

**DER EINFLUSS VON FGF-2 ÜBEREXPRESSION
AUF ARTERIOGENESE UND ANGIOGENESE**

TIM CLAUßNITZER

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Der Einfluss von FGF-2 Überexpression auf Arteriogenese und Angiogenese

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

TIM CLAUBNITZER

aus Karl-Marx-Stadt

Gießen 2006

Aus dem Max-Planck-Institut für Physiologische und Klinische
Forschung
W.G. Kerckhoff-Institut
Abteilung für Experimentelle Kardiologie
Leiter: Prof. Dr. Dr. h. c. W. Schaper
in Bad Nauheim

Gutachter:

Frau Prof. Dr. med. Dr. h.c. J. Schaper

Gutachter:

Herr Prof. Dr. med. R. Voss

Tag der Disputation:

11.12.2006

Meiner Familie und meinen Freunden gewidmet.

Inhaltsverzeichnis:

| | Seite |
|---|-----------|
| I. Einleitung | 1 |
| 1. Gefäßwachstum | 3 |
| 2. Der basische Fibrozyten Wachstumsfaktor (FGF-2) | 5 |
| 3. Der Einfluss aktiver physischer Bewegung auf Muskulatur und Gefäßsystem | 7 |
| 4. Andere Faktoren der Arterio- und Angiogenese | 8 |
| 5. Modell der chronischen Ischämie im Hinterlauf der Maus | 8 |
| 6. Zielsetzung | 9 |
| | |
| II. Material und Methoden | 10 |
| 1. Tiermodell | 10 |
| 1.1. Versuchstiere | 10 |
| 1.1.1. FGF-2 überexprimierende Mäuse | 10 |
| 1.1.2. Nicht transgene Mäuse (Wild-Typ) | 11 |
| 1.2. Narkose und Operation | 11 |
| 2. Funktionelle Untersuchungen | 12 |
| 2.1. Bestimmung der Trainingskapazität | 13 |
| 2.2. Messung des Blutflusses | 16 |
| 2.3. Bestimmung der Atrophie des M. gastrocnemius | 16 |
| 3. Histologische Untersuchungen | 17 |
| 3.1. Gewebeentnahme und Paraffineinbettung | 17 |

| | |
|--|----|
| 3.1.1. Entnahme des Musculus gastrocnemius und der Gruppe der Musculi adductorii | 17 |
| 3.1.2. Paraffineinbettung | 18 |
| 3.2. Erstellung histologischer Schnittpräparate | 19 |
| 3.2.1. Erstellung der Schnitte (Paraffinmikrotomie) | 19 |
| 3.2.2. Vorbereitung der Schnittpräparate | 19 |
| 3.3. Histologische Nachweisverfahren | 20 |
| 3.3.1. Hämatoxilin-Eosin-Färbung | 20 |
| 3.3.2. Lectin-Färbung | 21 |
| 3.3.3. Immunhistochemische Nachweisverfahren | 21 |
| 3.3.3.1. Inkubation mit Primärantikörpern | 23 |
| 3.3.3.2. Peroxidase Färbung | 24 |
| 3.3.3.3. Immunfluoreszenz-Färbung | 27 |
| 3.3.4. Anhang | 28 |
| 3.4. Quantifizierung | 30 |
| 3.4.1. Bestimmung der Anzahl der Kollateralarterien in den Mm. adductorii | 30 |
| 3.4.2. Bestimmung des Gesamtdurchmessers der Kollateralarterien in der Adduktorengruppe | 32 |
| 3.4.3. Bestimmung der Zunahme des Gesamtdurchmessers der Kollateralarterien in der Adduktorengruppe von nicht okkludierter Seite zu okkludierter Seite | 32 |
| 3.4.4. Bestimmung der Arteriendichte im Musculus gastrocnemius | 33 |
| 3.4.5. Bestimmung der Kapillardichte im Musculus gastrocnemius | 33 |
| 3.4.6. Flächenbestimmung der langsamen Muskelfasern (Typ I) im Musculus gastrocnemius | 33 |

| | |
|---|-----------|
| 3.5. Auswertung und Statistik | 34 |
| III. Ergebnisse | 35 |
| 1. Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen | 35 |
| 1.1. 1.1. Trainingskapazität | 35 |
| 1.2. Blutfluss | 35 |
| 1.3. Atrophie des M. gastrocnemius | 36 |
| 2. Ergebnisse der histologischen Untersuchung | 37 |
| 2.1. Anzahl der Kollateralen in der Adduktorengruppe | 37 |
| 2.2. Summe des Gesamtdurchmessers der Kollaterarterien in der Adduktorengruppe | 40 |
| 2.3. Zunahme des Gesamtdurchmessers der Kollaterarterien in der Adduktorengruppe von nicht okkludierter Seite zu okkludierter Seite | 41 |
| 2.4. Arteriendichte im Musculus gastrocnemius | 43 |
| 2.5. Kapillardichte im Musculus gastrocnemius | 47 |
| 2.6. Flächenbestimmung der langsamen Muskelfasern (Typ I) im Musculus gastrocnemius | 52 |
| 3. Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse | 55 |
| IV. Diskussion | 57 |
| 1. Zusammenfassung der Ergebnisse | 57 |
| 1.1. Zusammenfassung der funktionellen Ergebnisse | 57 |
| 1.2. Zusammenfassung der histologischen Ergebnisse | 58 |
| 2. Diskussion der Ergebnisse | 59 |

| | | |
|-------|----------------------|----|
| V. | Zusammenfassung | 67 |
| 1. | Zusammenfassung | 67 |
| 2. | Abstract | 68 |
| VI. | Literaturverzeichnis | 70 |
| VII. | Lebenslauf | 77 |
| VIII. | Danksagung | 79 |

I. Einleitung

Ischämische Gefäßerkrankungen stellen trotz zahlreicher Präventivmaßnahmen in den westlichen Industrieländern die mit Abstand häufigste Todesursache dar. So starben nach Angaben der American Heart Association im Jahre 1999 in den USA 529659 Menschen an der Koronaren-Herz-Krankheit (KHK). Dies entspricht einem Fünftel aller Todesfälle. Bei dieser zentral-arteriellen Gefäßerkrankung liegen arteriosklerotisch bedingten Stenosen von Koronararterien vor, die zur Ischämie des Herzmuskels führen. Diese manifestieren sich klinisch als Angina Pectoris, Herzinsuffizienz und Herzinfarkt. Nach Angaben der American Heart Association leiden allein in den Vereinigten Staaten derzeit ca. 13 Millionen Menschen an einer KHK.

Im peripheren Gefäßsystem stellt die Periphere-Arterielle-Verschluss-Krankheit (pAVK) das Korrelat zur koronaren Herzkrankheit dar. Bei dieser Erkrankung entsteht durch eine arteriosklerotisch bedingte Stenose in den Beinarterien eine Ischämie der betroffenen Gliedmaßen. Die Patienten leiden anfangs unter dem Symptom einer so genannter Claudicatio Intermittens, einem belastungsabhängigem Schmerz in der betroffenen Extremität. Schreitet die Erkrankung fort, folgt diesen schmerzhaften Sensationen, die von einer immer kleiner werdenden beschwerdefreien Gehstrecke begleitet sind, oft die Amputation der betroffenen Gliedmaße wegen ischämischer Gewebsläsionen (Gangrän).

In den vergangenen Jahrzehnten wurden innovative Methoden etabliert, um stenosierte Gefäße zu revaskularisieren. Techniken wie die perkutane transluminale (Coronar-) Angioplastie (PTCA/PTA), welche minimal invasiv durchgeführt werden können, oder operative Bypassverfahren können die Ursachen vaskulärer Veränderungen langfristig nicht beseitigen und sind äußerst kostenintensiv. Nach Angaben der American Heart Association wurden allein in den USA im Jahre 1999 etwa 1,1 Millionen Perkutane Transluminale

Revaskularisationen, 355000 koronare Bypass-Operationen und 131000 Endarteriektomien durchgeführt. Hinzu kommen viele Patienten, bei denen das OP-Risiko höher ist als der zu erwartende mögliche Erfolg. Für diese Patienten stellen solch invasive Verfahren keine Option dar. Patienten, die sich dennoch einer solchen Behandlung unterziehen, sind nach wie vor durch Re-Stenosen gefährdet. Die Folge ist eine ständig wachsende Anzahl von Patienten mit chronischen Gefäßerkrankungen. Unter diesem Aspekt ist es von großer Bedeutung, neue Therapiestrategien zu entwickeln, um diesem Teufelskreis zu entgehen.

Es ist bekannt, dass einige Patienten mit ischämischen Gefäßerkrankungen natürliche Umgehungskreisläufe durch so genannte Kollateralgefäße, ausbilden können. Dabei scheint das Wachstum dieser Kollateralgefäße vom Grad der Gefäßverengung abhängig zu sein. In einigen Fällen leben sogar Patienten mit Totalverschluss einer Koronararterie aber gut ausgeprägten Kollateralen völlig beschwerdefrei [1].

Daher könnte eine Erfolg versprechende Möglichkeit der Therapie die Induktion und Förderung des Wachstums von Kollateralkreisläufen sein. In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche Studien durchgeführt, um den Mechanismus des Kollateralwachstums zu ergründen. Dabei konnte festgestellt werden, dass wachsende Kollateralen bereits vorher existierende Gefäßstrukturen sind [2, 3]. Außerdem zeigte sich, dass im Wesentlichen zwei Faktoren zu diesem Wachstum führen. Zum einen sind das physiologischen Veränderungen innerhalb des Kollateralgefäßes, wie die Erhöhung des intraluminalen Druckes. Damit geht die Erhöhung der so genannten Scherkräfte einher, die auf Endothelzellen einwirken. Zum anderen ist es die Ausschüttung zahlreicher Wachstumsfaktoren und deren Wirkung auf das Gefäß. Beide Faktoren führen zum Wachstum von Zellen des Gefäßendothels und der glatten Gefäßmuskulatur. Einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren ist der basische Fibrozyten Wachstumsfaktor (FGF-2).

1. Gefäßwachstum

Das Wachstum von Gefäßen lässt sich in drei verschiedene Formen unterteilen.

Der erste Typ wird als Vaskulogenese bezeichnet. Dieser Begriff beschreibt die Neuentstehung von Gefäßstrukturen aus einzelnen Zellen. Diese Form des Gefäßwachstums ist der Hauptmechanismus während der embryonalen Entwicklung sowohl von Arterien, Arteriolen und Kapillaren, als auch von Venolen und Venen [4].

Weitere Formen des Gefäßwachstums beziehen sich auf die postnatale Gefäßentwicklung. Dabei lässt sich die Angiogenese von der Arteriogenese unterscheiden. Gemeinsam ist beiden, dass das Wachstum aus bereits bestehenden Gefäßen stattfindet. Diese präexistenten Gefäße sind in der Lage, zu proliferieren. Dabei entstehen funktionell wichtige Kollateralkreisläufe zur Gewebeversorgung.

Als Angiogenese wird der Prozess bezeichnet, bei dem neue Kapillaren entstehen. Dabei gibt es zwei unterschiedliche Formen der Angiogenese. Gemeinsam ist beiden die präexistente Kapillare. Deren Zellen können sich teilen und damit verdoppeln, oder durch Aussprossung eine Tochterkapillare bilden. Der entscheidende Vorgang der Angiogenese ist die Endothelzellproliferation und -migration. Dabei sind viele Faktoren, wie z.B. FGF-2, am Ablauf dieses komplexen Prozesses beteiligt.

Die Angiogenese stellt einen wichtigen Bestandteil sowohl physiologischer als auch pathologischer Vorgänge dar. Wundheilung, Follikulogenese und Ovulation, sowie die Angiogenese bei Tumoren und bei der diabetischen Retinopathie seien hier als Beispiele genannt. Dieser Prozess ist eine Reaktion auf veränderte physiologische Bedingungen im betroffenen Gewebe. Sauerstoffmangel (Hypoxie) und Entzündungsvorgänge spielen die entscheidende Rolle bei der Induktion der Angiogenese [5, 6, 7].

Der Begriff der Arteriogenese bezeichnet einen Prozess, bei dem neue Arterien entstehen. Wie die Angiogenese, ist auch die Arteriogenese auf bereits vorhandene Gefäßstrukturen angewiesen. Präexistente Kollateralarteriolen bilden dabei den Ausgangspunkt des Gefäßwachstums. Im Gegensatz zur Angiogenese, an der ausschließlich Endothelzellen beteiligt sind, werden beim Kollateralwachstum alle in einer Arteriolenwand enthaltenen Zellen am Wachstumsprozess beteiligt. Es kommt zu einer Proliferation der gesamten Gefäßwand, also sowohl von Endothel- als auch von glatten Muskelzellen. Der Prozess der Arteriogenese wird durch eine hämodynamisch wirksame Stenose oder durch die Okklusion einer Arterie ausgelöst. Der entstehende Druckgradient zwischen der verschlossenen Arterie und den Kollateralen führt zu einer Erhöhung des Blutflusses und des intraluminalen Druckes in den Umgehungskreisläufen, somit zu einer gesteigerten Wandspannung der dortigen Endothelzellen. Diese Scherkräfte induzieren damit den Prozess der Arteriogenese [8, 4].

Faktoren, die an den Wachstumsprozessen des Gefäßsystems beteiligt sind, sind nach wie vor das Ziel vieler Untersuchungen. Dennoch sind viele funktionelle Zusammenhänge noch ungeklärt. Eine Differenzierung maßgeblicher Einflussgrößen ist aber möglich: Zum ersten ist der genetische Hintergrund zu nennen: Untersuchungen verschiedener Mäusestämme zeigten Unterschiede in der Beschaffenheit der präexistenten Gefäßsysteme und ebenfalls unterschiedliche Reaktionen während der Entwicklung der Kollateralkreisläufe [9]. Zum zweiten haben physikalische Veränderungen des Blutflusses und die damit verbundenen Veränderung der Scherkräfte einen starken Einfluss auf die Induktion und Entwicklung der Arteriogenese [10, 11]. Weiterhin haben einwandernde Monozyten [12] einen wichtigen Einfluss auf die Entwicklung von Kollateralen. Entsprechend findet auch das in diesem Zusammenhang entdeckte Macrophage chemoattractant Protein-1 (MCP-1) besondere Aufmerksamkeit [13, 14]. Zum vierten nehmen eine Reihe von Wachstumsfaktoren deutlichen Einfluss auf das Kollateralwachstum. Vor allem die Familie der Fibrozyten-

Wachstumsfaktoren (FGF) und der Vascular-Endothelial-Growth-Factor (VEGF) sind im Laufe der letzten Jahre immer häufiger das Ziel von Untersuchungen [15, 7, 8, 16].

2. Der basische Fibrozyten Wachstumsfaktor (FGF-2)

Der Fibrozyten-Wachstums-Faktor-2 wurde erstmals 1975 von Gospodarowicz beschrieben. Er isolierte dieses Polypeptid aus der Hypophyse von Kühen [17], nachdem beobachtet worden war, dass ein Extrakt der Hypophyse Fibrozyten zur Zellteilung anregt. Gospodarowicz zeigte *in vitro*, dass es dieser Wachstumsfaktor ist, der die Fibrozyten zur Teilung anregt. So erhielt nach den von ihm stimulierten Zellen auch der Faktor seinen Namen. Der Stimulus konnte durch Erniedrigung des pH-Wertes inhibiert werden. Es entstand die spätere Nomenklatur des „basischen“ FGF. Aus dem basischen (bFGF) wurde später FGF-2. In folgenden Untersuchungen entdeckte man weitere Faktoren der Familie der FGF. Mittlerweile sind mehr als 20 Wachstumsfaktoren zur Familie der FGF's hinzugekommen [18].

Der erste und bis heute am besten erforschte Fibrozyten-Wachstums-Faktor ist FGF-2. Dieses Protein wird ubiquitär von mesodermalen und neuroektodermalen Geweben gebildet und kommt in vier verschiedenen Isoformen vor. Die von Gospodarowicz entdeckte Isoform ist ein - hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiertes - 18 kDa schweres Protein. Die 22,5 kDa, 23 kDa und 24 kDa schweren Isoformen sind im Nukleus lokalisiert und bestehen aus einer Verlängerung der 18 kDa Form [19, 20]. Bis heute ist jedoch nicht klar, wie FGF-2 die Zelle verlassen kann. FGF-2 besitzt kein Signalpeptid oder eine hydrophobe Domäne, welche, wie bei anderen Proteinen, für die Sekretion verantwortlich wäre. Wie alle Mitglieder der FGF-Familie bindet auch FGF-2 an Heparin oder Heparansulfat. Diese Verbindung schützt das Protein vor der Zerstörung durch Hitze, saurer Denaturierung und dem Abbau durch Proteasen. [20, 21, 22]

Die Interaktion von FGF-2 und der Zelle geschieht über spezifische Fibrozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren (FGFR), die in vier verschiedene Familien unterteilt werden: FGFR1, FGFR2, FGFR3 und FGFR4. Diese Rezeptorenfamilien gehören zum Typ der Tyrosin-Kinase Rezeptoren. Alle Subtypen besitzen die Tyrosin-Kinase Domäne, eine transmembrane und eine extrazelluläre Domäne. Die extrazelluläre liganden-bindende Domäne unterscheidet sich bei den verschiedenen Splicing Varianten. [23]

Flamme et al. beobachteten 1992, dass FGF-2 *in vitro* Endothelzellen zur Bildung von Gefäßstrukturen anregen kann [24]. In den folgenden Jahren zeigten weitere Untersuchungen, welchen Einfluss FGF-2 auf die Gefäßproliferation und -neubildung hat. Hierbei werden grundsätzlich drei verschiedene Arten von Gefäßwachstum unterschieden. Als Vaskulogenese wird die von Flamme beschriebene Neubildung eines Gefäßes aus einzelnen Zellen bezeichnet. Die anderen zwei Möglichkeiten beziehen sich auf das Wachstum aus existierenden Gefäßen. Wie bereits oben erwähnt, wird der Begriff der Angiogenese zur Beschreibung von wachsenden Kapillaren verwendet, die durch Teilung und oder Aussprossung bestehender Kapillaren entstehen. Die Endothelzellen vermehren sich und bauen neue Kapillarstrukturen an bereits vorhandene an. Dabei handelt sich um Gefäße (Kapillaren), die nur aus einer Wandschicht bestehen (Endothel). Als Arteriogenese wird das Wachstum von Gefäßen beschrieben, die eine dreischichtige Wand aus Lamina Intima, Lamina Media und Lamina Adventitia besitzen. Auch diese Gefäße wachsen aus bereits bestehenden Arterien durch Zellteilung, Vermehrung und Aussprossung. Es zeigte sich, dass FGF-2 in der Lage ist, diesen Weg *in vitro* [25] und *in vivo* [26, 27] zu induzieren.

Da FGF-2 ubiquitär vorkommt, wurden auch noch andere Wirkungen dieses Wachstumsfaktors entdeckt. Der Einfluss von FGF-2 auf den Blutdruck wurde von Cuevas et al untersucht. Er konnte nachweisen, dass durch systemische Gabe von FGF-2 der Blutdruck signifikant gesenkt wird [28]. FGF-2 scheint auch an der Genese von Atherosklerose beteiligt zu sein. Hughes et al wiesen

den Wachstumsfaktor in allen Stadien von arteriosklerotischen Plaques nach [29]. Es ist jedoch bekannt, dass ein Glas Rotwein pro Tag diesem Prozess entgegen wirkt und Gefäße gewissermaßen „geschmeidig“ hält. Es zeigte sich, dass Ethanol ein wichtiger Inhibitor des FGF Rezeptors ist [30] und die durch FGF-2 induzierte Proliferation der Gefäßwand verhindert.

Yang et al untersuchten den Blutfluss in der hinteren Extremität von Ratten nach Okklusion der A. femoralis. Den Tieren wurde intraarteriell FGF-2 verabreicht um zu bestimmen, welchen Einfluss dieser Wachstumsfaktor besitzt. Wie sich zeigte, stieg der Blutfluss im Hinterlauf der behandelten Tiere signifikant an [31].

3. Der Einfluss aktiver physischer Bewegung auf Muskulatur und Gefäßsystem

Aktive Bewegung löst im Körper eines jeden Individuums eine Vielzahl von Anpassungsvorgängen aus. Bei erhöhter Belastung steigen Blutdruck und Herzfrequenz, die Atmung wird forciert, um der entstehenden Sauerstoffschuld entgegen zu wirken. Bewegung kostet Energie, was sich durch Hunger bemerkbar macht. Diese Faktoren haben entscheidenden Einfluss auf die Funktion der Muskulatur, die auf suffiziente Durchblutung angewiesen ist.

Aktives Training kann die Blutversorgung verbessern. Dabei wird nicht nur die Leistungsfähigkeit des Herz-Kreislauf-Systems gesteigert, auch im Muskelgewebe selbst kommt es zu morphologischen Veränderungen. Durch Training ändert sich die Gefäßversorgung des Muskels und die Zusammensetzung der Muskelfasern. So zeigten mehrere Studien, dass sich auch der Fasertyp deutlich verändert [32, 33]. Es kommt zu einem Umwandlungsprozess von schnelleren zu langsameren Fasern.

Durch Bewegung steigt die Durchblutung des aktiven Muskelgewebes. Dadurch erhöht sich der intraluminale Druck, was zu einer Vasodilatation und so zur

Steigerung der Scherkräfte zwischen den Endothelien führt. Diese Scherkräfte sind wichtige physiologische Aktivatoren des Gefäßwachstums [34]. Diese führen letztlich zu einer erhöhten Ausschüttung von FGF-2 [35]. Die Folge ist eine deutliche Erhöhung der Gefäßdichte

4. Andere Faktoren der Arterio- und Angiogenese

Die Abläufe der Angiogenese und Arteriogenese werden durch das Zusammenspiel vieler Einflussgrößen bestimmt. FGF-2 ist nicht der einzige Wachstumsfaktor, der in diesen Prozess involviert ist. Andere Faktoren sind VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein) und PDGF (Platelet Derived Growth Factor). Ziel all dieser Proteine ist im Wesentlichen die Endothelzelle. Aber auch Hämodynamik und Blutversorgung spielen als physiologische Größen eine wichtige Rolle. Endothelzellen reagieren sowohl auf Scherkräfte, als Folge der Vasodilatation, als auch auf Ischämie, die in erster Linie zu einer Veränderung des pH-Wertes führt [36, 6, 16].

