

Aus der Abteilung für Kardiologie
der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor: Professor Dr. med. T. Meinertz

Die Rolle von Stickstoffmonoxid in der Arteriogenese

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Hendrik Sager

aus Nordenham

Hamburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 13.02.2006

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Herr Prof. Dr. med. T. Meinertz

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. R. Böger

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Herr PD Dr. med. J. Kähler

Inhaltsverzeichnis

1. Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2. Einführung in die Thematik	4
2.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen.....	4
2.1.1 Arterielle Verschlusskrankheiten	4
2.1.1.1 Koronare Herzerkrankung	4
2.1.1.2 Akuter Myokardinfarkt.....	4
2.1.1.3 Periphere arterielle Verschlusskrankheit.....	5
2.1.1.4 Therapiemöglichkeiten bei arteriellen Verschlusskrankheiten.....	5
2.2 Gefäßwachstum	6
2.2.1 Angiogenese.....	6
2.2.2 Vaskulogenese	7
2.2.3 Arteriogenese	7
2.3 Gefäßwachstumsstimulation.....	11
2.3.1 Fibroblasten Wachstumsfaktoren.....	12
2.3.2 Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor	13
2.3.3 Monozyten attrahierendes Protein 1.....	14
2.3.4 Stickstoffmonoxid.....	14
2.3.4.1 Allgemein	14
2.3.4.2 Chemische Eigenschaften.....	15
2.3.4.3 NO-Biosynthese	15
2.3.4.4 Isoformen der NO-Synthase	15
2.3.4.6 NO-Funktion.....	17
3. Material.....	20
3.1 Tiermodell	20
3.2 Ausguss-Modelle.....	20
3.3 Immunhistochemie	21
3.4 Western Blot-Analysen	23
3.5 Guanylat-Cyclase-Assay	27
3.6 Post mortem Angiographien	29
4. Methoden.....	30
4.1 Tiermodell	30
4.1.1 Allgemeines	30
4.1.2 Tier Operationen.....	30
4.1.2.1 Unilaterale Femoralarterienligatur.....	30

4.1.2.2 Unilaterale Femoralarterienligatur + Pumpenimplantation	31
4.1.2.3 Exitus letalis + Aortenkanülierung.....	31
4.2 Ausguss-Modelle	32
4.3 Immunhistochemie	33
4.3.1 Allgemein	33
4.3.2 Paraffin-Schnitte	34
4.3.2.1 Perfusionsfixierung und Gewebeentnahme	34
4.3.2.2 Erstellen der Schnitte	35
4.3.2.3 Immunhistochemie (polyklonaler Antikörper)	35
4.3.2.4 Immunhistochemie (monoklonaler Antikörper).....	36
4.3.3 Gefrierschnitte	37
4.3.3.1 Gewebeentnahme	37
4.3.3.2 Erstellen der Schnitte	38
4.3.3.3 Immunhistochemie (polyklonaler Antikörper)	38
4.3.3.4 Immunhistochemie (monoklonaler Antikörper).....	38
4.4 Western Blot-Analysen	39
4.5 Guanylat-Cyclase-Assay	42
4.6 Post mortem Angiographie	45
4.7 Statistik	45
5. Ergebnisse.....	46
5.1 Tiermodell	46
5.2 Enzymexpression	50
5.2.1 Immunhistochemische Analysen.....	50
5.2.2 Western Blot-Analysen.....	55
5.3 Enzymaktivität	59
5.4 Post mortem Angiographien	61
6. Diskussion	66
6.1 Ein in vivo Modell für Arteriogenese	66
6.2 Arteriogenese und Stickstoffmonoxid	67
7. Zusammenfassung	75
8. Literaturverzeichnis.....	77
9. Abkürzungsverzeichnis	86
10. Danksagung.....	88
11. Lebenslauf	89
12. Erklärung	90

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Wie im Folgenden ausführlich dargestellt, war es das Ziel zahlreicher Forschungsprojekte im Herz-Kreislauf-Bereich der letzten fünf bis zehn Jahre, das Wachstum natürlich bestehender Umgehungskreisläufe (Kollateralkreisläufe) zu fördern. Das Wachstum dieser Kollateralgefäße wird dabei als Arteriogenese bezeichnet [1, 2]. Diese ist bisher als ein Zwei-Phasen-Prozess mit Proliferation- und Remodeling-Phase verstanden worden. Um die Arteriogenese näher studieren zu können, muss zunächst einmal ein geeignetes Modell gefunden werden; ein Modell in dem Arteriogenese tatsächlich stattfindet.

Fragestellung 1

Anhand von Ausguss-Modellen, immunhistochemischen Analysen und Angiographien soll gezeigt werden, dass das von uns entwickelte in vivo Modell mit peripherer arterieller Insuffizienz am Hinterlauf der Ratte alle Voraussetzungen erfüllt, Arteriogenese im Tiermodell zu simulieren und somit Studien zum Kollateralwachstum zulässt.

Mögliche Wege der Stimulation der Arteriogenese gibt es viele [3]. Pharmakologische Substanzen, die potenziell in der Lage sind die Arteriogenese zu fördern, sind zahlreich. Das Monozyten-attrahierende Protein 1 (MCP-1) ist eindeutig ein potenter Stimulator der Arteriogenese und wirkt über eine Steigerung der Makrophagenakkumulation [4]. Aktivierte Monozyten/Makrophagen verstärken nachweislich die Arteriogenese; sie sezernieren Gefäßwachstumsfaktoren und Metalloproteinasen [5]. Andererseits ist die Wirkung weiterer Substanzen bisher nicht eindeutig geklärt. So ist die Rolle von Stickstoffmonoxid (NO) im Kollateralgefäßwachstum (Arteriogenese) nach wie vor Gegenstand kontroverser Diskussionen [3]. In der Literatur lassen sich überwiegend proarteriogene Eigenschaften von NO finden:

Einerseits erhöht NO signifikant den Blutfluss durch Kollateralarterien [6, 7]. NO stimuliert zudem die Proliferation und Migration von Endothelzellen in vitro [8, 9]. Auch transgene Mäuse, denen die eNOS fehlt, zeigen verminderte arteriogene Eigenschaften [10, 11]. Auch die arteriogenen und angiogenen Effekte der Gefäßwachstumsfaktoren VEGF-121 und bFGF setzen eine normale NO-Produktion voraus. Beide Faktoren wirken hierbei über NO [12, 13].

Andererseits ergeben sich im Zusammenspiel vom proarteriogenen NO und dem proarteriogenem MCP-1 auch gewisse Widersprüche:

So vermindert NO die MCP-1 Produktion in Makrophagen und Endothelzellen [14, 15]. Auch führt NO zu einer verminderten Expression von Zell-Adhäsions-Molekülen (wie z. B.

CD11, CD18, VCAM- und ICAM-1) [16, 17]. Diese Moleküle sind aber für die Akkumulation von Makrophagen an die Gefäßwand wichtig und für das Kollateralwachstum unerlässlich. Weiter ist die Hauptstimulation der Arteriogenese eine erhöhte Scherkraft [18]. Diese wiederum bewirkt am Endothel eine erhöhte Produktion von NO durch eine Stimulation der eNOS [19]. NO bewirkt andererseits durch Hemmung von MCP-1 [14] eine verminderte Monozyten/Makrophagenakkumulation. Auch sind Makrophagenadhäsionen am Endothel nur unter niedrigen Scherkraftbedingungen beobachtet worden [20]. Das Kollateralgefäßwachstum wiederum ist durch eine vermehrte Makrophagenakkumulation in der Gefäßwand charakterisiert [21]. So stellt sich die Frage, wie passt der einerseits gemeinsame Stimulus zu einer gehemmten, für die Arteriogenese aber essentiellen Makrophagenakkumulation?

Wir hypothetisieren, dass sowohl NO wie auch MCP-1 pro-arteriogen wirken. Da NO aber die Adhäsion, Migration und damit die Akkumulation von Makrophagen durch eine verminderte MCP-1 Produktion verhindert, ergibt sich hier ein Widerspruch. Damit müssen die proarteriogenen Effekte der Substanzen auf zeitlich unterschiedliche Phasen der Arteriogenese verteilt sein. Um dies zu verstehen, muss eine NO- und Makrophagen-Kinetik aufgestellt und dabei die unterschiedlichen Phasen der Arteriogenese berücksichtigt werden.

Von der Makrophagen-Kinetik in der Arteriogenese weiß man, dass Makrophagen 12 h nach Initiierung der Arteriogenese an die Gefäßwand adhären und durchs Endothel migrieren [18]. Hierzu sind niedrige Scherkraftverhältnisse nötig [20]. Drei Tage nach Initiierung der Arteriogenese vermindert sich die Makrophagenanzahl in der Gefäßwand wieder, nach 7 d sind sie fast ganz verschwunden [22].

Eine NO-Kinetik im Kollateralwachstum fehlt bisher. NO dabei direkt in Kollateralgefäßen nachzuweisen ist technisch nicht möglich gewesen.

2. Fragestellung

Daher haben wir die Expression der Produzenten von NO (iNOS und eNOS), ihres Aktivators (pAkt), des zellulären NO-Rezeptors (sGC) und weiterer Enzyme der NO-Signalkaskade (PKG, p-VASP) mittels Immunhistochemie, Western-Blotting und Enzym-Assays zu verschiedenen Zeiten nach Femoralarterienokklusion analysiert.

So kann indirekt auf die NO-Konzentration geschlossen und eine Kinetik aufgestellt werden. Die Ergebnisse werden dann mit der Makrophagenkinetik korreliert. Anhand dieser Daten planen wir, in einem hypothetischen Ansatz einen zeitlichen Ablauf der Arteriogenese abzuleiten und diesen weiter in verschiedene Phasen aufzuteilen.

3. Fragestellung

Im dritten Teil der Arbeit soll der Zusammenhang zwischen MCP-1 induzierter Makrophagenakkumulation und NO-System in der Arteriogenese funktionell beleuchtet werden. Wir planen hiermit, eine Aussage zur Abhängigkeit von Makrophagenakkumulation und NO-System während des Kollateralwachstums zu treffen. Hierzu sind post mortem Angiographien angefertigt worden. Beurteilt wurde dabei das kollaterale Netzwerk in Gegenwart einer endogenen NO-Synthasen-Hemmung und die Wirkung der proarteriogenen Substanz MCP-1 in Gegenwart einer NO-Synthasen-Hemmung.

2. Einführung in die Thematik

2.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen

2.1.1 Arterielle Verschlusskrankheiten

Unter dem Begriff der arteriellen Verschlusskrankheiten werden Prozesse zusammengefasst, die zu Obstruktionen der arteriellen Strombahnen führen. Häufig sind arterielle Verschlusskrankheiten an den Herzkranzgefäßen (koronare Herzkrankheit) und an den Gliedmaßengefäßen (periphere arterielle Verschlusskrankheit) [23].

2.1.1.1 Koronare Herzerkrankung

In den westlichen Industrieländern ist die koronare Herzerkrankung (KHK) die häufigste Todesursache beim Menschen [24]. 5-10% der Männer und 2-5% der Frauen in Deutschland leiden an einer KHK [25]. Bei der KHK entwickeln sich Einengungen im Verlauf der Koronararterien. Je nach Stenosierungsgrad können diese den Koronarfluss behindern und somit eine Sauerstoffunterversorgung des Herzmuskelgewebes auslösen. Ursache der KHK ist die Arteriosklerose der Koronararterien. Durch Ablagerungen von Lipiden, Bindegewebe und Kalk in der Gefäßwand kommt es zur Lumeneinengung in den Herzkranzgefäßen mit Beeinträchtigung der Blutzufuhr zum Myokard [25]. Es resultiert eine relative oder absolute Ischämie des Herzmuskels.

Klinisch manifestiert sich die KHK mit Krankheitsbildern wie der Angina pectoris, dem Myokardinfarkt, der Linksherzinsuffizienz oder Herzrhythmusstörungen.

2.1.1.2 Akuter Myokardinfarkt

Der akute Myokardinfarkt ist Folge einer Myokardischämie, die durch Unterbrechung der Koronardurchblutung zur Ausbildung einer Gewebsnekrose führt. Ursache ist meist ein thrombotischer Koronararterienverschluss auf dem Boden einer KHK [25]. Man unterscheidet einen alle Wandschichten durchsetzenden transmuralen Infarkt von einem nicht transmuralen (subendokardialen) Infarkt.

In der Bundesrepublik Deutschland erleiden ca. 350.000 Patienten pro Jahr einen Herzinfarkt. 35% der Infarkte verlaufen dabei tödlich. Haupttodesursachen sind schwer beherrschbare Rhythmusstörungen und die Ausbildung einer progredient verlaufenden Herzinsuffizienz. Etwa 20% der Patienten, die den akuten Herzinfarkt überleben, versterben innerhalb des nachfolgenden Jahres.

2.1.1.3 Periphere arterielle Verschlusskrankheit

Die pAVK umfasst stenosierende und okkludierende Veränderungen der die Extremitäten versorgenden Arterien. Diese führen zu einer Minderperfusion und Sauerstoffunterversorgung weiter stromabwärts gelegener Abschnitte. In bis zu 90% sind dabei die unteren Extremitäten betroffen. Im Stadium I (nach Fontaine) der Erkrankung ist der Patient zunächst noch asymptomatisch, obwohl sich klinisch eine Verschlusskrankheit objektivieren lässt. Im Stadium II klagt der Patient über Schmerzen (häufig in der Wadenmuskulatur), die streng belastungsabhängig sind. Im Stadium III kommt es bereits in Ruhe zu Schmerzen in den Extremitäten. Das Stadium IV ist durch eine ischämisch bedingte Nekrose gekennzeichnet [23].

Die Ursache der pAVK ist in bis zu 95% aller Fälle die Arteriosklerose; der Rest entfällt auf eine Reihe von entzündlichen Gefäßkrankheiten [25]. Meist entsteht der Gefäßverschluss in zwei Phasen. Auf die langsam progrediente Stenose, bedingt durch eine artherosklerotische Plaque, folgt der thrombotische Totalverschluss. Diagnostisch kommen neben der Palpation und Auskultation die Doppler- und Duplex-Sonographie, die Oszillographie und die Angiographie in Frage.

Periphere arterielle Durchblutungsstörungen werden bereits bei 2,4% der 35 jährigen Männer gefunden; die Prävalenz steigt auf 34% bei den 65 jährigen Männern. Die asymptomatische Form (Stadium I) ist dabei dreimal häufiger als die symptomatische (Stadien II-IV). Männer sind bis zu fünfmal häufiger betroffen als Frauen [25].

2.1.1.4 Therapiemöglichkeiten bei arteriellen Verschlusskrankheiten

Bei oben genannten Zahlen liegt es nahe, dass man in den letzten fünf Jahrzehnten die Forschung auf dem kardiovaskulären Gebiet intensiviert und nach neuen Therapieformen gesucht hat. Es sind bedeutende Fortschritte in der Behandlung von akuten Herzinfarkten und in ihrer Prophylaxe erreicht worden. So kann die Gabe von Nitraten zum Beispiel über eine Verbesserung des Koronarflusses zu einer Infarktgrößenreduktion führen [25]. β -Blocker sind indiziert, da sie das Herz vor exzessiven Katecholamineinflüssen abschirmen und sich günstig auf Herzrhythmusstörungen auswirken.

Da in über 90% der akuten Myokardinfarkte ein thrombotischer Koronararterienverschluss die Ursache ist, kann eine rechtzeitige Rekanalisation mittels thrombolytischer Therapie zur Reperfusion des ischämischen Myokardgewebes und damit auch zur Reduktion der Infarktgröße führen. Neben der Thrombolysetherapie sind mit der Bypass-Operation und der Herzkatheter-Untersuchung mit Ballondilatation weitere revaskularisierende Verfahren entwickelt worden. Diese Verfahren sind aber z. T. mit erheblichen Komplikationen behaftet. So wird z. B. bei der Ballondilatation trotz Einführung der Stentimplantation mit Restenose-Raten bis zu 30% gerechnet.

Es ist deshalb nicht verwunderlich, dass neben diesen operativen/interventionellen Maßnahmen auch verstärkt nach Möglichkeiten einer biologischen Revaskularisierung gesucht wird [26-28].

Ein Ansatzpunkt für eine solche Therapiemöglichkeit kann zum Beispiel so aussehen:

Bei Verschluss oder Stenose eines Gefäßes versucht man das Gefäßwachstum so zu stimulieren, dass sich alternative Gefäßverbindungen bilden. Der Blutfluss könnte nun an der Stenose vorbei durch eine Art Umgehungskreislauf (Kollateralkreislauf) aufrechterhalten werden. Tatsächlich führt die Kollateralenentstehung zu einer Kompensation des Gefäßverschlusses bei vielen Patienten. Es ist gezeigt worden, dass eine gute Kollateralisierung mit einer verbesserten Überlebensrate nach Herzinfarkt assoziiert ist. Meistens ist die Kompensation jedoch unzureichend, so dass nach Wegen gesucht wird, diese zu beeinflussen.

2.2 Gefäßwachstum

Grundsätzlich unterscheidet man drei Arten des Gefäßwachstums:

2.2.1 Angiogenese

Die Angiogenese ist die am besten beschriebene Form des Gefäßwachstums [2]. Der Begriff Angiogenese beschreibt das Wachstum bereits existierender Kapillaren zu einem neuen kapillären Netzwerk. Dabei sprossen die neuen Gefäße aus den bereits vorhandenen heraus. Die aktivierte Angiogenese bildet Gefäße auf Kapillar-Niveau, also mit einem Durchmesser von 5 - 8 Mikrometern [29].

Unter physiologischen Bedingungen hat das Endothel eine Vielzahl von Funktionen: Aufrechterhaltung der Hämostase, Abwehrreaktionen, angiogenes Aussprossen während Zellreparaturvorgängen und pathologischen Vorgängen. Es liegt daher auf der Hand, dass die Angiogenese in vivo strikten Kontrollmechanismen unterliegt. Sollten diese aber ausfallen, hat die Angiogenese z. B. Anteil am Tumorwachstum und Tumervaskularisierung, an rheumatischer Arthritis, sowie an Retinopathien (z. B. bei Rubeosis iridis).

Die Angiogenese an sich ist ein komplexes Phänomen, welches sich aus unterschiedlichen Einzelprozessen zusammensetzt: endotheliale Migration und Proliferation, extrazelluläre Proteolyse, endotheliale Differenzierung in kapilläre Röhren und vaskuläre Umbauprozesse (Remodeling).

