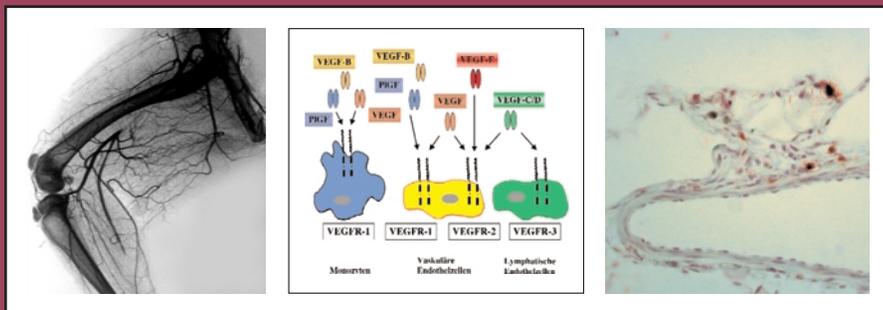


Die Rolle der VEGF-Rezeptoren bei der Arteriogenese im peripheren Kreislauf des Kaninchens



INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Frederic Pipp

Bibliografische Informationen Der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;

Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über

<http://dnb.ddb.de> abrufbar.

Auflage 2003

© 2003 by Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH, Gießen

Printed in Germany

ISBN 3-936815-66-6

Verlag: DVG Service GmbH

Frankfurter Straße 89

35392 Gießen

0641/24466

geschaeftsstelle@dvg.net

www.dvg.net

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

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Die Rolle der VEGF-Rezeptoren bei der Arteriogenese im peripheren Kreislauf des Kaninchens

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Frederic Christian Pipp
Tierarzt aus Büdingen

Gießen 2003

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

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. R. Gerstberger

Die Rolle der VEGF-Rezeptoren bei der Arteriogenese im peripheren Kreislauf des Kaninchens

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Frederic Christian Pipp
Tierarzt aus Büdingen

Gießen 2003

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. W. Schaper

2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Gerstberger

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Juli 2003

Meinen Eltern und der Schöpfung

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
1. Hintergrund	1
2. Zielsetzung	2
II. LITERATURÜBERSICHT	3
1. Das Blutgefäßsystem	5
1.1. Physiologie des Blutgefäßsystems	5
1.2. Morphologie des Blutgefäßsystems	5
1.2.1. Die Blutkapillaren	5
1.2.2. Die Arterien	5
1.2.3. Die Venen	6
1.3. Pathophysiologie des Blutgefäßsystems	6
1.4. Allgemeine Hämodynamik	7
2. Formen der Gefäßentwicklung	8
2.1. Vaskulogenese	8
2.2. Angiogenese	12
2.3. Arteriogenese	13
2.3.1. Grundlegendes	13
2.3.2. Mechanismen	17
2.3.2.1. Initialphase auf zellulärer Ebene	18
2.3.2.2. Gefäßumbau aus histologischer Sicht	20
3. Gefäßwachstumsfaktoren	21
3.1. Die Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Familie und ihre Rezeptoren	21
3.2. Placenta Growth Factor (PlGF)	24
3.3. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1)	25

	Seite
4. Kollateralwachstum in Tiermodellen	27
4.1. Chronisch ischämischer Ventrikel des Hundes	27
4.1.1. Allgemeines	27
4.1.2. Druck-Fluß Beziehungen des Koronar- und koronaren Kollateralkreislaufes im Hunde-Modell	27
4.2. Chronisch ischämischer Ventrikel des Schweines	28
4.3. Chronisch ischämische Hintergliedmaße des Kaninchens	28
4.3.1. Mikrosphärenperfuisionsmodell	29
4.3.2. Intraarterielle Doppler-Flußmessung	30
4.3.3. Nicht-invasive, Doppler-basierte periphere Blutdruckmessung	30
III. METHODEN	31
1. Induktion chronischer Ischämie im Kaninchenhinterbein	31
1.1. Tiermodell	31
1.2. Versuchstiere	32
1.3. Narkose	32
1.4. Operationstechnik	32
2. Lokale, chronische Applikation von Proteinen	33
2.1. Allgemeines	33
2.2. Versuchsgruppen	33
3. Hämodynamische Auswertung	34
3.1. Narkose und Beatmung	34
3.2. Blutflußmessung	35
3.2.1. Funktionsprinzip des Blutflußmeßgerätes (Flowmeter)	35
3.3. Blutdruckmessung	37
3.4. Maximale Vasodilatation	38

	Seite
3.4.1. Anfertigen eines arteriellen Katheters nach der Methode nach Barger	39
3.4.2. Einbau eines arteriellen Katheters nach Barger	39
3.4.3. Bau der Ballonmanschette	41
3.5. Berechnung der kollateralen Konduktanz	42
4. Angiographische Auswertung	42
4.1. Kontrastmittel-Herstellung	42
4.2. Kontrastmittel-Infusion	42
4.3. Erstellung eines Angiogrammes	43
4.4. Auswertung eines Angiogrammes	43
4.4.1. Kollateralenzahl	43
4.4.2. Kollateralindex	43
5. Histologische Quantifizierung perivaskulärer mononukleärer Zellen	44
5.1. Perfusionsfixation	44
5.2. Probenentnahme	44
5.3. Präparatanfertigung	44
5.3.1. Herstellung beschichteter Objektträger	44
5.3.2. Herstellung von Gefrierschnitten	45
5.4. Transmigrations-Vergleich	45
6. Auswertung und Statistik	46
IV. ERGEBNISSE	47
1. Hämodynamische Auswertung	47
1.1. Etablierung des Hämodynamikmodells	47
1.1.1. Hämodynamik der unoperierten Hintergliedmaße	47
1.1.1.1. Blutfluß in Ruhe	47
1.1.1.2. Arterieller Blutdruck in Ruhe	48

	Seite
1.1.1.3. Hämodynamik bei maximaler Vasodilatation	49
1.1.2. Hämodynamik der operierten Hintergliedmaße	53
1.1.2.1. Adenosin-Dosis-Wirkungskurve nach Femoralisligatur	53
1.1.2.2. Hämodynamischer Vergleich der ligierten mit der unoperierten Hintergliedmaße	57
1.2. Maximale kollaterale Konduktanz nach Wachstumsfaktor-Stimulation	58
1.2.1. Hämodynamik nach Infusion von MCP-1	58
1.2.1. Hämodynamik nach Infusion von VEGF-A	60
1.2.2. Hämodynamik nach selektiver Stimulierung des VEGFR-1	61
1.2.3. Hämodynamik nach selektiver Aktivierung des VEGFR-2	61
1.2.4. Hämodynamik nach kombinierter Aktivierung des VEGFR-1/-2	62
1.3. Hämodynamischer Gruppenvergleich	62
2. Angiographische Auswertung	64
2.1 Angiographien	66
2.1.1. Kollateralgebiet nach Ligatur der Femoralarterie	66
2.1.2. Kollateralgebiet nach Infusion von VEGF-A	67
2.1.3. Kollateralgebiet nach selektiver Stimulierung des VEGFR-1	68
2.1.4. Kollateralgebiet nach selektiver Aktivierung des VEGFR-2	68
2.1.5. Kollateralgebiet nach kombinierter Aktivierung des VEGFR-1/-2	69
2.2. Kollateralenzahl	70
2.2.1. Kollateralenzahl nach Ligatur der Femoralarterie	70
2.2.2. Kollateralenzahl nach Infusion von VEGF-A	70
2.2.3. Kollateralenzahl nach selektiver Stimulierung des VEGFR-1	71
2.2.4. Kollateralenzahl nach selektiver Aktivierung des VEGFR-2	72
2.2.5. Kollateralenzahl nach kombinierter Aktivierung des VEGFR-1/-2	72
2.3. Kollateralindex	73
2.3.1. Kollateralindex nach Ligatur der Femoralarterie	74
2.3.2. Kollateralindex nach Infusion von VEGF-A	74
2.3.3. Kollateralindex nach selektiver Stimulierung des VEGFR-1	75
2.3.4. Kollateralindex nach selektiver Aktivierung des VEGFR-2	76

	Seite
2.3.5. Kollateralindex nach kombinierter Aktivierung des VEGFR-1/-2	76
2.4. Angiographischer Gruppenvergleich	77
3. Histologische Quantifizierung perivaskulärer mononukleärer Zellen	79
V. DISKUSSION	82
1. Tiermodell	83
1.1. Chronisches Ischämiemodell	83
1.2. Hämodynamikmodell zur Bestimmung kollateraler Konduktanz	84
1.2.1. Grundlegendes	85
1.2.2. Vergleich mit bekannten Hämodynamikmodellen	86
1.2.3. Einstellung einer maximalen Vasodilatation	88
1.2.4. Limitierung des Modells	89
1.3. Angiographiemodell zur Ermittlung des Kollateralwachstums	90
1.3.1. Allgemeines	90
1.3.2. Vergleich mit bekannten Angiographiemodellen	90
1.4. Anwendung humaner Proteine beim Kaninchen	91
2. Einfluß der selektiven Aktivierung von VEGFR-1 oder -2 in der Arteriogenese	92
3. Einfluß der kombinierten Aktivierung von VEGFR-1 oder -2 in der Arteriogenese	96
4. Einfluß von VEGF auf das Kollateralwachstum in anderen Modellen	97
5. Nachweis einer Monozyteninfiltration in die Kollateralgefäßwand	98
6. Funktion von VEGFR-1/-2 auf weitere Zelltypen	99
6.1. Stammzellmobilisation über VEGFR-1/-2	99
6.2. Gefäßmuskelproliferation über VEGFR-1/-2	99

	Seite
6.3. Neurogenese über VEGFR-1/-2	100
7. Therapeutische Stimulierung des Gefäßwachstums	100
7.1. Probleme der angiogenen Therapie	100
7.2. Optimierung der arteriogenen Therapie	102
7.3. Möglichkeiten der Gentherapie	102
7.4. Die arteriogene Therapie der Zukunft	103
8. Schlußfolgerung	104
VI. ZUSAMMENFASSUNG	105
VII. SUMMARY	107
VIII. ANHANG	109
1. Material	109
1.1. Allgemeine Chemikalien und Lösungsmittel	109
1.2. Medikamente	109
1.3. Operationszubehör	110
1.4. Versuchstiere	110
1.5. Laborzubehör	110
1.6. Geräte	111
1.6.1. Labor	111
1.6.2. Hämodynamik	111
1.6.3. Angiographie	112
1.6.4. Histologie	112
1.7. Puffer	112
2. Abkürzungen	114
IX. LITERATURVERZEICHNIS	117
X. DANKSAGUNG	139

I. EINLEITUNG

1. Hintergrund

Ischämische Gefäßerkrankungen stellen trotz wirksamer Präventivmaßnahmen weiterhin die Haupttodesursache in den Industrieländern dar. Aufgrund der zunehmend alternden Gesellschaft scheint keine wesentliche Änderung in Sicht. Mit Einführung des westlichen Lebensstils in Osteuropa und Asien ist in diesen Teilen der Welt sogar eine Zunahme der Inzidenz zu verzeichnen¹. Im Jahr 1999 starben alleine in den USA 529.659 Menschen an der Koronaren Herzkrankheit (KHK)². Somit war etwa einer von fünf Todesfällen die Folge einer KHK. Bei dieser zentral-arteriellen Gefäßerkrankung kommt es durch eine arteriosklerotisch bedingte Koronarstenose zur Ischämie des Herzmuskels. Diese kann sich dann klinisch als Angina pectoris, Myokardinfarkt oder Linksherzinsuffizienz manifestieren³. In den USA leiden derzeit etwa 12,6 Millionen an der KHK².

Im peripheren Gefäßsystem stellt die Periphere Arterielle Verschlusskrankheit (PAVK) eine sich meist mit dem Bild der Claudicatio intermittens (intermittierendes Hinken) äußernde Stenosierung der Beinarterien dar. Anfänglich schmerzhaften Sensationen bei immer kürzer werdender Gehstrecke folgt oft die Amputation der betroffenen Gliedmaße infolge Nekrotisierung^{4,5}.

Eine wesentliche Ursache für das häufige Auftreten dieser Erkrankungen ist, daß das Gefäßsystem nur eine eingeschränkte Regenerationsfähigkeit besitzt. Ebenfalls aus diesem Grund können Stenosen der Blutgefäße bis heute nur invasiv behandelt werden, so durch das Öffnen der Gefäßverschlüsse (Perkutane Transluminale Revaskularisation oder Lyse) oder die Schaffung von Umgehungskreisläufen (Gefäßtransplantation, Bypass). Gleichwohl sind manche Eingriffe unter kardiopulmonalem Bypass durchzuführen, was immer mit einem gewissen neurologischen Risiko verbunden⁶ und infolge von Gefäßrestenotisierung (bei einem Drittel der Patienten) und Thromboisierung oft nur begrenzt erfolgreich ist⁷. Zudem sind sie für viele Patienten mit hochgradiger Gefäßpathologie keine Option und auch äußerst kostenintensiv⁸. Allein in den USA wurden 1999 etwa 1,1 Millionen Perkutane Transluminale Revaskularisationen, 355.000 koronare Bypass-Operationen und 131.000 Endarterektomien durchgeführt².

Schon lange ist bekannt, daß einige Patienten mit ischämischen Gefäßerkrankungen natürliche Umgehungskreisläufe ausbilden können. Das Wachstum dieser Kollateralgefäße scheint vom Grad der Gefäßverengung abhängig zu sein. Stellenweise

leben sogar Patienten mit Totalverschluß einer Koronararterie aber gut ausgeprägten Kollateralen völlig beschwerdefrei⁹.

Die Kollateralarterien gehen aus präexistierenden arterio-arteriolen Anastomosen hervor, welche infolge Schubspannungszunahme nach Gefäßverschluß in kurzer Zeit zu funktionellen Arterien umgebaut werden. Für diesen Prozeß wurde der Terminus Arteriogenese etabliert. Als Alternative zur invasiven Behandlung wurde daher im vergangenen Jahrzehnt an der Entwicklung therapeutischer Ansätze gearbeitet, welche dieses Wachstum fördern⁸.

2. Zielsetzung

Ziel dieser Dissertation war es, das Potential verschiedener Wachstumsfaktoren zur Stimulierung des Kollateralgefäßwachstums im ischämischen Kaninchenhinterlauf durch die chronische, lokale Applikation zu bestimmen¹⁰⁻¹². Da Monozyten eine zentrale Rolle im Ablauf der Arteriogenese einnehmen¹³, sollten die zugrunde liegenden Mechanismen näher untersucht werden. Im Vergleich dazu sollte zusätzlich die Rolle des Gefäßendothels bei der Arteriogenese identifiziert werden. Dazu wurden Faktoren, deren monozyten- bzw. endothelspezifische Aktivität bekannt war, mittels implantierter Minipumpe lokal in den Kollateralkreislauf infundiert. Da die spezifische Expression zweier Rezeptoren für den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor-1/2 (VEGFR-1/2), auf Monozyten bzw. Endothelzellen die Möglichkeit zur selektiven Aktivierung des jeweiligen Zelltyps eröffnete, wurden rezeptorspezifische Vertreter der VEGF-Familie mit Monozyten- bzw. endothelspezifischer Wirkung infundiert. Im einzelnen wurde VEGF, der an beiden Rezeptoren bindet, sowie der VEGFR-2-spezifische VEGF-E und der VEGFR-1-spezifische Plazenta Wachstumsfaktor (PlGF) verwendet.

Zur Quantifizierung des Kollateralwachstums sollte neben der etablierten, postmortalen Angiographie eine neue Methode entwickelt werden, mit der die kollaterale Perfusion im Hinterlauf am lebenden Tier quantifiziert werden konnte. Außerdem sollte durch histologische Verfahren nachgewiesen werden, in wieweit die Applikation von PlGF die Akkumulation von Monozyten im Gewebe zur Folge hat. Die Invasion von Monozyten in die Kollateralgefäßwand wird seit jüngster Zeit¹⁶⁶ als wesentlicher, an der frühen Phase der Arteriogenese beteiligter Mechanismus diskutiert.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Das Blutgefäßsystem

1.1. Physiologie des Blutgefäßsystems

Ein geregelter Kreislauf ist eine der wichtigsten Voraussetzungen dafür, daß das Blut seine Aufgaben in den einzelnen Organen sowie im Gesamtorganismus erfüllen kann. Der Bau und die Leistung des gesamten Kreislaufsystems werden zu einem großen Teil durch die Ansprüche der zahlreichen Versorgungsgebiete geregelt. Während die Arterien den Transport des vom Herzmuskel angetriebenen Blutes zur Peripherie und die Venen den Rückfluß zum Herzen übernehmen, findet der Stoffaustausch in allen Organen über ein diffiziles Kapillarsystem statt. Sowohl die Dichte als auch die Anordnung dieser Kapillaren variiert vor allem in Abhängigkeit von der potentiellen Verbrauchsgröße des Zielgewebes. Typischerweise sind die Kapillaren in Form eines Netzwerkes miteinander verbunden (Abb. 1). Die Regulation des Blutflusses durch die Kapillaren erfolgt vor allem durch die vorgeschalteten Arteriolen. Deren Gefäßwand besitzt eine muskuläre Mittelschicht, welche die Gefäßweite regulieren kann. Infolge von Vasokonstriktion wird der Blutfluß gemindert, infolge von Vasodilatation dagegen verstärkt. Über Vasomotion und in einigen Organen durch muskuläre Sphinkter erfolgt eine Adaptation der Blutversorgung in Abhängigkeit vom Bedarf im Versorgungsgebiet. Die vielfach beschriebene Kapillarverengung und -erweiterung dagegen ist nicht auf eine Tätigkeit muskulär differenzierter Zellen zurückzuführen, denn das Kapillarendothel kann Mediator-vermittelt an- und abschwellen und zu einer Verengung oder Erweiterung des Kapillarlumens führen. Darüber hinaus wird die Kapillarwand bei vermehrter Blutzufuhr zu den verschiedenen Organen und Geweben passiv dilatiert. Beispielsweise werden die Kapillaren bei Entzündungszuständen besonders geweitet und stark durchströmt.

Diesen terminalen Abschnitten des Blutgefäßsystems kann man als Verteilersystem die größeren Abschnitte des Arterien- und Venensystems gegenüberstellen. Die Anatomie der Arterien ist geprägt durch ihre Position im Kreislauf und den damit verbundenen physikalischen Gegebenheiten. Die großen herznahen Arterien sind durch die hohe Elastizität ihrer Wände zum Auffangen und Verstärken der Pulswellen eingerichtet und sorgen dadurch für einen kontinuierlichen arteriellen Blutfluß (Windkesselfunktion).

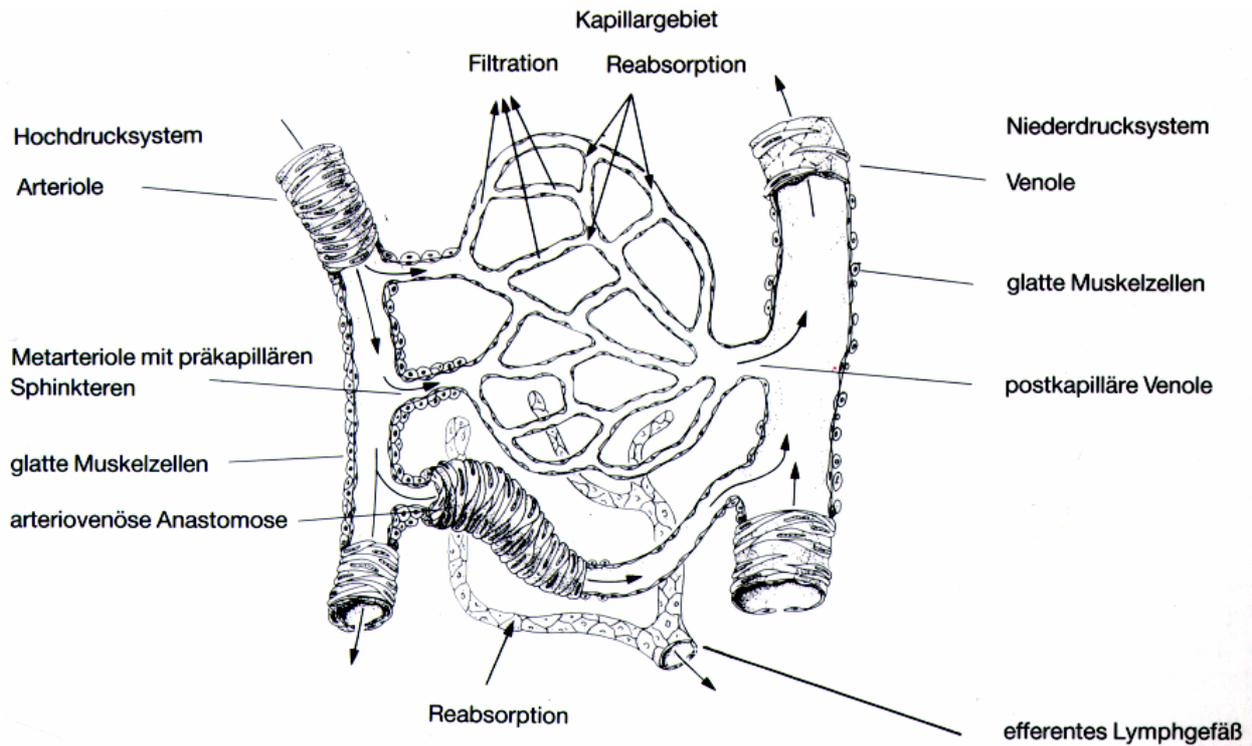


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Kapillarbettes, die Ab- und Zuflußwege der terminalen Strombahn darstellend (aus Rohen, Funktionelle Histologie, Schattauer 2000).

Je entfernter die Arterie vom linken Ventrikel liegt, umso größer ist ihre eigene Regulationskraft; man unterscheidet daher die großen, herznahen Gefäße als „elastischen Typ“ von den distalen Arterien als dem „muskulären Typ“.

Beim venösen Niederdrucksystem ist der Wandbau in weitem Maße vom hydrostatischen Druck abhängig: Venen der unteren Körperhälfte sind mit kräftiger Muskulatur und Klappen versehen, wohingegen solche der oberen Körperhälfte, insbesondere diejenigen vom Kopf und Hals, dünnwandig, muskel- und klappenarm sind. Das gesamte Kreislaufsystem wird jedoch nicht allein vom Bedürfnis der Organe aus gesteuert. Auch dem Blutgefäßsystem ist der Gesamtorganismus mit seinen zahlreichen Regulationseinrichtungen übergeordnet, deren das Nervensystem und das endokrine System sind.

1.2. Morphologie des Blutgefäßsystems

1.2.1. Die Blutkapillaren

Kapillaren bestehen aus einem einschichtigen Endothel (Angiothel), das zu einem Rohr geschlossen ist und die Innenwand bildet. Dem Endothel liegt außen eine vollständige

oder unterbrochene Basalmembran an, welche neben ihrer Stabilisierungsfunktion auch für die Regulation des Stoffaustausches an den Kapillaren verantwortlich ist. Den meisten Kapillaren liegen abluminal einzelne Zellen auf, die sogenannten Perizyten. Sie sind fein verzweigt und fibrillenlos. Diese undifferenzierten Mesenchymzellen können zu Makrophagen transformieren und Stoffwechsel- sowie Abwehrfunktionen übernehmen.

1.2.2. Die Arterien

Im großen Kreislauf sind die Aorta und ihre nachfolgenden Hauptarterien nach dem elastischen Typ gebaut. Bei ihnen ist die Leistung mehr ein Widerstand gegen die hämodynamische Beanspruchung (passiv). Je weiter weg vom Herzen eine Arterie liegt, desto größer wird das Verhältnis von Muskelzellschicht zu Gefäßdurchmesser¹⁴. Zwar nimmt die absolute Dicke der Muskelschicht ab, von etwa 2 mm auf höchstens 20 µm, doch das Lumen der Arterie tut dies in noch größerem Ausmaß, von 30 mm auf höchstens 40 µm. Beim muskulären Typ lassen sich von innen nach außen histologisch drei Wandschichten unterscheiden: Intima, Media und Adventitia. Als Intima werden das lumenauskleidende Endothel sowie die darauf aufliegenden achsenparallelen Fasernetze bezeichnet. Es folgt eine stark elastische Membran, die Tunica elastica interna, an der sich zirkulär angeordnete, rechts- und linksgewundene Muskelfaserspiralen, die Media, anschließen. Die abschließende, bindegewebige Adventitia vereint kollagene, elastische Elemente mit glatten, längs in der Außenschicht verlaufenden Muskelfasern. Sie dient der Einbettung des Gefäßes sowie der Stabilisierung der Gefäßwand¹⁵.

1.2.3. Die Venen

Zwar handelt es sich beim venösen System um ein Niederdrucksystem, jedoch sind Venen gegenüber Arterien relativ größeren Druckschwankungen ausgesetzt. Aus diesem Grund überwiegt im Bau das kollagene Bindegewebe. Auch die glatte Muskulatur ist recht gut ausgebildet, jedoch fehlt immer eine kompakte muskulöse Media, sowie eine Lamina elastica interna. Die große Kapazität und elastische Weitbarkeit des Niederdrucksystems bedingen einen elliptischen Querschnitt bei Venen im Druckbereich um 0 mm Hg. Bis zum Erreichen eines kreisförmigen Gefäßquerschnittes ist nur ein geringfügiger Druckzuwachs notwendig¹⁴.

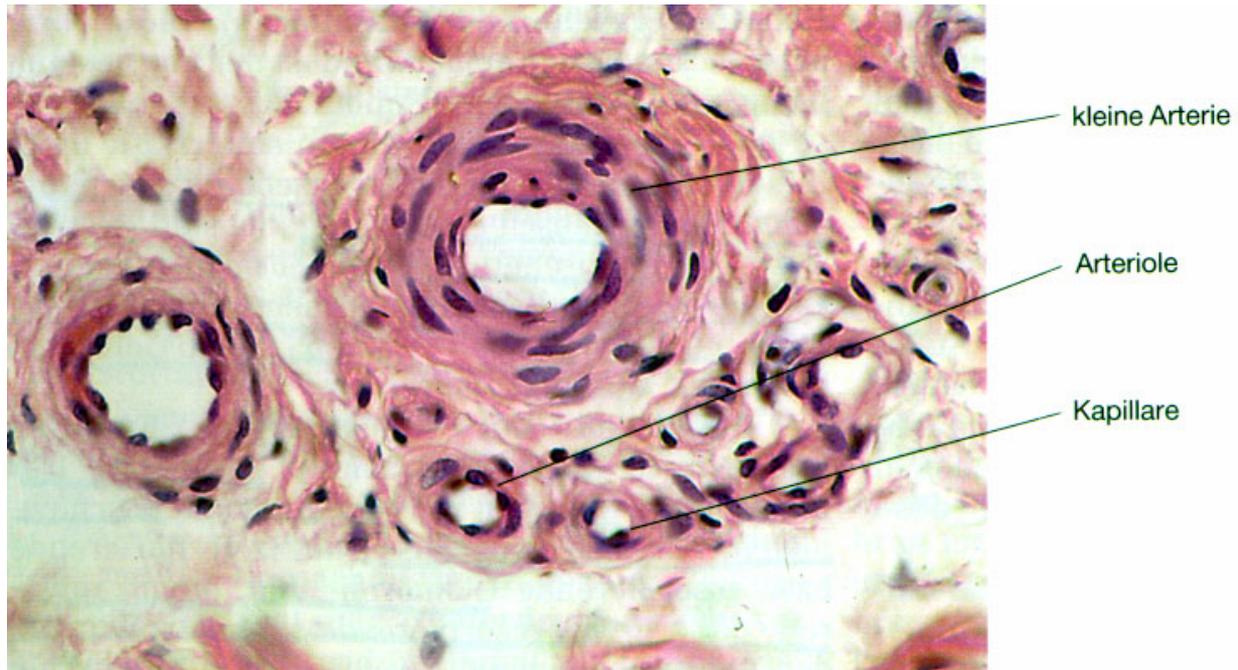


Abbildung 2: Histologische Übersicht der arteriellen Gefäßtypen aus Liebig: Funktionelle Histologie. F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart. 1999; Seite 104. Deutlich zu sehen ist der größere Durchmesser der Arterien gegenüber den kleineren Arteriolen, welche aber im Gegensatz zu den kleineren Kapillaren eine dickere Gefäßwand aufweisen. Der Kapillarwand fehlen glatte Gefäßmuskelzellen, sie besteht nur aus einer Lage Endothelzellen und einzelnen Perizyten (HE-Färbung)¹⁶.

1.3. Pathophysiologie des Blutgefäßsystems

Unter den Gefäßerkrankungen, welche durch eine Kollateralisierung symptomlos verlaufen könnten, spielt die *Arteriosklerose* die Hauptrolle. Bei ihrer Entstehung sind in der Arterienwand ablaufende Prozesse involviert, welche unter normalen Umständen protektive Mechanismen darstellen.

Durch die Persistenz einer Reihe von Risikofaktoren wie z.B. Hyperlipidämie (Triglyzeride, Cholesterin), Hypertonie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus und Adipositas werden diese Prozesse pathologisch. Bei diesen Erkrankungen kommt es initial zu einer Schädigung des Gefäßendothels. Die dadurch induzierte Dysfunktion des Endothels fördert die Anlagerung von Lipoproteinen, die Expression von inflammatorischen Zytokinen wie das „monocyte chemoattractant protein-1“ (MCP-1), sowie die Aufnahme von Lipiden, darunter vom Endothel oxidiertes, sogenanntes „low density lipoprotein“ (oxLDL). Auf diese Weise wird ein inflammatorisches Umfeld geschaffen, das wiederum die Anlagerung von Monozyten und T-Lymphozyten am Endothel und ihre Transmigration in den subendothelialen Bereich der Arterienwand

beschleunigt. Begleitet von der Proliferation glatter Muskelzellen nehmen die aus den Monozyten differenzierten Makrophagen oxLDL auf und werden dann aufgrund ihrer daraus resultierenden Morphologie als Schaumzellen bezeichnet. Absterbende Schaumzellen setzen große Mengen an MCP-1 und Lipiden frei, wodurch der Prozeß noch verstärkt wird. Dadurch entstehen an der Gefäßwand sogenannte Fettstreifen, die im weiteren zu verkalkenden *atheromatösen Plaques* werden. Das Endothel wird zerstört. Diese atherosklerotischen Gefäße besitzen nur noch eine eingeschränkte Fähigkeit zum Bluttransport, was zum Mißverhältnis von Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf des Gewebes führt. Am Herzen tritt dies als *Angina pectoris* zutage, was die klinische Ausprägung einer kritischen Koronarstenose und öfters den Vorboten eines *Herzinfarktes* darstellt. Außerdem kann die Ruptur eines atheromatösen Plaques mit der Bildung eines Fibringerinnsels eine prothrombotische Reaktion auslösen, was als die häufigste Ursache für den plötzlichen Tod durch Herzinfarkt gilt¹⁷.

1.4. Allgemeine Hämodynamik

Für den Transport einer realen Flüssigkeit (Blut) im Gefäßsystem gelten die Grundlagen der Strömungslehre: Die *Stromstärke*, das pro Zeiteinheit fließende Blutvolumen (Blutfluß \dot{Q}), wird bestimmt durch den Widerstand des Gefäßes bzw. Gefäßsystems. Da dieser negativ mit dem Gefäßdurchmesser korreliert, steigt der Blutfluß mit zunehmendem Gefäßradius an.

Zwar stellt Blut keine Newtonsche Flüssigkeit dar, da seine Viskosität abhängig vom Scherungsgrad der Blutkörperchen ist und im Kreislauf keine laminare Strömung mit parabolischem Geschwindigkeitsprofil herrscht, dennoch findet eingeschränkt das für starre Röhren geltende Hagen-Poiseuille Gesetz Anwendung:

$$\dot{Q} = \frac{r^4 \pi \Delta p}{8 \eta L}$$

Abbildung 3: Hagen-Poiseuille Gesetz: Die Stromstärke ist proportional zur vierten Potenz des Gefäßradius. Abgewandelt gelten folgende Bezeichnungen: \dot{Q} =Blutfluß; r =Gefäßradius; Δp =Blutdruckgefälle; η =Blutviskosität; L =Gefäßlänge

Demzufolge ist die Stromstärke bzw. der Blutfluß \dot{Q} proportional zur 4. Potenz des Radius (r) und dem Druckgefälle Δp und antiproportional zur Länge (L) des Rohres und der Flüssigkeitsviskosität (η). Der Gefäßradius hat somit (neben der Gefäßlänge) den entscheidenden Einfluß auf die Stromstärke. Daher ist der Blutfluß in den Kapillaren

am geringsten. Der winzige Durchmesser der Kapillare (4-8 μm) bedingt durch einen hohen Gefäßwiderstand kleinste Stromstärken. Beim Menschen jedoch haben alle unter Ruhe durchströmten Kapillaren der terminalen Strombahn, etwa 8-10 Milliarden der 30-40 Milliarden angelegten Kapillaren, einen Gesamtquerschnitt von 0,2 bis 0,4 m^2 . Dies entspricht dem 500- bis 800-fachen des Querschnitts der Aorta ascendens.

Da Blutgefäße keine starren Röhren sondern innerhalb gewisser Grenzen dehnbar sind, müssen die oben beschriebenen physikalischen Gesetze modifiziert werden. Der Dehnungszustand der Gefäßwand kann durch die *Wandspannung* beschrieben werden, die durch transmuralen Druck, Radius und Gefäßwanddicke bestimmt wird. Die Dehnungsfähigkeit wird dagegen durch die *Compliance* ($\Delta V/\Delta P$) oder deren Kehrwert, den Volumenelastizitätskoeffizienten, beschrieben.

Die Durchblutungsregulation der Organe und Gewebe erfolgt in Arteriolen. Diese besitzen die Fähigkeit, mittels ihrer glatten Muskelzellen den Durchmesser und damit den Widerstand zu variieren. Damit sind sie die Regulatoren der terminalen Perfusion und Steuerungsorgan der Organdurchblutung, da nachfolgende Kapillaren lediglich passiv gedehnt werden können: Vasokonstriktion bewirkt eine Minderung, Vasodilatation dagegen eine Steigerung der Durchblutung.

2. Formen der Gefäßentwicklung

2.1. Vaskulogenese

Die früheste Phase der Gefäßentwicklung ist die *Vaskulogenese*. Unter diesem Begriff wurden seither die verschiedenen Stadien der embryonalen Kreislaufentwicklung beschrieben, so die Differenzierung und Ausdehnung sowie der Zusammenschluß der Endothelzellvorläuferzellen (Progenitoren) zum initialen Gefäßnetzwerk. Im Hühnerembryo konnte zunächst nachgewiesen werden, daß sich unter dem Einfluß der verschiedenen Fibroblasten Wachstumsfaktoren (FGFs) aus der lateralen und paraxialen Mesodermleiste außerhalb des Embryos bipotentielle Vorläuferzellen differenzieren, die Hämangioblasten. Diese lagern sich zu Blutinseln zusammen^{18,19}. Dagegen gibt es auch die Hypothese, daß diese Hämangioblasten nur im Embryo selbst entstehen²⁰. Die innere Schicht dieser zellulären Aggregate entwickelt sich dann zu hämatopoetischen Vorläuferzellen (Hämozytoblasten), wogegen die Zellen der Randregion sich zu Vorläufern einfacher Endothelzellen differenzieren (Angioblasten).

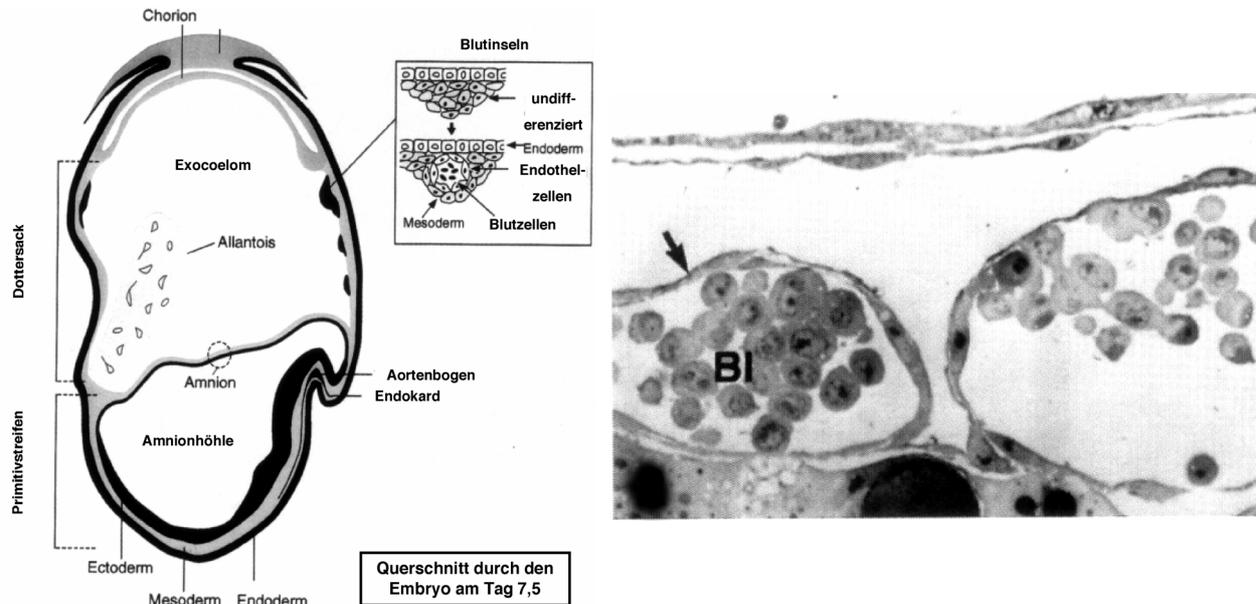


Abbildung 4: Schema zur Lokalisation der Blutinseln im Hühnerembryo. Der durch den Dottersack eines zwei Tage bebrüteten Hühnerembryos. Endothelzellen (Pfeil) hüllen die Blutstammzellen in den Blutinseln (BI) ein. (Max-Planck-Gesellschaft Gd. Jahrbuch 1997. Göttingen: Max-Planck-Gesellschaft; 1997)²⁰.

Letztere fusionieren und bilden ein vaskuläres Netzwerk, zunächst den Gefäßplexus des Dottersackes, wobei zwei Prozesse ablaufen: Entweder die Einstülpung und Bildung transendothelialer Brücken nach der Einwanderung von umgebenden Perizyten, glatten Gefäßmuskelzellen und Matrix, oder die Aufspaltung präexistierender Gefäße in zwei Tochtergefäße²¹⁻²⁴.

Aber auch innerhalb des Embryos entstehen Endothelzellen, hier jedoch zunächst unabhängig von Blutzellen. Sie formieren sich zu Strängen, die wenig später die großen Schlagadern und Venen sowie das Endokard des Embryos auskleiden. Zudem erhalten innerembryonale Blutgefäße nun Anschluß an das Kapillargeflecht des Dottersackes. Mit dem Einsetzen des Herzschlags, beim Menschen zu Beginn der vierten Woche der Embryonalentwicklung, wird das primäre Gefäßsystem mit Blut durchspült, indem die Blutzellen aus den Blutinseln in die Zirkulation ausgeschwemmt werden. Hiermit geht die Vaskulogenese in die Angiogenese über, welche nun das Geflecht der Blutgefäße auch in solche Organanlagen trägt, die zunächst frei von Blutgefäßen sind, wie etwa das embryonale Zentralnervensystem.

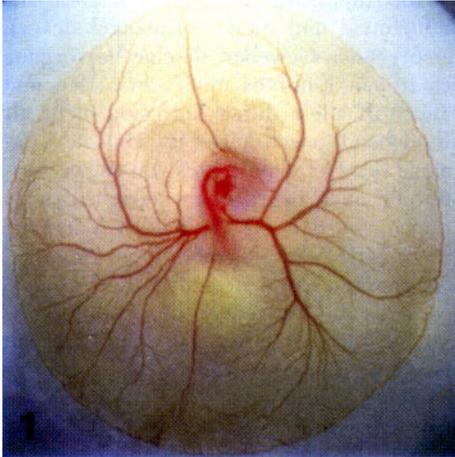


Abbildung 6: Eingeschränkt auf den Menschen übertragbares Blutgefäßsystem eines drei Tage bebrüteten Hühnerembryos. Die Darstellung mit dem Gefäßnetz des Dottersackes und dem zentral gelegenen Herzen veranschaulicht die große Bedeutung, die das Blutgefäßwachstum schon während der frühen Embryogenese einnimmt (Max-Planck-Gesellschaft Gd. Jahrbuch 1997. Göttingen: Max-Planck-Gesellschaft; 1997)²⁰.

Kürzlich publizierte Studien weisen darauf hin, daß die Vaskulogenese nicht auf die Embryogenese beschränkt zu sein scheint. Möglicherweise können postnatal Untergruppen von CD34+ Zellen des Knochenmarks mobilisiert werden und in der Peripherie zu Endothelzellen differenzieren^{25,26}. Dieser postembryonale Prozeß wird auch als Neo-Vaskulogenese bezeichnet.

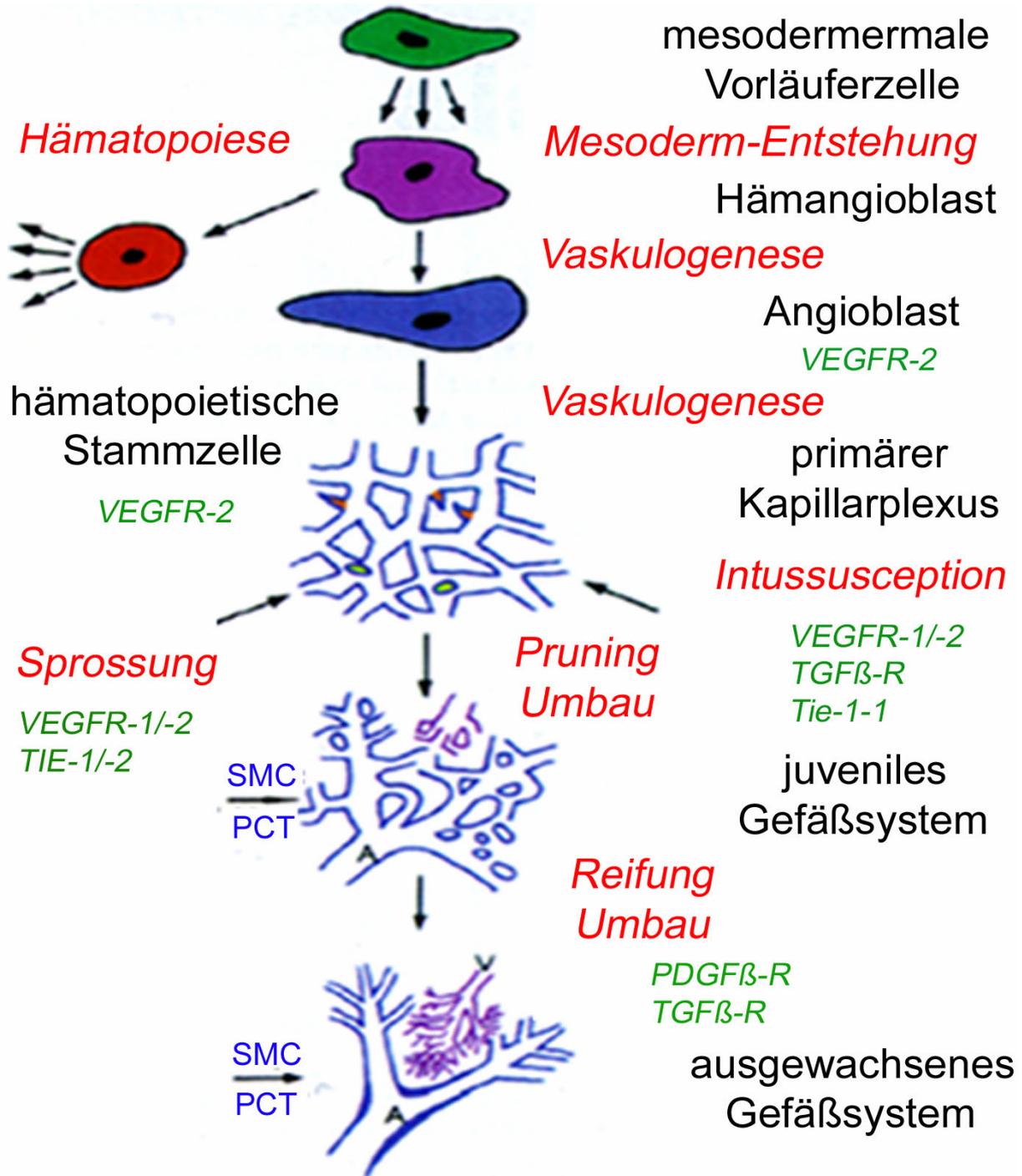


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Einzelschritte (rot), Moleküle (grün) und Erscheinungsformen (schwarz) im Rahmen der Entwicklung des Gefäßsystems, abgeleitet von Beobachtungen im Gefäßsystem des Dottersacks. Rote Spitzen im kapillären Primärplexus stellen Aussprossungen, grüne Kreise sich teilende Kapillaren dar. A, Arteriole; V Venole; SMC, glatte Gefäßmuskelzellen; PCT, Perizyten (Risau W., Mechanisms of angiogenesis. Nature. 1997;386:671-4²¹).

2.2. Angiogenese

Der Terminus Angiogenese wurde 1935 von Hertig eingeführt, um den Prozeß der Bildung von neuen Blutgefäßen in der Plazenta zu beschreiben²⁷. Später, 1971, verwendete ihn Folkman auch für das Gefäßwachstum in soliden Tumoren²⁸. Prinzipiell steht die Angiogenese für das Wachstum von Kapillaren aus bereits bestehenden Gefäßen. Hierbei unterscheidet man zwischen einer sprossenden und einer nicht sprossenden Form²¹: Die *sprossende* Angiogenese beginnt mit der Proliferation von Endothelzellen aus präexistierenden Kapillaren. Nach proteolytischer Degradation der Extrazellulärmatrix kommt es infolge chemotaktischer Endothelzellmigration zur Bildung kapillärer Sprossen ins umliegende Gewebe³⁰.

Bei der *nicht-sprossenden* Angiogenese dagegen zerteilen transkapilläre Matrixstege präexistierende Gefäße (Intussuszeption), was zuerst für die embryonale Lunge beschrieben wurde²⁹. Welcher Typ dieser synchron während der Entwicklung von Organen ablaufenden Prozesse in einem Gewebe vorzufinden ist, hängt wahrscheinlich von der Anzahl bereits vorhandener Gefäße bei Organwachstumsbeginn ab²¹. Es entstehen jeweils kapilläre Netzwerke zur lebensnotwendigen Nähr- und Sauerstoffversorgung von Geweben²⁷.

Im *adulten* Organismus mit bereits ausreichend existierenden Kapillarnetzen kommen der Angiogenese wichtige *physiologische* Funktionen zu, zum Beispiel im Rahmen der Wundheilung und der zyklischen Ovarfunktion. Unter *pathologischen* Bedingungen wie der Tumorprogression, der Inflammation und der Gewebsischämie kommt es ebenfalls zur Neubildung von Blutgefäßen. Die überschießende oder fehlende Entwicklung von Blutgefäßen während derartiger pathologischer Prozesse kann zu Erkrankungen mit hohem Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko führen. Ein Beispiel für eine pathologische Neubildung von Blutgefäßen ist die Vaskularisierung von soliden Tumoren. Um im Wachstum nicht durch einen Mangel an Nährstoffen und Sauerstoff limitiert zu sein, sind viele Tumorzellen in der Lage, die Bildung von Blutgefäßen über die Produktion und Freisetzung von Angiogenesefaktoren zu induzieren. Desweiteren ist Angiogenese beispielweise bei der rheumatischen Arthritis und verschiedenen Retinopathien wesentlicher Bestandteil des pathophysiologischen Prozesses³⁰.

Die Induktion der Angiogenese erfolgt vor allem durch Hypoxie im betroffenen Gewebe. Dieses verursacht die Expression von spezifischen Transkriptionfaktoren wie dem „hypoxia inducible factor-1“ (HIF-1), über den wiederum die Expression angiogener Wachstumsfaktoren induziert wird. So wird unter anderem in Tumoren und an Orten der Entzündung in der Folge eine Expressionssteigerung des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) beobachtet³¹⁻³⁴. Die Steigerung der Genexpression von VEGF wird so durch die Bindung von HIF-1 an den Promotor des VEGF-Gens bedingt³⁵. Außerdem konnte auch ein Einfluß der Hypoxie auf die Stabilität der VEGF-mRNA nachgewiesen werden³⁶⁻³⁸.

2.3. Arteriogenese

2.3.1. Grundlegendes

Im Gegensatz zur Angiogenese differenzieren bei der Arteriogenese präexistierende arterio-arteriolare Anastomosen zu funktionellen Arterien aus. Diese Kollateralgefäße arteriolen Charakters werden unter physiologischen Bedingungen zur Versorgung der Gewebe benötigt und spielen vor allem pathophysiologisch nach dem Verschuß einer Arterie eine wichtige Rolle; sie werden dann zu dessen Überbrückung rekrutiert und stellen eine ausreichende Blutzufuhr zu weiter peripher gelegenen Geweben sicher¹³. Kollateralarterien entwickeln sich sowohl im koronaren als auch im peripheren Kreislauf, jedoch variiert ihre Ausprägung bei verschiedenen Spezies deutlich³⁹.

Die Ursache für die Anlage von Kollateralgefäßen nach dem „Arkadenprinzip“ wird unterschiedlich diskutiert. Zum einen könnte es sich um unvollständig differenzierte Reste des primären Gefäßplexus handeln, welche sich im Rahmen der embryonalen Entwicklung nicht in zwei anatomische Endarterien aufteilten. Zum anderen könnten die präexistierenden Arteriolen zur besseren Versorgung der Gewebe angelegt sein, da sie wie am Beispiel der Muskulatur auch während der Beanspruchung im Rahmen der Kontraktion eine maximale Durchblutung des Gewebes gewährleisten: Sie können das Gewebe von zwei Richtungen aus perfundieren, der proximal und der distal gelegenen Verbindung zur Hauptarterie.

Der englische Anatom Richard Lower beschrieb 1669 als erster die Existenz präformierter Kollateralverbindungen am Herzen⁴⁰. Er erkannte auch bereits deren Schutzfunktion im Falle eines Verschlusses von Koronargefäßen.



Abbildung 8: Richard Lower: Porträt des englischen Anatomen aus dem 17. Jahrhundert⁴⁰.

Cap. 1. & Structura. 13

mox ab origine divisa. Quorum orificia circa principium aortae immediate extra valvas semilunares aperiuntur, coronariae inde dictae quod truncis non statim in parenchyma demissis, sed facto prius circuitu quo commodius undique sese explicent, cordis basin amplectuntur & cingunt: Et licet ab ipsa origine in oppositas cordis regiones ab invicem recedant, circa extremas tamen partes rursus conveniunt & passim apertis osculis invicem communicant; adeo ut si uni liquor aliquis injiciatur, per utramque simul & semel dispergatur: Cum enim eadem ubique caloris vitalis atque nutrimenti necessitas urgeat, ne alibi deficient, anastomosi hanc abunde providetur.

Uti autem arteriae duae sanguinem ad alimentum & calorem cordi suppeditandum, subministrant, pariter & duae venae ab ambitu suo coronariae quoque dictae, reducendo sanguini inserviunt. Et ne quis in posterum dubitet an venae capillares apertis osculis in se invicem hient, si intueatur conum cordis vitulini aut cujuspiam animalis recens nati

in

Abbildung 9: „Tractus de Corde“. Auszug des Originaltextes von Richard Lower R., 1669⁴⁰.

