

**Die Entwicklung von Kollateralgefäßen  
im Koronargefäßsystem des Hundeherzen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin  
des Fachbereiches Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von      Deyhim Mousavipour

aus                      Schiraz, Iran

Giessen 1998

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

**Gutachterin: Prof. Dr. Dr. h.c. Jutta Schaper**

**Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Hehrlein**

**Tag der Disputation: 19. April 1999**

Meinem Mann und meinem Sohn gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	4
2.1.	Experimentelle Durchführung	4
2.2.	Gewebeentnahme	5
2.3.	Vorbereitung des Materials für die Elektronenmikroskopie	6
2.4.	Vorbereitung des Materials für die Immunzytochemie	6
2.5.	Lichtmikroskopie zur Mastzellenbestimmung	7
2.6.	Elektronenmikroskopie	8
2.7.	Auswertung der elektronenmikroskopischen Befunde	8
2.8.	Tabelle 1	9
3.	RESULTATE	10
3.1.	Makroskopische Beobachtungen	10
3.2.	Licht- und Elektronenmikroskopie	10
3.2.1.	Kontrollgefäße	15
3.2.2.	Kollateralgefäße	16
3.2.3.	Veränderungen an Gefäßen von diabetischen Tieren	35
3.3.	Mastzellen	38
3.3.1.	Tabelle von Mastzellen	42
3.4.	IMMUNZYTOCHEMIE	43
3.4.1.	Vimentin	43
3.4.2.	Desmin	44
3.4.3.	Fibronektin	44
3.4.4.	Laminin	45
4.	DISKUSSION	48
4.1.	Wachstum der Kollateralgefäße	49
4.2.	Die Neointima und Media	52
4.3.	Desmin und Vimentin	55
4.4.	Fibronektin und Laminin	57
4.5.	Rolle der Ischämie	60
4.6.	Mastzellen	60
4.6.1.	Histamin	65
4.6.2.	Serotonin	66
4.7.	Veränderungen bei Diabetes mellitus	66
5.	ZUSAMMENFASSUNG	69
6.	LITERATURVERZEICHNIS	72
7.	TABELLE 3	86
8.	LEBENS LAUF	
9.	DANKSAGUNG	

# 1. Einleitung

Die Arteriosklerose der Koronargefäße führt zu einem langsamen Verschluss des Gefäßlumens, der schließlich durch mangelnde Perfusion einen Myokardinfarkt verursachen kann. Jedoch tritt nicht bei allen Patienten mit Stenosen und/oder Verschlüssen der Koronargefäße notwendigerweise ein Infarkt auf. Bei einigen Patienten werden die bestehenden Störungen der Myokarddurchblutung überhaupt nicht während des Lebens bemerkt, sondern die Gefäßverschlüsse sind ein Befund, der erst bei der Autopsie erhoben wird. Das Koronarsystem dieser Patienten ist dadurch gekennzeichnet, daß es Umgehungskreisläufe aufweist, die die verschlossenen mit intakten Gefäßen verbinden. Diese Gefäße werden als Kollateralen oder Anastomosen bezeichnet.

Die präexistierenden arteriolären Verbindungen zwischen den Ästen von zwei Koronararterien, die größer als eine Kapillare sind, wurden ursprünglich als Anastomosen bezeichnet. Spalteholz<sup>1,2</sup> machte Unterschiede zwischen beiden Begriffen und definierte die Kollateralen als eine Verbindung zwischen gleichen versorgenden Arterien, wohingegen Anastomosen arterielle Verbindungen zwischen zwei unabhängigen Arterien (z.B. zwischen der rechten und der linken Koronararterie) sind. Die deutschen Autoren<sup>3,4</sup> folgten im allgemeinen diesen Definitionen. Die Begriffe Anastomosen und Kollateralen wurden meist synonym verwendet, wobei sich jedoch heutzutage der letztere Begriff im klinischen Sprachgebrauch und auch in der wissenschaftlichen Literatur durchgesetzt hat.

Schoenmackers nahm an, daß Kollateralen und Anastomosen verschiedene Gefäßtypen darstellen und ging von unterschiedlichen Funktionen der Gefäße aus. Er vermutete, daß bei einem Verschluss eines Astes einer großen Arterie sich in unmittelbarer Nähe dieses Hindernisses Kollateralen entwickeln. In diesem Falle

werden angrenzende Perfusionsgebiete von anderen Arterien versorgt. Die Erweiterung einer Anastomose durch den Verschluss einer großen Arterie führt zu einer Umleitung des Blutes aus der angeschlossenen Arterie in ein größeres Perfusionsgebiet und somit zu einem größeren Blutfluß durch dieses Gefäß. Die Reduktion der Koronarreserve führt zu einer Verminderung der Kontraktionskraft des Herzens <sup>5</sup>.

W. Schaper zeigte 1971 <sup>5</sup>, daß Kollateralen und Anastomosen die gleiche Funktion haben. Sie sind mehr oder weniger passive Blutleiter, und sie reagieren auf Gewebischämie und Entzündung mit Wachstum. Als gängiges experimentelles Modell zur Simulation der Situation am menschlichen Herzen wird die Kollateralentwicklung bei Schweinen- oder Hundeherzen, hervorgerufen durch künstliche Verengung eines Koronargefäßes, verwandt<sup>5</sup>. In diesen experimentellen Modellen wurde gefunden, daß der Kollateralkreislauf des Herzens sich durch Wachstum den veränderten Bedingungen von Koronarstenose und Okklusion anpassen kann. Die Gefäße können ihren Durchmesser um den Faktor 20 vergrößern und ihre Durchflußkapazität um den Faktor 10 erhöhen <sup>5</sup>.

Zahlreiche Studien sind bisher im Max-Planck-Institut durchgeführt worden, um diesen Wachstumsprozess der Kollateralgefäße aufzuklären. Diese schließen hämodynamische, biochemische, molekularbiologische und morphologische Studien ein <sup>5,6</sup>. Das Wachstum der Kollateralgefäße ist gekennzeichnet durch eine Erhöhung der Durchblutung des Myokardareals "area at risk", durch einen Abfall des Druckgradienten und eine Erhaltung der energiereichen Phosphate in der gefährdeten Region <sup>7</sup>. Die Morphologie der Kollateralgefäßentwicklung ist durch die Entstehung einer Neointima und die Ruptur der *Elastica interna* der Gefäße charakterisiert. Außerdem wurde gefunden, daß Wachstumsfaktoren vermehrt exprimiert werden und Umbauprozesse durch Metalloproteinasen stattfinden <sup>8 9</sup>. Die besondere Fragestellung, die nun geklärt werden sollte, betrifft den Einfluss von Diabetes mellitus auf die Entwicklung von Kollateralen. Des weiteren sollte der

mögliche Einfluss von Mastzellen und den von ihnen produzierten Substanzen auf die Kollateralgefäßentwicklung untersucht werden.

Diabetes mellitus führt zu arteriosklerotischen Gefäßveränderungen, wobei die Veränderungen der Gehirn- und Nierengefäße, aber auch der Gefäße der Netzhaut und der Skelettmuskulatur Durchblutungsstörungen hervorrufen, und daher zu Funktionsstörungen der betroffenen Organe führen <sup>10 11 12</sup>. Es erschien uns aus diesen Gründen interessant, den Einfluss des Diabetes mellitus auf die Angiogenese des erwachsenen Organismus zu untersuchen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, mit morphologischen Methoden die Kollateralgefäßentwicklung am Hundeherzen nach einem Gefäßverschluss bei zwei verschiedenen Gruppen zu untersuchen. Die erste Gruppe war stoffwechselgesund, bei der zweiten Gruppe bestand ein durch Alloxan induzierter Diabetes mellitus. Die Befunde an den Kollateralgefäßen beider Gruppen wurden miteinander verglichen und systematisch ausgewertet. Es ergab sich, daß hinsichtlich des ultrastrukturellen Aufbaus der Kollateralgefäße und ihrer Proteinexpression kein qualitativer Unterschied bestand, daß jedoch bei den diabetischen Tieren die Intima zellreicher und breiter war und wesentlich mehr extrazelluläre Matrix enthielt. Des weiteren war die Anzahl der Mastzellen bei den diabetischen Tieren signifikant erhöht.

## 2. Material und Methoden

Siebzehn Mischlingshunde beiderlei Geschlechts mit einem Körpergewicht zwischen 18-20 kg wurden untersucht. Es wurden zwei Gruppen von Hunden gebildet.

**Gruppe 1:** Es wurden 10 stoffwechselgesunde Hunde mit einer jeweils 4, 8 und 9 wöchigen Okklusionsphase des Ramus circumflexus untersucht.

**Gruppe 2:** Bei 7 weiteren Hunden wurde durch Vorbehandlung mit Alloxan (3mg/kg) ein künstlicher Diabetes mellitus verursacht. Später wurde durch einen Ameroidkonstriktor in Zeitintervallen von 4, 8 und 9 Wochen eine Okklusion des Ramus circumflexus herbeigeführt.

### *2.1 Experimentelle Durchführung*

Nach einer Prämedikation mit Azoperon (Stresnil<sup>®</sup>) 2 mg/kg Körpergewicht intramuskulär wurde nach 45 Minuten die Narkose mit Pentobarbital (Nembutal<sup>®</sup>) 15 mg/kg Körpergewicht intravenös eingeleitet und bei Bedarf nachinjiziert, um eine ausreichende Narkosetiefe zu erhalten. Die Hunde wurden über einen Orotrachealtubus mit einem Sauerstoff/Raumluftgemisch mit Hilfe eines Engström Respirators beatmet. Nach dem Erreichen der angestrebten Narkosetiefe wurde im linken Interkostalraum thorakotomiert und perikardiotomiert, und anschließend die Äste des Ramus circumflexus (LCX) und des Ramus interventricularis anterior (RIVA) der Arteria coronaria sinistra dargestellt.

Herzfrequenz, myokardialer Sauerstoffverbrauch, Koronardurchblutung, und die Pumpleistung des Herzens, sowie Blutgaswerte wurden ständig überwacht.

Nach Stabilisierung der hämodynamischen Parameter wurde um die freipräparierte LCX ein Ameroidkonstriktor gelegt. Der Konstriktor besteht aus



Galalith (Ameroid), das von einem Stahlmantel umgeben ist. Galalith absorbiert Flüssigkeit aus dem Gewebe und beginnt daher an Volumen zuzunehmen, wobei die LCX innerhalb von 10-15 Tagen erst stenosiert und schließlich verschlossen wird (5). Der Thorax wurde wieder verschlossen und die Tiere erholten sich während der folgenden Wochen. Sie wurden während der Erholungsphase mit Analgetica und Antibiotica zur Bekämpfung von Schmerzen und Entzündungen bei der Wundheilung behandelt.

## ***2.2 Gewebeentnahme***

Nach 4, 8, und 9 Wochen wurden die Tiere wieder wie zuvor beschrieben anästhesiert und thorakotomiert. Die Tiere wurden mit einer Überdosis KCl getötet, das Herz entnommen, und die Kollateralgefäße makroskopisch auf der epikardialen Oberfläche des linken Ventrikels freipräpariert. Weiterhin wurde makroskopisch untersucht, ob ein Infarkt des Perfusionsgebietes der verschlossenen Arterie vorlag und ob der Konstriktor wirklich verschlossen war. Die in dieser Arbeit beschriebenen Resultate stammen ausschließlich von Herzen, bei welchen ein verschlossener Konstriktor, aber kein Infarkt vorlag.

Bei den Kollateralgefäßen unterscheidet man zwischen drei verschiedenen Gefäßsegmenten: Stem, midzone, reentry<sup>13</sup>. Die "midzone" ist der Teil des Gefäßes, in dem sich signifikante Umbauvorgänge während des Wachstums abspielen, deshalb sind die hier beschriebenen Resultate alle an diesen Gefäßsegmenten erhoben worden. "Stem" und "reentry" zeigen kaum Veränderungen, wie aus früheren Studien bekannt ist<sup>14 15</sup>. Die Gewebeproben wurden für die Elektronenmikroskopie und für die Immunzytochemie fixiert und eingebettet bzw. eingefroren.

### ***2.3 Vorbereitung des Materials für die Elektronenmikroskopie***

Die Gewebeproben wurden für zwei Stunden mit 3%igem, 4°C kaltem Glutaraldehyd in 0,1 molarem Natrium-Cacodylatpuffer (pH 7.4, 400 mosmol) fixiert.

Anschließend wurden die Proben mehrfach in Natrium-Cacodylatpuffer (mit 7.5% Saccharose) gewaschen und danach in 1.6%igem OsO<sub>4</sub> (Osmiumtetroxid) in Veronalacetatpuffer für zwei Stunden fixiert.

Nach erneutem Waschen, diesmal in Veronalacetatpuffer, wurden die Gewebeproben in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, danach zweimalig mit Propylenoxid behandelt und anschließend in Epon eingebettet.

Nach Polymerisation bei 50°C im Wärmeschrank über drei Tage war das Epon-Kunstharz ausgehärtet. Mit einem Ultramikrotom wurden zunächst semidünne, etwa 1µm dicke Schnitte hergestellt, die mit Toluidinblau gefärbt wurden.

Die Betrachtung dieser Schnitte im Durchlichtmikroskop erlaubte die Auswahl artefaktfreier Areale, von denen dann ultradünne Schnitte von 50 nm Dicke angefertigt wurden.

Diese Schnitte wurden auf Kupfergrids aufgefangen und mit Bleizitrat und Uranylacetat kontrastiert und schließlich mit einem Philips EM CM10 angesehen und fotografiert.

### ***2.4 Vorbereitung des Materials für die Immunzytochemie***

Das Gewebe wurde frisch, d.h. nicht chemisch vorfixiert in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dann wurden mit einem Gefriermikrotom (Leica Kryostat 1720 digital) 4 µm dünne Schnitte angefertigt.

Die Schnitte wurden mit Hematoxylin/Eosin gefärbt. Die strukturelle Wandzusammensetzung wurde identifiziert und es wurde festgestellt, ob es sich um ein normales oder ein wachsendes Gefäß handelte. Daran anschließend wurden

die Schnitte für die Immunzytochemie mit monoklonalen Antikörpern weiterbehandelt.

Die Schnitte wurden auf gelatinebeschichtete Objektträger montiert, an der Luft getrocknet, in Azeton bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für 10 min fixiert. und anschließend in Phosphatpuffer (Phosphate Buffered Saline, PBS) abgespült. Die Inkubation mit primären Antikörpern (Laminin für die Basalmembran, sowie Fibronectin für das Interstitium, Vimentin und Desmin für die glatten Muskelzellen, Serotonin und Histamin für die Mastzellen erfolgte bei Raumtemperatur und in einer dunklen Kammer für eine Stunde. Dann wurden die Schnitte in PBS gewaschen. Anschließend wurde der biotinylierte sekundäre Antikörper aufgetragen, der sich an den primären Antikörper bindet. Die Inkubationszeit betrug auch hier 60 min. Dann wurden die Schnitte erneut gewaschen. Die letzte Inkubation wurde mit Fluoroisothiocyanat (FITC) gebundenem Streptavidin (Amersham, Großbritannien) durchgeführt. Alle Antikörper sind aus der Tabelle 1 auf Seite 9 ersichtlich.

Danach wurden die Kerne mit 1:100 verdünntem Actinomycin D für 30 min angefärbt; sie erschienen rot im Fluoreszenzmikroskop (Molecular Probes, Eugene, U.S.A). Die fotografische Dokumentation wurde mit Kodak Film Kodachrome 200 durchgeführt. Die Abbildungen sind Reproduktionen von Diapositiven.

## ***2.5 Lichtmikroskopie zur Mastzellenbestimmung***

Die Bestimmung der Zahl der Mastzellen wurde an mit Toluidin Blau (pH 12.0) gefärbten "dicken" ( $1\mu\text{m}$ ) Schnitten durchgeführt. Die Anzahl der Mastzellen, die durch ihre dunkelblauen Granula leicht zu identifizieren sind, wurde in der Gefäßwand, in der Adventitia und im umliegenden Myokard gezählt und schließlich als Anzahl pro Gefäßsegment ausgedrückt.

## ***2.6 Elektronenmikroskopie***

Von allen Quadraten des Kupfergrids wurden zunächst Übersichtsaufnahmen und später höhere Vergrößerungen fotografiert. Die so gewonnenen schwarz-weiß - Negative wurden um den Faktor 4 vergrößert und im Format 11x11.5 abgezogen. Bei der Elektronenmikroskopie wurden sowohl typische, repräsentative als auch besonders auffallende einzelne Merkmale fotografiert.

## ***2.7 Auswertung der elektronenmikroskopischen Befunde***

Die Befunde wurden fotografisch dokumentiert und systematisch in einem semiquantitativen Auswertungsschema erfasst. Hierbei wurde jedes Präparat in die histologisch üblichen Abschnitte eingeteilt: Endothel, Lamina elastica interna, Intima, Media, und Adventitia. Endothel und die Lamina elastica interna werden auch als Intima zusammengefasst. Nach dieser Einteilung fand die Auswertung statt.

Anhand der Bilder wurde zunächst festgestellt, ob das mikroskopische Bild einem gesunden Gewebe entsprach oder nicht.

Fand sich eine Abweichung vom normalen Bild (z.B. das Auftreten von vielen Fibroblasten, lange Endothelfortsätze oder eine zu schmale Media) so erfolgte eine Zuordnung des Präparates nach dem Schweregrad der Gewebsveränderung. Der normale Zustand (Kontrollgefäße) oder der fast normale wurden mit **n** gekennzeichnet. Eine leichte Abweichung vom normalen Zustand wurde mit **+** und eine signifikante Abweichung wurde mit **++** gekennzeichnet. Ein nicht beurteilbares oder fehlendes Präparat wurde mit **(/)** in der Tabelle markiert. Der normale Zustand der LEI wurde mit **n**, eine leichte Unterbrechung mit **+** und eine deutliche Unterbrechung mit **++** bezeichnet. Es ist darauf hinzuweisen, daß sich diese Graduierung nicht auf degenerative Veränderungen bezieht, sondern Ausdruck der mehr oder weniger stark ausgebildeten Wachstumsvorgänge ist.

Das Vorkommen von Mitosen im Endothel und anderen Zellen und das Vorhandensein von hämatopoetischen Zellen, sowie von Mastzellen, wurde besonders beachtet und aufgezeichnet.

Dieses System schaffte eine Übersicht über die untersuchten Präparate, so daß eine differenzierte Aussage über den definitiven Zustand des untersuchten Gewebes möglich war.

### ***2.8 Tabelle 1: Verwendete Antikörper***

Antikörper	Wirtstier	Verdünnung	Hersteller	Klon
Desmin	Maus	1:20	Sigma	DE-U10
Vimentin	Maus	1:3	Immunotech	V9
Fibronectin	Kaninchen	1:50	ICN, Costa-Mesa, USA	R122
Laminin	Ratte	1:50	Immunotech	A112

### 3. Resultate

#### ***3.1 Makroskopische Beobachtungen***

Die Kollateralgefäße befanden sich auf der epikardialen Oberfläche des linken Ventrikels, wo sie die Äste von LCX und LAD miteinander verbinden (**Abb. 1a,b**). Die Ameroidkonstriktoren waren bei allen Tieren vollständig verschlossen, ohne daß ein Infarkt vorlag. Dies zeigt, daß zwischen der Geschwindigkeit des Eintrittes der Stenose und der daran anschließenden Okklusion der Koronararterien und dem Fortschreiten der Entwicklung der Kollateralgefäße ein Gleichgewicht bestand oder daß die Entwicklung der Kollateralgefäße sogar beschleunigt stattfand.

#### ***3.2. Licht- und Elektronenmikroskopie***

Licht- und elektronenmikroskopisch wurden verschiedene Arten von Gefäßen gefunden: a) Normale Arterien von unterschiedlicher Größe mit einer regelrechten Wandstruktur und einer ausgeprägten Lamina elastica interna (**Abb. 2**).

b) Große und mittlere Gefäße, die eine unregelmäßige Wandstruktur zeigten, d.h. eine Ruptur oder völliges Fehlen der Lamina elastica interna und eine mehr oder weniger stark ausgeprägte schmale Intima (**Abb. 3**).

c) Kleine Gefäße, die unregelmäßig strukturiert waren. Sie sind eventuell die Äste von großen Kollateralgefäßen, die am Wachstumsprozess beteiligt sind (**Abb. 4**).

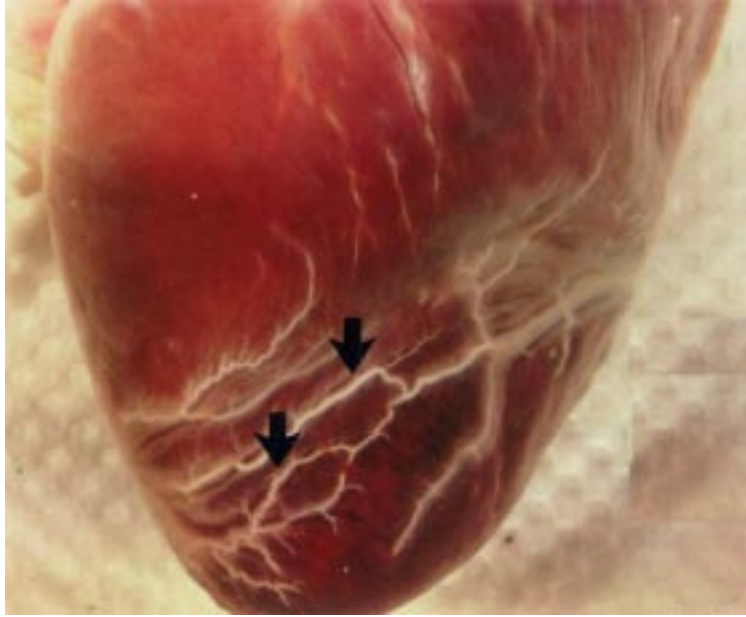


Abb. 1a: Das Herz eines Hundes mit deutlich ausgebildeten Kollateralgefäßen auf der epikardialen Oberfläche (Pfeile).

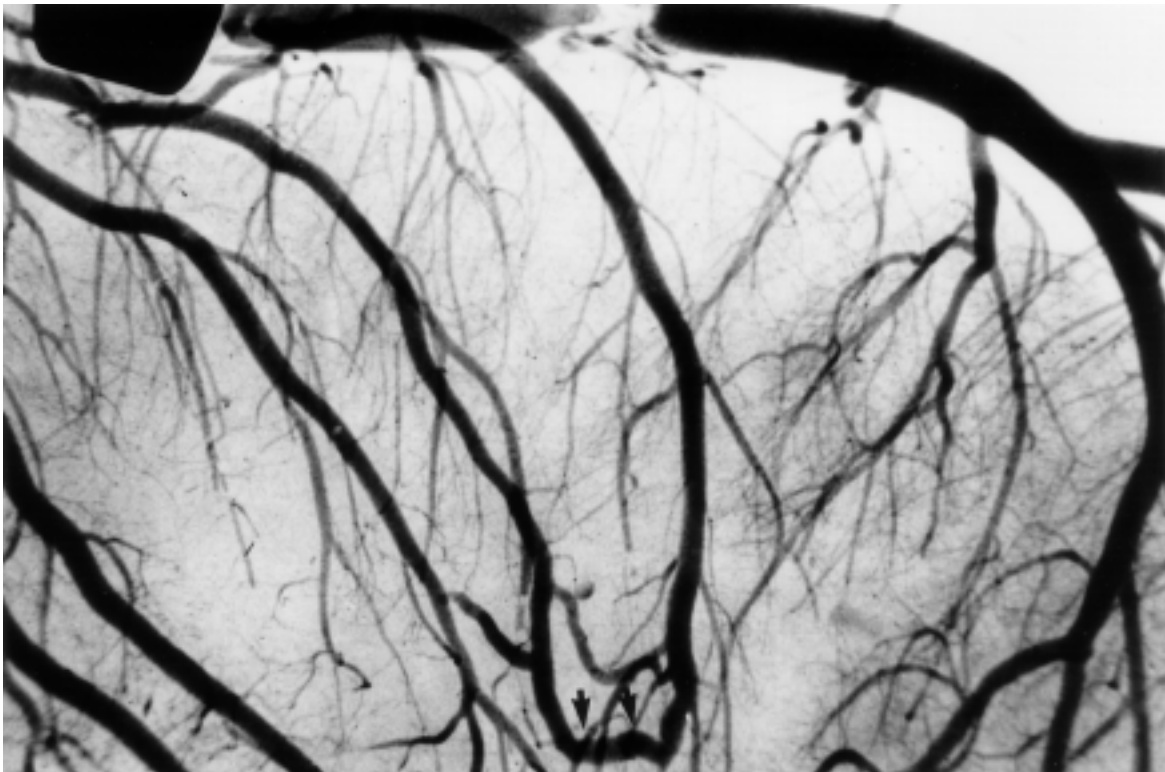


Abb. 1b: Im Angiogramm stellen sich die Kollateralgefäße deutlich dar (Pfeile). Der Konstriktor hat den R. circumflexus der linken Koronararterie verschlossen.

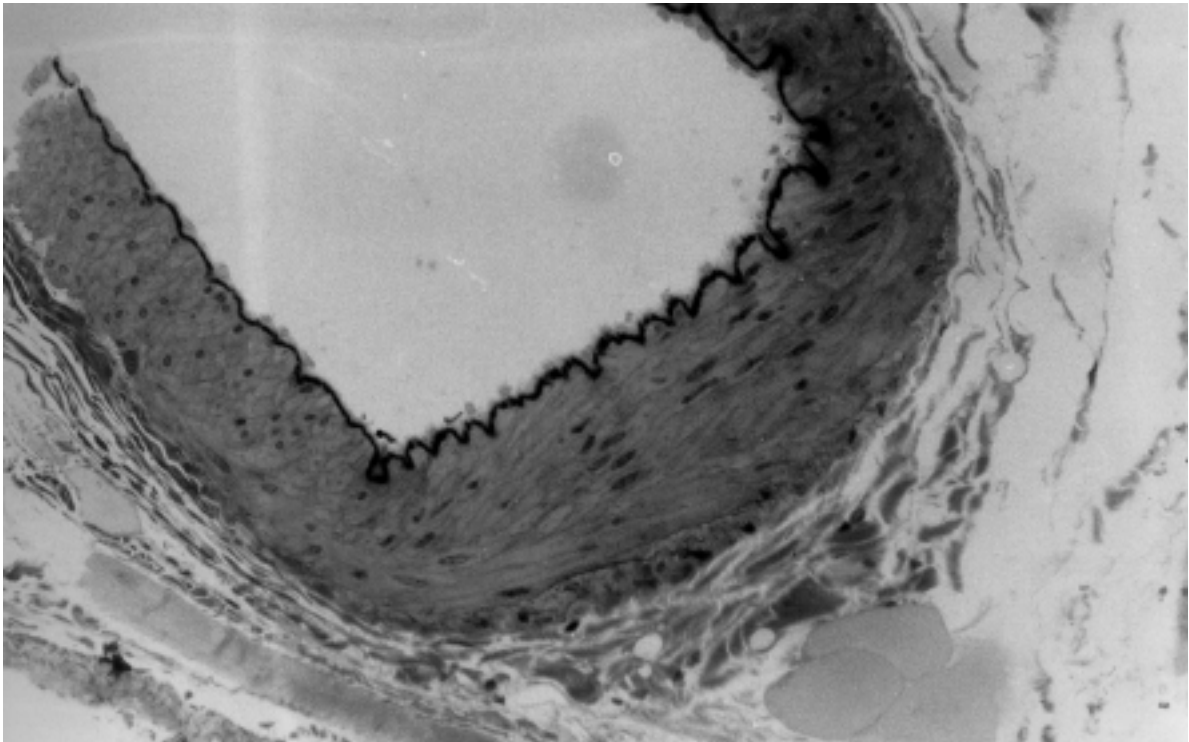


Abb. 2: Die Struktur einer normalen kleinen koronaren Arterie, bzw. eines präexistierenden Kollateralgefäßes, ist durch einen ganz regelmäßigen Aufbau gekennzeichnet. Die *Elastica interna* ist kontinuierlich, die glatten Muskelzellen der *Media* liegen eng aneinander.

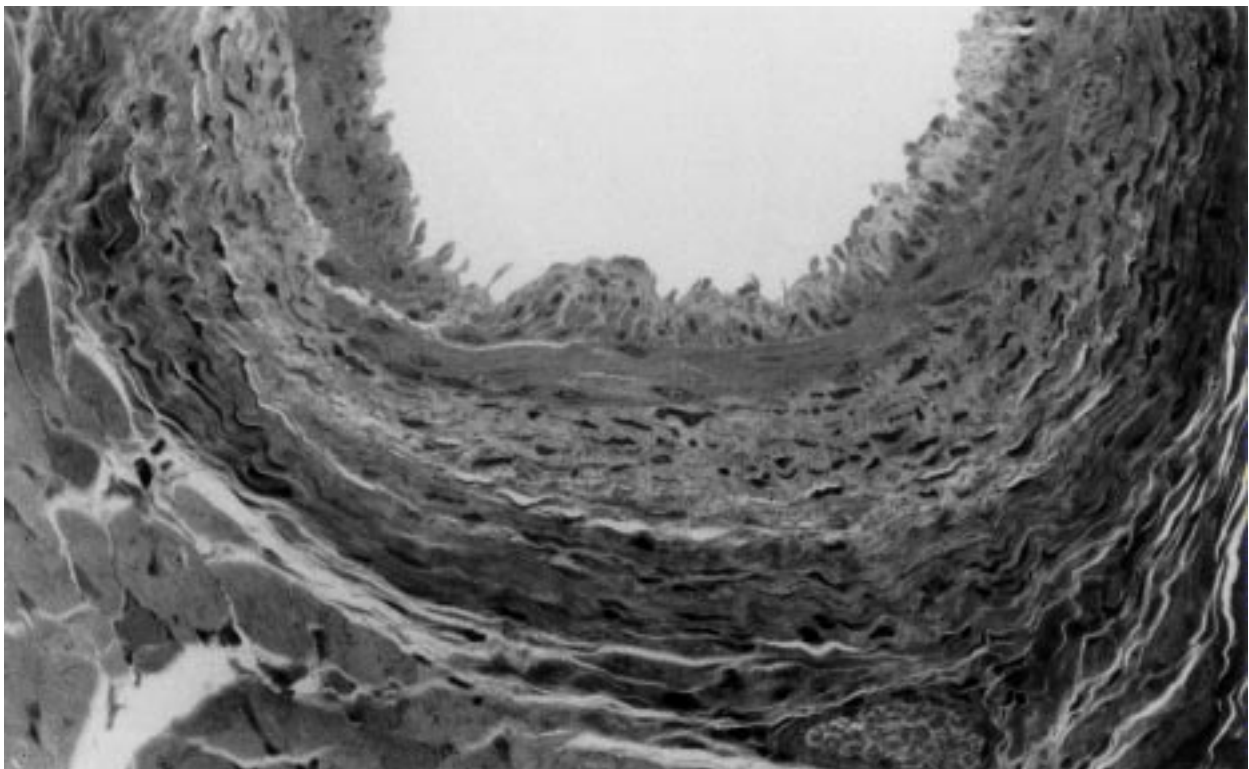


Abb. 3: Wachsendes Kollateralgefäß mit unregelmäßiger Wandstruktur.