Allen neu entstandenen Kapillarschläuchen ist gemeinsam, dass sie keine glatten Muskelzellen in der Gefäßwand aufweisen. Aufgrund dessen sind die ausgesprosten Kapillaren auch vermehrt rupturfähig [30-38].

Ischämie und die damit verbundene Hypoxie sind die Hauptstimulantien der Angiogenese [39, 40]. Der Abfall des lokalen Sauerstoff-Partial-Druckes stimuliert die Zellen in der betroffenen Region zur Synthese von angiogenen Faktoren (z.B. VEGF) und führt daher zu einer Hochregulierung des Hypoxie induzierten Faktors-1 (HIF-1) [41].

Lange Zeit ging man davon aus, dass durch Angiogenese der Verlust einer Arterie kompensiert werden kann. Dieses ist aus verschiedenen Gründen aber nicht der Fall:

Um funktionell eine Arterie zu ersetzen, würde es einer sehr großen Anzahl an Kapillaren bedürfen. Kein Gewebe könnte so viele Kapillaren aufnehmen. Zudem ist der Gefäßwiderstand in den zuführenden Arterien viel niedriger als der im nachgeschalteten Kapillarnetz. Der periphere Gefäßwiderstand würde derart ansteigen, dass das Herz außerstande wäre, gegen diesen Druck anzupumpen [42]. Des Weiteren ist die Distanz zwischen ischämischem Gebiet und arteriellem Verschluss zu groß. Nur in der ischämischen Region findet sich Kapillarwachstum. Am Ort des Verschlusses dagegen bildet sich eine Kollateralzirkulation, aber keine Ischämie und keine Kapillarsprossung.

Sprossende Kapillaren sind außerdem nicht in der Lage, glatte Muskelzellen zu rekrutieren. Ohne diese ist die Bildung neuer Arterien unmöglich [42]. Die Angiogenese kommt therapeutisch bei arteriellen Verschlüssen oder Stenosen somit nicht in Betracht.

2.2.2 Vaskulogenese

Die Vaskulogenese per se ist definiert als eine Differenzierung von vaskulären endothelialen Vorläuferzellen und deren Vereinigung zu einem primitiven Gefäßnetzwerk. Streng genommen wird der Begriff Vaskulogenese nur in Zusammenhang mit der Formierung von neuen Blutgefäßen während der Embryogenese benutzt. Dabei differenzieren sich mesenchymale Zellen zunächst zu Hämangioblasten. Diese wiederum aggregieren und bilden sogenannte Blutinseln. Die inneren Zellen dieser Blutinseln differenzieren sich zu hämatopoetischen Vorläuferzellen, die äußeren zu primitiven Endothelzellen, aus denen die ersten primitiven Blutgefäße hervorgehen [29]. Nach und nach entsteht aus diesen dann ein komplex organisiertes Netzwerk aus miteinander kommunizierenden Blutgefäßen; der fetale Blutkreislauf [38, 43-48].

2.2.3 Arteriogenese

Der menschliche Organismus selber ist in der Lage, bei Gefäßverschlüssen oder Gefäßstenosen eigene Umgehungskreisläufe, sogenannte Kollateralkreisläufe zu bilden. Diesen Prozess kann man sich wie die Bildung natürlicher Bypässe vorstellen. Bereits vorhandene (präexistente) Kollateralen, meist Arteriolen-Arteriolen-Anastomosen mit

einem Durchmesser von 30 - 50 Mikrometern [42], können sich zu großen Kollateralgefäßen [49] entwickeln. Diese entsprechen funktionell dann kleinen Arterien. Dabei proliferieren die kleinen Arteriolen, so dass sie sich auf das 25-fache ihres ursprünglichen Durchmessers erweitern [42, 50, 51], die Anzahl ihrer glatten Muskelzellschichten vermehren und eine neue Tunica intima (Neointima) bilden [52]. Dieser Vorgang wird Arteriogenese genannt. Große Kollateralgefäße sind potentiell in der Lage, Stenosen oder Verschlüsse in den Arterien zu kompensieren.

Der Begriff „Arteriogenese“ wurde Mitte der Neunziger von Schaper, Ito und ihren Kollegen eingeführt, da es häufig zu Verwechslungen zwischen Angiogenese und Kollateralarterienwachstum (Arteriogenese) gekommen war. Die Arteriogenese ist scharf von der Angiogenese abzugrenzen. Der Terminus ist international akzeptiert und vielfach zitiert worden [2].

Hypothetischer Mechanismus

Eine progressive Stenose (oder eine akuter Verschluss) führt zu einem Druckabfall in den poststenotischen Gefäßen. Wenn prä- und poststenotische Regionen über präexistierende Arteriolen verbunden sind, führt dies zu drastischen Veränderungen in den Flußverhältnissen innerhalb der Kollateralgefäße. Die Schubspannung wird drastisch erhöht und erhöht damit auch die Scherkräfte (shear stress), die auf das Endothel wirken. Man geht davon aus, dass dieses die Prozesse (s. unten) anstößt und damit die Arteriogenese initiiert [18].

Das Kollateralgefäßwachstum besteht aus zwei Phasen: Proliferation und Remodeling. Diese sind aber nur bedingt voneinander abgrenzbar und verlaufen zeitlich zum Teil parallel.

Proliferation

Als erstes erscheinen alle Zell-Zell-Verbindungen in der Arteriolengefäßwand dilatiert, überstreckt und sogar beschädigt. Plasmaproteine und Erythrozyten treten durch geschädigte Gefäßwände in die extrazelluläre Matrix ein [53]. Dies lockt Entzündungszellen (v. a. Monozyten) an. Es zeigt sich das bunte Bild einer Entzündung.

Die Endothelzellen werden durch die erhöhte Schubspannung aktiviert und zur Proliferation angeregt. Unter diesen Bedingungen treten sie in die G₁-Phase ein und können ihren Zellzyklus innerhalb von 22 Stunden beenden [54].

Das aktivierte Endothel wirkt wie ein Anziehungspunkt (chemoattractant) auf im Blut zirkulierende Monozyten. Diese adhären über bestimmte Adhäsionsmoleküle (so wird z. B. der Rezeptor für das Adhäsionsmolekül ICAM-1 durch das aktivierte Endothel hochreguliert [18]) an das Endothel und treten dann in den subintimalen Raum über [21,

55]. Das Anlocken von Monozyten wird über bestimmte, vom aktivierten Endothel gebildete Zytokine vermittelt. Hierzu zählen vor allem das MCP-1, der TGF- β und der GM-CSF [42, 56]. Die adhärenzten Monozyten sind nun in der Lage, bestimmte Wachstumsfaktoren und Metalloproteinasen zu bilden.

Neueren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe zufolge, spielen in der Arteriogenese aber nicht wie bisher angenommen die zirkulierenden Zellen die dominierende Rolle [22]. Es hat vielmehr den Anschein, als würde den gewebständigen Zellen und ihren gewebständigen Vorläufern eine größere Rolle zukommen. In Experimenten mit Ratten konnte durch die Gabe des Zytostatikums Cyclophosphamid eine Depletion des Knochenmarks erreicht werden. Dies führte zu einer signifikanten Panzytopenie; zirkulierende Monozyten wurden so auf 1% ihrer ursprünglichen Anzahl reduziert. Erstaunlicherweise aber hatte dieses weder einen Effekt auf die Akkumulation und Proliferation von Makrophagen innerhalb der Kollateralgefäßwände, noch auf die Proliferation der Kollateralgefäße (Endothelzellen, glatte Muskelzellen) selber. Aus dem Knochenmark kommende Stammzellen lagerten sich über den gesamten Zeitraum der Arteriogenese nicht in der Kollateralgefäßwand ab.

Es liegt die Vermutung nahe, dass die initiale Phase des Kollateralwachstums durch eine lokale Proliferation von gewebständigen und nicht von zirkulierenden Vorläuferzellen charakterisiert ist. Diese Untersuchungen schließen nicht aus, dass eine geringe Anzahl an „Vorläufer-Monozyten“ in das Gefäß migriert, lokal proliferiert und differenziert.

Neointima

Glatte Muskelzellen migrieren in die Tunica intima (Intima), durchbrechen dabei auf dem Weg die Lamina elastica interna [18]. In der Intima dann setzt ihre Proliferation ein [57]. Sie sind im Wesentlichen an der Bildung der neuen Intima (Neointima) beteiligt [58]. Dabei ordnet sich die neue, glatte Muskulatur in einer longitudinalen und einer helikalen Richtung an. Es sind zumeist kaum differenzierte Zellen, die wenig von ihrer eigentlichen Ultrastruktur besitzen; sie verfügen z. B. kaum über kontraktile Aktin-Filamente. Ihre Funktion liegt in der Synthese. So bilden sie z. B. Kollagen und Elastin für eine neue extrazelluläre Matrix [52]. Letztendlich wird auch die neue Lamina elastica interna durch sie gebildet [18]. Die Bildung einer neuen Intima lässt sich also durch eine endotheliale Schädigung bei gleichzeitig überschießenden Reparaturvorgängen beschreiben [59].

Remodeling von Arteriolen in Kollateralarterien

Der Begriff Remodeling (vaskuläre Umbauprozesse) stammt eigentlich aus der Arteriosklerose-Forschung. Hier wird er benutzt, um einen Prozess zu beschreiben, der eine normale Gefäßfunktion in Gegenwart einer Stenose aufrecht zu erhalten versucht.

Mit einer Steigerung des ursprünglichen Diameters um den Faktor 25 und einer Zunahme der Gewebemasse um den Faktor 50 ist die Arteriogenese das beeindruckendste Beispiel für Remodeling [5, 60].

Die Proliferation von glatten Muskelzellen und Endothel allein kann kein Gefäßwachstum vorantreiben. Vergrößerte Arteriolen und Arterien im Umbau benötigen Platz. Dieser kann nur vom Gewebe, in das das Gefäß eingebettet ist, zur Verfügung gestellt werden. Es findet daher ein kontrollierter Abbau des älteren, kleineren Gefäßes statt, begleitet von einem Abbau der umgebenden extrazellulären Matrix. Ein Remodeling-Prozess findet also nur dort statt, wo die das Gefäß umgebende Grundsubstanz aus Kollagen und Elastin durch Proteasen (sogenannte Matrix-Metalloproteinasen, z.B. MMP-2, MMP-9) aufgelöst wird [5, 60]. Diese Proteasen werden von der glatten Muskulatur der Gefäßwand gebildet. Auch die durch die Entzündung und MCP-1 angelockten Monozyten lösen die extrazelluläre Matrix auf.

Die glatten Muskelzellen erlangen somit mehr Spielraum in ihrer Beweglichkeit. Der größte Teil migriert in die Intima, ein Teil teilt sich an Ort und Stelle, der Rest geht durch Apoptose zu Grunde oder wird von anderen glatten Muskelzellen phagozytiert [61]. Sind die glatten Muskelzellen erst in der Intima angelangt, haben sie eine höhere mitotische Aktivität als die in der Media verbliebenen glatten Muskelzellen.

Kollateralgefäße wachsen oft in noch sauerstoffreichem Gewebe; Hypoxie ist somit im Gegensatz zur Angiogenese kein Stimulator [39]. Kollateralgefäßwachstum ist zudem von Entzündungszellen (v. a. Makrophagen) abhängig. Angiogenese dagegen kann von Entzündungszellen induziert werden, aber auch in entzündungsfreier Umgebung stattfinden [29, 62].

Die biologische Wichtigkeit von Kollateralgefäßen wurde in den letzten Jahrzehnten kontrovers diskutiert. Generell akzeptiert ist mittlerweile, dass durch rekrutierte präexistierende Kollateralgefäße einer Ischämie vorgebeugt werden kann, und dass sie protektiv gegen Gewebeschäden und Infarkte wirken [63]. Für die Koronarzirkulation im einzelnen konnte gezeigt werden, dass Kollateralgefäße die Größe des beschädigten Herzmuskel im Falle eines Infarktes verkleinern und damit letztendlich auch die Mortalität senken [64].

Zusammenfassend ist festzustellen: Die Arteriogenese ist die wahrscheinlich einzige Art des Gefäßwachstums, welche potentiell in der Lage ist, arterielle Gefäße zu ersetzen [42].

2.3 Gefäßwachstumsstimulation

So unterschiedlich die Arten des Gefäßwachstums, so unterschiedlich sind auch die Arten der Stimulation. Grundsätzlich kann das Gefäßwachstum über so genannte Wachstumsfaktoren oder über verschiedene Chemokine stimuliert werden.

Die Forschung rund um das Gefäßwachstum machte einen großen Sprung nach vorne, als in den 80iger Jahren dieses Jahrhunderts die ersten genetisch hergestellten Wachstumsfaktoren kommerziell erhältlich waren [29].

Die folgende Abbildung zeigt, welchen Faktoren eine angiogene, eine arteriogene oder eine beide Prozesse stimulierende Wirkung zugesprochen wird.

Grundsätzlich gilt: Angiogene Faktoren induzieren eher die Proliferation von Endothelzellen, arteriogene Faktoren eher die Proliferation von glatten Muskelzellen.

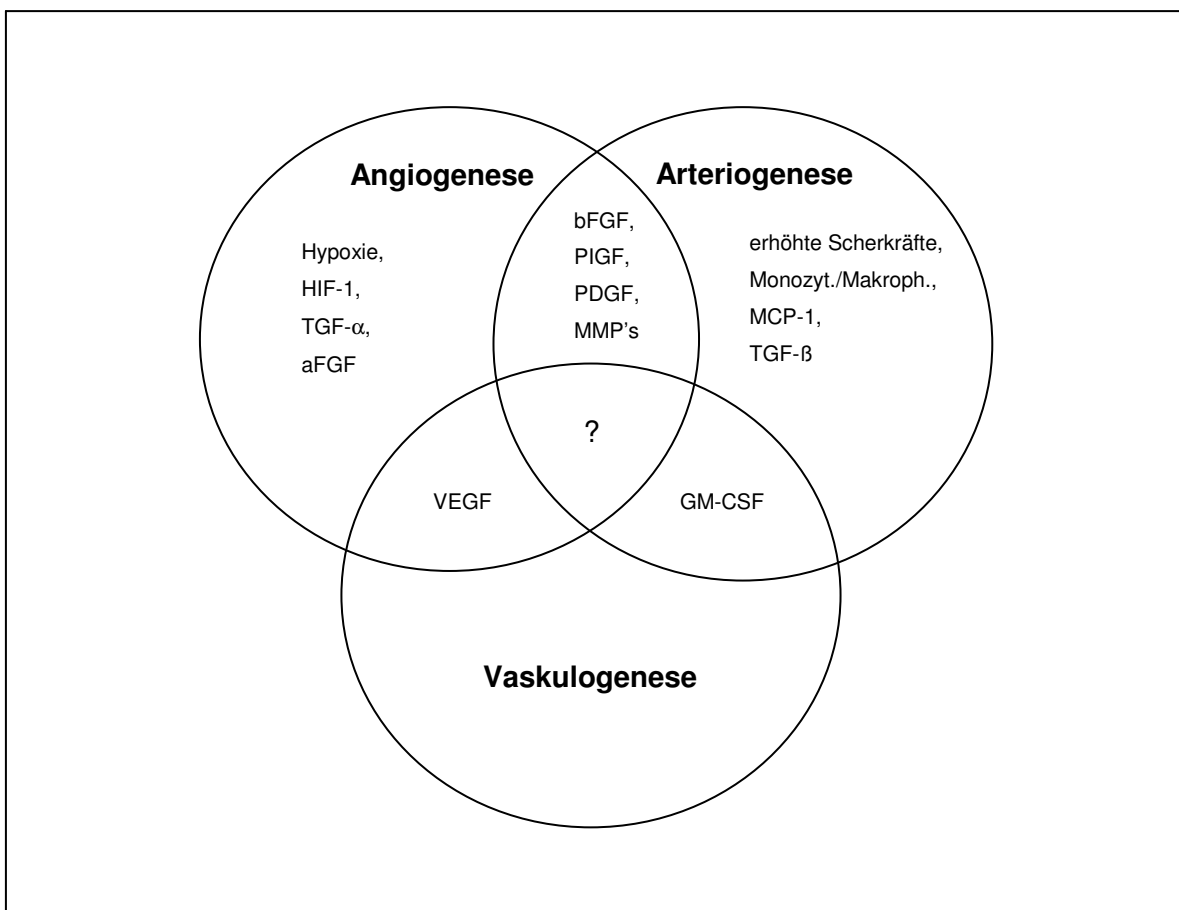


Abb. 2.3.1: Drei unterschiedliche Arten des Gefäßwachstums und ihre Stimulation, Grafik adaptiert von [65]

Es konnte für verschiedene Wachstumsfaktoren gezeigt werden, dass sie nach intraarterieller Injektion im Tiermodell signifikant den kollateralen Blutfluss steigern. Kollateralwachstum kann also therapeutisch stimuliert werden [66-68].

Auch das große Potential der Gentherapie ist für die kardiovaskulären Erkrankungen entdeckt worden. 1994 starteten die ersten klinischen Studien am Menschen. Zunächst konzentrierte man sich auf die Behandlung peripherer arterieller Verschlusskrankheiten mit dem Wachstumsfaktor VEGF. Seit dem sind viele weitere angiogene Wachstumsfaktoren in klinischen Studien zur Behandlung der pAVK getestet worden. Seit 1997 macht man sich das VEGF Gen auch in der Behandlung von ischämischen Herzerkrankungen zu nutze. Es konnte ein Verbesserung der klinischen Symptome erreicht werden [69-79].

Alle randomisiert kontrollierten Studien dagegen zeigten keine Verbesserungen im Vergleich zu Placebo, wobei ein ausgeprägter Placeboeffekt besonders auffällig war. Grund dieser bisher enttäuschenden Ergebnisse ist vermutlich mangelndes und rudimentäres Verständnis der physiologischen Vorgänge um das Kollateralwachstums. Eine bessere Erforschung der Mechanismen der Arteriogenese, welches auch primäres Ziel dieser Arbeit ist, ist Voraussetzung für die Planung klinischer Studien.

Im Folgenden werden zunächst einmal die klassischen angiogenen Wachstumsfaktoren FGF und VEGF beschrieben. Anschließend werden zwei arteriogene Wachstumsfaktoren vorgestellt. Ihre genauere Wirkungsweise in der Arteriogenese zu beleuchten, ist Gegenstand dieser Dissertation.

