

Die Rolle des Fibroblast Growth Factor-2 und der  
volumen-abhängigen Chlorid-Kanäle während der  
Arteriogenese der Kollateralgefäße nach Ligatur der  
Arteria femoralis bei Mäusen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades  
eines Doktors der Medizin des Fachbereiches Humanmedizin der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von  
Christian Antonio Friedrich  
aus Lima/Perú

Gießen, November 2006

Aus dem  
Max-Planck-Institut für Physiologische und Klinische Forschung  
Abteilung für Experimentelle Kardiologie  
William G. Kerckhoff-Institut  
Bad Nauheim

Direktor:  
Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wolfgang Schaper

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wolfgang Schaper
2. Gutachterin: Prof. Dr. med. E. Baumgart-Vogt

Tag der Disputation: 08. November 2006





# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>v</b>
<b>Abstract</b>	<b>vii</b>
<b>Abkürzungen</b>	<b>ix</b>
<b>I. Einleitung</b>	<b>1</b>
I.1. Ablauf der Arteriogenese nach Verschluss der Arteria femoralis	2
I.2. Mausmodell	3
I.3. Volumen abhängige Chlorid-Kanäle des Endothels	3
I.4. Fibroblast Growth Factor-2	4
I.5. Ziele dieser Arbeit	5
<b>II. Material</b>	<b>7</b>
II.1. Mäusegruppen	7
II.1.1. Gesetzliche Bestimmungen zu Tierversuchen	7
II.1.2. Ligatur bei Balb/c Mäuse	7
II.1.3. Balb/c Mäuse der Mibefradil-Gruppe	7
II.1.4. FGF-2-/- und FGF-2 w.t. Mäuse mit Ligatur der A. femoralis	7
II.1.5. FGF-2-Pumpenimplantation	7
II.1.6. Ligatur bei sv129 Mäusen	8
II.1.7. Mikrosphären-Gruppe	8
<b>III. Methoden</b>	<b>9</b>
III.1. Modell und anatomische Strukturen	9
III.2. Operationen	9
III.2.1. Narkose	9
III.2.2. Operationstechniken	10
III.2.2.1. Distale Ligatur der A. femoralis	10
III.2.2.2. Proximale Ligatur der A. femoralis	10
III.2.2.3. Implantation der osmotischen Mikropumpe Alzet® 1007D	11
III.2.2.4. Postoperative Maßnahmen	13
III.3. Auswertungsmethoden	13
III.3.1. Hämoglobin-Sauerstoff-Sättigung	14
III.3.2. Laser-Doppler-Imaging	15
III.3.3. Quantifizierung des Blutflusses mit fluoreszierenden Mikrosphären	18
III.3.4. Perfusionsfixierung	19
III.3.5. Angiografie	19
III.3.6. Fotografie und Probeentnahme	20
III.3.7. Einbettung	20
III.3.8. Lichtmikroskopie	21
III.3.9. Transmissionselektronenmikroskopie	22
III.3.10. Morphometrie	22
III.3.11. Kapillarendichtebestimmung	23
III.3.12. Statistische Auswertung	23
<b>IV. Ergebnisse</b>	<b>25</b>
IV.1. Anatomische Definitionen	25
IV.1.1. Regelmäßiges Auftreten der Kollateralen in definierten Muskelsträngen	25

IV.1.2. <i>Kollateralgefäße proximal des Abgangs der Arteria femoralis</i>	31
<b>IV.2. Arteriogenese der untersuchten Kontrollgruppen .....</b>	<b>33</b>
IV.2.1. <i>Balb/c - Mäuse</i>	33
IV.2.1.1. <i>Stärkere Durchblutung durch Gefäßwandwachstum</i>	35
IV.2.2. <i>sv129 - Mäuse</i>	36
IV.2.2.1. <i>Gibt es Geschlechtsunterschiede bei der Arteriogenese?</i>	38
<b>IV.3. Strukturelle Veränderungen der Gefäßwand während der Arteriogenese</b>	<b>40</b>
IV.3.1. <i>Präexistierende Kollateralgefäße</i>	40
IV.3.2. <i>Kollateralen nach 4 Stunden erhöhter Scherkräfte</i>	40
IV.3.3. <i>Kollateralen nach 24 Stunden erhöhter Scherkräfte</i>	42
IV.3.4. <i>Drei Tage nach Ligatur</i>	42
IV.3.5. <i>Sieben Tage nach Ligatur</i>	43
<b>IV.4. Hemmung der Arteriogenese durch Blockierung der endothelialen Chlorid-Kanäle</b>	<b>46</b>
<b>IV.5. Die Rolle des Fibroblast Growth Factor-2 während der Arteriogenese .....</b>	<b>51</b>
IV.5.1. <i>Ligatur bei FGF-2<sup>-/-</sup> und FGF-2 <i>w.t.</i>-Mäusen</i>	51
IV.5.2. <i>FGF-2 Mikropumpe bei sv129 Mäusen</i>	52
<b>IV.6. Kapillarendichte.....</b>	<b>53</b>
<b>IV.7. Ergebnisse der zusätzlich angewendeten Methoden .....</b>	<b>55</b>
IV.7.1. <i>Fluoreszierende Mikrosphären</i>	55
IV.7.2. <i>Gleichzeitiger Laser-Doppler von Kollateralen 7 Tage und direkt nach Ligatur der A. femoralis</i>	56
<b>V. Diskussion .....</b>	<b>59</b>
<b>V.1. Ablauf der Arteriogenese nach Ligatur der A. femoralis .....</b>	<b>61</b>
<b>V.2. Gewachsene präexistierende Kollateralgefäße nach Verschluss der A. femoralis</b>	<b>64</b>
<b>V.3. Größen und Flussverhältnisse .....</b>	<b>65</b>
<b>V.4. Mechanische Kräfte am Endothel während der Arteriogenese .....</b>	<b>68</b>
<b>V.5. Durchblungsverhältnisse nach Ligatur der A. femoralis .....</b>	<b>69</b>
<b>V.6. Korkenzieherform der Kollateralen .....</b>	<b>70</b>
<b>V.7. Verlangsamung der Arteriogenese durch Blockade der endothelialen Chlorid-Kanäle mit Mibefradil .....</b>	<b>72</b>
<b>V.8. Fibroblast Growth Factor-2 hat eine Arteriogenese fördernde Wirkung ....</b>	<b>74</b>
<b>V.9. Arteriogenese und Angiogenese: Zwei unterschiedliche Anpassungsreaktionen .....</b>	<b>76</b>
V.9.1. <i>Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen Balb/c und sv129</i>	77
<b>V.10. Beurteilung der Methoden .....</b>	<b>78</b>
V.10.1. <i>Mausmodell für Arteriogenese</i>	78
V.10.2. <i>Durchblutungsmessung mit Laser-Doppler</i>	79
V.10.3. <i>Hämoglobin-Sauerstoffsättigung</i>	80
V.10.4. <i>Radiologische Auswertung</i>	80
V.10.5. <i>Lichtmikroskopische Morphometrie</i>	80
V.10.6. <i>Fluoreszierende Mikrosphären zur Bestimmung der Durchblutung</i>	81
V.10.7. <i>Intraarterielle Injektion durch die osmotische Mikropumpe</i>	82
V.10.8. <i>Kapillardichtenbestimmung</i>	83
<b>V.11. Mögliche klinische Anwendungen der Ergebnisse .....</b>	<b>83</b>
<b>VI. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>85</b>
<b>VII. Anhang .....</b>	<b>93</b>

## Zusammenfassung

**Einleitung:** Nach Verschluss einer Hauptarterie kommt es zu Wachstum der Kollateralgefäße. Angiogenese ist das Wachstum neuer Kapillaren aus bestehenden Gefäßen, während Arteriogenese die durch erhöhte Scherkräfte ausgelöste Vergrößerung präexistierender Kollateralarteriolen darstellt. Durch Arteriogenese kommt es zu einer geringeren Gewebischämie im Vergleich zur Angiogenese. Frühe Arteriogenese auslösende Faktoren wurden in dieser Arbeit untersucht. Die endotheliale Schwellung unter erhöhter Scherkraft ist der erste Schritt der Arteriogenese. Wir untersuchten mittels des Mibefradils, eines Blockers volumenregulierender endothelialer Chloridkanäle, die Rolle der Zellschwellung und die Verlangsamung der Arteriogenese durch Blockierung der volumenabhängigen Chloridkanäle. Des Weiteren untersuchten wir die Rolle des Fibroblast Growth Factor 2 in der Arteriogenese bei FGF-2<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen.

**Methoden:** Wir entwickelten ein neues Mausmodell zur Untersuchung arteriogener Prozesse nach Okklusion der A. femoralis mit nicht invasiven und invasiven Auswertungsmethoden. Gemessen wurde die Verbesserung der Durchblutung im Laser-Doppler-Imager im Vergleich zur nicht operierten Gegenseite. Genauso wurde die unterschiedliche Gewebssauerstoffsättigung gemessen. Das Gefäßwachstum wurde morphologisch anhand des Durchmessers quantifiziert. Exogenes FGF-2 und Mibefradil wurden mittels osmotischer Mikropumpe intraarteriell appliziert und mit der Kontrollgruppe (PBS) verglichen. Die Rolle des FGF-2 wurde bei knockout-Mäusen im Vergleich zu wild type-Mäusen sowie nach exogener Zufuhr untersucht. Zur Unterscheidung der Arteriogenese und Angiogenese wurde die Kapillardichtezunahme im Gewebe distal der Ligatur gemessen.

**Ergebnisse:** Die Arteriogenese findet in unserem Modell regelmäßig in fünf Muskeln statt. Nach 4-stündiger Einwirkung erhöhter Scherkräfte tritt ein intrazelluläres Ödem in Form von Vakuolen in den Endothelzellen auf, das sich nach 24 Stunden zu einem extrazellulären Ödem ausweitet. Nach 3 Tagen nehmen die Endothelzellen an Volumen zu und befinden sich, wie die Fibroblasten, in der Synthesephase. Gleichzeitig finden Umbauprozesse in der Adventitia statt: Makrophagen sind nachzuweisen und Fibroblasten proliferieren. Auf elektronenmikroskopischer Ebene kann man keine Unterschiede zwischen den FGF-2<sup>-/-</sup> Mäusen und der Kontrollgruppe erkennen. Lediglich eine Unterscheidung der verschiedenen Anpassungsschritte an die erhöhten Scherkräfte ist möglich. Nach Ligatur der A. femoralis der Bab/c-Mäusen stieg der Kollateralgefäßdurchmesser von  $34 \pm 11 \mu\text{m}$  auf  $89 \pm 27 \mu\text{m}$  am 21. Tag ( $p < 0,02$ ). Nach intraarterieller PBS- Applikation in der Kontrollgruppe verbesserte sich die im Laser-Doppler gemessene relative Durchblutung zwischen der ligierten zur nicht ligierten Seite von  $0,06 \pm 0,01$  direkt postoperativ auf  $0,25 \pm 0,02$  am 7. Tag, während in der Mibefradilgruppe die relative Durchblutung von postoperativ  $0,07 \pm 0,02$  nur auf  $0,13 \pm 0,02$  anstieg ( $p < 0,01$ ). Die

Sauerstoffsättigung bestätigt diese Ergebnisse ( $p < 0,02$ ). Der Kollateraldurchmesser war in der Mibefradilgruppe ( $61 \pm 4.7 \mu\text{m}$ ) signifikant geringer gegenüber der Kontrollgruppe ( $77.3 \pm 0.9 \mu\text{m}$ ) ( $p < 0.05$ ). FGF-2 spielt während der Arteriogenese eine Rolle. Es zeigt sich in unseren Experimenten zwar kein statistisch relevanter Unterschied zwischen den FGF-2 w.t und - knockout-Mäusen in der Fähigkeit zur Arteriogenese nach Ligatur der A. femoralis, aber die exogene intraarterielle Zufuhr von FGF-2 via Mikropumpe hat einen fördernden Einfluss auf die Arteriogenese. Die Kapillardichte in den Oberschenkelmuskel nimmt nicht zu ( $p < 0,3$ ), während die Kapillardichte der Mm. gastrocnemii nach Ligatur signifikant um das 1,5-fache zunimmt ( $p < 0,001$ ).

**Schlussfolgerungen:** Die Kollateralgefäße treten nach der Ligatur der A. femoralis regelmäßig in den selben Muskeln des Oberschenkels auf. Die Hemmung der Arteriogenese in der Mibefradil-Gruppe spricht für eine Beteiligung der endothelialen volumenregulierenden Chloridkanäle in der Initialphase der Arteriogenese. FGF-2 hat eine fördernde Wirkung auf die Arteriogenese.

## Abstract

**Introduction:** After occlusion of a main artery collateral vessels begin to grow. The sprouting of capillaries we call Angiogenesis to differentiate from the Arteriogenesis or enlargement of pre-existing collateral arterioles enforced by higher shear stress. Arteriogenesis participates to saving ischemic tissues significantly more than Angiogenesis. Very early triggering of Arteriogenesis has been chosen for the present experimental study. Endothelial cell swelling is the first step in Arteriogenesis. A volume regulated Chloride channel, blocked by Mibefradil, plays a mean role in this cell swelling and slows down Arteriogenesis. Furthermore, we examined the role of Fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2) during Arteriogenesis in FGF-2<sup>-/-</sup> and w.t. mice.

**Methods:** We developed a mouse model for the examination of arteriogenic processes after femoral artery occlusion by invasive and non-invasive methods. Blood flow improvement was measured in the paws with a Laser Doppler Imager after one-side occlusion. The tissue oxygen saturation was measured by quantifying the spectral absorption of saturated haemoglobin. The vessel enlargement was analysed morphometrically on histological cross-sections. Exogenous FGF-2 and Mibefradil were applied intraarterially via an implanted osmotic micropump. In the control group, PBS was given. Also FGF-2 was given to FGF-2 knock out mice via micropump and compared with wild type mice. Capillary density in the m. gastrocnemius was measured to quantify Angiogenesis.

**Results:** We observed constantly five enlarged collateral arteries in the thigh muscles. After four hours of enforced shear stress endothelial cell swelling starts, after 24 hours a severe cellular oedema was observed. Three days thereafter endothelial cell enlarge and change together with smooth muscle cells into a synthesizing phenotype. At the same time the vessel wall adventitia changes: macrophages appear and fibroblasts proliferate. No structural differences between collateral arteries of FGF-2<sup>-/-</sup> and control mice were observed, even on electronmicroscopical level. After femoral artery occlusion in Balb/c mice the collateral artery diameter increased from  $34 \pm 11 \mu\text{m}$  to  $89 \pm 27 \mu\text{m}$  in 21 days ( $p < 0,02$ ). After intra-arterially application of PBS in Balb/c mice relative laser doppler measured blood flow from  $0,06 \pm 0,01$  to  $0,25 \pm 0,02$  after seven days. In the Mibefradil group blood flow increased from  $0,07 \pm 0,02$  after vessel occlusion only to  $0,13 \pm 0,02$  ( $p < 0,01$ ). Oxygen saturation measures confirm this difference ( $p < 0,02$ ). Collateral diameter in mice with Mibefradil application ( $61 \pm 4,7 \mu\text{m}$ ) was significantly smaller comparing with the control mice ( $77,3 \pm 0,9 \mu\text{m}$ ) after seven days of increased shear stress ( $p < 0,05$ ). FGF-2 plays a significant role in Arteriogenesis. There was no statistical significant difference between FGF-2 w.t und -k.o. mice in our experiments. But exogenous applied FGF-2 promotes collateral vessel enlargement. Capillary density in thigh muscle does not in-

crease after femoral artery occlusion, but increased 1,5-times in the gastrocnemius muscles 1,5-fold ( $p < 0,001$ ) after ligation.

**Conclusions:** Collateral growth after femoral artery occlusion occurs always in the same tight muscles. The inhibition of Arteriogenesis in the Mibefradil-group indicates the involvement of endothelial volume-regulated Chloride-channel at the beginning of the Arteriogenesis. FGF-2 promotes Arteriogenesis.

## Abkürzungen

A./Art.	Arterie
EM	Elektronenmikroskop
HIF-1	Hypoxia Induced Factor-1
FGF-2	Fibroblast Growth Factor-2
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
k.o. / -/-	knock out
LDI	Laser-Doppler-Imaging
N./Nv.	Nerv
PBS	phosphate-buffered saline
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule 1
PIGF	Placenta Growth Factor
shear stress	Scherkräfte oder Schubspannung
sO <sub>2</sub>	Sauerstoffsättigung
V.	Vene
VACK	volumen-abhängiger Chlorid-Kanal
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
w.t.	wild type



# I. Einleitung

Während es bei einem schnellen Verschluss einer Arterie in dem von ihr versorgten Gebiet zu einer Infarzierung des Gewebes wegen Sauerstoffmangels kommt, treten Gewebsschäden bei einer langsamen Stenosierung der Arterie in geringerem Maße auf<sup>1</sup>. Umgehungskreisläufe übernehmen die Blutzufuhr; sie garantieren aber oft nur eine suffiziente genügende Blutzufuhr für einen Metabolismus in Ruhe. Wird der Stoffwechsel gesteigert, treten Symptome des Sauerstoffmangels auf. Ein klinisches Beispiel dafür ist die Claudicatio intermittens. Durch die arteriosklerotisch bedingten Lumenverlegungen im Bereich der Arterien kommt es bei Belastung zu einer azidotischen Stoffwechsellaage in der Muskulatur und es treten Schmerzen im Wadenbereich auf, die in Ruhe wieder sistieren. Die derzeitigen therapeutischen Ansätze beschränken sich auf die Verbesserung der rheologischen Eigenschaften der Erythrozyten, die chirurgische Therapie durch Umgehung dieser Stenosen (bypass) oder die krankengymnastische Übungsbehandlung.

Weitere therapeutische Möglichkeiten können sich durch die Förderung der Entwicklung der Kollateralgefäße, die sich bei langsamer Stenosierung an die veränderten Fluss- und Druckverhältnisse adaptieren können, ergeben.

Bei der Untersuchung des Gefäßwachstums muss man prinzipiell zwischen den verschiedenen Mechanismen der Gefäßentstehung bzw. -veränderung unterscheiden. Es spielen hier eine essentielle Rolle die Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese. Diese Unterscheidung ist wichtig, da diese Vorgänge zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Organentwicklung bzw. -anpassung stattfinden, von bestimmten Bedingungen abhängig sind und zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Nur wenn man die notwendigen Faktoren kennt, kann man das Gefäßwachstum gezielt fördern.

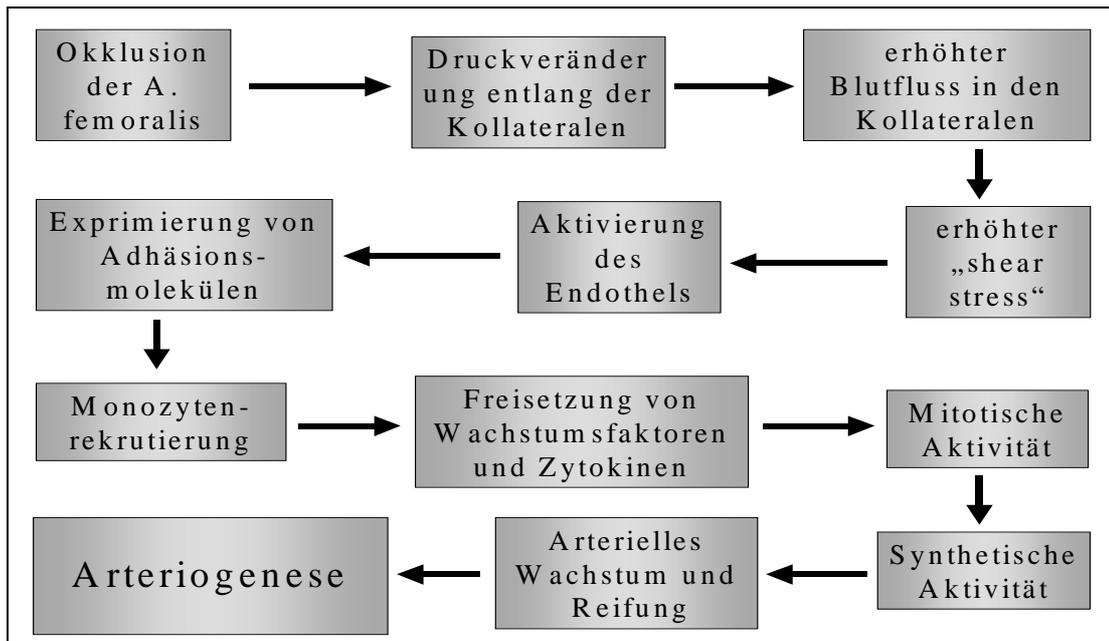
Die de novo Entstehung von Blutgefäßen aus Angioblasten aus dem primären kapillären Plexus mesodermalem Ursprungs im embryonalen Organismus bezeichnet man als **Vaskulogenese**<sup>2</sup>. Aus angiogenen „Blutinseln“ entwickeln sich primitive hämatopoetische Zellen und Endothelzellen, die einen primären kapillären Plexus bilden, aus dem sich dann primitive Gefäße bilden<sup>3,4</sup>.

**Angiogenese** dagegen bezeichnet die Sprossung neuer Kapillaren aus bereits bestehenden Gefäßen im entwickelten Organismus<sup>5</sup>. Dieser Prozess findet sowohl im embryonalen als auch im adulten Organismus statt. Sie spielt aber auch während der Tumorprogression und –metastasierung<sup>6</sup> eine wichtige Rolle. Andere Beispiele sind die Gefäßeinsprossung in das Granulationsgewebe während der Wundheilung, die diabetischen Retinopathie<sup>5</sup> und die rheumatoide Arthritis<sup>7</sup>.

Während die Angiogenese und die Vaskulogenese die Entstehung neuer Gefäße darstellen, bezieht sich die **Arteriogenese** auf den Umbau präexistierender Arteriolen zu größeren Gefäßen<sup>8,9</sup>. Ausgelöst wird dieses Remodelling durch einen erhöhten Fluss und der dadurch bedingten stärkeren Scherkräfte (in Englisch als *shear stress* bezeichnet)<sup>8,9</sup> entlang der Endothelschicht nach Verschluss einer zuführenden Arterie. Durch die Arteriogenese im Bereich der präexistierenden Kollateralgefäße kann bei einem plötzlichen Verschluss der zuführenden Arterie die Blutzufuhr garantiert und die anschließende Gewebsnekrose verhindert werden. Die Arteriogenese ist aber ein relativ langsam verlaufender Prozess<sup>10,11</sup>. Bei einem langsam progredienten Verschluss kommt es während der Arteriogenese zu einer Adaptation der Gefäße und einer Versorgung des Gewebes in Ruhe. Eine Beschleunigung bzw. Verstärkung der Arteriogenese mittels exogener Wachstumsfaktoren soll den Embolie bedingten Gewebsuntergang verhindern.

### ***1.1. Ablauf der Arteriogenese nach Verschluss der Arteria femoralis***

Nach der Okklusion eines Hauptgefäßes kommt es in den vorbestehenden Kollateralgefäßen zu einem Anstieg des Blutflusses und der Scherkräfte entlang der Endothelzellen. Die verstärkten mechanischen Kräfte auf die Gefäßwand bewirken eine Aktivierung der Endothelzellen, es kommt zu einer Veränderung des Zellvolumens<sup>12</sup>, was zur Aktivierung von Ionenkanälen der Zellmembran führt. Gleichzeitig kommt es zur Exprimierung von Adhäsionsmolekülen<sup>12</sup>, insbesondere E-Selectin, ICAM-1 und VCAM-1. Während der Anpassung an die neuen Flussverhältnisse spielen verschiedene Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle: unter anderem HIF-1, VEGF, PIGF und FGF-2. Eine Monozytenrekrutierung entlang des Gefäßes ist zu beobachten. Insgesamt führen die stärkeren Scherkräfte zu einer erhöhten mitotischen und synthetischen Aktivität des Endothels, aus dem ein Wachstum des präexistierenden Kollateralgefäßes resultiert. Schematisch sind die Abläufe der Arteriogenese in der folgenden Skizze dargestellt (s. Abbildung 1 ).



**Abbildung 1:** Ablaufschema der Arteriogenese (nach Scholz et al.)<sup>13</sup>

## 1.2. Mausmodell

In der Vergangenheit sind präexistierende, zum Wachstum befähigte Kollateralarterien in unterschiedlichen Geweben verschiedener Spezies beschrieben und in zahlreichen Modellen untersucht worden<sup>11,14,15,16</sup>. Diese Kollateralarteriolen befinden sich (mit wenigen Ausnahmen wie Schweine-, Schafs- und Rattenherzen) in den meisten Organen unterschiedlichster Spezies. Die Arteriogenese weist in verschiedenen Organen kaum Unterschiede auf. Zur Untersuchung des Gefäßwachstums wurde ein Maus-Modell entwickelt, das uns ermöglicht, die Funktion und Lokalisation in vivo genau zu beschreiben, die Abläufe während der Arteriogenese in vivo zu beobachten und zwischen dem Kapillarenwachstum (Angiogenese) und der Gefäßumwandlung (Arteriogenese) zu unterscheiden.

Die Arteria femoralis in den Hinterläufen der Maus besitzt mehrere präexistierende Kollateralkreisläufe, die bei Verschluss des Gefäßlumens die Blutversorgung der distalen Gewebe bis zu einem gewissen Grad übernehmen können. Durch die Ligatur dieser Arterie kommt es zu einem Druckgefälle entlang der Kollateralen und das Kollateralwachstum wird ausgelöst. Durch genetisch manipulierte Mäuse lassen sich die Rollen der beteiligten Faktoren untersuchen.

## 1.3. Volumen abhängige Chlorid-Kanäle des Endothels

Die Scherkräfte bei erhöhter Durchblutung wirken direkt auf die Endothelzellen. Das Endothelium stellt aber nicht nur den Übergang zwischen dem intra- und extravaskulärem Raum dar, es ist auch in der Lage, im Zusammenspiel mit den anderen Zellen der Gefäßwand, die Plättche-

naggregation zu regulieren, Adhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktoren zu produzieren und die Permeabilität zu regulieren. Die Endothelzellen sind einerseits fähig, durch eine Vasodilatation, mittels NO- und Prostaglandin-Synthese, kurzfristig auf einen erhöhten Blutfluss zu reagieren, andererseits können sie sich an einen andauernden erhöhten Fluss durch strukturelle Veränderungen und Hypertrophie anpassen. Sie können die durch stärkeren Blutfluss erhöhten mechanischen Kräfte in biochemische Stimuli umsetzen<sup>17</sup>. Diese Mechanismen sind bisher noch nicht entdeckt worden, das Zytoskelett, die tight junctions sowie die Desmosomen scheinen aber eine Rolle zu spielen<sup>18</sup>. Die Chlorid-Ionenkanäle der Zellmembran sind in diesen anfänglichen Anpassungsprozessen beteiligt<sup>19</sup>. Durch das Zellvolumen aktivierte, nach außen gerichtete volumen abhängigen Chlorid-Kanäle (VACK) sind in vielen Zellen vorhanden, ihr Aufbau ist aber bisher nicht in Einzelheiten geklärt worden. Sie scheinen eine elementare Rolle während der osmotischen Volumenregulierung spielen<sup>20,21</sup> und unter anderem, durch die Zellschwellung aktiviert, mittels einem auswärtsgerichteten Chloridstrom die Wassermolekülsekretion zu bewirken<sup>21</sup>. Durch die in vitro Hemmung der VACK konnte eine Minderung des Endothelzellwachstums nachgewiesen werden<sup>22</sup>. Manolopoulos et al<sup>23</sup> wiesen bei vier VACK-Blockern, darunter der vom Markt genommene Calcium-Antagonist Mibefradil (Posicor<sup>®</sup>, Ro 40-597), in in vitro- und in „chorioallantoic membrane assay“-Versuchen die Fähigkeit zur Angiogenese-Inhibition. Jackson<sup>24</sup> zeigte, dass VACK-Inhibition den Gefäßmyotonus cerebraler Gefäße herabsetzt und dieser Tatsache auch auf periphere Gefäße zutreffen kann. Zusätzlich habe die VACK eine wichtige Funktion in der Umwandlung mechanischer Kräfte in chemische Prozesse. Nakao et al zeigten, dass die auf das Endothel wirkenden Scherkräfte die VACK aktivieren können<sup>25</sup>. In früheren Studien zeigten wir, dass die Zellschwellung eine der ersten Vorgänge während der Arteriogenese ist<sup>16,26</sup>.

Aus diesem Zusammenhang heraus untersuchen wir die Rolle der Inhibition der VACK während der Arteriogenese durch die intra-atrielle Applikation von Mibefradil.

#### ***1.4. Fibroblast Growth Factor-2***

Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) wurde zuerst in der Hypophyse entdeckt<sup>27</sup> und konnte später in fast allen Organen nachgewiesen werden. FGF-2 spielt eine essentielle Rolle während der embryonalen Vasculogenese<sup>28</sup> und fördert im erwachsenen Organismus die Proliferation glatter Muskelzellen<sup>29</sup> und Endothelzellen<sup>30</sup>. Es konnte unter anderem auch in Makrophagen in der Adventitia wachsender Kollateralgefäße bei Kaninchen<sup>31</sup> und Mäusen<sup>32</sup> nachgewiesen werden. Andere Gruppen konnten eine erhöhte Expression von FGF-2 mRNA und FGFR1 mRNA in proliferierenden Endothel- und glatten Muskelzellen in in vitro und in vivo Modellen nachweisen<sup>33</sup>. Nach Ligatur der A. femoralis bei Ratten und exogener FGF-2-Zufuhr konnte

eine Verbesserung der Pfortendurchblutung unter Belastung auf dem Laufband nachgewiesen werden<sup>16</sup>.

Da FGF-2 eine fördernde Wirkung auf die Arteriogenese zu besitzen scheint, soll in dieser Arbeit zum einem die Verbesserung der Pfortendurchblutung nach Ligatur bei FGF-2 knock-out im Vergleich zu wild-type-Mäusen untersucht werden. Zum anderem soll die Wirkung von intraarteriell gegebenem FGF-2 auf die Arteriogenese untersucht werden.

## ***1.5. Ziele dieser Arbeit***

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung verschiedener während der Arteriogenese regulatorisch wirkender Faktoren in einem *in vivo-Mausmodell*. Einerseits untersuchten wir die Rolle der Zellschwellung zu Beginn der Arteriogenese und die Rolle der volumen-abhängigen Chlorid-Kanäle während der Arteriogenese.

Andererseits untersuchten wir die Rolle des Fibroblast Growth Factor 2 während der Arteriogenese.

Gleichzeitig sollte der Unterschied zwischen arteriogenen und angiogenen Prozessen und die Rolle der Gewebshypoxie bei diesen Anpassungsreaktionen untersucht werden.

Weiterhin sollten weitere Auswertungsmethoden in diesem Mäuse-Modell entwickelt und kritisch beurteilt werden.

Wir fanden bisher keine genaue Beschreibung der Anatomie des Mausoberschenkels, daher war die exakte Bezeichnung der anatomischen Strukturen in diesem Gebiet ein zusätzliches Ziel dieser Arbeit. Häufig waren kleinere Strukturen, wie zum Beispiel die Gefäße distal der A. femoralis profunda, nicht exakt bezeichnet und für unterschiedliche Gefäße wurden gleiche Bezeichnungen benutzt (unterschiedliche Abschnitte wurden als A. saphena bezeichnet)<sup>34,35,36,37</sup>. Daher war es nötig, die vorhandenen anatomischen Strukturen genauer zu bezeichnen, um deren Veränderungen beschreiben zu können.



## **II. Material**

### **II.1. Mäusegruppen**

#### **II.1.1. Gesetzliche Bestimmungen zu Tierversuchen**

Die vorliegende Versuchsreihe wurde mit Erlaubnis des Landes Hessen, Regierungspräsidium Darmstadt, durchgeführt und entspricht Paragraph 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes (Fassung in der Bekanntmachung vom 29. Mai 1998 [Bundesgesetzblatt Jahrgang 1998 Teil I, Nr. 30, S. 1106 ff.]).

#### **II.1.2. Ligatur bei Balb/c Mäuse**

Bei 23 Balb/c Mäusen wurde die A. femoralis ligiert (s. III.2.2.1). Sie dienten zur Untersuchung des Kollateralwachstums und als Vergleichsgruppe für die Hemmung der Arteriogenese. Die Mäuse wurden von der Firma Harlan (Niederlande) gezüchtet und waren zum Zeitpunkt der Operation 11 Wochen alt.

#### **II.1.3. Balb/c Mäuse der Mibefradil-Gruppe**

Zur Untersuchung des Einflusses der volumen-abhängigen Chlorid-Kanäle wurde einer Gruppe von sieben Balb/c-Mäusen mit 175 µg Mibefradil (Posicor<sup>®</sup>, Ro 40-597) gefüllte osmotische Pumpen implantiert (s. III.2.2.3). Als Kontrollgruppe benutzten wir sieben Balb/c-Mäuse, denen nach derselben Methode PBS-gefüllte Mikropumpen implantiert wurden. Alle 14 Tiere waren zum Zeitpunkt der Operation 11 Wochen alt und wogen durchschnittlich 21,3 g. Die Balb/c wurden von der Firma Harlan (Niederlande) gezüchtet.

#### **II.1.4. FGF-2-/- und FGF-2 w.t. Mäuse mit Ligatur der A. femoralis**

Die 3 FGF-2-/- Mäuse und 5 FGF-2 w.t.- Mäuse wurden von der Firma Charles River, Frankreich, gezüchtet und waren zum Zeitpunkt der Operation (s. III.2.2.1) circa 11 Wochen alt. Diese Knock-out-Mäuse wurde aus 129sv-Mäusen gezüchtet.

#### **II.1.5. FGF-2-Pumpenimplantation**

Benutzt wurden 7 129sv Mäuse zur Implantation einer FGF-2 gefüllten Mikropumpe (s. III.2.2.3) sowie 4 129sv-Mäuse zur Implantation PBS-gefüllter Pumpen (s. III.2.2.3) als Kontrollgruppe. Die Mäuse waren zum Zeitpunkt der Pumpenimplantation circa 10 Wochen alt und wogen durchschnittlich 22,3 g. Sie wurden von der Firma Charles River, Frankreich, gezüchtet.

Über die Mikropumpen (Alzet 1007D<sup>®</sup>) wurden entweder 5µg FGF-2 in 100µl PBS gelöst bzw. nur PBS gegeben.

### **II.1.6. Ligatur bei sv129 Mäusen**

Da die FGF-2-manipulierten Mäuse einen 129sv Hintergrund besitzen, benutzten wir 10 weibliche und 9 männliche 129sv Mäuse als Kontrollgruppe für die Ergebnisse der Ligatur (s. III.2.2.1) bei der FGF-2<sup>-/-</sup> und FGF-2 w.t.- Gruppe. Die sv129 Mäuse waren 1 Monat alt und wogen durchschnittlich 24,2 g.

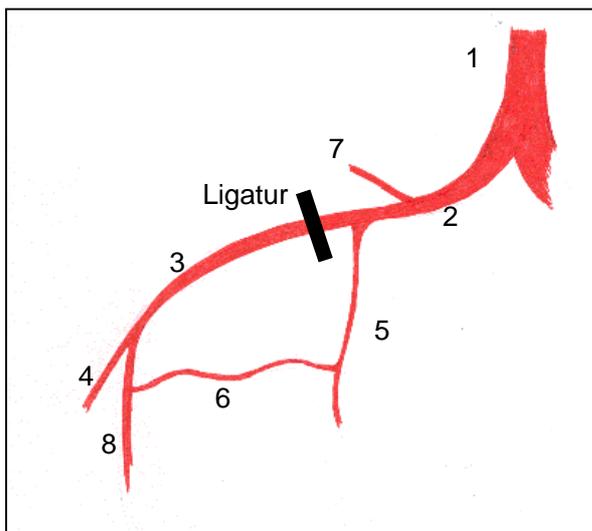
### **II.1.7. Mikrosphären-Gruppe**

Zur Untersuchung der Möglichkeiten der Durchblutungsbestimmung mit fluoreszierenden Mikrosphären wurden 7 GM-CSF<sup>-/-</sup> Mäuse benutzt. Sie waren ca. 2 Monate alt und wogen durchschnittlich 24,1g.

## III. Methoden

### III.1. Modell und anatomische Strukturen

Zur Untersuchung der Arteriogenese wurde ein Modell entwickelt, in dem das Wachstum der präexistierenden Umgehungskreisläufe der A. femoralis bei Mäusen gefördert bzw. gehemmt werden kann<sup>3816</sup>. Es wurde die A. femoralis der rechten Hinterläufe der Mäuse distal des Abgangs der A. profunda femoris ligiert und die Entwicklung der Kollateralgefäße mit der linken, nicht ligierten Seite verglichen. Durch die Ligatur der A. femoralis sinkt der Druck distal der Einmündung der Umgehunggefäße in die A. femoralis superficialis, was zu einem erhöhten Blutfluss in den zu untersuchenden Kollateralen führt. Die A. femoralis besitzt mehrere präexistierende Umgehungskreisläufe, die bei Verschluss des Gefäßlumens die Blutversorgung der distalen Gewebe bis zu einem gewissen Grad übernehmen können. Eine Skizze des Operationsgebietes bietet die Abbildung 2.



**Abbildung 2:** Skizze des Operationsgebietes: (1) Aorta, (2) A. iliaca communis, (3) A. femoralis, (4) A. poplitea, (5) A. profunda femoris, (6) Kollateralgefäß, (7) A. circumflexa femoris medialis, (8) A. femoralis superficialis

Wegen ihrer guten Zugänglichkeit und ihrem regelmäßigen Vorhandensein entnehmen wir zur weiteren Untersuchung hauptsächlich die beiden Kollateralgefäße aus den Musculi semitendinosus und gracilis anticus (zur näheren Bezeichnung der Muskeln siehe IV.1.).

### III.2. Operationen

#### III.2.1. Narkose

Die Versuchstiere wurden 15 Minuten vor Versuchsbeginn durch die intraperitoneale Gabe von Ketamin 0,065 mg/g Körpergewicht (Ketaminhydrochlorid, medistar, BRD) und Xylazin 0,013 mg/g Körpergewicht (Xylazinhydrochlorid, medistar, Holzwickede) narkotisiert. Im Allge-

meinen hielt die Narkose 30-45 Minuten an, was für die verschiedenen Untersuchungen und Operationen ausreichte. Gegebenenfalls konnte die Narkose problemlos durch erneute Gabe einer geringeren Dosis verlängert werden.

### **III.2.2. Operationstechniken**

Es wurden verschiedene Operationen im Bereich des Oberschenkels durchgeführt: distale Ligatur der A. femoralis, proximale Ligatur der A. femoralis und Implantation der osmotischen Mikropumpe.

#### **III.2.2.1. Distale Ligatur der A. femoralis**

Um das Wachstum der zu untersuchenden Kollateralgefäße der A. femoralis auszulösen, wurde diese Arterie distal des Abgangs der A. profunda femoris ligiert. Da es sich um sehr kleine Strukturen handelt, wurde zum Operieren ein Mikroskop (OPMI 1-FR, Carl Zeiss Jena, Deutschland) benutzt.

Nach der Hautdesinfektion mit PVP-Jod (medistar, Deutschland) wurde ein Hautschnitt durchgeführt. Weiter wurde das Binde- und Fettgewebe der Mammae abdominalis zur Seite geschoben und die Gefäße dargestellt. Die A. femoralis wurde dann vorsichtig von Nerv und Vene in diesem Bereich getrennt. Die Ligatur der A. femoralis wurde proximal der Abzweigung der A. poplitea und distal des Abgangs der A. profunda femoris gesetzt. Benutzt wurde ein nicht resorbierbarer Seidenfaden (Ethicon K890 6-0 (1 metric), Perma-Hand<sup>®</sup>, Johnson & Johnson Ltd., USA). In Abbildung 2 werden die anatomischen Bedingungen nach der Ligatur der A. femoralis dargestellt werden.

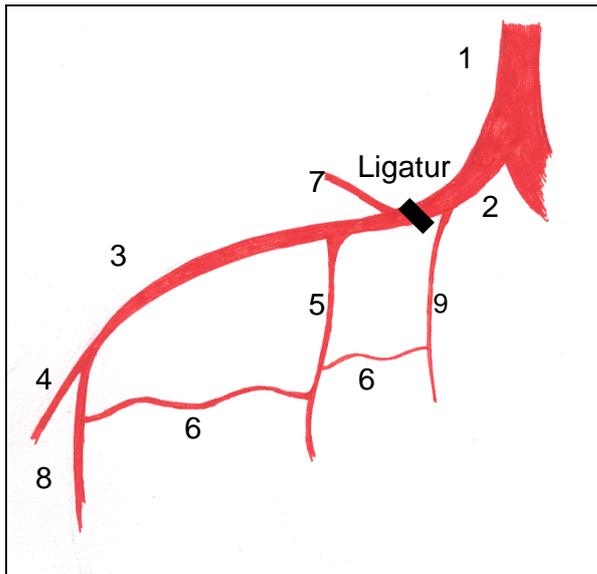
Anschließend wurde die Wunde durch eine Hautnaht (Ethicon K890 5-0, Johnson & Johnson Ltd., USA) verschlossen und anschließend die Beweglichkeit des Hinterbeines überprüft.