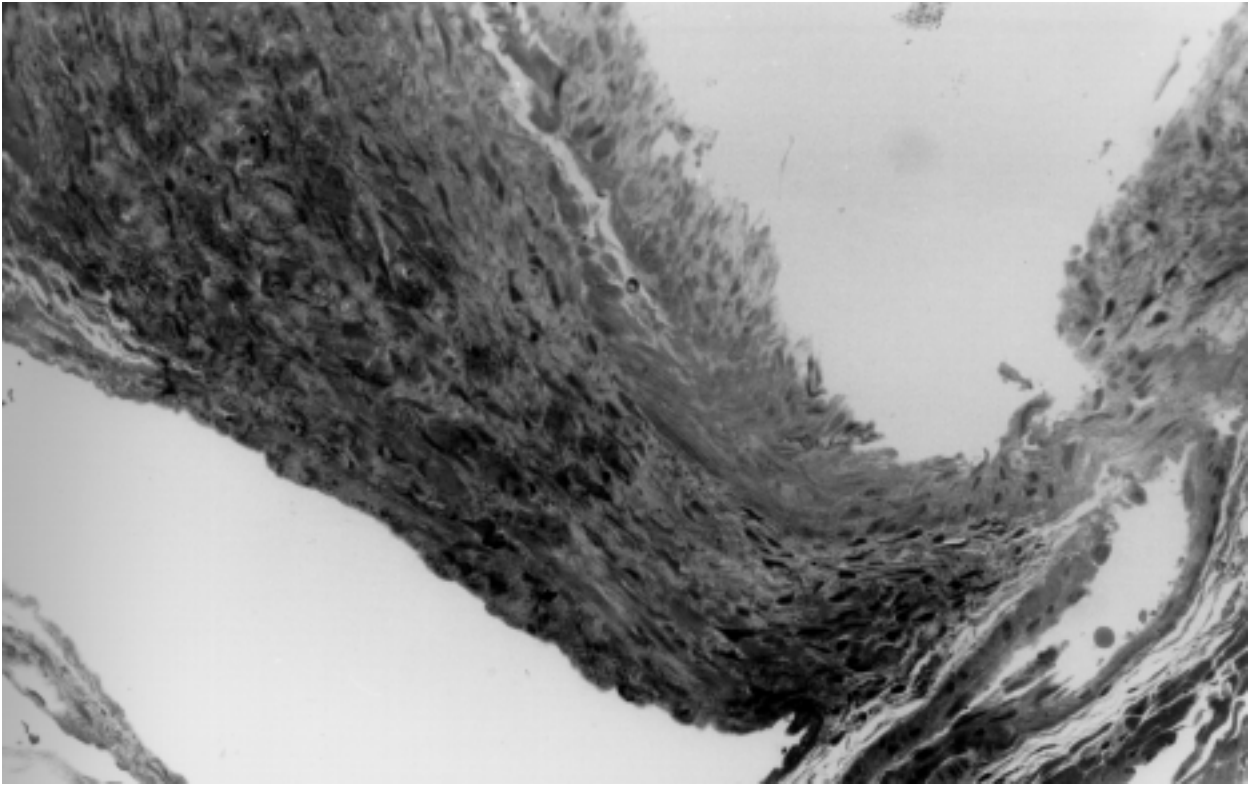


Abb. 4: Wachsendes Kollateralgefäß.

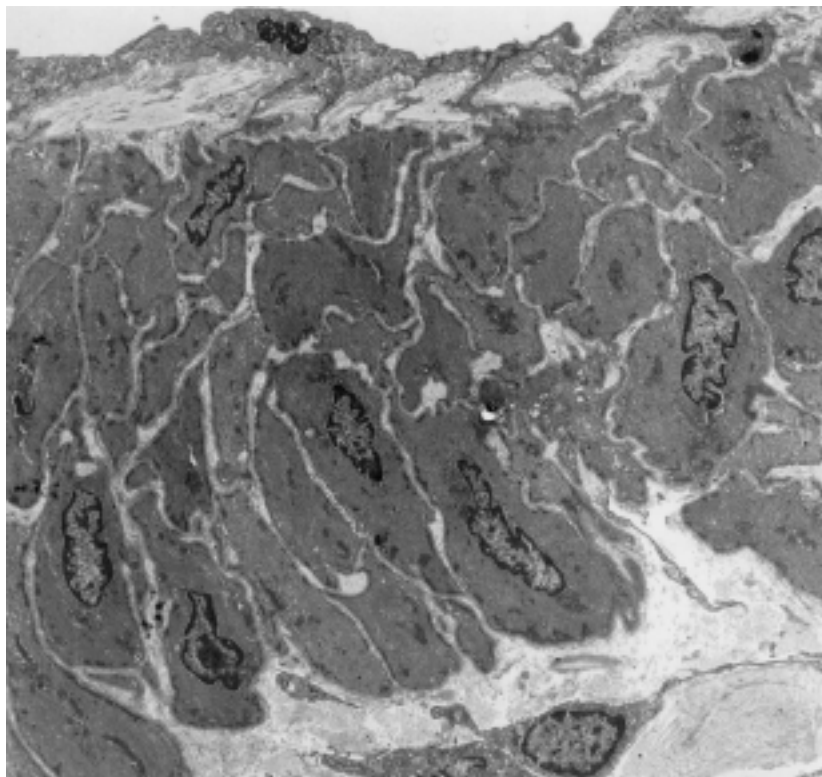


Abb. 5: Gefäß mit einer normalen Wandstruktur. Die Lamina elastica interna ist intakt, die Media enthält 4 Schichten von glatten Muskelzellen.

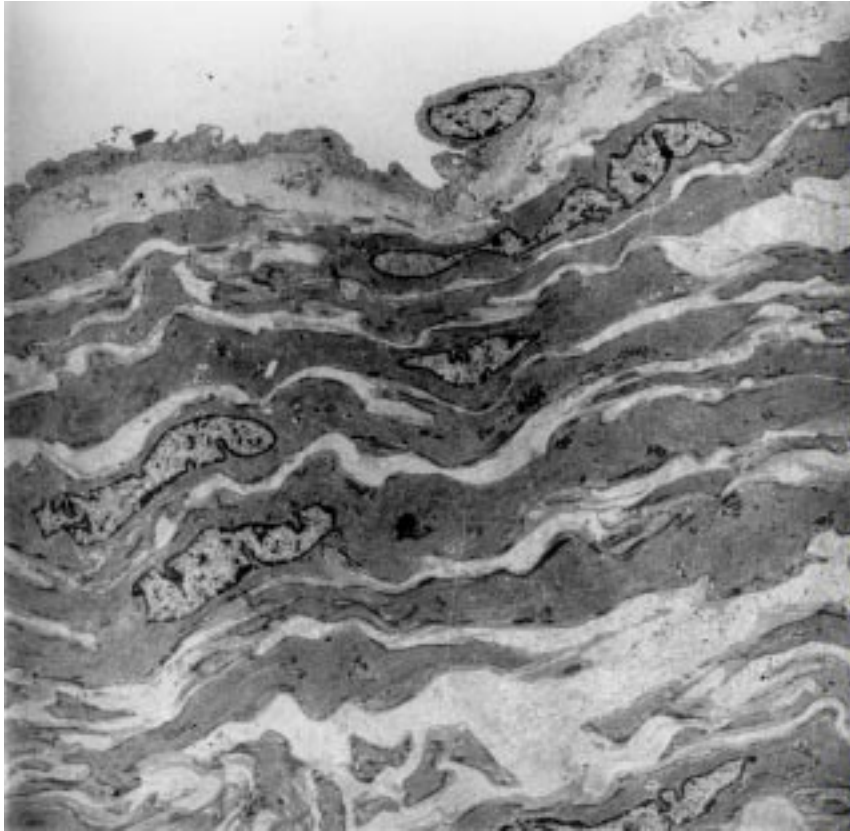


Abb. 6: Zwischen den Schichten von glatter Muskulatur befindet sich gleichmäßig verteiltes Bindegewebe.

### 3.2.1 Kontrollgefäße

Die Kontrollgefäße zeigten einen dreischichtigen Wandaufbau wie in **Abbildung 5** dargestellt wird:

#### **a) Intima**

Die Intima bestand aus einem einschichtigen Endothel, unter dem eine dünne Membran von Bestandteilen der extrazellulären Matrix lag. Die extrazelluläre Matrix war aus verschiedenen Proteinen wie Laminin und Fibronectin zusammengesetzt. Die Membrana elastica interna, eine 1 bis 2  $\mu\text{m}$  dicke Membran aus elastischem Material, grenzte die Endothelschicht von den glatten Muskelzellen der Media ab. Die Fasern besaßen Eigenfluoreszenz, d.h. sie leuchteten im Fluoreszenzmikroskop. Die Endothelzellen waren regelmäßig angeordnet, und die Membrana elastica interna zeigte einen kontinuierlichen Verlauf.

#### **b) Media**

Die Media bestand aus mehreren Schichten glatter Muskelzellen, die regelmäßig ausgebildet waren und ringförmig verliefen. Die zirkulären Muskelzellen der Media waren spindelförmig und wiesen Myofilamente und andere Zellorganellen wie rauhes endoplasmatisches Retikulum, Golgi Apparat und Mitochondrien auf. Die glatten Muskelzellen waren gleichmäßig von der extrazellulären Matrix umgeben. Vereinzelt fand man auch elastische Fasern zwischen den Zellen (**Abb. 6**).

#### **c) Adventitia**

Die Adventitia bestand aus lockerem Bindegewebe, aus Kollagenfasern und elastischen Fasern, die längs verliefen, aber auch unregelmäßig angeordnet waren. In der Adventitia befanden sich außerdem zahlreiche Zellen, wie Fibroblasten, Makrophagen, Mastzellen und Nervenzellen, sowie extrazelluläres Matrixmaterial. Diese Schicht ist die peripher liegende vaskuläre Schicht, die das Einfügen des Gefäßes in das umliegende Gewebe ermöglichte (**Abb. 7 und 8**).

### *3.2.2 Kollateralgefäße*

Die Hauptkriterien zur Identifizierung der Kollateralgefäße waren:

1. Makroskopisches Vorhandensein der Gefäße an der epikardialen Oberfläche des linken Ventrikels.
2. Ungeordneter Wandaufbau mit einer deutlichen zellreichen Intima.
3. Vorkommen einer fragmentierten Lamina elastica interna.

Diese Veränderungen wurden in unterschiedlich starker Ausprägung gefunden, erlaubten aber immer die Identifizierung von Kollateralgefäßen (**Abb. 9**).

#### **a) Intima**

Die Intima bestand aus Endothelzellen, die in ihrem Verlauf und ihrer Form sehr unterschiedlich waren. Die Endothelzellen wölbten sich ins Lumen vor. In manchen Gefäßen zeigten die Endothelzellen eine zelluläre Aktivierung, die gekennzeichnet war durch das Vorkommen von zahlreichen Zellorganellen wie Golgi-Apparat, Mitochondrien, einem großen Kern mit mehreren Nukleoli und vielen Vakuolen im Zytoplasma. Mitosen wurden im Endothel und in den glatten Muskelzellen der Intima gefunden. Mitosen wurden besonders häufig 4 Wochen nach Implantation des Konstriktors gefunden (**Abb. 10-13**). Die Intima war zellreich in allen Stadien, besonders aber 4 Wochen nach Konstriktorimplantation. Im späteren Stadium wurde sie breiter, enthielt nur noch Fragmente der "alten" Elastica interna aber punktuell schon neugebildetes elastisches Material, und zeigte einen erhöhten Gehalt an extrazellulärem Matrixmaterial (**Abb. 14,14a**). Die Intima variierte in ihrer Breite zwischen 2-6 Zellschichten.

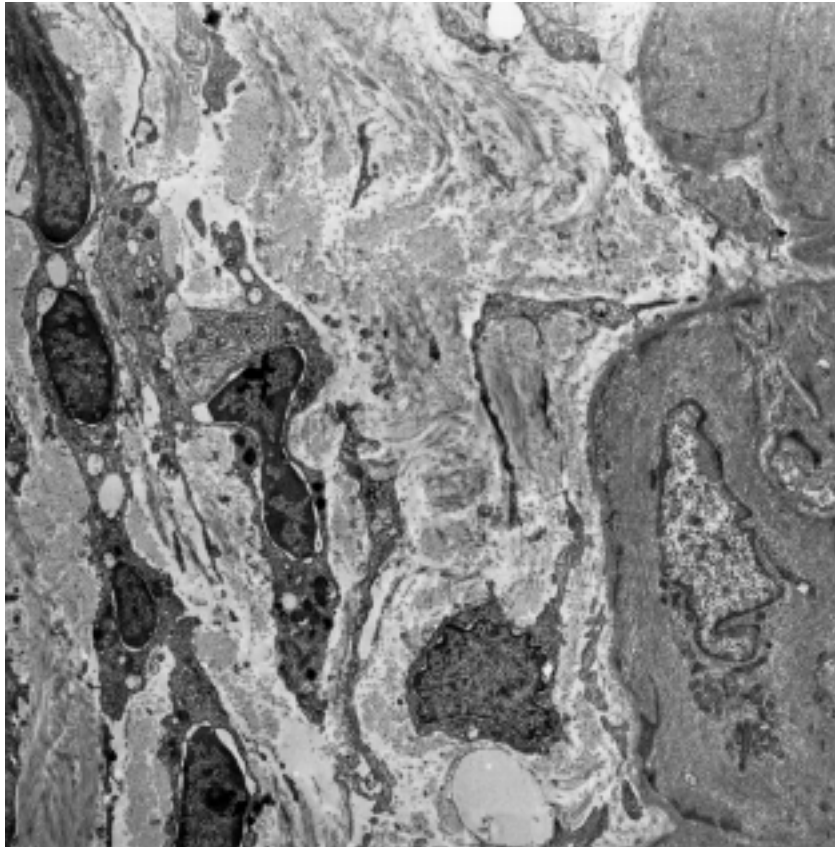


Abb. 7: Die Adventitia ist breit und enthält Kollagenfasern und elastisches Material, Fibroblasten und Makrophagen. Rechts befindet sich eine glatte Muskelzelle.

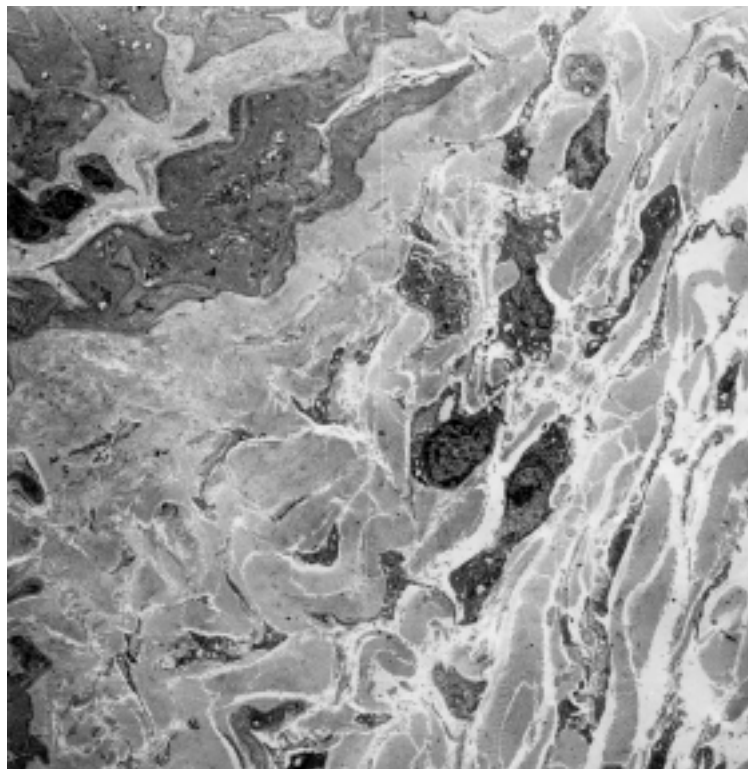


Abb. 8: Adventitia mit zahlreichen Kollagenfasern, Fibroblasten, Makrophagen. Links oben befindet sich ein Leukozyt.

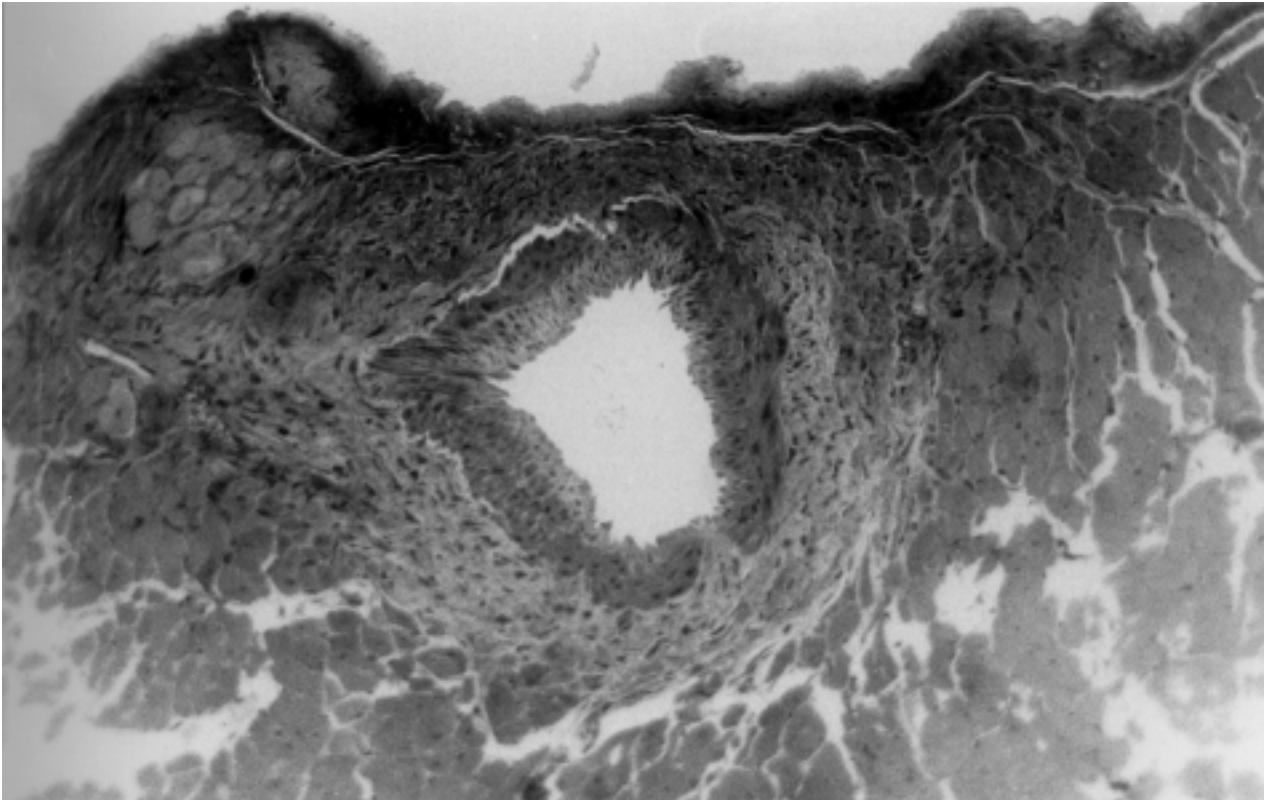


Abb. 9: Ein wachsendes Kollateralgefäß mit einem ungeordneten Wandaufbau, umgeben von Myokardgewebe.

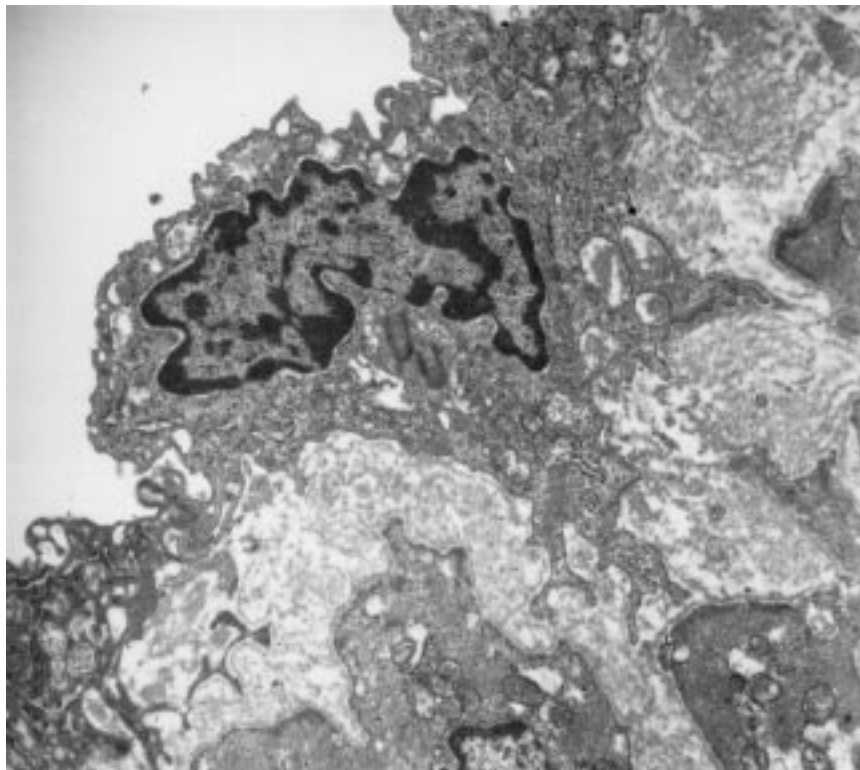


Abb. 10: Typische Endothelzelle eines wachsenden Kollateralgefäßes mit zahlreichen Zellorganellen. Besonders deutlich sind die beiden Zentriolen.



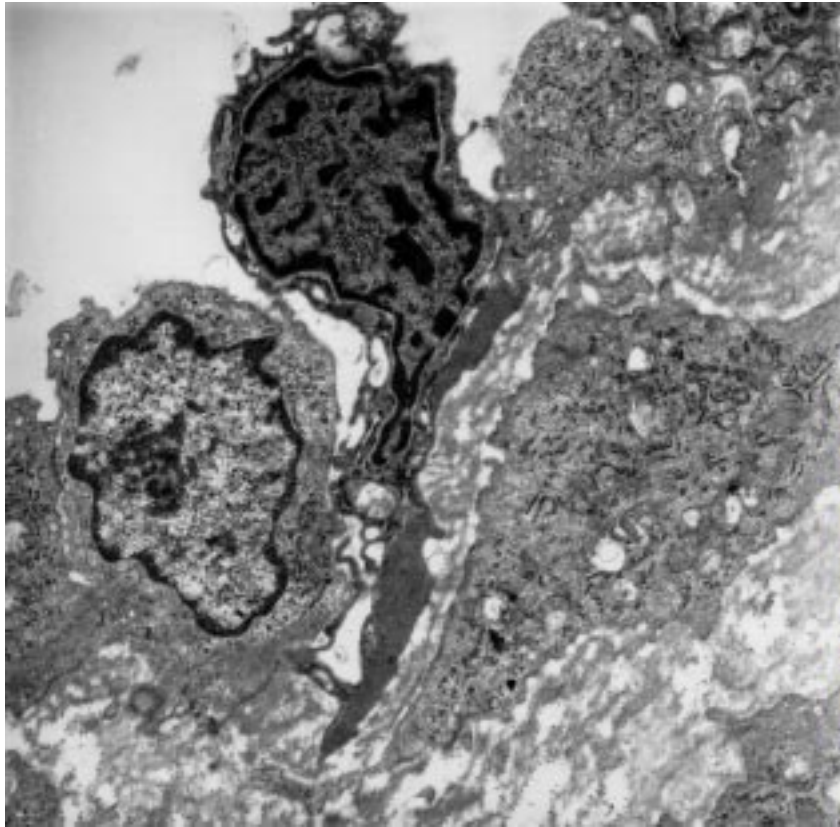


Abb. 11: Endothelzellen im wachsenden Koronargefäß. Auffallend ist die unterschiedliche Elektronendichte. Unter den Endothelzellen befindet sich eine glatte Muskelzelle vom synthetischen Phänotyp.

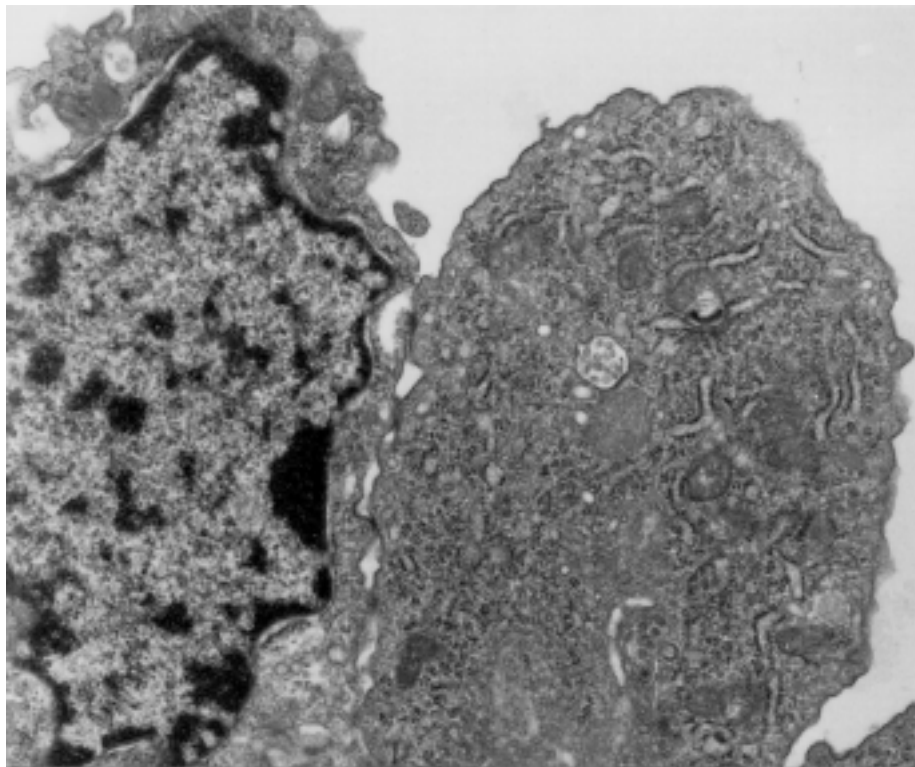


Abb. 12: Endothelzelle eines wachsendes Kollateralgefäßes mit zahlreichen Mitochondrien, freien Ribosomen, multivesicular body und Golgi-Apparat.



Abb. 13: Wachsendes Kollateralgefäß mit zwei Mitosen, in einer Endothelzelle (Pfeil) und einer glatten Muskelzelle (doppelter Pfeil).



Abb. 14: Wachsendes Kollateralgefäß mit unregelmäßiger Wandstruktur, verbreiteter Intima und unterbrochener Elastica interna, breite Adventitia.



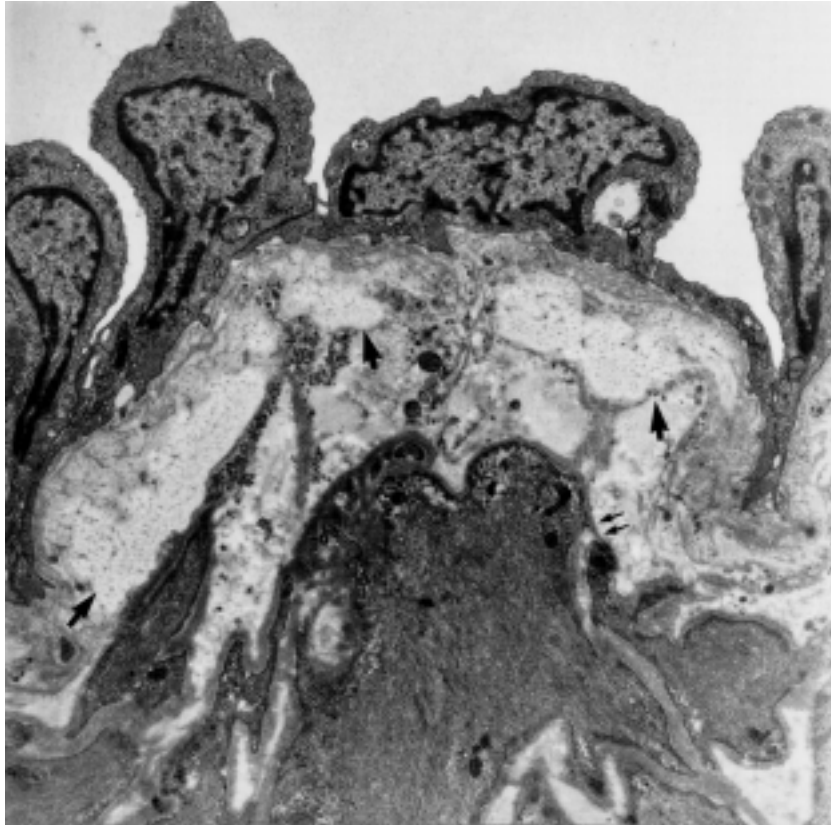


Abb. 14a: Wachsendes Kollateralgefäß mit Endothel, das sich in das Lumen vorwölbt, reichlich elastischem Material (Pfeile) und unregelmäßig angeordneten glatten Muskelzellen (doppelter Pfeil).

