging Methods of Detection. *Antioxid Redox Signal* 21, 260–292

- Rockwell S, Dobrucki IT, Kim EY, Marrison ST, Vu VT (2009): Hypoxia and radiation therapy: Past history, ongoing research, and future promise. *Curr Mol Med* 9, 442–458
- Rodriguez-Niedenführ M, Papoutsi M, Christ B, Nicolaides KH, von Kaisenberg CS, Tomarev SI, Wilting J (2001): Prox1 is a marker of ectodermal placodes, endodermal compartments, lymphatic endothelium and lymphangioblasts. *Anat Embryol (Berl)* 204, 399–406
- Ryan M, Stainton MC, Slaytor EK, Jaconelli C, Watts S, Mackenzie P (2003): Aetiology and prevalence of lower limb lymphoedema following treatment for gynaecological cancer. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 43, 148–151
- Sassetti C, Tangemann K, Singer MS, Kershaw DB, Rosen SD (1998): Identification of Podocalyxin-like Protein as a High Endothelial Venule Ligand for L-selectin: Parallels to CD34. *J Exp Med* 187, 1965–1975
- Schlatter P, König MF, Karlsson LM, Burri PH (1997): Quantitative study of intussusceptive capillary growth in the chorioallantoic membrane (CAM) of the chicken embryo. *Microvasc Res* 54, 65–73
- Sung HK, Morisada T, Cho C-H, Oike Y, Lee J, Sung EK, Chung JH, Suda T, Koh GY (2006): Intestinal and peri-tumoral lymphatic endothelial cells are resistant to radiation-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 345, 545–551
- Todo Y, Yamazaki H, Takeshita S, Ohba Y, Sudo S, Minobe S, Okamoto K, Kato H (2015): Close relationship between removal of circumflex iliac nodes to distal external iliac nodes and postoperative lower-extremity lymphedema in uterine corpus malignant tumors. *Gynecol Oncol* 139, 160–164
- Wernicke AG, Greenwood EA, Coplowitz S, Parashar B, Kulidzhanov F, Christos PJ, Fischer A, Nori D, Chao KSC (2013): Tissue compliance meter is a more reproducible method of measuring radiation-induced fibrosis than late effects of normal tissue-subjective objective management analytical in patients treated with intracavitary brachytherapy accelerated partial breast irradiation: results of a prospective trial. *Breast J* 19, 250–258
- Wilting J, Papoutsi M, Christ B, Nicolaides KH, Kaisenberg CS von, Borges J, Stark GB, Alitalo K, Tomarev SI, Niemeyer C, Rössler J (2002): The transcription factor Prox1 is a marker for lymphatic endothelial cells in normal and diseased human tissues. *FASEB J* 16, 12711273
- Xavier S, Piek E, Fujii M, Javelaud D, Mauviel A, Flanders KC, Samuni AM, Felici A, Reiss M, Yarkoni S, et al. (2004): Amelioration of Radiation-induced Fibrosis inhibition of transforming growth factor- β signaling by halofuginone. *J Biol Chem* 279, 15167–15176
- Yamazaki H, Todo Y, Takeshita S, Ohba Y, Sudo S, Minobe S, Okamoto K, Yamashiro K, Kato H (2015): Relationship between removal of circumflex iliac nodes distal to the external iliac nodes and postoperative lower-extremity lymphedema in uterine cervical cancer. *Gynecol Oncol* 139, 295–299
- Zink FE (1997): X-ray tubes. *RadioGraphics* 17, 1259–1268

In vivo experimental evidence that the nitric oxide pathway is involved in the X-ray-induced antiangiogenicity. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2074821/>; Zugriff am 25.10.2016