Postoperativ wurden 1-2 Hub 10%iges Xylocain-Spray (Astra, Wedel) als Oberflächenanästhetikum appliziert. Die Dauer der Operation betrug durchschnittlich 10 Minuten.

#### **III.2.2.2. Proximale Ligatur der A. femoralis**

In einer kleinen Untergruppe wurde die Kollateralgefäßbildung der A. femoralis und der A. iliaca untersucht. Hier wurde die Ligatur proximal des Abgangs der A. profunda femoris und distal der Bifurkation der A. iliaca interna gesetzt (s. Abbildung 3).

Nach der Narkose (s. II.2.1.) wurden die Gefäße im Bereich der A. femoralis dargestellt. Das weitere Procedere entsprach dem der distalen Ligatur (s. III.2.2.1.).



**Abbildung 3:** Ligatur der A. femoralis proximal des Abgangs der A. profunda femoris (1) Aorta, (2) A. iliaca, (3) A. femoralis, (4) A. poplitea, (5) A. profunda femoris, (6) Kollateralgefäß, (7) A. circumflexa femoris medialis, (8) A. femoralis superficialis, (9) A. pudenda externa

### III.2.2.3. Implantation der osmotischen Mikropumpe Alzet® 1007D

Um den Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren auf die Kollateralentstehung in vivo beobachten zu können benutzten wir osmotische Mikropumpen. Diese ermöglichen die Dauergabe eines Stoffes in einer konstanten intravaskulären Konzentration über einen definierten Zeitraum. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die direkte Gabe der Wirkstoffe in die zu untersuchende Arterie unter Umgehung des first-pass-Effektes.

In unserem Modell wurden die Mikropumpe Alzet 1007D (Alzet Corp., Palo Alto, USA) (s. Abbildung 4) verwendet. Die Pumpe fördert über einen Zeitraum von 7 Tagen eine Stoffmenge von  $0.50 \pm 0.02 \mu\text{l}$  pro Stunde. Über einen Katheter wird der Wachstumsfaktor direkt in die A. profunda femoris geführt. Der Katheter verschließt die A. femoralis distal des Abgangs der A. profunda femoris.



**Abbildung 4:** Osmotische Mikropumpe ALZET® und Querschnitt. *Rechtes Bild:* Wir benutzen das kleinste Modell ALZET 1007D (Länge 1,5 cm, Durchmesser 0,6 cm, Gewicht 0,4 g, Gesamtvolumen 0,5 ml, Füllungsvolumen 0,1 ml); *linkes Bild:* Querschnitt der osmotischen Mikropumpe (1) semipermeable Außenmembran, (2) osmotisch aktiver Stoff, (3) mit der zu applizierenden Flüssigkeit gefüllter, komprimierbarer Raum, (4) Metallrohr, an das der Katheter angeschlossen wird. (Quelle: [www.alzet.com](http://www.alzet.com))

Entsprechend den Vorgaben des Herstellers wurden die osmotischen Mikropumpen 3 Stunden vor der Implantation in sterile PBS gelegt, damit sich der osmotisch aktive Stoff aufladen

kann. Anschließend wurden die Mikropumpen mit dem zu applizierenden Stoff gefüllt. Aus Polythene-Schlauch (0.58 mm Innendurchmesser, 0.96 mm Außendurchmesser, Portex Ltd., England) wurden ca. 0,2 mm dünne Katheter hergestellt und im Formaldehyd-Schwenkverfahren sterilisiert. Kurz vor der Operation wurde der Katheter blasenfrei mit dem zu applizierenden Stoff gefüllt. Alle Flüssigkeiten wurden vor der Pumpenfüllung gefiltert (0.22 µm Millipore-Filter, Millepore Corporation, Bedford, USA).

Die benutzte phosphate buffered solution-Lösung (PBS-Lösung) wurde selbst hergestellt. Eine Stammlösung wurde aus 5 Liter destilliertem Wasser und 397,40 g NaCl, 10,00 g KCl, 10,00 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 88,75 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot (\text{H}_2\text{O})$  (alle Komponenten von Firma Merck, Deutschland) zusammengestellt und gelöst. Anschließend wurden 0,5 Liter dieser Stammlösung in 4,5 Liter Wasser (aqua dest.) verdünnt und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

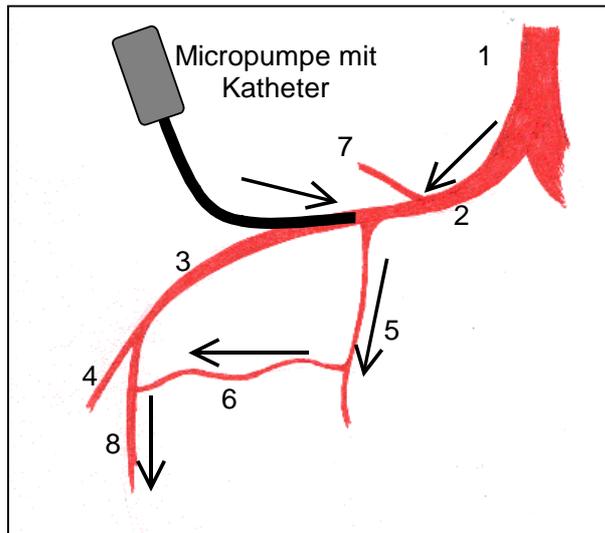
Nach der Narkotisierung der Versuchstiere (s. III.2.1) wurden die Gefäße im Bereich der A. femoralis dargestellt.

Anschließend wurde ein Hautschnitt im Bereich der rechten Scapula durchgeführt, die Haut nach proximal stumpf präpariert und ein Hautsack gebildet, in den die Pumpe implantiert wurde. Zum Hautschnitt hin wurde unter der Haut ein kleiner Kanal stumpf abgehoben, durch den dann der Katheter durchgeführt wurde. Anschließend wurde dieser Bereich wieder vernäht.

Die A. femoralis wurde im Bereich der Abgänge der A. profunda femoris und der A. poplitea freilegt, vom umgebenden Bindegewebe befreit und vorsichtig von Nerv und Vene getrennt. Distal wurde die A. femoralis superficialis vor dem Abgang der A. poplitea mit einem 5-0 Faden durch doppelten Knoten ligiert und damit der Blutfluss unterbunden. Dabei ist darauf zu achten, dass der Abgang der A. poplitea offen bleibt. Die A. femoralis superficialis wurde mit einem Faden im Bereich proximal des Abgangs der A. profunda femoris fixiert und der Blutfluss nach distal unterbunden. Ein dritter Faden wurde zwischen den beiden anderen platziert. Er diente zur Fixierung des Katheters in der Arterie. Die Arterie wurde mit einer feinen Gefäßschere vorsichtig oberhalb des distalen Knotens geöffnet, der Katheter in seiner Länge angepasst, in die Arterie eingeführt und mit dem mittleren Faden fixiert. Durch Lösen der proximalen Fixierung wurde die Blutzufuhr wieder ermöglicht. Die Dichtigkeit des Katheters und das Füllen des Katheters mit arteriellem Blut wurde überprüft. Ein Schema der postoperativen Situation zeigt Abbildung 5.

Die Spitze des Katheters darf weder den Abgang der A. femoralis profunda verstopfen noch weit von ihm entfernt sein, um den Blutfluss zu garantieren und die Bildung von Appositionsthromben zu vermeiden. Es ist auch wichtig, dass die Vena femoralis nicht durch einen zu starren Katheter zugedrückt wird und dadurch der venöse Rückfluss behindert wird. Während der Operation wurde ein Austrocknen des Gewebes durch regelmäßiges Betropfen des Operationsgebietes mit NaCl-Lösung verhindert.

Abschließend wurde noch einmal die Lage des Katheters in der Arterie und die Füllung der A. profunda femoris kontrolliert. Der Hautschnitt wurde vernäht und besonders auf die Beweglichkeit der Hinterläufe nach der Hautnaht geachtet. Am Ende der Operation wurden noch Xylocain-Spray (2-3 Hub) auf die Nähte appliziert und die Tiere bis zum Aufwachen beobachtet. Alle weiteren postoperativen Maßnahmen wurden wie bei den oben genannten Operationen durchgeführt (s. III.2.2.4). Je kürzer die Operation, desto schneller erholten sich die Mäuse von dem Eingriff und desto schneller benutzten sie wieder ihre Hinterläufe wie die ligierten Mäuse.



**Abbildung 5:** Implantation der osmotischen Mikropumpe ALZET® mit Katheter in die A. femoralis: (1) Aorta, (2) A. iliaca, (3) A. femoralis, (4) A. poplitea, (5) A. profunda femoris, (6) Kollateralgefäß, (7) A. circumflexa femoris medialis, (8) A. femoralis superficialis

#### III.2.2.4. Postoperative Maßnahmen

Nach der Operation wurde die Beweglichkeit der operierten Extremität überprüft und die Maus während der Aufwachphase vor dem Auskühlen geschützt.

Bei Mäusen mit Pumpenimplantation wurde direkt postoperativ und am 3. postoperativen Tag wurde zusätzlich eine Antibiotikaprophylaxe mit 0,125 mg Gentamycin<sup>39</sup> (cp-pharma, Deutschland) subkutan durchgeführt.

Die Mäuse wurden in Standardkäfigen (15 x 22 cm) und bei normaler Ernährung (Trockenfuttermittel und Wasser *ad libitum*) in Dreier-Gruppen gehalten. Regelmäßig wurden die operierten Extremitäten, der Allgemeinzustand und eventuelle Körpergewichtsveränderungen der Maus kontrolliert, um frühzeitig auf Erkrankungen reagieren zu können.

### III.3. Auswertungsmethoden

Die Versuchstiere wurden direkt vor der Operation, direkt im Anschluss, am 3., 7., 14. und 21. postoperativen Tag untersucht. Jedes Mal wurde die Bestimmung der Hämoglobin-Sauerstoff-

Sättigung und der Gewebsdurchblutung mit dem Laser-Doppler Imaging (LDI) durchgeführt. Beide Untersuchungen sind nicht invasiv und stellen für die Tiere, außer der nötigen Narkose, keine weitere Belastung dar. Tiere mit Nekrosen der Pfoten wurden ausgeschlossen. Untergruppen wurden am 28. Tag (sv129) und nach 6 Monaten untersucht.

Bei den terminalen Versuchen wurden zuerst die nicht invasiven Untersuchungen durchgeführt. Anschließend wurde bei den bereits narkotisierten Mäusen die kontralaterale A. femoralis okkludiert und die Tiere getötet, die Mikrosphären über die Aorta descendens gespritzt, mit Formaldehyd perfusionsfixiert und abschließend das Kontrastmittel infundiert.

Danach wurden die kontrastierten Gefäße fotografiert, Röntgenaufnahmen gemacht, die Präparate entnommen und später eingebettet, geschnitten, gefärbt, mikroskopisch analysiert und anschließend morphometrisch ausgewertet.

### **III.3.1. Hämoglobin-Sauerstoff-Sättigung**

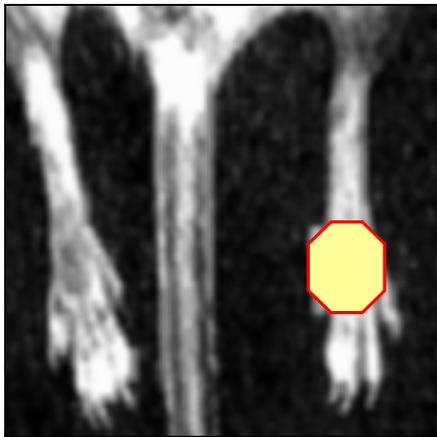
Die Hämoglobin-Sauerstoff-Sättigung wurde mit einem *AbTisSpec*® Spektrometer an den narkotisierten Mäusen unter standardisierten Bedingungen durchgeführt.

Die Sauerstoffspannung im Gewebe ist ein zuverlässiger Indikator der Gewebsdurchblutung<sup>40,41</sup>. Durch die Verbindung des Hämoglobins mit Sauerstoff ändert sich das Absorptionsspektrum im Vergleich zu ungesättigtem Hämoglobin. Diese unterschiedlichen Absorptionsspektren können zur nichtinvasiven transdermalen Bestimmung der Hämoglobin-Sauerstoffsättigung benutzt werden, um so Rückschlüsse auf die Durchblutung ziehen zu können. Die Sauerstoffkonzentration des Gewebes wurde durch Trennen der Lichtwellenspektren von gesättigtem und ungesättigtem Hämoglobin im Längenwellenbereich zwischen 500 und 620 nm festgestellt. Die Software errechnete Werte für die Gewebssauerstoffsättigung und relative Hämoglobinkonzentration, welche dann als zeitlichen Verlauf gespeichert wurden.

Zur Datenerfassung wurde von der Firma LES Medizintechnik GmbH ein speziell für Mäusepfoten geeigneter Sensor bzw. eine Lichtquelle entwickelt. Über ein Glasfaserkabel wird weißes Licht an die runde, ca. 4 Millimeter breite Sonde geleitet. Die Messfasern befinden sich im Umkreis von 1 Millimeter um die im Zentrum liegende Lichtquellen. Die Sonde wurde direkt auf die Pfote gehalten und das rückgestrahlte Licht durch die Messfaser erfasst. Dadurch ergab sich das Absorptionsspektrum des Hämoglobins (s. Abbildung 6 und Abbildung 7).

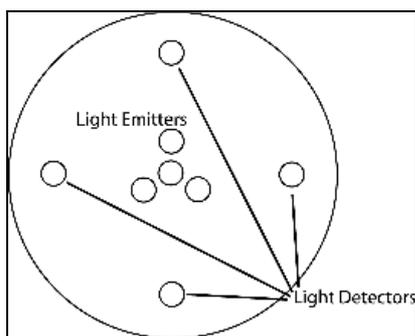
Zuerst wurden die Mäuse narkotisiert (s. III.2.1.) und zur Standardisierung der kutanen Durchblutung der Extremitäten in einer Wärmekammer (konstante Lufttemperatur 37°C) fünf Minuten aufgewärmt. Die Sonde wurde auf Höhe der fünften Zehe ohne Druck direkt auf die Pfote gehalten. Die Gewebssauerstoffsättigung und die relative Hämoglobinkonzentration der beiden Pfoten wurden nacheinander gemessen. Messzeitpunkte waren direkt vor und nach der

Okklusion der A. femoralis und 3, 7, 14 und 21 Tage nach der Operation. Kleinere Untergruppen wurden auch am 28. Tag untersucht (sv12-Mäuse). Zusätzlich wurden einige Balb/c-Mäuse nach 6 Monaten erneut untersucht.



Messbereich der Sonde zur Bestimmung der Hämoglobin-Sauerstoffsättigung

**Abbildung 6:** Messbereich der Hämoglobin-Sauerstoffsättigung



**Abbildung 7:** Aufbau des Sondenkopfes der Sauerstoffsättigungsmessung (LES Medizintechnik)

### III.3.2. Laser-Doppler-Imaging

Das Laser-Doppler-Imaging ist eine weitere nichtinvasive Methode, die schon bei anderen Gruppen zu Durchblutungsmessung benutzt wurde<sup>41</sup>. Die Gewebedurchblutung wird dabei anhand des Doppler-Effektes bestimmt. Im Gegensatz zu unbewegten Teilchen, ändert sich die Frequenz des reflektierten Lichts bei bewegten Teilchen wie z.B. Erythrozyten (Doppler-Effekt). Zur Bestimmung der Durchblutung nutzt man die Tatsache, dass die Frequenzänderung dabei auch von der Geschwindigkeit der Teilchen - sie verändert die Richtung und den Betrag der Reflexion - abhängt. Die Intensität des reflektierten Lichts entspricht der Anzahl bewegter Teilchen in einem definierten Bereich bei einem als konstant vorausgesetztem Hämatokrit. Die Software des LDI wandelte die gewonnenen Daten in ein farbkodiertes Bild der relativen Gewebedurchblutung um (s. IV.1.1.).

Aussagen in bezug auf den Absolutwert des Flusses in der Extremität sind nicht möglich. Hinzu kommen unterschiedliche Faktoren wie Behaarung, Pigmentierung und Dicke der Haut oder Hämoglobingehalt des Blutes, die die Messung beeinflussen. Um diese Störfaktoren zu minimieren, wurden auch tote Mäuse gemessen und dieser „background“ oder „Hintergrundrauschen“ von den in vivo gemessenen Werten abgezogen. Die Messwerte werden daher in nicht festgelegten Einheiten angegeben und die Durchblutung der Extremitäten des einzelnen Tieres im Verhältnis zueinander verrechnet. Wir benutzten einen Color-Laser-Doppler-Gerät MLDI 5115 (Moor Instruments Ltd. Devon, GB) mit einem Helium-Neon-Laser mit der Wellenlänge  $\lambda = 632,8$  nm und der entsprechenden Software (moorLDI V3.0). Der Laser wurde 20 cm von den Hinterläufen der betäubten Mäuse entfernt platziert und ein Bereich von circa 2 x 2 cm mit einer Geschwindigkeit von 4 Pixel/s abgetastet. Die Auflösung des Bildschirms betrug 256 x 256 Pixel. Der Computer errechnete für jeden Pixel einen Wert, der einer relativen Durchblutung entsprach.

Mit Hilfe der Software wurden die Pfoten umfahren und ein Mittelwert errechnet (s. Abbildung 8). Bei allen Versuchstieren wurde eine transdermale Messung des Blutflusses vor der Ligatur, direkt postoperativ, am 3., 7., 14. und 21. Tag, und teilweise auch am 28. Tag (sv129-Mäuse), durchgeführt. Zusätzlich wurden einige Balb/c-Mäuse nach 6 Monaten erneut untersucht. Hierzu wurden die Versuchstiere narkotisiert (s. III.2.1.), 2 Minuten in einer geschlossenen klimatisierten Kammer mit Doppelwänden und 37°C Lufttemperatur aufgewärmt und die Pfoten abgetastet.



**Abbildung 8:** Umfahrener Messbereich der Pfoten bei der LDI-Auswertung



**Abbildung 9:** LDI mit Messkammer

Bei der Untersuchung mit dem LDI nach Entfernen der Haut kann man semiquantitative Daten über den Blutfluss in ausreichend großen Gefäßen bekommen. Dazu wurde bei der narkotisierten Maus im Oberschenkelbereich die Haut entfernt und die Gefäße, ohne das Bindegewebe zu verletzen oder austrocknen zu lassen, dargestellt. Um die gewachsenen Kollateralgefäße mit den präexistierenden Kollateralen vergleichen zu können, wurde die kontralaterale A. femoralis okkludiert (s. III.2.2.1.). Anschließend wurde der freigelegte Bereich mit dem LDI abgetastet und der Blutfluss gemessen.

Da diese Untersuchung für das Tier einen größeren Eingriff bedeutet und nicht beliebig oft wiederholt werden konnte, wurde er nur vor der terminalen Versuchsreihe durchgeführt.

### III.3.3. Quantifizierung des Blutflusses mit fluoreszierenden Mikrosphären

Anhand der Verteilung der Mikrosphären im Gewebe lässt sich der Blutfluss nur semiquantitativ definieren<sup>42</sup>. Wir bestimmten durch Auszählung der Mikrosphären im Gewebe den relativen Flussunterschied zwischen den Pfoten. Die Mikrosphären wurden in die Aorta descendens injiziert und verteilten sich dann entsprechend der Durchblutung im Gewebe. Bedingt durch ihren Durchmesser (15 µm) bleiben die Mikrosphären in die Arteriolen stecken und lassen sich dank ihrer Fluoreszenz unter dem Mikroskop auszählen. Verglichen werden sollte die unterschiedliche Verteilung der Mikrosphären in den Mm. gastrocnemii der okkludierten und der nicht ligierten Seite. Als Kontrolle der seitengleichen Verteilung der Mikrosphären dienten die Nieren als paarige, proximal der Flussunterbrechung gelegene Organe mit hoher Durchblutung.

Die Versuchstiere wurden narkotisiert (s. III.2.1.) und eine Ligatur der linken, intakten A. femoralis (s. III.2.2.1.) durchgeführt. Damit konnte man den Blutfluss in den gewachsenen Kollateralen mit dem der präexistierenden vergleichen.

Dann wurde das Versuchstier mit einer Überdosis Narkosemittel getötet. Zusätzlich wurden 200-250 I.U. Heparin (100 I.E., Liquemin® N 25000, Roche, Deutschland) intraperitoneal injiziert, um ein Verstopfen der Kapillaren durch Thromben zu verhindern. Sofort nach der Überdosis bedingtem Atemstillstand der Maus wurde der Thorax geöffnet, die Aorta descendens mit einem Plastikschlauch (Portex Polythene Tubing; 0,58 mm ID; 0,96 mm OD; SIMS Portex Ltd., Großbritannien) bis proximal des Diaphragmas kanuliert und mit einem Faden fixiert. Um einen venösen Abfluss zu ermöglichen, wurde das rechte Herzohr angeschnitten.

Die Mikrosphären (FluoSpheres® polystyrene microspheres 15 µm red fluorescent, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) befanden sich in einer 0,02%igen Tween-Lösung, die zusätzlich in 5 ml PBS mit 0,2% Adenosin (Sigma Aldrich, Deutschland) verdünnt und während 30 Sekunden in einem Ultraschallbad in Suspension gebracht wurde.

Durch den Aortakatheter wurde dann entsprechend den Erfahrungen anderer Gruppen<sup>42</sup> 0,25 ml der Lösung (entspricht einer Anzahl von 50000 Mikrosphären) als Bolus bei 100 mmHg, gemessen proximal des Katheters mit einem Drucksensor (Dieffenbach U5, Deutschland), gegeben. Anschließend wurde das Gewebe perfusionsfixiert (s. III.3.4.).

Die Muskeln und Nieren wurden zum Wasserentzug und Vermeidung von Kristallbildung beim Einfrieren in 20% Saccharose-Lösung gegeben, in der Mitte zerschnitten und aufgeklappt mit Tissue-Tek® (O.C.T. Compound 4583, Miles, USA) auf die Schlitten aufgeblockt. Anschließend wurden die Präparate schrittweise eingefroren (zuerst in Methylbutan bei -130°C vorgekühlt und dann in flüssigen Stickstoff gegeben). Die Kryopräparate wurden dann mit einem Leica CM 3000 Kryomicrotom (Leica, Deutschland) bei -20°C 10 µm dick geschnitten. Die Schnitte wurden auf bei Zimmertemperatur gelagerten, gelatinebeschichteten Glasobjektträger gesetzt. Zur

Fixierung wurden 100%-Aceton (10 min bei 20°C) oder 4%-Formaldehyd (20 min bei 20°C) verwendet.

### **III.3.4. Perfusionsfixierung**

Gleich nach der Gabe der Mikrosphären wurde über die kanulierte Aorta mit körperwarmer PBS-Lösung das bereits heparinisierte Blut aus den Gefäßen gespült. Um eine maximale Dilatation der Gefäße zu erreichen, wurden im PBS zusätzlich 0,2% Adenosin (Sigma, St. Louis, USA) gelöst. Um das gesamte Blut auszuwaschen, wurden die Gefäße 3 Minuten lang bei einem konstanten Druck von 100 mmHg (kontrolliert mit Dieffenbach U5, Frankfurt/M., Deutschland) gespült.

Danach wurde die Maus mit 2%iger Formaldehyd-Lösung bei konstantem Druck (100 mmHg) 3 Minuten lang perfusionsfixiert. Zur Herstellung der Formaldehyd-Lösung wurde 40g des schwer löslichen Formaldehydpulvers (Merck, Deutschland) in einer stark alkalische NaOH-Lösung (pH 12-13) aufgelöst. Die sedimentierten Kristalle wurden verworfen und dann der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde bis zur weiteren Benutzung eingefroren.

Das Formaldehyd vernetzt die Proteine untereinander und führt zu einer anhaltenden Fixierung. Durch die Diffusion des Formaldehyds vom Lumen aus kommt es zur Fixierung der Gefäßwand und der zu untersuchenden Strukturen. Eine gute Kontrolle der Fixierung ist das Versteifen der hinteren Extremitäten.

Anschließend musste das verbleibende Formaldehyd durch erneutes Spülen mit PBS-Lösung (100 mmHg während 3 Minuten) aus den Gefäßen entfernt werden, da es zu einer Verklumpung der Gelatine des Kontrastmittels führen kann und die Kapillaren verstopfen würde.

Als letztes wurde über die kanulierte Aorta das körperwarme Kontrastmittel gegeben.

### **III.3.5. Angiografie**

Direkt nach der terminalen Versuchsreihe wurde eine Angiografie durchgeführt. Zur Herstellung des Kontrastmittels wurden 30 g Wismut(III)nitrat-pentahydrat (Sigma-Aldrich, Deutschland) in 100 ml 18%iger NaCl-Lösung unter ständigem Rühren aufgelöst. Durch Zugabe von konzentrierter Salzsäure wurden die restlichen Kristalle aufgelöst. Die Flüssigkeit wurde dann langsam in 5 Liter Wasser (aqua dest.) gegeben und verrührt. Dabei kristallisierte das Wismut-Chlorid aus. Anschließend ließ man die entstandenen Kristalle sedimentieren, um sie bei 6000 Umdrehungen pro Minute für zu 10 Minuten zentrifugieren. Der Überstand wurde verworfen und das gewonnene Sediment mit 10%-iger Gelatine im Verhältnis 1:1 bei 40°C gemixt. Das Gemisch wurde anschließend gefiltert, um Gelatineklumpen zu entfernen. Das Kontrastmittel kann längere Zeit bei 4°C aufbewahrt werden. Vor Gebrauch das Gemisch auf 37°C im Wasserbad

erhitzen. Wismut absorbiert wegen seiner hohen Ordnungszahl sehr gut die Röntgenstrahlen und liefert so einen guten Kontrast im Röntgenbild.

Das Wismut- Kontrastmittel wurde unter kontrolliertem Druck (100 mmHg, s.o.) über die kanulierte Aorta descendens zügig injiziert. Beendet wurde die Kontrastmittel-Injektion zu Beginn der Füllung des venösen Systems, da dies die Interpretation der Röntgenbilder erschweren würde. Dann wurden unter dem Mikroskop Haut und intraabdominelle Organe entfernt, um die Qualität der Bilder zu verbessern und ihre Interpretation zu erleichtern. Um das Erstarren der Gelatine zu erreichen, wurden die Mäuse sofort auf Eis gekühlt.

Die Angiografien wurden mit einem Röntgengerät (Balteau, Römatec, Deutschland) mit einer Spannung von 20 kV, einem Stromstärke von 8 mA und 40 s Belichtungsdauer auf AGFA STRUCTURIX ISO 9001- Filmen abgebildet. Zusätzlich wurden Aufnahmen gemacht, bei denen das gesamte Präparat mit Wasser bedeckt war und die Belichtungsdauer 2 Minuten betrug.

### **III.3.6. Fotografie und Probeentnahme**

Anschließend an die Röntgenaufnahmen wurden die oberflächlich sichtbaren Gefäße der Hinterläufe unter dem Stereoskop mit einer Spiegelreflex-Kamera (CONTAX 167 MT-Fotokamera) fotografiert. Auf diesen Bildern konnten die entstandenen Kollateralen von den präexistierenden Kollateralen der unbehandelten Seite unterschieden werden.

Zur Entnahme der entstandenen Kollateralgefäße wurden dann die oberflächlichen Muskeln (M. gracilis anticus und M. semitendinosus) freipräpariert und die Gefäße mit dem umgebenden Muskelgewebe herausgeschnitten. Die gewonnenen Proben wurden dann mit 3%igem Glutaraldehyd (Merck, Deutschland) fixiert und bei 4°C bis zur Einbettung aufbewahrt.

### **III.3.7. Einbettung**

Die entnommenen Präparate wurden mit Formaldehyd perfusionsfixiert und anschließend mit Glutaraldehyd immersionsfixiert. Daher mussten sie zuerst mehrmals mit PBS-Lösung gewaschen werden. Anschließend erfolgte ein mehrmaliges Spülen der Präparate während 24 Stunden mit Natrium-Cacodylat-Pufferlösung (0,1 M, pH 7,4, 400 mosmol).

Die gewaschenen Präparate wurden anschließend mit Osmiumtetroxid stabilisiert und in Epon, einem monomeren Epoxid-Kunstharzgemisch, eingebettet. Benutzt wurde dazu ein Einbettautomat (Lynx Microscopy Tissue Processor, Reichert-Jung, Deutschland), der zuerst die Proben mit Osmiumtetroxid stabilisierte, dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe das Wasser entzog und anschließend in Kunstharz einbettete:

1.)	Osmiumtetroxid in PBS (Verhältnis 2:3)	120 min bei 20°C
2.)	PBS	15 min bei 20°C
3.)	PBS	15 min bei 20°C
4.)	PBS	15 min bei 20°C
5.)	Alkohol 30%ig	15 min bei 20°C
6.)	Alkohol 50%ig	30 min bei 20°C
7.)	Alkohol 70%ig	30 min bei 20°C
8.)	Alkohol 90%ig	30 min bei 20°C
9.)	Alkohol 100%ig	30 min bei 20°C
10.)	Alkohol 100%ig	30 min bei 20°C
11.)	Propylenoxid	15 min bei 20°C
12.)	Propylenoxid	15 min bei 20°C
13.)	Propylenoxid/Epon (Verhältnis 1:1)	60 min bei 20°C
14.)	Epon	60 min bei 37°C
15.)	Epon	60 min bei 37°C
16.)	Epon	15 min bei 37°C

Anschließend wurden die Präparate zur Polymerisation des Epon 3 Tage bei 56°C aufbewahrt. Nach dem Aushärten des Epons konnten die Proben geschnitten werden. Das Epoxidharz wurde aus folgenden Substanzen der Firma LADD Research Industries, USA in den entsprechenden Mengen zusammengesetzt:

22,0 ml LX-120 (Harz)  
 17,3 ml DDSA (Dodecylbernsteinsäureanhydrid, Härter)  
 8,1 ml NMA (Methylnorbornen-dicarbonensäureanhydrid, Härter)  
 0,7 ml DMP-30 (Tris-(dimethylaminomethyl)-phenol, Katalysator)

Die einzelnen Komponenten wurden zusammengegeben, verrührt und in die entsprechenden Behälter des Einbettautomates Lynx Microscopy Tissue Processor (Reichert-Jung, Deutschland) gegeben.

### III.3.8. Lichtmikroskopie

Für die Gewebsanalyse im Bereich der Lichtmikroskopie genügten 0,5 - 1,0 µm dicke Semidünnschnitte, die mit einem Mikrotom ULTRACUT-E (Reichert-Jung, Deutschland) mit Glasmessern angefertigt wurden.

Es wurde besonders darauf geachtet, dass die Präparate quer zum Verlauf der Muskelfasern und der Kollateralgefäße geschnitten wurden, um die morphometrische Auswertung möglichst zu standardisieren. Die Schnitte wurden mit Toluidinblau gefärbt. Dadurch wurden alle basophilen und zusätzlich alle osmiophilen Strukturen angefärbt.

Zur Herstellung der Toluidinblau-Lösung wurden 6,5 g Toluidinblau (Merck, Deutschland) in 650 ml Wasser (aqua dest.) gelöst (1%ige gesättigte Stammlösung) und anschließend filtriert. Durch Verdünnen mit aqua dest. erhält man eine 0,5 %ige Gebrauchslösung, deren pH-Wert mit NaOH auf 11,4 eingestellt wurde.

Die 0,5%ige Färbelösung (pH 11,4) wurde auf die Schnitte gegeben, 2-3 Minuten auf einer Wärmeplatte getrocknet, die restliche Toluidinlösung abgewaschen und die Schnitte anschließend mit Entellan<sup>®</sup> (Merck, Deutschland) eingedeckelt<sup>43</sup>.

Mikroskopiert wurde mit einem Leica DM-RB Mikroskop (Leica, Deutschland) und Bilder zur späteren Morphometrie mit einer Digitalkamera Leica DC 2000 (Leica, Deutschland) aufgenommen.

### **III.3.9. Transmissionselektronenmikroskopie**

Für die elektronenmikroskopische Analyse der in Epon eingebetteten Kollateralgefäße wurden mit einem Mikrotom (ULTRACUT-E, Reichert-Jung, Deutschland) 50 nm dünne Schnitte angefertigt und auf einem Kupfergrid aufgefangen. Nach dem Trocknen erfolgte die Kontrastierung durch zweiminütiges Eintauchen in 3%ige Uranylacetatlösung und anschließendes Waschen mit aqua dest. Weiter wurde mit Bleicitrat über zwei Minuten kontrastiert, erneut gewaschen und abschließend getrocknet. Die Blei-Zitrat-Lösung (nach Reynolds) wurde durch Auflösen von 1,33 g Blei-II-Nitrat ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ) und 1,76 g Natrium-Citrat in 30 ml aqua dest. hergestellt. Die Flüssigkeit wurde ca. 1 Stunde geschüttelt, um eine Suspension zu ergeben. Anschließend wurden 8,0 ml NaOH (1N) zugegeben und mit aqua dest. auf 50 ml aufgefüllt. Ein pH-Wert von 12 wurde eingestellt. Die Gebrauchslösung stellte man aus 10 ml Stammlösung, 10 ml aqua dest. und 14 Tropfen NaOH zusammen. Der pH Wert sollte größer als 11 sein. Anschließend wurde mit Millipore-Filter (0,2 $\mu$ ) filtriert. Da die Lösung lichtempfindlich ist und mit  $\text{CO}_2$  der Luft reagiert (Trübung), musste sie in luftdichten braunen Behältern aufbewahrt werden.

Durch das Binden des Osmiumtetroxids an die Lipide und Proteine der Zellen wurden diese bereits bei der Einbettung stabilisiert. Die Schwermetalle der Kontrastierung ermöglichen nun die Bildgebung im Elektronenmikroskop, da sie die Elektronen absorbieren.

Mit einem Philips CM 10 Transmissionselektronenmikroskop wurden anschließend die Ultrastrukturen in den Zellen untersucht. Mit einer integrierten Kamera (Kodak 35mm 5302 Rollfilme) wurden die Befunde dokumentiert. Wichtig für die Beurteilung der Zellveränderungen waren hier die ultrastrukturellen Veränderungen wie das raue endoplasmatische Retikulum in den Endothelzellen, die Lamina elastica interna, die glatten Muskelzellen und Fibroblasten der Media sowie die Zellen im paravaskulären Gewebe.

### **III.3.10. Morphometrie**

Zur morphometrischen Analyse der Kollateralgefäße wurden 1  $\mu\text{m}$  dicke Semidünnschnitte benutzt. Es wurde darauf geachtet, dass die Schnitte quer zum Verlauf der Gefäße und Muskelfasern verliefen. Die Schnitte wurden unter dem Leica DM-RB Mikroskop (Leica, Deutschland)

betrachtet und die im Muskel verlaufenden Kollateralgefäße mit einer Digitalkamera Leica DC 200 (Leica, Deutschland) zur weiteren Untersuchung aufgenommen.

Wegen der Korkenzieherform der Kollateralgefäße wurden die Gefäße in den Schnitten selten senkrecht zu ihrem Verlauf geschnitten, sondern eher in eine elliptische Schnittfläche. Dadurch war es nötig, den Umfang der Ellipse und dessen kleinsten Radius zu errechnen. Diese kürzeste Achse wurde dann als eigentlicher Gefäßradius bzw. -durchmesser genommen. Die Auswertung der so gewonnenen Bilder wurde mit dem Softwareprogramm NIH Image 1.62 (für Apple Macintosh) durchgeführt. Hierzu wurde die Endothelgrenze zum Gefäßlumen umfahren. Die Software errechnete aus dieser markierten Linie den Umfang einer idealen Ellipse. Die Mittelwerte der Kollateraldurchmesser wurde zu verschiedenen Zeitpunkten erfasst und die Ergebnisse der einzelnen Gruppen untereinander verglichen.

### **III.3.11. Kapillarendichtebestimmung**

Gemessen wurde die Gefäßdichte in verschiedenen Muskelgruppen nach Verschluss der A. femoralis. Ziel war es, festzustellen, ob distal der Okklusion Angiogenese stattfindet. Dazu wurde die A. femoralis okkludiert (s. III.2.2.1.) und das Versuchstier nach sieben Tagen getötet. Entnommen wurden die Mm. gastrocnemii und die Mm. graciles anticus bzw. semitendinosus der okkludierten und der nicht okkludierten Seiten. Es wurden 5 µm dicke Kryoschnitte quer zum Muskelverlauf mit einem Leica CM 3000 Kryomicrotom (Leica, Deutschland) angefertigt, auf beschichtete Objektträger gegeben und mit TRICT-labeled Lektin (BS-1 Lectin, Sigma, USA) die Endothelzellen gefärbt. Lektine binden an Polysaccharide<sup>44</sup>. Diese Eigenschaft ermöglicht, ohne Immunreaktion die Mukopolysaccharidreiche Oberflächen von Endothelzellen darzustellen. Für jede Tierart gibt es ein oder mehrere spezifische Lektine, z.B. für die Maus das Lektin aus *Bandeiraea simplicifolia* (BS-I, Sigma, USA). Mit einer Digital-Kamera (Leica CM200) wurden Bilder der Schnitte aufgenommen und anschließend die Menge der Gefäße mit Hilfe der Software NIH Image 1.62 erfasst. Die Ergebnisse wurden in Gefäße pro Quadratmillimeter ausgedrückt.

### **III.3.12. Statistische Auswertung**

Die gewonnenen Daten wurden mit dem Student t-Test statistisch ausgewertet. Unterschiede wurden ab einer Signifikanz  $p < 0,05$  als statistisch relevant angesehen.



## IV. Ergebnisse

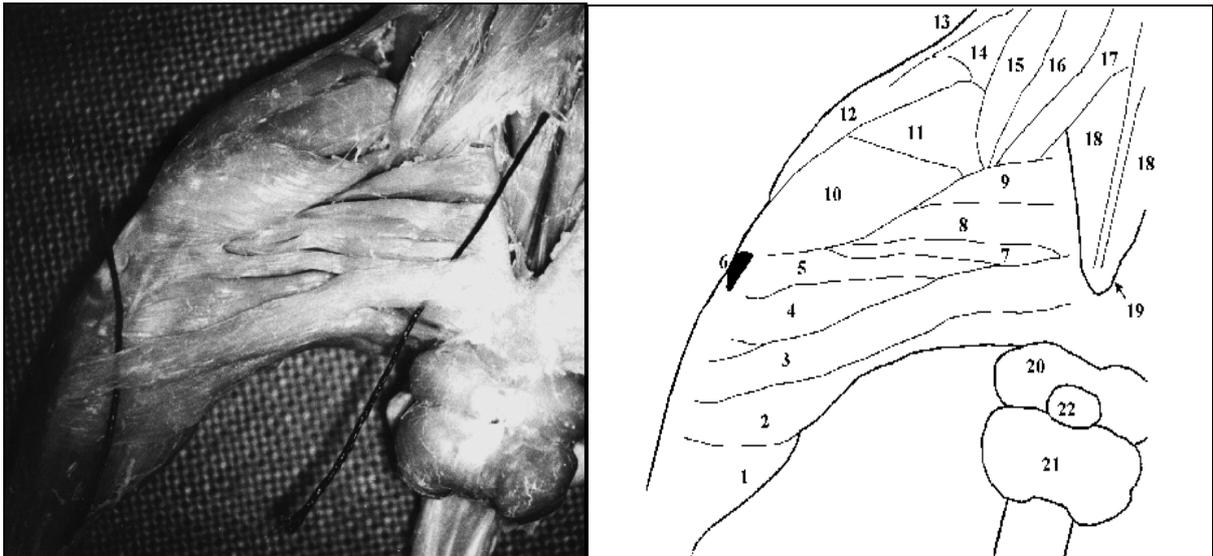
### IV.1. Anatomische Definitionen

#### IV.1.1. Regelmäßiges Auftreten der Kollateralen in definierten Muskelsträngen

Da das Kollateralwachstum im Oberschenkel untersucht werden sollte, wollen wir hier die Anatomie des Mausoberschenkels genauer definieren, zumal die Ergebnisse sehr von der Okklusionsstelle abhängen. In der Literatur<sup>45,38</sup> und den Anatomieatlanten<sup>34,35,36</sup> fanden wir keine exakte Beschreibung bzw. widersprüchliche Angaben zur Strukturen im Oberschenkelbereich der Maus. Zum Teil wurden nur die größeren Strukturen beschrieben und die kleineren Gefäße und Muskel nicht bezeichnet. Wir bezeichneten die einzelnen Muskeln und Gefäße anhand der Anatomie des Menschen<sup>46</sup> und der Nomina Anatomica Veterinaria. Die Bezeichnungen der Strukturen, die im Rahmen dieser Arbeit benutzt wurden, sollen anhand der folgenden Abbildungen definiert werden. Abbildung 10 zeigt die Muskeln im Operationsgebiet; in Klammern stehen die von anderen Autoren benutzten Bezeichnungen.