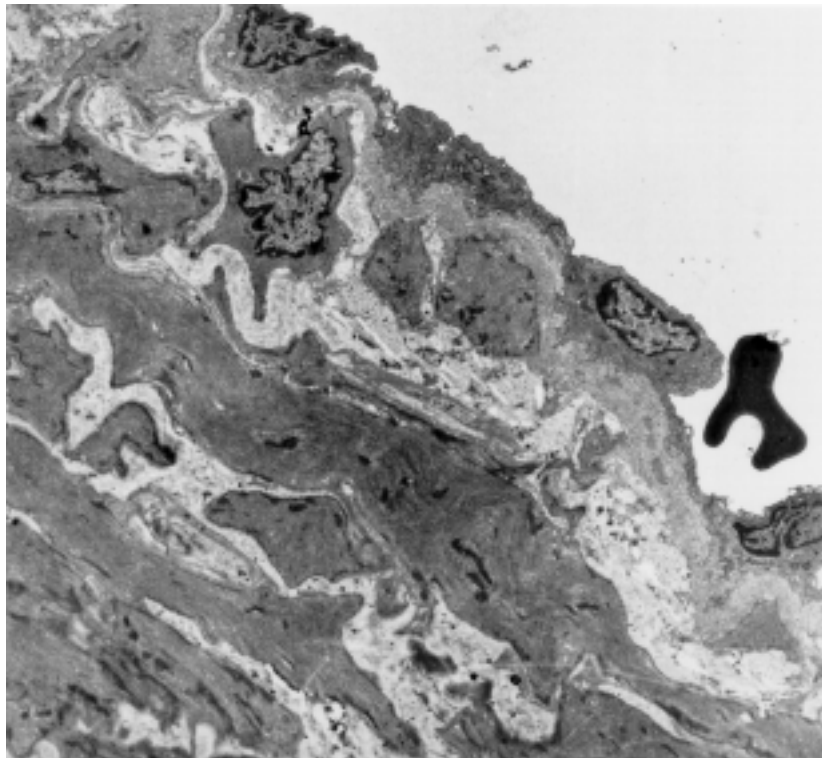


Abb. 15: Glatte Muskelzellen von "kontraktilen Phänotyp" mit zahlreichen Myofilamenten und Mitochondrien, wenig Zellorganellen.

Hier konnten drei Zelltypen identifiziert werden:

**a)** Typische glatte Muskelzellen mit Myofilamenten und wenigen zytoplasmatischen Organellen in der Nähe der Kerne und einer regelmäßigen Basalmembran (**Abb. 15**). Diese werden als Zellen vom "kontraktilen" Phänotyp bezeichnet.

**b)** Glatte Muskelzellen, die eher das Aussehen von Fibroblasten besaßen. Sie zeigten einen großen Kern mit dunklem Chromatin, nur wenige Myofilamente und pinocytotische Vesikel sowie mehr rauhes endoplasmatisches Retikulum und zahlreichere Mitochondrien als die normalen glatten Muskelzellen. Die Basalmembran war nur geringfügig ausgeprägt oder fehlte ganz (**Abb. 16-18**). Diese Zellen werden dem "synthetischen" Phänotyp zugerechnet.

**c)** Vereinzelt Monozyten wurden beobachtet. Diese hafteten sich an das Endothel oder waren bereits in die Intima eingewandert (**Abb. 19 und 19a**). Vereinzelt fanden sich in der Intima auch Lymphozyten (**Abb. 17**).

## **b) Media**

Die Media zeigte keine regelmäßige Struktur. Die glatten Muskelzellen waren unregelmäßig angeordnet, und es befand sich reichlich extrazelluläre Matrix zwischen den Zellen. Die glatten Muskelzellen zeigten eine unregelmäßige Form und Größe, und ihr Verlauf war häufig nicht mehr zirkulär, sondern eher längs oder schräg zur Gefäßachse. Die Media war häufig schmaler als bei normalen Arterien gleicher Größe, während die Intima den größten Teil der Gefäßwand darstellte. Zahlreiche glatte Muskelzellen zeigten regionale Unterbrechungen oder eine Verdickung der Basalmembran, was typisch für Umbauvorgänge und für proliferierende Zellen ist (**Abb. 20-24**).

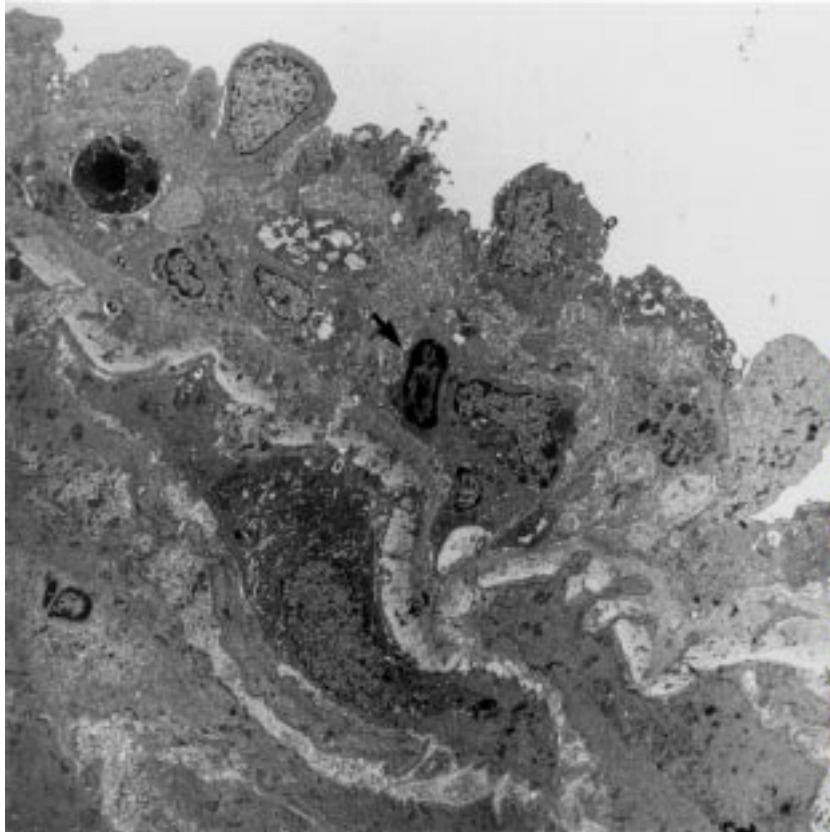


Abb. 16: Stark verändertes wachsendes Kollateralgefäß mit sehr aktivem Endothel, subendothelialen Monozyten (Pfeil), und einer glatten Muskelzelle vom kontraktiven Phänotyp.

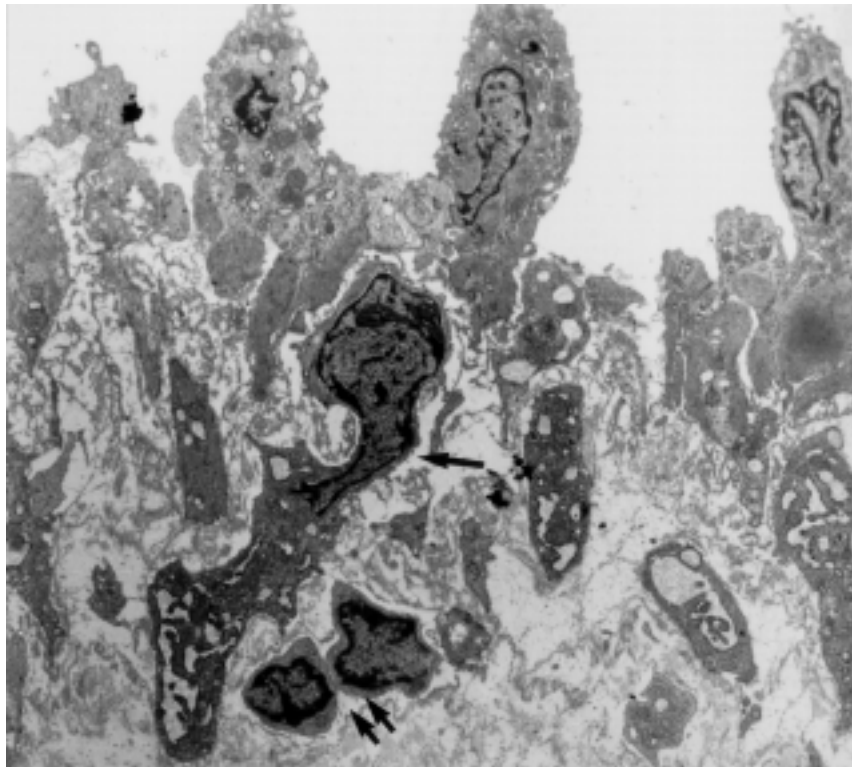


Abb. 17: Wachsendes Kollateralgefäß mit unregelmäßiger Wandstruktur, einer migrierenden Muskelzelle (Pfeil) und zwei Lymphozyten, (doppelter Pfeil).

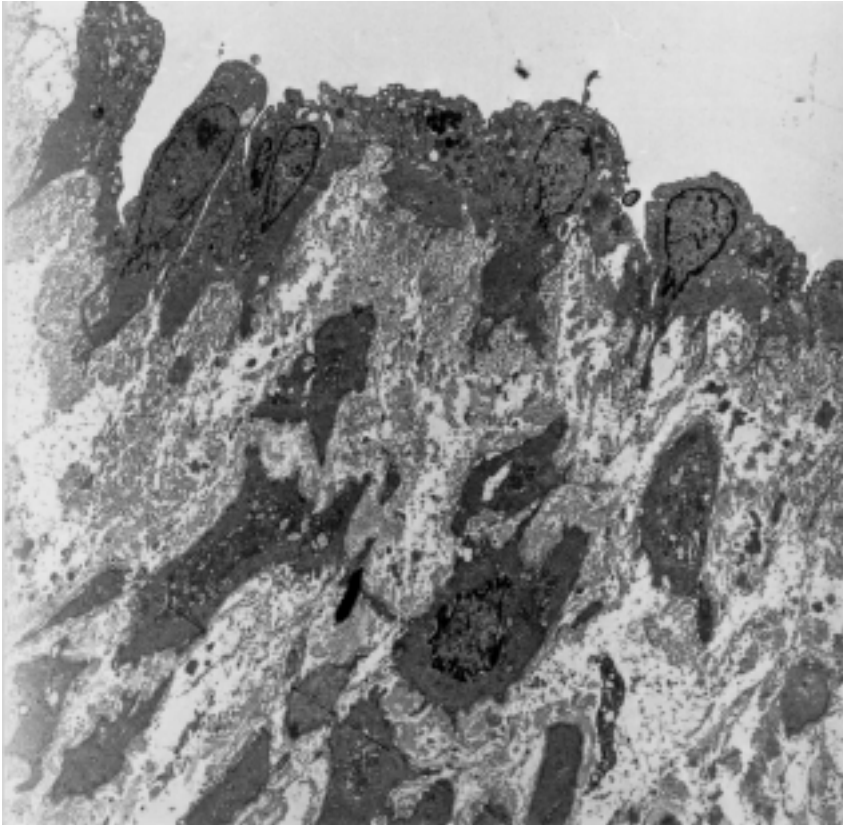


Abb. 18: Stark unregelmäßiger Wandaufbau eines Kollateralgefäßes.

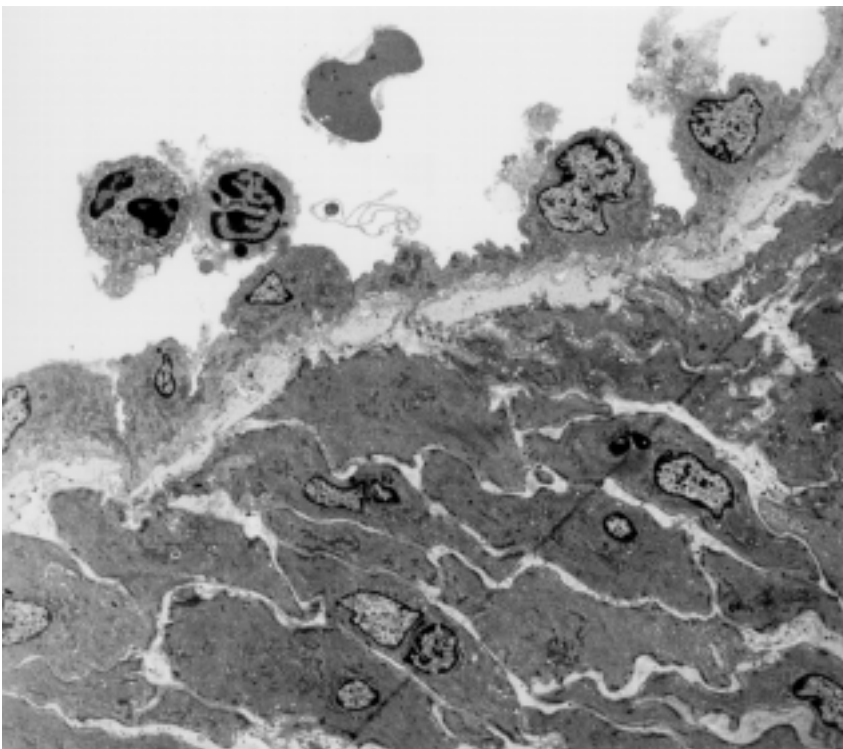


Abb. 19: Anhaften eines Monozyten und eines neutrophilen Granulozyten an das Endothel einer Kollateralen.

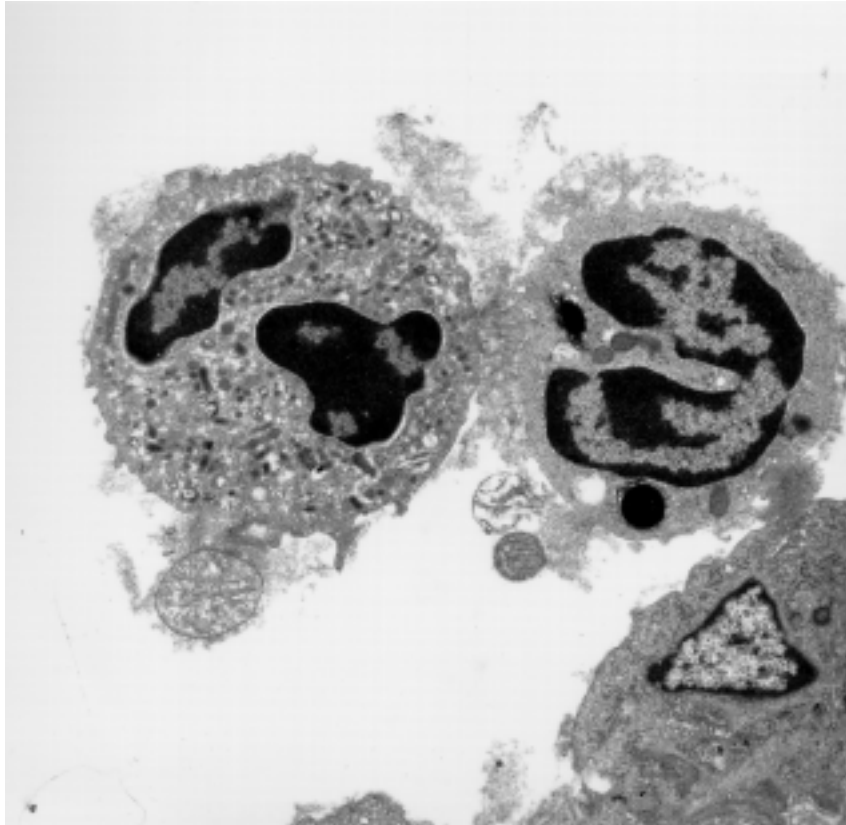


Abb. 19a: Ein Monozyt haftet an der Endothelzelle eines wachsenden Gefäßes. An diesem hängt ein neutrophiler Granulozyt.

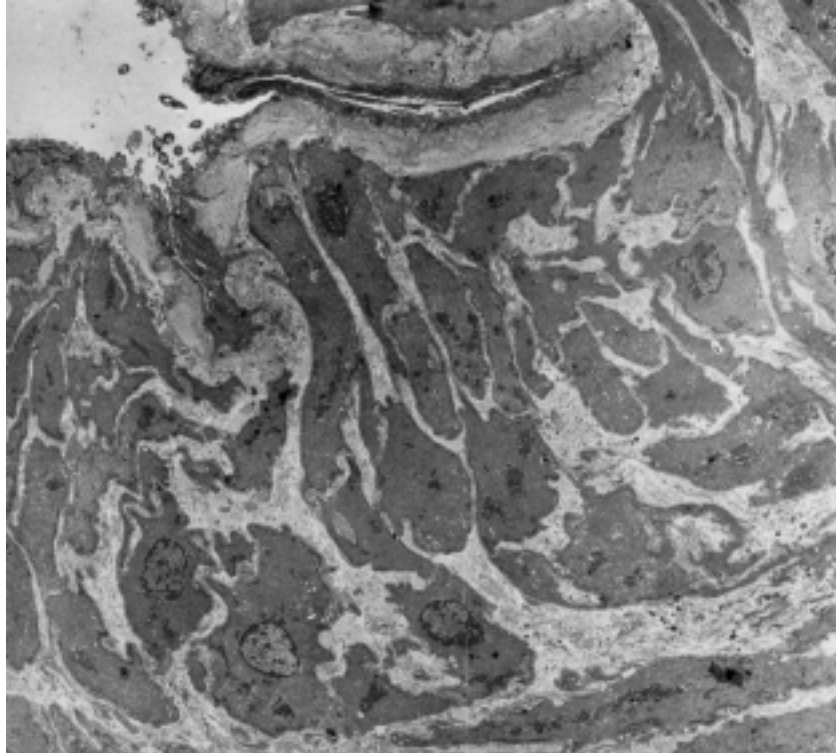


Abb. 20: Unregelmäßiger Wandaufbau mit reichlich Bindegewebe zwischen den einzelnen glatten Muskelzellen.

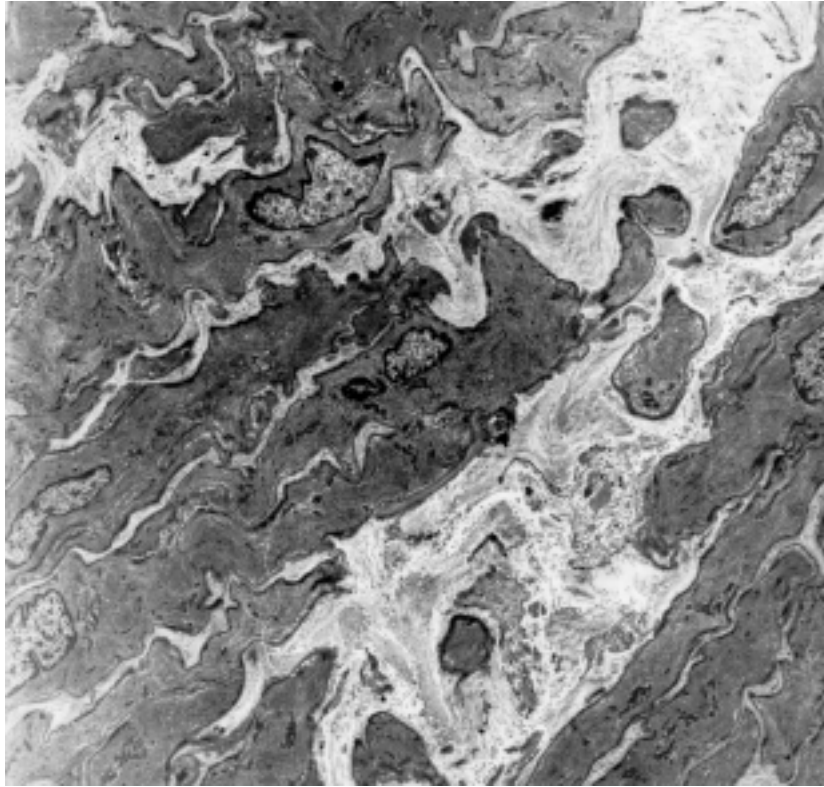


Abb. 21: Unregelmäßiger Aufbau der Media eines Kollateralgefäßes.

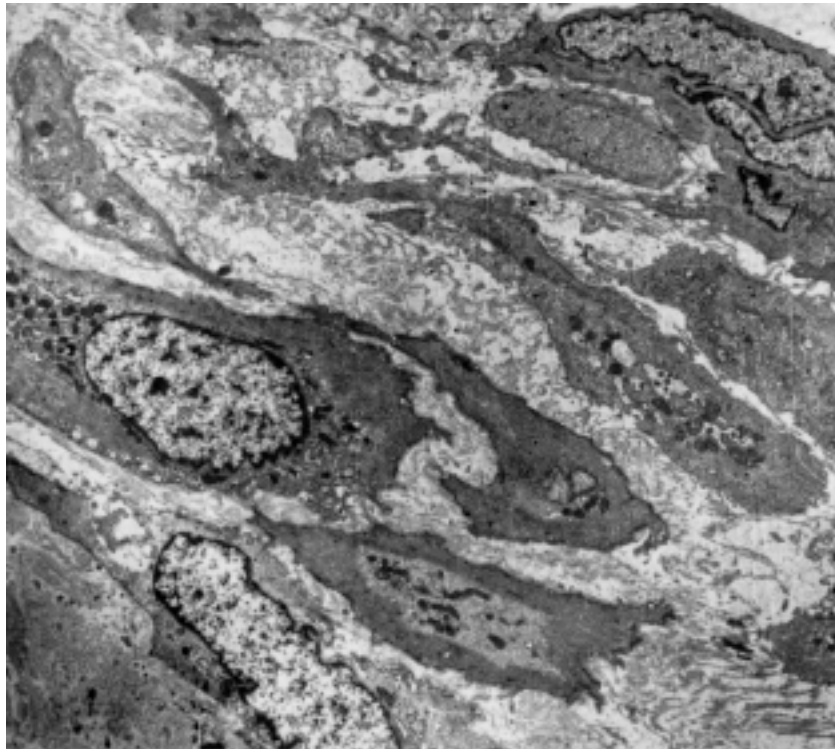


Abb. 22: Reichlich Bindegewebe ist zwischen den unregelmäßigen glatten Muskelzellen der Intima zu finden.



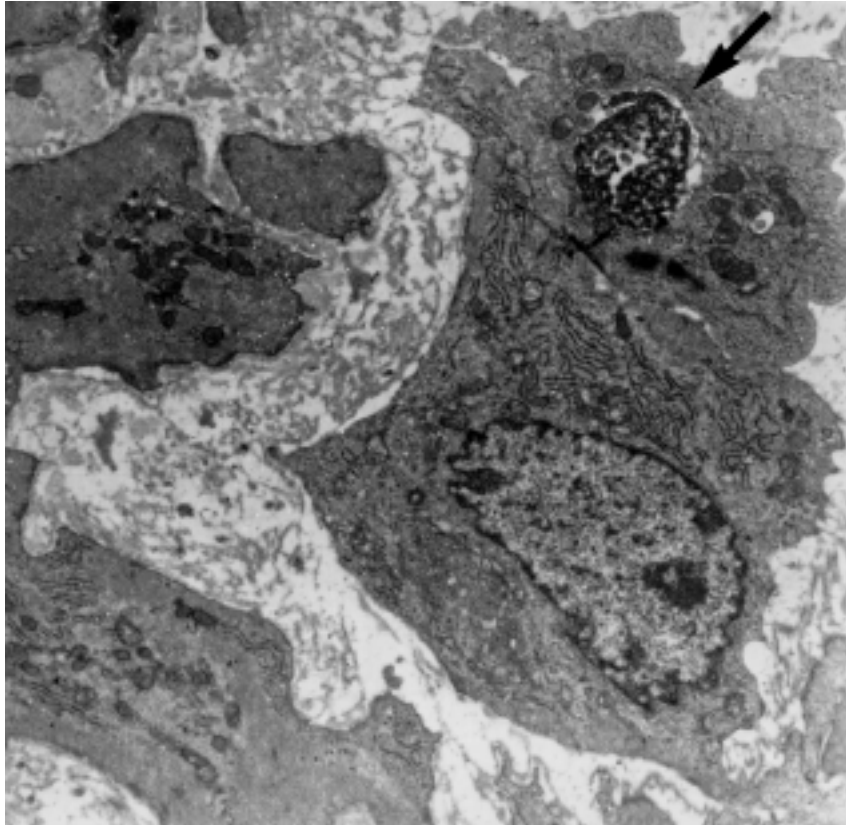


Abb. 23: Eine glatte Muskelzelle der Intima mit reichlich endoplasmatischem Retikulum und einer degenerativen Vakuole (Pfeil).

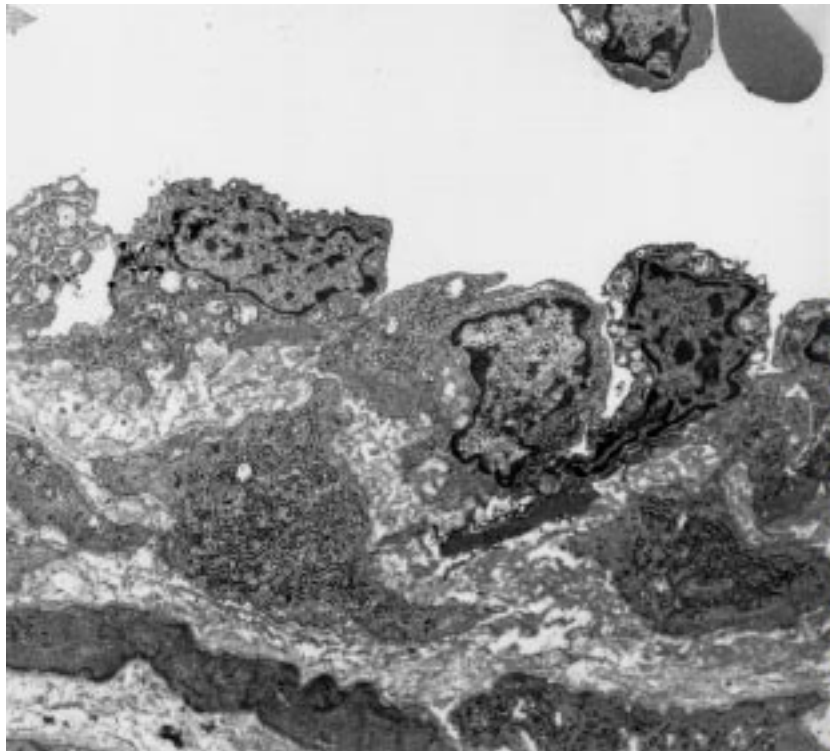


Abb. 23a: Unregelmäßige Struktur einer Kollateralen mit glatten Muskelzellen vom "synthetischen Phänotyp" und vielfacher Basalmembran.

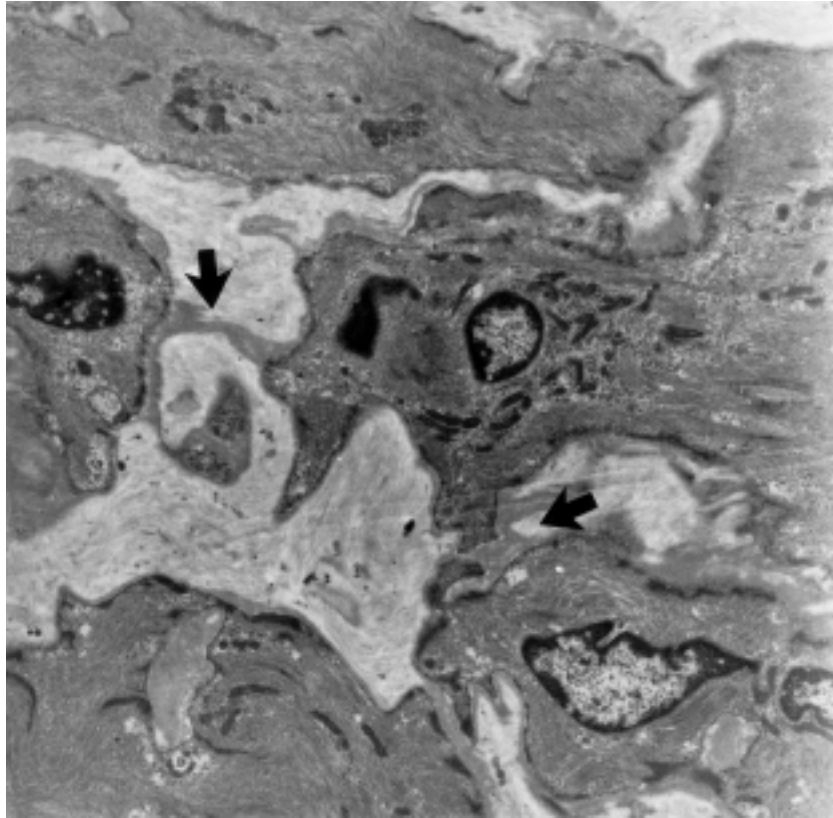


Abb. 24: Die glatten Muskelzellen der Media sind über Basalmembranmaterial miteinander verbunden (Pfeile).

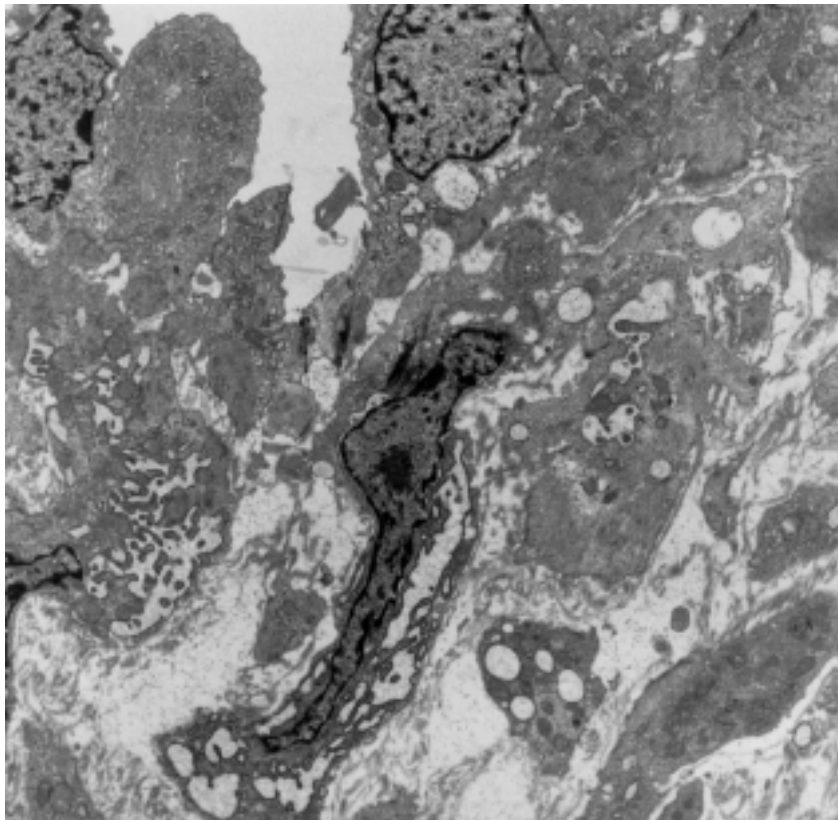


Abb. 25: Eine nekrotische glatte Muskelzelle, die allmählich aufgelöst wird.