2.3.1 Fibroblasten Wachstumsfaktoren

Die 1982 entdeckten Fibroblasten Wachstumsfaktoren (FGF, fibroblast growth factor) sind Polypeptide und gehören in die unübersichtliche Klasse von Zytokinen. Abrahams et al. konnten 1986 FGF isolieren, reinigen, klonieren und sequenzieren [80]. Es sind zurzeit mindestens 21 Fibroblasten Wachstumsfaktoren bekannt. Sie gehören in die Familie der Heparin-bindenden Polypeptide [81, 82] und besitzen eine hohe Homologie. Ihr Molekulargewicht liegt zwischen 16 - 32 kDa. Der saure Fibroblasten Wachstumsfaktor (acidic FGF, aFGF oder FGF-1) und der basische Fibroblasten Wachstumsfaktor (basic FGF, bFGF oder FGF-2) sind die am besten charakterisierten Mitglieder. FGF dienen als Mitogene für Zellen, die mesodermalen oder neuroektodermalen Ursprungs sind (also z.B. für Endothelzellen, glatte Gefäßmuskelzellen, Glia-Zellen und Neurone) [83, 84].

Basic FGF ist ein Mitogen sowohl für Endothel- als auch für glatte Muskelzellen [85]. Deshalb verstärkt er auch Arterio- und Angiogenese in experimentellen in vivo Modellen [86]. Es konnte sowohl am Rattenhinterlauf wie auch am Hundeherzen gezeigt werden, dass eine intraarterielle Infusion von bFGF signifikant den Kollateralfluß nach arterieller Okklusion steigern konnte [51, 87]. In einer in groß angelegten Studie konnte dies jedoch nicht reproduziert werden [88].

Schaper et al. konnten FGF in Schweineherzen isolieren und sequenzieren. Es stellte sich heraus, dass das Herz die reichste Quelle von FGF-1 mRNA ist [89]. Weiter konnte aber nicht gezeigt werden, dass sich die FGF Expression während der Bildung eines Kollateralkreislaufes (nach Koronararterienligatur) veränderte. In Kaninchen mit Femoralarterienligatur blieb die Transkription von FGF1/2 unverändert. Einzig allein der FGF Rezeptor 1 wurde für einen kurzen Zeitraum hochreguliert [90]. Es liegt daher nahe, dass weniger die Liganden als die Rezeptoren selber in der Anfangsphase des Gefäßwachstums eine wichtige Rolle zu spielen scheinen.

2.3.2 Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor

1984 wurde ein weiterer Wachstumsfaktor entdeckt [91]. Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) ist ein Glykoprotein mit einem molekularen Gewicht von über 45 kD. Seine wichtigste Funktion ist die des Endothel spezifischen Mitogens (erhöhte Proliferation und Akkumulation von Endothelzellen). VEGF besitzt zwei unterschiedliche Tyrosin-Kinase-Rezeptoren [92]. Die mitogene Wirkung wird hauptsächlich über den sich in Endothelzellen befindlichen VEGF-Rezeptor-2 (VEGFR-2, KDR) vermittelt [93].

Über seinen anderen endothelialen Rezeptor (VEGF-Rezeptor-1, VEGF-1, Flt-1) bewirkt VEGF eine vermehrte NO-Freisetzung. So konnte hier gezeigt werden, dass eine VEGFR-1 Blockade zu einer verminderten NO-Freisetzung führte. Die Endothelzellen zeigten daraufhin eine verminderte Differenzierungsfähigkeit (verminderte Formation eines kapillären Netzwerkes). Zudem war die Anzahl der kapillären Verbindungen vermindert. Es kam somit zu einer gedrosselten Angiogenese [93].

Des Weiterem stimuliert VEGF auch die Endothelzell-Migration. Im Zuge dessen konnte gezeigt werden, dass eine eNOS Aktivierung (über eine Phosphorylierung von Serin-1177 durch die Akt) für die VEGF-vermittelte Endothelzellen-Migration wichtig ist [8]. VEGF kann auch direkt die Gefäßpermeabilität für Wasser und auch für größere Moleküle erhöhen. Zudem wirkt es auch direkt vasodilatatorisch [94]. Auch eine Monozyten anlockende Wirkung von VEGF konnte nachgewiesen werden [95]. Im Tiermodell konnten die arteriogenen Eigenschaften von VEGF (vermittelt über den VEGF1-Rezeptor) durch Monozyten-Depletion antagonisiert werden [95].

Analog zu der unveränderten FGF-Expression nach arterieller Ligatur, ist auch die Expression von VEGF, sowohl in den Kollateralgefäßen selber, als auch im umgebenden Skelettmuskel, unverändert geblieben [96]. Weder FGF-1/2 noch VEGF werden transkriptional oder translational in Kollateralgefäßen oder den sie umgebenden Geweben vermehrt exprimiert. Dies kann zum einen darauf hindeuten, dass die eigentlichen Wachstumsfaktoren der Arteriogenese noch unentdeckt sind. Man könnte aber auch

postulieren, dass den zirkulierenden Zellen wie z. B. Monozyten/ Makrophagen in der Wachstumsfaktorenproduktion eine bedeutendere Rolle als bisher angenommen zukommt.

2.3.3 Monozyten attrahierendes Protein 1

Das Monocyte Chemoattractant Protein-1 ist ein aus 76 Aminosäuren bestehendes, 8.6 kDa schweres Chemokin. Es gehört in die Familie der Cys-Cys Chemokine [15]. MCP-1 ist ein potenter chemotaktischer Faktor für Monozyten; die Bindung an sie erfolgt über den CCR-2 Rezeptor. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung von MCP-1 die Anzahl der sichtbaren Kollateralarterien signifikant erhöht werden konnte [4, 21]. Neben dieser chemotaktischen Wirkung begünstigt MCP-1 auch die Migration der Monozyten durch das Endothel [65]. Zudem konnte durch das Blockieren der endothelialen Bindungsstelle für Monozyten (mit ICAM-Antikörpern) gezeigt werden, dass die Arteriogenese verlangsamt ablief [42]. Der arteriogene Effekt von MCP-1 wird als streng monozyten-vermittelt beschrieben.

MCP-1 wird konstitutiv produziert oder nach Induktion durch oxidativen Stress, Zytokine oder Wachstumsfaktoren. Beteiligt an der Produktion sind verschiedene Zellarten (Monozyten, vaskuläre glatte Muskelzellen, Endothelzellen). Erhöhte Werte von MCP-1 mRNA wurden in Menschen und Tieren mit Arteriosklerose beobachtet [97].

2.3.4 Stickstoffmonoxid

2.3.4.1 Allgemein

In das medizinische Interesse gelangte der NO-Donor Nitroglycerin in der Mitte des 19. Jahrhunderts. Der Schwede Alfred Nobel begann zu dieser Zeit seine Dynamitproduktion in Stockholm. Die Arbeiter, die mit dem Rohsprengstoff Nitroglycerin in Berührung kamen, klagten über Kopfschmerzen, Schwindel und Ohnmachtsanfälle. Ein Phänomen, welches auf die gefäßrelaxierende Wirkung des NO-freisetzenden Nitroglycerins zurückzuführen war. Seit der Entdeckung von 1987, dass NO gleich EDRF ist [98], ist Stickstoffmonoxid Gegenstand intensiver Forschung. Sein therapeutischer Nutzen in der Behandlung des akuten Koronarsyndroms ist weltweit anerkannt [25].

1992 wurde NO zum Molekül des Jahres gewählt. Im Jahre 1998 ging der Medizin-Nobelpreis für Arbeiten rund um Stickstoffmonoxid an Robert F. Furchgott, Ferid Murad und Louis J. Ignarro.

2.3.4.2 Chemische Eigenschaften

Stickstoffmonoxid ist eine gasförmige, farblose Substanz mit einer relativ geringen Wasserlöslichkeit [98, 99]. Es ist eines der kleinsten, natürlich vorkommenden Moleküle überhaupt. Es ist in alle Richtungen frei diffundabel und biologische Membransysteme stellen keine Barriere dar [99]. Ein ungepaartes Elektronenpaar macht das Molekül extrem reaktionsfreudig und ist für seine Radikaleigenschaften verantwortlich. Seine Gewebehalbwertszeit ist daher nur kurz und beträgt ca. drei bis sieben Sekunden [98].

2.3.4.3 NO-Biosynthese

NO wird im Gefäßendothel von den NO-Synthasen (NOS) durch Oxidation aus der Aminosäure L-Arginin gebildet [100, 101, 102]. Neben einer konstitutiven, endothelialen NO-Synthase (eNOS), die die basale NO-Produktion aufrechterhält, sind noch zwei weitere Isoenzyme bekannt; eine induzierbare NOS (iNOS) und eine neuronale NOS (nNOS). Alle drei Isoformen sind Häm-Proteine [103].

2.3.4.4 Isoformen der NO-Synthase

ecNOS (endotheliale NOS, eNOS, NOS III)

Die ecNOS wird v. a. in Gefäßendothelzellen exprimiert. Sie liegt konstitutiv vor und hält, wie bereits erwähnt, die basale NO Produktion aufrecht [104]. Das Enzym besteht aus zwei Domänen, jeweils mit Bindungsstellen für Cofaktoren. So existiert eine N-terminale Oxygenase-Domäne mit Bindungsstellen für Haem, BH₄ (Tetrahydrobiopterin) und L-Arginin und eine C-terminalen Reductase-Domäne mit Bindungsstellen für FAD, FMN und NADPH [105]. Zwischen den Domänen findet ein Elektronenfluss statt. Elektronen werden von NADPH auf die Reductase-Domäne übertragen, dann über die Reduktionstransporter FAD und FMN an die Oxygenase-Einheit abgegeben, dort interagieren sie mit dem Haem-Eisen und dem BH₄ und katalysieren die Reaktion von Sauerstoff und L-Arginin zu Citrullin und NO. Beide Domänen sind über eine Bindungsstelle für einen Komplex aus Ca²⁺ und dem Protein Calmodulin verbunden.

Das Enzym verfügt über mehrere Stellen, an denen es phosphoryliert werden kann. Über diesen Phosphorylierungsstatus lässt sich die Enzymaktivität steuern. Die wichtigsten Phosphorylierungsstellen sind Serin in der Reductase Domäne (Ser¹¹⁷⁷) und Threonin in der Calmodulin-Bindungsstelle (Thr⁴⁹⁵) [106]. Das Enzym kann über vorgeschaltete Kinasen bzw. Phosphatasen phosphoryliert/dephosphoryliert werden.

Grundsätzlich benötigen die verschiedenen Stimulationsmechanismen der NOS intrazelluläres Calcium. Sie können zum einen über eine erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration ablaufen: Normalerweise wird die ecNOS durch Calcium-Eintritt in die

Zellen und durch binden an Calmodulin aktiviert [107]. Oder die Stimulation läuft bei gleich bleibender intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration ab: Die z. B. über den Tyrosin-Kinase Rezeptor von VEGF aktivierte PI3-Kinase (Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase) aktiviert wiederum die Protein-Kinase Akt. Die Akt (kann selber an Serin 473 und an Threonin 308 phosphoryliert werden) kann direkt die eNOS an Serin 1177 phosphorylieren, aktiviert damit das Enzym und führt zu erhöhter NO-Produktion [108]. Des Weiteren können auch Scherkräfte (fluid shear stress), Pulsationskräfte (pulsatile stretch) oder rezeptorgebundene Agonisten wie Acetylcholin, Bradykinin, Serotonin, Substanz P oder Thrombin die eNOS zu einer erhöhten NO-Produktion stimulieren [19, 106].

iNOS (induzierbare NOS, NOS II)

Die iNOS werden in nahezu allen Körpergeweben (z. B. in Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen, aber auch in Blutzellen) exprimiert [104, 109]. Induziert werden die iNOS calciumunabhängig über Entzündungsmediatoren (Interleukine, $\text{TNF-}\alpha$), Bakterien und deren Endotoxine (z. B. Lipopolysaccharide) [104, 110]. Die Induktionszeit beträgt 4-6 Stunden. Danach kann die iNOS über Stunden bis Tage NO produzieren.

nNOS (NOS I)

Die nNOS findet sich vor allem in peripheren und zentralen Neuronen [111]. Auch sie liegt konstitutiv vor und ist calciumabhängig.

2.3.4.5 NO-Signaltransduktion

Das von der eNOS in der Tunica intima gebildete NO diffundiert in die Tunica media und bewirkt dort, durch Stimulation der löslichen Guanylatcyclase (sGC), eine Steigerung der Produktion des second messengers zyklisches Guanosin-Monophosphat (cGMP). NO bindet dabei an die prosthetische Häm-Gruppe der löslichen Guanylatcyclase. Dies bewirkt eine 400 fache Steigerung der Enzymtätigkeit [112, 113]. Die lösliche Guanylat-Cyclase besteht aus zwei unterschiedlichen Polypeptidketten, die als α - und β -Kette bezeichnet werden [114-117].

cGMP aktiviert zytosolische cGMP-abhängige Protein-Kinasen vom Typ 1 (PKG), cAMP-abhängige Proteinkinasen (PKA), Phosphodiesterasen (PDE) und Ionenkanäle [118]. Die Ionenkanäle regulieren die Aufnahme von Na^+ und Ca^{2+} in die Zelle, die PDEs den cGMP-Metabolismus, indem sie cGMP hydrolysieren können.

Den Kinasen aber kommt die wichtigste Funktion zu. Sie wirken als ein Modulator des Kalzium-Haushaltes der Zellen. Dabei wirkt die PKG über eine Phosphorylierung seiner Substrate. Zu den wichtigsten zählen hier der IP3-Rezeptor im endoplasmatischen

Retikulum (der Rezeptor wird phosphoryliert und inhibiert damit den Kalzium-Ausstrom aus dem endoplasmatischen Retikulum ins Zytosol), das VASP (die PKG phosphoryliert das Substrat VASP an Serin 239, es entsteht pVASP), Vimentin, Leichtketten-Myosin-Phosphatase, Substrat G und die Phospholipase A_2 .

Für die Gefäßrelaxation bedeutet dies:

Einerseits phosphoryliert und aktiviert die PKG die Myosin Leichtketten-Phosphatase. Dieses führt dann zur Dephosphorylierung der 20-kDa leichten Myosinketten an Serin 19, wodurch es zur Muskelerlaffung kommt [118, 119]. Andererseits kommt es durch erhöhte cGMP-Spiegel zu einer Erniedrigung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration. Dadurch wird auch die Muskelkontraktion gehemmt. Beides hat zur Folge, dass sich die Gefäße erweitern und der Blutdruck abfällt [19].

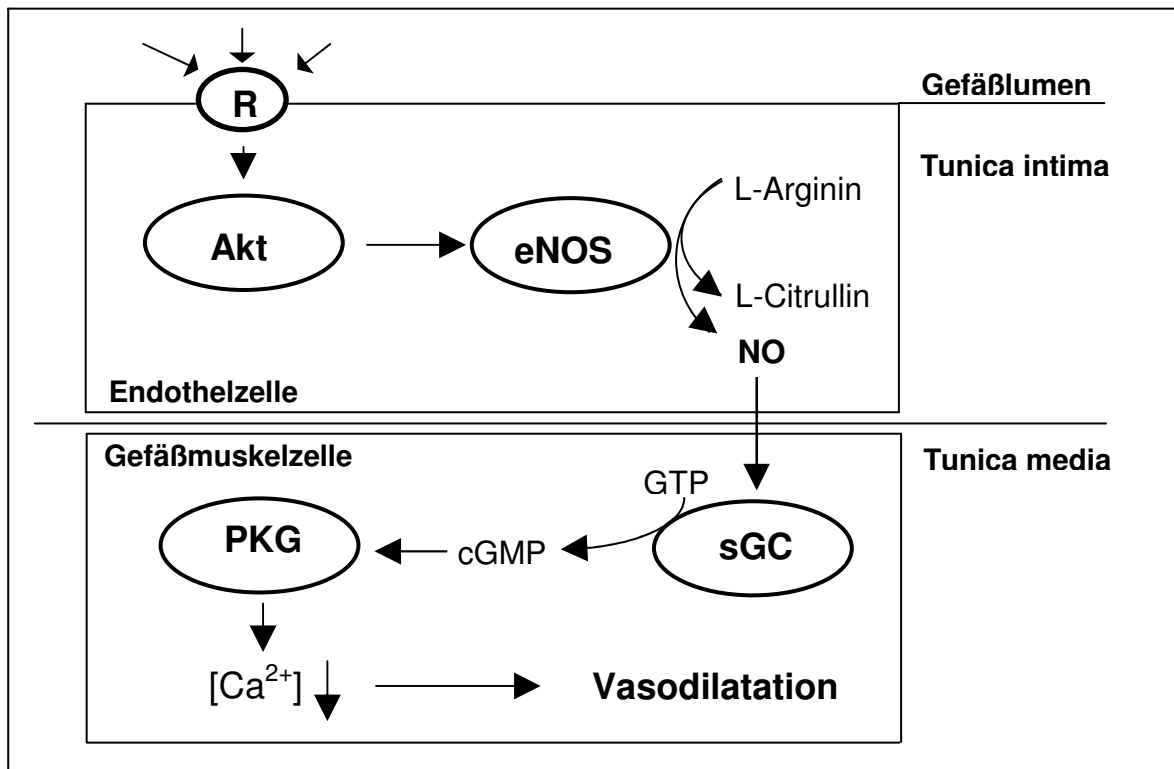


Abb. 2.3.4.5.1: vereinfachte Darstellung der NO-Signaltransduktion über den cGMP-Signalweg (R = endothelialer Membranrezeptor, z. B. VEGF-Rezeptor)

2.3.4.6 NO-Funktion

Vasodilatation

Unter basalen Bedingungen produziert das Endothel über die NOS III Stickstoffmonoxid. Diese Produktion wird über eine Vielzahl von Rezeptor-Agonisten (z. B. Acetylcholin)

genauso wie durch die Scherkräfte an der Gefäßwand stimuliert [19, 120]. NO dilatiert dabei alle Typen von Blutgefäßen über eine stimulierte Guanylat-Zyklase und erhöhtes zyklisches GMP in den glatten Muskelzellen [121-124]. Eine Blockade der NO-Produktion mit inhibitorischen L-Arginin Analoga (z. B. mit L-NAME) führt zu einer signifikanten peripheren Vasokonstriktion und zu erhöhtem Blutdruck [125-129]. Auch ecNOS defiziente knock out Mäusen waren hypertensiv und die aus ihnen isolierten Gefäße zeigten keinerlei Reaktionen auf Vasodilatoren [130].