5. Modell der chronischen Ischämie im Hinterlauf der Maus

Das folgende Tiermodell wurde verwendet, um die Mechanismen in einer von pAVK betroffenen Extremität zu untersuchen. Das Modell der chronischen Ischämie im Hinterlauf der Maus basiert auf dem akuten Verschluss des arteriellen Hauptgefäßes des Beines, der A. femoralis, unmittelbar distal der Aufzweigung der A. iliaca externa. Damit übernehmen die nicht verschlossenen A. circumflexa femoris lateralis und A. profunda femoris den Blutstrom zur distalen Gliedmaße. Sie anastomosieren über präexistente Kollateralkreisläufe mit der A. genus descendens, A. saphena parva und A. caudalis femoris. In der Folge kommt es zur Ischämie des Unterschenkels (z.B. des M. gastrocnemius) und aufgrund des großen Druckgradienten zu ansteigenden Scherkräften in den arteriellen Kollateralgefäßen des Oberschenkels [37, 9]. Dieses Modell erlaubt es, zwei physiologisch deutlich unterschiedliche Bereiche im Hinterlauf

gleichzeitig zu untersuchen: Zum einen den des Oberschenkels direkt um die Okklusion der A. femoralis herum. Hier herrschen in den Gefäßen der Umgehungskreisläufe die bereits beschriebenen Scherkräfte. Im Muskelgewebe findet sich ein weitgehend physiologisches Milieu. [38, 39]. Zum anderen den Bereich des Unterschenkels, der deutlich unterhalb der Okklusion liegt und somit ausschließlich durch Umgehungskreisläufe versorgt werden kann. Hier besteht eine deutliche Ischämie im Muskelgewebe, im Gegensatz zu dem Bereich oberhalb des Knies [38, 40].

Die Analyse der Veränderungen infolge einer Femoralisokklusion bei der Maus erfolgte sowohl durch funktionelle Untersuchungen, wie Messung der Trainingskapazität, Blutflussbestimmung und Bestimmung der Atrophie der Mm. gastrocnemii, als auch durch Erstellung und Beurteilung histologischer Präparate von Gefäßen und Muskulatur beider oben beschriebenen Bereiche.

6. Zielsetzung

Zusammenfassend ist zu sagen, dass viele Faktoren, die die Gefäßneubildung beeinflussen, bis jetzt noch nicht systematisch untersucht wurden. In der hier vorliegenden Arbeit sollte deshalb der Einfluss von physischer Bewegung, des Fibrozyten-Wachstumsfaktors und der Kombination aus beiden auf den Mechanismus der Kollateralarterienentwicklung nach einem Gefäßverschluss geklärt werden. Gleichzeitig sollte auch ein möglicher Wechsel des Muskelfasertyps unter dem Einfluss von Ischämie untersucht werden. Hierzu wurden sowohl funktionelle als auch histologische Untersuchungen an dem gut etablierten Modell der Langzeit-Ischämie im Hinterlauf der Maus durchgeführt.

II. Material und Methoden

1. Tiermodell

In dieser Arbeit wurde ein *in vivo* Modell der einseitigen Langzeit-Ischämie im Hinterlauf der Maus verwendet [37]. Es wurden 24 Tiere untersucht.

1.1. Versuchstiere

Diese Studie wurde mit der Zustimmung des Regierungspräsidiums des Landes Hessen, unter Berücksichtigung des aktuellen Tierschutzgesetzes (BGB 1 Jahrgang 1998, Teil I, Nr. 30, S. 1106 ff) durchgeführt. Die Untersuchungen richteten sich nach der „*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*“ des National Institute of Health (NIH) [DHHS Jahrgang 1985, Publikation Nr. (NIH) 85-23, Office of Science and Health Reports, Bethesda, MD 20892]. Alle Tiere wurden in Standardkäfigen gehalten und einem Tag- Nacht-Rhythmus von jeweils 12 Stunden ausgesetzt. Sie erhielten Wasser und Futter nach Belieben.

1.1.1. FGF-2 überexprimierende Mäuse

Es wurden 12 männliche Mäuse FVB/NCrl mit globaler FGF-2 Überexprimierung untersucht.

Die erste Generation wurde uns freundlicherweise von Dr. J. Douglas Coffin von der Universität von Montana (USA) zur Verfügung gestellt [41]. Die experimentellen Tiere wurden im Max-Planck-Institut, Bad Nauheim in der Abteilung für experimentelle Kardiologie gezüchtet. Als die Tiere ein Alter von 12 Wochen erreicht hatten, wurden die hier beschriebenen Messungen durchgeführt

Um zu überprüfen, ob es sich auch tatsächlich um genetisch veränderte Tiere handelt, wurde die DNA aller Tiere mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) untersucht. Hierbei konnte die FGF-2 Zielsequenz der DNA nachgewiesen werden.

Ebenfalls untersucht werden musste, ob die transgenen Mäuse diese DNA auch tatsächlich in mRNA, Voraussetzung für eine erfolgreiche Proteinbiosynthese, umwandeln. Die FGF-2 mRNA wurde im Northern Blot Verfahren nachgewiesen.

Zum Abschluss wurde auch das überexprimierte FGF-2 Protein mittels Western Blot nachgewiesen.

1.1.2. Nicht transgene Mäuse (Wild-Typ)

Als Kontroll-Tiere wurden 12 männliche FVB/NCrl Mäuse verwendet. Die Tiere wurden von den Charles River Laboratorien (Sulzfeld, Deutschland) im Alter von 11 Wochen bezogen und nach einwöchiger Haltung zur Eingewöhnung für die vorliegende Studie verwendet.

1.2. Narkose und Operation

Die Mäuse wurden durch intraperitoneale Injektion einer Mischung aus Ketamin (10% Medistar) und Xylazin (2% Medistar) gelöst in NaCl (0,9% Braun) im Verhältnis 1:1:2 narkotisiert. Verwendet wurden initial 0,125ml dieses Gemisches. Bei Bedarf erhielten die Tiere weitere Injektionen des angemischten Narkotikums. Die Dosierung erfolgte nach Wirkung.

Die Tiere wurden auf dem Rücken liegend auf einer Wärmeplatte fixiert. Zum einen konnte so während der Operation die Körpertemperatur bei 37° gehalten werden, und zum anderen gewährte diese Lagerung einen optimalen Zugang zu der medial in der Leiste des Tieres gelegenen A. femoralis.

Bei allen Tieren wurde anschließend die rechte A. femoralis freipräpariert und distal des Abgangs der Arteria femoralis profunda und proximal der Arteria poplitea durch eine Ligatur okkludiert. Die Operation wurde mit Hilfe eines binocularen Operationsmikroskopes der Firma Leica durchgeführt. Nach dem Erwachen aus der Narkose kamen die Tiere wieder zurück in ihre Käfige.

Anschließend wurden die Tiere in folgende Gruppen eingeteilt und untersucht. Die Gruppen sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tabelle 1: Tiergruppeneinteilung

| | | | |
|----------|-----------|----------|-----------|
| Wild-Typ | Wild-Typ | Transgen | Transgen |
| Ruhend | Trainiert | Ruhend | Trainiert |
| n = 6 | n = 6 | n = 6 | n = 6 |

Bei allen Tieren wurden funktionelle und histologische Daten sowohl des linken (ohne Femoralisokklusion) Hinterlaufes, als auch des rechten (mit Femoralisokklusion) Hinterlaufes erhoben, die im Folgenden beschrieben werden sollen.

2. Funktionelle Untersuchungen

Alle funktionellen Untersuchungen wurden von Dr. biol. hom. Swen Wolfram durchgeführt. Diese Ergebnisse wurden mir für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Sie sind ausführlicher in seiner Dissertation „Determination of the Cardiovascular Phenotype of Different transgenic Mouse Models“ beschrieben, und diese Methoden und Ergebnisse sollen im Folgenden deshalb nur kurz dargestellt werden. [42]

2.1. Bestimmung der Trainingskapazität

Alle transgenen und Wild-Typ-Tiere wurden nach Okklusion der rechten A. femoralis im Zufallsprinzip in jeweils eine Kontroll- und in eine Trainingsgruppe aufgeteilt. Die Tiere der Trainingsgruppe absolvierten ein 5-wöchiges Trainingprogramm. Hierbei wurden die Tiere in definierten Zeitabständen auf ein Laufband gesetzt. Das Band hatte eine Steigung von 9°, und die Geschwindigkeit konnte geregelt werden. Am unteren Ende des Bandes befand sich ein Kontaktmechanismus, welcher einen elektrischen Impuls erzeugte, falls das Tier mit diesem in Berührung kam. So wurden die Tiere zum Weiterlaufen angehalten.

Das Training erfolgte wie in folgendem Schema (siehe Abbildung 1) gezeigt:

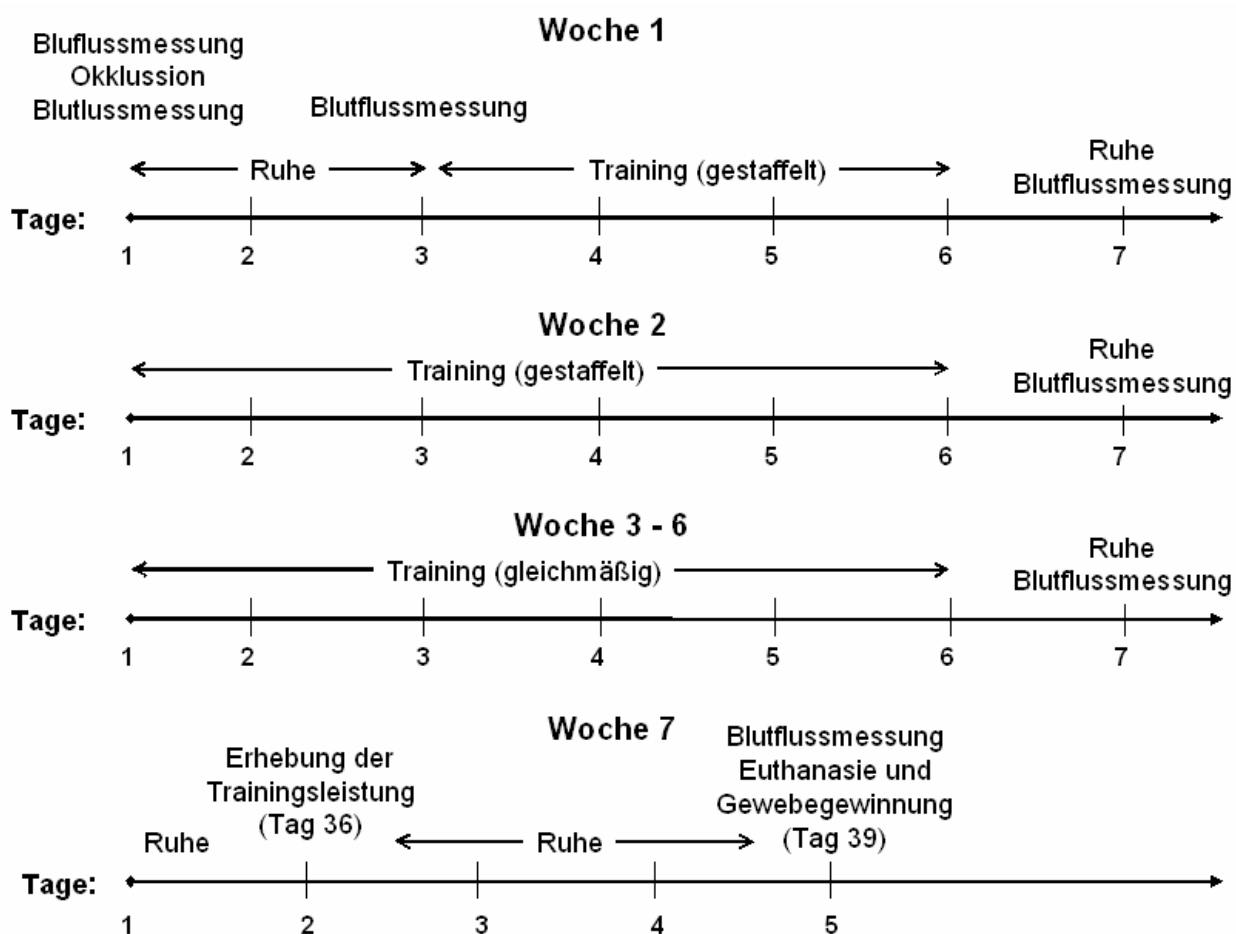


Abbildung 1: Diese Abbildung zeigt den Ablauf des Trainingsprogramms nach der Femoralisokklusion und die Zeitpunkte der Datenerhebung für die Trainingsleistung, den Blutfluss und der Gewebeentnahme.

Am ersten Tag der ersten Woche erfolgte die Okklusion. Nach einer zweitägigen Pause wurden die Tiere an den folgenden drei Tagen mit kontinuierlich steigender Belastung auf dem Laufband trainiert. Es begann mit 30 Minuten bei 10m/min und wurde jeden Tag um 5 Minuten und 1m/min erhöht. Am 7ten Tag der ersten Woche wurden die Tiere nicht trainiert. In der zweiten Woche wurde die Steigerung der Belastung an 6 Tagen fortgesetzt, gefolgt von einem Pausentag. Die letzten zwei Wochen wurden die Tiere kontinuierlich jeweils an den ersten fünf Tagen bei 25m/min und am letzten Tag bei 30m/min für 60

Minuten trainiert. Am letzten Tag von jeder Woche wurden die Tiere nicht trainiert.

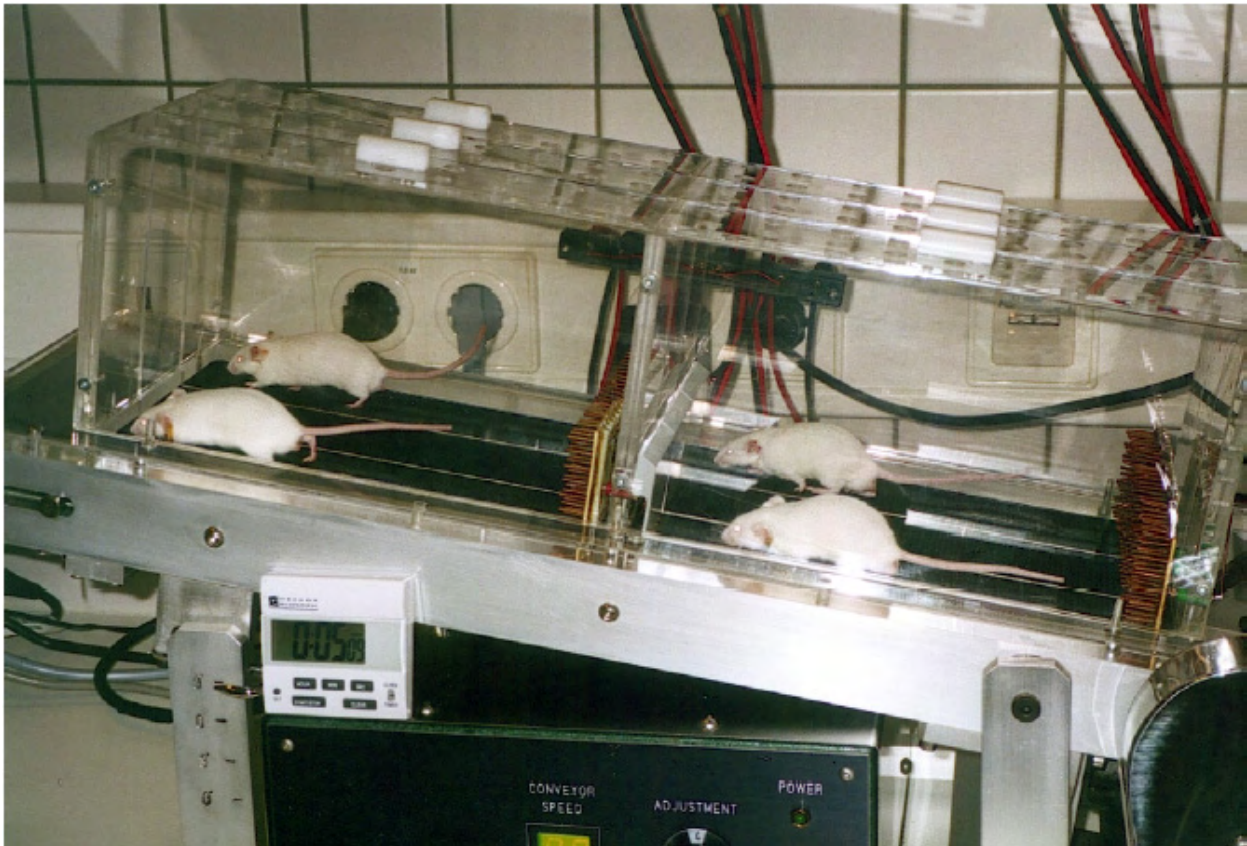


Abbildung 2: Diese Abbildung zeigt den Aufbau der Trainingseinheit. Die Steigung des Laufbandes ist auf 9° eingestellt. Die Geschwindigkeit ist variabel.

Am Tag 36 nach Okklusion der A. femoralis wurden die Tiere einem Trainingstest unterzogen. Bei dem Laufband wurde eine Geschwindigkeit von 20m/min für 15 Minuten eingestellt. Danach wurde die Geschwindigkeit alle 15 Minuten um 5m/min erhöht, bis das Tier den Punkt der Erschöpfung erreicht hatte. Kriterium für Erschöpfung war das Unvermögen der Maus, mit dem Laufband mitzuhalten.

Abschließend wurde die geleistete Arbeit für jedes Tier in Joule wie folgt berechnet:

Formel 1: Berechnung der Trainingskapazität

$$J = \text{kg} \times \text{m} \times [1 + 9.81 \text{m/s}^2 \times \alpha]$$

(J)Arbeit = (kg) Masse des Tieres x (m) zurückgelegte Distanz x [1 + 9.81m/s² x (°) Steigung]

siehe auch [43]

2.2. Messung des Blutflusses

Vor der Okklusion der rechten A. femoralis, direkt im Anschluss, nach 3, 7, 14, 21, 28 und 39 Tagen wurden nichtinvasive Blutflussmessungen durchgeführt.

Die Bestimmung der relativen Durchblutung des Fußes erfolgte mit einem roten Laser Doppler Imager (MLDI 5063) der Firma Moor Instruments Ltd. Es wurden Aufnahmen beider Hinterläufe der Maus gemacht und anschließend das Verhältnis der Durchblutung zwischen okkludierter zu nicht okkludierter Seite bestimmt.

Zur Bestimmung des absoluten Blutflusses im Bereich des Musculus Gastrocnemius der Maus wurden am Tag 39 nach Okklusion der A. femoralis Aufnahmen in einem Magnet Resonanz Imager (PharmaScan 70/16 7.0 Tesla Imager) der Firma Brucker erstellt. Der Fluss wurde in ml/min/g berechnet.

2.3. Bestimmung der Atrophie des M. gastrocnemius

Am Tag 39 nach Femoralisokklusion wurden die Tiere mit Hilfe einer Überdosis von Ketamin und Xylazin euthanasiert. Anschließend erfolgte die Entnahme des Musculus gastrocnemius. (siehe Kap.:3.1.1.). Das Gewicht des Muskels wurde im

Verhältnis zur gesamten Körpermasse des jeweiligen Tieres bestimmt. Die Verhältnisse zwischen den Gruppen wurden verglichen.

3. Histologische Untersuchungen

Diese stellen den Hauptteil der vorliegenden Arbeit dar und wurden von mir durchgeführt.

3.1. Gewebeentnahme und Paraffineinbettung

3.1.1. Entnahme des Musculus gastrocnemius und der Gruppe der Musculi adductorii

Die Tiere wurden mit einer Überdosis eines Ketamin- (10% Medistar) Xylazin- (2% Medistar) Gemisches euthanasiert. Der Thorax wurde durch Sternotomie eröffnet und das Herz durch Eröffnen des Herzbeutels freipräpariert. Es erfolgte die Punktion der Aorta descendens mit einem schräg angeschnittenen Kunststoffschlauch, entsprechend dem Durchmesser der Aorta (ca.:2mm). Es wurde darauf geachtet, dass keine Luft in die Aorta aspiriert wurde. Der Schlauch wurde an eine eigens entwickelte Perfusionsapparatur angeschlossen, welche es ermöglichte, bei der Perfusion der hinteren Extremität Temperatur und Perfusionsdruck zu regulieren. Außerdem wurde die V. cava caudalis durchtrennt, um einen offenen Kreislauf in der hinteren Extremität zu erzeugen. Zunächst wurde so der kaudale Kreislauf für 5 Minuten, bei einer Temperatur von 37°C und einem mittleren Druck von 100mmHg mit einer Waschlösung (PBS (Phosphate Buffered Saline, Herstellung siehe Anhang, Kapitel 3.3.4.) + 0,5% BSA (Bovine Serum Albumin)) perfundiert. Durch Zusatz von Papaverin (5mg/l) und 0.01% Adenosin wurde eine maximale Dilatation des durchspülten Gefäßsystems bewirkt. So konnte das sich noch in der hinteren Extremität befindliche Blut durch die offene V. cava ausgespült werden. Die Spülung wurde so lange fortgesetzt, bis nur noch klare Waschlösung aus der V. cava floss.

Zur Gewebefixierung wurde anschließend statt der Waschpufferlösung für 10 Minuten 2% PFA (Paraformaldehyd, Herstellung siehe Anhang, Kapitel 3.3.4.) bei 100mmHg Druck perfundiert. Zuletzt erfolgte die Entnahme des rechten und linken M. gastrocnemius und der Gruppe der Mm. adductorii. Dazu wurde die Haut an der medialen Seite über die gesamte Länge des Hinterlaufes aufgetrennt. Der M. gastrocnemius wurde am Ursprung vom Knochen gelöst und die Achillessehne durchtrennt. Die Gruppe der Mm. adductorii wurde ebenfalls an Ursprung und Ansatz vorsichtig vom Knochen abgelöst und entnommen. Die gewonnenen Proben wurden nach der Entnahme über Nacht in PFA 2% bei 4°C belassen.

3.1.2. Paraffineinbettung

Am folgenden Tag erfolgte die Dehydratation in aufsteigender Alkoholreihe. Dazu wurden die Proben jeweils 30 Minuten erst in destilliertem Wasser und dann in 30%, 50%, 70%, 95% und 2 mal je 20 Minuten in 100% Ethanol belassen.

Um eine optimale Paraffinaufnahme in das Gewebe zu erreichen, wurden die Proben in einer aufsteigender Paraffinreihe gegeben. Im ersten Schritt 20 Minuten in reines Xylol (Merck) bei 60°C. Es folgen 30 Minuten in einem Gemisch aus Xylol (Merck) und Paraffin (Sigma) (1:1) bei 60°C und zum Abschluss 2 mal 60 Minuten in reinem Paraffin (Sigma) bei jeweils 60°C. Danach wurden die Proben in Würfel ausgegossen und über Nacht bei Zimmertemperatur ausgehärtet. Dabei musste darauf geachtet werden, dass das Gewebe in den Würfeln senkrecht zum Boden stand, um später eine transversale Schnittrichtung zu gewähren.