Abbildung 11 und Abbildung 12 beschreiben die Gefäßanatomie dieses Bereiches.

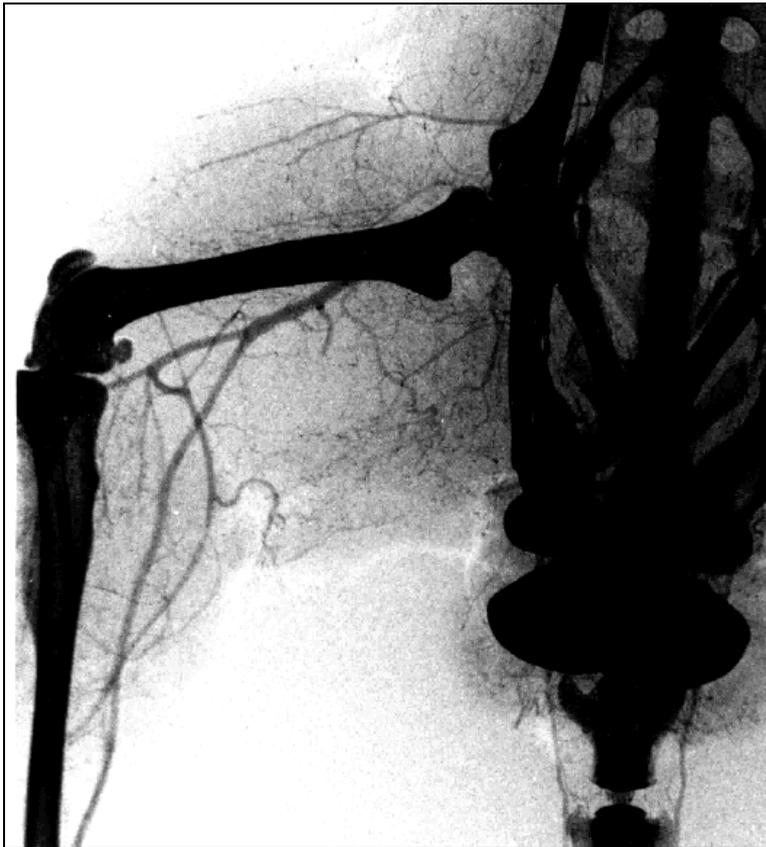
Die aus der Aorta (**1**; die Zahlen in Klammern beziehen sich auf Abbildung 12) entspringende A. iliaca communis teilt sich in die A. iliaca interna (**2**), die wiederum die A. pudenda externa (**4**) abgibt, und in die A. iliaca externa (**3**). Diese bildet außerhalb des Abdomens die A. femoralis (**6**), die A. circumflexa femoris lateralis (**14**) und weiter distal die A. circumflexa femoris medialis (**15**) abgibt, welche hauptsächlich den M. quadriceps (**10-12** in Abbildung 10) versorgen. Dann entspringen weiter distal, meistens mit einem gemeinsamen Stamm, die A. profunda femoris (**5**), aus der die Kollateralgefäße der Mm. semitendinosus (**4** in Abbildung 10) und gracilis anticus (**3** in Abbildung 10) -in älteren Atlanten als M. abductor cruris caudalis bezeichnet- abgehen, und die die Bauchdecke und Corpora mammaria versorgende A. epigastrica superficialis (**16**). Im Bereich des Kniegelenkes entspringt die A. poplitea (**10**) aus der A. femoralis, die als A. femoralis superficialis (**11**) –auch als A. saphena bezeichnet- medial der Tibia weiter verläuft. Die den M. gastrocnemius (**1** in Abbildung 10) versorgende A. tibialis posterior (**9**) entspringt aus der A. poplitea.



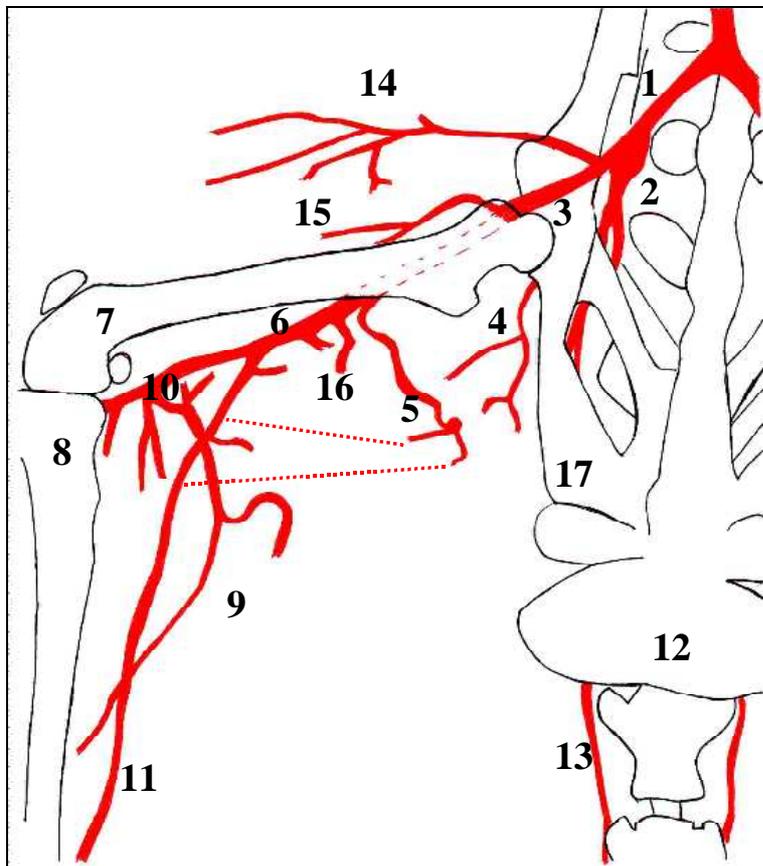
**Abbildung 10:** Muskeln der rechten Hinterläufe, mit Skizze (Namen in Klammern entsprechen Bezeichnungen anderer Autoren<sup>34,35</sup>): 1. *M. gastrocnemius*, 2. *M. semitendinosus*, 3. *M. gracilis anticus* (*abductor cruris caudalis*), 4. *M. semimembranosus*, 5. *M. semimembranosus* (*M. caudo femoralis*), 6. Patella, 7.+8. *M. adductor magnus*, 9. *M. adductor brevis*, 10. *M. vastus medialis*, 11. *m rectus femoris*, 12. *M. vastus lateralis*, 13. *M. tensor fasciae latae*, 14. *Fascia lata*, 15.-17. *M. adductor longus*, 18. Beckenmuskulatur, 19. *linea terminalis* des Beckens, 20.-22. *M. bulbospongiosus* und *Peniswurzel*

In unserem Mausmodell wurde der Blutfluss der A. femoralis distal des Abgangs der A. profunda femoris durch eine Ligatur unterbunden (siehe auch Abbildung 2). Dadurch sinkt der Druck distal der Einmündung der Umgehungsgefäße in die A. femoralis superficialis, was zu einem erhöhten Blutfluss entlang der präexistierenden Kollateralen führt. Die A. femoralis besitzt mehrere präexistierende Umgehungs-kreisläufe, die bei Verschluss des Gefäßlumens die Blutversorgung der distalen Gewebe bis zu einem gewissen Grad übernehmen können.

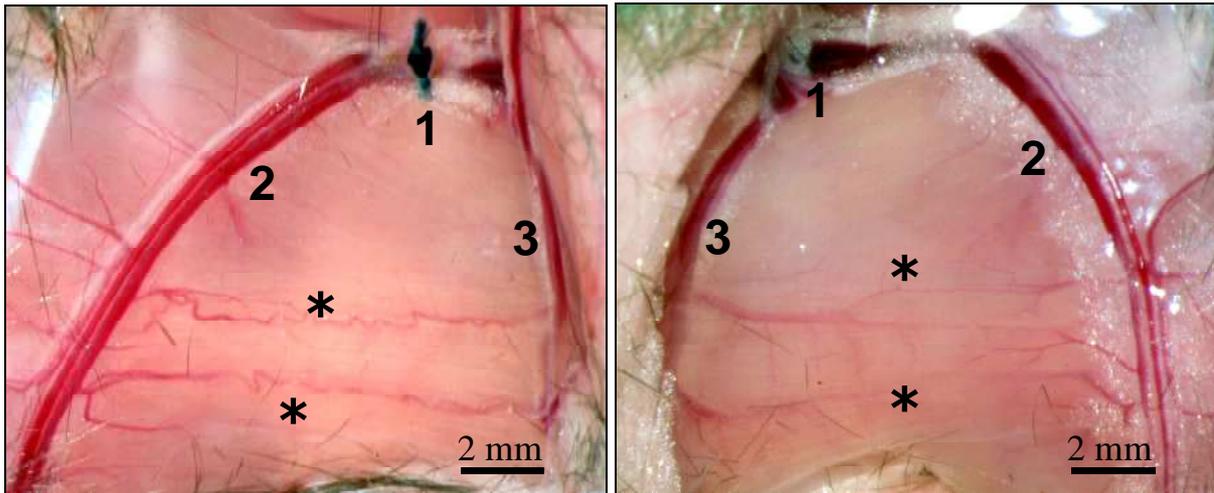
Nach dem Entfernen der Haut fanden wir regelmäßig zwei deutlich sichtbar gewachsene Kollateralgefäße in den Mm. graciles anticus und semitendinosus, wie in der linken Aufsichtfotografie der Abbildung 13 (mit Sternen markiert; das obere Gefäß verläuft im M. semitendinosus, das untere im M. gracilis anticus) oder in der Nahaufnahme dieser Muskeln in Abbildung 14 zu sehen ist. Sie verlaufen mittig in den entsprechenden Muskeln und verbinden die A. profunda femoris mit dem mittleren Abschnitt der A. femoralis superficialis.



**Abbildung 11:** Röntgenbild der normalen Anatomie der rechten Hinterläufe.



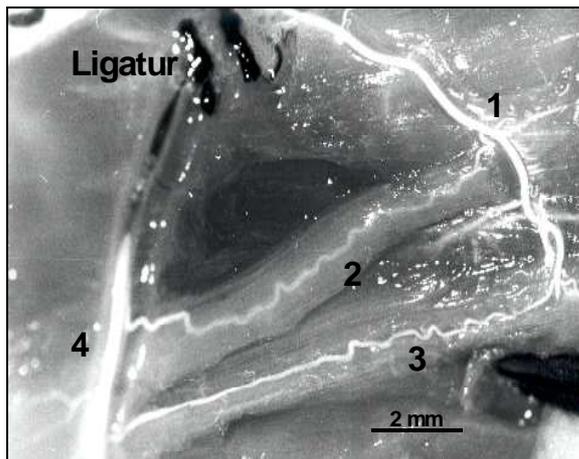
**Abbildung 12:** Skizze zu Abb. 10.1. 1. Aorta, 2. A. iliaca interna, 3. A. iliaca externa, 4. A. pudenda externa, 5. A. profunda femoris, 6. A. femoralis 7. Femur mit Patella, 8. Tibia, 9. A. tibialis posterior, 10. A. poplitea mit Abgängen, 11. A. femoralis superficialis (saphena), 12. Corpus cavernosus, 13. A. caudalis, 14. A. circumflexa femoris lateralis, 15. A. circumflexa femoris medialis, 16. A. epigastrica superficialis, die gestrichelten Linien stellen den Verlauf der nicht sichtbaren Kollateralgefäße dar.



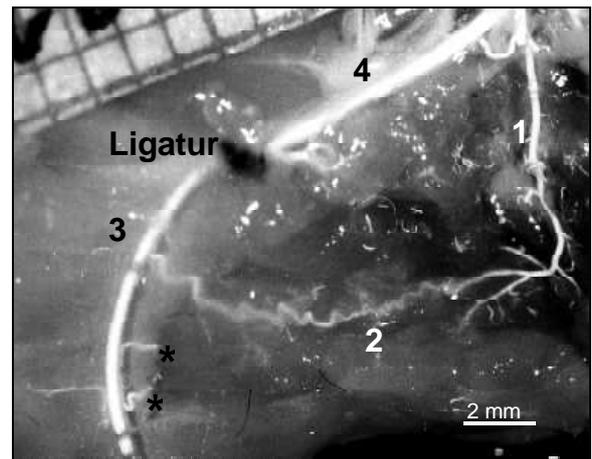
**Abbildung 13:** Die Fotografien der nach 7 Tagen entstandenen Kollateralen (linkes Bild) im Vergleich zur kurz vor der Aufnahme okkludierten Seite (rechtes Bild) zeigen die Steigerung der Kollateralendurchblutung nach der Ligatur. Man kann deutlich die Korkenzieherform und das größere Kaliber der gewachsenen Kollateralgefäße(\*) im linken Bild erkennen. Beschriftung: 1. Ligatur, 2. A. femoralis superficialis, 3. A. profunda femoris, Kollateralgefäße mit Sternen markiert.

Auf der okkludierten Seite (Abbildung 13, linkes Bild) ist die typische Korkenzieherform der Kollateralen zu erkennen. In Abbildung 14 heben sich die entsprechenden Muskeln nach der Perfusionsfixierung und der Kontrastmittelinjektion besser vom Hintergrund ab. An diesem Bild kann man auch gut erkennen, dass das Kontrastmittel aus der A. profunda femoris über die beiden Kollateralen im M. gracilis anticus bzw. semitendinosus die distale A. femoralis superficialis gefüllt hat. Eine Füllung von proximal fand nicht statt, da die Ligatur die A. femoralis komplett verschlossen hat. Auf der anderen Seite ist die distale Füllung schwach, weil sich die präexistierende Kollaterale noch nicht entwickelt hat.

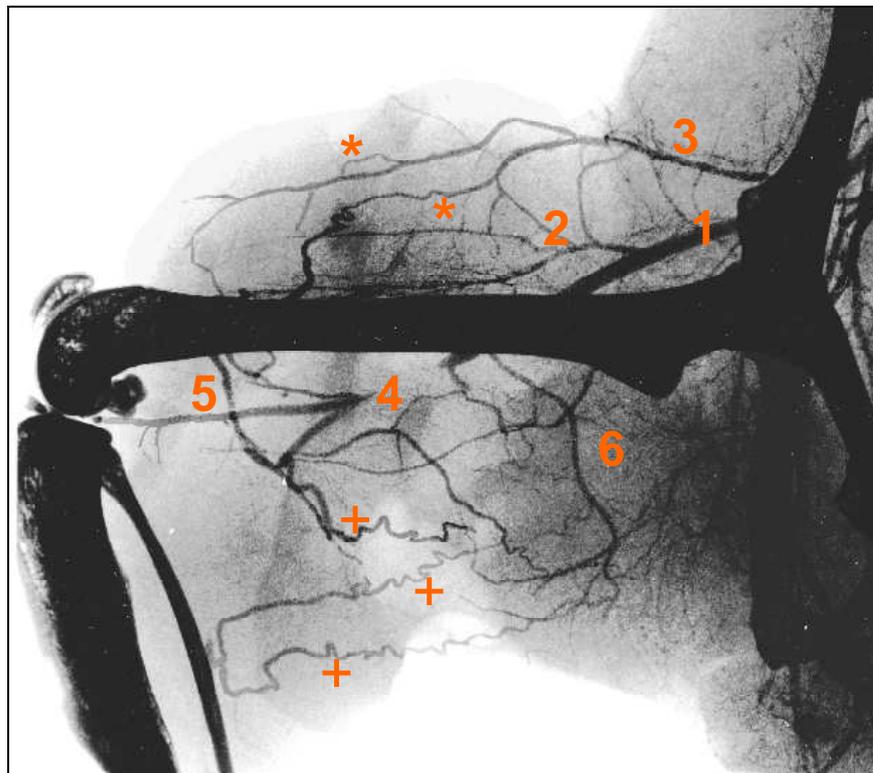
Eine weitere Kollaterale verläuft durch den tieferliegenden Musculus semimembranosus (4 in Abbildung 10). Sie entspringen der A. profunda femoris und mündet in der A. femoralis superficialis etwas distal des Abgangs der A. poplitea. In Abbildung 15 kommt diese Kollaterale und der entsprechende Muskel nach Entfernung des darüber liegenden M. gracilis anticus zur Darstellung. Ihre Größe kann variieren, sodass sie nicht in allen Fällen darstellbar ist.



**Abbildung 14:** Verlauf der Kollateralen in den Mm. semitendinosus (2) und gracilis anticus (3); (1) A. femoralis profunda und (4) A. femoralis superficialis (saphena); zu beobachten ist die Füllung der A. femoralis superficialis nur über die Kollateralgefäße.



**Abbildung 15:** Kollateralgefäß des M. semimembranosus nach Entfernung der darrüberliegenden Muskeln (s. Abbildung 14); 1. A. profunda femoris, 2. Kollateralgefäß, 3. A. femoralis superficialis, (\*) Schnitte der entfernten Mm. semitendinosus und gracilis anticus.

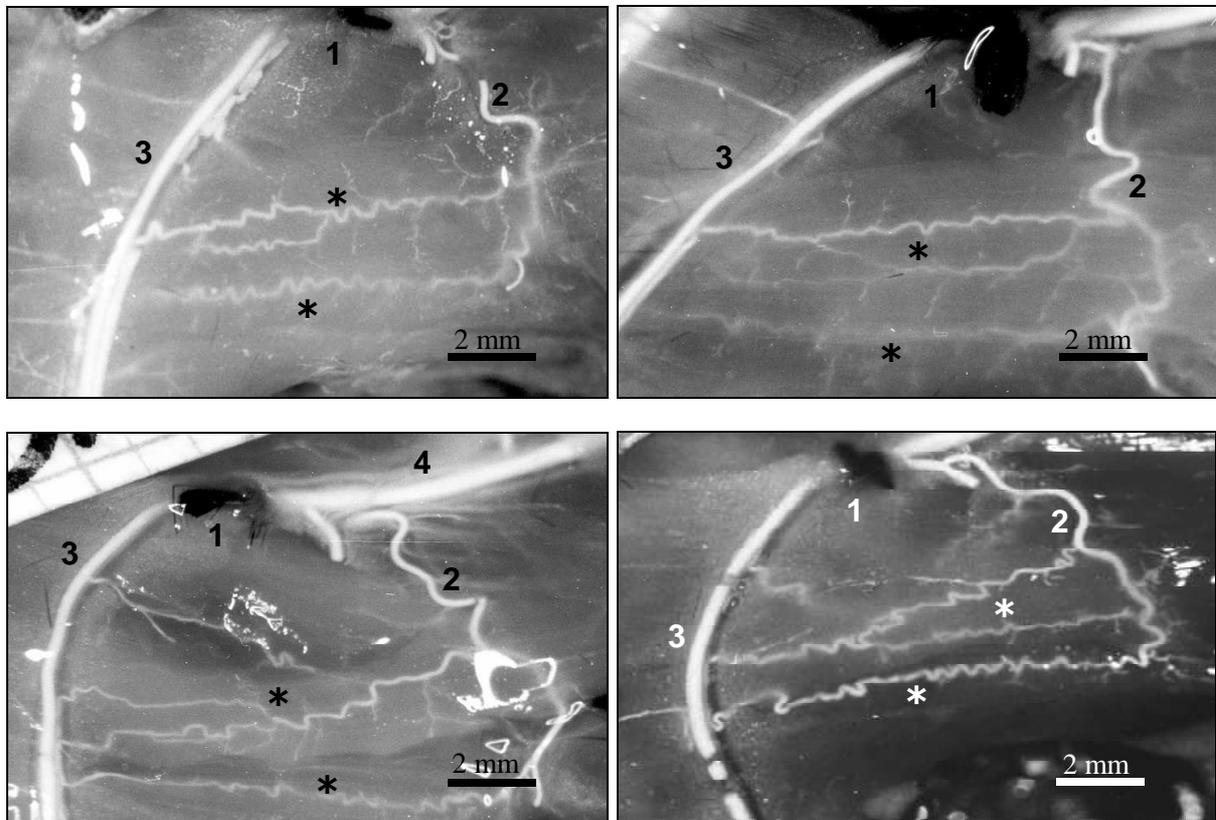


**Abbildung 16:** Röntgenbild des linken Oberschenkels 7 Tage nach Ligatur; 1. A. femoralis, 2. A. circumflexa femoris medialis, 3. A. circumflexa femoris lateralis, 4. Aussparung des Kontrastmittels durch die Ligatur, 5. A. poplitea, 6. A. profunda femoris, (\*) Kollateralen im M. quadriceps, (+) Kollateralen der Adduktorengruppe (oben beschrieben)

Andere Kollateralgefäße entspringen der A. circumflexa femoralis medialis und verlaufen in den einzelnen Teilen des Musculus quadriceps, um dann über die A. descendens genicularis in die A. poplitea zu münden. Da sie in den Muskeln verlaufen, sind sie nur im Röntgenbild zu erkennen. In Abbildung 16 sind die Kollateralen im Bereich des M. quadriceps mit einem Stern

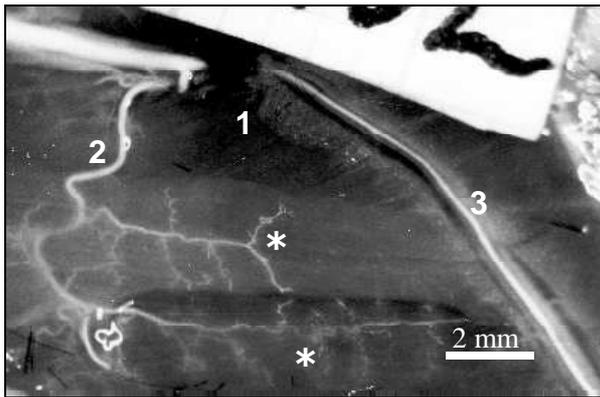
markiert. Sie sind nur im Röntgen zu beobachten, während die mit einem Kreuz markierten Kollateralen der Adduktorenmuskulatur bereits in der Aufsicht zu erkennen sind.

Häufig verliefen die Kollateralgefäße als einzelne Arteriolen mittig entlang des gesamten Muskels (s. Abbildung 14 und Abbildung 15). Wir fanden aber auch andere Varianten, in denen sich die Gefäße in einem Muskel teilten und dann wieder zusammenführten (s. Abbildung 17). Die geteilten Arteriolen traten sowohl im *M. semitendinosus* sowie im *M. gracilis anticus* auf. Sie teilten sich im Muskelgewebe und trafen teils im gleichen Muskel wieder aufeinander (Beispiele bieten die oberen Bilder in Abbildung 17) oder entsprangen bzw. mündeten getrennt, wie in den unteren Bildern in Abbildung 17 sichtbar. Wir beobachteten aber nie ein verzweigtes Kapillarnetz, das sich im mittleren Muskelbereich ausbildete.



**Abbildung 17:** Beispiel geteilter Kollateralen im *M. semitendinosus* bzw. *gracilis anticus*. Beschriftung: 1. Ligatur; 2. A. profunda femoris; 3. A. femoralis superficialis; mit Stern markierte Kollateralen.

Genauso fanden sich Aufteilungen der präexistierenden Arteriolen auf der linken, nicht okkludierten Seite (s. Abbildung 18). Eine Arteriole entspringt der A. profunda femoris, verläuft zuerst mittig im *M. semitendinosus* und teilt sich im mittleren Bereich des Muskels auf. Darunter ist das durchgängige Kollateralgefäß im *M. gracilis anticus* zu beobachten.



**Abbildung 18:** Beispiel für präexistierende geteilte (oben) und ungeteilte (unten) Kollateralen.

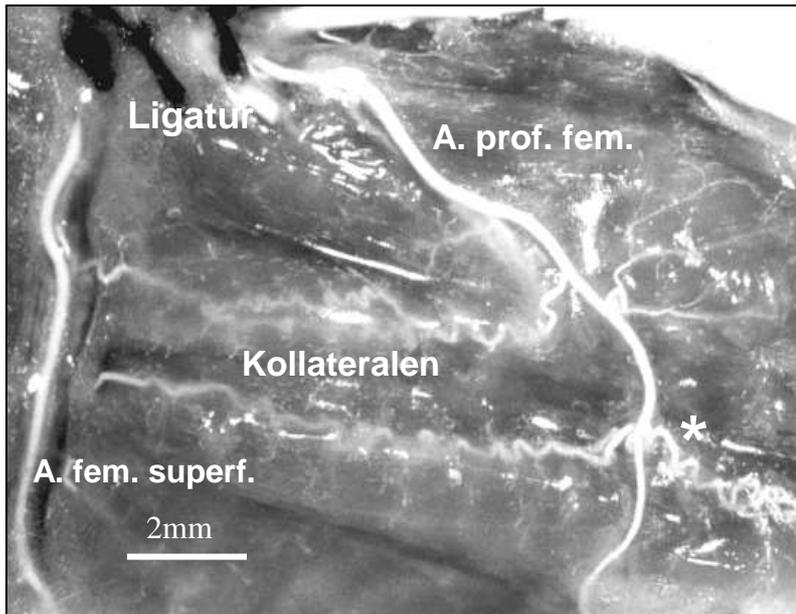
### IV.1.2. Kollateralgefäße proximal des Abgangs der Arteria femoralis

Durch die Okklusion der Art. femoralis proximal des Abgangs der A. profunda femoris erhöht sich der Fluss in anderen präexistierenden Kollateralgefäßen. Zum einen entwickelten sich wie bei der Ligatur distal des Abgangs der A. profunda femoris (s. o.) Kollateralkreisläufe im Musculus quadriceps.

Es bildeten sich aber auch Kollateralen zwischen der A. obturatoria externa und dem distalen Anteil der A. profunda femoris aus. Hier fließt das Blut aus der A. iliaca interna über die A. obturatoria zur A. profunda femoris. Dort gelangt es dann direkt in die Kollateralgefäße des M. gracilis anticus und des M. semitendinosus. Gleichzeitig konnten wir auch eine retrograde Füllung der gesamten A. profunda femoris beobachten, sodass die Blutversorgung nach der Okklusion über beide Gefäße, retrograd über die A. profunda femoris in die A. femoralis superficialis und anterograd über die Kollateralen in die A. saphena, in der Pfote erhalten blieb.

Abbildung 19 und die Detailvergrößerung zeigen die oben beschriebenen Kollateralgefäße mit der typischen Korkenzieherform. Wir fanden keine weiteren Kollateralen. Diese einzelne Kollaterale scheint die Blutversorgung des gesamten Unterschenkels übernommen zu haben, denn das Tier wies keine Nekrosen auf.

Dieser Versorgungstyp aus der A. pudenda externa konnte auch beim Menschen, wenn auch selten, nach Stenose der A. iliaca beobachtet<sup>47</sup> werden.



**Abbildung 19:** Aufsichtsfotografie 7 Tage nach proximaler Ligatur: Die mit Stern markierte korkenzieherförmige Kollaterale entspringt aus der A. obturatoria externa (nicht sichtbar) und füllt retrograd die A. profunda femoris. Genauso wird die distale A. femoralis superficialis über die Kollateralen der Mm. semitendinosus und gracilis anticus anterograd gefüllt.

Trotz der Nähe der Versorgungsgebiete konnten wir während keiner Untersuchung einen Kollateralkreislauf bzw. eine Verbindung zwischen dem Versorgungsbereich der A. glutealis und dem der A. profunda femoris feststellen.

Abschließend kann man sagen, dass präexistierende Kollateralen regelmäßig in bestimmten Muskeln wachsen, wenn die Veränderung der Flussverhältnisse in einem großen Gefäß die Strömung in diesen Kollateralarteriolen erhöhen. Da die Durchblutung der Unterschenkel nur durch die Kollateralen erfolgte, kommt zu einem Gefäßwachstum und Ausbildung der typischen Korkenzieherform. Diese können auch geteilt auftreten.

## **IV.2. Arteriogenese der untersuchten Kontrollgruppen**

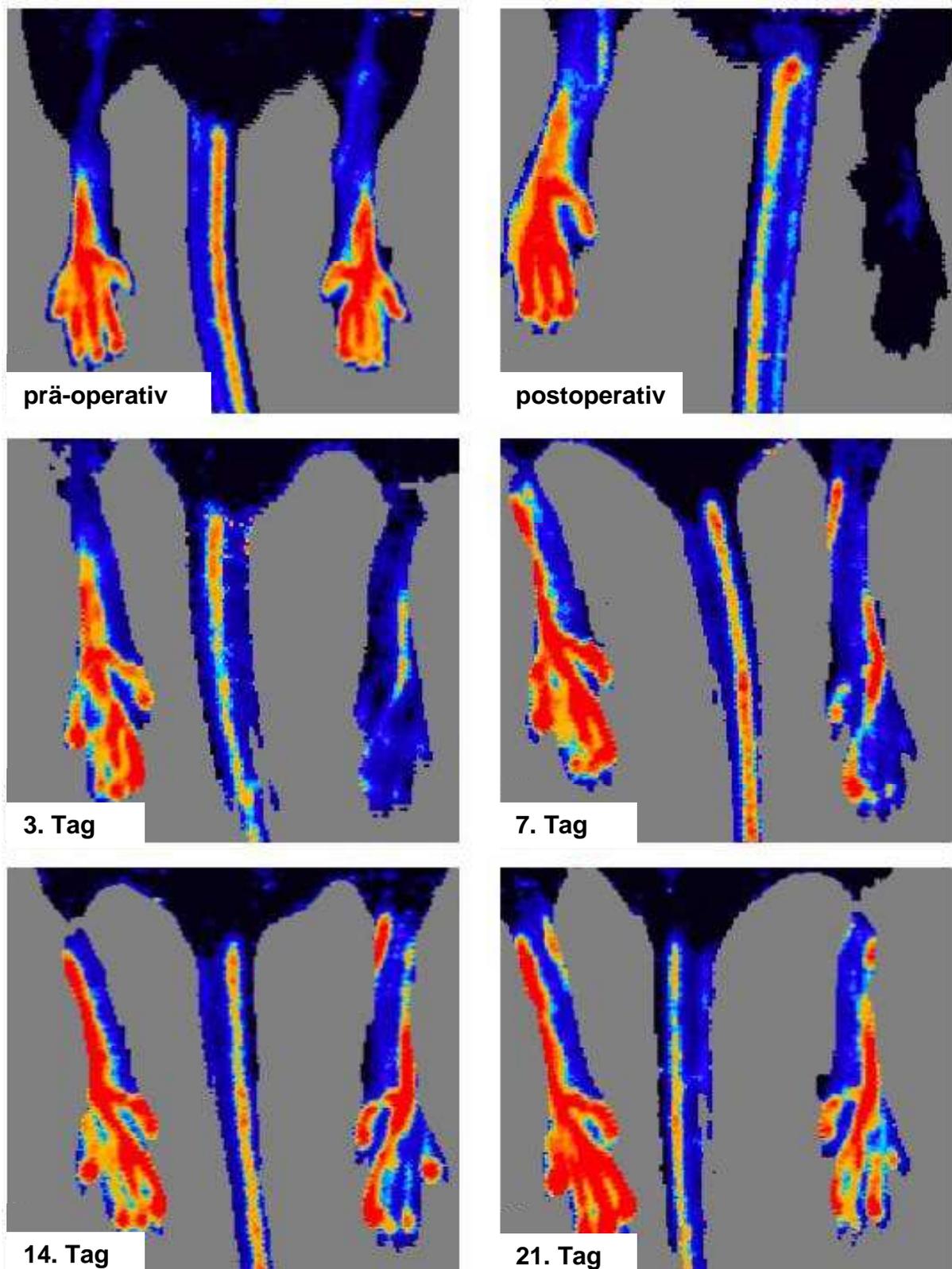
Um das Wachstum der Kollateralgefäße unter Einwirkung verschiedener Wachstumsfaktoren bzw. -hemmer in dieser Arbeit untersuchen zu können, wurde zuerst die Arteriogenese bei „unbehandelten“ Kontrollgruppen untersucht. Uns standen dazu Balb/c- und sv129-Mäuse zur Verfügung.

### **IV.2.1. Balb/c - Mäuse**

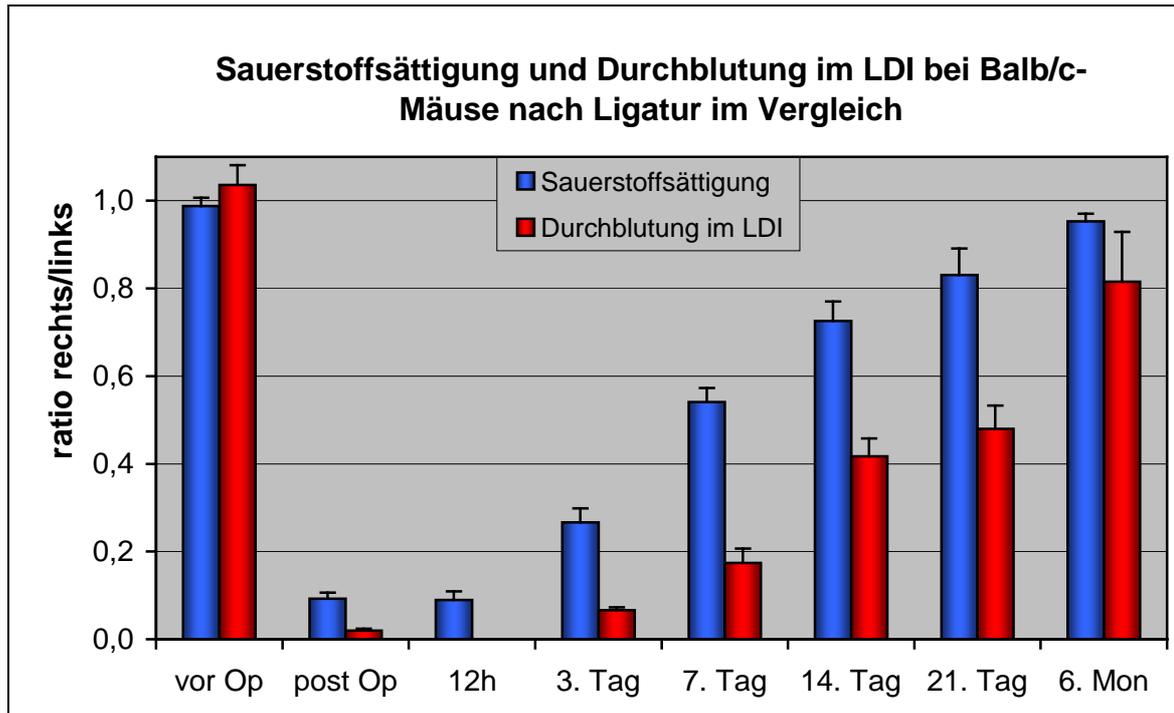
In der **Laser-Doppler-Imaging-Auswertung** des Blutflusses in der Mauspfote zeigte sich nach einem direkt postoperativ aufgetretenen Abfall eine kontinuierliche Verbesserung der relativen Durchblutung.

Abbildung 20 zeigt den repräsentativen Verlauf der Durchblutung der Mauspfote für alle Mausgruppen zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten. Rote Farbmarkierungen stellen hohe Durchblutungsraten dar und je dunkler die Farbe, desto geringer die Durchblutung. Bild A zeigt die seitengleiche Durchblutung vor der Ligatur der A. femoralis, man kann deutlich den Verlauf der subkutan verlaufenden Arterien in den Pfoten und dem Schwanz sehen. In Bild B sieht man in der rechten Pfote den geringen, fast sistierten Blutfluss direkt nach der Ligatur. In Bild C, D und E sieht man die langsame Zunahme der Durchblutung am 3., 7. und 14. postoperativen Tag. In Bild F zeigt sich die Durchblutung der Pfoten am Ende der Messungen nach 21 Tagen, die seitengleiche Durchblutung wird in diesem Zeitraum nicht erreicht.

Entsprechend zu diesen Bildern kann man anhand der aus dem Laser Doppler Imaging (LDI) gewonnenen Daten eine Relation zwischen der Durchblutung der ligierte Seite zur nicht operierten Kontrollseite errechnen. Abbildung 21 verdeutlicht den unterschiedlichen Verlauf der Durchblutung und der Hämoglobin-Sättigung. Die LDI-Auswertung zeigt eine kontinuierliche Zunahme der im LDI gemessenen Durchblutung der Pfoten. Anfangs war die Durchblutung seitengleich ( $1,036 \pm 0,045$ ). Postoperativ verschlechterte sich die Durchblutung der operierten Pfote, der Quotient rechts zu links sank auf  $0,02 \pm 0,004$ , um am 3. Tag  $0,066 \pm 0,007$ , am 7. Tag  $0,174 \pm 0,033$ , am 14. Tag  $0,417 \pm 0,041$  und nach 3 Wochen  $0,48 \pm 0,053$  zu erreichen. Auch nach 6 Monaten betrug die Durchblutung der operierten Pfote nur 80% der normal durchbluteten Pfote ( $0,815 \pm 0,114$ ). Die Messung der Sauerstoffsättigung zeigt eine anfänglich seitengleiche Sauerstoffsättigung ( $0,98 \pm 0,04$ ). Direkt nach der Ligatur fiel das Verhältnis auf  $0,09 \pm 0,03$ . Nach 3 Tagen betrug das Verhältnis  $0,26 \pm 0,07$ , nach 7 Tagen  $0,54 \pm 0,07$ , nach 14 Tagen  $0,72 \pm 0,09$ , nach 21 Tagen  $0,83 \pm 0,13$ . Erst nach 6 Monaten erreicht das Verhältnis das Ausgangsniveau ( $0,95 \pm 0,03$ ). Durch die kontinuierliche Zunahme der Durchblutung durch das Kollateralwachstum, kommt es zu einer besseren Sauerstoffversorgung des distalen Gewebes. In allen Fällen lag die Signifikanz  $p < 0,01$ .



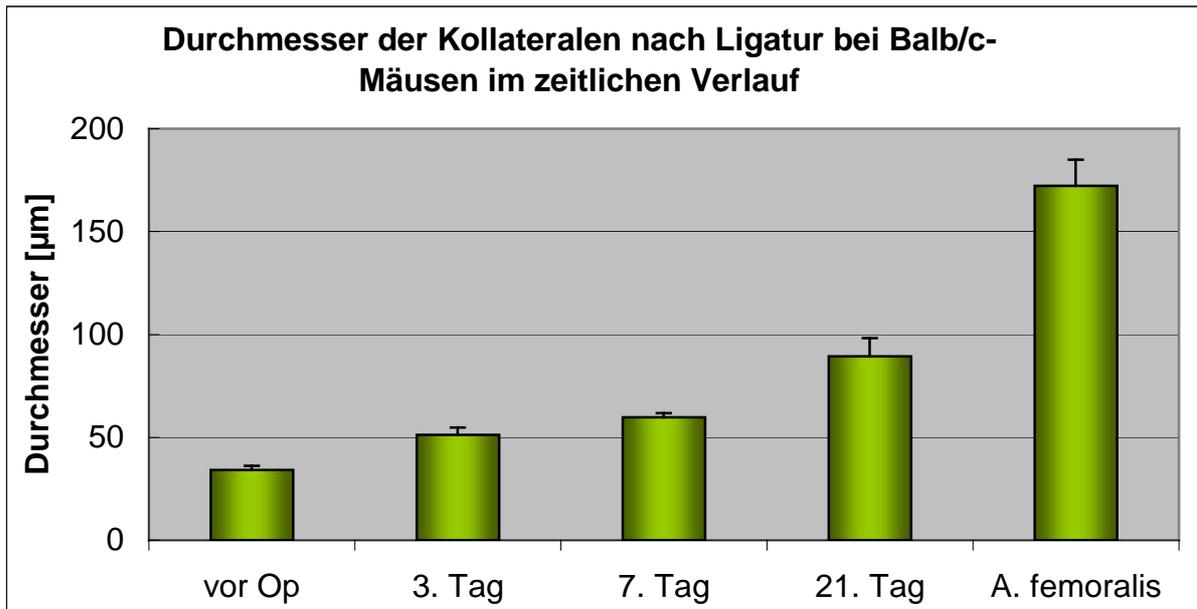
**Abbildung 20:** Repräsentativer Verlauf im Laser Doppler bei einer BALB/C-Maus. Die Durchblutung sistierte direkt nach der Ligatur und verbesserte sich im Verlauf, ohne aber innerhalb der ersten 21 Tage das Ausgangsniveau zu erreichen.



**Abbildung 21:** Sauerstoffsättigung und Durchblutung im LDI bei Balb/c-Mäusen nach Ligatur der A. femoralis: während die Durchblutung kontinuierlich zunimmt, steigt die Sauerstoffsättigung des Gewebes langsamer an. Das Ausgangsniveau der Durchblutung wird auch nach 6 Monaten nicht erreicht, während die Sauerstoffsättigung sich rascher normalisierte. In allen Fällen war  $p < 0,01$ .