Vasoprotektive und anti-atherosklerotische Effekte

Zusätzlich zu den vasodilatatorischen Effekten besitzt NO auch vasoprotektive und anti-atherosklerotische Eigenschaften. Da NO sowohl abluminal zum Gefäßmuskel wie luminal zum Blutstromgebiet diffundiert, wurden auch Auswirkungen auf Blutzellen, insbesondere Thrombozyten, beobachtet. Hier hemmt NO die Thrombozytenaggregation und ihre Adhäsion an die Gefäßwand [131-134].

NO und Gefäßwachstum

Schon lange wird auch NO mit dem Gefäßwachstum (Angiogenese und Arteriogenese) in Verbindung gebracht. Hierbei scheinen pro- und anti-arterio- bzw. angiogene Eigenschaften von NO Hand in Hand zu gehen:

Transgene Mäuse, denen die ecNOS fehlt, zeigten verminderte angiogene Effekte [10, 11]. Bei Inhibition der NOS zeigten sich gedrosselte vaskuläre Umbauprozesse (Remodeling) in vivo [135-137] und eine geringere Proliferation und Migration von kultivierten Endothelzellen in vitro [8, 9, 138, 139]. Des Weiteren gibt es Beweise, dass viele der angiogenen Wachstumsfaktoren via NO wirken [8, 9, 137, 139]. So konnte z.B. auch der durch exogene Gabe von VEGF und bFGF gesteigerte kollaterale Blutfluss (durch induzierte Arteriogenese) durch NOS-Inhibition antagonisiert werden [12]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die durch Blutfluss induzierte Gefäßerweiterung in Anwesenheit von NOS-Hemmern blockiert werden konnte [136].

Andererseits hemmt NO die Expression von MCP-1 [15, 140], Oberflächen-Adhäsions-Molekülen wie CD 11/18 [141, 142], P-Selectin [143, 144], VCAM-1 [16, 17] und ICAM-1 [144]. Hierdurch wird die Adhäsion von Monozyten an das Endothel und die Migration durch die Gefäßwand gemindert. Ein Phänomen, welches zwar vor der ersten Phase der Atherosklerose schützt, aber der von Monozytenakkumulation abhängigen Arteriogenese im Wege steht. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass NO anti-mitogen und anti-proliferativ auf glatte Muskelzellen wirkt [145-148]. Auch dies lässt sich nur schwer mit den vaskulären Umbauprozessen der Arteriogenese vereinbaren.

Dass NO-Produktion und die Arteriogenese eng miteinander verknüpft sind, zeigt auch die Tatsache, dass es Gemeinsamkeiten in der Stimulation gibt. Der wichtigste physiologische Stimulus für eine kontinuierliche NO-Produktion ist die Scherkraft, erzeugt durch den Blutfluss entlang am Endothel. Diese Scherkräfte induzieren eine Phosphorylierung der eNOS und führen zu einer erhöhten NO-Produktion [149].

Ein Hauptstimulus der Arteriogenese ist ebenfalls eine erhöhte Schubspannung und damit eine gesteigerte Scherkraft am Endothel. Diese würde zu einer erhöhten NO-Freisetzung und dies wiederum zu einer verminderten MCP-1 Produktion führen. Wie aber passt dies zu der in der Arteriogenese so wichtigen Akkumulation von Makrophagen in der Gefäßwand? Diese Diskrepanzen aufzulösen, ist Aufgabe dieser Dissertation.

3. Material

3.1 Tiermodell

Geräte und Instrumente:

- Fäden, ETHICON (Norderstedt), Vicryl 3-0, V 1225
- Nadeln und Fäden, ETHICON (Norderstedt), Vicryl 3-0, V305
- Operationsinstrumente, AESCULAP (Tuttlingen)
- Osmotische Mini-Pumpe, DURECT CORPORATIO (USA), ALZET, Model 2ML1
- PE-Schlauch, FÖHR MEDICAL INSTRUMENTS GmbH, für die Mini-Pumpe, 0,40x0,80 mm Code Nr. ZUA-PE-0,4x0,8 mm
- PE-Schlauch, FÖHR MEDICAL INSTRUMENTS GmbH, für die Mini-Pumpe, 0,75x1,22 mm Code Nr. ZUA-PE-0,75x1,22mm

Chemikalien:

- Ether, ASID BONZ GmbH, Dethylether Ph. Eur.
- Rompun (Xylazinhydrochlorid), BAYER 00826524
- Liquemin (Heparin), ROCHE G 069511, Liquemin N 2500
- Ketamin, ATAROST GmbH, Zul.-Nr.: 29819.01.00
- Cutasept, BODE CHEMIE (Hamburg)
- MCP-1, SEROTEC (UK), recombinant rat MCP-1
- L-NAME (N_w-Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester), SIGMA

Puffer und Lösungen:

- PBS, GIBCO (Karlsruhe)
- Ringer-Lösung, DELTA-PHARMA (Deutschland)

3.2 Ausguss-Modelle

Chemikalien:

- Resin (Harz) Mercocox CL-2B, LADD RESEARCH INDUSTRIES, INC. (USA)
- Catalyst (Katalysator) Mercocox MA, LADD RESEARCH INDUSTRIES, INC. (USA)

3.3 Immunhistochemie

Geräte und Instrumente:

- Kryocut, 2800 Frigocut N, REICHERT- JUNG (Deutschland)
- Objektträger, Super Frost Plus, MENZEL-GLÄSER (Deutschland)
- Mikroskop, OLYMPUS BH-2

Chemikalien:

- Xylol-Ersatz, VOGEL, Bestnr. ND-HS200
- H₂O₂, 30%, MERCK KGaA (Deutschland), 1.07210.1000
- Methanol, MERCK KGaA, 1.06009.2500
- Normal Swine Serum, BIOTREND, D 312
- Normal Rabbit Serum, SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH (Deutschland), S 2632
- Anti-mouse IgG biotin (rabbit), DAKO, E 0354
- Anti-rabbit IgG biotin (swine), DAKO, E 0353
- Mouse-PAP, DAKO, P 0850
- Rabbit-PAP, DAKO, Z 0113
- Avidin-Biotin-Komplex, VEKTOR, Vectastain ABC-Kit
- D-Glucose, SIGMA, G 8270
- Glucose-Oxidase, SIGMA, G 2133
- Nickel(II)-sulfat-Hexahydrat z. A., MERCK KGaA, 6727.0100
- Ammoniumchlorid, SIGMA, A 4514
- DAB (Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid), SIGMA, D-5637
- Eukitt, O. KINDLER GmbH & Co
- Mowiol, POLYSCIENCES, Inc., CAT. N° 17951
- Zitronensäure, SIGMA, C 7129
- Na-Citrat, MERCK KGaA (Deutschland), 1.06448.1000
- Paraformaldehyd (PFA) reinst, MERCK KGaA, 1.04005.1000
- Na₂HPO₄, MERCK KGaA, 1.06580.1000
- Sodium Chloride (NaCl), J.T. BAKER, 0278
- Mayers Hämalaunlösung, MERCK KGaA, 1.09249.0500
- Essigsäure, UKE-APOTHEKE (Hamburg-Eppendorf)
- Salzsäure c(HCl)=2 mol/l (2N), MERCK KGaA, 1.09063.1000
- Tissue Tec (O.C.T.T.M. Compound), SAKURA FINETEK EUROPE B.V. (Netherlands)
- n-Hexan, ICN BIOMEDICALS (USA)
- Falcon-Röhrchen, Falcon, BECTON DICKINSON (Heidelberg)
- BSA (Bovine Serum Albumin), SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, A 7638

- EDTA (Ethyldiamintetraazetsäure), SIGMA, 25,404-5, MFCD00003541
- Formalin, SIGMA, HT50-1-1
- KH_2PO_4 (potassium phosphate monobasic), SIGMA, P 5379
- NaN_3 (Sodium Azide), SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH (Deutschland), S 2002
- Tris, MERCK KGaA (Deutschland), 108382

Puffer und Lösungen:

Spüllösung

BSA	0,5%	
EDTA	5mM	
in 1 l PBS lösen		

Fixierlösung (4% Formalin)

Formalin 31%	108 ml	
EDTA	5 mM	
in 1 l PBS lösen		

PBS (0,1 M pH 7, 4)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	17,8 g	(entspricht 0,05 M)
NaCl	16 g	(entspricht 0,136 M)
ad 2 l Aqua dest., auf pH 7,4 einstellen		

PB (0,1 M pH 7,4)

KH_2PO_4	4,9 g	(entspricht 0,018 M)
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	29,2 g	(entspricht 0,08 M)
ad 2 l Aqua dest., auf pH 7,4 einstellen		

Verdünnungspuffer (für den 1. Antikörper)

BSA	200 mg	
NaN_3	100 mg	
ad 100 ml PBS, auf pH 7,4 einstellen		

Tris-Puffer (0,05 M pH 7,6)

Tris	3,02 g	
NaCl	4,5 g	
ad 500 ml Aqua dest., auf pH 7,6 einstellen		

Antikörper:

- Anti ecNOS (C-20): sc-654, rabbit polyclonal, SANTA CRUZ
- Anti iNOS (M-19): sc-650, rabbit polyclonal, SANTA CRUZ
- Anti eNOS (SA-201), polyklonal, BIOMOL

- Anti iNOS (SA-200), polyklonal, BIOMOL
- Anti eNOS (# 610297), monoklonal, BD TRANSDUCTION LAB
- Anti iNOS, (# 610329), monoklonal, BD TRANSDUCTION LAB
- Anti PKG (CT), KAS PK 005, STRESSGEN
- Anti β_1 sGC, polyklonal, PHARMAKOLOGISCHES INSTITUT (Universität Hamburg)
- Anti α_2 sGC, polyklonal, PHARMAKOLOGISCHES INSTITUT (Universität Hamburg)
- Anti guanylate cyclase, soluble, # 371712, CALBIOCHEM
- Anti phospho-eNOS (Thr495), # 9574, CELL SIGNALING TECHNOLOGY
- Anti phospho-eNOS (Ser1177), # 9771, CELL SIGNALING TECHNOLOGY
- Anti phospho-Akt (Ser473), # 9271, CELL SIGNALING TECHNOLOGY
- Anti VASP (Serin239), # 676602, CALBIOCHEM

3.4 Western Blot-Analysen

Geräte und Hilfsmittel:

- Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell, BIO RAD
- Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, BIO RAD
- Power Pack 300, Power supply, BIO RAD
- Protran, Nitrocellulose Transfer Membrane, SCHLEICHER & SCHUELL
- Gel Blotting Papier, GB 002, SCHLEICHER & SCHUELL
- Tischschüttler, IKA, Schüttler MTS 4
- Tischheizgerät für Eppendorf-Reagiergefäße, SCHUTRON SNT-1
- Scanner, EPSON GT-9600
- Durchlichtaufsatz, Model EU-35
- Röntgenfilm, KODAK BioMaxTM MR
- BioDocAnalyse und Scan Pack 3.0, BIOMETRA

Chemikalien:

- Flüssig-N₂
- Glycin, CARL ROTH GmbH & Co, Karlsruhe, Nr. 3908.2
- Tris, GIBCO-BRL, No.: 15504-020
- TritonX-100, SIGMA, H-0613
- Hemoglobin, SIGMA, H-2625
- NaCl, J.T. BAKER, # 0278
- Glycerol, SIGMA, G-8773
- Bromphenolblau, SIGMA B-5525

- β-Mercaptoethanol, SIGMA, M-7154
- SDS (Sodium dodecylsulfate, Lauryl Sulfate), SIGMA, L-3771
- 40% Acrylamid/Bis Solution 29:1 (3:3%), BIO RAD, Control 79724
- Bench Mark Protein Ladder, INVITROGEN, Cat. No. 10747-012
- Precision Plus Protein Standards, Dual Color, BIO RAD, Catalog #161-0374
- Isobutanol, MERCK, 1.00985.1000
- Albumin, bovine, (BSA), SIGMA, A-3059
- TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamide), SIGMA, T-9281
- Non-fat dry milk, BIO RAD, # 170-6404
- ECL Immunodetektion (AMERSHAM ECL-detection kit)
- Immunodetektion SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, PEARSE, #34095
- Ponceau-S Lösung, SERVA, # 33427, Heidelberg
- Bradford-Protein-Assay, BIO RAD
- PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride), SIGMA, H-1265
- Cantharidin (inhibitor of protein phosphatase 2A), SIGMA, C-7632
- APS (Ammonium Persulfate), SIGMA, H-1089
- Leupeptin, SIGMA, L-0649
- Pepstatin, SIGMA, P-4265
- Aprotinin, SIGMA, A-6279
- Tween – 20 (polyoxyethylene-sorbitan monolaurate), SIGMA, P-5927
- Na₂HPO₄, MERCK KGaA (Deutschland), 1.06580.1000
- NaH₂PO₄ (Sodium dihydrogen phosphate), MERCK KGaA (Deutschland), 106370
- Tris-HCl (pH 6,8), SIGMA, H-5704
- Sucrose (Saccharose), SIGMA, K-0061,
- EGTA (Ethylene glycerol-bis-N,N,N',N' – tetraacetic acid), SIGMA, E-3889
- EDTA (Ethylenediamine-Tetraacetic acid), SIGMA, H-0821
- KCl, MERCK 1.04936.0500
- CaCl₂, MERCK 1.02382.1000
- MgSO₄, MERCK 1.05886.0500
- NaHCO₃, MERCK 1.06329.1000
- K₂HPO₄, MERCK 1.05099.0250
- Na-Hepes, SIGMA, H-3375
- D-Glucose, MERCK 1.08337.1000

Puffer und Lösungen:**KH-Puffer (Krebs-Hepes-Puffer)**

	mM/L	g/L
NaCl	99,01	5,782
KCl	4,69	0,350
CaCl₂	2,50	0,366
MgSO₄	1,20	0,296
NaHCO₃	25,00	2,100
K₂HPO₄	1,03	0,140
Na-Hepes	20,00	5,206
D-Glucose	11,10	2,000
auf pH 7,35 einstellen		

KH-Puffer + Protease-Inhibitoren

Leupeptin (5mg/ml)	10 μ l	
Pepstatin (2mg/ml)	10 μ l	
Aprotinin (1mg/ml)	66.6 μ l	
KH-Puffer	ad 10 ml	

PBS_{TT}

NaCl	8,765 g	
Na₂HPO₄	2,850 g	
NaH₂PO₄	0,550 g	
H₂O bidest.	ad 1000 ml	
Triton X - 100	+ 3,0 ml	
Tween 20	+ 0,5 ml	

TBS

Tris	2,42 g	
NaCl	8 g	
H₂O bidest.	ad 1000 ml	
auf pH 7,6 einstellen		

3x Laemmli

Tris-HCl (pH 6,8)	188 μ l	
20% ige SDS	300 μ l	
Glycerol	300 μ l	
0,5-1% Bromphenolblau	30 μ l	
β-Mercaptoethanol	150 μ l	erst kurz vor Gebrauch dazu!
H₂O bidest.	32 μ l	

TBST

TBS	1l	
Tween 20	1ml	

Homogenisierungs (Hg)-Puffer

	mM	g/50 ml
Tris-HCL	20	0,121
Sucrose	250	4,280
EGTA	3	0,057
EDTA	20	0,292
auf pH 7,5 einstellen		

Homogenisierungs (Hg)-Lösung

Aprotinin (1mg/ml)	100 µl	
Leupeptin (5mg/ml)	10 µl	
Pepstatin (2mg/ml)	10 µl	
PMSF (0,1 M)	50 µl	
Cantharidin (1mM)	10 µl	
Triton-X-100	1%	
Hg-Puffer	10 ml	

SDS-PAGE Puffer (Running Buffer)

Tris	3,03 g	
Glycin	14,40 g	
SDS	1,00 g	
H2O-bidest	ad 1000 ml	

Blotting Puffer (Transfer Buffer)

Tris	3,03 g	
Glycin	14,40 g	
H2O-bidest	ad 800 ml	
Methanol	200 ml	

Trenngel (10%)

H2O	4,8 ml	
Tris (1,5 M, pH 8,8)	2,5 ml	
Acrylamid 40%	2,5 ml	
SDS 10%	100 µl	
APS 10%	50 µl	
TEMED	5 µl	
Gesamtvolumen 10 ml		

Sammelgel (4%)

H2O	1,6 ml	
Tris (0,5 M, pH 6,6)	630 µl	
Acrylamid 40%	250 µl	
SDS 10%	25 µl	
APS 10%	12,5 µl	
TEMED	2,5 µl	
Gesamtvolumen 2,5 ml		

Antikörper:**anti-ecNOS, anti-iNOS** (TRANSDUCTION, monoklonal)

Waschpuffer	TBST
Blocking Medium	5% BSA in TBST
1. Antikörper	1:1000, in 3% BSA in TBST
2. Antikörper	anti- mouse IgG, 1:10000, in 3% BSA in TBST
Immuno-Detektion	eNOS mit ECL-Lösung
	iNOS mit Super Signal Substrate

anti- α -Aktinin (SIGMA, monoklonal), **anti-P-VASP** (CALBIOCHEM, monoklonal)

Waschpuffer	PBS _{TT}
Blocking Medium	1 % Haemoglobin in PBS _{TT}
1. Antikörper	1:1000, in 1% Haemoglobin in PBS _{TT}
2. Antikörper	anti- mouse IgG, 1:10000, in 1% Hem in PBS _{TT}
Immuno-Detektion	ECL-Lösung

anti-PKG (STRESSGEN, polyklonal), **anti-sGC** (CALBIOCHEM, polyklonal)

Waschpuffer	PBS _{TT}
Blocking Medium	1 % Haemoglobin in PBS _{TT}
1. Antikörper	1:1000, in 1% Haemoglobin in PBS _{TT}
2. Antikörper	Anti- rabbit IgG, 1:10000, in 1% Hem in PBS _{TT}
Immuno-Detektion	ECL-Lösung

anti-phospho-eNOS (Ser und Thr) und anti-phospho-Akt

Waschpuffer	TBST
Blocking Medium	5% Trockenmilch in TBST
1. Antikörper	1:1000, in 5% BSA in TBST
2. Antikörper	anti- rabbit IgG, 1:10000, in 5 % Trockenmilch in TBST
Immuno-Detektion	mit Super Signal Substrate

2. Antikörper

Anti-rabbit-IgG	VECTOR LAB	Peroxidase
Anti-mouse-IgG	VECTOR LAB	Peroxidase

3.5 Guanylat-Cyclase-Assay**Geräte und Instrumente:**

- Analysenwaage, METTLER (Greifensee, Schweiz)
- Beckmann Zentrifuge (J2-21), BECKMANN (Palo Alto, USA)
- Beckmann Zentrifuge (J6-B), BECKMANN (Palo Alto, USA)
- Digitalwaage, METTLER (Greifensee, Schweiz)

