

Gen-tragender Transfer viraler Vektoren in den peripheren Kreislauf des Kaninchens

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Inka Kathrin Eitenmüller

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2005

© 2005 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**, Gießen
Printed in Germany

ISBN 3-938026-57-X

Verlag: DVG Service GmbH
Frankfurter Straße 89
35392 Gießen
0641/24466
geschaeftsstelle@dvg.net
www.dvg.net

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Joachim Roth

und

Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung,
W.G. Kerckhoff-Institut, Abteilung für Experimentelle Kardiologie, Bad Nauheim
Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Schaper

Gen-tragender Transfer viraler Vektoren in den peripheren Kreislauf des Kaninchens

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Inka Kathrin Eitenmüller
Tierärztin aus Groß-Umstadt

Gießen 2005

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Manfred Reinacher

Gutachter:

Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Schaper

Prof. Dr. Joachim Roth

Tag der Disputation: 23.11.2005

Meinem Vater

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	HINTERGRUND	1
1.2.	PATHOPHYSIOLOGIE	2
1.3.	ZIELSETZUNG	3
2.	LITERATURÜBERSICHT	4
2.1.	DAS BLUTGEFÄßSYSTEM	4
2.1.1.	<i>Die Arterien</i>	4
2.1.1.1.	<i>Physiologie und Morphologie der Arterien</i>	4
2.1.1.2.	<i>Die Blutkapillaren</i>	5
2.1.2.	<i>Das venöse Blutgefäßsystem</i>	6
2.2.	DIE GEFÄßNEUBILDUNG	7
2.2.1.	<i>Vaskulogenese</i>	7
2.2.2.	<i>Angiogenese</i>	8
2.2.2.1.	<i>Vorgang und Regulation der Angiogenese</i>	9
2.2.3.	<i>Arteriogenese</i>	10
2.2.3.1.	<i>Die Induktion der Arteriogenese</i>	11
2.2.3.2.	<i>Aktiviertes Endothel</i>	12
2.2.3.3.	<i>Zirkulierende Zellen</i>	12
2.2.3.4.	<i>Proliferation und Neuordnung (=Remodelling)</i>	13
2.2.3.5.	<i>Die Adaptation der Kollateralgefäße</i>	14
2.3.	BEDEUTUNG DER LEUKOZYTEN FÜR DIE ARTERIOGENESE	14
2.3.1.	<i>Regulation der Leukozytendiapedese</i>	15
2.3.2.	<i>Stimulierung der Arteriogenese durch Monozyten</i>	16
2.3.3.	<i>Der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF)</i>	17
2.3.3.1.	<i>Der GM-CSF-Rezeptor</i>	18
2.3.3.2.	<i>Die Rolle von GM-CSF in der Arteriogenese</i>	21
2.3.3.3.	<i>Der rekombinante humane Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor</i>	21
2.4.	BEDEUTUNG DER ENDOTHELZELLEN FÜR DIE ARTERIOGENESE	22
2.4.1.	<i>Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-4</i>	22
2.4.2.	<i>Stimulierung der Arteriogenese durch Ad 5.1 FGF-4</i>	23
2.4.3.	<i>Der vaskuläre adenovirale Gentransfer</i>	24
2.4.3.1.	<i>Technik des intravasalen Gentransfers</i>	26
3.	METHODEN	27
3.1.	INDUKTION DER ARTERIOGENESE IM KANINCHENHINTERLAUF	27

3.1.1.	<i>Das Tiermodell</i>	27
3.1.1.1.	<i>Versuchstiere</i>	27
3.1.1.2.	<i>Narkose</i>	27
3.1.2.	<i>Operationstechniken</i>	28
3.1.2.1.	<i>Einbau der osmotischen Minipumpe</i>	28
3.1.2.2.	<i>Adenovirale Transfektion</i>	28
3.1.2.3.	<i>Kombination von adenoviralen Transfektion mit osmotischer Minipumpe</i>	30
3.1.3.	<i>Verwendete Systeme zur lokalen chronischen Applikation von Testsubstanzen</i>	30
3.1.3.1.	<i>Lokale chronische Infusion</i>	30
3.1.3.2.	<i>Lokaler adenoviraler Gentransfer</i>	31
3.1.4.	<i>Versuchsgruppen zur Stimulierung der Arteriogenese</i>	31
3.2.	KONTROLLE DES BLUTBILDES	33
3.2.1.	<i>Blutzellenbestimmung mittels Durchflusszytometrie</i>	33
3.2.1.1.	<i>Durchführung des Tests</i>	33
3.2.2.	<i>Leukozytenbestimmung mittels Hämatologie-Analysator</i>	34
3.2.2.1.	<i>Durchführung des Tests</i>	34
3.2.3.	<i>Versuchsgruppen der Blutzell-Messungen</i>	35
3.3.	HÄMODYNAMISCHE AUSWERTUNG	37
3.3.1.	<i>Narkose und Beatmung</i>	37
3.3.2.	<i>Blutflussmessung</i>	37
3.3.3.	<i>Blutdruckmessung</i>	38
3.3.4.	<i>Ermittlung der optimalen peripheren Dilatation</i>	38
3.3.5.	<i>Einbau eines intraaortalen Katheters</i>	39
3.3.6.	<i>Berechnung der kollateralen Konduktanz</i>	39
3.4.	ANGIOGRAPHISCHE AUSWERTUNG	41
3.4.1.	<i>Kontrastmittel-Herstellung</i>	41
3.4.2.	<i>Kontrastmittel-Infusion</i>	41
3.4.3.	<i>Erstellung der Angiogramme</i>	41
3.4.4.	<i>Auswertung der Angiogramme</i>	42
3.5.	NACHWEIS DES ADENOVIRALEN GENTRANSFERS	43
3.5.1.	<i>Gewinnung der Proben</i>	43
3.5.2.	<i>Auswahl der Primer</i>	45
3.5.3.	<i>Durchführung des Tests</i>	45
3.6.	AUSWERTUNG UND STATISTIK	47
4.	ERGEBNISSE	48
4.1.	CHARAKTERISIERUNG DER LYMPHOZYTENPOPULATION IM PERIPHEREN KANINCHENBLUT	48
4.1.1.	<i>Leukozytenanalyse unbehandelter Kaninchen</i>	51

4.1.2.	<i>Leukozytenanalyse nach Ligatur der A. femoralis</i>	52
4.1.3.	<i>Leukozytenanalyse bei Verabreichung von rh GM-CSF</i>	54
4.1.3.1.	<i>Leukozytenanalyse bei Verabreichung von 25 µg GM-CSF</i>	54
4.1.3.2.	<i>Leukozytenanalyse bei Verabreichung von 100 µg GM-CSF</i>	54
4.1.3.3.	<i>Leukozytenanalyse bei Verabreichung von 500 bzw. 1000 µg GM-CSF</i>	55
4.1.4.	<i>Korrelation von Durchflusszytometrie und Hämatologie-analysator</i>	56
4.2.	HÄMODYNAMISCHE AUSWERTUNGEN	58
4.2.1.	<i>Maximale kollaterale Konduktanzen ohne Stimulierung</i>	61
4.2.1.1.	<i>Maximale kollaterale Konduktanz bei einseitiger Ligatur</i>	62
4.2.1.2.	<i>Maximale kollaterale Konduktanz bei beidseitiger Ligatur</i>	62
4.2.1.3.	<i>Maximale kollaterale Konduktanz nach beidseitiger Ligatur mit einseitiger Transfektion des Kontrollvektors</i>	62
4.2.2.	<i>Maximale kollaterale Konduktanzen mit exogener Stimulierung</i>	63
4.2.2.1.	<i>Maximale kollaterale Konduktanz nach Stimulierung der Arteriogenese mit rh GM-CSF</i>	64
4.2.2.2.	<i>Maximale kollaterale Konduktanz nach Stimulierung der Arteriogenese mit rh FGF-4</i>	64
4.2.2.3.	<i>Maximale kollaterale Konduktanz nach Stimulierung der Arteriogenese mit rh FGF-4 und rh GM-CSF</i>	66
4.3.	ANGIOGRAPHISCHE AUSWERTUNGEN	68
4.3.1.	<i>Kollateralgebiete ohne exogene Stimulierung</i>	70
4.3.2.	<i>Kollateralgebiete nach lokaler Infusion von rh GM-CSF</i>	71
4.3.3.	<i>Kollateralgebiete nach Stimulierung der Arteriogenese mit rh FGF-4</i>	73
4.3.4.	<i>Kollateralgebiete nach Stimulierung der Arteriogenese mit rh FGF-4 und rh GM-CSF</i>	74
4.4.	NACHWEIS DER mRNA VON RH FGF-4 IM GEWEBE	77
5.	DISKUSSION	80
5.1.	MODELL DER LIGATUR DER FEMORALARTERIE IM KANINCHEN	80
5.2.	HÄMODYNAMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR BESTIMMUNG DER MAXIMALEN KOLLATERALEN KONDUKTANZ	81
5.2.1.	<i>Adenosininfusion zur Bestimmung der maximalen Konduktanz</i>	81
5.3.	ANGIOGRAPHISCHES MODELL ZUR UNTERSUCHUNG DES KOLLATERALWACHSTUMS	82
5.4.	QUANTIFIZIERUNG DER LEUKOZYTEN DES PERIPHEREN BLUTES	83
5.4.1.	<i>Etablierung der Leukozytenzellmessung im Kaninchenblut mittels Durchflußzytometrie</i>	83
5.4.2.	<i>Vergleich der Kaninchenleukozyten-Messung mittels Durchflußzytometrie und Hämatologieanalysator</i>	84
5.4.3.	<i>Leukozytenmessung unbehandelter Kaninchen</i>	85
5.4.4.	<i>Einfluß von rh GM-CSF auf die peripheren Leukozyten des Kaninchens</i>	85
5.5.	INTRAVASALER GENTRANSFER	87
5.5.1.	<i>Methode des intravasalen Gentransfers</i>	89

5.5.2.	<i>Einfluß einer Vektor-induzierten Immunreaktion auf die Arteriogenese</i>	90
5.5.3.	<i>Nachweis der Expression des FGF-4-Gens</i>	90
5.6.	ARTERIOGENESE NACH LIGATUR OHNE WEITERE EXOGENE STIMULIERUNG	92
5.6.1.	<i>Einfluss der temporären Ischämie auf die Arteriogenese</i>	93
5.7.	EINFLUSS VON HUMANEM FGF-4 AUF DIE ARTERIOGENESE IM KANINCHENMODELL	94
5.8.	EINFLUSS VON RHGM-CSF AUF DIE ARTERIOGENESE	96
5.9.	EINFLUSS DES KOMBINIERTEN EINSATZES VON RH FGF-4 UND RH GM-CSF AUF DIE ARTERIOGENESE	97
6.	ZUSAMMENFASSUNG	100
7.	SUMMARY	102
8.	ANHANG	104
8.1.	ALLGEMEINE CHEMIKALIEN UND LÖSUNGSMITTEL	104
8.2.	MEDIKAMENTE	104
8.3.	OPERATIONSZUBEHÖR	105
8.4.	VERSUCHSTIERE	105
8.5.	LABORZUBEHÖR	106
8.5.1.	<i>Blutzellanalyse</i>	106
8.5.2.	<i>RT-PCR</i>	106
8.5.3.	<i>Hämodynamik</i>	107
8.5.4.	<i>Angiographie</i>	108
8.6.	PUFFER	108
8.7.	LÖSUNGEN ZUR RÖNTGENBILDENTWICKLUNG	110
9.	ABKÜRZUNGEN	111
10.	LITERATURVERZEICHNIS	114
11.	ERKLÄRUNG	125
12.	DANKSAGUNG	126

1. EINLEITUNG

1.1. Hintergrund

Laut Jahresbericht der Weltgesundheitsorganisation (WHO) 2000¹ waren im Jahr 2002 kardiovaskuläre Erkrankungen weltweit die zweithäufigste Todesursache. Außerdem stellen Herz-Kreislaufkrankungen die häufigsten tödlich endenden Zivilisationskrankheiten dar.

Vor allem in Zentral- und Osteuropa, sowie in Asien zeigte sich in den vergangenen Jahren eine erhöhte Inzidenz der koronaren Herzerkrankungen (KHK). Dieser Trend wird durch die immer älter werdende Bevölkerung der Industrienationen verstärkt. Selbst in Afrika, wo die durchschnittliche Lebenserwartung aufgrund Mangelernährung und Infektionskrankheiten vergleichsweise gering ist, wird infolge verstärkten Tabakgenusses in Kombination mit der schon vorherrschenden hohen Prävalenz an Bluthochdruck ein Anstieg der Todesfälle durch kardiovaskuläre Krankheiten erkennbar².

In Ländern mit hohen Morbiditätsraten lagen 1998 die durch kardiovaskuläre Krankheiten verursachten Ausgaben bei ca. 7,9% der gesamten Gesundheitsaufwendungen. Allein in den USA wurden 1999 etwa 1,1 Millionen perkutane koronare revaskularisierende Maßnahmen (z.B. perkutane transluminale Koronarangioplastien), 355.000 Bypass-Operationen und 131.000 Endarteriektomien durchgeführt^{2,3}.

Obwohl die chirurgischen Maßnahmen zur Therapie der Herz-Kreislaufkrankungen stark optimiert wurden und mittlerweile weniger invasive Techniken als die Bypass-Operation verfügbar sind, gibt es immer noch Patienten mit Herz-Kreislaufkrankungen, die nicht mittels dieser Verfahren therapiert werden können. Bei vielen der therapierefraktären Patienten ist eine ausreichende Behandlung aufgrund einer vorliegenden Mehrgefäßerkrankung, einer diffusen Arteriosklerose oder des Fehlens revaskulierbarer distaler Gefäße nicht möglich. Außerdem stellen sich bei ca. einem Drittel der Patienten, die sich perkutanen koronaren Eingriffen unterzogen, Rezidive ein⁴.

Hier eröffnet sich ein Feld für neue therapeutische Ansätze.

1.2. Pathophysiologie

Kardiovaskuläre Erkrankungen entstehen häufig aufgrund arteriosklerotischer Veränderungen der Gefäße, in deren Folge sich eine Minderdurchblutungen von Organen einstellt.

Schon 1858 erkannte der deutsche Pathologe Virchow die Konsequenzen, die eine eingeschränkte Durchblutung auf das umgebende Gewebe hat⁵. Durch die Reduktion der Sauerstoffbereitstellung wird die aerobe Energiegewinnung stark beeinträchtigt. Des weiteren sammeln sich im ischämischen Gewebe toxische Stoffwechselprodukte an.

Bei zur Ischämie führenden Gefäßkrankheiten besitzt der Organismus potenziell die Fähigkeit, natürliche Bypässe, sogenannte Kollateralgefäße, auszubilden. Gelegentlich kann man beobachten, dass Patienten mit kompletter Einengung einer Herzkranzarterie keine oder nur minimale kardiologische Symptome zeigen, gleichzeitig ist die normale myokardiale Funktion erhalten^{6,7}. In diesen Fällen haben sich gut ausgebildete Kollateralgefäße entwickelt, die den unterbrochenen Blutfluss überbrücken.

Voraussetzung für die Ausbildung von Kollateralen ist allerdings, dass sich der Verschluss des zu umgehenden Gefäßes langsam entwickelt und genug Zeit für das Wachstum der Kollateralen vorhanden ist. Häufiger entwickelt sich jedoch der Verschluss des Gefäßes schneller als das Wachstum von Kollateralarterien möglich ist, so dass sich ein Infarkt entwickelt.

In klinischen Studien konnte festgestellt werden, dass bei Patienten mit angiographisch sichtbaren Kollateralgefäßen nach einer Ballon-Dilatation weniger Beschwerden auftreten⁸. Sind Kollateralgefäße vorhanden, ist außerdem die Gefahr des Auftretens links-ventrikulärer Aneurysmen nach akutem Koronarverschluss geringer und die Überlebensrate nach myokardialer Infarzierung ist erhöht⁸.

1.3. Zielsetzung

Unter Anwendung eines intravasalen Gentransfers sollte ein potenziell arteriogener Faktor auf seine Fähigkeit untersucht werden, das Kollateralgefäßwachstum zu steigern. Hierzu wurde im Modell der Ligatur der Arteria femoralis im Kaninchen eine neue Methode der adenoviralen Transfektion etabliert, um einen für den Fibroblasten-Wachstumsfaktor-4 (FGF-4) kodierenden adenoviralen Vektor (Ad5.1 FGF-4) auf das Gefäßendothel übertragen zu können. Endothel- und glatte Muskelzellen nehmen zentrale Rollen im Gefäßwachstum ein⁹, daher sollte ihre Stimulierung durch rh FGF-4 in Bezug auf das Kollateralwachstum untersucht werden.

Da das Kollateralwachstum in entscheidendem Maß von Monozyten abhängt¹⁰, sollte der Einfluss von intraarteriell verabreichtem rekombinanten humanen Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierendem-Faktor (rh GM-CSF) auf die Konzentration der Monozyten im peripheren Kaninchenblut analysiert werden. Zur Evaluierung eventuell auftretender additiver oder synergistischer Effekte wurde schließlich eine Kombinationstherapie mit rh FGF-4 und rh GM-CSF untersucht.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. Das Blutgefäßsystem

Das Blutgefäßsystem umfasst alle Organe des Körpers und übernimmt die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie die Entsorgung von Stoffwechselprodukten. Zum Kreislaufsystem sind das Herz, die Blut- und Lymphgefäße zu zählen. Das Blutgefäßsystem besteht aus dem Herzen und den Blutgefäßen.

2.1.1. Die Arterien

Die Arterien (gr. *arteria*, Luftröhre) wurden im klassischen Griechenland für Luftleiter gehalten, woraus sich ihre Bezeichnung ergab¹¹. Sie transportieren im großen Kreislauf sauerstoff- und nährstoffreiches Blut. Vom Herz ausgehend zweigen sie sich immer weiter auf und gehen schließlich in die Kapillargebiete über, in denen der Stoffaustausch stattfindet. Da die Arterien je nach Lokalisation unterschiedlichen Belastungen ausgesetzt sind, ist auch ihr Aufbau unterschiedlich.

2.1.1.1. Physiologie und Morphologie der Arterien

Die vom Herzen ausgehende Aorta und ihre nachfolgenden Hauptarterien sind nach dem elastischen Typ gebaut, sie halten passiv der hämodynamischen Beanspruchung stand. Je weiter eine Arterie vom Herzen entfernt liegt, desto größer wird das Verhältnis von Muskelzellschicht zu Gefäßdurchmesser¹². Zwar nimmt die absolute Dicke der Muskelschicht ab, von etwa 2 mm auf höchstens 20 µm, doch das Lumen der Arterie verkleinert sich in noch größerem Ausmaß, von 30 mm auf höchstens 40 µm. Die Wandschichtung der Gefäße läßt sich bei Arterien des muskulären Typs am deutlichsten unterscheiden. Das lumenaukleidende Endothel sowie die darauf aufliegenden achsenparallelen Fasernetze und die sich nach außen anschließende Tunica elastica interna werden zusammen als Intima bezeichnet. Es folgt eine zirkulär angeordnete, rechts- und linksgewundene glatte Muskelzellschicht, die Media, zu der auch die sich nach außen anschließende Membrana

elastica externa zu zählen ist. Je nach Arteriengröße umfasst die Tunica media bis zu 40 konzentrisch angeordnete Lagen glatter Muskelzellen¹¹.

Die abschließende, bindegewebige Adventitia vereint kollagene, elastische Elemente mit glatten, längs in der Außenschicht verlaufenden Muskelfasern. Sie dient der Einbettung des Gefäßes in das umgebende Gewebe, sowie der Stabilisierung der Gefäßwand¹³.

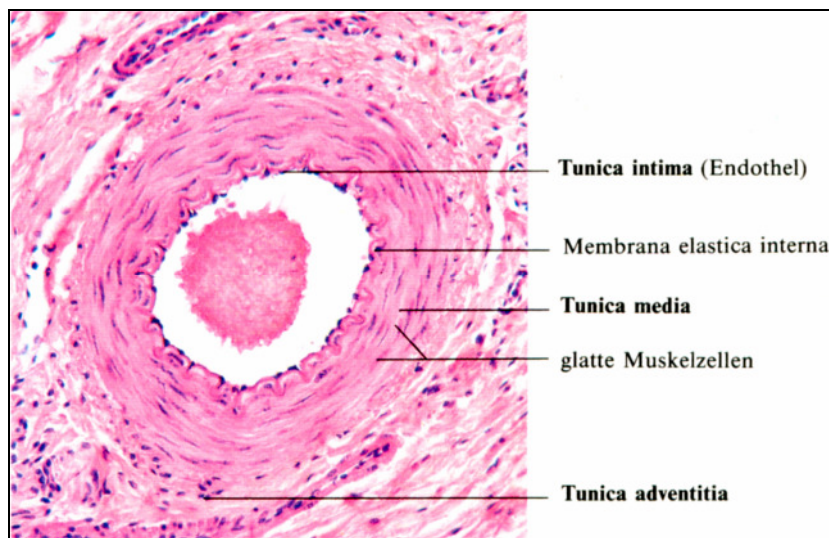


Abbildung 1: Histologisches Darstellung einer kleinen Arterie (H/E-Färbung x165) ¹⁴

2.1.1.2. Die Blutkapillaren

Die Blutkapillaren bilden mit den präkapillären Arteriolen und postkapillären Venolen die terminale Strombahn. Sie besitzen im Vergleich zu den Arterien eine geringere Anzahl an Wandschichten, wodurch der Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe sowie die Emigration von Abwehrzellen erleichtert wird¹⁵.

Die Innenauskleidung der Kapillaren besteht aus einschichtigen Endothelzellen. Den Endothelzellen liegt außen eine vollständige oder unterbrochene Basalmembran auf, die neben ihrer Stabilisierungsfunktion auch für die Regulation des Stoffaustausches der Kapillaren verantwortlich ist. In den Kapillaren sind insgesamt nur etwa 8% des Blutvolumens enthalten¹¹. Wären alle Kapillaren gleichzeitig geöffnet, könnten sie die gesamte Blutmenge des Körpers aufnehmen.

2.1.2. Das venöse Blutgefäßsystem

Die Blutgefäßsystem bringt das sauerstoffarme mit Stoffwechselprodukten angereicherte Blut aus der Peripherie zum Herzen zurück.

Beim Aufbau der Venen überwiegt das kollagene Bindegewebe. Glatte Muskulatur ist ausgebildet, aber eine kompakte muskulöse Media, sowie eine Lamina elastica interna sind nicht vorhanden¹².

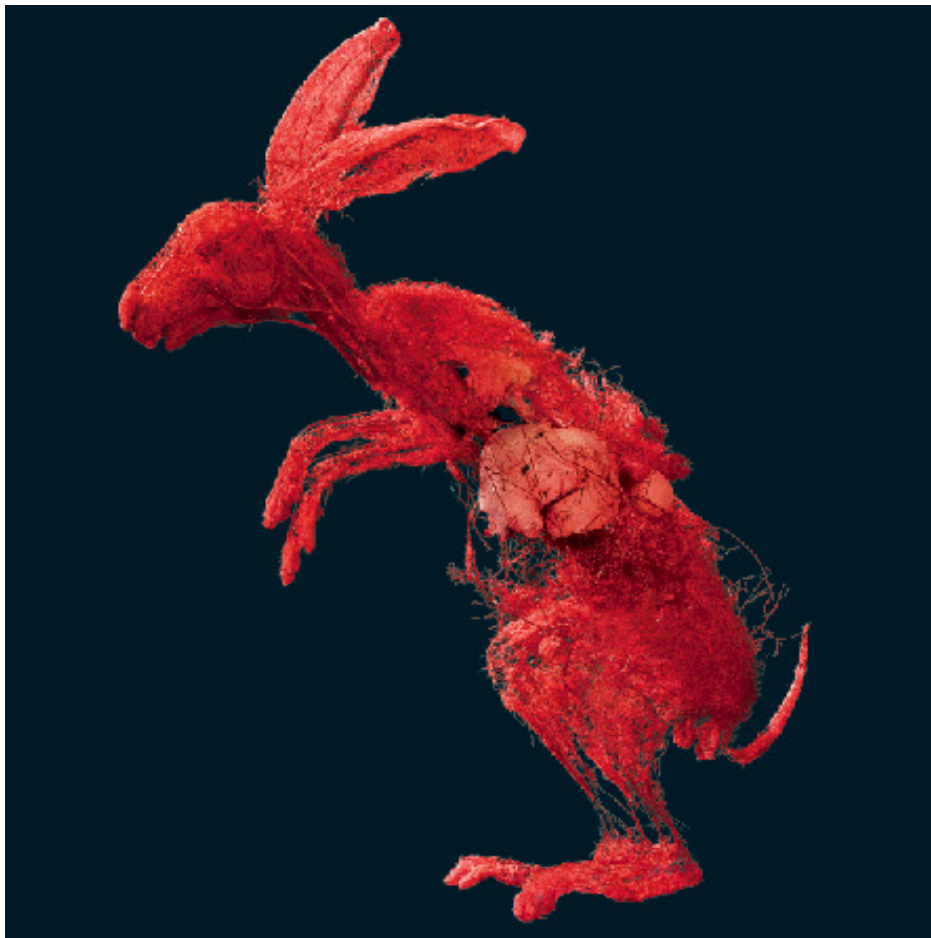


Abbildung 2: Plastinat des Blutgefäßsystems eines Kaninchens. (Mit freundlicher Genehmigung von Gunther von Hagens Institut für Plastination, Heidelberg, Germany)¹⁶

2.2. Die Gefäßneubildung

Neben der Entstehung des Blutgefäßsystems während der frühen Embryonalentwicklung sind danach weitere Wachstumsvorgänge essentiell für die Entwicklung und Aufrechterhaltung von Geweben und Organen.

Man klassifiziert drei verschiedene Formen der Gefäßbildung, nämlich Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese.

2.2.1. Vaskulogenese

Der Terminus Vaskulogenese beschreibt die Bildung des frühen Gefäßplexus während der Embryonalentwicklung². Der erste Schritt zur Entstehung des Blutgefäßsystems ist die Differenzierung endothelialer Vorläuferzellen aus dem Mesoderm. Diese Vorläuferzellen werden Angioblasten genannt. Die Angioblasten wandern aus, differenzieren sich zu soliden Strängen und bilden Blutinseln. Diese Blutinseln sind die ersten erkennbaren Gefäßstrukturen¹⁷ und führen durch Fusion zur Ausbildung des primitiven vaskulären Netzwerks¹⁸.

Weitere Wachstums- und Anpassungsvorgänge, deren Ziel es ist, ein ausgereiftes Gefäßsystem zu erstellen, werden unter dem Terminus Angiogenese zusammengefasst.

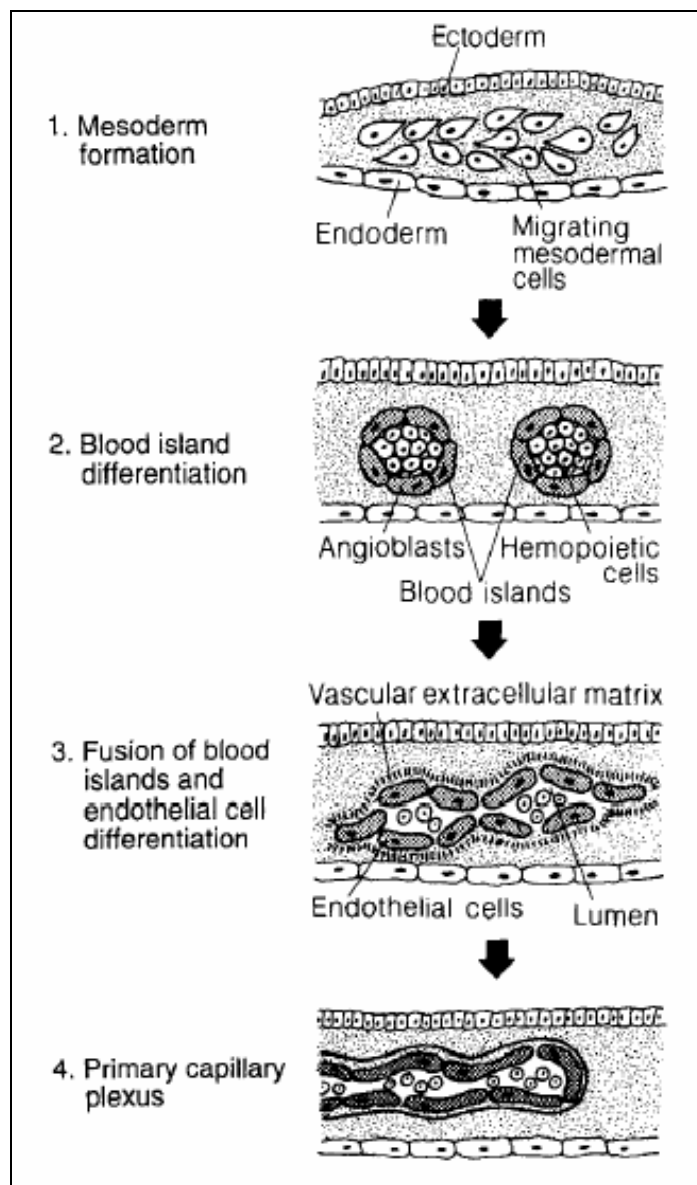


Abbildung 3: Schematische Abbildung der Vaskulogenese¹⁷

1. Bildung des Mesoderm

2. Blutinseldifferenzierung

3. Fusion der Blutinseln und Differenzierung der Endothelzellen

4. Entstehung des primären Gefäßplexus

2.2.2. Angiogenese

Angiogenese bezeichnet die Neubildung von Kapillaren, ausgehend von bestehenden Blutgefäßen⁴.

Angiogenese wurde zum ersten Mal 1935 von Hertig definiert⁹, um die Bildung neuer Gefäße in der Plazenta zu beschreiben. Später wurde dieser Begriff von Folkman aufgegriffen, der die Vaskularisation solider Tumoren hiermit in Verbindung brachte¹⁹. Mittlerweile ist bekannt, dass Angiogenese ein Prozess ist, der nicht nur während der embryonalen Entwicklung, sondern auch in adulten Organismen auftritt, sowohl unter physiologischen als auch

pathologischen Bedingungen (z.B. bei Follikulogenese, Wundheilung, Tumorentstehung, Retinopathien und rheumatischer Arthritis)^{9,20}.

Der Angiogenese liegen zwei verschiedene Mechanismen zur Bildung neuer Gefäße zu Grunde. Kapillaren können aus schon bestehenden Gefäßen auswachsen (Sprossung) und neue Gefäße können sich durch längsgerichtete Einstülpung von Gefäßwänden bilden, so dass aus einem Gefäß, zwei neue entstehen (Intussuszeption).

2.2.2.1.Vorgang und Regulation der Angiogenese

Der komplexe Vorgang der Angiogenese beginnt mit einer Dilatation und erhöhten Permeabilität des betroffenen Gefäßabschnittes. Hierauf folgen endotheliale Migrationen und Proliferationen. Zur Neuordnung der Gefäßwände finden extrazelluläre Proteolysen und endotheliale Differenzierungen in Form von Röhrenbildung statt. Zuerst sammeln sich die Endothelzellen in der extrazellulären Matrix an, verbinden sich und formen schließlich das Lumen des neu gesprossenen Gefäßes.

Der Hauptstimulus zur Sprossung neuer Gefäße, bzw. zur längsgerichteten Einstülpung von Gefäßen ist Gewebshypoxie. Die Hypoxie verursacht die Induktion des Hypoxie-induzierten-Faktors-1 (Hypoxia-inducible-Factors-1, HIF-1). HIF-1 ist der einzige bekannte in Säugern vorkommende Faktor, der allein aufgrund physiologisch relevanter Grade von Hypoxie vermehrt exprimiert wird. Im Anschluss an den Anstieg von HIF-1 erfolgt der erste morphologisch erkennbare Schritt der Angiogenese, die Gefäßdilatation. Sie wird durch Stickstoffmonoxid (NO) vermittelt, das u. a. eine vermehrte Transkription des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) induziert²¹. VEGF ist ein sezerniertes Mitogen mit angiogenen Eigenschaften und hoher Spezifität für Endothelzellen. VEGF trägt u.a. zum Anstieg der vaskulären Permeabilität aufgrund einer Verminderung der Zell-Adhäsionsmoleküle, wie z.B. des Plättchen-Endothelzell-Adhäsions-Molekül-1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1) und des vaskulären endothelialen Cadherin (vascular endothelial-, (VE)-cadherin) bei und löst Veränderungen in der Zellmembranstruktur durch Induktion verschiedener Kinasen aus. Hierauf folgt die Extravasation von Plasma-Proteinen, die für die auswandernden Endothelzellen eine positive Umgebung schaffen.

Weiterhin ist der Abbau der Extrazellulärmatrix und der Basalmembran notwendig, damit die sich teilenden Endothelzellen migrieren können. Für die Degradationsprozesse sind Proteasen

verantwortlich, vor allem die Matrix-Metallo-Proteasen (MMP). Hier sind vor allem MMP-2, -3 und -9 am Sprossen von Gefäßen beteiligt²².

2.2.3. Arteriogenese

Im Gegensatz zur Vaskulo- und Angiogenese stellt die Arteriogenese einen Vorgang dar, bei dem sich schon existierende, also präformierte Gefäße durch Zellproliferation und Umstrukturierung (Remodelling) weiterentwickeln²³. Arteriogenese findet im adulten Organismus statt, wenn eine Hauptarterie (z.B. Koronar- oder Femoralarterie) akut oder chronisch stenosierte ist und der Blutfluss durch natürliche Umgehungskreisläufe wiederhergestellt wird. Die Arteriogenese geht im Allgemeinen von vollständig angelegten, dünnwandigen Arteriolen-artigen Gefäßen aus, die aus Endothelzellschicht, Lamina elastica interna und glatten Muskelzellschichten bestehen. Diese prä-existierenden Kollateralarterien sind Teil eines arkadenartigen Gefäßnetzwerkes im Perfusionsgebiet²³. Sie kommen vor allem in Skelettmuskulatur vor, wo jeweils das proximale und distale Ende des Muskels an versorgende Arterien angeschlossen ist. Die prä-existierenden Kollateralarterien verbinden beide Gefäßäste im mittleren Teil des Muskels. Innerhalb dieser Arteriolen ist der Blutfluss nicht unidirektional, sondern es besteht eher ein oszillierender Blutfluss. Da diese kleinen Gefäße unter physiologischen Bedingungen nicht essentiell sind, ist wahrscheinlich ein embryonaler Entwicklungsprozess für ihre Existenz verantwortlich. Hierbei blieb die terminale Differenzierung des primären Gefäßnetzwerkes zu Endarterien unvollständig.

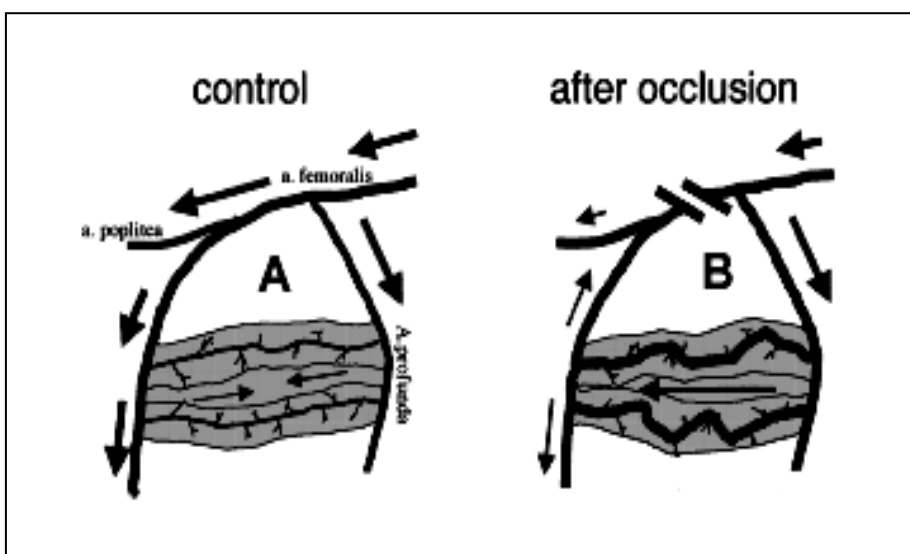


Abbildung 4: Prä-existierende Kollateralgefäße sind vollständig entwickelte Arteriolen, die arterielle Arkaden formen. Die Pfeile geben die Richtung des Blutflusses vor und nach Verschluss der Hauptarterie an.²⁴

Im Kaninchen besitzen diese prä-existierenden Kollateralgefäße einen Durchmesser von ca. 50 μm , bestehen aus ein bis zwei Lagen glatter Muskulatur und sind morphologisch nicht von normalen Arteriolen unterscheidbar²³.

Im Verlauf des Wachstums nehmen die Kollateralgefäße eine typische korkenzieherartige Struktur an, die wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass nicht nur eine Zunahme des Querschnitts stattfindet, sondern auch eine Längenzunahme².