Übersetzt aus dem Lateinischen läßt sich die Kernaussage seiner Publikation folgendermaßen zusammenfassen:

Die Koronargefäße kommunizieren teilweise über Anastomosen, welche einem Versorgungsmangel mit Blut völlig vorbeugen können.

Hieran zeigt sich, daß Lower nicht nur präzise die Kollateralen beschrieb, sondern sich schon deren Schutzfunktion im Falle eines Gefäßverschlusses bewußt war.

Im Jahre 1757 bewies der deutsche Anatom Albrecht von Haller⁴¹, daß Koronararterien an Stellen hohen arteriellen Druckes ein System interarterieller Verbindungen ausprägen. Außerdem grenzte er bereits die Kollateralarterien von Kapillargefäßen ab. Ein Jahrhundert später postulierten jedoch namhafte Anatomen, wie Conheim⁴², Hyrtl⁴³ und Henle⁴⁴, die Koronaren seien Endarterien. Dies blieb auch trotz stichiger

Beweise für die physiologische Existenz der Kollateralen durch Spalteholz⁴⁵ um die vorherige Jahrhundertwende bis in die Mitte des 20. Jahrhunderts allgemeine Lehrmeinung - die „neue“ Röntgentechnologie der 30er Jahre war noch nicht in der Lage, kleine Arteriolen darzustellen.

So nahm man bis in die frühen 60er Jahre an, koronare Kollateralen fänden sich lediglich in etwa 4 % der menschlichen Herzen und öffneten sich passiv unter dem Einfluß von Druckgradienten infolge Stenose. Es gab Hinweise aber keine Beweise für die Entwicklung der Kollateralen: Eckstein wies auf die Zeitabhängigkeit der Erholung der peripheren Drücke nach akutem Verschuß hin⁴⁶.

Letztendlich waren es Longland¹⁰ und Fulton⁴⁷, welche unwiderlegbare Beweise für die Existenz von Kollateralen im gesunden als auch im chronisch herzkranken Menschen fanden. Zudem zeigten sie, daß bei KHK-Patienten oftmals größere koronare Kollateralen zu finden sind⁵⁰.

Longland definierte einzelne Bereiche der Kollateralarterien als Stamm, Mittelzone und Wiedereintritt und hob so hervor, daß es sich nicht um anatomische Endarterien handelt¹⁰. Fulton zeigte erstmals, daß der Stamm epikardialer Kollateralen im menschlichen Herzen von nicht-ischämischen Myokardbereichen umgeben ist⁴⁸. Weitere Untersuchungen bestätigten in der Folge, daß das Wachstum von Kollateralgefäßen nicht durch Hypoxie ausgelöst wird^{11,39,49-51}.

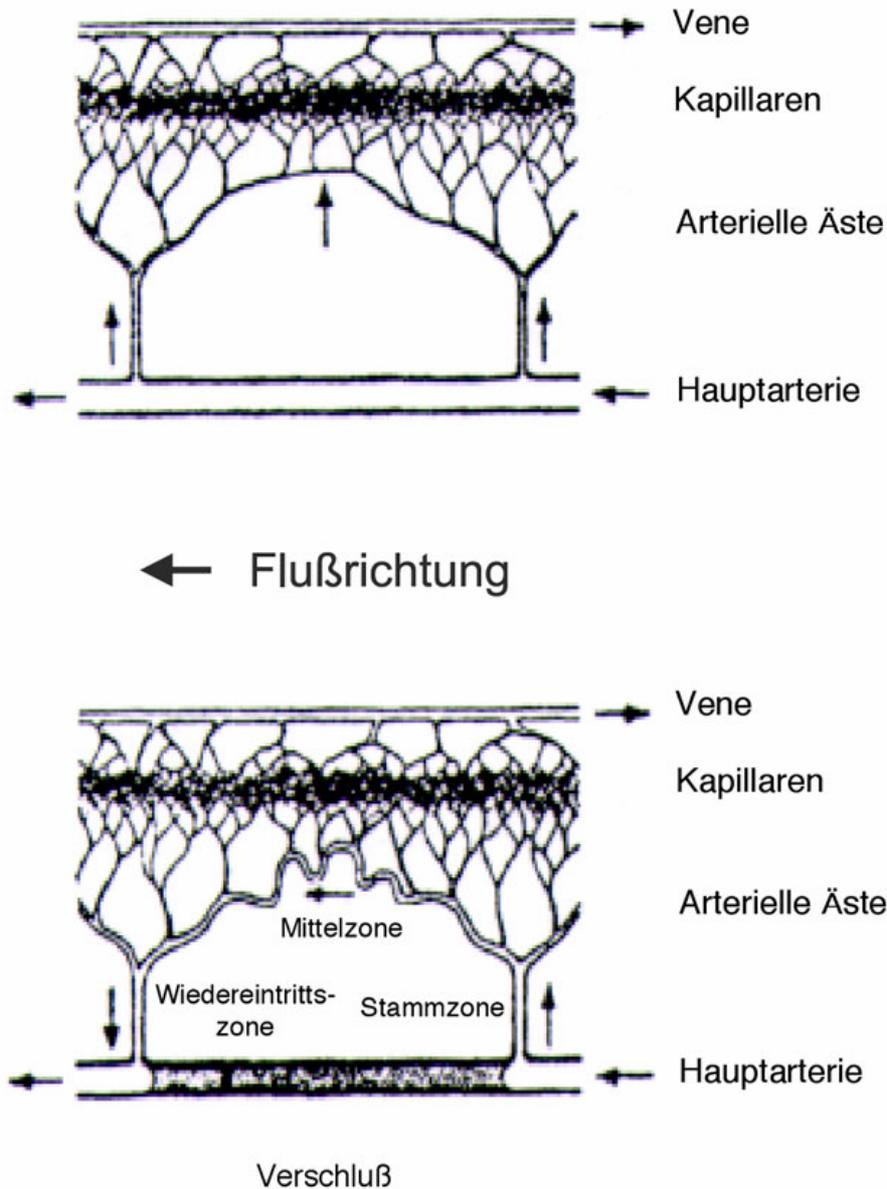


Abbildung 10: Definition der arteriellen Bereiche im Kollateralgebiet nach Longland, 1953¹⁰. Infolge Verschlusses der Hauptstromarterie wird eine präexistierende, anastomosierende Arteriole zur Kollateralarterie umfunktioniert. Sie übernimmt die Funktion des verschlossenen Gefäßes, das Blut in die Peripherie zu leiten.

Es wurde klar, daß Kollateralen anderen Mechanismen als der Vaskulogenese und Angiogenese unterliegen. Sie stellen vielmehr präexistierende Gefäße dar, welche im Gegensatz zu komplett neugebildeten Kapillaren zu funktionellen Arterien umgebaut werden. Zudem ist dieser Prozeß nicht an Ischämie gebunden, bzw. findet sogar lediglich im nicht-hypoxischen Gewebe statt. Es wurde nachgewiesen, daß epikardiale Kollateralen nie in Verbindung mit dem ischämischen Endomyokard im Hundeherzen stehen⁴⁹. Außerdem kommt es im Kaninchenmodell in Ruhe zu keiner Veränderung des

Blutflusses zur Oberschenkelmuskulatur, wo Kollateralarterien nach Femoralisligatur entstehen. Ihr Adenosintriphosphat (ATP) und Phosphokreatinin (PCr)-Gehalt ist normal, und es konnte keine Hypoxie-induzierte Gentranskription (z.B. VEGF) festgestellt werden^{11,39,50-52}. Der Abstand zwischen Regionen der Ischämie und des Kollateralwachstums kann extrem lang sein: Bis zu 70 cm zwischen der gangränösen Fußzehe und den eine Femoral- oder Poplitealokklusion überbrückenden Kollateralen⁴⁹.

Wachstum als Mechanismus koronarer Kollateralentwicklung wurde 1967 zum ersten Mal von Schaper et al. beschrieben, und 1971 konnte schließlich nachgewiesen werden, daß präexistierende Kollateralarteriolen nicht durch Vasodilatation, sondern infolge Proliferation von Endothel und glatter Gefäßmuskulatur zu großen Kollateralarterien werden⁵³⁻⁵⁴. Schließlich brachte eine Reihe von Studien zum Anteil des Kollateralwachstums an der Genesung nach Myokardialinfarkt den entgeltigen Beweis für die Funktionalität von Kollateralen⁵⁵⁻⁵⁷. Es wurde bewiesen, daß Kollateralarterien Gewebe und Leben retten.

2.3.2. Mechanismen

Hauptelement der Arteriogenese sind verstärkte *Scherkräfte*, Einwandern zirkulierender *Monozyten* und deren Vorläuferzellen, sowie *präexistierende Kollateralarteriolen* als Substrat. Sobald sich eine Stenose in der Hauptstrombahn hämodynamisch bemerkbar macht, nimmt das Blut den Weg des geringsten Widerstandes: Es fließt über präexistierende Kollateralen in die Peripherie. Sofort nach Verschluss des Hauptgefäßes entwickelt sich somit ein enormer Druckgradient innerhalb des Kollateralsystems, entlang der kürzesten Verbindung zwischen dem Hoch- und Niederdruckgebiet. Dies führt zum Anstieg der Flußgeschwindigkeit, des Druckes, sowie der Schubspannung in den nun als Kollateralen fungierenden Gefäßen. Schon 1893 wies Thoma auf die Rolle der hämodynamischen Parameter beim Gefäßwachstum während der Entwicklung hin. Jegliche anhaltende Abweichung von der Konstante zwischen Gefäßdurchmesser und Blutflußgeschwindigkeit bewirkt Prozesse des Wachstums oder der Atrophie, bis das ausgewogene Verhältnis wieder eingestellt ist. Er formulierte das ***Gesetz der Histiomechanik***: Demnach tendieren größere Gefäße mit geringem Durchfluß dazu, ihr Lumen zu reduzieren (z.B. Bypass-Stenose), wogegen kleine Gefäße mit chronisch verstärktem Durchfluß infolge Umbau oder Kollateralwachstum im Durchmesser zunehmen⁵⁸.

2.3.2.1. Initialphase auf zellulärer Ebene

Der physiologische Blutfluß der Femoralarterie verursacht annähernd eine Schubspannung von $4,8 \times 10^{-3} \text{ dyn cm}^{-2}$ auf. Infolge der Okklusion der Femoralarterie kommt es zum etwa 200-fachen Anstieg des Blutflusses entlang der präexistierenden Anastomosen und damit zur Zunahme der Schubspannung auf Werte von $889 \times 10^{-3} \text{ dyn cm}^{-2}$ ⁵⁹. Hieraus resultiert eine Öffnung von Chlorid-Kanälen zur Aktivierung des Endothels. Es werden Chemokine wie das „monocyte chemoattractant protein-1“ (MCP-1), Kolonie-stimulierende Faktoren wie der „granulocyte macrophage-colony stimulating factor“ (GM-CSF) und Zelladhäsionsmoleküle wie das „intercellular adhesion molecule-1“ (ICAM-1) hochreguliert. Hierdurch wird das Einwandern von im Blut zirkulierenden Monozyten induziert⁶⁰⁻⁶³. Die gesteigerte Expression solcher Gene wird teilweise durch das sogenannte „shear stress responsive element“ (SSRE) im Promotor verschiedener Gene vermittelt (NOS, PDGF, MCP-1)^{64,65}. Außerdem bewirken die das Volumen von Endothelzellen kontrollierenden, offenen Chloridkanäle ein elektronen-mikroskopisch sichtbares Anschwellen des Endothels⁶⁶.

Zusätzlich lassen die bereits nach 12 Stunden vermehrt exprimierten Kalzium-unabhängigen Adhäsionsmoleküle, „vascular cell adhesion molecule-1“ (VCAM-1) und ICAM-1 die Endotheloberfläche rauh aussehen^{60,67}; sie mediierten das Anheften von Monozyten an die Gefäßwand⁶⁸⁻⁷¹, welche darauf transmigrieren können.

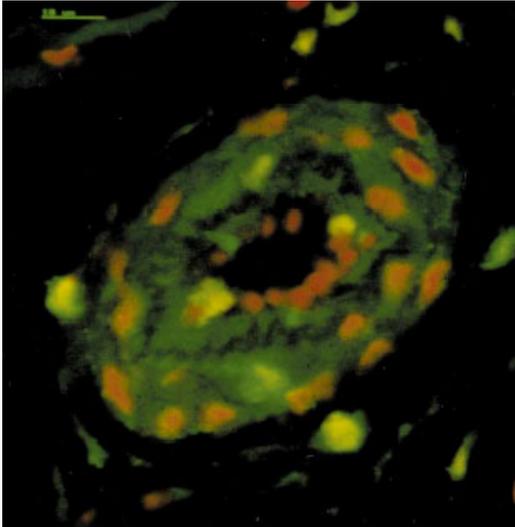


Abbildung 11: ICAM-1 Expression (gelb) nach 12 h Okklusion der Femoralarterie im Kaninchen. Bild aus „Collateral and capillary formation: a comparison“ von E. Deindl/W. Schaper in *Therapeutic Angiogenesis, J.A. Dormandy*⁷².



Abbildung 12: Am Kollateralgefäßendothel angehefteter Monozyt (Rolling) des Kaninchens. Bild aus Schaper, J.: „The endothelial surface of ...“ in *Virchows Arch*⁶⁸.

Auch Thrombozyten heften sich an und produzieren neben verschiedenen Wachstumsfaktoren Interleukin-4 (IL-4), welches erneut die Expression von Adhäsionsmolekülen verstärkt. Desweiteren schafft die vermehrte Expression von GM-CSF ein günstiges Milieu für die angehefteten Monozyten⁷³⁻⁷⁶. Sobald diese innerhalb von 72 Stunden nach Okklusion in die Arteriolarwand eingewandert sind, akkumulieren sie in der Adventitia und produzieren nach Aktivierung und Umwandlung zu Makrophagen zusätzlich große Mengen an Wachstumsfaktoren^{50,77}. Darunter fallen vor allem der „fibroblast growth factor-2“ (FGF-2), ein Mitogen für Endothel und Gefäßmuskulatur^{78,79-81} sowie der „vascular endothelial growth factor“ (VEGF), ein Endothelmitogen⁸⁰ mit der Eigenschaft, Monozyten zu aktivieren. Daneben werden auch Matrix-Metallo-Proteinase (MMPs) zum Umbau der alten arteriolen Struktur und zur Platzschaffung für die Ausbreitung der Kollateralen freigesetzt⁸¹. Außerdem wird durch die Produktion von „tumor necrosis factor- α “ (TNF- α) das zur Arteriogenese nötige entzündliche Milieu geschaffen und weitere Monozyten zur Potenzierung des initialen Ablaufes angelockt.

Rund drei Tage nach der Okklusion kommt es zur Proliferation von Endothel- und glatten Gefäßmuskulzellen. Es entsteht auf diese Weise innerhalb einer Woche eine Kollateralarterie, welche sich morphologisch nur geringfügig von einer normalen Arterie unterscheidet^{39,70}.

2.3.2.2. Gefäßumbau aus histologischer Sicht

Normalerweise ist die Mitoserate und somit die Proliferation von Endothel- und Gefäßmuskelzellen in adulten Geweben extrem niedrig und nur unter bestimmten pathologischen Bedingungen wie Atherosklerose und Restenose verstärkt⁵⁴.

Nach ein bis drei Tagen Gefäßokklusion erreicht die Mitoseaktivität von Endothel, Gefäßmuskel und Fibroblasten ihr Maximum⁸². Somit befindet sich die Arteriogenese in der zweiten Stufe, der *proliferativen Phase*. Jedoch ist Proliferation nicht die einzige Säule des Kollateralenwachstums, sondern auch ein anschließender starker Umbauprozess ist zur Vergrößerung des Durchmessers gefordert. Dieser wird in eine frühe synthetische Phase und spätere Reifungsphase eingeteilt⁸³:

Während der *synthetischen Phase* am 3. bis 14. Tag kommt es neben einer Vergrößerung des endoplasmatischen Retikulums, der Mitochondrienzahl und des Golgi-Apparates zur Verdauung und Zerstörung der Lamina elastica interna als Hauptbarriere für die Gefäßmuskelzellmigration. Die Verbindungen zwischen Gefäßmuskelzellen werden aufgelockert, wodurch die kleine Arteriole dilatiert und durchlässig für Fibrinogen wird. Gefäßmuskelzellen migrieren nun aus der mittleren Gefäßmuskelschicht (Media) in den subendothelialen Raum und bilden eine dicke Gefäßinnenschicht (Intima). Diese neuen Gefäßmuskelzellen besitzen einen undifferenzierten, sekretorischen Phänotyp mit reichlich Organellen und haben eine longitudinale oder helikale Orientierung⁸⁴. Außerdem ist der Verlust der meisten Aktinfilamente typisch für diesen Synthesetyp der Gefäßmuskulatur, welcher extrazelluläre Matrix, Kollagen, Elastin und schließlich eine neue Lamina elastica interna produziert^{39,85}.

Die Reifungsphase beginnt erst zwischen dem 14. und 21. Tag nach Ligatur. Sie ist gekennzeichnet durch verminderte Proliferation, Migration und Proteolyse, Wiederherstellung des kontraktiven Phänotyps unter den Gefäßmuskelzellen und Neubildung der Lamina elastica interna nahe dem Endothel. Zudem ist die Monozytenanlockung bereits beendet und Adhäsionsmoleküle werden nicht länger exprimiert⁸³.

In einigen wachsenden Kollateralarterien nimmt die Dicke der neuen Innenschicht (Neointima) infolge der Gefäßmuskelproliferation derart zu, daß es infolge eines Verschlusses des Lumens zur Regression des Gefäßes kommt⁸⁶. Dies hat wahrscheinlich

mit der Konkurrenz um den Blutfluß zu tun: Initial größere Gefäße führen einen beständig zunehmenden Anteil des Gesamtflusses, was die Scherkräfte in den kleineren vermindert. Dies führt zur Reduktion des Umbaus bereits mitotisch stimulierter, kleinerer Gefäße und somit zur überschießenden Intimaproliferation und verstärkter Fibronektin-Expression³⁹. Trotz des starken Wachstums von Kollateralarterien können diese bisher nicht die Konduktanz der zu ersetzenden Arterie erreichen. Dies läßt eine Option zur therapeutischen Verstärkung des Kollateralwachstums mittels exogener Zufuhr von Wachstumsfaktoren oder lokalen Gentransfers offen.

3. Gefäßwachstumsfaktoren

3.1. Die Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Familie und ihre Rezeptoren

VEGF ist ein endothelial sezerniertes, endothelspezifisches Mitogen mit angiogenen Eigenschaften, das eine parakrine Steuerung der Angiogenese möglich erscheinen läßt²⁴. Seine Gen-Expression wird durch Bindung des infolge Hypoxie vermehrt exprimierten Transkriptionsfaktors HIF-1 an den Promotor hochreguliert^{87,88}. Bereits 24 Stunden nach Okklusion der Femoralarterie ist beim Kaninchen eine signifikante Erhöhung der VEGF mRNA im ischämischen Muskel nachzuweisen⁸⁹. Da alleine der Verlust eines VEGF-A-Allels zur Letalität von Mäuseembryonen am Lebenstag 10,5 führt, muß VEGF essentiell für die embryonale Entwicklung des Kreislaufsystems sein²².

Infolge alternativen Splicings oder Degradation der Primär-mRNA existieren mehrere Formen von VEGF, so der Placenta Growth Factor (PlGF), VEGF-A (einige Isoformen mit z.B. 121, 145, 165, 183, 189 oder 206 Aminosäuren), -B, -C, -D, und -E⁹⁰.

Chemisch ist die 165 Aminosäuren große Isoform von VEGF-A (VEGF₁₆₅) ein basisches und daher Heparin-bindendes, homodimerisches Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 45 Kilodalton (kDa). Wogegen die 121 Aminosäuren große Isoform von VEGF-A (VEGF₁₂₁) als frei diffundierendes Protein zu schwach basisch für eine Heparin-Bindung ist^{91,92}.

Die unterschiedlichen Funktionen der verschiedenen *VEGF-Formen* sind durch die Bindungsaffinitäten zu den drei VEGF-Rezeptoren (VEGFR-1, -2 und -3) bedingt:

VEGF-A kann durch Bindung des VEGFR-1 auf Monozyten deren Transmigrationseigenschaften potenzieren und durch Aktivierung des endothelialen VEGFR-2 die Proliferation von Endothelzellen bewirken; zudem kann es indirekt über die Induktion von MCP-1 die endotheliale Mitoserate steigern⁹³. Es ist auch alleinig in der Lage Neuropilin-1 zu binden⁹⁴.

VEGF-B und PlGF aktivieren ausschließlich VEGFR-1 und beeinflussen somit die Aktivierung und Differenzierung von Monozyten⁷⁷. Dagegen binden VEGF-C und -D neben VEGFR-2 auch den Lymphgefäß-spezifischen VEGFR-3. Sie sind somit Mitogene für vaskuläres und lymphatisches Endothel⁹⁵. VEGF-E ist durch ausschließliche Bindung an VEGFR-2 ein rein endothelialer Wachstumsfaktor⁹⁶.

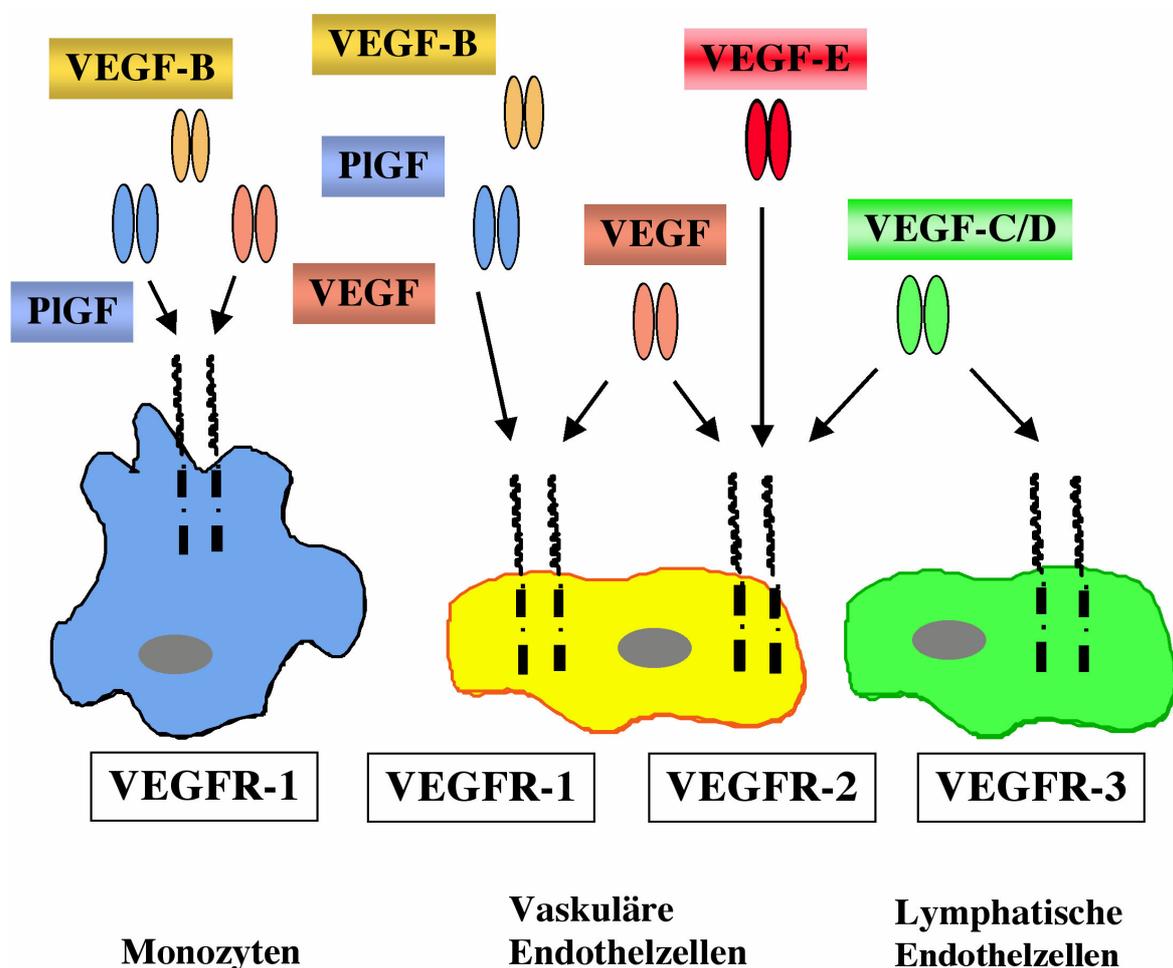


Abbildung 13: Schematische Darstellung der VEGF-Rezeptoren-Familie und ihrer Liganden. VEGF bindet an VEGFR-1 und -2, VEGF-C/D an VEGFR-2 und -3. PlGF und VEGF-E hingegen sind spezifische Liganden für jeweils VEGFR-1 bzw. VEGFR-2⁹⁷.

Alle Rezeptoren für VEGF sind *Tyrosinkinasen* und besitzen sieben Immunoglobulin (Ig)-ähnliche Domänen in der extrazellulären Domäne, eine einzelne transmembranäre Region und eine homologe Tyrosinkinasesequenz mit eingeschobener Kinasendomäne⁹⁸⁻¹⁰⁰. Der VEGFR-1 wird meist als „fms-like tyrosine kinase-1“ (Flt-1) bezeichnet, und der VEGFR-2 auch als „fetal liver kinase-1“ (Flk-1) oder im Menschen als „kinase insert domain-containing receptor“ (KDR) beschrieben.

Die *Bindungsstelle* für VEGF ist in der zweiten Ig-ähnlichen Domäne von VEGFR-1 und VEGFR-2 lokalisiert, da nach deren Deletion die VEGF-Bindungsfähigkeit aufgehoben ist¹⁰¹.

Es wurde berichtet, daß die *Expression* dieser Rezeptoren durch Hypoxie beeinflusst ist, jedoch in geringerem Maße als die des Liganden, VEGF selbst. Da Gerber et al. eine Transkriptionssteigerung von lediglich VEGFR-1 infolge Hypoxie zeigen konnten¹⁰², wird für VEGFR-2 ein posttranskriptioneller Mechanismus angenommen¹⁰³. Außerdem könnte der Expressionsanstieg indirekt verstärkt werden, da VEGF auch selbst die Expression seiner Rezeptoren fördert¹⁰⁴.

Die Funktion und Signaltransduktion von VEGFR-1 und VEGFR-2 sind verschieden: Am rezeptorfreien Schweineaortenendothel konnte VEGF nur nach Transfektion mit einem für Flk-1 kodierenden Plasmid, nicht mit einem Flt-1-Plasmid, seine chemotaktische und mitogene Wirkung entfalten. Zudem wurde gezeigt, daß das Ausmaß der Rezeptor-Phosphorylierung im Gegensatz zu KDR, bei Flt-1 nur sehr schwach ist¹⁰⁵, obwohl dieser Rezeptor VEGF zehnfach stärker bindet als KDR⁷².

Soker et al. wiesen einen weiteren Rezeptor für die VEGF-Familie nach, nämlich Neuropilin-1⁹⁴. Dieser Rezeptor der Kollapsin-Familie bindet die Heparin-bindende Isoform von PlGF, PlGF-2 und die 165 Aminosäuren-Isoform von VEGF. Seine Wirkung liegt in der Potenzierung der Bindung von VEGF₁₆₅ zu KDR und dessen Chemotaxis. Dahingegen minimiert die Hemmung der Bindung zu Neuropilin-1 die Affinität von VEGF₁₆₅ zu KDR und dessen mitogene Wirkung auf Endothelzellen: Neuropilin-1 scheint VEGF₁₆₅ dem KDR-Rezeptor derart zu präsentieren, daß dessen Signaltransduktion effektiver wird.

Neben seiner mitogenen Eigenschaft funktioniert VEGF auch als Überlebensfaktor für serumfrei kultivierte Endothelzellen: Über den Phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt Signaltransduktionsweg bewirkt es im menschlichen Endothel die Expression der anti-

apoptotischen Proteine Bcl-2 und Al¹⁰⁶. Außerdem veranlaßt es die endotheliale Expression einiger Proteasen, wie „tissue-plasminogen activator“ (t-PA) und dessen Inhibitor (PAI-1)¹⁰⁷, sowie der Metalloproteinase Kollagenase¹⁰⁸. Zudem ist VEGF aufgrund seiner Eigenschaft des „Gefäßleckens“ in der Meerschweinchenhaut auch als „vascular permeability factor“ (VPF) bekannt¹⁰⁹. Nach Dvorak ist diese mikrovaskuläre Permeabilitätssteigerung für Proteine ein kritischer Schritt in der Angiogenese von Tumoren und Wunden¹¹⁰. Später zeigten Bates und Curry, daß VEGF über einen vermehrten Einstrom von Kalzium auch einen Anstieg der hydraulischen Konduktanz von Kapillaren bewirkt¹¹¹. Wiederum andere Arbeitsgruppen zeigten, daß VEGF in vitro und in vivo eine Fenestrierung im Endothel ermöglicht^{112,113}. Clauss et al. berichteten schließlich 1990 von der Vermittlung der Monozytenchemotaxis durch VEGF¹¹⁴.

3.2. Placenta Growth Factor (PlGF)

PlGF ist als Mitglied der VEGF-Familie ein homodimerisches Glykoprotein und weist eine 53 %ige Identität mit der „platelet-derived growth factor“ (PDGF)-ähnlichen Region von VEGF auf. Infolge alternativen mRNA-Splittings existieren zwei Isoformen von PlGF: Das aus 131 Aminosäuren (As) bestehende, 28 kDa schwere PlGF-1 (PlGF₁₃₁) und das um 21 hauptsächlich basische As größere, 32 kDa schwere PlGF-2 (PlGF₁₅₂). Dieser Anteil mehr basischer As bedingt die starke Bindungsaffinität von ausschließlich PlGF-2 zu Heparin.

PlGF bindet sehr stark an den VEGFR-1 (Flt-1), kann aber nicht den rein endothelialen VEGFR-2 (Flk-1) binden. Somit bewirkt es im Gegensatz zu seinem Verwandten VEGF keine direkte Steigerung der Mitogenität, Permeabilität oder Tyrosin-Phosphorylierung von Endothelzellen⁷⁷. Carmeliet et al. wiesen bestätigend an Mäusen mittels PlGF-Deletionsmutanten (PlGF^{-/-}) nach, daß PlGF nicht für die embryonale Angiogenese essentiell ist. Jedoch konnten sie in diesen Tieren feine Umbaudefekte in Gefäßen der Retina feststellen und durch transformierte Fibroblasten provozierte PlGF^{-/-}-Fibrosarkome waren kleiner als die Wildtypsarkome; sie wiesen trotz vergleichbarer Dichte an Gefäßen überwiegend solche mit einem kleineren Lumen auf¹¹⁵.

Weiterhin interessant an dieser Studie erscheint die Beobachtung, daß Wildtypmäuse während der Wundheilung mehr Arteriolen als Kapillaren entwickelten, wohingegen für PlGF^{-/-} Mäuse das Gegenteil der Fall war. Entsprechend waren auch die Kollateralgefäße nach Ligatur der Femoralarterie in den Wildtypmäusen, nicht aber in

den Deletionsmutanten vergrößert. Deren Kollateralen wurden weniger von Monozyten infiltriert, was eine reduzierte Aktivierung und Chemotaxis der Monozyten infolge Mangels an PlGF möglich erscheinen läßt⁷⁷.

Zudem konnte die deutlich geminderte Extravasation von Fibrinogen in den Deletionsmutanten mittels rekombinanten PlGF-2 wieder normalisiert werden. PlGF-2 ermöglicht somit wahrscheinlich im Rahmen des Kollateralwachstums eine bessere Migration von Endothel und Gefäßmuskelzellen.

Hohe PlGF-2-Konzentrationen, welche die VEGFR-1 Bindungsstellen sättigen, potenzierten die Aktivität von VEGF in vivo und in vitro. Dies führte zur Annahme, VEGFR-1 sei weniger ein Signalrezeptor, eher ein „Köder-Rezeptor“ für PlGF-2; durch Besetzen des VEGFR-1 mit PlGF-2 kann VEGF nicht mehr abgefangen werden und bindet somit vermehrt an VEGFR-2, was scheinbar den synergistischen Effekt von PlGF-2 und VEGF erklärt^{116,117}. Die alternative Hypothese, daß PlGF-2 die Angiogenese über einen an VEGFR-1 gekoppelten Mechanismus stimuliert, scheint unwahrscheinlich: VEGFR-1 besitzt nur eine schwache Tyrosinkinase-Aktivität^{90,118}. Außerdem wird noch kontrovers diskutiert, PlGF-2 könne durch eine Heterodimerbildung mit VEGF angiogen wirken¹¹⁹⁻¹²¹.

3.3. Monozyten Chemoattraktives Protein-1 (MCP-1)

Biochemisch gesehen ist humanes „monocyte chemoattractant protein-1“ (MCP-1) ein 76 Aminosäuren großes, 14 kDa schweres Glykoprotein. Die Gene dieser wegen ihrer verbindenden N-terminalen Cysteinreste C-C Chemokine genannten Gruppe liegen gemeinsam auf Chromosom 17 (q11.2-12).

Das N-terminale Ende von MCP-1 ist mit seiner, bis auf den β_0 -Faltblatt Abschnitt, ungeordneten Struktur essentiell für die biologische Aktivität. Jedoch ist auch das folgende β_1 -Faltblatt mit den Aminosäuren Serin, Tyrosin und Arginin wichtig. Hieran schließt sich strukturell eine C-terminale α -Helix an, welche durch ihre Interaktion mit Glykosaminoglykanen wahrscheinlich die Rezeptorbindungsaffinität und auch Dimerisierung verstärkt. Bisher ist jedoch die physiologische Rolle von MCP-1 Dimeren unerforscht, denn MCP-1 kommt in normalen Konzentrationen fast nur als Monomer vor¹²². Dies schließt aber die synchrone Bindung zweier Monomere an den Rezeptor zur Signalübermittlung nicht aus.

MCP-1 wird von vielen Zellen sezerniert, einschließlich Endothel- und Gefäßmuskelzellen und induziert Monozytenchemotaxis bereits bei subnanomolaren Konzentrationen¹²³⁻¹²⁵. Seine Genexpression und Sekretion werden durch Immunglobulin G (IgG) und verschiedene Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), sowie Scherkräfte und Schubspannung hochreguliert^{63,126,127}.

MCP-1 ist ein potenter Agonist der β -Chemokin-Rezeptoren (CCR)-2 und (CCR)-4, welche hauptsächlich von Monozyten exprimiert werden, aber auch auf T- und B-Lymphozyten zu finden sind¹²⁸. Diese G-Protein-gekoppelten, mit sieben transmembranären Domänen versehenen Rezeptoren führen zur Monozytenaktivierung und verstärken die Integrinadhäsion, was letztendlich in der Monozytenbindung auf der Oberfläche von Endothelzellen resultiert^{63,127,129}. Nach dem histologischen Nachweis dieser endothelialen Adhäsion⁶⁷ konnten schließlich Buschmann et al. 1999 mittels Antikörper gegen ICAM-1 auch die funktionelle Bedeutung dieses Integrins deutlich machen, denn der arteriogene Effekt von MCP-1 war hiernach komplett unterbunden⁷¹. Daß MCP-1 aber nicht nur Monozyten anlockt, sondern diese auch zur transendothelialen Migration bewegt, konnten Randolph et al. bereits 1995 nachweisen¹³⁰.

Da aktivierte, transmigrierte Monozyten angiogene Zytokine wie den Fibroblasten Wachstumsfaktor-2 (FGF-2) und TNF- α produzieren¹³¹, hat MCP-1 indirekt angiogene und arteriogene Eigenschaften: Die lokale Infusion von MCP-1 erhöht die kollaterale und periphere Konduktanz innerhalb von sieben Tagen nach Femoralokklusion im Kaninchenhinterbein⁵².

4. Kollateralwachstum in Tiermodellen

Im Rahmen zweier Tiermodelle wurde das Kollateralwachstum bereits in den 70er und 80er Jahren intensiv studiert: Sie zeigten, daß große epikardiale Kollateralen am besten im Hunde-Modell wachsen⁵⁴, wohingegen kleinere intramyokardiale Kollateralen typisch für das Schweine-Modell sind⁵³. Beide Modelle sind auf den Menschen anwendbar, denn dort wurden sowohl große epikardiale Kollateralen als auch zahlreiche Kapillarverbindungen nachgewiesen³⁹.

4.1. Chronisch ischämischer Ventrikel des Hundes

4.1.1. Allgemeines

Die ersten detaillierten Studien an wachsenden Kollateralgefäßen wurden an Hundeherzen mittels langsam fortschreitenden Verschlusses des Ramus circumflexus der linken Koronararterie durchgeführt⁵⁴. Dieses wurde durch einen um das Gefäß gelegten, über mehrere Wochen langsam okkludierenden Ameroid-Konstriktor erreicht¹³².

Infolge des Verschlusses vervielfachten die am Ramus subsinuus präformiert angelegten Anastomosen ihren Durchmesser von 40 µm durch Proliferation von Endothel- und Gefäßmuskelzellen bis um den Faktor 20; ihr Gewebevolumen nahm sogar um das 50-fache zu³⁹. Bis heute ist der Grund des plötzlichen Proliferationsanstieges nicht eindeutig geklärt, aber mikroskopisch erscheint das Endothel aktiviert. Es reguliert Adhäsionsmoleküle herauf. Folglich heften sich Monozyten an und wandern in den subintimalen Raum aus, wo sie angiogene Wachstumsfaktoren produzieren^{50,77,85}.

4.1.2. Druck-Fluß Beziehungen des Koronar- und koronaren Kollateralkreislaufes im Hunde-Modell

Nach mehreren Wochen Okklusion des Ramus circumflexus der linken Koronararterie wurde terminal das noch schlagende Herz isoliert, entnommen und sogleich nach Entleerung mit Blut eines Spender-Hundes perfundiert. Hämodynamisch erhoben wurden Zuflußrate, Perfusionsdruck und peripher koronarer Druck. Durch die Variation des Zuflusses konnte der Perfusionsdruck zwischen 20 und 200 mm Hg verändert werden, wobei zur Erzielung einer maximalen koronaren Vasodilatation Adenosin in

steigenden Mengen beigemischt wurde. Dies geschah, bis bei der Zugabe von 1 bis 2 mg/min kein weiterer Abfall des Perfusionsdruckes unter konstantem Fluß möglich schien. Um die regionale Verteilung des Koronarflusses zu bestimmen, wurden bei sechs verschiedenen Druck- und Flußniveaus jeweils ca. 200.000 unterschiedlich radioaktiv markierte Mikrosphären von 8-10 µm Durchmesser dem Blutzufuß beigemischt¹³³.

Nach dem Experiment wurde das isolierte Herz formalinfixiert und in fünf Querscheiben geschnitten, welche weiter in jeweils 40 Einzelstücke zerlegt wurden. Nach deren Trennung in endo-, myo- und epikardialen Anteil von jeweils etwa 500 mg konnte nun die Durchblutung anhand der Analyse auf Radioaktivitätsgehalt der Gewebeproben bestimmt werden.

4.2. Chronisch ischämischer Ventrikel des Schweines

Beim Schwein resultiert der fortschreitende Verschuß des Ramus circumflexus der linken Koronararterie mittels Ameroid-Konstriktor nicht wie im Hund in der Ausbildung großer epikardialer Kollateralen, sondern in vielen kleinen, über das gesamte Risikogebiet verteilten Gefäßen. Diese sind kaum größer als Kapillaren, besitzen keine glatten Gefäßmuskelzellen und häufen sich um Mikronekrosen. Da fokale Nekrosen wichtig für ihre Entstehung sind, nimmt man an, daß die Angiogenese im Rahmen der Wundheilung wirksam ist und ein Druckgradient die Regression der neuen Gefäße mit Narbenausbildung verhindert.

Die Quelle der Wachstumsfaktoren sind auch hier wiederum die Monozyten, jedoch mit dem Unterschied, daß nun eine myokardiale Nekrose den Auslöser zur monozytären Invasion darstellt.

4.3. Chronisch ischämische Hintergliedmaße des Kaninchens

Ein Modell der chronisch ischämischen Hintergliedmaße des Kaninchens basiert auf dem Verschuß des arteriellen Hauptgefäßes des Beines, der A. femoralis, direkt distal der Aufzweigung der A. iliaca externa. Damit übernehmen die nicht verschlossenen Aa. circumflexa femoris lateralis und profunda femoris den gesamten Blutstrom zur distalen Gliedmaße. Sie anastomosieren über präformierte Kollateralkreisläufe mit den Aa. genus descendens, saphena parva und caudalis femoris¹³⁴. Folglich kommt es in diesem Modell zur Ischämie des Unterschenkels und infolge des großen

Druckgradienten zu ansteigenden Scherkräften in den arteriellen Gefäßen des Oberschenkels, was dort den Prozeß der Arteriogenese initiiert⁸⁴.

Abzugrenzen hiervon ist ein Modell mit Totalexzision der A. femoralis nach Ligatur der Aa. iliaca externa, profunda femoris, circumflexa femoris lateralis und pudendoepigastrica¹³⁵⁻¹³⁷. Hierbei soll die distale Gliedmaße vollständig über an der A. iliaca interna entspringende, mit der A. caudalis femoris kommunizierende Anastomosen versorgt werden. Infolge des massiven operativen Eingriffes sind Entzündungen, Nekrosen und auch Gangränе unvermeidbar.

Die Analyse des Kollateralwachstums im Kaninchenbein erfolgt neben der post-mortalen Angiographie und Histologie mittels diverser Hämodynamikmodelle.

4.3.1. Mikrosphärenperfuisionsmodell

Mittels eines künstlichen Shunts zwischen Bauchaorta und großer Bauchvene wird bei sechs verschiedenen Perfusionsdrücken heterologes Mischblut mit jeweils einer andersfarbigen, fluoreszierenden Mikrosphäre von 15 µm Größe in die Hintergliedmaßen des Kaninchens infundiert¹³⁴. Synchron wird aus der unligierten, kontralateralen A. femoralis jeweils eine Referenzprobe entnommen. Zudem wird über eine Ultraschallsonde der Gesamtfluß zur Aorta und durch Kanülierung der A. saphena magna der periphere, post-okklusive Druck gemessen.

Anschließend werden von Kollateralen versorgte Muskeln freipräpariert. Von diesen werden Proben entnommen, gewogen und verdaut. Hiernach kann ihr Gehalt an kapillär gebundenen, unverdaulichen Mikrosphären mittels eines Durchflußzytometers (FACS) bestimmt werden. Aus deren Anzahl bezogen auf die Muskelmasse, den Werten interner Standardmikrosphären und der Einbeziehung der Referenzprobe, sowie deren Entnahmedauer wird der Blutfluß für jede Probe berechnet^{138,139}.

Da peripher (PP) und zentral (SP) arterieller Blutdruck bereits gegeben sind, kann nach erfolgter Bestimmung des kollateralen Blutflusses (Q_{koll}), die kollaterale Konduktanz berechnet werden.

4.3.2. Intraarterielle Doppler-Flußmessung

Bei dieser in vivo Methode bedient man sich eines nach dem Dopplerprinzip arbeitenden Flußmeßdrahtes (Flow-Wire®); dieser wird mittels eines über eine

Karotisschleuse in die terminale Aorta vorgeführten Herzkatheters in Position gebracht. Der Ort der Messung liegt hierbei in der das Kollateralgebiet speisenden Hauptarterie, hier der A. iliaca interna. Über einen zusätzlich in die A. iliaca communis vorgeschobenen zweiten Infusionskatheter wird Adenosin zur maximalen Vasodilatation appliziert. Der hierbei gewonnene maximale Blutflußwert wird zur Berechnung der kollateralen Konduktanz verwendet. Ergänzend hierzu werden noch die peripheren Blutdrücke bestimmt. Dies geschieht in der Regel mittels nachstehender, nicht-invasiver Methode.

4.3.3. Nicht-invasive, Doppler-basierte periphere Blutdruckmessung

Mittels Dopplergerät wird die Blutflußamplitude der oberflächlichen A. tibialis anterior dargestellt. Der Schallkopf wird dazu von medial so auf die Beinarterie ausgerichtet, daß der Schallkegel das Gefäß maximal erfaßt, was an der Amplitudengröße zu sehen ist. Durch Inflation einer proximal der Meßstelle angebrachten Druckmanschette kommt es zum Verschwinden der mittels Doppler dargestellten Amplitude. Unterschreitet der anliegende Manschettendruck beim Druckablassen den systolischen Blutdruck, so tritt die Blutdruckamplitude wieder in Erscheinung. Der ablesbare Manschettendruck entspricht in diesem Moment in etwa dem systolischen Blutdruck im Gefäß.

III. METHODEN

1. Induktion chronischer Ischämie im Kaninchenhinterbein

1.1. Tiermodell

Es wurde ein in vivo Modell der regionalen Ischämie in der Hintergliedmaße durchgeführt. An anästhesierten Kaninchen wurde nach Haut- und Muskelschnitt im rechten Oberschenkelspalt die Femoralarterie freigelegt und durch zweifache Ligatur akut unterbunden. Nach einer Woche Versuchszeitraum wurden die Hintergliedmaßen der Tiere hämodynamisch, angiographisch und histologisch untersucht.

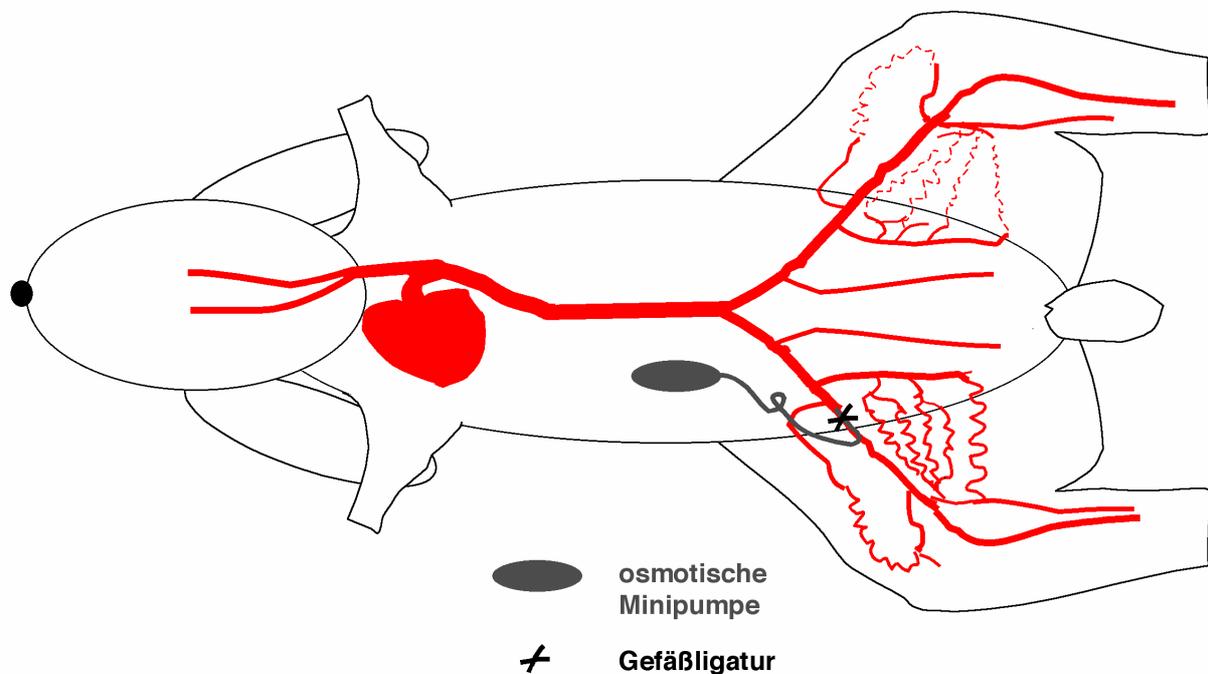


Abbildung 14: Modell der chronischen Ischämie in der Kaninchenhintergliedmaße. Nach Ligatur der A. femoralis wird der Unterlauf über präexistierende Kollateralgefäße mit Blut versorgt. Durch die lokale Infusion von Wachstumsfaktoren mittels osmotischer Minipumpe kann deren Wachstum angeregt werden.

Die Studie des hier beschriebenen experimentellen Tierversuches, das Tierversuchsmodell sowie die Versuchsdurchführung erfolgte nach Prüfung und Genehmigung der bioethischen Kommission des Veterinärdezernats des Regierungspräsidiums Darmstadt. Alle Tiere wurden unter tierschutzrechtlichen Gesichtspunkten des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. Jahrgang 1998 Teil I, Nr. 30, S. 1106 fff.) ordnungsgemäß behandelt

und untergebracht. Die Versuche erfolgten unter Aufsicht des Leiters des Tierversuchsvorhabens, Prof. Dr. W. Schaper und nach Absprache mit dem Tierschutzbeauftragten und Tierstalleiter Prof. Dr. F. Pierau. Den Leitsätzen der GV-SOLAS wurde Folge geleistet.

1.2. Versuchstiere

Für das Versuchsvorhaben wurden spezifiziert pathogenfreie, männliche Weiße Neuseeländer Kaninchen mit einem Körpergewicht von 2,5 kg, durch Charles River bezogen, jeweils zu dritt in Euroboxen gehalten. Neben Wasser erhielten die Tiere ein Alleinfuttermittel (Altromin®) zur freien Aufnahme und hatten dort eine Woche Zeit sich zu akklimatisieren, bevor sie zu Versuchsbeginn in den Stall der nahegelegenen tierexperimentellen Einrichtungen gebracht wurden.

1.3. Narkose

Die Tiere wurden durch intramuskuläre Gabe von 40 mg/kg Körpermasse (KM) Ketamin und 4 mg/kg KM Xylazin anästhesiert. Erhaltungsdosen wurden bedarfsgesteuert als 10-20 % der Initialdosis intravenös gegeben. Zur postoperativen Schmerzausschaltung erhielten die Tiere zusätzlich 50 µg/kg KM Buprenorphin intramuskulär injiziert. Um Hornhautschäden zu vermeiden, wurde bilateral die Cornea mit Dexpanthenol-Salbe bedeckt.

1.4. Operationstechnik

Den Tieren wurde der rechte mediale Oberschenkelbereich bis hin zur rechten Flanke geschoren und sprühdesinfiziert. Unter sterilen Kautelen gemäß GV-SOLAS-Richtlinien wurde nach Hautschnitt im Schenkelspalt die A. femoralis freipräpariert und mittels eines mit der osmotischen Minipumpe verbundenen Schlauches kanüliert. Durch die damit verbundene Verlegung des Gefäßes kam es zur chronischen Ischämie der Kaninchenhintergliedmaße. Über den retrograd bis unterhalb der Aufzweigung der rechten A. iliaca externa in die Aa. femoralis, profunda femoris und circumflexa femoris lateralis vorgeschobenen Schlauch konnten die Testsubstanzen je nach Pumpentyp über sieben Tage lokal appliziert werden. Der Blutstrom verteilte diese im Kollateralgebiet. Nach Festnähen der Minipumpe in einer unter die Haut der rechten Flanke präparierten Tasche wurde der Einschnitt durch Muskel- und Hautnaht verschlossen⁵². Nach dem Aufwachen aus der Narkose wurden die Versuchstiere wieder in ihre Boxen zurückgebracht und daraufhin täglich bis Versuchszeitende bezüglich der Wundheilung kontrolliert.