- Einwegpipetten, steril (10 ml; 25 ml), BECTON DICKINSON (Heidelberg)
- Falcon Röhrchen (50 ml), Falcon, BECTON DICKINSON (Heidelberg)
- Digitalkamera, KAISER (Buchen)
- Heizblock, EPPENDORF (Hamburg)
- Kühltruhe (-80 °C; -20 °C), KRYOTEC (Hamburg)
- Magnetrührer, HEIDOLPH (Kelheim)
- pH-Meter, KNICK (Berlin)
- Photometer, PERKIN ELMER (Palo Alto, USA)
- Pipetten, EPPENDORF (Hamburg)
- Pipettenspitzen, TREFF LAB (Degersheim, Schweiz)
- Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml), EPPENDORF (Hamburg)
- Szintillationszähler, BECKMANN (Palo Alto, USA)
- Tischzentrifuge, EPPENDORF (Hamburg)
- Ultrazentrifuge (Centricon T-2170), KONTRON INSTRUMENTS (Mailand, Italien)
- Vortexer, HEIDOLPH (Kelheim)
- Wasserbad, GFL (Burgwedel)
- Mikrodismembrator S/U+Mahlkugel+Schüttelgefäß, BRAUN BIOTECH (Melsungen)

Chemikalien:

- Aqua ad injectabilia, PHARMACIA BIOTECH (Freiburg)
- [α -³²P]-dCTP, AMERSHAM (Freiburg)
- PBS, GIBCO (Karlsruhe)
- Bradfordreagenz, BIORAD (München)
- Kreatin-Kinase (creatine-kinase), SIGMA, C 9983
- TEA / HCl (tetraethylammonium), SIGMA, T 2265
- MnCl₂ (manganese chloride), SIGMA, M 3634
- Kreatin-Phosphat, SIGMA, C 7886
- cGMP, SIGMA, G 7504
- GTP, SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH (Deutschland), G 0635
- DEA / NO, RESEARCH BIOCHEMICALS INTERNATIONAL (Natick, USA)
- Zinkacetat (zinc acetate), SIGMA, Z 0625
- Natriumcarbonat (sodium carbonate), SIGMA, S 2127
- Aluminiumoxid (aluminum oxide), SIGMA, A 9003
- Perchlorsäure (perchloric acid), SIGMA, 24, 425-2
- Natriumacetat (Sodium acetate), SIGMA, S 2889
- DTT ((2R, 3R)-1, 4-Dimercapto-2,3-butanediol), SIGMA, D9760, MFCD00064305
- IBMX, (3-Isobutyl-1-methylxanthine), SIGMA, I7018, MFCD00005584

- YC-1, Y-102, SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH (Deutschland), MFCD01868876
- Tris (Tris Buffer Solution), SIGMA, 93302, MFCD00236359
- EDTA (Ethylendiamintetraazetsäure), SIGMA, 25,404-5, MFCD00003541

Lösungen und Puffer:

Puffer A

Tris	2,42 g	
EDTA	0,372 g	
DTT	0,154 g	als Oxidationsschutz!
ad 1 l Aqua dest., auf pH 8 einstellen		

3.6 Post mortem Angiographien

Hilfsmittel und Geräte:

- X-Ray chamber, Model 43855D, FAXITRON x-ray corporation (USA)
- Mammographie-Bilder, X-OMAT MA 13x18 cm, KODAK (Frankreich)
- Stereoscope, Model Topcon, TOKYO KOGAKU KIKAI Co. LTD. (Japan)

Chemikalien:

Röntgenkontrastmittel

Gelatine (from Porcine Skin, SIGMA)	9g	
Bariumsulfat , MERCK	40g	
ad 100 ml Aqua dest.		

4. Methoden

4.1 Tiermodell

4.1.1 Allgemeines

Für die vorliegende Arbeit wurden Tierexperimente an 400 bis 500 Gramm schweren, männlichen Ratten (Sprague Dawley Rats) vorgenommen. Die Experimente sind entsprechend den Tierschutzverordnungen durchgeführt und durch Paragraph 8, Absatz 4, Satz 2 des Gesetzes zum Tierschutz genehmigt worden (Antragsnummer 5402, Behörde für Umwelt und Gesundheit der Freien Hansestadt Hamburg, 18.09.2002). Alle Ratten wurden in genormten Käfigen gehalten und bekamen Futterpellets und Wasser ad libidum.

Das verwendete Tiermodell ist ein Modell mit peripherer arterieller Insuffizienz am Hinterlauf der Ratte. Nach einseitiger proximaler Femoralarterienligatur umgeht der Blutstrom die herbeigeführte Stenose unter Benutzung eines kollateralen Netzwerkes. Hierbei wandeln sich kleine arterioläre Shunts in große Kollateralgefäße um. Das Modell bietet somit die Möglichkeit, das Kollateralwachstum (Arteriogenese) näher zu studieren. Das Tiermodell ist von unserer Arbeitsgruppe entwickelt worden und wurde im Juli 2002 veröffentlicht [150].

4.1.2 Tier Operationen

4.1.2.1 Unilaterale Femoralarterienligatur

Die Ratten wurden zunächst mit Ether kurznarkotisiert. Die anschließende Anästhesie, bestehend aus 0,5 ml Ketamin + 0,05 ml Rompun, konnte so problemlos intraperitoneal appliziert werden. Zur Antikoagulation wurde noch 0,2 ml Liquemin dazugefügt. Nach einer Latenzzeit von 5 - 7 Minuten setzte die narkotische Wirkung ein. Gegebenenfalls wurde Ketamin nachgespritzt.

Die Operationen sind unter möglichst sterilen Bedingungen durchgeführt worden. Der OP-Bereich (rechtsseitiger, proximaler Teil des Oberschenkels) wurde zunächst rasiert, dann mit Cutasept desinfiziert und mit einem sterilen OP-Tuch abdeckt. Mit einem Skalpell wurde ein 3 cm langer, parallel zur rechten Femoralarterie verlaufender Hautschnitt durchgeführt. Die Oberschenkelmuskulatur wurde vorsichtig zur Seite präpariert und die Femoralarterie in ihrem Verlauf bis zum Leistenband dargestellt. Das Wundgebiet wurde mittels eines Spreizers geweitet und der Hautast der Femoralarterie aufgesucht. Dieser

wurde zweimal ligiert und dann abgesetzt (zur Vermeidung von Zuflüssen in die Femoralarterie unterhalb der Ligatur). Die Femoralarterie wurde einmal 1 cm unterhalb des Leistenbandes und ein zweites Mal 1 cm weiter distal angeschlungen und ligiert. Zwischen den Ligaturen wurde das Gefäß durchtrennt. Der Nervus femoralis und die Vena femoralis blieben dabei unversehrt. Am Schluss wurde das OP-Gebiet mit sterilem NaCl gespült und die Wunde zugeklammert.

4.1.2.2 Unilaterale Femoralarterienligatur + Pumpenimplantation

Die osmotische Mini-Pumpe besteht aus zwei Komponenten, dem Pumpenstecker und dem Pumpenkörper. Sie wurde gemäß der beiliegenden Gebrauchsanweisung zusammengesetzt. Auf den Pumpenstecker, an dem die zu fördernde Substanz später austritt, wurde ein Schlauch montiert. Dieser Schlauch kam später als Katheter in der proximalen Arteria femoralis zu liegen. Anschließend wurde die Pumpe eingeschweißt und sterilisiert.

Die Pumpen wurden unter sterilen Bedingungen entweder mit MCP-1 (1 µl MCP-1 verdünnt in 3000 µl PBS) oder nur mit 3 ml PBS (Kontrolle) gefüllt. Anschließend wurden die Pumpen in ein 37° warmes Wasserbad überführt. Nach einer Inkubationszeit von 4-6 Stunden begannen die Pumpen zu fördern. Sie förderten 10 µl Substanz pro Stunde über eine Dauer von 7 Tagen.

Die Ratten wurden wie vorher beschrieben narkotisiert (gemäß 4.1.2.1). Es wurde dann zunächst wie bei der einfachen Femoralarterienligatur verfahren. Die Femoralarterie wurde einmal 1 cm unterhalb des Leistenbandes und ein zweites Mal 1 cm weiter distal angeschlungen. Nur mit dem distalen Faden wurde die Femoralarterie ligiert. Die Haut über dem Peritoneum wurde jetzt angehoben und mit einer stumpfen Schere eine Tasche zwischen Haut und Muskulatur freipräpariert. Hier wurde die Pumpe vorsichtig hinein geschoben und mittels einer Naht an der Haut fixiert. Proximal der Femoralarterienligatur wurde die Arterie eröffnet, und der Katheter der osmotischen Pumpe in das Lumen eingeführt. Man fixierte den Katheter nun mit Fäden. Am Schluss wurde das OP-Gebiet mit sterilem NaCl gespült und die Wunde zugeklammert.

4.1.2.3 Exitus letalis + Aortenkanülierung

Bei der Narkose wurde analog zu Punkt 4.1.2.1 verfahren. Zusätzlich wurde aber noch 1 ml Heparin in die Schwanzvene injiziert. Die Bauchhöhle des Tieres wurde eröffnet. Das Intestinum wurde zur Seite gelegt und die Aorta vom Truncus coeliacus bis zur Aortenbifurkation freipräpariert. Anschließend wurde das Gefäß zweimal angeschlungen. Mit der weiter proximal gelegenen Schlinge wurde die Aorta ligiert. Unterhalb dieser Ligatur wurde die Aorta mit spitzer Pinzette angehoben und angeschnitten. Der Katheter

wurde in das Gefäßlumen eingebracht und nach distal vorgeschoben. Zur Lagekontrolle des Katheters aspirierte man Blut. Der Katheter wurde anschließend durch beide Fäden fixiert. Jetzt wurde die Vena cava inferior mit einer scharfen Schere angeschnitten und das Tier ausgeblutet. Dann infundierte man eine 37° warme Ringer-Lösung über den Katheter. Bei der Perfusion wurde ein Druck von 120 bis 140 mmHg aufrechterhalten. Man perfundierte solange, bis die klare Ringer aus der Vena cava trat und das meiste Blut aus dem Kreislauf gespült war. Darauf wurde das Kontrastmittel unter gleich bleibendem Perfusionsdruck an den Katheter angeschlossen. Zur Kontrolle sollte man eine mit Kontrastmittel gefüllte Aortenbifurkation sehen. Dann wurde das Tier in eine Glaswanne mit 37° warmem Wasser gelegt. Waren dann die Gefäße an der Fußsohle mit Kontrastmittel gefüllt, konnte man das Tier aufs Eis legen. Das Kontrastmittel wurde so zum Aushärten gebracht.

4.2 Ausguss-Modelle

Mercox ist ein gesetzlich geschütztes Acryl-Ausguss-Material, welches aus zwei Komponenten besteht; einem Harz (Resin) und einem Katalysator (Catalyst). Wenn Harz und Katalysator miteinander in Verbindung gebracht werden, setzt eine Polymerisation ein, und das Material härtet aus. Ausguss-Präparate (corrosion casts) lassen sich prinzipiell von allen Hohlraumorganen anfertigen, werden in erster Linie aber zur Darstellung von Gefäßbäumen benutzt.

Corrosion Casts wurden von fünf Tieren mit 2 Wochen und 2 Monaten nach einseitiger Femoralarterienligatur (nach Punkt 4.1.2.1) erhoben. Die Ausguss-Modelle wurden dabei wie in der Literatur beschrieben durchgeführt [151-153]. Die Ratten wurden anästhesiert und antikoaguliert (700 Units Heparin/kg; intraperitoneal). Die Bauchhöhle wurde eröffnet und die Aorta kanüliert. Die Vena cava inferior wurde eröffnet und das Tier ausgeblutet. Das restliche, sich in den Gefäßen befindliche Blut wurde mit einer Ringer-Lösung herausgespült. Mercocox Harz und Katalysator wurden im Verhältnis 10 zu 0.3 (in einer Petrieschale) zusammengemischt und über den Katheter in die Aorta infundiert. Nach 5 bis 8 min setzte die Polymerisation ein. Zum weiteren Aushärten des Harzes wurde das infundierte Gewebe in heißes Wasser (50 °C) überführt. Anschließend wurde das die Gefäße umgebende Gewebe alternierend (24 h) in 5% KOH und heißem Wasser mazeriert. Nach ca. einer Woche waren dann die Hinterlaufgefäße mit dem Kollateralnetzwerk sichtbar.

4.3 Immunhistochemie

4.3.1 Allgemein

Die immunhistochemischen Färbungen und ihre Auswertungen sind in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. med. Middendorff, Abteilung für Mikroskopische Anatomie, Anatomisches Institut der Universität Hamburg, entstanden. Die verwendete Färbemethode ist eine international anerkannte Standardmethode [154]. Es handelt sich um eine Immunperoxidase-Färbemethode, die zelluläre Antigene darstellen kann. Sie basiert im Wesentlichen auf einer Doppel-Färbemethode.

PAP-Methode

Bei dieser Methode werden drei Reagenzien benötigt: Primärantikörper, Sekundärantikörper und der PAP-Komplex, bestehend aus dem Enzym Peroxidase und dem Antikörper gegen Peroxidase (genauer: 3 Peroxidasemoleküle plus 2 Antikörper gegen dieses Enzym) [155]. Der Primärantikörper ist spezifisch gegen das Antigen gerichtet. Der Sekundär- oder Brückenantikörper kann sowohl an den Primärantikörper als auch an den PAP-Komplex binden, da beide in derselben Tierspezies hergestellt wurden. Das Enzym Peroxidase wird durch eine Substrat-Chromogenreaktion sichtbar gemacht.

Avidin-Biotin-Methode

Diese Methode basiert auf der Fähigkeit des Glykoproteins Avidin, 4 Moleküle des Vitamins Biotin physikalisch zu binden [156]. Wie bei der PAP-Methode werden 3 Reagenzien gebraucht. Das erste ist der Primärantikörper, spezifisch gegen das zu bestimmende Antigen gerichtet. Der Sekundärantikörper, der an den ersten binden kann, ist mit Biotin konjugiert. Das dritte Reagenz ist ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex. Die freien Bindungsstellen des Avidinmoleküls ermöglichen die Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers. Das Enzym Peroxidase kann mit einem geeigneten Chromogen sichtbar gemacht werden.

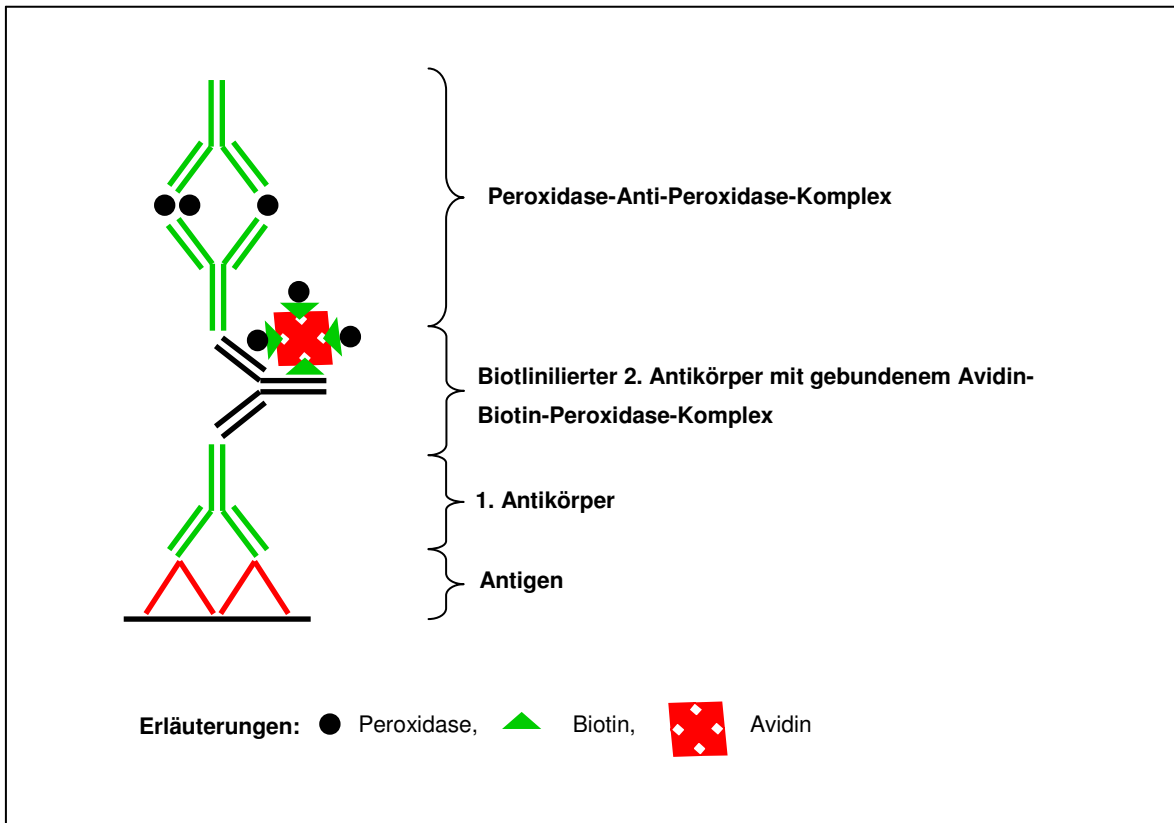


Abb. 4.3.1.1: kombinierte PAP- und Avidin-Biotin-Methode, Abbildung modifiziert nach [Naish, 1989 #1731]

Peroxidase

Durch die Peroxidase-Aktivität bildet sich in Anwesenheit eines Elektronendonors ein Enzym-Substratkomplex; anschließend erfolgt die Oxidation des Elektronendonors. Es gibt verschiedene Elektronendonoren, die sich durch Oxidation in unlösliche und gefärbte Verbindungen umwandeln. Man nennt sie daher Chromogene. Das hier verwendete 3,3' Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) ist ein solches Chromogen. Es bildet ein braunes Reaktionsprodukt, das in Alkohol und anderen organischen Lösungsmitteln unlöslich ist.

4.3.2 Paraffin-Schnitte

Es wurden sechs Tiere mit 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 4 Wochen und 4 Monaten nach unilateraler Femoralarterienligatur (operiert wurde gemäß Punkt 4.1.2.1) untersucht.