Besonders 4 Wochen nach der Ameroidkonstriktorimplantation fanden sich in der Media auch Mitosen, jedoch nicht so häufig wie in der Intima. In der Media wurden außerdem wie zerklüftet erscheinende (**Abb. 26**) oder auch eindeutig nekrotische glatte Muskelzellen beobachtet. Diese Veränderungen wurden als das morphologische Korrelat von Umbauprozessen interpretiert(**Abb. 25,25a**).

### **c) Adventitia**

Die Adventitia enthielt längsverlaufende kollagene Gitter und elastische Netze (**Abb. 27**). Mitosen von Fibroblasten waren häufig zu sehen (**Abb. 28,29**). Hier waren auch Bruchstücke von degenerierten Myokardzellen, Fibrozyten, häufig auch Mastzellen, Makrophagen und neutrophile Leukozyten zu finden. Gelegentlich wurde auch eine Apoptose beobachtet (**Abb.30,31**).

Die Myozyten in der unmittelbaren Nähe des wachsenden Gefäßes zeigten eine geschädigte Struktur, d.h. eine irreguläre Form und Größe, manche waren komplett degeneriert und zeigten zahlreiche Lipidtropfen(**Abb. 32,33**).

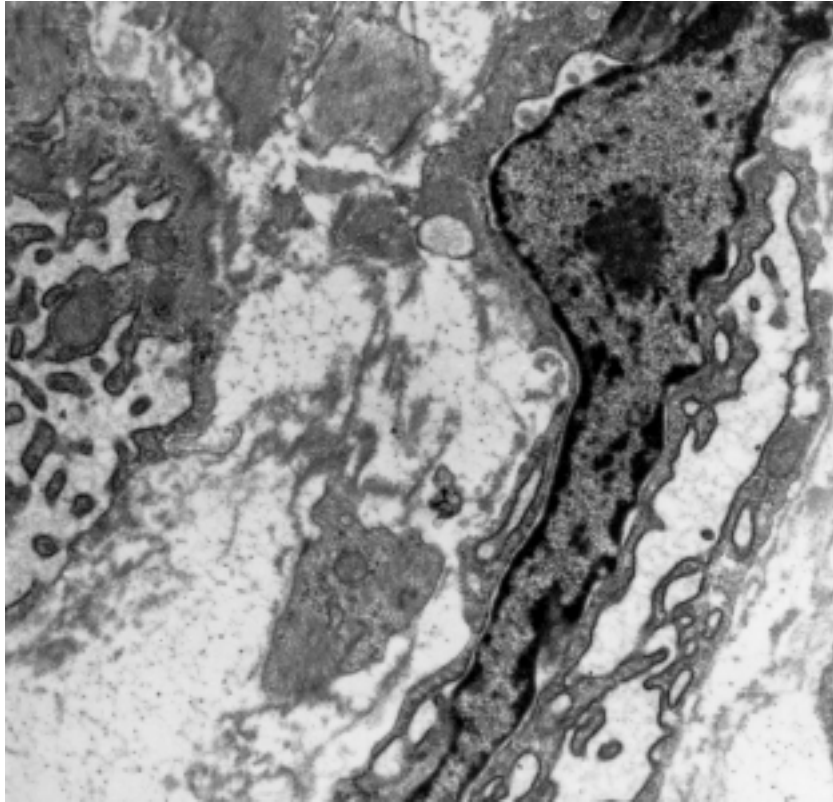


Abb 25a: Vergrößerung der nekrotischen Muskelzelle von Abb. 25.

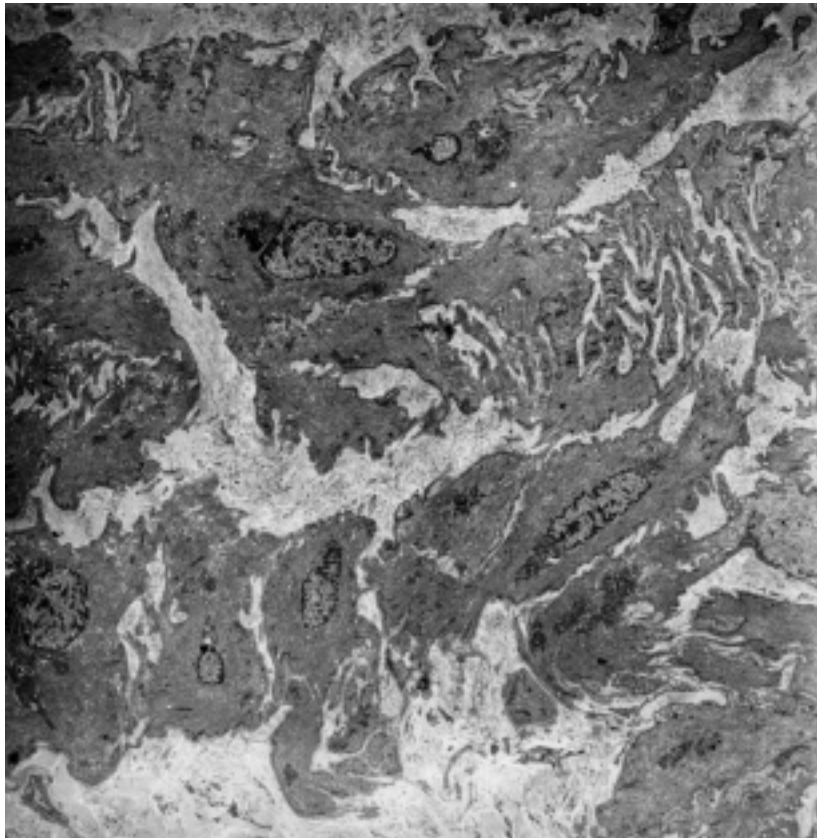


Abb. 26: Die glatten Muskelzellen der Intima sehen häufig stark zerklüftet aus.

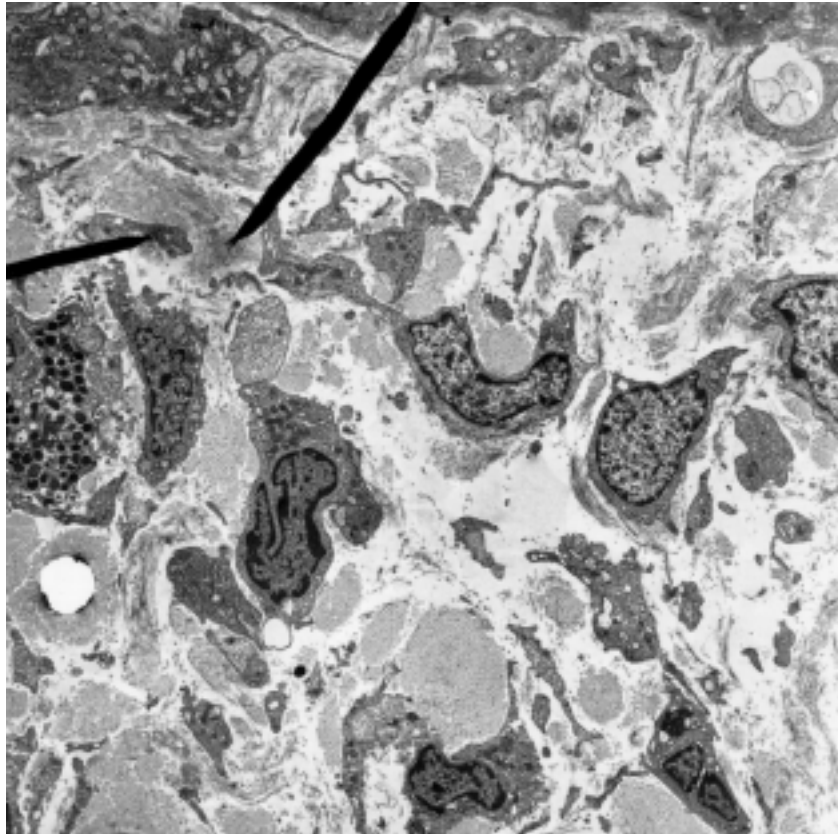


Abb 27: Die Adventitia besteht hauptsächlich aus Kollagenfibrillen und elastischem Material. Auch Fibroblasten, Makrophagen und eine Mastzelle sind vorhanden.

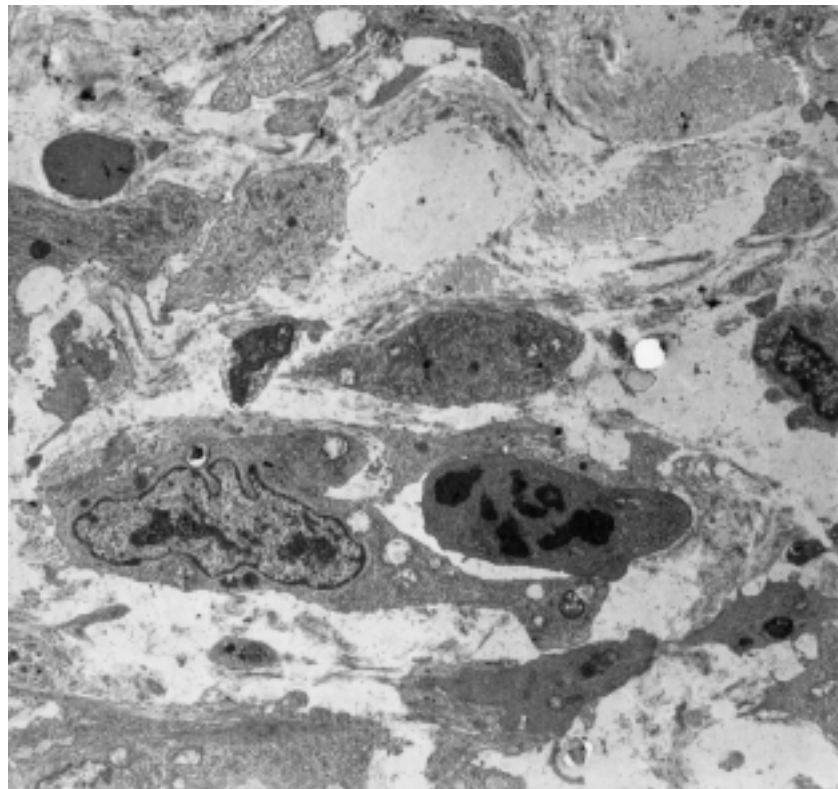


Abb. 28: Wachsendes Kollateralgefäß mit einer Mitose eines Fibroblasten in der Adventitia.

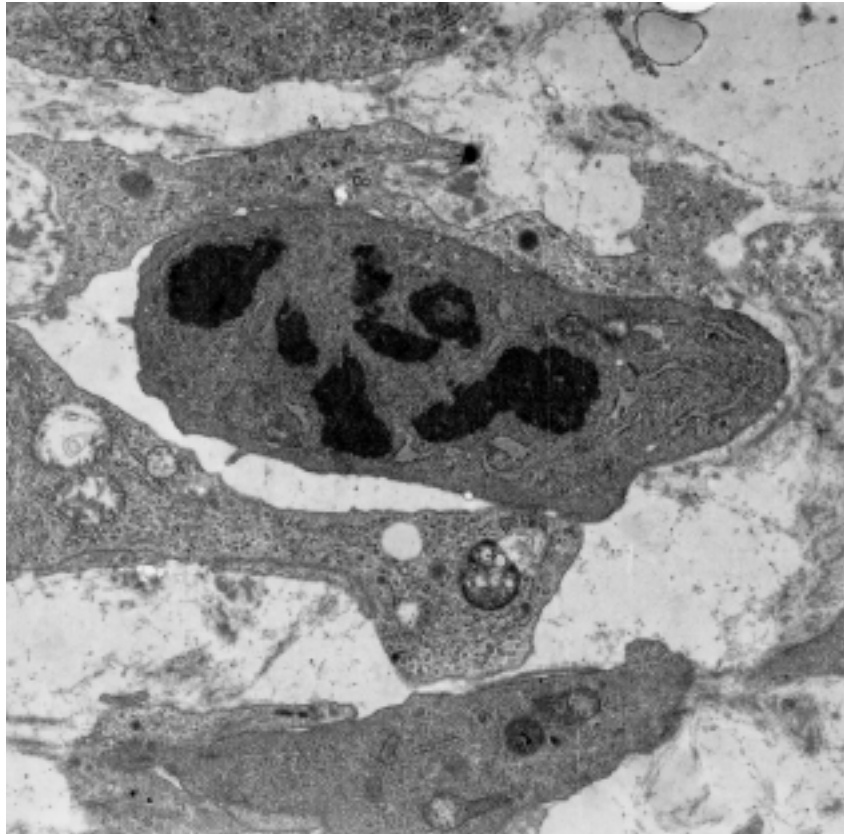


Abb. 29: Vergrößerung der Mitose von Abb. 28.

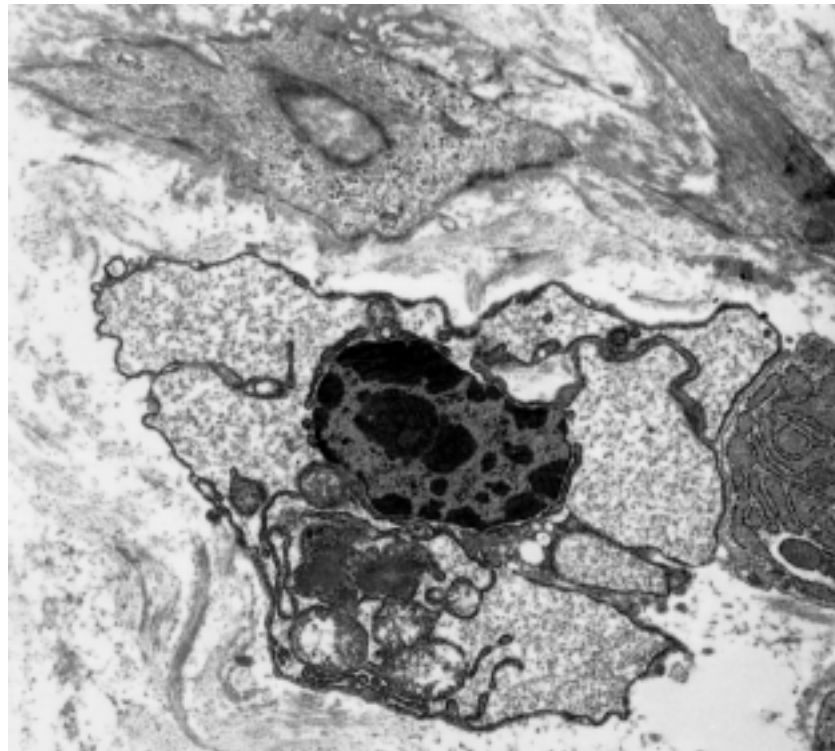


Abb. 30: Ein Fibroblast mit extrem erweitertem endoplasmatischem Reticulum und einem Zellkern mit verklumptem Chromatin, typisch für Apoptose.

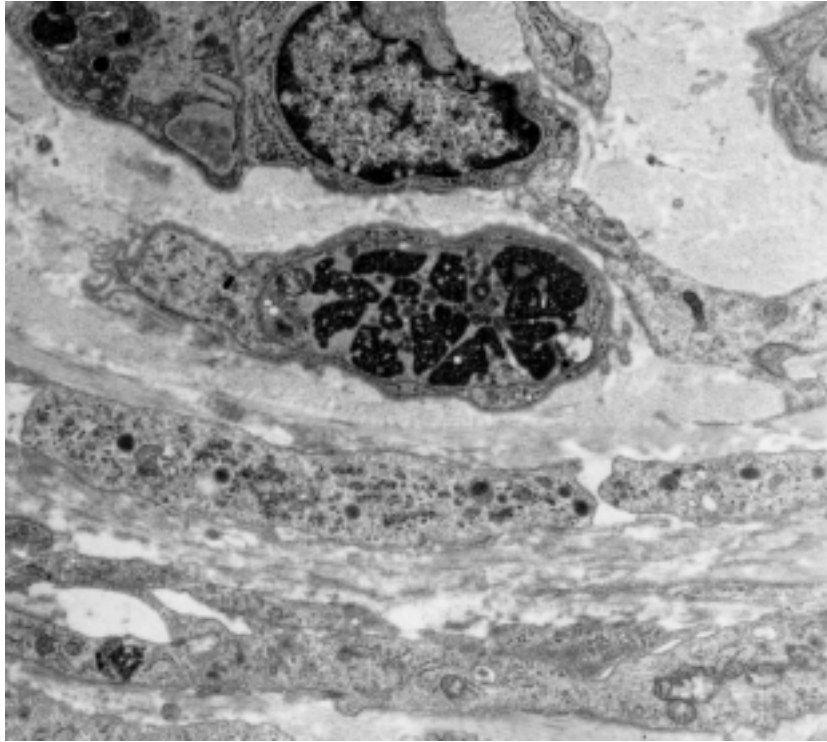


Abb 31: Apoptose eines Fibroblasten.

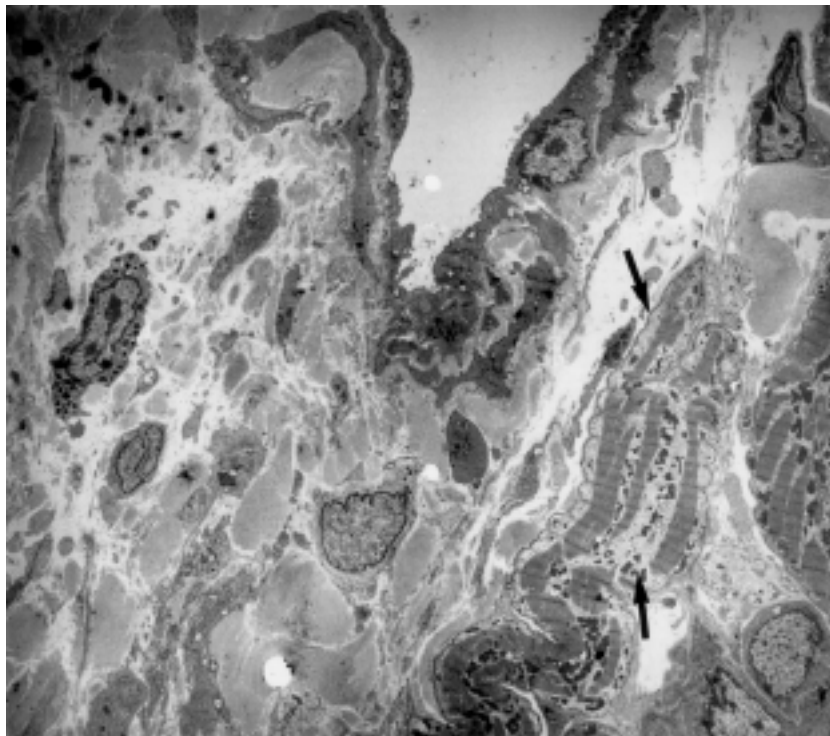


Abb 32: Leichte Schädigung der Myozyten, die ein wachsendes Kollateralgefäß umgeben (Pfeile).

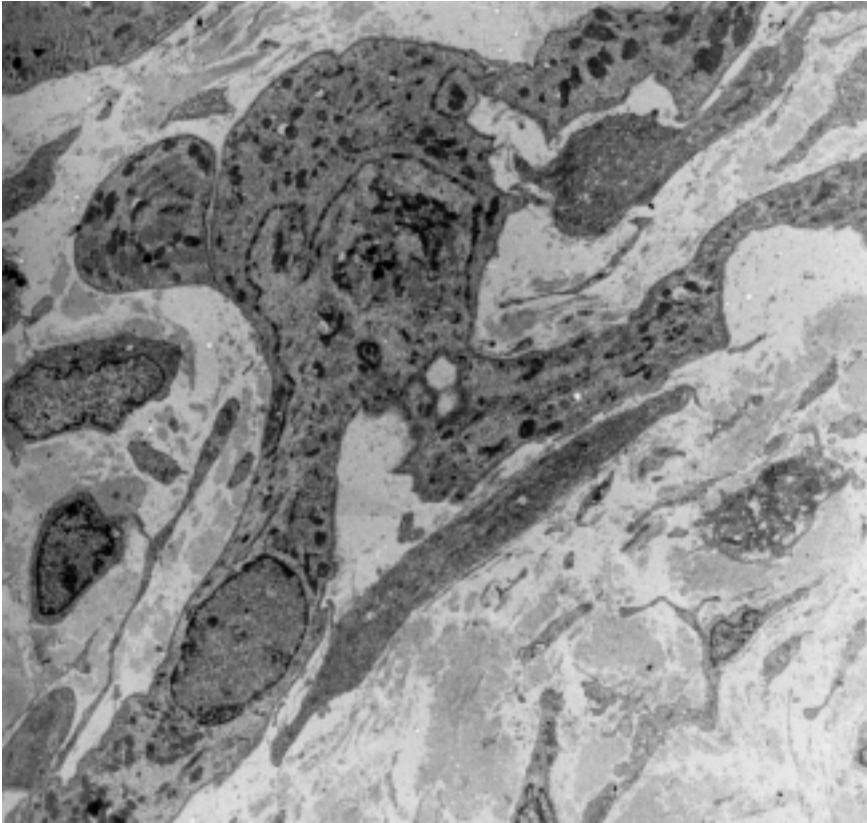


Abb 33: Stark degenerierter Myozyt in der Nähe eines wachsenden Kollateralgefäßes.

### **3.2.3. Veränderungen an Gefäßen von diabetischen Tieren**

Die Gefäßveränderungen der diabetischen Hunde spielten sich vorwiegend in der Intima und in der Media ab. Diese Veränderungen waren hauptsächlich durch eine Zunahme des Bindegewebes in diesem Bereich charakterisiert. Weiterhin fielen der Verlust der elastischen Fasern, eine starke Zellproliferation, die durch Zunahme der Breite der Intima zur Einengung des Lumens führte, und eine vermehrte Zahl der Mastzellen, die sich in der Adventitia und im umliegenden Myokard befanden, auf. Die Veränderungen traten sowohl 4 wie auch 8 Wochen nach der Implantation des Konstriktors auf (**Abb.34-38**).

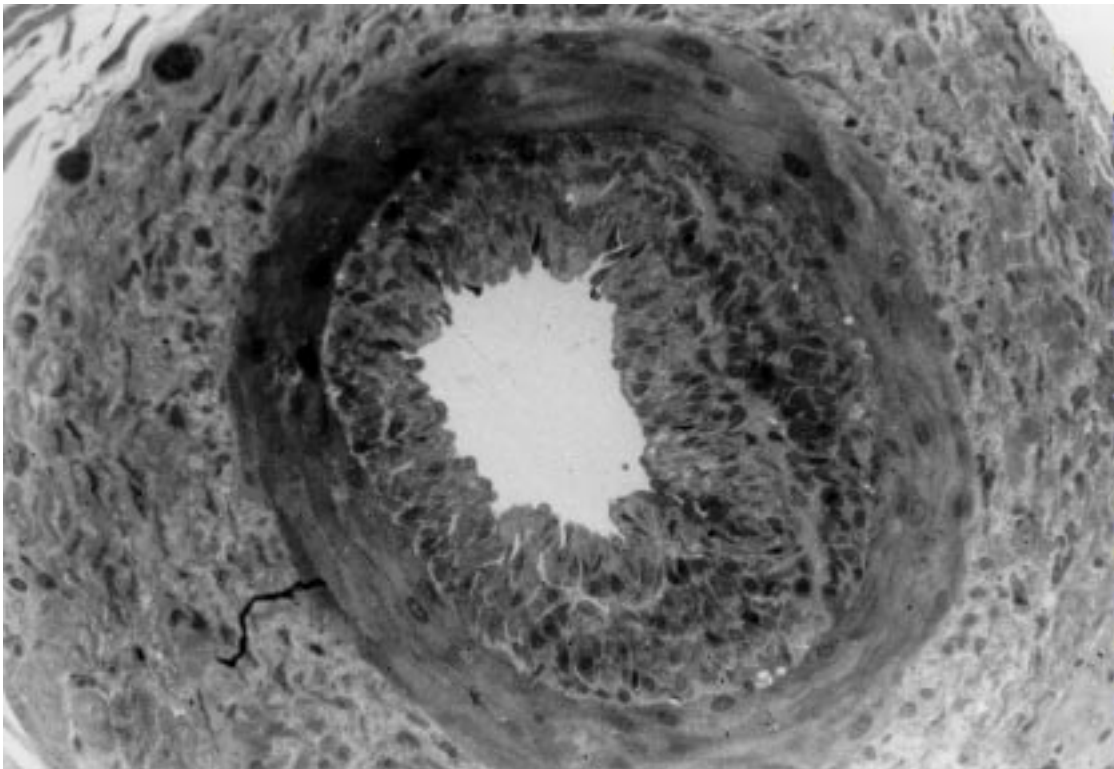


Abb. 34: Lichtmikroskopische Aufnahme eines wachsenden Kollateralgefäßes eines diabetischen Hundes. Typisch sind die breite Neointima und die sehr breite Adventitia.



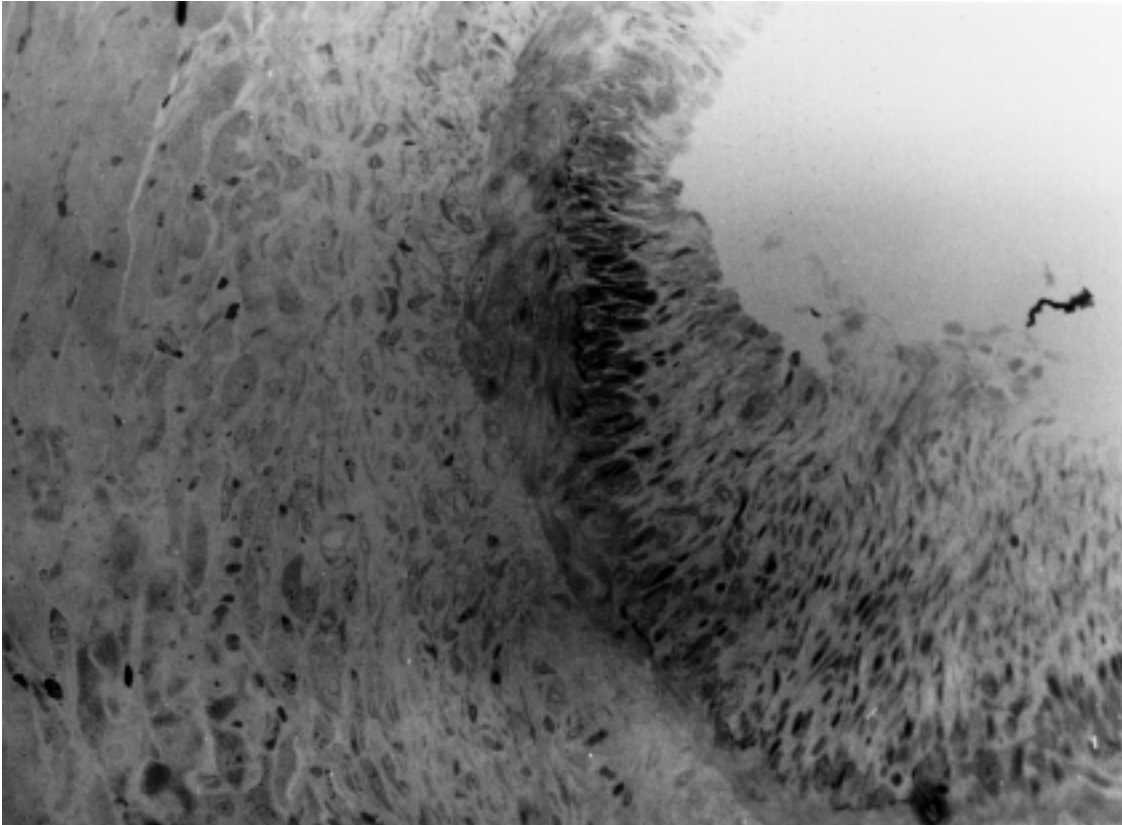


Abb. 35: Starke Intimaproliferation und eine sehr schmale Media in einem Gefäß von einem diabetischen Hund. Sehr breite Adventitia.

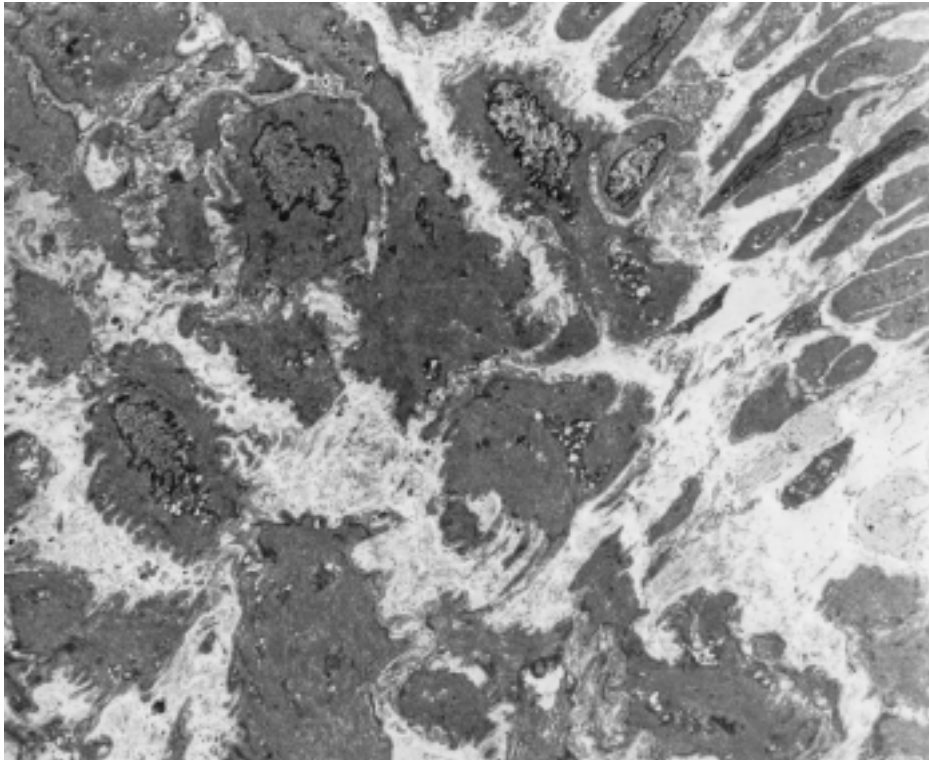


Abb. 36: Sehr unregelmäßige Anordnung der glatten Muskelzellen der Media und Umorientierung in die Neointima, vermutlich durch Migration bedingt.