2. Lokale, chronische Applikation von Proteinen

2.1. Allgemeines

Zur lokalen Applikation der Testsubstanzen wurden osmotisch aktivierte Pumpen (Alzet® osmotic pumps, Modell 2ML1) mit einer Pumpleistung von 10 µl/h verwendet. Die Testsubstanzen wurden in 3 ml 0,1 %iger Kaninchenalbuminlösung gelöst. Die Beschickung der Pumpen mit diesem Volumen erfolgte steril unter dem Abzug. Die Pumpe selbst nahm davon 2,2 ml auf, wobei das restliche Volumen von 0,8 ml für die Füllung des von einem Venenpunktionsbesteck (Venofix®) abgetrennten PE-Schlauchstückes diente. Dieses 30 cm lange Stück verband flexibel die Arterie mit der Pumpe. Vor dem Einbau mußten die geladenen Pumpen drei Stunden bei 37°C in isotoner 0,9 %iger Kochsalzlösung inkubiert werden.

2.2. Versuchsgruppen

Die zur Stimulation des Kollateralwachstums eingesetzten Testsubstanzen waren rekombinant humanes PlGF-2, VEGF-A, Heparin-bindendes (HB) VEGF-E und MCP-1. Ihre Dosierungen in den Minipumpen variierten zwischen 0,5 µg/kg/d und 6,0 µg/kg/d, was bei 3 kg schweren Tieren in etwa 10 µg und 100 µg über sieben Tage entsprach. Als Kontrolle diente Kaninchenalbumin. Die Einzeldosierungen für die unterschiedlichen Versuchsgruppen sind in nachstehender Tabelle aufgeführt.

Tab. 1: Einzeldosierungen der verschiedenen Versuchsgruppen über einen Behandlungszeitraum von einer Woche.

Protein	Dosis	Behandlungszeitraum	Versuchstierzahl
Albumin	1 mg/kg	7 d	n = 8
PlGF-2	1,5 µg/kg	7 d	n = 6
	3,0 µg/kg	7 d	n = 4
	1,5 µg/kg	7 d	n = 6
VEGF-A	3,0 µg/kg	7 d	n = 3
	6,0 µg/kg	7 d	n = 3
	1,5 µg/kg	7 d	n = 4
HB VEGF-E + PlGF-2	je 1,5 µg/kg	7 d	n = 4
MCP-1	0,5 µg/kg	7 d	n = 6

3. Häodynamische Auswertung

3.1. Narkose und Beatmung

Nach einer bzw. zwei Wochen wurden die Versuchstiere erneut narkotisiert. Als Prämedikation zur Intubation erhielten sie 1 mg/kg KM Midazolam zusammen mit 20 mg/kg KM Ketamin intramuskulär. Zum Erlangen der Intubationsbereitschaft wurden den Tieren über eine in die rechte V. auricularis magna gelegte Braunüle initial rasch 10 mg/kg KM Pentobarbital intravenös gegeben. Bedarfsgesteuert wurden weitere Dosen von 2 mg/kg KM appliziert, bis eine Intubation möglich war. Daraufhin wurden die Tiere pressluftgesteuert mit 3,5 l/min Raumluft und 0,7 l/min Sauerstoff bei 45 Atemzügen/min künstlich beatmet (Respirator ABV-I®, Fa. Stephan). Im weiteren Verlauf wurden auch die arteriellen Blutgase bestimmt, um einer möglichen Abweichung aus dem Normbereich gegenregulieren zu können. Während der häodynamischen Auswertung wurden 20 mg/kgKM/h Pentobarbital und 6 µg/kgKM/h Fentanyl in der Mischspritze intravenös perfundiert¹⁴⁰. Nach Beendigung der häodynamischen Messungen wurden die Tiere in Narkose mit einer Überdosis Pentobarbital getötet.

3.2. Blutflußmessung

Zur perivaskulären Blutflußmessung, basierend auf dem *Ultraschall-Laufzeitverfahren* wurde an in Rückenlage befindlichen Tieren das Abdomen in der Linea alba geöffnet. Durch stumpfe Präparation in der Beckenhöhle mußten darauf die beiden Aa. iliacae extt. vom umgebenden Fettgewebe gelöst werden, bevor die Blutflußmeßsonden (Transonic® Flowprobe, 2.5 mm; Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA) um die Gefäße gelegt werden konnten. Dabei war zu beachten, daß die Arterie mindestens $\frac{3}{4}$ des Querschnittes des akustischen Fensters zwischen Sondenkörper und Reflektor ausfüllte (Abb. 21). Ein eventueller bestehender Winkel zwischen Sondenlängsachse und Gefäßlängsachse war unkritisch¹⁴¹.

Extensive Gefäßpräparationen mußten vermieden werden, da sie zu Gefäßspasmen führen. Um Vasokonstriktion zu vermeiden, wurde prophylaktisch Papaverin auf die Gefäße getropft.

Der Raum zwischen dem runden Gefäß und dem rechteckigen Querschnitt der Sonde mußte mit einem Kopplungsmedium luftblasenfrei ausgefüllt werden. Hierzu eignete sich isotone, körperwarme Kochsalzlösung am besten. Alle fetthaltigen, die Schallausbreitung störenden Gewebsteile waren vom Ultraschallfenster fernzuhalten.

Die Sonden wurden an ein Transonic® Animal Research Flowmeter (T206) angeschlossen und dessen Signale über einen ADI-Wandler in den die Daten aufzeichnenden Computer am Meßplatz eingespeist. Die Sonden mußten jedoch vor der Messung einige Minuten lang in isotoner Kochsalzlösung bei 37°C inkubiert werden, da Kunststoff seine mechanischen und elektrischen Eigenschaften unter Feuchtigkeit verändert. Danach erreichte das Empfangssignal seine größte Amplitude.

3.2.1. Funktionsprinzip des Blutflußmeßgerätes (Flowmeter)

Das erste Ultraschallflowmeter, das in den USA gebaut wurde¹⁴², funktioniert ebenfalls nach dem **Ultraschall-Laufzeitverfahren** (*Transit Time Principle*). Anders als beim Dopplerprinzip, das die Frequenzverschiebung mißt, wenn Schall von einem bewegten Ziel reflektiert wird, wird hier der *Laufzeitunterschied* über eine gegebene Distanz gemessen. Dies geschieht zwischen der stromaufwärts und der stromabwärts gerichteten Schallwelle (Abb.17).

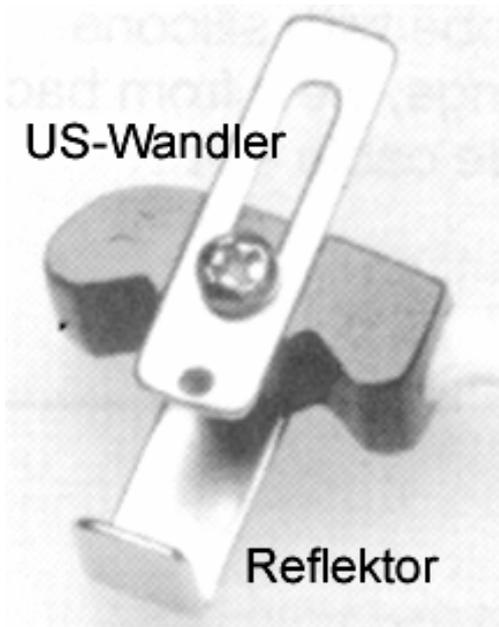


Abbildung 15: Aufbau einer Flow-Meßsonde zur vollständigen Gefäßumschließung.

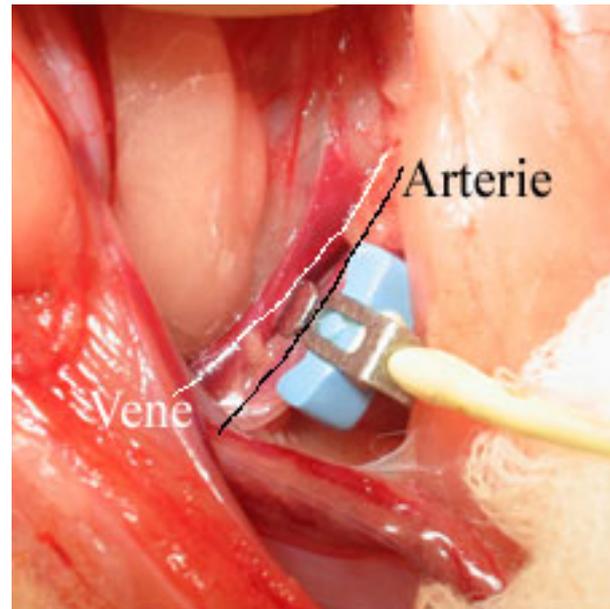


Abbildung 16: Angesetzte Flow-Meßsonde in situ. Der Gefäßverlauf ist schematisch skizziert. Die Sonde umklammert die A. iliaca ext. proximal des Leistenspaltes; Zugang von der Beckenhöhle aus.

Früher maßen die ersten Laufzeit-Flowmeter die Geschwindigkeit an einem Punkt im Strömungsquerschnitt und erforderten eine zusätzliche Abschätzung des Gefäß-Innendurchmessers, um den Volumenfluß zu bestimmen. Das Transonic Flowmeter basiert auf einer Weiterentwicklung des Laufzeitprinzips und ermöglicht eine direkte Flußmessung. Ein divergierender Ultraschallkegel beschallt das gesamte Fenster des Sensors unter Einschluß des vollen Gefäßquerschnitts (Abb. 17).

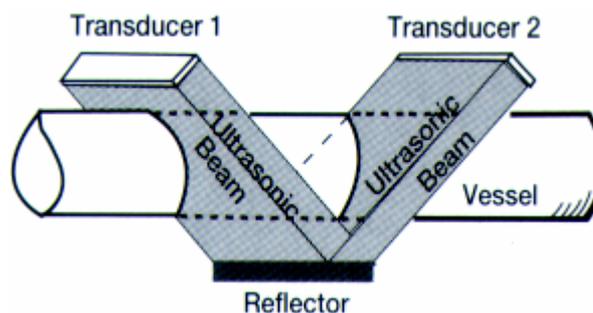


Abbildung 17: Divergierender Ultraschallkegel („Ultraschallstrahl“), das Sensorfenster und Gefäß beschallend.

Zunächst sendet der stromaufwärts positionierte Schallwandler (Transducer) einen Schallimpuls. Nach dem Passieren des Gefäßes und des umgebenden Gewebes wird

dieser Schallimpuls vom stromabwärts positionierten Transducer empfangen, verstärkt und einem Phasendetektor zugeführt. Die Schallgeschwindigkeit hat sich durch den Transport in Flußrichtung erhöht, damit verkürzt sich die Laufzeit des eintreffenden Impulses. Zwischen diesem Empfangssignal und einem Referenzsignal vom Taktgenerator entsteht eine *Phasendifferenz*, die gespeichert wird.

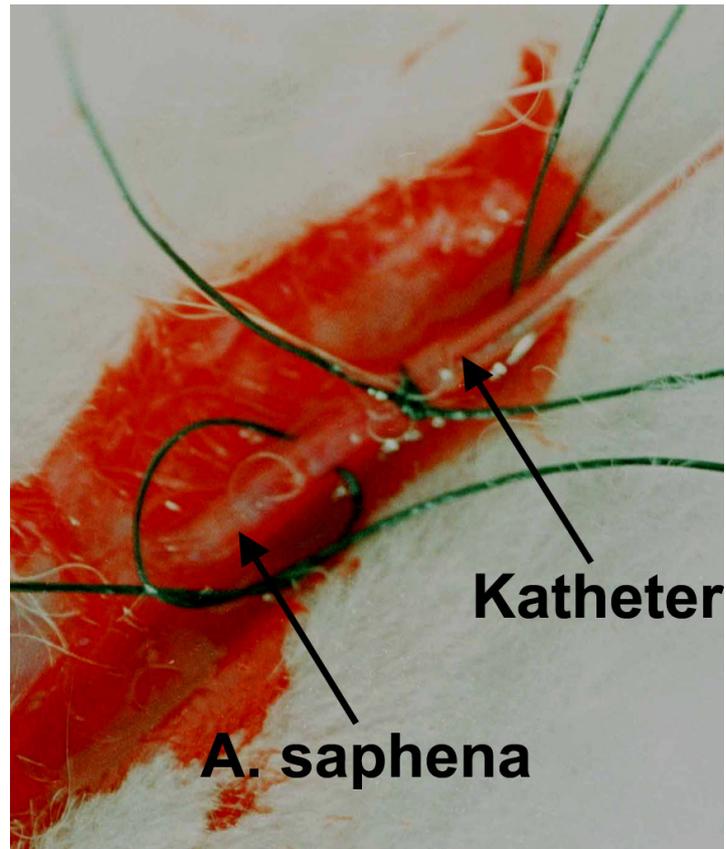
Beim nächsten Zyklus sind die Funktionen von Sender und Empfänger vertauscht. Der Ultraschall durchwandert das strömende Medium stromaufwärts und wird dadurch verzögert. Auch diese Phasenverschiebung wird gespeichert und von der ersten subtrahiert. Die Differenz ergibt den Volumenfluß, unabhängig von den Gefäßabmessungen¹⁴³.

Der elektrische Detektor ist so sensitiv, daß das Transonic Flowmeter im Meßbereich um 25 ml/min Zeitdifferenzen von einer Pikosekunde auflösen kann. Viele Ultraschallflowmeter erfordern einen bestimmten Winkel zwischen Einstrahlrichtung der Sonde und dem Gefäß (Flowvektor). Eine solche Messung ist empfindlich gegenüber Änderungen in der Sondenposition und Störungen des laminaren Flusses, wie z.B. Sekundärströmungen und mäanderförmigem Fluß, hervorgerufen durch Biegungen im Gefäßverlauf. Die Transonic-Flowsonde löst dieses Problem durch zweifache Erfassung des Blutflusses in einem reflektierenden Schallweg (Abb. 17). Die Vektorsumme beider Messungen entspricht der axialen Flowkomponente. Diese Technik macht die Flowmessung in weiten Grenzen unabhängig vom Flowprofil und dem Einstrahlwinkel der Sonde.

3.3. Blutdruckmessung

Um den mittleren systemischen Druck zu messen, mußte die rechte A. carotis communis nach einem Längsschnitt im Halsbereich freipräpariert und mit einem heparinisierten, mit 0,9 % Kochsalzlösung gefüllten Schlauch (PVC, Ø 2,5 mm) kanüliert werden. Für die Messung der peripheren Drücke war beidseitig die A. saphena distal im medialen Unterschenkelbereich nach Hautschnitt freizupräparieren und ebenfalls zu katheterisieren (heparinisierte PE-Schlauch, Ø 0,8 mm (Abb. 18)). Alle Schläuche wurden an einen mit einer Druckmeßanlage (P23XL; Statham; San Juan; Puerto Rico) verbundenen Statham-Druckwandler angeschlossen und die Druckmeßdaten sodann über einen ADI-Wandler dem Computer zugeführt.

Abbildung 18: Zur peripheren Blutdruckmessung mittels Polyethylen-Schlauch katheterisierte A. saphena der Kaninchenhintergliedmaße.



3.4. Maximale Vasodilatation

Um die maximale Konduktanz der einzelnen Tiere bestimmen zu können, mußte die Messung der Blutflüsse unter maximaler Vasodilatation und einer aufrechtzuerhaltenden physiologischen Körpertemperatur von 38-40°C erfolgen. Dies wurde mittels Infusion steigender Dosen an Adenosin von 30, 100, 300, 600 und 1000 µg/kg/min in die Aorta etwa 3 cm kranial der Aufzweigung in die Aa. iliacae communes erreicht¹⁴⁴. Nach jeweils 4,5 min, sobald ein Gleichgewicht erreicht wurde, konnte die nächsthöhere Konzentration infundiert werden. Um den Blußfluß nicht zu beeinträchtigen, mußte hierzu ein eigens hergestellter dünner, heparinierter Aorten Katheter (PVC) nach der Methode von A.C. Barger in die Aorta eingenäht werden^{145,146}. Die lichtgeschützt zu lagernden, frisch angesetzten Adenosinlösungen wurden darauf mittels einer Mikroinfusionspumpe (Minipuls 3; ABIMED-Gilson, Frankreich) bei einer konstanten Pumprate von 1 ml/min infundiert.

3.4.1. Anfertigen eines arteriellen Katheters nach der Methode nach Barger

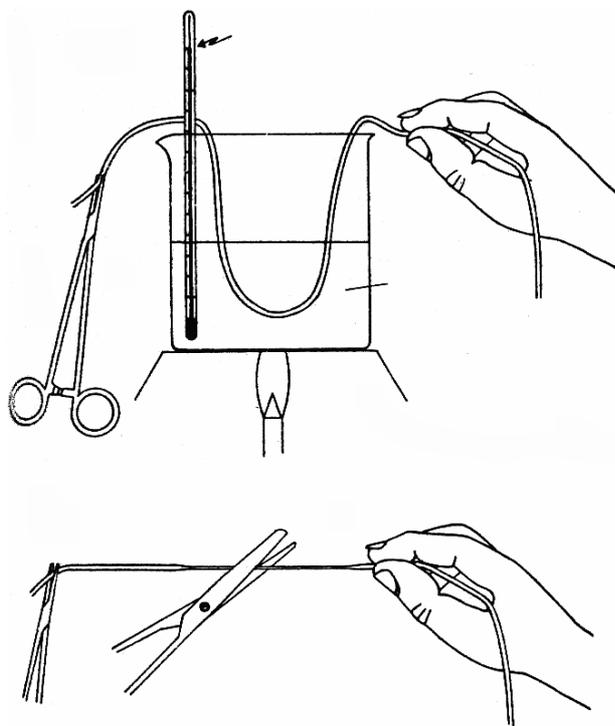


Abbildung 19A: Anfertigung eines intraaortalen Gefäßkatheters nach der Methode von A.C. Barger¹⁴⁵.

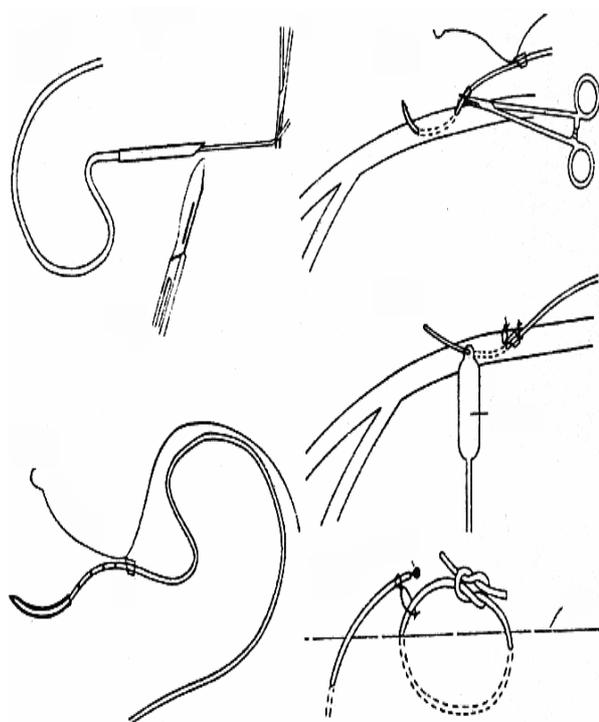


Abbildung 19B: Einnähen eines intraaortalen Infusionskatheters nach der Methode von Barger¹⁴⁵.

Zur Herstellung eines hauchdünnen Gefäßkatheters wurde ein im Außendurchmesser 1,2 mm und Innendurchmesser 0,8 mm dicker PVC-Schlauch (THOMAFLUID®-Mikro-Katheter-Schlauch) bei 220°C in Silikonöl ausgezogen (Abb. 19). Nach dem Durchtrennen an seiner dünnsten Stelle wurde ihm dort eine konuslose 0,45 x 12 mm Nadelspitze aufgesetzt. Zur späteren Arretierung am Gefäß wurde ein weiteres Schlauchstück zur Katheterspitze hin angeschrägt, als Manschette auf den ausgezogenen Katheterteil aufgeschoben, festgeklebt und mit einer 0,5 metric Nadel-Faden-Kombination (Prolene®) versehen. Der Katheter wurde mit seinem stumpfen Ende auf eine 0,7 x 30 mm Nadel aufgezogen, mit heparinierter Kochsalzlösung entlüftet und für den Einbau bereit gehalten.

3.4.2. Einbau eines arteriellen Katheters nach Barger

Am offenen Abdomen wurde die terminale Bauchaorta dargestellt und vom umgebenden Fettgewebe isoliert. Um mögliche Blutverluste im Rahmen der Operation vermeiden zu können, wurde zunächst im weiter proximalen Teil der Aorta eine eigens

hergestellte Ballonmanschette angelegt (Bauanleitung Ballonmanschette siehe 3.4.3.). Etwa 3 cm proximal der Bifurkation wurde sodann eine adventitiale Tabaksbeutel-Naht von wenigen Millimetern Durchmesser angelegt. Der Katheter konnte nun unweit proximal dieser Naht ein- und durch sie wieder ausgestochen werden; er war bis zum Anschlag der Manschette am Gefäß durch das Lumen zu führen und adventitial zu fixieren (Abb. 21). Nach Abschneiden der überstehenden mit der scharfen Nadelspitze versehenen Katheterspitze glitt der Katheter in das Gefäßlumen zurück. Der Tabaksbeutel wurde sofort zugezogen. Der Katheter war zur Infusion von Adenosin bereit.

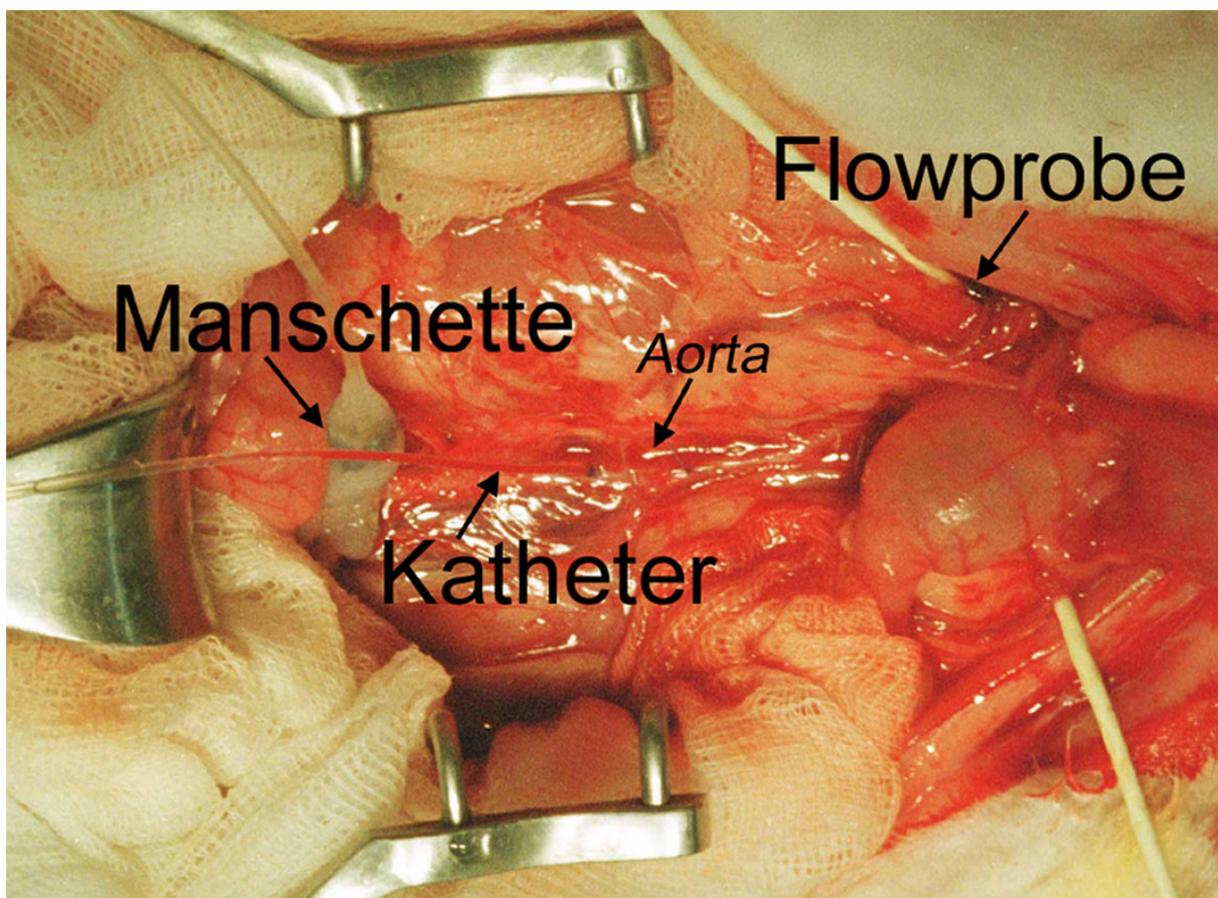


Abbildung 20: Eingebauter intraaortaler Katheter nach der Methode von Barger in situ am in Rückenlage befindlichen Kaninchen. Die Ballonmanschette zur temporären Aortenokklusion sowie die Flußmeßsonden an den Aa. iliacae extt. sind indiziert.

3.4.3. Bau der Ballonmanschette

Um Blutverluste beim Einbau des Katheters nach Bangers zu vermeiden, mußte die Aorta abdominalis temporär verschlossen werden. Hierzu wurde eine Ballonmanschette gebaut, welche aus mehreren Schlauchtypen bestand: Ein 8 mm langer Nylonschlauch [Außendurchmesser (AD) 2,1 mm; Innendurchmesser (ID) 1,5 mm] wurde auf das Ende eines 50 cm PVC-Schlauches (AI 1,52 mm; ID 0,86 mm) geklebt. Der Anfang eines 2,5 cm langen Silastic-Schlauches (AD 2,41 mm; ID 1,57 mm) wurde auf die nun mit Nylon verstärkte Spitze gestülpt und mittels Faden festgebunden. Das freie Silastic-Schlauchende wurde darauf durch die beiden gestanzten Löcher eines 5 mm breiten, aufgeschnittenen Silastic-Schlauches (AD 9,5 mm; ID 6,4 mm) gezogen und an Ein- sowie Austrittsstelle mittels Silikon fixiert. Um die Manschette später am Gefäß zu fixieren, wurde der massige, 5 mm breite Manschettenschlauch an der Schnittstelle beidseitig mit Fäden durchstoßen (Abb. 28). Um den Ballon darauf innerhalb der Manschette zu inflatieren, wurde zudem eine 2 ml Spritze auf das freie PVC-Schlauchende gesetzt.



Abbildung 21: Aufbau der Ballonmanschette für die temporäre Aortenokklusion im Kaninchen.

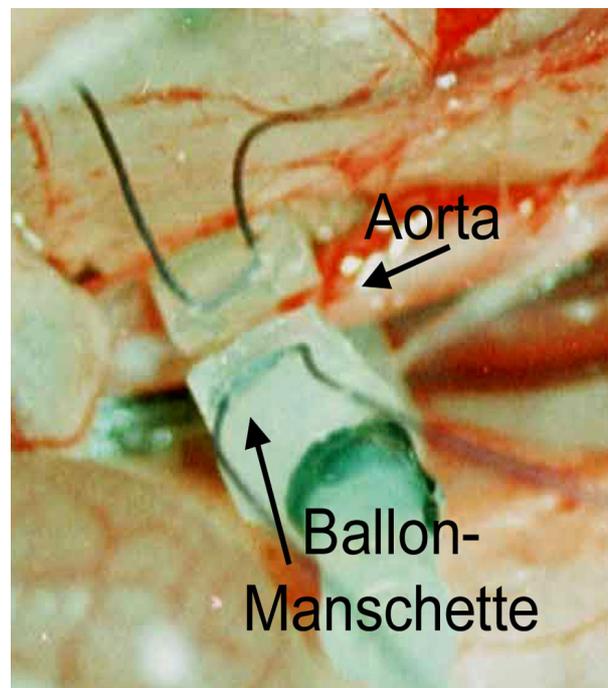


Abbildung 22: Einbau der Ballonmanschette für die temporäre Aortenokklusion im Kaninchen.

3.5. Berechnung der kollateralen Konduktanz

Die Berechnung der kollateralen Konduktanz erfolgte nach folgender Gleichung:

$$CC \text{ (ml / min / 100 mmHg)} = \frac{\dot{Q}_{ai} \text{ (ml / min)}}{SP - PP \text{ (mmHg)}}$$

Die einzusetzenden Meßwerte wurden mittels Analyse der hämodynamischen Aufzeichnungen des Mac Lab® Gerätes gewonnen. Sie stellten immer den Höchstwert unter maximaler Vasodilatation bei Erreichen des Gleichgewichtes dar. Hierbei steht CC für die kollaterale Konduktanz, \dot{Q}_{ai} für den Blutfluß in der A. iliaca externa (Kollateralfluß) und SP für den systemischen Druck (Präokklusionsdruck in A. carotis), bzw. PP für den peripheren Druck (Postokklusionsdruck in A. saphena).

4. Angiographische Auswertung

4.1. Kontrastmittel-Herstellung

Das Kontrastmittel wurde auf Bismuth- und Gelatinebasis frisch hergestellt. Zunächst waren 150 g Bismuth-Pulver in 300 ml Aqua dest. zu lösen und dann mit etwa 250 ml konz. Salzsäure zu klären. Von dieser Lösung mußten nun jeweils 100 ml in 5 l kaltem Leitungswasser ausgefällt werden. Der Bodensatz konnte nach 45 min durch Dekantieren gewonnen, in einen Erlenmeyerkolben überführt und über Nacht in den Kühlschrank gestellt werden. Am nächsten Tag war der restliche Überstand aus dem Erlenmeyerkolben vor und nach 15-minütiger Zentrifugation in 50 ml Röhrchen, bei 600 U/min abzusaugen. Nun waren 150 g gepulverte Gelatine in 200 ml kochendem Aqua dest. einzurühren und in gleicher Menge über die etwa 20 ml großen Bismuth-Pellets in den 50 ml Röhrchen zu füllen. Das nach kräftigem Mischen fertige Kontrastmittel wurde nun bis zum Verbrauch im Kühlschrank bei +4°C gelagert⁴⁸.

4.2. Kontrastmittel-Infusion

Die narkotisierten Tiere wurden nach Heparinisierung (2.500 I.E.) durch intravenöse Gabe von 100 mg/kg KM Pentobarbital getötet. Die abdominale Aorta wurde sogleich kanüliert (gefeilte Stahlkanüle; Ø 2.5 mm) und das zuvor auf 38°C erwärmte, gut geschüttelte Kontrastmittel nach Eröffnen der großen Bauchvene bei 80 mm Hg

druckgesteuert und luftblasenfrei in die Hintergliedmaßen infundiert. Zur Vermeidung einer auskühlungsbedingten Vasokonstriktion wurden die Tiere in ein Wasserbad von 38°C gelegt. Nach acht Minuten Infusionsdauer und guter Füllung der Beinarterien mußten die Tiere zum Aushärten des Kontrastmittels für eine Stunde auf Eis gelegt werden.

4.3. Erstellung eines Angiogrammes

Nach Aushärten des Kontrastmittels wurden die Hintergliedmaßen im Lendenbereich vom Tierkörper gelöst und in der Beckensymphyse voneinander getrennt. Bevor sie im eigens für die Fixation gebauten Plexiglaskasten mit Wasser bedeckt eingespannt werden konnten, mußte die Haut vollständig entfernt werden. Ein unter den Fixationskasten geschobener Röntgenfilm wurde im Balteau-Röntgengerät bei 30 keV Spannung und 14 mA für 105 sec belichtet⁵².

4.4. Auswertung eines Angiogrammes

Die Auswertung der postmortalen Angiogramme erfolgte durch Auszählen der angiographisch sichtbaren Kollateralarterien, sowie durch Erstellen eines Durchmesser-korrelierten Kollateralindexes mittels des Computers.

4.4.1. Kollateralzahl

Zur Quantifizierung der sichtbaren Kollateralarterien wurden die Angiogramme auf einem Röntgenfilmbetrachter ausgewertet. Da die Kollateralarterien zwischen den Aa. profunda und circumflexa femoris und den Aa. femoris caudalis und genus descendens anastomosieren, wurden nur Gefäße mit zweifelsfrei sichtbarer Stamm-, Mittel- und Wiedereintrittszone nach der Longland Klassifikation ausgezählt¹⁰. Gefäße ohne proximale oder distale Verbindung zum arteriellen Gefäßsystem wurden nicht mitgezählt.

4.4.2. Kollateralindex

Um den nach dem Gesetz von Poiseuille für den Kollateralfluß entscheidenden Durchmesser der Kollateralgefäße zu berücksichtigen, wurde zusätzlich zur Kollateralzahl ein Durchmesser-korrelierter Kollateralindex erstellt. Dazu wurden die Angiographien eingescannt (Duoscan T1200, Agfa) und auf dem Computer (iMac G3/500) mittels der Adobe® Photoshop® Software 7.0 (Adobe Systems, USA) betrachtet. Alle angiographisch sichtbaren Kollateralgefäße wurden vermessen und in vier, nach Durchmesser sortierte Gruppen eingeteilt. Die Anzahl der Gefäße einer einzelnen Gruppen wurde mit einem der Gruppe zugeordneten Faktor multipliziert. Dieser Faktor nahm

mit dem ansteigenden Durchmesserbereich der Gruppe zu. So wurde die Gefäßzahl der Gruppe von 100 bis 300 µm Durchmesser mit 4, der Gruppe von 300 bis 400 µm mit 9, der Gruppe von 400 bis 600 µm mit 16 und der Gruppe von über 600 µm mit 36 mal genommen. Die Summe der Produkte eines ausgezählten Hinterbeines stellte dessen Kollateralindex dar.

5. Histologische Quantifizierung perivaskulärer mononukleärer Zellen

5.1. Perfusionsfixation

Nach Gabe von 2500 I.E. Heparin-Na wurden die narkotisierten Tiere durch intravenöse Gabe von 100 mg/kg KM Pentobarbital getötet. Die abdominale Aorta wurde freipräpariert und kanüliert, danach die V. cava caudalis eröffnet. Zunächst mußte zur Erzielung maximaler Vasodilatation etwa ein halber Liter einer vor Licht zu schützenden Papaverinlösung, druckgesteuert bei 50 mm Hg, in die Aorta infundiert werden. Um Verklumpungen der Plasmaproteine mit dem anschließend zu perfundierenden Paraformaldehyd (pFA) zu verhindern, war darauf zu achten, daß alles Blut aus der Bauchvene gespült wurde. Unter Vermeidung einer Luftembolie wurden sodann unter Druckbeibehaltung etwa 0,5 l einer 4 %igen pFA-Lösung infundiert. Nach ca. 15 Minuten war das Gewebe fixiert, was an der ausgehärteten Muskulatur des Oberschenkels geprüft wurde.

5.2. Probenentnahme

Zur Quantifizierung der aktivierten perivaskulären mononukleären Zellen wurde bei den Versuchstieren nach Perfusionsfixation jeweils der M. vastus intermedius entnommen. Von diesem Muskel wurden jeweils sechs etwa 15 x 10 mm große, 3 mm hohe Stücke im Abstand von 100 µm entnommen, in Tissue Tech® (O.T.C. Compound 4583, Fa. Miles) eingebettet und im Faserverlauf auf Kork gesetzt. Diese Muskelproben wurden zuerst in stickstoffgekühltem Methylbutan (-160°C) und dann in flüssigem Stickstoff bei -195°C schockgefroren. Die Lagerung des Probenmaterials erfolgte bis zur Auswertung bei -80°C.

5.3. Präparatanfertigung

5.3.1. Herstellung beschichteter Objektträger

Für die durchgeführten Versuche wurden ausschließlich beschichtete Objektträger verwendet, da die Silikonbeschichtung ein Ablösen der Schnitte während der Inkubations- und Waschschrte verhindert. Hierzu wurden die unbeschichteten Objektträger mit in Wasser gelöstem Extran (Merck) gereinigt, mit Aqua dest. gespült und über Nacht im Trockenschrank (40°C) getrocknet. Am nächsten Tag wurden die Objektträger für 5 Sekunden in eine 2 %igen 3-Aminopropyltriethoxysilan-Lösung (Sigma) getaucht und nach kurzem Spülen in Aceton und Aqua dest. wieder über Nacht getrocknet.

5.3.2. Herstellung von Gefrierschnitten

Mit einem CM 3000 Kryostaten der Firma Leica wurden 10 µm dicke Gefrierschnitte hergestellt. Zu diesem Zweck wurden die bei -80° gelagerten Muskelproben mit Tissue Tek auf die vorher beschrifteten Probenhalter aufgebloekt. Hierbei wurde die Biopsie im Innenraum des Kryostaten (-26°C) mit Tissue Tek auf die Probenhalter vorfixiert und anschließend komplett mit Tissue Tek umhüllt in flüssigen Stickstoff getaucht. Das raschere Gefrieren des Tissue Tek führt zu einer stabilen Fixierung des Gewebes und bietet gleichzeitig einen Schutzmantel beim Schneiden der Proben.

Nach dem Anschneiden der Proben wurden die unter dem Deckgläschen aufgefangenen Schnitte vorsichtig mit einem bei Zimmertemperatur gelagerten Objektträger aufgefangen und bis zur Fixierung im Innenraum des Kryostaten aufbewahrt. Das nicht verwendete Gewebe wurde aufgebloekt bei -80°C gelagert.

5.4. Transmigrations-Vergleich

Da aktivierte mononukleäre Zellen in Kaninchen eine endogene Galaktosidase-Aktivität aufweisen^{147,148}, wurden die angefertigten Kryoschnitte, nachdem sie 5 Minuten mit 4 % pFA nachfixiert und mehrmals mit PBS gewaschen wurden, für 24 bis 48 Stunden bei 37°C mit einer X-Gal-Lösung (siehe Puffer) inkubiert. In einigen Fällen wurden zusätzlich die Kerne mit Hämatoxilin gegengefärbt.

Für jeden der pro Kaninchengliedmaße im Abstand von 100 µm angefertigten sechs Schnitte des M. vastus intermedius wurde die Gesamtzahl an X-Gal-positiv gefärbten mononukleären Zellen mittels eines Leitz Aristoplan Lichtmikroskopes gezählt. Zudem wurde jeweils eine Photomikrografie erstellt und eingescannt. Durch anschließende Planimetrie mittels der NIH Image 1.62 Software für Macintosh konnte die

Gesamtfläche eines jeden Schnittes berechnet werden. Es wurde die zahlenmäßige Dichte aktivierter mononukleärer Zellen (Anzahl positiver Zellen pro mm² Muskel- fläche) berechnet. Sodann wurden die Mittelwerte der Versuchstiere mit denen der Kontrollgruppe (Albumin 0,1 %) auf Signifikanz geprüft (t-test).

6. Auswertung und Statistik

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

Zur statistischen Auswertung der Daten wurden mit Hilfe von SPSS 10.0 einfaktorielle Varianzanalysen (ANOVA) durchgeführt. Zum multiplen Vergleich zweier Gruppen wurde als post-hoc Test ein LSD- bzw. Bonferroni-Test durchgeführt. Ein Ergebnis mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ galt als signifikant.

IV. ERGEBNISSE

1. Hämodynamische Auswertung

1.1 Etablierung des Hämodynamikmodells

Im Rahmen der Etablierung eines hämodynamischen Modells zur Blutflußbestimmung am Kaninchenhinterlauf wurden zunächst Experimente am Tier ohne Ligatur der Femoralarterie durchgeführt. Diese sollten Aufschluß über die periphere Kreislaufphysiologie geben, den mittleren Ausgangs-Blutfluß der dem Kollateralgebiet vorgeschalteten Hauptarterie und normalen mittleren Blutdruck der nachgeschalteten Gefäße bestimmen. Zudem wurde eine Methode der intraaortalen Infusion von Adenosin nach Barger^{145,146} zur Erzielung maximaler Vasodilatation auf ihre Anwendbarkeit überprüft.

1.1.1. Hämodynamik der unoperierten Hintergliedmaße

1.1.1.1. Blutfluß in Ruhe

Zur perivaskulären Messung des Blutflusses in den Aa. iliacae extt. mußten diese Gefäße zunächst stumpf freipräpariert und mit den Ultraschall-Klammersonden versehen werden. Um eine optimale Schall-Anbindung an die Gefäße zu haben, d.h. die maximale Signalstärke zu empfangen, erwies es sich als günstig, die Beckenhöhle mit etwas körperwarmer, isotoner Kochsalzlösung anzufüllen. Um die Messwerte unter den Versuchstieren vergleichen zu können, mußten alle Tiere eine normale physiologische Körpertemperatur aufweisen. Hierzu wurde kontinuierlich die Rektaltemperatur gemessen. Eine Wärmematte verhinderte das Auskühlen der Versuchstiere bei offenem Abdomen im Rahmen der Präparation zur hämodynamischen Auswertung. Die Messungen erfolgten nur im Bereich von 38,5-40,0° C Körpertemperatur.

Durch den angeschlossenen Analog-Digital-Instrumenten (ADI)-Wandler wurden die gewonnenen hämodynamischen Meßdaten digitalisiert, aufgezeichnet und mittels der Chart®-Software auf dem Rechner analysiert. Die Meßgrößen wurden einheitlich graphisch übereinander dargestellt. Hierbei ergab sich für die Blutflüsse zum unligierten Kaninchenhinterlauf folgendes Bild:

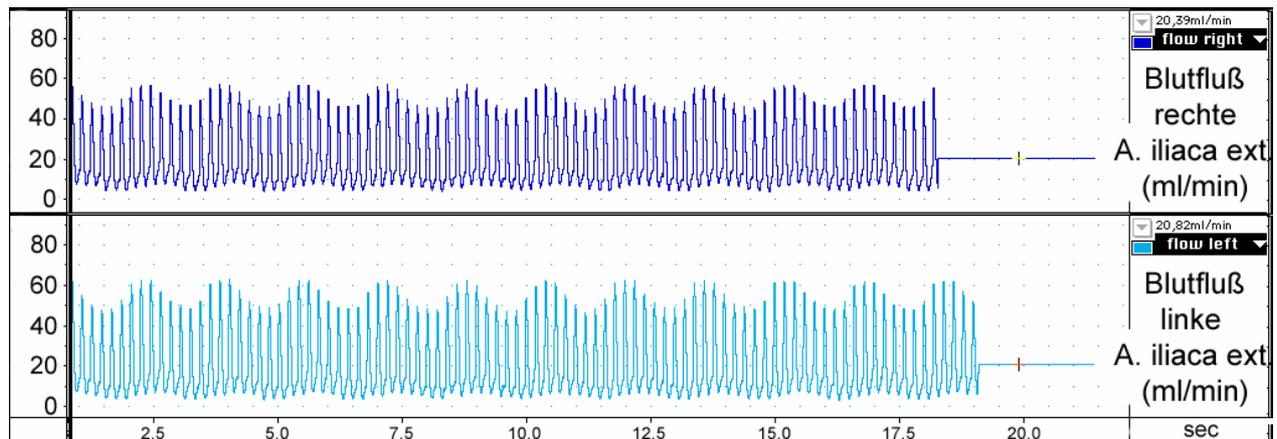


Abbildung 23: Blutfluß der Aa. iliacae extt. in Ruhe an einem 2,5 kg schweren Weißen Neuseeländer Kaninchen in Narkose. Auf der x-Achse ist die Zeit (sec) auf der y-Achse der Blutfluß (ml/min) aufgetragen. Bis Sekunde 19,5 ist die Amplitudenform dargestellt, danach der Mittelwert. Die rechts aufgeführten Werte stellen den Wert zum Zeitpunkt Sekunde 20 dar.

Der mittlere physiologische Blutfluß in den Aa. iliacae extt. der für die Experimente verwendeten 2,5 kg schweren Weißen Neuseeländer Kaninchen betrug $19,8 \pm 0,7$ ml/min ($n=4$). Die in Abbildung 23 zu erkennende Amplitude des Blutflusses eines stellvertretend für die Gruppe dargestellten Versuchstieres resultiert aus der Pulswelle. Die atemsynchronen Schwankungen der Amplitude sind auf die künstliche Beatmung des in Narkose liegenden Kaninchens zurückzuführen (Pulswellen 2. Ordnung).

1.1.1.2 Arterieller Blutdruck in Ruhe

Der mittlere zentrale Blutdruck betrug 98 ± 4 mm Hg ($n=4$). Der physiologische periphere Druckwert war 86 ± 3 mm Hg ($n=4$). Nachstehende Abbildung zeigt die Gesamtheit der erhobenen hämodynamischen Normalparameter eines unoperierten Versuchstieres in Ruhe stellvertretend für die unligierte Kontrollgruppe.

Die bilateral invasive Messung des mittleren peripheren Blutdruckes (PP) ergab Werte um etwa 12 % unter mittlerem zentralen Blutdruck (SP).

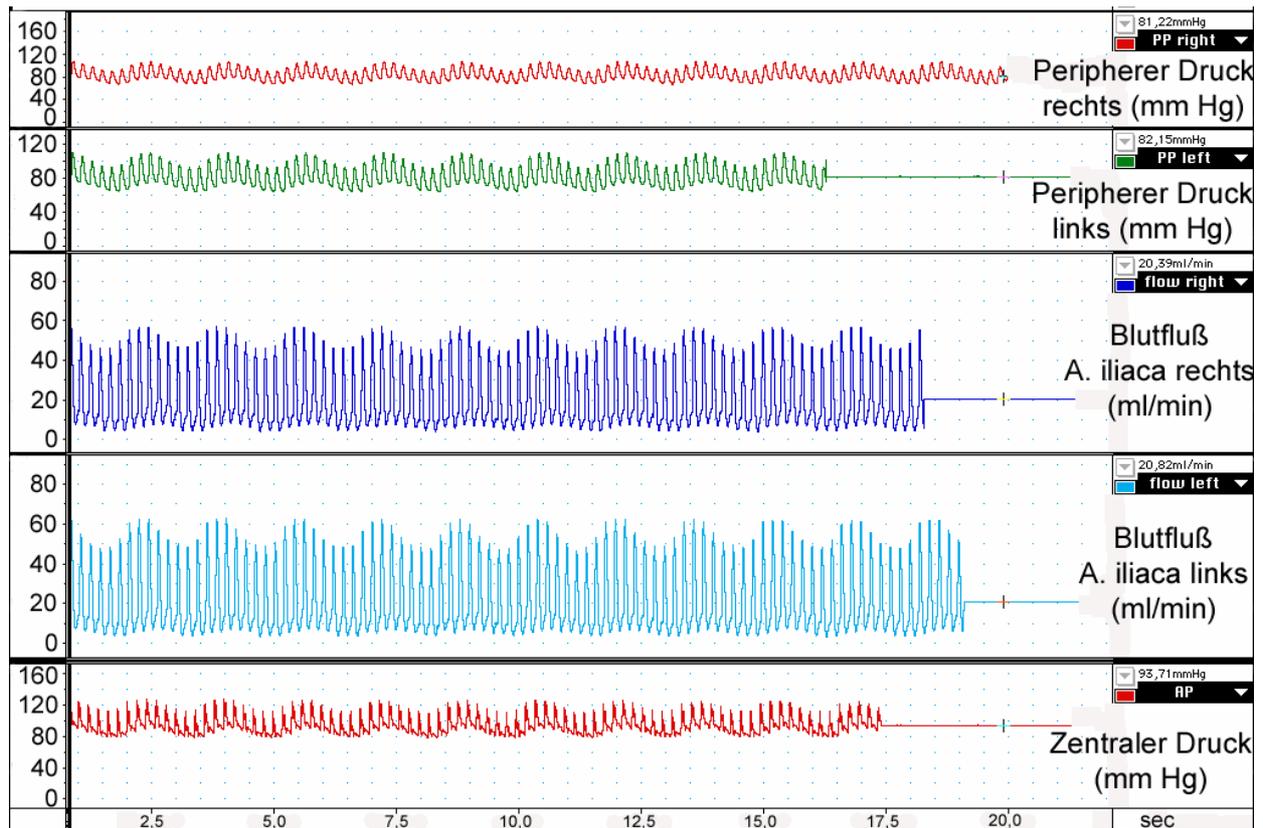


Abbildung 24: Invasiv permanent gemessene Blutdrücke (peripher: Aa. saphenae und zentral: A. carotis), sowie perivaskulär gemessene Blutflüsse (Aa. iliaca extt.) am Versuchstier, stellvertretend für alle unligierten Kaninchen in Ruhe ($n=4$). Dargestellt sind die Amplitudenform und ab Sekunde 20 die Mittelwerte der einzelnen Ableitungen. Die zum Zeitpunkt Sekunde 20 gemessenen Mittelwerte sind rechts aufgetragen.

1.1.1.3 Hämodynamik bei maximaler Vasodilatation

Eine Vasodilatation bewirkt eine Minimierung der präkapillären Gefäßwiderstände und somit einen peripheren Druckabfall. Der Anstieg des Druckgradienten (peripherer zu zentralem Blutdruck) hat eine Hyperämie zur Folge, der Blutfluß in die Peripherie nimmt zu. Bei maximaler Vasodilatation erzielt die Leitfähigkeit (Konduktanz) des Gefäßes ihren Höchstwert. Um den Zustand maximaler Vasodilatation herbeizuführen, wurde eine Adenosin-Konzentrationsreihe erstellt und Adenosin intraaortal infundiert. Die Infusion begann mit $30 \mu\text{g}/\text{kg KM}/\text{min}$ Adenosin und wurde sukzessiv auf Konzentrationen von 100, 300 und $600 \mu\text{g}/\text{kg KM}/\text{min}$ Adenosin erhöht. Für jede Dosis stellte sich nach etwa 4 min ein Gleichgewicht ein. Sobald keine Steigerung der Werte mehr möglich war, war das Gefäßsystem maximal dilatiert.