#### IV.2.1.1. Stärkere Durchblutung durch Gefäßwandwachstum

Anhand der **morphologischen Veränderungen** der Kollateralen kann man auch auf das Gefäßwachstum schließen. Wie in der Abbildung 22 dargestellt, betrug der ursprüngliche Durchmesser der Kollateralgefäße bei der Balb/c-Gruppe  $34,14 \pm 11,32 \mu\text{m}$ . Nach 3 Tagen stieg der Durchmesser auf  $51,27 \pm 12,49 \mu\text{m}$ , am 7. Tag auf  $59,79 \pm 6,76 \mu\text{m}$  und am 21. Tag auf  $89,39 \pm 27,86 \mu\text{m}$ . In allen Fällen betrug  $p < 0,02$ . Im Vergleich dazu betrug der Durchmesser der A. femoralis auf Höhe des Abgangs der A. profunda femoris  $172,23 \pm 43,8 \mu\text{m}$ . Die anfängliche Vasodilatation reicht zur Gewebsversorgung nicht aus, es kommt zur Zunahme des Gefäßdurchmessers durch Wachstum der präexistierenden Arteriolen.

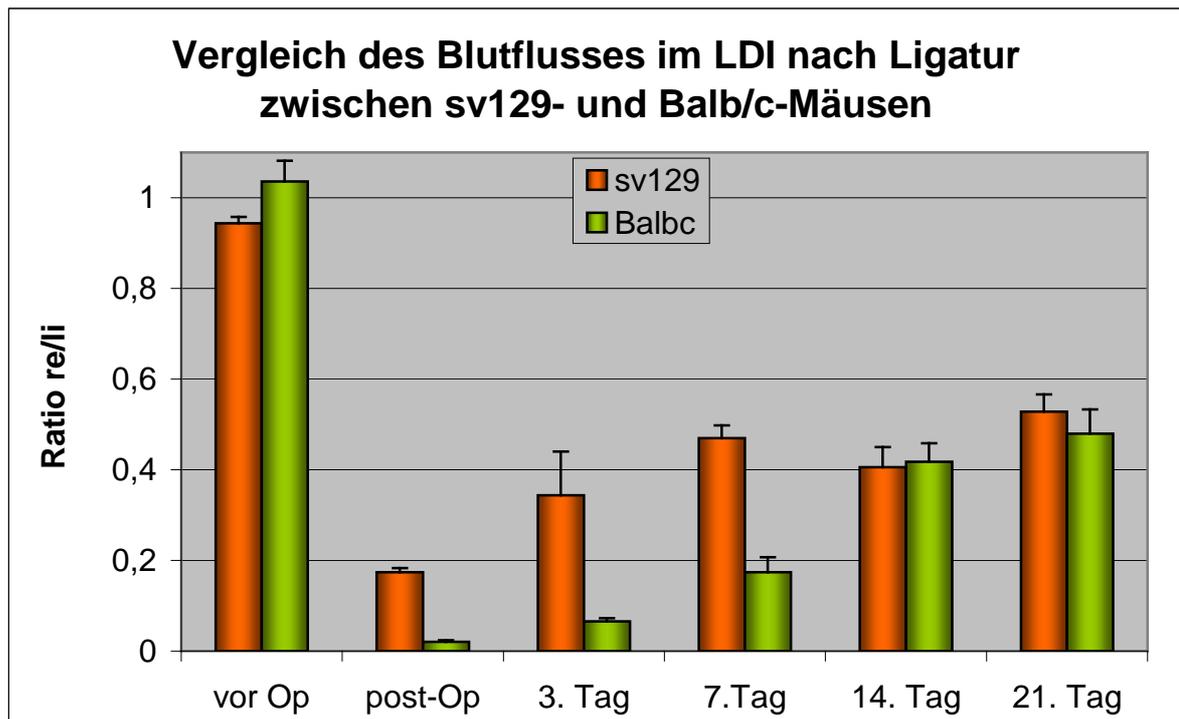


**Abbildung 22:** Durchmesser der Kollateralgefäße vor und direkt nach Ligatur der A. femoralis, sowie am 3., 7. und 21. Tag. Im Vergleich dazu der Durchmesser der A. femoralis distal des Abgangs der A. profunda femoris.

### IV.2.2. sv129 - Mäuse

Genauso wurde das Kollateralwachstum bei sv129-Mäusen untersucht. Bei den sv129 Mäusen betrug in der Laser-Doppler-Imaging-Messung vor der Ligatur der Quotient zwischen den beiden Pfoten fast 1 ( $0,94 \pm 0,06$ ) und fiel direkt nach der Ligatur auf  $0,17 \pm 0,04$ . Am 3. Tag hatte sich der Vergleich zwischen den Pfoten auf  $0,34 \pm 0,08$  gebessert. Zwischen dem 7. und dem 14. Tag verlangsamte sich die Besserung (7.Tag  $0,47 \pm 0,12$ , und am 14. Tag  $0,4 \pm 0,12$ ). Drei Wochen nach der Ligatur erreichten die Werte ein Verhältnis von  $0,52 \pm 0,1$ .

Die Abbildung 23 zeigt den Verlauf der Durchblutung bei sv129-Mäusen und setzt diese Daten in Vergleich zu den Balb/c-Mäusen. Bei den sv129 verbesserten sich die Ergebnisse der Durchblutung im Laser-Doppler schneller als bei den Balb/c. Dies muss beim Vergleich der untersuchten Gruppen mit diesen Kontrollgruppen beachtet werden, um die Veränderungen des Blutflusses beurteilen zu können.

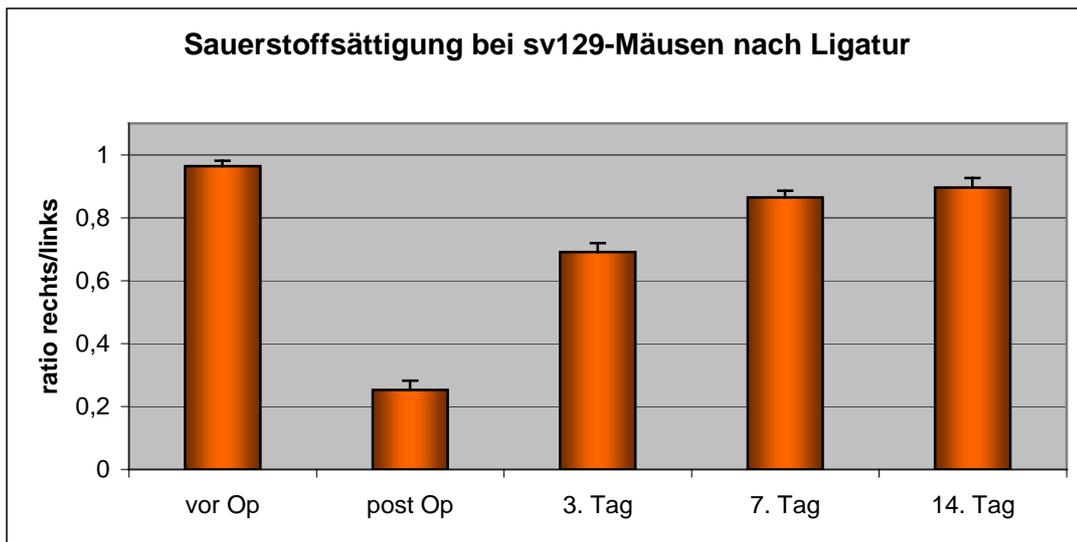


**Abbildung 23:** Vergleich der Laser-Doppler Untersuchungen nach Ligatur der A. femoralis zwischen Balb/c und sv129. Es zeigte sich eine bei den sv129-Mäusen schnellere Wiederherstellung der Durchblutung im Vergleich zu den Balb/c-Mäusen.

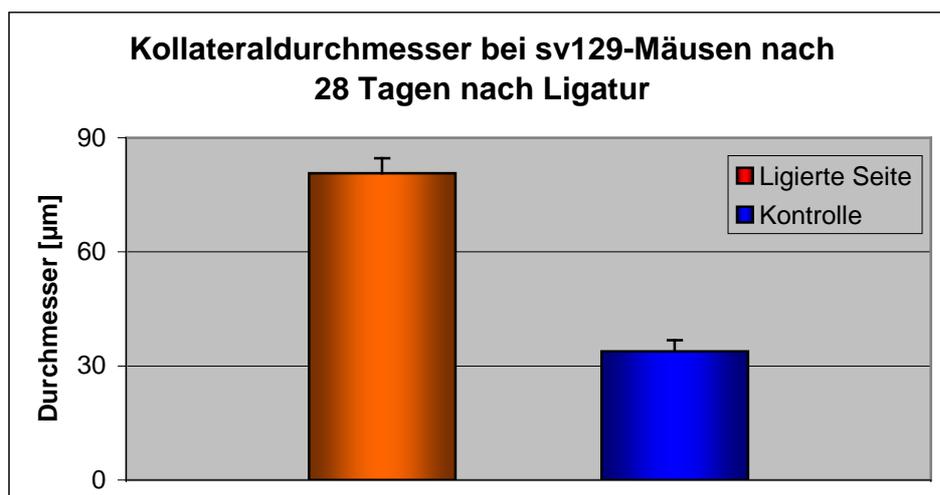
Die Hämoglobin-Sauerstoffsättigung bei dieser Gruppe zeigte eine raschere Besserung im Vergleich zur Balb/c-Gruppe. Vor der Ligatur zeigte sich keine Seitendifferenz ( $0,96 \pm 0,07$ ), postoperativ ein Abfall auf  $0,25 \pm 0,13$  und dann ein kontinuierlicher Anstieg auf  $0,69 \pm 0,12$  am 3. Tag,  $0,86 \pm 0,09$  am 7. Tag und schließlich  $0,9 \pm 0,07$  am 21. postoperativen Tag (s. Abbildung 24). Eine Messung am 21. Tag wurde nicht durchgeführt, da keine wesentlichen Veränderungen zu erwarten waren.

Auch morphologisch wurde das Kollateralenwachstum beurteilt (s. Abbildung 25). Der Durchmesser der gewachsenen Kollateralen 28 Tage nach Ligatur betrug bei den sv129  $80,67 \pm 16,88 \mu\text{m}$ . Im Vergleich dazu betrug der Durchmesser der nicht operierten Kontrollseite  $33,87 \pm 8,63 \mu\text{m}$  ( $p < 0,001$ ). Dies bedeutet eine Durchmesserzunahme um ca. das 2,5fache. Im Vergleich fanden wir bei der Balb/c-Gruppe einen anfänglichen Kollateralendurchmesser von  $34,14 \pm 11,32 \mu\text{m}$ , der innerhalb von 21 Tagen auf  $89,39 \pm 27,86 \mu\text{m}$  wuchs. Beide Gruppen zeigen also eine signifikante Durchmesserzunahme, auch wenn die Untersuchungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattfanden. Die relevanten Veränderungen scheinen in den ersten Tagen stattzufinden.

Während die Sauerstoffsättigung wie zu erwarten rasch anstieg, zeigte sich bei den sv129-Mäusen eine schnellere Normalisierung der Durchblutung, was eine bessere Voraussetzung zur Arteriogenese im Vergleich zu den Balb/c-Mäusen vermuten lässt.



**Abbildung 24:** Die Sauerstoffsättigung bei sv129-Mäusen nach Ligatur stieg rapide an.



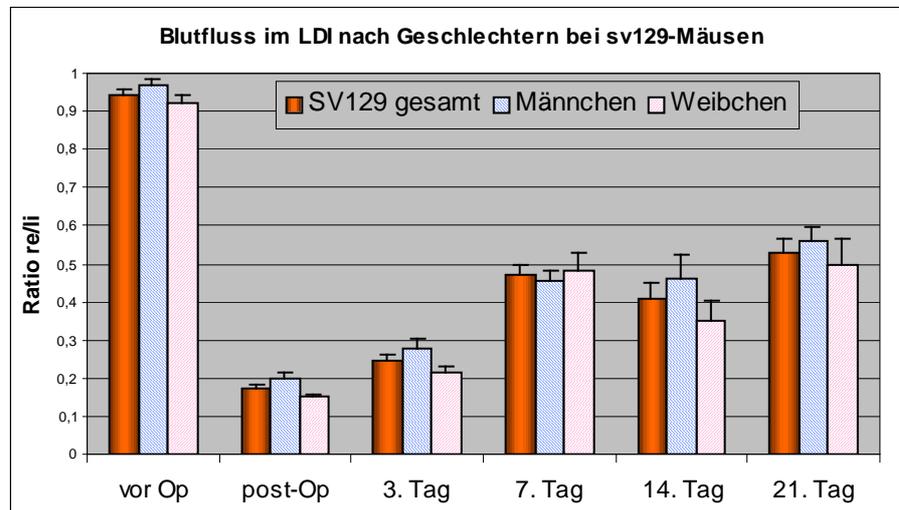
**Abbildung 25:** 28 Tage nach Ligatur zeigte sich bei sv129-Mäusen eine Durchmesserzunahme um das 2,5fache im Vergleich zur Kontrollseite.

#### IV.2.2.1. Gibt es Geschlechtsunterschiede bei der Arteriogenese?

Da die sv129-Gruppe aus Versuchstiere beider Geschlechter bestand (9 Männchen und 10 Weibchen), untersuchten wir den Einfluss des Geschlechts auf den Blutfluss im LDI.

Abbildung 26 zeigt die Unterschiede zwischen den Männchen und Weibchen im Vergleich zum Durchschnitt beider Geschlechter. Alle Tiere waren zum Zeitpunkt der Untersuchung 11 Wochen alt und noch nicht geschlechtsreif. Vor der Operation lag der Quotient zwischen der rechten und der linken Pfote bei den Männchen bei  $0,96 \pm 0,05$  und bei den Weibchen bei  $0,92$

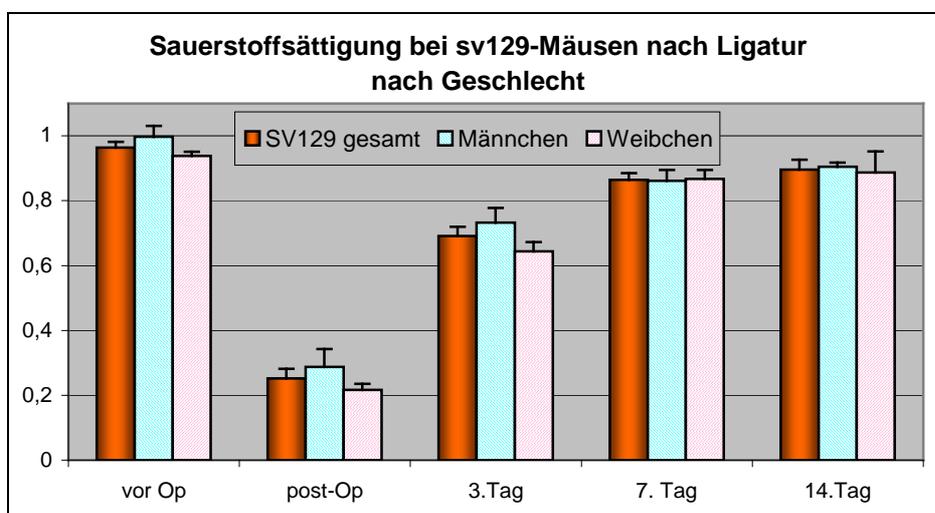
$\pm 0,07$ . Auch direkt nach der Ligatur unterschieden sich die Gruppen nicht (Männchen:  $0,19 \pm 0,05$ ; Weibchen:  $0,15 \pm 0,02$ ). Auch zu den anderen Kontrollzeitpunkten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede: 3. Tag Männchen  $0,27 \pm 0,07$ , Weibchen  $0,22 \pm 0,05$ ; 7. Tag Männchen  $0,45 \pm 0,07$ , Weibchen  $0,48 \pm 0,15$ ; 14. Tag Männchen  $0,46 \pm 0,12$ , Weibchen  $0,35 \pm 0,11$ ; 21. Tag Männchen  $0,566 \pm 0,07$ , Weibchen  $0,49 \pm 0,14$ .



**Abbildung 26:** Vergleich der Durchblutung zwischen Männchen und Weibchen der sv129-Gruppe

Wir untersuchten bei der SV129-Gruppe auch den Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Tieren in der Sauerstoffsättigung (s. Abbildung 27). Es zeigten sich, analog zu den Daten der LDI-Auswertung derselben Gruppe, keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern.

Insgesamt zeigten sich keine relevanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern und ihrer Fähigkeit zur Arteriogenese.



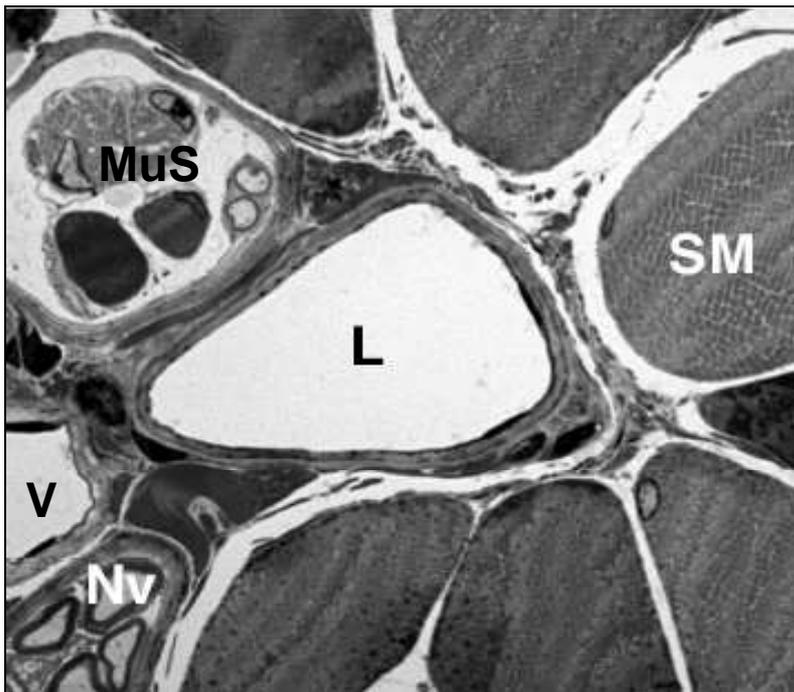
**Abbildung 27:** Relevante Unterschied des Verlaufs der Sauerstoff-Sättigungskurve zwischen Männchen und Weibchen finden sich nicht.

### **IV.3. Strukturelle Veränderungen der Gefäßwand während der Arteriogenese**

#### **IV.3.1. Präexistierende Kollateralgefäße**

Bei nicht okkludierter A. femoralis kann man die normale Anatomie der präexistierenden Kollateralgefäße bzw. Arteriolen beobachten. Die Endothelzellen sind flach, die Zellkerne sind klein und nicht aktiviert. Insgesamt entspricht es dem Bild eines nicht synthetischen Phänotyps. Die intakte Basalmembran und die intakte Lamina elastica interna umgeben die Endothelschicht. Beobachten kann man auch die glatten Muskelzellen vom kontraktiven Typ in der Mediaschicht. Auch hier zeigt sich ein nicht aktivierter Phänotyp, man kann keine freien Ribosomen oder Golgi-Apparate beobachten. Auch hier befindet sich das Chromatin am Rand des Zellkernes als Zeichen der geringen Syntheseaktivität.

Einen lichtmikroskopischen Eindruck einer normalen Kollateralarteriole bietet Abbildung 28.

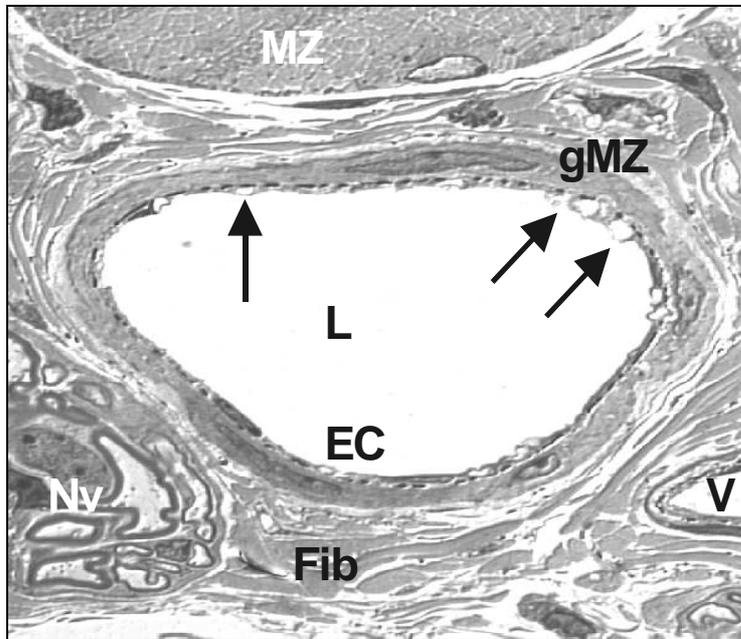


**Abbildung 28:** Querschnitt eines präexistierenden Kollateralgefäßes unter dem Lichtmikroskop. Neben der Arteriole liegen Vene und Nerv, umgeben von perivaskulärem Bindegewebe und Skelettmuskelzellen. Zusätzlich zu sehen ist eine Muskelspindel im Querschnitt. (Semidünnschnitt, Toluidinblau, x600); L: Lumen; Nv: Nerv; SM: Skelettmuskelfaser; MuS: Muskelspindel; V: Vene

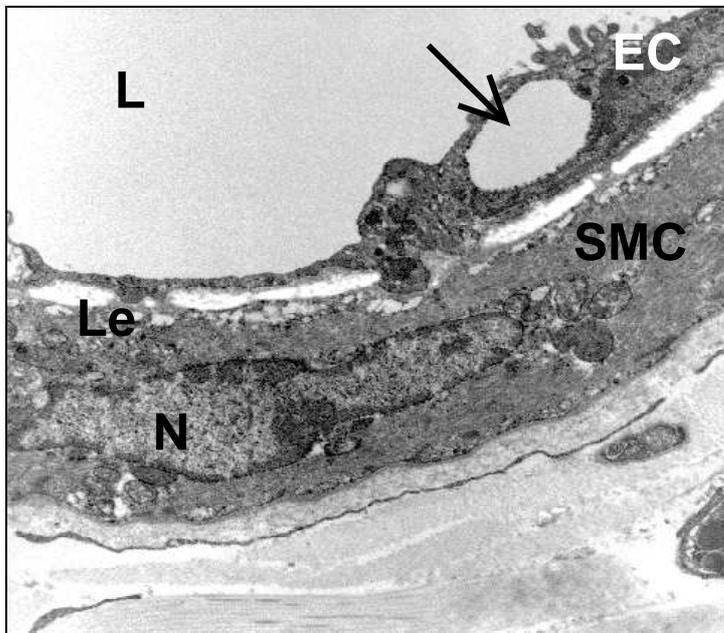
#### **IV.3.2. Kollateralen nach 4 Stunden erhöhter Scherkräfte**

Wir konnten zeigen, dass es durch die angestiegenen Scherkräfte zu einer Schwellung der Endothelzellen kommt. Kurz nach Verschluss der A. femoralis kommt es durch den erhöhten Blutfluss entlang der Kollateralarteriolen zu strukturellen Veränderungen in den Endothelzellen.

Sichtbar werden diese Veränderungen durch die perinukleäre Vakuolenbildung in den Endothelzelle im Bereich der „midzone“ (s. Abbildung 29). Die Lamina elastica interna ist verdickt und zum Teil nicht fenestriert. Das Chromatin im Zellkern der glatten Muskelzelle hat sich als Zeichen eines erhöhten Metabolismus an der Zellkernwand gesammelt (s. Abbildung 30).



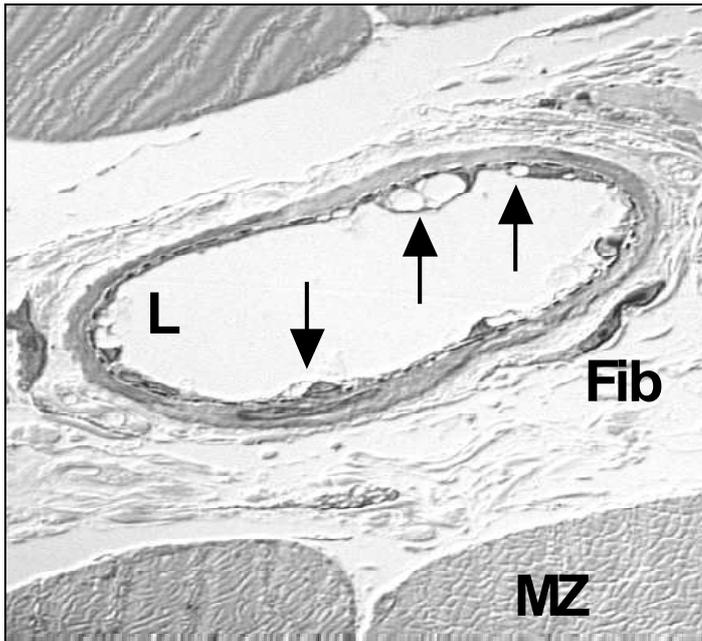
**Abbildung 29:** Im lichtmikroskopischen Bild zeigt sich nach 4 Stunden erhöhter Scherkräfte die perinukleäre Vakuolenentstehung (mit Pfeilen markiert); weitere strukturelle Veränderungen sind nicht zu beobachten. (Semidünnschnitt, Methylenblau, x1250). L: Arteriolenlumen; MZ: Skelettmuskelzelle, EC: Endothelzelle, gMZ: glatte Muskelzelle, Fib: Fibroblasten, V: Vene, Nv: Nerv



**Abbildung 30:** Elektronenmikroskopisches Bild einer Vakuole (Pfeil) in einer aktivierten Endothelzelle nach 4 Stunden erhöhter Scherkräfte (x8800); EC: Endothelzelle; Le: Lamina elastica interna; L: Lumen; N: Nukleus; SMC: glatte Muskelzelle.

### IV.3.3. Kollateralen nach 24 Stunden erhöhter Scherkräfte

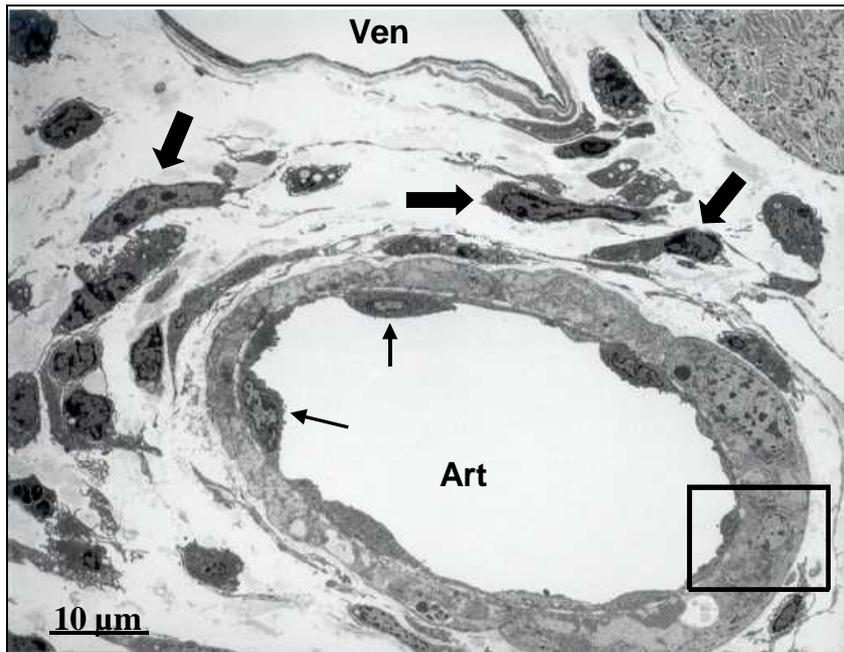
24 Stunden nach Okklusion und dadurch erhöhte Scherkräfte entlang des Endothels bildet sich ein perivaskuläres Ödem (s. Abbildung 31), das wahrscheinlich durch die VEGF-Sezernierung durch die Endothelzellen und den erhöhten hydrostatischen Druck entlang der Endothelzellen bedingt ist. Dies spricht für eine durch auf das Endothel wirkende Scherkräfte induzierte Schrankenstörung. Die Struktur der Gefäßwand ist erhalten.



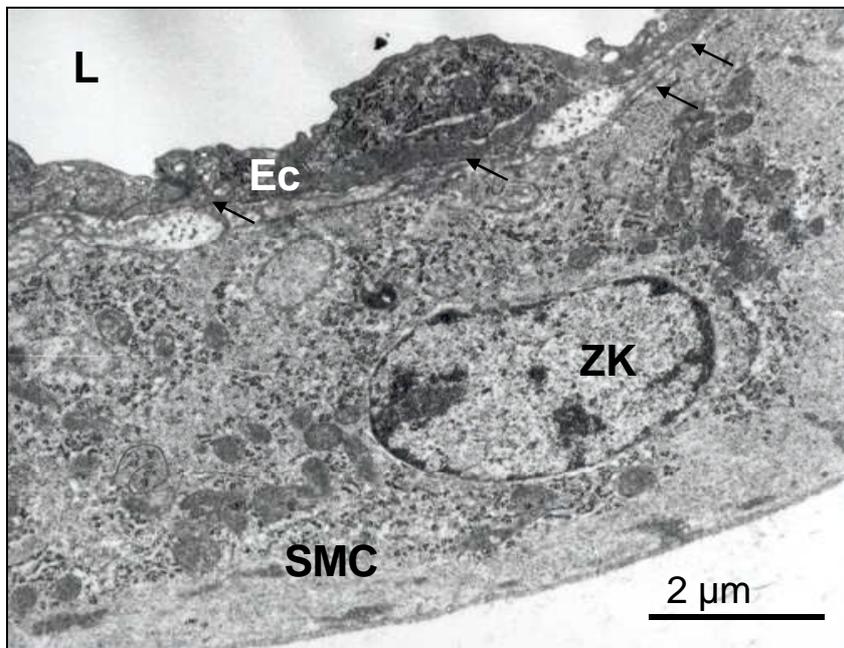
**Abbildung 31:** Lichtmikroskopisches Bild der Vakuolisierung (Pfeile) und des perivaskulärem Ödems nach 24 Stunden erhöhter Scherkräfte (Semidünnschnitt, Toluidinblau, x800) L: Lumen; MZ: Skelettmuskel, Fib: Fibroblasten.

### IV.3.4. Drei Tage nach Ligatur

Drei Tage nach Ligatur der A. femoralis kommt es zu Veränderung der Ultrastruktur. Die Endothelzellen und die glatten Muskelzellen befinden sich in der Synthesephase. Es kommt zu einer Volumenzunahme der Endothelzelle, eine Hyperplasie der Endothelschicht ist aber nicht zu beobachten. Die Endothelzellkerne sind größer und ragen in das Gefäßlumen hinein. In den glatten Muskelzellen vermindert sich die Anzahl der kontraktilen Filamente und steigert sich die Anzahl der Ribosomen und Golgi-Apparate. Das Chromatin der Endothelzelle und der glatten Muskelzellen ist im gesamten Zellkern verteilt. Insgesamt zeigen die Zellen der Gefäßwand eine gesteigerte Syntheseaktivität. Die Lamina elastica interna ist in ihrer Kontinuität unterbrochen.



**Abbildung 32:** Querschnitt eines Kollateralgefäßes drei Tage nach Verschluss der A. femoralis. Die dünnen Pfeile zeigen auf aktivierte, ins Lumen ragende Endothelzellkerne. Im perivaskulären Gewebe, jenseits der das Endothel umgebenden glatten Muskelzellen, sind Makrophagen (dicke Pfeile) und eine Zellzunahme zu erkennen. Art: Arteriole, Ven: Vene. (Elektronenmikroskop, x1500)

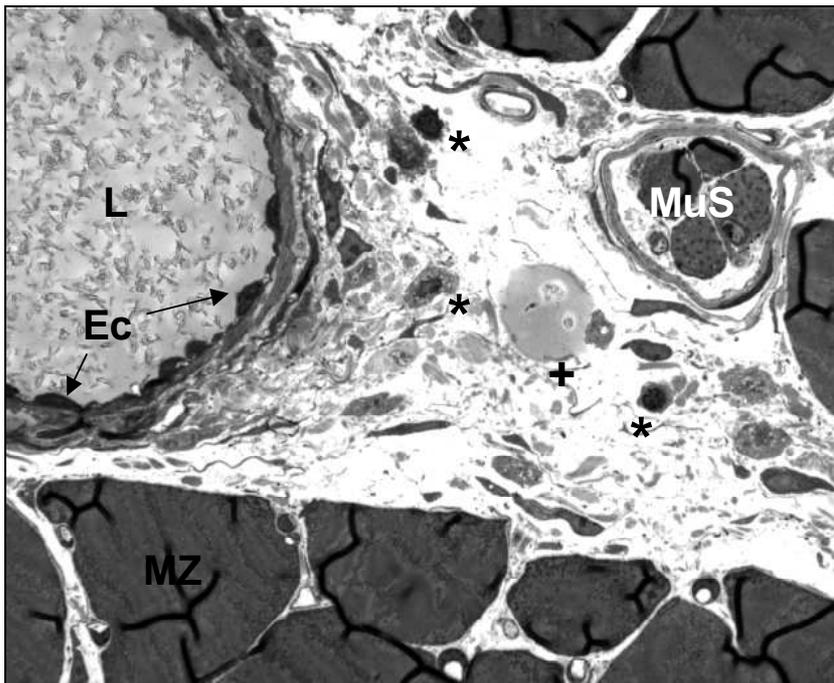


**Abbildung 33:** Detailvergrößerung von Abbildung 32: Die glatten Muskelzellen zeigen einen synthetischen Phänotyp: Das Chromatin des Zellkerns der glatten Muskelzelle (ZK) ist an den Zellkernrand verschoben, Vermehrung der Zellorganellen in der glatten Muskel (SMC), Endothelzellkernvergrößerung (Ec) und Chromatinvermehrung. Die mit Pfeilen markierte Lamina elastica interna ist unterbrochen. (Elektronenmikroskop, x12500)

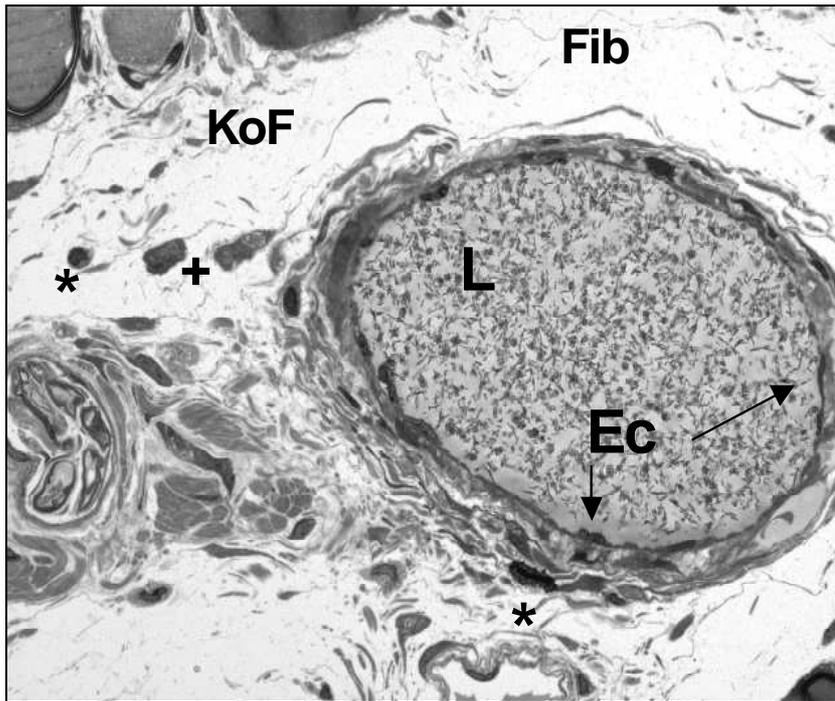
### IV.3.5. Sieben Tage nach Ligatur

Sieben Tage nach Anstieg des Blutflusses in den Kollateralgefäßen kommt es zu weiteren Veränderungen. In den lichtmikroskopischen Bildern (Abbildung 34 und Abbildung 35) zeigt sich die Zellzunahme im perivaskulären Gewebe. Die Endothelzellen sind weiterhin vergrößert, die glatten Muskelzellen der Gefäßwand sind noch aktiviert, was andere Gruppen auch nachweisen konnten<sup>51</sup>. Im perivaskulären Raum kommt es zu einer Zunahme der Zellzahl, darunter weiterhin Makrophagen. Die Anzahl der Fibroblasten nimmt in diesem Bereich zu, genauso die Menge kollagener Fasern. Man kann insgesamt eine Bindegewebiszunahme beobachten.

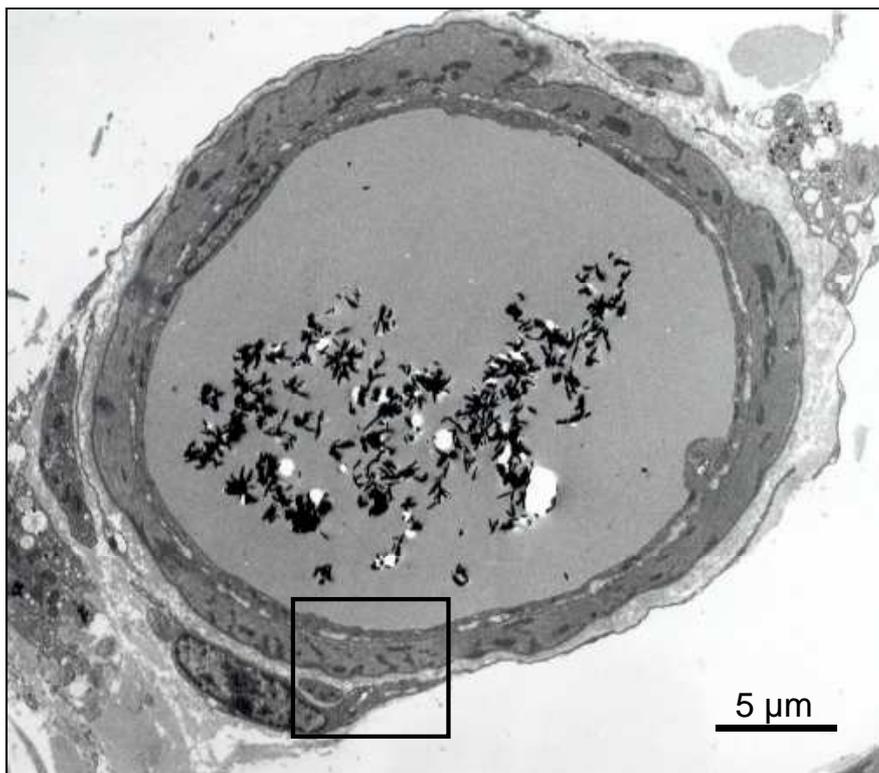
In der Gefäßwand kann man die beginnende Umwandlung der glatten Muskelzellen zurück in den nicht aktiven Phänotyp beobachten. Die Zellkerne der glatten Muskelzellen haben an Größe abgenommen, es finden sich weniger freie Ribosomen und die kontraktile Fasern haben zugenommen (s. Abbildung 36). Die Lamina elastica interna als wichtigste Barriere der Zellwanderung wird aufgelöst (s. Abbildung 37), die Zellen verlieren die Kontakte zueinander und migrieren. Das Gefäß wächst im Durchmesser; die Gefäßwand wird dicker, neue Zellschichten entstehen.



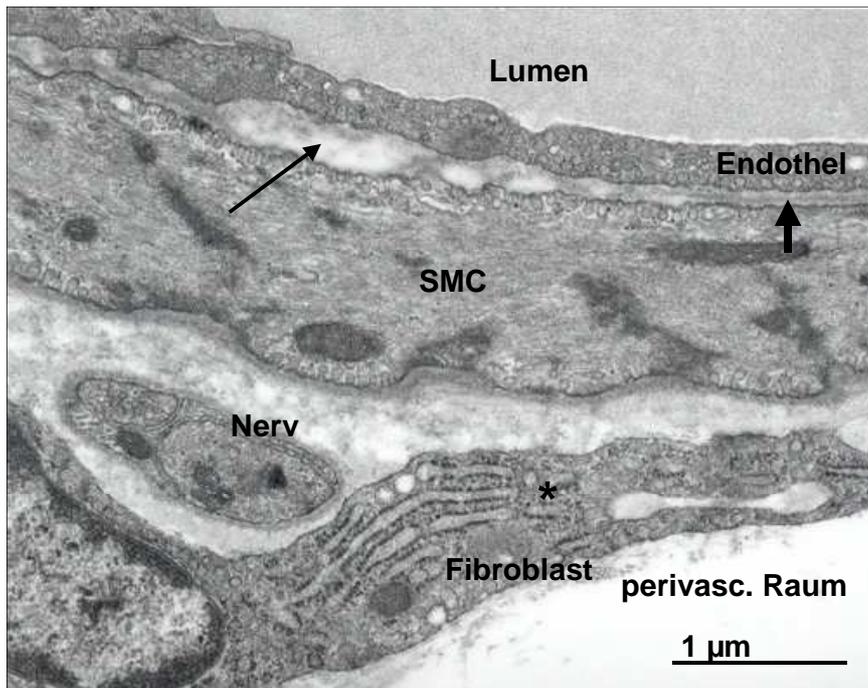
**Abbildung 34:** Periarteriöles Gewebe 7 Tage nach Ligatur der A. femoralis. Das Lumen (L) ist mit Kontrastmittelkristallen gefüllt. Die Endothelzellkerne (Ec) sind vergrößert, die glatten Muskelzellen sind nicht mehr aktiviert, im perivaskulären Gewebe zeigt sich eine Zellzunahme: Makrophagen (mit Sternen markiert), vermehrte Fibroblasten in der Gefäßumgebung, vermehrtes Kollagen, Adipozyten im Abbau mit + markiert.