3.2. Erstellung histologischer Schnittpräparate

3.2.1. Erstellung der Schnitte (Paraffinmikrotomie)

Die Paraffinblöcke wurden mit einem Rotationsmikrotom 1516 mot (Leitz) in Schnitte von 10µm Dicke geschnitten. Die Proben der Mm. gastrocnemii wurden in 4 äquivalente Bereiche aufgeteilt. Pro Bereich wurden jeweils 6 Schnitte gewonnen. Da es beim Schneiden der Blöcke an der Schnittkante zu einer leichten Verfaltung der Schnitte kommt, wurden sie 20 Minuten lang in ein Wasserbad bei 37° zur Entfaltung gegeben. Anschließend wurden die Schnitte auf Objektträger übertragen und über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank zur Trocknung belassen. Bis zur weiteren immunhistochemischen Untersuchung wurden die Schnitte bei 4°C gelagert.

Ähnlich wurde mit den Proben der Mm. adductorii verfahren, wobei hier drei repräsentative Schnitte aus der Mitte der Muskelgruppe zwischen Ursprung und Ansatz im Abstand von 100 µm gewonnen wurden, um eine repräsentative Übersicht der Morphologie der Mm. adductorii zu erhalten.

3.2.2. Vorbereitung der Schnittpräparate

Um an den gefertigten Schnittpräparaten histologische Nachweisverfahren anwenden zu können, müssen die Schnitte entparaffiniert und rehydriert werden.

Tabelle 2: Protokoll zur Entparaffinierung und Rehydrierung

| | | |
|----|--|------------|
| 1. | Schnitte in Xylol (Merck) entparaffinieren | 2 x 10 min |
| 2. | Einlegen in 100% Ethanol | 5 min |
| 3. | Einlegen in 95% Ethanol | 5 min |
| 4. | Einlegen in 70% Ethanol | 5 min |
| 5. | Einlegen in Aqua dest. | 2 x 5 Min |

3.3. Histologische Nachweisverfahren

3.3.1. Hämatoxilin-Eosin-Färbung

Zur vorläufigen Beurteilung bezüglich der Gewebeerhaltung und -beschaffenheit wurden zunächst HE-Präparate aller Gewebeproben angefertigt. Zellkerne werden von dem basischen Hämalaun blau angefärbt, alle anderen Strukturen erscheinen in verschiedenen Farbabstufungen durch Eosin rot. Auf Grund dieser Färbung war es Möglich, die Schnitte in Ausrichtung und Qualität des Schneidevorgangs zu selektieren. Nur optimale Schnitte wurden in dieser Studie verwendet.

Tabelle 3: Färbeprotokoll Hämatoxilin-Eosin-Färbung

| | | |
|----|---|----------------|
| 1. | Schnitte in Hämalaun nach Mayer (Chroma) zur Kernfärbung einstellen | 3 min |
| 2. | Bläuen in fließendem Leitungswasser | 5 min |
| 3. | Aqua dest. | Eintauchen |
| 4. | Färben in Eosin 2% (Chroma) | 3 min |
| 5. | 95% Alkohol | 2 x eintauchen |
| 6. | 100% Alkohol | 2 x 30 sec. |
| 7. | Xylol | 5 min |
| 8. | Eindecken der Schnitte mit Entellan (Merck) | |

3.3.2. Lectin-Färbung

In dieser Studie wurde Lectin von *Bandeirea Simplicifolia* (BS-I von Sigma) verwendet, das mit dem Fluorochrom Tetramethylrodamine Isothiocyanat (TRITC) konjugiert ist. Dieses Fluorochrom leuchtet bei Betrachtung durch ein Fluoreszenzmikroskop rot.

Lectin ist ein Polysaccharid, welches an die Glycokalix, d. h. an eine spezifische Zuckerstruktur in der Basalmembran von Gefäßendothelien, bindet. Es eignet sich daher besonders zur Darstellung von Kapillaren.

Nach Entparaffinierung und Rehydratation wurden die Schnitte 4 mal 3 Minuten in PBS gewaschen. BS-I wurde in PBS auf ein Verhältnis von 1:100 verdünnt. Dann wurden 50µl pro Schnitt (3 Schnitte pro Objektträger) aufgetragen und für 60 Minuten im Wärmeschrank bei 37°C belassen. Es folgte wieder eine Waschung in PBS von 4 mal 3 Minuten. Anschließend wurden die Objektträger mit Mowiol (Herstellung siehe Anhang, Kapitel 3.3.4.) eingedeckt.

Diese Färbung erfolgte gemeinsam mit der Immunfluoreszenzfärbung von MHC-I (s. unten) und diente der Bestimmung der Kapillardichte.

3.3.3. Immunhistochemische Nachweisverfahren

In der Immunhistochemie werden Proteine (Antigene) mit Hilfe von Antikörpern (Immunglobulinen) markiert. Diese Antikörper können entweder selbst mit einem sichtbaren Farbstoff gekoppelt sein (direkte Methode) oder aber ein zweiter Antikörper (Sekundärantikörper) bindet an den ersten Antikörper (Primärantikörper). Der Sekundärantikörper wiederum kann mit einem Farbstoff gekoppelt sein, oder aber er lässt sich mit chemischen Methoden anfärben (z.B. durch Oxidationsvorgänge, siehe unten) Die so markierten Proteine können dann sowohl in der Licht- oder in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden. Außerdem lässt sich das Signal verstärken, da es möglich ist, den Primärantikörper mit mehreren Sekundärantikörpern zu binden. In der

vorliegenden Studie wurden verschiedene indirekte Methoden verwendet. Um die gewünschten Proteine nachzuweisen, wurden Immunglobuline der Klasse G benutzt (IgG). Es wurden sowohl monoklonale, als auch polyklonale Antikörper verwendet.

Monoklonale Antikörper zeichnen sich durch hohe Spezifität für ein bestimmtes Antigenepitop aus. Dadurch sind sie jedoch weniger sensitiv als polyklonale Antikörper.

Polyklonale Antikörper dagegen erkennen mehrere Epitope desselben Antigens. Dadurch ist zwar die Reaktivität höher, aber die Wahrscheinlichkeit einer falsch positiven Markierung (Kreuzreaktion) erhöht sich ebenfalls.

Die in Tabelle 4 gezeigten Antikörper wurden verwendet.

Tabelle 4: Antikörper

| Antikörper | Wirt | Verd. in μ l | Hersteller |
|---|-----------|---------------------|-------------------|
| Monoclonal- Anti-skeletal- myosin-I (slow) | Maus | 1 :200 0 | Sigma |
| Anti-smooth- muscle- myosin-IgG | Kaninchen | 1 :200 | Paesel & Lorei |

Die Bestimmung des Muskelfasertyps wurde durchgeführt, da ein typisches Zeichen dafür, dass ein Muskel unter Hypoxie leidet, die Tatsache ist, dass die Fasern innerhalb dieses Muskels den Typ ändern. Monoclonal-Anti-skeletal-myosin-I wurde zur Markierung der Muskelfasern im Bereich des M. gastrocnemius, und im M. plantaris benutzt. Dieser Antikörper bindet an Myosin

vom langsamen Typ (Typ I) von Skelettmuskulatur. So konnte festgestellt werden, ob eine Veränderung des Muskelfasertyps bei den verschiedenen Gruppen auftritt.

Anti-smooth-muscle-myosin-IgG wurde zur Markierung von Arterien und Arteriolen benutzt. Hierbei bindet der Antikörper an Myosin von glatten Muskelzellen. So können die Parameter Arteriendichte, Kapillardichte, Anzahl der Kollateralarterien und der Durchmesser der Kollateralarterien bestimmt werden.

3.3.3.1. Inkubation mit Primärantikörpern

Für die Immunhistochemie an Paraffinschnitten müssen alle Schnitte zunächst, wie oben beschrieben, entparaffiniert und rehydriert werden.

Für die Markierung mit Monoclonal-Anti-skeletal-myosin- I (MHC-I) und Anti-smooth-muscle-myosin-IgG wurden zunächst alle Schnitte für 20 Minuten in 0.02% Pepsinlösung (siehe Anhang, Kapitel 3.3.4.) bei 35°C belassen. Anschließend erfolgte eine viermalige Waschung in PBS für drei Minuten. Daraufhin wurden alle Schnitte für 25 Minuten bei Raumtemperatur in Block-Lösung (siehe Anhang, Kapitel 3.3.4.) belassen. Dann erfolgte die Markierung durch den Antikörper (siehe Tabelle). Pro Schnitt wurden 50µl des Antikörpers auf die Objektträger aufgetragen. Zur Inkubation wurden alle Schnitte in feuchte Kammern gebettet, um ein mögliches Austrocknen der Schnitte und der Antikörperlösung zu verhindern. Außerdem wurde so eine Lichtexposition der photosensiblen Antikörper zu vermeiden. Die Inkubation erfolgte dabei nach folgendem Schema:

Tabelle 5: Inkubation mit erstem Antikörper

| Antikörper | Verd. | Verdünnungs- -medium | Inku- bationszeit | Inkubations- temperatur | Nachweis von: |
|--|-------------|-------------------------|----------------------|----------------------------|--|
| Monoclonal- Anti-skeletal- myosin-I (slow) | 1 :200 0 | Block- Lösung | 60 Min. | 37°C | Langsame Fasern von quer- gestreifter Muskulatur |
| Anti-smooth- muscle- myosin-IgG | 1 :200 | PBS | 16 Std. | 4°C | Glatte Muskulatur (Gefäß- muskulatur) |

Anschließend erfolgte eine nochmalige Spülung von drei mal drei Minuten in PBS und die Markierung der Primärantikörper nach verschiedenen Färbungsmethoden. (s.ff.)

3.3.3.2. Peroxidase Färbung

Peroxidase ist ein Enzym, welches in der Lage ist, oxidative Reaktionen zu katalysieren. Somit lassen sich Strukturen, die mit Peroxidase gekoppelt wurden, durch die Zugabe einer leicht zu oxidierenden Substanz sichtbar machen.

Färbung der mit Anti-smooth-muscle-myosin-IgG gekoppelten Schnitte:

Diese Schnitte wurden vor der endgültigen Färbung mit einem zweiten Antikörper gekoppelt.

Tabelle 6: Sekundärer Antikörper:

| Antikörper | Wirt | Verd. | Hersteller |
|---|------|---------------|------------|
| Biotin-SP-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG | Esel | 1 :100 PBS | Dianova |

Dieser Antikörper ist mit dem Vitamin Biotin verbunden. Biotin wiederum besitzt vier Bindungsstellen für Streptavidin, ein Protein von *Streptomyces avidinii*, einer Pflanze. Dieses zeichnet sich durch seine hohe Bindungsaffinität zum Vitamin Biotin aus. So können an einen Primärantikörper letztendlich vier Streptavidinkomplexe binden und so eine Verstärkung des Signals bewirken. Die entgültige Färbung erfolgte, wie oben bereits erwähnt, mittels Peroxidase gekoppeltem Streptavidin:

Tabelle 7: Peroxidase gekoppeltes Streptavidin

| Name | Verd. | Hersteller | Farbe |
|--|--------------|------------|-------|
| Peroxidase conjugated Streptavidin | 1:100 PBS | Rockland | Braun |

Die Schnitte wurden bei dieser Prozedur nach der Markierung mit dem ersten Antikörper mit 50µl pro Schnitt benetzt und 60 Minuten bei Raumtemperatur zur Inkubation belassen. Nach erneuter 4 mal 3 Min. Spülung in PBS, erfolgte die ebenfalls 60 minütige Inkubation mit Peroxidase conjugated Streptavidin (50µl pro Schnitt)

Färbung der mit Monoclonal-Anti-skeletal-myosin-I gekoppelten Schnitte:

Die mit Monoclonal-Anti-skeletal-myosin-I markierten Schnitten wurden ebenfalls nach Markierung mit dem Primärantikörper mit einem zweiten Antikörper inkubiert.

Tabelle 8: Sekundärer Antikörper:

| Name | Verd. | Hersteller | Farbe |
|--|------------------|------------|-------|
| Anti-mouse- peroxidase- linked-IgG | 1:100 PBS | Amersham | Braun |

Im Gegensatz zu den mit Anti-smooth-muscle-myosin-IgG markierten Schnitten wurde hier ein Antikörper gewählt, der bereits mit Peroxidase gekoppelt ist. Wie oben erfolgte die Inkubation des verdünnten Antikörpers (50µl pro Schnitt) für 60 Minuten bei Raumtemperatur.

Anschließend wurden alle Schnitte, Anti-smooth-muscle-myosin-IgG und Monoclonal-Anti-skeletal-myosin- I, nach 4 mal 3 Min. Waschung in PBS wie folgt eingefärbt. Zur Initialisierung dieser sichtbaren Oxidation wurde Diaminobenzidin (DAB, Herstellung siehe Anhang, Kapitel 3.3.4) verwendet. Diaminobenzidin fungiert als Substrat für die Peroxidase, wird oxidiert und hinterlässt eine braune Ablagerung an den Stellen, an denen sich die Peroxidase befindet. Die Reaktion wird mit einem O₂ -Donator wie Wasserstoffperoxid aktiviert.

Dazu wurden die Schnitte bei Raumtemperatur in DAB (Sigma) ca. 10 bis 15 Minuten getaucht. Alle ein bis zwei Minuten erfolgte eine mikroskopische Beurteilung der Schnitte, um den Verlauf der Oxidation genau zu verfolgen. War eine ausreichende Färbung der Zielstrukturen erreicht, wurde die Reaktion durch mehrmaliges Spülen in PBS gestoppt, da eine zu lange Inkubation zu einer starken Hintergrundfärbung führen würde. Zum Abschluss erfolgte eine letztmalige Spülung in PBS für vier mal drei Minuten.

Abschließend erfolgte das Eindecken der Schnitte mit Mowiol (siehe Anhang, Kapitel 3.3.4.).

3.3.3.3. Immunfluoreszenz-Färbung

Bei den Schnitten, die bereits mit Monoclonal-Anti-skeletal-myosin-I markiert wurden, kam ein weiteres Verfahren zur Anwendung. Es wurde ein sekundärer Antikörper verwendet, der mit dem fluoreszierenden Farbstoff Fluorescein verbunden ist. Betrachtet man den Schnitt unter dem Fluoreszenzmikroskop, so leuchten die markierten Strukturen grün.

Tabelle 9: Sekundärer Antikörper:

| Name | Verd. | Hersteller | Farbe |
|--|------------------|------------|-------|
| Fluorescein (FITC) conjugated AffiniPure Donkey Anti- mouse-IgG | 1:200 PBS | Dianova | Grün |

Die mit Monoclonal-Anti-skeletal-myosin-I markierten Schnitte wurden mit Fluorescein (FITC) conjugated AffiniPure Donkey Anti-mouse-IgG zusammen mit BS-I (50µl pro Schnitt) (siehe Kap.: 3.3.2.) inkubiert. Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten und wurde bei 37°C durchgeführt. Die so markierten Schnitte erlaubten auf diese Weise eine gleichzeitige Beurteilung sowohl der Typ I Muskelfasern und der sie umgebenden Kapillaren im Fluoreszenzmikroskop.

Abschließend erfolgte auch hier das Eindecken der Schnitte mit Mowiol (siehe Anhang, Kapitel 3.3.4.).

3.3.4. Anhang

Beschichtung der Objektträger

Für die Untersuchungen wurden silikonbeschichtete Objektträger verwendet, da diese Beschichtung eine bessere Haftung der Schnitte während der Inkubations- und Waschschrte gewährleistet. Hierzu wurden unbeschichteten Glasobjektträger (Menzel-Superfrost) mit in Wasser gelöstem Extran (Merck) gereinigt, mit Aqua dest. gespült und über Nacht in einem Trockenschrank bei 40°C getrocknet. Am nächsten Tag konnten die Objektträger für jeweils 5 Sekunden in eine 2%igen 3-Aminopropyltriethoxy-silane-Lösung (Sigma) getaucht und nach kurzem Spülen in Aceton und 2mal in Aqua dest. wieder über Nacht getrocknet werden. Um Verunreinigungen zu vermeiden, wurden die Objektträger bis zur Verarbeitung in einem Exsikkator gelagert.

Herstellung von PBS (Phosphate Buffered Saline) Lösung

Zur Herstellung der Stammlösung wurden 397,4 g NaCl, 10 g KCl, 10 g H₂PO₄ und 88,75 g Na₂HPO₄ x H₂O in 5 Liter Aqua dest. aufgelöst.

Für das gebrauchsfertige PBS wurden 500 ml dieser Lösung mit Aqua dest. auf 5 Liter verdünnt und auf einen pH von 7,4 eingestellt.

Herstellung von 2% Paraformaldehyd (PFA) Lösung

Es wurden 20g Paraformaldehyd (Merck) und drei Natriumhydroxid-Plätzchen (Merck) in einem Liter PBS unter kontinuierlichem Rühren aufgelöst. Danach wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und das aliquotierte PFA bei -20°C aufbewahrt, und bei Bedarf wieder aufgetaut.

Herstellung von gebrauchsfertigem Mowiol

200 ml PBS werden auf pH 8,0 eingestellt, 50 g Mowiol 4-88® (Calbiochem # 475904), zugeben und 16 h gerührt. Anschließend werden 25 ml wasserfreies Glycerin (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) zugegeben und weitere 16 h gerührt. Nach 15 minütigem Zentrifugieren bei 4°C und 12.000 UpM kann der

Überstand in geeignete Gefäße abgegossen und bei -20°C eingefroren oder bei $+4^{\circ}\text{C}$ gebrauchsfertig aufbewahrt werden.

Herstellung von Pepsin-Lösung

Pepsin ist ein Verdauungsenzym. Es ist in der Lage, Proteine unspezifisch zu spalten. Dadurch erhöht sich die Anzahl der Antigen präsentierenden Strukturen, und man erzielt dabei eine bessere Markierung durch Antikörper.

In dieser Arbeit wurde eine Lösung von 0.02% Pepsin in 0.2N HCl-Lösung benutzt.

Herstellung von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)

Diaminobenzidin (DAB) der Firma Sigma wurde als Substrat für die mit Peroxidase konjugierten Immunglobuline benutzt. Dabei oxidiert die Peroxidase das DAB und dieses färbt sich braun. Diese Braunfärbung lässt sich dann lichtmikroskopisch beurteilen.

DAB liegt als Pulver vor und wurde zur weiteren Verwendung zu 0.3% in PBS gelöst. Da das DAB sehr photosensitiv ist, wurde es bei jeder Färbung neu angesetzt und dabei vor direkter Belichtung durch Aluminiumfolie geschützt. Direkt vor der Inkubation wurde $1\mu\text{l}$ H_2O_2 als Reaktionsaktivator pro ml DAB addiert.

Herstellung von Block-Lösung

Um eine Kreuzreaktion der Antikörper mit anderen als den erwünschten antigenen Strukturen zu vermeiden, wurden alle Schnitte vor der Markierung durch Antikörper geblockt. Es wurde eine Lösung aus 0.4% Glycin und 0.1% BSA gelöst in PBS benutzt. Diese Lösung blockiert unspezifisch Protein-Protein Bindungen und verbessert dadurch das Verhältnis von Antikörpermarkierung zu Kreuzreaktion. Die so genannte Hintergrundfärbung wird dadurch vermieden.

Eindecken der Schnitte mit Mowiol:

Es wurde ein Tropfen des dickflüssigen Mowiois auf jeden Schnitt gegeben und dann ohne Bläschenbildung mit Deckgläschen (Mariefeld) abgedeckt.

3.4. Quantifizierung

Zur Quantifizierung der Parameter in den mikroskopischen Schnitten wurde ein DM-RB Mikroskop der Firma Leica verwendet.

Zur Beurteilung der mit fluoreszierenden Farbstoffen (FITC und BS I) markierten Schnitte wurden sie in Auflichttechnik untersucht. Bei dieser Methode wird das von einer 100 Watt Quecksilber-Dampf-Lampe (Osram) erzeugte Licht von oben durch spezifische Lichtfilter auf den Objektträger geleitet. Dort führt es zu einer Anregung der Fluoreszenz-Farbstoffe. Da die Filter nur für Licht einer oder mehrerer spezifischer Wellenlängenbereiche durchlässig sind, können die verschiedenen Fluoreszenz-Farben sowohl separat als auch gemeinsam beurteilt werden.

Zur Beurteilung der mit Peroxidase behandelten Schnitte wurden Immunfluoreszenzfarbfilter und Quecksilber-Dampf-Lampe ausgeschaltet und die Präparate konventionell in der Durchlichttechnik beurteilt.

Zur Messung der Oberflächen und Durchmesser wurden die Schnitte zusammen mit einem Messgitter, passend zu den verwendeten Objektiven und deren Vergrößerung, fotografiert und mit dem Programm NIH v.1.62 am Computer ausgemessen.

3.4.1. Bestimmung der Anzahl der Kollateralarterien in den Mm. adductorii

In den Schnitten der Mm. adductorii wurden alle Kollateralarterien gezählt (siehe unten). Die Schnitte umfassten die gesamte Muskelgruppe (Mm. adductorii) eines Tieres.