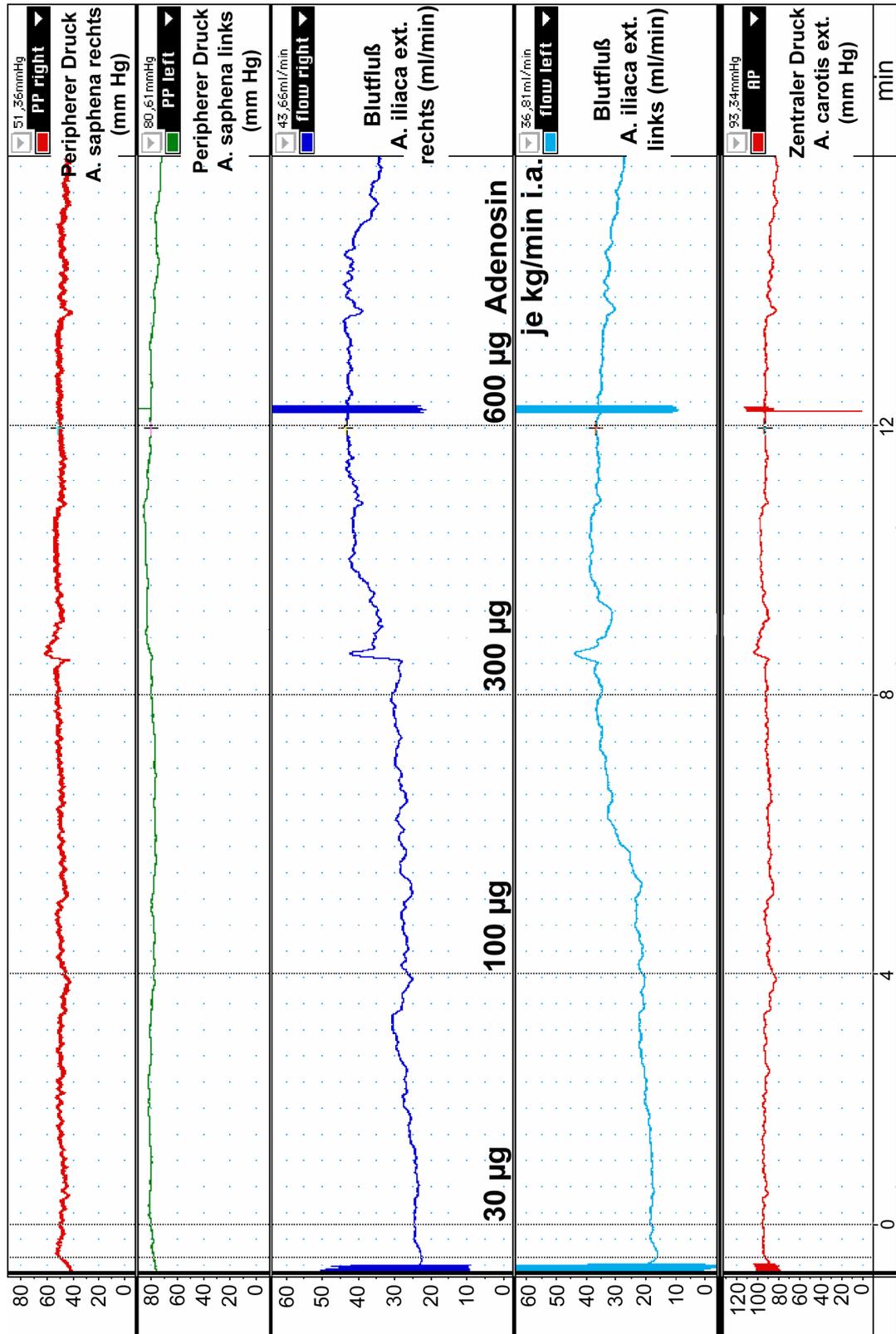
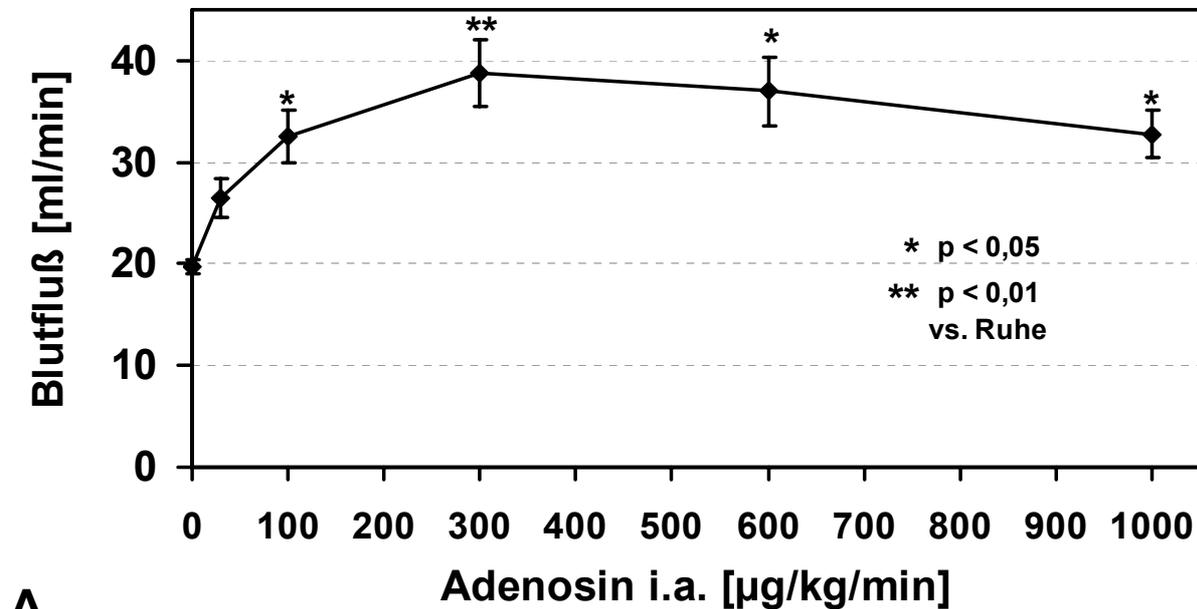
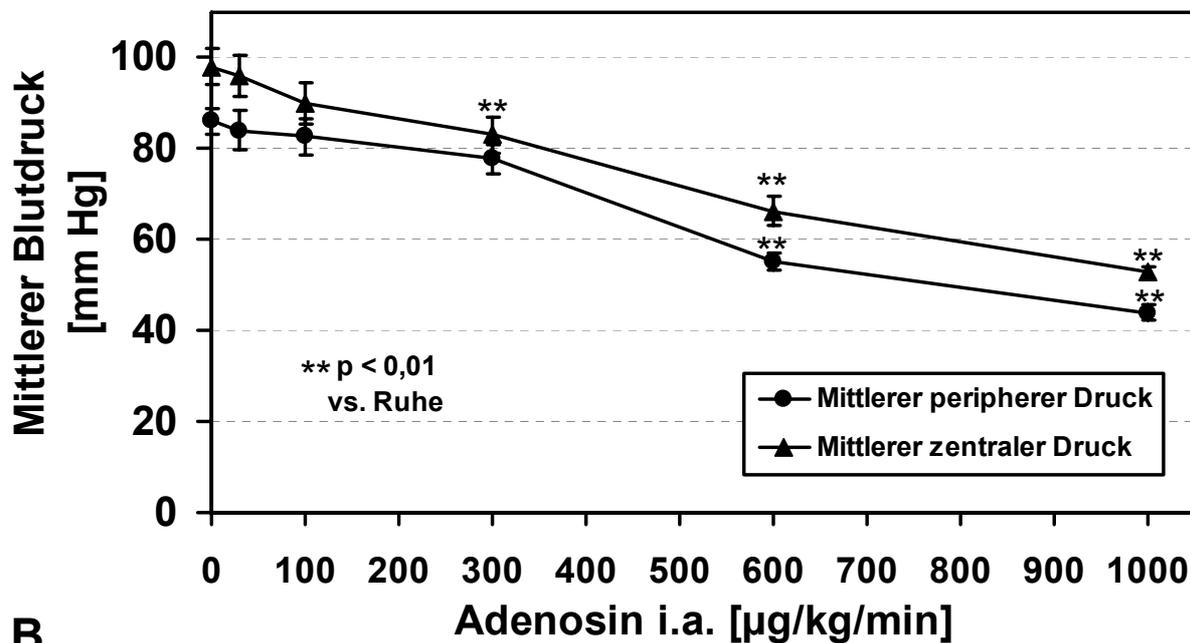


Abbildung 25: Veränderung der mittleren peripheren Blutdrücke in den Aa. saphenae magnae und der Blutflüsse in den Aa. iliaceae externae (jeweils rechts und links) sowie des zentralen Mitteldruckes in der A. carotis externa desunoperierten Kaninchens in Abhängigkeit von der in die terminale Aorta infundierte Adenosinmenge (Dosis-Wirkungsverlauf für Adenosin).

Abbildung 25 zeigt die Entwicklung der einzelnen hämodynamischen Parameter in Abhängigkeit von der applizierten Adenosinmenge, welche mit dem Vasodilatationsgrad der Hintergliedmaße korrelierte.



A



B

Abbildung 26: Adenosin-Dosis-Wirkungskurven für den Blutfluß in der *A. iliaca ext.* (A) sowie den peripheren und zentralen arteriellen Blutdruck in der *A. carotis*, bzw. *A. saphena* (B) der unoperierten Hintergliedmaße des Weißen Neuseeländer Kaninchens von 2,5 kg Körpermasse. Dargestellt sind die Mittelwerte und ihre Standardfehler (SEM; $n=4$).

Durch das anschließende Auftragen der Werte im Gleichgewicht einer jeden Dosis gegen die Adenosin-Konzentration erhielt man für das Versuchstier eine Adenosin-Dosis-Wirkungskurve (Abb. 26).

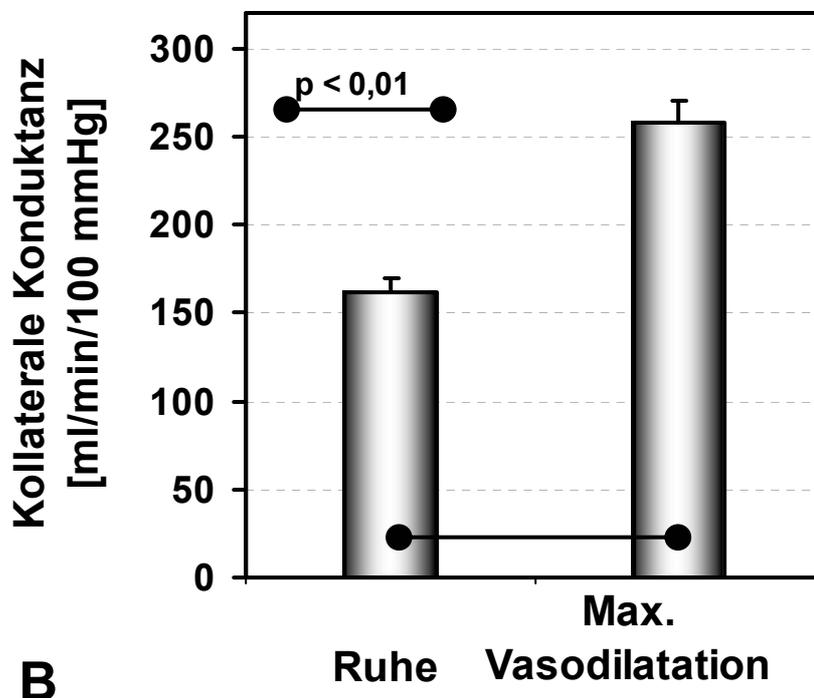
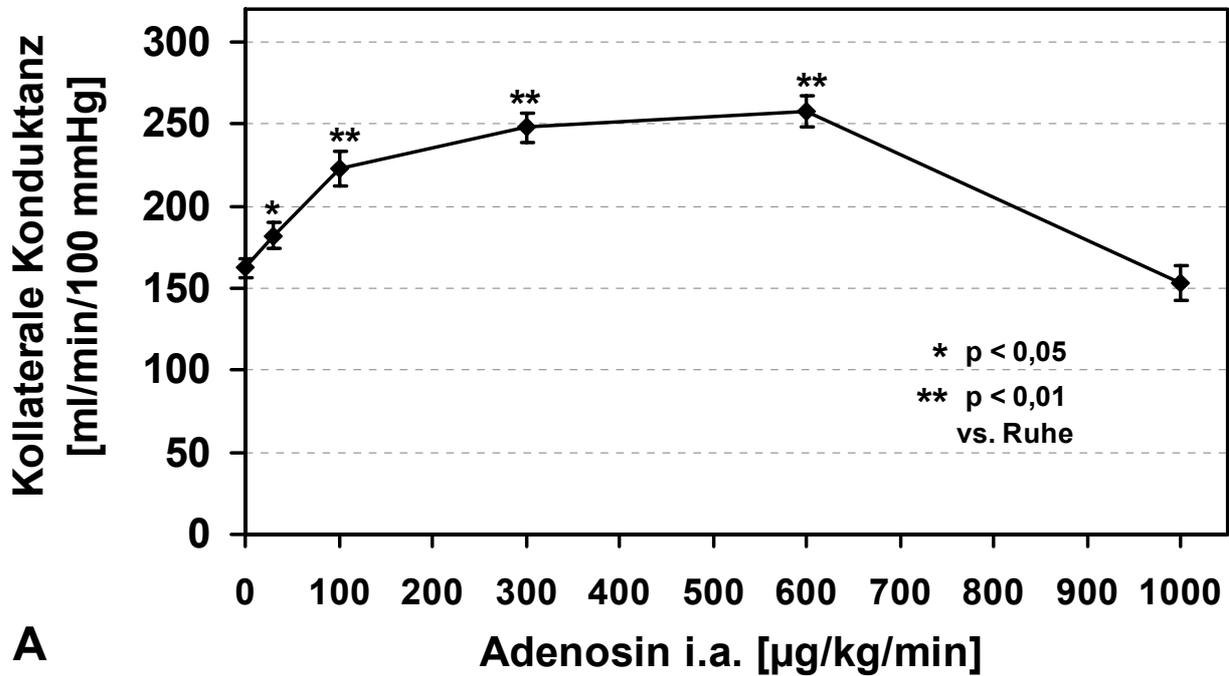


Abbildung 27: Adenosin-Dosis-Wirkungskurve (A) sowie deren Ruhewert und Maximum bei 600 μg Adenosin/kg/min (B) für die abgeleitete kollaterale Konduktanz in der unligierten Kaninchenhintergliedmaße ($n=4$). Dargestellt sind die Mittelwerte und ihre Standardfehler (SEM).

Für die aus diesen Parametern abgeleitete kollaterale Konduktanz ließ sich dementsprechend ebenfalls eine Adenosin-Dosis-Wirkungskurve erstellen, welche ihr Maximum bei maximaler Vasodilatation aufwies (Abb. 27).

Die kollaterale Konduktanz am unligierten Tier betrug in Ruhe (keine Infusion von Adenosin) 162 ± 3 ml/min/100 mm Hg und hatte ihr Maximum von 258 ± 12 ml/min/100 mm Hg bei $600 \mu\text{g}/\text{min}/\text{kg}$ KM Adenosin (maximale Vasodilatation).

Bei dieser Adenosin-Dosis erreichten die Blutflüsse Werte bis zu 40 ml/min, während die peripheren Blutdrücke um bis zu 32 % auf Werte von ca. 55 mm Hg fielen. Da es bei der Dosis von $1000 \mu\text{g}/\text{min}/\text{kg}$ KM Adenosin zu einer starken Abnahme des zentralen Blutdruckes auf Werte unter 55 mm Hg kam, wurde diese Dosis später für weitere Versuche nicht mehr verwendet. Ein solch niedriger Blutdruck ist unphysiologisch und sollte am humanen Patienten nicht vorherrschen. Zudem muß der Dilatationsgrad des Gefäßbaumes schon bei vorausgegangener, niedrigerer Dosierung maximal sein, da der dem Kollateralfluß entsprechende Blutfluß in den Aa. iliacae extt. bereits abnimmt (Abb. 26 A).

1.1.2. Hämodynamik der operierten Hintergliedmaße

1.1.2.1. Adenosin-Dosis-Wirkungskurve nach Femoralisligatur

Um den therapeutischen Einfluß der zu applizierenden Wachstumsfaktoren mit dem rein endogen gesteuerten Kollateralwachstum vergleichen zu können, mußten zunächst Versuchstiere nach einwöchigem Verschuß der rechten Femoralarterie und lokaler Applikation von Albumin (Negativkontrolle; n=8) hämodynamisch ausgewertet werden. Die hämodynamischen Ableitungen bei Erstellung der Adenosin-Dosis-Wirkungskurve für Albumin stellten sich wie in Abbildung 28 zu sehen dar.

Die Ausgangswerte der einzelnen hämodynamischen Parameter nach Ligatur (n=8; Abb. 29) waren zum Teil schon in Ruhe gegenüber denen der unligierten Tiere (n=4; Abb. 26) verändert. So lag das Ausgangsniveau der peripheren Drücke nach einwöchiger Okklusion der Femoralarterie mit 34 ± 1 mm Hg deutlich unter dem Wert von 86 ± 3 mm Hg bei unoperiertem Bein ($p < 0,01$). Die Blutflüsse dagegen erreichten mit $18,3 \pm 0,6$ ml/min annähernd das Ausgangsniveau von $19,8 \pm 0,7$ ml/min (nicht signifikant). Der zentrale Druck entsprach mit 96 ± 4 mm Hg nahezu dem bei unoperierten Tieren gemessenem Wert von 98 ± 4 mm Hg (nicht signifikant).

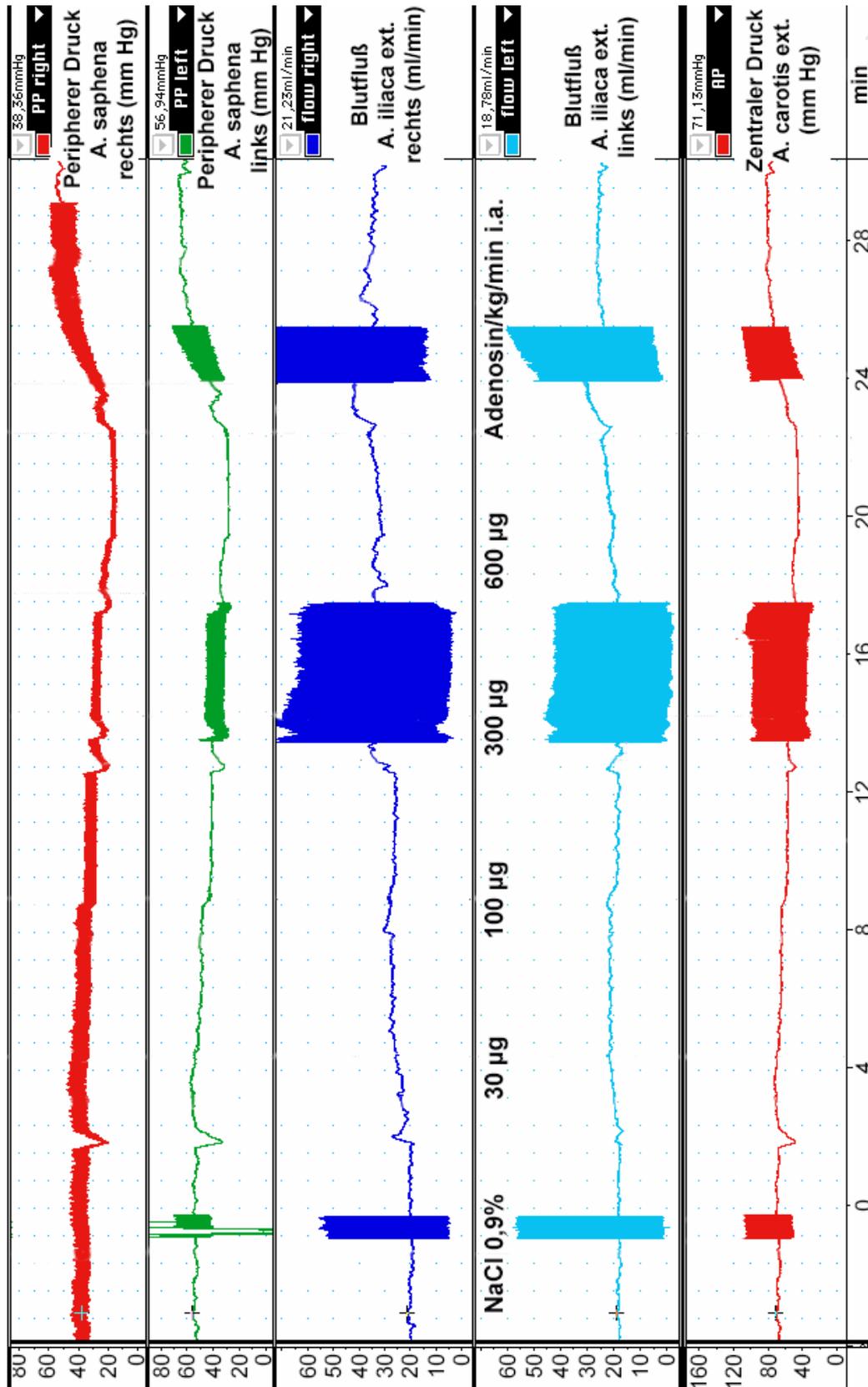


Abbildung 28: Veränderung der mittleren peripheren Blutdrücke in den Aa. saphenae magnaе und der Blutflüsse in den Aa. iliacae externaе (jeweils rechts und links) sowie des zentralen Mitteldruckes in der A. carotis externa in Abhängigkeit von der in die terminale Aorta infundierte Adenosinmenge (Dosis-Wirkungsverlauf für Adenosin).

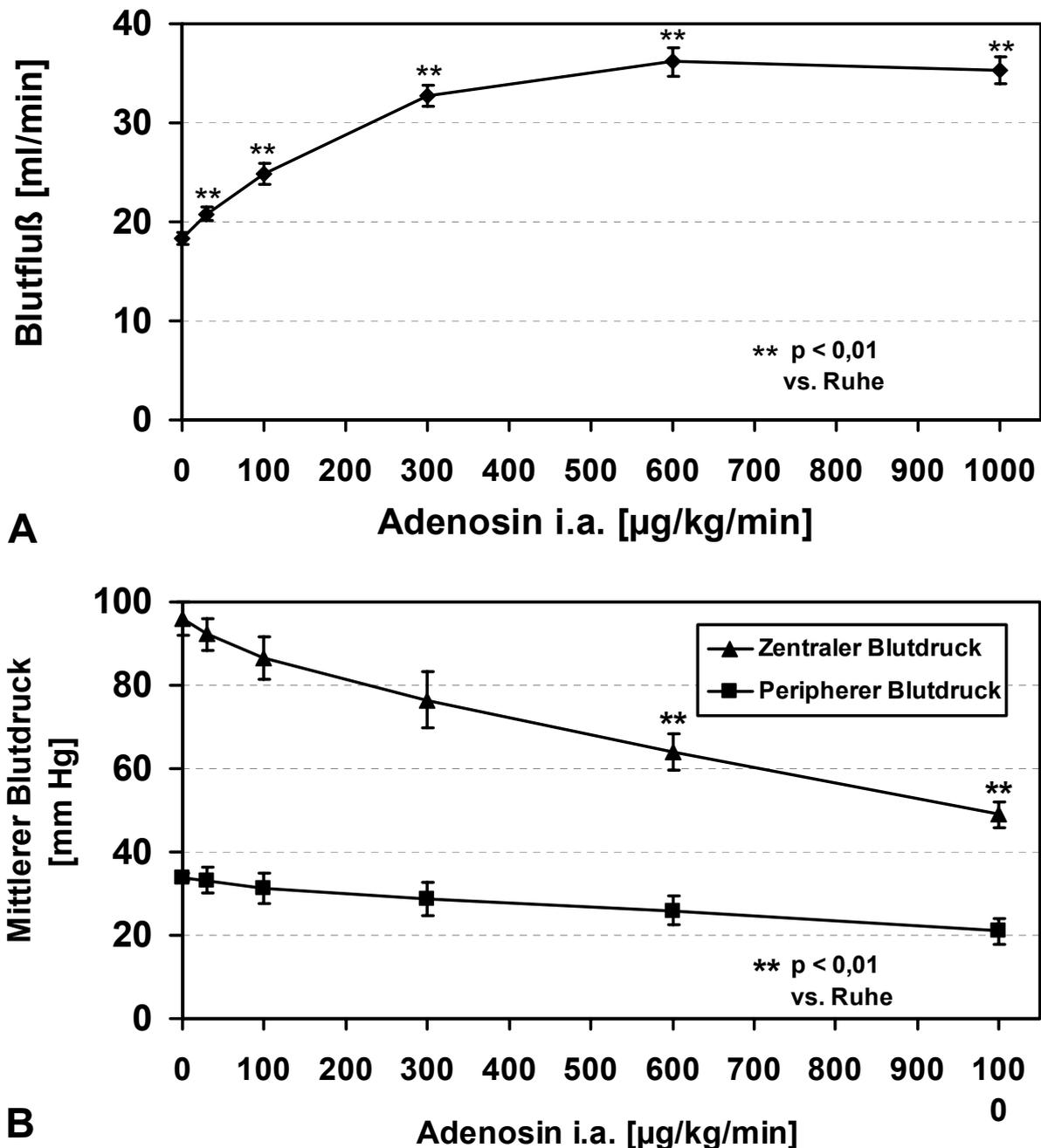
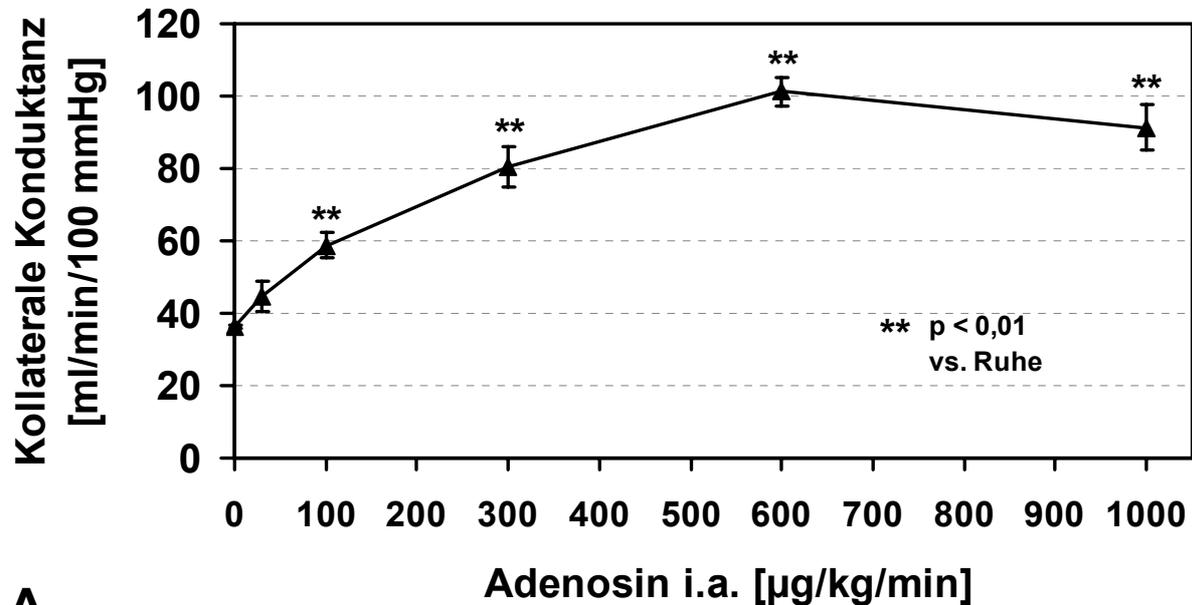


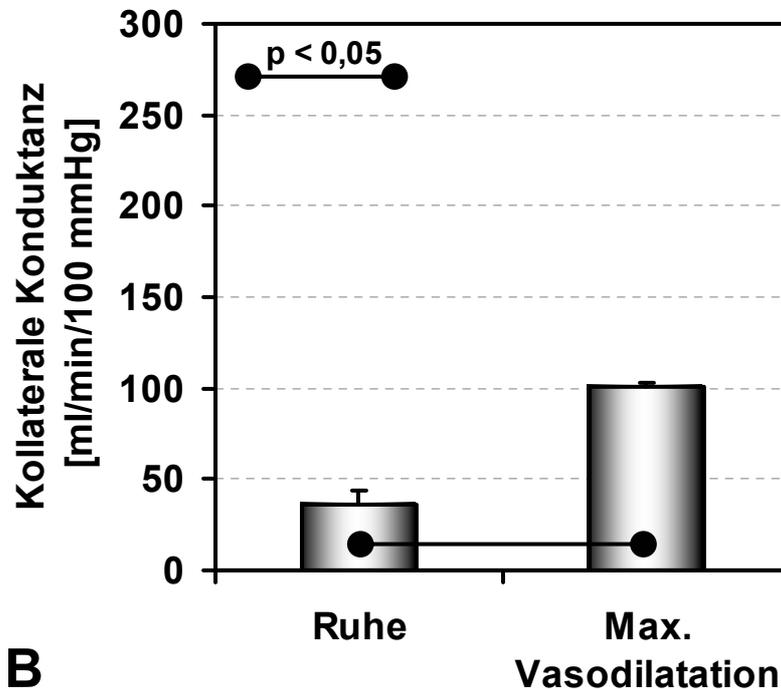
Abbildung 29: Adenosin-Dosis-Wirkungskurven für den Blutfluß in der Aa. iliaca extt. (A) sowie peripher und zentral arteriellen Blutdruck in der A. carotis, bzw. Aa. saphenae (B) der Hintergliedmaße des Weißen Neuseeländer Kaninchens von 2,5 kg Körpermasse nach Ligatur der Femoralarterie und einwöchiger Lokalinfusion von 0,1%iger Albuminlösung. Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihren Standardfehlern (SEM; n=8).

Die kollaterale Konduktanz am ligierten Tier betrug in Ruhe (keine Infusion von Adenosin) $36 \pm 0,4$ ml/min/100 mm Hg (n=8). Sie stieg fast linear mit steigender Adenosin-Konzentration an und hatte ihr Maximum von $101,3 \pm 4,0$ ml/min/100 mm Hg (n=8) bei 600 µg/min/kg KM Adenosin (maximale Vasodilatation; Abb. 30). Bei dieser

Adenosin-Dosis erreichten die Blutflüsse Werte von bis zu $36 \pm 1,4$ ml/min, während die peripheren Blutdrücke um 23 % auf Werte von $26 \pm 3,4$ mm Hg fielen ($p < 0,05$; $n=8$; Abb. 29). Darüber hinausgehende Konzentrationen von $1000 \mu\text{g}/\text{min}/\text{kg}$ KM Adenosin bewirkten dagegen eine Abnahme der hämodynamischen Werte. Die maximale Vasodilatation bzw. das Konduktanzmaximum waren bereits überschritten.



A



B

Abbildung 30: Adenosin-Dosis-Wirkungskurve (A) und ihr Minimum sowie Maximum (B) für die kollaterale Konduktanz in der einwöchig ligierten Kaninchenhintergliedmaße. Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihren Standardfehlern (SEM; $n=8$).

Da Vergleiche der individuellen kollateralen Leitfähigkeit nur bei Ausschaltung aller additiv postkollateralen Gefäßwiderstände zulässig sind, wurden im weiteren nur die Werte in maximaler Vasodilatation vergleichend aufgeführt. Ein Überbewerten vasodilatativ wirkender Wachstumsfaktoren wurde somit ausgeschlossen.

1.1.2.2. Hämodynamischer Vergleich der ligierten mit der unoperierten Hintergliedmaße

Die Adenosin-Wirkungskurve für beide Gruppen ist in Abb. 31A dargestellt. In den ligierten Kontrolltieren betrug die Grundkonduktanz der Hintergliedmaße in Ruhe 22,5 % bzw. unter maximaler Vasodilatation 40,5 % des Wertes am unligierten Bein (Abb. 31B). Demzufolge können pathophysiologische Regulationsmechanismen einschließlich des Kollateralwachstums bereits nach einer Woche den ursprünglichen Blutfluß zur Hintergliedmaße zu 40 % wiederherstellen.

Es ist einfach zu erkennen, daß das Maximum der kollateralen Konduktanz bei 600 µg Adenosin/kg/min liegt. Die Konzentration von 1000 µg bewirkt ein Abfallen des zentralen Blutdruckes, was sich in der Reduktion der Leitfähigkeit der Gefäße widerspiegelt. Das Herz als Pumpe für den Blutfluß limitiert diesen zugleich. Die physiologisch maximale Konduktanz wird bestimmt.

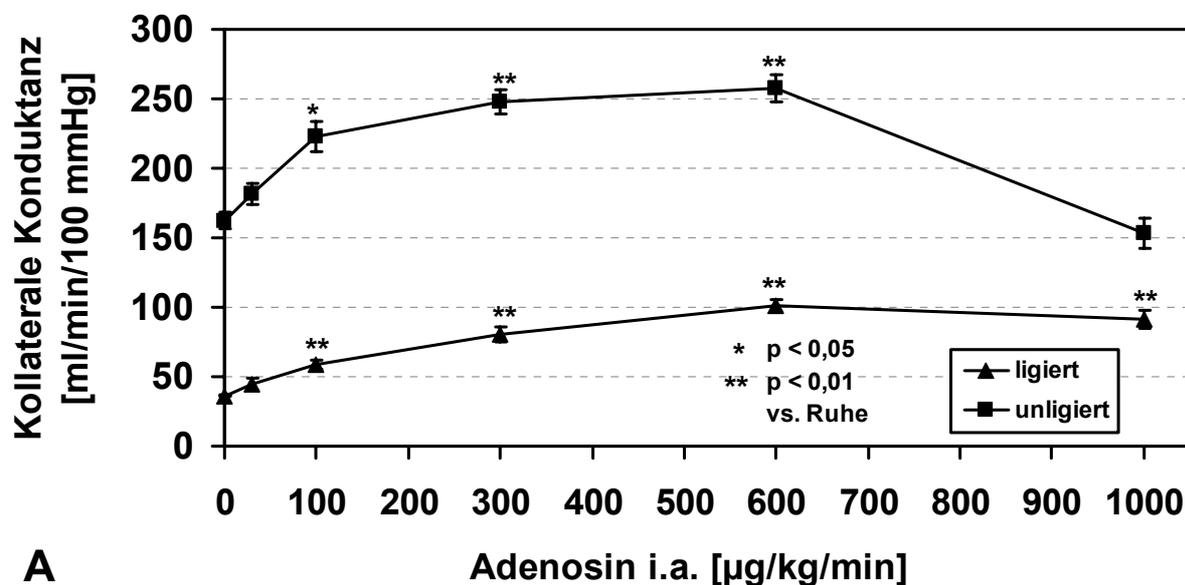


Abbildung 31A: Adenosin-Dosis-Wirkungskurve für die kollaterale Konduktanz in der unoperierten (n=4) und der einwöchig ligierten Kaninchenhintergliedmaße (Infusion von Albuminlösung 0,1%; n=8). Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihren Standardfehlern (SEM).

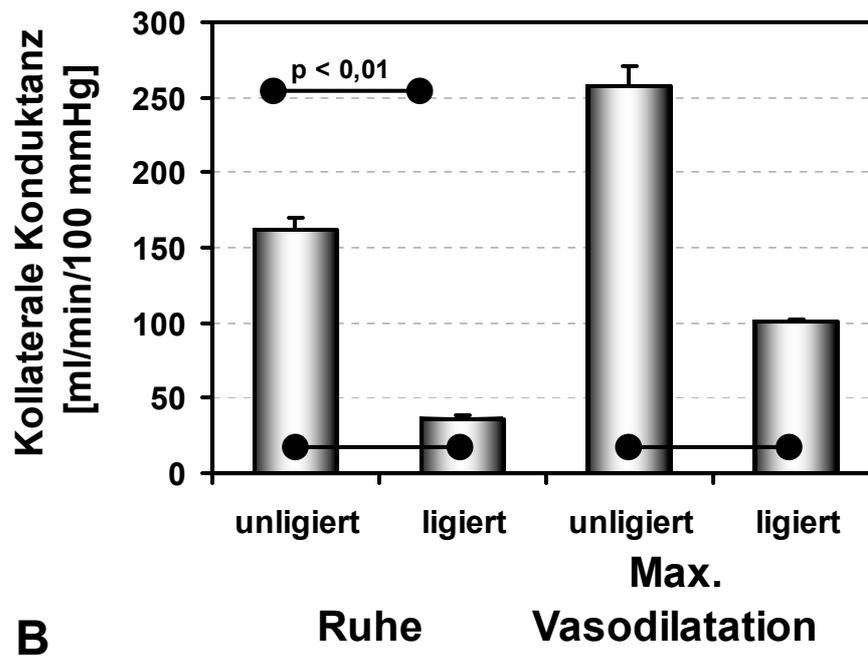


Abbildung 31B: Minima sowie Maxima für die kollaterale Konduktanz in der unoperierten ($n=4$) und der einwöchig ligierten Kaninchenhintergliedmaße (Infusion von Albuminlösung 0,1 %; $n=8$). Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihren Standardfehlern (SEM).

1.2. Maximale kollaterale Konduktanz nach Wachstumsfaktor-Stimulation

Aus den nach einer Woche lokaler Infusion der Testsubstanzen gewonnenen hämodynamischen Meßdaten wurde für jedes Tier die maximale kollaterale Konduktanz bestimmt und der Mittelwert der Versuchsgruppe mit seinem Standardfehler (SEM) ermittelt. Um das Modell auf seine Tauglichkeit zu testen, ein vermehrtes Kollateralwachstum zu messen, wurde zunächst eine Versuchsgruppe mit lokaler einwöchiger Infusion von MCP-1 nach Femoralisligatur hämodynamisch ausgewertet ($n=6$). Die stark arteriogene Wirkung dieses chemotaktisch wirkenden Zytokins war bereits zuvor mehrfach publiziert worden.

1.2.1. Hämodynamik nach Infusion von MCP-1

In dem hier vorliegenden Modell wies MCP-1 die gleichen, stark arteriogenen Eigenschaften auf, wie sie bereits intern an anderen in vivo Tiermodellen nachgewiesen werden konnte. So bewirkte MCP-1 eine Steigerung der kollateralen Konduktanz um 37 % in Ruhe und um 88 % bei maximaler Vasodilatation, verglichen mit Albumin:

Mit der lokalen Infusion von MCP-1 wurden in maximaler Vasodilatation Konduktanzwerte von 220 ± 11 ml/min/100 mm Hg ($n=6$) erzielt. Die Gabe von MCP-1 verdoppelte somit den mit Albuminlösung erzielten Kontrollwert ($p < 0,01$).

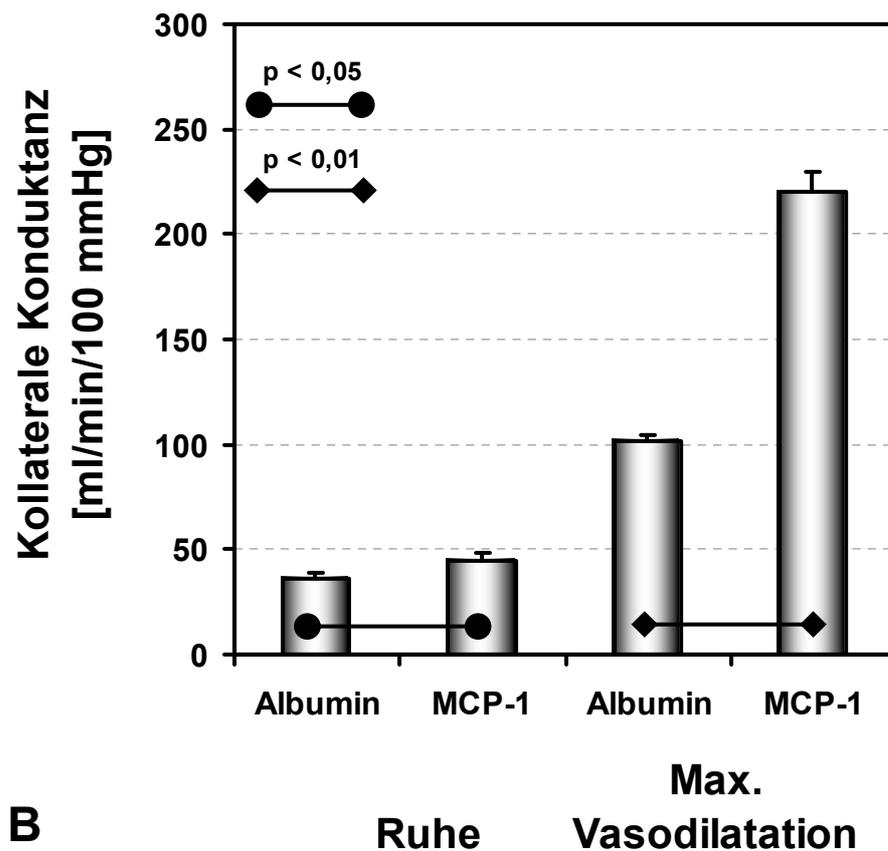
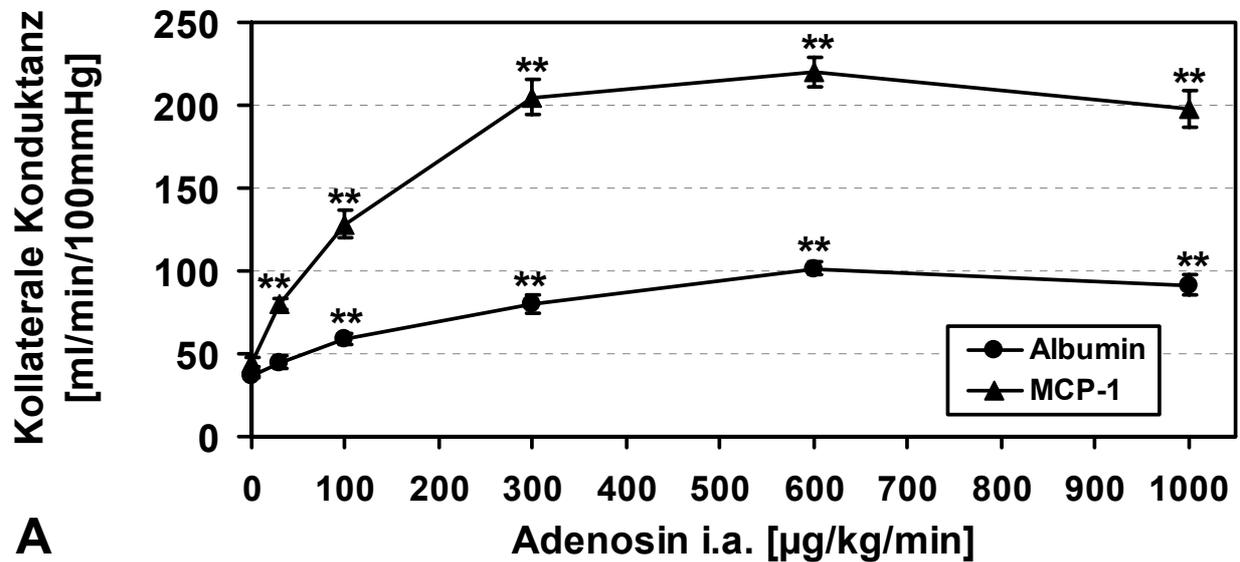


Abbildung 32: Adenosin-Dosis-Wirkungskurve (A) und ihre Minima sowie Maxima (B) für die kollaterale Konduktanz in der Kontrollgruppe ($n=8$) sowie in den mit MCP-1 behandelten Kaninchen ($n=6$). Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihren Standardfehlern (SEM).

Selbst in Ruhe bewirkte MCP-1 mit $45 \pm 3,1$ ml/min/100 mm Hg signifikant höhere Werte als $36 \pm 0,4$ ml/min/100 mm Hg nach Gabe der Albuminlösung ($p < 0,05$; Abb. 32). Demnach ist das hier vorliegende Modell geeignet auch eine Steigerung des endogen bewirkten Kollateralwachstums durch exogene Stimulierung zu bestimmen.

1.2.2. Hämodynamik nach Infusion von VEGF-A

Nach einwöchiger Behandlung mit VEGF-A, dem Liganden für den endothelialen VEGFR-2 und den vor allem monozytär exprimierten VEGFR-1, ergab sich eine maximale kollaterale Konduktanz bei $1,5 \mu\text{g VEGF/kg KM/7d}$ von $122 \pm 16,8$ ($n=6$) und bei $3,0 \mu\text{g VEGF/kg KM/7d}$ von $133 \pm 7,2$ ml/min/100 mmHg ($n=3$). Die weitere Verdopplung der Dosis auf $6,0 \mu\text{g VEGF/kg KM/7d}$ bewirkte wiederum eine Zunahme der kollateralen Konduktanz auf $164 \pm 17,5$ ml/min/100 mmHg ($n=3$). Im Vergleich zur Kontrolle war die Zunahme nach Applikation von VEGF jeweils signifikant ($p < 0,05$; Abb. 33). Die Zunahme der kollateralen Konduktanz bei Erhöhung der VEGF-Konzentration gegenüber der niedrigen Dosis war zu gering, um Signifikanzniveau zu erreichen.

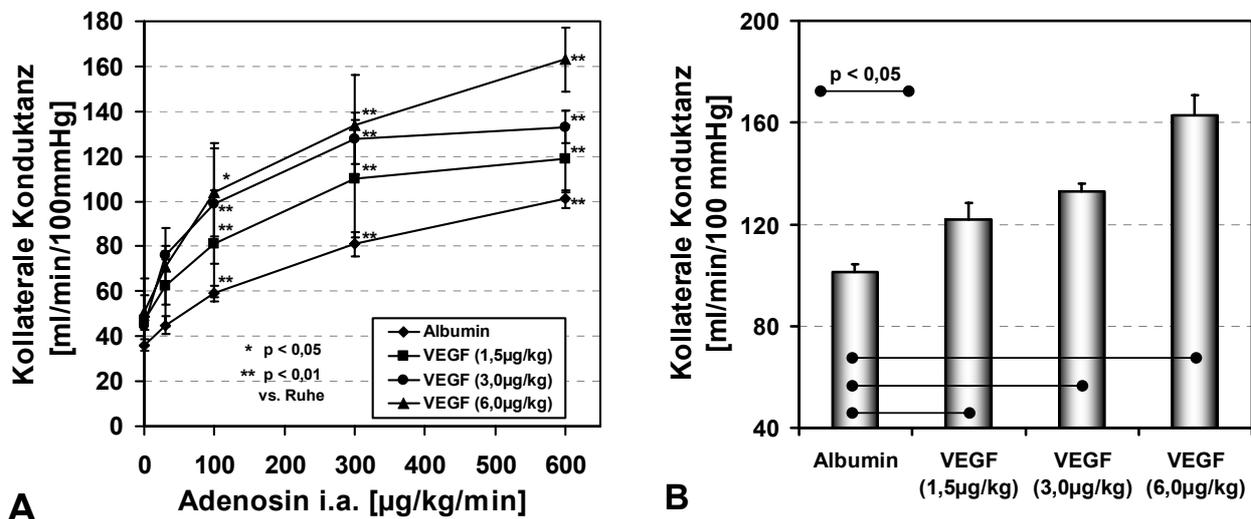


Abbildung 33: Adenosin-Dosis-Wirkungskurve (A) und daraus abgeleitete maximale kollaterale Konduktanz (B) nach einwöchiger Infusion von VEGF-A [$1,5 \mu\text{g}$ ($n=6$) oder $3,0 \mu\text{g}$ ($n=3$) oder $6,0 \mu\text{g}$ ($n=3$)/kg KM/7d] im Vergleich zur Albuminkontrolle ($n=8$). Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihren Standardfehlern (SEM).

1.2.3. Hämodynamik nach selektiver Stimulierung des VEGFR-1

Nach einwöchiger lokaler Behandlung mit dem für VEGFR-1-spezifischen Agonisten PlGF-2 ergab sich eine maximale kollaterale Konduktanz bei 1,5 µg PlGF-2/kg KM/7d von 141±9,5 ml/min/100 mmHg (n=6) und bei 3,0 µg PlGF-2/kg KM/7d von 165±7,2 ml/min/100 mmHg (n=4). Im Vergleich zur Kontrolle war die Zunahme nach Applikation von PlGF-2 jeweils signifikant ($p < 0,05$; Abb. 34). Zusätzlich konnte eine Konzentrationsabhängigkeit der Stimulierung des Kollateralfäßwachstums durch PlGF-2 festgestellt werden: Die Verdopplung der PlGF-2-Konzentration auf 3,0 µg/kg KM/7d bewirkte eine Erhöhung der kollateralen Konduktanz gegenüber den gewonnenen Werten mit 1,5 µg/kg KM/7d ($p < 0,05$; Abb. 34B).

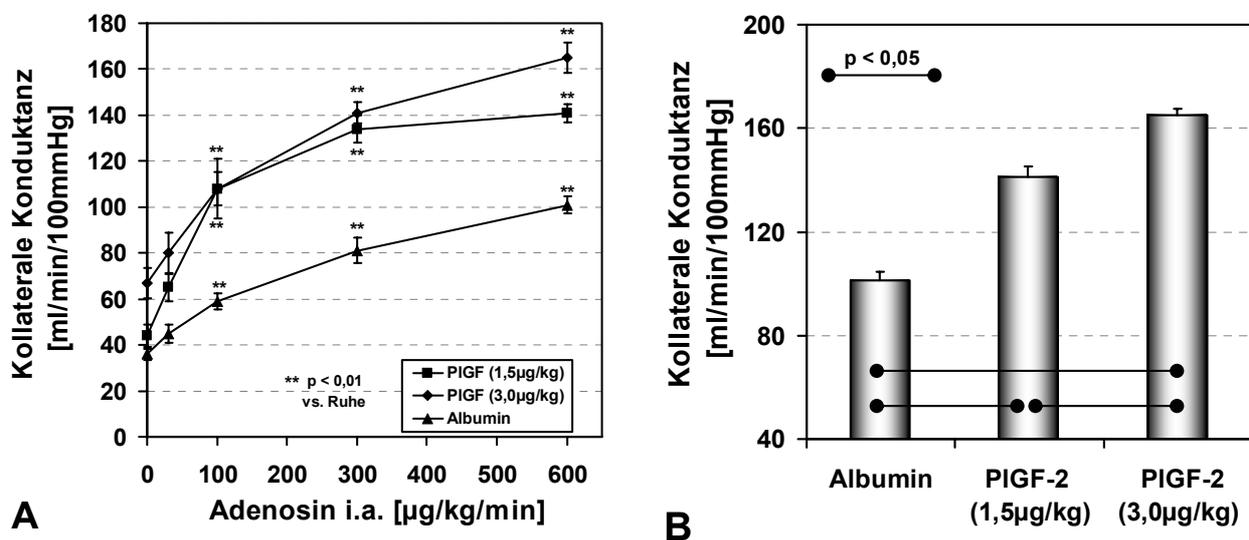


Abbildung 34: Adenosin-Dosis-Wirkungskurve (A) und daraus abgeleitete maximale kollaterale Konduktanz (B) nach einwöchiger Infusion von PlGF-2 [1,5 µg (n=6) oder 3,0 µg (n=4)/kg KM/7d]. Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihren Standardfehlern (SEM).

1.2.4. Hämodynamik nach selektiver Aktivierung des VEGFR-2

Zur ausschließlichen Stimulierung des Endothel-vermittelten Kollateralwachstums wurde der selektiv an den endothelialen VEGFR-2 bindende VEGF-E über eine Woche lokal in den Kollateralkreislauf infundiert. Die hierbei zur Verfügung stehende Dosis von 1,5 µg VEGF-E/kg KM/7d (n=4) bewirkte eine Erhöhung der kollateralen Konduktanz auf 124±9,2 ml/min/100 mmHg ($p < 0,05$; Abb. 35).

1.2.5. Hämodynamik nach kombinierter Aktivierung des VEGFR-1/-2

Die lokale Infusion des selektiv den endothelialen VEGFR-2 bindenden VEGF-E zusammen mit dem spezifischen Liganden für den VEGFR-1, PlGF-2, zu jeweils 1,5 µg/kg KM/7d (n=4) bewirkte eine Zunahme der kollateralen Konduktanz auf $129 \pm 25,8$ ml/min/100 mmHg ($p < 0,05$).

Die kombinierte Stimulierung des endothelialen mit dem monozytären VEGFR konnte somit nicht annähernd Meßergebnisse erzielen, welche bei der ausschließlichen Gabe von 3,0 µg PlGF-2/kg KM/7d (n=4) erreicht wurden. Vielmehr lagen die hämodynamischen Werte sogar noch unter denen bei ausschließlicher Gabe von 1,5 µg PlGF-2/kg KM/7d gemessenen (Abb. 35).