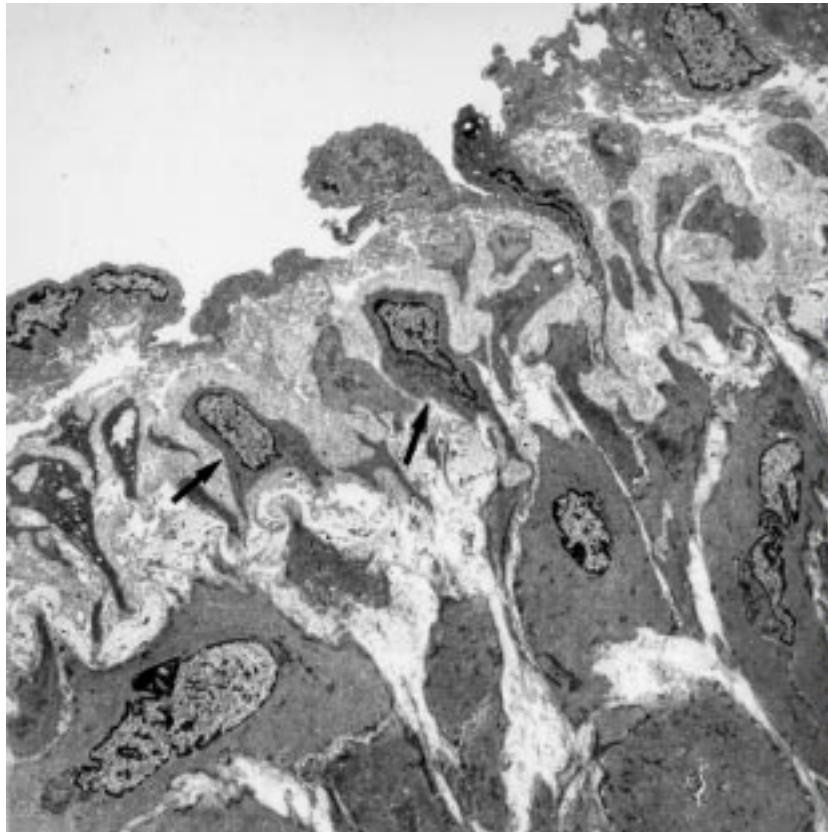


Abb. 37: In der Intima befinden sich auffallend kleine glatte Muskelzellen (Pfeile) und reichlich extrazelluläre Matrix.

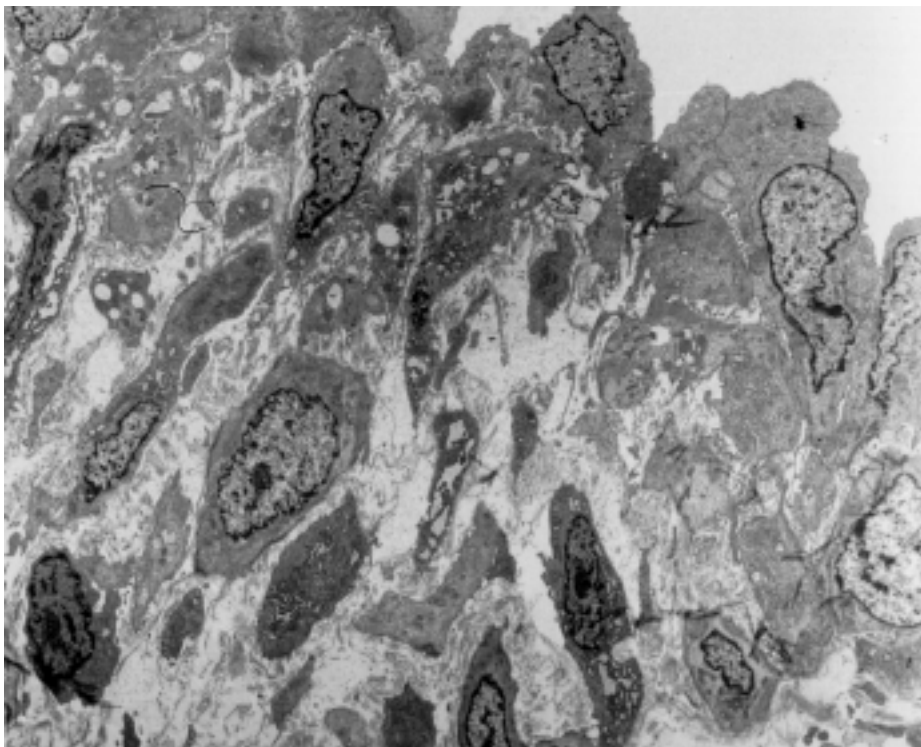


Abb. 38: "Remodeling" in der Wand eines wachsenden Kollateralgefäßes von einem diabetischen Hund. Auffallend sind das aktivierte Endothel, die zahlreichen Muskelzellen in der Neointima in unterschiedlichem Aktivierungszustand und das Vorkommen von reichlich Matrixmaterial.

### 3.3 Mastzellen

Die Mastzellen konnten in der Toluidin-Blau-Färbung klar identifiziert werden, da sich ihre spezifischen Granula deutlich und unverwechselbar darstellen. Im normalen Gewebe wurden nur selten Mastzellen gefunden. In den Präparaten der Kollateralgefäße wurden sie besonders zwischen Adventitia und Myokard gefunden, aber auch im Myokard selbst, weiter entfernt von der Adventitia. Im lockeren Bindegewebe lagen diese Zellen einzeln oder in Gruppen in der Umgebung großer aber auch kleinerer Blutgefäße. Häufig waren die Mastzellen degranuliert. Sie zeigten eine positive Reaktion für Histamin und Serotonin, zwei Überträgerstoffe, die spezifisch von Mastzellen freigesetzt werden. Die Anzahl der Mastzellen variierte stark (Tabelle 2).

Die Tabelle 2 auf Seite 42 zeigt, daß sich in den Präparaten der diabetischen Hunde mit 8-wöchiger Konstriktorimplantation deutlich mehr Mastzellen befanden als bei den 4 Wochen alten diabetischen Tieren und als bei der Vergleichsgruppe der stoffwechselgesunden Tiere.

Mastzellen sind dargestellt mit dem Lichtmikroskop (Abb. 39 und 40) und mit dem Elektronenmikroskop (Abb. 41-42). Die immunzytochemische Darstellung von Histamin (Abb. 43) und Serotonin (Abb. 44) zeigen, daß Spuren dieser Substanzen nachweisbar sind.

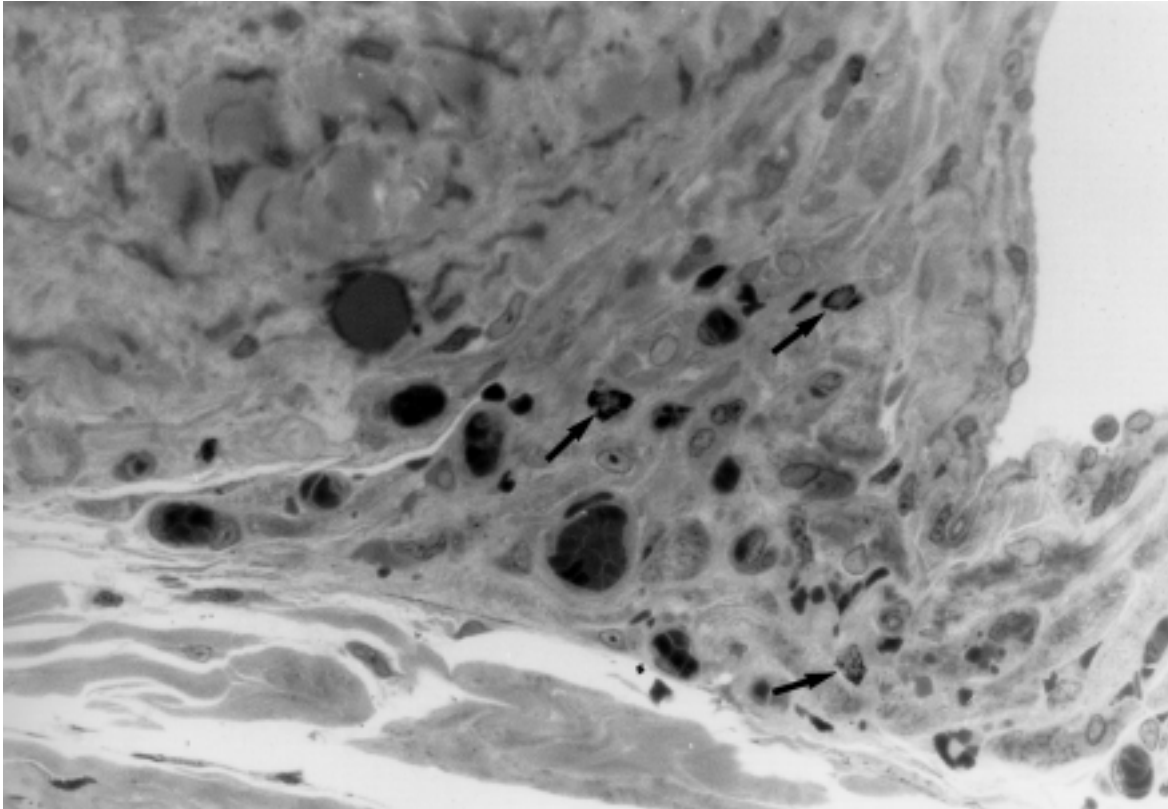


Abb. 39: Deutlich erkennbare Mastzellen in der Adventitia (Pfeile).

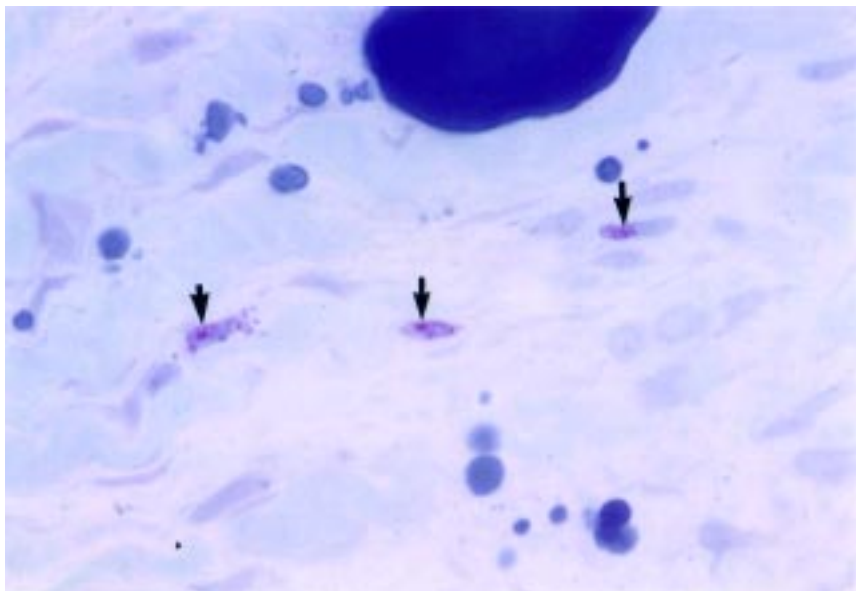


Abb. 40: Zahlreiche, auch degranulierende Mastzellen in der Adventitia (Pfeile).

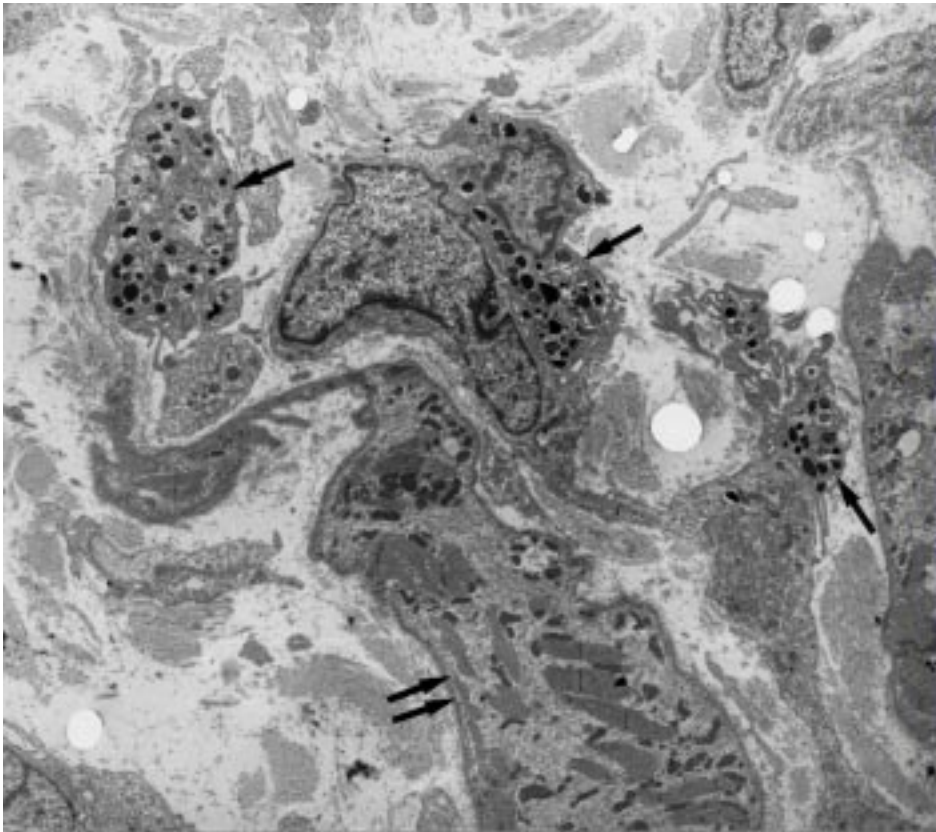


Abb 41: Drei verschiedene Mastzellen (Pfeile) liegen in der Adventitia und in der Nähe eines degenerierten Myozyten (Doppelpfeil).

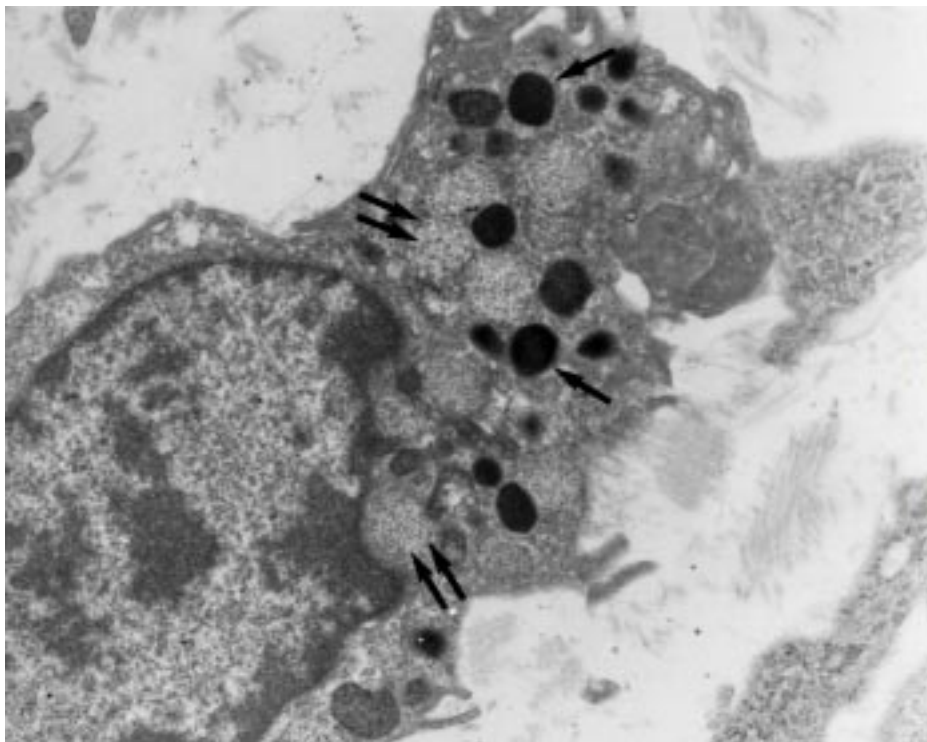


Abb. 42: Eine Mastzelle bei höherer Vergrößerung. Deutlich sind die noch intakten Granula (Pfeile) und die schon degranulierten Granula (Doppelpfeile).



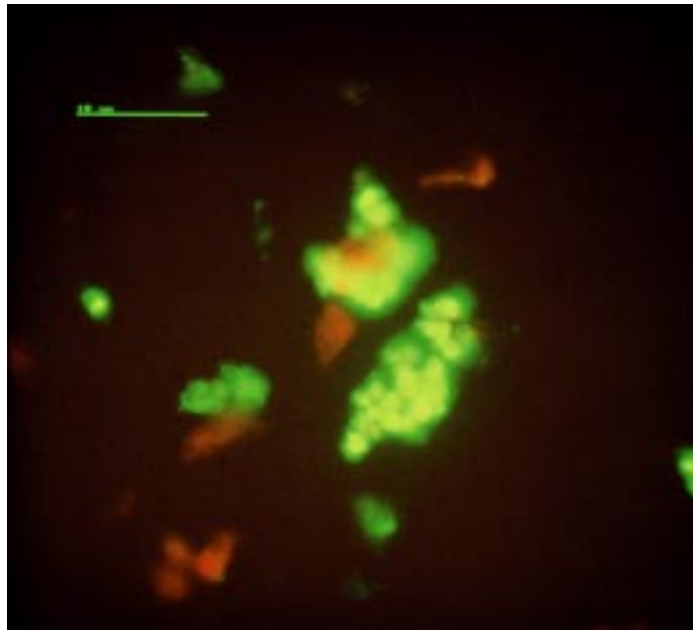


Abb. 43: Lokalisation von Histamin in mehreren Mastzellen der Adventitia eines wachsenden Kollateralgefäßes. Spezifische Fluoreszenz gelbgrün, Kerne rot.

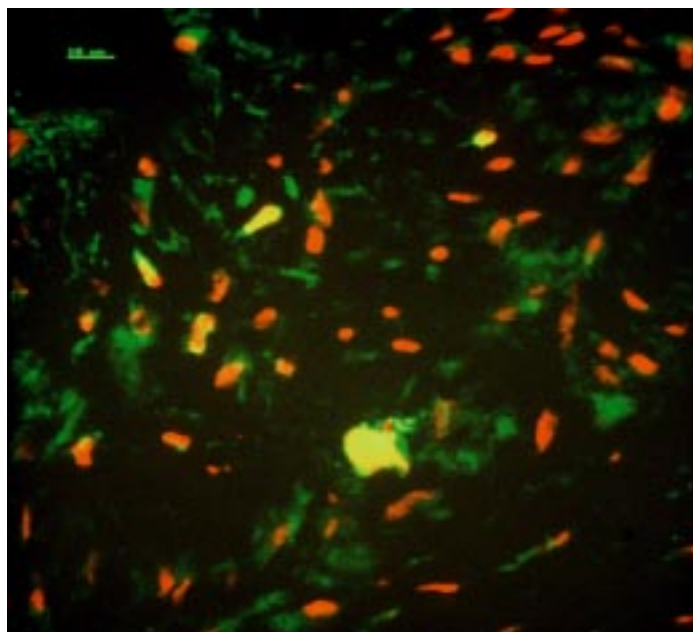


Abb. 44: Darstellung von Serotonin in einer Mastzelle der Adventitia. Spezifische Fluoreszenz grün, Kerne rot.

## Vorkommen von Mastzellen

Hund-Nr.	Wochen	Normales Kollateral- gefäß	Normales Myokard
6	4	2,8	0,3
10	4	4,0	4,5
12	4	10,2	3,7
1	8	2,6	3,8
2	8	2,5	4,5
2	8	7,1	4,1
9	8	7,5	3,5
Mittelwert:		5,2	3,4

Hund-Nr.	Wochen	Diab. Kollateral- gefäß	Diab. Myokard
4	4	4,6	4,8
8	4	13,0	11,2
11	4	11,7	8,5
2	8	11,5	16,3
3	8	8,0	8,2
4	8	7,0	6,8
5	8	17,2	16,3
Mittelwert:		10,4	10,3

### 3.3.1. Tabelle 2:

Quantitative Auswertung des Vorkommens von Mastzellen bei gesunden und Diabetischen Hunden. Die Zahlen bedeuten die Anzahl der Mastzellen gemittelt für alle Kollateralgefäße und für das Myokard eines Tieres.

### ***3.4. Immunzytochemie***

Alle Abbildungen für die Immunzytochemie und die dazugehörigen Legenden befinden sich im Anschluß an diesem Text.

Die Immunzytochemie erlaubt die Lokalisation von intra- und extrazellulären Proteinen, wie Laminin, Fibronectin, Desmin und Vimentin. Desmin und Vimentin gehören zu den zytoskelettären Proteinen. Wir führten diese Untersuchungen durch, um die Beteiligung dieser intra- und extrazellulären Proteine am Kollateralwachstum zu bestimmen.

#### ***3.4.1 Vimentin***

##### **Kontrollgefäße**

Vimentin war in den Endothelzellen und den Fibroblasten lokalisiert. Die Media zeigte gleichfalls eine leichte Markierung, die jedoch nicht so intensiv wie bei den Endothelzellen war. Die Fibroblasten der Adventitia war auch schwach angefärbt.

##### **Kollateralgefäße**

In den Kollateralgefäßen ist Vimentin in den glatten Muskelzellen der Intima und Media und in den Fibroblasten der Adventitia vertreten. Im Gegensatz zu den Kontrollgefäßen ist die Fluoreszenz für Vimentin in den glatten Muskelzellen der Intima sehr intensiv. Die Endothelzellen und die Fibroblasten sowie die glatten Muskelzellen der Media zeigten eine Fluoreszenzintensität, die derjenigen der normalen Gefäße entsprach. Da die normalen glatten Muskelzellen der Media in den Kontrollgefäßen nur eine leichte Fluoreszenz zeigten, ist die erhöhte Fluoreszenz in den intimalen glatten Muskelzellen als ein wichtiger Befund zu werten. Er zeigt, daß die Intimazellen durch die Expression embryonaler Proteine gekennzeichnet waren.

### ***3.4.2 Desmin***

#### **Kontrollgefäße**

In den normalen Blutgefäßen wurde kein Desmin im Endothel gefunden, aber die glatten Muskelzellen färbten sich intensiv, d.h. sie enthielten reichlich Desmin. Aber es gab auch Zellen, die keine Markierung zeigten. Deswegen war die Anfärbung nicht so gleichmäßig verteilt. Die Adventitia wies keine Anfärbung auf.

#### **Kollateralgefäße**

In den wachsenden Kollateralgefäßen erkannte man Desmin in den glatten Muskelzellen der Media, aber auch hier zeigte sich keine gleichmäßige und homogene Färbung, jedoch waren in der Intima nur wenige Zellen leicht gefärbt, die meisten dagegen waren negativ. Dieser Befund bestätigte die Annahme, daß in den glatten Muskelzellen der Intima eine Rekapitulation der Embryogenese stattfand. Die Adventitia wies keine markierten Zellen auf.

### ***3.4.3 Fibronektin***

#### **Kontrollgefäße**

Fibronektin befand sich mäßig in den normalen Gefäßen in der Basalmembran der Endothelzellen und der glatten Muskelzellen und in der extrazellulären Matrix, und es bildete eine homogene Matrix in der Adventitia, in die die übrigen zellulären und fibrillären Strukturen eingelagert waren. Die Myozyten und benachbarten Kapillaren wurden gleichfalls durch die Markierung ihrer Basalmembran mit Fibronektin markiert.



## **Kollateralgefäße**

In den Kollateralgefäßen wurde in allen Schichten reichlich Fibronectin gefunden. Besonders auffallend war die Lokalisation in der Neointima. In dieser war Fibronectin zwischen allen glatten Muskelzellen eingelagert, bei 8 Wochen in größerer Menge als bei 4 Wochen. Besonders auffallend war die Intensität der Fluoreszenz für Fibronectin bei den diabetischen Hunden. Die Adventitia war gleichfalls intensiv angefärbt.

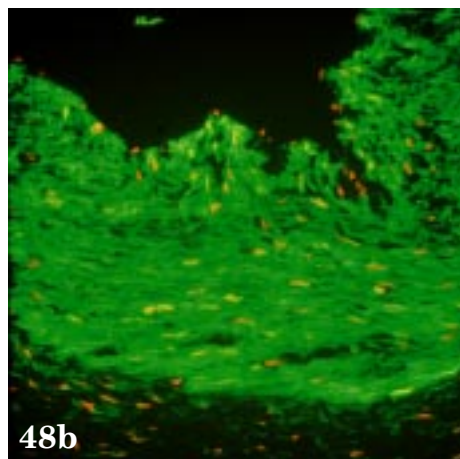
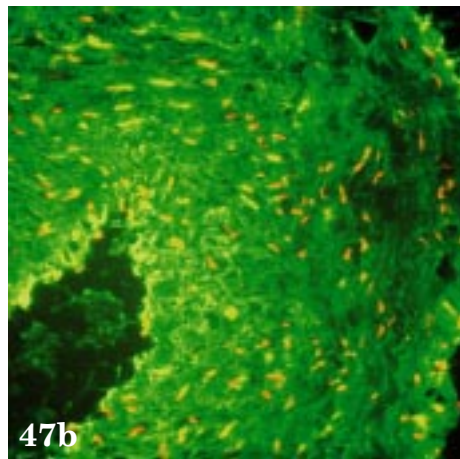
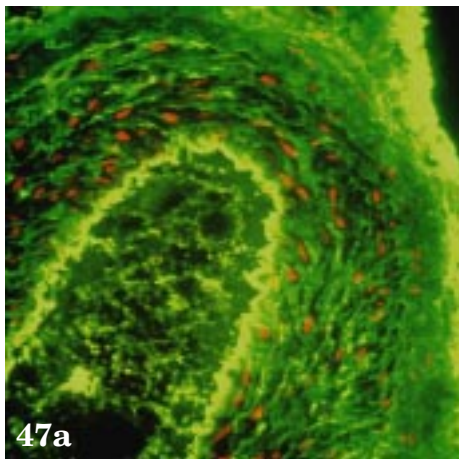
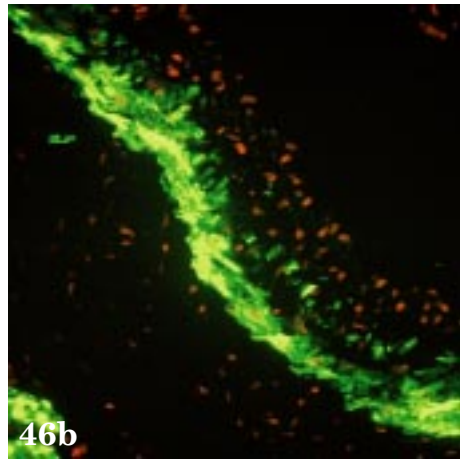
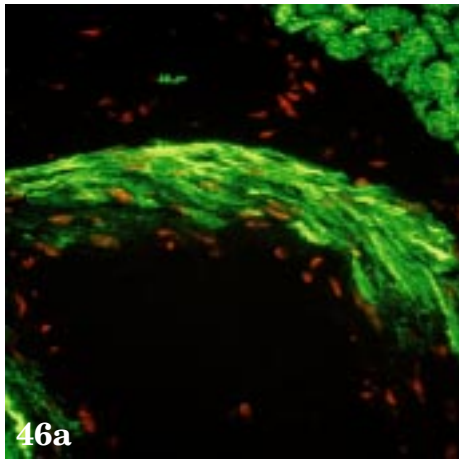
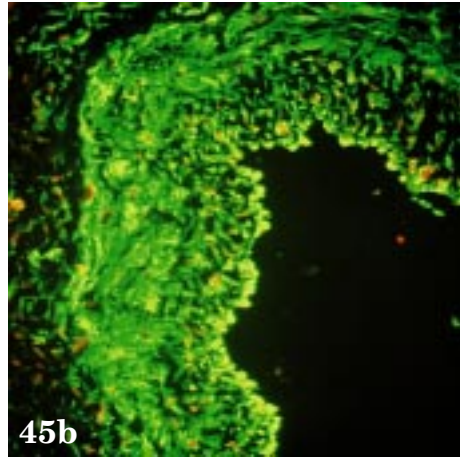
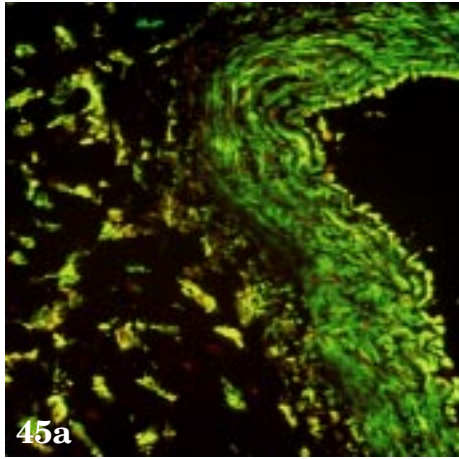
### ***3.4.4 Laminin***

## **Kontrollgefäße**

Laminin wurde in der Basalmembran der Endothelzellen und der glatten Muskelzellen, sowie des Kapillarendothels und der Myozyten gefunden. Die Adventitia wurde nur geringfügig angefärbt.

## **Kollateralgefäße**

In den Kollateralgefäße war Laminin vermehrt in der Basalmembran der glatten Muskelzellen der Intima, aber auch in deren Matrix zu finden. Die Media zeigte eine starke Lamininexpression im extrazellulären Raum. Bei der Adventitia konnten wir nur eine schwache Anfärbung nachweisen. Wie im Falle von Fibronectin, wurde mehr Laminin in den fortgeschrittenen Stadien der Intimabildung gefunden.



Legenden der Abbildungen 45-48.

Abb. 45: Färbung für Vimentin. a. Normales Gefäß mit mäßiger Markierung in Media und den Endothelzellen. Auf der linken Bildhälfte markierte Kapillarendothelien im Myokard. b. Wachsendes Gefäß mit starker markierung in der Neointima, Media und Adventitia.

Abb. 46: Färbung für Desmin. a. Normales Gefäß mit deutlicher Markierung der Media, jedoch sind das Endothel und die Adventitia negativ, das angrenzende Myokard positiv. b. In einer wachsenden Kollateralen ist nur die desorganisierte Media stark positiv, die Neointima ist, obwohl sie glatte Muskelzellen enthält, negativ.