4.3.2.1 Perfusionsfixierung und Gewebeentnahme

Als die oben genannten Zeiten verstrichen waren, wurde das Tier ausgeblutet und die Aorta kanüliert (nach Punkt 4.1.3.1). Anstelle des Kontrastmittels wurde zunächst eine

Spüllösung bei 140 mmHg über den Katheter infundiert. Ihr folgte eine Fixierlösung für ca. 20 min bei 140 mmHg Perfusionsdruck. Daraufhin erfolgte die Kollateralgefäßentnahme mit umgebendem Muskelgewebe am rechten (ligierten) und am linken (nichtligierten, Kontrolle) Hinterlauf. Die Gewebestücke wurden zur weiteren Fixierung in ein Falkon-Röhrchen mit Fixierlösung gegeben.

4.3.2.2 Erstellen der Schnitte

Nach der Fixation wurden die Gewebepreparate dehydriert, geklärt und entsprechend den Routinebearbeitungsmethoden eingebettet. Zum Erzielen der besten Ergebnisse sind die Gewebepreparate in reines Paraffin eingebettet worden. Beim Einbetten wurde nach folgendem Schema verfahren:

- 70% Alkohol für ca. eine Woche
- 80% Isopropanolol 2 x 60 min
- 96% Isopropanolol 2 x 90 min
- 100% Isopropanolol 2 x 60 min
- 100% Isopropanolol 3 x 90 min
- 100% Isopropanolol 1 x 120 min
- Paraplast/Isopropanolol 120 min
- Paraplast 60° 120 min
- Paraplast 120 min

Vom erstellten Gewebeblock wurden nun 5 µm dicke Schnitte angefertigt und diese mit einem Objektträger aufgenommen. Anschließend wurden die Objektträger mit den Schnitten für ca. 4 Stunden bei 40 °C in einem Trockenschrank gelagert.

4.3.2.3 Immunhistochemie (polyklonaler Antikörper)

Die Schnitte wurden zunächst in eine Küvette überführt und anschließend in der absteigenden Alkoholreihe hydriert bzw. entparaffiniert:

- Xylolersatz: 3x 5min
- 100% Ethanol: 5min
- 1,2% H₂O₂/Methanol: 30 min (zum Ausschalten endogener Peroxidasen)
- 96% Ethanol: 5 min
- 80% Ethanol: 5 min
- 70% Ethanol: 5 min
- Aqua dest.: 5 min

Anschließend wurden die Schnitte für 15 Minuten in PBS gespült, dann für 30 min mit 2 % Normal Swine Serum (NSS in PBS gelöst) in einer feuchten Kammer inkubiert. Hierdurch wurden unspezifische Bindungen des zweiten Antikörpers abgeblockt. Das Normale Schweine Serum wurde dann einfach vom Objektträger abgekippt und verworfen. Der primäre Antikörper (verdünnt mit Verdünnungspuffer) oder nur der Verdünnungspuffer (Kontrolle) wurden nun auf die Schnitte aufgeträufelt. Die Inkubation erfolgte im Kühlschrank bei 4 Grad über Nacht. Als primäre, polyklonale Antikörper wurden anti- β 1 sGC, anti- α 2 sGC, anti-PKG, anti-iNOS, anti-eNOS, anti-phospho-Akt, anti-phospho-eNOS verwendet. Die Antikörperkonzentration entsprach der Empfehlung der jeweiligen Gebrauchsanweisung.

Am folgenden Tag wurden die Schnitte für dreimal zehn Minuten in PBS gespült. Die Schnitte wurden dann mit dem Zweitantikörper, einem biotiniliertem anti rabbit IgG (vom Schwein, Verdünnung 1:250 in PBS), für 60 min inkubiert. Anschließend wurde für zweimal zehn Minuten in PBS gespült. Die Schnitte wurden dann mit Rabbit PAP (Peroxidase anti-Peroxidase, Verdünnung 1:200 in PBS) beträufelt. Die Inkubationszeit betrug jetzt 30 min. Anschließend wurde wiederum für zweimal zehn Minuten in PBS gespült. Dann folgte eine 30 minütige Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Komplex (Verdünnung 1:250, gelöst in PBS). Anschließend wurde zehn Minuten in PBS gespült und weitere zehn Minuten in PB. Es folgte dann die Entwicklung der Peroxidase-Aktivität. Dazu wurden die Schnitte in eine Küvette mit folgender Lösung überführt:

- 45 ml PB 0,1 M pH 7,4
- 900 μ l D-Glucose
- 150 μ l Glucose-Oxidase
- 900 μ l Nickel(II)-sulfat-Hexahydrat
- 100 μ l Ammoniumchlorid
- 1 ml DAB

Die Entwicklung wurde unter dem Mikroskop beobachtet, die Entwicklungszeit (zwischen 10 – 30 min) notiert. Anschließend wurde für dreimal fünf Minuten in PBS gespült. Nun wurde in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert. Am Schluss wurden die Objektträger mit einem Deckgläschen versehen (Eindeckeln mit Eukitt).

4.3.2.4 Immunhistochemie (monoklonaler Antikörper)

Das Verfahren für monoklonale Antikörper weicht geringfügig vom beschriebenen Verfahren für polyklonale Antikörper ab.

Die Schnitte wurden zunächst in eine Küvette überführt und anschließend in der absteigenden Alkoholreihe hydriert bzw. entparaffiniert:

- Xylolersatz: 3 x 5min
- 100% Ethanol: 5min
- 96% Ethanol: 5 min
- 80% Ethanol: 5 min
- 70% Ethanol: 5 min
- Aqua dest.: 5 min

Anschließend wurden die Schnitte für 15 Minuten in PBS gespült. In der feuchten Kammer erfolgte die 30 minütige Inkubation mit 2 % Normal Rabbit Serum (NRS in PBS gelöst). Der primäre Antikörper (verdünnt mit Verdünnungspuffer) oder nur der Verdünnungspuffer (Kontrolle) wurden auf die Schnitte aufgeträufelt. Die Inkubation erfolgte im Kühlschrank bei 4 Grad über Nacht. Als primäre, monoklonale Antikörper wurden anti-iNOS und anti-eNOS eingesetzt. Die Antikörperkonzentrationen entsprachen den Empfehlungen.

Am darauf folgenden Tag wurden die Schnitte für dreimal zehn Minuten in PBS gespült. Die Schnitte wurden dann mit einem biotiniliertem anti mouse IgG (vom Kaninchen, Verdünnung 1:250 in PBS) für 60 min inkubiert. Anschließend wurde für zweimal zehn Minuten in PBS gespült. Die Schnitte wurden mit Mouse PAP (Verdünnung 1:100 in PBS) beträufelt. Die Inkubationszeit betrug 30 min. Anschließend erfolgte ein weiteres Spülen für zweimal zehn Minuten in PBS. Dann folgte eine 30 minütige Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Komplex (Verdünnung 1:250, gelöst in PBS). Anschließend wurde zehn Minuten in PBS gespült und weitere zehn Minuten in PB. Es folgte die Entwicklung der Peroxidase-Aktivität. Anschließend wurde für dreimal fünf Minuten in PBS gespült. Nun wurde in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert. Das Eindeckeln der Schnitte erfolgte mit Eukitt.

4.3.3 Gefrierschnitte

Es wurden 18 Ratten mit 3 x 2 h, 3 x 4 h, 3 x 6 h, 3 x 8 h, 12 h, 24 h, 3 d, 5 d, 7 d, 21 d nach unilateraler Femoralarterienligatur (operiert wurde gemäß 4.1.2.1) untersucht.

4.3.3.1 Gewebeentnahme

Als die oben genannten Zeiten verstrichen waren, wurde das Tier ausgeblutet und die Aorta kanüliert (gemäß Punkt 4.1.3.1). Die Kollateralgefäße am rechten (ligierten) und linken (unligierten, Kontrolle) Hinterlauf wurden anschließend aufgesucht und mit

umgebendem Muskelgewebe entnommen. Mit Tissue Tec wurden die Gewebestücke anschließend auf Korkplättchen fixiert und mit in flüssigem Stickstoff gekühltem n-Hexan schockgefroren. Die Gewebeproben wurden dann in Falcon-Röhrchen bei -80 °C gelagert.

4.3.3.2 Erstellen der Schnitte

Die Schnitte wurden mit dem Kryocut bei -22 °C angefertigt. Die Schnittdicke betrug jeweils $5\text{-}7\text{ }\mu\text{m}$. Die Schnitte wurden mit Objektträgern aufgenommen und unfixiert bei -80 °C gelagert.

4.3.3.3 Immunhistochemie (polyklonaler Antikörper)

Die Schnitte wurden zunächst in eine Küvette überführt und anschließend in Paraformaldehyd (6 g PFA in 150 ml PBS) fixiert. Darauf wurde für dreimal zwei Minuten in PBS gespült. Anschließend wurde die Küvette mit den Schnitten für 30 min in 1,2% H_2O_2 /Methanol überführt. Dann erfolgte ein Spülen für 15 Minuten in PBS. Die Schnitte wurden in eine feuchte Kammer überführt und mit 2 % Normal Swine Serum (NSS in PBS gelöst) inkubiert. Der primäre Antikörper (verdünnt mit Verdünnungspuffer) oder nur der Verdünnungspuffer (Kontrolle) wurden nun auf die Schnitte aufgeträufelt. Die Inkubation erfolgte im Kühlschrank bei 4 Grad über Nacht. Als primäre, polyklonale Antikörper wurden anti- β 1-sGC, anti- α 2-sGC, anti-PKG, anti-iNOS, anti-eNOS, anti-phospho-Akt, anti-phospho-eNOS verwendet. Die Antikörperkonzentration entsprach der Empfehlung der jeweiligen Gebrauchsanweisung.

Am darauf folgenden Tag wurden die Schnitte für dreimal zehn Minuten in PBS gespült. Die Schnitte wurden dann mit einem biotiniertem anti rabbit IgG (vom Schwein, Verdünnung 1:250 in PBS) für 60 min inkubiert. Anschließend wurde für zweimal zehn Minuten in PBS gespült. Die Schnitte wurden mit Rabbit PAP (Verdünnung 1:200 in PBS) beträufelt. Die Inkubationszeit betrug 30 min. Anschließend wurde für zweimal zehn Minuten in PBS gespült. Dann folgte eine 30 minütige Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Komplex (Verdünnung 1:250, gelöst in PBS). Anschließend wurde zehn Minuten in PBS gespült und weitere zehn Minuten in PB. Es folgte die Entwicklung der Peroxidase-Aktivität. Danach wurde für zweimal fünf Minuten in PBS gespült, dann für weitere fünf Minuten in Aqua dest. Am Schluss wurden die Schnitte mit Mowiol eingedeckelt.

4.3.3.4 Immunhistochemie (monoklonaler Antikörper)

Das Verfahren für monoklonale Antikörper weicht wiederum nur geringfügig vom beschriebenen Verfahren für polyklonale Antikörper ab. Die Schnitte wurden in Paraformaldehyd fixiert. Darauf wurde für dreimal zwei Minuten in PBS gespült. Zum

Ausschalten endogener Peroxidasen wurde für 30 min in 1,2% H₂O₂/Methanol gespült, danach für 15 Minuten in PBS. Die Schnitte wurden darauf in die feuchte Kammer überführt und mit 2 % Normal Rabbit Serum (NRS in PBS gelöst) inkubiert. Der primäre Antikörper (verdünnt mit Verdünnungspuffer) oder nur der Verdünnungspuffer (Kontrolle) wurden nun auf die Schnitte aufgeträufelt. Die Inkubation erfolgte im Kühlschrank bei 4 Grad über Nacht. Als primäre, monoklonale Antikörper wurden anti-iNOS und anti-eNOS eingesetzt. Die Antikörperkonzentrationen entsprachen den Empfehlungen.

Am darauf folgenden Tag wurden die Schnitte für dreimal zehn Minuten in PBS gespült. Die Schnitte wurden dann mit einem biotiniliertem anti mouse IgG (vom Kaninchen, Verdünnung 1:250 in PBS) für 60 min inkubiert. Anschließend wurde für zweimal zehn Minuten in PBS gespült. Die Schnitte wurden mit Mouse PAP (Verdünnung 1:100 in PBS) beträufelt. Die Inkubationszeit betrug 30 min. Anschließend wurde für zweimal zehn Minuten in PBS gespült. Dann folgte eine 30 minütige Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Komplex (Verdünnung 1:250, gelöst in PBS). Anschließend wurde zehn Minuten in PBS gespült und weitere zehn Minuten in PB. Es folgte die Entwicklung der Peroxidase-Aktivität. Anschließend wurde für zweimal fünf Minuten in PBS gespült, dann für weitere fünf Minuten in Aqua dest. Am Schluss wurden die Schnitte mit Mowiol eingedeckelt.

4.4 Western Blot-Analysen

Kollateralgefäßentnahme

Es wurden fünf Tiere 12 h, fünf Tiere 24 h und fünf Tiere 3 Tage nach unilateraler Femoralarterienligatur untersucht (gemäß Punkt 4.1.2.1). Nach verstrichener Zeit wurden die Tiere dann ausgeblutet und die Aorta kanüliert (gemäß Punkt 4.1.3.1). Nachdem das infundierte Kontrastmittel ausgehärtet war, wurden die Kollateralgefäße auf der behandelten und auf der unbehandelten Seite (Kontrolle) aufgesucht und mit dem umliegenden Muskelgewebe entnommen. Anschließend wurden die Kollateralgefäße in einer mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllten Petrischale auf Eis komplett freipräpariert; das umliegende Muskel- und Bindegewebe und venöse Gefäße wurden entfernt. Die „nackten“ Kollateralgefäße wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80 °C aufbewahrt.

Proteinextraktion aus Gewebe

Die gepoolten Kollateralgefäße (jeweils 5 Gefäße) wurden zunächst in flüssigem Stickstoff mit einem Mörser zerrieben und in ein mit flüssigem Stickstoff vorgekühltes 1 ml Eppendorf-Reagiergefäß überführt. Anschließend wurde 120 µl der Hg-Lösung in jedes

Reagiergefäß pipetiert und die Gefäße durch leichtes Vortexen aufgetaut. Anschließend wurde das Homogenat unter mehrmaligem Vortexen 1 h auf Eis inkubiert. Darauf erfolgte eine Zentrifugation für 10 Minuten mit 5000 x g bei 4° C. Der so gewonnene Überstand wurde in ein neues Reagiergefäß überführt und ca. 20 µl für die Protein-Konzentrationsbestimmung abgenommen. Der restliche Überstand wurde dann 2:1 mit 3x Laemmli-Puffer versetzt, 5 min bei 95° C denaturiert und entweder gleich über eine SDS-PAGE aufgetrennt oder bei -20° C gelagert.

Protein-Konzentrationsbestimmung

Es wurde wie in Punkt 4.5 verfahren.

SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Es ist ein modifiziertes Protokoll nach Laemmli [157] verwendet worden. Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte mit dem System MINI PROTEAN II der Firma BIO RAD. Dafür wurden zunächst 0,75 mm starke, ca. 5 cm lange 10% Trenngelle angefertigt. Zur Synthese einer gleichmäßigen Gelkante wurde das Trenngel mit Isobutanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation und Entfernen des Isobutanol wurde ein 4% Sammelgel über das Trenngel gegossen. Zur Denaturierung der Proteine wurden die mit Laemmli-Puffer versetzten Proben unmittelbar vor dem Auftragen 5 Minuten bei 95° C inkubiert. Dann wurden die Taschen des Gels jeweils mit 20 µl Probe beladen.

Zusätzlich wurden in jedem Gel noch ein 10 kDa Molekulargewichtsstandard und ein vorgefärbter, im Gel sichtbarer Protein-Standard aufgetragen. Alle leeren Taschen wurden nur mit 3x Laemmli beschickt. Die Elektrophorese erfolgte in SDS-Laufpuffer zunächst bei 60 V, bis die Proben in das Trenngel übergetreten waren. Dann erfolgte die Elektrophorese bei konstant 200 V für ca. 2 Stunden, bis die 30 kDa-Bande des Protein-Standards das Ende des Trenngels erreicht hatte.

Transfer und Nachweis von Proteinen auf Membranen (Western Blotting)

Es ist ein modifiziertes Protokoll nach Towbin [158] verwendet worden. Der Transfer von Proteinen aus einem SDS-PAGE-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte mit der MINI TRANS BLOT CELL der Firma BIO RAD.

Eine Nitrocellulose-Membran wurde in der Größe des Trenngels zugeschnitten und zwei 1,5 mm Filterpapiere bereitgelegt. In einer mit Transfer-Puffer gefüllten Schale wurden möglichst luftblasenfrei ein Filterpapier, das Trenngel, die Membran und das zweite Filterpapier übereinander gelegt und mit einem Blotthaler zusammengeklemmt. Der

Blotthalter wurde nun in die mit Blotting Puffer gefüllte Transferkammer überführt, so dass die Membran zur Anode ausgerichtet war.

Der Proteintransfer erfolgte bei 4° C und einem konstanten Stromfluss von 250 mA über 2 Stunden. Hiernach wurden die Proteine mittels einer Ponceau S Färbung (10 min Inkubation) sichtbar gemacht. Die jetzt sichtbaren 10 kDA Molekulargewichtsmarkerbanden wurden gekennzeichnet. Die Membran wurde horizontal entsprechend dem Molekulargewicht der nachzuweisenden Proteine geschnitten. Nach Entfernen der Ponceau S Färbung mit dem Waschpuffer erfolgte der immunologische Nachweis von Proteinen. Hierzu wurden die freien Bindungsplätze der Membran zunächst durch eine Inkubation mit Blockmedium in Waschpuffer (über Nacht bei 4° C) abgesättigt. Am folgenden Tag wurde der Blott 1-2 Stunden mit in Waschpuffer und Blockmedium verdünntem Antikörper inkubiert, wobei etwa 0,5 ml Inkubationslösung pro cm² Membran eingesetzt wurden. Anschließend wurde die Membran fünfmal für 5 min mit Waschpuffer gewaschen und nachfolgend für 1-2 Stunden mit in Waschpuffer und Blockmedium verdünntem Sekundärantikörper (Peroxidase gekoppelter anti-mouse/rabbit-IgG) inkubiert. Nach 5 x 5 min Waschen wurde die Membran auf eine Glasplatte gelegt, eine 2 Komponenten ECL-Lösung zusammenpipetiert und auf der Membran verteilt. Bei manchen Antikörpern (siehe Punkt 3.6) kam statt des ECL's eine sensitivere Lösung (Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate) zum Einsatz. Nach einer 1 bzw. 5 minütiger Inkubation wurde die Membran abgetropft, mit Klarsichtfolie bedeckt und in eine Filmkassette gelegt. Die Detektion erfolgte durch Auflegen eines Röntgenfilms in der Dunkelkammer für Sekunden bis zu 30 Minuten.