Die Schichten der Mm. adductorii unterscheiden sich durch die Größe ihrer einzelnen Fasern. Die oberflächliche Schicht enthält sehr kleine dünne Fasern, während die tiefer gelegene Schicht deutlich größere Fasern enthält. Die oberflächlichen Muskelschichten der Mm. adductorii enthalten präexistierende Kollateralen [9], während sich in den tiefer gelegenen Schichten auch muskelversorgende Arterien befinden (siehe Abbildung 3)

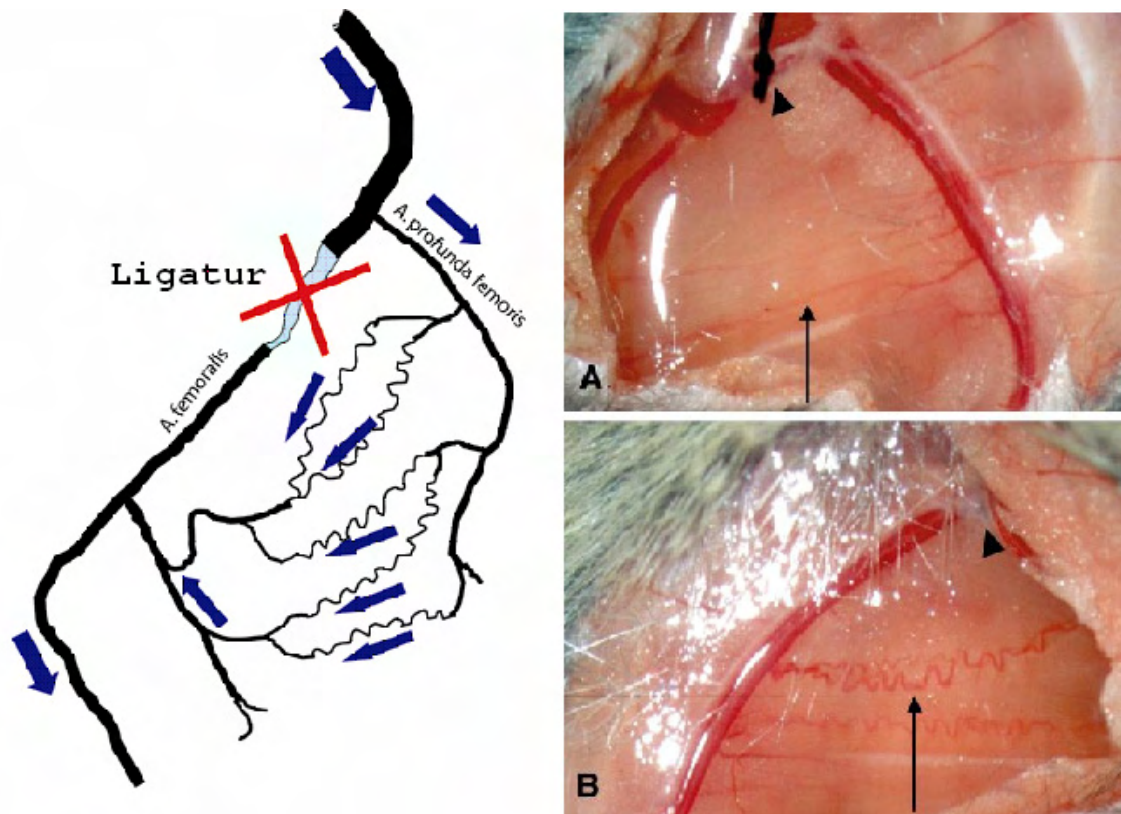


Abbildung 3: Diese Abbildung zeigt den Verlauf der Kollateralarterien im rechten Oberschenkel der Maus. Die Ligatur befindet sich zwischen dem Abgang der A. profunda femoris und der A. poplitea. Die Kollateralarterien liegen oberflächlich auf der Muskulatur der Mm. Adductorii und sind mit einem dünnen schwarzen Pfeil markiert. Das schwarze Dreieck markiert die Ligatur. A: Tag 1 der Okklusion B: Tag 39 der Okklusion In B sieht man die deutlich ausgebildeten Kollateralgefäße.

Als Kollateralarterie gilt jedes Gefäß, welches sich epifascial, subfascial oder zwischen den oberflächlichen Muskelschichten des Präparates befindet (siehe Abbildung 4 rote Pfeile). Alle anderen Gefäße wurden nicht mitgezählt.

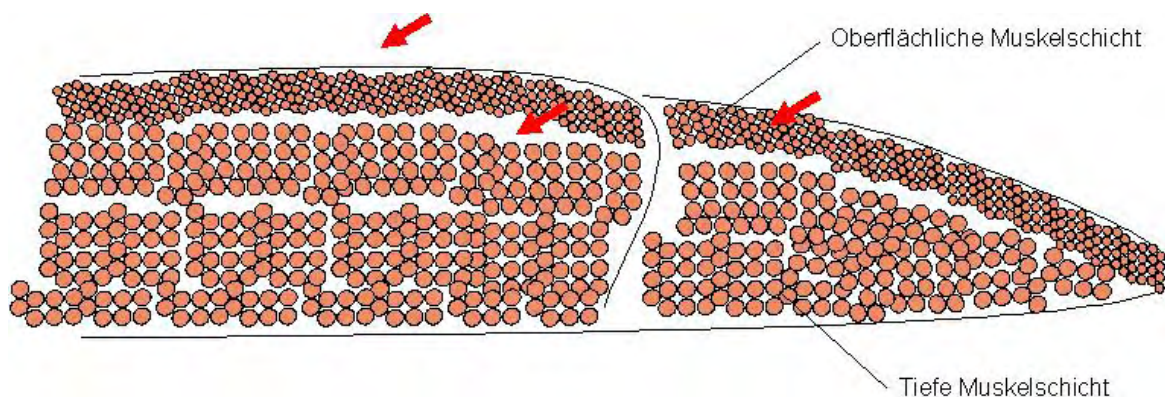


Abbildung 4: Diese Abbildung zeigt einen schematischen Querschnitt durch die Gruppe der Mm. Adductorii. Die oberflächliche Muskulatur ist durch dünne Muskelfasern charakterisiert, während die tiefe Schicht aus dickeren Fasern besteht. Als Kollateralen wurden Gefäße identifiziert, die sich an den mit roten Pfeilen markierten Stellen befanden und deren Wand glatte Muskulatur enthielt.

3.4.2. Bestimmung des Gesamtdurchmessers der Kollateralarterien in der Adduktorengruppe

Die Präparate der mit Anti-smooth-muscle-myosin-IgG gefärbten Adduktorengruppe wurden fotografiert und zur weiteren Bearbeitung in das NIH-Programm importiert. Dort wurde der Perimeter jeder Kollateralarterie pro Probe gemessen und der Durchmesser bestimmt. Die Durchmesser wurden addiert und als Gesamtdurchmesser pro Probe dargestellt.

3.4.3. Bestimmung der Zunahme des Gesamtdurchmessers der Kollateralarterien in der Adduktorengruppe von nicht okkludierter Seite zu okkludierter Seite

Aus den Werten des Gesamtdurchmessers der Kollateralarterien (siehe Kap. 3.4.2.) wurde der Unterschied zwischen der nicht okkludierten und der okkludierten Seite eines jeden Tieres bestimmt.

3.4.4. Bestimmung der Arteriendichte im Musculus gastrocnemius

Die Präparate des mit Anti-smooth-muscle-myosin-IgG, zur Darstellung der Arterien (siehe Kap. 3.3.3.), eingefärbten M. gastrocnemius wurden unter dem Mikroskop mit einem Messgitter betrachtet und die Arteriolen des gesamten Muskels gezählt. Anschließend wurde deren Anzahl mit der Fläche des Muskels in Relation gesetzt. Um den Zählfehler möglichst gering zu halten, wurde diese Prozedur dreimal wiederholt und der Mittelwert gebildet.

3.4.5. Bestimmung der Kapillardichte im Musculus gastrocnemius

In den mit BS-I, zur Darstellung der Kapillaren (siehe Kap. 3.3.2.), und MHC-I, zur Darstellung der Muskelfasern (siehe Kap. 3.3.3.), gefärbten Schnitten des M. gastrocnemius wurde jeweils die Anzahl der Kapillaren und der Muskelfasern im vorliegenden Präparat bestimmt. Anschließend wurde die Anzahl an Kapillaren pro Muskelfaser berechnet. Die Messungen erfolgten in verschiedenen Bereichen. Zum einen in dem Bereich des M. gastrocnemius, der zum überwiegenden Anteil von langsamen Fasern (Typ I Fasern) besetzt ist (rot), und zum anderen in dem Bereich, der zum überwiegenden Anteil von schnellen Fasern (Typ II Fasern) besetzt ist (weiß). Auch im M. Plantaris (hauptsächlich bestehend aus Typ I Fasern) erfolgte eine solche Messung, die mit der Messung des roten M. gastrocnemius zusammengefasst wurde. Die von Armstrong [44] beschriebene Verteilung der Fasertypen ist die Grundlage der in dieser Arbeit dargestellten Resultate.

3.4.6. Flächenbestimmung der langsamen Muskelfasern (Typ I) im Musculus gastrocnemius

Die Proben wurden unter dem Mikroskop fotografiert und die Aufnahmen anschließend mittels des NIH Programms weiterbearbeitet. Dabei wurde die von langsamen Fasern (MHC-I) eingenommene Fläche im M. gastrocnemius

bestimmt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde dann der prozentuale Anteil der MHC-1 markierten Fasern an der Gesamtfläche des Muskels berechnet.

Anschließend wurden die Werte zwischen den Gruppen verglichen.

3.5. Auswertung und Statistik

Die Datenaufbereitung, Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Programms Excel (Microsoft Corporation), wobei alle Ergebnisse als Mittelwerte mit zugehörigen Standardfehlern dargestellt wurden. Die vergleichende Statistik wurde mit Hilfe des Programms SigmaStat durchgeführt. Der verwendete Test war bei gegebenen Voraussetzungen die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA). Zum Vergleich der Tiergruppen wurde der t-Test für unabhängige bzw. abhängige Stichproben oder alternativ der Mann-Whitney- bzw. Wilcoxon-Test benutzt. In allen Fällen galt ein Ergebnis mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als signifikant.

III. Ergebnisse

1. Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen

Alle Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen wurden von Swen Wolfram erarbeitet und für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Sie sind ausführlicher in seiner Dissertation „Determination of the Cardiovascular Phenotype of Different transgenic Mouse Models, Fachbereich Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen 2002“ beschrieben.

1.1. Trainingskapazität

Die Gruppe der transgenen, trainierten Tiere zeigte gegenüber allen anderen Gruppen einen signifikanten Anstieg der Trainingskapazität.

So stieg die Trainingskapazität der transgenen, trainierten Gruppe um 206% und die der nicht transgenen, trainierten Gruppe um 120% gegenüber den nicht transgenen, nicht trainierten Tieren.

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der nicht trainierten, transgenen und der nicht trainierten, nicht transgenen Gruppe.

1.2. Blutfluss

Die Messung der relativen Durchblutung ergab eine signifikante Verbesserung bei den transgenen, trainierten Tiere im Vergleich zu den trainierten, nicht transgenen und den nicht trainierten, nicht transgenen Tieren. Auch die Gruppe der transgenen, nicht trainierten Tiere zeigte eine deutliche Steigerung der Durchblutung im Verhältnis zu den nicht transgenen nicht trainierten Tieren, der Unterschied erreichte jedoch keine Signifikanz.

Die Messung der absoluten Durchblutung zeigte unterschiedliche Ergebnisse für die Hinterläufe mit und ohne Okklusion der A. Femoralis. So erwies sich die Durchblutung in den Hinterläufen mit Femoralisokklusion der transgenen, trainierten und der transgenen, nicht trainierten Tiere als signifikant verbessert im Vergleich zu den Hinterläufen der nicht trainierten, nicht transgenen Tiere mit Femoralisokklusion. Es ergab sich kein Unterschied in der Durchblutung zwischen den Hinterläufen der transgenen, nicht trainierten und den transgenen, trainierten Tieren. Die Untersuchung der Hinterläufe der nicht okkludierten Tiere ergab eine abgestufte Erhöhung der Durchblutung mit der Zugehörigkeit zwischen den Gruppen. Die niedrigsten Durchblutung der Hinterläufe zeigten die nicht transgenen, nicht trainierten, die nächst höhere die nicht transgenen, trainierten, gefolgt von den transgenen, nicht trainierten und schließlich den transgenen, trainierten Tiere. Letztere wiesen eine signifikant verbesserte Durchblutung der Hinterläufe im Vergleich zu den nicht transgenen, nicht trainierten Tieren auf.

1.3. Atrophie des M. gastrocnemius

Die Berechnung des Gewichtsverhältnisses zwischen Körpermasse und Masse des M. gastrocnemius ergab folgende Ergebnisse: Die Gruppe der nicht transgenen, nicht trainierten Tiere zeigte eine Reduktion der rechten Seite, mit Femoralisokklusion, von 15% im Vergleich zur linken Seite ohne Femoralisokklusion. Ein ähnliches Ergebnis ergab sich für die Gruppe der nicht transgenen, trainierten Tiere. Hier zeigte sich eine Reduktion der rechten Seite mit Femoralisokklusion von 14% im Vergleich zur linken Seite ohne Femoralisokklusion.

Bei der Überprüfung der transgenen Tiere ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen okkludierter und nicht okkludierter Seite, weder in der trainierten noch in der untrainierten Gruppe.

Der Unterschied der Gewichtsverhältnisse zwischen den linken Seiten ohne Femoralsiokklusion aller Tiere erwies sich als nicht signifikant. Es zeigte sich jedoch ein Trend zu einem geringeren Gewichtsverhältnis der linken Seite ohne Femoralsiokklusion beider transgener Gruppen im Vergleich zu den Wild-Typ Tieren.

2. Ergebnisse der histologischen Untersuchung

Alle hier dargestellten Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

2.1. Anzahl der Kollateralen in der Adduktorengruppe

Beim Vergleich von Wild-Typ und transgenen Tieren zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die Messwerte, sowohl der Hinterläufen mit Okklusion und der ohne Okklusion der A. femoralis, der trainierten und der ruhenden Tiere, wiesen keinen statistisch messbaren Unterschied im Vergleich zueinander auf. Dennoch konnte gesehen werden, dass Training bei beiden Gruppen eine leichte Erhöhung der Anzahl der Kollateralen in den Hinterläufen ohne Femoralisokklusion zeigte.

Tabelle 10: Ergebnisse der Anzahl der Kollateralarterien

| | Wild-Typ Ruhend | Wild-Typ Trainiert | Transgen Ruhend | Transgen Trainiert |
|-------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|
| Kontrolle | 2,13 \pm 0,35 | 2,15 \pm 0,41 | 2,0 \pm 0,0 | 2,25 \pm 0,5 |
| Okkludiert | 2,5 \pm 0,53 | 2,67 \pm 0,82 | 2,83 \pm 0,75 | 2,75 \pm 0,5 |

Angaben in n/Mm. adductorii \pm Standardabweichung in n/Mm. adductorii

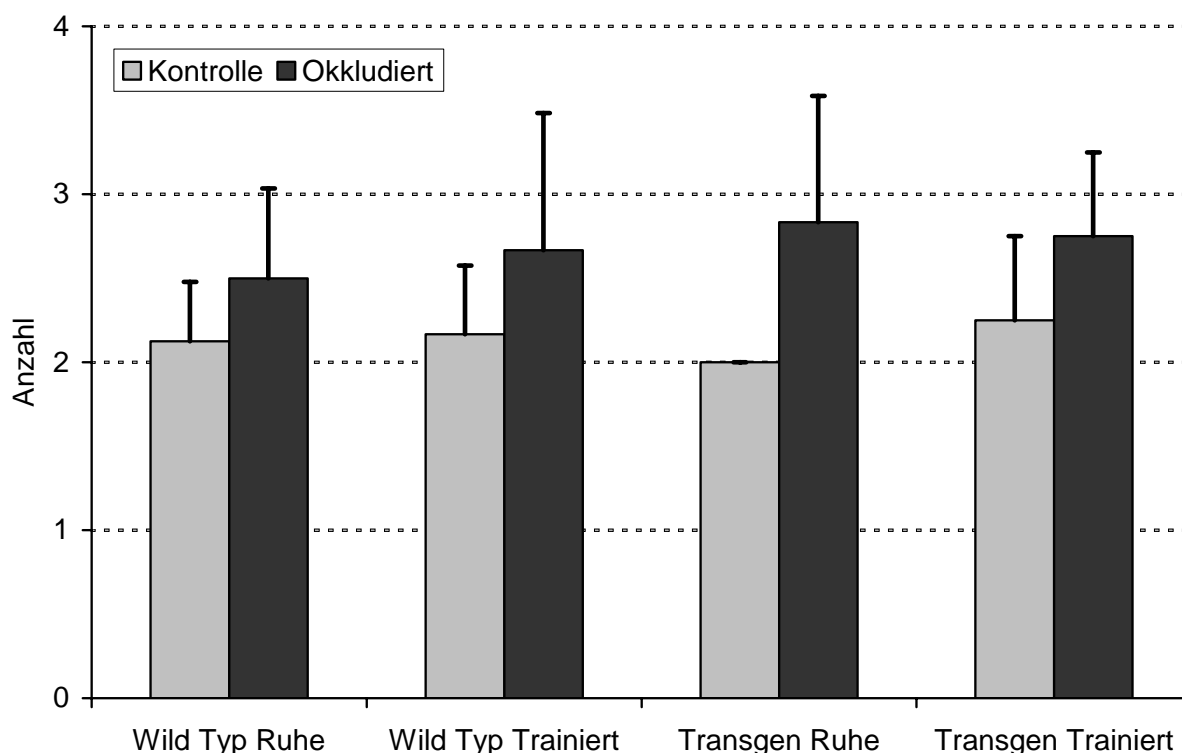


Diagramm 1: Dieses Diagramm stellt die Anzahl der Kollateralarterien dar. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die trainierten, transgenen Tiere weisen in den Kontrollproben (nicht okkludiert), im Vergleich zu ruhenden, transgenen Tieren, eine leichte, aber nicht signifikante Erhöhung der Anzahl der Kollateralen auf.

Da sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den ruhenden und den trainierten Tieren, weder bei der Wild-Typ, noch bei der transgenen Tiergruppe zeigten, wurden die Gruppen der Transgenen und die der Wild Typ zusammengefasst und nochmals statistisch überprüft. Die Zusammenfassung der Messwerte der Tiere ergab, dass die Anzahl der Kollateralarterien in den Mm. adductorii der transgenen Tiere auf der Seite mit Okklusion der A. femoralis signifikant erhöht war gegenüber der ohne Okklusion der A. femoralis.

Tabelle 11: Ergebnisse der Anzahl der Kollateralarterien

| | Wild-Typ | Transgen |
|------------|------------|------------|
| Kontrolle | 2,0 ± 0,36 | 2,0 ± 0,47 |
| Okkludiert | 2,5 ± 0,65 | 3,0 ± 0,63 |
| P | * | < 0.05 |

Angaben in n/Mm. adductorii ± Standardabweichung in n/Mm. adductorii

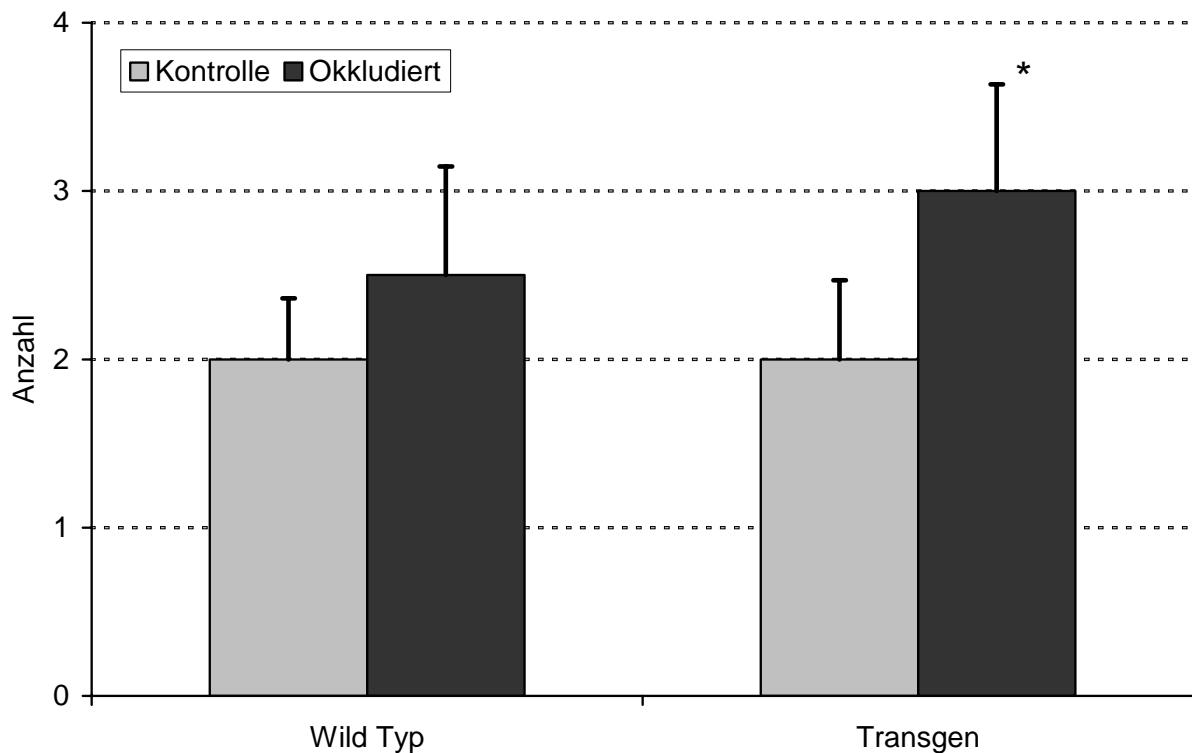


Diagramm 2: Dieses Diagramm stellt die Anzahl der Kollateralarterien in der Gruppe der transgenen und der Wild-Typ Tiere dar. Eine signifikante Erhöhung der Anzahl der Kollateralen zeigen die transgenen Tiere (*). Trainierte und ruhende Tiere beider Gruppen wurden zusammengefasst.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen der Wild-Typ und der transgenen Tiere.

2.2. Summe des Gesamtdurchmessers der Kollaterarterien in der Adduktorengruppe

Der Vergleich aller Gruppen miteinander ergab keine signifikanten Unterschiede. Die Messwerte des Gesamtdurchmessers zwischen den Gruppen der ruhenden Tiere erreichte ein p von 0,05. Vergleich man jedoch die Messwerte der Hinterläufe mit Okklusion der A. femoralis mit denen ohne Okklusion, so zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Gesamtdurchmessers in allen Proben mit Femoralisokklusion in allen Gruppen.