Abb. 47: Färbung für Fibronektin. a. In einem normalen Gefäß ist die Media leicht positiv und die Adventitia enthält auch Fibronektin. Das Endothel ist stark angefärbt. Im Lumen des Gefäßes ist eine positive Färbung zu beobachten, vermutlich hervorgerufen durch Fibronektin aus dem Serum. b) In einem wachsenden Gefäß von einem diabetischen Hund befindet sich in allen Schichten eine große Menge Fibronektin.

Abb. 48: Färbung für Laminin. a. Normales Gefäß mit Färbung der glatten Muskelzellen der Media und der Myozyten und Kapillarendothelien des Myokards. b. In einem wachsenden Gefäß von einem diabetischen Hund befinden sich große Mengen Laminin in allen vaskulären Schichten.

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Entwicklung von Kollateralgefäßen mit morphologischen Methoden untersucht. Besonderes Interesse galt den ultrastrukturellen Besonderheiten im Aufbau der Gefäßwand während der unterschiedlichen Entwicklungsstadien, der Expression der Proteine aus der Gruppe der Intermediärfilamente Vimentin, Desmin und Fibronectin und Laminin und dem Vorkommen von Mastzellen. Die Befunde an wachsenden Kollateralgefäßen wurden mit denjenigen an normalen Koronararterien gleicher Größe verglichen. Diese Befunde wurden daraufhin mit denjenigen von diabetischen Hunden verglichen.

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Untersuchungen waren folgende: Während des Wachstums der Kollateralgefäße fand ein starker Umbauprozess in den Gefäßen statt, in welchen alle Schichten miteinbezogen waren. Eine signifikante zelluläre Proliferation war begleitet von der Degeneration einzelner glatter Muskelzellen, der Bildung einer Neointima und einer Fragmentierung der elastischen Membran. Es gab graduelle Unterschiede zwischen den Kollateralgefäßen im Stadium von 4 und 8 Wochen: im frühen Stadium gab es nur eine schmale Intima und eine leicht desorganisierte Media, und bei 8-9 Wochen war die Media stark desorganisiert und die Intima bedeutend breiter. Schließlich erfolgte eine Zunahme in der Wanddicke der Kollateralgefäße, und eine Verhinderung der Entstehung eines Infarktes durch erhöhte Durchblutung der "area at risk" <sup>7,16,17</sup>.

Die Unterschiede zwischen Kollateralgefäßen von stoffwechselgesunden und diabetischen Tieren waren qualitativ deutlich. Die Wandstruktur des wachsenden Gefäßes war weitgehend ähnlich, jedoch war die Ansammlung von extrazellulären Matrixproteinen, besonders von Fibronectin deutlich bei den diabetischen Tieren erhöht. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen bestand darin, daß in diabetischen Gefäßen die Intimaverdickung wesentlich stärker war, mehr

extrazelluläre Matrix angesammelt war und die Zahl der Mastzellen wesentlich höher war. Im folgenden Text werden die typischen strukturellen Eigenschaften von wachsenden Kollateralgefäße allgemein beschrieben, und zwischen stoffwechselgesunden und diabetischen Tieren werden Unterschiede besonders hervorgehoben werden.

#### ***4.1 Wachstum der Kollateralgefäße***

Kollateralgefäße werden im Verlauf einer relativ kurzen Zeit signifikant größer: die Wand verbreitert sich, und das Lumen wird weiter. Kollateralgefäße erhöhen ihren Durchmesser von 30-50 µm fast bis zum Zwanzigfachen ihres Ausgangsdurchmessers. Dieses Wachstum ist charakterisiert durch die Bildung einer Neointima, die Fragmentierung der internen Membrana elastica und das Auftreten von Mitosen in den verschiedenen Schichten des Gefäßes <sup>14 18 19</sup>. Der Wachstumsprozess beginnt ungefähr 2 Wochen nach Implantation des Konstriktors, er ist ausgesprochen aktiv nach 4-8 Wochen und nimmt dann wieder ab. Drei bis vier Monate nach Konstriktorimplantation ist das Wachstum beendet. In zahlreichen früheren Untersuchungen wurde festgestellt, daß die Schwellung des Ameroid, des Materials, das Flüssigkeit aufnimmt und den Gefäßverschluss hervorruft, ungefähr 10-15 Tage stattfinden muß, bis eine Okklusion wirklich stattfindet <sup>5</sup>. Es wurde früher bereits nachgewiesen, daß während des Entstehens der Stenose der Wachstumsprozess in Gang gesetzt wird und auf diese Art und Weise eine gewisse Restdurchblutung über die Kollateralgefäße immer gewährleistet ist. Bei normalen Hunden wurden in der subepikardialen Schicht kleine Kollateralgefäße gefunden, die den Arteriolen entsprechen. Diese können bei Bedarf proliferieren. Nur so läßt es sich erklären, daß in den hier untersuchten Herzen ein Myokardinfarkt nicht nachweisbar war obwohl der Konstriktor verschlossen war. Ein zeitliches Gleichgewicht zwischen der Geschwindigkeit des Verschlusses und der Stimulierung des Wachstums läßt sich aus diesen Fakten ableiten.

Dieser komplizierte Mechanismus beruht auf der Beteiligung verschiedener Zellarten und verschiedener Mediatoren<sup>20 9</sup>, d.h. die speziellen zellulären Funktionen wie Proliferation, Migration und die Produktion von extrazellulärer Matrix können durch verschiedene Faktoren vermittelt werden, wie (z.B. platelet-derived-growth-factor (PDGF), der von Thrombozyten und den glatten Muskelzellen synthetisiert wird. PDGF stimuliert die glatten Muskelzellen zur Migration, dadurch kommt es zur Expression von insulin-like growth-factor-1 (IGF-1) in den Muskelzellen. Diese Faktoren können die Zellen zur Proliferation anregen, d. h, sie wirken mitogen. Wenn PDGF und IGF-1 zusammenwirken, wird ihre Einfluss erheblich verstärkt <sup>21</sup>.

Angiotensin II fördert eine neointimale Proliferation nach einer Gefäßverletzung wie z.B. bei Ballondilatation der Koronararterien. Die Studien von Rakugi et al weisen darauf hin, daß Angiotensin-converting-enzyme-Hemmer (ACE- Hemmer) diesen Prozess reduzieren. Dies bedeutet, daß eine Hemmung von vaskulärem ACE möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Prevention von Restenosen nach PTCA spielt <sup>22,23</sup>.

Dagegen verursacht Endothelin-1 aus Zellen des Endothels oder den glatten Muskelzellen die Ausbildung von Restenosen nach PTCA <sup>24</sup>.

Ein weiterer Wachstumsfaktor, der in vielen Zellen gebildet und gespeichert wird und mitogen auf Endothelzellen und den glatten Muskelzellen wirkt, ist basic fibroblast-growth-factor (bFGF). Dieser gehört zur Familie der heparinbindenden Wachstumsfaktoren und ist in der extrazellulären Matrix zu finden <sup>25</sup>.

In einer Publikation wurde über die Mastzellen als eine bedeutende Quelle für basic fibroblast growth- factor berichtet, welcher eine wichtige Rolle für die Form und Gestaltung der Adventitia der wachsenden Kollateralen hat <sup>26</sup>.

Transforming-growth-factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ist im normalen Herz und in den Kollateralregionen vorhanden. TGF- $\beta$  beeinflusst die Zellproliferation <sup>16</sup>. Außerdem ist er ein wichtiger Regulator der Matrixproduktion. Er stimuliert die Produktion

von Proteoglycanen, Kollagenen und Fibronectin, und auch die Expression der entsprechender Rezeptoren wird von TGF- $\beta$  reguliert <sup>21,27</sup>.

Interleukin-I (alpha und beta) wird von Monozyten und Makrophagen produziert. Eine lokale Injektion von IL-1 steigert die vaskuläre Permeabilität und verursacht eine Leukozytenemigration <sup>28</sup>. In diesem Zusammenhang wurde bereits auch in einer Studie <sup>29</sup> darauf hingewiesen, daß Interleukin-I- $\beta$  die Expression von Adhäsionsmolekülen in den glatten Muskelzellen induziert, so daß Anlockung von Monozyten und Neutrophilen in die Kollateralgefäße ermöglicht.

Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) wird gleichfalls von Monozyten und Makrophagen produziert und spielt eine Rolle bei dem anfänglichen Entzündungsprozess. Er unterdrückt die Proliferation der Endothelzellen, steigert die Produktion von andere Zytokinen und stimuliert die Kollagenproduktion der Fibroblasten <sup>30</sup>.

Außer diesen Mediatoren und Wachstumsfaktoren, die alle auf irgendeine Weise bei der Ausbildung der Neointima beteiligt sind, wird auch der extrazellulären Matrix eine große Bedeutung zugeschrieben. Die extrazelluläre Matrix umgibt die glatten Muskelzellen. Dabei spielen die Integrine, Proteine, die in der Zellmembran der glatten Muskelzellen vorhanden und für die Verankerung von extrazellulärer Matrix an der Zellmembran zuständig sind, eine wichtige Rolle <sup>31</sup>.

Das Wachstum der Kollateralen erfolgt durch Mitosen von Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Zellen der Adventitia, besonders von Fibroblasten. Ausgelöst wird der Wachstumsprozess durch die Erhöhung der Scherkräfte in dem plötzlich durch den Verschluss einer Koronararterie überlasteten Kollateralgefäß. Diese tangentialen Scherkräfte sind Auslöser für die Aufregulierung der Adhäsionsmoleküle in den Endothelzellen, die die Adhäsion von Leukozyten am Endothel bewirken <sup>17</sup>. Das wachsende Gefäß ist also in der Anfangsphase des Wachstums einem konstanten mechanischen Reiz ausgesetzt, der auch eine Entzündungsreaktion in der Adventitia auslösen kann. So erklärt sich das vermehrte Vorkommen von Leukozyten in der Gefäßwand und in der Adventitia



und das Vorkommen von Mastzellen. Diese bewirken eine weitere Stimulation des Entzündungsprozesses durch Freisetzung von Histamin. Dieser Vorgang wird erst beendet sein, wenn die Gefäße größer geworden sind, wenn die Wand an Volumen zugenommen hat und dadurch die Scherkräfte wieder abnehmen.

Bei diabetischen Hunden waren diese Verhältnisse noch deutlicher ausgeprägt, auch die Anzahl der Mastzellen war höher in der Adventitia. Dieser Zustand ist eventuell vergleichbar mit dem Wachstum der glatten Muskelzellen bei Hypertonie und Diabetes mellitus beim Menschen oder experimentellen Tieren <sup>20,32</sup>.

#### ***4.2 Die Neointima und Media***

Wie bereits einleitend gesagt wurde, ist eines der auffallendsten Charakteristika des Kollateralwachstums das Auftreten einer Neointima, wodurch die Gefäßwand an Dicke zunimmt, das Lumen aber nicht verschlossen wird, was sich auch im Verlauf unserer Untersuchungen bestätigt hat <sup>9,33</sup>. Wir haben in der Neointima 2 bis 6 Zellschichten gesehen. Die Neointima bestand aus einer immer breiter werdenden Schicht aus extrazellulärer Matrix mit glatten Muskelzellen, die unregelmäßig angeordnet waren, und die keinen regelmäßigen Verlauf aufwiesen. Sie waren außerdem kleiner als die glatten Muskelzellen der Media. Die Media selbst verlor ihren regulären Aufbau und bestand in vielen Kollateralgefäßen nur noch aus einigen zirkulär angeordneten und vielen zum Lumen des Gefäßes hingewendeten Muskelzellen. Diese waren typischerweise größer als die Zellen der Neointima.

Mitosen wurden hauptsächlich in der Neointima gefunden, aber nicht in der Media. Diese Beobachtung spricht dafür, daß die glatten Muskelzellen aus der Media in die Intima auswandern, migrieren, und sich dort erst teilen, diese Befunde wurden von anderen Autoren auch bestätigt <sup>34</sup>. Ob alle Zellen der Media zuerst migrieren und dann proliferieren oder ob sie zuerst proliferieren und dann migrieren, wurde in zahlreichen Studien untersucht. Clowes und Schwartz haben in ihrer Studie

festgestellt, daß die Hälfte der proliferierenden Zellen in der Neointima vor der Proliferation aus der Media wandern. M. M. Kockx<sup>35</sup> hat nachgewiesen, daß die glatten Muskelzellen in der Media zuerst proliferieren und dann in die Intima migrieren. Unter diesen Umständen und der Tatsache, daß der Zeitpunkt der Proliferation nicht immer beweisbar ist, vermutet man, daß die glatten Muskelzellen der Media auf unterschiedliche Art und Weise mit Proliferation und Migration antworten. In einer Studie, die bei Gefäßen des Hundeherzens durchgeführt wurde, haben diese Autoren außerdem verschiedene Typen von glatten Muskelzellen festgestellt, von welchen nur einige die Fähigkeit zur Proliferation haben<sup>36</sup>. In unseren Untersuchungen haben wir die Proliferation hauptsächlich in der Neointima beobachtet, so daß wir davon ausgehen können, daß die glatten Muskelzellen zuerst migrierten und dann proliferierten. Deshalb zeigte die Media in vielen Gefäßen einen unregelmäßigen Aufbau, die Zellen waren zum Lumen hin orientiert, und die Anzahl der Muskelzellen war reduziert.

Die Migration der Muskelzellen wird durch extrazelluläre Matrixproteine gefördert. Nach einer anfänglichen Entzündungsphase, die durch Infiltration von entzündungshemmenden Zellen in die Intima gekennzeichnet ist, kommt die Proliferationsphase, die mit einer Auflösung der extrazellulären Matrix einhergeht. Die Auflösung geschieht durch die von den glatten Muskelzellen sezernierten Matrixmetalloproteinasen<sup>8</sup>. Die extrazelluläre Matrix der Gefäßwand ist eine Komponente, die für die mechanische Stabilität der Zelle sorgt. Die Interaktion der Zellen, Differenzierung, die Proliferation und die Migration geschehen unter ihrem Einfluss<sup>37</sup>, und die extrazelluläre Matrixproteine spielen bei der Ausbildung einer Neointima eine bedeutende Rolle.

Die extrazelluläre Matrix, die die glatten Muskelzellen umgibt, löst sich bei der Entstehung der Neointima auf. Dadurch wurden die glatten Muskelzellen angeregt, Matrixproteine zu synthetisieren, und es kam wiederum zur Stimulation der glatten Muskelzellen, die daraufhin proliferierten<sup>38</sup>. Libby et al. schlugen ein "Kaskaden-Modell" vor. Durch jegliche Form von Gefäßwandschädigung wurden in

Makrophagen und glatten Muskelzellen Zytokine und Wachstumsfaktoren produziert, die eine Antwort der Muskelzellen im Bezug auf DNA-Synthese, Migration und Bildung von Matrixproteinen zur Folge hat <sup>39</sup>. Die Migration ist erst möglich nach Auflösung der Basalmembran, mit der die Zellen über die Integrine an den extrazellulären Proteinen verankert sind <sup>40</sup>. Die Integrine stellen die Verbindung zwischen intrazellulären Strukturen (Zytoskelett der Zelle) und extrazellulären Matrixproteinen dar. Die Integrine sind für die Zellstabilität sehr wichtig. Die Integrine sind in ihrem Aufbau sehr vielfältig und bestehen aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten, deshalb haben sie auch unterschiedliche Funktionen <sup>41</sup>.  $\beta$ 1-Integrine können die Adhäsion von glatten Muskelzellen über Fibronectin (Matrixprotein) und Laminin (Bestandteil der Basalmembran) fördern, und  $\beta$ 3-Integrine spielen bei der Migration der glatten Muskelzellen eine Rolle <sup>42</sup>. Elektronenmikroskopisch wurde häufig beobachtet, daß die Basalmembran der glatten Muskelzellen teilweise oder völlig fehlte, weil die Basalmembran durch migrierende glatte Muskelzellen unter der Mitwirkung einer Metalloproteinase (Typ IV Collagenase) aufgelöst wurde. Jedoch können nur die Zellen migrieren, die vom synthetischen Phänotyp sind <sup>43</sup>. Die Zellen der Intima wiesen wesentlich zahlreichere Zellorganellen wie Mitochondrien, rauhes endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparate auf, während die Myofilamente weitgehend fehlten und werden in Übereinstimmung mit Glukhova <sup>44</sup> als Zellen vom "synthetischen Phänotyp" bezeichnet. Ein weiteres Merkmal ist die longitudinale Anordnung dieser Muskelzellen im Gegensatz zu den zirkulär verlaufenden normalen glatten Muskelzellen <sup>45</sup>. Dies wird durch unsere Ergebnisse bestätigt. Die Syntheserate für Proteine ist in den Zellen vom "synthetischen Phänotyp" stark erhöht <sup>46,47</sup>. Unterschiedliche Proteine müssen in diesen Zellen wieder synthetisiert werden, ehe diese glatten Muskelzellen als normale Zellen vom "kontraktilen Phänotyp" zur Kontraktion des Gefäßes beitragen können.

### ***4.3 Desmin und Vimentin***

Die akute Wachstumsphase der Kollateralen ist durch Wachstum und Mitose der individuellen glatten Muskelzellen in der Intima gekennzeichnet. Die Muskelzellen der Intima zeigen einen Mangel an Desmin und statt dessen eine starke Expression von Vimentin was ein weiterer Hinweis auf die Tatsache ist, daß die Muskelzellen einen proliferativen Phänotyp darstellen <sup>46</sup>. In Gefäßen im weiter fortgeschrittenen Wachstumsstadium ist das Desmin jedoch wieder vorhanden, und das Vimentin nimmt mengenmäßig ab. Diese Situation entspricht den normalen Gefäßen und spricht für eine Beendigung des Wachstums.

Desmin und Vimentin gehören zur Familie der "intermediate filaments", der Intermediärfilamente mit einem Durchmesser von 12-15 nm und sie sind, zusammen mit Tubulin, die Hauptbestandteile des Zytoskeletts in Muskel- und Mesenchymalzellen. Das Molekulargewicht von Desmin beträgt 55 KD, und das Molekül besteht aus drei Domänen <sup>48</sup>. Beide Filamentarten, Desmin und Vimentin, werden in embryonalen Zellen exprimiert, aber in reifen glatten Muskelzellen kommt hauptsächlich Desmin und nur wenig Vimentin vor <sup>49-53</sup>. Desmin und Vimentin kommen meistens als Homopolymerproteine vor, aber es könnte sein, daß die beide auch in einem Filament vorkommen <sup>54</sup>. In quergestreiften Skelett- und in Herzmuskelzellen ist nur Desmin zu finden aber kein Vimentin, jedoch ist Vimentin spezifisch für Endothelzellen, Fibroblasten und Fibrozyten <sup>55,56</sup>. Das Expressionsmuster von Desmin und Vimentin bei wachsenden Kollateralen weist auf eine Rekapitulation der Ontogenese im Verlauf der Entwicklung der glatten Muskelzellen hin.

Eine Reduktion von Desmin und Vermehrung von Vimentin fand in "intimal cushions" während des Verschlusses des Ductus arteriosus statt <sup>57</sup>. Eine Reduktion von Desmin ist bereits in den Muskelzellen in Kultur vorhanden <sup>58</sup>.

Vimentin trägt als Komponente des Zytoskeletts wesentlich zur Stabilität der Zelle bei <sup>59</sup>, jedoch ist seine Funktion noch nicht eindeutig geklärt. Die Zellen der

Adventitia der normalen Blutgefäße (inklusive der kleinen Blutgefäße, Endothelzellen und Fibroblasten) enthalten Vimentin. In den Kollateralgefäßen tritt Vimentin in der Media auf. Diese Ergebnisse unterscheiden sich wesentlich von den Befunden in den Koronarien. Vielleicht ist diese Synthese von Vimentin ein Hinweis auf eine zelluläre Komponente entweder in den unreifen Muskelzellen der Media und Subintima, oder in den modifizierten glatten Muskelzellen, die mehr zu den Fibroblasten gehören, als zu den glatten Muskelzellen.

Ein Anstieg von Vimentin und eine Abnahme von Desmin in den glatten Muskelzellen der Portalvenen von Ratten mit steigender Drucküberlastung im linken und rechten Ventrikel wurde berichtet <sup>60,61</sup>. Das gleicht unseren Resultaten vom Wiederauftreten von Vimentin in der Media unter pathologischen Bedingungen. Da die glatten Muskelzellen in Kultur fähig sind, Vimentin zu produzieren, und vaskuläre glatte Muskelzellen Desmin und Vimentin in unterschiedlichen Konzentrationen <sup>52,62</sup> produzieren, vermuten wir, daß die Anwesenheit von Vimentin in den glatten Muskelzellen bei den wachsenden Kollateralgefäßen ein Hinweis auf einen programmierten Prozess ist, der nach der Embryogenese abgeschaltet wurde aber je nach Bedarf wieder aktiviert werden kann.

Vermehrtes Vimentin ist vielleicht eine Antwort auf die mechanische Beanspruchung der Muskelzellen der Gefäße. Wachsende Kollateralen werden besonders im Anfangsstadium des Wachstums extrem gedehnt, eine Entlastung tritt erst später mit einer Dickenzunahme des Gefäßes auf. Es wäre auch möglich, daß Vimentin ein funktionelles Signal zur Vermittlung zwischen der Zellmembran und dem Nukleus darstellt. Weitere, besonders *in vitro* Untersuchungen, sind zur Klärung dieser Frage erforderlich.

Wie schon erwähnt wurde, gehört Desmin zu den Intermediärfilamenten und tritt im Muskelgewebe und in vaskulären glatten Muskelzellen auf <sup>63-66</sup>. Die relative Konzentration von Vimentin und Desmin verändert sich im glatten Muskelgewebe <sup>50,60,67</sup> aber in den Koronararterien färbt sich Desmin stark in der Media an.

Die Funktion des Desmins gleicht der des Vimentins, sie besteht in der Vermittlung von Signalen zwischen der Zellmembran und dem Nukleus <sup>59,68</sup> und in der Stabilisierung der Muskelzellen. Es gibt Untersuchungen, die auf Interaktionen zwischen desminhaltigen Filamenten und den Zellkernen und vielleicht auch Mitochondrien in den glatten Muskelzellen hinweisen <sup>69</sup>. In den normalen Blutgefäßen findet man kein Desmin im Endothel, die glatten Muskelzellen färben sich jedoch intensiv an. In den wachsenden Kollateralgefäßen erkennt man Desmin in der Media d.h. in reifen glatten Muskelzellen, aber im Intimalraum sind nur wenige Zellen positiv für Desmin.

Desmin tritt in allen Z- Streifen der Myozyten und der Glanzstreifen auf <sup>70</sup>. Deshalb zeigte Desmin auch sehr deutlich die Veränderungen der Myozyten in der Nähe der Adventitia. Die Myozyten erschienen klein und degeneriert. Dieser Befund wird durch ultrastrukturelle Beobachtungen bestätigt. Es wird angenommen, daß die Myozyten im Verlauf des Gefäßwachstums beschädigt werden, daß es sich sozusagen um einen "raumfordernden " Prozess handelt. Die Pathologie dieser Myozyten ist begleitet von einer Entzündungsreaktion, gefolgt von einem Reparaturprozess, der zu einer Zunahme der Breite der Adventitia und ihrer zellulären und ihrer Matrixbestandteile führt <sup>71</sup>.

#### ***4.4 Fibronektin und Laminin***

Die Matrix der Neointima besteht aus den glatten Muskelzellen, die wesentlich kleiner als die Muskelzellen der Media sind, und in vermehrte Matrix und Kollagenfasern eingelagert sind. Laminin ist mengenmäßig das wichtigste Protein der Basalmembran <sup>72,73</sup>. Laminin spielt strukturell und biologisch eine aktive Rolle <sup>74</sup>. Im Gegensatz zu Fibronektin, das überall in der extrazellulären Matrix vorhanden ist und eine Matrix für zelluläre und fibrilläre Komponenten im Interstitium bildet <sup>75,76</sup>, ist Laminin auf die Basalmembran von Endothelzellen, Myozyten und den glatten Muskelzellen beschränkt <sup>74,77,78</sup>.

In vivo wurde die Rolle von Fibronektin bei der Angiogenese erstmalig bei der Wundheilung geklärt <sup>79,80</sup>. Clark et al <sup>81</sup> haben festgestellt, daß Endothelzellproliferation von erhöhten Fibronektinsynthese in der Umgebung des Gefäßes begleitet ist. Die Kapillarendothelzellen beinhalten mRNA für Fibronektin, <sup>82</sup> und während der normalen Entwicklung kann dieses Protein in großen Mengen produziert werden <sup>83</sup>. Die Bedeutung von Fibronektin für das Zellwachstum wurde von Orly und Sato beschrieben <sup>84</sup>. Bei Untersuchungen, die an Follikularzellen bei der Ratten gemacht worden sind, waren ohne Fibronektin viele zweikernige Zellen zu sehen. Nach Fibronektinzugabe wurden das Zellwachstum und die Mitose gefördert, d.h. die Anzahl von den zweikernigen Zellen wurde verringert.

Es wurde auch beschrieben, daß Fibronektin an der Migration von den glatten Muskelzellen in die Intimalen Kissen im Ductus arteriosus beteiligt ist <sup>85</sup>.

Fibronektin und Laminin sind Proteine der extrazellulären Matrix, und beide sind auch Bestandteile der Basalmembran von glatten Muskelzellen und Endothelzellen. Fibronektin ist außerdem ubiquitär in der Matrix, in die strukturelle Proteine wie die Kollagene eingebettet sind, vorhanden. Aus in vitro Versuchen ist bekannt, daß Fibronektin Adhäsion und Migration von Zellen bewirkt <sup>86</sup> und daß es eine Rolle bei der Blutkoagulation und Wundheilung spielt <sup>75 79 80</sup>. Ähnlich ist die Funktion von Laminin, so daß beide Proteine eine bedeutende Rolle für die Regulierung des zellulären funktionellen Verhaltens spielen.

Die Basalmembran wird im Verlauf des Kollateralwachstums durch Metalloproteinasen abgebaut <sup>8</sup>, wodurch die Adhäsion der Zellen weitgehend aufgehoben ist und eine größere Beweglichkeit der Zellen ermöglicht wird. Die Migration von glatten Muskelzellen aus der Media in die Intima ist auf diese Weise möglich. Des weiteren besitzt die extrazelluläre Matrix der wachsenden Gefäße zu Beginn des Wachstums kaum Kollagene, am Ende des Reifungsstadiums sind diese jedoch in größerer Menge vorhanden. Vermutlich werden auch die schon vorhandenen Kollagenfibrillen zu Beginn des Wachstums abgebaut, und auf diese



Art wird die Matrix zu einer Substanz, in der die glatten Muskelzellen leicht migrieren können. Kollagene sollen das Wachstum von Gefäßen hemmen, und so ist das vermehrte Vorkommen von Kollagenen im reifen Gefäß mit zwei Faktoren zu erklären: Beendigung des Wachstumsprozesses und Erhöhung der Stabilität der Gefäßwand. In reifen Kollateralgefäßen ist die Basalmembran um die glatten Muskelzellen wieder intakt, ein weiterer Hinweis auf die Beendigung des Wachstumsprozesses.

Die Interaktionen zwischen Fibronektin und Kollagen <sup>87,88</sup> und ihre Rolle bei der Wundheilung nach den myokardialen Verletzungen ist bereits von verschiedenen Studien bekannt <sup>89-93</sup>. Auf die Bedeutung von Fibronektin für die Kollagenablagerung haben Kleinmann <sup>94,95</sup> und McDonald <sup>96,97</sup> hingewiesen. Das stimmt mit der unseren Beobachtungen überein.

Es ist interessant zu beobachten, daß sowohl die Bildung einer Neointima, mit anfänglich erhöhter und später erniedrigter Dichte von glatten Muskelzellen mit veränderter Proteinexpression als auch eine vermehrte Bildung extrazellulärer Matrix, wie sie in Kollateralgefäßen beobachtet wird, auch in Gefäßen mit frühen Stadien der Arteriosklerose oder bei restenosierten Gefäßen nach Ballondilatation beobachtet wird <sup>98</sup>. Die vaskuläre glatte Muskulatur proliferiert in der Media, und die Muskelzellen wandern in die Intima und in den Subendothelialraum ein. Für die Entwicklung von Gefäßerkrankungen jeglicher Art ist ein Ungleichgewicht zwischen dem Wachstum fördernden und hemmenden Faktoren verantwortlich.

Anscheinend verfügt ein Gefäß mit seinen drei Schichten nur über ein begrenztes Repertoire in seiner Reaktionsfähigkeit auf Stimuli, Noxen oder mechanische Beschädigung und wird immer ähnlich reagieren. Im Gegensatz zu den Modellen mit vaskulärer Beschädigung wie z.B. bei Ballondilatation, hört jedoch der Wachstumsprozess 8 Wochen nach Konstriktorimplantation bei den Kollateralen auf, und das Gefäß ist nicht verschlossen, sondern größer geworden.

#### ***4.5 Rolle der Ischämie***

Durch die langsam entstehende Stenose einer Koronararterie entsteht eine Sauerstoffunterversorgung im davon abhängigen Gewebe, eine Ischämie in der "area at risk"<sup>7</sup>. Diese Situation führt zu einer maximalen Vasodilatation, die den Druckgradienten über kleine präexistierende Kollateralverbindungen zwischen der linken absteigenden Koronararterie und dem stenosierten Ramus circumflexus um ein Mehrfaches erhöht und eine Zunahme des Flusses über diese Verbindungen und damit eine erhöhte Perfusion bewirkt. Wie bereits diskutiert, vergrößert der erhöhte "Flow" in den Kollateralen den "shear stress" in den Gefäßen, was zur Expression von Adhäsionsmolekülen und zur Anhaftung von Monozyten führt. Diese enthalten zahlreiche Wachstumsfaktoren. Durch diese hämodynamischen Veränderungen wird das Wachstum der Kollateralgefäße stimuliert, die Gefäßwände verbreitern sich, und das Lumen wird größer<sup>5,17-19</sup>. Besteht ein Gleichgewicht zwischen der Verschlussrate des Ramus circumflexus und der Wachstumsgeschwindigkeit der Kollateralarterie, so kann die Unterperfusion des betroffenen Myokardareals kompensiert werden, d.h. es wird die Entstehung eines Infarktes verhindert.

Ischämie einer gewissen Stärke entsteht nur im subendokardialen Gebiet des minderperfundierten Myokards, nicht jedoch an dem Ort des Gefäßwachstums, d.h. an der epikardialen Oberfläche, so daß Ischämie als direkter Stimulus für das Kollateralwachstum ausgeschlossen werden kann.