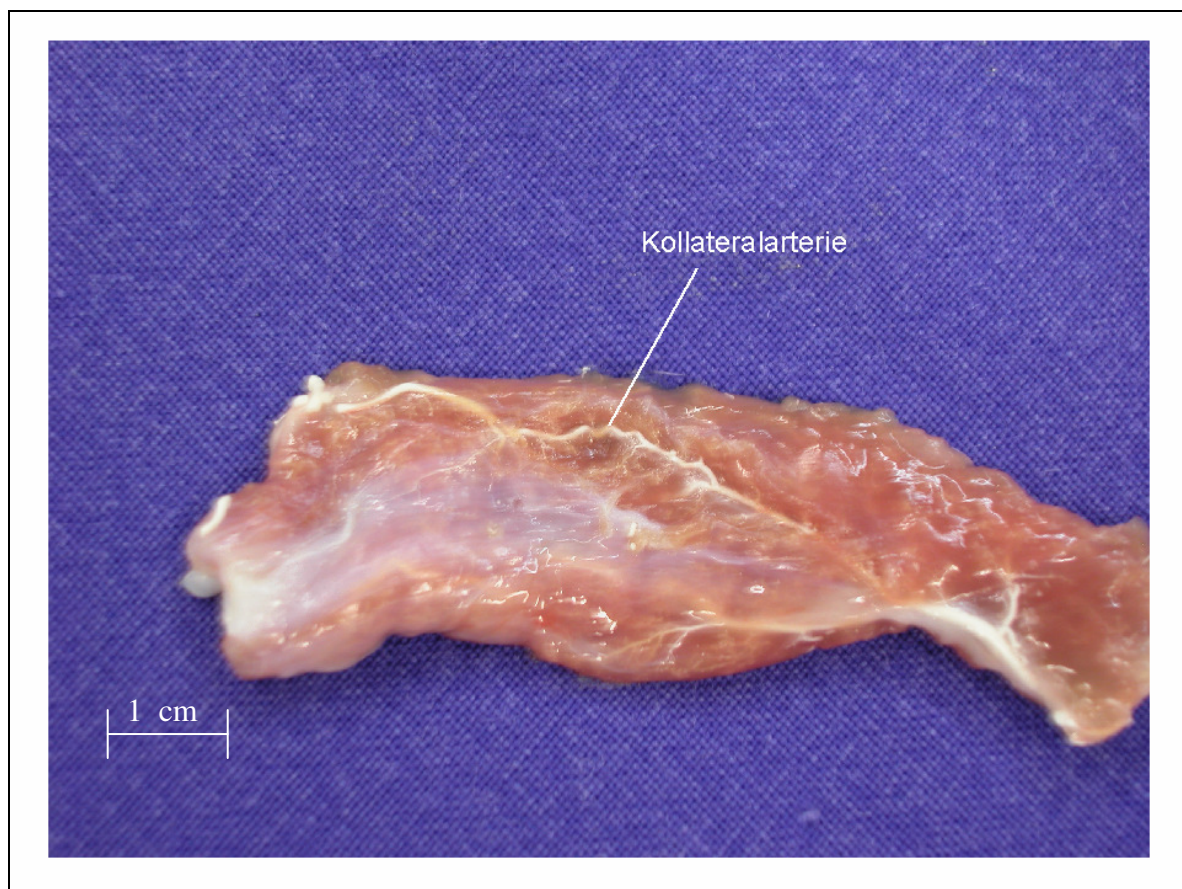


Abbildung 5: Darstellung eines Kollateralgefäßes im Bereich des M. vastus intermedius eines Kaninchens. Die Gefäße wurden zuvor mit weißem Bariumsulfat-haltigem Kontrastmittel gefüllt.

2.2.3.1. Die Induktion der Arteriogenese

Im Falle der akuten oder chronischen Okklusion einer größeren Arterie kommt es zu einem steilen Druckgradienten entlang der Arteriolen, die diesen Defekt überbrücken.

Unter physiologischen Bedingungen ist in den Kollateralanastomosen nur ein minimaler Blutfluss vorhanden, der nun um ein Vielfaches ansteigt. Der gesteigerte Blutfluss in diesen Gefäßen induziert physikalische Kräfte, die auf die Gefäßwand wirken. Neben Blutdruck-basierenden Kräften ist dies vor allem die Schubspannung („shear stress“), die die Endothelzellen der Gefäßwand beeinflusst.²⁵ Es wird angenommen, dass der initiale Auslöser der Arteriogenese die erhöhte Schubspannung ist.²⁶ Die normalerweise in der A. femoralis vorherrschende Schubspannung beträgt $4,8 \times 10^{-3} \text{ dyn/cm}^2$. Die Schubspannung, die nach Okklusion dieses Gefäßes in den überbrückenden Anastomosen vorherrscht, beträgt ca. $889 \times 10^{-3} \text{ dyn/cm}^2$.

2.2.3.2. Aktiviertes Endothel

Die Transduktion des initialen Signals der erhöhten Schubspannung von der Zellmembran in den Zellkern ist bisher nur teilweise geklärt. Die Signalübermittlung geschieht u.a. über ein Protein, das im Zellkern an ein Schubspannungs-verantwortliches-Element (shear-stress-responsive-element) bindet und die Grundlage für die Expression der endothelialen Stickoxyd-Synthetase (eNOS), des Plättchen-abstammenden-Wachstumsfaktors (platelet-derived-growth-factor, PDGF) und des Monozyten-chemoattraktives-Proteins-1 (Monocyte-chemoattractant-protein-1, MCP-1) ist^{9,27}.

Der erste Schritt der Aktivierung des Endothels ist die Öffnung der Chlorid-Kanäle, die für die Volumenkontrolle der Zelle verantwortlich sind. Hierdurch erhält das Schubspannungs-aktivierte Endothel im elektronenmikroskopischen Bild ein Ödem-artiges Aussehen.

Des weiteren werden vermehrt Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche exprimiert und somit die Adhäsion und Migration zirkulierender Blutzellen gefördert.

2.2.3.3. Zirkulierende Zellen

Das durch die Schubspannung aktivierte Endothel bildet vermehrt MCP-1²⁷, außerdem erfolgt eine Induktion der Adhäsionsmoleküle. Dies führt zu einer Anlockung von Monozyten aus dem Blut, die mit der Gefäßwand interagieren, an diese adhären und transmigrieren.

Gleichzeitig werden Monozyten aktiviert²⁸, sie produzieren daraufhin u.a. MCP-1 und locken hierdurch weitere Monozyten an. Plättchen haften ebenfalls an das aktivierte Endothel an und setzen verschiedene Wachstumsfaktoren (z.B. Interleukin-4 und PDGF) frei, die das Endothel zu weiterer Expression von Adhäsionsmolekülen anregen.

Außerdem verstärkt das Endothel die Produktion des Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktors (GM-CSF), was die Überlebenszeit der Monozyten verlängert. Sie sind so in der Lage, große Mengen an weiteren Wachstumsfaktoren (z.B. Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2 (FGF-2)) zu bilden, die die Umstrukturierung des Gefäßes beeinflussen⁹.

Im Anschluss an die Adhäsion und Invasion der Monozyten und Plättchen vollziehen sich bald die ersten Mitosen der Endothel- und glatten Muskelzellen. Dieser Vorgang beginnt in den präformierten Kollateralgefäßen etwa ab 24 Stunden nach akuter Okklusion im Tiermodell²³.

Monozyten dringen anfangs vor allem in die Intima ein, sind später jedoch vermehrt in der Adventitia zu finden, wo sie eine entzündliche Umgebung schaffen. Diese Entzündungsreaktion hat die Auflösung der Basalmembran des Gefäßes zur Folge. Außerdem wird im umgebende Gewebe Raum für das sich neu entwickelnde Gefäß geschaffen⁹, das seinen Durchmesser bis zu 20-fach erhöhen kann.

2.2.3.4.Proliferation und Neuordnung (=Remodelling)

Damit aus präformierten Kollateralen ein Kollateralgefäß entstehen kann, muß die alte Gefäßstruktur in weiten Teilen abgebaut und ersetzt werden. Hierbei werden zwei Phasen unterschieden: Proliferation und Remodelling.

Im Zuge der Arteriogenese erfolgen Migrationen und Proliferationen der Endothelzellen, und es finden Mitosen der glatten Muskelzellen statt. Die glatten Gefäßmuskelzellen wandern aus, um eine neue Neointima zu formen. Die sich anordnenden glatten Muskelzellen sind sowohl longitudinal, als auch zirkulär gerichtet und bestehen aus dedifferenzierten Muskelzellen, die die meisten ihrer Differenzierungsmarker inklusive der meisten Aktin-Filamente verloren haben. Sie stellen somit den Synthese-Typ glatter Muskelzellen, im Vergleich zum physiologisch anzutreffenden kontraktile Typ dar.

Bestimmte Muskelzellen, die sich als Synthesetyp der glatten Muskelzellen beschreiben lassen, produzieren extrazelluläre Matrix, Kollagen, Elastin und letztendlich die neue Lamina elastica interna⁹.

2.2.3.5. Die Adaptation der Kollateralgefäße

Nach dem Verschluss eines Gefäßes stoppt die Adaptation der Kollateralen vor dem Erreichen der optimalen Anpassung an die neuen Blutflussgegebenheiten^{29,30,31}. Für die therapeutische Arteriogenese ist aber von großer Bedeutung, die Periode des Wachstums zu verlängern bzw. wiederaufzunehmen. Es konnte gezeigt werden, dass Gefäßwachstum zum einen durch die Stimulation von Monozyten¹⁰, zum anderen aber auch durch die Aktivierung von Endothelzellen⁴ verbessert werden kann.

Die kombinierte Stimulierung von Monozyten und weiteren Zellarten, wie z.B. Endothelzellen könnte möglicherweise einen noch stärkeren arteriogenen Stimulus darstellen.

2.3. Bedeutung der Leukozyten für die Arteriogenese

Innerhalb der letzten Jahre konnten anhand verschiedener Tiermodelle wesentliche Teile der an der Arteriogenese beteiligten Prozesse geklärt werden. Hauptansatzpunkte zur Stimulierung des kollateralen Gefäßwachstums finden sich momentan in der gezielten Anreicherung von Monozyten durch verschiedene Wachstumsfaktoren am Einsatzort, d.h. am Ort der gewollten Arteriogenese.

Beim gesunden erwachsenen Menschen treten Leukozyten in der Konzentration von 4.000 bis 10.000/ µl Blut auf, beim Kaninchen existieren Angaben von 3.000 bis 11.000 Leukozyten/µl Blut^{32, 33}. Im Kaninchenblut lassen sich drei leukozytäre Subpopulationen unterscheiden:

- ◆ Monozyten (1-4 %)
- ◆ Granulozyten (Neutrophile 20-75 %, Basophile 2-7 %, Eosinophile 0-4 %)
- ◆ Lymphozyten (30-85 %)

Alle weißen Blutkörperchen stammen gemeinsam mit den Erythrozyten und Thrombozyten von den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen ab. Granulozyten und Monozyten entstehen im Knochenmark unter dem Einfluss bestimmter Glykoprotein-Gewebshormone, den Kolonie-stimulierenden Faktoren (CSFs)³⁴.

Die Vorläufer der Lymphozyten sind die ersten Entwicklungsstufen, die von der gemeinsamen Stammzelllinie abweichen, wobei die Lymphozyten selbst unter dem Einfluss von Interleukin-2 in sekundären lymphatischen Organen gebildet werden. Die Hauptaufgaben der Leukozyten liegen in der Infektabwehr und Phagozytose. Je nach Leukozytentyp sind hierfür verschiedene Enzyme vorhanden, zu denen Proteasen, Peptidasen, Lipasen und Desoxyreduktasen gehören. Über 50 % der Leukozyten halten sich im extravasalen, interstitiellen Raum auf, während sich mehr als 30 % im Knochenmark befinden¹². Mit Ausnahme der Granulozyten stellt das Blut offenbar vornehmlich einen Transportweg der Leukozyten von den Bildungsstätten im Knochenmark und den lymphatischen Geweben zu den Einsatzorten dar.

Zur Stimulation des Gefäßwachstums werden hohe lokale Konzentrationen u.a. an leukozytären Wachstumsfaktoren benötigt, da die Leukozyten zuerst aus dem Blutstrom in das umliegende Gewebe transmigrieren müssen³⁵.

Durch chemotaktisch wirksame Stoffe (z.B. Interleukin-8, den Komplementfaktor C5a, Eikosanoide, den Plättchen-aktivierende-Faktor und MCP-1) werden die Leukozyten, vor allem Monozyten angelockt. Eine entscheidende Rolle bei der Migration der Leukozyten spielen Endothelzellen, da sie bestimmte Oberflächenmoleküle für die leukozytäre Interaktion besitzen. Der Prozess der leukozytären Migration beinhaltet drei Stufen, nämlich das Rollen, die Adhäsion und die Diapedese (Transmigration) durch die Gefäßwand³⁶.

2.3.1. Regulation der Leukozytendiapedese

Die Regulation der Leukozytendiapedese erfolgt über die Modulation verschiedener Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche von Endothelzellen und Leukozyten.

Es wurde gezeigt, dass die Expression dieser Adhäsionsmoleküle (z.B. Selektine, Integrine) auf der Oberfläche des Gefäßendothels durch erhöhte Schubspannung induziert wird²³. Selektine sind in der Lage, auf der Oberfläche von Leukozyten bestimmte

Karbohydratstrukturen von Glykoproteinen zu erkennen und zu binden. Sie ermöglichen so eine reversible Anbindung (sog. Tethering) der Leukozyten an die Endothelzellen, wodurch das Rollen³⁷ der Leukozyten mit dem Blutstrom in Erscheinung tritt³⁸.

Die Adhäsion der Leukozyten an die Gefäßwand wird durch Integrin-Verbindungen moduliert. Hierbei spielen zwei heterodimere Integrine (Mac-1 und LFA-1) auf der Oberfläche der Monozyten eine dominierende Rolle. Ihre entsprechenden Partner auf den Endothelzellen sind interzelluläre Adhäsionsmoleküle, ICAM-1 und ICAM-2^{36,39}. Aufgrund dieser Interaktionen wird eine feste Adhäsion der Leukozyten an die Gefäßwand erreicht, die Transmigration der Leukozyten in subendotheliale Bereiche kann sich nun anschließen.

Auf der Oberfläche von Endothelzellen findet die Regulation der Adhäsionsmoleküle im wesentlichen durch Konformationsveränderungen der Molekülstruktur statt. Die Leukozyten regulieren dagegen die Leukodiapedese vor allem durch eine Expressionssteigerung ihrer Adhäsionsmoleküle^{36,38}.

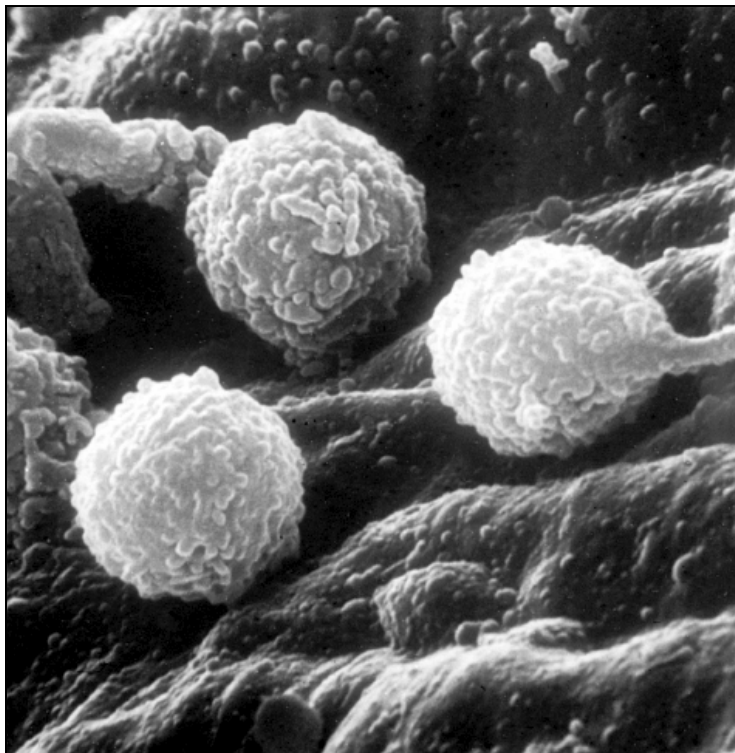
2.3.2. Stimulierung der Arteriogenese durch Monozyten

Innerhalb der letzten Jahre konnte gezeigt werden, dass den Monozyten eine wichtige Funktion in der Arteriogenese zukommt¹⁰. Die Stimulation der Monozyten, z.B. durch intraarterielle Gabe von MCP-1, bewirkt eine deutliche Stimulierung der Arteriogenese¹⁰. Sowohl im Tiermodell als auch in einer klinischen Studie konnte gezeigt werden, dass die Verlängerung der Lebenszeit der Monozyten durch den Granulozyten- und Makrophagen-Kolonie stimulierenden Faktor (GM-CSF) ein schnelleres und besser adaptiertes Kollateralwachstum bewirkt^{40,41}.

Heil et al. konnten die bedeutende Rolle der Monozyten in der Arteriogenese beweisen, indem sie ein stark verringertes Gefäßwachstum in Tieren feststellten, bei denen die Blutmonozyten stark dezimiert worden waren. Sobald es zu einem Anstieg der Monozytenzahl kam, wurde auch die Arteriogenese wieder verstärkt¹⁰.

Die Schlüsselrolle der Monozyten wird u. a. durch die monozytäre Produktion von bFGF und TNF α erklärt, beides Zytokine mit bekannter stimulierender Wirkung auf die Arteriogenese. Außerdem wurde festgestellt, dass bFGF die Effekte von VEGF verstärkt und anders als VEGF auch direkten Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung glatter Muskelzellen

hat^{42,43}. $\text{TNF}\alpha$, ein Zytokin, das vornehmlich von aktivierten Makrophagen produziert wird, ist einer der Hauptinitiatoren der Inflammation, wobei gezeigt werden konnte, dass eine Inhibition von $\text{TNF}\alpha$ mit einer Hemmung der Arteriogenese einhergeht. $\text{TNF}\alpha$ fördert die vermehrte Ausbildung von Adhäsionsmolekülen auf der Endothelzelloberfläche, wodurch wiederum die Anlockung und Adhäsion von Monozyten begünstigt wird³⁵.



*Abbildung 6:
Elektronenmikroskopische
Aufnahme von Monozyten am
Gefäßendothel⁴⁴*

2.3.3. Der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF)

GM-CSF ist ein Zytokin, das die Mobilisation von Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmark in das zirkulierende Blut stimuliert⁴⁵. Weiterhin ist es in der Lage, schon ausdifferenzierte Monozyten zu aktivieren und deren Lebensdauer zu verlängern⁴⁶.

GM-CSF ist beteiligt an der Regulation der Proliferation, Differenzierung und Aktivierung hämatopoietischer, als auch nicht hämatopoietischer Zellen. Er wird von einer Vielfalt normaler Zellen gebildet, u.a. von T-Lymphozyten, Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten, generell aber nur nach vorheriger Aktivierung⁴⁷.

1977 wurde zum ersten Mal das murine GM-CSF aus Mäuse-Lungenzellen-Erhaltungs-Medium isoliert. Es wurde festgestellt, dass dieses Protein je nach Konzentration eine verstärkte Formation von Granulozyten oder Makrophagen aus murinem Knochenmark bewirkt⁴⁸. Erst sechs Jahre später wurde das humane GM-CSF zum ersten Mal identifiziert und zwar als ein regulatorisches Protein mit der Fähigkeit, das Wachstum von Granulozyten- und Makrophagen-Kolonien im humanen Knochenmark zu stimulieren⁴⁹.

Neben GM-CSF wurden noch drei weitere Kolonie-stimulierende Faktoren (CSF) identifiziert. Es handelt sich hierbei um den Makrophagen-Kolonie-stimulierenden-Faktor (M-CSF), den Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF) und den Multi-Kolonie-stimulierenden Faktor (Multi-CSF), der schließlich zu Interleukin-3 (Il-3) umbenannt wurde⁴⁶.

Humanes GM-CSF hat ein errechnetes Molekulargewicht von 22kDa. Durch unterschiedliche Glykosylierung sind Größen von 20 bis 200 kDa möglich⁵⁰. Das eigentliche GM-CSF-Protein besteht aus 124 Aminosäuren mit dem Molekulargewicht von 14 kDa. Das Polypeptid beinhaltet vier Zystein-Reste, die über Disulfid-Brücken miteinander verbunden sind.

Die biologische Bedeutung von GM-CSF bezieht sich vor allem auf die Stimulation der Proliferation hämatopoietischer Vorläuferzellen. Die Wirkung von GM-CSF auf vollständig ausdifferenzierte Granulozyten und Makrophagen zeigt sich z.B. im inflammatorischen Milieu, wo GM-CSF von Endothelzellen in hohen Mengen freigesetzt wird. Die Überlebenszeit der Monozyten wird hier durch GM-CSF verlängert und ihre Zellmobilität und Phagozytoseaktivität werden erhöht. Außerdem wird die Synthese biologisch aktiver Moleküle (z.B. bFGF, MCP-1, Metalloproteasen) gefördert⁴⁰, genauso wie die Antikörper-abhängige Zytotoxizität und die verstärkte Expression verschiedener Membranmarker⁴⁶.

Des weiteren bewirkt TNF- α über die Aufregulierung von GM-CSF sowohl ein verstärktes Anheften als auch eine stärkere Aktivierung von Monozyten⁴¹.

2.3.3.1. Der GM-CSF-Rezeptor

Obwohl GM-CSF und Il-3 eine überlappende Funktionen in Bezug auf die meisten Vorläuferzellen des Knochenmarks haben, gibt es zwischen beiden Faktoren keine

Sequenzhomologie. Das weist darauf hin, dass unterschiedliche Rezeptoren für diese beiden Zytokine auf den Zielzellen vorhanden sind⁵¹. Trotzdem besitzen beide Faktoren wahrscheinlich gemeinsame Signalübertragungs-Rezeptoruntereinheiten, die sie sich auch mit den Il-5-Rezeptoren teilen.

Granulozyten, Monozyten und Makrophagen exprimieren u.a. Rezeptoren für GM-CSF auf der Zelloberfläche. Hierbei nimmt die Anzahl der Rezeptoren mit voranschreitender Reifung der Zellen ab, außerdem gibt es starke Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelltypen. So besitzen ausgereifte eosinophile Granulozyten nur die Hälfte der GM-CSF Rezeptoren der neutrophilen Granulozyten.

Die meisten murinen Granulozyten und Monozyten bilden drei oder vier unterschiedliche Rezeptoren für die CSF aus, wobei sich die Ligandenbindung des einen CSF teilweise direkt auf die Rezeptorenanzahl eines oder mehrerer anderer CSF auswirkt⁴⁶.

Der Rezeptor für GM-CSF besteht aus zwei Untereinheiten der α - und der β_c -Kette. Beide Untereinheiten sind aus einer extrazellulären Domäne aufgebaut, die in die Ligandenbindung miteinbezogen wird, einer transmembranären Domäne, die die Ketten in der Zellmembran verankert und einer zytoplasmatischen Domäne, die die Signalübertragung übernimmt.

Die α -Kette, ein Protein mit dem Molekulargewicht von 80 kDa, bindet mit geringer Affinität den Liganden, ist aber nicht fähig, alleine das Signal zu übertragen⁵¹. Diese Kette scheint u.a. eine Rolle beim Glukosetransport zu spielen⁵².

Die β_c -Kette (Molekulargewicht von 120.000) besitzt nicht die Fähigkeit, den Liganden zu binden, hat aber eine hohe Affinität zum Liganden-tragenden α -Ketten-Komplex. Durch die Ausbildung von Disulfidbrücken verbinden sich beide Ketten. Wahrscheinlich erfolgt nach Verbindung der Ketten eine Rezeptor-Dimerisation, ein in der Zytokin-Rezeptor-Superfamilie üblicher Vorgang, der als Voraussetzung zur Rezeptor-Aktivierung angesehen wird⁵¹.

Neben den Merkmalen, die der GM-CSF-Rezeptor mit anderen Zytokin-Rezeptoren teilt, besitzt er auch ungewöhnliche Charakteristika. So tritt eine lösliche Isoform der α -Kette aufgrund alternativen Spleißens auf, die von allen Zellen gebildet wird, die auch die normale α -Kette des GM-CSF-Rezeptors exprimieren. Diese lösliche Isoform, genannt sol α , besitzt die vollständige extrazelluläre Domäne, die mit der α -Kette identisch ist. Allerdings sind

die transmembranären und die zytoplasmatischen Domänen vollständig durch eine C-terminale Domäne aus 16 Aminosäuren ersetzt⁵³.

Besteht eine Koexpression von $\text{sol}\alpha$ und der β_c -Kette, so ist es $\text{sol}\alpha$ möglich, GM-CSF zu binden. Wird diese lösliche Isoform aber von Zellen ausgebildet, die keine β_c -Kette herstellen, kann sie auch nicht ihren vermeintlichen Liganden binden, was dafür spricht, dass β_c die geringe Bindungsaffinität des $\text{sol}\alpha$ kompensieren kann. Des weiteren können $\text{sol}\alpha$ und β_c einen Liganden-unabhängigen Komplex bilden, wobei diese Assoziation durch die C-terminale Domäne des $\text{sol}\alpha$ vermittelt wird.

Die zweite für Zytokinrezeptoren eher ungewöhnliche Eigenschaft des GM-CSF-Rezeptors ist dessen Fähigkeit, zwei Rezeptor-Typen auszubilden.

1. Ein induzierbarer Rezeptor (wie bei anderen Zytokin-Rezeptoren)
2. Ein vorgefertigter (präformierter) Rezeptor-Komplex

Die präformierten Rezeptor-Komplexe bilden sich unter Abwesenheit des Liganden. Die Anzahl der präformierten Rezeptorkomplexe variiert von Zelle zu Zelle, wobei in einigen Fällen die vorhandenen GM-CSF-Rezeptoren schon miteinander verbunden sind und nach Ligandenbindung keine weitere Assoziation stattfindet. Die präformierten Komplexe stellen wahrscheinlich die GM-CSF-Rezeptoren dar, die GM-CSF mit hohen Geschwindigkeit binden, die nicht präformierten Komplexe, das heißt noch freie α - und β_c -Ketten, binden den Liganden in einem längeren Zeitintervall⁵¹.

Monozyten, die viele präformierte GM-CSF-Rezeptor-Komplexe besitzen, können folglich schneller auf GM-CSF als auf andere Zytokine (speziell Il-3 und Il-5) reagieren und so eine schnellere Adhäsion aufgrund eines GM-CSF-Stimulus ausbilden. Das basiert darauf, dass GM-CSF, Il-3 und Il-5 in Konkurrenz um die β_c -Kette in ihren Rezeptoren stehen. Die präformierten GM-CSF-Rezeptor-Komplexe verfügen über eine Liganden-unabhängige Beschlagnahme der β_c -Kette, wodurch sie sich einen zeitlichen Vorteil gegenüber den induzierbaren Rezeptoren verschaffen⁵³.

2.3.3.2. Die Rolle von GM-CSF in der Arteriogenese

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Monozyten eine entscheidende Rolle beim Wachstum von Kollateralarterien spielen, wurde versucht, mittels GM-CSF die Arteriogenese verstärken.

Auch die Tatsache, dass GM-CSF in Endothelzellen, die einer erhöhten Schubspannung ausgesetzt sind, verstärkt produziert wird⁴⁷, weist darauf hin, dass GM-CSF für die Arteriogenese von Bedeutung sein könnte.

GM-CSF sollte eine Stimulation und verstärkte Mobilisierung der Monozyten bewirken, bzw. einen antiapoptotischen Stimulus für diese Zellpopulation darstellen. Die Monozyten können somit durch GM-CSF in die optimale Lage versetzt werden, ein Maximum an Wachstumsfaktoren bilden zu können, um die Arteriogenese zu fördern.

In einer klinischen Studie bei Patienten mit Herzgefäßerkrankungen konnte festgestellt werden, dass GM-CSF nach kombinierter intrakoronarer und subkutaner Injektion die kollaterale Durchblutung nach kurzer, vorübergehender Verabreichung verbessert⁴¹.

Allerdings löst GM-CSF auch eine Aktivierung des Immunsystems und damit inflammatorische Reaktionen aus. Die Aktivierung des Immunsystems führt jedoch zu einer schlechteren Prognose bei Patienten mit koronaren Herzerkrankungen⁵⁴. Inwieweit eine sehr kurzfristige Aktivierung des Immunsystems sich hier nachteilig auswirkt, ist bisher nicht bekannt⁵⁵.

Am Kaninchenmodell der ischämischen Hintergliedmaße wurde nach einwöchiger intraarterieller Infusion von rh GM-CSF ein deutlicher Anstieg in Anzahl, Durchmesser und Leitfähigkeit der Kollateralen festgestellt. Diese Ergebnisse wurden auf eine verlängerte Lebenszeit und dadurch eine verstärkte Produktion von Wachstumsfaktoren durch die Monozyten zurückgeführt⁴⁰.

2.3.3.3. Der rekombinante humane Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor

Bei der rekombinanten Herstellung von humanem GM-CSF ist das Expressionssystem dafür verantwortlich, ob das entstehende Protein glykosyliert ist oder nicht.

Bakterielle Expression von rh GM-CSF (z.B. durch *Escherichia coli*) erzeugt nicht-glykolysierte Moleküle (Molgramostim), während Hefen (z.B. *Saccharomyces cerevisiae*) oder Säugerzellen (Chinese-Hamster-Ovary-Cells) glykosylierte Proteine erzeugen (Sargramostim, bzw. Regramostim). Die glykosylierte Form besitzt im Vergleich zur nicht glykolysierten Form eine geringere spezifische Aktivität und eine niedrigere Rezeptoraffinität⁵⁶. Weiterhin steht die Stärke der Glykosylierung mit der Immunogenität in Verbindung.

2.4. Bedeutung der Endothelzellen für die Arteriogenese

2.4.1. Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-4

Die Migration und Proliferation von Endothelzellen stellt einen essentiellen Schritt der Arteriogenese dar^{9,57}.

Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF) stimulieren die Proliferation, Migration und Differenzierung von Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen, Fibroblasten und weiteren Zelltypen⁵⁸⁻⁶³. Zur Zeit sind mehr als 20 Mitglieder der FGF-Familie bekannt, wobei sie eine Homologie von 30-70 % besitzen. Die FGFs binden an 5 unterschiedliche Tyrosin-Kinase-Rezeptoren, die FGFR- 1-5. Sie spielen eine entscheidende Rolle in der Embryonalentwicklung, Gewebsregeneration, Hämatopoese, im Gefäß- und im Tumorwachstum^{64,65}. Der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-4 (FGF-4) bindet vor allem an den FGF-Rezeptor-2, Variante IIIc⁶⁶.

Unabhängig voneinander wurde Mitte der 80er Jahre aus Magenkarzinomen und aus Kaposi-Tumoren DNA isoliert (hst (Human-Stomach-Cancer) und k-FGF), die transformierende Eigenschaften in Zellkulturen hatte^{67,68}. Nach Aufklärung der Gensequenzen der hst- und k-FGF-Gene, wurde erkannt, dass es sich bei dem Genprodukt um das gleiche Protein handelte. Es erfolgte eine Umbenennung zu FGF-4, da eine große Homologie zu FGF-1 und FGF-2, sowohl die genetische Struktur als auch die biologische Aktivität betreffend, bestand⁶⁹.

FGF-4 spielt eine große Rolle bei der Implantation von Blastozyten und ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Lebensfähigkeit des Embryos (FGF-4-gendefekte Mäuse sind nicht lebensfähig)⁷⁰.

Des weiteren ist FGF-4 für die embryonale Entwicklung und das Wachstum der Gliedmaßen mitbestimmend. FGF-4 hat mitogene Wirkung auf Fibroblasten, Melanoblasten, Endothelzellen, embryonale Mesenchymzellen der Gliedmaßen und weitere Zellen. In adulten Organismen tritt FGF-4 vorrangig während der Entstehung von Tumoren auf, jedoch kann dieser Wachstumsfaktor auch im Nervensystem, im Darm und in den Hoden nachgewiesen werden⁷¹.

Möglicherweise wird das schnelle Wachstum einiger Tumoren durch FGF-4 begünstigt, indem es die Tumervaskularisation stimuliert, die auf einen FGF-4-vermittelten Anstieg von VEGF zurückzuführen ist⁷². Außer VEGF steigen auch Matrix-Metalloproteinasen-2 und-9 (MMP)⁷³ und c-ETS-1 nach der Stimulation durch FGF-4 an. Gleichzeitig wird die Produktion des physiologischen MMP-Inhibitors TIMP-1 gehemmt. Das durch FGF-4 vermittelte Gefäßwachstum ist anscheinend VEGF-abhängig. Bemerkenswert ist, dass FGF-4 direkt die Expression von 21 anderen Genen beeinflussen kann, nicht aber die des VEGF-Gens.

2.4.2. Stimulierung der Arteriogenese durch Ad 5.1 FGF-4

In bisher durchgeführten Studien konnte gezeigt werden, dass ein Adenovirus-vermittelter Transfer des FGF-4 Gens im Modell der ischämischen Hintergliedmaße bei der Ratte und beim Kaninchen eine Steigerung der Angio- und Arteriogenese bewirkt⁷⁴.

Die Steigerung der Arteriogenese wird durch das Auftreten zusätzlicher Wachstumsfaktoren wie VEGF, die Induktion der NO-Produktion und den Anstieg von Proteasen erklärt. Der Gentransfer erfolgte jeweils nach intramuskulärer Verabreichung der Vektoren. Nach intraarterieller Gabe konnte im Modell der ischämischen Hintergliedmaße des Kaninchens mit den bisher eingesetzten Methoden kein signifikant erhöhtes Gefäßwachstum erzielt werden⁷⁴.

Das therapeutische Ziel ist der Einsatz des Ad5.1FGF-4 zur Verbesserung myokardialer Minderdurchblutung, wofür eine lokale Transfektion nötig ist.

Am Schwein wurden Studien zur intrakoronaren Applikation dieses Genproduktes durchgeführt. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass eine einzelne intrakoronare Injektion dieses Vektors einen verbesserten myokardialen Blutfluss erbringt⁷⁵⁻⁷⁷. Nach lokaler intrakoronarer Freisetzung des Ad5.1FGF-4 im ischämischen Myokardium dringen die Adenoviren rezeptorvermittelt in die myokardialen Zellen ein. Das Translationsprodukt (FGF-4) wird in das Interstitium sezerniert und bindet sodann an Proteoglykane der extrazellulären Matrix der benachbarten Endothelzellen. Diese werden darauf hin zur Teilung und Migration stimuliert⁷⁸.

Da Ad5.1FGF-4 vielversprechende Ergebnisse im Tierversuch lieferte, wurden bereits klinische Studien an Patienten mit ischämischen Herzkrankheiten durchgeführt^{78,79}. Das Ziel dieser Studien war, das Potenzial und die Sicherheit der Gentherapie mit Ad5.1FGF-4 in Bezug auf die Verbesserung der myokardialen Durchblutung bei ischämischen Herzkrankheiten festzustellen. Die Studien ergaben, dass die virale Expression auf das Herz beschränkt war und nur minimale toxikologische bzw. immunologische Nebeneffekte auftraten. Ein Trend zur Verbesserung der myokardialen Durchblutung wurde festgestellt.

2.4.3. Der vaskuläre adenovirale Gentransfer

Adenoviren sind unbehüllte Viren mit einer linearen Doppelstrang-DNA mit einer Länge von annähernd 36 kB⁸⁰. Die ikosaedrisch-symmetrischen Viruspartikel haben einen Durchmesser von 70-90 nm und sind aus 252 Kapsomeren aufgebaut. Die 12 Kapsomeren an den Eckpunkten (Pentons) besitzen fadenförmige Fortsätze, die „fibers“⁸¹.

Adenoviren sind in der Lage, eine Vielzahl von Zellen und Geweben zu infizieren. Auch sich nicht teilende Zellen werden erfaßt.

Um die Replikation des Gens sicherzustellen, das für den therapeutischen Faktor kodiert, werden bestimmte Promotoren (z.B. der CMV (Cytomegalievirus)-Promotor) vor dieses Gen geschaltet. Des weiteren handelt es sich um replikationsdefekte Viren, die sich im Zielgewebe nicht weiter vermehren und so keine progrediente Infektion auslösen können.

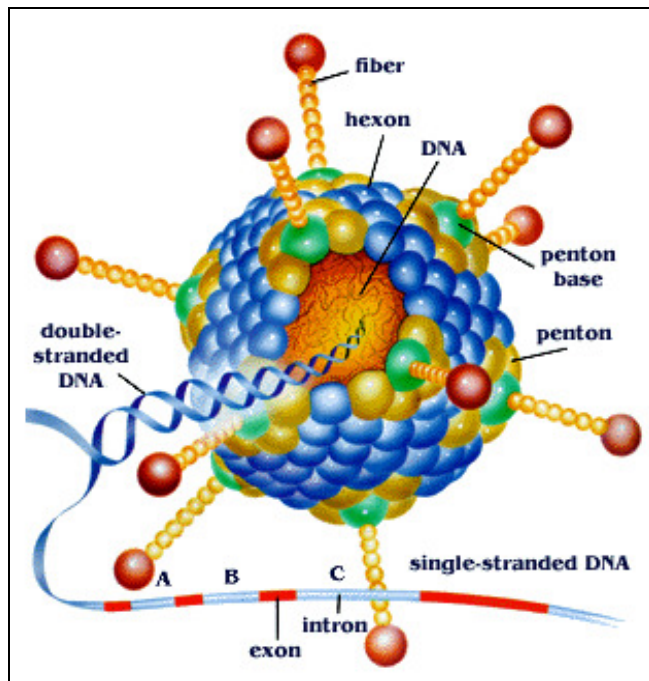


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Adenovirus⁸²

Das Genom der adenoviralen Vektoren ist zusammengesetzt aus Regionen, die in der Replikation früh exprimiert werden, den E1-E4 Regionen, und solchen, die erst spät abgelesen werden, den L1-L5 Regionen. Die Expression wird zum einen über zelluläre Transkriptionsfaktoren kontrolliert, zum anderen aber auch über die E1-Region, die für einen Transaktivationsfaktor kodiert⁸³. Des weiteren spielen die E-Regionen bei der DNA-Replikation und der Suppression der Wirtszellen eine wichtige Rolle. Um replikationsdefekte Viren zu generieren, macht man sich diese Tatsachen zu nutze und entfernt bestimmte für die Replikation essentielle Gene, z.B. E1A und E1B. Um lange Transgene (bis zu 7,5 kB) ins virale Genom zu inserieren, kann zusätzlich die E-3 Region entfernt werden.