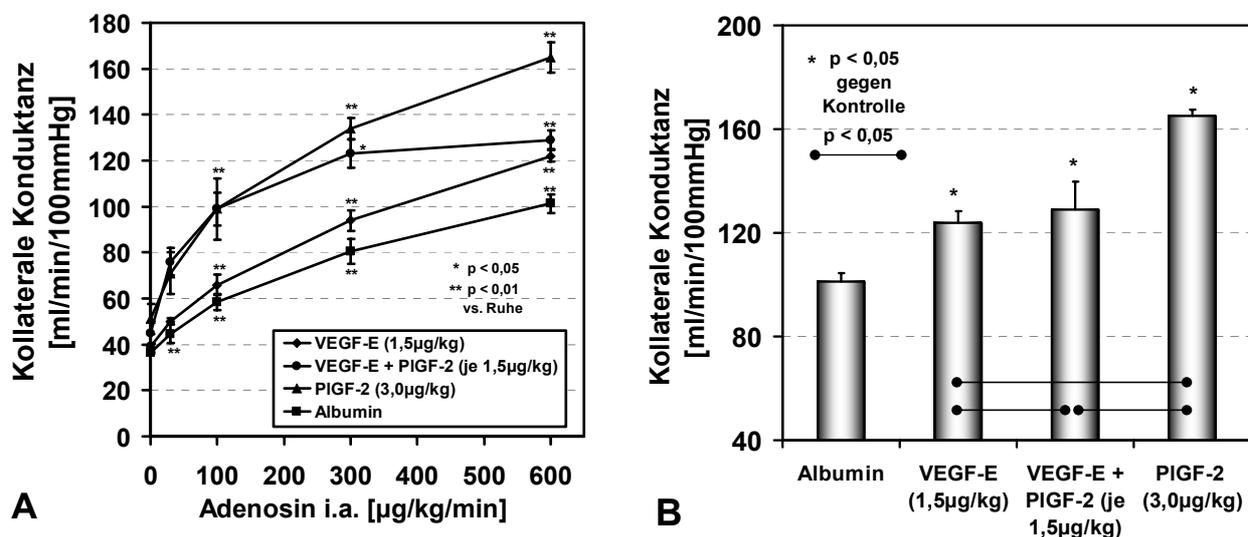


Abbildung 35: Dosis-Wirkungskurve für Adenosin und maximale kollaterale Konduktanz nach einwöchiger Infusion von VEGF-E (1,5 µg/kg KM/7d; n=4), PlGF-2 (3,0 µg/kg KM/7d; n=4) alleine oder in Kombination (jeweils 1,5 µg/kg KM/7d; n=4). Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihren Standardfehlern (SEM).

1.3. Hämodynamischer Gruppenvergleich

Nach Auswertung der einzelnen Gruppen erwies es sich als sinnvoll, den Vergleich der Gruppen untereinander zu führen. Es waren Vergleiche des Einflusses rein endothelialer oder monozytärer Stimulierung, sowie der kombinierten Stimulierung auf das Kollateralwachstum möglich. Abbildung 36 stellt die einzelnen Versuchsgruppen gegeneinander auf.

Die Gabe von 0,5 µg MCP-1/kg KM/7d (n=6) erzielte mit Abstand die höchste kollaterale Konduktanz ($220 \pm 27,3$ ml/min/100 mm Hg) im Vergleich zu den anderen Testsubstanzen.

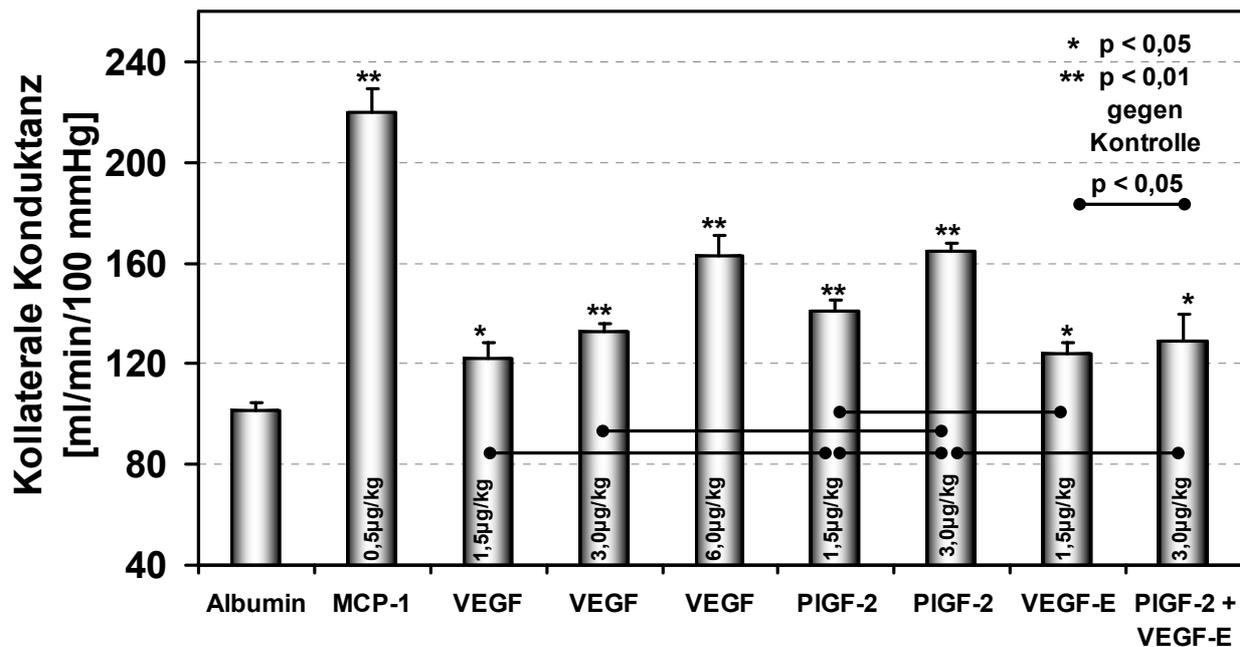


Abbildung 36: Maximale kollaterale Konduktanz nach einwöchiger Infusion von Albumin alleine oder mit darin gelöstem MCP-1 (0,5 µg/kg; n=6), VEGF-A [1,5 µg/kg (n=6) oder 3,0 µg/kg (n=3) oder 6,0 µg/kg (n=3)], VEGF-E (1,5 µg/kg; n=4), PlGF-2 (1,5 µg/kg (n=6) oder 3,0 µg/kg (n=4)) alleine oder in Kombination mit VEGF-E (jeweils 1,5 µg/kg; n=4). Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihren Standardfehlern (SEM). Gruppenvergleiche mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ galten als signifikant.

Dem stark chemotaktisch auf Monozyten wirkenden Zytokin vergleichbare Ergebnisse wurden nach selektiver Stimulierung des VEGFR-1, welcher vor allem auf Monozyten zu finden ist, mittels PlGF-2 erzielt. Die Gabe von 1,5 µg PlGF-2/kg KM/7d steigerte die Konduktanz auf $141 \pm 9,5$ ml/min/100 mmHg (n=6) und mit 3,0 µg PlGF-2/kg KM/7d (n=4) konnte eine weitere Steigerung auf $165 \pm 7,2$ ml/min/100 mm Hg erreicht werden, welche jedoch nicht Signifikanzniveau erreichte. Die nicht selektive Stimulierung des

rein endothelialen VEGFR-2 sowie des VEGFR-1 mittels VEGF-A dagegen konnte nur bedingt ähnlich hohe Konduktanzwerte erreichen.

Die Infusion von 1,5 µg VEGF/kg KM/7d (n=6) bewirkten mit 122±116,8 ml/min/100 mmHg keine deutliche Zunahme der Konduktanz, wogegen mit 133±7,2 ml/min/100 mmHg 3,0 µg VEGF/kg KM/7d (n=3) eindeutig arteriogen wirkten. Die weitere Erhöhung der Dosis auf 6,0 µg VEGF/kg KM/7d (n=3) erzielte mit PlGF vergleichbare Werte von 164±117,5 ml/min /100 mmHg. Die Gabe von 1,5 µg VEGF-E/kg KM/7d VEGF-E (n=4) zur selektiven Bindung des rein endothelialen VEGFR-2 erzielte mit 124±9,2 ml/min/100 mmHg lediglich dem VEGF-A entsprechende, nicht deutlich erhöhte Konduktanzwerte. Die gleichzeitige, selektive Stimulierung des endothelialen VEGFR-2 sowie des monozytären VEGFR-1 mittels einer Kombination von 1,5 µg VEGF-E/kg KM/7d mit 1,5 µg PlGF-2/kg KM/7d (n=4) bewirkte keine Potenzierung der bekannten Werte bei getrennter Stimulierung beider Rezeptoren. Die Kombination erreichte mit 127±25,8 ml/min/100 mmHg bei weitem nicht die Konduktanzwerte nach Gabe von 3,0 µg PlGF-2/kg. KM/7d. Die Konduktanz lag sogar unter dem Wert nach alleiniger Gabe von 1,5 µg PlGF-2/kg KM/7d.

2. Angiographische Auswertung

Alle Versuchstiere wurden neben der Hämodynamik zusätzlich angiographisch ausgewertet. Nach postmortaler Perfusion der Hintergliedmaßen mit Bismuth-haltigem Kontrastmittel auf Gelatinebasis wurden diese präpariert. Anschließend wurden im Röntgenapparat davon Angiogramme erstellt, welche auf einem Röntgenschirm dreidimensional betrachtet und quantitativ sowie qualitativ ausgewertet wurden.

Die präexistierenden Kollateralgefäße der Kaninchenhintergliedmaße anastomosieren zwischen den Aa. profunda femoris und circumflexa femoris lateralis und den Aa. genus descendens, caudalis femoris und Rr. musculares distales (Abb. 37A). Daher wird für alle Versuchsgruppen nachfolgend nur der in Abbildung 37B markierte Oberschenkelbereich stellvertretend abgebildet.

Für jedes Bein wurden die den Gefäßverschluß überbrückenden Kollateralgefäße einzeln ausgezählt (Kollateralenzahl; 2.2.). Als Kollateralgefäße galten nur Gefäße mit erkennbarer Stamm-, Mittel- und Wiedereintrittszone. Nachfolgend wurden alle Kollateralen einzeln ihrem Durchmesser entsprechend mit einem Faktor multipliziert und die Produkte summiert (Kollateralindex; 2.3.).

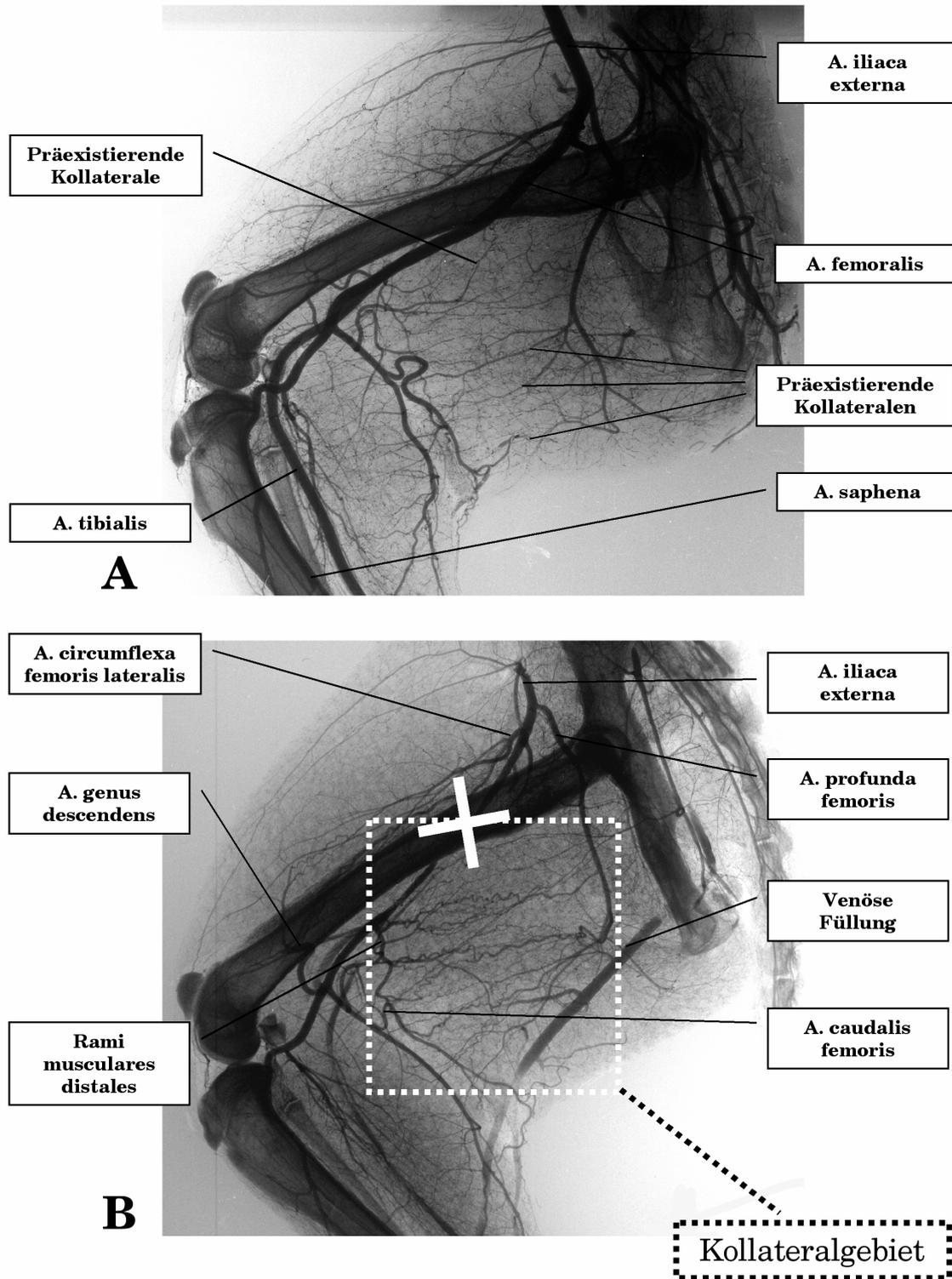


Abbildung 37: Postmortale Angiographien ohne Ligatur (A) und nach vier Wochen Femoralisligatur (B). Die dem Kollateralgebiet vorgeschalteten und nachfolgenden Arterien sind bezeichnet. Im oberen Bild sind zusätzlich die präexistierenden Kollateralgefäße indiziert, welche nach mehrwöchiger Ligatur der Femoralarterie zu den Kollateralarterien im unteren Bild auswachsen.

2.1. Angiographien

Nach einwöchiger Ligatur und lokaler Infusion der Testsubstanzen wurden postmortale Angiographien angefertigt, welche zunächst innerhalb der Versuchsgruppe und anschließend gruppenübergreifend verglichen wurden. Zunächst wurde jedoch das endogen bedingte Kollateralwachstum nach Femoralisligatur ohne äußere Stimulierung durch Wachstumsfaktoren analysiert.

2.1.1. Kollateralgebiet nach Ligatur der Femoralarterie

Um die einwöchige Ligatur als Kontrolle für die zu testenden Substanzen verwenden zu können, mußte den Tieren über eine Woche lokal Albuminlösung (0,1%) infundiert werden (n=8). Das endogene Kollateralwachstum konnte dann nur im Vergleich zu rein präexistierenden Kollateralgefäßen einer Angiographie ohne Femoralisligatur (Abb. 38A) bestimmt werden (n=4).

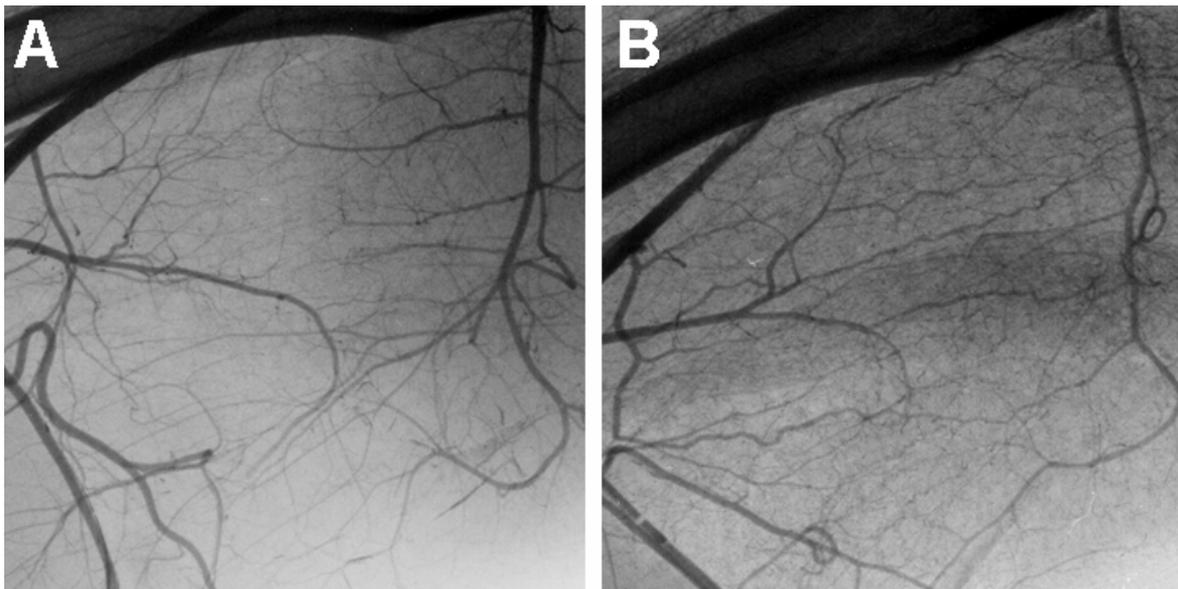


Abb. 38: Details postmortalen Angiographien des Kaninchenhinterlaufes bei unligierter Femoralarterie (A), sowie nach einer Woche Femoralisligatur und lokaler Infusion von Albuminlösung in das Kollateralgebiet (B).

Die Angiographien der unligierten Hintergliedmaße wiesen eine geringe Anzahl angiographisch sichtbarer Kollateralen auf. Diese waren gerade und von sehr kleinem Durchmesser. Dagegen stellten sich die zuführenden Arterien der Stammzone groß und stark mit Kontrastmittel gefüllt dar. Nach einwöchiger Ligatur und Infusion von Albuminlösung in das Kollateralgebiet waren mehr Kollateralgefäße je Hinterbein sichtbar. Sie waren von korkenzieherartigem Aussehen und größerem Durchmesser (200 μm) als die präexistierenden Kollateralgefäße der unligierten Gliedmaße (30 μm).

2.1.2. Kollateralgebiet nach Infusion von VEGF-A

Nach einwöchiger Ligatur und Infusion von Albumin waren wenige kleine Kollateralarterien im Angiogramm zu erkennen. Sie wiesen die für sie typische korkenzieherartige Form auf (Abb. 39A). Die Infusion von 1,5 μg VEGF-A/kg KM/7d bewirkte keine Zunahme der Anzahl der Kollateralen. Erst die Dosisverdoppelung (3 μg VEGF-A/kg KM/7d) bzw. -vervierfachung (6 μg VEGF-A/kg KM/7d) hatte eine Zunahme der Zahl an vor allem kleinen Kollateralarterien zur Folge (Abb. 39B-D).

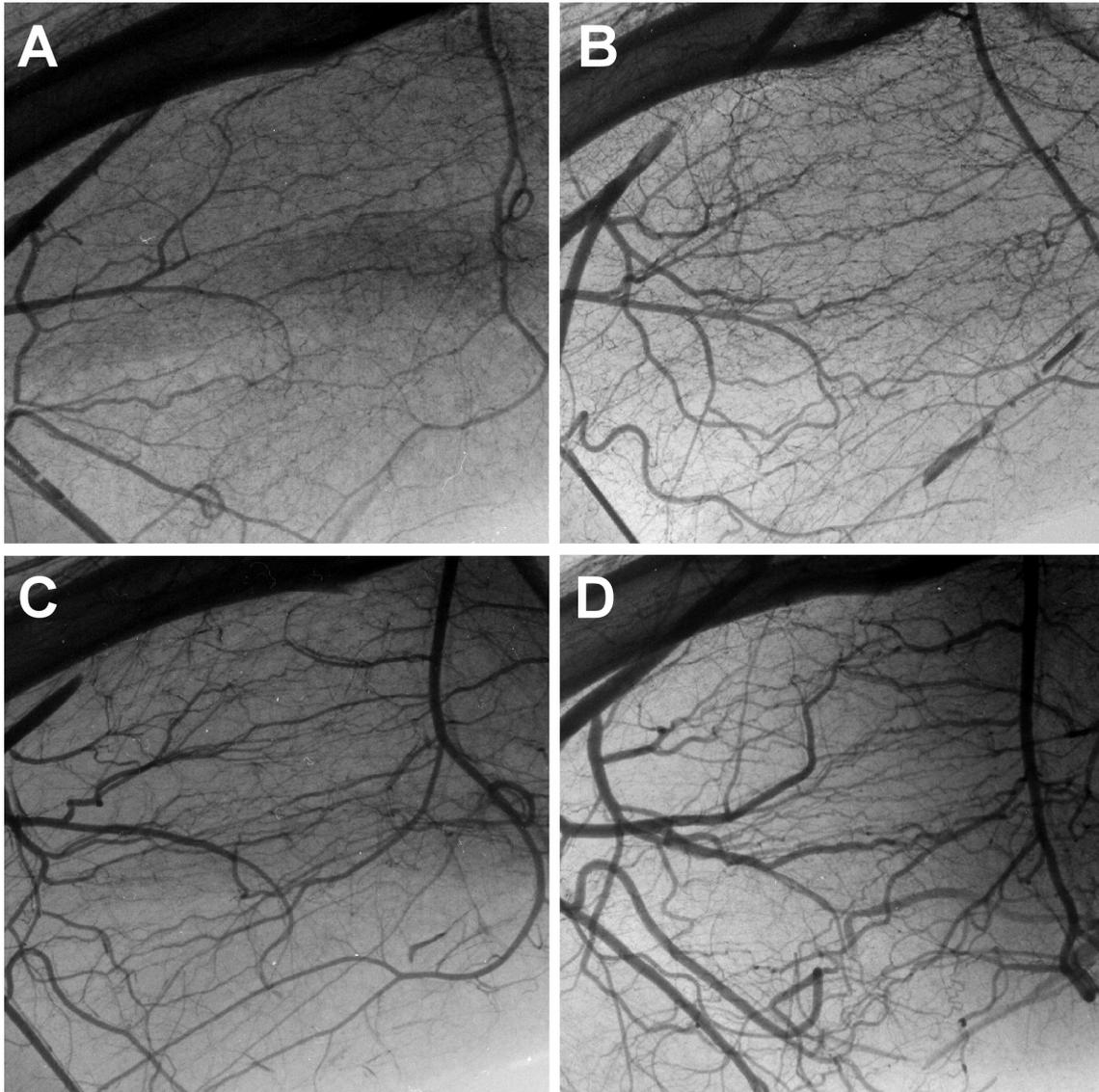


Abb. 39: Postmortale Angiographien des Kaninchenhinterlaufes nach einwöchiger lokaler Infusion von A) Albumin, B) 1,5 μg VEGF, C) 3,0 μg VEGF oder D) 6,0 μg VEGF/kg KM/7d in das Kollateralgebiet.

2.1.3. Kollateralgebiet nach selektiver Stimulierung des VEGFR-1

Die ausschließliche Stimulierung des VEGFR-1 mittels Gabe von PlGF-2 bewirkte eine angiographisch deutliche Zunahme der Kollateralgefäßdichte. Neben der Anzahl der Kollateralarterien war auch deren Durchmesser vergrößert (Abb. 40).

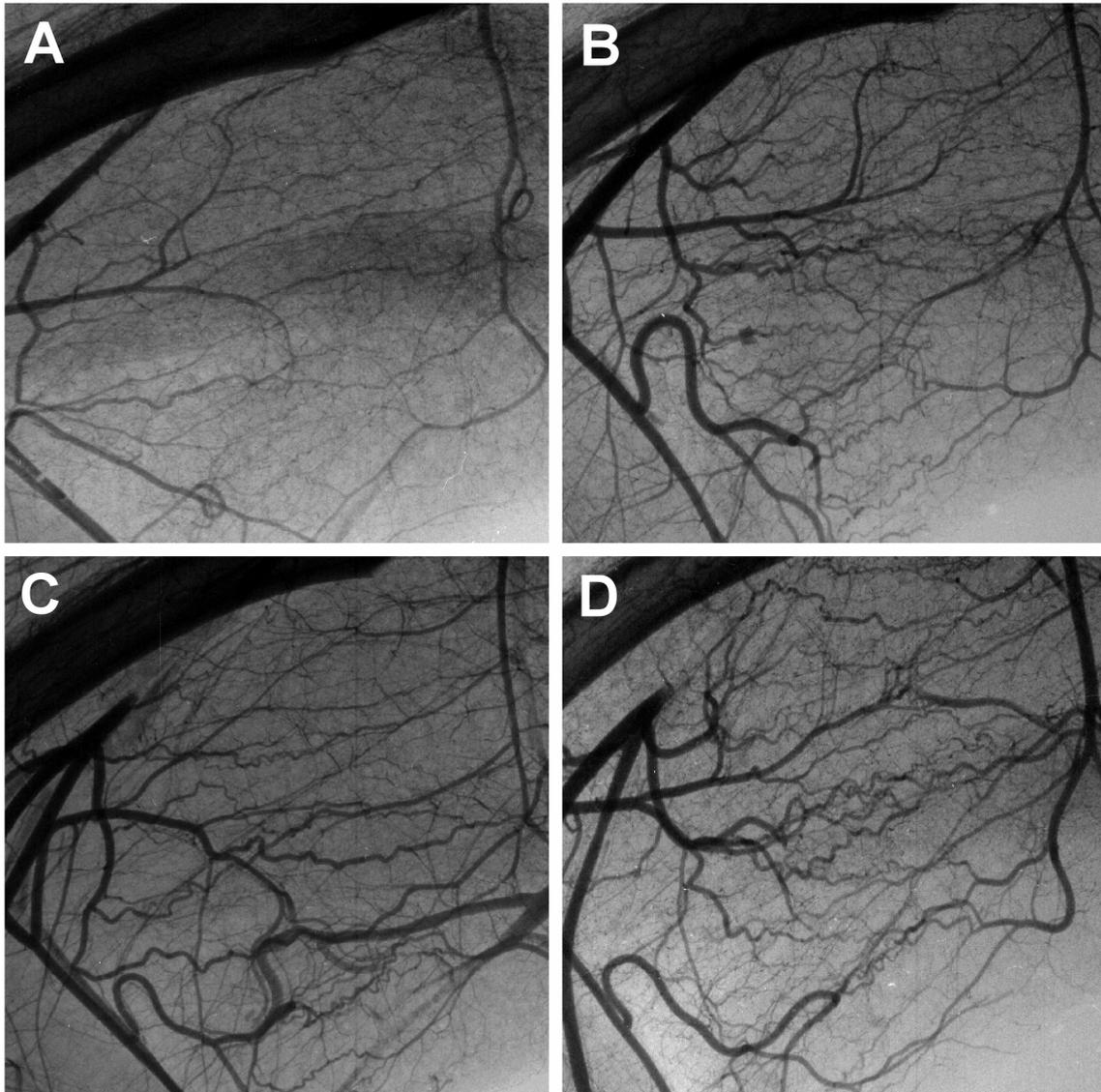


Abb. 40: Postmortale Angiographien des Kaninchenhinterlaufes nach lokaler Infusion von A) Albumin, B) 1,5 µg PlGF-2, C) 3,0 µg PlGF-2 oder D) 0,5 µg MCP-1/kg KM/7d in das Kollateralgebiet über eine Woche.

2.1.4. Kollateralgebiet nach selektiver Aktivierung des VEGFR-2

Durch alleinige Aktivierung des endothelialen VEGFR-2 mittels Infusion von an ihn spezifisch bindenden VEGF-E kam es zu keiner sichtbaren Zunahme der

Kollateralgefäßzahl in der Angiographie (Abb. 41B). Der Durchmesser der gewachsenen Gefäße war nicht anders als bei Gabe der Kontrollsubstanz (Albumin).

2.1.5. Kollateralgebiet nach kombinierter Aktivierung des VEGFR-1/-2

Die Gabe der Kombination von VEGF-E und PlGF-2 zu gleichen Anteilen konnte keine deutliche Verbesserung gegenüber den Angiographien mit VEGF-E alleine erzielen (Abb. 41). Anzahl und Größe sichtbarer Kollateralen waren geringer als bei alleiniger Stimulierung des VEGFR-1 mit PlGF-2.

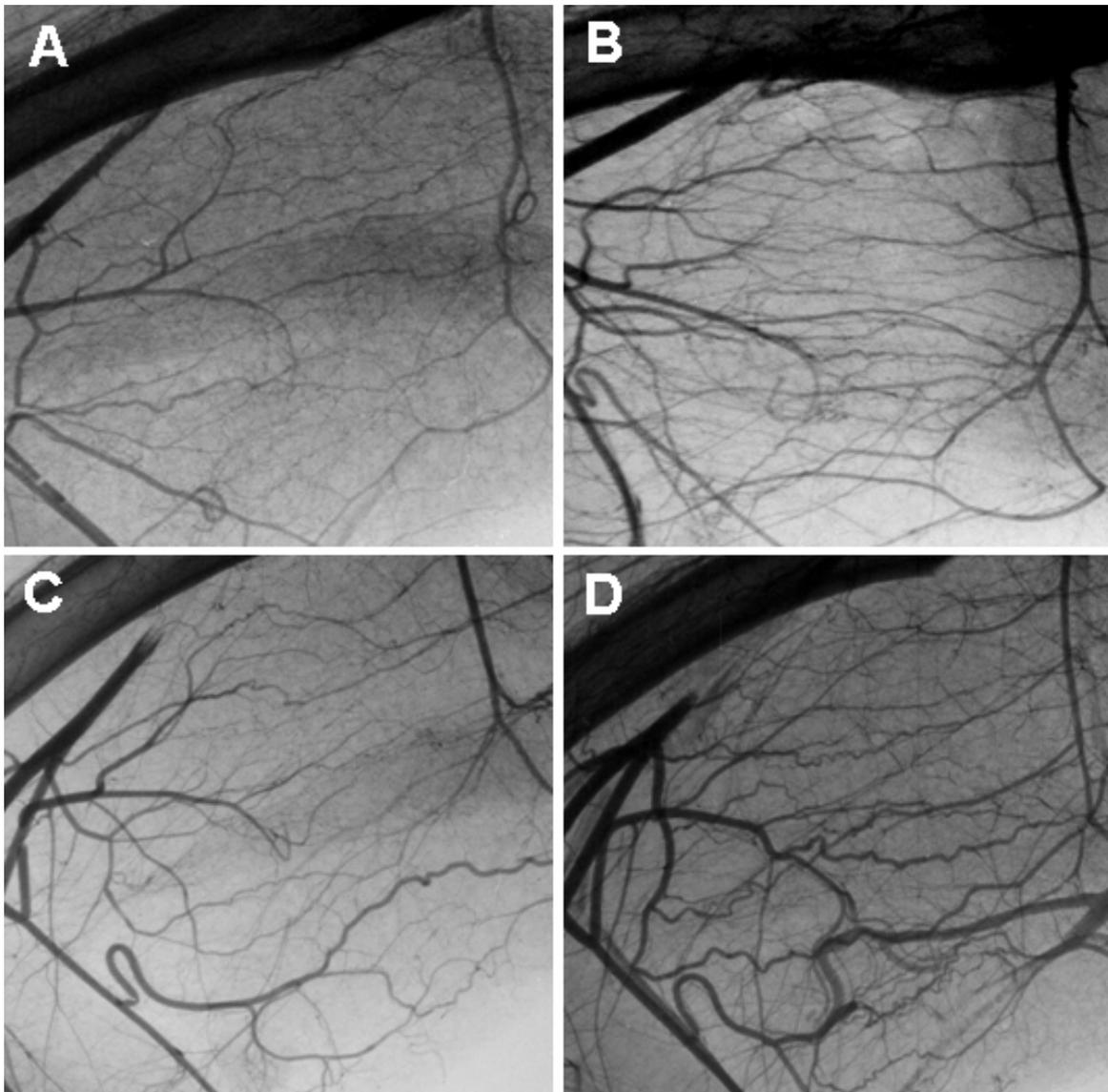


Abb. 41: Postmortale Angiographien des Kaninchenhinterlaufes nach lokaler Infusion von A) Albumin, B) 1,5 µg VEGF-E, C) 1,5 µg VEGF-E + 1,5 µg PlGF-2 oder D) 3,0 µg PlGF-2 kg KM/7d in das Kollateralgebiet.

2.2. Kollateralenzahl

Die Kollateralenzahl sollte als direktes Maß für die Stimulierung der Arteriogenese dienen. Um die arteriogene Wirkung in den einzelnen Versuchsgruppen zu analysieren wurden daher von jedem Tier alle angiographisch sichtbaren Kollateralgefäße ausgezählt. Nachfolgend werden die einzelnen Versuchsgruppen abgehandelt und anschließend untereinander verglichen.

2.2.1. Kollateralenzahl nach Ligatur der Femoralarterie

Die als Kontrolle dienende einwöchige Ligatur und Infusion von Albuminlösung (n=8) bewirkte verglichen mit dem unligierten Bein (n=4) einen deutlichen Anstieg der Kollateralarterien von $5 \pm 0,4$ auf $11,6 \pm 0,4$ je Hintergliedmaße ($p < 0,05$; Abb. 42).

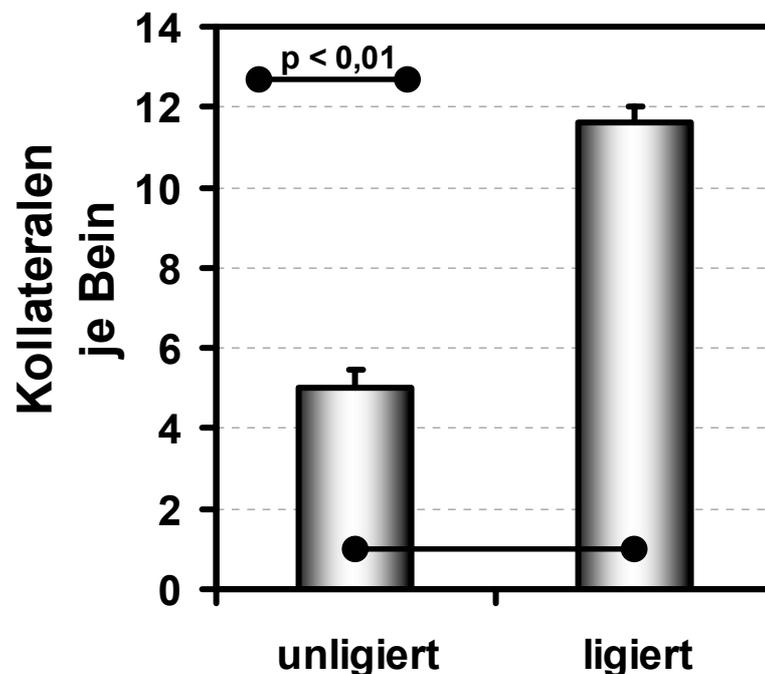


Abbildung 42: Kollateralenzahl je Hintergliedmaße nach einwöchiger Ligatur und lokaler Infusion von Albuminlösung (n=8) im Vergleich zur unligierten Hintergliedmaße (n=4). Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihren Standardfehlern (SEM).

2.2.2. Kollateralenzahl nach Infusion von VEGF-A

Die quantitative Analyse der Angiographien ergab nach einer Woche lokaler Infusion von $1,5 \mu\text{g VEGF-A/kg KM/7d}$ mit $13,0 \pm 0,5$ (n=6) keine Zunahme der Kollateralenzahl verglichen mit der Infusion von Albuminlösung alleine ($11,6 \pm 0,4$, n=8), die

Dosiserhöhung auf 3,0 und 6,0 μg VEGF-A/kg KM/7d (beide $n=3$) jedoch eine Erhöhung auf $14,3 \pm 0,3$ bzw. $19,0 \pm 1,5$ Kollateralarterien je Bein ($p < 0,05$; Abb. 43).

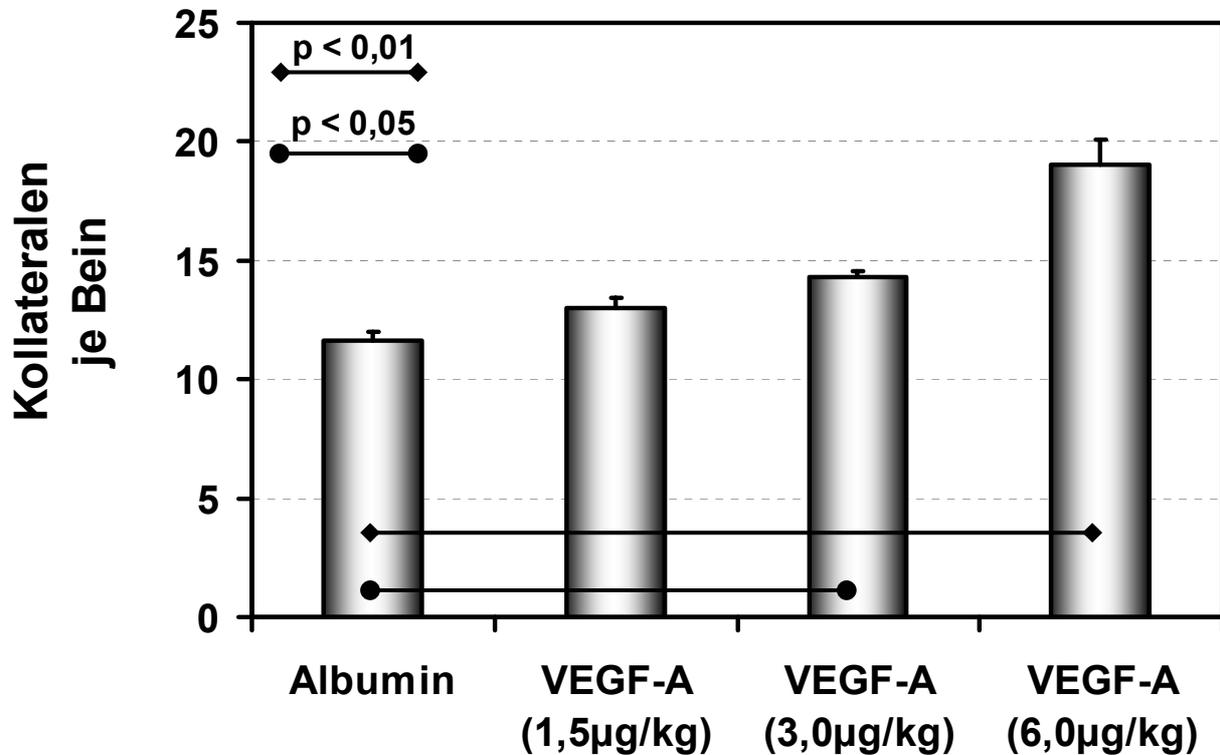


Abbildung 43: Kollateralenzahl je Hintergliedmaße nach einwöchiger lokaler Infusion von VEGF-A [1,5 μg ($n=6$) oder 3,0 μg ($n=3$) oder 6,0 μg ($n=3$)/kg KM/7d] im Vergleich zur Albuminkontrolle ($n=8$). Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihren Standardfehlern (SEM).

2.2.3. Kollateralenzahl nach selektiver Stimulierung des VEGFR-1

Die Infusion von PlGF-2 bewirkte bei einer Dosierung von 1,5 μg PlGF-2/kg KM/7d eine Zunahme der Kollateralgefäße gegenüber der Kontrolle auf $16 \pm 0,8$ je Hinterbein ($p < 0,05$). Die Verdoppelung der Dosis auf 3,0 μg PlGF-2/kg KM/7d konnte die Anzahl der Kollateralgefäße nicht weiter steigern (Abb. 44). Mit $16,7 \pm 0,4$ angiographisch sichtbaren Kollateralen je Hinterbein war ihre Anzahl nicht signifikant erhöht gegenüber der niedrigeren Dosis PlGF-2.

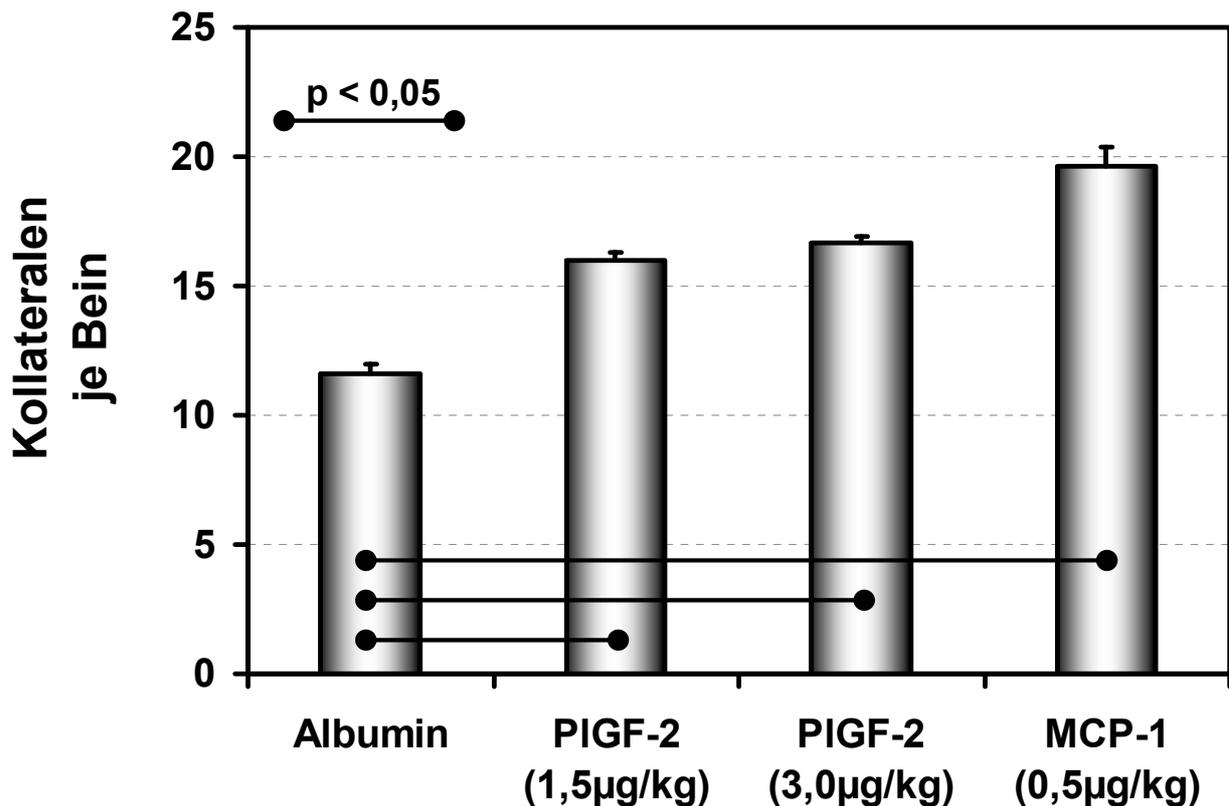


Abbildung 44: Kollateralenzahl je Hintergliedmaße nach einwöchiger lokaler Infusion von PIGF-2 [1,5 µg (n=6) oder 3,0 µg (n=4)/kg KM/7d] oder MCP-1 (1,5 µg/kg; n=6) im Vergleich zur Albuminkontrolle (n=8). Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihren Standardfehlern (SEM).

2.2.4. Kollateralenzahl nach selektiver Aktivierung des VEGFR-2

Die endotheliale Aktivierung über den VEGFR-2 mittels lokaler Infusion von 1,5 µg VEGF-E/kg KM/7d (n=4) bewirkte das Wachstum von 13±0,7 angiographisch sichtbaren Kollateralen je Hinterbein (Abb. 45B). Damit kam es zu keiner Zunahme der Kollateralenzahl gegenüber der Kontrolle (11,6±0,4).

2.2.5. Kollateralenzahl nach kombinierter Aktivierung des VEGFR-1/-2

Die zusätzliche Gabe von 1,5 µg PIGF-2/kg KM/7d (n=4) bewirkte eine Zunahme der Anzahl an Kollateralgefäßen. Mit 14,3±0,8 Kollateralen je Hinterbein lagen die Werte jedoch unter denen nach alleiniger Stimulierung des VEGFR-1. Die dazu durchgeführte Infusion von 3,0 µg PIGF-2/kg KM/7d (n=4) erreichte das Wachstum von 16,7±0,6 Kollateralen je Hinterbein. Zusätzlich hatte die Kombination sogar ein geringeres

Kollateralenwachstum zur Folge als die alleinige Gabe von 1,5 μg PlGF-2/kg KM/7d (n=6; Abb. 45).

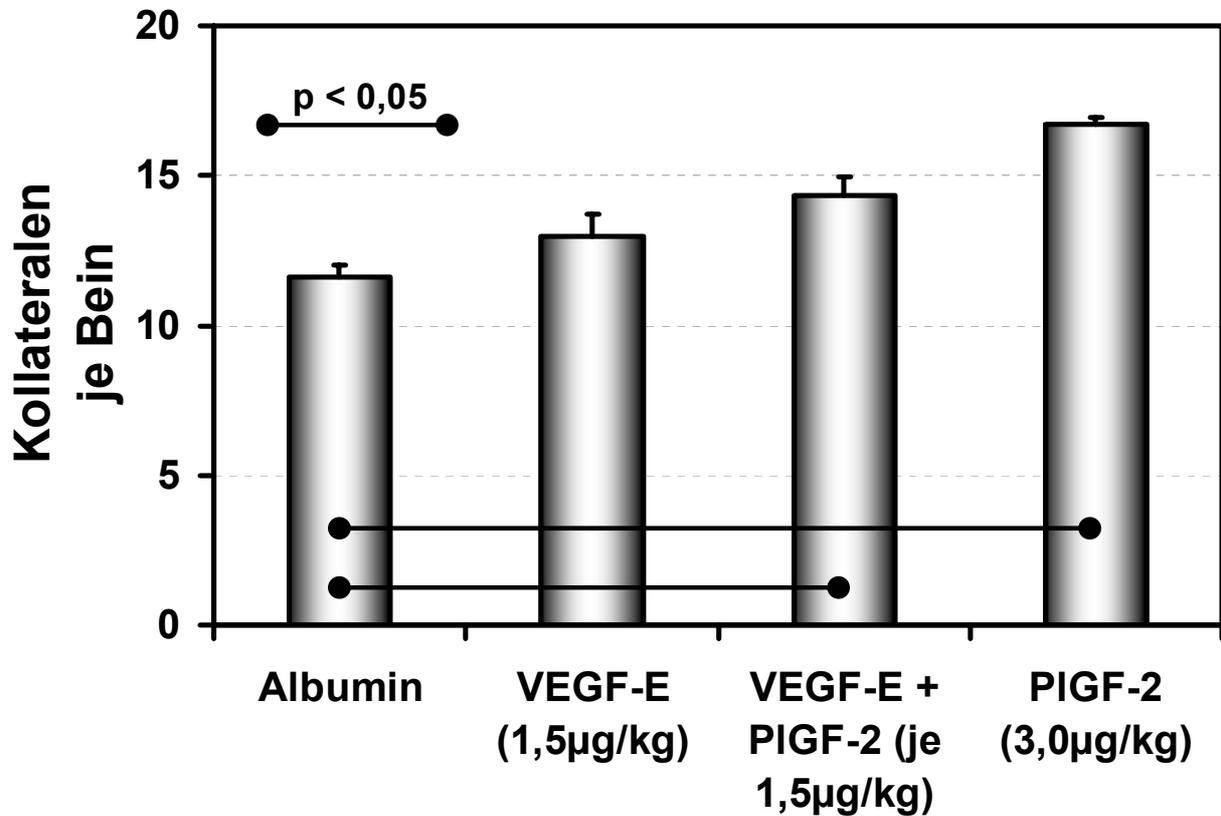


Abbildung 45: Kollateralenzahl je Hintergliedmaße nach einwöchiger lokaler Infusion von VEGF-E (1,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KM/7d; n=4), PlGF-2 (3,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KM/7d; n=4) alleine oder in Kombination (jeweils 1,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KM/7d; n=4) im Vergleich zur Albuminkontrolle (n=8). Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihren Standardfehlern (SEM).

2.3. Kollateralindex

Für jede Gruppe wurde ein Kollateralindex erstellt, welcher den Durchmesser der Kollateralgefäße miteinbezog. Dafür wurden die Kollateralgefäße in fünf Gruppen eingeteilt. Die Gefäße von 30 bis 100 μm Durchmesser wurden mit 1, jene von 100 bis 300 μm Durchmesser mit 4, die der Gruppe von 300 bis 400 μm mit 9, jene der Gruppe von 400 bis 600 μm mit 16 und die der Gruppe von über 600 μm mit 36 multipliziert. Die Summe der Produkte eines angiographisch ausgezählten Hinterbeines stellte dessen Kollateralindex dar.

2.3.1. Kollateralindex nach Ligatur der Femoralarterie

Nach einer Woche lokaler Infusion von Albuminlösung (Kontrolle; n=8) ergab die qualitative Analyse des Kollateralwachstums $11,6 \pm 0,5$ Kollateralgefäße mit einem durchschnittlichen Durchmesser von $200 \mu\text{m}$, was wie aus Abbildung 46 ersichtlich einem Kollateralindex von $66,7 \pm 2,5$ entsprach. Die Angiographien der unligierten Beine dagegen bekamen aufgrund der geringen Anzahl an Kollateralarterien, sowie deren minimalen Durchmesser einen Kollateralindex von $5 \pm 0,5$ je Hintergliedmaße zugeordnet.

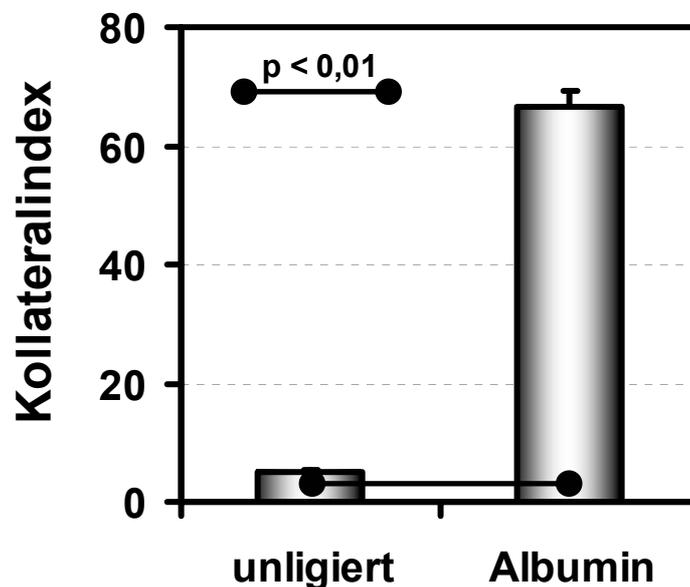


Abbildung 46: Kollateralindex je Hintergliedmaße nach einwöchiger Ligatur und lokaler Infusion von Albuminlösung (n=8) im Vergleich zur unligierten Hintergliedmaße (n=4). Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihren Standardfehlern (SEM).