#### ***4.6 Mastzellen***

Vor 100 Jahren beschrieb Paul Ehrlich erstmals die Mastzellen. Ihre Rolle im Myokard ist immer noch nicht klar. Jedoch nimmt man an, daß sie eine wichtige Rolle bei der Proliferation der neuen Gefäßen spielen<sup>99</sup>.

Die Mastzellen werden meist mit den basophilen Granulozyten zusammen erwähnt, weil die beide in ihrer Struktur und Funktion sehr ähnlich sind, obwohl die

Mastzellen sich im Bindegewebe des gesamten Körpers und die Basophilen nur im Blut befinden.

Beide sind in der Lage, bei der Degranulation Histamin und andere Mediatoren freizusetzen, und zwar in einer Menge, die in wenigen Minuten zum Tode führen kann <sup>28</sup>.

Es ist noch nicht ganz geklärt, welche Herkunft der Gewebsmastzellen haben. Es wird vermutet, daß sie von bisher noch nicht klassifizierten Stammzellen aus dem Knochenmark abzuleiten sind, die in der Frühphase der Entwicklung aus dem Gefäßsystem in das perivaskuläre Bindegewebe einwandern und hier eine Zellreifung durchmachen <sup>100</sup>.

Die Mastzellen sind durch zahlreiche metachromatische Granula im Zytoplasma gekennzeichnet. Diese Granula haben eine charakteristische Ultrastruktur mit dichten und kontrastreichen granulären Anteilen und rollenartig geschichteten lamellären Strukturen. Das Zytoplasma enthält neben endoplasmatischem Retikulum, einzelne Mitochondrien, einen Golgi-Apparat, Zentralkörperchen sowie Mikrofilamente und Mikrotubuli.

Der Zellkern ist in der Regel oval und liegt exzentrisch. Die Mastzellen haben wahrscheinlich auch in ausgereiftem Zustand eine gewisse Motilität, durch die sie in der Lage sind, Epithelien wie das Bronchialepithel zu durchwandern und in Lumina auszutreten. Die Hauptaufgabe der Mastzellen ist die Produktion von Mediatoren, die entzündliche Reaktionen steuern <sup>100</sup>.

Die Mastzellen degranulieren, und die Granula setzen im Gewebe ihre vasoaktiven Substanzen frei. Diese Reaktion kann nur stattfinden, wenn die IgE, die von aktivierten B-Lymphozyten ausgeschieden werden, an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche von in Geweben eingewanderten Mastzellen und von im Blut zirkulierenden basophilen Leukozyten binden. Die derartig gebundenen IgE - Moleküle wiederum dienen als Rezeptoren für das Antigen (Allergen): Antigen -

Bindung stimuliert die Zellen dazu, massiv eine ganze Palette von biologisch aktiven Aminen, besonders Histamin und bei einigen Arten auch Serotonin durch Exocytose auszustoßen <sup>101</sup>.

Die Schutzfunktion der Amine und damit der gesamten IgE - Antwort ist weniger offensichtlich, man nimmt aber an, daß sie daran beteiligt sein könnte, weiße Blutzellen, Antikörper und Komplement-Komponenten den Weg zu und in Infektionsherde im Gewebe zu bahnen.

Die typische Degranulation ist vermutlich ein immunologischer Mechanismus, welcher zu einer anaphylaktische Reaktion führen kann <sup>28</sup>.

Außer Histamin und Serotonin sezernieren die Mastzellen auch andere Mediatoren, wie platelet activating factor (PAF) und verschiedene Zytokine, z.B. den tumor necrosis factor alpha <sup>28</sup>. Die Mastzellen aktivieren außerdem Phospholipide der Zellmembran, die Leukotriene, und Prostaglandin, sowie PAF <sup>102</sup>.

Die Mastzellen aktivieren weiterhin Metalloproteinasen und Stromelysin <sup>103</sup> sowie Trypsin <sup>104</sup>. Dies bewirkt eine Auflösung der extrazellulären Matrix, und ermöglicht die Penetration von Fibroblasten und Makrophagen in das entzündliche Gewebe. Die Mastzellen spielen eine bedeutende Rolle für den entzündlichen Prozess, der in der Adventitia stattfindet und notwendig für das Wachstum ist <sup>105</sup>, <sup>106</sup>. Außerdem sind sie eine wichtige Quelle für basic-fibroblast-growth-factor (bFGF), der für das "remodeling" der wachsenden Kollateralen bedeutsam ist <sup>26</sup>.

Die Mastzellen sind bei der Angiogenese bei verschiedenen Formen der Gefäßverletzungen beteiligt <sup>107</sup>. Die jetzige Studie ist jedoch die erste Beschreibung der Rolle der Mastzellen in der Vaskulogenese.

Mastzellen beinhalten das Antikoagulant Heparin, an das Histamin und Serotonin gebunden sind <sup>28</sup>.

Bei der Entstehung eines neuen Gefäßes können zwar alle diese Substanzen potentiell eine Mitwirkung haben, aber es wird vermutet, daß Heparin eine

wichtigere Rolle dabei spielt. Dies erkannte man erst bei einer Blockade der Heparinfreisetzung<sup>108,109</sup>.

Heparin ist der zuerst beschriebene Hemmer des vaskulären Muskelzellwachstums, aber bis jetzt ist nicht bewiesen, ob es eine effektive Prävention für die intimale Hyperplasie darstellt. Heparin ist eine heterogene Substanz, die aus einer Mischung verschiedener Komponenten zusammengesetzt ist, die unterschiedliche antiproliferative Aktivitäten zeigen. Diese Unterschiede sind ausgeprägter bei höheren Dosierungen. Weiterhin hat man festgestellt, dass eine zum Teil verringerte Sensivität für den Wachstumsinhibitor Heparin bei Patienten mit Restenose oder schwere Arteriosklerose vorlag<sup>110</sup>.

Heparin hat einen Antithrombineffekt, und Thrombin stimuliert die Aktivierung von Platelet, und Platelet-derived growth factor. Diese stimuliert die Migration und die Proliferation von glatten Muskelzellen<sup>100</sup>.

Es gibt zwei Mastzelltypen: eine mit den dichteren und größeren Granula, den TC-Typ, die für Tryptase und Chymase positiv sind. Diese sind Haut und Bindegewebsmastzellen<sup>28</sup>.

Die anderen sind Mastzellen der Lunge und aus der Mucosa, die kleinere und weniger Granula und weniger Histamin enthalten, sie sind mobiler und haben eine kürzere Lebensdauer, und sind als T-Typ bekannt d. h. Tryptase positiv<sup>28</sup>.

Die Mastzellen in unseren Untersuchungen gehören zum TC-Typ. Die Funktion der Mastzellen ist allerdings immer noch nicht ganz geklärt. Möglicherweise sind sie die Antwort auf eine akute Infektion, eine Funktion, für die sie perfekt ausgestattet sind.

Bei unseren Untersuchungen haben wir festgestellt, daß die Adventitia verbreitert war und Entzündungsreaktionen zeigte. Viele Fibroblasten befanden sich im Zustand der Apoptose, andere waren in Mitose. Die Mastzellenanzahl war bei 8-

wöchig okkludierten Hunden größer, als bei den 4-wöchig okkludierten, bei den diabetischen Hunden war ihre Anzahl noch Höher.

Im Rahmen unsere Beobachtungen kam es in einigen Fällen vor, daß auch 4 Wochen nach Konstriktorimplantation die Mastzellen vermehrt auftauchten. Wir vermuten, daß dies eine Folge des Wachstumsprozesses des Gefäßes ist und daß dieser individuell unterschiedlich ablaufen kann.

#### 4.6.1. Histamin

Histamin gehört zu den vasoaktiven Aminen und wird in den Granula der Mastzellen und Basophilen gespeichert. Histamin ist in fast allen Geweben vorhanden und ist einer der ersten Mediatoren, die bei einer Infektion freigesetzt werden. Bei einer akuten Entzündung verursacht Histamin eine Erweiterung der Arteriolen mit einer Permeabilitätssteigerung der Gefäßwände, und ermöglicht auf diese Weise den Zustrom von Leukozyten, Antikörpern und Komplementfaktoren zum Infektionsherd. Am Endothel der Kapillaren und der Venolen kommt es zu einer Erweiterung der Interzellulargaps zwischen den Endothelzellen. Die Wirkung des Histamins ist von kurzer Dauer, da es innerhalb von 15 bis 30 Minuten abgebaut wird. Aus neutrophilen und eosinophilen Granulozyten wird für diesen Abbau eine Histaminase mit desaminierender Wirkung freigesetzt<sup>28,100</sup>.

Histamin verursacht nach einer Gewebsalteration eine sich rasch erschöpfende Kontraktion glatter Muskelfasern. Dadurch entsteht eine initiale Ischämie. Nach etwa 2 bis 3 Minuten bildet sich eine Gefäßerweiterung mit Dilatation der Arteriolen und Venolen. Es entsteht eine aktive Hyperämie mit Erhöhung der Durchblutung des Reaktionsbereiches<sup>28,100</sup>.

Histamin kann also zu einer Kontraktion oder Dilatation führen. Ob die Gefäße mit einer Kontraktion oder eine Dilatation antworten, hängt von der Dosis und von der Physiologie des Rezeptors ab. Die Mechanismen sind jedoch noch nicht vollständig klar. Mediatoren, zu denen Histamin gehört, sind potente (wirksame) Moleküle, welche schon bei niedriger Dosierung toxisch wirken können. Eine allgemeine Freisetzung von Histamin durch alle Mastzellen des Körpers verursacht, wie bereits oben erwähnt, einen anaphylaktischer Schock<sup>28</sup>.



#### 4.6.2. Serotonin

Serotonin oder 5-Hydroxytryptamin(5-HT) gehört gleichfalls zu den vasoaktiven Aminen. Serotonin ist in den Mastzellen, weiterhin in Thrombozyten, in der Darmmukosa, und in den enterochromaffinen Zellen (diese Zellen bilden Serotonin, das u.a. die glatte Muskulatur der Blutgefäße und der Darmwand zur Kontraktion veranlasst) und im Zentralen Nerven System gespeichert <sup>28</sup>. Im Rahmen unserer immunzytochemischen Untersuchungen haben wir in den Mastzellen außer Histamin auch Serotonin in kleinen Mengen festgestellt.

Die vaskuläre Wirkung ähnelt derjenigen des Histamins.

-Venöse Durchlässigkeit ( erhöhte vaskuläre Permeabilität).

-Arterielle Kontraktion und arterioläre Dilatation, aber mit verstärkter Tendenz zur Kontraktion (Gefahr von "vasospasm").

Der Name Serotonin deutet auf eine Serums substanz, die einen erhöhten Druck verursacht. Serotonin hat eine Eigenschaft, die bei Histamin fehlt, es stimuliert Fibroblasten. Serotonin ist bekannt als Mitogen für Fibroblasten<sup>28</sup>.

Serotonin wird schnell durch Monoaminoxidase abgebaut, welche in vielen Zellen unter anderen in Monozyten und im Endothelium vorhanden ist.

### 4.7 Veränderungen bei Diabetes mellitus

Die wichtigste langfristige Komplikation des Diabetes mellitus sind Gefäßschädigungen. Die Veränderungen der Gefäße entsprechen der Arteriosklerose, die auch beim Nichtdiabetiker vorkommt, aber beim Diabetiker früher beginnt. Die diabetischen Veränderungen sind abhängig vom Ausmaß der Hyperglykämie.

Pathologisch-anatomisch handelt es sich um eine Verdickung und Strukturveränderung der Basalmembran kleinster Gefäße. Prinzipiell werden

durch die diabetische Mikroangiopathie alle kleineren Blutgefäße geschädigt, jedoch sind die Gefäßveränderungen der Netzhaut des Auges und der Glomeruli in den Nieren klinisch von besonderer Bedeutung<sup>10-12</sup>.

Yokota et al<sup>111</sup> untersuchten die Koronargefäße diabetischer Patienten und stellten eine deutliche Abweichung von der Norm fest. Die Kapillaren waren unregelmäßig angeordnet und waren relativ klein. Es machte den Anschein, als ob sie sich verjüngten und schließlich verschließen würden. Diese strukturellen Veränderungen waren in ihrer Stärke abhängig von der Dauer des Bestehens des Diabetes. Verschiedene Faktoren wurden erwähnt, um diese Veränderungen zu erklären, besonders aber die Dickenzunahme der Basalmembran und die Degeneration der Perizyten. Die Veränderungen, die wir in den wachsenden Kollateralgefäßen der diabetischen Hunde beobachtet haben, bestätigen die Befunde von Yokota und können deshalb als für Diabetes spezifisch angesehen werden. Bei Diabetes erfolgt eine Ablagerung von den verschiedensten Polysacchariden und von Matrixproteinen, so daß in der Intima eine Art Fibrose entsteht, die weiter zur Verengung des Lumens beitragen kann.

Diabetische Gefäße sind dadurch charakterisiert, daß sie schlechter dilatieren können als die Gefäße von normalen Tieren. Bei der Kompensierung dieser Funktionsstörung können Prostaglandine eine wichtige Rolle spielen. Diese können bei allen Säugetieren in allen Organen synthetisiert werden. Sie wirken vasodilatatorisch und sind im Entzündungsprozess in der Spätphase der Permeabilitätsstörung wirksam. Prostaglandine hemmen die Bildung von Thrombozytenaggregaten und die Thrombusbildung.

Diabetische Erkrankungen zeichnen sich weiter durch eine veränderte Thrombozytenfunktion aus. Da Thrombozyten verschiedene Wachstumsfaktoren enthalten, stellen sie einen wichtigen Regulator der Gefäßwandhomöostase dar. Am längsten bekannt ist der Platelet-derived-growth-factor (PDGF), ein von Thrombozyten gebildetes Polypeptid, das insbesondere auf glatte Muskelzellen und

Fibroblasten eine mitogene (proliferationsfördernde) und chemotaktische Wirkung hat. An der Endothelläsionstelle bilden sich Thrombozytenaggregate, die PDGF abgeben. Darüber hinaus weiß man heute, daß derartige Wachstumsfaktoren nicht nur von Thrombozyten gebildet werden, sondern auch von anderen Zellen, insbesondere Makrophagen. Eine gesteigerte Thromboxan (TX-2) Produktion ist charakteristisch für Diabetes. Die Hauptwirkung von Thromboxan 2 besteht in einer Förderung der Thrombozytenaggregation und einer Vasokonstriktion. Daher rührt seine Bedeutung für den Verschluss kleiner Gefäße nach Schädigung von Geweben <sup>112,113</sup>. Schon kleine Gefäßendotheldefekte können den Thrombozyten-Mechanismus in Gang setzen.

Pogatsa et al berichteten über eine Störung der Vasodilatation bei diabetischen Patienten, und diese Einschränkung könnte auch bei den hier vorliegenden diabetischen Gefäßen vorhanden sein<sup>114</sup>.

Intimale Traumata der Koronargefäße und Thromboxanfreisetzung vermindert die Prostacyclinsynthese, besonders des vaskulären PG12. Es ist möglich, daß die Mastzellen eine Rolle in diesem Prozess spielen, da bekannt ist, daß sie neben der Aktivierung von Leukotrienen und den Phospholipiden der Zellmembran auch Prostaglandine aktivieren können <sup>114</sup>. Insofern mag die erhöhte Anzahl von Mastzellen in den diabetischen Gefäßen als Kompensationsmechanismus für verminderte Vasodilatation aufgefasst werden.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Mechanismus des Wachstums von Kollateralgefäßen im Koronargefäßsystem des Hundeherzens und der Einfluss von Diabetes mellitus auf diesen Prozess untersucht. Bei stoffwechselgesunden und bei diabetischen Hunden wurde eine Stenose und spätere Okklusion des R. circumflexus der linken Koronararterie durch Implantation eines Ameroidkonstriktors hervorgerufen. Vier bis neun Wochen nach der Konstriktorimplantation wurden die Tiere unter Narkose getötet und die makroskopisch auf der epikardialen Oberfläche des linken Ventrikels sichtbaren Kollateralgefäße entnommen. Die Gewebeproben wurden entweder in Glutaraldehyd für die Elektronenmikroskopie fixiert oder sie wurden eingefroren für die Immunzytochemie. Es wurden nur Kollateralgefäße entnommen, wenn der Konstriktor völlig verschlossen war und ein Infarkt nicht vorlag.

Die Befunde der Elektronenmikroskopie wurden systematisch von jedem Gefäß fotografisch erfasst und tabellarisch ausgewertet. Die wichtigsten Befunde sind: Das Wachstum der Kollateralen erfolgt über die Bildung einer Neointima, die die Gefäßwand verdickt und eine Vergrößerung des Lumens erlaubt. Mitosen von Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Zellen der Adventitia, besonders von Fibroblasten, werden häufig beobachtet, desgleichen Apoptosen. Adhäsion und Einwanderung von Leukozyten, besonders von Monozyten, ist ein häufig beobachtetes Phänomen. Die Intima besteht aus modifizierten glatten Muskelzellen vom synthetischen Phänotyp. Die glatten Muskelzellen der Media sind nicht mehr zirkulär angeordnet, sondern die Media zeigt einen desorganisierten Aufbau. Zwischen den Zellen der Neointima befindet sich extrazelluläre Matrix, und diese ist bei den Gefäßen von diabetischen Tieren verdickt. Immunzytochemische Untersuchungen zeigten, daß diese Matrix hauptsächlich aus Fibronektin und Laminin besteht.

An semidicken Epon-Schnitten wurde das Vorkommen von Mastzellen erfasst und quantitativ ausgewertet. Es ergab sich, daß bei den diabetischen Tieren signifikant mehr Mastzellen in der Adventitia vorhanden waren.

Diese Befunde führten zu folgender Hypothese: Das Wachstum der Kollateralen erfolgt durch Mitosen von Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Zellen der Adventitia, besonders von Fibroblasten. Ausgelöst wird der Wachstumsprozess durch die Erhöhung der Scherkräfte in dem plötzlich durch den Verschluss einer Koronararterie überlasteten Kollateralgefäß. Diese tangentialen Scherkräfte sind Auslöser für die Aufregulierung der Adhäsionsmoleküle in den Endothelzellen, die die Adhäsion von Leukozyten am Endothel bewirken. Das wachsende Gefäß ist also in der Anfangsphase des Wachstums unter einem konstanten mechanischen Reiz ausgesetzt, der auch eine Entzündungsreaktion in der Adventitia auslösen kann. So erklärt sich das vermehrte Vorkommen von Leukozyten in der Gefäßwand und in der Adventitia, und so erklärt sich das Vorkommen von Mastzellen. Diese bewirken eine weitere Stimulation des Entzündungsprozesses durch Freisetzung von Histamin. Dieser Vorgang wird erst beendet sein, wenn die Gefäße größer geworden sind, wenn die Wand an Volumen zugenommen hat und dadurch die Scherkräfte wieder abnehmen. Fibronektin und Laminin haben eine direkte Wirkung auf die Adhäsion, Migration und Proliferation der glatten Muskelzellen, und die Vermehrung dieser Proteine in der Neointima würden die besonders starke Wanddickenzunahme der Kollateralgefäßen bei Diabetes mellitus erklären.

Bei diabetischen Hunden waren diese Verhältnisse noch deutlicher ausgeprägt, auch die Anzahl der Mastzellen war höher als bei nicht-diabetischen Tieren. Dieser Zustand ist eventuell vergleichbar mit dem Wachstum der glatten Muskelzellen bei Hypertonie und Diabetes mellitus beim Menschen.

Der Wachstumsprozess bei koronaren Kollateralgefäßen ist demjenigen bei Restenose nach PTCA strukturell ähnlich. Der Unterschied liegt jedoch darin, daß

die Proliferation und die Wanddickenzunahme bei der Restenose so weit gehen, daß das Gefäß schließlich völlig verschlossen ist, während bei dem Kollateralgefäßwachstum der Prozess in einem bestimmten Stadium aufhört, das Gefäß offen bleibt und seine Leitungskapazität so erhöht ist, daß die Entstehung eines Myokardinfarktes verhindert wird.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Spalteholz W: Die Koronararterien des Herzens. *Anat Anz.* 1907; 21: 141.
2. Spalteholz W. *Die Arterien der Herzwand.* Leipzig: Hirzel; 1924.
3. Meesmann W: Untersuchungen zur Funktion der intra-arteriellen Koronaranastomosen beim Herzinfarkt. *Z Kreislauff.* 1959; 48: 193.
4. Schoenmackers J: Zur Anatomie und Pathologie der Coronargefäße. *Bad Oehnhausener Gespräche.* 1958; II: 133.
5. Schaper W: Coronary artery occlusion in animals, in (eds.): *The Collateral Circulation of the Heart.* Amsterdam, London: North-Holland Publishing; 1971: 19-28.
6. Schaper W, Sharma HS, Quinkler W, Markert T, Wunsch M, J. S: Molecular Biologic Concepts of Coronary Anastomoses. *J Am Coll Cardiol.* 1990; 15: 513-518.
7. Schaper J, Weihrauch D: Collateral Vessel Development in the Porcine and Canine Heart, in Schaper W ,Schaper J (eds.): *Collateral Circulation : Heart, Brain, Kidney, Limbs.* Bosten, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publisher; 1993: 65-102.
8. Galis ZS, Muszynski M, Sukhove GK, Simon-Morrissey E, Unemori EN, Lark MW, Amento E, Libby P: Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ Res.* 1994; 75: 181-189.
9. Schwartz SM: Biology of the neointima. *Exp Nephrol.* 1994; 2: 63-77.

10. Kraushar M, Brown G: Retinal neovascularization after branch retinal arterial obstruction. *Am J Ophthalmol.* 1987; 104: 294-6.
11. Oehler G. *Kurzlehrbuch der Inneren Medizin für Zahnmediziner und Mediziner.* Stuttgart, New York: Schattauer; 1987.
12. Williams JS, de Juan EJ, Machemer R: Ultrastructural characteristics of new vessels in proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol.* 1988; 105: 491-9.
13. Longland CJ: The collateral circulation of the Limb. *Ann Roy Coll Surg.* 1953; 13:
14. Schaper W: The microscopic structure of developing collaterals, in (eds.): *The Collateral Circulation of the Heart.* Amsterdam, London: North-Holland Publishing Company; 1971: 51-65.
15. Schaper W: The ultrastructure of developing collateral vessels, in (eds.): *The Collateral Circulation of the Heart.* Amsterdam, London: North-Holland Publishing Company; 1971: 93-116.
16. Schaper W: Development and Role of Coronary Collaterals. *Trends Cardiol Med.* 1991; 1: 256-260.
17. Schaper W: New paradigms for collateral vessel growth. *Basic Res Cardiol.* 1993; 88: 193-198.
18. Schaper W, Gorge G, Winkler B, Schaper J: The Collateral Circulation of the Heart. *Progr Cardiovasc Dis.* 1988; 31: 57-77.
19. Kass RW, Kotler MN, Yazdanfar S: Stimulation of coronary collateral growth: Current developments in angiogenesis and future clinical applications. *Am Heart J.* 1992; 123: 486-496.



20. Standley P, Rose K: Insulin and insulin-like growth factor-1 modulation of glucose transport in arterial smooth muscle cells: Implication of GLUT-4 in the vasculature. *Am J Hypertension*. 1994; 7: 357-362.
21. Cercek B, Sharifi B, Barath P, Bailey L, Forrester JS: Growth factors in pathogenesis of coronary arterial restenosis. *Am J Cardiol*. 1991; 68: 24C-33C.
22. Rakugi H, Kim D, Krieger J, Wang D, Dzau V, Pratt R: Induction of angiotensin converting enzyme in the neointima after vascular injury: possible role in restenosis. *J Clin Invest*. 1994; 93: 339-346.
23. Rakugi H, Wang D, Dzau V, pratt R: Potential importance of tissue angiotensin-converting enzyme inhibition in preventing neointima formation. *Circulation*. 1994; 90: 449-455.
24. Douglas SA, Loudon C, Vickery-Clark LM, Storer BL, Hart T, Feuerstein GZ, Elliott JD, Ohlstein EH: A role for endogenous endothelin-1 in neointimal formation after rat carotid artery balloon angioplasty. *Circ Res*. 1994; 75: 190-197.
25. Casscells W: Migration of smooth muscle and endothelial cells- Critical events in restenosis. *Circulation*. 1992; 86: 723-729.
26. Qu Z, Liebler J, Powers M, Galey T, Ahmadi P, Huang X, Ansel J, Butterfield J, Planck S, Rosenbaum J: Mast cells are a major source of basic fibroblast growth factor in chronic inflammation and cutaneous hemangioma. *Am J Pathol*. 1995; 147: 564-573.
27. Rasmussen LM, Wolf YG, Ruoslahti E: Vascular smooth muscle cells from injured rat aortas display elevated matrix production associated with transforming growth factor-beta activity. *Am J Pathol*. 1995; 147: 1041-1048.
28. Majno G, Joris I. *Cells, Tissues, and Disease*. Massachusetts: Blackwell Science; 1996.

29. Wang X, Feuerstein GZ, Gu JL, Lysko PG, Yue TL: Interleukin -1- beta induces expression of adhesion molecules in human vascular smooth muscle cells and enhances adhesion of leukocytes to smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 1995; 115: 89 - 98.
30. Beutler B, Cerami A: Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature*. 1986; 320: 584-588.
31. Matsuno H, Stssen JM, Vermylen J, Deckmyn H: Inhibition of integrin function by a cyclic RGD-containing peptide prevents neointima formation. *Circulation*. 1994; 90: 2203-2206.
32. Mikhail N, Fukuda N, Tremblay J, Hamet P: Platelets, growth factors, and vascular smooth-muscle cells in hypertension and diabetes. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1993; 22: S64-S74.
33. Schwartz RS, Edwards WD, Bailey KR, Camrud AR, Jorgenson MA, Holmes J: Differential neointimal response to coronary artery injury in pigs and dogs. *Arterioscler Thromb*. 1994; 14: 395-400.
34. Clowes AW, Schwartz SM: Significance of quiescent smooth muscle migration in the injured rat carotid artery. *Circ Res*. 1985; 56: 139-145.
35. Kockx MM, De Meyer GRY, Jacob WA, Bult H, Herman AG: Triphasic sequence of neointimal formation in the cuffed carotid artery if the rabbit. *Arterioscler Thromb*. 1992; 12: 1447-1457.
36. Holifield B, Helgason T, Jemelka S, Taylor A, Navran S, Allen J, Seidel C: Differentiated vascular myocytes: are they involved in neointimal formation? *J Clin Invest*. 1996; 97: 814-825.
37. Owens GK: Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*. 1995; 75: 487-509.

38. Schwartz R, Holmes DRJ, Topol E: The restenosis paradigm revisited an alternative proposal for cellular mechanisms. *J Am Coll Cardiol.* 1992; 20: 1284-1293.
39. Libby P, Schwartz D, Brogi E, Tanaka H, Clinton SK: A cascade model for restenosis. *Circulation.* 1992; 86: 47-52.
40. Grant DS, Kleinman HK, Martin GR: The role of basement membranes in vascular development. *Ann NY Acad Sci.* 1990; 588: 61-72.
41. Carey DJ: Control of growth and differentiation of vascular cells by extracellular matrix proteins. *Annu Rev Physiol.* 1991; 53: 161-77.
42. Clyman RI, Mauray F, Kramer RH: Beta 1 and beta 3 integrins have different roles in the adhesion and migration of vascular smooth muscle cells on extracellular matrix. *Exp Cell Res.* 1992; 200: 272-284.
43. Pauly RR, Passaniti A, Bilato C, Monticone R, Chenk L, Papadopoulos N, Glusband YA, Smith L, Weinstein C, Lakatta EG, Crow MT: Migration of cultured vascular smooth muscle cells through a basement membrane barrier requires type IV Collagenase activity and is inhibited by cellular differentiation. *Circ Res.* 1994; 75: 41-54.
44. Glukhova MA, Frid MG, Shekhonin BV, Balabanov YV, Kotelianlky VE: Expression of fibronectin variants in vascular and visceral smooth muscle cells in development. *Dev Biol.* 1990; 141: 193-202.
45. Kockx MM, De Meyer GRY, Andries LJ, Bult H, Jacob WA, Herman AG: The endothelium during cuff-induced neointima formation in the rabbit carotid artery. *Arterioscler Thromb.* 1993; 13: 1874-1884.
46. Malmqvist U, Arner A: Isoform distribution and tissue contents of contactile and cytoskeletal proteins in hypertrophied smooth muscle from rat portal vein. *Circ Res.* 1990; 66: 832-845.

47. Orlandi A, Ehrlich HP, Ropraz P, Spagnoli LG, Gabbiani G: Rat aortic smooth muscle cells isolated from different layers and at different times after endothelial denudation show distinct biological features in vitro. *Arterioscler Thromb.* 1994; 14: 982-989.
48. Kaufmann E, Weber K, Geisler N: Intermediate filament forming ability of desmin derivatives lacking either the amino-terminal 67 or the carboxy-terminal 27 residues. *J Mol Biol.* 1985; 185: 733-742.
49. Vincent M, Levasseur S, Currie RW, Rogers PA: Persistence of an embryonic intermediate filament-associated protein in the smooth muscle cells of elastic arteries and in Purkinje fibers. *J Mol Cell Cardiol.* 1991; 23: 873-882.
50. Gabbiani G, Schmid E, Winter S, Chaponnier C, De Chastonay C, Vanderkeckhove J, Weber K, Franke W: vascular smooth muscle cells differ from other smooth muscle cells. Predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin. *Proc Natl Acad Sci.* 1981; 78: 298-302.
51. Tokuyasu KT, Dutton AH, Singer SJ: Immunoelectron microscopic studies of desmin (skeletin) localization and intermediate filament organization in chicken cardiac muscle. *J Cell Biol.* 1983; 96: 1736-1742.
52. Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzouana G, Gillessen D, Gabbiani G: A new monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol.* 1986; 103: 2787-2796.
53. Bennett GS, Fellini SA, Toyama Y, Holtzer H: Redistribution of intermediate filament subunits during skeletal myogenesis and maturation in vitro. *J Cell Biol.* 1979; 82: 577-584.
54. Quinlan RA, Franke WW: Heteropolymer filaments of vimentin and desmin in vascular smooth muscle tissue and cultured baby hamster kidney cells demonstrated by chemical cross-linking. *Proc Natl Acad Sci.* 1982; 79: 3452-2456.