Virale Vektoren besitzen grundsätzlich die Fähigkeit, eine Entzündung auszulösen⁸⁴. In deren Folge kommt es zu Gewebsschädigung und zu einem Abfall der Transkription der Genprodukte. Zur Minimierung der inflammatorischen Potenz adenoviraler Vektoren wurden sog. „Backbone“-Vektoren entwickelt, bei denen transkriptional kodierende Regionen entfernt wurden, um die Immunantwort möglichst gering zu halten⁸⁵.

Außerdem besteht die Möglichkeit der parallelen Verabreichung immunmodulierender Arzneimittel oder die Kotretransfektion von Vektoren, die immunmodulatorische Gene exprimieren⁸⁶.

2.4.3.1. Technik des intravasalen Gentransfers

Der intravasale Gentransfer erwies sich in vivo als problematisch, da die glatten Gefäßmuskelzellen nur mit geringer Effizienz transfiziert werden konnten⁸⁷. Diese geringe in-vivo Transduktion stand in erster Linie mit den unzureichenden Methoden der Vektorenfreisetzung und den natürlichen Barrieremechanismen der Gefäßwände (Lamina elastica interna) in Verbindung⁸⁸.

Die intravasale Freisetzung eines Vektors mit dem Ziel des arteriellen Gentransfers ist mit der Gefahr der Dissemination des Vektors und somit mit der Gefahr der Transfektion vieler verschiedener Gewebe verbunden. Nach Katheter-vermittelter intravasaler Virusfreisetzung ohne Inkubationszeit erfolgt eine sofortige systemische Verteilung des Vektors und Expression in einer Vielzahl verschiedener Gewebe, wobei die lokale Transfektion der Gefäßmuskelzellen und der so gewollte therapeutische Effekt nur sehr gering sind⁸⁹.

Um die ektopische Expression, das heißt eine Expression außerhalb des Zielgewebes, zu vermeiden und die Transfektionseffizienz in den Gefäßwänden zu verbessern, wurden verschiedene Systeme zur Freisetzung des Virus entwickelt⁸⁷. Mittlerweile stehen verschiedene Methoden und Katheter zur intravasalen Freisetzung des viralen Vektors mit dem Ziel der lokalen Transfektion der Gefäßwände zur Verfügung.

Ein Verfahren besteht darin, das Gefäß an zwei Stellen vorübergehend zu verschließen, den Vektor in das vom Blutstrom abgetrennte Segment zu infundieren und anschließend zu inkubieren. Der Gefäßverschluss kann sowohl mittels Klemmen, als auch über einen Doppelballonkatheter erreicht werden⁹⁰.

Außerdem können zur Transfektion der Gefäßwand Perfusions-Katheter eingesetzt werden, die den Blutstrom durch die Arterie auch während der Freisetzung des Virus erlauben (z.B. Kanal-Ballon (Boston Scientific, Natick, MA)).

3. METHODEN

3.1. Induktion der Arteriogenese im Kaninchenhinterlauf

3.1.1. Das Tiermodell

Es wurde ein in vivo Modell der regionalen Ischämie in der Kaninchenhintergliedmaße verwendet. An anästhesierten Kaninchen wurde nach Haut- und Muskelschnitt im rechten Oberschenkelspalt die Femoralarterie freigelegt und ligiert. Nach dem Versuchszeitraum von einer Woche wurden die Hintergliedmaßen der Tiere hämodynamisch und angiographisch untersucht.

Die in dieser Arbeit dokumentierten Tierexperimente wurden durch das bioethische Komitee des Veterinärdezernats des Regierungspräsidiums Darmstadt genehmigt. Alle Tiere wurden unter tierschutzrechtlichen Gesichtspunkten des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998, zuletzt geändert durch Art. 153 V v. 25.11.2003, ordnungsgemäß behandelt und versorgt. Die Leitsätze der GV-SOLAS (Gesellschaft für Versuchstierkunde / Society of Laboratory Animal Science) wurden berücksichtigt.

3.1.1.1. Versuchstiere

Es wurden männliche Kaninchen der Rasse Weiße Neuseeländer mit einem Körpergewicht von ca. 3,0 kg verwendet. Die Tiere stammten aus der Züchtung von Elevage Scientifique, Chatillon, France. Die Tiere wurden jeweils einzeln in Euroboxen gehalten, erhielten unbeschränkten Zugang zu Wasser per Nippeltränke und genormtem Mischfutter (Altromin) für Kaninchen. Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere mindestens eine Woche akklimatisiert.

3.1.1.2. Narkose

Die Kaninchen wurden durch intramuskuläre Injektion mit einer Kombination aus Ketamin (40 mg/kg Körpergewicht (KGW)) und Xylazin (4 mg/kg KGW) anästhesiert. Erhaltungsdosen wurden als 5-10% der Initialdosis intravenös injiziert. Zur postoperativen

Schmerzausschaltung wurde den Tieren zusätzlich Buprenorphin (50 µg/kg KGW, i.m.) verabreicht. Um Hornhautschäden zu vermeiden, wurde zu Beginn der Operation bilateral die Kornea mit Dexpanthenol-Salbe bedeckt.

3.1.2. Operationstechniken

3.1.2.1. Einbau der osmotischen Minipumpe

Den Tieren wurde der rechte mediale Oberschenkelbereich bis hin zur rechten Flanke geschoren und sprühdesinfiziert. Unter sterilen Kautelen wurde nach Hautschnitt im Schenkelspalt die A. femoralis freipräpariert und mittels eines mit einer osmotischen Minipumpe verbundenen Schlauches kanüliert. Über den retrograd bis unterhalb der Aufzweigung der rechten A. iliaca externa in die Aa. femoralis, profunda femoris und circumflexa femoris lateralis vorgeschobenen Schlauch konnte die Testsubstanz über sieben Tage lokal appliziert werden. Aufgrund der Ausrichtung der Katheteröffnung war gewährleistet, dass die Testsubstanz das Kollateralgebiet im „first pass“ passierte. Nach dem Festnähen der Minipumpe in einer unter die Haut der rechten Flanke präparierten Tasche wurde der Einschnitt durch Muskel- und Hautnaht verschlossen. Postoperativ wurden die Tieren prophylaktisch antibiotisch mit Enrofloxacin (5 mg/kg KGW) abgedeckt. Nach dem Aufwachen aus der Narkose wurden die Tiere wieder in ihre Boxen zurückgebracht und die Wundheilung täglich bis Versuchszeitende kontrolliert.

3.1.2.2. Adenovirale Transfektion

Die adenoviralen Konstrukte (Ad5.1FGF-4) wurden bei -80°C gelagert, vor Verwendung wurden sie auf Eis aufgetaut. Als Kontrollvirus wurde ein adenoviraler Vektor verwendet (Ad5.1) der nicht für einen Wachstumsfaktor kodierte. Um die Vergleichbarkeit zu wahren, wurden beide Gentransfere mit gleicher Methode, Konzentration und in gleichen Volumina durchgeführt.

Wie unter 1.4.1 beschrieben wurde beidseits die A. femoralis freigelegt und auf der linken Seite ligiert. In die rechte A. femoralis wurde ein Katheter nach proximal bis kurz unterhalb der Aufzweigung der A. iliaca externa eingeführt. Nach dem Abklemmen der A. iliaca externa auf Höhe des Leistenspaltes wurde über den Katheter zuerst das Gefäßsystems des Beines mit 5ml körperwarmer physiologischer Kochsalzlösung gespült, um das Blut zu

entfernen. Da die A. iliaca externa nach proximal unterbunden war, wurden die Aa. circumflexa lateralis, profunda femoris, sowie die präformierten Kollateralgefäße gespült. Um den retrograden Blutrückfluss zu minimieren, bzw. um den Abfluss des Puffers (Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung, PBS) zu verhindern, wurden vor Infusion der Viruslösung die V. femoralis und die V. profunda femoris mittels Gefäßklemmen abgeklemmt. Nun wurden $2,87 \times 10^{10}$ PFU in 2,5 ml PBS infundiert und 30 min inkubiert. Der eingeführte Schlauch wurde anschließend entfernt und das Gefäß verschlossen. Die Wunde wurde durch Muskel- und Hautnaht vernäht. Nach der Operation verblieb das Tier 24 Stunden im S2-Bereich, um eventuelle Kontaminationen der Umwelt zu verhindern. Benutzte Instrumente, Tücher, Handschuhe und alle weiteren Hilfsmittel wurden unverzüglich nach Beendigung der Operation sterilisiert.

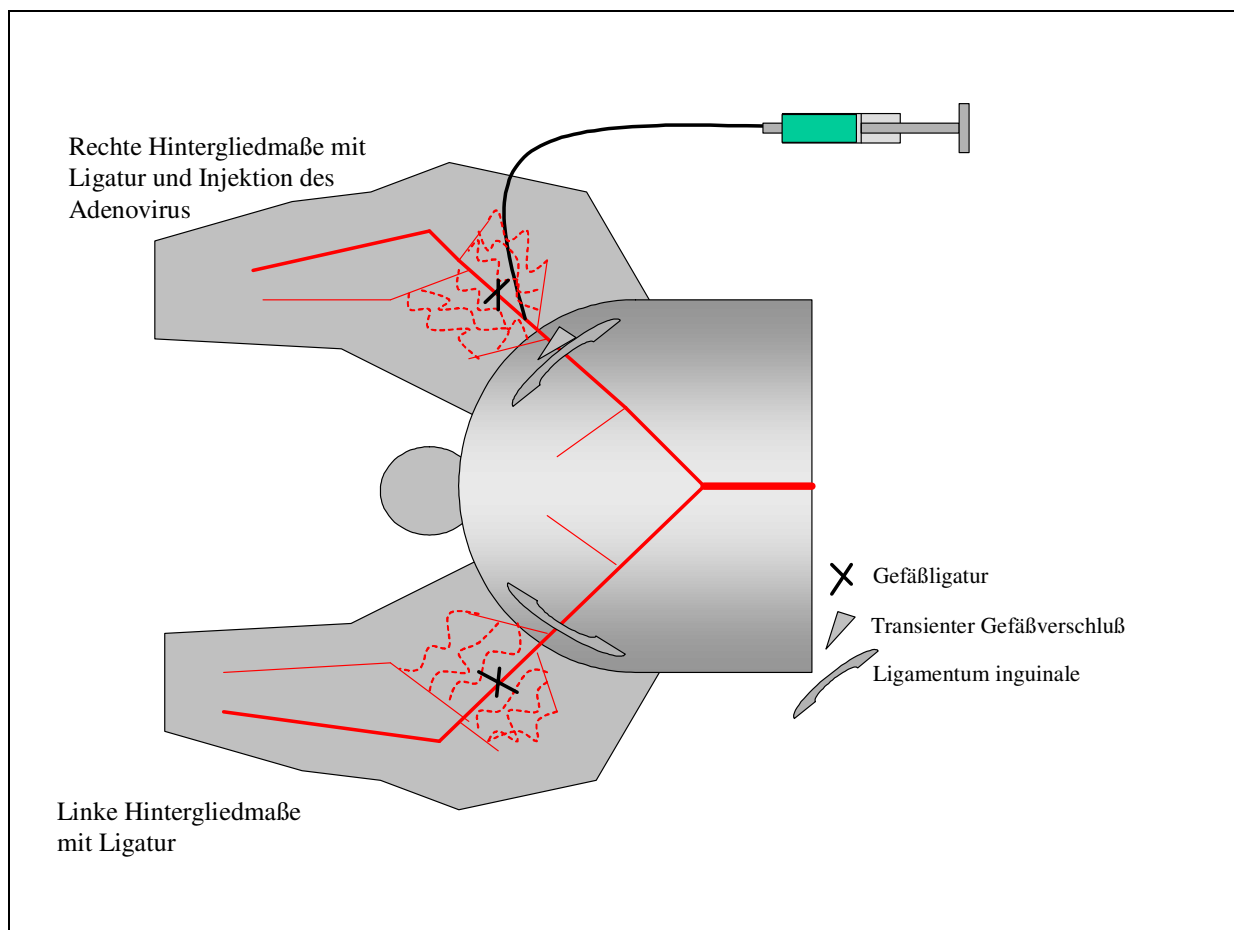


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur intravasalen Injektion von Adenoviren. Über einen Katheter wird in ein vom Blutfluss abgetrenntes Segment der rechten Arteria femoralis die Viruslösung infundiert. Die gestrichelten Linien stellen die präformierten Kollateralanastomosen dar. Nicht dargestellt sind die Vena femoralis und weitere venöse Äste, die ebenfalls abgeklemmt werden.

3.1.2.3. Kombination von adenoviralen Transfektion mit osmotischer Minipumpe

Um gleichzeitig die Infusion einer Testsubstanz über die osmotische Minipumpe und die adenovirale Transfektion durchzuführen, wurden beide Operationstechniken miteinander verknüpft.

Nach Abschluss der 30-minütigen Inkubationszeit des adenoviralen Gentransfers, der wie unter 1.4.2 beschrieben durchgeführt wurde, wurde der Katheter, der zu diesem Zweck in die A. femoralis eingebracht worden war, mit der zum Einbau bereitgehaltenen osmotischen Minipumpe blasenfrei verbunden. Im Anschluss erfolgte die subkutane Implantation der Pumpe.

3.1.3. Verwendete Systeme zur lokalen chronischen Applikation von Testsubstanzen

3.1.3.1. Lokale chronische Infusion

Zur lokalen Infusion des Testproteins wurden osmotisch aktivierte Pumpen (Alzet® osmotic pumps, Modell 2ML1) (Abb. 9) mit einer Pumpleistung von 10 µl/h verwendet. Die Testsubstanzen wurden in 3 ml 0,1 %iger Kaninchenalbuminlösung gelöst. Die Beschickung der Pumpen erfolgte in der Sterilbank. Die Pumpe selbst nahm 2,2 ml auf, wobei das restliche Volumen von 0,8 ml für die Füllung des Mikro-Katheter-PVC-Schlauches (Reichert Chemietechnik Heidelberg) diente. Dieser 14 cm lange Katheter wurde mit der osmotischen Minipumpe verbunden. Vor dem Einbau mussten die geladenen Pumpen drei Stunden bei 37°C in 0,9 %iger Kochsalzlösung inkubiert werden.

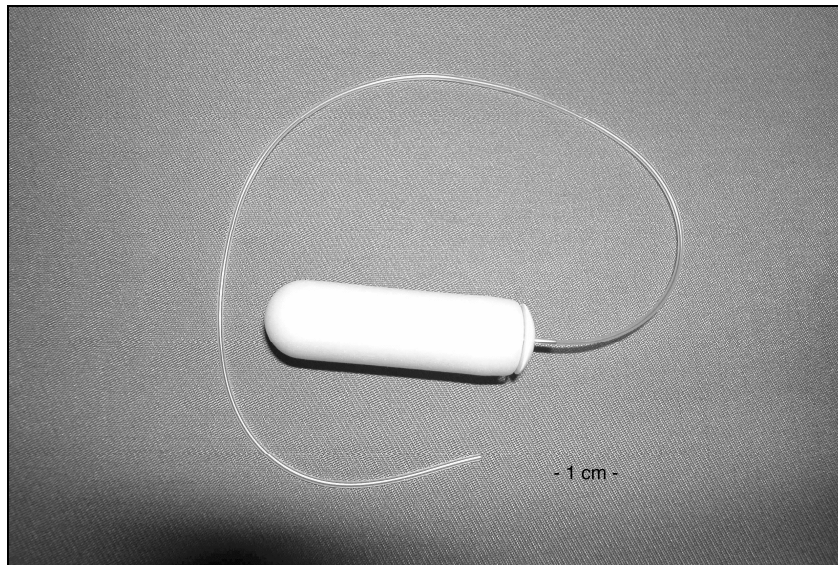


Abbildung 9: Darstellung einer mit dem Mikro-Katheter verbundenen osmotischen Minipumpe

3.1.3.2. Lokaler adenoviraler Gentransfer

Das verwendete Virussystem ist das gentherapeutische Produkt Ad5.1. Es handelt sich hierbei um ein rekombinantes Adenovirus des humanen Serotyps 5, in dessen Genom die E1-Region entfernt wurde, so dass es in nicht empfänglichen Geweben (Geweben, in deren Genom nicht die komplementäre E1-Region vorhanden ist) nicht replikationskompetent ist. In einer bestimmten Zelllinien, einer sog. Packungszelllinie, ist jedoch die Replikation möglich, da hier die Genprodukte der E1-Region, die E1A- und E1B-Proteine, von den Zellen hergestellt werden und so dem Adenovirus zur Replikation zur Verfügung stehen. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um transformierte embryonale Retinoblasten-Zellen mit der Bezeichnung PER.C6.

Das Gen für die adenovirale Expression des humanen FGF-4 wurde in der E1-Region inseriert, deren Expression über den Cytomegalievirus (CMV) -Promoter gesteuert wird.

3.1.4. Versuchsgruppen zur Stimulierung der Arteriogenese

Die zur Stimulation des Kollateralwachstums eingesetzte Testsubstanz war zum einen der rekombinante humane Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende-Faktor (GM-CSF), zum anderen wurde ein für den Fibroblasten-Wachstumsfaktor-4 (FGF-4) kodierender

adenoviraler Vektor (Ad5.1FGF-4) eingesetzt. Zusätzlich wurden beide Substanzen in Kombination getestet.

GM-CSF wurde in der Dosierung von 100 µg/Pumpe intraarteriell verabreicht, zusätzlich wurden 80 µg/d GM-CSF zwei Tage vor der Operation bis fünf Tage danach subkutan injiziert. Der adenovirale Vektor Ad5.1FGF-4 wurde in einer Konzentration von $1,148 \times 10^{10}$ Viruspartikeln/ml eingesetzt, wobei ein Volumen von 2,5 ml Viruslösung/Tier verabreicht wurde. Zusätzlich wurden drei Kontrollgruppen gebildet.

In der ersten Kontrollgruppe wurden osmotische Minipumpen implantiert, die 0,1 %ige Kaninchenalbumin (RSA)-Lösung enthielten. In der zweiten Kontrollgruppe wurde ein Gentransfer mit Ad5.1 in der Konzentration des Ad5.1 FGF-4 durchgeführt. In der dritten Gruppe wurde die Ligatur der Arteria femoralis beidseits vorgenommen. Alle Gruppen wurden eine Woche nach der Operation hämodynamisch und angiographisch untersucht.

Die Versuchsgruppen:

Behandlung	Dosis	Tierzahl
GM-CSF-Pumpe	100µg/Pumpe (5µg/kg) + 80µg/Tag (26µg/kg) s.c. ab Tag -2 bis Tag +5	6
Ad5.1 FGF-4	2,5 ml mit $2,87 \times 10^{10}$ Viruspartikeln	6
Ad5.1 FGF-4 + GM-CSF-Pumpe	2,5 ml mit $2,87 \times 10^{10}$ Viruspartikeln + 100µg/Pumpe (5µg/kg) + 26µg/kg s.c. ab Tag -2 bis Tag +5	6
RSA-Pumpe	0,1%ige Lösung	6
Ad5.1 (Kontrollvektor)	2,5 ml mit $2,87 \times 10^{10}$ Viruspartikeln	6
Beidseitige Ligatur	-	3

Tabelle 1: Die Versuchsgruppen mit Behandlung, jeweiliger Dosierung und Gruppengröße. Die Dosierungen in µg/kg bezeichnen die jeweilige Tagesdosis.

3.2. Kontrolle des Blutbildes

Um Veränderungen des peripheren Blutbildes durch die Gabe von rh GM-CSF zu quantifizieren, wurden qualitative und quantitative Blutzellenmessung mittels Fluoreszenzfarbstoff-konjugierter Antikörper im Durchflusszytometer durchgeführt. Außerdem wurde zusätzlich die Anzahl der Leukozyten in einem Routineverfahren ermittelt.

3.2.1. Blutzellenbestimmung mittels Durchflusszytometrie

Die qualitative Analyse der Leukozyten-Subpopulationen, d.h. der Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie erfolgt nach Zugabe von Antikörpern, die gegen spezifische Leukozytenantigene gerichtet waren. Da diese Antikörper an jeweils unterschiedlich fluoreszierende Farbstoffe gekoppelt waren, konnten die verschiedenen Populationen unterschieden und bestimmt werden.

Bei Antikörpern, die selbst nicht mit fluoreszierenden Konjugaten versehen waren, wurde im zweiten Schritt ein farbstoffmarkierter Sekundärantikörper verwendet, der gegen den Primärantikörper gerichtet war.

Um die quantitative Messung durchzuführen, wurden kurz vor dem Messen Flow-Count Fluorosphären in definierter Konzentration (1018 Partikel/ μ l) zu der aufgearbeiteten, gefärbten und lysierten Blutprobe gegeben und zwar im Volumen des Blutausgangsvolumens dieser Probe.

3.2.1.1. Durchführung des Tests

Jeweils am späten Vormittag wurde durch Punktion der mittleren Ohrarterie (A. auricularis media) ca. 1 ml Blut pro Kaninchen gewonnen und mittels EDTA antikoaguliert. 50 μ l des Blutes wurden in Reagenzröhrchen pipetiert und folgende Antikörper wurden hinzugefügt:

- 5 μ l Maus- Monoklonaler Antikörper (MAK), gerichtet gegen Kaninchen-CD45

- 5 µl einer 1:20 PBS-Verdünnung von Phycoerythrin-konjugierter MAK gerichtet gegen CD14
- 1µl FITC-konjugierter MAK gerichtet gegen IgG

Nach vorsichtigem Mischen erfolgte eine 20 minütige Inkubation bei +4°C.

Anschließend wurden die Proben in 2 ml NaCl resuspendiert und bei 1300 RPM für 4 Minuten zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgesaugt und verworfen, der rote Bodensatz wurde in 2 ml Lysepuffer (1x) resuspendiert und erneut bei 1300 RPM für 4 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgeschüttet, 600 µl NaCl und 50µl „FLOW-COUNT Fluorospheres“ wurden zum Zellsediment gegeben. Anschließend konnte die Messung durchgeführt werden.

Da CD45 einen Panleukozytenmarker repräsentiert, konnten die Gesamtleukozyten im ersten Fluoreszenzkanal identifiziert werden. Die durch den Antikörper gegen CD14 markierten Monozyten und Granulozyten wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen Streulichteigenschaften voneinander differenziert. Durch die Quantifizierung der „FLOW-COUNT Fluorospheres“ war es möglich, die Absolutzahlen der Gesamt-Leukozyten zu bestimmen.

3.2.2. Leukozytenbestimmung mittels Hämatologie-Analysator

Beim Hämatologie-Analysator, K-4500 (Fa. Sysmex) können mittels Widerstandsmessprinzip, die Gesamtleukozyten bestimmt werden.

3.2.2.1. Durchführung des Tests

Wie unter 4.1.2 beschrieben wurde Kaninchenblut gewonnen und antikoaguliert. Nach kurzem Schwenken erfolgte die Messung im K-4500 Sysmex und die Anzahl der Gesamtleukozyten $\times 10^3/\mu\text{l}$ Blut wurden ausgedruckt.

3.2.3. Versuchsgruppen der Blutzell-Messungen

Zur Bestimmung der Leukozyten im Versuchszeitraum wurde zuerst Blutzellmessungen unbehandelter Tiere durchgeführt.

Weiterhin wurden osmotische Minipumpen mit unterschiedlichen Konzentrationen an rh GM-CSF in Kaninchen implantiert. Vor der Operation und täglich danach wurden Blutproben entnommen und die Leukozytenpopulationen mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

In einer Gruppe wurden ab dem zweiten Tag vor der Implantation der Minipumpen bis zum 5. Tag danach tägliche subkutane rh GM-CSF-Injektionen von $80 \mu\text{g}/\text{Tag} \times \text{Tier}$, entsprechend $26 \mu\text{g}/\text{kg}$, verabreicht, daher wurde mit den Blutzellmessungen schon zwei Tage vor der Pumpenimplantation begonnen.

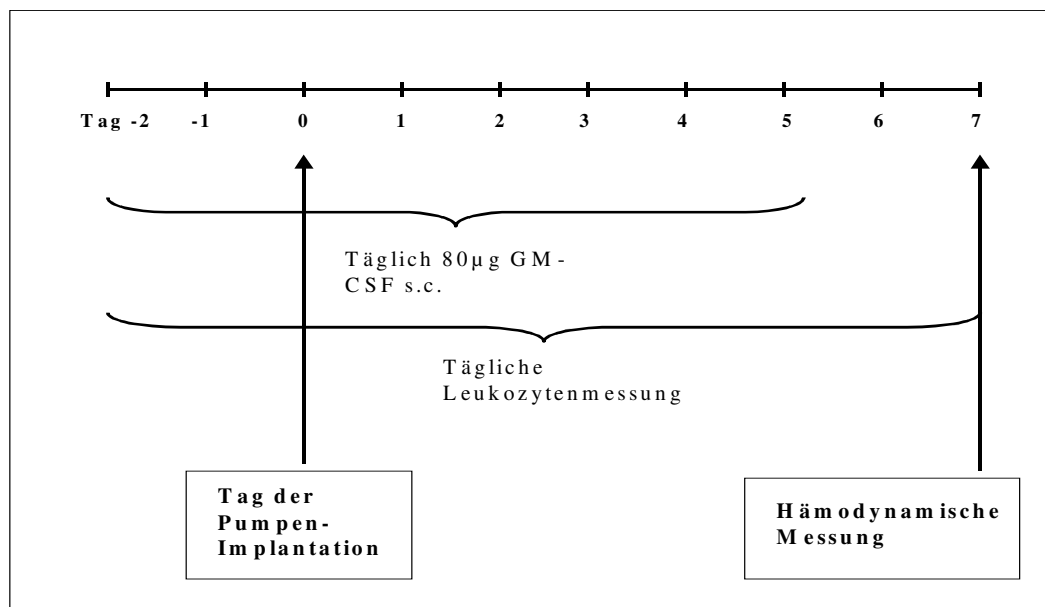


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Vorgehens bei der Versuchsgruppe, die zusätzlich zur mit rh GM-CSF beladenen Minipumpe subkutane rh GM-CSF-Injektionen erhielt

Um mögliche Beeinflussungen der Leukozytenkonzentrationen durch die Operation im Blut zu quantifizieren, wurden tägliche Blutzellmessungen von Tieren angefertigt, bei denen eine mit 0,1 %iger Kaninchenalbumin befüllte Minipumpe implantiert worden war.

Zusätzlich wurden Bestimmungen der absoluten Leukozytenanzahlen am Hämatologieanalysator durchgeführt, um die Korrelation mit der Durchflusszytometrie zu ermitteln.

Anzahl der Tiere	Behandlung
6	100 µg GM-CSF/Pumpe (5µg/kg) + subkutane Gabe von 80 µg GM-CSF/Tag (26µg/kg) ab dem 2. Tag vor der Implantation der Pumpe bis zum 5. Tag danach
4	25 µg GM-CSF/Pumpe (1,2µg/kg)
2	500 µg GM-CSF/Pumpe (24µg/kg)
2	1000 µg GM-CSF/Pumpe (48µg/kg)
7	Ligatur der A. femoralis ohne GM-CSF-Verabreichung
33	Keine Behandlung

Tabelle 3: Versuchsgruppen der Leukozyten-Messungen

3.3. Hämodynamische Auswertung

Die kollaterale Konduktanz als Maß für die Arteriogenese wurde in den verschiedenen Versuchsgruppen in einem hämodynamischen Messverfahren quantifiziert.

3.3.1. Narkose und Beatmung

Eine Woche nach Ligatur der Femoralarterie wurden die Versuchstiere erneut narkotisiert. Als Prämedikation zur Intubation wurde Midazolam (1,3 mg/kg KGW) zusammen mit Ketamin (30 mg/kg KGW) intramuskulär appliziert. Zum Erlangen der Intubationsbereitschaft wurden den Tieren über eine in die V. auricularis magna gelegte Braunüle initial rasch 10 mg/kg KGW Pentobarbital injiziert. Bei weiterem Bedarf wurden hiervon Dosen von 2 mg/kg KGW verabreicht, bis eine Intubation möglich war. Daraufhin wurden die Tiere mit 3,5 l/min Raumluft und 0,7 l/min Sauerstoff bei 45 Atemzügen/min künstlich beatmet. Während der hämodynamischen Versuchsdurchführung wurden 20 mg/kg KGW/h Pentobarbital und 6 µg/kg KGW/h Fentanyl in der Mischspritze intravenös über einen Anästhesie-Perfusor perfundiert. Nach Versuchsende wurden die Tiere in Narkose mit einer Überdosis Pentobarbital getötet.

3.3.2. Blutflussmessung

Zur perivaskulären Blutflussmessung wurde den sich in Rückenlage befindenden Tieren das Abdomen in der Linea alba geöffnet. Durch stumpfe Präparation in der Beckenhöhle wurden daraufhin die beiden Aa. iliacae comm. vom umgebenden Gewebe gelöst, bevor die Blutflussmesssonden (Ultrasonic Flowprobes) um die Gefäße gelegt werden konnten. Um Gefäßspasmen zu vermeiden, wurden extensive Gefäßpräparationen vermieden und prophylaktisch Papaverin in 30 %iger Verdünnung nach Anbringung der Ultraschallsonden auf die Gefäße getropft.

Der Raum zwischen dem Blutgefäß und dem rechteckigen Querschnitt der Sonde wurde mit einem Kopplungsmedium (0,9 % NaCl, 37°C) luftblasenfrei ausgefüllt. Weiterhin wurden alle die Schallausbreitung störenden Gewebsteile, z.B. Fett, vom Ultraschallfenster ferngehalten,

um optimale Signale zu erhalten. Die Sonden wurden an ein „Transonic® Animal Research Flowmeter (T206)“ angeschlossen und dessen Signale über einen Analog Digital (ADI)-Wandler in den die Daten aufzeichnenden Computer am Messplatz eingespeist.

3.3.3. Blutdruckmessung

Um den mittleren systemischen Druck zu messen, wurde die rechte A. carotis communis nach einem Längsschnitt im Halsbereich frei präpariert und mit einem heparinisierten, mit 0,9 %iger Kochsalzlösung gefüllten Schlauch (PVC, Ø2,5 mm) kanüliert. Für die Messung der peripheren Drücke wurde beidseitig die A. saphena distal im medialen Unterschenkelbereich nach einem Hautschnitt frei präpariert und ebenfalls katheterisiert (heparinisierte PE-Schlauch, Ø 0,8 mm. Alle Katheter wurden an einen mit einer Druckmessanlage verbundenen Statham-Druckwandler angeschlossen und die Druckmessdaten über einen ADI-Wandler dem Computer zugeführt.

Alle Messparameter wurden mittels Mac-Lab Software auf einem PC gespeichert.

3.3.4. Ermittlung der optimalen peripheren Dilatation

Um Daten über die maximale Kapazität des Gefäßsystems der Gliedmaßen zu erhalten, wurden die Messungen unter ansteigenden Adenosin-Konzentrationen durchgeführt⁹¹. Die hierdurch induzierte Vasodilatation bewirkt einen Abfall der Gefäßwiderstände, woraus eine verstärkte Durchblutung resultiert. Hierdurch wird eine hyperämische Belastungssituation imitiert. Die Vasodilatation wurde mittels Infusion ansteigender Adenosin-Dosen von 100, 300, 600 und 1000 µg/kg KGW/min in die Aorta etwa 3 cm kranial der Aufzweigung in die Aa. iliacae communes erreicht. Um den Blutfluss nicht zu beeinträchtigen, musste hierzu ein dünner, heparinisierte Katheter (PVC) in die Aorta eingeführt werden. Die lichtgeschützt zu lagernden, frisch angesetzten Adenosinlösungen wurden über diesen Katheter mittels einer Mikroinfusionspumpe bei einer konstanten Pumprate von 1 ml/min infundiert.

Sobald bei Infusion einer Adenosinkonzentration die Messparameter ein Gleichgewicht erreichten, konnte die nächst höhere Konzentration infundiert werden.

3.3.5. Einbau eines intraaortalen Katheters

Zur Herstellung eines Gefäßkatheters wurde ein PVC-Schlauch mit einem Außendurchmesser von 0,8 mm und einem Innendurchmesser von 0,4 mm unter einer Heißluftpistole ausgezogen. Hierdurch wurde das Lumen erhalten, der Außendurchmesser des Schlauches konnte jedoch erheblich verkleinert werden. Der Katheter wurde mit seinem stumpfen Ende auf eine 0,7x30 mm Nadel aufgezogen, mit heparinisierter Kochsalzlösung entlüftet und für den Einbau bereit gehalten. Die kaudale Mesenterialarterie wurde ca. 1,0 bis 1,5 cm nach ihrem Abgang aus der Aorta mit diesem Katheter kanüliert und ca. 0,5 cm nach kranial in die Aorta vorgeschoben, so dass das freie Ende des Schlauches im Lumen der Aorta zu liegen kam. Darauf folgend konnte die Adenosin-Lösung direkt in die Aorta infundiert werden.

3.3.6. Berechnung der kollateralen Konduktanz

Die kollaterale Konduktanz berechnete sich nach folgender Gleichung:

$$\text{CC (ml/min/100 mmHg)} = \frac{\text{Fluß [ml/min]} \times 100}{\text{zentraler arterieller Druck [mmHg]} - \text{peripherer arterieller Druck [mmHg]}}$$

Die Werte zur Berechnung der kollateralen Konduktanz wurden mittels Analyse der hämodynamischen Aufzeichnungen des Mac Lab® Gerätes gewonnen. Wie in *Abbildung 11* dargestellt, wurde der zentrale Blutdruck mittels Druckwandler in der A. carotis communis und die peripheren Blutdrücke in den Aa. saphenae der rechten und linken Hintergliedmaße gemessen. Die Blutflüsse, die in die Kollateralgebiete übergehen, wurden in der rechten und linken A. iliaca communis mittels Blutflussmesssonden ermittelt.

Nach der Infusion ansteigender Konzentrationen von Adenosin konnten die maximalen kollateralen Konduktanzen errechnet werden.

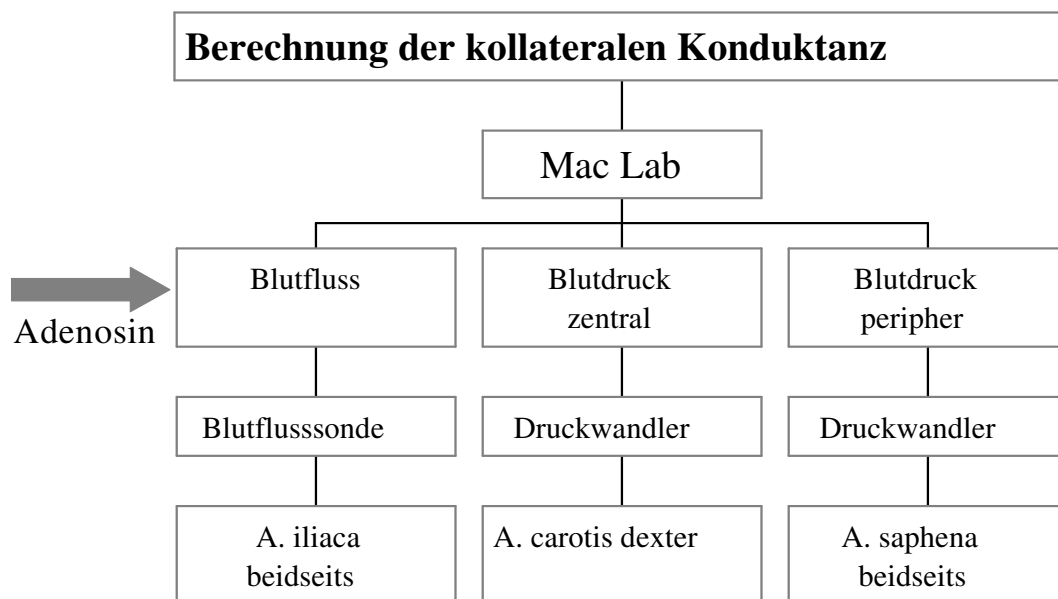


Abbildung 11: Übersicht über die zur Quantifizierung der kollateralen Konduktanz ermittelten Messparameter

3.4. Angiographische Auswertung

Zur Quantifizierung sichtbarer Kollateralarterien wurden Angiographien erstellt und ausgewertet.

3.4.1. Kontrastmittel-Herstellung

Für die Herstellung des Kontrastmittels wurden 80 g Gelatine in 300 ml Aqua dest. gelöst. Daraufhin wurden 230 g Bariumsulfat zugegeben und so lange weitergerührt, bis die Masse klümpchenfrei war. Bis zum Gebrauch wurde das Kontrastmittel bei 4°C aufbewahrt.

3.4.2. Kontrastmittel-Infusion

Die narkotisierten Tiere wurden nach Heparinisierung (2.500 I.E.) durch eine i.v. - Injektion von 100 mg/kg KM Pentobarbital getötet. Die abdominale Aorta wurde daraufhin kanüliert (gefeilte Stahlkanüle; Ø 2.5 mm) und das zuvor auf 38°C erwärmte, gut geschüttelte Kontrastmittel nach Eröffnen der großen Bauchvene bei 80 mm Hg luftblasenfrei in die Hintergliedmaßen infundiert. Zur Vermeidung der vorzeitigen Aushärtung des Kontrastmittels und um einer auskühlungsbedingten Vasokonstriktion entgegenzuwirken, wurden die Tiere in ein Wasserbad von 38°C gelegt.

Sobald eine gute Füllung der Beinarterien erreicht war, konnten die Tiere zum Aushärten des Kontrastmittels für eine Stunde auf Eis gelegt werden.

3.4.3. Erstellung der Angiogramme

Nach dem Aushärten des Kontrastmittels wurden die Hintergliedmaßen enthäutet, im Lendenbereich vom Tierkörper gelöst und in der Beckensymphyse voneinander getrennt. Die jeweilige Gliedmaße wurde in einem eigens zu diesem Zweck gebauten Fixationskasten eingespannt und zur Erzielung optimaler Kontraste vollständig mit Wasser bedeckt. Ein unter den Kasten geschobener Röntgenfilm (Strukturix, Fa. Agfa) wurde im Balteau-Röntgengerät bei 30 kV Spannung und 13 mA für 105 sec belichtet⁹².