Tabelle 12: Ergebnisse der Summe der Durchmesser der Kollateralarterien

| | Wild-Typ Ruhend | Wild-Typ Trainiert | Transgen Ruhend | Transgen Trainiert |
|-------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|
| Kontrolle | 81,22 ± 7,27 | 74,38 ± 13,54 | 65,44 ± 20,29 | 82,30 ± 4,49 |
| Okkludiert | 139,61 ± 41,42 | 155,76 ± 24,48 | 238,91 ± 76,51 | 178,10 ± 38,66 |
| P | < 0.05 | < 0.05 | < 0.05 | < 0.05 |

Angaben in $\mu\text{m} \pm$ Standardabweichung in μm

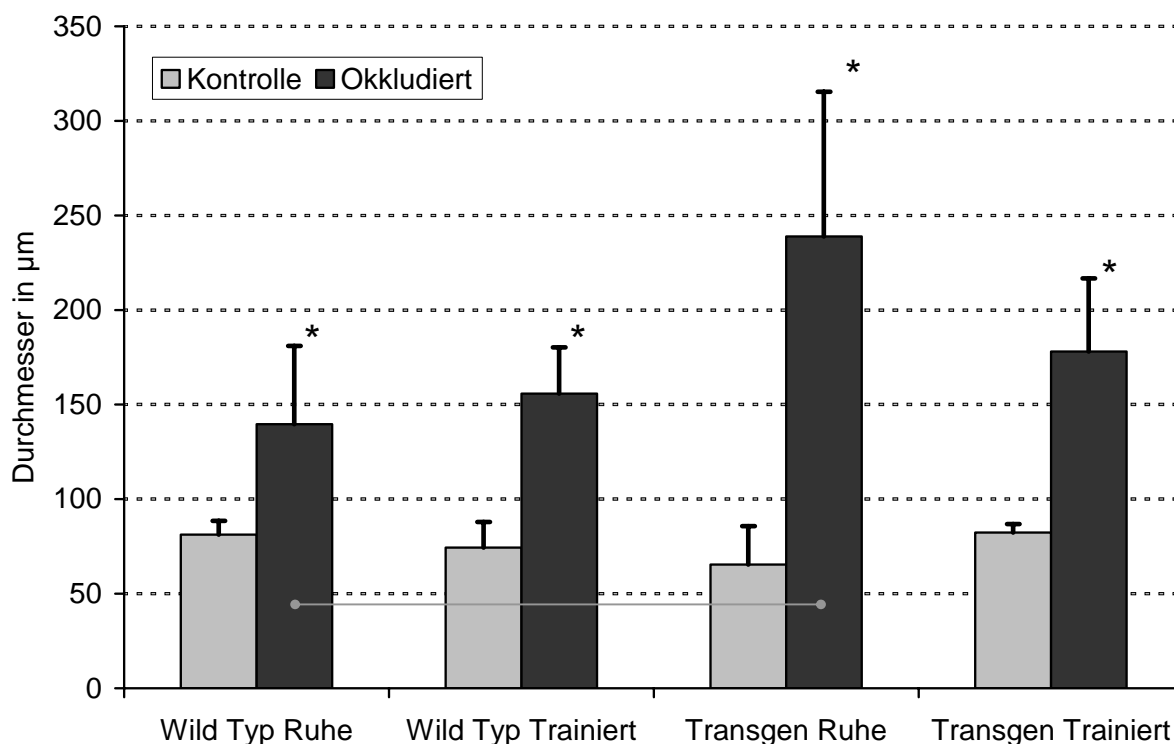


Diagramm 3: Dieses Diagramm stellt die Durchmesser der Kollateralarterien dar. Alle Gruppen zeigen eine signifikante Erhöhung des Gesamtdurchmessers (*) in dem Hinterlauf mit Okklusion der A. femoralis. Der Vergleich zwischen der Gruppe der okkludierten Wild Typ und der Transgenen Tiere zeigt ebenfalls eine signifikante Erhöhung des Gefäßdurchmessers der Kollateralarterien (Balken).

2.3. Zunahme des Gesamtdurchmessers der Kollateralarterien in der Adduktorengruppe von nicht okkludierter Seite zu okkludierter Seite

Die Messwerte des Zuwachses des Durchmessers der Kollateralarterien erhöhten sich signifikant in den transgenen ruhenden Tieren im Vergleich zu den ebenfalls ruhenden Wild-Typ-Tieren.

Tabelle 13: Ergebnisse der Zunahme des Durchmessers der Kollateralarterien

| | Wild-Typ Ruhend | Wild-Typ Trainiert | Transgen Ruhend | Transgen Trainiert |
|---------|--------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|
| Zuwachs | 55,55 ± 51,89 | 42,88 ± 35,37 | 177,68 ± 45,49 | 45,49 ± 21,51 |

Angaben in $\mu\text{m} \pm$ Standardabweichung in μm

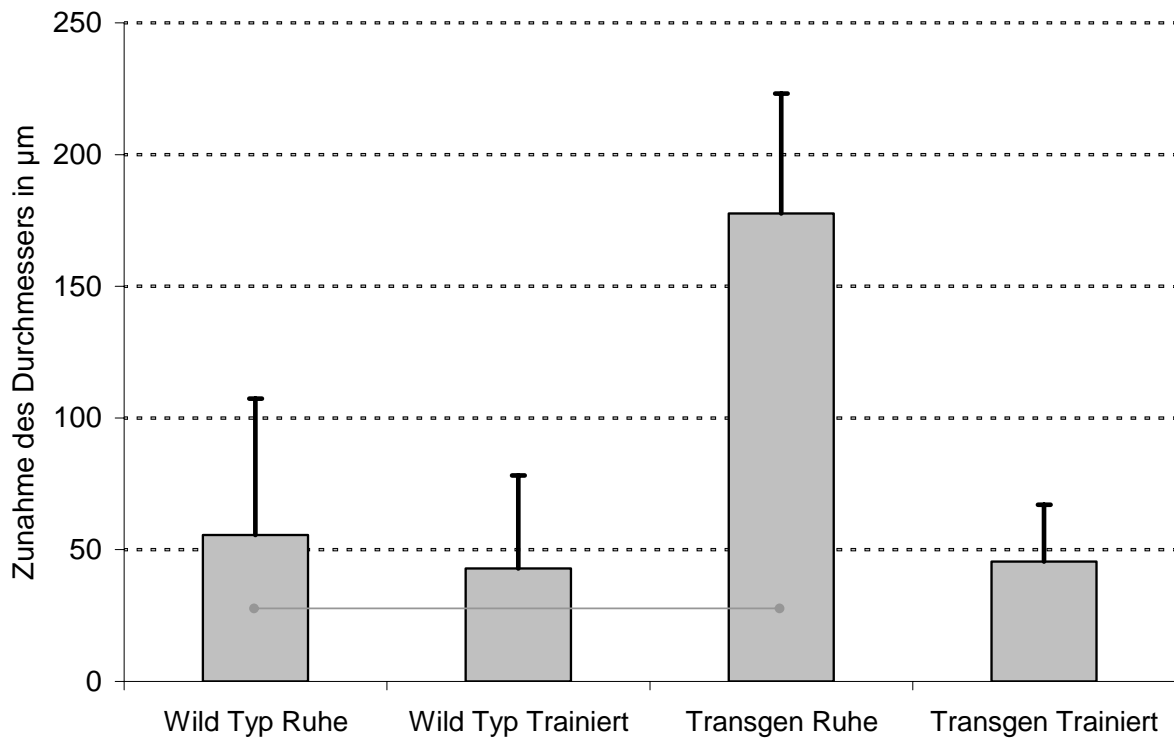


Diagramm 4: Dieses Diagramm stellt die Zunahme des Durchmessers der Kollateralarterien in der Adduktorengruppe dar. Es zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Zunahme des Kollateralarteriedurchmessers zwischen den Gruppen der ruhenden Tiere.

2.4. Arteriendichte im Musculus gastrocnemius

Beim Vergleich der Gruppen von wilden und transgenen Tieren zeigten sich keine Unterschiede. Die Messwerte aller Hinterläufe, mit Okklusion der A. femoralis, oder ohne Okklusion, die der trainierten und der ruhenden Tiere, wiesen keinen statistisch messbaren Unterschied im Vergleich zueinander auf.

Tabelle 14: Ergebnisse der Arteriendichte

| | Wild-Typ Ruhend | Wild-Typ Trainiert | Transgen Ruhend | Transgen Trainiert |
|-------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|
| Kontrolle | 11,71 ± 2,01 | 13,11 ± 2,77 | 11,71 ± 2,97 | 15,91 ± 5,18 |
| Okkludiert | 19,17 ± 11,75 | 17,64 ± 7,57 | 14,47 ± 5,64 | 12,85 ± 2,10 |

Angaben in n/mm² ± Standardabweichung in n/mm²

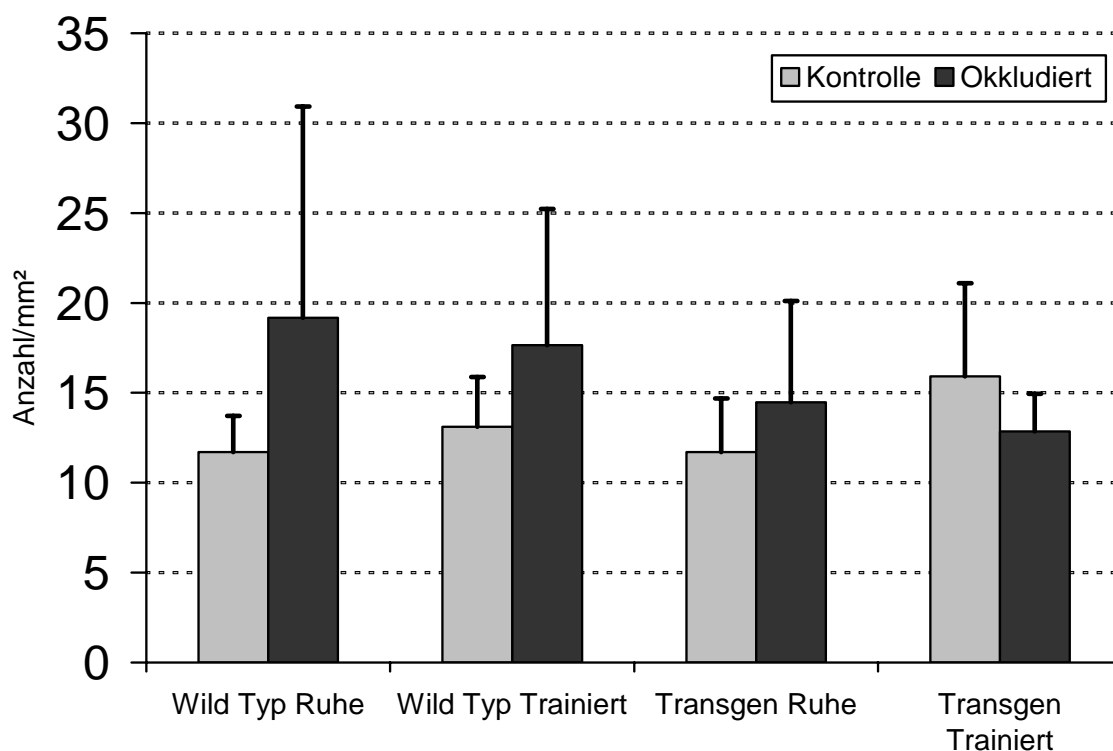


Diagramm 5: Dieses Diagramm stellt die Anzahl der Arterien im *M. gastrocnemius* dar. Die trainierten, transgenen Tiere weisen in den Kontrollproben (nicht okkludiert) eine leichte, aber nicht signifikante, Erhöhung der Anzahl der Arterien auf, im Vergleich zu ruhenden transgenen Tieren.

Da sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den ruhenden und den trainierten Tieren, weder der Wild-Typ, noch der transgenen Tiergruppe zeigten, wurden die Gruppen der transgenen und die der Wild Typ zusammengefasst und nochmals statistisch überprüft. Die Zusammenfassung der Messwerte der ruhenden und der trainierten Tiere ergab, dass die Dichte der Arterien im *Gasrocnemius* der Wildtiere in den Hinterläufen mit Okklusion der *A. femoralis* signifikant erhöht war. In transgenen Tieren war dies jedoch nicht der Fall. (Siehe Abbildung 5-7)

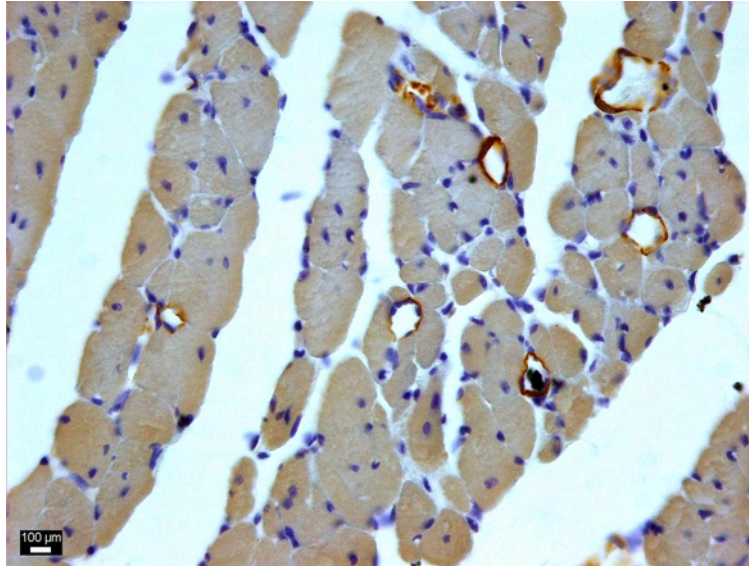


Abbildung 5: In dieser Abbildung sieht man einen Ausschnitt aus dem *M. gastrocnemius*. Der histologische Schnitt stammt von einer Wild-Typ-Maus ohne Okklusion der *A. femoralis*. Hellbraun sind die Muskelzellen, dunkelbraun die glatte Muskulatur der Arterien und blau die Kerne aller Zellen dargestellt. (Hämatoxilin-Peroxidase-Färbung)

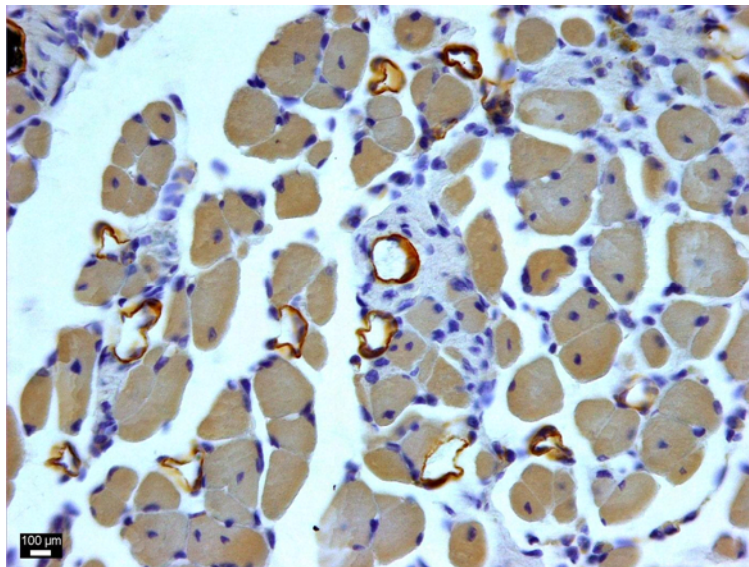


Abbildung 6: In dieser Abbildung sieht man einen Ausschnitt aus dem *M. gastrocnemius*. Der histologische Schnitt stammt von einer Wild-Typ-Maus 30 Tage nach der Okklusion der *A. femoralis*. Hellbraun sind die Muskelzellen, dunkelbraun die glatte Muskulatur der Arterien und blau die Kerne aller Zellen dargestellt. (Hämatoxilin-Peroxidase-Färbung)

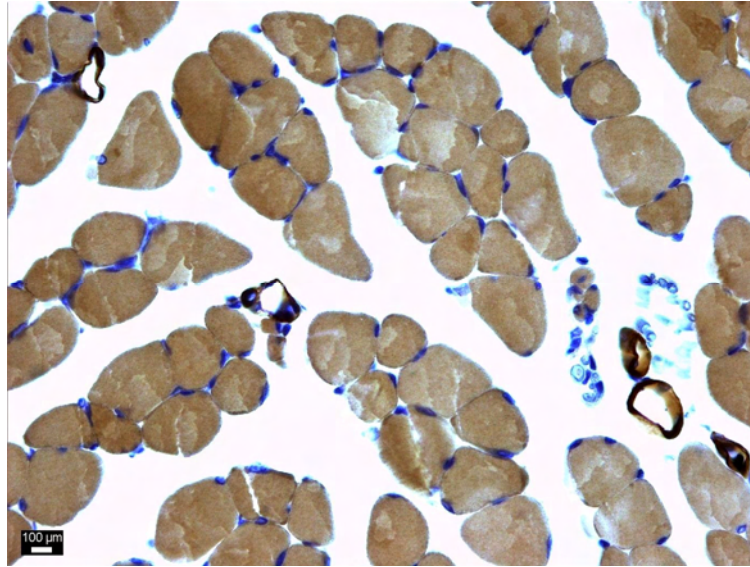


Abbildung 7: In dieser Abbildung sieht man einen Ausschnitt aus dem *M. gastrocnemius*. Der histologische Schnitt stammt von einer transgenen Maus 30 Tage nach der Okklusion der *A. femoralis*. Hellbraun sind die Muskelzellen, dunkelbraun die glatte Muskulatur der Arterien und blau die Kerne aller Zellen dargestellt. (Hämatoxylin-Peroxidase-Färbung)

Tabelle 15: Ergebnisse der Arteriendichte

| | Wild-Typ | Transgen |
|------------|--------------|--------------|
| Kontrolle | 12,27 ± 2,36 | 13,39 ± 4,31 |
| Okkludiert | 18,47 ± 9,67 | 13,66 ± 4,03 |
| P | < 0,05 | * |

Angaben in $n/mm^2 \pm$ Standardabweichung in n/mm^2

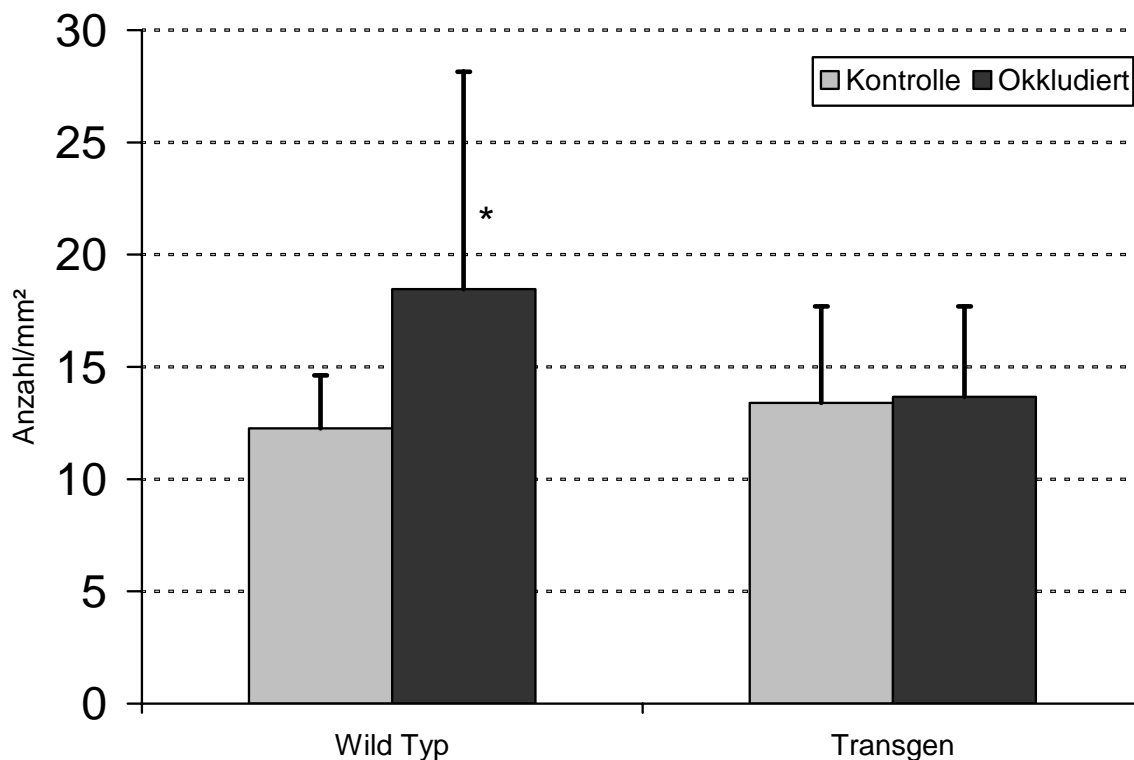


Diagramm 6: Dieses Diagramm zeigt die Arteriendichte im *M. gastrocnemius*. Die Gruppen der trainierten und ruhenden Tiere sind zusammengefasst.

2.5. Kapillardichte im Musculus gastrocnemius

Weißer M. gastrocnemius (von Typ II Fasern besetzt):

Der Vergleich der Werte der Hinterläufe mit und ohne Okklusion der A. femoralis ergab einen signifikant höheren Wert nur bei der Gruppe der ruhenden Wild-Typ Tiere. Alle anderen Tiergruppen zeigten diesen Unterschied nicht.