**Abbildung 35:** Perivaskuläres Gebiet 7 Tage nach Ligatur. KoF: Kollagenfasern, glatte Muskelzellen in der Gefäßwand; L: Lumen (Kontrastmittelkristalle); Ec: Endothelzellen; \*: Makrophagen; +: Fibroblasten im perivaskulären Raum(Fib).



**Abbildung 36:** Sieben Tage nach Okklusion der Femoralarterien.. (Elektronenmikroskop, x3500), Wismutkristalle im Lumen.



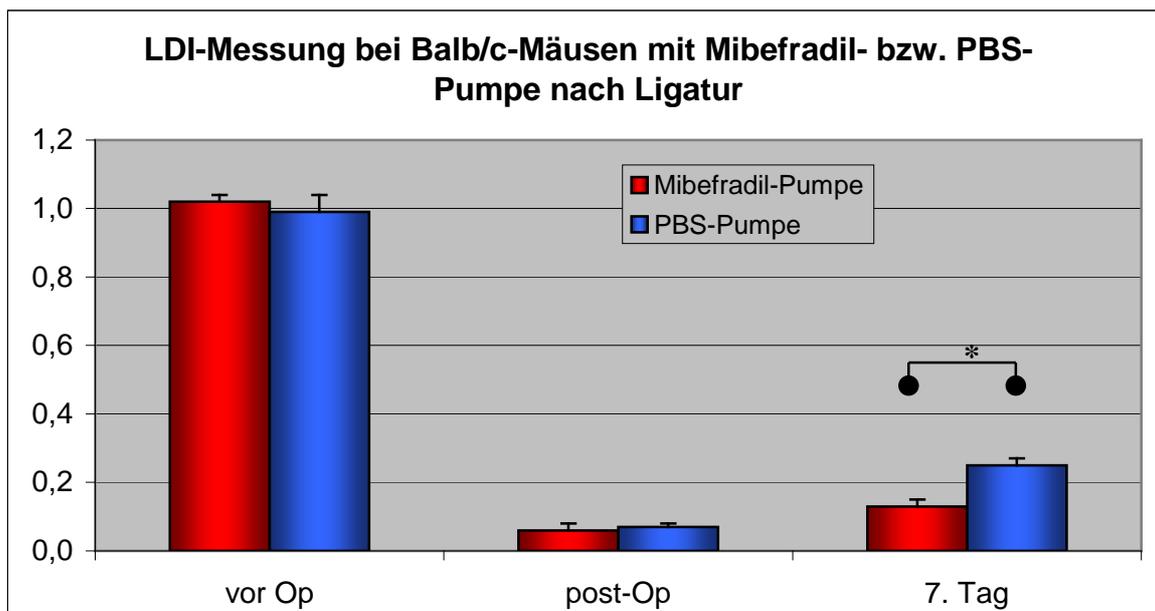
**Abbildung 37:** Detailvergrößerung aus Abbildung 36: glatte Muskelzellen im kontraktiven Phänotyp (SMC). Mit Stern markierte Golgi-Apparat, Vesikel in der Endothelzelle und den Fibroblasten sichtbar. Mit dünnem Pfeil markierte Verbreiterung des interzellulären Raumes und Unterbrechung der Lamina elastica interna (dicker Pfeil); (x32000)

#### **IV.4. Hemmung der Arteriogenese durch Blockierung der endothelialen Chlorid-Kanäle**

Bei den Versuchen mit Mibefradil wurden den 7 Balb/c Mäusen Mikropumpen implantiert, die über einen Zeitraum von 7 Tagen  $175 \mu\text{g}$  Mibefradil ( $0.50 \pm 0.02 \mu\text{l/h}$ ) in die A. femoralis abgaben. Als Kontrollgruppe wurden bei 7 Balb/c mit PBS gefüllte Mikropumpen implantiert.

Mit dem Laser Doppler Imager wurde zur verschiedenen Zeitpunkten die Pfortendurchblutung gemessen.

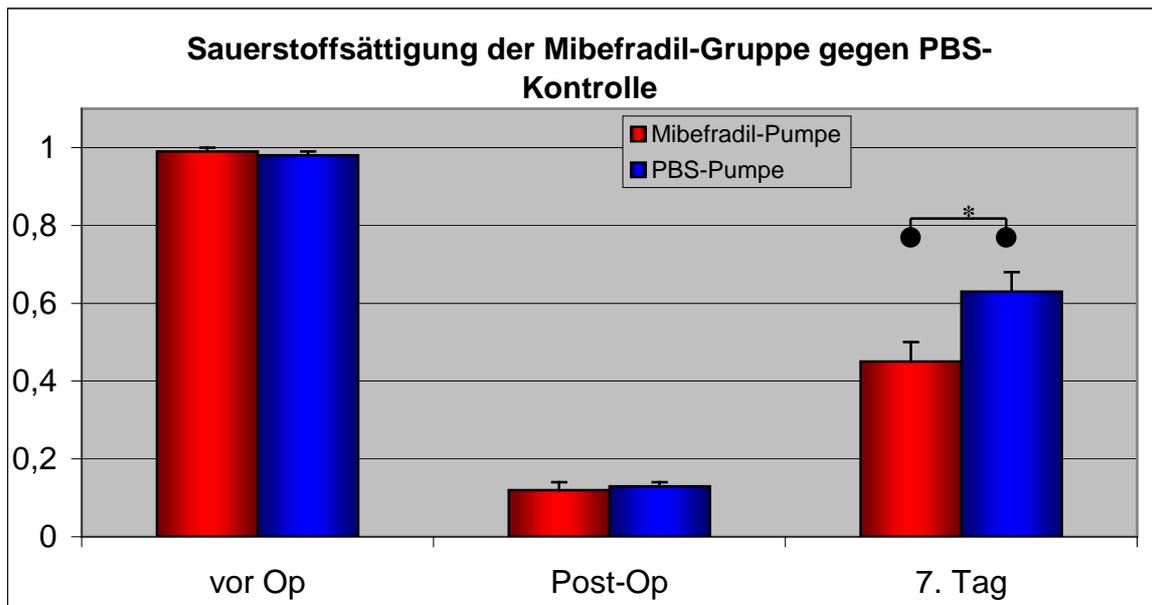
Direkt vor der Operation fanden wir keinen Unterschied zwischen der Mibefradil-Gruppe ( $1,02 \pm 0,02$ ) und der Kontrollgruppe ( $0,99 \pm 0,05$ ). Im Anschluss an die Operation unterschieden sich die Gruppen auch nicht (Kontrolle  $0,07 \pm 0,02$  und Mibefradil  $0,06 \pm 0,01$ ). Am 7. postoperativen Tag hatte sich das Verhältnis okkludierte zu nicht-okkludierte Seite bei der PBS-Kontroll-Gruppe auf  $0,25 \pm 0,02$  verbessert, während bei der Mibefradil-Gruppe das Verhältnis bei  $0,13 \pm 0,02$  lag. Dies entspricht ca. 50% der Kontrollgruppe ( $p < 0.01$ ). Abbildung 38 veranschaulicht diese Daten.



**Abbildung 38:** Blutflussverhältnisse im LDI: durch die intraarterielle Mibefradil-Gabe verlangsamte sich die Erholung der distalen Durchblutung ( $p < 0.01$ ).

Die Hämoglobin-Sauerstoffsättigung der beiden Hinterläufe wurde in Abbildung 39 zueinander in Relation gesetzt. Vor und direkt nach der Ligatur der A. femoralis fanden sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Bei der Mibefradil-Gruppe sank das Verhältnis von  $0,99 \pm 0,01$  auf  $0,12 \pm 0,02$  nach der Operation und in der Kontroll-Gruppe von  $0,98 \pm 0,01$  auf  $0,13 \pm 0,01$ . Am 7. postoperativen Tag verbesserte sich die Sauerstoffsättigung der Kontroll-Gruppe auf ein Verhältnis okkludiert zu nicht-okkludiert von  $0,63 \pm 0,05$ , während die Mibefradil-Gruppe nur auf ein Verhältnis von  $0,45 \pm 0,05$  zunahm ( $p < 0.02$ ). Diese Ergebnisse entsprechen denen des Laser-Dopplers in Abbildung 38.

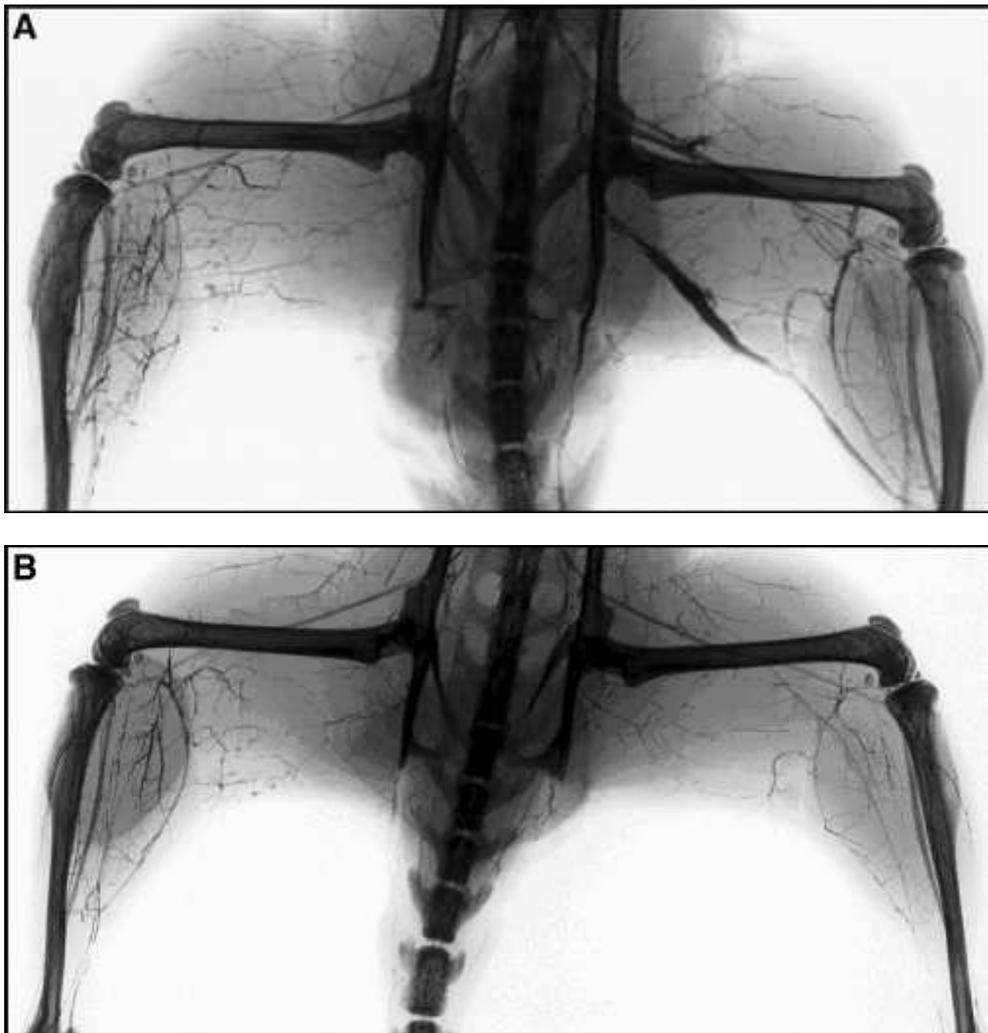
Durch Blockade der Chloridkanäle mit Mibefradil kommt es zu einer langsameren Wiederherstellung der Durchblutung sowie der Sauerstoffsättigung.



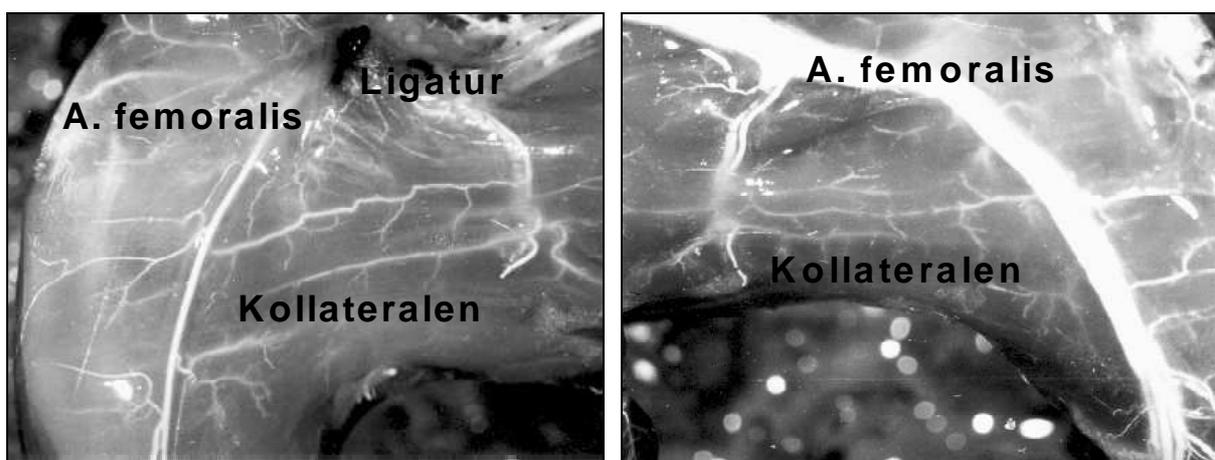
**Abbildung 39:** Langsamere Besserung der Sauerstoffsättigung bei Mäusen mit intraarterielle Mibefradil-Gabe im Vergleich zur Kontrollgruppe (\*  $p < 0.02$ ).

Sieben Tage nach der Pumpenimplantation wurden die postmortem Angiografien bei beiden Gruppen durchgeführt. Bei der Kontrollgruppe (Bild A) kann man auf der operierten Seite die typischen korkenzieherförmig gewachsenen Kollateralen identifizieren, die bei der Mibefradil-Gruppe (Bild B) schwächer ausgebildet sind.

In den Fotografien der Oberschenkel ist dieser Seitenunterschied noch deutlicher sichtbar. In Abbildung 41 zeigt sich eine geringer entwickelte Korkenzieherform im Vergleich zur Kontrollseite der gleichen Maus, aber trotzdem kann man ein Kollateralwachstum erkennen.



**Abbildung 40:** Repräsentative postmortem Angiografien nach 7 Tagen; **A:** PBS-Kontroll-Gruppe; **B:** Mibefradil-Gruppe



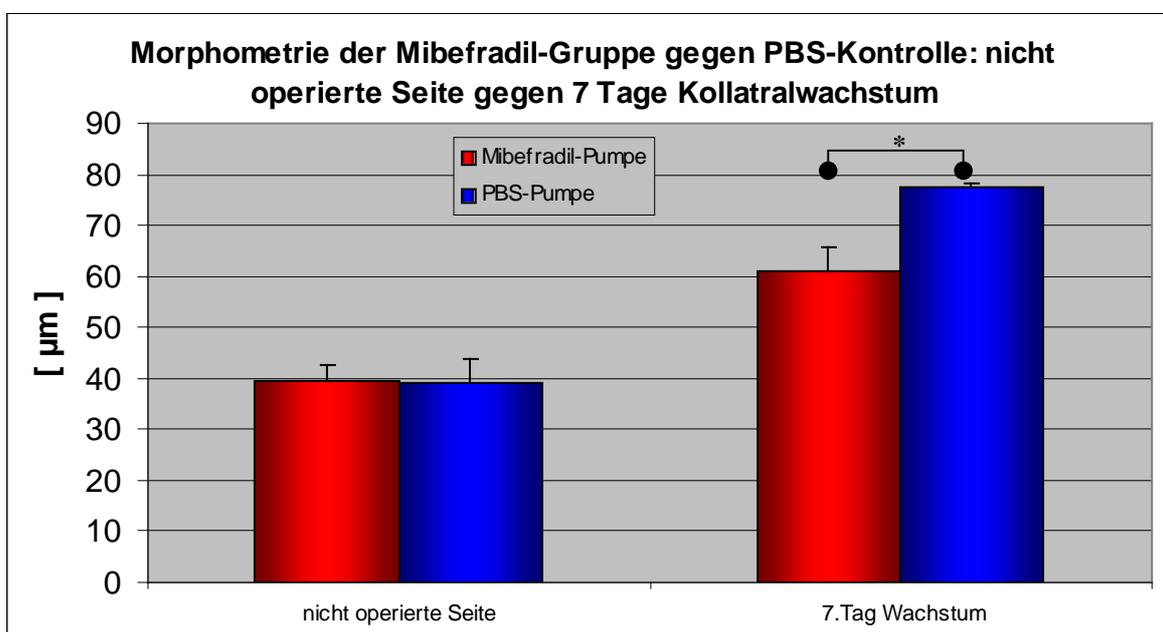
**Abbildung 41:** Durch Mibefradil gehemmte Arteriogenese ergibt eine geringer entwickelte Korkenzieherform der Kollateralgefäße (linkes Bild) im Vergleich zur Kontrollseite der selben Maus (rechtes Bild). Man kann das geringere Kollateralwachstum der ligierten Seite und die weniger ausgeprägte Korkenzieherform der Kollateralen mit den Kontrollgruppen in Abbildung 13 vergleichen.

In Abbildung 41 stellen sich die entwickelten Kollateralgefäße der Mm. semitendinosus und semimembranosus der Mibefradil-Gruppe dar. Sie sind im Vergleich zu den entstandenen Kollateralen anderer Versuchsgruppen (s. z.B. Abbildung 17 oder Abbildung 15) aber geringer ausgeprägt. Im Vergleich zu der nicht okkludierten Kontrollseite beim gleichen Tier sieht man schon in der Aufsichtsfotografie einen Unterschied. Die Gefäße der Mibefradil-Gruppe sowie die präexistierenden Kollateralen weisen keine typische Korkenzieherform auf.

Die morphometrische Auswertung der gewachsenen Kollateralen wurde nach 7 Tagen durchgeführt. Von den mittleren Abschnitten der entnommenen Gefäße der Mm. semitendinosus und graciles anticus wurden Semidünnschnitte angefertigt und mit Toluidinblau gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte fotografiert und der kleinere innerer Durchmesser der meist oval angeschnittenen Gefäße mittels des NIH-Programms ausgemessen.

Auf der nicht ligierten Seite fanden wir einen Durchmesser von  $39 \pm 4,8 \mu\text{m}$  bei der Kontrollgruppe und einen Durchmesser von  $39,5 \pm 3,1 \mu\text{m}$  in der Mibefradil-Gruppe.

Auf der operierten Seite unterschieden sich die Diameter nach 7 Tagen. Bei der Mibefradil-Gruppe betrug der gemessene Durchmesser nur  $61,0 \pm 4,7 \mu\text{m}$ , während die Kollateralen der Kontroll-Gruppe auf  $77,3 \pm 0,9$  anwuchsen. ( $p < 0.05$ ).



**Abbildung 42:** Morphometrie bei Mibefradil-Pumpe gegenüber PBS-Pumpe: Mibefradil hemmt das Kollateralwachstum (\* $p < 0.05$ )

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Chloridkanalblocker Mibefradil in unseren Versuchen die Arteriogenese verlangsamt sowie die initiale Zellschwellung der Endothelzellen reduziert. Daher vermuten wir, dass die Arteriogenese durch die anfängliche, durch erhöhte Scherkräfte ausgelöste Endothelzellschwellung initialisiert wird und die Chloridkanäle eine elementare Rolle in der Arteriogenese spielen.

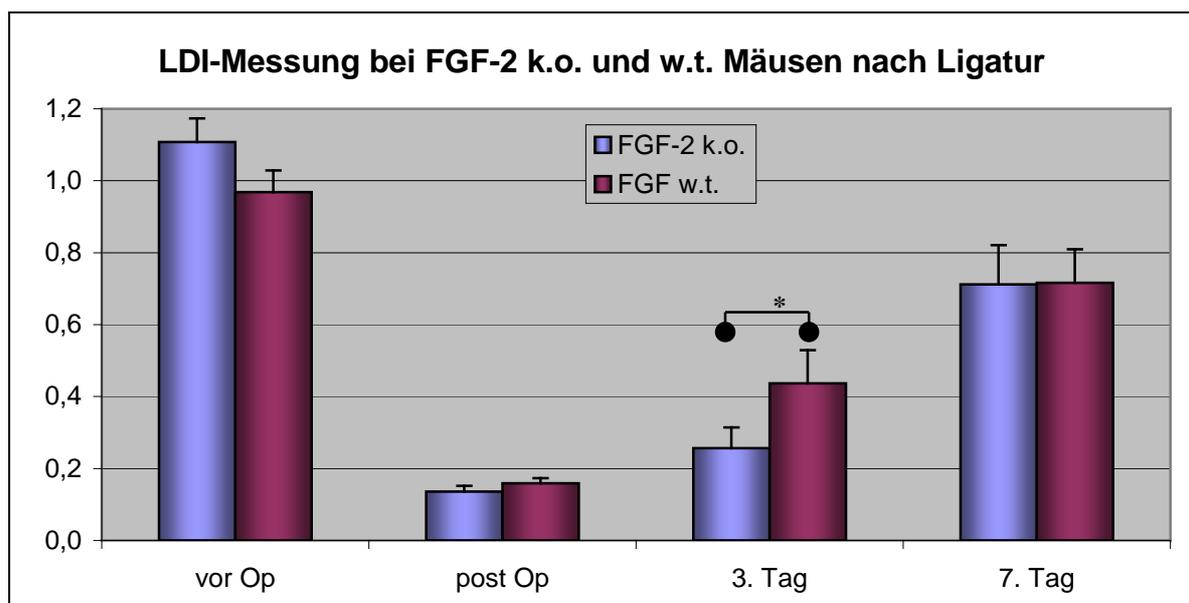
## IV.5. Die Rolle des Fibroblast Growth Factor-2 während der Arteriogenese

In früheren Untersuchungen zeigte sich, dass Fibroblast Growth Faktor-2 (FGF-2) in Makrophagen zu finden ist<sup>30</sup> und dass Makrophagen am Gefäßwachstum beteiligt sind und im perivaskulären Bereich und der Gefäßwand zu finden sind<sup>33</sup>. Aus diesem Grund vermuten wir, dass FGF-2 fördernde Eigenschaften auf die Arteriogenese besitzt und untersuchten wir in einer kleinen Gruppe zuerst die arteriogenen Eigenschaften bei FGF-2<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu FGF-2 w.t. Mäusen, um anschließend die Wirkung von über die osmotische Mikropumpe gegebenem FGF-2 bei sv129 zu untersuchen.

### IV.5.1. Ligatur bei FGF-2<sup>-/-</sup> und FGF-2 w.t.-Mäusen

Abbildung 43 zeigt den unterschiedlichen Verlauf der im Laser Doppler Imager gemessenen Durchblutung der Mäusepfoten bei FGF-2<sup>-/-</sup> (n=3) und FGF-2 w.t. (n=5) nach Ligatur der A. femoralis. Bei den k.o. -Mäusen zeigte sich anfangs ein Verhältnis  $1,11 \pm 0,11$ , postoperativ  $0,14 \pm 0,03$  mit einem Anstieg auf  $0,26 \pm 0,10$  am 3. Tag und schließlich  $0,71 \pm 0,15$  am 7. Tag. Ähnlich der Verlauf bei den w.t. -Mäusen: vor Operation  $0,97 \pm 0,13$ , postoperativ  $0,16 \pm 0,03$ , am 3. Tag  $0,44 \pm 0,21$  und am 7. Tag  $0,72 \pm 0,21$ . Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, auch nicht am 3. postoperativen Tag ( $p = 0,2098$ ). Bei der Bewertung der Messungen muss man die geringe Gruppengröße bedenken.

Es zeigt sich kein statistisch relevanter Unterschied zwischen den FGF-2 w.t und -k.o. Mäusen in der Fähigkeit zur Arteriogenese nach Ligatur der A. femoralis.

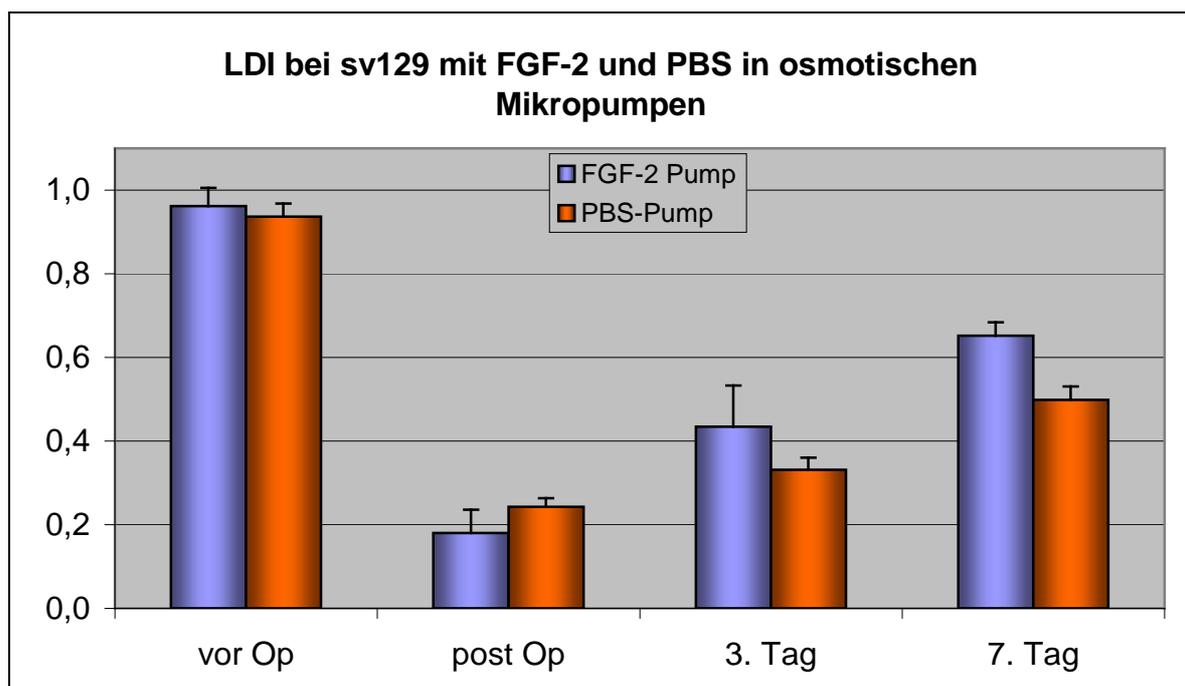


**Abbildung 43:** LDI bei FGF-2<sup>-/-</sup> und w.t.-Mäusen nach Ligatur der A. femoralis. Es zeigt sich am 3. Tag eine Differenz in der Durchblutung, deren Signifikanz bei der kleinen Gruppe statistisch nicht relevant ist (\* $p = 0,2098$ ).

### IV.5.2. FGF-2 Mikropumpe bei sv129 Mäusen

Bei dieser Gruppe operierten wir 7 sv129 Mäuse und implantierten mit FGF-2 gefüllte osmotische Mikropumpen. Anschließend maßen wir mit dem Laser Doppler Imager die regionale Durchblutung in den Pfoten und verglichen sie untereinander. Vor der Pumpenimplantation, und dem damit verbundenen Verschluss der A. femoralis, betrug das Verhältnis der Durchblutung der beiden Pfoten zueinander  $0,96 \pm 0,11$ . Direkt nach der Operation sank das Verhältnis auf  $0,18 \pm 0,14$  und stieg dann am dritten postoperativen Tag auf  $0,43 \pm 0,26$  an. Am 7. Tag betrug das Verhältnis rechts zu links  $0,65 \pm 0,08$ .

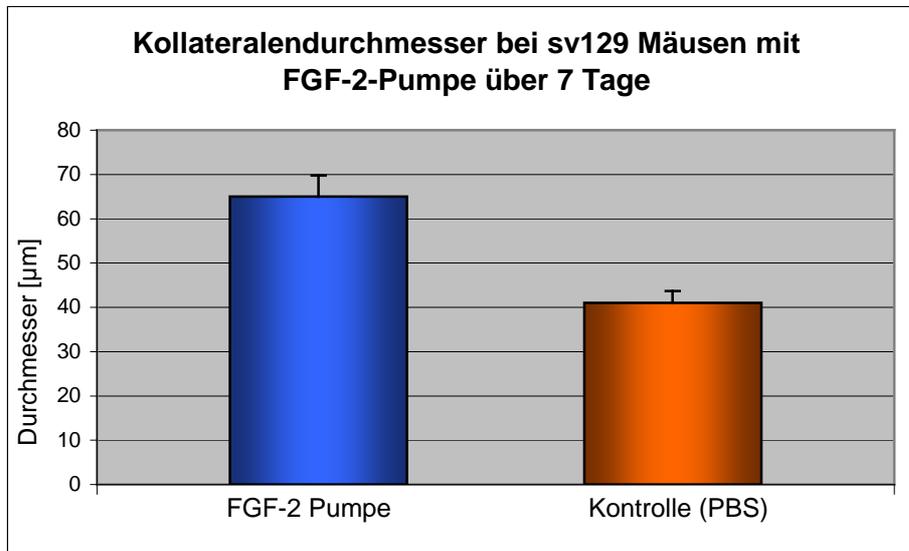
Bei der sv129-Kontrollgruppe mit PBS-Mikropumpe fanden wir vor Pumpenimplantation ein Verhältnis zwischen rechter und linker Pfote von  $0,95 \pm 0,05$ . Direkt nach der Operation sank das Verhältnis auf  $0,19 \pm 0,09$  und stieg am 3. Tag auf  $0,28 \pm 0,13$  an. Nach 7 Tagen betrug es  $0,47 \pm 0,14$ . Vergleicht man nun beide Gruppen im LDI, findet man statistisch relevanten Unterschiede ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 44:** FGF-2 und PBS Pumpen bei sv129 im Vergleich mit statistisch relevantem Unterschied. Das exogene FGF-2 hat eine fördernde Wirkung auf die Arteriogenese.

In der in Abbildung 45 dargestellten Gruppe wurde über 7 Tage FGF-2 mittels der implantierten osmotischen Mikropumpe gegeben. In der morphometrischen Untersuchung wurden die Durchmesser der Kollateralgefäße nach Ligatur der A. femoralis mit den präexistierenden Kollateralgefäßen auf der nicht okkludierten Seite verglichen. Der Durchmesser der gewachsenen

Kollateralgefäße nach 7 Tage FGF-2-Gabe betrug  $65,0 \pm 12,6 \mu\text{m}$ . Dagegen blieb auf der Kontrollseite der Durchmesser bei  $41,0 \pm 6,7 \mu\text{m}$  ( $p < 0,002$ ).



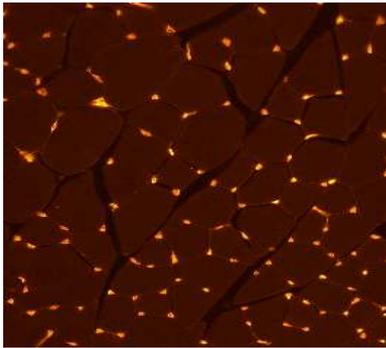
**Abbildung 45:** Morphometrie nach FGF-2 Applikation mittels Mikropumpe nach 7 Tagen. Als Kontrolle diente die nicht okkludierte Seite ( $p < 0,002$ ).

Der Fibroblast Growth Factor-2 hat bei exogener intraarterieller Dauergabe einen fördernden Einfluss auf die Arteriogenese.

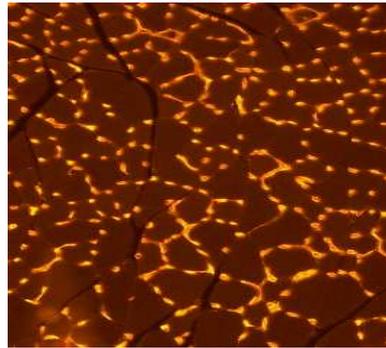
## IV.6. Kapillarendichte

Bei der Untersuchung der Kapillarendichte wurden die Mm. graciles anticus und gastrocnemii am 7. postoperativen Tag entnommen und mit TRICT-labeled Lektin gefärbt.

Hier fand sich im M. gracilis anticus nach 7 Tagen kein relevanter Unterschied zwischen der ligierten und der nicht okkludierten Seite. Die Kapillarendichte im M. gracilis anticus betrug  $1013,24 \pm 261,97 \text{ Kap/mm}^2$  bzw.  $885,04 \pm 165,33 \text{ Kap/mm}^2$ . Dagegen weichen die Kapillarendichten im M. gastrocnemius voneinander ab. Auf der ligierten Seite stieg die Dichte auf  $1218,62 \pm 180,97 \text{ Kap/mm}^2$  gegenüber  $828,10 \pm 185,97 \text{ Kap/mm}^2$  auf der Kontrollseite an. Die Kapillarendichte im M. gastrocnemius der okkludierten Seite stieg um ca. das 1,5-fache (s. Abbildung 50). In der Abbildung 46 und Abbildung 47 kann man die Kapillardichtenzunahme deutlich beobachten, während im M. gracilis anticus die Dichte gleich bleibt (s. Abbildung 48 gegen Abbildung 49).



**Abbildung 46:** *M. gastrocnemius* ohne Ligatur



**Abbildung 47:** *M. gastrocnemius* 7 Tage nach Ligatur



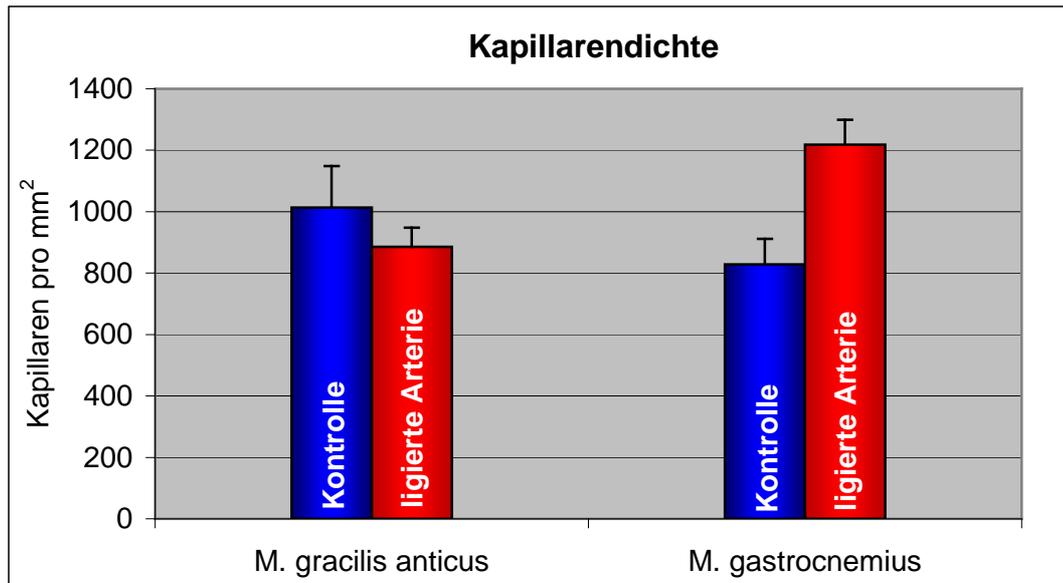
**Abbildung 48:** *M. gracilis anticus* ohne Ligatur



**Abbildung 49:** *M. gracilis anticus* 7 Tage nach Ligatur

Die Abbildung 50 zeigt die unterschiedlichen Kapillardichten, die in den *Mm. gastrocnemii* und *graciles anticus* gemessen wurden. Die Unterschiede waren zwischen den Muskeln der ligierten Seite und denen der Kontrollseite im Bereich der Oberschenkel nicht signifikant ( $p < 0,3$ ). Zwischen den beiden Unterschenkel zeigte sich aber ein signifikanter Unterschied in der Kapillardichte ( $p < 0,001$ ).

Dies zeigt, dass im Bereich des hypoxischen *M. gastrocnemius* Angiogenese stattfindet. In den Muskeln, in denen die Kollateralen verlaufen, fand dagegen innerhalb der ersten 7 Tage keine Veränderung der Kapillarendichte und damit keine Angiogenese statt.



**Abbildung 50:** Es zeigen sich Unterschiede der Kapillarendichte zwischen den Mm. gastrocnemii. Die Angiogenese findet aber nur in den distalen Muskeln statt ( $p < 0,001$ ), in den Muskeln, in denen die untersuchten Kollateralen verlaufen, wurde kein Anstieg der Kapillarendichte beobachtet ( $p < 0,3$ ).

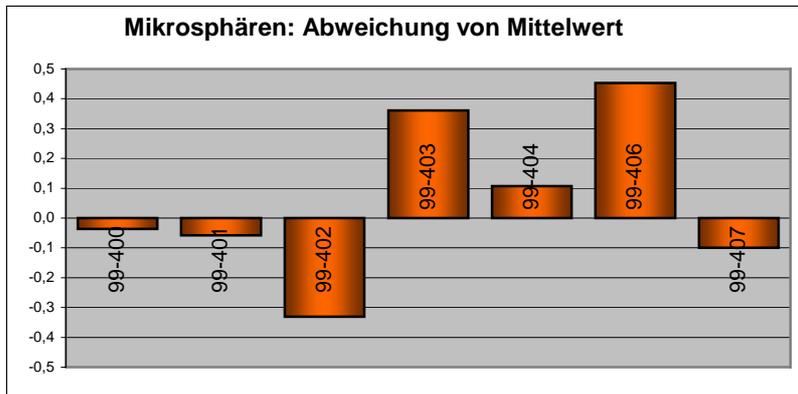
## IV.7. Ergebnisse der zusätzlich angewendeten Methoden

### IV.7.1. Fluoreszierende Mikrosphären

Bei einer anderen Mäusegruppe (GM-CSF<sup>-/-</sup> Mäuse, 13 männliche Tiere) ergab die mikroskopische Untersuchung des Durchmessers der Kollateralgefäße 21 Tage nach Ligatur auf der ligierten Seite einen Durchmesser von  $67,87 \pm 18,79 \mu\text{m}$ , während die nicht okkludierte Seite einen Durchmesser von  $31,63 \pm 12,08 \mu\text{m}$  aufwies. Damit lagen diese Tiere im gleichen Bereich wie die Kontrollgruppen in anderen Gruppen und konnten zur Auswertung der Methode herangezogen werden. Die Mikrosphären wurden über eine in die Aorta eingeführte Katheter unter konstantem Druck und Fluss in das Gefäßsystem von 7 GM-CSF<sup>-/-</sup> Mäusen gegeben. Anschließend wurden die Nieren und die Mm. gastrocnemii entnommen. Nach der Anfertigung von 10 und 50  $\mu\text{m}$  dicken Schnitten wurden die Mikrosphären unter dem Fluoreszenzmikroskop manuell ausgezählt.