3.4.4. Auswertung der Angiogramme

Zur Quantifizierung der sichtbaren Kollateralarterien wurden die Angiogramme auf einem Röntgenfilmbetrachter ausgewertet. Da die Kollateralarterien zwischen den Aa. profunda und circumflexa femoris und den Aa. femoris caudalis und genus descendens anastomosieren, wurden nur Gefäße mit zweifelsfrei sichtbarer Stamm-, Mittel- und Wiedereintrittszone nach der Longland Klassifikation ausgezählt⁹³. Gefäße ohne proximale oder distale Verbindung zum arteriellen Gefäßsystem wurden nicht mitgezählt.

3.5. Nachweis des adenoviralen Gentransfers

Durch die intraarterielle Transfektion von Ad5.1FGF-4 sollte erreicht werden, dass das Gefäßendothel rekombinantes humanes FGF-4 bildet. Mittels Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) sollte für rh FGF-4 kodierende mRNA in den Kollateralarterien der Transfektionsseite nachgewiesen werden. Zusätzlich sollte festgestellt werden, ob auch außerhalb der Kollateralarterien mRNA von rh FGF-4 nachweisbar ist.

3.5.1. Gewinnung der Proben

Zur Durchführung des Nachweises wurde bei einem Kaninchen ein wie unter 1.4.2. beschriebener Gentransfer mit für rh FGF-4 kodierenden adenoviralen Vektoren (Ad5.1FGF-4) durchgeführt. Da der Expressionspeak des FGF-4 zwischen 3 und 7 Tagen liegt⁹⁴ wurden die Gewebeproben am 5. Tag postoperativ entnommen. Hierzu wurde das Gefäßsystem der Hintergliedmaßen mit Kontrastmittel perfundiert. Die sich weiß darstellenden Gefäße (siehe *Abbildung 4*) konnten so gewonnen werden. Sofort nach der Entnahme wurden die Proben in flüssigen Stickstoff überführt und bis zur weiteren Untersuchung bei -80°C gelagert. Die entnommenen Proben des transfizierten Tieres und des unbehandelten Kontroll-Tieres sind in den *Tabellen 4* und *5* aufgelistet. Beim Kontroll-Tier wurde die Femoralarterie einer Hintergliedmaße ligiert, die andere Hintergliedmaße blieb unbehandelt.

Entnommene Proben des transfizierten Tieres
A. profunda femoris (beidseits)
Kollateralarterien (beidseits)
A. saphena (beidseits)
A. femoralis, distal der Ligatur (beidseits)
A. iliaca (beidseits)
Leber
Hirn
Herz
Milz
Hoden (beidseits)

Tabelle 4: Auflistung der mittels RT-PCR untersuchten Proben des transfizierten Tieres

Proben des Kontroll-Tieres
Kollateralarterien
präformierte Kollateralarterien
Leber
Milz

Tabelle 5: Auflistung der mittels RT-PCR untersuchten Proben des nicht behandelten Kontroll-Tieres

3.5.2. Auswahl der Primer

Zur Durchführung des Nachweises der mRNA von rh FGF-4, die aufgrund des adenoviralen Gentransfers in den Zellen der Kollateralarterien gebildet werden sollte, mussten zuvor Primer ausgewählt werden, die möglichst spezifisch für humanes FGF-4 waren.

Der verwendete *forward-primer* bestand aus Nukleotiden an Positionen 99 bis 120, der *reverse primer* aus denen an Positionen 222 bis 243 der *coding sequence* des Gens. Daraus folgt, dass der Bereich von Position 99 bis 324 der *coding sequence* des FGF-4-Gens amplifiziert wurde.

```

1    gggagcgggc gagtaggagg gggcgccggg ctatatatat agcggcctcg gcctcggggc
61   ggcctggcgc tcagggaggc gcgcactgct cctcagagtc ccagctccag ccgcgcgctt
121  tccgcccggc tcgccgctcc atgcagccgg ggtagagccc ggcccccggg ggccccgctc
181  cttgcctccc gcacctcttc ggttgcgcac tcccggccga ggtcggccgt gcgctcccgc
241  gggacgccac agggcgagct ctgcccccca gcttcccggg cgcactgacc gcctgaccga
301  cgcacgccct cgggcccggg atgtcggggcc cgggacggcc gcggtagcgc tgctcccggc
361  ggtcctgctg gccttgctgg cgccctgggc gggccgaggg ggcgcgcgcg caccactgc
421  acccaacggc acgctggagg ccgagctgga gcgcgcgtgg gagagcctgg tggcgctctc
481  gttggcgcgc ctgccgggtg cagcgcagcc caaggaggcg gccgtccaga gcggcgccgg
541  cgactacctg ctgggcatca agcggctgcg gcggtctctac tgcaacgtgg gcacgcgctt
601  ccacctccag gcgctccccg acggccgcac cggcggcgcg cacgcggaca cccgcgacag
661  cctgctggag ctctcgcccc tggagcgggg cgtggtgagc atcttcggcg tggccagccg
721  gttcttcgtg gccatgagca gcaagggcaa gctctatggc tcgcccttct tcaccgatga
781  gtgcacgttc aaggagattc tccttcccaa caactacaac gcctacgagt cctacaagta
841  ccccggcattg ttcctcgccc tgagcaagaa tgggaagacc aagaagggga accgagtgtc
901  gccaccattg aaggtcacc ctttctctcc caggctgtga cctccagag gacccttgcc
961  tcagcctcgg gaagcccctg ggagggcagt gcgaggggtc ccttggtgca ctttcttcgg
1021 atgaagagtt taatgcaaga gtaggtgtaa gatattttaa ttaattattt aaatgtgtat
1081 atattgccac caaattattt atagtctctg ggggtgtgtt ttttaattttc tggggggaaa
1141 aaaagacaaa acaaaaaacc aactctgact tttctggtgc aacagtggag aatcttacca
1201 ttggatttct ttaacttgt

```

Abbildung 12: Die veröffentlichte mRNA-Sequenz des humanen FGF-4 (accession number M17446). Rot unterlegt das atg-Start-Codon, bzw. das tga-Stop-Codon. Der forward primer ist gelb-hinterlegt, der reverse primer ist grün-hinterlegt.

3.5.3. Durchführung des Tests

Zuerst wurde jeweils für die verschiedenen Gewebeproben eine Isolierung der Gesamt-RNA durchgeführt. Um die Anwesenheit von DNA auszuschließen, wurde jeweils 1 µg dieser RNA mit DNase (Turbo DNase, Fa. Ambion) behandelt.

Die Reverse Transkription (RT)-Reaktion erfolgte im Volumen von 20 µl mit 250 ng RNA, 200 ng random nonamer, 10 mM DTT, 10 mM dNTP's, 1x Synthesepuffer, 40 U RNaseOUT und 200 U Superscript II Reverse Transkriptase. Es wurde das Invitrogen Superscript II Protokoll eingehalten.

Die anschließende PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

50 µl Ansatz:

12,5 ng	cDNA
1x	Reaktionspuffer
200 nM	dNTP's
1,5 mM	MgCl ₂
200 nM	forward Primer (humanspezifisch für FGF-4)
200 nM	reverse Primer (humanspezifisch für FGF-4)
1 U	Platinum Taq-Polymerase

Die Amplifikationen erfolgten mit folgendem Thermoprofil:

3 min 95°C

40 Zyklen: 30 sek. 95°C, 30 sek. 67°C, 30 sek. 72°C

Um eine Detektion von endogenem hFGF-4 ausschließen zu können, wurde der gleiche Test mit Gewebe eines unbehandelten Kaninchens durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle diente der Nachweis von hFGF-4 in humaner genomischer DNA. Weiterhin wurde von allen cDNAs eine Kontroll-PCR mit einem 18S Primerpaar durchgeführt. Als Negativ-Kontrolle diente Wasser. Die synthetisierte DNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung nachgewiesen.

Die Amplifikationen erfolgten mit folgendem Thermoprofil:

3 min 95°C

40 Zyklen: 30 sek. 95°C, 60 sek. 60°C

3.6. Auswertung und Statistik

Die Datenaufbereitung, Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Programmes Excel (Microsoft Corporation), wobei alle Ergebnisse als Mittelwerte mit zugehörigen Standardfehlern dargestellt wurden.

Zur statistischen Auswertung der Daten wurden mit Hilfe von SPSS 10.0 einfaktorielle Varianzanalysen (ANOVA) durchgeführt. Zum multiplen Vergleich zweier Gruppen wurde als post-hoc Test ein LSD- bzw. Bonferroni-Test durchgeführt. Ein Ergebnis mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ galt als signifikant.

4. ERGEBNISSE

4.1. Charakterisierung der Lymphozytenpopulation im peripheren Kaninchenblut

Es wurden Messungen der Gesamt-Leukozyten sowie der Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten durchgeführt, um mögliche Einflüsse der rh GM-CSF-Behandlung auf die Leukozytenzahl im peripheren Blut zu analysieren.

Die Identifizierung der Leukozytensubpopulationen erfolgte durchflusszytometrisch mittels Fluoreszenzfarbstoff-konjugierter Antikörper sowie anhand der charakteristischen Streulichteigenschaften.

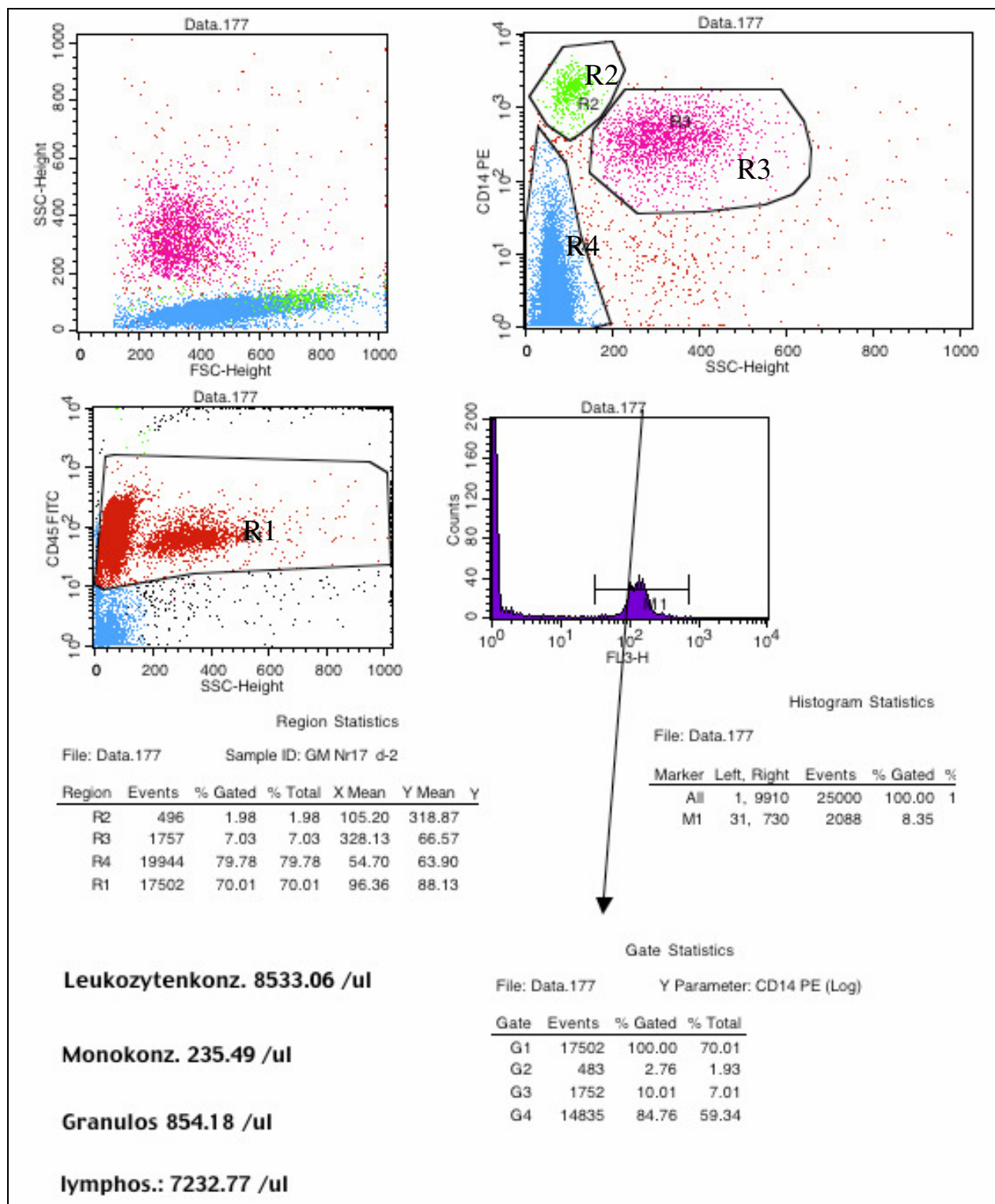


Abbildung 13: Die Abbildung zeigt eine repräsentative Auswertung einer durchflusszytometrischen Messung von Kaninchenblut

Da CD45 ein für Leukozyten spezifisches Oberflächenantigen darstellt, wurden alle CD45-positiven Zellen als Leukozyten gewertet (gekennzeichnet durch „R1“ in *Abbildung 13*).

Zur Darstellung der Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten wurden die identifizierten Leukozyten in ein weiteres Diagramm übertragen, in dem die Fluoreszenz des CD14-Antikörpers gegen das Seitwärtsstreulicht aufgetragen war. Die y-Achse dieses Punktdiagramms, bzw. Dot Blots, trägt in *Abbildung 13* die Beschriftung CD14PE. Die mit „R2“ gekennzeichnete Population stellt die CD14-positiven Monozyten dar, „R3“ kennzeichnet die ebenfalls CD14-positiven Granulozyten, die CD14-negativen Lymphozyten sind mit „R4“ beschriftet.

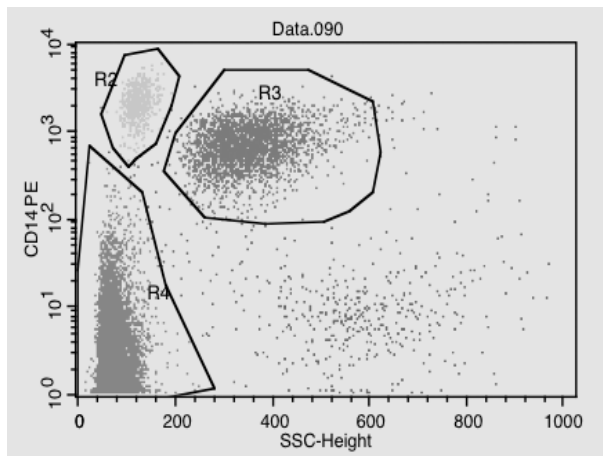


Abbildung 14: Punktdiagramm zur Identifizierung der Leukozyten-subpopulationen mittels CD14-Expression und Seitwärtsstreulicht

R2: Monozyten

R3: Granulozyten

R4: Lymphozyten

Wie in *Abbildung 14* ersichtlich, ist die Bindung des Antikörpers gegen humanes CD14 an Monozyten und Granulozyten des Kaninchens ähnlich stark. Aus diesem Grund wurde ein weiterer Parameter, das Seitwärtsstreulicht hinzugezogen, aufgrund dessen diese beiden Populationen voneinander getrennt analysiert werden konnten.

Aufgrund der Umrandungen, die ein Zählen der eingekreisten Fluoreszenzereignisse möglich macht, können die drei leukozytären Untergruppen als Prozent der Gesamtleukozyten angegeben werden. Durch die Zugabe fluoreszierender Partikel (Flowcount Fluorespheren) wurden außerdem die absoluten Konzentrationen bestimmt.

4.1.1. Leukozytenanalyse unbehandelter Kaninchen

Um Aussagen über die Normalwerte der Leukozyten machen zu können, wurden Untersuchungen nicht behandelter Tiere (n=33) vorgenommen. Hierbei erfolgte die Bestimmung der Zellzahlen qualitativ als auch quantitativ.

Die erstellten Punktdiagramme unbehandelter Kaninchen zeigen gut voneinander abgegrenzte Zellansammlungen, die sich eindeutig den drei großen leukozytären Untergruppen zuordnen lassen.

Die Normalwerte nicht vorbehandelter Kaninchen betrugen 6594 ± 1621 Leukozyten, 232 ± 71 Monozyten, 1220 ± 293 Granulozyten und 4989 ± 1390 Lymphozyten/ μl Blut.

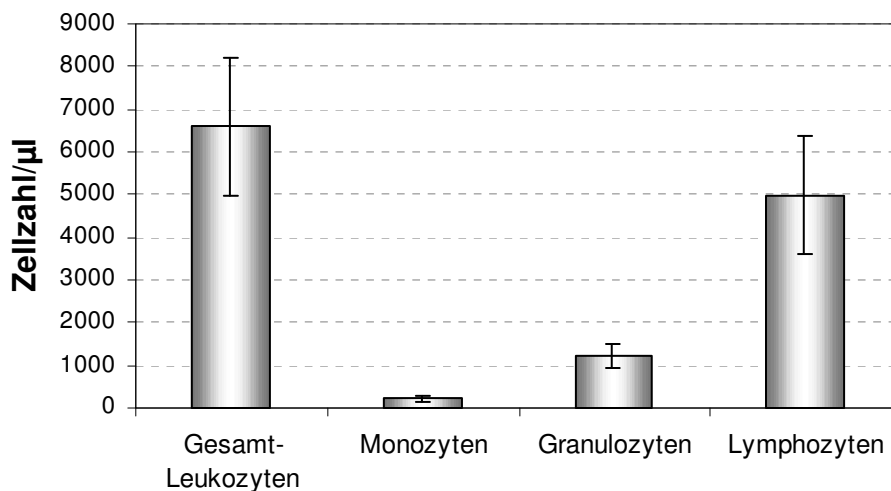


Abbildung 15: Dargestellt sind die Absolutzellzahlen/ μl Blut für die Gesamt-Leukozyten sowie ihre Subpopulationen als Mittelwerte mit ihren Standardfehlern.

Die prozentualen Anteile der Untergruppen an den Gesamtleukozyten lagen bei den Monozyten bei $3,79 \pm 1,8$ %, bei den Granulozyten bei $20,09 \pm 4,07$ % und bei den Lymphozyten bei $72,79 \pm 4,49$ %.

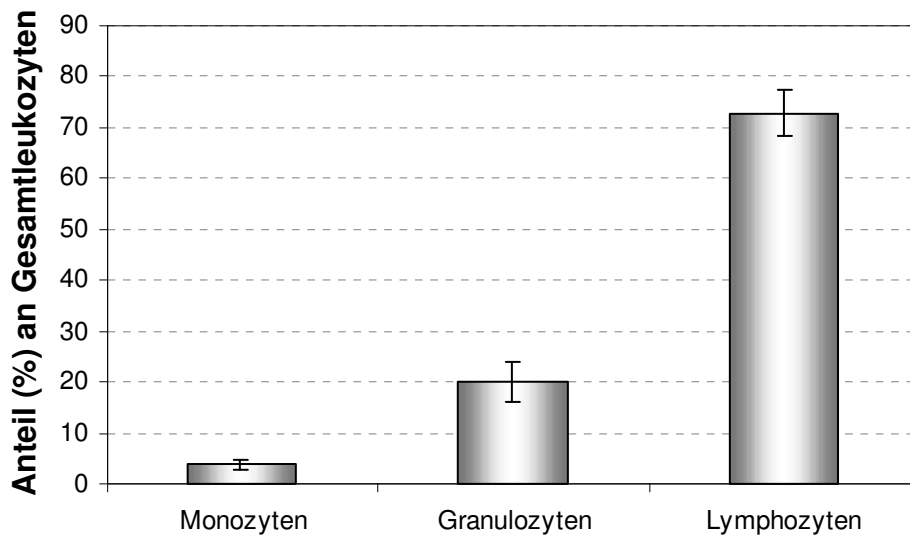


Abbildung 16: Die prozentualen Anteile der leukozytären Untergruppen als Mittelwerte mit ihren Standardfehlern (SEM).

4.1.2. Leukozytenanalyse nach Ligatur der A. femoralis

Es sollte untersucht werden, welchen Einfluss die kontinuierliche Infusion von rh GM-CSF nach Femoralisligatur auf die Leukozyten des peripheren Blutes hat.

Als Kontrolle dienten Tiere, bei denen die A. femoralis ligiert worden war, aber keine Gabe von GM-CSF erfolgte. Bei 6 Tieren wurde jeweils am Tag vor der Ligatur als auch in den 6 Tagen danach Blut entnommen und der Messung zugeführt. Die Leukozytenanalysen wurden täglich durchgeführt. Es konnte festgestellt werden, dass der Mittelwert der Gesamt-Leukozyten am Tag 1 nach der Operation anstieg und dann auf einem Plateau verblieb. Am Tag sieben hatten die Werte das Ausgangsniveau wieder annähernd erreicht. Signifikante Unterschiede zum Tag 0 konnten zu keinem Zeitpunkt festgestellt werden.

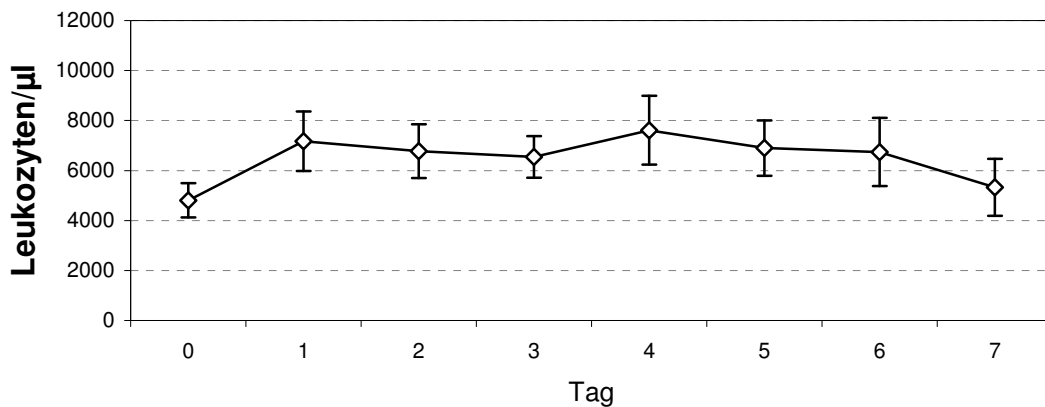


Abbildung 17: Dargestellt sind die Leukozyten/μl im Wochenverlauf als Mittelwerte mit Standardabweichern (SEM). Die Implantation einer 0,1 %igen Albumin-Pumpe erfolgte am Tag 0.

Der Verlauf der Monozytenzahlen zeigt, dass die Mittelwerte von $148 \pm 23,2$ am Tag 0 auf $308 \pm 60,4$ am zweiten und $355,4 \pm 54,7$ am Tag 4 ansteigen. Danach zeigt sich ein Abfall der Werte, wobei jedoch das Niveau des Tages 0 nicht erreicht werden kann. Von Tag 2 bis 6 sind die Monozytenzahlen im Vergleich zum Tag 0 signifikant erhöht.

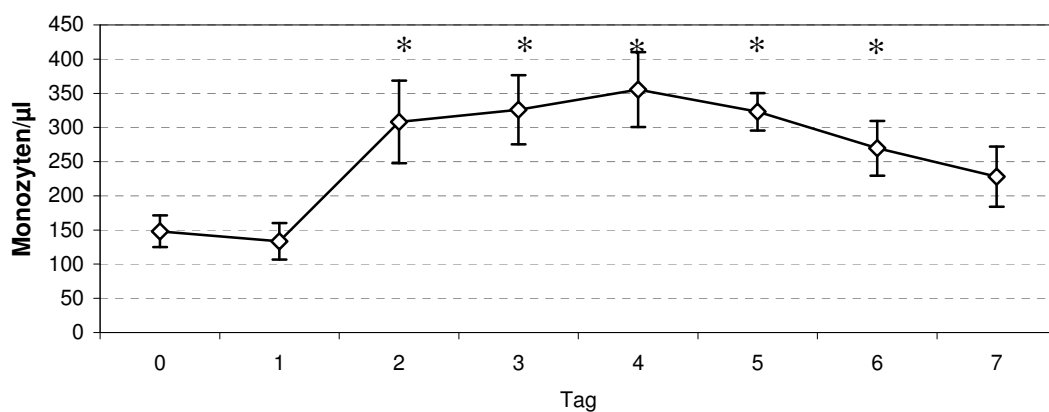


Abbildung 18: Anzahl der Monozyten/μl Blut nach Ligatur der A. femoralis im Wochenverlauf. Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihren Standardfehlern (SEM). (*<0,05)

4.1.3. Leukozytenanalyse bei Verabreichung von rh GM-CSF

Im Rahmen dieses Tiermodells sollte untersucht werden, welche Auswirkungen intraarteriell verabreichtes rekombinantes humanes GM-CSF auf das Blutbild des Kaninchens hat. Daher wurden osmotische Minipumpen mit verschiedenen Konzentrationen an GM-CSF implantiert. Der Versuchszeitraum erstreckte sich über 7 Tage, in denen die implantierten Pumpen ihren Inhalt freisetzen. Tägliche Messung der Gesamtleukozyten und der Monozyten wurde durchgeführt. Die verwendeten Konzentrationen von GM-CSF lagen bei 25 µg/Pumpe (1,2µg/kg), 100µg/Pumpe (5µg/kg) und 500µg/Pumpe (24µg/kg). Bei der Konzentration von 100µg/Pumpe wurden zusätzlich täglich ab dem zweiten Tag vor der Implantation bis zum 5. Tag danach 26µg/kg rh GM-CSF subkutan verabreicht.

4.1.3.1. Leukozytenanalyse bei Verabreichung von 25 µg GM-CSF

Bei der Konzentration von 25µg GM-CSF/Pumpe (n=4) wurde kein besonderer Befund erhoben. Wie in der Kontrollgruppe waren die Zellansammlungen in den Dot Blots immer gut voneinander getrennt und lagen auf gleichem Niveau. Des weiteren waren auch die Zellzahlen sowohl absolut als auch prozentual nicht signifikant verändert.

4.1.3.2. Leukozytenanalyse bei Verabreichung von 100 µg GM-CSF

Da bei der GM-CSF-Konzentration von 100µg/Pumpe ab dem zweiten Tag vor der Implantation mit der täglichen subkutanen Gabe von GM-CSF begonnen wurde, wurden auch die Leukozyten ab diesem Tag bestimmt (n=6).

Die Monozytenwerte der GM-CSF-Gruppe mit 100µg/Pumpe waren im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant verändert, auch wenn Einzelwerte stark abwichen. Ebenso wie bei der Kontrollgruppe war auch hier ein Anstieg der Monozyten am Tag 2 nach der Implantation zu verzeichnen. Bei zwei Tieren dieser Gruppe konnten am Tag 1 im Dot Blot bei der Identifizierung der Monozytenpopulationen die gleichen Auffälligkeiten wie nach der Gabe von 500 und 1000 µg GM-CSF/Pumpe beobachtet werden (siehe unten).

Die Absolutzahlen der Leukozyten wichen nicht signifikant von der Kontrollgruppe ab.

Granulozytenkonzentrationen waren am Tag 3 und 4 signifikant verringert. Des weiteren bestand ein ebenfalls signifikanter Abfall der Granulozyten nach zweimaliger subkutaner Gabe von GM-CSF im Vergleich zu den Werten dieser Kaninchen vor der Behandlung. Der Verlauf Granulozyten/ μl Blut der Gruppe mit $100\mu\text{g}$ GM-CSF/Pumpe ist im Vergleich zur Kontrollgruppe in *Abbildung 19* dargestellt.

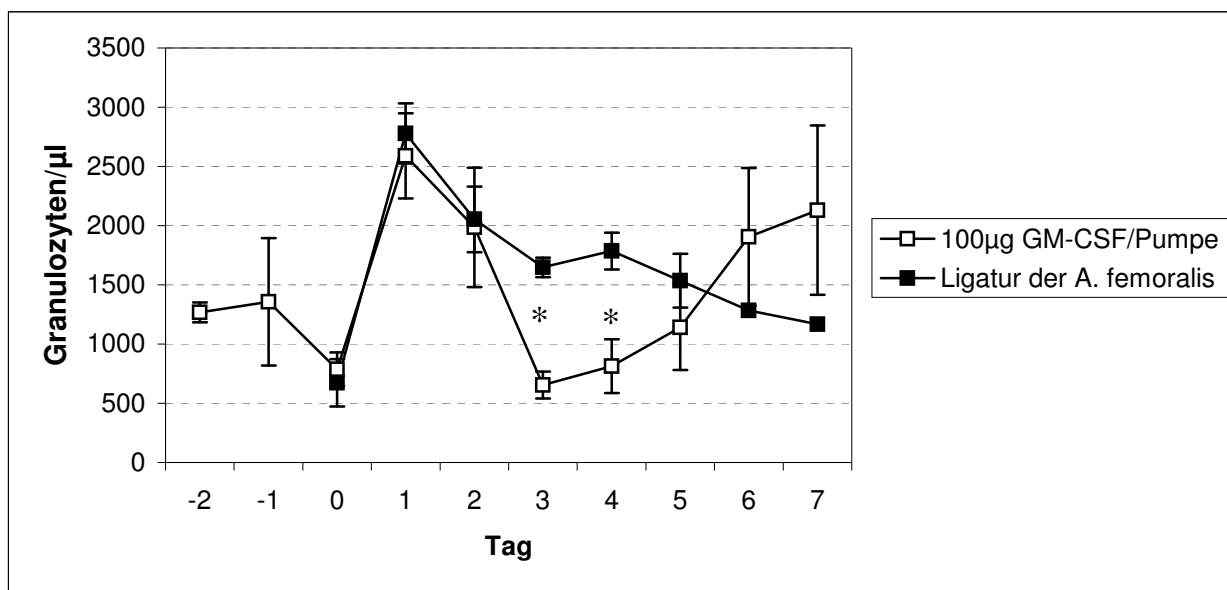


Abbildung 19: Im Diagramm sind der Verlauf der Granulozyten/ μl Blut der GM-CSF-100-Gruppe und der Kontrollgruppe (Ligatur der A. femoralis) als Mittelwerte mit ihren Standardfehlern (SEM) dargestellt. (< 0,05)*

4.1.3.3. Leukozytenanalyse bei Verabreichung von 500 bzw. $1000\mu\text{g}$ GM-CSF

Die tägliche Leukozyten-Messungen der Tiere, denen eine osmotische Minipumpe mit der Gesamtdosis von 500 ($n=2$), bzw. $1000\mu\text{g}$ ($n=2$) implantiert worden war, zeigten Veränderungen in den Dot Blots zur Identifizierung der leukozytären Subpopulationen. Es konnte eine Auffälligkeit der Monozyten beobachtet werden. Entweder waren die Monozyten nicht mehr feststellbar, oder sie waren nicht mehr eindeutig von der Granulozyten-Population zu trennen. Bei der Konzentration von $500\mu\text{g}/\text{Pumpe}$ war dieses Phänomen von Tag 1 bis 6, bei $1000\mu\text{g}/\text{Pumpe}$ bis Tag 7, feststellbar.

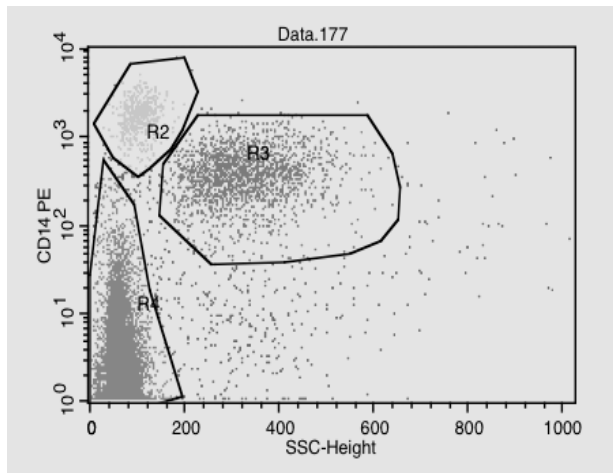


Abbildung 20: Darstellung eines typischen Punktdiagramms zur Identifizierung der Leukozyten-subpopulationen eines unbehandelten Tieres.

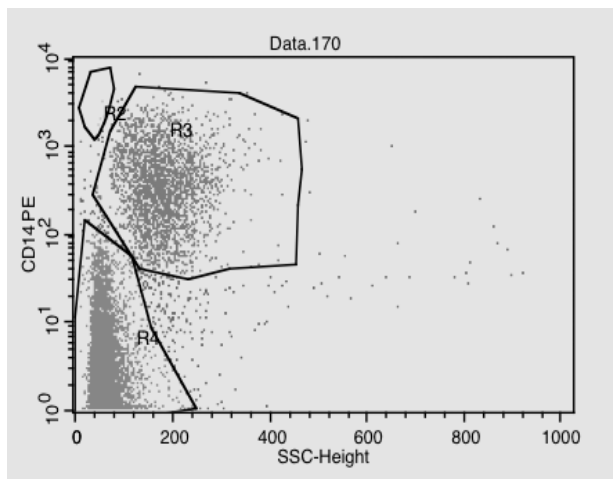


Abbildung 21: Typische Darstellung eines Punktdiagramms nach Behandlung mit 500, bzw. 1000 μg GM-CSF/Pumpe

Aufgrund dieser Tatsache war es nicht möglich, die Zellzahlen für die leukozytären Untergruppen nach Behandlung mit 500 und 1000 μg rh GM-CSF/Pumpe zu bestimmen. Die Gesamtzahlen der Leukozyten waren nicht signifikant verändert.

4.1.4. Korrelation von Durchflusszytometrie und Hämatologie-analysator

Die neu etablierte Methode der Kaninchenleukozytenmessungen mittels Durchflusszytometrie wurde mit einer Standardmethode verglichen.

Bei 60 Blutproben wurden die Leukozytenzahlen/ μl sowohl mittels Durchflusszytometrie als auch mittels vollautomatischem Hämatologieanalysator bestimmt.

Die jeweiligen Leukozytenwerte wurden im folgenden Diagramm gegeneinander aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass die mittels Hämatologieanalysator bestimmten Konzentrationen gegenüber den Messungen mittels Durchflusszytometrie erhöht waren. Die durchschnittliche Differenz der in beiden Methoden pro Probe gemessenen Werte lag bei $1,25 \times 10^3$ Leukozyten/ μl , der Korrelationskoeffizient beim Vergleich beider Methoden betrug 0,93.

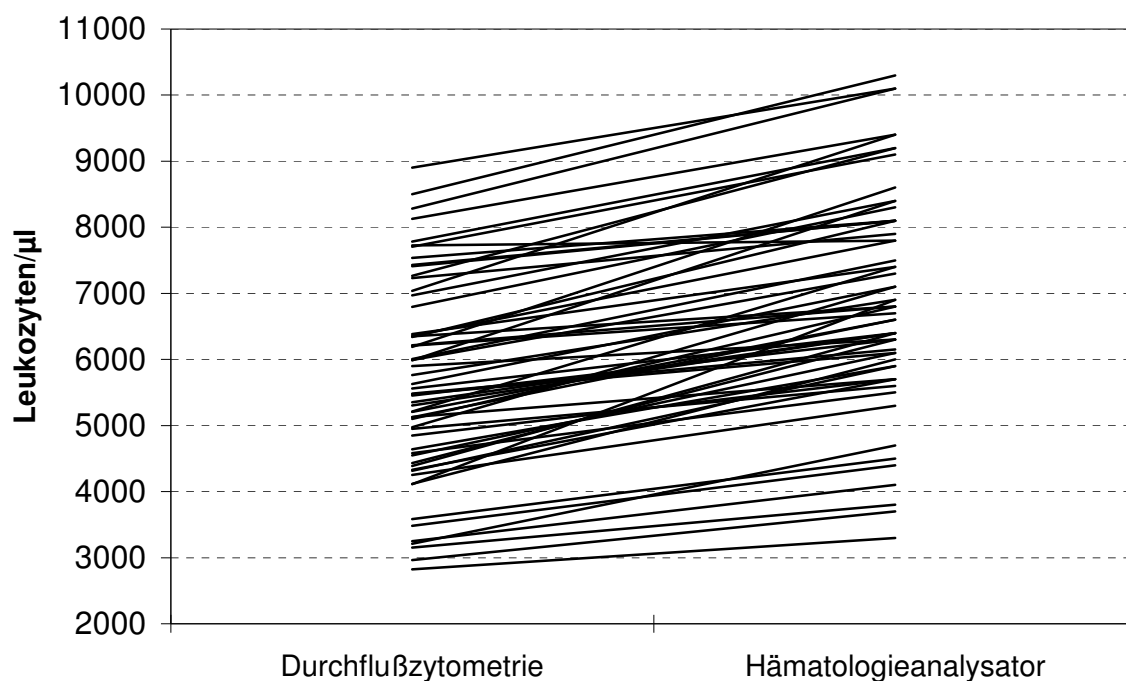


Abbildung 22: Gegenüberstellung der mittels Durchflusszytometrie und Hämatologieanalysator gemessenen Leukozytenwerte. Die zusammengehörigen Blutproben sind durch eine Grade miteinander verbunden.

4.2. Hämodynamische Auswertungen

Die hämodynamischen Auswertungen sollten Aufschluss über die Kapazität des Kollateralgefäßsystems geben. Hierzu wurde die maximale kollaterale Konduktanz bestimmt.

Es wurden perivaskuläre Blutflussmessungen in den dem Kollateralgebiet vorgeschalteten Aa. iliacae extt. durchgeführt. Die gemessenen Resultate wurden durch den angeschlossenen Analog-Digital-Wandler (ADI)-Wandler digitalisiert, aufgezeichnet und mittels Chart®-Software auf dem Computer analysiert.

Da die Durchblutung der Gliedmaßen in entscheidendem Maß vom zentralen Blutdruck abhängt, wurde dieser unilateral in der rechten A. carotis invasiv mittels eines Druckwandlers in mmHg gemessen. Methodengleich wurden die peripheren Blutdruckwerte bilateral in den Aa. saphenae ermittelt. Die Daten wurden ebenfalls im Computer gespeichert und ausgewertet.