Beim Vergleich der Gruppen untereinander ergab sich eine signifikant niedrigere Kapillardichte der Seite der Wild-Typ ohne Okklusion ruhend und allen andern Proben ohne Okklusion. (Siehe Abbildung 8-10)

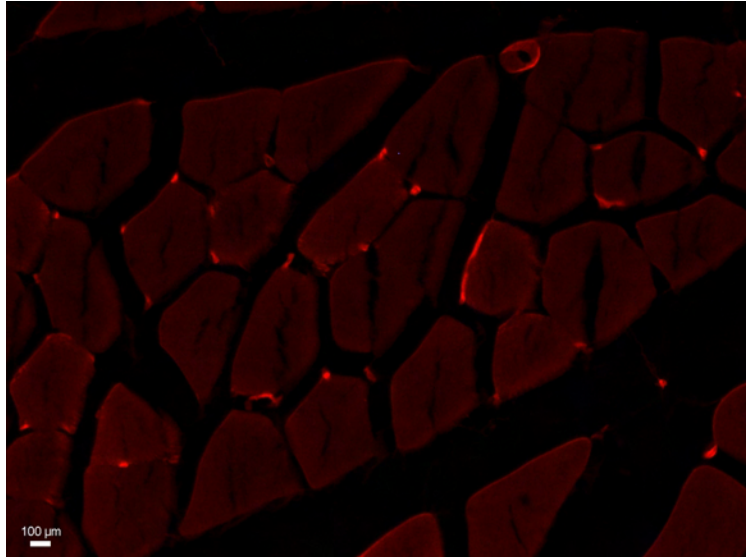


Abbildung 8: In dieser Abbildung sieht man einen Ausschnitt aus dem *M. gastrocnemius*. Der histologische Schnitt stammt von einer Wild-Typ-Maus ohne Okklusion der *A. femoralis*. Leuchtend rot sind die Endothelzellen der Kapillaren dargestellt. Sie befinden sich zwischen den dunkelrot angefärbten Muskelzellen. (Lectin-Färbung)

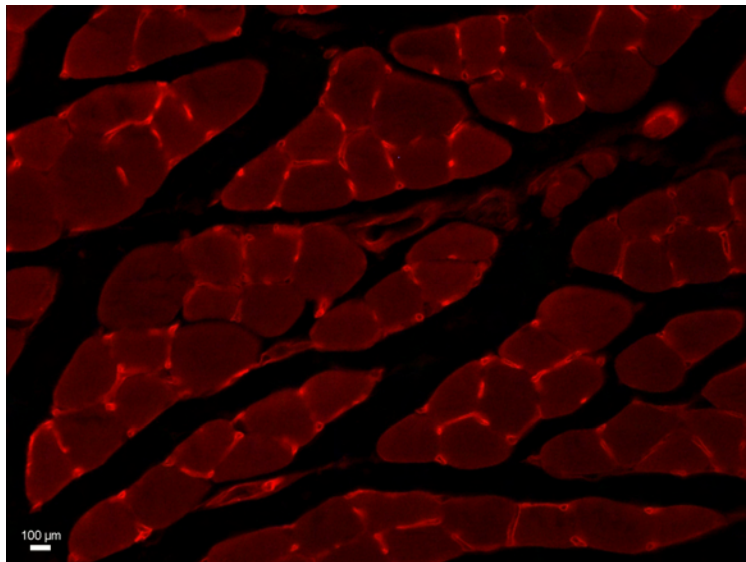


Abbildung 9: In dieser Abbildung sieht man einen Ausschnitt aus dem *M. gastrocnemius*. Der histologische Schnitt stammt von einer Wild-Typ-Maus 30 Tage nach der Okklusion der *A. femoralis*. Leuchtend rot sind die Endothelzellen der Kapillaren dargestellt. Sie befinden sich zwischen den dunkelrot angefärbten Muskelzellen. (Lectin-Färbung)

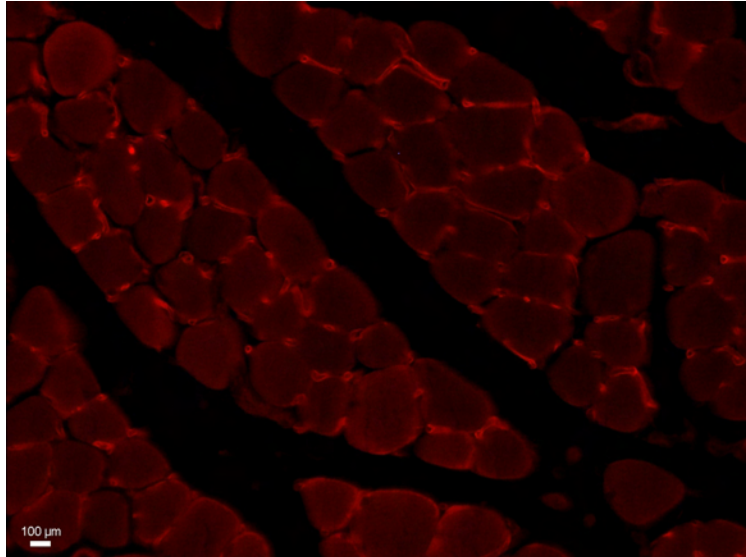


Abbildung 10: In dieser Abbildung sieht man einen Ausschnitt aus dem *M. gastrocnemius*. Der histologische Schnitt stammt von einer transgenen Maus ohne Okklusion der *A. femoralis*. Leuchtend rot sind die Endothelzellen der Kapillaren dargestellt. Sie befinden sich zwischen den dunkelrot angefärbten Muskelzellen. (Lectin-Färbung)

Tabelle 16: Ergebnisse der Kapillardichte im weißen *M. gastrocnemius*

| | Wild-Typ Ruhend | Wild-Typ Trainiert | Transgen Ruhend | Transgen Trainiert |
|------------|--------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|
| Kontrolle | 0,73 ± 0,15 | 1,09 ± 0,26 | 0,94 ± 0,23 | 1,22 ± 0,28 |
| Okkludiert | 0,95 ± 0,21 | 0,97 ± 0,13 | 1,06 ± 0,15 | 1,025 ± 0,11 |

Angaben in n/Muskelfaser ± Standardabweichung in n/Muskelfaser

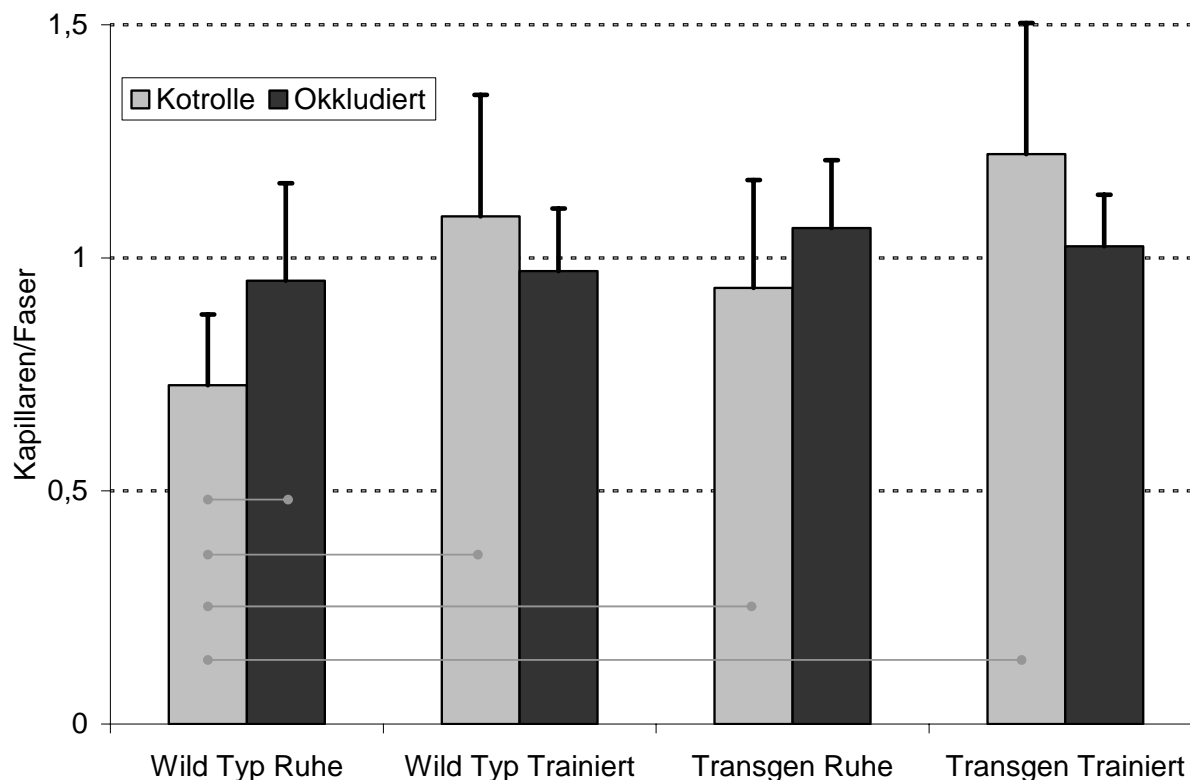


Diagramm 7: Dieses Diagramm stellt die Dichte der Kapillaren im Anteil des von Typ II Fasern besetzten *M. gastrocnemius* dar. Die Querbalken bezeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zwischen den Gruppen. Die trainierten, transgenen Tiere weisen in den Kontrollproben (nicht okkludiert) eine nicht den Level der Signifikanz erreichende Erhöhung der Kapillardichte auf, im Vergleich zu ruhenden transgenen Tieren.

Roter *M. gastrocnemius* und *M. plantaris* (von Typ I Fasern besetzt):

Beim Vergleich zwischen der Seite mit und ohne Okklusion der *A. femoralis* ergab sich bei keiner der Tiergruppen ein signifikanter Unterschied.

Beim Vergleich der Gruppen untereinander ergaben sich signifikante Erhöhungen der Kapillardichte von den Proben der Wild-Typ ruhenden ohne Femoralisokklusion zu der transgen ruhenden ohne Femoralisokklusion und von den Wild-Typ ruhend mit Femoralisokklusion zu den Proben von Wild-Typ trainiert mit Femoralisokklusion und transgen ruhenden mit Femoralisokklusion.

Tabelle 17: Ergebnisse der Kapillardichte im roten M. gastrocnemius und M. plantaris

| | Wild-Typ Ruhend | Wild-Typ Trainiert | Transgen Ruhend | Transgen Trainiert |
|------------|--------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|
| Kontrolle | 1,86 ± 0,11 | 2,03 ± 0,19 | 2,05 ± 0,09 | 2,12 ± 0,09 |
| Okkludiert | 1,63 ± 0,39 | 2,04 ± 0,24 | 2,04 ± 0,22 | 1,95 ± 0,22 |

Angaben in n/Muskelfaser ± Standardabweichung in n/Muskelfaser

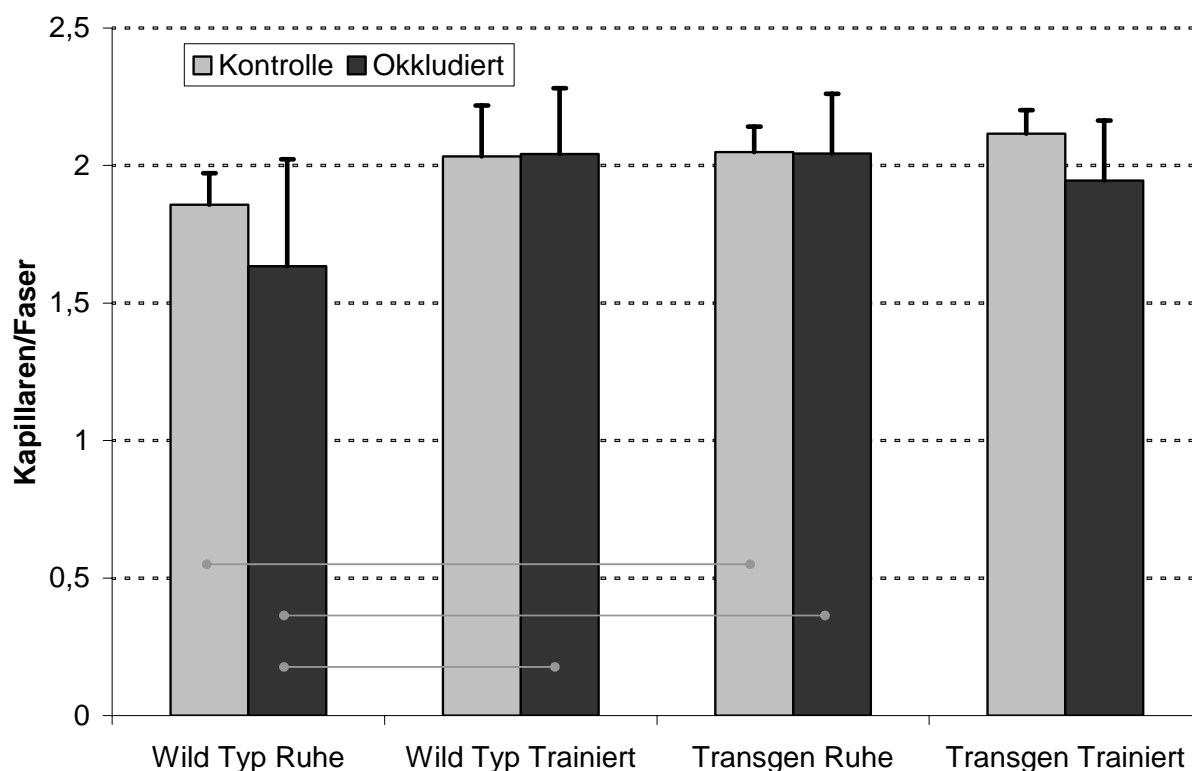


Diagramm 8: Dieses Diagramm zeigt die Kapillardichte im Anteil des von Typ I Fasern besetzten M. gastrocnemius. Die Querbalken bezeichnen signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zwischen den Gruppen.

2.6. Flächenbestimmung der langsamen Muskelfasern (Typ I) im Musculus gastrocnemius

Die Bestimmung der Fläche der langsamen Muskelfasern im M. gastrocnemius zeigte eine signifikante Veränderung zwischen den Messwerten der Wild-Typ Tiere und den Messwerten der transgenen Tiere. Während sowohl trainierte, als auch untrainierte Wild-Typ Tiere eine signifikant höhere Anzahl von Typ I Muskelfasern im M gastrocnemius der Seite mit Femoralisokklusion aufwiesen, zeigten die transgenen Tiere keine Veränderung.

Trainierte und nicht trainierte Tiere zeigten keine Unterschiede, weder in der Gruppe der Wild-Typ Tiere noch in der Gruppe der transgenen Tiere. (Siehe Abbildung 11-13)

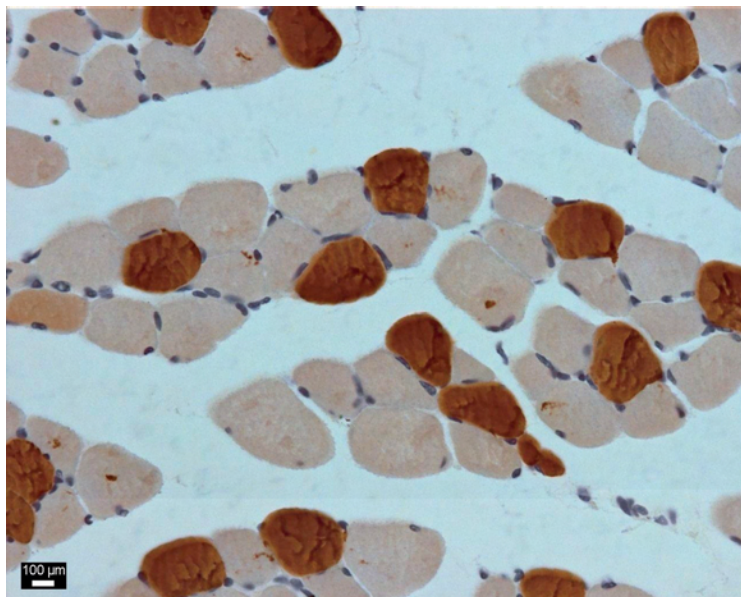


Abbildung 11: In dieser Abbildung sieht man einen Ausschnitt aus dem M. gastrocnemius. Der histologische Schnitt stammt von einer Wild-Typ-Maus ohne Okklusion der A. femoralis. Dunkelbraun sind Typ I Muskelzellen, hellbraun alle anderen Muskelzelltypen und blau die Kerne aller Zellen dargestellt. (Hämatoxilin-Peroxidase-Färbung)

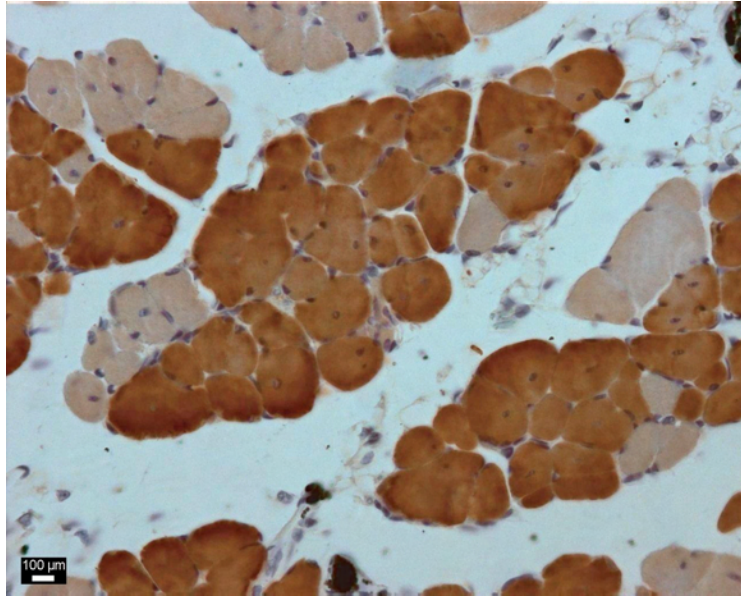


Abbildung 12: In dieser Abbildung sieht man einen Ausschnitt aus dem *M. gastrocnemius*. Der histologische Schnitt stammt von einer Wild-Typ-Maus 30 Tage nach der Okklusion der *A. femoralis*. Dunkelbraun sind Typ I Muskelzellen, hellbraun alle anderen Muskelzelltypen und blau die Kerne aller Zellen dargestellt. (Hämatoxilin-Peroxidase-Färbung)

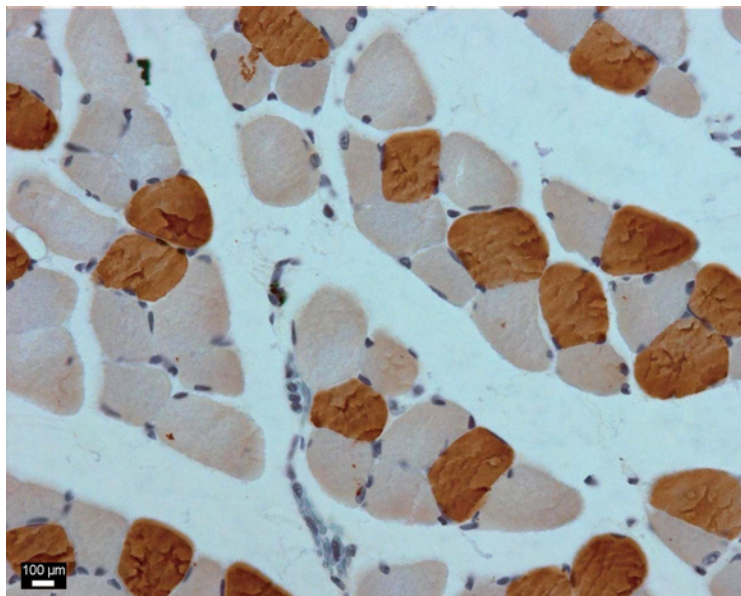


Abbildung 13: In dieser Abbildung sieht man einen Ausschnitt aus dem *M. gastrocnemius*. Der histologische Schnitt stammt von einer transgenen Maus 30 Tage nach der Okklusion der *A. femoralis*. Dunkelbraun sind Typ I Muskelzellen, hellbraun alle anderen Muskelzelltypen und blau die Kerne aller Zellen dargestellt. (Hämatoxilin-Peroxidase-Färbung)

Tabelle 18: Ergebnisse der Flächenbestimmung der Typ-I Fasern

| | Wild-Typ Ruhend | Wild-Typ Trainiert | Transgen Ruhend | Transgen Trainiert |
|------------|--------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|
| Kontrolle | 21 ±4 | 20 ±3 | 21 ±5 | 20 ±6 |
| Okkludiert | 29 ±0,1 | 28 ±5 | 18 ±3 | 17 ±3 |
| P | < 0,05 | < 0,05 | * | * |

Angaben in % der Gesamtfläche des M. gastrocnemius
± Standardabweichung in %

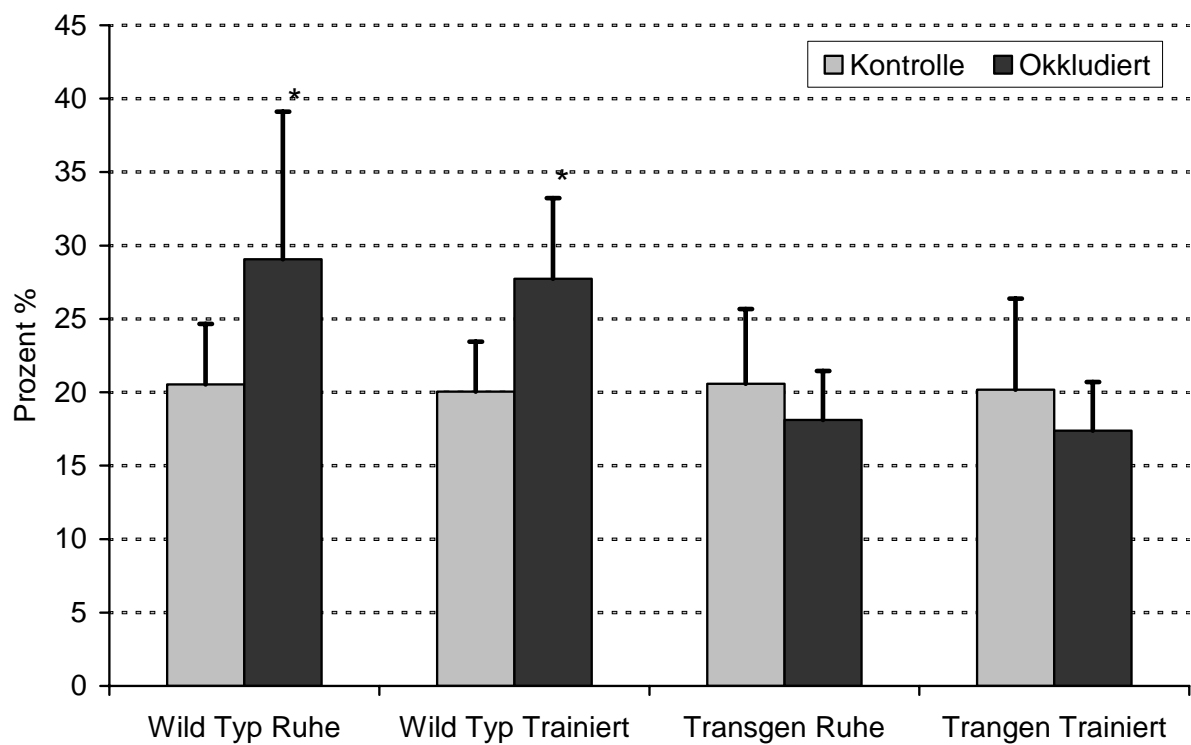


Diagramm 9: Dieses Diagramm zeigt die prozentualen Anteile der Typ I Fasern im M. gastrocnemius. Signifikante Erhöhungen zeigten sich bei beiden Gruppen der Wild-Typ Tiere (*).

3. Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse sind im Folgenden zur besseren Übersicht nochmals tabellarisch dargestellt.

Tabelle 19: Zusammenfassung der Veränderungen nach Okklusion der A. femoralis

| | Transgene Tiere | Wild-Typ-Tiere |
|--|--------------------------------|--|
| Anzahl der Kollateralen | Signifikant erhöht | Keine Veränderung |
| Gesamtdurchmesser der Kollateralen | Erhöht | Erhöht |
| Zunahme des Gesamtdurchmessers | Höher im Vergleich zu Wild-Typ | Niedriger im Vergleich zu Transgen |
| Arteriendichte im M. gastrocnemius | Keine Veränderung | Signifikant erhöht |
| Kapillardichte im M. gastrocnemius | Keine Veränderung | Signifikante Erhöhung im weißen Anteil |
| Anteil an Typ I Muskelfasern im M. gastrocnemius | Keine Veränderung | Signifikante Erhöhung |

Tabelle 20: Zusammenfassung der Veränderungen nach Training

| | Transgene Tiere | Wild-Typ Tiere |
|--|--------------------------------------|--|
| Anzahl der Kollateralen | Keine Veränderung | Keine Veränderung |
| Gesamtdurchmesser der Kollateralen | Leicht erhöht (nicht signifikant) | Leicht erhöht (nicht signifikant) |
| Zunahme des Gesamtdurchmessers | Keine Veränderung | Keine Veränderung |
| Arteriendichte im M. gastrocnemius | Keine Veränderung | Keine Veränderung |
| Kapillardichte im M. gastrocnemius | Keine Veränderung | Signifikante Erhöhung im weißen Anteil |
| Anteil an Typ I Muskelfasern im M. gastrocnemius | Keine Veränderung | Keine Veränderung |

IV. Diskussion

Es gibt zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten, die sich mit dem Thema der peripheren Arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) befassen. Obwohl Untersuchungen zeigen, dass der Fibrozyten-Wachstums-Faktor-2 (FGF-2) einen wichtigen Einfluss auf Arteriogenese und Angiogenese hat [45, 21, 20, 18], wurde dies bisher nicht in einem transgenen Tiermodell gezeigt, in dem Wachstumsfaktor überexprimiert wird. Dadurch ist es möglich, die Entwicklung von Kollateralarterien nach Gefäßverschluss funktionell und histologisch detailliert zu untersuchen und die Wirkung des Wachstumsfaktors FGF-2 genauer zu erfassen.