Um eine Relation zwischen Durchblutung der ligierten und der nicht operierten Seite zu erhalten, wurden die Anzahl der Mikrosphären in den Mm. gastrocnemii ins Verhältnis zueinander gesetzt. Zur Kontrolle wurden auch die Mikrosphären in den Nieren ausgezählt. Als paarig angelegte Organe mit annähernd gleicher Durchblutung sollte die Verteilung der Mikrosphären in beiden Nieren gleich sein (Ratio rechts/links = 1). Gleichzeitig sollte überprüft werden, ob diese Methode bei der Untersuchung des Blutflusses bei Mäusen ausreichend genau und in weiteren

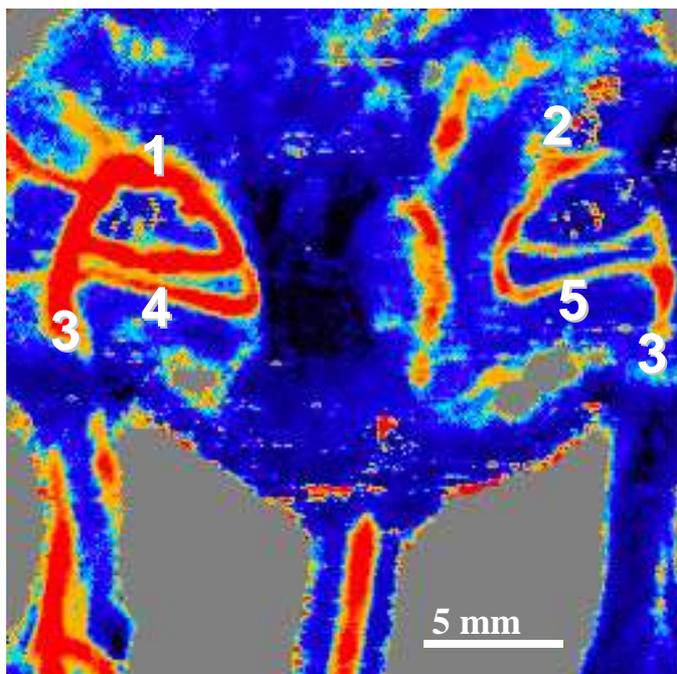
Untersuchungsreihen einsetzbar ist. Bei unseren Untersuchungen ergab sich bei den Nieren dieser 7 Tiere (s.o.) eine Ratio von 0,95 mit einer Standardabweichung von 0,32. Insgesamt wurden in den Nieren 57.171 Mikrosphären ausgezählt. Die Verteilung in den Mm. gastrocnemii ergab ein Verhältnis rechts zu links von 0,55 bei einer relativ hohen Standardabweichung von 0,27.



**Abbildung 51:** Auszählung der Mikrosphären in den Nieren: Abweichung der einzelnen Versuchstiere vom Mittelwert

#### IV.7.2. Gleichzeitiger Laser-Doppler von Kollateralen 7 Tage und direkt nach Ligatur der A. femoralis

Vier Wochen nach der Ligatur der A. femoralis rechts wurde die Tiere narkotisiert (s. III.2.1) und nach beidseitiger Entfernung der Haut im medialen Oberschenkelbereich und Ligatur der linken A. femoralis ein Laser-Doppler des gesamten Oberschenkel- und Beckenbereichs durchgeführt. Es zeigten sich in der LDI-Messung die unterschiedliche Flussstärke zwischen den innerhalb 28 Tagen gewachsenen Kollateralen und den kurz vor der Messung okkludierten kontralateralen Gefäßen (s. Abbildung 52). Genauso kann man die unterschiedliche Durchblutung der Pfoten distal der Okklusion beobachten. Dieses Bild entspricht den Fotografien in der Abbildung 13, die bei einem anderen Tier den selben Bereich abbilden.



**Abbildung 52:** Laser Doppler 28 Tagen nach Ligatur rechts und mit akuter Ligatur der linken Seite; (1) Ligatur vor 28 Tagen, (2) akute Ligatur, (3) A. femoralis superficialis, (4) Kollateralen nach 28 Tagen, (5) Kollateralen nach akutem Verschluss der A. femoralis.



## V. Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Veränderungen der Gefäße nach Okklusion eines Hauptgefäßes und die Ausbildung der Kollateralkreisläufe untersucht werden. Dazu wurde ein Mausmodell entwickelt, bei dem die A. femoralis distal des Abgangs der A. profunda femoris ligiert und so das Wachstum der präexistierenden Kollateralgefäße ausgelöst wird.

In einem Teil dieser Arbeit wurden die anatomische Lage der entstandenen Kollateralgefäße und ihr Aufbau bzw. Veränderung untersucht.

Ein anderer Teil dieser Arbeit widmete sich der Arteriogenese bei unterschiedlichen Mäusegruppen sowie der Inhibition des Kollateralwachstums durch den Chlorid-Kanal-Blocker Mi-befradil und die Förderung der Arteriogenese durch den Fibroblast Growth Factor-2.

Die Unterscheidung zwischen Arteriogenese und Angiogenese soll anhand dieses Modells hervorgehoben werden.

Schließlich sollen in dieser Diskussion noch die angewendeten und getesteten Methoden kritisch beurteilt werden.

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit zusammengefasst:

- Nach Ligatur der A. femoralis findet in den Muskeln des Oberschenkels, in diesem Mausmodell im M. semitendinosus, gracilis anticus, semimembranosus sowie in den Mm. vastus medialis rectus medialis des M. quadriceps, ein Wachstum der präexistierenden arteriolen Kollateralen statt (Arteriogenese).
- Gleichzeitig findet in den Muskeln des Unterschenkels, in unseren Untersuchungen im M. gastrocnemius, eine Zunahme der Kapillarendichte im Muskelgewebe statt (Angiogenese). In den Muskeln, in denen die Kollateralen verlaufen, fand dagegen innerhalb der ersten 7 Tage keine Veränderung der Kapillarendichte und damit keine Angiogenese statt. Arteriogenese und Angiogenese verlaufen räumlich getrennt und werden durch unterschiedliche Faktoren ausgelöst.
- Die anfängliche Vasodilatation der Kollateralgefäße reicht nicht aus, um die Versorgung des distalen Gewebes zu garantieren. Trotzdem kommt es in der Regel nicht zu Nekrosen im Unterschenkel und Pfotenbereich. Die immer beobachtete Atrophie der Unterschenkelmuskulatur kann jedoch die Angiogenese vortäuschen oder ihren Grad vermindern. Die kontinuierliche Zunahme des Kollateraldurchmessers durch Wachstum der präexistierenden Umgehungskreisläufe führt zu einer besseren Durchblutung und Sauerstoffsättigung im distalen Gewebe.
- Die Arteriogenese folgt einem regelmäßigen Schema. Nach 4 Stunden erhöhter Scherkräfte tritt ein intrazelluläres Ödem in Form von Vakuolen in den Endothelzellen auf, das sich nach 24

Stunden zu einem extrazellulären Ödem ausweitet. Nach 3 Tagen nehmen die Endothelzellen an Volumen zu und befinden sich, wie die glatten Muskelzellen, in der Synthesephase. Gleichzeitig finden Umbauprozesse in der Gefäßwand statt. In den glatten Muskelzellen nehmen die kontraktilen Fibrillen ab und es zeigen sich vermehrt Elemente der Synthese (Caveolae, Golgi-Apparate). Im perivaskulären Gewebe nimmt die Zellzahl zu, Makrophagen sind nachzuweisen. In der Gefäßwand nimmt die Fibroblastenzahl zu. Insgesamt kann man aber auf elektronenmikroskopischer Ebene keine Unterschiede zwischen den unterschiedlichen genetisch manipulierten Versuchstiergruppen finden. Lediglich eine Unterscheidung zwischen den verschiedenen Zeitpunkten der Arteriogenese im Vergleich zur Kontrollseite anhand der morphologischen Veränderungen ist möglich.

- Durch die Inhibition der volumenabhängigen endothelialen Chloridkanäle mit Mibefradil kommt es zu einer Verlangsamung der Wiederherstellung der Durchblutung sowie der Sauerstoffsättigung (Hemmung der Arteriogenese). Da Mibefradil die Chloridkanäle blockiert und in unseren Versuchen die Arteriogenese verlangsamt sowie die initiale Zellschwellung der Endothelzellen reduziert, vermuten wir, dass die Arteriogenese durch die anfängliche, Scherkräfte abhängige Endothelzellschwellung initialisiert wird und die Chloridkanäle eine wichtige Rolle in der Arteriogenese spielen.

- Fibroblast Growth Factor-2 spielt während der Arteriogenese eine Rolle. Es zeigt sich in unseren Experimenten zwar kein statistisch relevanter Unterschied zwischen den FGF-2 wild type und -knockout. Mäusen in der Fähigkeit zur Arteriogenese nach Ligatur der A. femoralis. Aber die exogene intraarterielle Zufuhr von FGF-2 via Mikropumpe hat einen fördernden Einfluss auf die Arteriogenese.

- Die Fähigkeit zur Arteriogenese ist bei den hier untersuchten Mäusestämmen unterschiedlich stark ausgeprägt. Die periphere Durchblutung normalisiert sich rascher bei den sv129-Mäusen im Vergleich zu den Balb/c-Mäuse oder den FGF-2-Wildtyp-Mäusen.

- Balb/c-Mäuse besitzen eine geringere Fähigkeit zur Arteriogenese als sv129-Mäuse, während es keine Unterschiede zwischen den Mäusen unterschiedlichen Geschlechts und ihrer Fähigkeit zur Arteriogenese gab.

## **V.1. Ablauf der Arteriogenese nach Ligatur der A. femoralis**

Durch das plötzliche Verlegen eines Hauptgefäßes verändern sich die Druck- und Flussverhältnisse in den von ihm abgehenden Gefäßen. Distal der Okklusion sinkt sofort der Druck im Gefäß. Bei Experimenten mit Hunden fiel der arterielle Druck nach Ligatur auf ein Drittel des Ausgangswertes<sup>48</sup>. Beim Menschen wurden Druckabfälle auf ein Viertel (ca. 20-50 mmHg) beobachtet<sup>49</sup>. Durch die Druckdifferenz nach der Okklusion steigt der Fluss in den präexistierenden Kollateralgefäßen sprunghaft an. Die Scherkräfte entlang des Endothels der Kollateralgefäßen nimmt zu. Diese reagieren initial mit einer maximalen funktionellen Dilatation des Gefäßlumens und einer maximalen Relaxation der Regulationsarteriolen. Diese Dehnung reicht aber nicht aus, um den ursprünglichen distalen arteriellen Druck und Fluss wiederherzustellen. Anfänglich beträgt der Innendurchmesser der Kollateralen 30 µm, er wächst im Verlauf mehrerer Tage auf 60 µm an.

Histologisch bestehen die Kollateralen aus einer Endothelschicht und ein bis zwei Schichten glatter Muskelzellen. Die erhöhten Scherkräfte entlang der Endothelzellen führt zu Umbauvorgängen des Zytoskeletts<sup>50</sup>. Vermutlich werden die auf die luminalen Membran wirkenden Kräfte über das Zytoskelett an die tight junctions und die basalen Verbindungen zur Matrix übertragen, was zur Aktivierung von bisher nicht identifizierten „Mechanorezeptoren“ führt. Die dadurch verstärkte Adhäsionsmolekülexpression wird durch schubspannungsreaktive Elemente in den Promoterregionen einzelner endothelialer Gene reguliert<sup>51</sup>. Scholz et al<sup>12</sup> konnten zeigen, dass die endothelialen Adhäsionsmoleküle E-Selectin, ICAM-1 und VCAM-1 durch die mechanischen Kräfte aber auch durch Zytokinen aktiviert werden. Die sich ausbildenden Verbindungen werden bereits 30 Minuten nach Beginn der Scherkräfte phosphoryliert<sup>12,52</sup>. Dadurch wird eine Signalkaskade aktiviert, die die weitere Adhäsionsmolekületranskription reguliert (Nuclear Transcription Factor Kappa B)<sup>52</sup>. Die initialen Phosphorylierung und die Adhäsionsmolekülexpression dauert nur 12 bis 24 Stunden an<sup>12</sup>.

Gleichzeitig kann man eine Schwellung der Endothelzellen im Elektronenmikroskop beobachten. Es kommt zu „Vakuolen-Bildung“ in den Zellen, die nach 4 Stunden auftreten und auch 24 Stunden nach Erhöhung der Scherkräfte noch nachweisbar sind (s. IV.3.2 und IV.3.3). Wir konnten zeigen, dass die scherkraftbedingte Zellschwellung durch Inhibierung der volumenabhängigen Chlorid-Kanälen mit Mibefradil vermindert werden kann<sup>53</sup> und damit die Arteriogenese der Kollateralen der A. femoralis gehemmt wird.

Durch die aktivierten Endothelzellen kommt es zur Chemotaxis zirkulierender Monozyten, die, einmal in die Gefäßwand migriert, mittels Zytokinproduktion (z.B. FGF-2, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, MCP-1)<sup>12,54</sup> die Gefäßwachstum und Proliferation fördern. MCP-1 kann die Arteriogenese durch vermehrte Transmigration der Monocyten fördern<sup>55</sup>.

In dieser Initialphase nach Erhöhung der Scherkraft kommt es initial zur Vasodilatation und zur Expression bzw. zur Phosphorylierung von Adhäsionsmolekülen. Gleichzeitig kommt es zu einer Zellschwellung, bei der die volumen-abhängigen Chlorid-Kanäle eine Rolle spielen. Da durch Hemmung dieser Faktoren eine Reduzierung des Gefäßwachstums nach Erhöhung der Scherkraft möglich ist, scheinen sie Teil des auslösenden Mechanismus der Arteriogenese zu sein.

In den ersten drei Tagen nach Ligatur der A. femoralis beginnt die gesteigerte Synthese von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, Makrophagen wandern in das perivaskuläre Gewebe ein, die Zellen der Arteriolengefäßwand zeigen ihre höchste Aktivität im Verlauf der Arteriogenese.

Anschließend, im Verlauf der nächsten 3 bis 14 Tagen, reduziert sich die Mitoserate. Statt dessen kommt es zur Auflösung der Lamina elastica interna und läßt so die Zellmigration zu. Die Gefäßwand wird dicker durch die Entstehung neuer Wandschichten. Insgesamt nimmt der Gefäßdurchmesser zu. Die Proteine der Extrazellulärmatrix wie Kollagen I, II, IV, Fibronectin, Laminin, Tenascin und Chondroitin<sup>56</sup>, sowie Matrix-Metallo-Proteinasen<sup>57,58</sup> werden synthetisiert. Zur gleichen Zeit nimmt die Anzahl der Fibroblasten im perivaskulären Gewebe zu und es zeigt sich eine vermehrte Menge an Fibronectin und Kollagenfasern, während die Anzahl an elastischen Fasern stark abnimmt<sup>51</sup>, was die geringere Elastizität der Kollateralgefäße erklären würde<sup>51</sup>.

Die glatten Muskelzellen verlieren durch Aktin- und Myosinfilamentenabbau ihren kontraktilen Phänotyp, während als Zeichen erhöhter synthetischer Aktivität eine große Menge an rauhem Endoplasmatischem Retikulum in allen Schichten der Gefäßwand neu auftritt<sup>29</sup> (s. IV.3.5). Zusätzlich bilden sich vermehrt Golgi-Apparate und Caveolae an der apikalen Seite als Zeichen der gesteigerten Syntheseaktivität. Die Anzahl der Fibrillen nimmt ab, Reststrukturen bleiben aber erhalten (dense bodies). Eine Zellproliferation ist aber bis zu diesem Zeitpunkt nicht zu beobachten. Auch in in vitro-Versuchen konnten durch eine shear stress-Erhöhung keine Zellproliferation der glatten Muskelzellen induzieren<sup>59</sup> werden. Die Veränderungen führten aber zu einer erhöhten FGF-2-Sekretion<sup>60</sup> und einer verstärkten DNA-Synthese<sup>61</sup>. Bekannt ist, dass PDGF eine Rolle in der Regulierung der glatten Muskelzellen nach strukturellen Gefäßwandveränderungen spielt<sup>62</sup>. Ein Botenstoff, der von den shear stress bedingt aktivierten Endothelzellen sezerniert wird, aktiviert die glatten Muskelzellen der Gefäßwand. Dies könnte PDGF sein, scheint aber in der Frühphase der Arteriogenese keine relevante Rolle zu spielen<sup>63</sup>. Die Aktivierung könnte aber durch die die Gefäßwand durchwandernden Monozyten ausgelöst werden.

Ab etwa dem 14. postoperativen Tag beginnt die Reifungsphase mit der Verringerung der Migration der glatten Muskelzellen, die sich allmählich wieder vom synthetischen in den kontraktilen Phänotyp. Eine Neointima wurde bei Mäusen kollateralen nicht beobachtet.

Abbildung 53 und Abbildung 54 sollen die Abläufe der Arteriogenese und der Unterschied zur Angiogenese schematisch darstellen.

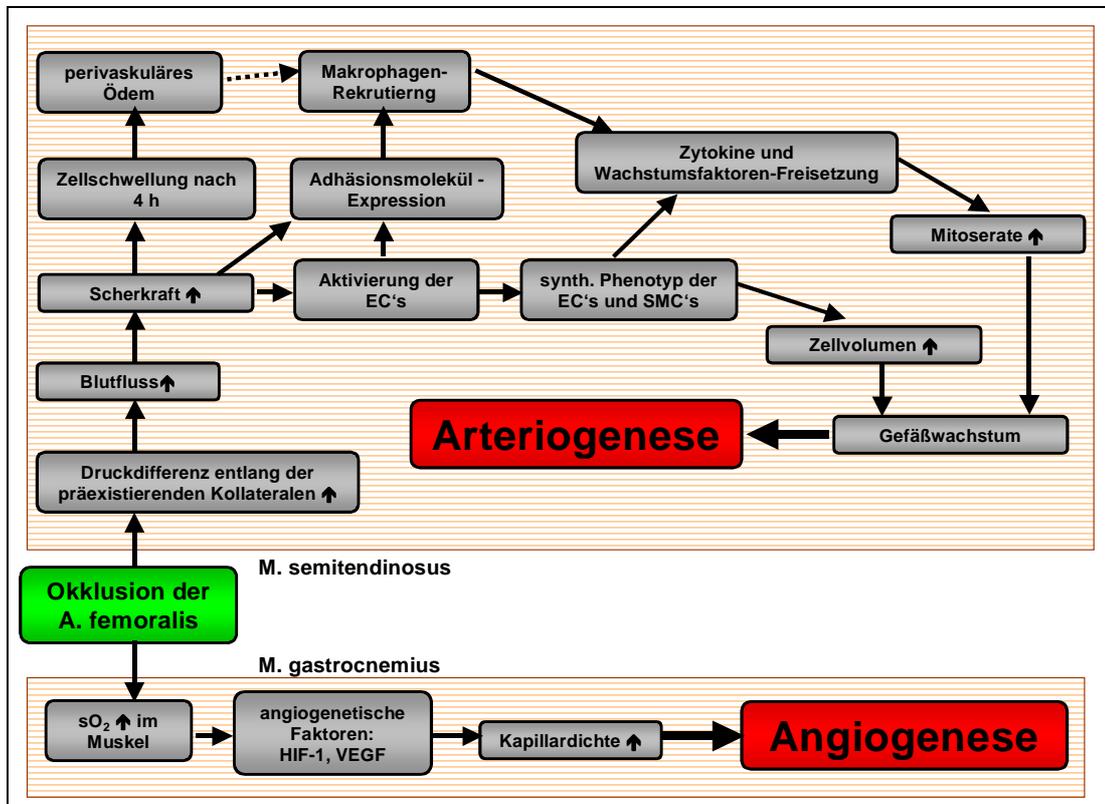


Abbildung 53: Unterschiedlicher Verlauf Arteriogenese und Angiogenese

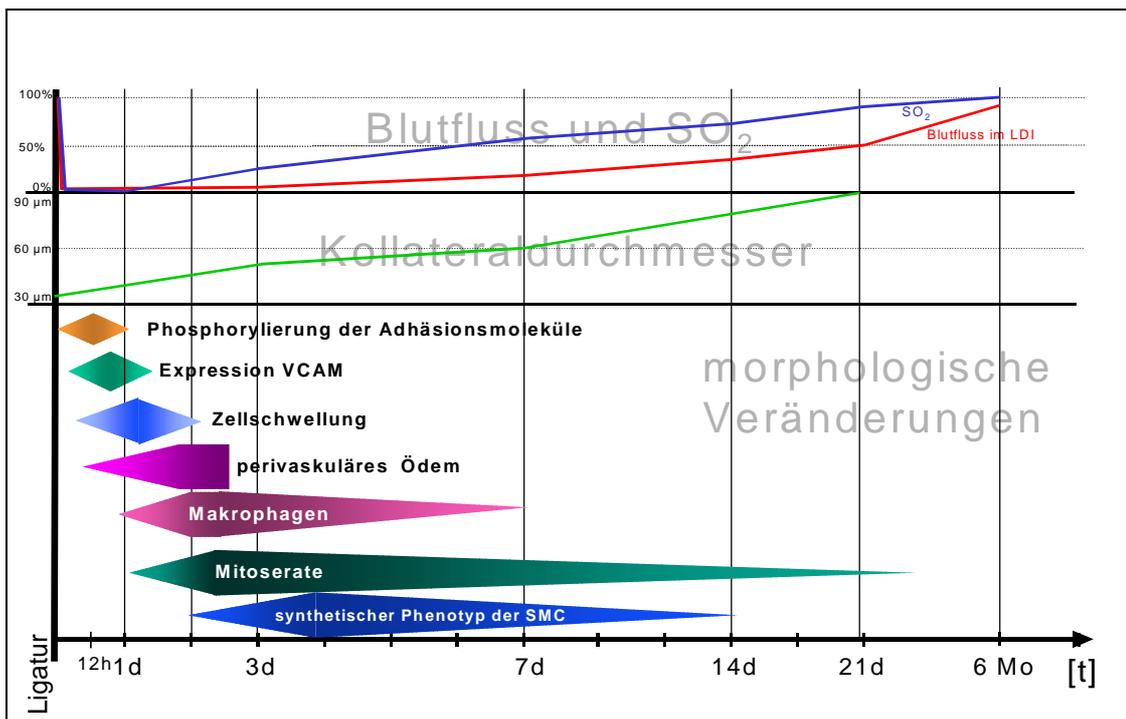


Abbildung 54: Zeitlicher Verlauf in unserem Modell

## **V.2. Gewachsene präexistierende Kollateralgefäße nach Verschluss der A. femoralis**

Da in dieser Arbeit die Kollateralgefäße der A. femoralis profunda untersucht werden sollen, ist es wichtig, die genauen anatomischen Verhältnisse zu definieren. Die A. femoralis wurde in unserem Modell immer proximal des Abgangs der A. femoralis superficialis ligiert. Andere Arbeiten<sup>33,64</sup> zeigten anhand von Kaninchenmodellen, dass nach Okklusion der A. femoralis regelmäßig Kollateralen in den entsprechenden Oberschenkelmuskeln wachsen. Wir fanden in der Literatur keine andere Studien, in denen die A. femoralis proximal der A. profunda femoris ligiert wurde, bzw. in denen die anatomischen Angaben eine genauere Zuordnung des Operationsgebietes zulassen. Anhand der veröffentlichten Angiogramme kann man auf eine eher distale Lokalisation der Ligatur der A. femoralis schließen, da die A. profunda femoris nicht zur Darstellung kommt<sup>38,65,66</sup>. Wir sahen das Wachstum mehrerer, regelmäßig auftretender Kollateralgefäße nach Ligatur der A. femoralis. Zwei verlaufen in den Mm. semitendinosus und gracilis anticus, eine weitere im M. semimembranosus und zwei im M. quadriceps (Mm. vastus lateralis und medialis). Diese Befunde konnten durch andere Gruppen bestätigt werden<sup>67</sup>. Durch sie wird die Versorgung des distalen Gewebes nach Verschluss des Hauptgefäßes möglich. Durch ihr Wachstum normalisiert sich die Sauerstoffsättigung nach ca. 1 Woche.

Nach Okklusion einer Arterie kann man in bestimmten Regionen des erwachsenen Organismus das Wachstum präexistierender Kollateralgefäße sehen. Diese sind vor der Ligatur nicht von anderen Arteriolen zu unterscheiden. Im Falle der Extremitätenmuskulatur wird ein längerer Skelettmuskel von zwei zentralverlaufenden Arterien versorgt, die am proximalen bzw. distalen Muskelansatz in den Muskel eintreten. Im mittleren Muskelabschnitt gibt es einen Bereich, in dem sich die beiden Arterien sich in Arteriolen aufteilen. Es existiert bei den präexistierenden Kollateralen eine direkte Verbindung auf arteriolärer Ebene zwischen den beiden aufeinander zulaufenden Arterien. Wir konnten aber feststellen, dass nach Verschluss der A. femoralis es zu einer schon makroskopisch sichtbaren Zunahme des Durchmessers der zentral in den Mm. semitendinosus und gracilis anticus verlaufende Gefäße kam (z.B. Abbildung 13). Der Blutfluss führt von der A. femoralis über die A. profunda femoris in die Kollateralgefäße, um dann im Bereich des Unterschenkels wieder in die A. femoralis superficialis zu münden und so auch die A. poplitea zu versorgen. Man könnte die Kollateralgefäße mit dem von A. von Humboldt beschriebenen Casiquiare-Fluss, der bei höherem Wasserstand statt in den Orinoco-Fluss über der Rio Negro in den Amazonas fließt und so zwei völlig unabhängige Flusssysteme verbindet<sup>68</sup>.

Obwohl die Kollateralen auch zum Teil in geteilter Form auftreten, in Abbildung 17 und Abbildung 18 vor bzw. nach der Ligatur der A. femoralis beschrieben, verliefen die präexistierenden und ausgebildeten Kollateralen zentral im Muskel und bildeten nie ein komplexes Kapillarnetz im mittleren Muskelabschnitt aus, welches entstehen müsste, wenn statt der präexistie-

renden Arteriolen nur ein Kapillarbett bestünde. Dies spricht gegen die Angiogenese nach Ligatur der A. femoralis und für die Arteriogenese in präexistierenden Kollateralen in diesen Muskeln. Es kommt im mittleren Muskelabschnitt auch nicht zu einer Zunahme der Kapillarendichte (s. IV.6. ).

Die Kollateralgefäße treten in unserem Modell regelmäßig in den gleichen Muskeln auf. Ihr Verlauf im mittleren Muskelabschnitt ist vor der Arteriogenese schon sichtbar. Nach Wachstum dieser präexistierender Gefäße sind die Kollateralen schon mit bloßem Auge zu sehen. Es findet hier weder eine Angiogenese noch eine Kapillardichtenzunahme statt. Es gibt also auch keine „Neo-Arteriogenese“.

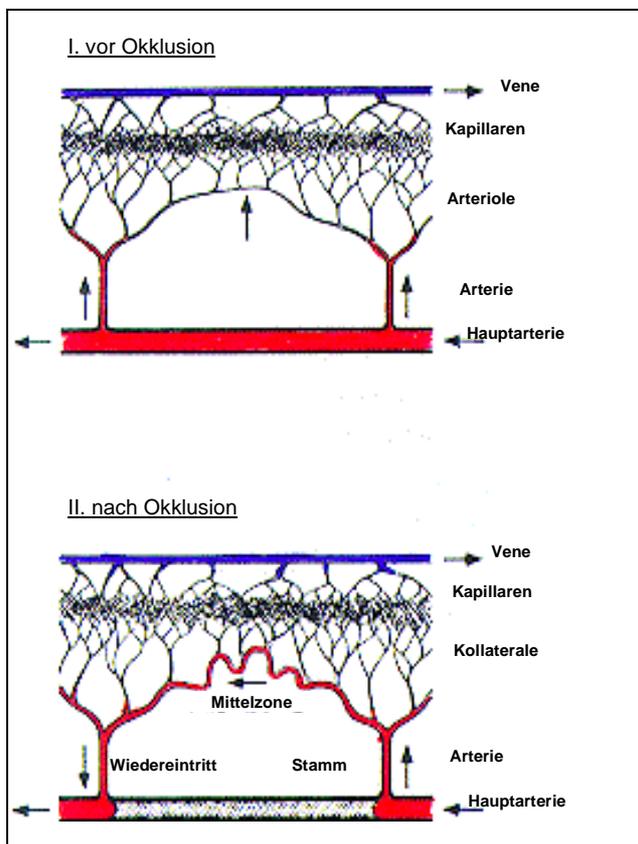
### **V.3. Größen und Flussverhältnisse**

Die Arteriogenese findet hauptsächlich in Arteriolen mit einem Durchmesser von 30 bis 50  $\mu\text{m}$  statt, die Teil eines arkadenförmigen Netzwerkes sind. Sie erschließen die Kapillarnetze zwischen zwei größeren Arterien und deren Abgängen. Longland teilte bereit 1953 die präexistierenden Umgehungskreisläufe in „stem“, „midzone“ und „re-entry“<sup>69</sup> (s. Abbildung 55). Nach Okklusion einer Hauptarterie kommt es zu einem verstärkten Fluss entlang der Kollateralen. Das Blut fließt anterograd über den am Anfang der arkadenförmigen Blutbahn stehenden Stamm-Bereich („stem“ nach Longland) in den arteriolären mittleren Bereich („midzone“) der Kollaterale. Hier findet das Gefäßwachstum, die Arteriogenese, statt. Das Blut fließt dann weiter in den weiteren Abschnitt der „midzone“, jetzt aber entgegen der ursprünglichen Flussrichtung. Von dieser arteriolären, nun gewachsenen Zone gelang das Blut dann retrograd in die entsprechende Arterie („re-entry“), die wieder in die weiter proximal okkludierte Hauptarterie mündet. Während die Endothelzellen wachsen, bleibt das umgebende Gewebe in der Länge konstant. Daher ergibt sich die für Kollateralgefäße typische Korkenzieherform in der „midzone“ der Arkade. Longland zeigte auch, dass bei Kaninchen die Gefäße der „midzone“ in Relation zu den anderen Abschnitten schneller wuchsen. Zusätzlich nimmt die Anzahl an glatten Muskelzellen in der Gefäßwand zu und führt zu einer weiteren Verdickung der Gefäßwand<sup>29</sup>.

Während der Arteriogenese kommt es in der von Longland als „midzone“ bezeichneten Abschnitt zum Wachstum präexistierender Kollateralgefäße, die vermutlich als Arteriolen schon während der Organogenese gebildet wurden, die aber durch den geringen Fluss in dem mittleren Muskelbereich nicht größer sind als die anderen Arteriolen. Die präexistierenden Kollateralgefäße könnten eine Rolle während der embryonalen Myogenese gespielt haben. Anfänglich wurde der Muskel von einem einzelnen Gefäß versorgt, welches nach Ausbildung des Muskels und des Kapillarbettes im Vergleich zu den Muskel versorgenden Arterien nicht weiter gewachsen ist. Erst durch den erneuten Blutflussanstieg kommt es zum Wachstum dieser Gefäße. Ähnlich verläuft die Rekanalisierung der nach der Geburt obliterierten Vv. umbilicales bei der porta-

len Hypertension<sup>1</sup>, auch wenn hier nur fibrosierte Gewebstränge vor der Rekanalisierung nachweisbar sind. Abbildungen E und F in Abbildung 56 entsprechen stellen dieses Wachstum präexistierender Arteriolen in der „midzone“ dar.

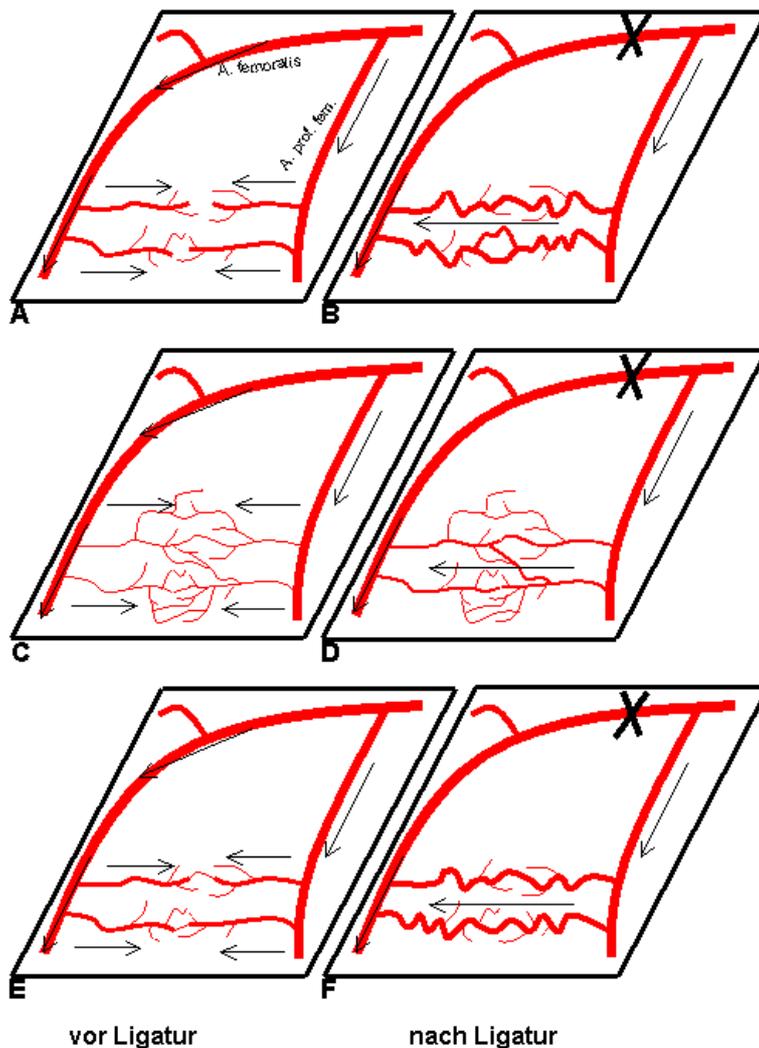
Die gewachsenen Gefäße fanden sich immer in den gleichen Muskeln. Wir fanden keine Verbindung zwischen dem „Gefäß-System“ der A. iliaca externa/A. femoralis und dem System der A. glutealis. Die Ligatur der A. femoralis proximal des Abgangs der A. profunda femoris zeigte einen Kollateralkreislauf zwischen der A. obturatoria externa, aber keine Anastomosen zwischen den zwei Blutversorgungssystemen des Oberschenkels. Eine Verbindung zwischen zwei unterschiedlichen arteriellen Versorgungssystemen konnte auch nicht im menschlichen Organismus nachgewiesen werden<sup>47,70</sup>. Zu beachten ist hier aber auch, dass die unterschiedlichen Gefäßsysteme durch Muskelfaszien getrennt sind und diese zusammen mit der erhöhten mechanischen Belastung ein Gefäßwachstum verhindern.



**Abbildung 55:** Einteilung der Kollateralschnitte nach Longland (1953)<sup>69</sup>: Nach Okklusion einer Hauptarterie kommt es zu Wachstum der präexistierenden Kollateralen. Die abgehende Arterie kann man als Stamm („stem“ nach Longland) der Kollateralen bezeichnen, die vergrößerte Arteriole befindet sich im mittleren Bereich („midzone“) der Kollaterale und eine Arterie, in der das Blut nun retrograd fließt, die in die weiter proximal okkludierte Hauptarterie mündet („re-entry“).

Die bei manchen Mäusen beobachtete Spaltung des medial im Muskel verlaufenden Kollateralgefäßes (s. Abbildung 17) kann einerseits als Variante der Organogenese aus mehreren Somiten gewertet werden. Sarelus<sup>71</sup> hat in Untersuchungen des M. cremasters bei Ratten nachgewiesen, dass der Blutfluss im kapillaren Bett nicht unbedingt immer den kürzesten Weg nehmen muss. Dies konnte aber auf arteriolärer Ebene nicht bestätigt werden. Wir beobachteten aber nur zentral verlaufende, in manchen Fällen geteilte, Kollateralgefäße. Es trat nie ein Gefäß auf,

aus dessen Form man auf einen Ursprung aus einem Kapillarbett schließen kann. Außerdem konnten wir direkt nach der Ligatur die mit Blut gefüllten dilatierten Kollateralen mit bloßem Auge erkennen. Eine Hypervaskularisierung eines gesamten Kapillarbettes mit anschließender Ausbildung eines Hauptgefäßes konnten wir nicht beobachten (vergleiche Abbildung 13). Auch dies spricht für ein präexistierendes Kollateralgefäß.



**Abbildung 56:** Mögliche Entstehungswege der Kollateralgefäße: A/B geben die mögliche Angiogenese wieder; C/D die Entwicklung der Kollateralgefäße aus einem Kapillarbett; E/F zeigt die Arteriogenese aus präexistierenden Kollateralgefäßen.

Wir konnten in jedem Muskelquerschnitt mindestens eine meist zentral verlaufende Arteriole nachweisen, was auf der einen Seite gegen die de novo Angiogenese zwischen zwei Kapillarbett (siehe Skizze A und B in Abbildung 56), und auf der anderen Seite für die Arteriogenese aus präexistierenden Kollateralgefäße spricht.

In den Skizzen C und D in Abbildung 56 zeigt die Entstehung der Kollateralgefäße aus dem bestehenden Kapillarbett. Diese Möglichkeit der Gefäßbildung können wir auch nicht bestäti-

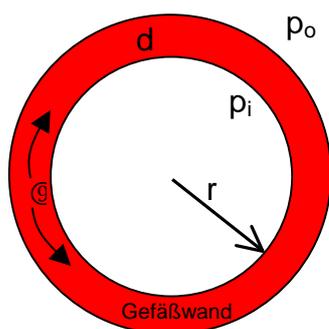
gen, da wir bereits direkt nach der Ligatur die Füllung der präexistierenden Kollateralen beobachten konnte und in den histologischen Schnitten vor der Ligatur immer eine zentral verlaufende Arteriole nachweisen konnten.

#### V.4. Mechanische Kräfte am Endothel während der Arteriogenese

Typisch zu beobachten war die Korkenzieherform dieser Kollateralgefäße<sup>72</sup> (vergleiche Abbildung 14). Sie tritt bei der Ausbildung von Kollateralgefäßen in allen menschlichen Organen auf<sup>1</sup>. Die Entstehung dieser speziellen Form ist bisher nicht geklärt worden, die auf die Endothelzellen wirkenden Kräfte scheinen aber eine essentielle Rolle zu spielen.

Diese mechanischen Kräfte bestehen aus dem Kompressionsdruck (der vom mittleren arteriellen Druck abhängigen Differenz zwischen Innen- und Aussendruck entlang der Gefäßwand), der entlang des Endothels wirkenden Scherkräfte und die Dehnungsspannung.

Die **Dehnungsspannung**  $\sigma$  ist in der Abbildung 57 schematisiert und errechnet sich aus der Formel (1). Sie ist direkt abhängig vom Gefäßradius ( $r$ ) und der transmuralen Druckdifferenz ( $p_o - p_i$ ) und umgekehrt proportional zur Wanddicke ( $d$ ). Im Bereich der „midzone“ der Kollateralen beträgt die Dehnungsspannung näherungsweise 70-80 mmHg (10100 Pa). Die Zellen des Gefäßes passen sich diesen Kräften durch Vermehrung der glatten Muskelzellen und ihrer Zell-Zell-Kontakte an.



$$\sigma = \frac{\pi \cdot r \cdot (p_i - p_o)}{d} \quad \text{Formel (1)}^{73}$$

**Abbildung 57:** Skizze zu Dehnungsspannung  $\sigma$  entlang der Gefäßwand

Die **Scherkräfte** oder **Schubspannung**  $\tau$  (engl. shear stress) wirken dagegen direkt auf das Endothel. Der shear stress ist direkt abhängig von der dynamischen Viskosität des Blutes ( $\eta$ ) und vom Blutfluss ( $Q$ ), und umgekehrt proportional zur 3. Potenz des Gefäßradius ( $r$ ).

$$\tau = \frac{4 \cdot \eta \cdot Q}{\pi \cdot r^3} \quad (\text{dyn} \cdot \text{cm}^{-2}) \quad \text{Formel (2)}^{73}$$

Zur genauen Berechnung der Scherkraft benötigt man unter anderem die Blutflussgeschwindigkeit direkt am Endothel. Die exakte Messung der Scherkraft ist aber bisher bei der geringen Größe der Kollaterale nicht möglich. Man kann aber den durchschnittlichen Fluss von 0,3 m/s für Gefäße dieses Durchmessers nehmen<sup>74</sup>. Vermutlich kommt es nur zu einem Kontakt des Serums mit den Endothelzellen, da die Erythrozyten bei Gefäßen mit 30 µm Durchmesser im mittleren Abschnitt des Schergradienten schwimmen. Bei größeren gekrümmten Gefäßen bildet zusätzlich noch zwei gegenläufige Wirbel senkrecht zur Flussrichtung, was die Berechnung des Scherkräfte zusätzlich erschwert. Außerdem verändert sich die Viskosität des Blutes in Abhängigkeit von Schergradienten, Hämatokrit, Temperatur und Zusammenlagerung der Erythrozyten. Daher kann die Viskosität bei langsam fließendem Blut zwischen 150 und 4 mPas liegen, die Viskosität des Plasmas dagegen beträgt bei 37°C 1,2 mPas. Da das Endothel strömungsbedingt weniger mit der Erythrozyten in Kontakt kommt, sollte nur die Plasmaviskosität beachtet werden. Schätzungsweise die Scherkraft in den Kollateralen bei einem mittleren arteriellen Druck von 70mmHg in der A. femoralis und 20mmHg distal der Ligatur, einem Durchmesser von 35 µm und einer Länge von ca. 25 mm ungefähr 20-70 dyn/cm<sup>2</sup>, was höher liegt als die in in vitro Studien benutzten Werte (3 – 12 dyn/cm<sup>2</sup>)<sup>75</sup>.