Durch die erfassten Blutdruck- und Blutfluss-Werte konnte die Kapazität des Kollateralgefäßsystems in vivo durch die Berechnung der maximalen kollateralen Konduktanz quantifiziert werden.

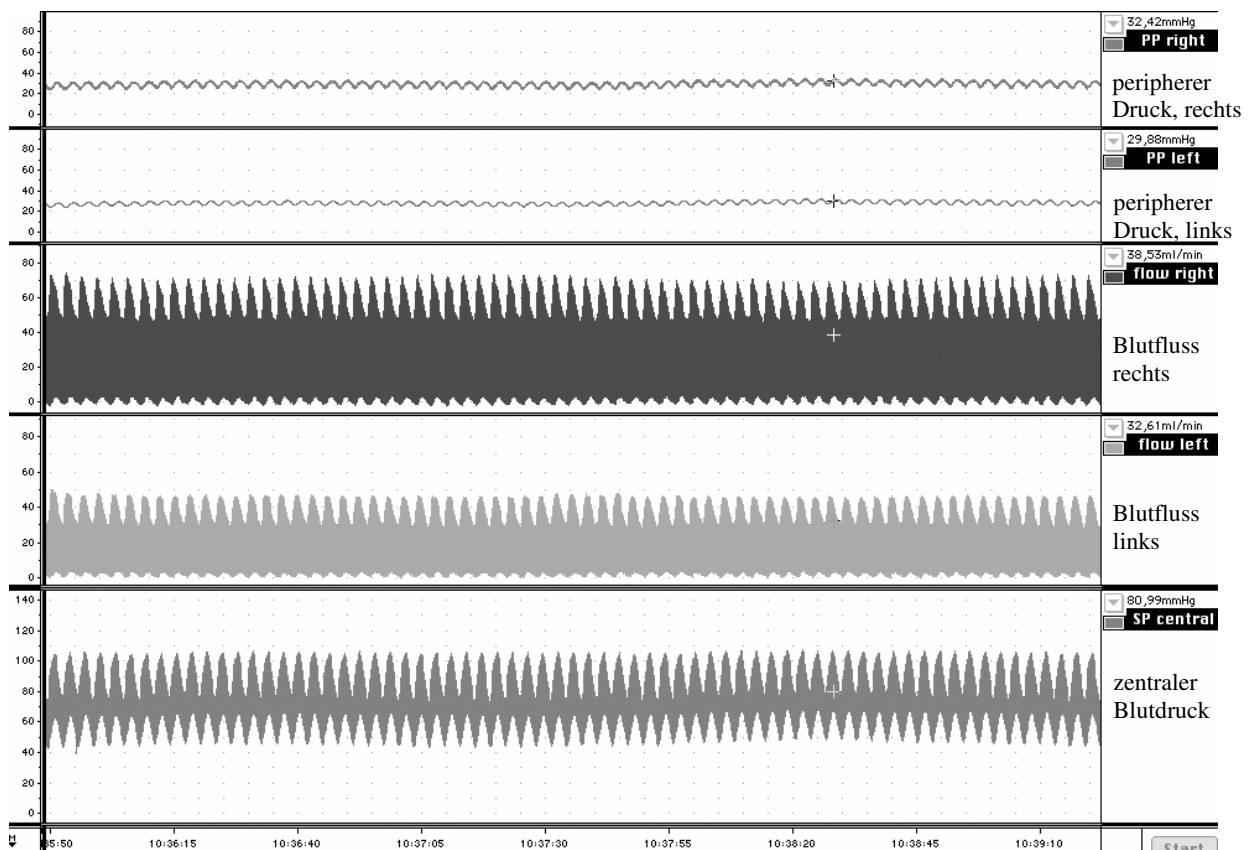


Abbildung 23: Es sind jeweils von oben nach unten die rechts und links in den Aa. saphenae gemessenen peripheren Drücke, die rechts und links perivaskulär gemessene Blutflüsse in den Aa. iliacae communes und der in der rechten A. carotis gemessene zentrale Blutdruck dargestellt und gegen die Zeit aufgetragen. Die Werte sind amplitudenförmig aufgezeichnet.

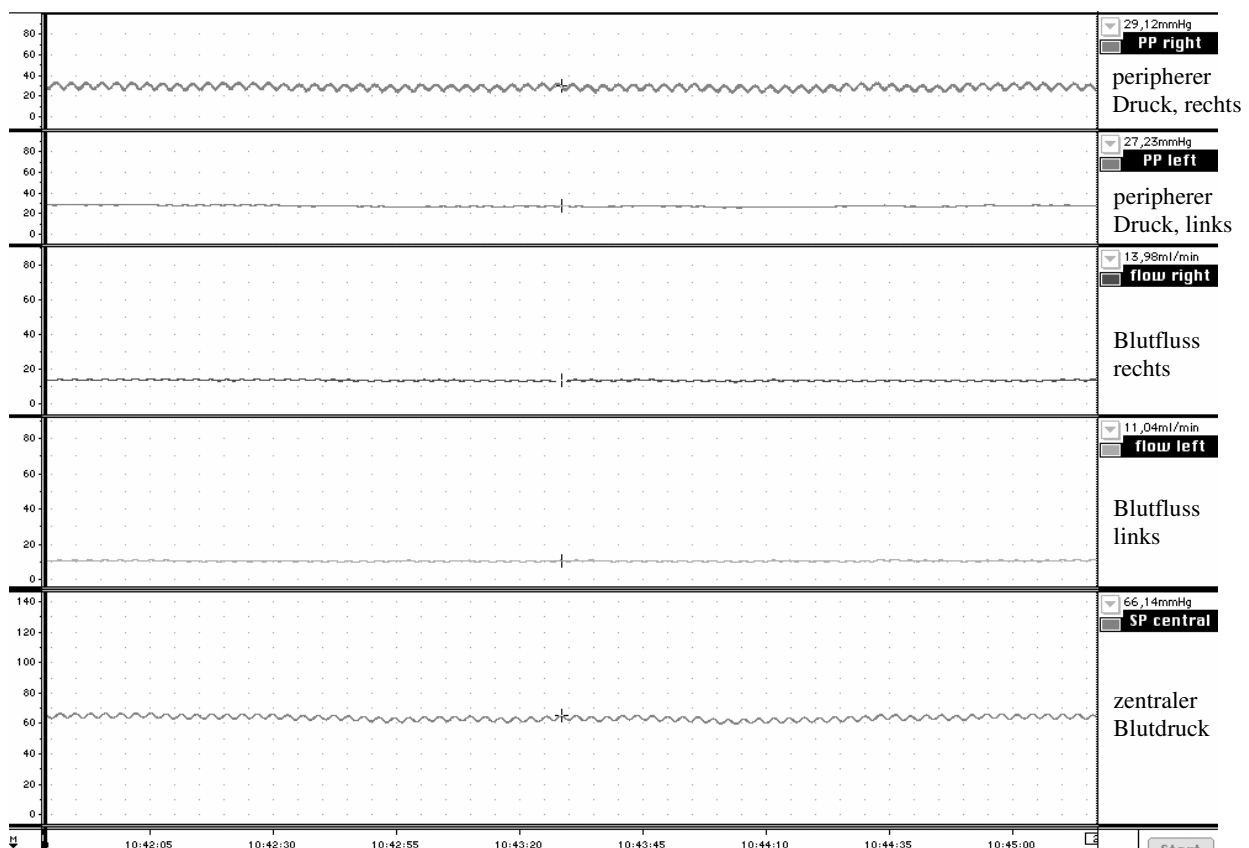


Abbildung 24: Darstellung der Blutdruck- und -flussmessung wie in Abbildung 22, die Abbildung der Werte erfolgte gemittelt, mit Ausnahme der Messung des peripheren Blutdrucks der rechten Seite

Da die Messung der maximalen kollateralen Konduktanz nur unter maximaler Vasodilatation möglich ist, wurde Adenosin in aufsteigenden Konzentrationen (100, 300, 450 und 600 $\mu\text{g/kg/min}$) in die Aorta infundiert. Für jede Dosis stellte sich nach ca. 15-20 Sekunden ein Gleichgewicht ein. Sobald keine Steigerung der Konduktanz durch eine höhere Gabe an Adenosin mehr möglich war, war das Gefäßsystem maximal dilatiert und die maximale Konduktanz war erreicht. Eine weitere Infusion von Adenosin bewirkte einen Abfall des zentralen Blutdrucks und somit auch einen Abfall der Konduktanz.

Die maximale kollaterale Konduktanz wurde für das jeweilige Bein aus den gemessenen Blutdrücken und Blutflüssen errechnet und in ml/min/100 mm Hg angegeben.

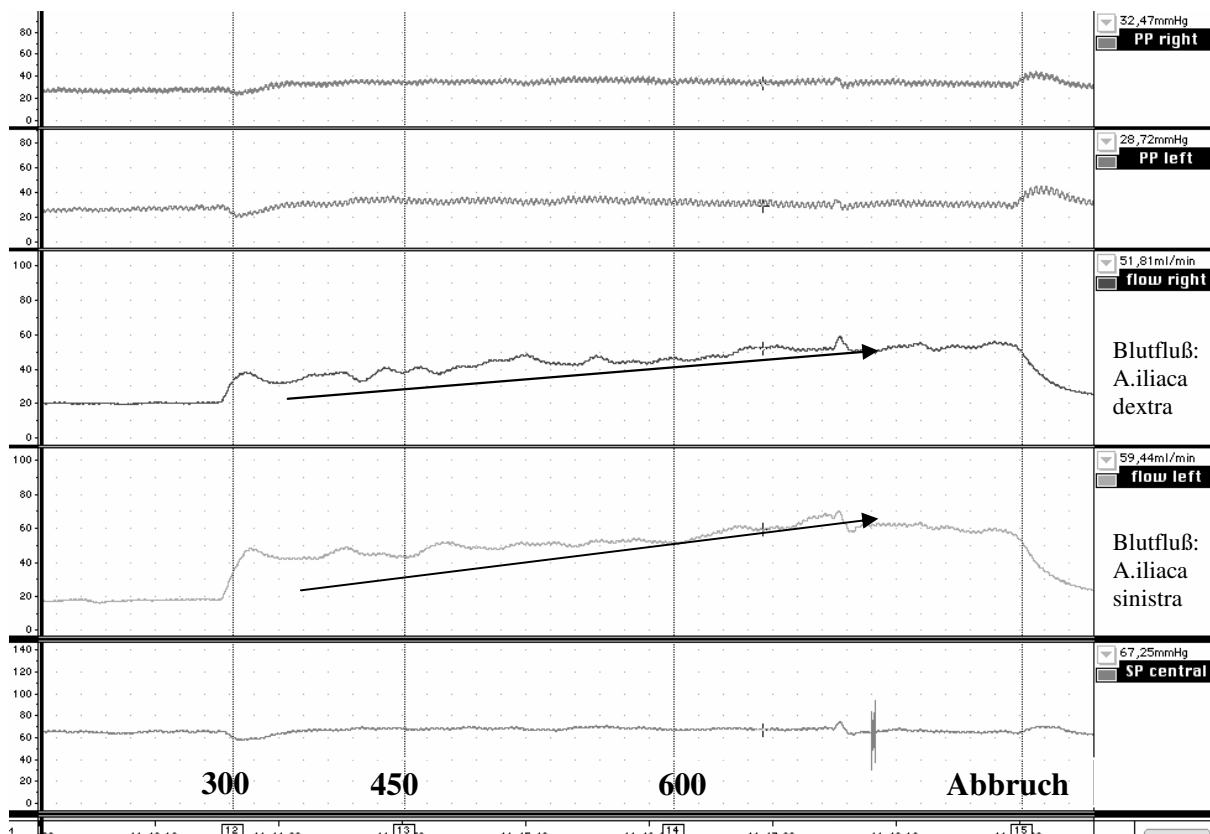


Abbildung 25: Zunahme der Blutflüsse in den Aa. iliacae in Abhängigkeit von der Adenosininfusion (siehe Pfeile). Beschriftungen an der x-Achse geben die Infusion von 300, 450 und 600 μg Adenosin/kg KGW/min, bzw. den Abbruch der Adenosininfusion an.

4.2.1. Maximale kollaterale Konduktanzen ohne Stimulierung

Die maximalen kollateralen Konduktanzen ohne exogene Stimulierung der Arteriogenese wurde für folgende Gruppen bestimmt:

- einseitige Ligatur mit 0,1 %iger Albumin-Pumpe
- beidseitige Ligatur ohne weitere Behandlung
- beidseitige Ligatur mit Transfektion des adenoviralen Kontrollvektors auf der rechten Seite

4.2.1.1. Maximale kollaterale Konduktanz bei einseitiger Ligatur

Sechs Tiere wurden nach einseitiger Ligatur mit lokaler Verabreichung von 0,1 %iger Albuminlösung über den Zeitraum von einer Woche hämodynamisch ausgewertet. Bei drei Tieren wurde die maximale kollaterale Konduktanz bei der intraaortalen Gabe von 450 µg/kg KGW/min Adenosin erreicht, bei den zwei anderen Tieren bei 600 µg/kg KGW/min. Der Mittelwert der maximalen kollateralen Konduktanzen lag bei $140,80 \pm 12,07$ ml/min/100 mmHg.

4.2.1.2. Maximale kollaterale Konduktanz bei beidseitiger Ligatur

Bei den beidseitig ligierten Tieren (n=3) wurde die kollaterale Konduktanz jeweils für beide Beine bestimmt. Die maximale Vasodilatation wurde bei allen Tieren bei einer Adenosin-Konzentration von 600 µg/kg KGW/min erreicht. Die maximalen kollateralen Konduktanzen lagen bei $144 \pm 16,8$ ml/min/100 mmHg auf der linken Seite und auf der rechten Seite bei $150 \pm 16,2$ ml/min/100 mmHg. Die Unterschiede beider Seiten waren nicht signifikant.

4.2.1.3. Maximale kollaterale Konduktanz nach beidseitiger Ligatur mit einseitiger Transfektion des Kontrollvektors

Wie bei den beidseitig ligierten Tieren wurde die maximale kollaterale Konduktanz ebenfalls für beide Hintergliedmaßen bestimmt. Bei einem der 6 Tiere dieser Gruppe war jedoch die Bestimmung der Konduktanz für die linke Seite nicht möglich, da hier keine Dilatation erreicht werden konnte. Die maximale Konduktanz der linken Seite lag bei $135,6 \pm 17,8$ ml/min/100 mmHg, die der rechten Hintergliedmaße bei $144 \pm 10,61$ ml/min/100 mmHg.

Sowohl der Vergleich der transfizierten Gliedmaße mit der nicht transfizierten als auch die Unterschiede zu den anderen Kontrollgruppen waren nicht signifikant.

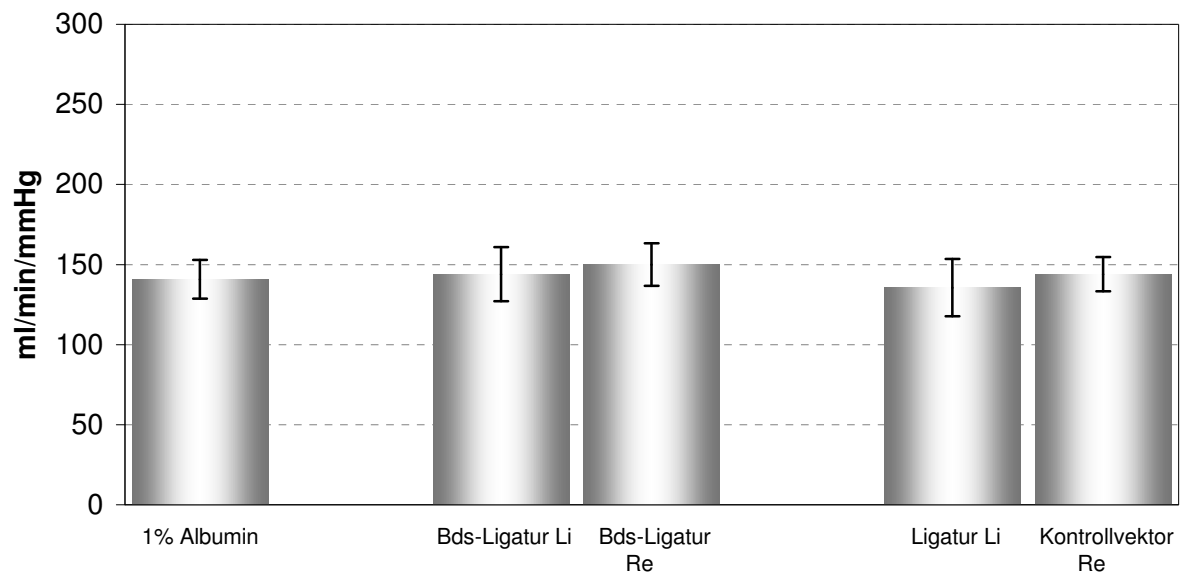


Abbildung 26: Das Diagramm zeigt die maximalen kollateralen Konduktanzen der Kontroll-Gruppen. Der linke Balken gibt die maximale kollaterale Konduktanz für die einseitig ligierten Tiere mit lokaler Albumin-Infusion an. Die beiden Balken in der Mitte zeigen die Werte der beidseitig ligierten Tiere für das linke (Li) und rechte (Re) Bein, die beiden rechten Balken geben die der Kontrollvektor-Gruppe an, wieder separat für links (Li) und rechts (Re). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehlern (SEM).

4.2.2. Maximale kollaterale Konduktanzen mit exogener Stimulierung

Die maximalen kollateralen Konduktanzen mit exogener Stimulierung des Kollateralgefäßwachstums wurden nach einem Zeitraum von einer Woche für folgende Gruppen bestimmt:

- einseitige Ligatur mit gleichzeitiger subkutaner Verabreichung und kontinuierlicher lokaler Infusion von rh GM-CSF
- beidseitige Ligatur mit einseitiger Transfektion eines für rh FGF-4 kodierenden adenoviralen Vektors

- beidseitige Ligatur mit einseitiger kombinierter Anwendung der Transfektion eines für rh FGF-4 kodierenden adenoviralen Vektors und der lokalen Infusion von rh GM-CSF

4.2.2.1. Maximale kollaterale Konduktanz nach Stimulierung der Arteriogenese mit rh GM-CSF

Bei 6 Tieren wurde die kollaterale Konduktanz nach einseitiger Femoralis-Ligatur mit lokaler und systemischer Verabreichung von GM-CSF über den Zeitraum von einer Woche bestimmt. Die maximale kollaterale Konduktanz lag bei $148,3 \pm 14,6$ ml/min/100 mmHg und war im Vergleich zur Kontrollgruppe ($140,8 \pm 12,07$ ml/min/100 mmHg) nicht signifikant erhöht.

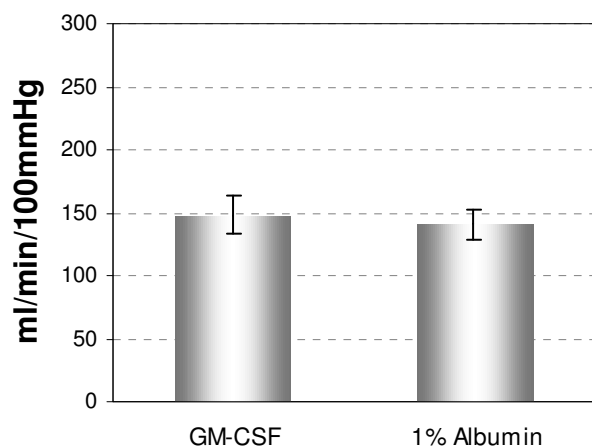


Abbildung 27: Gegenübergestellt sind die maximalen kollateralen Konduktanzen mit Standardfehlern (SEM) nach einer Woche lokaler Infusion von rh GM-CSF, bzw. 0,1 %iger Albumin-Lösung (Kontrolle).

4.2.2.2. Maximale kollaterale Konduktanz nach Stimulierung der Arteriogenese mit rh FGF-4

Bei sechs Tieren wurden hämodynamische Flussmessungen nach beidseitiger Ligatur mit zusätzlichem intravasalem Gentransfer (Ad5.1 FGF-4) der rechten Hintergliedmaße durchgeführt (FGF-4-Gruppe). Bei drei der sechs Tiere konnte im linken Bein keine Dilatation herbeigeführt werden, die in der A. iliaca abgenommenen Flusswerte überstiegen 15 ml/min nicht. Der Mittelwert der maximalen Konduktanz der linken Hintergliedmaße der anderen drei Tiere lag bei $106 \pm 8,84$ ml/min/100 mmHg. Die maximale Konduktanz der transfizierten Hintergliedmaßen lag bei $234,3 \pm 24,4$ ml/min/100 mmHg.

In der Kontrollgruppe erreichte die mittlere maximale Konduktanz der transfizierten Hintergliedmaße nur einen Wert von $144,0 \pm 10,61$ ml/min/100 mmHg, somit ist die Konduktanz der Transfektionsseite der Ad5.1FGF-4 Gruppe signifikant erhöht ($p < 0,01$).

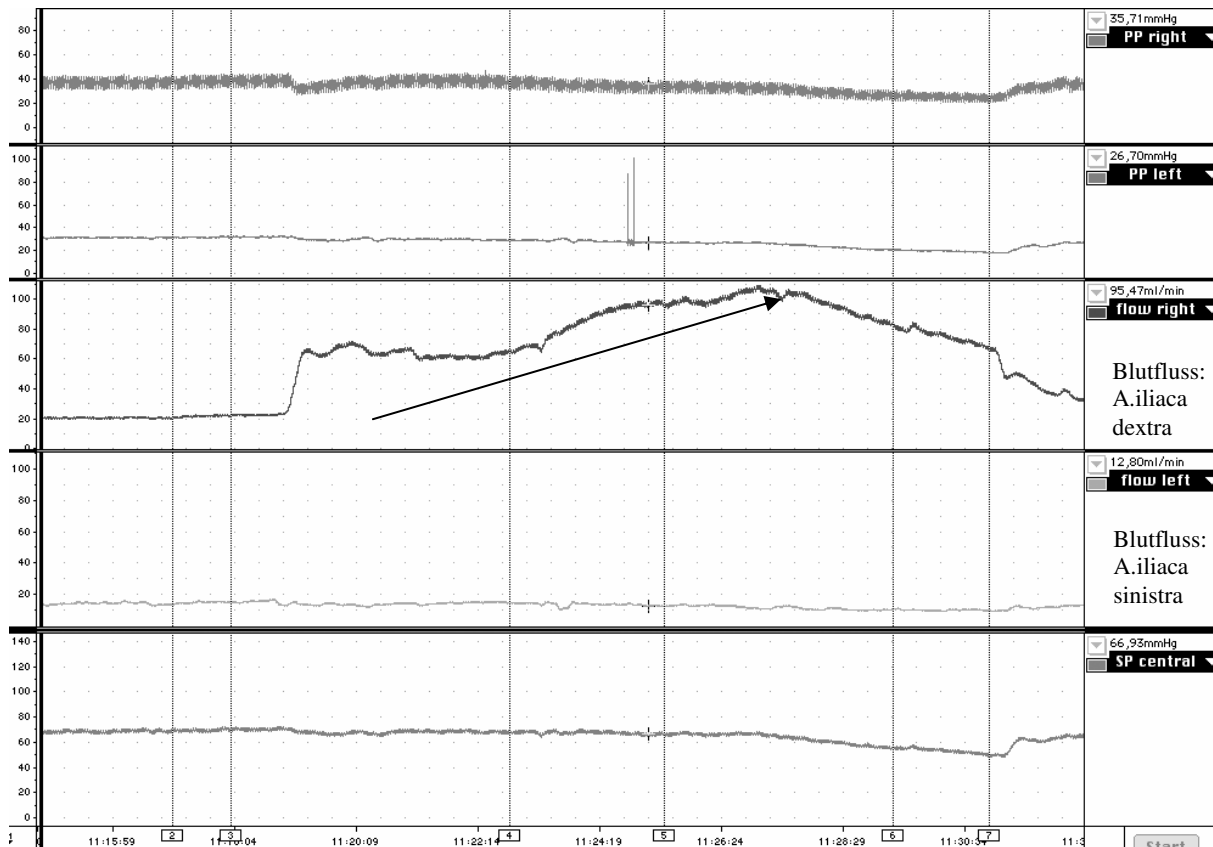


Abbildung 28: Fluss- und Druckverhältnisse der hämodynamischen Messung eines Tieres aus der FGF-4-Gruppe. Der Fluss in der rechten A. iliaca nimmt unter Adenosin stark zu (siehe Pfeil), der Fluss in der linken Gliedmaße verändert sich kaum.

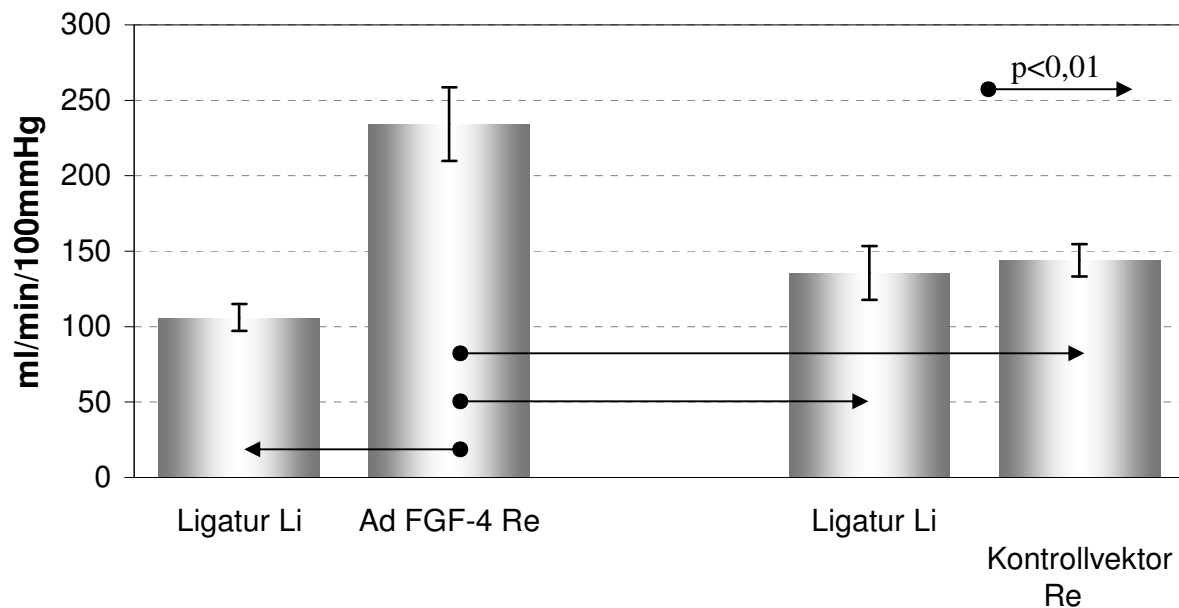


Abbildung 29: Gegenüberstellung der maximalen kollateralen Konduktanzen der FGF-4-Gruppe und der Kontrollvektor-Gruppe, jeweils für die linken (Li) und rechten (Re) Beine getrennt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihren Standardfehlern (SEM).

4.2.2.3. Maximale kollaterale Konduktanz nach Stimulierung der Arteriogenese mit rh FGF-4 und rh GM-CSF

In dieser Gruppe wurden die Tiere wie in der FGF-4-Gruppe behandelt, es wurde jedoch zusätzlich rh GM-CSF lokal in das Kollateralsystem infundiert.

Die maximal erreichte Konduktanz der linken ligierten Hintergliedmaße lag bei $122,7 \pm 12,4$ ml/min/100 mmHg. Die rechte mit rh FGF-4 und rh GM-CSF behandelte Seite zeigte eine maximale kollaterale Konduktanz von $181,1 \pm 29,7$ ml/min/mmHg. Diese Werte waren im Vergleich zur FGF-4-Gruppe nicht signifikant erniedrigt.

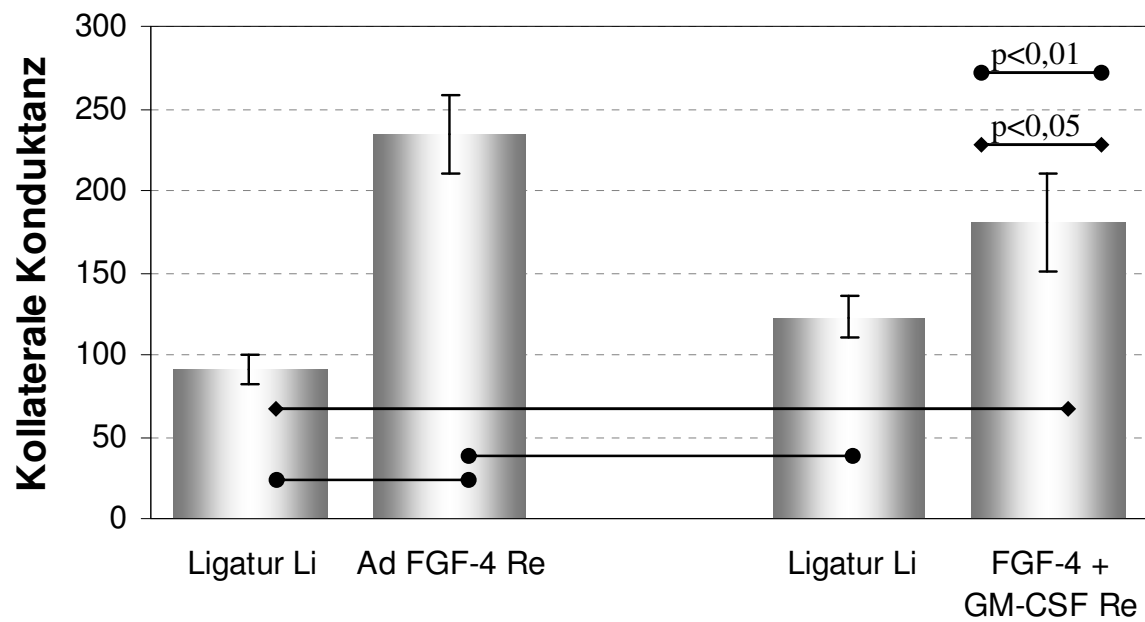


Abbildung 30: Die maximalen kollateralen Konduktanzen der beiden Hintergliedmaßen (links (Li) und rechts (Re)) der FGF-4 - und der FGF-4/GM-CSF -Gruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihren Standardfehlern (SEM).

4.3. Angiographische Auswertungen

Neben den hämodynamischen Auswertungen wurden in den gleichen Versuchsgruppen Kontrastmittel-gestützte Angiographien der Oberschenkel erstellt. Die Hintergliedmaßen wurden nach postmortalen Perfusion mit Bariumsulfat-haltigem Kontrastmittel präpariert. Anschließend wurden davon im Balteau-Röntgengerät Angiogramme erstellt, die quantitativ ausgewertet wurden.

Die Kollateralgefäße der Kaninchenhintergliedmaße anastomosieren zwischen den Aa. profunda femoris und circumflexa femoris lateralis und den Aa. genus descendens, caudalis femoris und Rr. musculares distales (*Abbildung 31*). Daher wird nachfolgend für alle Versuchsgruppen nur der mittlere Oberschenkelbereich stellvertretend abgebildet.

Für jedes Bein wurden die den Gefäßverschluss überbrückenden Kollateralgefäße einzeln ausgezählt und somit die Kollateralenzahlen bestimmt. Als Kollateralgefäße galten nur Gefäße mit eindeutig erkennbarer Stamm-, Mittel- und Wiedereintrittszone.

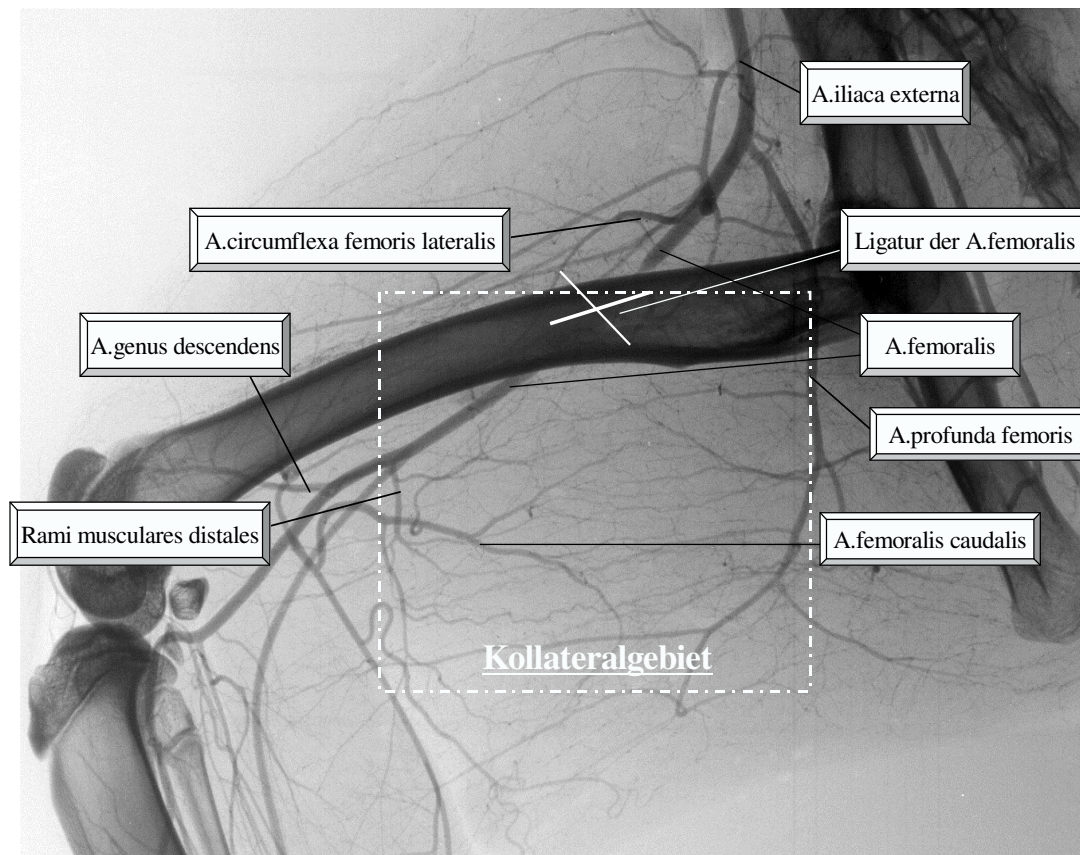


Abbildung 31: Postmortale Angiographie nach einer Woche Ligatur der Femoralarterie. Die dem Kollateralgebiet vorgeschalteten und nachfolgenden Arterien sind bezeichnet

Nach einwöchiger Ligatur mit lokaler Infusion von rh GM-CSF bzw. lokaler Transfektion mit Ad5.1FGF-4 oder einer Kombination aus beidem wurden postmortale Angiographien angefertigt. Zunächst wurde jedoch das endogen bedingte Kollateralwachstum nach Femoralisligatur ohne äußere Stimulierung durch Wachstumsfaktoren analysiert.

Die Angiographien wurden zuerst innerhalb der Versuchsgruppen, bzw. bei beidseitiger Ligatur auch interindividuell, und anschließend gruppenübergreifend verglichen.

4.3.1. Kollateralgebiete ohne exogene Stimulierung

Die drei Versuchsgruppen zur Untersuchung des Kollateralgebietes entsprechen den Kontroll-Gruppen der hämodynamischen Auswertung.

Nach einwöchiger Ligatur mit lokaler Albumininfusion über eine osmotische Minipumpe (n=6) waren wenige, feine Kollateralarterien zu erkennen, die die für sie typische korkenzieherartige Form aufwiesen (*Abbildung 34*). Die Anzahl der angiographisch auszählbaren Gefäße lag bei $12,5 \pm 1,3$.

Bei 6 Tieren wurde ein intravasaler Gentransfer eines adenoviralen Kontrollvektors (Ad5.1) durchgeführt. Die Gruppe diente als Kontrolle für den Transfer von Ad5.1 FGF-4. Die Transfektion mit Ligatur der A. femoralis wurde im rechten Bein durchgeführt, die linke A.femoralis wurde ebenfalls verschlossen, jedoch nicht weiter behandelt. Die Kollateralgebiete wiesen korkenzieherartige feine Kollateralen auf, ohne dass sie sich im Seitenvergleich in Qualität oder Quantität maßgeblich unterschieden (siehe *Abbildung 32*). Die Kollateralzahlen lagen auf der Transfektionsseite bei $13,8 \pm 0,3$ und auf der Ligaturseite bei $13,7 \pm 0,22$.

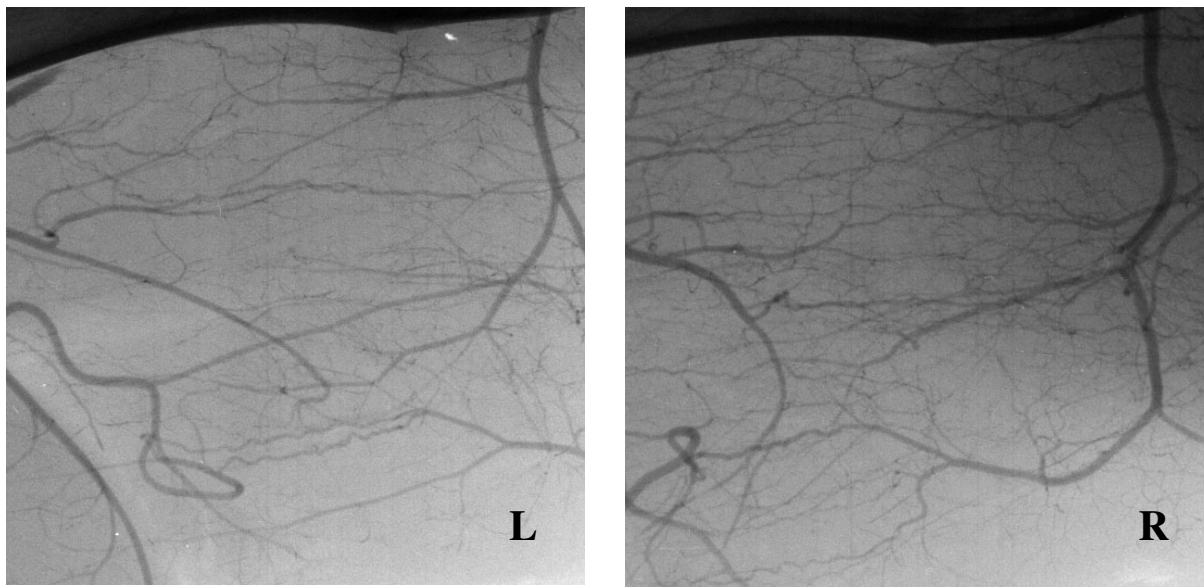


Abbildung 32: Vergleichende Darstellungen der Kollateralgebiete des nicht transfizierten Beins (L) und des mit dem Kontrollvektor transfizierten Beins (R).