2.3.2. Kollateralindex nach Infusion von VEGF-A

Wie in Abb. 39 B zu sehen, kam es nach Infusion von $1,5 \mu\text{g VEGF-A/kg KM/7d}$ (n=6) zwar zu einer geringfügigen Zunahme der Zahl der Gefäße aber zu keiner Zunahme des Kollateraldurchmessers. Somit war mit $74,0 \pm 4,5$ eine Erhöhung des Kollateralindex im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht möglich. Erst die Dosisverdoppelung und -vervierfachung erbrachte einen statistisch signifikanten Anstieg des Kollateralindex durch einen starken Zuwachs von Kollateralen mit geringem Durchmesser. So wurde

bei der Gruppe, die mit $3,0 \mu\text{g VEGF-A/kg KM/7d}$ ($n=3$) behandelt wurde, ein Kollateralindex von $85 \pm 1,8$ und bei $6,0 \mu\text{g VEGF-A/kg KM/7d}$ ($n=3$) von $116,7 \pm 12,9$ ($p < 0,05$; Abb. 47) ermittelt.

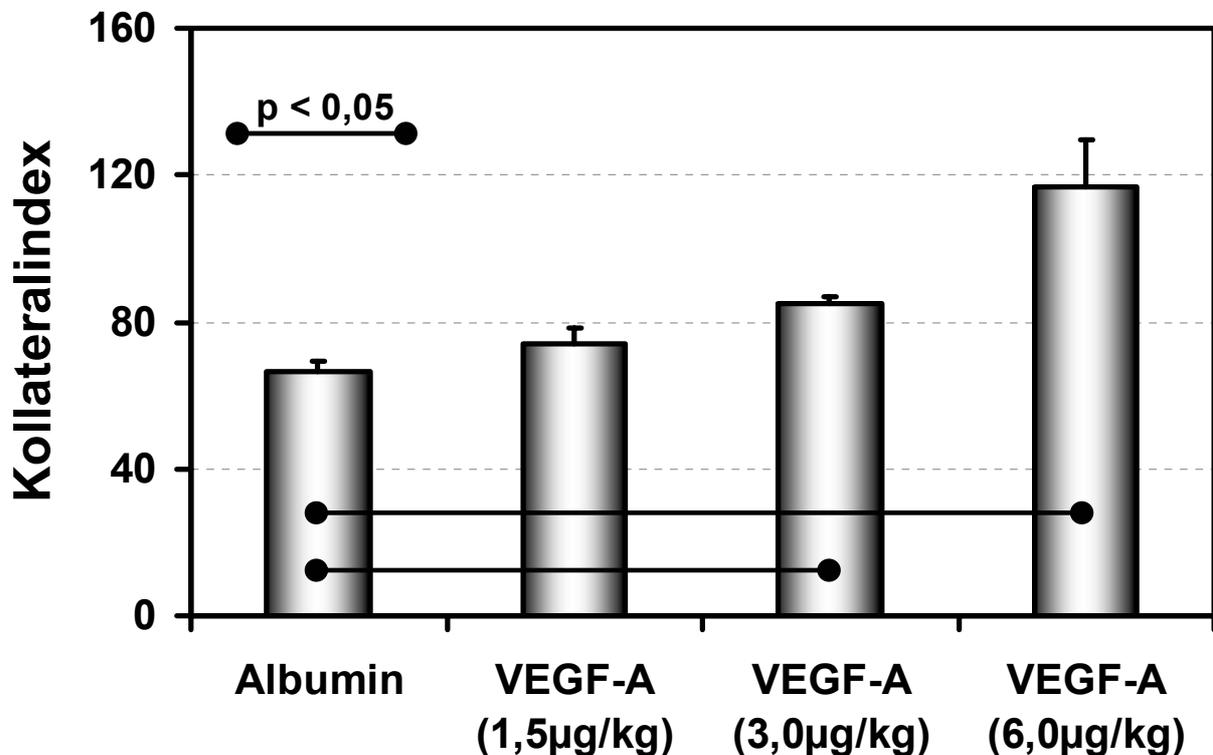


Abbildung 47: Kollateralindex errechnet anhand der Angiographien nach einwöchiger lokaler Infusion von VEGF-A [$1,5 \mu\text{g}$ ($n=6$) oder $3,0 \mu\text{g}$ ($n=3$) oder $6,0 \mu\text{g}$ ($n=3$)/kg KM/7d] im Vergleich zur Albuminkontrolle ($n=8$). Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihren Standardfehlern (SEM).

2.3.2. Kollateralindex nach selektiver Stimulierung des VEGFR-1

Die ausschließliche Stimulierung des VEGFR-1 mittels PlGF-2 bewirkte sowohl bei $1,5 \mu\text{g/kg}$ ($n=6$) als auch bei $3,0 \mu\text{g/kg KM/7}$ ($n=4$) ein markantes Wachstum der Kollateralgefäße. Die Anzahl von Kollateralen mit einem Durchmesser von $300 \mu\text{m}$ nahm zu. Zudem waren einige Kollateralen um $400 \mu\text{m}$ Durchmesser vorhanden. Infolge der deutlich vergrößerten Durchmesser der Kollateralgefäße wurden für die jeweiligen Dosierungen Kollateralindices von $105,2 \pm 5,7$ bzw. $118,4 \pm 7,2$ ($p < 0,05$; Abb. 48) berechnet.

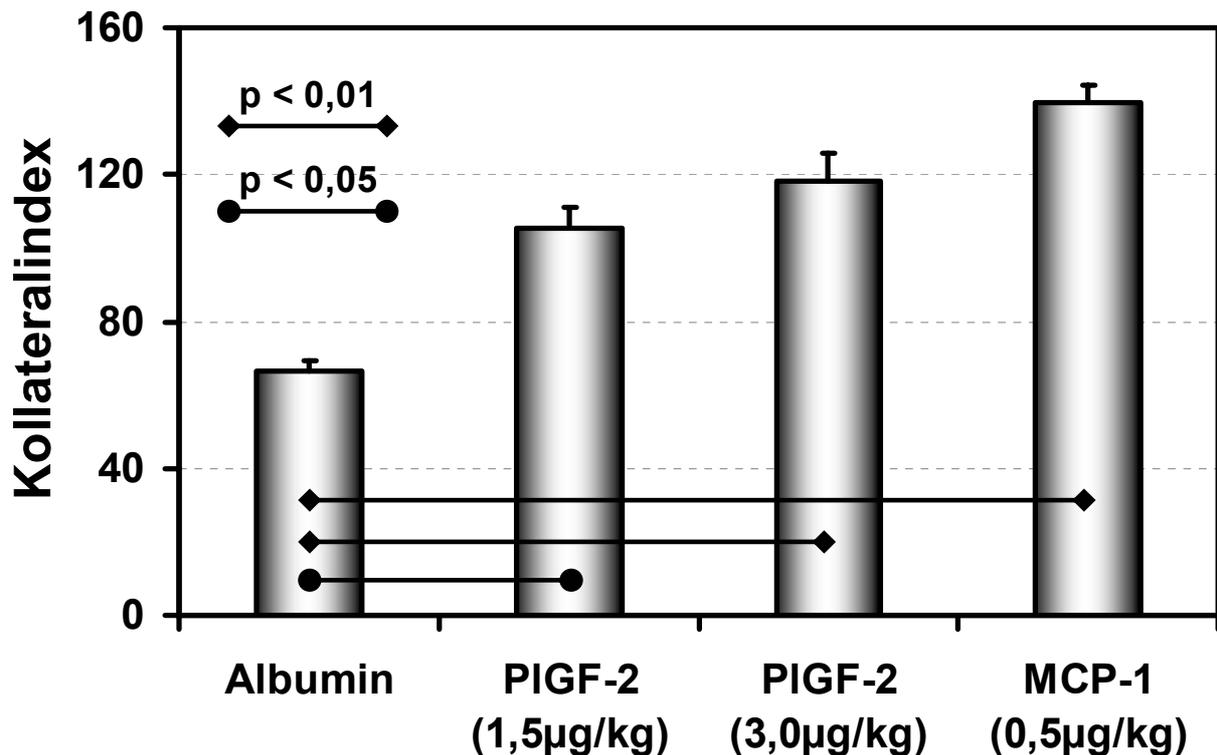


Abbildung 48: Kollateralindex je Hintergliedmaße nach einwöchiger lokaler Infusion von PlGF-2 [1,5 µg (n=6) oder 3,0 µg (n=4)/kg KM/7d] oder MCP-1 (1,5 µg/kg; n=6) im Vergleich zur Albuminkontrolle (n=8). Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihren Standardfehlern (SEM).

2.3.3. Kollateralindex nach selektiver Aktivierung des VEGFR-2

Die Infusion von 1,5 µg/kg VEGF-E (n=4) erzielte 13±0,7 Kollateralen je Hinterbein, welche überwiegend unter 200 µm Durchmesser waren. Aufgrund der nahezu unveränderten Anzahl und recht geringen Durchmessern der Gefäße konnte der Kollateralindex mit 72,8±2,7 keine signifikante Verbesserung gegenüber der Kontrolle mit 66,7±2,5 aufweisen (Abb. 49).

2.3.4. Kollateralindex nach kombinierter Aktivierung des VEGFR-1/-2

Die additive Gabe von 1,5 µg PlGF-2/kg KM/7d (n=4) bewirkte eine Zunahme der Kollateraldurchmesser. Da jedoch die Anzahl der Kollateralgefäße mit 14,3±0,6 nur geringfügig gesteigert werden konnte, erreichte diese Kombination mit 97,7±5,4 nicht den Kollateralindex von 118,4±5,1 mit allein gegebenem 3,0 µg PlGF-2/kg KM/7d (Abb. 49). Diese selektive Stimulierung des VEGFR-1 stimulierte das Wachstum vieler Kollateralen von größerem Durchmesser.

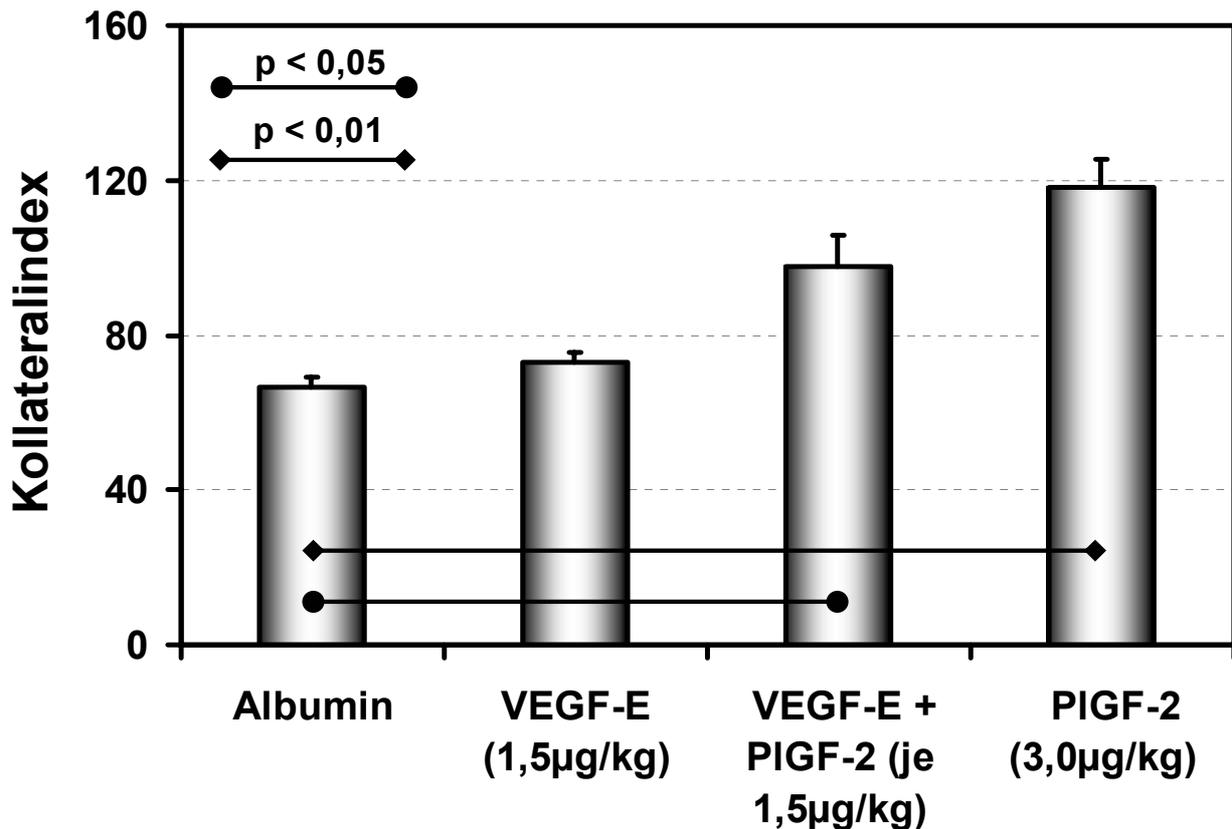


Abbildung 49: Kollateralindex je Hintergliedmaße nach einwöchiger lokaler Infusion von VEGF-E (1,5 µg/kg KM/7d; n=4), PlGF-2 (3,0 µg/kg KM/7d; n=4) alleine oder in Kombination (jeweils 1,5 µg/kg KM/7d; n=4) im Vergleich zur Albuminkontrolle (n=8). Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihren Standardfehlern (SEM).

2.4. Angiographischer Gruppenvergleich

Parallel zur hämodynamischen Auswertung erschien es nach getrennter Auswertung der Ergebnisse der einzelnen Gruppen sinnvoll, den Vergleich untereinander zu führen. Abbildung 50 stellt die Ergebnisse der einzelnen Versuchsgruppen gegeneinander auf und weist auf die unterschiedliche Einflußnahme des VEGFR-1/-2 im Rahmen des Kollateralwachstums hin.

Die Gruppe des monozytären Chemoattraktanz MCP-1 (n=6) wies bei weitem die höchste Anzahl an Kollateralgefäßen auf (19,8±0,7 je Hinterbein). Annähernd vergleichbar waren die Ergebnisse nach selektiver Stimulierung des VEGFR-1 mittels 1,5 µg oder 3,0 µg PlGF-2/kg KM/7d (n=6; n=4) oder nach gleichzeitiger Aktivierung des VEGFR-1/-2 durch 6,0 µg VEGF/kg KM/7d (n=3). Diese zehnfach höhere Dosis VEGF erhöhte die Anzahl an Kollateralgefäßen deutlich auf 19±0,6 je Hinterbein. Im Gegensatz zu MCP-1 und PlGF-2 wiesen die Tiere nach Gabe von VEGF angiographisch jedoch nur Kollateralen von kleinsten Durchmessern auf. Die Zunahme von Gefäßen

unter 200 μg Durchmesser trug nicht zu einer mit PlGF-2 vergleichbaren Erhöhung des Kollateralindex bei.

Die selektive Stimulierung des rein endothelialen VEGFR-2 mittels 1,5 μg VEGF-E/kg KM/7d ($n=4$) bewirkte angiographisch kein Wachstum der Kollateralen. Die kombinierte Stimulierung des endothelialen VEGFR-2 sowie des monozytären VEGFR-1 mittels einer Kombination von 1,5 μg VEGF-E/kg KM/7d mit 1,5 μg PlGF-2/kg KM/7d ($n=4$) bewirkte eine geringe Erhöhung des Kollateralwachstums. Da angiographisch nur der Durchmesser einiger Gefäße etwas vergrößert war, erreichte die Kombination im Kollateralindex bei weitem nicht die Werte nach Gabe von 3,0 μg PlGF-2/kg KM/7d ($97,7 \pm 5,4$ vs. $118,4 \pm 7,2$; $n=4$). Sie lagen sogar noch etwas unter dem Wert nach alleiniger Gabe von 1,5 μg PlGF-2/kg KM/7d ($105,2 \pm 5,7$; $n=6$).

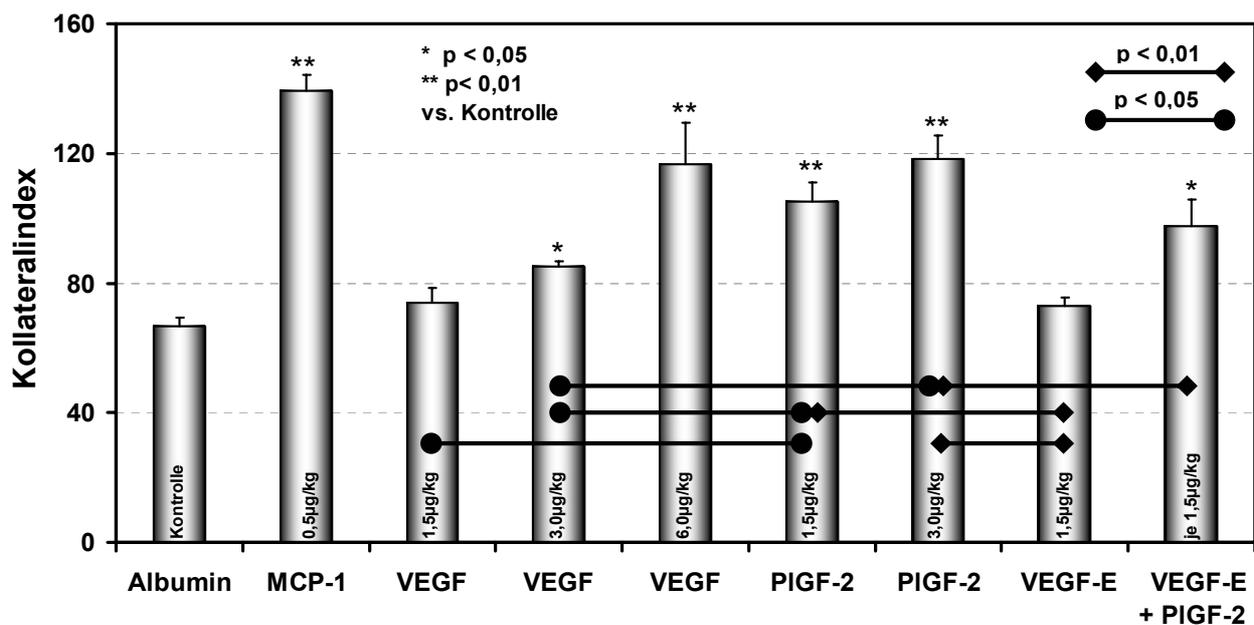


Abbildung 50: Kollateralindices nach einwöchiger Infusion von Albumin alleine oder mit darin gelöstem MCP-1 (0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$; $n=6$), VEGF-A [1,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($n=6$) oder 3,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($n=3$) oder 6,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($n=3$)], VEGF-E (1,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$; $n=4$), PlGF-2 (1,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($n=6$) oder 3,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($n=4$)] alleine oder in Kombination mit VEGF-E (jeweils 1,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$; $n=4$). Dargestellt sind die Mittelwerte mit ihren Standardfehlern (SEM).

3. Histologische Quantifizierung perivaskulärer mononukleärer Zellen

Die Invasion von Monozyten wurde nach Behandlung mit PlGF-2 bzw. Kontrolle histologisch untersucht. Ziel war es nachzuweisen, ob das mit PlGF-2 gesteigerte Kollateralwachstum auf einer vermehrten Beteiligung von Monozyten an der Arteriogenese beruht. Da in Vorversuchen festgestellt wurde, daß die Zahl von detektierbaren Monozyten/Makrophagen im Kollateral-nahen Gewebe zu einem Zeitpunkt von 72 h nach Okklusion maximal war, wurde für die zu testenden Gruppen dieser Zeitraum beibehalten. Die Analyse erfolgte an perfusionsfixierten Gewebsschnitten. Von dem Kollateralen-führenden M. vastus intermedius wurden je Hintergliedmaße sechs Gewebeproben entnommen und zur Kryoprotektion mit Saccharose inkubiert. In den nach Probenaufblocken erstellten Gefrierschnitten wurden die perivaskulären mononukleären Zellen anhand ihrer endogenen Galaktosidaseaktivität bestimmt, wobei es bei vorhandener Galactosidaseaktivität durch Umsatz des Substrates (X-Gal) zur Färbung der Monozyten/Makrophagen kam. Da im Skelettmuskel im Vergleich zu Leber und Lunge sehr viel weniger Gewebsmakrophagen vorliegen, kann man davon ausgehen, daß nahezu alle X-Gal gefärbten mononukleären Zellen transmigrierte Monozyten darstellen.

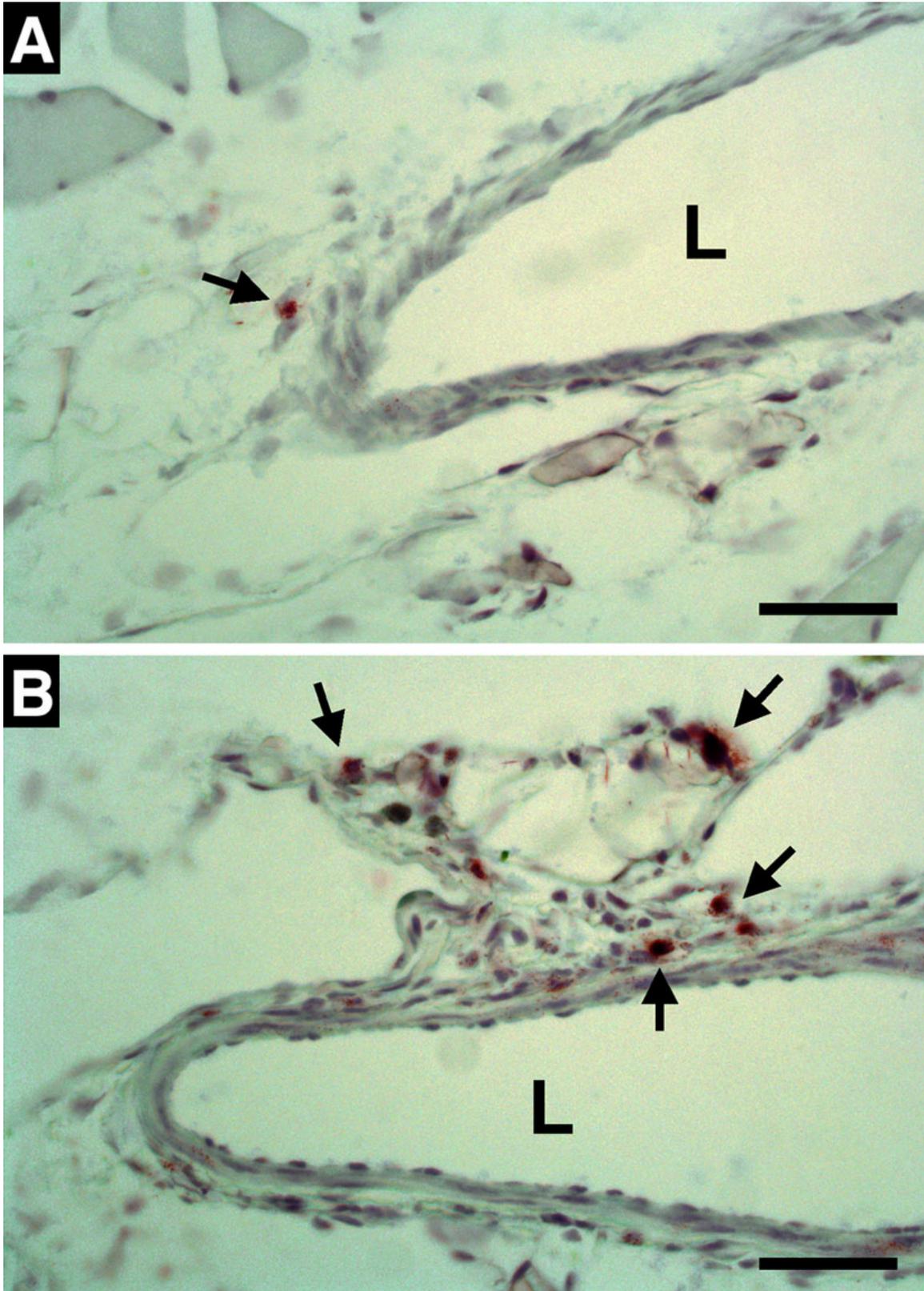


Abbildung 51: Mikroskopische Aufnahme von Gefrierschnitten des *M. vastus intermedius* der Kaninchenhintergliedmaße nach 72 h Infusion von Albumin (A) oder darin gelösten $1,5 \mu\text{g}/\text{kg}$ KM PIGF-2 (B). Die Pfeile markieren X-Gal-positive mononukleäre Zellen. Diese liegen perivaskulär um die Kollateralen (L). Die Skala entspricht $100 \mu\text{m}$.

In Abbildung 51 sind die Gefrierschnitte nach Infusion von 1,5 µg/kg KM/7d PlGF-2 oder Albumin (Kontrolle) über 72 h dargestellt. Die je mikroskopisch ausgezählten mononukleären Zellen betragen in der Kontrollgruppe $16,5 \pm 7,0$ ($n=4$). Die Infusion von PlGF-2 ($n=4$) erhöhte die Zahl der aktivierten, perivaskulären mononukleären Zellen um das Vierfache auf $62 \pm 5,8$ ($p < 0,001$; Abb. 52).

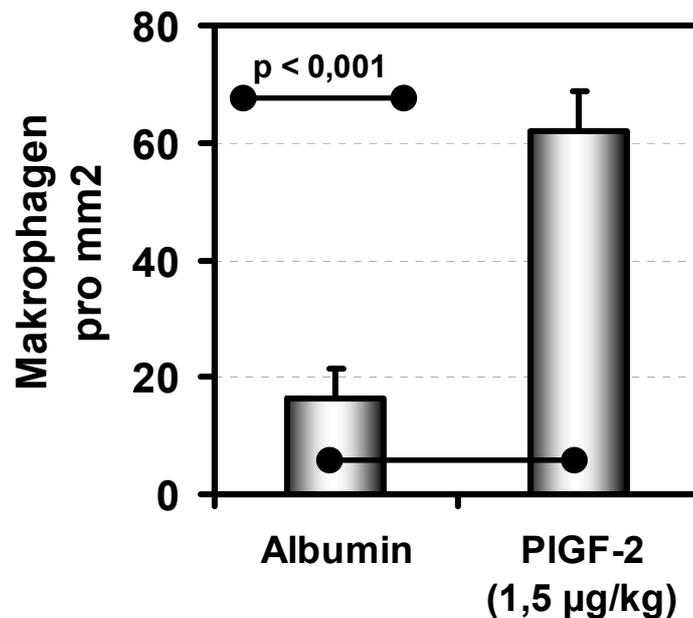


Abbildung 52: Anzahl perivaskulärer mononukleärer Zellen je Flächeneinheit in sechs Schnitten des *M. vastus intermedius* nach 72 h lokaler Infusion von 1,5 µg PlGF-2/kg KM/7d ($n=4$) im Vergleich zur alleinigen Applikation von Albuminlösung 0,1 % (Kontrolle; $n=4$). Dargestellt sind die Mittelwerte je Hintergliedmaße mit ihren Standardfehlern (SEM). Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ nach student's *t*-test galt als signifikant.

V. DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Dissertation war es zu untersuchen, welchen Anteil endothelial und monozytär mediierte Prozesse in der frühen Phase der Arteriogenese, dem Wachstum von Kollateralgefäßen, einnehmen. Dazu wurde ein hämodynamisches Modell zur Quantifizierung des Wachstums von Kollateralen im ischämischen Hinterlauf des Kaninchens etabliert. Um den selektiven Einfluß von Endothel und Monozyten auf die Arteriogenese zu differenzieren, wurden mehrere Vertreter aus der Familie des Gefäßwachstumsfaktors „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) eingesetzt.

Anregung für diese Studie lieferte das negative Abschneiden des VEGF in der VIVA-Studie, der einzigen bis dato publizierten klinischen Phase II Studie für Gefäßwachstumsfaktoren¹⁴⁹. Dies kontrastierte stark zu den positiven Ergebnissen vieler tierexperimenteller Studien¹⁵⁰.

VEGF, ein potentes Mitogen für Endothelzellen und ein starker Aktivator von Monozyten *in vitro*, kann durch seine vielseitige Wirkungsweise *in vivo* auch therapeutisch unerwünschte Mechanismen aktivieren. Zwar wurde in vielen Studien seine angiogene Eigenschaft genutzt, doch gibt es auch eine zunehmende Anzahl an Veröffentlichungen, welche die gefährlichen Nebenwirkungen von VEGF als Therapeutikum offenbaren. So wurden nach klinischem Gentransfer von VEGF in 34 % der Patienten eine Ödembildung an der Untergliedmaße diagnostiziert¹⁵¹, was der Eigenschaft von VEGF als Permeabilitätsfaktor von Gefäßen zuzuschreiben ist¹¹⁴. Auch kann VEGF die Verschlimmerung bereits ausgeprägter Krankheiten bewirken. Bei systemischer Behandlung am Patienten besteht die Gefahr der Hämangiombildung, Retina- oder gesteigerten arteriosklerotischen Plaque- und Tumorstromavaskularisierung¹⁵²⁻¹⁵⁴. Um daher zukünftige therapeutische Einsätze zu optimieren und ein Maximum an Sicherheit zu erlangen, bedürfen pro-angiogene und pro-arteriogene Therapien noch weiterer Grundlagenforschung¹⁵⁵.

Die Ergebnisse dieser Studie belegen, daß VEGF nur in sehr hohen Dosen, bei denen gleichzeitig starke Nebenwirkungen auftreten können¹⁵⁶, einen stimulatorischen Effekt auf die Kollateralenausbildung hat. Durch niedrigdosiertes VEGF scheint nur die Bildung von Kollateralen mit geringem Durchmesser ausgelöst zu werden. Außerdem ergaben sich Hinweise, daß eine Stimulierung des Endothels über den VEGFR-2 sogar kontraproduktiv für das Kollateralwachstum sein könnte. Dagegen konnte erstmals nachgewiesen werden, daß über die selektive Aktivierung des VEGFR-1, dem einzigen auf Monozyten exprimierten VEGF-Rezeptor, durch PlGF-2 eine starke arteriogene

Wirkung vermittelt wird. Zudem geht diese mit einer gesteigerten Einwanderung von Monozyten in die Kollateralgefäßwände einher.

1. Tiermodell

1.1. Chronisches Ischämiemodell

Im Rahmen dieser Dissertation wurde das chronische Ischämiemodell am Hinterlauf des Kaninchens verwendet. Hierzu wurde bei den Versuchstieren die den Hinterlauf mit Blut versorgende A. femoralis über einen Zeitraum von einer Woche okkludiert. Folge dieses Eingriffes waren eine Perfusionsminderung mit leichter Hypoxie im Unterschenkel⁸⁹ und eine vermehrte Durchblutung der präexistierenden Kollateralarteriolen im Oberschenkel⁸⁴. Diese Anastomosen leiteten zunächst in noch geringem Umfang das Blut nach Ligatur der Femoralarterie um die Okklusionsstelle herum zum Unterschenkel.

Dieses Modell erfüllte somit die Bedingungen für die Initiation der beiden postnatalen Gefäßwachstumsformen, der Arteriogenese und gleichzeitig etwas eingeschränkt auch der Angiogenese: Durch leichte Hypoxie im Unterschenkel, welche die Expression von Angiogenesefaktoren induzierte, wurde das Wachstum von Kapillargefäßen angeregt¹¹. Im normoxischen Oberschenkel dagegen wurden arterio-arteriolare Anastomosen zu Kollateralarterien umgebaut; die durch Anstieg des Druckgradienten vom zentralen zum peripheren Blutdruck (98:86 auf 98:12 mm Hg) bedingte Zunahme der Schubspannung regte die präexistierenden Arteriolen zum Wachstum an. Die Zunahme der hierbei endogen freigesetzten Wachstumsfaktoren ist gering, da vornehmlich deren Rezeptoren heraufreguliert werden. Daher ist es möglich durch exogene Zufuhr von aktiven Liganden für die Rezeptoren deren stimulierenden Einfluß auf das Kollateralwachstum zu testen.

Beide Prozesse sind demnach nicht nur systematisch voneinander zu unterscheiden, sondern können auch an getrennten Orten im gleichen Organismus ablaufen. Da die Angiogenese funktionell der Arteriogenese nachgeschaltet ist, limitiert das Kollateralwachstum die Organ- bzw. Gewebsdurchblutung. Somit erlischt bei guter Ausbildung von Kollateralen der hypoxische Stimulus im stromabwärts gelegenen Gebiet, d.h. eine indirekte Hemmung der Angiogenese durch die fortschreitende Arteriogenese scheint theoretisch möglich¹⁵⁰.

Für die Aufrechterhaltung der Versorgung von Geweben wie z.B. Herz und Gehirn nach Gefäßverengung ist das Wachstum bereits präexistierender Gefäße bei weitem der effektivste Prozeß. Über diese Arteriolen kann zunächst schnell eine Minimalversorgung

und durch anschließendes Auswachsen dieser Gefäße zu Kollateralarterien auch langfristig die gesamte Versorgung des Gewebes übernommen werden. Zudem können beim endgültigen Totalverschluß Kollateralarterien rekrutiert werden. Hierbei ist es wichtig darauf hinzuweisen, daß nur das Wachstum von Arterien den Transport großer Mengen an Blut ermöglicht. Eine erhöhte Anzahl von Kapillaren als Produkt der Angiogenese dagegen ist nicht in der Lage, die Funktion des verengten Ausgangsgefäßes zu übernehmen. Zudem kann ein Kapillarnetzwerk auf Perfusionsänderungen nicht ausreichend reagieren. Die dem Bedarf angepaßte Perfusion von Geweben und Organen ist auf das Wachstum großer Arterien angewiesen. Diese weisen ihrem Durchmesser entsprechend einen geringeren Flußwiderstand auf als viele kleine Kapillaren und können mehr Blutvolumen führen. Zudem lassen sie sich infolge ihrer muskulösen Media dem Perfusionsbedarf nach Gefäßverschluß anpassen, weshalb sie auch besser pharmakologisch zu beeinflussen sind.

Das vorliegende Tiermodell war geeignet zur Bestimmung des arteriogenen Einflusses der unterschiedlichen Wachstumsfaktoren, welche lokal mittels osmotischer Minipumpe in das Kollateralgebiet infundiert werden konnten. Nach einer Woche Versuchsdauer wurden die zwischen den Aa. profunda femoris et genus descendens und zwischen den Aa. circumflexa femoris et femoris caudalis anastomosierenden Kollateralgefäße angiographisch ausgewertet. Neben ihrer Anzahl war auch der Gefäßdurchmesser ein Maß für das Kollateralwachstum. Den funktionell entscheidenden Parameter stellte der kollaterale Blutfluß dar. Er gab den Wert wieder, welcher für die Versorgung der distalen Gliedmaße absolut zur Verfügung stand. Mit ihm konnte die prozentuale Wiederherstellung des Blutflusses zum Unterlauf vor Okklusion der Femoralarterie ermittelt werden.

1.2. Hämodynamikmodell zur Bestimmung kollateraler Konduktanz

Zu Beginn dieser Dissertation stand die Etablierung einer neuen hämodynamischen Meßmethode an. Zweck war die Quantifizierung des kollateralen Gefäßwachstums im Hinterlauf des lebenden Kaninchens. Die physiologische Größe der Hämodynamik ist hierbei die kollaterale Konduktanz. Diese setzt sich aus dem Kollateralfluß und der Druckdifferenz entlang der Kollateralgefäße zusammen.

Mittels Ultraschall-Meßsonde sollte der Blutfluß in der dem Kollateralgebiet vorgeschalteten Arterie perivaskulär gemessen werden. Dieser entsprach dem Kollateralfluß. Der invasiv gemessene Blutdruck in der A. saphena war dem Perfusionsdruck des Kollateralgebietes gleichzusetzen.

1.2.1. Grundlegendes

Der Blutfluß in der A iliaca externa betrug am unligierten Kaninchen in Ruhe durchschnittlich $22 \pm 0,7$ ml/min. Da die Wiederherstellung dieses Ausgangswertes in wenigen Tagen nach Ligatur der Femoralarterie erfolgte, stellte dieser Ruhewert keinen geeigneten hämodynamischen Parameter zur Beurteilung des Kollaterarterienwachstums dar. Schon nach einer Woche Femoralisligatur betrug der Blutfluß in der A. iliaca externa $18,3 \pm 0,6$ ml/min (n=8) und lag somit nur geringfügig unter dem Ausgangswert der unligierten Gliedmaße.

Der periphere Blutdruck im unoperierten Tier war in Ruhe mit $86 \pm 2,9$ mm Hg nur moderat niedriger als der zentral gemessene Blutdruck von $98 \pm 4,0$ mm Hg. Nach Ligatur sank er -bei unverändertem zentralen Druck- akut auf Werte um 10-12 mm Hg ab, erholte sich aber innerhalb weniger Stunden bereits auf Werte von etwa 20 mm Hg. Sieben Tage nach Femoralisligatur betrug der periphere Blutdruck um 36 ± 1 mm Hg. Der Ausgangswert war infolge Kollateralwachstums somit bereits zu einem Drittel wiederhergestellt.

Der frühe Anstieg des Drucks in den ersten Tagen nach Akutligatur beruht aber nicht auf einem Wachstumsprozeß, sondern auf einer über das Funktionelle hinausgehenden Vasodilatation (Gefügedilatation)¹⁴: Nach Femoralisligatur werden somit die Gefäßmuskeln stromabwärts weitgestellt, um die akut ischämische Untergliedmaße ausreichend mit Blut zu versorgen. Durch diese endogene Vasodilatation erholt sich der Blutfluß in der A. iliaca externa teilweise bereits nach einigen Stunden. Da die Kollateralen jedoch noch recht klein sind, ist der periphere Blutdruck zunächst sehr niedrig. Das am 3. Tag nach Ligatur einsetzende Wachstum der Kollateralarterien ermöglicht dann die Autoregulation der Durchblutung, wodurch es zu einem weiteren Anstieg des peripheren Druckes kommt. Vereinfachend kann man sagen, daß der postokklusive Druckanstieg unter Ruhebedingungen gut mit dem Kollateralwachstum korreliert. Erst durch die pharmakologisch erzeugte Vasodilatation wird ersichtlich, daß die Kollateralgefäße einen messbaren Widerstandswert haben: Die Erhöhung der peripheren Durchblutung führt zur peripheren Drucksenkung.

Um den Prozeß der schnellen Adaptation abzuwenden, greifen einige Gruppen auf ein Modell der Totalexzision der Femoralarterie inklusive Seitenästen und komplementären Venen zurück¹³⁵. Hierbei wird die distale Gliedmaße nur durch die wenigen der A. iliaca interna entspringenden Kollateralarterien versorgt. Dieses Modell ist jedoch aufgrund der operativen Invasivität mit der Ausbildung von Gewebsverlust, Gangrän und Nekrose verbunden. Wegen des zu großen Einflusses inflammatorischer Prozesse und aus Tierschutz-Gründen wurde dieses maximal invasive Modell nicht angewandt.

Als Vergleichsgröße des Kollateralwachstums wurde die maximale kollaterale Konduktanz herangezogen, welche nur bei maximalem Blutfluß bestimmt werden kann. In Ruhe wird nur wenig Blut benötigt, da dann der Sauerstoffbedarf des Gewebes gering ist. Durch sauerstoffzehrende Prozesse in der Peripherie mittels Training auf einem Laufband kann man den Blutfluß maximieren. Dies basiert auf der Hypoxie-induzierten Erschlaffung der präkapillären Sphinkteren, den Widerstandsgefäßen. Jedoch kann man die maximale Vasodilatation auch pharmakologisch mittels Vasodilantien induzieren. In unserem minimal-invasiven Ischämie-Modell wurde für jedes Versuchstier die maximale kollaterale Konduktanz in vollständiger Vasodilatation mit Adenosin bestimmt. Diese läßt sich aus maximalem Kollateralfluß und prä- und postokklusiver Blutdruck-Differenz berechnen¹¹ und ermöglicht Vergleiche zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Eine Überschätzung des Kollateralwachstums durch endogene Vasodilatation, z.B. über induzierte NO-Synthese¹⁵⁷, wird somit zudem verhindert.

Durch direkte Blutflußmessung am einzigen der Femoralarterie vorgeschalteten Gefäß, der A. iliaca externa, konnte der Totalfluß zum Kollateralgebiet, welcher der Kollateralperfusion entsprach, bestimmt werden. Infolge nutritiver Muskeldurchblutung kam es zu einer geringen Überschätzung des Kollateralflusses. Dieser Anteil am Blutfluß der proximalen Ursprungsarterie passierte nicht das gesamte Kollateralgebiet, sondern wechselte schon vorher in das venöse System über. Er stand damit nicht für die Versorgung der unteren Gliedmaße zur Verfügung. Da dies jedoch auch für die Kontrolle galt, war dieser Punkt nicht von Bedeutung bei der hämodynamischen Auswertung. Eine Unterschätzung infolge anderer vorgeschalteter, arterieller Abflüsse war jedoch durch die direkte Messung an der A. iliaca externa ausgeschlossen.

1.2.2. Vergleich mit bekannten Hämodynamikmodellen

Als Methode der Wahl zur hämodynamischen Quantifizierung der Arteriogenese wird international ein Mikrosphären-Perfusionsmodell verwendet¹³⁴. Bei diesem Modell kommt es durch nicht erfaßte Muskelpartien zu einer Unterschätzung des Kollateralflusses. Es werden nur einige Muskelpartien repräsentativ für die Gesamtheit der Muskulatur auf Mikrosphären analysiert. Diese Schätzmethode birgt ein hohes Risiko für Fehlmessungen, da nicht alle Muskelgruppen im gleichen Verhältnis durchblutet werden können. Der Hauptnachteil der Mikrosphärentechnik besteht darin, daß, sobald das Gewebe verdaut wird, keine Rückschlüsse mehr bezüglich der Probenorientierung gezogen werden können. Eine Auswertung mit Mikrosphären ist nur einmalig durchführbar und man kann erst post-mortal Werte der hämodynamischen Parameter in Erfahrung bringen. Somit birgt diese Auswertungs-

form ein Risiko für Fehlmessungen. In Folge von Probenverwechslung kann die Auswertung vollständig falsche Werte ergeben. Das Gesamtergebnis ist verfälscht. Jedoch gibt es keine Möglichkeit mehr dies zu überprüfen, da das Gewebe verdaut ist. Auch kann das Gewebe nach hämodynamischer Auswertung nicht weiter für morphologische Studien verwendet werden¹⁵⁸. Zudem handelt es sich nicht um ein echtes in vivo Modell, da eine externe Rollerpumpe die Funktion des Herzens übernimmt. Sie pumpt heterologes, mit Mikrosphären versehenes Spenderblut aus einem externen Kreislauf in die Kaninchenhinterbeine. Somit ist die Blutflußbestimmung nur noch an die Physiologie angelehnt, aber nicht mehr physiologisch im eigentlichen Sinne. Die maximale Vasodilatation wird durch die Gabe unphysiologisch hoher Mengen Adenosin herbeigeführt. Im normalen Kreislauf würde das Tier daran sterben. Da das Blut über eine Rollerpumpe jedoch mit beliebig hohem Druck perfundiert werden kann, spielte die Kreislafsituation des Versuchstieres keine Rolle. Dieses Mikrosphärenmodell ist unabhängig vom schlagenden Herzen, die mit ihm gewonnenen Erkenntnisse lassen sich nur bedingt auf die menschliche Kreislaufphysiologie anwenden.

Im Gegensatz hierzu wurde für diese Studie ein maximal an die Physiologie angelehntes Hämodynamikmodell etabliert. Da dem Herz die Funktion als Blutpumpe innebleibt, ist es ein echtes in vivo Modell. Die gemessene maximale kollaterale Konduktanz spiegelt einen physiologisch erreichbaren Wert wieder, welcher alleine durch die Infusion steigender Mengen von Adenosin im Rahmen einer Dosis-Wirkungskurve exakt gemessen werden kann. Diese hämodynamische Auswertung ist somit auf die Kreislaufphysiologie eines PAVK-Patienten entsprechend übertragbar.

Im hier etablierten Modell war das Erreichen der maximalen Vasodilatation wesentlich zur Bestimmung der maximalen kollateralen Konduktanz. Da das hierzu nötige Adenosin nicht wie im Mikrosphärenmodell einfach dem perfundierten Blut beigemischt werden konnte, mußte es minimal invasiv in die terminale Aorta infundiert werden. Die dazu ausgeführte Technik nach Barger bewirkte eine vernachlässigbar geringe Verlegung des Lumen durch das Einnähen eines Mikroinfusionskatheters¹⁴⁵.

Ein anderes verbreitet angewandtes, auf der intravaskulären Blutflußmessung basierendes Hämodynamikmodell im Kaninchen arbeitet mit einem in der A. carotis eingeführten und unter Röntgenkontrolle vorgeschobenen hauchdünnen Doppler-Draht, dem sogenannten FlowWire®¹³⁶. Nach der Bestimmung des Ruheflusses in der das Hinterbein versorgenden Hauptarterie wird die maximale Vasodilatation durch lokale Applikation von Adenosin über den zuvor für das Kontrastmittel verwendeten Katheter erreicht. Da aber die Blutflüsse beider Beine jeweils getrennt im Abstand einiger Minuten ermittelt werden, d.h. keine synchrone Messung vorliegt, kann es durch

Blutdruckschwankungen zu fehlerhaften Relationen kommen. Wenn der Blutfluß auf der nicht-okkludierten Seite erst als zweites gemessen wird, muß durch die vorausgegangene maximale Vasodilatation mit einem veränderten Blutdruck gerechnet werden. Hierdurch kann es zu Fehlbestimmungen des Blutflusses kommen. Zudem verlegt der Meßkatheter einen Teil des Lumens, so daß es bei kleineren Flüssen noch zu einer weiteren Abschwächung kommen kann. Die behandelte Seite wird somit überbewertet. Außerdem führen intravaskuläre Katheter zu Verwirbelung im Blutstrom. Da der FlowWire® zudem nur lokale Blutflüsse mißt, sind Fehlmessungen eigentlich unvermeidbar. Der mittels FlowWire® bestimmte Blutfluß entspricht demnach oft nicht dem wahren Totalfluß zum Kollateralgebiet.

Neben der intravaskulären Blutflußmessung ist auch die meist kombiniert durchgeführte nicht-invasive, periphere Blutdruckmessung mittels Doppler-Sonden kritisch zu sehen. Im Gegensatz zur invasiven Messung mittels Kanülierung einer peripheren Arterie wird bei diesem Verfahren der Blutfluß nicht permanent erfaßt. Für jede Messung muß eine Druckmanschette oberhalb der transkutan mit der Doppler-Sonde beschallten A. tibialis posterior maximal inflatiert werden. Der darauf beim Deflatieren angezeigte Manschettendruck, bei welchem das erste pulsatile Dopplerflußsignal empfangen wird, entspricht dem systolischen Blutdruck in der Arterie¹³⁷. Da jedoch keine einheitliche Definition besteht, wann das Dopplersignal stark genug ist, scheint dieses Verfahren stark subjektiven Einflüssen unterworfen. Zudem lassen die konisch zulaufenden Kaninchenunterschenkel die Druckmanschette beim Aufblasen nach distal rutschen, was den Kontakt der transkutan arbeitenden Doppler-Meßsonde mit dem Gefäß unterbindet. Die Amplitude erlischt.

Außerdem bietet diese Methode nicht die Möglichkeit, den Druck im Moment maximaler Vasodilatation zu bestimmen. Jedoch ist nur dann eine Relation zum maximalen Kollateralfluß möglich, bzw. zur Berechnung der maximalen kollateralen Konduktanz müssen alle Parameter in maximaler Vasodilatation bestimmt werden. Auch können narkosebedingte Blutdruckschwankungen während des Seitenwechsels beim kontralateralen Druckvergleich zu Verfälschungen der Druckrelation führen.

1.2.3. Einstellung einer maximalen Vasodilatation

Die für jedes Versuchstier erstellte Adenosin-Dosis-Wirkungskurve begann mit kontinuierlicher intraaortaler Infusion von isotoner Kochsalzlösung bei einer Pumprate von 1 ml/min. Nach einigen Minuten wurden übergangslos 30 µg Adenosin/kg/min für 4,5 Minuten und danach bis zur maximalen Vasodilatation jeweils für dieselbe Dauer 100, 300 und 600 µg Adenosin/kg/min infundiert. Die Wahl der Infusionsdauer einer jeden Dosis wurde in Abhängigkeit der Einstellung eines Gleichgewichtes für den Blutfluß auf die Adenosin-Konzentration gewählt¹⁴⁴. Nur die hämodynamischen Werte

am Ende einer jeden Konzentration wurden für die Erstellung der Dosis-Wirkungskurve herangezogen.

Hierbei stellte sich heraus, daß der Blutfluß sein Maximum individuell zwischen 300 und 600 μg Adenosin/kg/min i.a. hatte. Die peripheren Blutdrücke waren dementsprechend minimal und der zentrale Blutdruck sank auf Werte unter 60 mm Hg. In diesem Zustand war die maximale Vasodilatation erreicht. Für jedes Tier wurde die kollaterale Konduktanz in maximaler Vasodilatation bestimmt.

Die anfangs noch verwendete Dosis von 1000 μg Adenosin/kg/min wurde nach Etablierung des Modelles nicht mehr infundiert. Diese hohe Adenosin-Dosis wirkte bereits systemisch über kardiale Adenosinrezeptoren negativ inotrop und limitierte den Blutfluß.

Um einen Einfluß der Sauerstoffkonzentration auf die Vasodilatation auszuschließen, mußten die Blutgase (pO_2 , pCO_2) einschließlich pH-Wert des arteriellen Blutes bestimmt werden. Sodann konnten die Werte während der Beatmung über die Sauerstoffzufuhr im Normbereich gehalten werden.

1.2.4. Limitierung des Modells

Eine Limitierung in unserem Hämodynamikmodell bestand insofern, daß nur physiologische Blutvolumina und Drücke zur Verfügung standen. D.h. bei einem normalen Blutfluß in der terminalen Kaninchenaorta von 55 ml/min waren in den beiden externen Aa. iliaca jeweils in Ruhe etwa 20 ml/min meßbar. Die mit steigender Vasodilatation zunehmende Druckdifferenz entlang der Kollateralarterien ermöglichte größere Flußvolumina je Zeiteinheit. Da jedoch der Flußwiderstand in der unligierten Gliedmaße infolge großer konduktiver Arterien nicht sehr hoch war, konnten keine starken Druckgradienten durch Adenosingabe bewirkt werden. Demzufolge war der Blutfluß verhältnismäßig schwer zu steigern. Dennoch lag der Blutfluß mit lediglich einer Verdoppelung der Ruhewerte bei der maximalen Vasodilatation weit unter den erwarteten Werten. Da die Gefäße beidseitig unligiert waren, und schon bei geringen Dosen Adenosin die Blutflüsse ihre Maximalwerte von bis zu 40 ml/min aufwiesen, schien der Aortenfluß der limitierende Faktor zu sein. Dies läßt sich jedoch dadurch erklären, daß ein Kaninchen von 2,8 kg KM nur knapp 200 ml Blut besitzt und so der Blutfluß zu den Beinen nicht auf Werte über 100 ml/min steigt. Demnach kann bei beidseitiger Vasodilatation im unligierten Tier physiologisch nie eine kollaterale Konduktanz von über 350 ml/min/100mmHg gemessen werden. Hier wurde der Unterschied zum Mikrosphärenperfusionsmodell ersichtlich, bei welchem die Perfusionsdrücke mittels einer Rollerpumpe beliebig gesteigert werden konnten. Das Blutvolumen war hier durch vorausgegangene Entblutung von Spendertieren nahezu

unbegrenzt, somit aber nicht der normalen Kreislaufphysiologie entsprechend. Daher bietet das nun etablierte Hämodynamikmodell eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die menschliche Kreislaufphysiologie, was in Hinblick auf mögliche spätere klinische Studien mit den verwendeten Gefäßwachstumsfaktoren von Vorteil ist.