Expression der untersuchten Enzyme

Es wurden insgesamt sechs Western Blots mit jeweils 2 Gelen angefertigt. Zur Detektion der Enzyme wurden die Antikörper anti-eNOS, anti-iNOS, anti-sGC, anti-PKG, anti-phospho-Akt, anti-phospho-eNOS, anti-phospho-VASP, anti- α -Aktinin (siehe Punkt 3.6 für Details) benutzt. Jeder der insgesamt acht Antikörper kam dabei dreimal auf unterschiedlichen Gelen zur Anwendung. Durch eine zweifache horizontale Teilung der Membran konnten zwei Antikörper und α -Aktinin auf einer Membran zeitgleich getestet werden. Die erhaltenen Banden wurden densitometrisch ausgewertet und als Prozent der Expression des Enzyms im Kontrollgefäß (nicht ligierter Teil) zum Ausdruck gebracht. Die so ermittelten drei Werte für jedes Enzym wurden anschließend gemittelt. Um Schwankungen bezüglich Ladung (15-20 μ g) und Transfer der Proteine auf den Blots auszugleichen, wurde stets gegen α -Aktinin normalisiert.

Densitometrische Auswertung

Die densitometrischen Bestimmungen von Bandenintensitäten wurden mit Hilfe eines Scanners und des Programms Scan Pack durchgeführt. Für die Untersuchungen wurde aus den erhaltenen Daten (area under curve = AUC) für jede Probe der Einzelprozentwert zum Mittelwert der verwendeten Kontrollen (=100%) berechnet. Die Einzelprozentwerte aus mehreren Versuchen wurden dann gemittelt.

4.5 Guanylat-Cyclase-Assay

Allgemein

Zur Bestimmung der Aktivität der löslichen Guanylatcyclase wurde ein Enzym-Assay herangezogen. Dieser beruht auf der Bestimmung von aus $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$ gebildetem $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-cGMP}$. Die Versuche entstanden in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. med. S. Behrends, Pharmakologisches Institut der Universität Hamburg. Die Enzym-Assays sind wie in der Literatur beschrieben durchgeführt worden [159-163].

Kollateralgefäßentnahme

Es wurden zwei Enzym-Assays durchgeführt. Dabei wurden einmal 6 Tiere 12 Stunden nach Femoralarterienligatur und einmal 6 Tiere 4 Stunden nach Femoralarterienligatur untersucht (gemäß Punkt 4.1.2.1). Nach verstrichener Zeit wurden die Tiere dann ausgeblutet und die Aorta kanüliert (gemäß Punkt 4.1.3.1). Nachdem das infundierte Kontrastmittel ausgehärtet war, wurden die Kollateralgefäße auf der behandelten und auf der unbehandelten Seite (Kontrolle) aufgesucht und mit dem umliegenden Muskelgewebe entnommen. Anschließend wurden die Kollateralgefäße in einer mit physiologischen Kochsalzlösung gefüllten Petrischale auf Eis komplett freipräpariert; das umliegende Muskel- und Bindegewebe und venöse Gefäße wurden entfernt. Die „nackten“ Kollateralgefäße wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Zytosolgewinnung und –aufbereitung

Für einen Ansatz wurden die 6 Gefäße der ligierten und die der unligierten Seite jeweils gepoolt und zusammen mit Puffer A (auf ein Milligramm Gefäß 5 μl Puffer) und einer Mahlkugel in entsprechende Schüttelgefäße überführt. Anschließend wurden die Kollateralgefäße im Dismembrator fein zermahlen. Der Inhalt der Teflon-Gefäße wurde in 1 ml Eppendorf-Gefäße überführt und diese 90 min lang bei 18.000 U/min und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$

zentrifugiert. Im Pellet befanden sich dann die Zellmembranen und das Zytoskelett, im Überstand das Zytosol und damit auch die sGC.

Assay

Es wurden 10 µl des aufgearbeiteten Zytosols in einem Reaktionsvolumen von 100 µl in Anwesenheit von 0,025 mg Kreatin-Kinase, 50 mM TEA / HCl (pH 7,4), 1 mM IBMX (ein unspezifischer Inhibitor der cAMP- und cGMP-Phosphodiesterasen), 3 mM MnCl₂ bzw. MgCl₂, 5 mM Kreatin-Phosphat, 1 mM cGMP, 0,5 mM GTP und [α -³²P]-GTP für 15 min bei 37 °C inkubiert. Durch die Zugabe von cGMP erhöhte sich nicht nur die Wiederfindungsrate von [³²P]-cGMP, sondern verringerte sich auch der durch Phosphodiesterasen abgebaute Anteil an [³²P]-cGMP.

Die Guanylat-Cyclase-Aktivität wurde unter verschiedenen Bedingungen bestimmt: Einmal unter basalen Bedingungen (nur mit Zugabe von MnCl₂) und zweimal unter stimulierten Bedingungen (mit Zugabe von 100 µM DEA/NO und MgCl₂ und mit Zugabe von 100 µM DEA/NO, 100 µM YC-1 und MgCl₂). YC-1 ist ein NO unabhängiger Aktivator der sGC. 15 min nach Zusammenpipetieren des Reaktionsmixes wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml 120 mM Zinkacetat-Lösung gestoppt und die 5'-Nukleotide durch Zugabe von 0,5 ml 120 mM Natriumcarbonat-Lösung mit dem entstehenden Zinkcarbonat kopräzipitiert [164]. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (15 min bei 4000 rpm) abgetrennt, das [³²P]-cGMP verblieb im Überstand.

In Säulen wurde Aluminiumoxid mit 2 ml 0,1 N Perchlorsäure angesäuert und 800 µl Überstand der Inkubationsansätze noch während des Durchlaufs zugegeben und das [³²P]-cGMP an die Säule gebunden. Die Säule wurde mit 5 ml demineralisiertem H₂O gespült und anschließend das [³²P]-cGMP mit 5 ml 250 mM Natriumacetat in Szintillationsgefäße eluiert.

Die Zerfälle pro Minute (cpm) des [³²P] wurden durch Messung der Cerenkov-Strahlung in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler bestimmt. Zur Berechnung der Guanylat-Cyclase-Aktivität benötigte man einen Leerwert, der durch einen Ansatz ohne Protein in der Versuchsreihe erzielt wurde. Nicht enzymatisch entstandenes [³²P]-cGMP konnte so nachgewiesen werden und die Zählrate des Leerwertes von den Zählraten der Ansätze abgezogen werden. Die Wiederfindungsrate wurde in einigen Ansätzen durch den Einsatz von [³²P]-cGMP anstatt [α -³²P]-GTP bestimmt, da während der Probenaufbereitung ein Teil des cGMP mit dem entstehenden Zinkcarbonat kopräzipitierte bzw. nicht vollständig von den Aluminiumsäulen eluiert werden konnte. Die Wiederfindungsrate wurde dann aus dem Verhältnis von isolierter zu eingesetzter Radioaktivität errechnet und lag bei $0,5 \pm 0,05$. Die Reinheit des [α -³²P]-GTP lag bei 0,9. Die spezifische Aktivität der Guanylat-

Cyclase wurde als die Menge cGMP (in nmol), die von 1 mg Protein in 1 min gebildet wurde, nach folgender Formel berechnet:

$$v = \frac{(C - C_0)}{C_t} \times \frac{S}{W \times RG \times P \times t}$$

- v* spez. Aktivität der Guanylat-Cyclase (nmol cGMP x min⁻¹ x mg Protein⁻¹)
C Zählrate der Probe (cpm)
C₀ Zählrate des Leerwertes (cpm)
C_t Zählrate des eingesetzten [α -³²P]-GTP (cpm)
S Menge des eingesetzten Substrates 5'-GTP pro Ansatz (nmol)
W Wiederfindungsrate von cGMP (bestimmt mit [³²P]-cGMP, um Verluste durch Kopräzipitation mit ZnCO₃ oder unvollständige Elution von der Säule zu quantifizieren)
RG Reinheitsgrad des [α -³²P]-GTP
P Proteinmenge pro Inkubationsansatz (mg)
t Inkubationsdauer (min)

Zur Bestimmung der Guanylat-Cyclase-Aktivität in den Einzelmessungen wurde ein Mittelwert aus zwei oder drei Ansätzen berechnet.

Protein-Konzentrationsbestimmung

Nach Bradford [165] wurde mit Hilfe eines BIO RAD Protein Assays eine Eichkurve mit aufsteigenden definierten Proteinkonzentrationen (aus BIO RAD Standard Protein I) erstellt (inkl. einer Leerprobe 10 Reagenzgläser, Proteingehalt von 0,5 bis 20 µg/ml). Die zu messenden Proben wurden jeweils als Doppelbestimmung nach entsprechender Vorverdünnung (1:2) ebenfalls in Reagenzgläser überführt. Nach Zugabe des BIO RAD Reagenz (400 µl bei einem Gesamtvolumen von 2000 µl) wurden die Proben ausreichend gemischt und nach 15 Minuten die Extinktion bei 595 nm Wellenlänge gemessen.

Das Photometer erstellte selbstständig eine Eichkurve und errechnete daraus die Probenkonzentration in µg/ml. Durch Multiplikation mit dem Faktor 0,005 erhielt man die Absolutmenge Protein der Probe in mg, die in den bei der Messung eingesetzten 25 µl enthalten waren.

4.6 Post mortem Angiographie

Für diesen Teil der Arbeit wurden vierzehn Tiere untersucht. Alle Tiere erhielten zwei Tage vor der ersten Operation täglich L-NAME über das Trinkwasser. Der NO-Synthase-Hemmer N_W -Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester (L-NAME) wurde, wie in der Literatur beschrieben, täglich frisch über das Trinkwasser verabreicht (65-70 mg L-NAME pro kg und pro Tag) [13]. Alle Tiere erhielten eine einseitige Femoralarterienligatur und eine osmotische Pumpe (gemäß Punkt 4.1.2.2); sieben Ratten erhielten dabei eine mit MCP-1 gefüllte Pumpe, weiteren sieben wurde eine nur mit PBS gefüllte Pumpe (Kontrolle) eingebaut. Die Verteilung auf die beiden Gruppen erfolgte zufällig. Die Pumpen förderten und am siebten Tag nach Pumpenimplantation wurden bei allen Ratten die Aorta kanüliert und Kontrastmittel appliziert (4.1.3.1).

Vor der Angiographie wurden die Tiere in Gelatine (60 g Gelatine pro Liter H_2O) eingebettet. Dies diente einerseits der Fixierung der Tiere, andererseits der Normierung der Eindringtiefe der Röntgenstrahlen. Die in Gelatine eingebetteten Tiere wurden in die Röntgen-Kammer überführt. Es wurden zunächst plane Aufnahmen bei einer Röntgenstrahlung von 35 kV für 6 min angefertigt. Danach folgten dann die Rechts- und Links-Seitenlagen-Bilder bei gleicher Röntgenstrahleinstellung.

Die Röntgenbilder wurden somit aus drei verschiedenen Winkeln aufgenommen und machten so eine stereoskopische Analyse der Gefäßarchitektur möglich. Die Kollateralgefäße wurden mit der Hilfe eines Stereoskops identifiziert und anschließend ausgezählt. Es konnten so die verschiedenen Abschnitte der Kollateralgefäße (Gefäßstamm, Mittelteil, Wiederanschluss-Region) dargestellt werden.

4.7 Statistik

Zunächst wurde bei allen Versuchsreihen Mittelwert und Standardabweichung berechnet und folgend alle Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

Die Signifikanztestung wurde mit dem Programm SigmaStat (JANDEL SCIENTIFIC) durchgeführt, wobei im Vergleich von zwei Behandlungsgruppen der Studentische T-Test angewandt wurde. Signifikante Unterschiede wurden angenommen, wenn $P < 0,05$ war.

5. Ergebnisse

5.1 Tiermodell

Um die Mechanismen der Arteriogenese genauer untersuchen zu können, musste zunächst nach einem geeigneten Modell gesucht werden; einem Modell, in dem Arteriogenese nachweislich stattfindet.

Die Arteriogenese ist definiert als das Wachstum von kleinen arteriolen Shuntgefäßen eines Umgehungskreislaufes in funktionelle Kollateralarterien. Damit ergeben sich zwei Grundvoraussetzungen an ein geeignetes Modell. Man benötigt ein präexistentes kollaterales Netzwerk und eine geeignete Stimulation, um die Shuntgefäße des Netzwerkes zur Proliferation anzuregen.

Die Gefäß-Ausguss-Modelle der beiden Hinterläufe der Ratten zeigten eindeutig einen präexistenten arteriolen Shunt zwischen der Arteria iliaca interna und der Arteria poplitea (Abb. 5.1.1). Anatomisch konnte ein Gefäßstamm, ein Mittelteil und ein Wiederanschluss identifiziert werden. In fünf verschiedenen Casts waren diese Ergebnisse reproduzierbar. Auch angiographisch konnte in den Rattenhinterläufen eine präexistente Anastomose identifiziert werden (Abb. 5.1.2, dünne schwarze Pfeile). Ein präexistentes kollaterales Netzwerk war somit am Hinterlauf der Ratte gefunden.

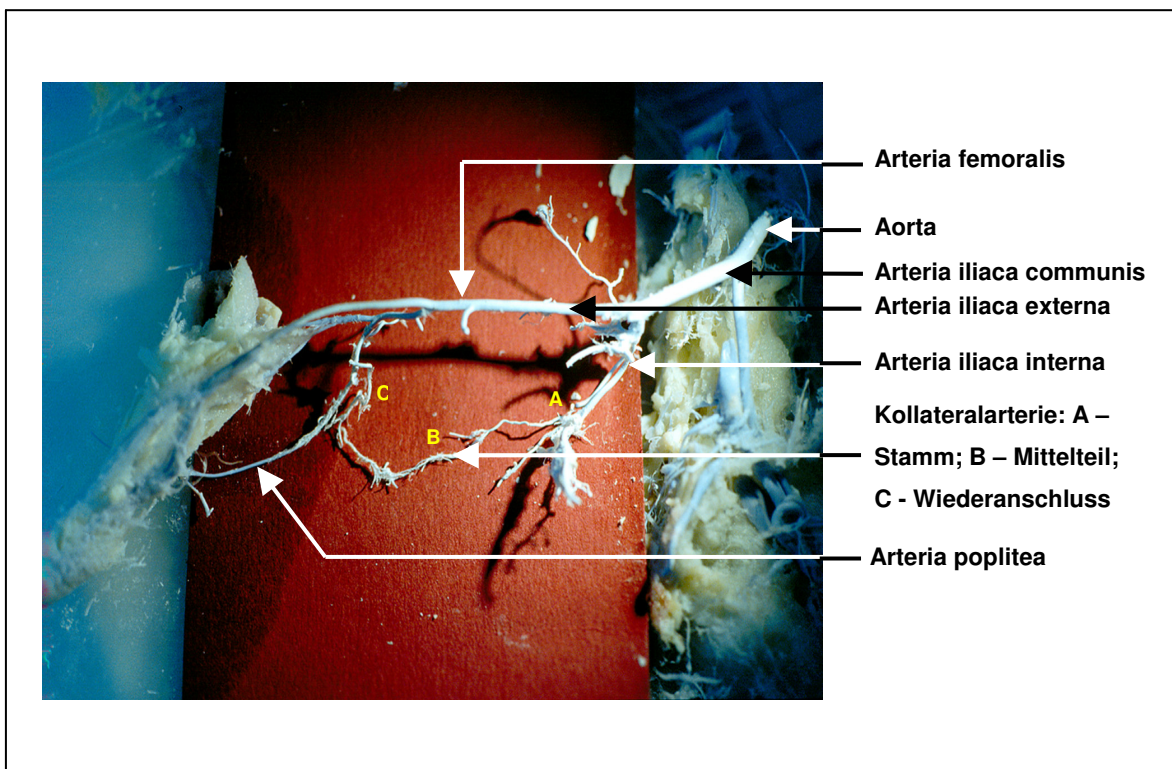


Abb. 5.1.1: Ausguss-Modell vom rechten Hinterlauf einer Ratte, ohne Femoralarterienligatur

Das größte Gefäß des kollateralen Netzwerkes (präexistente Anastomose) war intraoperativ makroskopisch, wie auch angiographisch von nur leicht gewundener Erscheinung (Abb. 5.1.2, dünne schwarze Pfeile). Der Durchmesser im Gefäßmittelteil betrug 140 µm. Eine operativ herbeigeführte Ligatur konnte die A. femoralis okkludieren (Abb. 5.1.2, rechter Hinterlauf). Um diesen Verschluss zu umgehen, wurde der Blutfluss nun komplett über das kollaterale Netzwerk umgeleitet. Dabei zeigte sich, dass 2 Wochen bzw. 2 Monate nach einer unilateralen Femoralarterienligatur aus der arteriolen Anastomose (Abb. 5.1.2, dünne schwarze Pfeile) eine prominente Kollateralarterie entstanden war (Abb. 5.1.2, dicke schwarze Pfeile). Der Gefäßverlauf zeigte nun makroskopisch eine stärkere Verwindung und nahm eine fast korkenzieherartige Gestalt an. Der Gefäßdurchmesser im Mittelteil war auf 300 µm angewachsen. Eine Stimulation der Arteriogenese war in der Femoralarterienligatur gefunden.

Die Lage und Anatomie sowohl des voll entwickelten Kollateralgefäßes, wie auch der arteriolen Anastomose waren in allen Experimenten gleich. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass das Hauptkollateralgefäß aus der präexistente arteriolen Anastomose gewachsen war.