Um festzustellen, ob die beidseitige Ligatur Auswirkungen auf das Kollateralwachstum hat, wurde eine Gruppe mit beidseitig ligierte Tieren gebildet.

Die Kollateralgebiete der beidseits ligierten Kaninchen (n=3) unterschieden sich nicht von denen der einseitig ligierten Kontrolltiere, es waren ebenfalls wenige feine Kollateralarterien sichtbar. Weiterhin ergaben sich bei den beidseits ligierten Tiere innerhalb dieser Gruppe keine signifikanten Seitendifferenzen. Auf der linken Seite waren $13 \pm 0,85$ Kollateralen zählbar, auf der rechten Seite $12,33 \pm 0,51$.

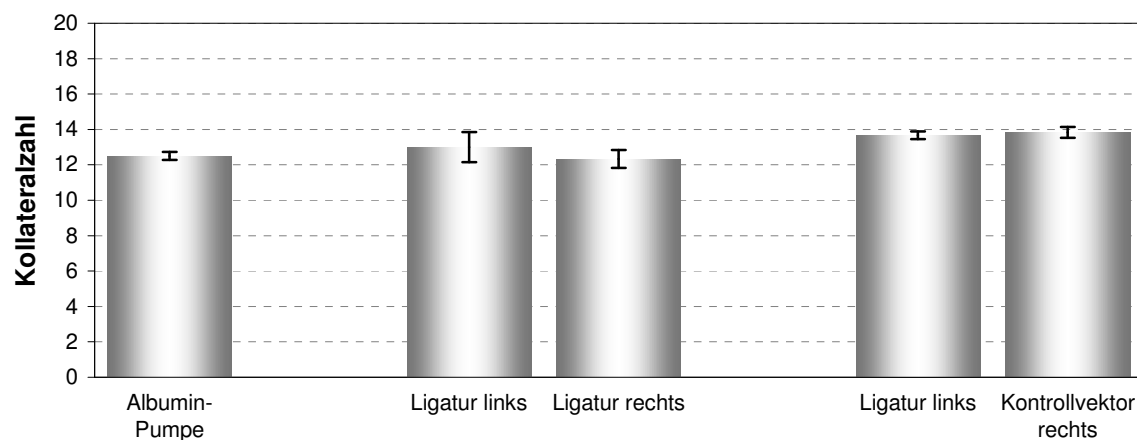


Abbildung 33: Dargestellt sind die Mittelwerte der Kollateralzahlen die Kontrollgruppen mit Standardfehlern (SEM).

Ganz links dargestellt ist die Kollateralzahl der Tiere mit lokaler Albumin-Infusion. Die beiden mittleren Balken geben die Werte der beidseits ligierten Tiere wieder, jeweils für das linke und rechte Bein. Das Gleiche gilt für die Gruppe des Kontrollvektors, die Transfektion wurde im rechten Bein durchgeführt. Keine Seite wies eine signifikant veränderte Kollateralzahl auf.

4.3.2. Kollateralgebiete nach lokaler Infusion von rh GM-CSF

Nach einwöchiger Ligatur und Infusion von 100 µg GM-CSF/Pumpe (5 µg/kg) kombiniert mit subkutaner Gabe von 26 µg GM-CSF/kg waren vermehrt kleine Kollateralarterien im Angiogramm ersichtlich. Die Anzahl großlumiger Kollateralgefäße, die vor allem für einen gesteigerten Blutfluss verantwortlich sind, konnte allerdings nicht erhöht werden.

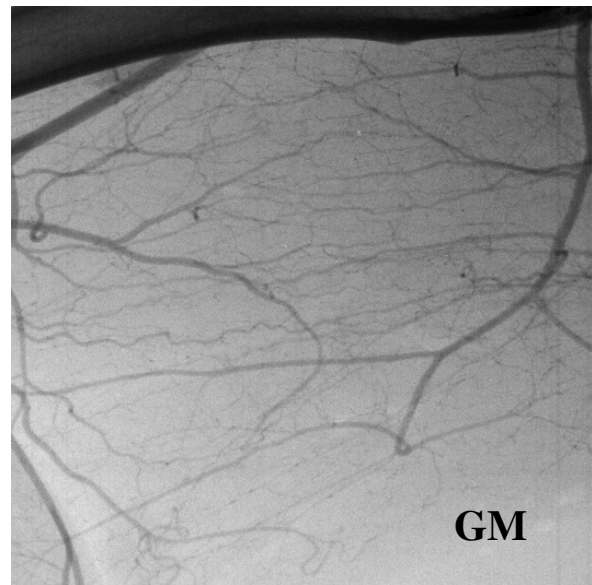


Abbildung 34: Angiographie eines typischen Kollateralgebietes nach lokaler Infusion 0,1 %iger Albuminlösung

Abbildung 35: Angiographie eines typischen Kollateralgebietes nach lokaler Infusion von rh GM-CSF

Die Anzahl der in den Angiographien sichtbaren Kollateralgefäße der GM-CSF-Gruppe lag bei $16,2 \pm 0,35$. Im Vergleich zur Kontrolle ($12,5 \pm 1,3$) stellte dies eine signifikante Erhöhung dar.

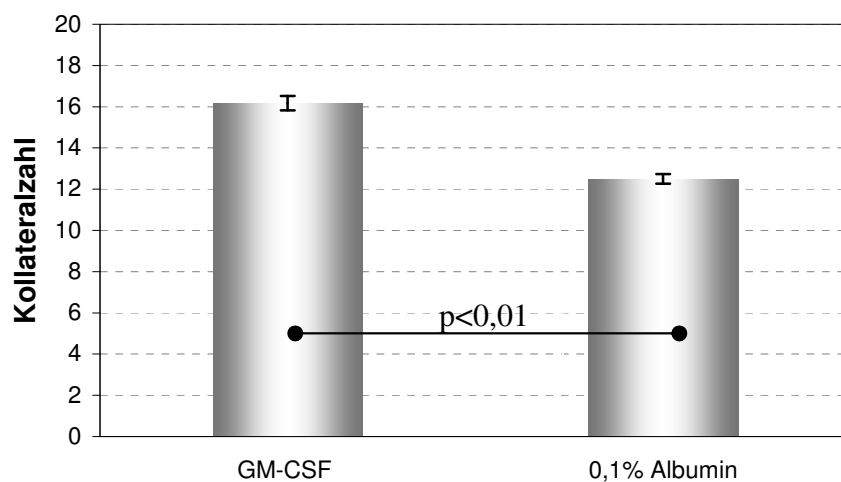


Abbildung 36: Anzahl der angiographisch sichtbaren Kollateralarterien der GM-CSF-Gruppe und der Kontrollgruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihren Standardfehlern (SEM).

4.3.3. Kollateralgebiete nach Stimulierung der Arteriogenese mit rh FGF-4

Die rechte A. femoralis wurde ligiert und ein intraarterieller Gentransfer mit Ad 5.1 FGF-4 wurde durchgeführt. Die linke A. femoralis wurde ohne weitere Behandlung ligiert.

Innerhalb der Gruppe war die Anzahl der Kollateralgefäße der transfizierten Seite ($18,7 \pm 0,2$) im Vergleich zur Gegenseite ($12,8 \pm 0,8$) signifikant erhöht. Auch im Vergleich zur Kontroll-Gruppe ($13,8 \pm 0,3$) waren die Kollateralzahlen nach Behandlung mit Ad5.1FGF-4 signifikant erhöht.

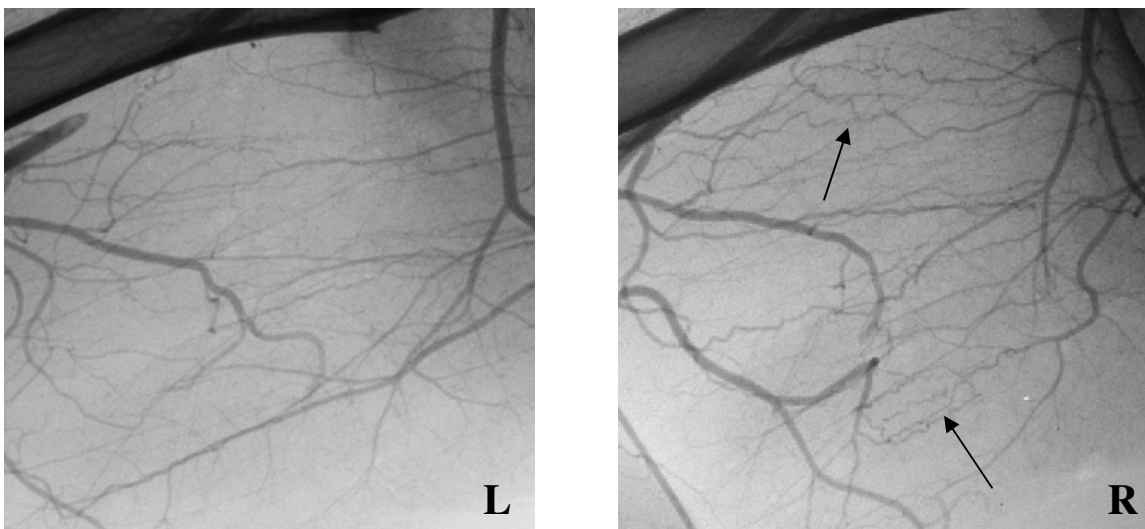


Abbildung 37: Die beiden Angiographie-Ausschnitte zeigen das linke (L) und rechte (R) Bein desselben Tieres. Rechts wurde ein adenoviraler Gentransfer mit AdFGF-4 durchgeführt. Eine erhöhte Kollateralzahl ist hier zu erkennen, gekennzeichnet durch die Pfeile.

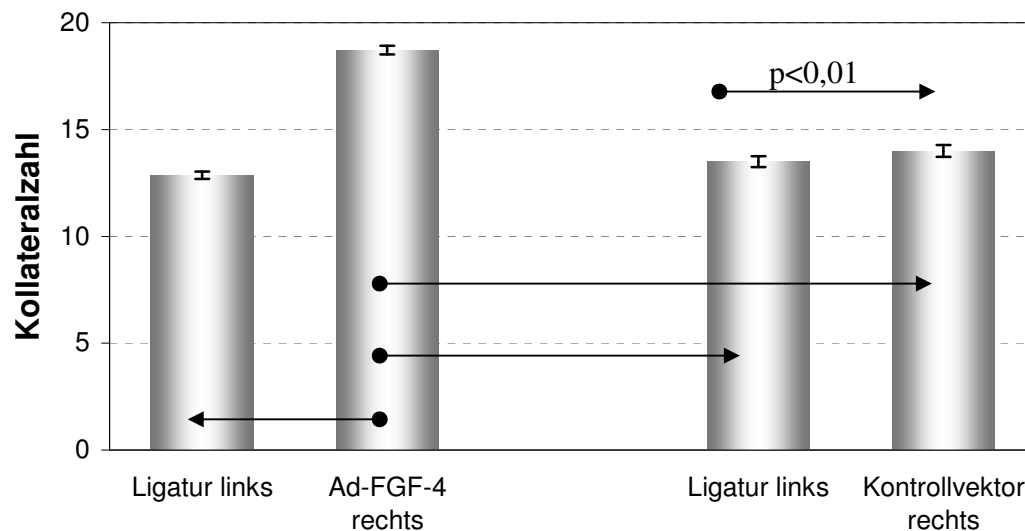


Abbildung 38: Gegenüberstellung der Kollateralzahlen der jeweils linken und rechten Beine der FGF-4-Gruppe (links) und der Kontrollvektor-Gruppe (rechts). Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihren Standardfehlern (SEM).

4.3.4. Kollateralgebiete nach Stimulierung der Arteriogenese mit rh FGF-4 und rh GM-CSF

In dieser Gruppe (n=6) wurde auf der rechten Seite ein intraarterieller Gentransfer mit AdFGF-4 in Kombination mit lokaler Infusion von GM-CSF (100 µg/ Pumpe, entsprechend 5 µg/kg) durchgeführt. Zusätzlich wurden 26 µg/kg GM-CSF subkutan verabreicht. Auf der linken Seite erfolgte die Ligatur der A.femoralis ohne weitere Behandlung.

Die Kollateralgebiete der behandelten Seiten zeigten angiographisch nur wenige Kollateralen mehr ($16,67 \pm 1,78$) als die ligierte Gegenseite ($14,33 \pm 1,47$). Die Unterschiede waren nicht signifikant.

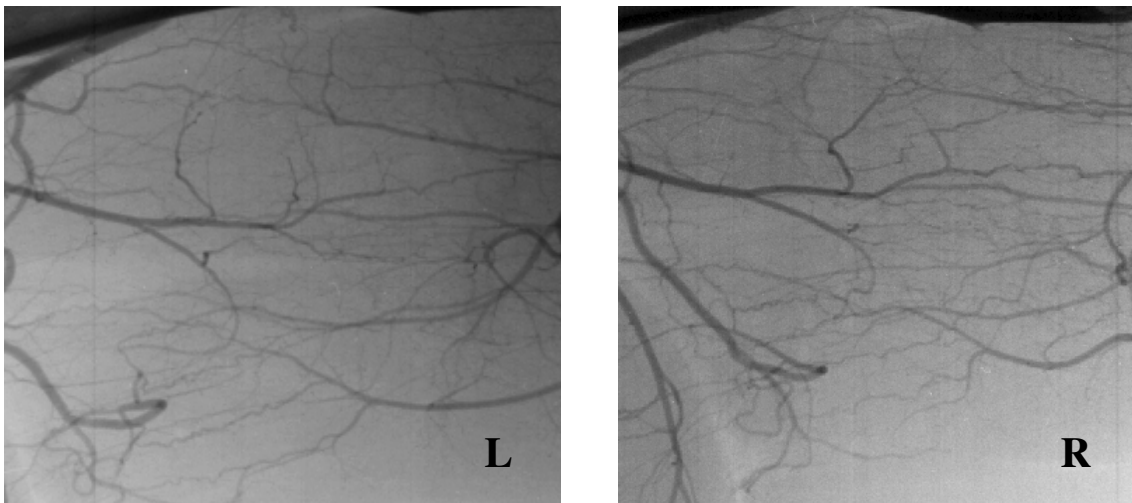


Abbildung 39: Links (L) ein typisches Kollateralgebiet der Ligaturseite, rechts (R) ein typisches Kollateralgebiet der mit Gentransfer und Protein-Infusion behandelten Seite desselben Tieres.

Beim Vergleich der Kollateralzahlen der FGF-4 Gruppe mit denen der FGF-4/GM-CSF-Gruppe waren ebenfalls keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Beim Seitenvergleich innerhalb der FGF-4/GM-CSF-Gruppe waren die Kollateralzahlen nicht signifikant unterschiedlich, jedoch waren auf der Transfektionsseite dieser Gruppe signifikant mehr Kollateralarterien sichtbar als auf der nicht transfizierte Seite der FGF-4-Gruppe ($p < 0,05$).

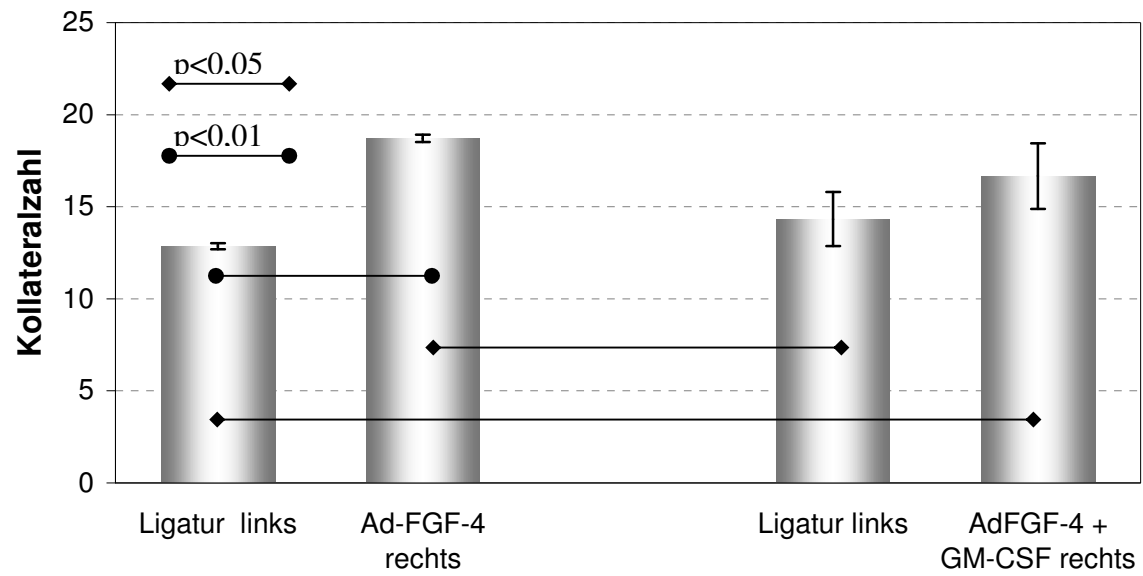


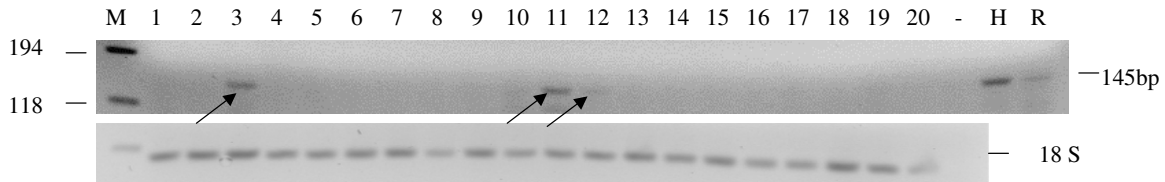
Abbildung 40: Anzahl sichtbarer Kollateralarterien jeweils für die linken und rechten Hintergliedmaßen der FGF-4-Gruppe und der FGF-4/GM-CSF-Gruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihren Standardfehlern (SEM).

4.4. Nachweis der mRNA von rh FGF-4 im Gewebe

Es wurden Untersuchungen zum Nachweis der mRNA für humanes FGF-4 in verschiedenen Geweben vorgenommen. Zum einen wurde ein Tier, in dem ein adenoviraler intravasaler Gentransfer mit Ad5.1FGF-4 durchgeführt worden war, untersucht, zum anderen ein einseitig ligiertes nicht transfiziertes Tier (siehe *Abbildungen 41 und 42*).

Als Kontrolle zur Anwesenheit von mRNA in den untersuchten Proben diente der Nachweis der Kaninchen -18S RNA. Als Positivkontrolle wurde der Nachweis der Sequenzen für humanes FGF-4 in humaner DNA durchgeführt. Außerdem wurde auch Kaninchen-DNA auf das Vorhandensein humaner FGF-4-Sequenzen untersucht.

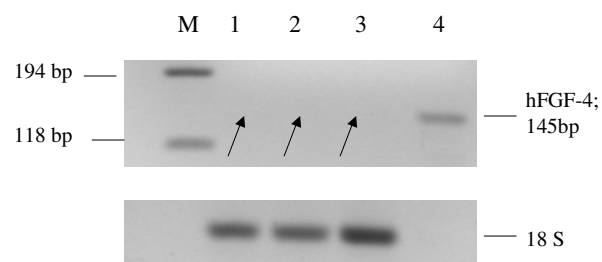
Die mRNA des humanen FGF-4 konnte ausschließlich in Kollateralarterien, in denen die Transfektion stattfand, außerdem in der Milz und schwach auch in der Leber des transfizierten Tieres nachgewiesen werden. Zudem war der Nachweis in der humanen DNA positiv, in der Kaninchen-DNA nur sehr schwach positiv.



M Größenmarker

1 Art. profunda femoris, Transfektionsseite	11 Milz	- Negativkontrolle (Wasser)
2 Art. profunda femoris, Kontrollseite	12 Leber	H gen. DNA human
3 Kollaterale, Transfektionsseite	13 Herz	R gen. DNA rabbit
4 Kollaterale, Kontrollseite	14 Hirn	
5 Art. saphena, Kontrollseite	15 Hoden, Transfektionsseite	
6 Art. saphena, Transfektionsseite	16 Hoden, Kontrollseite	
7 Art. femoralis, Kontrollseite	17 M.vastus intermedius, Transfektionsseite	
8 Art. femoralis, Transfektionsseite	18 M.vastus intermedius, Kontrollseite	
9 Art. iliaca, Kontrollseite	19 M.gastrocnemius, Transfektionsseite	
10 Art. iliaca, Transfektionsseite	20 M.gastrocnemius, Kontrollseite	

Abbildung 41: Agarosegel mit den Auftrennungen der DNA-Fragmente aus der RT-PCR mit Geweben eines mit Ad5.1FGF-4 transfizierten Tieres. Die Pfeile kennzeichnen die Banden, die das Vorhandensein der humanen FGF-4-mRNA in den transfizierten Kollateralarterien, in Milz und Leber nachweisen.



- M Größenmarker
1 Milz
2 Kollateralarterie
3 präformierte Kollateralarterie
4 Positiv-Kontrolle, humane genomische DNA

Abbildung 42: Agarosegel mit den Auftrennungen der DNA-Fragmente aus der RT-PCR des Gewebes des Kontrolltiers. Auf der Höhe der Positivkontrolle (4) ist im Kontroll-Gewebe keine mRNA von hFGF-4 nachweisbar (siehe Pfeile)

5. DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, eine neue Methode des intravasalen adenoviralen Gentransfers im Modell der ischämischen Kaninchenhintergliedmaße zu etablieren. Unter Anwendung dieser Methode sollte der Einfluss eines für rh FGF-4 kodierenden adenoviralen Vektors auf das Wachstum von Kollateralgefäßen untersucht werden. Weiterhin wurde die intravasale Transfektion dieses Vektors mit einer lokalen permanenten Infusion von rh GM-CSF kombiniert. Es sollte überprüft werden, ob dies einen zusätzlichen stimulativen Effekt auf die Arteriogenese hat.

Zur Quantifizierung des Wachstums der Kollateralarterien im ischämischen Hinterlauf des Kaninchens wurde ein hämodynamisches Modell verwendet sowie angiographische Auswertungen vorgenommen.

Erstmals konnte in der hier beschriebenen Studie eine Stimulierung des Kollateralgefäßwachstums im Kaninchenmodell nach einem lokalen intraarteriellen Gentransfer nachgewiesen werden.

5.1. Modell der Ligatur der Femoralarterie im Kaninchen

Zur Untersuchung des Einflusses der lokalen adenoviralen Transfektion und der lokalen rh GM-CSF-Infusion wurde ein Kaninchenmodell gewählt. Die Femoralarterie wurde akut verschlossen, so dass präformierte Kollateralgefäße, die natürliche Umgehungskreisläufe darstellen, vermehrt durchblutet wurden. Die arterio-arteriellen Anastomosen wachsen darauf hin im Zuge der Arteriogenese zu größeren Gefäßen aus. Die Ligatur der Femoralarterie stellt ein etabliertes Modell zur Quantifizierung des Kollateralgefäßwachstums dar.

In diesem Tiermodell ist aufgrund der normoxischen Situation im Oberschenkelbereich² das Wachstum der Kollateralgefäße auf den Prozess der Arteriogenese zurückzuführen. In distalen Regionen der Hintergliedmaße, in denen Hypoxie vorliegt, findet in geringem Maße auch Angiogenese statt. Aufgrund der Hypoxie⁹⁵ werden Angiogenesefaktoren induziert, die das lokale Wachstum von Kapillargefäßen in der ischämischen Region anregen⁹⁶.

5.2. Hämodynamische Untersuchungen zur Bestimmung der maximalen kollateralen Konduktanz

Im hier verwendeten Tiermodell konnte die Kapazität des Kollateralsystems in vivo mittels hämodynamischer Messungen untersucht und durch die Bestimmung der maximalen kollateralen Konduktanz bewertet werden. Die kollaterale Konduktanz wird durch eine Formel unter Verwendung des Kollateralflusses und der Druckdifferenz entlang der Kollateralgefäße bestimmt. Mittels Ultraschall-Messsonden wurde der Blutfluss in der dem Kollateralgefäß vorgeschalteten Arteria iliaca communis perivaskulär gemessen und dem Kollateralfluss gleichgesetzt. Der Blutfluss in diesem Gefäß, der nicht in das Kollateralsystem übergang, war zu vernachlässigen. Hierzu gehörten Äste der A. iliaca interna. Der invasiv gemessene Blutdruck in der distal des Kollateralgebietes liegenden A. saphena wurde dem Perfusionsdruck des dem Kollateralgebietes nachgeschaltetem Gefäßbettes gleichgesetzt.

Bei jedem Tier wurde die maximale kollaterale Konduktanz bestimmt, um die maximal mögliche Kapazität des Kollateralgefäßsystems des Hinterbeins quantifizieren zu können. Die maximale kollaterale Konduktanz wurde bei maximalem Blutfluss bestimmt, der durch den Einsatz eines pharmakologisch wirksamen Vasodilatators hervorgerufen wurde.

5.2.1. Adenosininfusion zur Bestimmung der maximalen Konduktanz

Zur Bestimmung der maximalen kollateralen Konduktanz wurde Adenosin über die kaudale Mesenterialarterie in die Aorta infundiert. Hierdurch konnte eine maximale Gefäßdilatation in den Hintergliedmaßen erreicht werden.

Vier verschiedene Adenosin-Rezeptoren sind bekannt, im einzelnen handelt es sich um die Rezeptoren A1, A2a, A2b und A3. Direkt am Herzen bewirkt Adenosin über die A1- und A3-Rezeptoren negative Chronotropie und Dromotropie⁹⁷. Im peripheren Gefäßsystem überwiegen A2a-Rezeptoren, die z.B. auf Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen vorkommen. Diese Rezeptoren sind für die vasodilatative Wirkung von Adenosin verantwortlich. Da die Halbwertszeit des Adenosins im Blut bei nur etwa 0,6 bis 1,5

Sekunden liegt⁵, ist die exogen hervorgerufene Vasodilatation durch verschiedene Konzentrationen optimal modulier- und kontrollierbar.

Es wurden ansteigende Adenosin-Konzentrationen eingesetzt, um eine stufenweise Erhöhung der Durchblutung der Gliedmaßen zu erreichen und um so die maximale Konduktanz feststellen zu können. Die infundierten Adenosinkonzentrationen von 100, 300, 450 und 600 µg/kg KGW/min wurden empirisch ermittelt.

Bei der Konzentration von 100 µg/kg KGW/min stellte sich in der hämodynamischen Messung keine oder nur eine minimale Änderung der Blutfluss- und Blutdruckwerte ein. Der Blutfluß konnte mit 300 µg Adenosin/kg KGW/min gesteigert werden und erreichte entweder bei 450 oder 600 µg/kg KGW/min sein Maximum, was die maximale Vasodilatation der Hintergliedmaßen kennzeichnete. Die maximale kollaterale Konduktanz wurde für jedes Tier bei maximaler Vasodilatation bestimmt. Wurden Adenosinkonzentrationen über 600 µg/kg KGW/min infundiert, hatte dies Auswirkungen auf die gesamte Kreislagsituation, und der zentrale Blutdruck fiel ab. Bei einem Abfall des zentralen Blutdrucks unter 50 mmHg wurde die Adenosininfusion abgebrochen.

5.3. Angiographisches Modell zur Untersuchung des Kollateralwachstums

Die postmortal durchgeführten Angiographien wurden nach druckkontrollierter intraaortaler Infusion eines Barium-Kontrastmittels auf Gelatinebasis erstellt. Die Kontrastmittel-perfundierten Hintergliedmaßen wurden in einem Balteau-Apparat geröntgt²⁵. Alle Kollateralarterien, die der Klassifizierung nach Longland⁹³ entsprachen, d.h. nur Kollateralarterien, die eine eindeutige Stamm-, Mittel- und Wiedereintrittszone aufwiesen, wurden je Gliedmaße ausgezählt.

Nach dem Hagen-Poiseuille'schen Gesetz verhält sich der Widerstand umgekehrt proportional zur vierten Potenz des Radius. Das bedeutet, dass ein größeres Gefäß überproportional mehr zum Blutfluß beiträgt als ein kleines. Da die Anzahl der sichtbaren Kollateralgefäße keine Aussage über ihren Durchmesser macht, ist die quantitative Auszählung der Kollateralarterien lediglich ein ungefähres Maß für das Kollateralgefäßwachstum, das nicht in direktem Zusammenhang mit der physiologischen Kapazität der Gefäße steht. Die Angiographie muß daher immer im Zusammenhang mit physiologischen Daten betrachtet werden.

5.4. Quantifizierung der Leukozyten des peripheren Blutes

Im Rahmen dieser Dissertation wurden Untersuchungen der im peripheren Blut des Kaninchens enthaltenen Leukozyten durchgeführt.

Hierzu wurde eine Methode zur Quantifizierung der weißen Blutkörperchen mittels Durchflusszytometrie etabliert, die die qualitative und quantitative Differenzierung von Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten erlaubte.

5.4.1. Etablierung der Leukozytenzellmessung im Kaninchenblut mittels Durchflußzytometrie

Durch einen Panleukozytenmarker, einen monoklonalen gegen Kaninchen-CD45 gerichteten Antikörper, wurden die Gesamt-Leukozyten markiert. CD45 ist ein Antigen, das von allen hämatopoietischen Zellen, außer denen der roten Zelllinie exprimiert wird⁹⁸⁻¹⁰⁰. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass alle Leukozyten mittels dieses Antikörpers spezifisch markiert wurden. Die Färbung wurde mit Hilfe eines FITC-konjugierten Sekundärantikörpers durchgeführt. Die Monozyten und die Granulozyten konnten durch einen gegen CD14 gerichteten, PE-konjugierten Antikörper markiert werden. Außer Monozyten und Granulozyten können auch dendritische Zellen und Makrophagen das CD14-Antigen tragen. Da die beiden letzteren Zelltypen im peripheren Blut nur in sehr geringen Konzentrationen (unter 1%) vorkommen, waren sie vernachlässigbar.

Da die Erythrozyten vor der Messung lysiert wurden, kann ausgeschlossen werden, dass sie fälschlicherweise als Leukozyten identifiziert wurden. Das Gleiche gilt auch für die Plättchen, da sie aufgrund ihrer Größe in den Punktdiagrammen nicht bei den Leukozyten lokalisiert sein konnte. Hinzu kommt, dass die Leukozyten spezifisch markiert wurden.

Mittels Durchflusszytometrie konnten die prozentualen Anteile der markierten Zellpopulationen an der Gesamtpopulation bestimmt werden. Durch Zugabe fluoreszierender Partikel in definierter Konzentration war zusätzlich eine Absolutzellzahlbestimmung möglich.

Die jeweilige Identifizierung der durch CD14-Antikörper markierten Monozyten und Granulozyten konnte aufgrund ihrer unterschiedlichen Streulichteigenschaften erfolgen, die im Punktdiagramm als Seitwärtsstreulicht (Sidescatter, SSC) auf der X-Achse dargestellt wurden. Das Seitwärtsstreulicht kann zur Bestimmung der Strukturkomplexität, z.B. der Granulierung, herangezogen werden. Aufgrund der stärkeren Granulierung der Granulozyten war deren Abgrenzung gegenüber den Monozyten möglich. CD45-positive Zellen, die CD14-negativ waren, wurden näherungsweise als Lymphozyten identifiziert.

Wurden die Absolutzahlen von Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten addiert, so ergaben sich leichte Differenzen von der Gesamtzahl der Leukozyten. Im Mittel konnten 2,94 $\pm$ 1,47 % der Gesamtlymphozyten nicht in den Untergruppen erfasst werden, da sie sich nicht eindeutig einer der Subpopulationen im Punktdiagramm zuordnen ließen.

5.4.2. Vergleich der Kaninchenleukozyten-Messung mittels Durchflußzytometrie und Hämatologieanalysator

Die Messung der Kaninchenleukozyten mittels Durchflusszytometrie wurde mit einem Standardverfahren zur Zellzahlbestimmung aus der klinischen Routine verglichen. Hierzu wurde ein vollautomatischer Hämatologieanalysator verwendet.

Bei dem eingesetzten Hämatologieanalysator (Sysmex K-450) handelte es sich um ein auf humanes Blut geeichtes Gerät, das unter Verwendung des elektrischen Widerstandsprinzip arbeitet. Die Größe der Zellen stellt bei Untersuchungen, die auf dem elektrischen Widerstandsmessprinzip beruhen, einen entscheidenden Faktor dar. Signale, die einem bestimmten Mindestwert nicht entsprechen, werden bei der Zellzählung nicht berücksichtigt. Somit wird verhindert, dass Zellfragmente oder elektrisches Rauschen als Zellen gezählt werden. Andererseits besteht hierdurch die Möglichkeit, dass kleine Zellen nicht als solche erkannt werden¹⁰¹. Kaninchenleukozyten weisen einen durchschnittlich 5 μ m kleineren Durchmesser als humane Leukozyten auf. Die Befürchtung, dass die kleineren Kaninchenleukozyten im Hämatologieanalysator nicht identifiziert werden können, wurde nicht bestätigt.

Beim Vergleich der mittels Hämatologieanalysator und Durchflusszytometrie gemessenen Leukozytenzahlen konnte festgestellt werden, dass die mittels Hämatologieanalysator

gemessenen Werte in jedem Fall höher lagen, durchschnittlich $1,25 \times 10^3$ Zellen/ μl , als die mittels Durchflusszytometrie bestimmten Werte. Die erhaltenen Werte beider Methoden korrelierten jedoch hoch, der Korrelationskoeffizient lag bei 0,93. Die Differenzen der mit beiden Geräten gemessenen Werte sind auf methodisch bedingte Unterschiede zurückzuführen. Aufgrund der hohen Korrelation stellen beide Methoden gute Möglichkeiten zur Bestimmung der Leukozytenzahlen des peripheren Blutes des Kaninchens dar. Allerdings besteht ein großer Vorteil der Durchflusszytometrie darin, dass zusätzlich eine Differenzierung der Leukozyten-Subpopulationen möglich ist.

5.4.3. Leukozytenmessung unbehandelter Kaninchen

Es wurden Blutzellmessungen unbehandelter Tiere durchgeführt, um Standard-Normalverteilungen der Leukozyten und deren Untergruppen zu erhalten. Die Angaben, die in der Literatur für Kaninchen der Rasse Weiße Neuseeländer gemacht werden, schwanken für Leukozyten zwischen $3,1 \times 10^3$ und $13,28 \times 10^3$ Zellen/ μl ^{33,102}. Die in dieser Arbeit gemessenen Werte für Leukozyten lagen bei $6,5 \times 10^3 \pm 1,6 \times 10^3$ Zellen/ μl .

Die geringe Schwankungsbreite dieser Werte kann in Zusammenhang mit der guten Meßmethode, der einheitlichen Kaninchenpopulation (gleiches Alter, Geschlecht und Züchtung) und der stressarmen Blutentnahmetechnik stehen.

Die in der Literatur gemachten Angaben über die prozentuale Verteilung der Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten entsprechen den hier gemessenen Werten.

5.4.4. Einfluß von rh GM-CSF auf die peripheren Leukozyten des Kaninchens

In dieser Studie sollte unter anderem überprüft werden, welchen Einfluss eine über den Zeitraum von einer Woche erfolgende intraarterielle kontinuierliche Infusion von humanem rekombinantem GM-CSF (Sargramostim) auf die Konzentration der Monozyten des peripheren Blutes des Kaninchens hat. Es stellte sich heraus, dass sich die Anzahl der Monozyten bei kombinierter Applikation von 5 $\mu\text{g/kg}$ intraarteriell mit 16 $\mu\text{g/kg}$ pro Tag subkutan nicht veränderte. Diese Ergebnisse decken sich mit einer Langzeitstudie, in der rh

GM-CSF (10 µg/kg) fünf Mal pro Woche an hyperlipidämischen Kaninchen (Watanabe) verabreicht wurde. Es konnten hier ebenfalls keine Veränderungen der Monozytenzahlen festgestellt werden¹⁰³. Die Granulozytenzahl fiel am zweiten Tag nach Beginn der subkutanen rh GM-CSF-Injektion signifikant ab. Außerdem war sie im Vergleich zur Kontrollgruppe am 3. und 4. Tag nach Implantation der osmotischen Minipumpe signifikant erniedrigt. Die Gesamtzahl der Leukozyten war zu keinem Zeitpunkt signifikant verändert.

In vitro Studien an humanen Knochenmarkszellen zeigten, dass rh GM-CSF die Proliferation von hämatopoietischen Stammzellen anregt und die Formation von granulozytären und monozytären Kolonien stimuliert⁴⁶. Weiterhin wurde die Phagozytoseaktivität von Granulozyten und Monozyten nach Zugabe von rh GM-CSF erhöht¹⁰⁴. Durch Verabreichung von rh GM-CSF an Patienten wird eine erhöhte Anzahl zirkulierender Granulozyten und Monozyten erreicht¹⁰⁵, die beispielsweise vor Infektionen (febrile Neutropenie) nach erfolgter Chemotherapie schützen soll¹⁰⁶.