### ***V.5. Durchblutungsverhältnisse nach Ligatur der A. femoralis***

Nach dem Hagen-Poiseuille-Gesetz (s. Formel 3) ist die Stromstärke  $I$ , auch als Volumenfluss  $V$  pro Zeit  $t$  [m<sup>3</sup>/s] zu bezeichnen, abhängig von den geometrischen Parametern des Systems (Radius  $r$ , Gefäßlänge  $l$ ), den strömungstreibenden Druckgradienten  $\Delta p$  und der Blutviskosität  $\eta$ . Man setzt aber voraus, dass es sich um laminare Strömungen Newtonscher Flüssigkeiten und ein gerades Rohr mit starren Wänden handelt. Daher lassen die Berechnungen bei Gefäßsystemen nur einen Näherungswert zu.

$$\frac{V}{t} = I = \frac{\pi * \Delta p * r^4}{8 * \eta * l} \quad \text{Formel (3)}^{73}$$

Somit ergibt sich zum Beispiel für eine Kollaterale mit 30 µm Durchmesser ein Volumenfluss von ca.  $6 \cdot 10^{-9}$  m<sup>3</sup>/s.

Der Durchmesser der Kollateralgefäße vergrößert sich in 4 Wochen nach der Ligatur bei Mäusen (Balb/c) um das 2,6fache. Nach dem Hagen-Poiseuille-Gesetz wächst die Konduktanz um die 4. Potenz. Damit steigert sich die Konduktanz in diesem Fall um den Faktor  $2,6^4 = 26$ . Da das Hagen-Poiseuille-Gesetz von Newtonschen Flüssigkeiten und starren Wänden aus-

geht, ist es in diesem Fall nicht anwendbar. Laut Wetzler<sup>74</sup> steigert sich die Konduktanz nur um den Faktor 2,5, was unseren experimentellen Daten (Faktor 3,2 - 25) entspricht.

Die A. femoralis besitzt auf Höhe des Abgangs der A. profunda femoris einen Durchmesser von ca. 150-170  $\mu\text{m}$ . Während der Arteriogenese wachsen die 5 präexistierenden Kollateralen von 35  $\mu\text{m}$  Durchmesser auf ca. 80  $\mu\text{m}$  nach 21 Tagen. Gleichzeitig steigt auch die im LDI gemessene Durchblutung an, erreicht aber nicht vollständig das Ausgangsverhältnis. Da der Widerstand eines Gefäßes abhängig von der Länge in Verhältnis zum Querschnitt ist, und man die Kollateralen als parallelgeschaltete Widerstände interpretieren kann, ist nach der 2. Kirhhoff-schen Regel die Summe parallelgeschalteten Widerstände kleiner ist als der kleinste der einzelnen Widerstände. Daher kann der kompletten Blutfluss, der ursprünglich durch die A. femoralis floss, durch die gewachsenen Kollateralen kompensiert werden. Am Ende der Arteriogenese erreichen die Kollateralen mit einem durchschnittlichen Radius von 44,5  $\mu\text{m}$  52% des Femoralisradius (85  $\mu\text{m}$ ). Allein die Summe der Lumina der meist fünf entwickelten Kollateralen ergab in unseren Versuchen eine gesamte Fläche von circa 34000  $\mu\text{m}^2$  im Vergleich zu der ursprünglichen Arteria femoralis mit circa 26000  $\mu\text{m}^2$ .

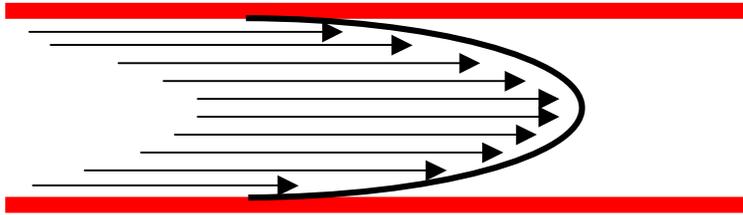
Bei fünf regelmäßig ausgebildeten Kollateralgefäßen –gleiche Bedingungen für alle Kollateralen vorausgesetzt– muss jede Kollaterale 20% des ursprünglichen femoralen Blutflusses übernehmen. Da nach dem Hagen- Poiseuille Gesetz der Radius in der 4. Potenz die Stromstärke beeinflusst, muss man die 4. Wurzel dieser aus dem Verhältnis der Radien zueinander ziehen. So erhält man den eigentlich nötigen Radius (56  $\mu\text{m}$ ), der nötig wäre, damit alle fünf Kollateralen den intakten Blutfluss der A. femoralis kompensieren können. Dieser beträgt also 65% des Femoralisradius.

Die Scherkraft entlang des Endothels ist von der 4. Potenz des Gefäßradius abhängig. Daher müsste die Scherkraft mit wachsendem Gefäßdurchmesser weiter steigen und weiteres Wachstum auslösen. Aber ab einem gewissen Schwellenwert der Durchblutung scheinen autoregulatorische Prozesse die weitere Zunahme zu drosseln, wodurch die Scherkräfte nicht weiter ansteigen und dieser Wachstumsauslöser sistieren. Dies könnte der Grund sein, weshalb die Arteriogenese vor dem Erreichen eines „mathematisch nötigen“ Radius abbricht.

## **V.6. Korkenzieherform der Kollateralen**

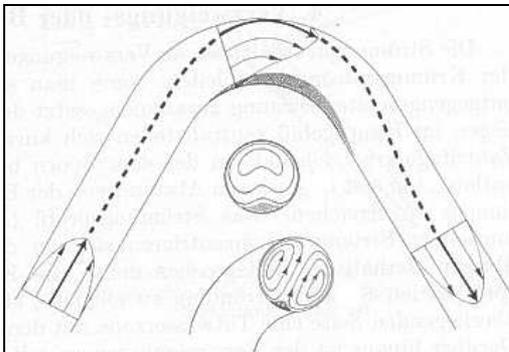
Nach Murray's Vorstellung<sup>76</sup>, ist das gesamte Kreislaufsystem so aufgebaut, dass die zur Stabilisierung des Systems notwendige Energie so gering wie nötig gehalten wird. Daher passt sich die Gefäßwand an die neuen Bedingungen an und stabilisiert die Scherkräfte<sup>77</sup> bei ca. 15 dyn/cm<sup>2</sup> in Gefäßabschnitten dieses Durchmessers. Im Rahmen dieser Anpassungen kommt es aber zu unterschiedlichen Zellwachstum in den verschiedenen Abschnitten der Kollaterale.

Blut besitzt als nicht-newtonsche Flüssigkeit einen asymmetrischen Primärfluss (s. Abbildung 58) mit einem parabolischen Flussgradienten, sodass genaue Aussagen zur exakten Scherkraft an den Endothelzellen (noch) nicht möglich sind.



**Abbildung 58:** Asymmetrischer Primärfluss

Hinzu kommt, dass in gekrümmten Gefäßen der Blutfluss auch Wirbel entwickelt und so in den Kurven eine höhere Scherkraft auf das Endothel wirkt (Abbildung 59 sollt dies schematisch darstellen<sup>51</sup>). Geht man davon aus, dass die erhöhten Scherkräfte ein elementarer Faktor der Arteriogenese darstellt, kann man die Korkenzieherform durch die stärkere Scherkräfte in den Kurven und die so bedingte verstärkte Hypertrophie der Zellen der Gefäßwand in diesem Bereich erklären.



**Abbildung 59:** Flussveränderungen in gekrümmten Gefäßen bei nicht Newtonschen Flüssigkeiten, veränderter Verlauf der Isotachen im Krümmer.

Außerdem konnten wir, wie vorher Scholz et al.<sup>12</sup>, zeigen, dass während der Arteriogenese ein Wachstum der Gefäßwand mit Zunahme der Zellzahl und Vergrößerung der Zellen stattfindet. Durch den asymmetrischen Primärfluss und die zusätzliche Strömungsentstehung (s. Abbildung 59) verstärken sich die Scherkräfte am Endothel der gebogenen Kollateralgefäße. Dies kann eine Ursache für Korkenzieherform der gewachsenen Kollateralgefäße sein. An einigen Stellen der Arterie bestehen bereits Biegungen, an denen durch den gesteigerten Fluss verstärkte Scherkräfte auftreten und die Zellen in diesem Bereich verstärkt stimuliert und ein größeres Wachstum im Vergleich zu Abschnitten der gewachsenen Kollaterale, die weniger unter Einfluss der Scherkräften stehen, fördert. Durch das größere Volumen dieser Zellen biegt

sich das Gefäß an diesen Stellen vermehrt und es kommt durch die Verstärkte Krümmung zur Korkenzieherform.

Bei den Experimenten mit Mibefradil konnten wir jedoch beobachten, dass sich die Korkenzieherform nicht so stark ausgebildet hat, was darauf schließen lässt, dass anfängliche Kompensieren der Zellschwellung wichtig für das Wachstum der Kollateralen ist.

Die Turbulenzen, die sich in den gekrümmten Rohren bilden, bedeuten einen zusätzlichen Energieaufwand zur Anpassung der Gefäßwand an stärkere mechanische Kräfte. Auch dies könnte das Wachstum der Endothelzellen während der Arteriogenese drosseln. Hinzu kommt, dass in den Arteriolen der Fluss pulsierend ist. Trotzdem wird die kritische Reynolds-Zahl von 2000 nicht erreicht, weswegen das Auftreten von Turbulenzen nicht wahrscheinlich ist<sup>135</sup>.

Durch die Korkenzieherform wird die Kollaterale erheblich länger, was zusammen mit der Biegung den Widerstand erhöht.

### ***V.7. Verlangsamung der Arteriogenese durch Blockade der endothelialen Chlorid-Kanäle mit Mibefradil***

Die Gewebischämie spielt während der Angiogenese eine Rolle, während die Arteriogenese eher durch mechanische Kräfte zustande kommt. Diese Hypothese wird durch die Hypoxie abhängigen Faktoren (Laktatdehydrogenase A, HIF-1alpha), die zu einer gesteigerten Expression angiogener Faktoren während der Ischämie führen, bestätigt<sup>78,79</sup>. Genauso finden sich Zeichen der Gewebischämie (Abnahme von Sauerstoffabhängigen Molekülen wie ATP oder Kreatinphosphat und Anstieg der Abbauprodukte wie Adenosine, Inosine, Hypoxanthine, Laktat) in den Bereichen des Kollateralwachstums<sup>79</sup>.

Die räumliche Trennung zwischen Bereichen der Angiogenese und der Arteriogenese ist zu groß, als dass Ischämie in beiden Fällen der auslösende Faktor sein könnte. Genauso findet in Gebieten der Angiogenese ein Abfall der Scherkräfte wegen der Abnahme der Durchblutung statt.

Der genaue Mechanismus, der vom Anstieg der Scherkräfte zur Arteriogenese führt ist bisher unbekannt. In früheren Studien wurde gezeigt, dass Volumen abhängige endotheliale Chlorid-Kanäle eine Rolle bei der Reaktion des Endothels auf erhöhte Scherkräfte spielen<sup>21</sup>. Diese Hypothese wird durch in vitro Untersuchungen mit Inhibitoren dieser Volumen abhängigen Ionenkanälen, einschließlich Mibefradil, zu einer Hemmung der Endothelproliferation führten<sup>22,80</sup>. Dies lässt die Vermutung zu, dass diese Ionenkanäle eine Rolle bei der Arteriogenese spielen.

Mibefradil (Posicor<sup>®</sup>, Ro 40-597) ist ein neuer Calcium-Antagonist mit hoher Bioverfügbarkeit und mit gut toleriertem antihypertensiven und antiischämischen Effekt, der zusätzlich ischämisch induzierte Ventrikelfibrillationen ohne negativen inotropischen Effekt vorbeugt. Es ver-

stärkt vermutlich die endotheliale NO-Wirkung und scheint einen antiproliferativen Effekt auf glatte Muskelzellen nach Gefäßverletzung zu haben<sup>80,81</sup>. Gleichzeitig zeichnet sich Mibefradil durch eine 10fach höhere Affinität zu T-Type  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle als auf andere Kanaltypen (L, N, Q, R)<sup>82,83,84</sup>. Das Gen für diesen Ionenkanal (CLNS1B) befindet sich beim Menschen auf den Chromosomen 11 und 6, bei der Maus auf den entsprechenden Chromosomen 2 und 7<sup>85</sup>. Der volumenabhängige Chloridkanal ist ein Protein, dessen Aminosäuresequenz sich zwischen den Spezies kaum unterscheidet (z.B. 92.7% Übereinstimmung Mensch – Hund)<sup>85</sup>. Da dieser Ionenkanal ubiquitär vorkommt, kann man davon ausgehen, dass er eine elementare Rolle bei der Zellhomeostase spielt.

Die Neointimahemmung scheint nur von der Blockade der spannungsabhängigen T-Typ Calciumkanäle abzuhängen. In nachfolgenden Studien wurde als Nebeneffekt des Mibefradil die Blockade der volumenabhängigen Chloridkanäle untersucht<sup>82,86</sup> und einen engen Zusammenhang zwischen der Blockade dieser Kanäle und der Inhibition der endothelialen Zellproliferation gefunden<sup>14</sup>.

Der Inhibitionsgrad der Zellproliferation war direkt abhängig von der gegebenen Konzentration Mibefradil, was sich auch bei anderen, strukturell und pharmakologisch unterschiedlichen Inhibitoren der volumenabhängigen Ionenkanäle zeigte, sodass man davon ausgehen kann, dass die Endothelzellproliferation direkt von diesen volumenabhängigen Ionenkanälen abhängt<sup>87</sup>.

Die Frage, ob eine Hochregulierung dieser Ionenkanäle der auslösende Faktor in der Arteriogenese oder ein Teil in den Anpassungsreaktionen der Endothelzelle auf die erhöhten Scherkräfte ist, ist bisher ungeklärt. In einer anderen Studie wurde anhand der Überexpression von T-Typ Calciumkanälen in HEK-293 Zellen eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration verursacht, ohne dass es zu Veränderungen im Zellzyklus oder Proliferation kam<sup>88</sup>.

Wir vermuten, dass die Hemmung des Kollateralwachstums durch Mibefradil auf der Inhibition der volumenabhängigen Chloridkanäle basiert.

Da bisher keine Untersuchungen mit Mibefradil bei Mäusen durchgeführt wurden, rechneten wir die bekannte Plasmakonzentration des Mibefradils bei Ratten auf Mäuse um.

Die Dosis betrug 0.65  $\mu\text{M}$ . Frühere Studie mit Ratten zeigten, dass pharmakologisch aktive Mibefradilabbauprodukte die anfängliche Mibefradilkonzentration um das 2,8fache überschreiten<sup>90</sup>. Deshalb benutzten wir eine anfängliche Konzentration von 0.65  $\mu\text{M}$ , entsprechend einer Mibefradilkonzentration von 0.1-10  $\mu\text{M}$  bei in vitro Chlorid-Kanal Inhibitionsversuche<sup>89</sup>.

In unserem Mausmodell untersuchten wir die Wirkung von Mibefradil auf die Arteriogenese. Wir fanden eine verminderte Perfusionswiederherstellung in den Hinterläufen der Mibefradilbehandelten Gruppe nach 7 Tagen. Dies zeigte sich in der Messung der Sauerstoffsättigung und des Blutflusses im Laser-Doppler. Genauso konnten wir schon makroskopisch ein verringertes

Kollateralwachstum im Vergleich zu der PBS-Kontrollgruppe in den Röntgenbildern und den Aufsichtsfotografie wahrnehmen, was sich in der morphometrischen Auswertung des geringeren Durchmessers der Kollateralgefäße bestätigte.

Die Morphologie zeigte die Zellschwellung einer der ersten sichtbaren Reaktionen der Endothelzelle in den ersten 24 Stunden auf erhöhte Scherkräfte ist. Die Aufrechterhaltung des Zellvolumens spielt eine essentielle Rolle in der Homeostase der Lebewesen. Die Zellschwellung führt zu der Aktivierung von Ionenkanälen zur „Ausscheidung“ osmotisch aktiver Teilchen und zur Volumenregulierung. Die volumenabhängigen Ionenkanäle scheinen hier die Hauptrolle zu spielen. Durch ihre Blockade kann man anscheinend den proliferationsfördernden Calciumfluss hemmen<sup>90</sup>. Gleichzeitig steigt durch die Ionenkanalblockade der intrazelluläre pH-Wert an, was wiederum die für den Zellzyklus wichtigen Kinasen hemmt und die Endothelzelle im Stadium G0/G1 hält<sup>91</sup>.

Insgesamt zeigen diese Daten und unsere Ergebnisse, dass der volumenabhängige endotheliale Chloridkanal, der durch Scherkräfte aktiviert wird<sup>25,92</sup>, eine Rolle am Anfang der Arteriogenese spielt.

Angiogenese und Arteriogenese sind wahrscheinlich die relevanten Gefäßwachstumsformen im erwachsenen Organismus. Sie unterscheiden sich in den auslösenden Faktoren und beteiligten Mediatoren<sup>93,94,95,96,97</sup>. Andererseits gibt es Faktoren, die in beiden Prozessen eine Rolle spielen, wie z.B. die Matrix-Metalloproteinases, FGF-2, PLGF<sup>98,99,100</sup> und die volumenabhängige Ionenkanäle.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass der Mechanismus der Aktivierung des volumenabhängigen endothelialen Chloridkanals während der Arteriogenese eine relevante Rolle spielt und eine Hemmung dieser Ionenkanäle zu einer Verlangsamung der Arteriogenese führt.

## ***V.8. Fibroblast Growth Factor-2 hat eine Arteriogenese fördernde Wirkung***

Untersuchungen haben gezeigt, dass heparinbindende Wachstumsfaktoren, unter anderem FGF-2 und VEGF, eine proangiogene Wirkung in in vivo Modellen besitzen. Der Fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2, auch als basic FGF bezeichnet) gehört zu einer großen Wachstumsfaktorengruppe mit 19 ähnlich strukturierten Proteinen, die sich durch eine hohe Affinität zu bestimmten transmembranösen Rezeptoren, die aus einer Transmembran-Domäne und einer intrazellulären Tyrosine-Kinase-Domäne bestehen, auszeichnet. FGF-2 ist ein 18 kD großes, heparinbindendes Protein, das ausschließlich aus  $\beta$ -Faltblatt-Strukturelementen besteht. Das entsprechende *fgf2*-Gen befindetet beim Menschen auf dem Chromosom 4 (q26 - q27) und kann bidirektional transkribiert werden. FGF-2 besitzt verschieden Isoformen (18, 22, 22,5 24, 34

kD)<sup>101</sup>. Durch Bindung des FGF-2 kommt es zu einer Dimerisierung und Aktivierung des Rezeptors<sup>102</sup>. FGF-2 wurde in der Hypophyse entdeckt<sup>30</sup>, und fördert die Proliferation glatter Muskelzellen<sup>31</sup> und Endothelzellen<sup>32</sup>.

FGF-2 ist in fast allen Organen nachgewiesen worden, es besitzt aber eine essentielle Rolle während der embryonalen Vaskulogenese, da das Ausschalten des Rezeptor letal ist<sup>30</sup>. FGF-2-mRNA und FGFR1-mRNA konnten in proliferierenden Endothel- und glatten Muskelzellen in in vitro und in vivo Modellen nach Alteration der Gefäßwand in stärkerer Expression nachgewiesen werden<sup>32</sup>. Versuche nach Gefäßballondilatationen bei Ratten zeigten eine Hemmung der Neointimabildung nach Injektion FGF-2 neutralisierender Antikörper<sup>103</sup>. FGF-2-/- Mäuse sind lebensfähig, aber die Angiogenese ist bei diesen Mäusen, wenn auch nur in geringem Maße, verlangsamt<sup>104,105</sup>. Auch an Herzgefäßen scheint FGF-2 eine Rolle zu spielen. Nach intra-myokardialer FGF-2 Gabe kam es zu einer Steigerung der kollateralen Durchblutung<sup>106</sup>.

Die Steigerung der Durchblutung des distalen Gewebes nach beidseitiger Okklusion der A. femoralis unter Belastung (Laufband) wurde mittels Mikrosphären untersucht<sup>42</sup>. In früheren Studien konnte die Gruppe um Terjung<sup>33</sup> zeigen, dass die Gabe von FGF-2 den Blutfluss im distalen Gewebe unter Belastung um das 200fache steigern kann. FGF-2 scheint auch bei älteren Ratten die Verbesserung der Durchblutung zu fördern<sup>107</sup>. Die durchblutungssteigernde Wirkung von FGF-2 unter Belastung wurde auch an anderen Tiermodellen nachgewiesen: Schweineherz<sup>108</sup>, Rattenhinterläufe<sup>109</sup> und Nagerhinterläufe<sup>110</sup>.

Die konkrete Rolle des FGF-2 in der Arteriogenese ist noch nicht geklärt. Unter normalen Bedingungen wird FGF-2 von Endothelzellen und Makrophagen, nicht aber von glatten Muskelzellen sezerniert. Makrophagenansammlungen in der Adventitia von wachsenden Kollateralarterien produzieren FGF-2 bei Kaninchen<sup>29</sup> und bei Mäusen<sup>30</sup>, genauso konnte ein perikollateraler Anstieg von FGF-Rezeptoren festgestellt werden<sup>111</sup>.

Ein auslösender Faktor für die FGF-2-Sezernierung ist der Anstieg der Scherkräfte an Endothel, da in in vitro-Versuchen die FGF-2-Konzentration bei erhöhtem shear stress in glatten Muskelzellen beim Schaf nach 1 Tag anstieg und nach 3 bis 7 Tagen ihr Maximum erreichte<sup>112</sup>. Erhöhten FGF-2-Konzentrationen liessen sich auch in Endothelzellen<sup>112</sup> nachweisen. FGF-2 scheint also eine wichtige Rolle in den Umbauprozessen während der Arteriogenese und den Veränderungen der glatten Muskelzellen zu spielen.

In unserem Mausmodell sind die erhöhten Scherkräfte am Endothel der Arteriogenese die auslösenden Faktoren, daher sollte bei FGF-2-/- Mäusen nach Ligatur der A. femoralis und erhöhter Durchblutung der Kollateralen ein geringeres Kollateralwachstum stattfinden. Wider Erwarten zeigten die FGF-2 "knockout" Mäuse in unseren Experimenten (s IV.5.1) im Vergleich zu den Kontrollmäusen keine Defizite in der Arteriogenese. Das lässt vermuten, dass die

Funktion des FGF-2 durch andere Faktoren kompensiert werden kann, da FGF-2/--Mäuse lebensfähig sind und keine Anomalien aufweisen. Bereits Sullivan et al. zeigten, dass die selektive Ausschaltung des *fgf-2* Gens keine Auswirkung auf die Arteriogenese und Angiogenese nach Ligatur der A. femoralis hat<sup>113</sup>. Diese Daten und unsere Ergebnisse, wenn auch in einer kleinen Gruppe, stimmen überein und zeigen, dass Rolle des FGF-2 weiter geklärt werden muss.

Die exogene intra-arterielle FGF-2 Gabe nach Ligatur der A. femoralis via osmotischer Mikropumpe (s. IV.5.2) fördert die Arteriogenese wie wir in unseren Experimenten zeigen konnten. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei anderen Gruppen<sup>110</sup>, die eine deutliche Verbesserung der Arteriogenese bei Mäusen mit Überexpression von FGF-2 unter Kontrolle des Phosphoglycerat-Kinase-Promoter durchführten. Die erhöhte FGF-2-Konzentration im Blut, sei es durch Überexpression oder durch exogene Zufuhr, hat einen fördernden Effekt auf die Arteriogenese.

## ***V.9. Arteriogenese und Angiogenese: Zwei unterschiedliche Anpassungsreaktionen***

Unsere Ergebnisse zeigen, dass das Wachstum und der Umbau präexistierender, arteriolärer Umgehungskreisläufe zu Kollateralgefäßen (Arteriogenese) hauptsächlich der Wiederherstellung der Durchblutung nach Verschluss eines arteriellen Gefäßes dient. Andere Gruppen<sup>38</sup> erklären die Verbesserung der Durchblutung der Mäusepfote nach der Ligatur der A. femoralis durch neues Gefäßwachstum (Angiogenese) und widersprechen unseren Ergebnissen.

Die Hypoxie wird von zahlreichen Autoren für das Wachstum der Gefäße als auslösenden Faktor verantwortlich gemacht<sup>114,115</sup>. Durch die Bildung proangiogener Faktoren (VEGF, HIF-1)<sup>2,4,116</sup> kommt es zur Angiogenese. Das Wachstum neuer Kapillaren bedeutet die koordinierte Migration, Proliferation und Differenzierung endothelialer Zellen und Perizyten aus bestehenden Gefäßen<sup>2</sup>.

In unserem Modell trifft dies auf die Angiogenese im Musculus gastrocnemius nach Ligatur der A. femoralis zu. Dort tritt im Moment der Ligatur eine Gewebsischämie auf, die über die proangiogene Faktorenfreisetzung zu einer Zunahme der Kapillardichte als Zeichen des Gefäßwachstums führt. Die Untersuchung der Kapillardichte in den Muskeln des Oberschenkels (M. gracilis anticus und semitendinosus) und denen des Unterschenkels (M. gastrocnemius) zeigte eine Zunahme der Kapillardichte um das 1,7-fache in den Mm. gastrocnemii, während in den Muskeln des Oberschenkels die Kapillardichte konstant bleibt. Diese Ergebnisse stimmen mit

denen anderer Gruppen überein<sup>12,14</sup>. Der Unterschied zwischen Angiogenese und Arteriogenese im proximalen Gewebe wurde auch von anderen Gruppen bestätigt<sup>117</sup>.

In den Bereichen, in denen das Kollateralwachstum eintritt, ist die Hypoxie nicht stark genug um ein Kapillaraussprossung auszulösen. In perikollateralen Skelettmuskeln haben Deindl et al.<sup>82</sup> während der Arteriogenese keine direkten Zeichen der Ischämie festgestellt. Sie übertrugen das Mausmodell auf Kaninchen und zeigten, dass weder endogenes noch hinzugefügtes VEGF Arteriogenese auslösen. Die Konzentrationen von den VEGF-Rezeptoren VEGFR1 und VEGFR2, HIF1 und ischämische Metaboliten im perikollateralen Geweben waren nicht abhängig von der Ligatur.<sup>118</sup>

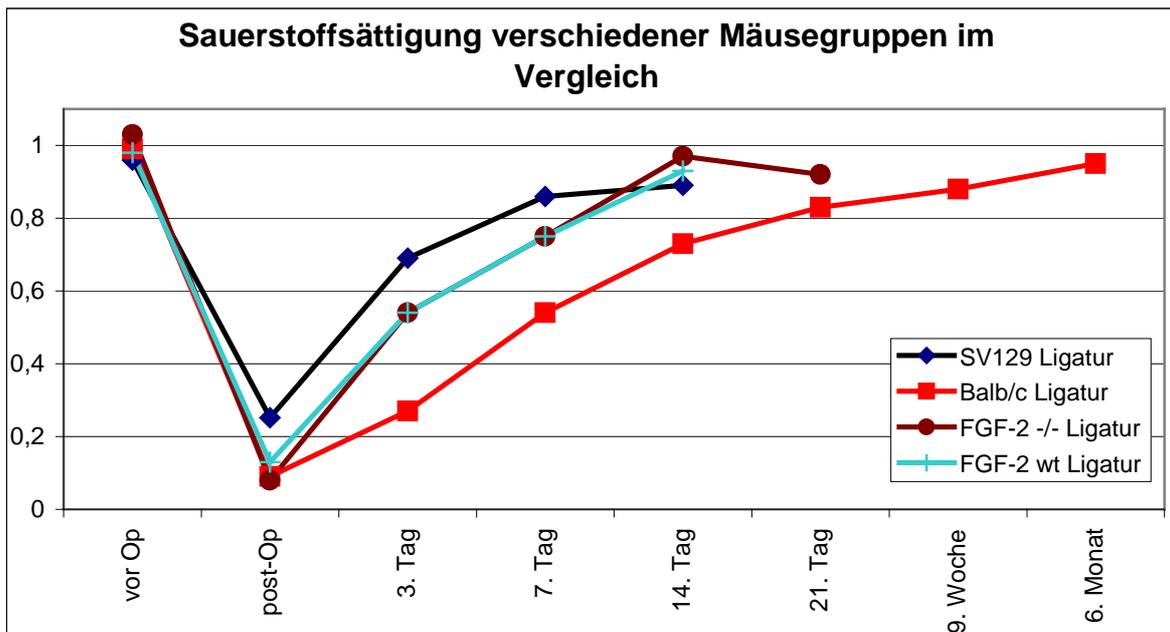
In den Extremitäten kann eine Vergrößerung der präexistierenden Kollateralgefäße (Arteriogenese) die Versorgung des distal der Okklusion gelegenen Gewebes besser garantieren als die Erhöhung der Kapillardichte durch Angiogenese.

Arteriogenese und Angiogenese besitzen gemeinsame biochemische Prozesse und sind wahrscheinlich zu einem gewissen Anteil eine Rekapitulation der Vaskulogenese, die unterschiedliche Auslöser benötigen und zu unterschiedlichen Anpassungsreaktionen führen.

Andere Gruppen zeigten, dass im älteren Organismus die Fähigkeit zur Arteriogenese, untersucht wurden die A. femoralis<sup>66</sup> und die Mesenterialarterien<sup>119</sup>, nicht dauerhaft erhalten bleibt. Wir benutzten ausschließlich 11 Wochen alte Tiere.

### **V.9.1. Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen Balb/c und sv129**

Auffällig war die unterschiedliche Fähigkeit zur Arteriogenese bei den unterschiedlichen Kontrolltiergruppen. Die gewonnenen Werte der verschiedenen Gruppen unterschieden sich nicht sehr. Vor Operation war, wie zu erwarten, die Sauerstoffsättigung seitengleich und fiel nach der Ligatur der A. femoralis natürlich auf der okkludierten Seite ab. Es fand eine rasche Besserung der Hämoglobinsättigung nach 3 Tagen statt. Ab dem 7. Tag erreichten alle Gruppen außer der Balb/c-Gruppe ein Verhältnis zwischen der okkludierten und der nicht okkludierten Seite von ca. 0,8. Das Ausgangsverhältnis wurde allerdings auch nach 3 Wochen nicht mehr erreicht. Auffällig ist die langsamere Besserung der Sättigungskurve der Balb/c-Gruppe (s. Abbildung 60). Diese Gruppe erreicht erst nach 6 Monaten das seitengleiche Ausgangsniveau. Dies zeigte sich auch in den im LDI gewonnen Daten zum Blutfluss in den Pfoten nach Ligatur. Es scheint auch bei den Kontrolltieren statistisch relevante Unterschiede zu geben.



**Abbildung 60:** Verlauf der Sauerstoffsättigung bei verschiedenen Gruppen mit Ligatur der A. femoralis. Auffällig ist der Unterschied zwischen der raschen Besserung der Sauerstoffsättigung der FGF-2- und sv129-Gruppen im Vergleich zur Balb/c-Gruppe, die erst nach 6 Monaten in den Bereich der seitengleichen Sättigung kommt.

Gleiche Verläufe zeigen sich bei den Laser-Doppler-Messungen. Die Abbildung 23 zeigt den Verlauf der Durchblutung bei sv129-Mäusen und setzt diese Daten in Vergleich zu den Balb/c-Mäusen. Bei den sv129 verbesserten sich die Ergebnisse der Durchblutung im Laser-Doppler schneller als bei den Balb/c. Dies muss beim Vergleich der untersuchten Gruppen mit diesen Kontrollgruppen beachtet werden, um die Veränderungen des Blutflusses beurteilen zu können.

## V.10. Beurteilung der Methoden

### V.10.1. Mausmodell für Arteriogenese

Interessanterweise findet man beim Menschen an der Bifurkation der Arteria femoralis (Femoralsgabel bis Adduktorenkanal) ca. 50% der chronischen Arterienverschlüsse<sup>1,47</sup>, was anatomisch der Lokalisation der Ligatur in unserem Mausmodell entspricht. Bei der Claudicatio intermittens kommt es durch den langsamen Verschluss der A. femoralis/A. Iliaca communis zum Wachstum der Umgehungskreisläufe, die den Blutfluss im peripherem Gewebe erhalten können. Nur unter Belastung kann es zu einer insuffizienten Versorgung kommen. Durch die dann anaerobe Stoffwechsellage im peripheren Muskelgewebe kommt es zum Anstieg von sauren

Stoffwechselprodukten, z.B. Laktat, was zu Schmerzen führt. Bei Nachlassen der Belastung ist die Blutversorgung durch die Kollateralgefäße wieder ausreichend.

In unserem Mausmodell konnten wir zeigen, dass keine Neuentstehung von Kollateralgefäßen stattfindet. Aus präexistierenden Verbindungen in Endstromgebiet der Arteriolen in den einzelnen Muskeln bestehen Verbindungen, die sich bei veränderten Strom- und Druckbedingungen zu Kollateralgefäßen entwickeln können.

Im Unterschied dazu kann im distal der Arteriogenese gelegenen Gewebe die hypoxiebedingte Angiogenese stattfinden und zu einer Kapillardichtezunahme führen.

Wir konnten auch mittels der osmotischen Mikropumpe die Wirkung verschiedener Stoffe auf die Abläufe der Arteriogenese beobachten, und waren nicht nur auf genetisch manipulierte Mäuse mit fehlender Expression bestimmter Faktoren angewiesen.

Eine der wichtigen Beobachtungen bei der Durchblutungsmessung bei Mäusen war, dass die genetisch verschiedenen Stämme sich voneinander sehr stark unterscheiden. Diese Unterschiede könnten fälschlicherweise als Effekt einer experimentellen Behandlung bzw. der inaktivierten Gene interpretiert werden<sup>120</sup>. Glücklicherweise sind die Unterschiede zwischen etablierten Mauslinien reproduzierbar. Als Folge sollten möglichst alle Versuche mit Mäusen von demselben Stamm vom selben Lieferanten durchgeführt werden. Wildtyp-Kontrollen für "knock-out" Mäuse müssen wenigstens fünf Generationen rückgekreuzt werden.

## **V.10.2. Durchblutungsmessung mit Laser-Doppler**

Das Laser-Doppler-Imaging (LDI) ist eine nicht-invasive, unbegrenzt wiederholbare Methode zur Messung des Blutflusses bei Mäusen<sup>41</sup>. Es lässt einen in vivo Vergleich der Durchblutung zwischen beiden Extremitäten zueinander zu. Eine Messung des absoluten Flusses ist leider nicht möglich, da es an einer Kalibrierungsmöglichkeit mangelt. In unserem Modell war das LDI eine der wichtigsten Auswertungsmethoden. Das LDI hängt aber von der Standardisierung der Untersuchungssituation, insbesondere der Raumtemperatur, ab.

Andere Gruppen<sup>38</sup> benutzten auch den LDI zur Messung der Pfortendurchblutung. Im Unterschied zu unserem Versuchsaufbau wurde aber bei diesen Gruppen eine Exzision der A. femoralis im gleichen Abschnitt durchgeführt. Sie fanden geringere Unterschiede zwischen der okkludierten und Kontrollseite. In unseren Versuchen schlossen wir Tiere mit Nekrosen an den Extremitäten aus und erhielten die Femoralvene und -nerv. Dies scheint bei den oben genannten Gruppen nicht der Fall zu sein. In Abbildungen der Publikationen dieser Gruppen kann man massive Nekrosen der Pfoten erkennen -10% Nekroseraten werden angegeben<sup>104</sup>-, die<sup>38</sup> trotzdem ausgewertet wurden. Zusätzlich kann man auf den Abbildungen erkennen, dass die Pfoten

nicht korrekt fixiert wurden und der Laserstrahl nicht die gesamte Pfotenoberfläche scannen kann.

### **V.10.3. Hämoglobin-Sauerstoffsättigung**

Insgesamt erreicht die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins nach der Ligatur schneller Normalwerte als die Ergebnisse der im Laser Doppler gemessenen Durchblutung.

Gemessen wird die Hämoglobin-Sauerstoffsättigung in der gesamten Pfote. Eine Erklärung für die rasche Normalisierung ist der erniedrigte Stoffwechsel der Extremität, sodass gar nicht der gesamte angebotene Sauerstoff verbraucht wird. Zusätzlich kommt es durch die Gewebshypoxie im Verlauf zur Muskelatrophie, wodurch der Bedarf zusätzlich gesenkt wird.

Ausserdem befand sich die Pfote während der Messung längere Zeit in Ruhe, wodurch der Stoffwechsel und damit der Sauerstoffwechsel geringer war.

Die Hämoglobin-Sauerstoffsättigung ist ein indirekter Blutflussparameter und läßt daher keinen direkten Schluss auf das Kollateralwachstum zu.

### **V.10.4. Radiologische Auswertung**

Häufig wird die Auswertung von Angiogrammen zur Bestimmung des Kollateralwachstums benutzt. Die Auflösung der Röntgenangiogramme ist für eine qualitative Auswertung ausreichend, lässt aber eine Quantifizierung nicht zu. Auch der entwickelte "Angiographic score" oder "angiographically visible collateral vessels"(Anzahl der Kreuzungen sichtbarer Gefäße auf einem Standard-Gitter)<sup>9,121,122</sup> kann nicht suffizient das Kollateralwachstum bestimmen. Die Arteriogenese führt nur zu einer Verdickung, aber nicht zur Vermehrung der Linien auf dem Angiogramm, was morphometrische Methoden nicht erfassen können. Durch die Arteriogenese kann der "Angiographic score" also gar nicht steigen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Angiografie nur der qualitativen Beurteilung des Gefäßwachstums dienen kann.

### **V.10.5. Lichtmikroskopische Morphometrie**

Die Morphometrie der Gefäße im mikroskopischen Bereich ist die sicherste Methode zur Erfassung des Gefäßwachstums und der Veränderungen im Bereich der gesamten Gefäßwand.

Ein Rückschluss auf die Veränderungen des Blutflusses allein anhand der mikroskopischen Morphometrie ist nicht möglich<sup>9,123</sup>. Diese Methode hängt sehr von der Qualität der Schnitte ab, insbesondere von der ausreichenden und korrekten Perfusionsfixierung und der Dicke der Schnitte. Hinzukommt, dass in den Schnitten die Gefäße selten senkrecht angeschnitten

werden und die Arterien sich oval darstellen. Zur Bestimmung des Durchmessers benutzen wir den kleinsten Radius der geschnittenen Ellipse.

Die Morphometrie hat sich als "goldener Standard" erwiesen, wenn es darum geht, das Wachstum von Arterien und die morphologischen Veränderungen zu beweisen, ist aber leider nicht sensitiv genug, um die kleineren Unterschiede zwischen experimentellen Gruppen statistisch signifikant zu erfassen. Der Fluss in einer Arterie ist von der 4. Potenz des Radius (Hagen-Poiseuille-Formel) abhängig. Durch die Fixierung und die Einbettung kann es zu kleinen Veränderungen des Gefäßdurchmessers kommen, die sich dann potenzieren. Ausserdem trifft man beim Schneiden nie den senkrechten Durchmesser der Gefäße, sondern meist eine Ellipse. Der eigentliche Durchmesser ist schwer zu erfassen, sodass Unterschiede zwischen den Gruppen sich nicht mit ausreichender Signifikanz darstellen lassen.

Die licht- und elektronenmikroskopische Morphometrie ist der „goldene Standard“ zur Erfassung von morphologischen Veränderungen in der Gefäßwand und im umgebendem Gewebe. Ein Rückschluss auf den Blutfluss selbst ist aber wegen der hohen Fehleranfälligkeit nicht möglich.

### **V.10.6. Fluoreszierende Mikrosphären zur Bestimmung der Durchblutung**

Die Untersuchung des Blutflusses mit intraaortal infundierten fluoreszierenden Mikrosphären mit 10 und 15 µm Durchmesser ergab Daten mit zu grossen Abweichungen.

Obwohl wir die Mikrosphären wie in Untersuchungen anderer Gruppen<sup>42,124,125,126</sup> direkt in die obere Aorta descendens unter kontrolliertem Druck spritzten, war die Verteilung in den Nieren nicht immer seitengleich, obwohl in anderen Fällen erfolgreich mit dieser Methode gearbeitet wurde.

Die in den Nieren gezählten Mikrosphärenmengen unterschieden sich sehr, obwohl wir den Anweisungen des Herstellers der Mikrosphären (FluoSpheres®, Leiden, NL) folgten und direkt vor der Injektion die Mikrosphären mittels Vortex und Ultraschallbad in Suspension brachten. Die in den Nieren der verschiedenen Tiere ausgezählten Mikrosphären wichen sehr voneinander ab (zwischen 17615 und 40 Mikrosphären bei durchschnittlich 20 Schnitten pro Niere und einer Schnittdicke von 15 µm). Injiziert wurden durchschnittlich 800000 Mikrosphären in 5 ml NaCl-Tween 80-Lösung. Unter dem Mikroskop konnte man auch regelmässig die Verklumpung der Mikrosphären mit der anschließenden Veränderung des Flusses in den Arteriolen der Nieren beobachten.