1.3. Angiographiemodell zur Ermittlung des Kollateralwachstums

1.3.1. Allgemeines

Die postmortal durchgeführten Angiographien wurden nach druckkontrollierter intraaortaler Infusion eines Bismuth-Kontrastmittels auf Gelatinebasis erstellt⁴⁸. Hierzu wurden die Kontrastmittel-perfundierten Hintergliedmaßen in einem Balteau-Apparat geröntgt¹¹. Alle der Klassifizierung nach Longland¹⁰ entsprechenden Kollateralarterien wurden je Gliedmaße ausgezählt. Zusätzlich wurden die Kollateralen anhand ihres Durchmessers in Kategorien eingeteilt und mit einem jeweils entsprechenden Faktor multipliziert. Die Summe der Einzelkategorien ergab einen Durchmesser-korrelierten Wert für das Wachstum der Kollateralarterien je Hinterlauf, den sogenannten Kollateralindex. Dieser Index ist als Arteriogenese-Parameter der Kollateralzahl überlegen, da er zusätzliche Information enthält. In ihn fließt die hämodynamisch entscheidende Größe des kollateralen Durchmessers ein, womit der Index eine Korrelation zum Blutfluß erfährt. Denn nach dem Gesetz von Hagen-Poiseuille nimmt der Blutfluß in einem Gefäß mit der vierten Potenz seines Durchmessers zu.

1.3.2. Vergleich mit bekannten Angiographiemodellen

Die oftmals angewandte intra vitam Angiographie wird durch intraarterielle Injektion von Nitroglycerin und unmittelbar nachfolgender Applikation von 5 ml Kontrastmittel proximal der einzigen zum Bein führenden Arterie durchgeführt. Hierzu muß ein transkutan eingebrachter Katheter mit der Spitze bis zur Injektionsstelle vorgeschoben werden. Für jede Auswertung werden Serienaufnahmen über 10 Sekunden angefertigt. Vorteil dieser Methode ist die mehrmalige Durchführbarkeit im Versuchszeitraum als Verlaufskontrolle. Jedoch besteht bei diesem Modell durch Vergleich zweier Aufnahmen unterschiedlicher Füllungsphase, also variierendem Zeitpunkt innerhalb der Serie, die Gefahr der Fehlinterpretation. Durch mögliche Variation des das Kontrastmittel transportierenden Blutflusses zum Injektionszeitpunkt kann es zudem zu Artefakten in der Auswertung kommen. Daher gaben wir der postmortalen Angiographie den Vorzug. Diese Variante birgt zwar den Nachteil der Unwiederholbarkeit, aber sie gewährleistet die Sicherheit vor Manipulation.

1.4. Anwendung humaner Proteine beim Kaninchen

Der Einsatz menschlicher Proteine beim Versuchstier kann Immunreaktionen gegen das Fremdeiweiß auslösen. Damit verbundene Entzündungsmechanismen können das Kollateralwachstum beeinflussen und somit die Aussagekraft von Tierversuchen beeinträchtigen. Daher besteht theoretisch durch eine mögliche mangelhafte Homologität der humanen mit den Kaninchen-eigenen Wachstums-faktoren ein Risiko für unerwünschte Immunreaktionen: Die Homologität der Testsubstanzen unter den Spezies ist entscheidend für die Rezeptoraktivierung. Rein in humanen Zellkulturen getestete Substanzen sind nicht glaubhaft spezifisch für die Rezeptoren im Kaninchen.

Es wurden bereits viele rekombinant hergestellte humane Wachstumsfaktoren beim Versuchstier eingesetzt. So wurden erfolgreich humanes VEGF-A¹³⁷, FGF-2¹⁵⁹ und humaner Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF)¹⁶⁰ intraarteriell sowie intramuskulär gespritzt. Außerdem wurde schon für die 121, 165 und 189 Aminosäuren große humane Isoformen von VEGF-A¹⁶¹ sowie für humanes FGF-1¹⁶² kodierende nackte DNA intramuskulär gespritzt. Die im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Substanzen sind bereits am Hühnerembryo getestet worden und sind somit auf jeden Fall auch in artfremden Organismen aktiv. So bewirkten VEGF-A sowie VEGF-E die Ausbildung von kapillaren Sprossen im Hühnergewebe ex vivo¹⁶³. Zudem konnte auch die spezifische Wirkung der humanen Testproteine auf Kaninchenmonozyten in vitro nachgewiesen werden. Sie regten diese zur Transmigration an (Heil et al., unveröffentlicht). Demzufolge ist von einer hohen Rezeptorspezifität der verwendeten Testsubstanzen auch bei anderen Spezies auszugehen. Eine mangelhafte Homologität der hier verwendeten humanen mit den Kaninchen- oder Hühner-eigenen Wachstumsfaktoren ist also unwahrscheinlich.

Eine Beeinflussung der Versuchsergebnisse durch Immunreaktionen war auszuschließen, weil diese erst nach dem fünften Tag der Behandlung spezifisch gegen die Testsubstanzen gerichtet sein konnten. Da das Zeitfenster für eine Stimulierung der Arteriogenese klein ist¹³⁴, waren die Wachstumsfaktoren nur in den ersten Tagen nach Ligatur der Femoralarterie für das Kollateralwachstum wichtig. Das Maximum einer Antikörperbildung auf Fremdprotein wird erst am 7-10. Tag erreicht. Zudem wurden die Wachstumsfaktoren zuvor gereinigt und auf Lipopolysaccharid-Kontamination geprüft. Da vor allem VEGF-E als virales Protein immunogen wirken müßte, wurde Serum nach sieben Tagen Infusion von 1,5 µg VEGF-E/kg/d mittels ELISA auf Antikörperbildung hin mit dem Kontrollserum vor Pumpenimplantation verglichen. Hierbei konnte kein Antikörpertiter gegen VEGF-E nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist voll nachvollziehbar, da im Kaninchen mindestens 10 µg Fremdprotein gespritzt werden müssen, um eine Immunantwort zu bekommen¹⁶⁴. Im Rahmen dieser Dissertation

wurden jedoch alle Testsubstanzen bis zur Dosis von maximal 6 µg/kg/d mittels osmotischer Minipumpe bei einer Pumprate von 10 µl/h infundiert. Somit war die Mindestdosis zum Auslösen einer Immunreaktion zu keinem Zeitpunkt des Versuches gegeben.

2. Einfluß der selektiven Aktivierung von VEGFR-1 oder -2 in der Arteriogenese

Derzeit werden die Mechanismen, welche der Arteriogenese zugrunde liegen, kontrovers diskutiert. Einerseits scheint sicher, daß die Regulation des Kollateralwachstums über endotheliale Rezeptoren geschieht¹³⁷. Jedoch nimmt man an, daß auch Monozyten eine Schlüsselrolle spielen^{50,52,84,165}. Hierbei scheint die Schubspannung in den präexistierenden Anastomosen wichtig zu sein.

Im Rahmen der Dissertation wurden Wachstumsfaktoren, welche jeweils selektiv den VEGFR-1, den VEGFR-2 oder beide Rezeptoren aktivierten, nach Ligatur der Hauptarterie lokal in das Kollateralgebiet infundiert. Zur selektiven Stimulierung des Endothels wurde das ausschließlich den endothelialen VEGFR-2 bindende VEGF-E eingesetzt⁹⁶. Um die Monozyten zu aktivieren, wurde der selektiv an den VEGFR-1 bindende PlGF-2⁷⁷ und als Ligand für beide Rezeptoren, der sowohl an den VEGFR-1 als auch an VEGFR-2 bindende VEGF-A verwendet¹⁶⁶. Als Positivkontrolle dienten das stark chemotaktisch auf Monozyten wirkende MCP-1, als Negativkontrolle das Lösungsmittel (Albumin 0,1 %).

Es stellte sich nach Auswertung der Angiogramme und hämodynamischen Messungen im Kaninchen heraus, daß durch PlGF-2 die größte Verstärkung des Kollateralwachstums zu erzielen war. VEGF-A erzielte nur bei höheren Dosen einen annähernd gleichen Effekt auf die Arteriogenese und VEGF-E bewirkte lediglich eine dem VEGF-A entsprechende Stimulierung.

Die selektive Aktivierung des VEGFR-1 mittels PlGF-2 bei Konzentrationen von 1,5 und 3,0 µg/kg KM erhöhte deutlich die Kollateralzahl, den Kollateralindex und die kollaterale Konduktanz gegenüber den Kontrollen. Die Durchmesser der Kollateralgefäße waren deutlich größer als solche der VEGF-Gruppe. Niedrige Konzentrationen von 1,5 µg/kg KM VEGF bewirkten keine Zunahme der Kollateralzahl. Erst die Verdoppelung der Konzentration erbrachte eine Erhöhung von Kollateralzahl und Kollateralindex gegenüber der Albuminkontrolle. Die weitere Konzentrationssteigerung auf 6,0 µg/kg KM induzierte eine maximale Anzahl angiographisch sichtbarer Kollateralgefäße. Ihre Anzahl erreichte Werte der Gruppe von MCP-1. Jedoch waren die Gefäßinnendurchmesser nur von geringer Größe, d.h. zwischen 150 und

250 µm. Die VEGF-Gruppe konnte nicht die Werte des Durchmesser-korrelierten Kollateralindex von MCP-1 erreichen. Dessen Gruppe wies nämlich Kollateral-durchmesser von 300 µm und mehr auf. In diesem Zusammenhang können Wachstum und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen den vergrößerten Durchmesser in den mit PlGF-2 oder MCP-1 gegenüber denen mit VEGF oder VEGF-E behandelten Tieren erklären. Ein erhöhter Kollateralindex nach Gabe von PlGF-2 und MCP-1 stand im Einklang mit den hämodynamischen Ergebnissen.

Mit diesen Ergebnissen läßt sich die bereits beschriebene dosisabhängige Förderung des Kollateralwachstums durch VEGF^{167,168} erneut und die durch PlGF-2 zum ersten Mal belegen. Zwar ist die Dosisabhängigkeit für die Aktivierung von Monozyten durch beide Faktoren in der Zellkultur beschrieben worden⁷⁷, jedoch wurde hier zum ersten Mal in vivo getestet, wie sich diese auf das Kollateralwachstum auswirkt.

Interessanterweise induziert VEGF eher das Wachstum vieler kleinkalibriger Kollateralen, wogegen PlGF-2 das Wachstum von Kollateralen größeren Durchmessers bewirkt. Da gemäß dem Hagen-Poiseuille'schen Gesetz die Leitfähigkeit eines Gefäßes mit großem Durchmesser in dessen vierten Potenz zunimmt, waren die Konduktanzwerte der Versuchsgruppen mit größeren Kollateralgefäßen erwartungsgemäß höher.

Die selektive Stimulierung des VEGFR-2 mittels VEGF-E bewirkte angiographisch keine Verbesserung des Kollateralwachstums, jedoch waren die Konduktanzwerte erhöht. Da infolge der lokalen Bestimmung des Kollateralflusses und des Druckgradienten entlang der Okklusionsstelle nur die kollaterale Konduktanz gemessen wurde, kann ein etwaiger angiogener Effekt im peripheren Gefäßbett nicht die Ursache für eine Verbesserung der hämodynamischen Werte sein. Die Zunahme des Kollateralwachstums durch VEGF-E scheint nur geringfügig und nicht angiographisch erfassbar zu sein. Jedoch ist es nicht auszuschließen, daß auch VEGF-E bei einer Konzentrationssteigerung analog zu VEGF eine Verbesserung der angiographischen und hämodynamischen Parameter bewirken könnte. Jedoch sind hierbei Zweifel angebracht, da in dieser Dissertation speziell die Heparin-bindende Form von VEGF-E genutzt wurde⁹⁶. VEGF-E hat nämlich analog dem VEGF₁₂₁ ohne basische, Heparin-bindende Eigenschaften lediglich mäßige Affinität zu VEGFR-2 gegenüber dem hier eingesetzten VEGF₁₆₅. Dennoch konnte VEGF-E in Zellkultur dem VEGF₁₆₅ adäquate Wirkungen offenbaren. Sowohl die mitotische Stimulierung primärer Endothelzellen, sowie die vaskuläre Permeabilitätsförderung waren vergleichbar²⁰⁴. Demzufolge muß eine Erhöhung seiner basischen, Heparin-bindenden Eigenschaften durch eine Affinitätszunahme für den VEGFR-2 zu einer stärkeren Aktivierung dieses Rezeptors führen. Außerdem wird bei VEGF-E im Gegensatz zu VEGF kein Protein von dem VEGFR-1 abgefangen. Das VEGF-E steht ganz

alleine zur spezifischen Stimulierung des VEGFR-2 zur Verfügung. Somit müßte bei einer starken Beteiligung des VEGFR-2 an der Arteriogenese bereits bei Gabe von 1,5 µg VEGF-E/kg KM/7d ein deutlich gesteigertes Kollateralwachstum zu verzeichnen sein.

Die zusätzlich durchgeführte Kombination von VEGF-E mit PlGF-2 diene zur Untersuchung der Zusammenarbeit der beiden VEGFR-Rezeptoren-1 und -2 im Rahmen der Arteriogenese. Die Kombination von 1,5 µg VEGF-E/kg mit 1,5 µg PlGF 2/kg konnte nicht die Ergebnisse von 3,0 µg PlGF-2/kg erreichen. Nicht einmal die Werte von 1,5 µg PlGF-2/kg alleine wurden erzielt. Da VEGFR-1 der einzige vorkommende VEGF-Rezeptor auf Monozyten ist, kann der Grund für die starke arteriogene Wirkung von PlGF-2 an dessen Eigenschaft liegen, Monozyten zu stimulieren⁷⁷.

Es ist zu vermuten, daß die durch VEGFR-1 vermittelten Mechanismen mehr als die über VEGFR-2 eingeleitete Signaltransduktionskaskade zum Kollateralwachstum führen. Damit ist es sehr wahrscheinlich, daß vor allem Monozyten zur Arteriogenese beitragen. Anhaltspunkte hierfür gaben schon Experimente mit dem starken Monozyten-Attraktanz MCP-1. Dieses wirkt stark arteriogen und erhöht die Anzahl perivaskulärer Monozyten im Kaninchenmodell⁵². In der Zellkultur konnte dementsprechend eine gesteigerte Transmigrationsaktivität unter dem Einfluß von MCP-1 nachgewiesen werden. Diese war jedoch für PlGF-2 als auch VEGF erhöht. Ein endgültiger in vivo Beweis konnte jedoch erst kürzlich in eigenen Studien durch Depletion der Monozyten bei mit PlGF-2 behandelten Versuchstieren geführt werden. Bei durch intravenöse Gabe von mit Bisphosphonaten beladenen Liposomen¹⁶⁹ Monozyten-depletierten Tieren konnte keine Wirkung des PlGF nachgewiesen werden. Vielmehr war das Kollateralwachstum vollständig gehemmt¹⁷⁰. Die Konduktanzwerte lagen unter denen nach einwöchiger Ligatur ohne Monozytendepletion und die Angiogramme entsprachen denen einer Akutligatur. Somit konnte auch die fundamentale Bedeutung der Monozyten für das Kollateralwachstum wiederholt bestätigt werden, welche Heil et al. kürzlich bewiesen¹⁶⁵. Demnach stellt die Monozytenzahl ein kritisches Moment im Rahmen der Arteriogenese dar, durch deren Erhöhung das Kollateralwachstum potenziert werden kann.

Auf der Suche nach einem Detail-Unterschied in der Monozytenaktivierung wurden weitere in vitro Versuche zur monozytären Integrinexpression durchgeführt. Es stellte sich heraus, daß VEGF und PlGF-2 im gleichen Maße die Expression von monozytären Integrinen, speziell des stark erhöhten CD11a und CD18 bewirken¹⁷⁰. Damit läßt sich die stärkere arteriogene Wirkung von PlGF-2 gegen VEGF in vivo nicht durch eine höhere

Bioaktivität von PlGF-2 erklären. VEGF-E dagegen, der selektive Ligand des endothelialen VEGFR-2, konnte keine Steigerung der Integrinexpression bewirken.

Die Beobachtung, daß VEGF in vivo nicht mit PlGF-2 vergleichbare Effekte hervorruft kann damit erklärt werden, daß VEGF an beide Rezeptoren bindet: An den von PlGF-2 angesteuerten VEGFR-1 sowie den von VEGF-E gezielt gebundenen VEGFR-2. Somit könnte durch spezifische endotheliale Rezeptoren gebundenes VEGF nicht weiter für die Rekrutierung und Aktivierung von Monozyten genutzt werden. PlGF-2 dagegen würde bei entsprechenden Konzentrationen immer noch ausreichend für Monozyten zur Verfügung stehen, da es nicht am endothelialen VEGFR-2 weggefangen werden kann. Die Stimulierung des rein endothelialen VEGFR-2 scheint somit nicht wesentlich zur Arteriogenese beizutragen. Dies zeigen auch die Versuchsergebnisse nach Gabe von VEGF-E, wo durch selektive Stimulierung des VEGFR-2 kein vermehrtes Kollateralwachstum zu sehen war.

Weitere Hinweise für eine wesentliche Rolle von Monozyten konnten durch die Gabe autologer monozytärer Zellen in vivo nach Femoralisligatur gefunden werden¹⁷¹. Die behandelten Tiere wiesen ein markant verstärktes Kollateralwachstum auf. Auch die Infusion von GM-CSF wirkte sich stark arteriogen aus¹⁷². Die hierdurch verlängerte Lebensdauer der vorhandenen Monozyten in Kombination mit der Anlockung durch MCP-1 erzielte im Kaninchenmodell die bis dato höchste Stimulierung der Arteriogenese. Außerdem konnte bereits in einer klinischen Doppelblind-Studie an Koronarpatienten gezeigt werden, daß die kontinuierliche Gabe von GM-CSF deren klinische Symptomatik linderte, die Hämodynamik verbesserte, den Blut-Cholesterinwert senkte und die Anzahl der Monozyten im Blut erhöhte¹⁷³.

Einen wichtigen Aspekt zur Klärung der stärker arteriogenen Wirkung von PlGF-2 gegenüber VEGF stellen die wahrscheinlich stark das Kollateralwachstum hemmenden Nebenwirkungen durch die Aktivierung des endothelialen VEGFR-2 dar. So induziert VEGF zwar die Freisetzung von NO im Endothel, worauf es infolge von Vasodilatation zu vermehrter Schubspannung kommt. Die Expression von Adhäsionsmolekülen und schubspannungsinduzierten Zytokinen wird heraufreguliert, wodurch das Kollateralwachstum angeregt wird. Aber gleichzeitig hemmt NO die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen, was wiederum in einer verminderten arteriogenen Antwort resultiert. Demzufolge scheint der endotheliale VEGFR-2 nur pro-angiogene Mechanismen zu induzieren. Die schwach arteriogene Wirkung des VEGF muß daher auf seine Eigenschaft in geringem Maße auch den monozytären VEGFR-1 zu aktivieren zurückzuführen sein.

Dies scheint ein fundamentaler Unterschied zwischen den beiden postnatalen Formen des Gefäßwachstums, der Arteriogenese und der Angiogenese, zu sein. Für die Angiogenese ist der VEGFR-2 unabdingbar, für das Kollateralwachstum dagegen nicht von Bedeutung. Zudem ist die Hemmung des Kapillarwachstums *in vitro* durch den hierbei als Köder für VEGF fungierenden endothelialen VEGFR-1 bekannt. Die nun publizierten Ergebnisse belegen die Führungsrolle des VEGFR-1 in der Arteriogenese und weisen zugleich auf die möglicherweise hemmende Wirkung des VEGFR-2 im Kollateralwachstum hin. Seine Stimulierung wirkt sich nicht direkt arteriogen aus, sondern seine Sättigung verhindert das Wegfangen von infundiertem, sowie endogenem VEGF. Dieses kann nur noch den das Kollateralwachstum steuernden VEGFR-1 binden.

Der Grund dafür, daß die arteriogene Wirkung von VEGF-E der von VEGF entsprach, könnte sein, daß bei Infusion von VEGF nach Sättigung des VEGFR-2 zwar noch freies VEGF zur Stimulierung des VEGFR-1 übrig bleibt, jedoch die infundierte Menge nicht die bereits vorhandene endogene VEGF-Konzentration markant erhöhen kann.

3. Einfluß der kombinierten Aktivierung von VEGFR-1 oder -2 in der Arteriogenese

Die gleichzeitige selektive Aktivierung des VEGFR-1 und des endothelialen VEGFR-2 sollte uns Erkenntnisse über einer mögliche Kooperation beider Rezeptoren in der Vermittlung des Kollateralwachstums geben. Zwar wurde diese schon des öfteren diskutiert, jedoch noch nicht am lebenden Organismus geprüft¹⁷⁴. Wir konnten nun erstmals nachweisen, daß eine kombinierte Stimulierung beider Rezeptoren sich *in vivo* nicht additiv auf das Kollateralwachstum auswirkt. Die Anzahl der angiographisch sichtbaren Kollateralgefäße und die kollateralen Konduktanzwerte lagen sogar noch etwas unter den Werten bei nur selektiver Stimulierung des VEGFR-1. Demzufolge existiert keine aktive Kooperation zwischen beiden Rezeptoren. Vielmehr scheint ein negativer Einfluß des VEGFR-2 auf die über den VEGFR-1 vermittelte Arteriogenese zu existieren, dessen Ursache die von VEGFR-2 vermittelten Nebenwirkungen sein können.

Das Fehlen einer Kooperation beider Rezeptoren gilt wahrscheinlich auch für die Angiogenese: In der Zellkultur konnte bei synchroner Stimulierung mit PlGF-2 und VEGF keine zusätzliche Wirkung auf die kapilläre Sprossung verzeichnet werden¹⁷⁰. Jedoch zeigten kürzlich Luttun et al., daß PlGF-2 die mitogene Wirkung von VEGF in der Kultur glatter Gefäßmuskelzellen potenziert¹¹⁷. Durch Sättigung des VEGFR-1 mittels PlGF-2 schien mehr VEGF zur Induktion der Zellproliferation über VEGFR-2 zur Verfügung zu stehen, was schon 1994 Park et al. hypothetisierten¹¹⁶. Damit ist es wahrscheinlich, daß keine aktive Kooperation beider Rezeptoren besteht, wie sie

Waltenberger et al. glauben gefunden zu haben¹⁷⁴. Vielmehr kann im Rahmen der Angiogenese eine multiple Kooperation unter den Liganden, dem PlGF-2 und dem VEGF bestehen: Erstens scheint PlGF-2 indirekt das Zellmitogen VEGF für die Aktivierung des VEGFR-2 zurückzuhalten¹¹⁶, zweitens induziert PlGF-2 möglicherweise die Expression von VEGF in periendothelialen Fibroblasten, Gefäßmuskelzellen oder Entzündungszellen in Wund oder Tumorstroma¹⁷⁵, und drittens wäre VEGFR-1 in der Lage, seine eigenen intrazellulären, angiogenen Signale zu vermitteln¹⁷⁶.

4. Einfluß von VEGF auf das Kollateralwachstum in anderen Modellen

Die Wirkung von VEGF in Rahmen des Gefäßwachstums wird international kontrovers diskutiert. Seine angiogenen Eigenschaften sind unbestritten, der Einfluß auf die Arteriogenese aber zweifelhaft beschrieben. Die gering arteriogene Wirkung von VEGF in den Versuchen zu dieser Dissertation steht im krassen Gegensatz zu anderen publizierten Daten. Takeshita et al. konnten angiographisch und mittels peripherer Blutdruckmessung eine stark arteriogene Wirkung für VEGF nachweisen, vier Wochen nach der einmaligen intraarteriellen Administration von 1000 µg VEGF im 3 kg schweren Kaninchen¹³⁷. Außerdem beschrieb Takeshita bereits eine Dosisabhängigkeit für den intramuskulären Einsatz von VEGF. Hierbei wurden über zehn Tage 200 bis 1000 µg VEGF täglich den Versuchskaninchen gespritzt¹⁶⁸. Die verbesserte Kollateralisierung durch VEGF, später auch mehrfach durch lokale Applikation von 500 µg VEGF-Plasmiden oder nackter, für VEGF kodierender DNA im Kaninchen publiziert¹⁷⁷ wurde letztendlich auch am Menschen nachgewiesen¹⁷⁸. Schwachpunkt dieser Studien war jedoch die extrem hohe Dosierung des rekombinant humanen Wachstumsfaktors. Es wurden bewußt Immunreaktionen in Kauf genommen, welchen die immense Menge artfremden Proteins zugrunde lag. So wurden in großem Ausmaß unspezifisch unter anderem Blutmonozyten aktiviert, welche sodann zum Ort der Applikation gelockt wurden und dort das Kollateralwachstum potenzierten. Bei den Studien am humanen Patienten war das Protein, bzw. dessen DNA zwar homolog, jedoch muß man sich eine intramuskuläre Dosis von 4000 µg nackter DNA ebenfalls recht immunreaktiv vorstellen¹⁷⁸. Zusätzlich waren einige klinische Studien nicht doppelt geblindet, so daß schließlich erst die bis dato einzige klinische Phase II Studie für VEGF, die sogenannte VIVA-Studie, seine mangelhafte Wirksamkeit feststellen konnte¹⁴⁹. Diese Studie war zwecks Vermeidung einer möglichen Stimulierung der Plaque- und Tumorvaskularisierung beim Patienten mit geringeren Dosierungen von VEGF durchgeführt wurden. Zusätzlich waren auch die behandelnden Ärzte geblindet, so daß sie keinen Einfluß auf den Patienten nehmen konnten. In vorherigen Studien waren die behandelnden Ärzte nämlich nicht geblindet¹⁷⁹.

In der vorliegenden Arbeit bewirkten erst höhere Dosierungen von 6,0 µg VEGF/kg KM/7d ein deutliches Kollateralwachstum. Daher kann man annehmen, daß für das Erreichen von mit MCP-1 oder PlGF, also Monozyten-spezifischen Stimulantien, erzielter Steigerung des Kollateralwachstums weitaus höhere Dosierungen von VEGF nötig wären. Diese wiederum würden aber das Risiko von Nebenwirkungen mit sich bringen. Daher scheint die selektive Aktivierung des VEGFR-1 die bessere Alternative in der arteriogenen Therapie zu sein.

5. Nachweis einer Monozyteninfiltration in die Kollateralgefäßwand

Um den Monozyten-stimulierenden Einfluß von PlGF-2 genauer zu untersuchen, wurde nach dreitägiger Infusion von 1,5 µg PlGF-2/kg KM mittels der monozytären Galaktosidaseaktivität¹⁴⁷ histologisch deren perivaskuläre Zahl bestimmt und mit der Albumingruppe (Kontrolle) verglichen.

Die Quantifizierung ergab einen etwa fünffachen Anstieg perivaskulärer, aktivierter Zellen der Monozyten/Makrophagen-Linie verglichen mit der Kontrolle. Diese Beobachtung steht in Einklang mit kürzlich publizierten Ergebnissen, daß die Monozytenzahl in wachsenden Kollateralgefäßen der Hintergliedmaße von PlGF-2 -/- Mäusen gemindert ist¹¹⁵. PlGF ist demnach wichtig für die Attraktivität von Monozyten und eignet sich somit für die Stimulierung der Arteriogenese. Zusätzlich stimmt dieses Ergebnis mit dem bekannten starken Einfluß des monozytären Chemokins MCP-1 und kürzlich gemachten Beobachtungen überein, daß der Zusatz von isolierten Monozyten das abgeschwächte Kollateralwachstum nach medikamentös induzierter Monozytopenie in der Maus wiederherstellen kann¹⁶⁵.

Obwohl die direkten Effekte von PlGF-2 auf Monozyten weitgehend beschrieben sind^{77,180-182}, kann nicht ausgeschlossen werden, daß nicht auch VEGFR-1 vermittelte Signale im Endothel am Kollateralwachstum beteiligt sind. Ein möglicher Mechanismus könnte die Freisetzung des arteriogenen Chemokins MCP-1 sein, was für Endothelzellen *in vitro* durch die Gabe von VEGF beschrieben ist⁹³. Jedoch konnte noch keinem der VEGF-Rezeptoren eine vermittelnde Funktion nachgewiesen werden.

Eine Differenzierung transmigrierter Monozyten von gewebständigen Makrophagen konnte bislang histologisch mittels Antikörperfärbung noch nicht vollzogen werden. Jedoch muß berücksichtigt werden, daß es sich beim Skelettmuskel gegenüber der Leber oder der Lunge nicht um eine Gewebe mit vielen Gewebemakrophagen handelt. Der Skelettmuskel ist kein resorptives Gewebe, die normal vorhandene Anzahl an

ortsständigen Makrophagen ist sehr gering. Daher kann davon ausgegangen werden, daß es sich bei den Galaktosidase-positiven, mononukleären Zellen mit großer Mehrheit um transmigrierte Monozyten handelt. Dennoch kann deren Herkunft multipel sein. Sowohl aus den Arterien, als auch Venen und Lymphgefäßen können die Monozyten transmigriert sein.

6. Funktion von VEGFR-1/-2 auf weiteren Zelltypen

6.1. Stammzellmobilisation über VEGFR-1/-2

In den letzten Jahren wird auch die Beteiligung von Stammzellen am Gefäßwachstum diskutiert. Es ist möglich, daß die arteriogenen Eigenschaften von VEGF und seiner Homologa auch durch dessen mobilisierende Wirkung auf hämatopoietische Vorläuferzellen bedingt sind. Diese wäre über eine Zunahme endothelialer oder monozytärer Vorläuferzellen für das Kollateralwachstum förderlich¹⁸³. So berichteten Asahara et al. von einer Zunahme endothelialer Progenitorzellen (EPZ) nach Gabe von VEGF in vivo¹⁸⁴. Die durch VEGF induzierte Mobilisierung der EPZ resultierte in einer Zunahme differenzierter EPZ in vitro und einem verstärkten kornealen Gefäßwachstum in vivo bei Mäusen. Jedoch gelten diese Ergebnisse heute als fragwürdig, denn darauffolgende Studien konnten nach VEGF-Gentransfer nur eine Zunahme von CD34+/Flk-1+ Zellen im Knochenmark und nur bedingt im peripheren Blut feststellen¹⁸⁵. Hierbei stößt man auf den Schwachpunkt der Hypothese: Können überhaupt kleinste Mengen an EPZ einen meßbaren Einfluß auf das Kollateralwachstum ausüben ?

Bis vor kurzem war es noch nicht bekannt, welcher Rezeptor die Stammzell-Mobilisation durch VEGF vermittelt. Es Hinweise, daß VEGFR-2 diese Funktion ausüben könnte. Daher wurde er neben CD34+ als Erkennungsmerkmal für hämatopoietische Stammzellen definiert¹⁸⁶. Jedoch konnten kürzlich Hinweise gefunden werden, welche für eine Stammzellaktivierung über VEGFR-1 und VEGFR-2 sprechen. Die EPZ-Mobilisierung hingegen bedarf nur des VEGFR-1[Heil et al., eingereicht].

6.2. Gefäßmuskelproliferation über VEGFR-1/-2

VEGFR-1 und VEGFR-2 sind außer auf Monozyten auch auf anderen nicht-endothelialen Gefäßzellen beschrieben worden, nämlich auf den glatten Muskelzellen von Koronararterien. Die Nachweise hierzu wurden mittels Western-Blot-Analyse¹⁸⁷ und Immunhistologie¹¹⁷ erbracht. Somit könnten alle VEGF-Homologa neben indirekter

Stimulierung von Gefäßmuskelzellen durch endotheliale Freisetzung von Mitogenen auch diese direkt aktivieren. Da die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen für das Kollateralwachstum unabdingbar ist⁸⁴, scheint ein Mechanismus über diese im Rahmen der PlGF-2- und VEGF-vermittelten Arteriogenese sehr wahrscheinlich.

Neueste wissenschaftliche Ergebnisse hingegen sprechen gegen eine starke direkte arteriogene Beteiligung des VEGFR-1 auf glatten Gefäßmuskelzellen. In Zellkultur konnte PlGF-2 im Gegensatz zum stark mitogen wirkenden VEGF nicht die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen bewirken. Jedoch in PlGF -/- SMCs konnte PlGF-2 die verminderte Proliferation auf Gabe von VEGF hin wieder herstellen¹⁸⁸. Grund hierfür könnte sein, daß infolge Bindung des VEGFR-1 durch PlGF-2 vermehrt VEGF für den VEGFR-2 zur Verfügung steht. Dieses kann somit die Proliferation der Muskelzellen anregen.

6.3. Neurogenese über VEGFR-2

Es ist schon seit längerer Zeit bekannt, daß VEGF als angiogenes Protein neurotrophisch und –protektiv wirkt. Seine direkt neurogenen Eigenschaften jedoch konnten erst in den letzten Jahren nachgewiesen werden. So ist heute bekannt, daß VEGF die Proliferation neuronaler Vorläuferzellen im adulten Rattenhirn stimuliert¹⁸⁹. Hierbei wurde VEGFR-2 als vermittelnder Rezeptor in den Nervenzellen nachgewiesen. Er vermittelt auch das axonale Auswachsen. Mittels des spezifischen VEGFR-2-Blockers SU5416 konnte nämlich dieses trotz Gabe von VEGF in Zellkultur unterbunden werden¹⁹⁰.

7. Therapeutische Stimulierung des Gefäßwachstums

Eine große Anzahl von Tierversuchen, klinische Phase I Studien und eine Phase II Studie haben die kurzfristige Sicherheit für die Behandlung mit verschiedenen Wachstumsfaktoren bewiesen^{79,149,177,191-195}. Bis zum heutigen Tage ist es jedoch ungewiß, ob sich die überzeugenden Therapieerfolge der Tierstudien in die Klinik umsetzen lassen¹⁵⁵.

7.1. Probleme der angiogenen Therapie

Patienten mit schweren ischämischen Gefäßerkrankungen weisen meist diffus arteriosklerotische Gefäße auf, welche nur abgeschwächt auf eine pro-arteriogene Therapie ansprechen würden. Da aber die Entwicklung arteriosklerotischer Plaques auch von Entzündungsvorgängen¹⁹⁶, sowie Angiogenese¹⁹⁷ abhängig ist, besteht

Übereinstimmung bezüglich der möglichen Verschlimmerung der Arteriosklerose im Rahmen einer angiogenen Therapie.

Carmeliet et al. konnten nun kürzlich für VEGFR-1 neben der Beteiligung am Kollateralwachstum auch dessen vermittelnde Tätigkeit in arteriosklerotischen Prozessen und autoimmunen Entzündungen nachweisen. Sie konnten mittels eines Antikörpers gegen den VEGFR-1 die Gefäßneubildung in Tumoren und ischämischer Retina, sowie die Angiogenese und entzündungsbedingte Gelenkzerstörung im Rahmen der autoimmunen Arthritis unterdrücken. Außerdem stellte sich heraus, daß VEGFR-1 zwar das Wachstum und die Brüchigkeit der arteriosklerotischen Plaques vermittelt, aber nicht an deren Vaskularisierung beteiligt ist¹⁸⁸.

Zhao et al. berichteten in einem Arteriosklerosemodell nach einem Gentransfer mit löslichem VEGFR-1 von einer Abschwächung der frühen Gefäßentzündungsphase und Verhinderung der späten Arteriosklerose. Außerdem war die normalerweise starke Exprimierung des MCP-1 und transforming growth factor- β (TGF- β) unterdrückt. Dies spricht für die essentielle Rolle von VEGF in der Arteriosklerose durch Rekrutierung und Aktivierung von Monozyten und weist auf einen positiven Rückkopplungsmechanismus über MCP-1 und TGF- β hin¹⁹⁸.

Mit rekombinanten humanen VEGF (rhVEGF) behandelte Mäuse wiesen einen starken Zuwachs der Plaquegröße auf. Dieser belief sich in etwa auf das fünf- bis zehnfache nach zwei Wochen und war begleitet von einer Zunahme der Dicke, was zusätzlich zur Destabilisierung des Plaques beitrug. Eine einmalige Dosis rhVEGF resultierte in einer Zunahme der Makrophagen-Akkumulation im Plaque, was somit dessen Wachstum erklärt¹⁸⁵. Somit wurde die These widerlegt, daß exogene Endothelzell-Wachstumsfaktoren aufgrund ihrer endogenen Präsenz im Plaquegewebe nicht den Ablauf der Plaque-Entstehung beeinflussen können¹⁹⁹.

Die selektive Stimulierung des VEGFR-1 durch PlGF-2 ohne die Nebenwirkungen infolge der unspezifischen Mitaktivierung des VEGFR-2 bei Gabe von VEGF stellt nach den hier gewonnenen Ergebnissen eine geeignete Methode zur Revaskularisierung dar. Im Gegensatz zu VEGF und FGF kommt es bei PlGF-2 zu keinen Ödemen oder Hypotension^{151,188,200,201}. Da zudem kürzlich durch die selektive Inhibition des VEGFR-2 mittels eines monoklonalen Antikörpers gegen VEGF das Tumorwachstum in Mäusen gehemmt werden konnte¹⁵² und somit die Tumor-fördernde Wirkung von VEGF gezeigt wurde, scheint der Weg über VEGFR-1 die für den Patienten sichere Variante zu sein.

Prinzipiell sollte jedoch immer die Wirkdosis von VEGF beachtet werden. So konnten im Rahmen der VIVA-Studie mit rekombinanten VEGF-Protein bei dreien von 178

Patienten das Wachstum von Tumoren innerhalb des Untersuchungszeitraums von 180 Tagen festgestellt werden¹⁴⁹. Zwei von ihnen starben in Folge. Jedoch sollen alle drei Patienten der Kontrollgruppe zugewiesen gewesen sein²⁰².

Daher werden längere klinische Verlaufsstudien und solche größeren Umfangs benötigt, um eine Zunahme Angiogenese-abhängiger maligner Tumoren als Nebenwirkung beweisen bzw. ausschließen zu können. Denn Krebs ist eine chronisch verlaufende Krankheit, deren Inzidenz infolge Therapie erst nach Jahren wirklich genau bestimmbar ist. Zwar ist das applizierte Protein nur kurze Zeit im Organismus aktiv, jedoch können auch kurze Einwirkungen mutagener Substanzen für die Auslösung einer Krebserkrankung ausreichen.

7.2. Optimierung der arteriogenen Therapie

Das Kollateralwachstum ist ein komplexer Prozeß, mit bis dato noch nicht vollständig bekannten Abläufen. Es scheint derzeit so, daß mehr als eine Substanz benötigt werden wird, um eine wirklich sichere Verbesserung des Blutflusses zum Ischämiegebiet zu erlangen^{203,204}. Möglicherweise wäre ein mehrphasiger Therapieverlauf mit der Gabe verschiedener Substanzen zu unterschiedlichen Zeitpunkten optimal. Zudem ist der beste Therapiezeitpunkt zu bedenken, denn das Kollateralwachstum läßt sich nur innerhalb der ersten Woche nach Gefäßverschluß signifikant steigern. Eine an unserem Institut durchgeführte Studie zum Zeitverlauf der Arteriogenese zeigte, daß die präexistierenden Kollateralgefäße nur in den ersten Tagen nach Anstieg der Schubspannung für therapeutische Stimuli sensibel sind. Die Applikation des bereits in den ersten Tagen wirkungsvollen Promotors der Arteriogenese, MCP-1 bewirkte nach dreiwöchiger Ligatur keine Zunahme des Kollateralwachstums über die Kontrollwerte hinaus¹³⁴.

Auch die Frage des Applikationsweges ist noch offen. Die intravenöse Therapie ist zwar sehr bequem und leicht durchzuführen, aber bei vielen Substanzen ist eine lokale Behandlung durch intraarterielle Katheter, Ballon-Katheter, extravaskuläre oder perikardiale Applikationsformen zur Maximierung des therapeutischen Effektes vorzuziehen. Hiermit können auch mögliche systemische Nebenwirkungen minimiert werden²⁰⁴. Daher könnte die lokal hohe Proteinkonzentration infolge Gentransfers eine Möglichkeit darstellen, einen maximal therapeutischen Effekt mit hoher Sicherheit zu kombinieren.

7.3. Möglichkeiten der Genterapie

Da VEGF neben einer starken Dosisabhängigkeit eine sehr kurze Plasma-Halbwertszeit besitzt, liegt es nahe, mittels Gentransfer eine lokal hohe Expression von VEGF-Protein

anzusteuern. Somit kann die systemische Konzentration sehr gering gehalten werden, so daß Nebenwirkungen auszuschließen sind, welche bei Proteinapplikation unvermeidbar wären.

Zwar konnten einige Studien eine Zunahme der Kollateralgefäße nach arteriellem Gentransfer von VEGF *in vivo* nachweisen^{161,179,205}, Lee et al. zeigten aber kürzlich, daß sich VEGF bei hoher lokaler Wirkdosis auch negativ auswirken kann. Infolge Überexpression des für VEGF kodierenden Gens in immundefizienten Mäusen, kam es zum Wachstum von endothelialen, intramuralen Gefäßtumoren und zur stark erhöhten Sterblichkeit der Versuchstiere¹⁵⁶. Zudem wurde berichtet, daß die *in vivo* Transfektion von Kaninchenarterien mit cDNA von humanem VEGF mittels des Sendai-Virus zu auffällig angiomatöser Proliferation von Endothelzellen und Verdickung der Intima geführt hat¹⁵⁴. Demnach kann der Gentransfer von VEGF also eine zu hohe lokale Wirkkonzentration bewirken, welche eigentlich zuvor infolge kurzer Plasma-Halbwertzeit zu niedrig war. Das heißt die Expressionsstärke des Konstruktes für VEGF muß noch dem jeweiligen Bedarf angepaßt werden, bevor es klinisch angewandt werden kann.

Jedoch gibt es auch Berichte über die Zunahme neointimalen Wachstums nach Gefäßverletzung durch die Gabe von VEGF in Proteinform²⁰⁶. Man kann diese Beobachtungen nicht ohne weiteres auf die Humantherapie projizieren, denn für VEGF wurden lediglich zwei Fälle von Neoplasien innerhalb von drei Jahren nach intrakoronarem Gentransfer mit VEGF unter 85 Patienten registriert. Dies gilt auch für andere Wachstumsfaktoren, da unter 79 Patienten mit intrakoronarem, adenoviralem Gentransfer von FGF-5 im Versuchszeitraum von neun Monaten nur in zwei Patienten neue Neoplasien diagnostiziert wurden²⁰⁷.

Trotz dieser scheinbar niedrigen Inzidenz ist ein Gentransfer immer mit der Gefahr verbunden, durch eine zu hohe lokale Proteinexpression des Wachstumsfaktors nicht tolerierbare Nebenwirkungen zu erzielen.

In Anbetracht der typischerweise zahlenmäßig starken Gruppe älterer Patienten ist aber noch ein genauere Nachweis der Zusammenhänge nötig, bevor man die Genthherapie als Ganzes verurteilt.

7.4. Die arteriogene Therapie der Zukunft

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Hypothese bestätigt, daß Monozyten nicht nur am „physiologischen“ Ablauf der Arteriogenese die Hauptrolle spielen. Man kann über sie auch das Kollateralwachstum stimulieren.

Hierbei bieten sich verschiedene therapeutische Ansätze an: Entweder appliziert man lokal Stoffe, welche Monozyten anlocken und aktivieren oder man manipuliert

Monozyten mittels Gentransfer; somit könnten sie z.B. als Vektoren für Gefäßwachstumsfaktoren dienen. Diese würden am Ort der Aktivität der Monozyten frei und könnten direkt arteriogen wirken. Hierbei bietet sich die Kombination mit Stoffen an, welche in der Lage sind das Endothel zu aktivieren. Das Endothel würde dann bei Aktivierung Monozyten-aktivierende und -anlockende Substanzen freisetzen. Dieses potenziert sodann die Effizienz der transfizierten Monozyten am Ort des Kollateralwachstums.

Außerdem besteht die Möglichkeit zur Kombination mit proliferativ wirkenden Substanzen. Diese könnten die SMC-Proliferation zusätzlich steigern, was unentbehrlich für den Umbau präexistierender Kollateralarteriolen in funktionelle Arterien ist.

Ein anderes Feld der arteriogenen Therapie stellt die Stammzelltherapie dar, welche auf folgenden Überlegungen basiert: Über die Verwendung noch proliferierender Monozytenvorläuferzellen könnte eine Erhöhung der Monozytenzahl am Kollateralgefäß erreicht werden. Zudem sind Stammzellen selbst in der Lage aktivierende Faktoren freizusetzen, welche wiederum das Kollateralwachstum stimulieren können, allen voran die FGFs.

8. Schlußfolgerung

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß das hier etablierte Hämodynamikmodell im Kaninchenhinterlauf eine geeignete Methode zur *in vivo* Analyse des Kollateralwachstums darstellt. Durch seine Anpassung an die Physiologie können die mit ihm gewonnenen Ergebnisse auch auf *in vivo* Situationen im Menschen angewandt werden. Somit bietet es eine geeignete Form, Wachstumsfaktoren vor ihrem klinischen Einsatz im lebenden Organismus zu erproben.

Physiologisch stellt sich heraus, daß Monozyten den entscheidenden Einfluß an der Arteriogenese haben. Die durch den VEGFR-2 über das Endothel vermittelten Mechanismen sind demnach nicht von entscheidender Bedeutung für das Kollateralwachstum. Die VEGFR-2 vermittelten Effekte auf das Gefäßendothel wirken sich vielmehr negativ auf die Stimulation des Kollateralgefäßwachstums aus.

Therapeutisch stellt die selektive Stimulierung des VEGFR-1 durch PlGF-2 eine Möglichkeit dar, die Arteriogenese ohne unerwünschte Begleiterscheinungen durch den endothelialen VEGFR-2 zu fördern. Die Aktivierung des monozytären VEGFR-1 ist somit der erfolversprechendere Weg, das Kollateralwachstum im Rahmen einer Therapie zu fördern. Die Nebenwirkungen der unspezifischen Aktivierung beider Rezeptoren mittels VEGF sind auf diesem Weg zu umgehen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Gefäßverschußkrankheiten stellen die Haupttodesursache in den westlichen Industrienationen dar. Trotz vielfältiger, kostenintensiver chirurgischer Interventionsmaßnahmen ist die post-operative Rezidivrate hoch. Zudem besteht für viele Patienten keine Möglichkeit zum Eingriff, welcher ein nicht zu unterschätzendes Operationsrisiko birgt. Da die Kosten im Gesundheitswesen im letzten Jahrzehnt um ein Vielfaches anstiegen, ergaben sich Möglichkeiten für alternative Therapieformen. So wurde viel Hoffnung in die exogene Stimulierbarkeit endogener Gefäßadaptationsprozesse durch endotheliale Wachstumsfaktoren gesetzt. Diese sollen das Wachstum neuer Gefäße induzieren, welche eine verschlossene Arterie ersetzen können.

Dies kann durch endotheliale Aussprossung von Kapillaren geschehen (Angiogenese) oder durch das Auswachsen präexistierender arterio-arteriolarer Verbindungen zu großen konduktiven Kollateralarterien (Arteriogenese)^{13,208}. Die muskulären Umgehungsstraßen sind bei weitem effektiver als ein kleinlumiges Kapillargeflecht, um minderperfundierte Gewebe nach Gefäßverschuß ausreichend mit Blut zu versorgen. Zudem können muskuläre Arterien aktiv auf Bedarfsänderungen im Rahmen der Blutversorgung reagieren und sich durch luminale Erweiterung (Vasodilatation) anpassen. So wurden bereits infolge Kollateralisierung im Herzen nicht-klinische Gefäßverschlüsse zufällig bei Untersuchungen entdeckt²⁰⁸.

Im Rahmen des Kollateralwachstums wurde viel über die Rolle der Angiogenesefaktoren aus der VEGF-Familie diskutiert. Infolge unterschiedlichem Splicings oder Degradation der Primär-mRNA existieren mehrere Formen von VEGF, so der Placenta Growth Factor (PlGF), VEGF-A (einige Isoformen mit z.B. 121, 145, 165 183, 189 oder 206 Aminosäuren), -B, -C, -D, und -E⁹⁰.

Aufgrund der hervorragenden Wirkung der 165 Aminosäuren großen Isoform von VEGF-A (VEGF₁₆₅) in einigen Tiermodellen, nahm man an, dieses Glykoprotein sei das herausragende Molekül für die Stimulierung der Arteriogenese. Jedoch versagte es in seiner ersten klinischen Phase II Studie¹⁴⁹. Daher wurde in dieser Dissertation die Rolle des endothelialen VEGFR-2 mit der des monozytären VEGFR-1 im Rahmen des Kollateralwachstums verglichen. Neben VEGF, der Agonist beider Rezeptoren ist, wurde sein selektiv den VEGFR-1 bindendes Homolog PLGF-2 und der ausschließlich VEGFR-2 aktivierende VEGF-E in den Kollateralkreislauf infundiert. Somit bestand die Möglichkeit zur Differenzierung zwischen endothelialen und monozytären Prozessen im Rahmen des Gefäßwachstums nach arteriellem Gefäßverschuß. Vielmehr sollte untersucht werden, welcher Prozeß ein stärkeres Kollateralwachstum und somit eine Verbesserung der Blutzufuhr zum ischämischen Gewebe bewirken kann.

Zur quantitativen Analyse wurde ein neues in vivo Hämodynamikmodell in der Femoralis-ligierten Kaninchenhintergliedmaße etabliert, welches zur Bestimmung des Kollateralflusses mit perivaskulären, auf Ultraschall basierenden, Flußmeßsonden arbeitet. Es mißt den dem Kollateralfluß entsprechenden Blutfluß zur Hintergliedmaße in der A. iliaca externa und den Druckgradienten entlang des Kollateralsystem um die Verschußstelle herum. Hieraus kann in vollständiger Vasodilatation die maximale kollaterale Konduktanz errechnet werden. Dieser hämodynamische Parameter korreliert mit dem Fließwiderstand und somit mit dem Kollateralwachstum. Das hier beschriebene Modell ist dem auf der Mikrosphären-Technik basierenden Vorläufermodell überlegen. Mikrosphärentechniken bergen die Gefahr der Fehlmessung, da nur einzelne Muskelproben stellvertretend für die Blutzufuhr zur ganzen Gliedmaße analysiert werden. Die Messung in der A. iliaca externa dagegen erfaßt den vollständigen Blutfluß zur Hintergliedmaße.

Die mit dem neuen Modell erhaltenen hämodynamischen Ergebnisse und zusätzlich postmortal angefertigte Angiographien nach einer Woche lokaler Applikation zeigten, daß zwar der VEGFR-1-spezifische PlGF-2 nicht aber der VEGFR-2-spezifische VEGF-E wesentlich zum Kollateralwachstum beitragen. Die Resultate mit PlGF-2 fielen sogar höher als mit dem beide Rezeptoren bindenden VEGF aus.

Die Experimentalergebnisse beweisen die herausragende Rolle von VEGFR-1 auf Monozyten im Rahmen der Stimulation des Kollateralwachstums. Die Aktivierung des endothelialen VEGFR-2 erwies sich nicht nur als ungeeignet zur Verstärkung der Arteriogenese, sie hemmte sogar ihren Verlauf. Die Kombination aus VEGF-E und PlGF-2 erzielte nicht die Wirkung von PlGF-2 alleine. Demnach scheint keine Notwendigkeit für eine Kooperation der beiden VEGF-Rezeptoren im Rahmen der Arteriogenese zu bestehen.