55. Traub P. *Intermediate filaments. A review.* Berlin, Heidelberg, NewYork, Tokyo: Springer Verlag; 1985.
56. Franke WW, Schmid E, Osborn M, Weber K: Different intermediate-size filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci.* 1978; 75(10): 5034-5038.
57. Giuriato L, Scatena M, Chiavegato A, Guidolin D, Pauletto P, Sartore S: Rabbit ductus arteriosus during development: anatomical structure and smooth muscle cell composition. *Anat Rec.* 1993; 235: 95-110.
58. Sakata N, Kawamura K, Fujimitsu K, Chiang YY, Takebayashi S: Immunocytochemistry of intermediate filaments in cultured arterial smooth muscle cells: differences in desmin and vimentin expression related to cell of origin and/or plating time. *Exp Mol Pathol.* 1990; 53: 224-231.
59. Goldman RD, Goldman AE, Green KJ, Jones JC: Intermediate filament networks: Organization and possible functions of a diverse group of cytoskeletal elements. *J Cell Sci.* 1986; Suppl 5: 69-97.
60. Malmquist U, Arner A, Uvelius B: Contractile and cytoskeletal proteins in smooth muscle during hypertrophy and its reversal. *Am J Physiol.* 1991; 260: C1085-C1093.
61. Berner PF, Somlyo A, Somlyo AP: Hypertrophy-induced increase of intermediate filaments in vascular smooth muscle. *J Cell Biol.* 1981; 88: 96-101.
62. Kjöll U, Thornell LE, Lehto VP, Virtanen I, Whalen RG: A comparative analysis of intermediate filament proteins in bovine heart Purkinje fibres and gastric smooth muscle. *Eur Cell Biol.* 1987; 44: 68-78.
63. Lazarides E: Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature.* 1980; 283: 249-256.

64. Lazarides E, Granger BL, Gard DL, O'Connor CM, Breckler J, Price M, Danto SI: Desmin- and vimentin-containing filaments and their role in the assembly of the Z disk in muscle cells. *Cold Spring Harbour Symp Quant Biol.* 1982; 46: 351-378.
65. Osborn M, Geisler N, Shaw G, Sharp G, Weber K: Intermediate filaments. *Cold Spring Harbour Symp Quant Biol.* 1982; 46: 413-429.
66. Danto SI, Fischman DA: Immunocytochemical analysis of intermediate filaments in embryonic heart cells with monoclonal antibodies to desmin. *J Cell Biol.* 1984; 98: 2179-2191.
67. Fujimoto T, Singer SJ: Immunocytochemical studies of desmin and vimentin in pericapillary cells of chicken. *J Histochem Cytochem.* 1987; 35: 1105-1115.
68. Geiger B: Intermediate filaments: Looking for a function. *Nature.* 1987; 329: 392-393.
69. Stromer MH, Bendayan M: Immunocytochemical identification of cytoskeletal linkages to smooth muscle cell nuclei and mitochondria. *Cell Motil Cytoskeleton.* 1990; 17: 11-18.
70. Schaper J, Froede R, Hein S, Buck A, Hashizume H, Speiser B, Friedl A, Bleese N: Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 1991; 83: 504-514.
71. Schaper J, Borgers M, Schaper W: Ultrastructure of ischemia-induced changes in the precapillary anastomotic network of the heart. *Am J Cardiol.* 1972; 29: 851-859.
72. Timpl R, Rohde H, Gehron Robey P, Rennard SI, Foidart J-M, Martin GR: Laminin-a glycoprotein from basement membranes. *Biol Chemist.* 1979; 254: 9933-9937.

73. Foidart JM, Bere EW, Yaar M, Rennard SI, Gullino M, Martin GR, Katz SI: Distribution and immunoelectron microscopic localization of laminin, a noncollagenous basement membrane glycoprotein. *Lab Invest.* 1980; 42: 336-342.
74. Martin GR, Timpl R: Laminin and other basement membrane components. *Ann Rev Cell Biol.* 1987; 3: 57-85.
75. Hynes RO: Wound healing, inflammation, and fibrosis, in (eds.): *Fibronectin.* New York, Berlin, Heidelberg: Springer Verlag; 1990: 349-364.
76. Albelda SM, Buck CA: Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.* 1990; 4: 2868-2880.
77. Yurchenco PD, Schittny JC: Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J.* 1990; 4: 1577-1590.
78. Speiser B, Weihrauch D, Riess CF, Schaper J: The extracellular matrix in human cardiac tissue. Part II: vimentin, laminin, and fibronectin. *Cardioscience.* 1992; 3: 41-49.
79. Repesh LA, Fitzgerald TJ, Furcht LT: Fibronectin involvement in granulation tissue and wound healing in rabbits. *J Histochem Cytochem.* 1982; 30: 351-358.
80. Grinnell F, Billingham RE, Burgess L: Distribution of fibronectin in wound healing in vivo. *J Invest Dermatol.* 1981; 76: 181-189.
81. Clark RA, DellaPelle P, Manseau E: Blood Vessel Fibronectin Increases in Conjunction with Endothelial Cell Proliferation and Capillary Ingrowth During Wound Healing. *J Invest Dermatol.* 1982; 79: 269-276.
82. French-Constant C, VanDeWater L, Dvorak HF: Reappearance of an embryonic pattern of fibronectin splicing during wound-healing in the adult rat heart. *J Cell Biol.* 1989; 109: 903-914.

83. Risau W, Lemmon V: Changes in the vascular extracellular matrix during embryonic vasculogenesis and angiogenesis. *Dev Biol.* 1988; 125: 441-450.
84. Orly J, Sato G: Fibronectin mediates cytokinesis and growth of rat follicular cells in serum-free medium. *Cell.* 1979; 17: 295-305.
85. Boudreau N, Turley E, Rabinovitch M: Fibronectin, hyaluronan, and a hyaluronan binding protein contribute to increased ductus arteriosus smooth muscle cell migration. *Dev Biol.* 1991; 143: 235-247.
86. Hynes RO, Yamada KM: Fibronectins: Multifunctional modular glycoproteins. *J Cell Biol.* 1982; 95: 369-377.
87. Engvall E, Ruhoslahti E, Miller EJ: Affinity of fibronectin to collagens of different genetic types and to fibrinogen. *J Exp Med.* 1978; 105: 1584-1594.
88. Cidadao AJ, Thorsteinsdottir S, David-Ferreira JF: Reevaluation of fibronectin-collagen interactions in tissues: An immunocytochemical and immunochemical study. *J Histochem Cytochem.* 1988; 36: 639-648.
89. Shekonin BV, Guriev SB, Irgashev SB, Koteliansky VE: Immunofluorescent identification of fibronectin and fibrinogen/fibrin in experimental myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 1990; 22: 533-541.
90. Casscells W, Kimura H, Sanchez JA, Yu ZX, Ferrans VJ: Immunohistochemical study of fibronectin in experimental myocardial infarction. *Am J Pathol.* 1990; 137: 801-810.
91. Vivaldi MT, Eyre DR, Kloner RA, Schoen FJ: Effects of methylprednisolone on collagen biosynthesis in healing acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 1987; 60: 424-425.
92. Knowlton AA, Connelly CM, Romo GM, Mamuya W, Apstein CS, Brecher P: Rapid expression of fibronectin in the rabbit heart after myocardial infarction with and without reperfusion. *J Clin Invest.* 1992; 89: 1060-1068.



93. Whittaker P, Boughner DR, Kloner RA: Analysis of healing after myocardial infarction using polarized light microscopy. *Am J Pathol.* 1989; 134: 879-893.
94. Kleinman HK, Wilkes CM, Martin GR: Interaction of fibronectin with collagen fibrils. *Biochem.* 1981; 20: 2325-2330.
95. Kleinman HK: Interactions between connective tissue matrix macromolecules. *Connective Tissue Res.* 1982; 10: 61-72.
96. McDonald JA, Kelley DG, Broekelmann TJ: Role of fibronectin in collagen deposition: Fab to the gelatin-binding domain of fibronectin inhibits both fibronectin and collagen organization in fibroblast extracellular matrix. *J Cell Biol.* 1982; 92: 485-492.
97. McDonald JA: Extracellular matrix assembly. *Ann Rev Cell Biol.* 1988; 4: 183-207.
98. Schwartz SM, deBlois D, O'Brien ERM: The Intima Soil for Artherosclerosis and Restenosis. *Circ Res.* 1995; 77: 445-465.
99. Rakusan K, Sarkar K, Turek Z, Wicker P: Mast cells in the rat heart during normal growth and in cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 1990; 66: 511-516.
100. Grundmann E. *Einführung in die Allgemeine Pathologie.* Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag; 1988.
101. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molekularbiologie der Zelle.* Weinheim (Deutschland): VHS; 1990.
102. Crowe S, Perdue M: Gastrointestinal food hypersensitivity: basic mechanisms of pathophysiology. *Gastroenterol.* 1992; 103: 1075-1095.
103. Suzuki K, Lee M, Newlands F, Nagase H, Wooley D: Activators of precursors of metalloproteinases 1 (interstitial collagenase) and 3 (stromelysin) by rat mast cell proteinases I and III. *Biochem Journal.* 1995; 305: 301-306.

104. Butterfield J, Weiler D, Hunt L, Wynn S, Roche P: Purification of tryptase from a human mast cell line. *J Leuk Biol.* 1990; 47: 409-419.
105. Enerbäck E, Norrby K. *The Mast Cells*. New York: Springer; 1989.
106. Galli SJ: New concepts about the mast cell. *N Engl J Med.* 1993; 328: 257-265.
107. Meininger C, Zetter B: Mast cells and angiogenesis. *Seminars Cancer Biol.* 1992; 3: 73-79.
108. Grainger D, Witchell C, Watson J, Metcalfe J, Weissberg P: Heparin decreases the rate of proliferation of rat vascular smooth muscle cells by releasing transforming growth factor beta-like activity from serum. *Cardiovasc Res.* 1993; 27: 2238-2247.
109. Chan P, Mill S, Mulloy B, Kakkar V, Demoliou-Mason C: Heparin inhibition of human vascular smooth muscle cell hyperplasia. *Internat Angiol.* 1992; 11: 261-267.
110. Chan P, Patel M, Betteridge L, Munro E, Schachter M, Wolfe J, Sever P: Abnormal growth regulation of vascular smooth muscle cells by heparin in patients with restenosis. *Lancet.* 1993; 341: 341-342.
111. Yokota K, M. F: The abnormalities of microvascular structure of the human diabetic heart, in Nagano M ,Dhalla N (eds.): *The Diabetic Heart*. New York: Raven Press; 1991: 103-113.
112. Wilcox J: Molecular biology: Insight into the causes and prevention of restenosis after arterial intervention. *Am J Cardiol.* 1993; 72: 88E-95E.
113. Koltai MZ: The Effects of Prostaglandins and the Role of their Altered Synthesis in Diabetes Mellitus, in Nagano M ,Dhalla NS (eds.): *The Diabetic Heart*. New York: Raven Press; 1991: 425-437.

114. Pogatsa G: Effect of Prostaglandins on the Diabetic Heart and Coronary Circulation., in Nagano M ,Dhalla N (eds.): *The Diabetic Heart*. New York: Raven Press; 1991: 45-58.

Auf den Seiten 87-98 befindet sich die Tabelle 3. Diese enthält die semiquantitative Auswertung aller licht- und elektronenmikroskopischen Bilder.

Kont.: Kontrolle	n: normal
Diab.: diabetischer Hund	/: fehlt
Präp. Nr.: Präparatnummer	+: leicht verändert
L.E.I.: Lamina Elastica Interna	++: stark verändert
Wo.: Wochen	A: Artefakt

Unsere Gewebeproben für die Kontrollgruppen stammen von den stoffwechselgesunden Hunden ohne Konstriktor.

### 7. Tabelle 3

Merkmale	Hund.Nr.	Präp.Nr.	Endothel	L . E . I.	Intima	Media	Adventitia
Kont.	5	A9116	n	n	n	n	n
Kont.	6	A9117	n	n	n	n	n
Kont.	6	A9118	n	n	n	n	n
Kont.	6	A9119	n	n	n	n	+
Diab.	7	A9122	n	n	n	n	++
Diab.	7	A9123	n	n	n	n	++
Diab.	7	A9124	+	n	n	n	++
Diab.	8	A9125	n	++	++	++	++
Diab.	8	A91251	++	++	++	++	++
Diab.	8	A91252	++	++	++	++	++
Diab.	8	A91253	/	++	++	++	++
Diab.	8	A9126	++	++	++	++	++
Diab.	8	A91262	++	++	++	++	++
Diab.	8	A91263	++	++	++	++	++

Lichtmikroskopie, 4 Wo.

Merkmale	Hund.Nr.	Präp.Nr.	Endothel	L . E . I.	Intima	Media	Adventitia
Koll.	1	D202	n	n	n	n	+
Koll.	1	D203	n	n	n	n	n
Koll.	1	D204	n	n	n	n	++
Koll.	1	D205	+	n	n	n	++
Koll.	2	D206	/	+	/	++	++
Koll.	2	D207	n	++	+	++	++
Koll.	2	D208	n	+	+	++	++
Koll.	2	D209	n	/	/	++	++
Koll.	2	D210	n	n	n	n	n
Koll.	2	D2102	+	n	n	n	/
Koll.	2	D211	++	+	++	++	++
Koll.	2	D212	++	+	++	++	++
Koll.	2	D2122	++	n	++	++	++
Koll.	2	D213	n	n	n	++	++
Diab.	4	D216	n	n	n	++	++
Diab.	4	D217	+	n	n	+	+
Diab.	5	D218	+	+	+	+	++
Diab.	5	D219	++	++	++	++	++
Diab.	5	D220	+	+	++	++	++
Diab.	5	D221	n	n	n	n	+
Diab.	5	D222	++	++	++	++	++
Diab.	5	D223	n	++	+	n	++
Diab.	5	D224	/	/	+	++	++
Diab.	5	D225	+	++	+	+	+
Diab.	5	D226	++	++	++	++	++
Diab.	5	D227	/	++	++	++	++

Lichtmikroskopie, 8 Wo.

Merkmale	Hund.Nr.	Präp.Nr.	Endothel	L . E . I.	Intima	Media	Adventitia
Diab.	1	D1824	++	+	++	++	++
Diab.	1	D1825	++	+	++	++	++
Diab.	1	D1826	+	++	++	++	++
Diab.	1	D1828	++	++	+	++	++
Diab.	2	D1829	+	+	+	+	+
Diab.	4	D1830	++	+	++	++	++
Diab.	4	D1832	n	n	n	n	/
Diab.	4	D1833	+	n	n	n	+
Kont.	6	D1834	n	n	n	n	n
Kont.	6	D1836	n	n	+	n	+
Kont.	6	D1837	n	n	n	n	n
Kont.	6	D1838	+	+	+	+	+
Kont.	6	D1839	+	+	n	n	+
Kont.	6	D1840	n		+	+	+
Kont.	6	D1841	n	/	n	n	n

Lichtmikroskopie, 9 Wo.

Merkmale	Hund.Nr.	Präp.Nr.	Endothel	L . E . I.	Intima	Media	Adventitia
Diab.	7	D1843	+	+	n	n	n
Diab.	7	D1845	/	/	/	++	++
Diab. 4 Wo.	7	D1846	n	n	n	n	/
Kont. 8 Wo.	9	D1850	+	+	n	n	+
Kont.	10	D1853	n	n	n	n	n
Kont.	10	D1854	n	+	+	n	+
Kont.	10	D1855	n	+	n	n	n
Kont.	10	D1856	n	n	n	n	n
Kont.	10	D1857	n	n	n	n	n
Kont.	10	D1858	n	n	n	n	n
Kont.	12	D1859	n	n	n	n	n
Kont.	12	D1860	n	n	n	n	n
Kont.	12	D1861	/	+	+	+	+
Kont.	12	D1863	+	/	+	n	+
Kont.	12	D1864	+	/	n	+	n
Kont.	12	D1866	+	/	+	n	+

Lichtmikroskopie, 4 W0.



Merkmale	Hund.Nr.	Präp. Nr.	Endothel	L . E . I.	Intima	Media	Adventitia
Kont.	11	1591p40	n	n	n	n	n
Kont.	11	1585p25	n	n	n	+	/
Kont.	11	1587p22	n	n	n	n	/
Kont.	11	1588p18	n	n	n	n	/
Kont.	9	1585p36	n	n	n	n	/
Kont.	9	1585p32	n	n	n	+	/
Kont.	9	1585p16	n	n	n	n	/
Kont.	9	1585p28	n	n	n	n	n
Koll.	8	A912640	++	++	++	/	/
Koll.	8	A912624	++	++	++	/	/
Koll.	8	A912621	++	++	++	/	/
Koll.	8	A912620	/	/	/	++	++
Koll.	8	A91267	/	/	/	++	/
Koll.	8	A91263	++	++	++	/	/
Koll.	8	A91261	++	++	++	/	/
Koll.	8	A912638	++	++	++	++	/
Koll.	8	A912626	++	++	++	/	/
Koll.	8	A912624	++	++	++	++	/
Koll.	8	A912617	+	+	+	+	/
Koll.	8	A912615	n	+	+	/	/
Koll.	8	A91265	++	++	++	/	/
Koll.	9	A912540	++	++	++	/	/
Koll.	9	A912539	/	/	/	/	++
Koll.	9	A912526	++	++	++	/	/
Koll.	9	A912521	++	++	++	/	/
Koll.	9	A912519	/	/	/	/	++
Koll.	9	A912513	/	/	/	++	++
Koll.	9	A912512	++	++	++	/	/
Koll.	9	A912510	/	/	/	/	++

Elektronenmikroskopie, 4 Wo.

Merkmale	Hund.Nr.	Präp. Nr.	Endothel	L . E . I.	Intima	Media	Adventitia
Kont.	7	A912440	n	n	n	n	/
Kont.	7	A912436	/	/	/	n	n
Kont.	7	A912430	/	/	/	n	/
Kont.	7	A912428	n	n	n	n	/
Kont.	7	A912424	n	n	n	n	n
Kont.	7	A912417	n	n	n	n	/
Kont.	7	A912414	/	/	/	n	n
Kont.	7	A912313	/	n	n	n	/
Kont.	7	A91238	n	n	n	n	/
Kont.	7	A91235	+	n	+	+	/
Kont.	7	A91232	/	/	/	+	+
Kont.	7	A912232	+	n	+	+	+
Koll.	6	A911930	n	n	n	+	/
Koll.	6	A911928	/	/	/	++	/
Koll.	6	A911926	n	n	n	++	/
Koll.	6	A911921	n	n	n	++	/
Koll.	6	A911820	n	n	n	+	/
Koll.	6	A911840	/	/	/	++	/
Koll.	6	A911833	n	n	n	+	/
Koll.	6	A911916	n	n	n	+	/
Koll.	6	A911919	n	n	n	+	/
Koll.	6	A911929	/	/	/	+	n
Koll.	6	A911938	n	n	n	++	/
Koll.	6	A911940	n	n	n	++	/
Koll.	6	A91194	n	n	n	+	/

Elektronenmikroskopie, 4 Wo.

Merkmale	Hund.Nr.	Präp. Nr.	Endothel	L . E . I.	Intima	Media	Adventitia
Koll.	1	D20240	+	n	n	/	/
Koll.	1	D20237	+	n	n	n	/
Koll.	1	D20234	n	n	n	n	/
Koll.	1	D20432	n	n	n	n	/
Koll.	2	D2105	n	n	n	n	/
Koll.	2	D2102	/	/	/	n	n
Koll.	2	D21140	A	/	+	+	/
Koll.	2	D21135	A	+	+	+	/
Koll.	2	D21132	/	/	/	++	/
Koll.	2	D21131	A +	n	+	+	/
Koll.	2	D21126	/	/	/	+	+
Koll.	3	D2132	A	n	++	++	/
Koll.	3	D2131	A	n	++	++	/
Koll.	3	D21323	A	n	+	++	/
Koll.	3	D21320	A	+	++	++	/
Koll.	3	D2134	A	n	+	++	/
Koll.	3	D2133	A	n	+	++	/
Koll.	3	D21440	n	n	n	n	/
Koll.	3	D21437	+	n	n	n	/

Elektronenmikroskopie, 8 Wo.

Merkmale	Hund.Nr.	Präp. Nr.	Endothel	L . E . I.	Intima	Media	Adventitia
Diab.	4	D21728	n	n	n	+	/
Diab.	4	D21726	n	n	n	+	/
Diab.	5	D21817	/	/	/	++	/
Diab.	5	D21914	++	/	++	++	/
Diab.	5	D21912	++	/	++	/	/
Diab.	5	D21936	++	/	++	/	/
Diab.	5	D21932	+	/	++	/	/
Diab.	5	D21927	++	/	++	/	/
Diab.	5	D21925	/	/	/	++	++
Diab.	5	D21922	/	/	/	/	++
Diab.	5	D21920	++	/	++	++	/
Diab.	5	D22110	++	/	++	/	/
Diab.	5	D2218	+	+	+	+	/
Diab.	5	D2216	++	/	++	++	/
Diab.	5	D22139	+	+	+	+	/
Diab.	5	D22134	++	/	++	/	/
Diab.	5	D22132	+	/	++	++	/
Diab.	5	D2218	/	/	/	+	++
Diab.	5	D2216	+	/	+	+	/
Diab.	5	D2213	++	/	++	/	/
Diab.	5	D22425	/	/	/	/	++
Diab.	5	D2262	/	/	/	+	+
Diab.	5	D22640	++	/	++	/	/
Diab.	5	D22638	++	/	++	/	/
Diab.	5	D22635	/	/	++	++	/
Diab.	5	D22634	/	/	/	++	++
Diab.	5	D22631	++	/	++	/	/
Diab.	5	D22629	++	/	++	++	/
Diab.	5	D22625	/	/	/	++	++
Diab.	5	D22617	++	/	++	/	/
Diab.	5	D22614	/	/	/	++	++
Diab.	5	D22611	A	/	++	++	/
Diab.	5	D22610	/	/	/	++	/
Diab.	5	D2267	/	/	/	/	++
Diab.	5	D2263	/	/	/	++	++
Diab.	5	D2261	/	/	/	/	++

Elektronenmikroskopie, 8 Wo.

Merkmale	Hund.Nr.	Präp. Nr.	Endothel	L . E . I.	Intima	Media	Adventitia
Koll.	4	183928	++	n	++	++	++
Koll.	4	183921	++	n	++	++	++
Koll.	4	183915	++	n	++	++	++
Koll.	4	183913	++	/	++	++	++
Koll.	4	183910	++	n	++	++	++
Koll.	4	18398	++	n	++	++	++
Koll.	4	18395	++	n	++	++	++
Koll.	4	18394	++	+	++	++	++
Koll.	7	183933	++	n	++	++	++
Koll.	7	183930	/	/	/	/	++
Koll.	7	183927	++	+	++	++	++
Koll.	7	183923	++	n	++	++	++
Koll.	7	183925	++	+	++	++	++
Koll.	2	184012	++	+	++	++	++
Koll.	2	18409	/	/	/	++	++
Koll.	2	18404	++	++	++	++	++
Koll.	2	184022	++	n	++	++	++
Koll.	2	184020	++	+	++	++	++
Koll.	2	184040	++	+	++	++	++
Koll.	2	184035	++	+	++	++	++
Koll.	2	184030	++	+	++	++	++
Koll.	2	184028	++	n	++	++	++
Koll.	2	184036	++	+	++	++	++
Koll.	2	184039	++	n	++	++	++
Koll.	2	184033	++	n	++	++	++
Koll.	2	184030	++	n	++	++	++
Koll.	2	184028	++	+	++	++	++
Koll.	2	184017	++	n	++	++	++
Koll.	2	184015	/	/	/	/	++
Koll.	3	184210	n	n	n	+	/
Koll.	3	18434	/	/	/	+	++
Koll.	3	18431	/	/	/	+	++
Koll.	3	184337	/	/	/	+	++

Elektronenmikroskopie, 8 Wo.

Merkmale	Hund.Nr.	Präp. Nr.	Endothel	L . E . I.	Intima	Media	Adventitia
Kont.	6	D183439	n	n	n	n	/
Kont.	6	D183438	+	n	n	n	/
Kont.	6	D183436	+	+	+	n	/
Kont.	6	D183433	n	+	+	n	/
Kont.	6	D183432	+	+	+	+	/
Kont.	6	D183431	/	/	/	n	n
Kont.	6	D183412	n	n	n	n	/
Kont.	6	D18349	n	n	n	+	/
Kont.	6	D18346	/	/	/	+	+
Kont.	6	D18345	n	n	n	n	/
Kont.	6	D183629	n	n	n	+	/
Kont.	6	D183627	/	/	/	+	n
Kont.	6	D183625	n	n	n	n	/
Kont.	6	D183623	n	n	n	n	n
Kont.	6	D183619	n	n	n	n	n
Kont.	6	D183615	n	n	n	n	/
Kont.	6	D183612	n	n	n	n	n
Kont.	6	D18367	n	n	n	+	n
Kont.	6	D18365	/	/	/	+	n
Kont.	6	D18364	/	n	n	n	n
Kont.	6	D183640	n	n	n	n	/
Kont.	6	D183732	n	n	n	n	n
Kont.	6	D183730	/	/	/	n	n
Kont.	6	D183824	/	n	n	n	+
Kont.	6	D183816	/	/	/	/	+
Kont.	6	D183940	+ A	+	+	/	/
Kont.	6	D183938	+ A	+	+	n	/
Kont.	6	D183935	+ A	n	n	/	/
Kont.	6	D183933	+	+	+	/	/
Kont.	6	D183929	/	/	/	n	+
Kont.	6	D183925	/	/	+	+	+
Kont.	6	D183921	/	/	/	+	+
Kont.	6	D183912	+	+	+	/	/
Kont.	6	D18395	n	+	n	n	/
Kont.	6	D18392	+	+	+	/	/
Kont.	6	D184020	/	/	/	n	+
Kont.	6	D184018	+	/	+	+	/
Kont.	6	D184016	n	/	n	+	/
Kont.	6	D184014	/	/	/	+	+
Kont.	6	D184112	/	/	/	n	n
Kont.	2	D182923	n	n	n	n	/
Kont.	2	D182922	n	n	n	n	/

Merkmale	Hund.Nr.	Präp. Nr.	Endothel	L . E . I.	Intima	Media	Adventitia
Diab.	7	D184338	n	n	n	n	/
Diab.	7	D184626	n	n	n	n	/
Diab.	7	D184624	+	+	+	n	/

Elektronenmikroskopie, 4 Wo.

Merkmale	Hund.Nr.	Präp. Nr.	Endothel	L . E . I.	Intima	Media	Adventitia
Diab.	1	D182840	+	++	++	++	/
Diab.	1	D182831	+	+	++	/	/
Diab.	1	D182829	/	/	/	++	++
Diab.	1	D182827	++	+	++	++	/
Diab.	1	D182429	+	+	++	/	/
Diab.	1	D182428	/	+	++	n	/
Diab.	1	D182425	+	+	++	/	/
Diab.	1	D182424	++	+	++	++	/
Diab.	1	D182423	++	+	++	++	/
Diab.	1	D182435	++	+	++	++	/
Diab.	1	D182637	/	/	/	/	++
Diab.	1	D182626	+	+	++	++	++

Elektronenmikroskopie, 9 Wo.

Merkmale	Hund.Nr.	Präp. Nr.	Endothel	L . E . I.	Intima	Media	Adventitia
Kont.	10	D185318	n	n	n	+	/
Kont.	10	D185316	+	n	n	n	/
Kont.	10	D185314	n	n	n	n	/
Kont.	10	D185310	+	n	n	n	/
Kont.	10	D18539	n	n	n	n	/
Kont.	10	D18536	n	n	n	n	/
Kont.	10	D18531	n	n	n	n	/
Kont.	10	D18547	n	+	+	+	/
Kont.	10	18545	n	+	+	+	/
Kont.	10	D18548	n	n	n	n	/
Kont.	10	D185435	n	+	+	+	/
Kont.	10	D185428	+	+	++	n	/
Kont.	10	D185525	+	n	n	+	/
Kont.	10	D185522	+	n	n	+	/
Kont.	10	D185520	n	n	n	+	/
Kont.	10	D185538	/	/	/	+	/
Kont.	10	D185537	n	n	n	+	/
Kont.	10	D185635	A	n	n	+	/
Kont.	10	D185633	+	n	n	/	/
Kont.	10	D185632	n	n	n	n	/
Kont.	10	D185731	n	n	n	n	/
Kont.	10	D185730	n	n	n	n	/
Kont.	10	D185729	n	n	n	n	/
Kont.	10	D185728	n	n	n	n	/
Kont.	10	D185726	n	n	n	n	n
Kont.	10	D185723	n	n	n	n	/
Kont.	10	D185720	n	n	n	n	/
Kont.	10	D185817	n	n	n	n	/
Kont.	10	D185816	n	n	n	n	/
Kont.	10	D185815	n	n	n	n	/
Kont.	10	D185813	n	+	+	n	/

Elektronenmikroskopie, 4 Wo



## 8. Lebenslauf

Deyhim Mousavipour	geboren am	20.02.1958 in Schiraz, Iran
Eltern:		Khyrollah Mousavipour, Richter Homa Mousavipour, Hausfrau
Schulbildung:	1964 - 1970	Grundschule, Iran
	1970 - 1976	Gymnasium, Iran
	1976	Abitur, Iran
Studienkolleg:	1981 - 1982	Bonn
Studium:	1982 - 1989	Studium der Zahnmedizin an der Justus-Liebig-Universität, Gießen
	10. 07. 1989	Bescheinigung als Zahnärztin
	Januar 1990	Beginn der Dissertation im Max- Planck-Institut für physiologische und klinische Forschung, Abteilung für experimentelle Kardiologie in Bad Nauheim

## 9. Danksagung

Frau Professor Dr. Dr. h. c. Jutta Schaper danke ich für die Überlassung des Themas. Ihr möchte ich meinen besonderen Dank für ihr stetes Interesse, welches sie dieser Arbeit widmete, aussprechen. Mit ihren wertvollen wissenschaftlichen Anregungen und Ratschlägen hat sie wesentlich zu dieser Arbeit beigetragen.

Den Mitarbeiterinnen der Abteilung für Elektronenmikroskopie des Max-Planck-Institutes, Frau Renate Möhren, Frau Beate Grohmann, Frau Brigitte Matzke und Frau Annemarie Möbs danke ich für ihre wertvolle und hilfreiche Unterstützung. Ebenso danke ich Herrn Gunther Schuster für seine Hilfe bei der Arbeit mit dem Computer.

Auch allen nicht namentlich genannten Mitarbeitern des Institutes danke ich für die herzliche Aufnahme und gute Kollegialität.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann Masoud Sanaei, der mir während der Promotionsarbeit stets hilfreich zur Seite stand.