Auffällig ist aber, dass die Mikrosphärenverteilung in den Muskeln bei dieser Gruppe trotzdem denen anderer Durchblutungsauswertungen mittels anderer Methoden (LDI, Sauerstoffsättigung) entsprachen. Das Problem liegt offensichtlich in der geringen Größe der Mäusegefäße. Kommerziell erhältliche Mikrosphären haben einen Durchmesser von 10 µm

oder 15  $\mu\text{m}$ . Die prä-existierenden Kollateralarterien mit einem Durchmesser von 30-35  $\mu\text{m}$  können damit schnell durch verklumpte Microsphären verstopft werden. Da die kleinsten Arteriolen bei Mäusen ca. 8-9  $\mu\text{m}$ , Kapillaren 2-3  $\mu\text{m}$  und die roten Blutkörperchen bei Mäusen ca. 6  $\mu\text{m}$  Durchmesser haben, wären ca. 5  $\mu\text{m}$  große Mikrosphären am besten zu verwenden.

In unseren Untersuchungen ergaben die Blutflussbestimmung mit intraaortal applizierten fluoreszierenden Mikrosphären keine sicheren Ergebnisse, was den Erfahrungen anderer Gruppen<sup>125</sup> entspricht. Bei Mäusen fand diese Methode nur einzelne Verfechter<sup>124</sup>.

### **V.10.7. Intraarterielle Injektion durch die osmotische Mikropumpe**

Wir entwickelten ein neues Modell, das es ermöglicht geringe Stoffmengen direkt im Zielbereich intraarteriell zu applizieren. Eine osmotische Mikropumpe wurde den Mäusen subkutan implantiert und mittels eines ebenfalls subkutanen Katheters mit der A. femoralis distal des Abgangs der A. profunda femoris verbunden. Dies ermöglichte es, eine relativ genaue Stoffmenge über einen definierten Zeitraum und einer konstanten Dosierung direkt in den die Kollateralen versorgenden Blutstrom zu geben.

Nachteil dieser Methode ist die schwierige Implantation der Pumpe, bzw. die Katheterisierung der A. femoralis. Anfänglich war die Operationszeit zu lang und die Verletzung der umgebenden Gewebe zu groß, es zeigten sich wiederholt Nekrosen. Auch lösten sich die Katheter anfänglich aus den Gefäßen. Wichtig ist das schnelle, aber gleichzeitige gewebschonende Operieren sowie das Fixieren des Katheters an der richtigen Stelle im Gefäß, weder der Abgang der A. profunda femoris noch die A. poplitea dürfen durch den Katheter oder den entstehenden Zug an den Gefäßen verschlossen werden, um ein wiederholbares Ergebnis zu erlangen. Diese Probleme traten nach einiger Zeit und durch geübte Operateure nicht mehr auf.

Vorteil dieser Methode ist die konstante Dosierung in einem bestimmten Bereich, was die Beobachtung der Wirkung verschiedener Stoffe in vivo ermöglicht. Nicht jeder Stoff ist über diese Methode applizierbar, da es zu Auskristallisierung oder zum Abbau des zu applizierenden Stoffes kommen kann. Man müsste den in der Pumpe verbleibenden Stoff nach der Explantation auf seine verbleibende Wirksamkeit und Konzentration testen. Bedingt durch die geringen Mengen der applizierten Stoff war diese Kontrolle in unseren Experimenten nicht möglich. Aber andere Gruppen zeigten bereits, dass FGF-2 in dem von uns benutzten Lösungsmittel über eine Woche stabil bleibt<sup>33</sup>.

Auffällig war auch die gute Tolerierung der Mikropumpen durch die Versuchstiere. Die in den Vorversuchen aufgetretenen Infektionen, konnten durch die Sterilisation der Katheter im Formaldehyd-Schwenkverfahren und die postoperative Antibiotikagabe beseitigt werden.

Die osmotische Mikropumpe hat sich trotz schwieriger Implantation als Methode zur intraarteriellen Applikation mit einem konstanten Wirkstoffspiegel bewährt.

### **V.10.8. Kapillardichtenbestimmung**

Im Gegensatz zur Arteriogenese findet im Gewebe distal der Arterienligatur durch Hypoxie induzierte Angiogenese statt. Dies zeigt sich in der Zunahme der Kapillardichte in den Mm. gastrocnemii. Eine Zunahme der Kapillardichte wurde auch bei anderen Untersuchungen beobachtet<sup>1416<sup>32,40,127</sup></sup>. Eine andere Untersuchung konnte in den perikollateralen Skelettmuskeln keine direkten Zeichen der Ischämie nachweisen<sup>111</sup>, was unseren Daten der gleichbleibenden Kapillardichte und fehlenden Angiogenese bestätigt. Durch die gedrosselte Blutzufuhr und den herabgesetzten Stoffwechsel kommt es zu einer Muskelatrophie, was wiederum zu einer Erhöhung der Kapillarendichte durch Abnahme des umgebenden Gewebes führt.

Mit der Kapillardichte konnten wir beweisen, dass Arteriogenese und Angiogenese räumlich getrennt statt finden. Es kommt nur im distal der Ligatur gelegenen M. gastrocnemius zu einer Kapillardichtenzunahme, also Angiogenese. In den Muskeln des Oberschenkels findet keine Angiogenese statt, nur die Kollateralgefäße wachsen.

## **V.11. Mögliche klinische Anwendungen der Ergebnisse**

Die Förderung der Arteriogenese kann bei frühzeitig erkannten drohenden Gefäßverschlüssen, wie z.B. diabetische Makroangiopathie, Artherosklerose, etc., eine Rolle in der Therapie im klinischen Alltag spielen. Eine Förderung der „prophylaktischen Kollateralbildung“ ist prinzipiell möglich, wodurch die Arteriogenese in den entsprechenden Gefäßen gefördert und die Gewebsnekrose im Moment der Gefäßobliteration reduziert wird. Nach der operativen Entfernung des Embolus (Desobliteration, Bypass mit Y-Kunststoffprothesen, Ballondilatation) beträgt die Rezidivrate nach 5 Jahren 20%<sup>128</sup>. Auch hier wäre eine prophylaktische Arteriogenese sinnvoll, um die Rezidivrate zu reduzieren.

Dagegen spielt eine „therapeutische Arteriogenese“ bei akuten arteriellen Verschlüssen zurzeit keine Rolle, da die Primärversorgung auf jeden Fall chirurgisch erfolgt und die Lyse oder Embolektomie innerhalb der ersten 6-8 Stunden der „Goldene Standard“ darstellt. Leider setzt

die Wirkung der Wachstumsfaktoren auf die Kollateralgefäße erst nach einigen Tagen ein und somit kommt es jenseits des therapeutischen Fensters zu einem Anstieg der Durchblutung.

Während der Tumor-Angiogenese kann die Arteriogenese nach weiteren Untersuchungen eine wichtige Rolle spielen. Gerade bei den längeren zuführenden Gefäßen eines Tumors, z.B. eines gestielt wachsenden Tumors, könnte durch Hemmung der Arteriogenese ein weiteres Wachstum gemindert werden. Untersuchungen mit Tamoxifen<sup>21</sup> haben den Einfluss der Hemmung der Volumen abhängigen Chloridkanälen gezeigt. Aber Hauptangriffspunkt in der Tumorthherapie bleibt die Angiogenese.

Interessant ist auch die Rolle der Monozyten und der im peripherem Blut zirkulierenden Stammzellen während der Arteriogenese und Angiogenese, auf die in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen werden konnte. Arras et al<sup>31</sup> zeigten, dass die Makrophagen während der Arteriogenese in die Gefäßwand migrieren und durch Sezernierung von Wachstumsfaktoren das Kollateralwachstum fördern. Sie sind auch perivaskulären Gewebe nachweisbar.

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass die Arteriogenese ein komplexes, zeitlich abgestimmtes Zusammenspiel vieler Faktoren ist. Man kann an verschiedenen Zeitpunkten das Kollateralwachstum fördern und hemmen. Wir konnten zeigen, dass die Inhibition der volumenabhängigen Chloridkanäle der Endothelzellen zu einer Hemmung der Arteriogenese führt und dass FGF-2 das Kollateralwachstum fördert. Andere Gruppen erforschten die Rolle anderer Faktoren wie z.B. VEGF<sup>129</sup> oder PlGF<sup>129</sup>. Aber keine Untersuchung konnte beweisen, dass die Arteriogenese allein durch einen einzelnen Faktor gefördert bzw. gehemmt werden kann. Dieser „Arteriogenese-Faktor“ wurde bisher noch nicht gefunden. Auch aus diesem Grund spielt die „therapeutische Arteriogenese“ in der heutigen Klinik noch eine untergeordnete Rolle. Fände sich ein Faktor, der alleine das Kollateralwachstum fördern kann, würde dieser die bisher überlegenen chirurgischen/lytischen Interventionen zumindest teilweise ersetzen oder unterstützen.

Die bisherigen Ergebnisse zeigten aber, dass kein einzelner Faktor das Kollateralwachstum unterstützen und die Gewebsnekrose verhindern kann. Eine Zukunft hat die Arteriogenese-Forschung auf jeden Fall in dem Bereich der Gefäßverschlüsse distal der Popliteatrifurkation, wo keine lokale Lyse mehr möglich ist und eine Stentversorgung wegen der mechanischen Belastung der Gefäße kontraindiziert ist. Hier kann nur eine Förderung der Arteriogenese die Gefäßsituation bei chronischen Erkrankungen verbessern.

## VI. Literaturverzeichnis

1. **Classen M, Kochsiek K** *Innere Medizin*. 3. Auflage, München, Wien, Baltimore: Urban & Schwarzenberg, 1994
2. **Risau W, Flamme I** Vasculogenesis. *Annual Review of Cell & Developmental Biology*. 1995; 11: 73-91.
3. **Hanahan D** Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science*. 1997; 277: 48-50.
4. **Risau W** Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997; 386: 671-74.
5. **Folkman J** Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Nature Medicine*. 1995; 1: 27-31.
6. **Folkman J** Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New England Journal of Medicine*. 1971; 285: 1182-1186.
7. **Koch A, Harlow L, Haines G, Amento E, Unemori E, Wong W, Pope R & Ferrara N** Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis. *Journal of Immunology*. 1994; 152: 4149-4156.
8. **Schaper W & Ito W** Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circulation Research*. 1996; 79: 911-919.
9. **Herzog S, Sager H, Khmelevski E & Ito W**. Collateral arteries grow from preexisting anastomoses in the rat hindlimb. *American Journal of Physiology*. 2002; 283: H2012-20.
10. **Spalteholz, W**. Die Koronararterien des Herzens. Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft. 1907; 21: 141 in *Anatomischen Anzeiger* 130.
11. **Schaper, W**. The Collateral Circulation of the Heart. 1971. Elsevier North Holland Publishing Company, Amsterdam & London.
12. **Scholz D, Devaux B, Hirche A, Pötzsch B, Kropp B, Schaper W, Schaper J**. "Expression of adhesion molecules is specific and time-dependent cytokine-stimulated endothelial cells in culture. *Cell & Tissue Research*. 1996; 284: 415-423.
13. **Scholz D, Ziegelhöfer T & Friedrich C**. "Collateral circulation - theory and experimental observation" in "Theory and Practice of Vascular Medicine", 2001; P. Lanzer, E. Topol (Hrg.), Springer Verlag, New York, Heidelberg.
14. **Ziegelhöfer T, Scholz D, Friedrich C, Helisch A, Wagner S, Fernandez B, Schaper W**. Inhibition of collateral artery growth by Mibefradil: possible role of volume-regulated chloride channels. *Endothelium* 2003; 10: 237-246.
15. **Davies PF, Tripathi SC** Mechanical stress mechanisms and the cell. An endothelial paradigm. *Circulation Research*. 1993; 72: 239-45.
16. **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 Archiv*. 2000; 436: 257-70.
17. **Davies PF, Tripathi SC** Mechanical stress mechanisms and the cell. An endothelial paradigm. *Circulation Research*. 1993; 72: 239-45.
18. **Malek AM, Izumo S**. Molecular aspects of signal transduction of shear stress in the endothelial cell. *Journal of Hypertension*. 1994; 12: 989-999.
19. **Barakat AI, Leaver EV, Pappone PA & Davies PF** A flow-activated chloride-selective membrane current in vascular endothelial cells. *Circulation Research*. 1999; 85: 820-8.
20. **Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F & Zdebik AA** Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiology Review*. 2002; 82: 503-568.
21. **Nilius B & Droogmans G** Amazing chloride channels: an overview. *Acta Physiologica Scandinavica*. 2003; 177: 119-147
22. **Voets T, Szucs G, Droogmans G & Nilius B** Blockers of volume-activated Cl<sup>-</sup> currents inhibit endothelial cell proliferation. *Pflugers Archiv*. 1995; 431: 132-4.
23. **Manolopoulos VG, Liekens S, Koolwijk P, Voets T, Peters E, Droogmans G, Lelkes PI, De Clercq E & Nilius B** Inhibition of angiogenesis by blockers of volume-regulated anion channels. *General Pharmacology*. 2000; 34: 107-16.
24. **Jackson WF** Ion channels and vascular tone. *Hypertension*. 2000; 35(part 2): 173-178.

25. **Nakao M, Ono K, Fujisawa S & Iijima T** Mechanical stress-induced Ca<sup>2+</sup> entry and Cl<sup>-</sup> current in cultured human aortic endothelial cells. *American Journal of Physiology*. 1999; 276: C238-C249.
26. **Scholz D, Ziegelhoeffer T, Helisch A, Wagner S, Friedrich C, Podzuweit T & Schaper W** Contribution of arteriogenesis and angiogenesis to postocclusive hindlimb perfusion in mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2002; 34: 775-787.
27. **Boehlen P, Baird A, Esch F, Ling N., Gospodarowicz D.** Isolation and partial molecular characterization of pituitary fibroblast growth factor. *Proceedings of the National Academy of Science*. 1984; 81: 5364-5368.
28. **Flamme I, Risau W.** Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. *Development*. 1992; 116: 435-439.
29. **Schwartz SM, Liaw L** Growth control and morphogenesis in the development and pathology of arteries. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1993; 21 (Suppl. I): S31-S49.
30. **Basilico C, Moscatelli D** The FGF family of growth factors and oncogenes. *Advances in Cancer Research*. 1992; 59: 115-165.
31. **Arras M, Ito WD, Scholz D, et al** Monocyte activation in Angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *Journal of Clinical Investigation*. 1998; 101: 40-50.
32. **Villaschi S, Nikosia R** Angiogenic role of endogenous basic fibroblast growth factor released by rat aorta after injury. *American Journal of Pathology*. 1993; 143: 181-190.
33. **Yang HT, Deschenes MR, Ogilvie RW & Terjung RL** Basic fibroblast growth factor increases collateral blood flow in rats with femoral arterial ligation. *Circulation Research*. 1996; 76: 62-69.
34. **Popesko P.** A color atlas of the anatomy of small laboratory animals 1992. London: Wolfe Publishing Ltd.
35. **Schaller O.** Illustrated veterinary and anatomical nomenclature. 1992.
36. **Greene E.** Anatomy of the rat. New York: Hafner Publishing Co. 1959 (1939).
37. **Nitschke Th.** Zur Frage der Arteria profunda femoris und der Arteria circumflexae femoris bei Mensch, Hund und Schwein. *Acta anatomica*. 1971; 79: 239-256.
38. **Couffinhal T, Silver M, Zheng LP, Kearney M, Witzenbichler B & Isner J.** Mouse model of angiogenesis. *American Journal of Pathology* 152:1667-1679, 1998.
39. **Hawk CT.** Formulary For Laboratory Animals". Iowa, USA: American College of Laboratory Animal Medicine, 1980.
40. **Bok YL, Ostrander LE, Karmakar M, Frenkel L, Herz B.** Tissue oxygen tension in myocutaneous flaps *European Journal of Surgery*. 1991; 157: 307-311.
41. **Liss, AG, Liss, P.** Monitoring changes in oxygen tension and microcirculation in a Flap with modified oxygen microelectrode and laser-doppler flowmetry in Oxygen Transport to Tissue XXI, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 1999, p. 697-703.
42. **Prinzen FW, Bassingthwaite JB.** Blood flow distribution by Microsphere methods. *Cardiovascular Research*. 2000; 45: 13-21.
43. **Romeis B, (Hrsg. P. Böck).** „Mikroskopische Techniken“. 1989. Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore.
44. **Sharon N.** Lectin carbohydrate complexes of plants and animals: An atomic view. *Trends in Biochemistry Science*. 1993; 18: 221-223.
45. **Rivard A, Fabre JE, Silver M, Isner J.** Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation*. 1999; 99: 111-20.
46. **Sobotta J.** Atlas der Anatomie des Menschen. 20. Auflage, Urban & Schwarzenberg. 1993.
47. **Macchi C, Giannelli F, Cecchi F, Corcos L, Repice F, Cantini C, Brizzi E.** Collateral circulation in occlusion of lower limbs arteries: an anatomical study and statistical research in 35 old subjects. *Italian Journal of Anatomy & Embryology*. 1996; 101: 89-96.
48. **Coffman J** Peripheral Collateral Blood Flow and Vascular Reactivity in the Dog. *Acta physiologica scandinavica*. 1966; 45(6): 923-931.
49. **Heiss H, Rieger H.** Klinische Angiologie. Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore. pp. 395-412.

50. **Gimbrone MA, Resnick N, Nagel T, Khachigian LM, Collins T, Topper JN.** Hemodynamics, endothelial gene expression, and atherogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1997; 801: 1-10.
51. **Ingber DE.** Tensegrity: The architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annual Review Physiology*. 1997; 59: 575-599.
52. **Imberbi B, Morigi M, Zoja C, Angioletti S, Abbate M, Remuzzi A, Remuzzi G.** Shear stress-Induced Cytoskeleton Rearrangement Mediates NF- $\kappa$ B-Dependent Endothelial Expression of ICAM-1. *Microvascular Research*. 2000; 60: 182-188.
53. **Ziegelhoeffer T, Scholz D, Helish A, Wagner S, Schaper W.** Swelling cell-doing well? Volume-regulated chloride channels and arteriogenesis. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*. 2002; 34: A71.
54. **Polverini, PJ, Cotran, RS, Gimbrone, MA Jr, Unanue, ER.** Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature*. 1977; 269: 804-806.
55. **Ito WD, Arras M, Winkler B, Scholz D, Schaper J, Ss Schaper W.** Monocyte Chemotactic Protein-1 Increases Collateral and Peripheral Conductance After Femoral Artery Occlusion. *Circulation Research*. 1997; 80: 829-837.
56. **Wolf C, Cai WJ, Vosschulte R, Koltai S, Mousavipour D, Scholz D, Afsah-Hedjri A, Schaper W, Schaper J.** Vascular remodeling and altered protein expression during growth of coronary collateral arteries. *Journal Molecular & Cellular Cardiology*. 1998; 30: 2291-2305.
57. **Cai W, Vosschulte R, Afsah-Hedjri A, Koltai S, Kocsis E, Scholz D, Kostin S, Schaper W, Schaper J.** Altered balance between extracellular proteolysis and antiproteolysis is associated with adaptive coronary arteriogenesis. *Journal Molecular & Cellular Cardiology*. 2000; 32: 997-1011.
58. **Cai WJ, Koltai S, Kocsis E, Scholz D, Kostin S, Luo X, Schaper W, Schaper J.** Extracellular proteolysis is involved in coronary collateral vessel development in dog. *Journal Molecular & Cellular Cardiology*. 1997; 29: A128.
59. **Strepetti A, Cuccina A, Santoro I, Cardillo B, Cavarallo A.** Modulation of arterial smooth muscle cell growth bei haemodynamic forces. *European Journal of Vascular Surgery* 1992; 6: 16-20.
60. **Rhoad D, Eskin SG, McIntire LV.** Fluid shear stress releases FGF-2 from human aortic smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology*. 2000; 20: 416-421.
61. **Opitz F, Schenke-Layland K, Richter W, Martin DP, Degenkolbe I, Wahlers T, Stock UA.** Tissue engineering of ovine aortic blood vessel substitutes using applied shear stress and enzymatically derived vascular smooth muscle cells. *Annual of Biomedical Engineering*. 2004; 32: 212-222.
62. **Ferns GA, Raines EW, Sprugel KH, Montani AS, Reidy MA, Ross R.** Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody og PDGF. *Science*. 1991; 253: 1129-1132.
63. **Schaper W, Scholz D.** Factors Regulating Arteriogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003;23;1143-1151.
64. **Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W.** Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion. *American Journal of Physiology*. 1997; 273: H1255-H1265.
65. **Silvestre JS, Mallat Z, Duriez M, Tamarat R, Bureau M, Scherman D, Duverger N, Branellec D, Tedgui A, Levy B.** Antiangiogenic Effect of Interleukin-10 in Ischemia-Induced Angiogenesis in Mice Hindlimb. *Circulation Research*. 2000; 87: 448-452.
66. **Rivard A, Fabre J.-E, Silver M, Dongfen C, Murohara T, Kearney M, Magner M, Asahara T, Isner JM.** Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation*. 1999; 99: 111-20
67. **Prior BM, Lloyd PG, Ren J, Li H, Yang HT, Laughlin MH, Terjung RL.** Time course of changes in collateral blood flow and isolated vessel size and gene expression after femoral artery occlusion in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: H2434–H2447.

68. **Alexander von Humboldt** Kosmos-Entwurf einer physischen Weltbeschreibung, 1. Auflage 1845, Gottascher Verlag, Stuttgart, Tübingen.
69. **Longland CJ.** The collateral circulation of the limb. *Annals of the Royal College of Surgery of England.* 1953;13:161.
70. **Domini R, D'Addato.** Clasificación nosologica de los vasos colaterales arteriales en relación con las progresivas modificaciones de la tectónica parietal inducida por la nueva hemodinámica. Estudio de arteriografía clínica comparada. *Angiología.* 1968; 20: 125-139.
71. **Sarelius ICH, Damon DN & Duling BR** Microvascular adaptations during maturation of striated muscle. *American Journal of Physiology.* 1981; 241: H317-H324.
72. **Schaper J, Borgers M, Schaper W.** Ultrastructure of ischemia-induced changes in the precapillary anastomotic network of the heart. *American Journal of Cardiology.* 1972; 29: 851-859.
73. **Müller HR, Gräfe R, Falkenhagen D.** Grundriß der Physik für Mediziner. 1990.4. Auflage. Thun-Verlag, Frankfurt, Deutschland.
74. **Wezler K, Sinn W.** *Das Stromungsgezetz des Blutkeislaufes.* Aulendorf: Editio Cantor KG.; 1953
75. **Walpolo L, Gotlieb AI, Cybulsky MI, Langille BL.** Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology.* 1995; 15: 2-10.
76. **Murray CD.** The physiological principle of minimum work applied to the angle of branching arteries. *Journal of General Physiology.* 1926; 9: 835-841.
77. **Rodbard S.** Vacular caliber. *Cardiology.* 1975; 60: 4-49.
78. **Deindl E, Buschmann I, Hoefler I, Podzuweit T, Boengler K, Vogel S, van Royen N, Fernandez B and Schaper W.** Role of ischemia and hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit. *Circulation Research.*2001; 89: 779-786.
79. **Deindl E, Neubauer E, Fernandez B, Thomas S and Podzuweit T.** Collateral artery growth in rabbit is not dependent on ischemia or an increased expression of VEGF. *Circulation* 2000;102: 41-51.
80. **Nilius B, Prenen J, Kamouchi M, Viana F, Voets T and Droogmans G.** Inhibition by mibefradil, a novel calcium channel antagonist, of Ca(2+)- and volume-activated Cl<sup>-</sup> channels in macrovascular endothelial cells. *British Journal of Pharmacology.* 1997; 121: 547-555.
81. **Gray GA, Clozel M, Clozel JP and Baumgartner HR.** Effects of calcium channel blockade on the aortic intima in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1993; 22: 569-576.
82. **Schmitt R, Clozel JP, Iberg N and Buhler FR.** Mibefradil prevents neointima formation after vascular injury in rats. Possible role of the blockade of the T-type voltage-operated calcium channel. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology.*1995; 15: 1161-1165.
83. **Bernink PJ, Prager G, Schelling A and Kobrin I.** Antihypertensive properties of the novel calcium antagonist mibefradil (Ro 40-5967): a new generation of calcium antagonists? Mibefradil International Study Group. *Hypertension.* 1996; 27: 426-432.
84. **Clozel JP, Veniant M and Osterrieder W.** The structurally novel Ca<sup>2+</sup> channel blocker Ro 40-5967, which binds to the [3H] desmethoxyverapamil receptor, is devoid of the negative inotropic effects of verapamil in normal and failing rat hearts. *Cardiovascular Drugs & Therapy.* 1990; 4: 731-736.
85. **Roux S, Buhler M and Clozel JP.** Mechanism of the antiischemic effect of mibefradil, a selective T calcium channel blocker in dogs: comparison with amlodipine. *Journal of Cardiovascular Pharmacology.* 1996; 27: 132-139.
86. **Gschwenter M, Fürst J, Ritter M, Bazzini C, Wöll E, Lamg F, Deetjen P, Paulmichl M.** ICln, an ion channel-forming protein associated with cell volume regulation. *Experimental Physiology.* 1999; 84: 1023-1031.
87. **Wondergem R, Gong W, Monen SH, Dooley SN, Gonce JL, Houser M, Ecay TW and Ferslew KE.** Blocking swelling-activated chloride current inhibits mouse liver cell proliferation. *Journal of Physiology.* 2001; 532: 661-672.

88. **Chemin J, Monteil A, Briquaire C, Richard S, Perez-Reyes E, Nargeot J and Lory P.** Overexpression of T-type calcium channels in HEK-293 cells increases intracellular calcium without affecting cellular proliferation. *FEBS Letters*. 2000; 478: 166-172.
89. **Wiltshire HR, Sutton BM, Heeps G, Betty AM, Angus DW, Harris SR, Worth E and Welker HA.** Metabolism of the calcium antagonist, Mibefradil (POSICORTM, Ro 40-5967). Part III. Comparative pharmacokinetics of mibefradil and its major metabolites in rat, marmoset, cynomolgus monkey and man. *Xenobiotica*. 1997; 27: 557-571.
90. **Nilius B, Prenen J, Voets T, Eggermont J and Droogmans G.** Activation of volume-regulated chloride currents by reduction of intracellular ionic strength in bovine endothelial cells. *Journal of Physiology*. 1998; 506: 353-361.
91. **Lloyd P, Yang HT and Terjung RL.** Arteriogenesis and angiogenesis in rat ischemic hindlimb: role of nitric oxide. *American Journal of Physiology Heart Circulation Physiology*. 2001; 282: H2528-H2538.
92. **Nilius B, Eggermont J, Voets T and Droogmans G.** Volume-activated Chlorid-channels. *General Pharmacology*. 1996; 27: 1131-1140.
93. **Hershey JC, Baskin EP, Glass JD, Hartman HA, Gilberto GB, Rogers IT and Cook JJ.** Revascularization in the rabbit hindlimb: dissociation between capillary sprouting and arteriogenesis. *Cardiovascular Research*. 2001; 49: 618-625.
94. **Hoefler I, van Royen N, Buschmann I, Piek JJ and Schaper W.** Time course of arteriogenesis following femoral artery occlusion in the rabbit. *Cardiovascular Research*. 2001; 49: 609-617.
95. **Epstein SE, Fuchs S, Zhou YF, Baffour R and Kornowski R.** Therapeutic interventions for enhancing collateral development by administration of growth factors: basic principles, early results and potential hazards. *Cardiovascular Research*. 2001; 49: 532-542.
96. **Helisch A and Schaper W.** Angiogenesis and arteriogenesis--not yet for prescription. *Zeitschrift für Kardiologie*. 2000; 89: 239-244.
97. **Deindl d, Schaper W.** The art of Arteriogenesis. *Cell Biochem Biophys*. 2005; 43(1): 1-15.
98. **Sang QX.** Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Cell Research*. 1998; 8: 171-177.
99. **Ziegelhoeffer T, Hoefler IE, van Royen N and Buschmann I.** Effective reduction in collateral artery formation through matrix metalloproteinase inhibitors. *Circulation*. 1999; 100: 705.
100. **Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H, Scholz D, Acker T, DiPalma T, Dewerchin M, Noel A, Stalmans I, Barra A, Blacher S, Vandendriessche T, Ponten A, Eriksson U, Plate KH, Foidart JM, Schaper W, Charnock-Jones DS, Hicklin DJ, Herbert JM, Collen D, Persico MG. V.** Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nature Medicine*. 2001; 7: 575-583.
101. **Nugent MA, Iozzo RV.** Fibroblast growth factor-2. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2000;32:115-120.
102. **Zhang X, Ibrahimi OA, Olsen SK, Umemori H, Mohammadi M, Ornitz DM.** Receptor specificity of the Fibroblast Growth Factor family. *Journal Biology & Chemistry*. 1996; 271: 15292-15297.
103. **Lindner V, Olson NE, Clowes AW, Reidy MA.** Inhibition of smooth muscle cell proliferation in injured rat arteries. Interaction of heparin with basic factor. *Journal Clinical Investigation*. 1992; 90: 2044-2049.
104. **Miller DL, Ortega S, Bashayan O, Basch R, Basilico S.** Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice. *Molecular Cell Biology*. 2000; 20: 2260-2268.
105. **Sullivan C, Hoying JB.** Flow-dependent remodeling in the carotid artery of fibroblast growth factor-2 knockout mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology*. 2002; 22: 1100-1105.

106. **Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin D.** Biological roles of Fibroblast Growth Factor-2. *Endocrine Reviews*. 1997;18:26-37.
107. **Yang HT, Feng Y.** bFGF increases collateral blood flow in aged rats with femoral artery ligation. *American Journal of Physiology. Heart & Circulation Physiology*. 2000; 278: H85–H93.
108. **Battler AM, Scheinowitz A, Bor D, Hasdai Z et al.** Intracoronary injection of basic fibroblast growth factor enhances angiogenesis in infarcted swine myocardium. *Journal American College of Cardiology*. 1993; 22: 2001–2006.
109. **Baffour, R., J. Berman, J. L. Garb, S. W. Rhee, J. Kaufman, and P. Friedmann.** Enhanced angiogenesis and growth of collaterals by in vivo administration of recombinant basic fibroblast growth factor in a rabbit model of acute lower limb ischemia: dose-response effect of basic fibroblast growth factor. *Journal of Vascular Surgery*. 1992; 16: 181–191.
110. **Chleboun, J. O., R. N. Martins, C. A. Mitchell, and T. V. Chirila.** bFGF enhances the development of the collateral circulation after acute arterial occlusion. *Biochemistry & Biophysiology Research Communication*. 1992; 185: 510–516.
111. **Deindl E, Neubauer E, Fernández B Schaper W.** Arteriogenesis, collateral blood vessels, and their development. In: Rubanyi GM, ed. *Angiogenesis in Health and Disease*. New York, Basel: Marcel Dekker; 1999: 31-46.
112. **Wolfram S, Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Coffin JD, Wagner S, Helisch A, Schaper W.** Arteriogenesis on demand in exercising mice expressing FGF-2 under the control of the phosphoglycerate kinase promoter. *Journal American College of Cardiology*. 2002: 204A.
113. **Strepetti AV, Cucina A, Morena AR, Di Donna S, Angelo IY, Cavalm A, Stipa S.** Shear stress influences the release of platelet growth factor and fibroblast growth by arterial smooth muscle cells. *European Journal of Vascular Surgery*. 1994; 8: 138.
114. **Semenza GL, Wang GL.** A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*. 1992;12: 5447–5454.
115. **Wang GL, Semenza GL.** Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of the DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem*. 1993;268:21513–21518.
116. **Folkman, J.** Angiogenesis: initiation and undulation. *Symposium on Fundamental Cancer Research*. 1983;36:201-208.
117. **Sullivan CJ, Doetschmann T & Hoying JB.** Targeted disruption of the fgf2 gene does not affect vascular growth factor in the mouse ischemic hindlimb. *Journal of Applied Physiology*. 2002; 93: 2009-2017.
118. **van Royen N, Piek JJ, Buschmann I, Hofer I, Voskuil M, Schaper W.** Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. *Cardiovascular Research* 49 (2001) 543–553
119. **Jay L, Tuttle TL, Hahn BM, Sanders FA, Witzmann SJ, Miller MC & Unthank JL.** Impaired collateral development in mature rats. *American Journal of Physiology. Heart & Circulation Physiology*. 2002; 283: H146–H155.
120. **Luo F, Wariaro D, Lundberg G, Blegen H, & Wahlberg E.** Vascular Growth Factor Expression in a Rat Model of Severe Limb Ischemia. *Journal of Surgical Research*. 2002; 108: 258–267.
121. **Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Isner J.** Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proceedings of the National Academy of Science*. 2000; 97: 3422-3427.
122. **Murohara T, Horowitz JR, Silver M, Tsurumi Y, Chen D, Sullivan A, Isner JM.** Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation*. 1998; 97: 99-107.
123. **Weibel ER, Elias H, eds.** Quantitative Methods in Morphology. Berlin: Springer-Verlag; 1967.
124. **Wetterlin S, Aronsen KF, Bjorkman I, Ahlgren I.** Studies on methods for determination of the distribution of cardiac output in the mouse. *Scandinavian Journal & Clinical Laboratory Investigation*. 1977; 37: 451-454.

125. **Sarin SK, Groszmann RJ** Splanchnic and systemic hemodynamics in mice using a radioactive microsphere technique. *American Journal of Physiology*. 1990; 258: G365-G369.
126. **Carlsson PO, Anderson A, Jansson L**. Pancreatic islet blood flow in normal and obese-hyperglycemic (ob/ob) mice. *American Journal of Physiology*. 1996; 271: E990-E995.
127. **Mack CA, Magovern CJ, Budenbender KT, Patel SR, Schwartz EA, Zanzonico P, Ferris B, Sanborn T, Isom P, Ferris B, Crystal RG, Rosengart TK. KT**. Salvage angiogenesis induced by adenovirus-mediated gene transfer of vascular endothelial growth factor protects against ischemic vascular occlusion. *Journal of Vascular Surgery*. 1998; 27: 699-709.
128. **Schumpelick V, Bleese N, Mommsen U**. Chirurgie. 5. Auflage. Enke-Verlag, Stuttgart. 2000.
129. **Carmeliet P**. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine*. 2000 Apr;6(4):389-95.



## VII. Anhang

### Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Dr. h. c. Wolfgang Schaper danke ich für die Überlassung des Themas und die Unterstützung während der ganzen Arbeit. Genauso danke ich Frau Professor Dr. med. Dr. h.c. Jutta Schaper für ihre Unterstützung und Begleitung dieser Arbeit.

Herrn Dr. rer. nat. Dimitri Scholz danke ich für die Betreuung. Mit seinen wertvollen wissenschaftlichen Anregungen und Ratschlägen hat er wesentlich zu dieser Arbeit beigetragen. Ich habe ihn während dieser Zeit sehr schätzen gelernt und bin ihm für seine Unterstützung sehr dankbar.

Weiter danke ich Herrn Dr. med. Tibor Ziegelhöfer für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung während der Operationen.

Herrn Dr. med. Hanno Elsässer und Frau Annegret Sauer für ihre tatkräftige Unterstützung.

Den Mitarbeitern der Abteilung für Elektronenmikroskopie des Max-Planck-Institutes, Frau Beate Grohmann, Frau Brigitte Matzke und Frau Annemarie Möbs danke ich für ihre hilfreiche Unterstützung.

Ebenso Herrn Siggis Langsdorf für die technische Unterstützung bei der Entwicklung der Wärmekammer und der Katheter sowie Herrn Gerd Stämmeler für seine Hilfe bei der elektronischen Bearbeitung dieser Arbeit.

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

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau Dipl.-Ing. Karin Friedrich, die während der ganzen Zeit stets hilfreicher zur Seite stand und diese Arbeit der Prüfung nach den Neuen Rechtschreibregeln unterzog (sie ist für „Neuerungen“ wie Fotografie mit zwei „f“ verantwortlich).

Ein besonderer Dank gilt auch meinen Eltern Bärbel und Gerhard Friedrich, die mir durch ihre Unterstützung mein Studium und diese Promotion erst ermöglicht haben.



## Curriculum vitae

Name: Christian Antonio Friedrich Möller  
geboren: 21. August 1974, in Jesús Maria, Lima (Perú)  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: verheiratet  
Ehefrau: Dipl. Ing. Karin Friedrich

### **Schulbildung und Ersatzdienst**

1981 Grundschule „Sindlinger Wiesen“ in Kelkheim, Deutschland  
1982 bis 1992 Primaria und Sekundaria an der deutsch-peruanischen Begegnungsschule „Alexander von Humboldt“ in Lima, Peru  
1992 bis 1994 Gymnasium „Christian-Wirth-Schule“ in Usingen, Deutschland  
Juni 1994 Allgemeine Hochschulreife  
1994 bis 1995 Ersatzdienst in der Ambulante Altenpflege und Individuellen Schwerstbehindertenbetreuung bei der Ev. Diakoniestation „Usinger Land“

### **Studium**

1995 bis 2002 Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität, Giessen  
Sept. 1997 Physikum  
1997-98 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Anatomie, Giessen, unter Prof. Dr. W. Kummer  
1998-99 Studium in Rahmen des Erasmus-Programm der Europäischen Union an der Universidad Autónoma de Madrid, Spanien  
Sept. 1999 I. Staatsexamen  
Sept. 2001 II. Staatsexamen  
2001-2002 Praktische Jahr

1. Tertial: Chirurgie an der Asklepios Klinik in Lich unter Prof. Dr. P. Hild
  2. Tertial: Innere Medizin an der Asklepios Klinik in Lich unter Prof. Dr. G. Goubeaud
  3. Tertial: Neurologie am Universitätsklinikum Gießen unter Prof. Dr. Kaps
- Okt. 2002            III. Staatsexamen
- 1997 bis 2002        Studium der Philosophie an der Justus-Liebig-Universität, Giessen

### **Promotion**

- 1999 bis 2003        Durchführung der experimentellen Arbeiten zur Promotion unter Prof. Dr. W. Schaper in der Abteilung für experimentelle Kardiologie des Max-Planck-Institutes für physiologische und klinische Forschung, W. G. Kerckhoff-Institut, Bad Nauheim

### **Ärztliche Tätigkeit**

- 2003 bis 2004        Arzt im Praktikum an den Medizinischen Klinik II des Klinikums Fulda unter Prof. Dr. med. D. Jaspersen
- seit Sept. 2004      Assistenzarzt an der Medizinischen Klinik II des Klinikum Offenbach unter Prof. Dr. med. H. Dancygier

### **wissenschaftliche Arbeiten und Publikationen**

#### Poster:

Poster für International Society of Heart Research-Kongress (ISHR), Atlanta 2000  
Elsässer H., Sauer A., Friedrich C., Helisch A., Luttun A., Carmeliet P., Scholz D. & Schaper W.

“Bone marrow transplants abolish inhibition of arteriogenesis in Placenta Growth Factor k.o. mice,,

Poster für Arteriogenesis-Kongress, Karolinska Institute, Stockholm, Schweden 2001  
Ziegelhütter T., Friedrich C., Scholz D., Helisch A., Wagner S. & Schaper W.  
“Activation of endothelial chloride-channels initiate collateral artery growth (Arteriogenesis)”

*Journal of the American College of Cardiology*. 2001;37(Suppl. II):A227

Poster Karolinska Hospital, Schweden 2001

Ziegelhütter T, Scholz D, Friedrich C, et al.

Fibroblast Growth Factor-2 induced acceleration of perfusion recovery after femoral artery occlusion in mice.

*Lower Limb Ischemia Bringing Basic Science into Clinical Practice.*  
Karolinska Hospital, Stockholm, Schweden; 2001:78-79.

Buchkapitel:

D. Scholz, T. Ziegelhöfer & C. Friedrich  
"Collateral circulation - theory and experimental observation"  
in "Theory and Practice of Vascular Medicine", 2001  
P. Lanzer, E. Topol (Hrg.), Springer Verlag, New York, Heidelberg

Publikationen:

Scholz D, Ziegelhöfer T, Helisch A, Wagner S, Friedrich C, Podzuweit T & Schaper W.  
"Contribution of Arteriogenesis and Angiogenesis to Postocclusive Hindlimb Perfusion in Mice"

*Journal of Molecular and Cell Cardiology.* Volume 34, Issue 7, July 2002, pg. 775-787

Scholz D., Elsässer H., Sauer A., Friedrich C., Luttun A., Carmeliet P. & Schaper W.  
„Bone marrow transplantation abolishes inhibition of arteriogenesis in placenta growth factor (PlGF)  $-/-$  mice"

*Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* Volume 35, Issue 2, Feb 2003, pg. 177-184.

Ziegelhöfer T, Scholz D, Friedrich C, Helisch A, Wagner S, Fernandez B, Schaper W.  
„Inhibition of collateral artery growth by Mibefradil: possible role of volume-regulated chloride channels.“

*Endothelium.* Volume 10, Numbers 4-5, Jul-Oct 2003, pg. 237 – 246.