1. Zusammenfassung der Ergebnisse

1.1. Zusammenfassung der funktionellen Ergebnisse

Alle funktionellen Ergebnisse wurden von Swen Wolfram erarbeitet und für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Sie sind ausführlicher in seiner Dissertation „Determination of the Cardiovascular Phenotype of Different transgenic Mouse Models“ [42] beschrieben. Die Befunde sollen hier kurz zusammengefasst werden, da sie zur Interpretation der histologischen Resultate und zum Verständnis der Untersuchungsergebnisse zur Kollateralarterienentwicklung wesentlich beitragen.

Es zeigte sich, dass nach Okklusion der A. femoralis FGF-2 überexprimierende Tiere eine deutlich bessere Laufleistung erbringen konnten als Wild-Typ-Tiere. Ebenso kam es bei transgenen Tieren im Gegensatz zu Wild-Typ-Tieren nicht zur Atrophie der Unterschenkelmuskulatur. Auch die Durchblutung im Endstromgebiet der A. femoralis 36 Tage nach Okklusion war im Vergleich zur Gruppe der Wild-Typ-Tiere bei den transgenen Tieren deutlich erhöht.

Offensichtlich sind FGF-2 überexprimierende Tiere in der Lage, eine Okklusion der A. femoralis binnen 36 Tagen zu kompensieren.

Diese Ergebnisse führen zu der Frage, welche histologischen Veränderungen vorliegen, die erklären, weshalb sich transgene Tiere nach einer Okklusion sehr viel besser erholen, als ihre Wild-Typ Artgenossen.

1.2. Zusammenfassung der histologischen Ergebnisse

Die Anzahl der Kollateralarterien war nach Okklusion bei transgenen Tieren stärker erhöht als bei Wild-Typ-Tieren. Unterschiede zwischen trainierten und ruhenden Tieren zeigten sich in keiner Gruppe.

Der Gesamtdurchmesser der Kollateralarterien nahm bei allen Tieren nach Okklusion der A. femoralis zu. Eindeutige Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht festzustellen.

Die Zunahme des Gesamtdurchmessers war bei ruhenden transgenen Tieren wesentlich höher, als bei ruhenden Wild-Typ-Tieren.

Zusätzlich zur Arteriogenese im Oberschenkel wurde überraschenderweise bei den Wild-Typ-Tieren (trainiert und ruhend) auch eine Zunahme der Arterienzahl im M. gastrocnemius festgestellt. Transgene Tiere zeigten weder in der trainierten, noch in der ruhenden Gruppe eine Veränderung der Arteriendichte.

Die Messung der Kapillardichte im M. gastrocnemius erbrachte verschiedene Resultate, je nach Bereich, in dem die Dichte bestimmt wurde. Im Muskelanteil mit überwiegend langsamen Fasern (Typ I) wurde nach Okklusion eine Verringerung der Dichte bei ruhenden Wild-Typ-Tieren nachgewiesen. Sowohl trainierte Wild-Typ, als auch ruhende und trainierte transgene Tiere besaßen eine höhere Kapillardichte als ruhende Wild-Typ-Tiere. Unterschiede zwischen Okklusion und Kontrolle konnten in diesen Gruppen jedoch nicht festgestellt werden. Im Bereich mit überwiegend schnellen Fasern (Typ II) zeigte sich nach Okklusion eine Zunahme der Kapillardichte bei ruhenden Gruppen sowohl bei

Wild-Typ, als auch transgenen Tieren. Eine signifikante Veränderung der Kapillardichte bei Tieren der beiden trainierten Gruppen war nicht nachzuweisen.

Insgesamt war die Kapillardichte bei allen transgenen Tieren höher als bei allen Wild-Typ-Tieren.

Die Untersuchung der Muskelfaserfläche auf Typ I Fasern ergab, dass nur Wild-Typ-Tiere auf die Okklusion mit einer Umwandlung in Richtung langsamer Faser (Typ I) reagierten. Dies betraf sowohl trainierte als auch ruhende Tiere, wobei der Wechsel des Fasertyps in der erstgenannten Gruppe geringer war.

2. Diskussion der Ergebnisse

Kollateralen der A. femoralis:

Es ist bekannt, dass FGF-2 an der Entwicklung von Kollateralgefäßen maßgeblich beteiligt ist [8]. Es konnte gezeigt werden, dass durch exogene Zufuhr von FGF-2 das Wachstum von Kollateralen beschleunigt werden kann [9]. Auf Grund dieser Resultate, und der aus den Blutfluss-Messungen an den untersuchten Mäusen, erwarteten wir eine Zunahme der Kollateraldichte in transgenen Tieren. Diese Hypothese wurde bestätigt. Tatsächlich wiesen transgene Tiere nach Okklusion der A. femoralis mehr Kollateralen als Wild-Typ-Tiere auf.

Bei den Gesamtdurchmessern der Kollateralarterien wäre ebenfalls eine deutliche Zunahme in transgenen Tieren zu erwarten gewesen. Es zeigte sich, dass die relative Zunahme des Durchmessers signifikant höher war, als in Wild-Typ-Tieren. Die Bestimmung des Gesamtdurchmessers nach Okklusion verfehlte nur knapp die Signifikanz ($p=0.05$) zwischen Wild-Typ und transgenen Tieren. Scholz et al. [9] beschrieben ebenfalls eine Erhöhung der Kollateraldurchmesser in Mäusen, in die mit einer Minipumpe exogenes FGF-2 infundiert wurde. Phänotypisch sind die transgenen Tiere der vorliegenden

Studie jedoch nicht mit den Tieren seiner Studie vergleichbar [41]. Auch wenn hier keine Signifikanz erreicht wurde, zeigten sich in der Gruppe der transgenen Tiere die höchsten Werte des Gesamtdurchmessers. Betrachtet man die relative Zunahme des Gesamtdurchmessers der Kollateralen, so wird deutlich, dass transgene Tiere ein signifikant stärkeres Kollateralwachstum zeigen. Der Durchmesser in transgenen Tieren nimmt um mehr als das Doppelte im Vergleich zu Wild-Typ Tieren zu. Schließlich bestätigen die Messungen ja auch eine höhere Durchblutung und eine Anzahlerhöhung der Kollateralarterien, somit eine höhere Kollateralisierung als in Wild-Typ-Tieren.

Obwohl allgemein angenommen wird, dass auch Training das Wachstum von Kollateralarterien induzieren kann [46], konnten unsere Untersuchungen dies nicht eindeutig bestätigen. Es lässt sich lediglich ein Trend in diese Richtung feststellen, der jedoch keine Signifikanz erreicht.

Arteriendichte:

Der M. gastrocnemius eignet sich sehr gut, um Veränderungen nach Okklusion der A. femoralis zu studieren. Dieser Muskel liegt direkt unterhalb der von uns gewählten Okklusionsstelle, und unterhalb des Wiedereintritts der Umgehungskreisläufe durch präformierte Kollateralarterien. Diese Tatsache ermöglichte es zu überprüfen, welche Auswirkung die Arteriogenese im Oberschenkel auf die im Unterschenkel gelegene ischämische Muskulatur hat. Unsere Ergebnisse zeigen, dass sich die Gefäßdichte im M. gastrocnemius nur bei den Wild-Typ-Tieren erhöht. In diesem Zusammenhang wiesen Bush et al. nach [26], dass es an der Grenzzone zwischen gut durchblutetem und ischämischem Gewebe zur Entstehung von Arteriolen kommt. Dieses Wachstum, so wurde gezeigt, ging mit einer Erhöhung von endogenem FGF-2 einher. Der Prozess konnte zudem durch exogene Zufuhr von FGF-2 noch forciert werden. Die Wild-Typ-Tiere zeigten eine deutliche Erhöhung der Arteriendichte im M. gastrocnemius. Es bleibt die Frage, ob diese Tatsache durch die Wirkung der Ischämie zu erklären ist. Transgene Tiere hingegen zeigten nach Okklusion

keine Anzeichen einer erhöhten Arteriendichte. Kapillardichte und der Muskelfasertyp veränderte sich in diesen Tieren ebenfalls nicht (siehe unten). Auch ist eine durch Ischämie verursachte Atrophie des Muskels nicht zu beobachten. Vergleicht man den Blutfluss in den hinteren Extremitäten der transgenen-Tiere und der Wild-Typ-Tiere, so ist eine deutlich bessere Versorgung bei den erstgenannten festzustellen. Auch die gesteigerte Trainingskapazität im Vergleich zu den Wild-Typ-Tieren belegt eine bessere Blutversorgung der Muskulatur.

Kapillardichte:

Um Veränderungen auf mikrovaskulärer Ebene zu untersuchen, wurde die Kapillardichte in langsamen (Typ-I) und schnellen (Typ-II) Muskelfasern bestimmt. So konnte die Dichte der Kapillaren in Abhängigkeit des Fasertyps unterschieden werden. Die Messung der Kapillardichte ist zu beachten, dass eine Erhöhung der Kapillardichte in einem ischämischen Muskel in Folge der Atrophie stark beeinflusst wird, wie Yamaguchi et al. beschreiben. Verringert sich die Fläche der Muskelzellen bei gleich bleibender Anzahl an Kapillaren (Kapillaren/mm²), so würde eine falsch höhere Kapillardichte gemessen werden [47]. Um diese Fehlinterpretation zu vermeiden, entschieden wir uns für die Messung von Kapillaren pro Muskelfaser.

1997 zeigten Ito et al., dass nach einer Okklusion der A. femoralis die Kapillardichte im M. gastrocnemius steigt, da dieser einer massiven Ischämie ausgesetzt ist [39]. Wegen der distalen Lage zur Ligatur kann er ausschließlich durch Kollateralkreisläufe versorgt werden. Die Messungen der Kapillardichte durch Ito wurden sieben Tage nach Okklusion der A. femoralis durchgeführt, während unsere Messungen nach 39 Tagen erfolgten. Untersuchungen von Scholz et al. an Mäusen zeigten vergleichbare Ergebnisse [9]. Seine Daten wurden nach einer Okklusionszeit von 21 Tagen erfasst. Messungen im M. gastrocnemius, zeigten eine Erhöhung der Kapillardichte. Diese erreichte ihr Maximum fünf Tage nach Okklusion der A. femoralis. Zeitgleich wuchsen die

Kollateralarterien. [48]. Diese Ergebnisse zeigen, dass Angiogenese die Reaktion auf Ischämie ist. Die Arteriogenese wird erst nach sieben Tagen funktionell wirksam, gemessen am Blutfluss im Endstromgebiet. Dennoch zeigen die Messungen in den langsamen Typ-I Fasern der ruhenden Wild-Typ-Tiere auch nach 39 Tagen Okklusion eine Erhöhung der Kapillardichte. Daraus lässt sich schließen, dass der M. gastrocnemius nach 39 Tagen der Okklusion der A. femoralis nach wie vor einer Ischämie ausgesetzt ist. Im Gegensatz dazu zeigen die Messungen im M. gastrocnemius aller transgenen Tiere diese Zeichen der Ischämie nicht. Messungen der Kapillardichte, des Atrophiegrades und der Muskelfaserveränderung ergaben, dass FGF-2 -Überexpression zu einer verbesserten Perfusion durch Wachstum der proximal gelegenen Kollateralarterien bis zum Tag 39 nach Okklusion führt. Die FGF-2 Tiere sind offensichtlich in der Lage, die Okklusion der A. femoralis innerhalb von 39 Tagen zu kompensieren.

Wie durch Ischämie, so wird auch durch Training Angiogenese angeregt [49, 34] (siehe Kap. VI 2.). Dabei steigt infolge von Aktivität der Muskulatur der Sauerstoffbedarf. Durch Ausdauertraining kommt es, (wie oben beschrieben), zur Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, die anschließend Angiogenese einleiten. So zeigte Waters et al., dass durch moderate spontane Bewegung zunächst die Kapillardichte in der Muskulatur steigt, gefolgt von einem Muskelfaserwechsel in Richtung der langsameren Fasern [50]. In unserer Studie treffen jedoch zwei Faktoren aufeinander: zum einen die Okklusion der A. femoralis und zum anderen das kontrollierte Training. Die Frage war, was in einem ischämischen Muskel abläuft, der anschließend trainiert wird. Schon 1988 vermuteten Terjung et al., dass bei Patienten mit pAVK, die ein moderates Training absolvieren, im Wesentlichen drei Faktoren zur Verbesserung der Laufleistung beitragen könnten: erstens die Umverteilung des Blutes (z.B. über Kollateralen), zweitens die Umstrukturierung des Muskels und drittens die Erhöhung der Kapillardichte [51]. 2002 konnten Luo et al. im ischämischen Hinterlauf der Ratte auch FGF-2 nachweisen. Auch unsere Untersuchungsergebnisse konnten genau diese

Mechanismen in Wild-Typ-Tieren nach Okklusion belegen. Wild-Typ-Tiere zeigen ebenfalls eine Erhöhung der Gefäßdichte, eine Erhöhung der Kapillardichte und eine Veränderung des Muskelfasertyps. In transgenen Tiere hingegen konnte statistisch keine dieser Veränderung nachgewiesen werden, was vermuten lässt, dass am Tag 39 nach der Okklusion der A. femoralis eine Ischämie nicht mehr vorhanden ist.

Fasershift:

In den funktionellen Untersuchungen konnten bei transgenen Tieren mit Okklusion sehr viel bessere Ergebnisse nachgewiesen werden, als bei Wild-Typ-Tieren mit Okklusion der A. femoralis. Deshalb erschien es sinnvoll, die histologische Struktur der im Ischämiegebiet liegenden Muskulatur zu untersuchen. Da Muskelzellen auf eine suffiziente Blutversorgung angewiesen sind, entschieden wir uns, den Aufbau des M. gastrocnemius, besonders die Muskelfasermuskelzusammensetzung zu untersuchen. Forschungen in früheren Jahren ergaben, dass die Muskulatur in der Lage ist, ihren Fasertyp zu modellieren, um sich physiologischen Änderungen anzupassen. So untersuchte man bereits 1977 die Folgen von peripheren Verschlusskrankheiten auf die Faserzusammensetzung in der unteren Extremität [52]. Diese Studien zeigten, dass ischämischer Stress eine Änderung der Faserkonfiguration zur Folge hat. Auch neuere Arbeiten belegen, dass sich der Fasertyp im Muskelgewebe bei peripherer Arterieller Verschlusskrankheit verändert [53, 54]. Weiterhin fand man heraus, dass sich langsame Muskelfasern bei einem eingetretenen Reperfusionsschaden schneller regenerieren können als schnelle Fasern [55]. Im Umkehrschluss zu diesen Erkenntnissen würde ein Wechsel des Fasertyps uns daher anzeigen, ob das Gewebe einem ischämischen Stress unterliegt. Unserer Untersuchungsergebnisse lassen den Schluss zu, dass Wild-Typ-Tiere einer Ischämie im M. gastrocnemius ausgesetzt waren und so ein Faserwechsel induziert wurde. Transgene Tiere hingegen konnten die Okklusion der A. femoralis offensichtlich kompensieren. In der Muskulatur dieser Tiere waren keinerlei ischämische Zeichen wie Atrophie, Muskelfaserveränderung oder

erhöhte Kapillardichte zu erkennen. Daraus folgerten wir, dass die Überexpression von FGF-2 zu einem verbesserten Kollateralarterienwachstum führt, wodurch die Okklusion der A. femoralis umgangen und die suffiziente Durchblutung des betroffenen Gebietes wieder hergestellt wird.

Frühere Untersuchungen von Gloe und Kuwabara haben bereits gezeigt, dass sowohl intraluminale Scherkräfte als auch Ischämie die Ausschüttung von endogenem FGF-2 stimulieren [56, 57]. Auch die mitogene Eigenschaft dieses Wachstumsfaktors sind sowohl für Angiogenese als auch für Arteriogenese belegt [24, 58, 18]. Ebenso provoziert FGF-2 die Ausschüttung weiterer Wachstumsfaktoren, wie z.B. VEGF [59]. Noch nicht erforscht ist, auf welche Weise FGF-2 die Zielzelle zur Mitose anregt und somit zu Gefäßwachstum führt. Die Rezeptoren für FGF-2 sind bekannt. Es gibt aber keine vergleichenden Untersuchungen zur Rezeptordichte und -funktion zwischen überexprimierenden und Wild-Typ-Tieren. Der Ablauf der Signaltransduktion in der Zelle ist ebenfalls noch nicht abschließend geklärt. Es lässt sich sicher sagen, dass FGF-2 Wachstumsprozesse in Gefäßen fördert, da überexprimierende Tiere sowohl ein gesteigertes Wachstum von glatten Muskelzellen, als auch von Endothelzellen zeigen [41, 60]. Letztendlich kommt es durch FGF-2 zur Proliferation von genau diesen Zellen [25, 59]. Es hat sich aber gezeigt, dass es auch ohne Anwesenheit von FGF-2 sowohl zu Angio- als auch zu Arteriogenese kommen kann [61]. Eine übermäßige FGF-2-Expression beschleunigt und verstärkt diese Prozesse jedoch deutlich.

Abschließend zeichnen unsere Ergebnisse ein interessantes Bild der histologischen Vorgänge im gesamten Hinterlauf der Maus. Vorangegangene Untersuchungen belegen, dass die wesentlichen Adaptationsvorgänge innerhalb der ersten Tage nach einer Femoralisokklusion eingeleitet werden. Unsere Studie zeigte durch den vergleichsweise spät gewählten Untersuchungszeitpunkt zwei Dinge: FGF-2 Überexpression führt nach Okklusion binnen 39 Tagen zu einer deutlichen Zunahme von Anzahl und Durchmesser der Kollateralarterien, und damit der Durchblutung und zu einer Steigerung der Laufleistung.

Histologisch gesichert ist die Erkenntnis, dass Überexpression von FGF-2 Gefäßwachstum fördert. Dadurch wird die durch Okklusion hervorgerufene akute Ischämie im M. gastrocnemius überwunden. In einem weit geringeren Maße scheint ein moderates Ausdauertraining über den gleichen Zeitraum diesen Wachstumsmechanismus zu fördern. Beide Einflussfaktoren zusammen (FGF-2 Überexpression und Training) führen zu einer deutlichen Verbesserung der Durchblutung durch Arteriogenese.

Es stellt sich die Frage, wie zukünftig Patienten mit pAVK behandelt werden. Sollen sie einer FGF-2 Infusionstherapie oder einer moderaten Trainingstherapie zugeführt werden? Oder ist die Kombination aus beidem ein sinnvolles Konzept? Im Jahre 2002 führte Lederman eine klinische Studie zur intraarteriellen Infusionstherapie mit FGF-2 bei Patienten mit pAVK durch. Diese TRAFFIC-Studie (Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication) belegte, welche Bedeutung FGF-2 in der Behandlung von pAVK hat [62, 63, 64]. 127 pAVK-Patienten wurde FGF-2 intraarteriell infundiert und deren schmerzfreie Laufleistung nach 90 Tagen bewertet. Es konnte nachgewiesen werden, dass Patienten, die FGF-2 erhalten hatten, ca. eine Minute länger schmerzfrei laufen konnten als eine mit Placebo behandelte Patientengruppe. Diese Studie bleibt viel diskutiert, da zum einen die Vorgänge der Angiogenese bis heute apparativ nicht nachweisbar sind, und zum anderen die verlängerte Laufzeit zwar signifikant, aber nur sehr gering (eine Minute) ist. Damit scheint eine alleinige Infusionstherapie mit FGF-2 nicht angebracht zu sein. Aus allen durchgeführten Untersuchungen resultiert, dass FGF-2 eine wichtige Rolle bei der Regeneration von unterversorgtem Gewebe hat. Die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen zeigen den deutlich protektiven Effekt auf das funktionelle Gewebe der von einem arteriellen Verschluss bedrohten Extremität. Dennoch ist an diesen Regenerationsprozessen eine Vielzahl weiterer Faktoren beteiligt, die beachtet werden müssen. Eine Therapie mit FGF-2 allein wird nach dem heutigen

Erkenntnisstand wohl nicht zum gewünschten Erfolg führen. Dafür müsste mit der Therapie vor dem Auftreten der Beschwerden begonnen werden.

Die Erkenntnis der hier vorliegenden Arbeit besteht darin, dass endogene Überexpression von FGF-2 die Extremität vor den Folgen eines akuten Gefäßverschlusses schützt. Das Gefäßsystem zeigt ein deutliches Wachstum, sowohl durch Arterio- als auch Angiogenese, was schnell zu einer Wiederherstellung der Blutversorgung führt. In der Muskulatur überexprimierender Tiere konnten keinerlei Anzeichen einer Mangelversorgung gesehen werden. Die funktionellen Untersuchungen bestätigen diese Erkenntnis. Die Effekte des kontrollierten moderaten Trainings sind dagegen nicht klar abzugrenzen. Training unterstützt lediglich die durch endogene Überexpression von FGF-2 eingeleiteten Kompensationsvorgänge.

Die Schlussfolgerung für die Behandlung der pAVK besteht darin, dass FGF-2 nur ein Bestandteil des Therapiekonzepts sein kann. Es bleiben also noch viele Faktoren, um das Ziel der Revaskularisierung durch medikamentöse Therapie der von pAVK bedrohten Extremitäten zu erreichen.

V. Zusammenfassung

1. Zusammenfassung

Einleitung: Der basische Fibrozyten Wachstumsfaktor (FGF2) hat sich in den letzten Jahren als potenter Stimulator des Gefäßwachstums (Arteriogenese und Angiogenese) erwiesen. Um den FGF-2 getriggerten Effekt der Arterio- und Angiogenese näher zu beleuchten, wurden genetisch veränderte Mäuse, die FGF-2 überexprimieren, untersucht. Es wurde nach histologischen Hinweisen für das Gefäßwachstum und der Verbesserung der Blutversorgung gesucht. Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, zu zeigen, dass endogen exprimiertes FGF-2 in der Lage ist, arterio- und angiogenetische Prozesse einzuleiten und zu verbessern. Des Weiteren galt es zu überprüfen, in wie weit die durch die Okklusion verursachte Ischämie, kompensiert werden konnte.