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chorioallantoismembran (CAM)	9
Abbildung 2: Allantoisepithel	9
Abbildung 3: Chorionepithel	11
Abbildung 4: Versuchsaufbau.....	25
Abbildung 5: Makroskopische Ansicht der CAM	25
Abbildung 6: Ödem und Rundzellen	29
Abbildung 7: Gefäßwandständige Rundzellen	30
Abbildung 8: Heterophiler Granulozyt	30
Abbildung 9: Normales Endothel.....	32
Abbildung 10: Gradient Gefäßschaden bei 2,5 Gy.....	33
Abbildung 11: Gradient Gefäßschaden bei 10 Gy.....	34
Abbildung 12: Vakuolisierung bei 2,5 Gy.....	34
Abbildung 13: Vakuolisiertes Endothel mit intrazellulären Einschlüssen	35
Abbildung 14: Ablösung des Endothels von der Basalmembran	36
Abbildung 15: Auffällige Gefäßwandung nach Bestrahlung	36
Abbildung 16: Unauffällige Lymphgefäße	37
Abbildung 17: Auffällige Lymphgefäße.....	38
Abbildung 18: Prox-1- und MEP-21-Kontrolle	41
Abbildung 19: Prox-1 und MEP-21 bei 2,5 Gy.....	42
Abbildung 20: Prox-1 und MEP-21 bei 10 Gy.....	43
Abbildung 21: Lektin-Nachweis mit SNA-FITC.....	44
Abbildung 22: Apoptose-Marker Caspase 3	46

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte und Verbrauchsmaterialien	19
Tabelle 2: Chemikalien.....	20
Tabelle 3: Primärantikörper	21
Tabelle 4: Sekundärantikörper	21
Tabelle 5: Lösungen und Puffer.....	22
Tabelle 6: Versuchs- und Kontrollreihen.....	22

Danksagung

Es ist mir ein wichtiges Anliegen, all jenen zu danken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jörg Wiltning für seine wissenschaftliche Unterstützung und außergewöhnliche Hilfsbereitschaft während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation. Auch für das mühevollen Korrekturlesen möchte ich mich herzlich bedanken. Ich hätte mir keine bessere Betreuung wünschen können.

Außerdem gilt mein Dank den Mitarbeitern des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Georg-August-Universität Göttingen für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und viele wertvolle Anregungen. Insbesondere möchte ich Berthold Manshausen und Simona Hellbach erwähnen, die mir bei der Durchführung der Experimente und Anfertigung der Bilder eine sehr große Hilfe waren.

Danken möchte ich weiterhin dem Institut für Strahlentherapie und Radioonkologie der Universitätsmedizin Göttingen für das Bereitstellen ihres Röntgenapparates und die stets zielführenden Diskussionen über die physikalischen Aspekte ionisierender Strahlung.

Lebenslauf

Ich wurde am 15.02.1990 in Karlsruhe geboren und dort im August 1996 eingeschult. Im darauffolgenden Jahr zog ich mit meiner Familie nach Ulm, wo ich den Rest meiner schulischen Ausbildung genoss. Im ersten Halbjahr des Schuljahres 2006/2007 ließ ich mich für ein Gastschuljahr in Neuseeland beurlauben, um dort die Burnside High School der Stadt Christchurch zu besuchen. Zwei Jahre später legte ich an meiner heimischen Schule, dem Hans und Sophie Scholl-Gymnasium, mein Abitur ab. Von September 2009 bis Juli 2010 ging ich nach Paris und ließ mich an der dortigen Schauspielschule Le Centre des Arts de la Scène in Gesang, Tanz und Schauspiel ausbilden. Anschließend begann ich im Oktober 2010 das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen und legte im August 2012 das Physikum ab. Während meines Studiums famulierte ich in den Fächern Innere Medizin, Pädiatrie, Orthopädie, Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Neurologie, Ophthalmologie, Gynäkologie, Allgemeinmedizin und Kardiologie. Im April 2016 absolvierte ich den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und begann einen Monat später mein Praktisches Jahr in Paris. Dort arbeitete ich 4 Monate in der Pädiatrie und 2 Monate auf der Orthopädie. Den zweiten Teil meines Chirurgie-Tertials verbrachte ich im Königreich Oman. Daraufhin kehrte ich zu meinem Tertial Innere Medizin an die Universitätsklinik Göttingen zurück, wo ich im Mai 2017 den letzten Teil der Ärztlichen Prüfung ablegte. Seit November 2017 habe ich eine Anstellung als Assistenzärztin in der HNO-Abteilung der HSK-Kliniken in Wiesbaden.