Obwohl zwischen humanem und murinem GM-CSF eine mehr als 50 %ige Homologie besteht, existiert zwischen beiden Proteinen keine funktionelle Kreuzreaktion¹⁰⁷. Das bedeutet, dass nur rekombinantes GM-CSF der jeweiligen Spezies (Maus oder Mensch) deren Makrophagen aktiviert, nicht aber Makrophagen einer anderen Spezies¹⁰⁴.

In den hier durchgeführten Versuchen wurde humanes rekombinantes GM-CSF im Kaninchenmodell eingesetzt. Möglicherweise besteht zwischen humanem und Kaninchen-GM-CSF ebenfalls keine funktionelle Kreuzreaktion. Dies würde erklären, warum nach der intraarteriellen kontinuierlichen Infusion von rh GM-CSF kein vermehrtes Auftreten von Monozyten und Granulozyten im Kaninchen zu erkennen waren.

Ab einer Konzentration von 500 µg GM-CSF/osmotische Minipumpe (entspr. 26 µg/kg) wurden jedoch Auffälligkeiten in den durchflusszytometrischen Messungen beobachtet. Die charakteristische Abgrenzung der Monozyten zu den Granulozyten war nicht mehr vorhanden. Eine realistische Erklärung für diese Veränderungen könnte in der Toxizität des rh GM-CSF liegen. Unter toxischen Einwirkungen tendieren Kaninchenmonozyten zur Granulation³³. Durch die Granulation ist denkbar, dass die Monozyten durch Überlagerung in der Durchflusszytometrie nicht mehr eindeutig nachweisbar waren. Eine verstärkte Granulation bedeutet, dass das auf die Monozyten auftreffende Licht in einem größeren Winkel abstrahlt wird, der Sidescatter einen höheren Wert ergibt und die Monozytenansammlung sich mit der Ansammlung der Granulozyten deckt. Möglicherweise

waren die toxischen Einflüsse zusätzlich mit Veränderung der Oberfläche verbunden. Auf diese Weise könnten die Monozyten die CD14-Antigene verloren oder verändert haben. Aufgrund der veränderten Oberflächeneigenschaften ist nicht auszuschließen, dass die Monozyten ebenfalls funktionelle Merkmale verändert oder verloren haben.

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen bei Konzentrationen von 1000 µg/Pumpe zeigten, dass sich die gesamten Leukozyten im Bereich von kleinen Sidescatter-Werten aufhielten. Dies deutet darauf hin, dass die Leukozyten geschädigt wurden.

5.5. Intravasaler Gentransfer

Das Konzept, mit Hilfe der lokalen Gentherapie therapeutische Wirkungen zu erzielen, wird derzeit von verschiedenen Gruppen intensiv untersucht¹⁰⁸⁻¹¹¹.

Eine wesentliche Voraussetzung für eine erfolgreiche Behandlung kardiovaskulärer Krankheiten mit Wachstumsfaktoren ist die Generierung einer ausreichend hohen lokalen Proteinkonzentration. In dieser Hinsicht könnte der Gentransfer der Therapie mit rekombinantem Protein (Wachstumsfaktoren) überlegen sein. Die direkte Applikation von Wachstumsfaktoren beinhaltet diverse Nachteile, wie z.B. die Notwendigkeit einer wiederholten Verabreichung, systemische Nebenwirkungen und hohe Kosten¹¹². Weiterhin dürfen negative Beeinflussungen, wie z.B. lokale Gefäßschäden durch die Methode der Verabreichung, nicht unterschätzt werden.

Mittels eines Vektors kann die Freisetzung von Proteinen direkt an dem Ort der erwünschten therapeutischen Wirkung erfolgen. Weitere Vorteile gentherapeutischer Strategien umfassen die Minimierung systemischer Nebenwirkungen und in Abhängigkeit vom gewählten Vektor eine kontinuierliche, jedoch zeitlich begrenzte Freisetzung des Genprodukts.

Der erste in vivo Gentransfer wurde Ende der 80er Jahre im Schweinmodell durchgeführt, wobei ein für Beta-Galaktosidase kodierender retroviraler Vektor auf iliofemorale Arterien übertragen wurde⁹⁰. Die Ergebnisse zeigten, dass in vivo ein spezifischer, lokal begrenzter Gentransfer möglich ist.

Das Ziel des vaskulären Gentransfers ist die ausschließlich lokale Transfektion von Gefäßwandzellen, um lokal hohe Konzentrationen an bestimmten Wachstumsfaktoren zu

erhalten. Es wurden verschiedene Studien publiziert, in denen die Stimulierung des Gefäßwachstums nach einem Gentransfer untersucht wurden. Dabei basierte der Gentransfer auf verschiedenen viralen Vektoren, aber auch auf anderen Methoden wie z.B. Elektroporation. Die Verwendung des adenoviralen Gentransfers bietet Vorteile, da Adenoviren in großen Mengen herzustellen sind, auch nicht-proliferierende Zellen infizieren und nur eine transiente Genexpression des zu kodierenden Faktors verursachen. Andere virale Vektoren, deren Einsatz für einen vaskulären Gentransfer denkbar ist, sind Retro-, Lenti-, Alpha-, Sendai-Viren, Vaccina- und Adeno-assoziierte Viren.

Da der adenovirale für FGF-4 kodierende Vektor (Ad5.1FGF-4) im Hinblick auf die Therapie kardiovaskulärer Krankheiten vielversprechende Ergebnisse im Tierversuch lieferte⁷⁴, wurden bereits klinische Studien an Patienten mit ischämischen Herzkrankheiten durchgeführt (AGENT (Angiogenic GENE Therapy) und AGENT-2)^{78,79}. Die AGENT-Studie war die erste randomisierte, doppel-blind, plazebo-kontrollierte klinische Studie, die eine Gen-Therapie zum Zweck der Verbesserung der myokardialen Durchblutung untersuchte. Ziel dieser Studien war, das Potenzial und die Sicherheit der Gentherapie mit Ad5.1FGF-4 festzustellen. Die Ergebnisse zeigten, dass die virale Expression auf das Herz begrenzt werden konnte und nur minimale toxikologische, bzw. immunologische Nebeneffekte auftraten. Darüber hinaus konnte ein Trend zur Verbesserung der myokardialen Durchblutung verzeichnet werden. Aufgrund des nur geringen Risikos für den Patienten besteht die potenzielle Möglichkeit, diese Therapieform mit der Verabreichung weiterer Wachstumsfaktoren zu potenzieren.

Zur Stimulation der Arteriogenese mittels Gentherapie wird die transiente Genexpression vorgezogen. Diese Möglichkeit besteht, da das Gefäßwachstum innerhalb der ersten zwei Wochen nach Gefäßverschluss am besten stimuliert werden kann⁹⁵. Eine Expression der Wachstumsfaktoren über einen Zeitraum von 1-2 Wochen ist demnach ausreichend. Eine längere Freisetzung des Transkripts könnte möglicherweise ein pathologisches Gefäßwachstum provozieren. Diese Gefahren sind besonders groß, wenn die Transfektion ektopischer Gewebe stattfindet oder das gebildete FGF-4 im Gefäßsystem zirkuliert. Die Ergebnisse der zweiten klinischen Studie zum therapeutischen Einsatz von Ad5.1FGF-4 (AGENT-2)⁷⁹ zeigen jedoch, dass dieses Risiko minimal ist, denn nach der intrakoronaren Verabreichung dieses Vektors konnte zu keinem Zeitpunkt FGF-4 im zirkulierenden Blut der Patienten nachgewiesen werden.

5.5.1. Methode des intravasalen Gentransfers

Die Effektivität des intravasalen Gentransfers ist stark abhängig von der Konzentration der viralen Vektoren. Aus diesem Grund wurden verschiedene Verfahren entwickelt, die zur Transfektion der Gefäßwand eingesetzt werden können. Hierzu zählen Katheter, die lokal hohe Vektorkonzentrationen erzeugen, nachdem sie in das Gefäß eingeführt worden sind¹¹³. Zur Stimulierung der Arteriogenese sollte das präformierte Kollateralnetzwerk transfiziert werden. Daher konnte kein auf nur einen bestimmten Gefäßabschnitt begrenztes Transfektionsverfahren angewandt werden, außerdem war es nicht möglich, diese kleinen Gefäße mittels Katheter zu erreichen. Des weiteren verursachen diese Katheter je nach Kathetertyp eine Verletzung der Gefäßwand durch den Aufbau eines Druckes, durch die Verwendung von Nadeln oder durch mechanische Reizungen.

Zur Übertragung der adenoviralen Vektoren wurde in dieser Studie eine neue Methode etabliert, um die Gefäßwandzellen der präformierten Kollateralgefäße zu transfizieren. Hierbei wurde vorübergehend die Hintergliedmaße vom Blutstrom durch Abklemmen der Arteria femoralis separiert. Nachdem das Gefäßsystem des Beins mit körperlwarmer Kochsalzlösung gespült worden war, wurden ebenfalls die großen Venen temporär verschlossen, um ein Zurückfließen des Blutes aus den Venen in die Gliedmaße zu vermeiden. Da der temporäre Verschluss der zuführenden Arterie oberhalb des Abganges der in das Kollateralgebiet übergehenden Arterien erfolgte, konnte die Vektorlösung in die präformierten Kollateralarterien verbracht und dort für 30 Minuten inkubiert werden. Der Verschluss der zuführenden Arterie bewirkte, dass der Vektor nicht aus dem Kollateralgefäßsystem der Gliedmaße herausgeschwemmt wurde. Außerdem konnte so sichergestellt werden, dass keine Inaktivierung oder Blockierung der Vektoren durch Blutbestandteile in den präformierten Kollateralarterien verursacht wurde. Weiterhin wurde der Abhängigkeit einer hohen Transfektionsrate von der Konzentration und der Einwirkzeit hiermit Rechnung getragen¹¹³.

Das in der hier durchgeführten Studie angewandte Verfahren des intravasalen Gentransfers stellte sich als praktikabel, effektiv und ausgezeichnet geeignet zur Überprüfung eines adenoviralen Vektors auf seine Fähigkeit, das Kollateralgefäßwachstum zu stimulieren, heraus.

5.5.2. Einfluß einer Vektor-induzierten Immunreaktion auf die Arteriogenese

Aufgrund der Immunogenität viraler Vektoren kann deren Injektion prinzipiell zur Auslösung einer Immunantwort führen. Gewebsschäden und eine Abnahme der transgenen Expression sind mögliche Folgen. Um Entzündungsreaktionen bzw. Immunantworten zu minimieren, wurden aus adenoviralen Vektoren sog. Backbone-Vektoren entwickelt, denen bestimmte Regionen des Erbgutes entfernt wurden⁸⁵.

Obwohl in der hier durchgeführten Studie eine Immunantwort auf das adenovirale Konstrukt nicht auszuschließen ist, konnte in der Gruppe, in der die Transfektion mit einem Kontrollvirus durchgeführt wurde, kein Einfluss auf die Arteriogenese festgestellt werden.

Auch in den bereits mit diesem Vektor durchgeführten klinischen Studien wurden nur geringe immunologische Reaktionen festgestellt^{78,79,114,115}. Jedoch ist aufgrund der Tatsache, dass Adenoviren ubiquitär vorkommende humane Pathogene sind, die Wahrscheinlichkeit groß, dass Patienten, die sich einer adenoviralen Gentherapie unterziehen, bereits zirkulierende Antikörper, bzw. T-Gedächtniszellen gegen diese Vektoren besitzen. In adulten Patienten konnte eine hohe Prävalenz (57%) von neutralisierenden Antikörpern gegen Adenoviren (Typ5) festgestellt werden¹¹⁶. Folglich kann der Erfolg des arteriellen Gentransfers und die Aufrechterhaltung der Genexpression in humanen Patienten erheblich beeinträchtigt sein.

5.5.3. Nachweis der Expression des FGF-4-Gens

Mit Hilfe einer RT-PCR wurde ein Nachweis der Expression des FGF-4-Gens erbracht. Hierzu wurden nach 5 Tagen nach der Transfektion aus einem Kaninchen verschiedene Gewebeproben entnommen, um über den Nachweis von FGF-4-mRNA die Expression des Vektorgens zu kontrollieren. Das Probenmaterial wurde hierzu von verschiedene Arterien und Muskeln der beiden Hintergliedmaßen, außerdem von weiteren Organen wie Milz, Leber, Herz, Hirn und Hoden entnommen. Als Kontrolle diente das Gewebe eines nicht-transfizierten, einseitig ligierten Kaninchens.

Der Zeitpunkt von 5 Tagen nach der Transfektion wurde gewählt, da Versuche im Rattenmodell erbracht hatten, dass nach intramuskulärer Verabreichung der Vektorlösung das Virus sein Verteilungsmaximum in verschiedenen Organen zwischen 3 und 7 Tagen post applicationem hatte. Auch in-vitro-Versuche bestätigen, dass Adenoviren 5 Tagen nach der Transfektion die größte Bioaktivität besitzen¹¹⁷.

In der hier durchgeführten Studie konnte zum ersten Mal die Expression des mittels adenoviralen intravasalen Gentransfers übertragenen Gens im Modell der ischämischen Kaninchenhintergliedmaße bewiesen werden. Eine spezifische Expression der hFGF-4-mRNA, die sich auf die Kollateralarterien der Transfektionsseite und Milz und Leber beschränkte, konnte nachgewiesen werden.

Die Sequenz des FGF-4 ist vom Menschen, von der Maus und der Ratte bekannt, nicht aber vom Kaninchen. Die Anforderungen an die Primer waren jedoch, dass sie spezifisch für humanes FGF-4 sind, um die Detektion von endogenem FGF-4 zu vermeiden. Hierzu wurden Primer aus nicht –konservierten Regionen des Gens ausgewählt, das heißt, sie unterschieden sich von der Maus- bzw. Ratten-Sequenz. Es wurde gehofft, dass sich diese Sequenzen dann auch von denen des Kaninchens unterscheiden. Dass keine Kreuzreaktivität der mRNA von FGF-4 aus dem Kaninchen und der humanen FGF-4 mRNA bestand wurde schliesslich dadurch bewiesen, dass in der humanen DNA FGF-4-Sequenzen gut nachweisbar waren, in der DNA vom Kaninchen jedoch kaum.

Der Nachweis der FGF-4-mRNA ist daher alleine auf die Vektor-vermittelte Expression zurückzuführen. Dafür spricht auch, dass nur im transfizierten Tier mRNA von hFGF-4 nachweisbar war.

Die Expression von hFGF-4 konnte in den Kollateralarterien der transfizierten Hintergliedmaße, nicht aber in weiteren Arterien oder in der Muskulatur oder im Kontrollgewebe des nicht transfizierten Tieres nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass die hier angewandte Methode des adenoviralen Gentransfers eine Möglichkeit der spezifischen Transfektion des Kollateralgefäßsystems darstellt. Die in Milz und Leber festgestellte Expression ist auf die Technik des Gentransfers zurückzuführen. Nachdem die Inkubationszeit von 30 Minuten abgeschlossen war, wurde der transiente Verschluss der Femoralarterie oberhalb der Abgänge der in das Kollateralgebiet übergehenden Gefäße wieder eröffnet. Das Gleiche gilt für die transienten venösen Verschlüsse. Im Anschluß an die Öffnungen des Blutzuflusses konnte die Vektorlösung aus dem Gefäßsystem der

Hintergliedmaße gespült werden. Die Milz als größtes lymphatisches Organ und die Leber als großes gut durchblutetes Stoffwechselsystem konnten so ebenfalls transfiziert werden.

Aufgrund der spezifischen Transfektion der Kollateralgefäße stellt die hier angewandte Methode eine neue, gut praktikable Möglichkeit dar, adenovirale Vektoren, bzw. deren Produkte, auf ihre Arteriogenität zu untersuchen.

5.6. Arteriogenese nach Ligatur ohne weitere exogene Stimulierung

Zur Untersuchung der Arteriogenese nach Ligatur der A. femoralis ohne exogene Stimulierung wurden drei Kontrollgruppen verwendet:

1. Ligatur der rechten Femoralarterie und Infusion von 0,1 %iger Kaninchenalbuminlösung
2. Beidseitige Ligatur der Femoralarterien
3. Beidseitige Ligatur der Femoralarterien und Transfektion des Kontrollvektors auf der rechten Seite

Die Versuchszeiträume erstreckten sich wie bei allen Untersuchungen über 7 Tage.

Die hämodynamischen Untersuchungen und postmortalen Angiographien ohne exogene Stimulierung wurden durchgeführt, um den zusätzlichen Einfluß der zur Förderung der Arteriogenese eingesetzten Substanzen evaluieren zu können.

Es stellte sich nach Auswertung der hämodynamischen Messungen und Angiogramme heraus, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Kontrollgruppen auftraten.

Die Arteriogenese ist in entscheidendem Maß von Monozyten abhängig¹⁰. Eine Stimulierung der Arteriogenese allein durch die adenovirale Transfektion, in deren Folge es aufgrund einer immunologischen Reaktion zu einem verstärkten Einwandern von Monozyten in die Wand der präformierten Kollateralarterien kam, war in Betracht zu ziehen. In einer Studie in der ebenfalls Adenoviren auf Arterien des Kaninchens übertragen wurden, konnte festgestellt

werden, dass die lokale adenovirale Transfektion außerdem eine lokale Entzündungsreaktion mit T-lymphozytärer Infiltration der Gefäßwand, eine verstärkte Expression von interzellulären Adhäsionsmolekülen und vaskulären Zell-Adhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) auslöst⁸⁴. Diese Vorgänge können auch während der Arteriogenese beobachtet werden. Daher war eine Beeinflussung des Kollateralgefäßwachstums auch hierdurch denkbar.

Die Untersuchungen der Arteriogenese nach lokaler adenoviraler Transfektion belegen jedoch, dass ein Kontrollvektor keinen stimulativen Effekt auf das Kollateralgefäßwachstum hat. Daher sind mit hoher Wahrscheinlichkeit alle arteriogenen Effekte, die nach Transfektion eines gentragenden Vektors auftreten, auf die Expression dieses Gens zurückzuführen.

5.6.1. Einfluss der temporären Ischämie auf die Arteriogenese

Wie bereits zuvor erwähnt, wurde während der Durchführung der adenoviralen Transfektion für die Dauer von 30 Minuten die Durchblutung der Hintergliedmaße unterbunden.

Durch die temporäre Ischämie im Gebiet des Kollateralgefäßwachstums könnte das Gefäßwachstum im Oberschenkel einen zusätzlichen Stimulus erhalten haben. Hypoxie bewirkt eine Aufregulierung der Expression von VEGF⁹. Durch VEGF wird das Sprossen von Kapillaren stimuliert, was unter dem Terminus Angiogenese beschrieben wird^{95,118}. Im Modell der ischämischen Kaninchenhintergliedmaße findet Angiogenese im Unterschenkel statt⁹⁵. In der Oberschenkelmuskulatur, im Bereich des Kollateralgefäßwachstums, tritt Angiogenese nicht auf, da hier keine Hypoxie vorhanden ist². Durch die Technik des Gentransfers tritt jedoch im Gebiet der Arteriogenese eine kurzzeitige Hypoxie auf, was einen stimulativen Effekt auf die Angiogenese ausüben könnte, so dass hier ein verstärktes Gefäßwachstum eintritt.

Diese These konnte widerlegt werden, da die Transfektion des Kontrollvektors methodengleich durchgeführt wurde und hier kein messbar stärkeres Kollateralgefäßwachstum im Vergleich zu Ligaturen ohne weitere Behandlung festgestellt werden konnte. Wahrscheinlich ist der Stimulus der temporären Ischämie von 30 Minuten zu kurz, um mögliche Effekte nach 7 Tagen nachweisen zu können.

5.7. Einfluss von humanem FGF-4 auf die Arteriogenese im Kaninchenmodell

Die Mechanismen, denen die Arteriogenese zugrunde liegt, sind derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt. Die erhöhte Schubspannung in den präexistierenden Kollateralgefäßen ist offensichtlich ein Hauptstimulus¹¹⁹. Unter anderem werden durch die auf die Zellwände einwirkenden physikalischen Kräfte verschiedene Adhäsionsmoleküle verstärkt produziert, und Monozyten wandern in die Wand des Gefäßes ein. Darauf folgend werden unterschiedliche Zytokine von diesen Entzündungszellen produziert, die das Gefäßwachstum anregen²⁵.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde der Einfluss von humanem FGF-4 auf die Arteriogenese im Kaninchenhinterbein untersucht und mittels postmortaler Angiographien bzw. hämodynamischer Messungen quantifiziert. Unter Verwendung eines adenoviralen Vektors wurde humanes FGF-4 in den Gefäßwänden der präformierten Kollateralarterien exprimiert.

Die Arteriogenese konnte unter dem Einfluss von hFGF-4 verstärkt werden. In den hämodynamischen Untersuchungen (n=6) wurden signifikant bessere maximale kollaterale Konduktanzen erreicht als in den Kontrollgruppen ($234,3 \pm 24,4$ vs. $144 \pm 10,6$ (Kontrolle) ml/min/100 mmHg; $p < 0,01$). Auch die Auswertungen der Angiographien (n=6) zeigten im Vergleich zur Kontrolle eine erhöhte Anzahl sichtbarer Kollateralarterien ($18,7 \pm 0,2$ vs. $13,8 \pm 0,3$ (Kontrolle); $p < 0,01$).

Es wurde die beidseitige Ligatur der Femoralarterie durchgeführt, der adenovirale Transfer erfolgte jedoch nur einseitig. Dieses Protokoll wurde durchgeführt, um herauszufinden, ob die Stimulation der Arteriogenese nur am Ort der Transfektion stattfindet, oder ob ein systemischer Effekt durch eine Übertragung des FGF-4 in das Blut bzw. durch eine systemische Verteilung des Vektors zu verzeichnen ist.

Die Ergebnisse belegen, dass eine systemische Stimulierung der Arteriogenese nicht stattgefunden hat, da das Kollateralwachstum nur in der transfizierten Hintergliedmaße, nicht aber auf der Kontrollseite verstärkt war. Durch die AGENT-Studien werden diese Resultate bestätigt, da dort nach intrakoronarer Freisetzung des Vektors zu keinem Zeitpunkt FGF-4 im Blut nachgewiesen werden konnte¹¹⁴.

Der arteriogene Effekt durch die Expression von rh FGF-4 in der Gefäßwand ist wahrscheinlich auf die Aktivierung und nachfolgende Proliferation der glatten Muskel-, der Endothelzellen und der Fibroblasten der Gefäßwand zurückzuführen. Dies wird vor allem auf eine indirekte Wirkung von rh FGF-4 zurückgeführt, da in den transfizierten Zellen eine verstärkte Expression von VEGF erfolgt^{72,74}. In in-vitro-Versuchen an humanen Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC) konnte gezeigt werden, dass die durch rh FGF-4 induzierte Ausbildung eines angiogenen Phänotyps durch die Gabe von VEGF-neutralisierenden Antikörpern verhindert werden konnte⁷². In in-vivo-Versuchen ist die direkt durch FGF-4 verursachte Stimulation mesenchymaler Zellen, wie z.B. glatter Muskelzellen¹²⁰, jedoch nicht auszuschließen.

Außer VEGF werden auch MMP-1 und c-ETS-1 nach FGF-4-Gabe in in-vitro-Versuchen vermehrt exprimiert, der physiologische MMP-Inhibitor TIMP-1 fällt ab⁷². Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von MMP-1 auch unter dem Einfluß einer erhöhten Umfangsspannung (Circumferal wall stress) ansteigt¹²¹. Eine erhöhte Umfangsspannung tritt auch in den präformierten Kollateralgefäßen nach Ligatur der A. femoralis auf.

Bisher konnten mit der lokalen Infusion von MCP-1 im Kaninchenmodell die größten Erfolge in der Stimulierung der Arteriogenese mittels Wachstumsfaktoren erzielt werden. Die maximalen kollateralen Konduktanzen lagen bei 220 ± 11 ml/min/100mmHg¹²². Vergleichbare Ergebnisse ($226 \pm 8,7$ ml/min/100mmHg) konnten nach lokaler Infusion von FGF-2 beobachtet werden (bisher unveröffentlichte Ergebnisse). Die hämodynamischen Auswertungen nach intravasalem lokalem Gentransfer mit Ad5.1FGF-4 ($234 \pm 24,4$ ml/min/mmHg) zeigten, dass ähnliche Resultate erzielt werden konnten. Es besteht die Möglichkeit, dass die direkte Bildung des Wachstumsfaktors direkt in der Gefäßwand, wie es beim erfolgten Gentransfer der Fall ist, eine bessere Stimulation der Arteriogenese, im Gegensatz zur intravasalen Freisetzung der Faktoren, ermöglicht.

5.8. Einfluss von rhGM-CSF auf die Arteriogenese

Wie schon mehrfach erwähnt wurde, spielen Monozyten während des Wachstums präformierter Kollateralgefäße zu Umgehungskreisläufen eine entscheidende Rolle^{4,10,35}. Zirkulierende Monozyten heften sich an die Wand wachsender Gefäße an, dringen in tiefere Schichten ihrer Wand ein und fördern schließlich das Kollateralgefäßwachstum durch die Freisetzung verschiedener Zytokine, Wachstumsfaktoren und Proteasen (z.B. bFGF, TNF- α)^{35,10}. Über Monozyten könnte ein möglicher stimulativer Effekt von rh GM-CSF auf die Arteriogenese vermittelt werden.

Das rh GM-CSF (Sargramostim) wurde intraarteriell direkt oberhalb der verschlossenen Arterie mittels osmotischer Minipumpen infundiert. Eine kontinuierliche und lokale Verabreichung des Wachstumsfaktors über den Zeitraum von einer Woche war so möglich^{40,91}. Eine vorherige Studie⁴⁰ belegt einen positiven Effekt von rh GM-CSF auf die Arteriogenese im Modell der ischämischen Kaninchenhintergliedmaße. Diese Versuche mußten mit den hier verwendeten Methoden wiederholt werden, um die Ergebnisse der GM-CSF-Gruppe mit den anderen Gruppen vergleichen zu können. Ein weiterer Aspekt, der eine Abklärung des arteriogenen Effektes des hier verwendeten rh GM-CSF erforderte, war die Tatsache, dass in dieser Studie das von Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) exprimierte Sargramostim verwendet wurde. In der von Buschmann et al. durchgeführten Studie wurde jedoch das bakteriell hergestellte Molgramostim verwendet.

In Vorversuchen wurde der Einfluss von rh GM-CSF auf das periphere Blutbild des Kaninchens evaluiert (siehe IV, 7.5.) Zur Stimulierung des Kollateralgefäßwachstums wurde die Dosis von rh GM-CSF eingesetzt, bei der in den durchflusszytometrischen Messungen die charakteristische Abgrenzung der Monozytenpopulation zu den Granulozyten noch möglich war. Diese Dosierung von 100 $\mu\text{g/Pumpe}$ (entspr. 5 $\mu\text{g/kg}$) kombiniert mit einer subkutanen Gabe von 80 $\mu\text{g/d}$ (entspr. 26 $\mu\text{g/kg}$) wurde gewählt, da rh GM-CSF in höheren Konzentrationen offensichtlich einen toxischen Effekt auf die Kaninchen-Monozyten hat. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass bei höheren Konzentrationen (40 $\mu\text{g/kg}$) Muskelnekrosen im Gebiet der Proteinfreisetzung auftraten.

Der Einfluss von rh GM-CSF auf die Arteriogenese wurde mittels postmortaler Angiographien und hämodynamischer Messungen untersucht. Die GM-CSF-Gruppe (n=6) wurde hierzu mit der Kontroll-Gruppe (n=6) verglichen.

Die in den Angiographien auszählbaren Kollateralarterien waren in der GM-CSF-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht ($16,2 \pm 0,35$ vs. $12,5 \pm 1,3$; $p < 0,01$). Es waren vermehrt kleine Kollateralarterien im Angiogramm vorhanden. Laut dem Hagen-Poiseuilleschen Gesetz tragen jedoch größere Gefäße überproportional mehr zum Blutfluß bei als kleinere, da der Blutfluss von der vierten Potenz des Radius abhängig ist. Die Anzahl der sichtbaren Kollateralen mit großem Durchmesser konnte allerdings durch die Gabe von rhGM-CSF nicht erhöht werden. Dies erklärt die Werte der maximalen kollateralen Konduktanzen der GM-CSF-Gruppe, die im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht erhöht waren ($148,3 \pm 14$ vs. $140,8 \pm 12$ (Kontrolle)).

Die Resultate der früheren Studie⁴⁰, die eine arteriogene Wirkung von rh GM-CSF belegt, konnten nicht bestätigt werden. Allerdings wurde in dieser Studie nicht-glykosyliertes, von Hefen hergestelltes rh GM-CSF (Molgramostim) eingesetzt, was möglicherweise die unterschiedlichen Ergebnisse erklären könnte.

5.9. Einfluß des kombinierten Einsatzes von rh FGF-4 und rh GM-CSF auf die Arteriogenese

In dieser Studie sollte u.a. untersucht werden, ob durch die lokale Applikation von rh GM-CSF zusätzlich zum Einsatz von Ad5.1FGF-4 eine weitere Stimulierung des Kollateralgefäßwachstums bewirkt werden kann.

Sowohl in den hämodynamischen Messungen als auch in den angiographischen Auswertungen konnte keine weitere Potenzierung des stimulativen Effektes von FGF-4 auf die Arteriogenese belegt werden.

Die Anzahl der Kollateralarterien nach kombinierter Stimulierung war im Vergleich zur FGF-4-Gruppe nicht signifikant verändert ($16,67 \pm 1,78$ vs. $18,71 \pm 0,2$).

Innerhalb der FGF-4-Gruppe wurde ein signifikanter Unterschied der Kollateralzahlen festgestellt, wenn die transfizierte mit der ligierten Seite verglichen wurde ($18,71 \pm 0,2$ vs.

12,85±0,71; $p<0,01$). Dieser Unterschied innerhalb der Gruppe konnte bei der kombinierten Stimulation mit FGF-4 und GM-CSF nicht gezeigt werden (16,67±1,78 vs 14,33±1,47).

Wie beim Vergleich der Kollateralzahlen konnte auch beim Vergleich der maximalen kollateralen Konduktanzen innerhalb der FGF-4-Gruppe ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (234,33±24,38 vs. 106,0±8,8 ml/min/mmHg; $p<0,01$). Dies traf nicht auf die FGF-4/GM-CSF-Gruppe zu (181,17±29,72 (transfizierte Seite) vs. 122,75±12,4 (ligierte Seite) ml/min/mmHg). Trotzdem ergab der Vergleich der maximalen kollateralen Konduktanz der Transfektionsseite der Gruppe mit kombinierter Stimulation nicht veränderte Werte im Vergleich zur Gruppe mit alleiniger Stimulation durch FGF-4 (181,17±29,72 vs. 234,33±24,38 ml/min/100 mmHg).

Die Ergebnisse zeigen, dass durch den kombinierten Einsatz von rh GM-CSF und rh FGF-4 keine weitere Stimulierung der Arteriogenese erfolgt. Die Werte der maximalen kollateralen Konduktanzen und der Kollateralzahlen der Transfektionsseite der FGF-4-Gruppe waren nicht signifikant zur Transfektionsseite der FGF-4/GM-CSF-Gruppe verändert.

Trotzdem traten starke Unterschiede innerhalb beider Gruppen auf. Die Unterschiede innerhalb der FGF-4-Gruppe (Vergleich Transfektionsseite mit Kontrollseite) waren signifikant, die Unterschiede innerhalb der FGF-4/GM-CSF-Gruppe waren nicht signifikant. Das bedeutet, die Kollateralzahlen und maximalen kollateralen Konduktanzen unterschieden sich innerhalb der FGF-4/GM-CSF-Gruppe nicht so stark wie in der FGF-4-Gruppe.

Nach der lokalen kontinuierlichen Infusion von rh GM-CSF konnte eine Zunahme der Kollateralarterien festgestellt werden. Ein systemischer Effekt des rh GM-CSF auf das Kollateralgefäßwachstum der ligierten Gegenseite und ein damit verbundener Anstieg der Kollateralzahlen ist jedoch auszuschließen, da die Erhöhung der Kollateralzahlen der FGF-4/GM-CSF-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant war. Die Kollateralzahlen der GM-CSF-Gruppe und der FGF-4/GM-CSF-Gruppe unterschieden sich nicht (16,2 ±0,35 vs. 16,6 ±1,78). Auch die maximalen kollateralen Konduktanzen waren nicht deutlich verändert (148,3 ±14,67 vs. 181,17 ±29,72 ml/min/100 mmHg). Das bedeutet, sowohl bei der Verabreichung von rh FGF-4 konnte durch die zusätzliche Gabe von rh GM-CSF, als auch bei der Verabreichung von rh GM-CSF konnte durch die zusätzliche Gabe von rh FGF-4 keine weitere Stimulierung der Arteriogenese bewirkt werden.

Auch wenn zwischen der FGF-4- und der FGF-4/GM-CSF-Gruppe keine starken Unterschiede bestehen, so wird dennoch klar, dass eine zusätzliche Verabreichung von GM-CSF zur FGF-4-Gabe einen hemmenden Einfluss auf die Arteriogenese ausübt. Dieser hemmende Einfluss äußert sich dadurch, dass sich die maximalen kollateralen Konduktanzen der FGF-4/GM-CSF-Gruppe nicht signifikant zur Kontrollgruppe unterscheiden. Worauf diese Wirkung der GM-CSF-Infusion zurückzuführen ist, bleibt vorerst unklar, möglicherweise steht auch sie in Zusammenhang mit der Toxizität dieses Zytokins.

Aufgrund der Tatsache, dass in der hier durchgeführten Studie durch den alleinigen Einsatz von rh GM-CSF keine Verstärkung der Arteriogenese belegt werden konnte, erscheint das Ergebnis, dass durch den Einsatz von rh GM-CSF additiv zur Therapie mit rhFGF-4 keine weitere Stimulierung des Gefäßwachstums bewirkt werden kann, schlüssig.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Herz-Kreislaufkrankungen stellen die häufigsten tödlich endenden Zivilisationskrankheiten dar. Trotz vielfältiger, kostenintensiver chirurgischer Interventionsmaßnahmen ist die postoperative Rezidivrate hoch. Außerdem besteht für viele Patienten u. a. aufgrund vorliegender Mehrgefäßkrankheiten keine Möglichkeit zum Eingriff. Hier eröffnet sich ein Feld für neue therapeutische Ansätze. Große Hoffnungen wurden auf die exogene Stimulierung endogener Gefäßadaptationsprozesse durch Wachstumsfaktoren gesetzt. Hierdurch sollte das Wachstum von Gefäßen induziert werden, die eine verschlossene Arterie umgehen.

Dieser Vorgang geschieht hauptsächlich durch das Auswachsen prä-existierender arterio-arteriolärer Verbindungen zu großen Kollateralarterien, was als Arteriogenese bezeichnet wird.

Im Rahmen des Kollateralgefäßwachstums wurde viel über die Rolle der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF) diskutiert. Neben FGF-2 kann FGF-4, das während der Embryonalentwicklung essentielle Aufgaben übernimmt, offenbar entscheidend zur Stimulation des Kollateralgefäßwachstums beitragen. In vorausgegangenen Studien wurde der Einfluss von rekombinantem humanen FGF-4 auf das Kollateralgefäßwachstum im Kaninchenmodell mittels Anwendung eines adenoviralen für FGF-4-kodierenden Vektors (Ad5.1FGF-4) untersucht⁷⁴. Es konnte ein positiver Einfluss von Ad5.1FGF-4 auf das Kollateralgefäßwachstum belegt werden, jedoch nur nach intramuskulärer, nicht jedoch nach intraarterieller Verabreichung des Vektors. Klinische Studien zur Überprüfung der Sicherheit und Effizienz der intrakoronaren Verabreichung von Ad5.1FGF-4 erbrachten ebenfalls vielversprechende Ergebnisse^{78,79,114}.

In dieser Dissertation wurde unter Anwendung einer neuen Methode der intravasalen Transfektion, bei der eine 30-minütige Inkubation der viralen Vektoren im Gefäßsystem erfolgte, der Einfluss von Ad5.1FGF-4 auf die Arteriogenese im Modell der ischämischen Kaninchenhintergliedmaße untersucht. Des weiteren sollte festgestellt werden, ob eine zusätzliche kontinuierliche lokale Verabreichung von rekombinantem humanen Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierenden Faktor (rh GM-CSF) in das Kollateralgefäßsystem einen additiven Effekt auf die Arteriogenese ausübt. Monozyten spielen als Produzenten verschiedener Wachstumsfaktoren in der Arteriogenese eine

herausragende Rolle. Durch die lokale Verabreichung von rh GM-CSF sollte eine verstärkte Anreicherung und Aktivierung der Monozyten in den wachsenden Kollateralarterien erreicht werden. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde auch der Einfluss von rh GM-CSF auf das periphere Blutbild der Kaninchens eruiert.

Zur quantitativen Analyse des Kollateralgefäßwachstums wurden postmortale Angiographien und ein in vivo-Hämodynamikmodell zur Untersuchung der Femoralis-ligierten Kaninchenhintergliedmaßen eingesetzt. Der dem Kollateralfluss entsprechende Blutfluss zur Hintergliedmaße in der A. iliaca externa und der Druckgradient entlang der Kollateralarterien konnten so bestimmt werden. Hieraus wurde während vollständiger Vasodilatation die maximale kollaterale Konduktanz als Maß für die funktionelle Blutleitfähigkeit des Kollateralgefäßsystems errechnet.

Die Ergebnisse der Experimente zeigten, dass die intravasale Transfektion von Ad5.1FGF-4 eine Stimulierung der Arteriogenese bewirkt. Die zusätzliche Verabreichung von rh GM-CSF konnte keine weiteren stimulativen Effekte erbringen. Bei der kontinuierlichen intraarteriellen Infusion von rh GM-CSF konnten außerdem keine signifikanten Erhöhungen der Konzentrationen der Monozyten und Granulozyten im peripheren Blut der Kaninchen festgestellt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Methode der hier angewandten intraarteriellen Transfektion von Ad5.1FGF-4 ein geeignetes Instrument zur Stimulation des Kollateralgefäßwachstums im Modell der ischämischen Kaninchenhintergliedmaße darstellt.