Methoden: FGF-2 überexprimierenden Mäusen wurde die A. femoralis der rechten Seite ligiert. Anschließend wurden die Tiere nach dem Zufallsprinzip zu gleichen Anzahlen in eine Gruppe, die moderates Training erhielt, und eine, die ruhen durfte, eingeteilt. Nach 39 Tagen wurden funktionelle Daten [42] erhoben und histologische Schnitte der Mm. adductorii und Mm. gastrocnemii beider Hinterläufe erstellt. Die Struktur des Gewebes wurde mittels immunhistochemischer histologischer Verfahren untersucht. Folgende Parameter wurden erhoben: Anzahl der Kollateralarterien, Gesamtdurchmesser und Zunahme des Gesamtdurchmessers der Kollateralarterien in den Mm. adductorii, Arteriendichte, Kapillardichte von schnellen und langsamem Muskelfasern und Fasertyp in den Mm. gastrocnemii. Die Ergebnisse wurden mit einer korrespondierenden Kontrollgruppe von Wild-Typ-Mäusen verglichen.

Ergebnisse: Die funktionellen Ergebnisse ergaben eine signifikant bessere Trainingskapazität und Durchblutung der transgenen Tiere [42]. Die

histologischen Untersuchungen bestätigten diese Ergebnisse. Transgene Tiere zeichneten sich per se durch eine höhere Kapillardichte aus. Auf Okklusion reagierten die transgenen Tiere mit einer stärker erhöhten Kollateralarteriendichte als die Kontrollen. Als Maß der Ischämie und zur Überprüfung der Kompensationsmechanismen wurden die Arteriendichte und der vorherrschende Fasertyp im M. gastrocnemius bestimmt. Transgene Tiere wiesen niedrigere Werte für die Arteriendichte im M. gastrocnemius auf als die Kontrollen. Auch der Faserwechsel im vom schnellen Typ II zum langsamen Typ I im M. gastrocnemius zeigte sich in den transgenen Tiere weit weniger ausgeprägt als in den Proben der Kontroll Tiere.

Schlussfolgerung: Transgene Tiere kompensieren die Okklusion der A. femoralis und erreichen in den funktionellen Untersuchungen deutlich bessere Werte als Kontrolltiere. Die histologischen Untersuchungen bestätigten diese Befunde. Transgene Tiere sind in der Lage, den Blutfluss durch die Vermehrung von Gefäßstrukturen (Kapillaren und Arterien) zu verbessern. FGF-2 Überexpression resultiert folglich in einem deutlich protektiven Effekt gegenüber Ischämie, hervorgerufen durch akuten oder chronischen arteriellen Verschluss.

2. Abstract

Introduction: In the past years the basic fibroblast growth factor (FGF-2) has been shown to be a potent stimulator of arteriogenesis and angiogenesis. To study the FGF-2 triggered effect on arterio- and angiogenesis FGF-2 overexpressing mice were used. It was searched for histological evidence of vessel growth. Aim of this study was to provide evidence for the arteriogenic and angiogenic effect of FGF-2 overexpression. In addition we wanted to test, if FGF-2 overexpressing mice could compensate the severe ischemia upon long term occlusion of the femoral artery.

Materials and methods: The right femoral artery of FGF-2 overexpressing mice was ligated. Animals were divided into two groups, one receiving moderate training and one resting. After 39 days functional data was obtained [42] and histological sections of the Mm. adductorii and Mm. gastrocnemii of both hind limbs were made. The histological structure of all tissues was studied with immunochemical histology. The number of collateral arteries, average diameter and increase of total diameter in the Mm. adductorii as well as the arterial density, capillary density in slow and fast fibres and fibre type shift in the Mm. gastrocnemii, was observed. Results were compared with groups of non transgenic littermates.

Results: The functional results showed a significantly improved training capacity as well as significantly improved blood flow in the occluded hind limb of transgenic mice [42]. The histological results confirmed these functional findings. Transgenic mice showed a higher capillary density, a higher number of collateral arteries and a higher increase in collateral diameter than controls. To measure the severity of ischemia, arterial density and fibre type-shift was studied. Transgenic mice showed a lower arterial density and a reduced fibre type shift in the Mm. gastrocnemii than the controls.

Conclusion: FGF-2 overexpressing mice are able to compensate the occlusion of the femoral artery and obtain better results in all functional tests than non-transgenic controls. The histology results were able to confirm these findings. Transgenic mice are able to improve their blood flow by vessel growth (capillaries and arteries). FGF-2 overexpression shows a significant protective effect towards ischemia caused by acute or chronic arterial occlusion.

VI. Literaturverzeichnis

- [1] **Hamawy, A. H., Lee, L. Y., Crystal, R. G. and Rosengart, T. K.**, "Cardiac angiogenesis and gene therapy: a strategy for myocardial revascularization," *Curr Opin Cardiol*, 1999, 515-22.
- [2] **Schaper, W.**, *The Collateral Circulation of the Heart*, Amsterdam, London: Elsevier North Holland Publishing Company, 1971.
- [3] **Schaper, W. and Schaper, J.**, *Collateral Circulation - Heart, Brain, Kidney, Limbs*, Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers, 1993.
- [4] **Schaper, W. and Schaper, J.**, *Arteriogenesis*, Kluwer Academic Publishers, 2004.
- [5] **Buschmann, I. and Schaper, W.**, "Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth," *News Physiol Sci*, 1999, 121-125.
- [6] **Papetti, M. and Herman, I. M.**, "Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis," *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002, C947-70.
- [7] **Distler, J. H. W., Hirth, A., Kurowska-Stolarska, M., Gay, R. E., Gay, S. and Distler, O.**, "Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis," *Q J Nucl Med*, 2003, 149-61.
- [8] **Schaper, W. and Scholz, D.**, "Factors regulating arteriogenesis," *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 1143-51.
- [9] **Scholz, D., Ziegelhoeffer, T., Helisch, A., Wagner, S., Friedrich, C., Podzuweit, T. and Schaper, W.**, "Contribution of arteriogenesis and angiogenesis to postocclusive hindlimb perfusion in mice," *J Mol Cell Cardiol*, 2002, 775-87.
- [10] **Pipp, F., Boehm, S., Cai, W., Adili, F., Ziegler, B., Karanovic, G., Ritter, R., Balzer, J., Scheler, C., Schaper, W. and Schmitz-Rixen, T.**, "Elevated fluid shear stress enhances postocclusive collateral artery growth and gene expression in the pig hind limb," *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,

- 2004, 1664-8.
- [11] **Heil, M. and Schaper, W.**, "Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (arteriogenesis)," *Circ Res*, 2004, 449-58.
- [12] **Schaper, J., Konig, R., Franz, D. and Schaper, W.**, "The endothelial surface of growing coronary collateral arteries. Intimal margination and diapedesis of monocytes. A combined SEM and TEM study," *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*, 1976, 193-205.
- [13] **Wang, D. L., Wung, B. S., Shyy, Y. J., Lin, C. F., Chao, Y. J., Usami, S. and Chien, S.**, "Mechanical strain induces monocyte chemotactic protein-1 gene expression in endothelial cells. Effects of mechanical strain on monocyte adhesion to endothelial cells," *Circ Res*, 1995, 294-302.
- [14] **Scholz, D., Ito, W., Fleming, I., Deindl, E., Sauer, A., Wiesnet, M., Busse, R., Schaper, J. and Schaper, W.**, "Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis)," *Virchows Arch*, 2000, 257-70.
- [15] **Talks, K. L. and Harris, A. L.**, "Current status of antiangiogenic factors," *Br J Haematol*, 2000, 477-89.
- [16] **Heil, M. and Schaper, W.**, "Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (arteriogenesis)," *Circ Res*, 2004, 449-58.
- [17] **Gospodarowicz, D.**, "Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary," *J Biol Chem*, 1975, 2515-20.
- [18] **Auguste, P., Javerzat, S. and Bikfalvi, A.**, "Regulation of vascular development by fibroblast growth factors," *Cell Tissue Res*, 2003, 157-66.
- [19] **Florkiewicz, R. Z. and Sommer, A.**, "Human basic fibroblast growth factor gene encodes four polypeptides: three initiate translation from non-AUG codons," *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 3978-81.
- [20] **Okada-Ban, M., Thiery, J. P. and Jouanneau, J.**, "Fibroblast growth factor-2," *Int J Biochem Cell Biol*, 2000, 263-7.

- [21] **Nugent, M. A. and Iozzo, R. V.**, "Fibroblast growth factor-2," *Int J Biochem Cell Biol*, 2000, 115-20.
- [22] **Chen, C., Poucher, S. M., Lu, J. and Henry, P. D.**, "Fibroblast growth factor 2: from laboratory evidence to clinical application," *Curr Vasc Pharmacol*, 2004, 33-43.
- [23] **Klint, P. and Claesson-Welsh, L.**, "Signal transduction by fibroblast growth factor receptors," *Front Biosci*, 1999, D165-77.
- [24] **Flamme, I. and Risau, W.**, "Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro," *Development*, 1992, 435-9.
- [25] **Cucina, A., Borrelli, V., Randone, B., Coluccia, P., Sapienza, P. and Cavallaro, A.**, "Vascular endothelial growth factor increases the migration and proliferation of smooth muscle cells through the mediation of growth factors released by endothelial cells," *J Surg Res*, 2003, 16-23.
- [26] **Bush, R. L., Pevac, W. C., Ndoeye, A., Cheung, A. T., Sasse, J. and Pearson, D. N.**, "Regulation of new blood vessel growth into ischemic skeletal muscle," *J Vasc Surg*, 1998, 919-28.
- [27] **Deindl, E., Hoefer, I. E., Fernandez, B., Barancik, M., Heil, M., Strniskova, M. and Schaper, W.**, "Involvement of the fibroblast growth factor system in adaptive and chemokine-induced arteriogenesis," *Circ Res*, 2003, 561-8.
- [28] **Cuevas, P., Carceller, F., Ortega, S., Zazo, M., Nieto, I. and Gimenez-Gallego, G.**, "Hypotensive activity of fibroblast growth factor," *Science*, 1991, 1208-10.
- [29] **Hughes, S. E., Crossman, D. and Hall, P. A.**, "Expression of basic and acidic fibroblast growth factors and their receptor in normal and atherosclerotic human arteries," *Cardiovasc Res*, 1993, 1214-9.
- [30] **Ghiselli, G., Chen, J., Kaou, M., Hallak, H. and Rubin, R.**, "Ethanol inhibits fibroblast growth factor-induced proliferation of aortic smooth muscle cells," *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 1808-13.

- [31] **Yang, H. T., Feng, Y., Allen, L. A., Protter, A. and Terjung, R. L.**, "Efficacy and specificity of bFGF increased collateral flow in experimental peripheral arterial insufficiency," *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, H1966-73.
- [32] **Howald, H.**, "Training-induced morphological and functional changes in skeletal muscle," *Int J Sports Med*, 1982, 1-12.
- [33] **Staron, R. S., Karapondo, D. L., Kraemer, W. J., Fry, A. C., Gordon, S. E., Falkel, J. E., Hagerman, F. C. and Hikida, R. S.**, "Skeletal muscle adaptations during early phase of heavy-resistance training in men and women," *J Appl Physiol*, 1994, 1247-55.
- [34] **Prior, B. M., Yang, H. T. and Terjung, R. L.**, "What makes vessels grow with exercise training?" *J Appl Physiol*, 2004, 1119-28.
- [35] **Yang, H. T., Deschenes, M. R., Ogilvie, R. W. and Terjung, R. L.**, "Basic fibroblast growth factor increases collateral blood flow in rats with femoral arterial ligation," *Circ Res*, 1996, 62-9.
- [36] **van Royen, N., Piek, J. J., Buschmann, I., Hoefer, I., Voskuil, M. and Schaper, W.**, "Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease," *Cardiovasc Res*, 2001, 543-53.
- [37] **Couffinhal, T., Silver, M., Zheng, L. P., Kearney, M., Witzenbichler, B. and Isner, J. M.**, "Mouse model of angiogenesis," *Am J Pathol*, 1998, 1667-79.
- [38] **Walgenbach, K. J., Gratas, C., Shestak, K. C. and Becker, D.**, "Ischaemia-induced expression of bFGF in normal skeletal muscle: a potential paracrine mechanism for mediating angiogenesis in ischaemic skeletal muscle," *Nat Med*, 1995, 453-9.
- [39] **Ito, W. D., Arras, M., Scholz, D., Winkler, B., Htun, P. and Schaper, W.**, "Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion," *Am J Physiol*, 1997, H1255-65.
- [40] **Scholz, D., Thomas, S., Sass, S. and Podzuweit, T.**, "Angiogenesis and myogenesis as two facets of inflammatory post-ischemic tissue

- regeneration," *Mol Cell Biochem*, 2003, 57-67.
- [41] **Coffin, J. D., Florkiewicz, R. Z., Neumann, J., Mort-Hopkins, T., Dorn, G. W. 2., Lightfoot, P., German, R., Howles, P. N., Kier, A. and O'Toole, B. A.**, "Abnormal bone growth and selective translational regulation in basic fibroblast growth factor (FGF-2) transgenic mice," *Mol Biol Cell*, 1995, 1861-73.
- [42] **Wolfram, S.**, *Determination of the Cardiovascular Phenotyp of Different Transgenic Mouse Models*, Diss. Justus-Liebig-Universität Giessen, Fachbereich Humanmedizin, 2002.
- [43] **Heglund, N. C., Cavagna, G. A. and Taylor, C. R.**, "Energetics and mechanics of terrestrial locomotion. III. Energy changes of the centre of mass as a function of speed and body size in birds and mammals," *J Exp Biol*, 1982, 41-56.
- [44] **Armstrong, R. B. and Phelps, R. O.**, "Muscle fiber type composition of the rat hindlimb," *Am J Anat*, 1984, 259-72.
- [45] **Bikfalvi, A., Klein, S., Pintucci, G. and Rifkin, D. B.**, "Biological roles of fibroblast growth factor-2," *Endocr Rev*, 1997, 26-45.
- [46] **Prior, B. M., Lloyd, P. G., Yang, H. T. and Terjung, R. L.**, "Exercise-induced vascular remodeling," *Exerc Sport Sci Rev*, 2003, 26-33.
- [47] **Yamaguchi, A., Maeda, J., Okumoto, T. and Katsuta, S.**, "Increased capillary density due to atrophy of ischaemic soleus muscle of the rat," *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 1994, 387-91.
- [48] **Hershey, J. C., Baskin, E. P., Glass, J. D., Hartman, H. A., Gilberto, D. B., Rogers, I. T. and Cook, J. J.**, "Revascularization in the rabbit hindlimb: dissociation between capillary sprouting and arteriogenesis," *Cardiovasc Res*, 2001, 618-25.
- [49] **Brown, M. D. and Hudlicka, O.**, "Modulation of physiological angiogenesis in skeletal muscle by mechanical forces: involvement of VEGF and metalloproteinases," *Angiogenesis*, 2003, 1-14.

- [50] **Waters, R. E., Rotevatn, S., Li, P., Annex, B. H. and Yan, Z.**, "Voluntary running induces fiber type-specific angiogenesis in mouse skeletal muscle," *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, C1342-8.
- [51] **Terjung, R. L., Mathien, G. M., Erney, T. P. and Ogilvie, R. W.**, "Peripheral adaptations to low blood flow in muscle during exercise," *Am J Cardiol*, 1988, 15E-19E.
- [52] **Makitie, J. and Teravainen, H.**, "Histochemical changes in striated muscle in patients with intermittent claudication," *Arch Pathol Lab Med*, 1977, 658-63.
- [53] **Regensteiner, J. G., Wolfel, E. E., Brass, E. P., Carry, M. R., Ringel, S. P., Hargarten, M. E., Stamm, E. R. and Hiatt, W. R.**, "Chronic changes in skeletal muscle histology and function in peripheral arterial disease," *Circulation*, 1993, 413-21.
- [54] **Steinacker, J. M., Opitz-Gress, A., Baur, S., Lormes, W., Bolkart, K., Sunder-Plassmann, L., Liewald, F., Lehmann, M. and Liu, Y.**, "Expression of myosin heavy chain isoforms in skeletal muscle of patients with peripheral arterial occlusive disease," *J Vasc Surg*, 2000, 443-9.
- [55] **Woitaske, M. D. and McCarter, R. J.**, "Effects of fiber type on ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle," *Plast Reconstr Surg*, 1998, 2052-63.
- [56] **Gloe, T., Sohn, H. Y., Meininger, G. A. and Pohl, U.**, "Shear stress-induced release of basic fibroblast growth factor from endothelial cells is mediated by matrix interaction via integrin alpha(v)beta3," *J Biol Chem*, 2002, 23453-8.
- [57] **Kuwabara, K., Ogawa, S., Matsumoto, M., Koga, S., Clauss, M., Pinsky, D. J., Lyn, P., Leavy, J., Witte, L. and Joseph-Silverstein, J.**, "Hypoxia-mediated induction of acidic/basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor in mononuclear phagocytes stimulates growth of hypoxic endothelial cells," *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 4606-10.
- [58] **Garcia-Martinez, C., Opolon, P., Trochon, V., Chianale, C., Musset, K.,**

- Lu, H., Abitbol, M., Perricaudet, M. and Ragot, T.**, "Angiogenesis induced in muscle by a recombinant adenovirus expressing functional isoforms of basic fibroblast growth factor," *Gene Ther*, 1999, 1210-21.
- [59] **Seghezzi, G., Patel, S., Ren, C. J., Gualandris, A., Pintucci, G., Robbins, E. S., Shapiro, R. L., Galloway, A. C., Rifkin, D. B. and Mignatti, P.**, "Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis," *J Cell Biol*, 1998, 1659-73.
- [60] **Fulgham, D. L., Widhalm, S. R., Martin, S. and Coffin, J. D.**, "FGF-2 dependent angiogenesis is a latent phenotype in basic fibroblast growth factor transgenic mice," *Endothelium*, 1999, 185-95.
- [61] **Sullivan, C. J., Doetschman, T. and Hoying, J. B.**, "Targeted disruption of the Fgf2 gene does not affect vascular growth in the mouse ischemic hindlimb," *J Appl Physiol*, 2002, 2009-17.
- [62] **Lederman, R. J., Mendelsohn, F. O., Anderson, R. D., Saucedo, J. F., Tenaglia, A. N., Hermiller, J. B., Hillegass, W. B., Rocha-Singh, K., Moon, T. E., Whitehouse, M. J. and Annex, B. H.**, "Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial," *Lancet*, 2002, 2053-8.
- [63] **Donnelly, R. and Yeung, J. M. C.**, "Therapeutic angiogenesis: a step forward in intermittent claudication," *Lancet*, 2002, 2048-50.
- [64] **Williams, D., Davenport, K. and Tan, Y.**, "Angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for claudication," *Lancet*, 2003, 256; author reply 256.

VII. Lebenslauf

Persönlichen Daten:

Name: Tim Claußnitzer
Geburtsdatum: 22. Mai 1977
Geburtsort: Karl-Marx-Stadt
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1983 bis 1994: Grundschule und Gymnasium in Suhl, München, Bad Honef, Kingston (Jamaika), Cusco (Peru) und Kelkheim/Ts
1994 bis 1997: Oberstufe, Immanuel-Kant-Schule Kelkheim/Ts
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulstudium:

WS 1999 bis WS 2004: Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
September 2001: Ärztliche Vorprüfung
März 2003: I Staatsexamen
September 2004: II Staatsexamen
April 2005 bis April 2006: Praktisches Jahr
Abteilung für Innere Medizin
Universitätsklinikum Gießen

Abteilung für Anästhesie
Universitätsklinikum Turku (Finnland)
Abteilung für Chirurgie
Kantonsspital Zimmerberg, Horgen (Schweiz)

Mai 2006: III Staatsexamen

Tätigkeiten:

Januar 1998 bis April 2005: Studentische Teilzeitkraft als Rettungssanitäter des Malteser Hilfsdienst gGmbH Kelkheim/Ts

WS 2002/2003: Studentische Hilfskraft des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

April 2001 bis Dezember 2004: Doktorand Studentische Hilfskraft und wissenschaftlicher Mitarbeiter der Max-Planck-Gesellschaft, Abteilung für experimentelle Kardiologie Bad Nauheim.
Thema der Arbeit: Der Einfluss von FGF-2 Überexpression auf Arteriogenese und Angiogenese

Dezember 2004: Dozent an der Theodora-Konitzky-Krankenpflegeschule, Bad Nauheim

Seit Juli 2006 Assistenzarzt am Klinikum Darmstadt
Klinik für Allgemein- Thorax- und Gefäßchirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. Petermann

VIII. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen herzlich danken, die auf unterschiedlichste Art und Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Frau Professor Dr. Dr. h.c. Jutta Schaper für die Überlassung des interessanten Themas und ihre herzliche und intensive Betreuung im Verlauf der Erstellung dieser Dissertation, sowie für ihre unendliche Geduld mit meinen literarischen Fähigkeiten.

Herrn Professor Dr. Dr. h.c. Wolfgang Schaper für die Gewährung der Mittel und Wege zur Nutzung des gesamten Potentials seines Institut und seiner Mitarbeiter, ohne diesen Umstand wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. für die gewährte finanzielle Unterstützung während dieser Zeit.

Herrn Dr. Borja Fernandez und Dr. Swen Wolfram, die mir immer tatkräftig zur Seite standen und mir sehr viel gezeigt und vor allem erklärt haben, und dies auch über Staatsgrenzen hinweg.

Herrn Gunther Schuster und Herrn Gerhard Stämmeler für ihre Hilfe bei allen computer-technischen Problemen.

Frau Beate Grohman und Frau Brigitte Matzke für die Einführung in die histologischen und immunhistologischen Arbeitstechniken sowie der fluoreszenz Mikroskopie.

Den Mitarbeitern innerhalb unserer Arbeitsgruppe für die freundschaftliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre, in der niemand allein gelassen wird.

Besonders seien hier Herr Dr. Sawa Kostin, Frau Dr. Kerstin Broich, Frau Dr. Elena Ninci, Herr Dr. Matthias Heil, Herr Dr. Sebastian Dammer und Herr Ivo

Löffler für die große Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit, und der Lösung anderer kleiner Probleme, erwähnt.

Meinen Eltern, die mir diesen Weg ermöglicht haben und mich bei meinen Vorhaben immer unterstützt haben.

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Tim Claußnitzer

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5105-X



9 783835 195105 1 ©