Zusätzlich konnte eine Akkumulierung von aktivierten Monozyten/Makrophagen in der Peripherie von Kollateralgefäßen nach Gabe von PlGF-2 beobachtet werden. Zusammengefaßt läßt sich somit sagen, daß die mit dem für VEGFR-1 spezifischen PlGF-2 dokumentierte arteriogene Wirkung durch dessen Monozyten-aktivierende Eigenschaft bedingt ist. Daher scheint die Stimulierung des Kollateralwachstums durch die Aktivierung von Monozyten ein effektiver Weg zur Behandlung von Gefäßverschlüßerkrankungen zu sein.

VII. SUMMARY

Obstructive vessel diseases are the most common reason causing death in the industrialized western world. Despite many expensive surgical interventions the post-operative relapses remain high. Furthermore, many patients cannot be treated by an surgical intervention, which in itself poses high risks. As costs of the medical care system rose during the last decade, alternative treatment procedures were investigated for future use. The exogenous stimulation of the endogenous vascular adaptation process by endothelium-specific growth factors was considered to be an effective strategy for future treatments. These would induce the de novo growth of vessels, thus replacing an occluded artery.

This can be achieved by endothelial sprouting of capillaries (angiogenesis) or through outgrowth of pre-existent arterio-arteriolar connections into big conductive collateral arteries (arteriogenesis)^{13,208}. These muscular highways are more effective than a small capillary plexus in meliorating the needs of ischemic tissue below vessel obstruction. Besides, muscular arteries actively react on changes in blood demand by dilatation. Thereby, a number of patients has been described lacking typical clinical signs despite having severe coronary stenosis²⁰⁸.

The role of VEGF-family-members as inducer of collateral growth has been frequently discussed. Following differential splicing and degradation of the mRNA several homologa of VEGF exist, such as Placenta Growth Factor (PlGF), VEGF-A (some isoforms with 121, 145, 165 183, 189 or 206 amino acids), -B, -C, -D, und -E⁹⁰.

Because of its pronounced effects in various animal models, the 165-amino-acid isoform of VEGF-A (VEGF₁₆₅) has been supposed to be the outstanding molecule for therapeutic vessel growth. However, it failed to stimulate vessel growth in its first Phase II clinical study¹⁴⁹. Therefore the impact of its two signaling receptors in the vasculature on arteriogenesis had to be examined. Besides VEGF, its homologue PlGF-2, which only binds to VEGFR-1 and VEGF-E, which only recognizes VEGFR-2 were infused into the collateral circulation. Therewith, endothelial and monocyte-mediated processes which participate in collateral growth following arterial occlusion could be differentiated. However, it had to be examined which process was more important for collateral growth, thus leading to an improved blood supply to ischemic tissues.

As a first step, a novel in vivo hemodynamic model for the determination of collateral-related blood flow was established in the ischemic rabbit hind limb, using perivascular ultrasonic flowprobes. External iliac blood flow, which was equivalent to collateral blood flow, as well as the pressure gradient along the collaterals was measured and the maximal collateral conductance was calculated at maximal hyperemia. This

hemodynamic parameter correlates with the collateral resistance and is thereby related to arteriogenesis. The here described hemodynamic model is more favourably than the previously described model based on microsphere technique. As only a few muscle samples are taken for flow analysis of the whole hind limb, analysis errors may occur easily. Iliac flow, however, describes total blood flow to the hind limb.

The hemodynamic data and additional postmortal angiographies after one week of local application demonstrated that the VEGFR-1 specific PlGF-2 significantly contributed to arteriogenesis but not the VEGFR-2 specific VEGF-E. The results with PlGF-2 even surpassed those of VEGF, the ligand for both receptors.

The experimental findings provide evidence for the dominant role of VEGFR-1 on monocytes in therapeutic arteriogenesis. The stimulation of endothelial VEGFR-2 not only failed to improve collateral growth, it even counteracted the process of arteriogenesis as the combination of VEGF-E and PlGF-2 did not exceed the effect of PlGF-2 alone. These results indicate that cooperation of the two VEGF-receptors in endothelial cell signaling is not required for arteriogenesis.

In addition, accumulation of activated monocytes/macrophages in the periphery of collateral vessels in PlGF-2 treated animals was observed. Together, these data indicate that the arteriogenic activity observed with the VEGFR-1 specific PlGF-2 is caused by its monocyte activating properties. Therefore the stimulation of collateral vessel growth via monocyte activation seems to be the more promising way for treatment of ischemic diseases.

VIII. ANHANG

1. Material

1.1. Allgemeine Chemikalien und Lösungsmittel

- Adenosin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- Aqua dest.
- Bismuth (Biron®B-50; Merck Eurolab GmbH, Frankfurt)
- Bovines Serumalbumin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- Konz. Salzsäure
- Natriumhydroxid-Plätzchen (Merck Eurolab GmbH, Frankfurt)
- Natronlauge
- para-Formaldehyd (pFA)
- Rabbit Albumin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- Rindergelatine (Merck Eurolab GmbH, Frankfurt)
- Silikonöl (200 Fluid, 350 cs; Ajax Chemicals)

1.2. Medikamente

- Bacitracin-Zink (Cicatrex®; Glaxo Wellcome, Bad Oldesloe)
- Buprenorphinhydrochlorid (Temgesic®, Essex Pharma GmbH, München)
- Dexpanthenol (Bepanthen® Augensalbe, Roche, Grenzach-Wyhlen)
- Fentanyl Dihydrogencitrat (Fentanyl®, Janssen-Cilag GmbH, Neuss)
- Heparin-Na (Liquemin® N 25000, Roche, Grenzach-Wyhlen)
- Ketaminhydrochlorid (Ketamin® 10 %, Medistar GmbH, Holzwickede)
- Midazolamhydrochlorid (Dormicum®; Roche, Grenzach-Wyhlen)
- Natriumbikarbonat-, Isotone Kochsalzlösung 0,9 % Braun (B. Braun AG, Melsungen)
- Papaverinhydrochlorid (Paveron®, Linden GmbH, Heuchelheim)

- Pentobarbital-Na (Narcofen®; Merial GmbH, Halbergmoos)
- Xylazinhydrochlorid (Xylazin® 2 %, Medistar GmbH, Holzwickede)

1.3. Operationszubehör

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

1.4. Versuchstiere

- 60 männliche Weiße Neuseeländer Kaninchen, spezifiziert pathogenfrei, 2,5 kg KM (Charles River; Elevages Scientifique des Dombes, Rannes, Frankreich)

1.5. Laborzubehör

- Glasware von Schott (Merck Eurolab GmbH, Frankfurt)

- Röntgenfilm (Structurix D7DW; Agfa)

1.6. Geräte

1.6.1. Labor

- Kochplatte Ikamag®Ret (Ika®-Labortechnik, Staufen i. Br.)
- Magnetrührer Ika-Combimag®RCO (Ika®-Labortechnik, Staufen i. Br.)
- Mikrofeinwaage Sartorius BP 211 D (Sartorius AG, Göttingen)

1.6.2. Hämodynamik

- Akkusauger (AEG Hausgeräte GmbH, Nürnberg)
- Beatmungsgerät (RespiratorABV-I®; Stephan GmbH, Gackenbach)
- Blutflußmeßgerät (Transonic® Animal Research Flowmeter T206; Transonics Systems Inc., Ithaca, USA)
- Druckwandler (P23XL; Ohmeda GmbH & Co. KG, Erlangen)
- Hard- und Software
 - Mac-Lab MKIII (ADI-Instruments, Castle Hill, Australien)
 - Macintosh-Rechner (Quadra 700)
 - Chart 3.6.3. (ADI-Instruments, Castle Hill, Australien)
- Mikroinfusionspumpe (Minipuls 3; ABIMED-Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich)
- Osmotische Minipumpe (ALZET®; alza Corporation, Palo Alto, USA)
- Perfusionsgerät für 50 ml Infusionsspritzen (Perfusor®; Fresenius, Bad Homburg)
- Schermaschine (Favorita®II; Aesculap GT 104, Tuttlingen)
- Statham-Blutdruckmeßanlage (P23XL; Statham, San Juan, Puerto Rico)
- Stoppuhr (Junghans, Schramberg)
- Thermometer (Huger, Villingen)
- Wärmematte (AEG Hausgeräte GmbH, Nürnberg)

1.6.3. Angiographie

- Balteau-Apparat (Machlett Laboratories, Stamford)
- Druckperfusionsanlage (Eigenbau des Instituts)
- Einspannkasten für Kaninchenbein aus Plexiglas (Eigenbau des Instituts)
- Hard- und Software
 - Macintosh-Rechner (iMac G3/500)
 - Flachbett-Scanner (Duoscan T1200, Agfa)
 - Adobe® Photoshop® Software 7.0 (Adobe Systems, USA)

1.6.4. Histologie

- Kryotom (Leica CM 3000; Leica, Bensheim)
- Mikroskop (Aristoplan; Leica, Bensheim)

1.7. Puffer10-fach Phosphat-gepufferte-Kochsalzlösung (10 x PBS)

PBS Stammlösung:	NaCl	80	g
	KCl	2	g
	KH ₂ PO ₄	2	g
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	18	g
	Aqua dest.	1	l

1 x PBS:

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

<u>Kaninchenalbuminlösung (0,1 %):</u>	Kaninchenalbumin	30	mg
	PBS steril	30	ml

Die gebrauchsfertigen 30 ml Lösung waren bei +4°C zu lagern und rasch aufzubrauchen.

Papaverin-Spüllösung

Stammlösung:	Aqua dest.	900 ml
	PBS	100 ml
	Bovines Serumalbumin (BSA)	1 g

Nach dem Lösen des BSA in der Lösung war diese auf einen pH-Wert von 7,4 – 7,5 einzustellen.

Gebrauchslösung:	Stammlösung	1000 ml
	Papaverin	4 mg

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

Paraformaldehyd-Fixationslösung 4 %:

Zur Herstellung von 1 Liter Fixationslösung waren zunächst unter dem Abzug 40 g pFA-Puder in 1000 ml 60°C-warmer PBS-Lösung aufzulösen und die Lösung darauf mittels Natriumhydroxid zu klären. Nach Filtration und Abkühlen auf Raumtemperatur wurde mittels Zugabe von 1 M HCl ein pH-Wert von 7,4 eingestellt. Die gebrauchsfertige Lösung wurde bei -20°C gelagert.

X-Galaktose-Lösung:

X-Galaktose	0,1 %
Kalium-Ferricyanid	5 mM
Kalium-Ferrocyanid	5 mM
Magnesiumchlorid	1 mM
NP-40	0,002 %
Natriumdeoxycholat	0,01 %
PBS	ad pH 7,0

2. Abkürzungen

A.	Arterie
Aa.	Arterien
ADI-Wandler	Analog-Digital Instrumenten-Wandler
ATP	Adenosin-Triphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	Endothelzelle
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
Flk-1	<i>Fetal-liver kinase-1</i>
Flt-1	<i>Fms-like tyrosine kinase-1</i>
g	Gramm
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage - colony stimulating factor</i>
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde - Society for Laboratory Animal Science
h	Stunde
HB-PIGF	<i>heparine-binding placenta growth factor</i>
HCl	Salzsäure
HIF-1	<i>hypoxia inducible factor-1</i>
Hg	Quecksilber
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
kDa	Kilodalton
KDR	<i>kinase insert domain-containing receptor</i>
KHK	Koronare Herzkrankheit

KM	Körpermasse
Konz.	Konzentration
l	Liter
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
mm	Millimeter
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
µm	Mikrometer
µg	Mikrogramm
PAVK	Periphere Arterielle Verschußkrankheit
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PE	Polyethylen
pFA	Paraformaldehyd
PlGF	<i>placenta growth factor</i>
PlGF-/-	PlGF-Deletionsmutante
PP	Mittlerer peripherer Blutdruck
PVC	Polyvinylchlorid
RAlb	Kaninchen-Albuminlösung
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
SMC	<i>smooth muscle cell</i>
SP	Mittlerer systemischer Blutdruck
TNF-α	<i>tumor necrosis factor-α</i>

V.	Vene
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
VPF	<i>vascular permeability factor</i>
3-D	dreidimensional

IX. LITERATURVERZEICHNIS

1. <http://www.chd-taskforce.com> TTW. In.
2. Association AH. 2002 Heart and Stroke Statistical Update. In: *Dallas, TX: American Heart Association*. Dallas, Tex: American Heart Association; 2001.
3. Roskamm H, Reindell H. *Herzkrankheiten: Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie*. Heidelberg: Springer-Verlag; 1996.
4. Hiatt WR, Hirsch AT, Regensteiner JG, Brass EP. Clinical trials for claudication. Assessment of exercise performance, functional status, and clinical end points. Vascular Clinical Trialists. *Circulation*. 1995;92:614-621.
5. Violi F, Criqui M, Longoni A, Castiglioni C. Relation between risk factors and cardiovascular complications in patients with peripheral vascular disease. Results from the A.D.E.P. study. *Atherosclerosis*. 1996;120:25-35.
6. Newman MF, Kirchner JL, Phillips-Bute B, Gaver V, Grocott H, Jones RH, Mark DB, Reves JG, Blumenthal JA. Longitudinal assessment of neurocognitive function after coronary-artery bypass surgery. *N Engl J Med*. 2001;344:395-402.
7. Hamawy AH, Lee LY, Crystal RG, Rosengart TK. Cardiac angiogenesis and gene therapy: a strategy for myocardial revascularization. *Curr Opin Cardiol*. 1999;14:515-522.
8. Schaper W, Buschmann I. VEGF and therapeutic opportunities in cardiovascular diseases. *Curr Opin Biotech*. 1999;10:541-543.
9. Maseri A, Araujo L, Finocchiaro ML. Collateral development and function in man. In: Schaper J, Schaper W, eds. *Collateral Circulation - Heart, Brain, Kidney, Limbs*. Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers; 1993:381-402.
10. Longland CJ. The collateral circulation of the limb. *Ann Roy Coll Surg Engl*. 1953;13:161-164.
11. Ito WD, Arras M, Winkler B, Scholz D, Htun P, Schaper W. Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion. *Am J Physiol*. 1997;273:H1255-H1265.

12. Hershey JC, Baskin EP, Glass JD, Hartman HA, Gilberto DB, Rogers IT, Cook JJ. Revascularization in the rabbit hindlimb: dissociation between capillary sprouting and arteriogenesis. *Cardiovasc Res.* 2001;49:618-625.
13. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 2000;6:389-395.
14. Schmidt RF, Thews G, Lang F. *Physiologie des Menschen.* 28 ed; 2000.
15. Rohen JW, Lütjen-Drecoll E. *Funktionelle Histologie.* 4 ed: Schattauer, F.K. Verlagsgesellschaft mbH; 2000.
16. Liebig HG. *Funktionelle Histologie:* Schattauer; 1999.
17. Davies MJ, Thomas A. Thrombosis and acute coronary-artery lesions in sudden cardiac ischemic death. *N Engl J Med.* 1984;310:1137-1140.
18. Risau W. Angiogenesis. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research.* 1994;44(I):416-417.
19. Bussolino F, Mantovani A, Persico G. Molecular mechanisms of blood vessel formation. *Trends Biochem Sci.* 1997;22:251-256.
20. Max-Planck-Gesellschaft Gd. *Jahrbuch 1997.* Göttingen: Max-Planck-Gesellschaft; 1997.
21. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997;386:671-674.
22. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstien M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature.* 1996;380:435-439.
23. Carmeliet P. Genetic analysis of blood vessel formation: role of endothelial versus smooth muscle cells. *Trends Cardiovasc Med.* 1997;7:271-281.
24. Carmeliet P, Collen D. Vascular development and disorders: molecular analysis and pathogenic insights. *Kidney Int.* 1998;53:1519-4159.
25. Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood.* 1998;92:362-367.

26. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999;85:221-228.
27. Hertig AT. Angiogenesis in the early human chorion. *Contrib Embryol Carnegie Inst.* 1935;25:37-43.
28. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971;285:1182-1186.
29. Patan S, Haenni B, Burri PH. Implementation of intussusceptive microvascular growth in the chicken chorioallantoic membrane (CAM): 1. pillar formation by folding of the capillary wall. *Microvasc Res.* 1996;51:80-98.
30. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1995;27-31.
31. Risau W. Development and differentiation of endothelium. *Kidney Int Suppl.* 1998;67:S3-6.
32. Yancopoulos GD, Klagsbrun M, Folkman J. Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border. *Cell.* 1998;93:661-664.
33. Marme D. Tumor angiogenesis: new approaches to cancer therapy. *Onkologie.* 2001;24 Suppl 1:1-5.
34. Plate KH, Beck H, Danner S, Allegrini PR, Wiessner C. Cell type specific upregulation of vascular endothelial growth factor in an MCA-occlusion model of cerebral infarct. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1999;58:654-666.
35. Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res.* 1995;77:638-643.
36. Stein I, Neeman M, Shweiki D, Itin A, Keshet E. Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes. *Mol Cell Biol.* 1995;15:5363-5368.
37. Damert A, Machein M, Breier G, Fujita MQ, Hanahan D, Risau W, Plate KH. Up-regulation of vascular endothelial growth factor expression in a rat glioma is

- conferred by two distinct hypoxia-driven mechanisms. *Cancer Res.* 1997;57:3860-3864.
38. Claffey KP, Shih S-C, Mullen A, Dziennis S, Cusick JL, Abrams KR, Lee SW, Detmar M. Identification of a human VPF/VEGF 3' untranslated region mediating hypoxia-induced mRNA stability. *Mol Biol Cell.* 1998;9:469-481.
 39. Schaper W, Schaper J. *Collateral Circulation - Heart, Brain, Kidney, Limbs.* Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers; 1993.
 40. Lower R. *Tractus de Corde.* Amsterdam: Elsevier; 1669.
 41. Haller v. A. *Elementa physiologicae corporis humani.* Lausanne. 1757.
 42. Cohnheim J, Von Schulthess-Rechberg A. Über die Folgen der Kranzarterienverschließung für das Herz. *Virchows Arch (Pathol Anat).* 1881;85:503-537.
 43. Hyrtl J. *Die Korrosionsanatomie und ihre Ergebnisse.* Wien. 1873.
 44. Henle FGJ. *Handbuch der systematischen Anatomie des Menschen.* Viewig, Braunschweig. 1876.
 45. Spalteholz W. Die Koronararterien des Herzens. *Verhandl Anat Ges.* 1907;21:141; in *Anat Anz* 30.
 46. Eckstein RW, Gregg DE, Pritchard HW. The magnitude and time of development of the collateral circulation in occluded femoral, carotid and coronary arteries. *Am J Physiol.* 1941;132:351-361.
 47. Fulton WFM. Arterial anastomoses in the coronary circulation, Part 2 (Distribution, enumeration and measurement of arterial anastomoses in health and disease. *Scott Med J.* 1963;8:466.
 48. Fulton WFM. Arterial anastomoses in the coronary circulation. In: Fulton WFM, ed. *The Coronary Arteries. Arteriography, Microanatomy, and Pathogenesis of Obliterative Coronary Artery Disease.* Springfield, Illinois: Thomas,C.C.; 1965:72-128.
 49. Buschmann I, Schaper W. The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis). *J Pathol.* 2000;190:338-342.

50. Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest.* 1998;101:40-50.
51. Schaper W, Buschmann I. Collateral circulation and diabetes. *Circulation.* 1999;99:2224-2226.
52. Ito WD, Arras M, Winkler B, Scholz D, Schaper J, Schaper W. Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ Res.* 1997;80:829-837.
53. Schaper W, Jageneau A, Xhonneux R. The development of collateral circulation in the pig and dog heart. *Cardiology.* 1967;51:321-335.
54. Schaper W, DeBrabander M, Lewi P. DNA-synthesis and mitoses in coronary collateral vessels of the dog. *Circ Res.* 1971;28:671-679.
55. Nohara R, Kambara H, Murakami T, Kadota K, Tamaki S, Kawai C. Collateral function in early acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 1983;52:955-959.
56. Blanke H, Cohen M, Karsch KR, Fagerstrom R, Rentrop KP. Prevalence and significance of residual flow to the infarct zone during the acute phase of myocardial infarction. *JACC.* 1985;5:827-831.
57. Schwartz H, Leiboff RL, Katz RJ, Wasserman AG, Bren GB, Varghese PJ, Ross AM. Arteriographic predictors of spontaneous improvement in left ventricular function after myocardial infarction. *Circulation.* 1985;71:466-472.
58. Thoma R. *Untersuchungen über die Histogenese und Histomechanik des Gefäßsystems.* Stuttgart: F.Enke; 1893.
59. Buschmann I, Schaper W. Arteriogenesis versus angiogenesis: two mechanisms of vessel growth. *News Physiol Sci.* 1999;14:121-125.
60. Chappell DC, Varner SE, Nerem RM, Medford RM, Alexander RW. Oscillatory shear stress stimulates adhesion molecule expression in cultured human endothelium. *Circ Res.* 1998;82:532-539.
61. Kosaki K, Ando J, Korenaga R, Kurokawa T, Kamiya A. Fluid shear stress increases the production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by endothelial cells via mRNA stabilization. *Circ Res.* 1998;82:794-802.

62. Nagel T, Resnick N, Atkinson WJ, Dewey CF, Jr., Gimbrone MA, Jr. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest.* 1994;94:885-891.
63. Shyy YJ, Hsieh HJ, Usami S, Chien S. Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemotactic protein 1 gene expression in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:4678-4682.
64. Resnick N, Yahav H, Khachigian LM, Collins T, Anderson KR, Dewey FC, Gimbrone MA, Jr. Endothelial gene regulation by laminar shear stress. *Adv Exp Med Biol.* 1997;430:155-164.
65. Bao X, Lu C, Frangos JA. Temporal gradient in shear but not steady shear stress induces PDGF-A and MCP-1 expression in endothelial cells: role of NO, NF kappa B, and egr-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:996-1003.
66. Ziegelstein RC, Blank PS, Cheng L, Capogrossi MC. Cytosolic alkalinization of vascular endothelial cells produced by an abrupt reduction in fluid shear stress. *Circ Res.* 1998;82:803-809.
67. Scholz D, Devaux B, Pötzsch B, Kropp B, Schaper W, Schaper J. Expression of adhesion molecules is specific and time dependent in cytokine stimulated endothelial cells in culture. *Cell Tissue Res.* 1996;284:415-423.
68. Schaper J, Koenig R, Franz D, Schaper W. The endothelial surface of growing coronary collateral arteries. Intimal margination and diapedesis of monocytes. A combined SEM and TEM study. *Virchows Arch A (Pathol Anat).* 1976;370:193-205.
69. Scholz D, Ito W, Arras M, Höfer I, Schaper J, Schaper W. Early events in adaptive arteriogenesis. In: *J Mol Cell Cardiol*; 1998:496 (abstr).
70. 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. *J Mol Cell Cardiol.* 1998;30:2291-2305.
71. Buschmann I, Hoefler I, Heil M, Schaper W. Anti-adhesion monoclonal antibodies against ICAM inhibit arteriogenesis. In: *JACC*; 1999:911-911 (abstr).

72. Deindl E, Schaper W. Collateral and capillary formation - a comparison. In: Dormandy JA, Dole WP, Rubanyi GM, eds. *Therapeutic Angiogenesis. Ernst Schering Research Foundation - Workshop 28*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 1999:67-86.
73. Donahue RE, Wang EA, Stone DK, Kamen R, Wong GG, Sehgal PK, Nathan DG, Clark SC. Stimulation of haematopoiesis in primates by continuous infusion of recombinant human GM-CSF. *Nature*. 1986;321:872-875.
74. Chachoua A, Oratz R, Hoogmoed R, Caron D, Peace D, Liebes L, Blum RH, Vilcek J. Monocyte activation following systemic administration of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol*. 1994;15:217-224.
75. Jones TC. The effects of rhGM-CSF on macrophage function. *Eur J Cancer*. 1993;29A:S10-13.
76. Plenz G, Koenig C, Severs NJ, Robenek H. Smooth muscle cells express granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the undiseased and atherosclerotic human coronary artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:2489-2499.
77. Clauss M, Grell M, Fangmann C, Fiers W, Scheurich P, Risau W. Synergistic induction of endothelial tissue factor by tumor necrosis factor and vascular endothelial growth factor: functional analysis of the tumor necrosis factor receptors. *FEBS Lett*. 1996;390:334-338.
78. Basilico C, Moscatelli D. The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv Cancer Res*. 1992;59:115-165.
79. Simons M, Annex BH, Laham RJ, Kleiman N, Henry T, Dauerman H, Udelson JE, Gervino EV, Pike M, Whitehouse MJ, Moon T, Chronos NA. Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2: double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Circulation*. 2002;105:788-793.
80. Loems-Ziegler-Heitbrock HW. The biology of the monocyte system. *Eur J Cell Biol*. 1989;49:1-12.

81. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res.* 2002;90:251-262.
82. Pasyk S, Schaper W, Schaper J, Pasyk K, Miskiewicz G, Steinseifer B. DNA synthesis in coronary collaterals after coronary artery occlusion in conscious dog. *Am J Physiol.* 1982;242:H1031-H1037.
83. Deindl E, Fernández B, Höfer IE, van Royen N, Scholz D, 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.
84. Schaper W, Ito WD. Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circ Res.* 1996;79:911-919.
85. Scholz D, Ito W, Fleming I, Deindl E, Sauer A, Wiesnet M, Busse R, Schaper J, Schaper W. Ultrastructure and molecular histology of rabbit hindlimb collateral artery growth (arteriogenesis). *Virchows Arch.* 2000;436:257-270.
86. Lazarous DF, Scheinowitz M, Shou M, Hodge E, Rajanayagam MAS, Hunsberger S, Robison WG, Stiber JA, Correa R, Epstein SE, Unger EF. Effects of chronic systemic administration of basic fibroblast growth factor on collateral development in the canine heart. *Circulation.* 1995;91:145-153.
87. Ikeda E, Achen MG, Breier G, Risau W. Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J Biol Chem.* 1995;270:19761-19766.
88. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 1992;359:843-845.
89. Deindl E, Neubauer E, Fernandez B, Thomas S, Podzuweit T. Collateral artery growth in rabbit is not dependent on ischemia or an increased expression of VEGF. In: *Circulation*; 2000:237 (abstr).
90. Neufeld G. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 1999;13:9-22.

91. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;161:851-858.
92. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem.* 1992;267:26031-26037.
93. Marumo T, Schini-Kerth, V., Busse, R. Vascular endothelial growth factor activates nuclear factor-kappaB and induces monocyte chemoattractant protein-1 in bovine retinal endothelial cells. *Diabetes.* 1999;48:1131-1137.
94. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell.* 1998;92:735-745.
95. Karkkainen MJ, Petrova TV. Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene.* 2000;19:5598-5605.
96. Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A, Waltenberger J, Augustin HG, Ziche M, Lanz C, Buttner M, Rziha HJ, Dehio C. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF- E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *Embo J.* 1999;18:363-374.
97. Clauss M, Weich H, Breier G, Knies U, Rockl W, Waltenberger J, Risau W. The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J Biol Chem.* 1996;271:17629-17634.
98. Matthews W, Jordan CT, Gavin M, Jenkins NA, Copeland NG, Lemischka IR. A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c- kit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:9026-9030.
99. Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H, Sato M. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene.* 1990;5:519-524.

100. Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy RL, Shows TB. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene*. 1991;6:1677-1683.
101. Davis-Smyth T, Chen H, Park J, Presta LG, Ferrara N. The second immunoglobulin-like domain of the VEGF tyrosine kinase receptor Flt-1 determines ligand binding and may initiate a signal transduction cascade. *Embo J*. 1996;15:4919-4927.
102. Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem*. 1997;272:23659-23667.
103. Waltenberger J, Mayr U, Pentz S, Hombach V. Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia. *Circulation*. 1996;94:1647-1654.
104. Wilting J, Birkenhäger R, Eichmann A, Kurz H, Martiny-Baron G, Marmé D, McCarthy JEG, Christ B, Weich HA. VEGF₁₂₁ induces proliferation of vascular endothelial cells and expression of flk-1 without affecting lymphatic vessels of the chorioallantoic membrane. *Devel Biol*. 1996;176:76-85.
105. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin C-H. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*. 1994;269:26988-26995.
106. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem*. 1998;273:30336-30343.
107. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Vascular endothelial growth factor induces plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Com*. 1991;181:902-906.
108. Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA, Amento EP. Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol*. 1992;153:557-562.

109. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Peruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983;219:983-985.
110. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*. 1986;315:1650-1659.
111. Bates DO, Curry FE. Vascular endothelial growth factor increases microvascular permeability via a Ca(2+)-dependent pathway. *Am J Physiol*. 1997;273:H687-H694.
112. Roberts WG, Palade GE. Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated. *Cancer Res*. 1997;57:765-772.
113. Esser S, Wolburg K, Wolburg H, Breier G, Kurzchalia T, Risau W. Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J Cell Biol*. 1998;140:947-959.
114. Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC, Pan YCE, Olander JV, Connolly DT, Stern D. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med*. 1990;172:1535-1545.
115. 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. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med*. 2001;7:575-583.
116. Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem*. 1994;269:25646-25654.
117. Luttun A, Carmeliet G, Carmeliet P. Vascular progenitors: from biology to treatment. *Trends Cardiovasc Med*. 2002;12:88-96.

118. Shibuya M, Ito N, Claesson-Welsh L. Structure and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 and -2. In: Claesson-Welsh L, ed. *Vascular Growth Factors and Angiogenesis*. Berlin: Springer Verlag; 1999:59-83.
119. Cao Y, Chen H, Zhou L, Chiang MK, Anand-Apte B, Weatherbee JA, Wang Y, Fang F, Flanagan JG, Tsang ML. Heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. Endothelial activity, tumor cell expression, and high affinity binding to Flk-1/KDR. *J Biol Chem*. 1996;271:3154-3162.
120. Cao Y, Linden P, Shima D, Browne F, Folkman J. In vivo angiogenic activity and hypoxia induction of heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. *J Clin Invest*. 1996;98:2507-2511.
121. DiSalvo J, Bayne ML, Conn G, Kwok PW, Trivedi PG, Soderman DD, Palisi TM, Sullivan KA, Thomas KA. Purification and characterization of a naturally occurring vascular endothelial growth factor, placenta growth factor heterodimer. *J Biol Chem*. 1995;270:7717-7723.
122. Paolini G, Lucignani G, Zuccari M, Landoni C, Vanoli G, Di Credico G, Rossetti C, Mariani MA, Fazio F, Grossi A. Identification and revascularization of hibernating myocardium in angina-free patients with left ventricular dysfunction. *Eur J of Cardio-Thoracic Surg*. 1994;8:139-144.
123. Kuratsu J, Leonard EJ, Yoshimura T. Production and characterization of human glioma cell-derived monocyte chemotactic factor. *J Natl Cancer Inst*. 1989;81:347-351.
124. Yoshimura T, Yuhki N, Moore SK, Appella E, Lerman MI, Leonard EJ. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. *FEBS Lett*. 1989;244:487-493.
125. Franci C, Wong LM, Van Damme J, Proost P, Charo IF. Monocyte chemoattractant protein-3, but not monocyte chemoattractant protein-2, is a functional ligand of the human monocyte chemoattractant protein-1 receptor. *J Immunol*. 1995;154:6511-6517.

126. Satriano JA, Shuldiner M, Hora K, Xing Y, Shan Z, Schlondorff D. Oxygen radicals as second messengers for expression of the monocyte chemoattractant protein, JE/MCP-1, and the monocyte colony-stimulating factor, CSF-1, in response to tumor necrosis factor-alpha and immunoglobulin G. Evidence for involvement of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-dependent oxidase. *J Clin Invest.* 1993;92:1564-1571.
127. Wang DL, Wung BS, Shyy YJ, Lin CF, Chao YJ, Usami S, Chien S. Mechanical strain induces monocyte chemotactic protein-1 gene expression in endothelial cells. Effects of mechanical strain on monocyte adhesion to endothelial cells. *Circ Res.* 1995;77:294-302.
128. Garcia-Zepeda EA, Combadiere C, Rothenberg ME, Sarafi MN, Lavigne F, Hamid Q, Murphy PM, Luster AD. Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3. *J Immunol.* 1996;157:5613-5626.
129. Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:827-872.
130. Randolph GJ, Furie MB. A soluble gradient of endogenous monocyte chemoattractant protein-1 promotes the transendothelial migration of monocytes in vitro. *J Immunol.* 1995;155:3610-3618.
131. Leibovich SJ, Polverini PJ, Shepard HM, Wiseman DM, Shively V, Nuseir N. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. *Nature.* 1987;329:630-632.
132. Litvak J, Siderides LE, Vineberg AM. The experimental production of coronary artery insufficiency and occlusion. *Am Heart J.* 1957;53:505-518.
133. Schaper W, Flameng W, Winkler B, Wuesten B, Türschmann W, Neugebauer G, Carl M, Pasyk S. Quantification of collateral resistance in acute and chronic experimental coronary occlusion in the dog. *Circ Res.* 1976;39:371-377.
134. Hoefler IE, van Royen N, Buschmann IR, Piek JJ, Schaper W. Time course of arteriogenesis following femoral artery occlusion in the rabbit. *Cardiovasc Res.* 2001;49:609-617.

135. Pu LQ, Jackson S, Lachapelle KJ, Arekat Z, Graham AM, Lisbona R, Brassard R, Carpenter S, Symes JF. A persistent hindlimb ischemia model in the rabbit. *J Invest Surg.* 1994;7:49-60.
136. Bauters C, Asahara T, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Physiological assessment of augmented vascularity induced by VEGF in ischemic rabbit hindlimb. *Am J Physiol.* 1994;267:H1263-H1271.
137. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu L-Q, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Therapeutic angiogenesis: a single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest.* 1994;93:662-670.
138. Mugge A, Lopez JA, Piegors DJ, Breese KR, Heistad DD. Acetylcholine-induced vasodilatation in rabbit hindlimb in vivo is not inhibited by analogues of L-arginine. *American Journal of Physiology.* 1991;260:H242-247.
139. Tsurumi Y, Takeshita S, Chen D, Kearney M, Rossow ST, Passeri J, Horowitz JR, Symes JF, Isner JM. Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion. *Circulation.* 1996;94:3281-3290.
140. Wright CE, Angus JA, Korner PI. The interactive vascular resistance amplifier and non-interactive reviewers. *J Hypertens.* 2002;20:1023-1027; discussion 1027-1028.
141. Drost CJ. Homogeneous Full Flow Illumination to Ultrasonic Systems. In: *Proceedings of the 31st Annual Conference of Engineering in Medicine and Biology*; 1978:183.
142. Franklin DL, Baker, D.W., Ellis, R.M., Rushmer, R.F. A pulsed ultrasonic flowmeter. *IRE Trans Med El.* 1959;ME-6:204-206.
143. Drost CJ. Vessel Diameter-Independent Volume Flow Measurements Using Ultrasound. In: *Proceedings of San Diego Biomedical Symposium.* San Diego, CA: San Diego Biomed. Society; 1978:299-302.
144. Wright CE, Angus JA, Korner PI. Vascular amplifier properties in renovascular hypertension in conscious rabbits. Hindquarter responses to constrictor and dilator stimuli. *Hypertension.* 1987;9:122-131.

145. Herd JA, Barger AC. Simplified technique for chronic catheterization of blood vessels. *J.Appl.Physiol.* 1964;19:791-792.
146. Wright CE, Angus JA. Techniques to measure pharmacodynamics in the intact vasculature. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2000;44:385-394.
147. Dannenberg Jr. AM. Histochemical stains for macrophages in cell smears and tissue sections: β -galactosidase, acid phosphatase, nonspecific esterase, succinin dehydrogenase, and cytochrome oxidase. In: *Methods for studying mononuclear phagocytes*: Academic press Inc; 1981:375-396.
148. Higuchi S, Suga M, Dannenberg AM, Jr., Schofield BH. Histochemical demonstration of enzyme activities in plastic and paraffin embedded tissue sections. *Stain Technol.* 1979;54:5-12.
149. Henry TD, Annex BH, Azrin MA, McKendall GR, Willerson JT, Hendel RC, Giordano FJ, Klein R, Gibson M, Berman DS, Luce CA, McCluskey ER. Final results of the VIVA trial of rhVEGF for human therapeutic angiogenesis. In: *Circulation*; 1999:I-476.
150. 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. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34:775-787.
151. Baumgartner I, Rauh G, Pieczek A, Wuensch D, Magner M, Kearney M, Schainfeld R, Isner JM. Lower-extremity edema associated with gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor. *Ann Intern Med.* 2000;132:880-884.
152. Brekken RA, Overholser JP, Stastny VA, Waltenberger J, Minna JD, Thorpe PE. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 2 (KDR/Flk-1) activity by a monoclonal anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice. *Cancer Res.* 2000;60:5117-5124.
153. Baffi J, Byrnes G, Chan CC, Csaky KG. Choroidal neovascularization in the rat induced by adenovirus mediated expression of vascular endothelial growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:3582-3589.
154. Yonemitsu Y, Kaneda Y, Morishita R, Nakagawa K, Nakashima Y, Sueishi K. Characterization of in vivo gene transfer into the arterial wall mediated by the

- Sendai virus (hemagglutinating virus of Japan) liposomes: an effective tool for the in vivo study of arterial diseases. *Lab Invest.* 1996;75:313-323.
155. Helisch A, Schaper W. Angiogenesis and arteriogenesis-not yet for prescription. *Z Kardiol.* 2000;89:239-244.
156. Lee RL, Springer ML, Blanco-Bose WE, Shaw R, Ursell PC, Blau HM. VEGF gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression. *Circulation.* 2000;102:898-901.
157. van der Zee R, Murohara T, Luo Z, Zollmann F, Passeri J, Lekutat C, Isner JM. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation.* 1997;95:1030-1037.
158. Unger E. Experimental evaluation of coronary collateral development. *Cardiovasc Res.* 2001:497-506.
159. Baffour R, Berman J, Garb JL, Rhee SW, Kaufman J, Friedmann P. 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. *J Vasc Surg.* 1992;16:181-191.
160. van Belle E, Witzembichler B, Chen D, Silver M, Chang L, Schwall R, Isner JM. Potentiated angiogenic effect of scatter factor/hepatocyte growth factor via induction of vascular endothelial growth factor: the case for paracrine amplification of angiogenesis. *Circulation.* 1998;97:381-390.
161. Takeshita S, Tsurumi Y, Couffinahl T, Asahara T, Bauters C, Symes J, Ferrara N, Isner JM. Gene transfer of naked DNA encoding for three isoforms of vascular endothelial growth factor stimulates collateral development in vivo. *Lab Invest.* 1996;75:487-501.
162. Safi Jr. J, DiPaula Jr. AF, Riccioni T, Kajstura J, Ambrosio G, Becker LC, Anversa P, Capogrossi MC. Adenovirus-mediated acidic fibroblast growth factor gene transfer induces angiogenesis in the nonischemic rabbit heart. *Microvascular Research.* 1999;58:238-249.

163. Issbruecker K, Marti H, Hippenstiel S, Springmann G, Voswinckel R, Gaumann A, Breier G, Drexler H, Suttorp N, M. C. p38 MAP Kinase - a molecular switch between VEGF-induced angiogenesis and vascular hyperpermeability. *FASEB J.* 2003;17:262-265.
164. Harlow E, Lane D. *Using antibodies: a laboratory manual.* New York: Cold Spring Laboratory Press; 1999.
165. Heil M, Ziegelhoeffer T, Pipp F, Kostin S, Martin S, Claus M, Schaper W. Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *Am J Physiol.* 2002;283:H2411.
166. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol.* 2001;280:C1358-C1366.
167. Hendel RC, Henry TD, Rocha-Singh K, Isner JM, Kereiakes DJ, Giordano FJ, Simons M, Bonow RO. Effect of intracoronary recombinant human vascular endothelial growth factor on myocardial perfusion: evidence for a dose-dependent effect. *Circulation.* 2000;101:118-121.
168. Takeshita S, Pu L-Q, Stein LA, Sniderman AD, Bunting S, Ferrara N, Isner JM, Symes JF. Intramuscular administration of vascular endothelial growth factor induces dose-dependent collateral artery augmentation in a rabbit model of chronic limb ischemia. *Circulation.* 1994;90:II228-II234.
169. Danenberg HD, Fishbein I, Gao J, Monkkonen J, Reich R, Gati I, Moerman E, Golomb G. Macrophage depletion by clodronate-containing liposomes reduces neointimal formation after balloon injury in rats and rabbits. *Circulation.* 2002;106:599-605.
170. Pipp F, Heil M, Issbrücker K, Ziegelhoeffer T, Martin S, van den Heuvel J, Weich H, Fernandez B, Golomb G, Carmeliet P, Schaper W, Clauss M. The VEGFR-1 selective VEGF-homologue PlGF is arteriogenic: Evidence for a monocyte-mediated mechanism. *Circ Res.* 2003;92:378-385.
171. Braun-Dullaes R, Herold J, Pipp F, Fernandez B, Xing Z, Tillmanns H, Schaper W. Monozytentransplantation: Neue Möglichkeiten zur in vivo Verstärkung des Kollateralwachstums. In: *Z Kardiol.* Mannheim, Germany; 2002:I/115.

172. Buschmann I, Hoefler IE, van Royen N, Katzer E, Braun-Dulleaus R, Heil M, Kostin S, Bode C, Schaper W. GM-CSF: a strong arteriogenic factor acting by amplification of monocyte function. *Atherosclerosis*. 2001;159:343-356.
173. Seiler C, Pohl T, Wustmann K, Hutter D, Nicolet PA, Windecker S, Eberli FR, Meier B. Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Circulation*. 2001;104:2012-2017.
174. Waltenberger J, Kliche S, Kranz A, Mayr U, Fellbrich G, Autiero N, Conway E, Dehio C, Collen D, Carmeliet P. Die Potenzierung der VEGFR-Rezeptor-2-Aktivierung über VEGF-Rezeptor-1 wird durch die Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphat-Kinase vermittelt. *Z Kardiol*. 2002;91(1):1/61.
175. Bottomley MJ, Webb NJ, Watson CJ, Holt L, Bukhari M, Denton J, Freemont AJ, Brenchley PE. Placenta growth factor (PlGF) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from mononuclear cells and is co-expressed with VEGF in synovial fluid. *Clin Exp Immunol*. 2000;119:182-188.
176. Persico MG, Vincenti V, DiPalma T. Structure, expression and receptor-binding properties of placenta growth factor (PlGF). *Curr Top Microbiol Immunol*. 1999;237:31-40.
177. Asahara T, Chen D, Tsurumi Y, Kearney M, Rossow S, Passeri J, Symes JF, Isner JM. Accelerated restitution of endothelial integrity and endothelium-dependent function after phVEGF165 gene transfer. *Circulation*. 1996;94:3291-302.
178. Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K, Isner JM. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation*. 1998;97:1114-1123.
179. Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, Asahara T, Rosenfield K, Razvi S, Walsh K, Symes JF. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet*. 1996;348:370-374.
180. Barleon B, Siemeister G, Martiny-Baron G, Weindel K, Herzog C, Marme D. Vascular endothelial growth factor up-regulates its receptor fms-like tyrosine

- kinase 1 (FLT-1) and a soluble variant of FLT-1 in human vascular endothelial cells. *Cancer Res.* 1997;57:5421-5425.
181. Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:9349-9354.
182. Heil M, Hoefler I, van Royen N, Buschmann I, Schaper W. Reactive monocytemia promotes arteriogenesis after femoral artery occlusion in rabbit hindlimbs. In: *J Mol Cell Cardiol*; 2000:C7 (abstr).
183. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275:964-967.
184. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Embo J.* 1999;18:3964-3972.
185. Celletti FL, Waugh JM, Amabile PG, Brendolan A, Hilfiker PR, Dake MD. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med.* 2001;7:425-429.
186. Ziegler BL, Valtieri M, Porada GA, De Maria R, Muller R, Masella B, Gabbianelli M, Casella I, Pelosi E, Bock T, Zanjani ED, Peschle C. KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science.* 1999;285:1553-1558.
187. Ishida A, Murray J, Saito Y, Kanthou C, Benzakour O, Shibuya M, Wijelath ES. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in smooth muscle cells. *J Cell Physiol.* 2001;188:359-368.
188. Luttun A, Tjwa M, Moons L, Wu Y, Angelillo-Scherrer A, Liao F, Nagy JA, Hooper A, Priller J, De Klerck B, Compennolle V, Daci E, Bohlen P, Dewerchin M, Herbert JM, Fava R, Matthys P, Carmeliet G, Collen D, Dvorak HF, Hicklin DJ, Carmeliet P. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med.* 2002;1:831-840.

189. Jin K, Zhu Y, Siun Y, Mao X, Xie L, Greenberg D. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99:11946-11950.
190. Sondell M, Sundler F, Kanje M. Vascular endothelial growth factor is a neurotrophic factor which stimulates axonal outgrowth through the flk-1 receptor. *Eur J Neurosci.* 2000;12:4243-4254.
191. Laham RJ, Chronos NA, Pike M, Leimbach ME, Udelson JE, Pearlman JD, Pettigrew RI, Whitehouse MJ, Yoshizawa C, Simons M. Intracoronary basic fibroblast growth factor (FGF-2) in patients with severe ischemic heart disease: results of a phase I open-label dose escalation study. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36:2132-2139.
192. Udelson JE, Dilsizian V, Laham RJ, Chronos N, Vansant J, Blais M, Galt JR, Pike M, Yoshizawa C, Simons M. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 improves stress and rest myocardial perfusion abnormalities in patients with severe symptomatic chronic coronary artery disease. *Circulation.* 2000;102:1605-1610.
193. Rosengart TK, Lee LY, Patel SR, Kligfield PD, Okin PM, Hackett NR, Isom OW, Crystal RG. Six-month assessment of a phase I trial of angiogenic gene therapy for the treatment of coronary artery disease using direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing the VEGF121 cDNA. *Ann Surg.* 1999;230:466-470; discussion 470-472.
194. Rosengart TK, Lee LY, Patel SR, Sanborn TA, Parikh M, Bergman GW, Hachamovitch R, Szulc M, Kligfield PD, Okin PM, Hahn RT, Devereux RB, Post MR, Hackett NR, Foster T, Grasso TM, Lesser ML, Isom OW, Crystal RG. Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation.* 1999;100:468-474.
195. Isner JM, Baumgartner I, Rauh G, Schainfeld R, Blair R, Manor O, Razvi S, Symes JF. Treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) by intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor: preliminary clinical results. *J Vasc Surg.* 1998;28:964-673; discussion 73-75.

196. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J.* 1999;138:S419-420.
197. Moulton KS, Heller E, Konerding MA, Flynn E, Palinski W, Folkman J. Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* 1999;99:1726-1732.
198. Zhao Q, Egashira K, Inoue S, Usui M, Kitamoto S, Ni W, Ishibashi M, Hiasa Ki K, Ichiki T, Shibuya M, Takeshita A. Vascular endothelial growth factor is necessary in the development of arteriosclerosis by recruiting/activating monocytes in a rat model of long-term inhibition of nitric oxide synthesis. *Circulation.* 2002;105:1110-1115.
199. Brogi E, Winkles JA, Underwood R, Clinton SK, Alberts GF, Libby P. Distinct patterns of expression of fibroblast growth factors and their receptors in human atheroma and nonatherosclerotic arteries. Association of acidic FGF with plaque microvessels and macrophages. *J Clin Invest.* 1993;92:2408-2418.
200. Hariawala MD, Horowitz JR, Esakof D, Sheriff DD, Walter DH, Keyt B, Isner JM, Symes JF. VEGF improves myocardial blood flow but produces EDRF-mediated hypotension in porcine hearts. *J Surg Res.* 1996;63:77-82.
201. Cuevas P, Carceller F, Ortega S, Zazo M, Nieto I, Gimenez-Gallego G. Hypotensive activity of fibroblast growth factor. *Science.* 1991;254:1208-1210.
202. Isner JM, Vale PR, Symes JF, Losordo DW. Assessment of risks associated with cardiovascular gene therapy in human subjects. *Circ Res.* 2001;89:389-400.
203. Ferrara N, Alitalo K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med.* 1999;5:1359-1364.
204. Helisch A, Ware A. Therapeutic angiogenesis for ischemic heart disease. In: Maragoudakis E, ed. *Angiogenesis: From the Molecular to Integrative Pharmacology.* New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2000:327-350.
205. Simovic D, Isner JM, Ropper AH, Pieczek A, Weinberg DH. Improvement in chronic ischemic neuropathy after intramuscular phVEGF165 gene transfer in patients with critical limb ischemia. *Arch Neurol.* 2001;58:761-768.

206. Lazarous DF, Shou M, Scheinowitz M, Hodge E, Thirumurti V, Kitsiou AN, Stiber JA, Lobo AD, Hunsberger S, Guetta E, Epstein SE, Unger EF. Comparative effects of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on coronary collateral development and the arterial response to injury. *Circulation*. 1996;94:1074-1082.
207. Grimes C. Adenovirus FGF angiogenic gene therapy (AGENT) trial. In: *Late-Breaking Clinical Trials Session of 50th Annual American College of Cardiology*. Orlando, Fla; 2001.
208. Helisch A, Schaper W. Arteriogenesis: the development and growth of collateral arteries. *Microcirculation*. 2003;10:83-97.

X. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt folgenden Personen:

- Herrn Professor Dr. med. Dr. h. c. Wolfgang Schaper für die Überlassung des interessanten Themas und seine Betreuung im Verlauf der letzten drei Jahre, sowie als Direktor des Max-Planck-Institutes für die Genehmigung der Auslandsaufenthalte und Fortbildungen
- Herrn Professor Dr. R. Gerstberger für die spontane Bereitschaft, die Arbeit von Seiten des veterinärmedizinischen Fachbereichs der Justus-Liebig-Universität zu betreuen, sowie für unentwegtes Korrekturlesen und fruchtbare Kritik
- Herrn Dr. Matthias Heil für die intensive Betreuung und den unentwegten Ansporn während des experimentellen Teils, sowie für das Korrekturlesen, die immerzu vorhandene Bereitschaft zur Diskussion und die vielen Hilfestellungen in der „heilen Welt“ der Windows-Rechner
- Herrn PD. Dr. Matthias Clauss für die Anregungen, kritischen Fragen zu den Versuchen sowie Hilfestellungen in der Diskussion zur VEGF-Rezeptoren-Familie
- Der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaft e.V. für die Bereitstellung der finanziellen Mittel zur Erstellung dieser Doktorarbeit sowie zur Teilnahme an zahlreichen Kongressen im In- und Ausland
- Herrn Gerhard Stämmeler für die freundschaftliche Einführung in die geheime Welt der Apple-Computer und Herrn Gunther Schuster für dessen Vertretungen
- Herren Sigfried Langsdorff und Christoph Bingel für die Hilfe bei der Erstellung für den experimentellen Teil essentieller Utensilien und die Hilfestellung bei der Bedienung der Gerätschaften
- Frau Dr. Christine Wright für die genaue Anleitung zum Handling des Kaninchens im Rahmen von Tierversuchen, sowie für die Hilfestellung bei Fragen bezüglich der Vasoreaktivität der Kaninchenhintergliedmaße
- Frau Renate Nordgren für die Ordnung und den immer guten Kaffee, sowie die unentwegte Diskussion über die Großwetterlage
- Meinen Eltern für ihre Unterstützung, welche mir die Schulausbildung und das Studium ermöglichten

ISBN 3-936 815-66-6



Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH

35392 Gießen · Frankfurter Str. 89 · Tel.: 06 41/2 44 66 · Fax: 06 41/2 53 75

e-mail: Geschaeftsstelle@dvg.net · Homepage: <http://www.dvg.net>