7. SUMMARY

Despite many expensive surgical interventions ischemic vascular diseases have remained the most common cause of death in the western world and the post-operative relapses remain high. Furthermore, many patients cannot be treated by surgical intervention, because they suffer from severe coronary and peripheral vascular diseases. In these cases new therapeutical strategies are needed. The exogenous stimulation of the endogenous vascular adaptation process by growth factors is considered to be an effective strategy for future treatments. So the growth of vessels, which substitute for the occluded artery should be induced and promoted. This process called arteriogenesis mainly occurs by growth of pre-existent arterio-arteriolar connections resulting in major collateral arteries.

The role of FGF-family-members as inducers of collateral growth has been frequently discussed. Evidence exists, that in addition to FGF-2, FGF-4, which plays a major role in the development of embryos, is able to stimulate arteriogenesis.

In a former study the potential of recombinant human FGF-4 for inducing collateral growth was investigated in a rabbit hind limb model, using an adenoviral vector (Ad5.1FGF-4). It was demonstrated that FGF-4 increases arteriogenesis following i.m.-injection, but not intra-arterial administration of this vector. Clinical trials, which were carried out to evaluate the safety and efficiency of intra-coronary infusion of Ad5.1FGF-4 also showed promising results.

In the present study, by using a new method of intravascular transfection, which includes a 30-minute incubation of the viral vector solution within the vascular system, the influence of Ad5.1FGF-4 on arteriogenesis was investigated in the ischemic rabbit hind limb model. Furthermore it investigated whether additional local administration of rh GM-CSF into the collateral system exerts an extra-arteriogenic effect. Monocytes play an important role in arteriogenesis because they are producers of different growth factors. The continuous infusion of rh GM-CSF should promote increased accumulation and activation of monocytes in the growing collateral arteries. In addition, the influence of rh GM-CSF on leucocyte count in the peripheral blood was analysed.

For determination of collateral growth post-mortem angiographies and in-vivo hemodynamic measurements were carried out. External iliac blood flow, which is equivalent to collateral blood flow, as well as the pressure gradient along the collaterals was measured. Here from the maximal collateral conductance at maximum vasodilatation was calculated. Maximum

collateral conductance is the calculatory unit to describe the maximum capacity of the collateral system.

The experiment's results showed, that intravascular transfection of Ad5.1FGF-5 strongly enhances stimulation of arteriogenesis. The additional administration of rh GM-CSF could not further improve this stimulation. Moreover, rh GM-CSF did not boost monocyte or granulocyte count in the peripheral blood of the rabbits.

Together, these data indicate that the method of intra-arterial transfection of Ad5.1FGF-4, as performed in this study, is an excellent tool for stimulation of collateral growth in the ischemic rabbit hind limb model.

8. ANHANG

8.1. Allgemeine Chemikalien und Lösungsmittel

- Adenosin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- Aqua dest.
- Natriumhydroxid-Plätzchen (Merck Eurolab GmbH, Frankfurt)
- Natronlauge
- para-Formaldehyd (pFA)
- Rabbit Albumin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- Rindergelatine (Merck Eurolab GmbH, Frankfurt)

8.2. Medikamente

- Buprenorphinhydrochlorid (Temgesic®, Essex Pharma GmbH, München)
- Dexpanthenol (Bepanthen® Augensalbe, Roche, Grenzach-Wyhlen)
- Fentanylidihydrogencitrat (Fentanyl®, Janssen-Cilag GmbH, Neuss)
- Heparin-Na (Liquemin® N 25000 ,Roche, Grenzach-Wyhlen)
- Ketaminhydrochlorid (Ketamin® 10 %, Medistar GmbH, Holzwickede)
- Midazolamhydrochlorid (Dormicum®; Roche, Grenzach-Wyhlen)
- Isotone Kochsalzlösung 0,9 % Braun (B. Braun AG, Melsungen)
- Papaverinhydrochlorid (Paveron®, Linden GmbH, Heuchelheim)
- Pentobarbital-Na (Narcoren®, Merial GmbH, Halbergmoos)
- Xylazinhydrochlorid (Xylazin® 2 %, Medistar GmbH, Holzwickede)

8.3. Operationszubehör

- Chirurgisches Nahtmaterial (Vicryl®; Supramid®; Ethicon GmbH, Norderstedt)
- Chirurgisches Operationsbesteck (Medicon, Tuttlingen)
- ES Kompressen 10 x 10 cm (unsteril, Hartmann AG, Heidenheim)
- Hautdesinfektionsmittel (Cutasept®; Bode Chemie, Hamburg)
- Intratracheal-Tubus (Portex-Endotube®; 2.5 mm, Simcare)
- Kompressen –steril- Topper®12 (Johnson & Johnson, Gargrave, UK)
- Leukoplast® (Beiersdorf, Hamburg)
- Operationshandschuhe –steril- sempermed® (Semperit, Wien, Österreich)
- Osmotische Minipumpe (ALZET®; alza Corporation, Palo Alto, USA)
- PE-, sowie PVC-Schläuche verschiedener Größe (Sims-Portex Ltd., Kent, UK)
- PVC-Schlauch (THOMAFLUID®-Mikro-Katheter-PVC-Chemieschlauch, Reichelt Chemietechnik GmbH & Co., Heidelberg)
- Schutzhandschuhe Peha-soft® (unsteril, Hartmann AG, Heidenheim)
- Spritzen zu 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20ml und 50 ml (B Braun, Melsungen)
- Sterican® Einmal-Injektions-Kanülen der Größen 1,20 x 40 mm, 0,90 x 40 mm, 0,70 x 30 mm und 0,45 x 12 mm (B Braun, Melsungen)
- Venenpunktionsbesteck 0.65 x 20 mm (Venofix®; B Braun, Melsungen)
- Venenverweilkanüle 0,9 x 25 mm (Vasofix® Braunüle®; B Braun, Melsungen)

8.4. Versuchstiere

60 männliche Weiße Neuseeländer Kaninchen, spezifiziert pathogenfrei, 2,8-3,2 kg KGW (Charles River; Elevages Scientifique des Dombes, Rannes, Frankreich)

8.5. Laborzubehör

- Glasware von Schott (Merck Eurolab GmbH, Frankfurt)
- Kochplatte Ikamag®Ret (Ika®-Labortechnik, Staufen i. Br.)
- Magnetrührer Ika-Combimag®RCO (Ika®-Labortechnik, Staufen i. Br.)
- Mikrofeinwaage Sartorius BP 211 D (Sartorius AG, Göttingen)
- Vortex-2 Genie, Scientific Industries
- Zentrifuge Multifuge 3 S-R

8.5.1. Blutzellanalyse

- Cell Quest Pro Software (Becton Dickinson, New York, USA)
- FACS Calibur (Becton Dickinson, New York, USA)
- Flow-Count™ Flourosperes (Beckman-Coulter, Inc., Miami)
- Counter K-4500 (Sysmex Medical Electronics)
- Mouse anti rabbit CD45-Antikörper (Biozol, Eching)
- My4-RD1 (Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA)
- Rat anti mouse IgG1 heavy chain: FITC (Biozol, Eching)

8.5.2. RT-PCR

- Turbo DNAfree (Ambion)
- random nonamer (NEB)
- dNTP (Roth)
- Synthesepuffer (Invitrogen)
- DTT (Invitrogen)
- RNaseOUT (Invitrogen)

- Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen)
- forward Primer hFGF-4 (Sigma-ARK)
- reverse Primer hFGF-4 (Sigma-ARK)
- Rabbit 18S Primer (Invitrogen)

8.5.3. Hämodynamik

- Akkusauger (AEG Hausgeräte GmbH, Nürnberg)
- Beatmungsgerät (RespiratorABV-I®; Stephan GmbH, Gackebach)
- Blutflußmeßgerät (Transonic® Animal Research Flowmeter T206; Transonics Systems Inc., Ithaca, USA)
- Druckwandler (P23XL; Ohmeda GmbH & Co. KG, Erlangen)
- Feinwaage (Sartorius, Göttingen)
- Hard- und Software
 - Mac-Lab MKIII (ADI-Instruments, Castle Hill, Australien)
 - Macintosh-Rechner (Quadra 700)
 - Chart 3.6.3. (ADI-Instruments, Castle Hill, Australien)
- Intratrachealtubus „Rüschelit“ 2,5mm (Rüsch, Kernen)
- Mikroinfusionspumpe (Minipuls 3; ABIMED-Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich)
- Perfusionsgerät für 50 ml Infusionsspritzen (Perfusor®; Fresenius, Bad Homburg)
- Schermaschine (Favorita®II; Aesculap GT 104, Tuttlingen)
- Statham-Blutdruckmeßanlage (P23XL; Statham, San Juan, Puerto Rico)
- Stoppuhr (Junghans, Schramberg)
- Thermometer „Thermoval“ (Hartmann)
- Wärmematte (AEG Hausgeräte GmbH, Nürnberg)

8.5.4. Angiographie

- AGEFIX, Fixierer (Agfa-Gevaert AG, Leverkusen)
- AGFA-400-Filme AGFA, Frankfurt
- Balteau-Apparat (Machlett Laboratories, Stamford)
- Druckperfusionsanlage (Eigenbau des Instituts)
- Einspannkasten für Kaninchenbein aus Plexiglas (Eigenbau des Instituts)
- LX24, X-Ray developer (Kodak, Chalen, Frankreich)
- Röntgenbildbetrachter (Eigenbau des Instituts)
- Röntgenfilm (Structurix D7DW; Agfa)
- Trockenschrank Metobox® (Meteor, Siegen)

Kontrastmittel:

Rindergelatine	80	g
BaSO ₄	230	g
Aqua dest.	300	ml

Zur Herstellung des Kontrastmittels mußte zuerst die Rindergelatine im Aqua dest. bei ca. 80°C aufgelöst werden. Danach erfolgte die Zugabe des Bariumsulfates. Das Kontrastmittel mußte so lange weitergerührt werden, bis keine Klümpchen mehr vorhanden waren.

Das fertige Kontrastmittels wurde bei 4°C aufbewahrt und alsbald verbraucht.

8.6. Puffer

10-fach Phosphat-gepufferte-Kochsalzlösung (10 x PBS)

NaCl	80	g
KCl	2	g

KH ₂ PO ₄	2	g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	18	g
Aqua dest.	1	l

1 x PBS:

Zehnfache Verdünnung der Stammlösung und Einstellung des pH-Wertes auf 7,4

10-fach Lysepuffer (10 x Lysepuffer)

Ammoniumchlorid	80,2	g
NaHCO ₃	8,4	g
EDTA	3,2	g
Aqua dest.	1	l

1 x Lysepuffer:

Zehnfach Verdünnung der Stammlösung

Kaninchenalbumin (RSA)- Lösung (0,1 %):

Kaninchenalbumin	3	mg
PBS steril	3	ml

Die gebrauchsfertigen 3 ml Lösung waren sofort zu verwenden

Papaverin-Spüllösung:

Sterile NaCl-Lösung	900	ml
Papaverin	4	mg

Die frisch angesetzte Lösung war lichtgeschützt zu lagern und unverzüglich aufzubrauchen.

8.7. Lösungen zur Röntgenbildentwicklung

Entwickler-Lösung:

LX 24	750	ml
-------	-----	----

Aqua dest.	2250	ml
------------	------	----

Fixier-Lösung:

AGEFIX	500	ml
--------	-----	----

Aqua dest.	2500	ml
------------	------	----

9. ABKÜRZUNGEN

Aa.	Arterien
ADI-Wandler	Analog-Digital Instrumenten-Wandler
ATP	basic fibroblast-growth-factor
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of differentiation
c-EST-1	<i>cellular expressed sequence tags-1</i>
CSF	Kolonie-stimulierenden Faktoren
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
dyn	Dynamic, Einheit der Kraft (entspricht 10^{-5} Newton)
EDTA	<i>Ethylenediamine-tetra-acetic-acid</i>
EC	Endothelzelle
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FITC	Fluorescein-iso-thio-cyanate Isomer1
FSS	<i>Fluid shear stress</i>
g	Gramm
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage - colony stimulating factor</i>
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde - Society for Laboratory Animal Science
h	Stunde

HCl	Salzsäure
HIF-1	<i>hypoxia inducible factor-1</i>
Hg	Quecksilber
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
Ig	Immunoglobulin
IGF-1	<i>Insulin-like-Growth-Factor-1</i>
Il	Interleukin
kDa	Kilodalton
KDR	<i>kinase insert domain-containing receptor</i>
KHK	Koronare Herzkrankheit
KM	Körpermasse
Konz.	Konzentration
l	Liter
NO	Stickoxid
MAK	monoklonaler Antikörper
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

µm	Mikrometer
PAVK	Periphere Arterielle Verschußkrankheit
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PE	Polyethylen
PECAM-1	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
pFA	Paraformaldehyd
PP	Mittlerer peripherer Blutdruck
PVC	Polyvinylchlorid
rh	rekombinant human
RNA	Ribonukleinsäure
RPM	<i>round per minute</i>
RSA	<i>Rabbit Serum Albumin</i>
TR	Reverse Transkription
SD	Standardabweichung
SMC	<i>smooth muscle cell</i>
SP	Mittlerer systemischer Blutdruck
TNF-α	<i>tumor necrosis factor-α</i>
TRITC	<i>Tetramethylrhodamine-isothio-cyanate</i>
V.	Vene
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VE-cadherin	vascular endothelial-cadherin
3-D	dreidimensional

10. LITERATURVERZEICHNIS

1. The World Health Report 2004. In; 2004.
2. Helisch A, Schaper W. Arteriogenesis: the development and growth of collateral arteries. *Microcirculation*. 2003;10:83-97.
3. Heart Attack and Angina Statistics. In: <http://www.americanheart.org/presenter>, ed.: American Heart Association; 2004.
4. Schaper W, Ito WD. Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circ Res*. 1996;79:911-919.
5. Sommerschild HT, Kirkeboen KA. Adenosine and cardioprotection during ischaemia and reperfusion--an overview. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2000;44:1038-1055.
6. Schwartz H, Leiboff RH, Bren GB, Wasserman AG, Katz RJ, Varghese PJ, Sokil AB, Ross AM. Temporal evolution of the human coronary collateral circulation after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 1984;4:1088-1093.
7. Fujita M, Sasayama S, Ejiri M, Asanoi H, Nakajima H, Miwa K. Coronary collateral development after acute myocardial infarction. *Clin Cardiol*. 1988;11:525-528.
8. Maseri A AL, Finocchiaro ML. *Collateral development and function in man*. Boston: Kluwer Academic Publisher; 1993.
9. Buschmann I, Schaper W. Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth. *News Physiol Sci*. 1999;14:121-125.
10. Heil M, Ziegelhoeffer T, Pipp F, Kostin S, Martin S, Clauss M, Schaper W. Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *American Journal of Physiology - Heart & Circulatory Physiology*. 2002;283:H2411-2419.
11. Geneser F. *Histologie*: Deutscher Ärzteverlag Köln; 1990.
12. Schmidt RF, Thews Gerhard. *Physiologie des Menschen*. 27 ed. Berlin Heidelberg New York: Springer; 1997.
13. Rohen RF L-DE. *Funktionelle Histologie*: Schattauer; 2000.
14. Geneser F. *Farbatlas der Histologie*: Deutscher Ärzteverlag Köln; 1987.

15. Weyrauch KD SA. *Histologie-Kurs für Veterinärmediziner*. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag; 1998.
16. Hagens CGv. In: Institut für Plastination, Heidelberg, Germany; 2004.
17. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1995;11:73-91.
18. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res*. 2001;49:507-521.
19. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997;386:671-674.
20. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*. 1995;1:27-31.
21. Kimura H, Weisz A, Kurashima Y, Hashimoto K, Ogura T, D'Acquisto F, Addeo R, Makuuchi M, Esumi H. Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood*. 2000;95:189-197.
22. Kim I, Kim HG, So JN, Kim JH, Kwak HJ, Koh GY. Angiopoietin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt signal transduction pathway. *Circ Res*. 2000;86:24-29.
23. Scholz D, Ito W, Fleming I, Deindl E, Sauer A, Wiesnet M, Busse R, Schaper J, Schaper W. Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis). *Virchows Arch*. 2000;436:257-270.
24. Scholz D, Cai WJ, Schaper W. Arteriogenesis, a new concept of vascular adaptation in occlusive disease. *Angiogenesis*. 2001;4:247-257.
25. Schaper Wolfgang SJ. *Arteriogenesis*. Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers; 2004.
26. Pipp F, Boehm S, Cai WJ, Adili F, Ziegler B, Karanovic G, Ritter R, Balzer J, Scheler C, Schaper W, Schmitz-Rixen T. Elevated fluid shear stress enhances postocclusive collateral artery growth and gene expression in the pig hind limb. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1664-1668.
27. Shyy YJ, Hsieh HJ, Usami S, Chien S. Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemotactic protein 1 gene expression in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:4678-4682.
28. Polverini PJ, Cotran PS, Gimbrone MA, Jr., Unanue ER. Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature*. 1977;269:804-806.

29. Kamiya A, Togawa T. Adaptive regulation of wall shear stress to flow change in the canine carotid artery. *Am J Physiol.* 1980;239:H14-21.
30. Unthank JL, Fath SW, Burkhardt HM, Miller SC, Dalsing MC. Wall remodeling during luminal expansion of mesenteric arterial collaterals in the rat. *Circ Res.* 1996;79:1015-1023.
31. Zarins CK, Zatina MA, Giddens DP, Ku DN, Glagov S. Shear stress regulation of artery lumen diameter in experimental atherogenesis. *J Vasc Surg.* 1987;5:413-420.
32. Harkness JE, Wagner, Joseph E. *The Biology and medicine of Rabbits and Rodents.* 3rd ed. Philadelphia, London: Lea & Febiger.
33. Weisbroth SH, Flatt, Ronald E, Kraus, Alan L. *The Biology of the Laboratory Rabbit.* New York, San Fransisco, London: Academic Press; 1974.
34. Bussolino F, Ziche M, Wang JM, Alessi D, Morbidelli L, Cremona O, Bosia A, Marchisio PC, Mantovani A. In vitro and in vivo activation of endothelial cells by colony-stimulating factors. *J Clin Invest.* 1991;87:986-995.
35. Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest.* 1998;101:40-50.
36. Heil M, Clauss M, Suzuki K, Buschmann IR, Willuweit A, Fischer S, Schaper W. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates monocyte migration through endothelial monolayers via increased integrin expression. *Eur J Cell Biol.* 2000;79:850-857.
37. Lawrence MB, Springer TA. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell.* 1991;65:859-873.
38. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood.* 1994;84:2068-2101.
39. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood.* 1998;91:3527-3561.
40. Buschmann IR, Hoefer IE, van Royen N, Katzer E, Braun-Dulleaus R, Heil M, Kostin S, Bode C, Schaper W. GM-CSF: a strong arteriogenic factor acting by amplification of monocyte function. *Atherosclerosis.* 2001;159:343-356.
41. Seiler C, Pohl T, Wustmann K, Hutter D, Nicolet PA, Windecker S, Eberli FR, Meier B. Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in

patients with coronary artery disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Circulation*. 2001;104:2012-2017.

42. Lazarous DF, Scheinowitz M, Shou M, Hodge E, Rajanayagam S, Hunsberger S, Robison WG, Jr., Stiber JA, Correa R, Epstein SE, et al. Effects of chronic systemic administration of basic fibroblast growth factor on collateral development in the canine heart. *Circulation*. 1995;91:145-153.

43. Goto F, Goto K, Weindel K, Folkman J. Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Lab Invest*. 1993;69:508-517.

44. Schaper J, König R, Franz D, Schaper W. The endothelial surface of growing coronary collateral arteries. Intimal margination and diapedesis of monocytes. A combined SEM and TEM study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*. 1976;370:193-205.

45. Metcalf D, Nicola NA. The clonal proliferation of normal mouse hematopoietic cells: enhancement and suppression by colony-stimulating factor combinations. *Blood*. 1992;79:2861-2866.

46. Metcalf D. The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood*. 1986;67:257-267.

47. Kosaki K, Ando J, Korenaga R, Kurokawa T, Kamiya A. Fluid shear stress increases the production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by endothelial cells via mRNA stabilization. *Circ Res*. 1998;82:794-802.

48. Burgess AW, Camakaris J, Metcalf D. Purification and properties of colony-stimulating factor from mouse lung-conditioned medium. *J Biol Chem*. 1977;252:1998-2003.

49. Gasson JC, Weisbart RH, Kaufman SE, Clark SC, Hewick RM, Wong GG, Golde DW. Purified human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: direct action on neutrophils. *Science*. 1984;226:1339-1342.

50. Nicola NA, Burgess AW, Metcalf D. Similar molecular properties of granulocyte-macrophage colony-stimulating factors produced by different mouse organs in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 1979;254:5290-5299.

51. Woodcock JM, McClure BJ, Stomski FC, Elliott MJ, Bagley CJ, Lopez AF. The human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) receptor exists as a preformed receptor complex that can be activated by GM-CSF, interleukin-3, or interleukin-5. *Blood*. 1997;90:3005-3017.

52. Ding DX, Rivas CI, Heaney ML, Raines MA, Vera JC, Golde DW. The alpha subunit of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor signals for glucose transport via a phosphorylation-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:2537-2541.
53. Prevost JM, Farrell PJ, Iatrou K, Brown CB. Determinants of the functional interaction between the soluble GM-CSF receptor and the GM-CSF receptor beta-subunit. *Cytokine*. 2000;12:187-197.
54. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105:1135-1143.
55. Heeschen Christopher DS. Grundlagen und Rationale für eine Therapie mit Stammzellen und Wachstumsfaktoren in der Kardiologie. *PTCAktuell*. 2003;April 2003.
56. Cebon J, Nicola N, Ward M, Gardner I, Dempsey P, Layton J, Duhrsen U, Burgess AW, Nice E, Morstyn G. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor from human lymphocytes. The effect of glycosylation on receptor binding and biological activity. *J Biol Chem*. 1990;265:4483-4491.
57. Helisch A, Schaper W. Angiogenesis and arteriogenesis--not yet for prescription. *Z Kardiol*. 2000;89:239-244.
58. Burgess WH, Maciag T. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem*. 1989;58:575-606.
59. Clarke MS, Khakee R, McNeil PL. Loss of cytoplasmic basic fibroblast growth factor from physiologically wounded myofibers of normal and dystrophic muscle. *J Cell Sci*. 1993;106 (Pt 1):121-133.
60. Rifkin DB, Moscatelli D. Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol*. 1989;109:1-6.
61. Cuevas P, Burgos J, Baird A. Basic fibroblast growth factor (FGF) promotes cartilage repair in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988;156:611-618.
62. Gospodarowicz D, Bialecki H, Greenburg G. Purification of the fibroblast growth factor activity from bovine brain. *J Biol Chem*. 1978;253:3736-3743.
63. Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweigerer L. Molecular and biological characterization of fibroblast growth factor, an angiogenic factor which also controls the proliferation and differentiation of mesoderm and neuroectoderm derived cells. *Cell Differ*. 1986;19:1-17.

64. Davies BR, Fernig DG, Barraclough R, Rudland PS. Effect on tumorigenicity and metastasis of transfection of a diploid benign rat mammary epithelial cell line with DNA corresponding to the mRNA for basic fibroblast growth factor. *Int J Cancer*. 1996;65:104-111.
65. Myoken Y, Okamoto T, Kan M, McKeehan WL, Sato JD, Takada K. Expression of fibroblast growth factor-1 (FGF-1), FGF-2 and FGF receptor-1 in a human salivary-gland adenocarcinoma cell line: evidence of growth. *Int J Cancer*. 1996;65:650-657.
66. Galzie Z, Kinsella AR, Smith JA. Fibroblast growth factors and their receptors. *Biochem Cell Biol*. 1997;75:669-85.
67. Sakamoto H, Mori M, Taira M, Yoshida T, Matsukawa S, Shimizu K, Sekiguchi M, Terada M, Sugimura T. Transforming gene from human stomach cancers and a noncancerous portion of stomach mucosa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83:3997-4001.
68. Delli Bovi P, Basilico C. Isolation of a rearranged human transforming gene following transfection of Kaposi sarcoma DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84:5660-5664.
69. Taira M, Yoshida T, Miyagawa K, Sakamoto H, Terada M, Sugimura T. cDNA sequence of human transforming gene hst and identification of the coding sequence required for transforming activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84:2980-2984.
70. Feldman B, Poueymirou W, Papaioannou VE, DeChiara TM, Goldfarb M. Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development. *Science*. 1995;267:246-249.
71. Yamamoto H, Ochiya T, Takahama Y, Ishii Y, Osumi N, Sakamoto H, Terada M. Detection of spatial localization of Hst-1/Fgf-4 gene expression in brain and testis from adult mice. *Oncogene*. 2000;19:3805-3810.
72. Deroanne CF, Hajitou A, Calberg-Bacq CM, Nusgens BV, Lapiere CM. Angiogenesis by fibroblast growth factor 4 is mediated through an autocrine up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res*. 1997;57:5590-5597.
73. Lo J, Hurta RA. Over-expression of K-FGF or bFGF results in altered expression of matrix metalloproteinases: correlations with malignant progression and cellular invasion. *Cell Biol Int*. 2002;26:319-325.
74. Rissanen TT, Markkanen JE, Arve K, Rutanen J, Kettunen MI, Vajanto I, Jauhiainen S, Cashion L, Gruchala M, Narvanen O, Taipale P, Kauppinen RA, Rubanyi GM, Yla-Herttuala S. Fibroblast growth factor 4 induces vascular permeability, angiogenesis and arteriogenesis in a rabbit hindlimb ischemia model. *Faseb J*. 2003;17:100-102.

75. Giordano FJ, Ping P, McKirnan MD, Nozaki S, DeMaria AN, Dillmann WH, Mathieu-Costello O, Hammond HK. Intracoronary gene transfer of fibroblast growth factor-5 increases blood flow and contractile function in an ischemic region of the heart. *Nat Med*. 1996;2:534-539.
76. Sandmair AM, Vapalahti M, Yla-Herttuala S. Adenoviruses as gene delivery vectors. *Adv Exp Med Biol*. 2000;465:423-429.
77. Gao MH, Lai NC, McKirnan MD, Roth DA, Rubanyi GM, Dalton N, Roth DM, Hammond HK. Increased regional function and perfusion after intracoronary delivery of adenovirus encoding fibroblast growth factor 4: report of preclinical data. *Hum Gene Ther*. 2004;15:574-587.
78. Grines C, Rubanyi GM, Kleiman NS, Marrott P, Watkins MW. Angiogenic gene therapy with adenovirus 5 fibroblast growth factor-4 (Ad5FGF-4): a new option for the treatment of coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 2003;92:24N-31N.
79. Grines CL, Watkins MW, Mahmarian JJ, Iskandrian AE, Rade JJ, Marrott P, Pratt C, Kleiman N. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of Ad5FGF-4 gene therapy and its effect on myocardial perfusion in patients with stable angina. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42:1339-13347.
80. Panchal RG, Williams DA, Kitchener PD, Reilly AM, Khan J, Bowser DN, Petrou S. Gene transfer: manipulating and monitoring function in cells and tissues. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2001;28:687-691.
81. Horzinek MC. *Kompandium der allgemeinen Virologie*: Pareys Studentexte; 1985.
82. <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/virus.html>. Der vaskuläre adenovirale Gentransfer.
83. Feldman LJ, Steg G. Optimal techniques for arterial gene transfer. *Cardiovasc Res*. 1997;35:391-404.
84. Newman KD, Dunn PF, Owens JW, Schulick AH, Virmani R, Sukhova G, Libby P, Dichek DA. Adenovirus-mediated gene transfer into normal rabbit arteries results in prolonged vascular cell activation, inflammation, and neointimal hyperplasia. *J Clin Invest*. 1995;96:2955-2965.
85. Kochanek S, Clemens PR, Mitani K, Chen HH, Chan S, Caskey CT. A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and beta-galactosidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:5731-5736.

86. Kay MA, Holterman AX, Meuse L, Gown A, Ochs HD, Linsley PS, Wilson CB. Long-term hepatic adenovirus-mediated gene expression in mice following CTLA4Ig administration. *Nat Genet.* 1995;11:191-197.
87. Willard JE, Landau C, Glamann DB, Burns D, Jessen ME, Pirwitz MJ, Gerard RD, Meidell RS. Genetic modification of the vessel wall. Comparison of surgical and catheter-based techniques for delivery of recombinant adenovirus. *Circulation.* 1994;89:2190-2197.
88. Rome JJ, Shayani V, Flugelman MY, Newman KD, Farb A, Virmani R, Dichek DA. Anatomic barriers influence the distribution of in vivo gene transfer into the arterial wall. Modeling with microscopic tracer particles and verification with a recombinant adenoviral vector. *Arterioscler Thromb.* 1994;14:148-161.
89. Hiltunen MO, Turunen MP, Turunen AM, Rissanen TT, Laitinen M, Kosma VM, Yla-Herttuala S. Biodistribution of adenoviral vector to nontarget tissues after local in vivo gene transfer to arterial wall using intravascular and periadventitial gene delivery methods. *Faseb J.* 2000;14:2230-2236.
90. Nabel EG, Plautz G, Nabel GJ. Site-specific gene expression in vivo by direct gene transfer into the arterial wall. *Science.* 1990;249:1285-1288.
91. Pipp F, Heil M, Issbrucker K, Ziegelhoeffer T, Martin S, van den Heuvel J, Weich H, Fernandez B, Golomb G, Carmeliet P, Schaper W, Clauss M. VEGFR-1-selective VEGF homologue PlGF is arteriogenic: evidence for a monocyte-mediated mechanism. *Circulation Research.* 2003;92:378-385.
92. Ito WD, Arras M, Winkler B, Scholz D, Schaper J, Schaper W. Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ Res.* 1997;80:829-837.
93. Longland CJ. The collateral circulation of the limb; Arris and Gale lecture delivered at the Royal College of Surgeons of England on 4th February, 1953. *Ann R Coll Surg Engl.* 1953;13:161-176.
94. Schering. Ad5.1FGF-4. In: *Investigator's Brochure*; 2002.
95. Ito WD, Arras M, Scholz D, Winkler B, Htun P, Schaper W. Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion. *Am J Physiol.* 1997;273:H1255-1265.
96. Buschmann I, Schaper W. The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis). *J Pathol.* 2000;190:338-342.

97. Mubagwa K, Mullane K, Flameng W. Role of adenosine in the heart and circulation. *Cardiovasc Res.* 1996;32:797-813.
98. Iida N, Lokeshwar VB, Bourguignon LY. Mapping the fodrin binding domain in CD45, a leukocyte membrane-associated tyrosine phosphatase. *J Biol Chem.* 1994;269:28576-2883.
99. Trowbridge IS. CD45. A prototype for transmembrane protein tyrosine phosphatases. *J Biol Chem.* 1991;266:23517-2320.
100. Thomas ML. The leukocyte common antigen family. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:339-369.
101. Anwenderhandbuch Sysmex. In. Sysmex Medical Electronics GmbH Deutschland, Norderstedt.
102. Fox RR, Laird CW. Diurnal variations in rabbits: hematological parameters. *Am J Physiol.* 1970;218:1609-1612.
103. Shindo J, Ishibashi T, Yokoyama K, Nakazato K, Ohwada T, Shiomi M, Maruyama Y. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor prevents the progression of atherosclerosis via changes in the cellular and extracellular composition of atherosclerotic lesions in watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Circulation.* 1999;99:2150-2156.
104. Reed SG, Nathan CF, Pihl DL, Rodricks P, Shanebeck K, Conlon PJ, Grabstein KH. Recombinant granulocyte/macrophage colony-stimulating factor activates macrophages to inhibit *Trypanosoma cruzi* and release hydrogen peroxide. Comparison with interferon gamma. *J Exp Med.* 1987;166:1734-1746.
105. Aglietta M, Piacibello W, Sanavio F, Stacchini A, Apra F, Schena M, Mossetti C, Carnino F, Caligaris-Cappio F, Gavosto F. Kinetics of human hemopoietic cells after in vivo administration of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Clin Invest.* 1989;83:551-557.
106. Ozer H, Armitage JO, Bennett CL, Crawford J, Demetri GD, Pizzo PA, Schiffer CA, Smith TJ, Somlo G, Wade JC, Wade JL, 3rd, Winn RJ, Wozniak AJ, Somerfield MR. 2000 update of recommendations for the use of hematopoietic colony-stimulating factors: evidence-based, clinical practice guidelines. American Society of Clinical Oncology Growth Factors Expert Panel. *J Clin Oncol.* 2000;18:3558-3585.
107. Anthony Mire-Sluis RT. *Cytokines*: Academic Press; 1998.
108. Selkirk SM. Gene therapy in clinical medicine. *Postgrad Med J.* 2004;80:560-570.

109. Niagara MI, Haider H, Ye L, Koh VS, Lim YT, Poh KK, Ge R, Sim EK. Autologous skeletal myoblasts transduced with a new adenoviral bicistronic vector for treatment of hind limb ischemia. *J Vasc Surg.* 2004;40:774-785.
110. Sasaki K, Chancellor MB, Goins WF, Phelan MW, Glorioso JC, de Groat WC, Yoshimura N. Gene therapy using replication-defective herpes simplex virus vectors expressing nerve growth factor in a rat model of diabetic cystopathy. *Diabetes.* 2004;53:2723-2730.
111. Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao GP, Wilson JM, Batshaw ML. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab.* 2003;80:148-158.
112. Kullo IJ, Simari RD, Schwartz RS. Vascular gene transfer : from bench to bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:196-207.
113. Palasis M, Luo Z, Barry JJ, Walsh K. Analysis of adenoviral transport mechanisms in the vessel wall and optimization of gene transfer using local delivery catheters. *Hum Gene Ther.* 2000;11:237-246.
114. Grines CL, Watkins MW, Helmer G, Penny W, Brinker J, Marmur JD, West A, Rade JJ, Marrott P, Hammond HK, Engler RL. Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. *Circulation.* 2002;105:1291-1297.
115. Freedman SB. Clinical trials of gene therapy for atherosclerotic cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol.* 2002;13:653-661.
116. Schulick AH, Vassalli G, Dunn PF, Dong G, Rade JJ, Zamarron C, Dichek DA. Established immunity precludes adenovirus-mediated gene transfer in rat carotid arteries. Potential for immunosuppression and vector engineering to overcome barriers of immunity. *J Clin Invest.* 1997;99:209-219.
117. Mozes G, Mohacsi T, Gloviczki P, Menawat S, Kullo I, Spector D, Taylor J, Crotty TB, O'Brien T. Adenovirus-mediated gene transfer of macrophage colony stimulating factor to the arterial wall in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:1157-1163.
118. Deindl E, Buschmann I, Hoefer IE, Podzuweit T, Boengler K, Vogel S, van Royen N, Fernandez B, Schaper W. Role of ischemia and of hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit. *Circ Res.* 2001;89:779-786.
119. Guzman RJ, Abe K, Zarins CK. Flow-induced arterial enlargement is inhibited by suppression of nitric oxide synthase activity in vivo. *Surgery.* 1997;122:273-279; discussion 279-80.

120. Mason IJ. The ins and outs of fibroblast growth factors. *Cell*. 1994;78:547-552.
121. Lee RT, Schoen FJ, Loree HM, Lark MW, Libby P. Circumferential stress and matrix metalloproteinase 1 in human coronary atherosclerosis. Implications for plaque rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:1070-103.
122. Pipp F. Die Rolle der VEGF-Rezeptoren bei der Arteriogenese im peripheren Kreislauf des Kaninchens. 2003.

11. ERKLÄRUNG

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

12. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt folgenden Personen:

- Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Schaper für die Überlassung des interessanten Themas und seine Betreuung im Verlauf der letzten zwei Jahre. Vor allem aber für das immer gute Arbeitsklima, die wunderbaren Rahmenbedingungen und die Möglichkeit, mich vielfältig fort- und weiterzubilden.
- Herrn Prof. Dr. Joachim Roth für die spontane Bereitschaft, die Arbeit von Seiten des veterinärmedizinischen Fachbereichs der Justus-Liebig-Universität zu betreuen. Danke für Ihr Engagement!
- Herrn Prof. Dr. Erich Eigenbrodt (†) für das freundliche Willkommen am Fachbereich
- Herrn Dr. Matthias Heil für das unentwegte Durchlesen der Arbeit, die äußerst positive Kritikbereitschaft, die vielen fruchtbaren Diskussionen und Problemlösungen in allen Bereichen
- Herrn Dr. Frederic Pipp vor allem für die Unterstützung im tierexperimentellen Teil, seine freundliche Anleitung in allem was Kaninchen und die Arbeit im Institut betraf
- Frau Kerstin Troidl für die molekularbiologische Untersuchung und die wunderbare Zusammenarbeit
- Gunther von Hagens Institut für Plastination, Heidelberg, für die freundliche Überlassung des Fotos des Kaninchenplastinats
- Frau Sandra Martin für die Einführungen in die Geheimnisse der Herstellung verschiedener Puffer, Antikörperlösungen und anderer Laborzubehöre
- Frau Petra Bingel für die immer gut gelaunte Bereitstellung sauberer und steriler Instrumentarien und Gläser
- Herren Sigfried Langsdorf und Christoph Bingel für die stets zügige Hilfe bei allen technischen Fragen und Problemen
- Frau Renate Nordgren für die Ordnung und den immer vorhandenen Kaffee
- Meinen Eltern, die mir alles ermöglicht haben

ISBN 3-938026-57-X



Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Frankfurter Str. 89 · Tel.: 06 41/2 44 66 · Fax: 06 41/2 53 75
e-mail: Geschaeftsstelle@dvg.net · Homepage: <http://www.dvg.net>