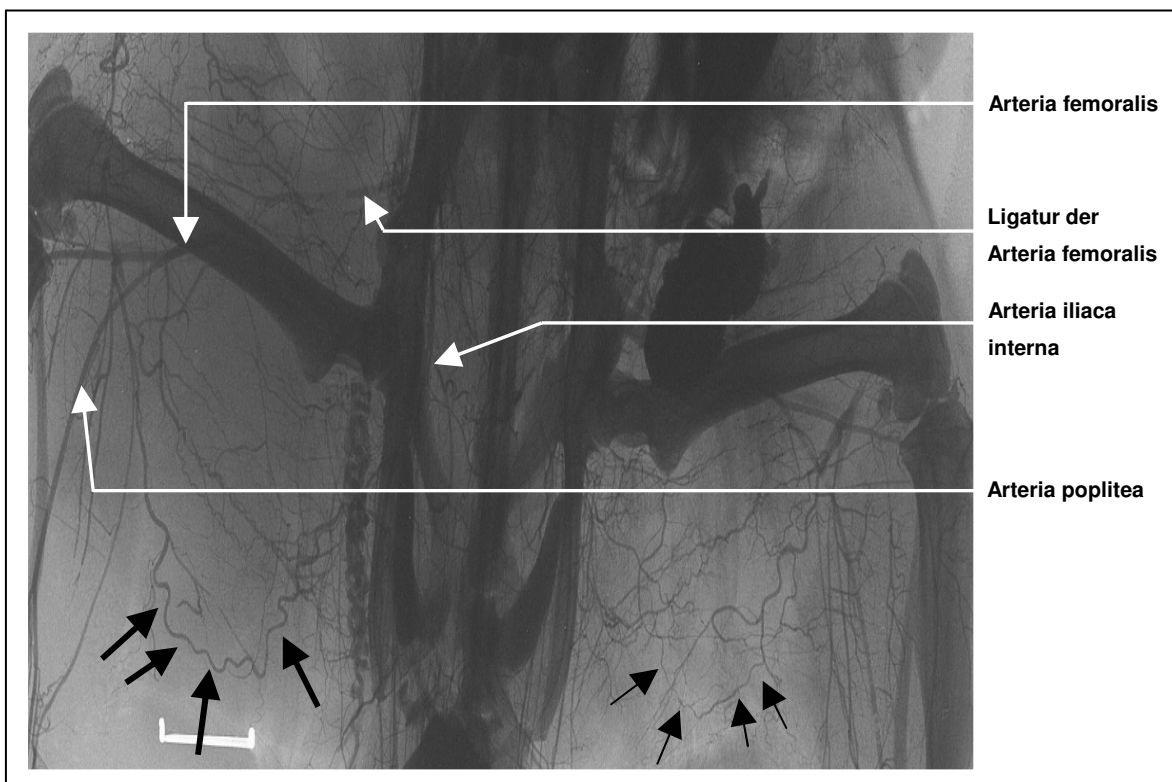


Abb. 5.1.2: Angiogramm von den Hinterläufen einer Ratte, 7 Tage nach rechtsseitiger Femoralarterienligatur

Die Gefäße wurden zusätzlich histologisch aufbereitet. Die folgenden Bilder zeigen die Gefäße zunächst in 10 facher Übersichtsvergrößerung (Abb. 5.1.3 und 5.1.5). Man erkennt die quergestreifte Muskulatur des Oberschenkels, die Kollateralarterie bzw. die Arteriole in ihrem zwischen der Oberschenkelmuskulatur gelegenen Sulcus aus Bindegewebe und Fett. Schon in der 40 fachen Vergrößerung lässt sich im Kollateralgefäß eine zunehmende Wandverdickung im Vergleich zur Arteriole ausmachen (Abb. 5.1.4 und Abb. 5.1.6). Vier Monate nach Ligatur hat die Gefäßwanddicke um ein vielfaches zugenommen; der Lumendurchmesser hat sich verdoppelt.

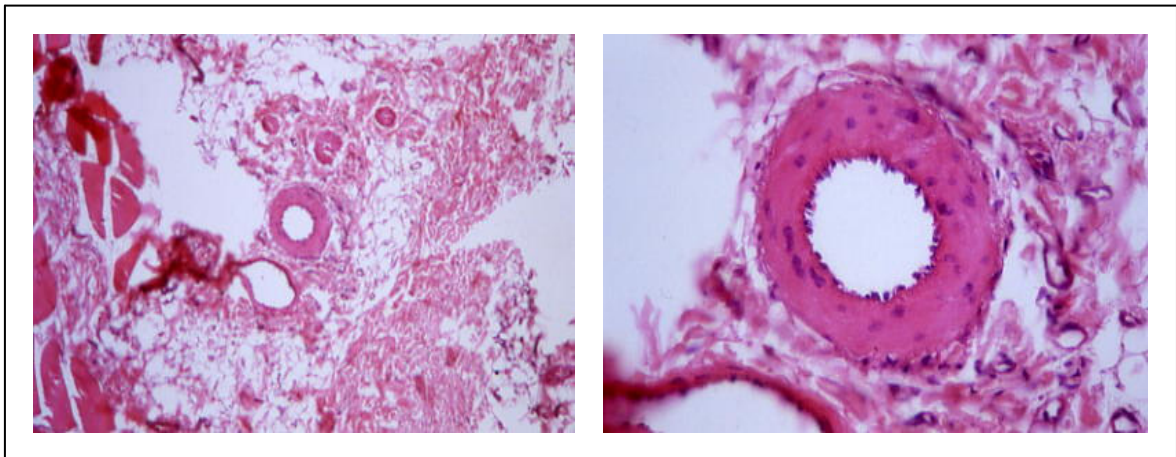


Abb. 5.1.3: Kollateralarterie, 4 Monate nach Ligatur, Paraffinschnitt, HE, 10x

Abb. 5.1.4: Kollateralarterie, 4 Monate nach Ligatur, Paraffinschnitt, HE, 40x

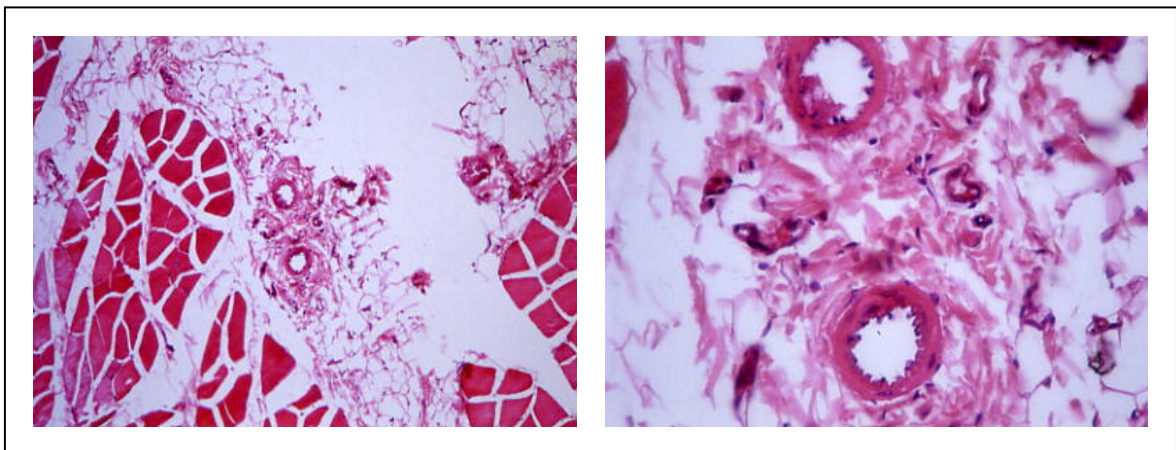


Abb. 5.1.5: Arteriole, unbehandelte Seite, Paraffinschnitt, HE, 10x

Abb. 5.1.6: Arteriole, unbehandelte Seite, Paraffinschnitt, HE, 40x

In der 100 fachen Vergrößerung der Kollateralarterie (Abb. 5.1.7) sieht man die Endothelzellkerne der Tunica intima (Intima). Sie springen ösenförmig in die Gefäßlichtung hinein. Die Tunica media (Media) besteht hier aus dichtgefügt, spindelförmigen, glatten Muskelzellen, die das Gefäßrohr zirkulär oder spiralg umgeben.

Die Arteriole als Kontrollgefäß (Abb. 5.1.8) dagegen verfügt über einen wesentlich kleineren Durchmesser. Auch die Media ist weniger mit glatten Muskelzellen bepackt.

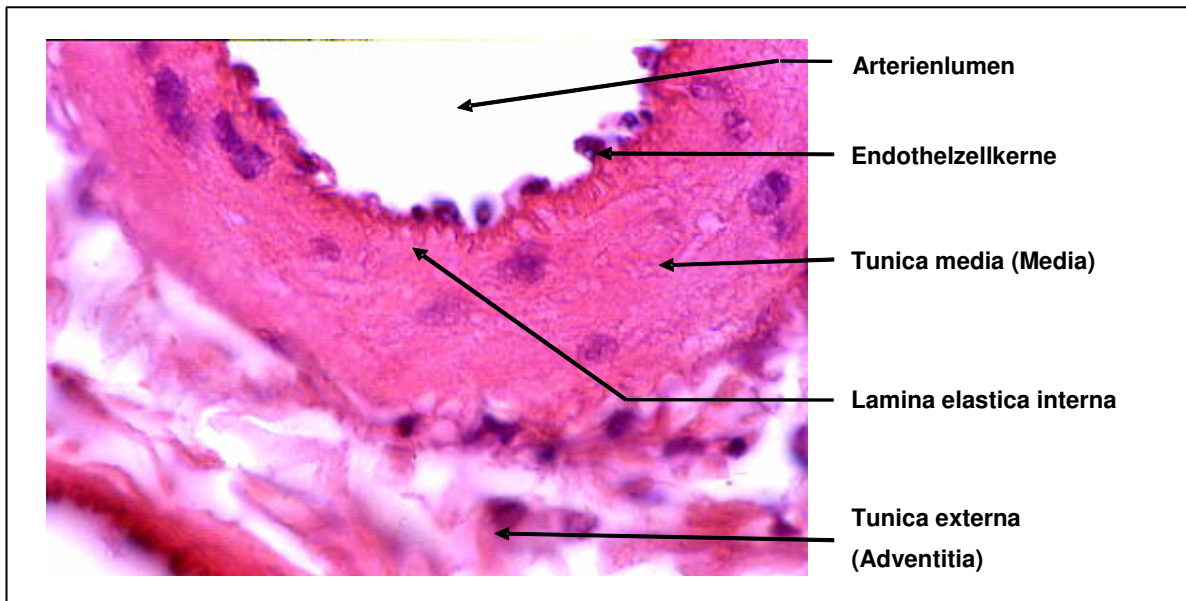


Abb. 5.1.7: Kollateralarterie, 4 Monate nach Ligatur, Paraffinschnitt, HE, 100x

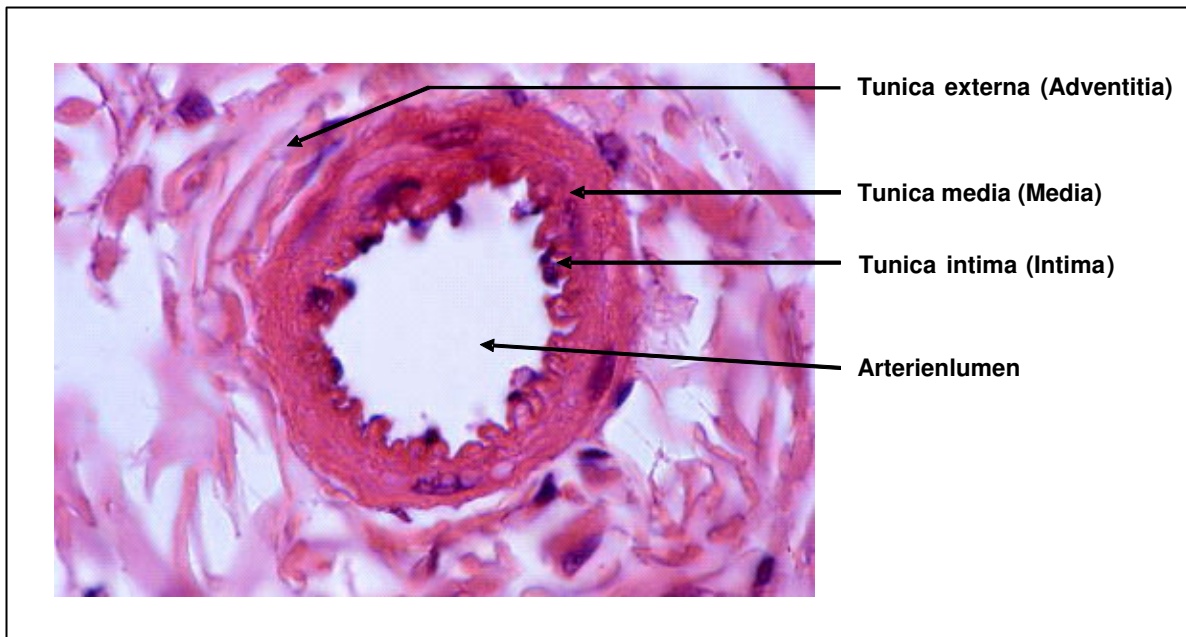


Abb. 5.1.8: Arteriole, unbehandelte Seite, Paraffinschnitt, HE, 100x

In unserer Arbeit konnten wir eindeutig einen präexistierenden arteriolären Shunt zwischen der Arteria iliaca interna und der Arteria poplitea nachweisen. Nach unilateraler, proximaler Femoralarterienligatur umging der Blutstrom die herbeigeführte Stenose unter Benutzung eines kollateralen Gefäßnetzwerkes. Die Hauptanastomose begann innerhalb

der ersten 24 Stunden zu proliferieren. Die maximale Proliferation konnte innerhalb der ersten drei Tage nach Okklusion verzeichnet werden. Die Zellteilung war dabei strikt auf das Kollateralgefäß beschränkt, umliegende Arterien und Kapillaren waren von ihr ausgenommen. Das Kollateralgefäß verdoppelte seinen Durchmesser innerhalb der ersten sieben Tage nach Ligatur und stellte sich in seiner Korkenzieher ähnlichen Form dar. Nach den sieben Tagen nahm das Kollateralgefäß auch weiterhin an Länge zu. Es fanden sich aber keine weitere Proliferation oder eine Zunahme im Durchmesser. Eine einseitige Femoralarterienligatur ermöglichte jederzeit, das Kollateralgefäß mit seinem „Ursprungsgefäß“ zu vergleichen.

Aufgrund all dieser Voraussetzungen ist das von unserer Arbeitsgruppe entwickelte Tiermodell geeignet, das Kollateralarterienwachstum (Arteriogenese) zu studieren. Das Tiermodell wurde im Juli 2002 veröffentlicht [150].

5.2 Enzymexpression

5.2.1 Immunhistochemische Analysen

Um den Einfluss von NO auf die Arteriogenese zu untersuchen, sollten folgende Fragen beantwortet werden: Verändert sich im Verlauf der Arteriogenese die Expression von Enzymen der Stickstoffmonoxid-Signalkaskade? Wo findet die Enzymexpression statt? Verändert sich der Ort der Enzymexpression?

Dies wurde zunächst qualitativ anhand von immunhistochemischen Färbungen der Gefäße untersucht. Es wurden Gefrierschnitte von Kollateralarterien (von der ligierten Seite) und Kontrollgefäßen (präexistente Anastomose, aus der unbehandelten Seite) aus 18 Tieren mit 3 x 2 h, 3 x 4 h, 3 x 6 h, 3 x 8 h, 12 h, 24 h, 3 d, 5 d, 7 d und 21 d nach einseitiger Femoralarterienligatur erhoben. Es wurden ergänzend Paraffinschnitte von sechs Tieren mit 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 4 Wochen und 4 Monaten nach einseitiger Femoralarterienligatur angefertigt.

Zunächst wurden die Paraffinschnitte mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Dieses diente der besseren Darstellung der anatomischen Strukturen und der Identifikation des Kollateralgefäßes. Die dann folgenden immunhistochemischen Färbungen wurden mit Antikörpern gegen die Enzyme der NO-Signalkaskade (eNOS, iNOS, sGC und PKG) sowohl an Paraffin-, wie auch an Gefrierschnitten durchgeführt. Die Versuche wurden zu unterschiedlichen Zeiten nach Ligatur ausgeführt, um etwaige Veränderungen in der Enzymexpression zeitlich besser zuordnen zu können.

Exemplarisch werden nun einige Bilder mit verschiedenen immunhistochemischen Färbungen gezeigt. Das Gefäß aus dem behandelten Bein mit Femoralarterienligatur

(Kollateralgefäß) und das aus dem unbehandelten Bein (präexistente Anastomose, Arteriole, Kontrollgefäß) sind sich in gleicher Vergrößerung jeweils gegenübergestellt und verglichen worden. Es folgen nun Bilder der Gefäße mit 12 h nach Femorararterienligatur. Hier sind zunächst die HE- Färbungen, danach die Immunfärbungen dargestellt.

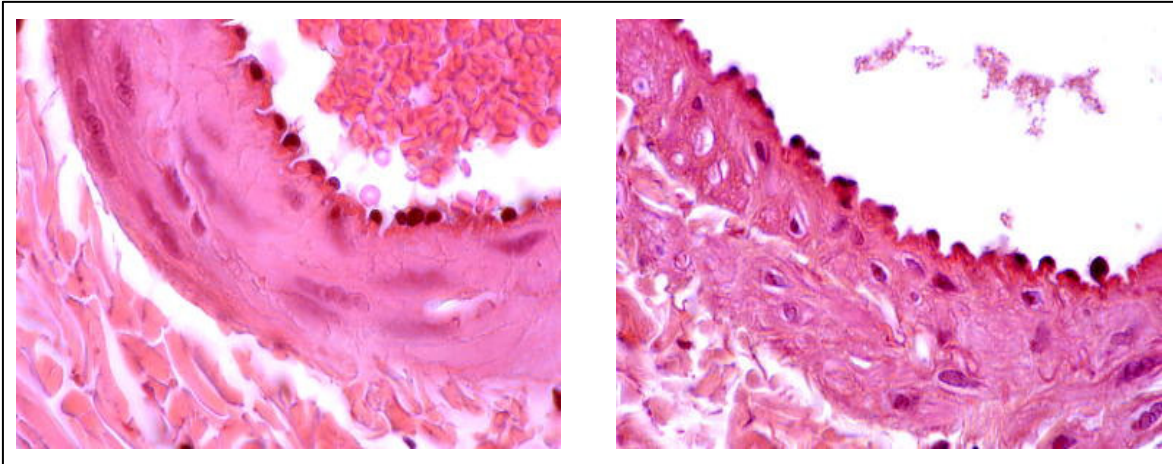


Abb. 5.2.1.1: Kollateralgefäß, 12 h nach Ligatur, HE, Paraffinschnitt, 100x

Abb. 5.2.1.2: Kontrollgefäß, unbehandelte Seite, HE, Paraffinschnitt, 100x

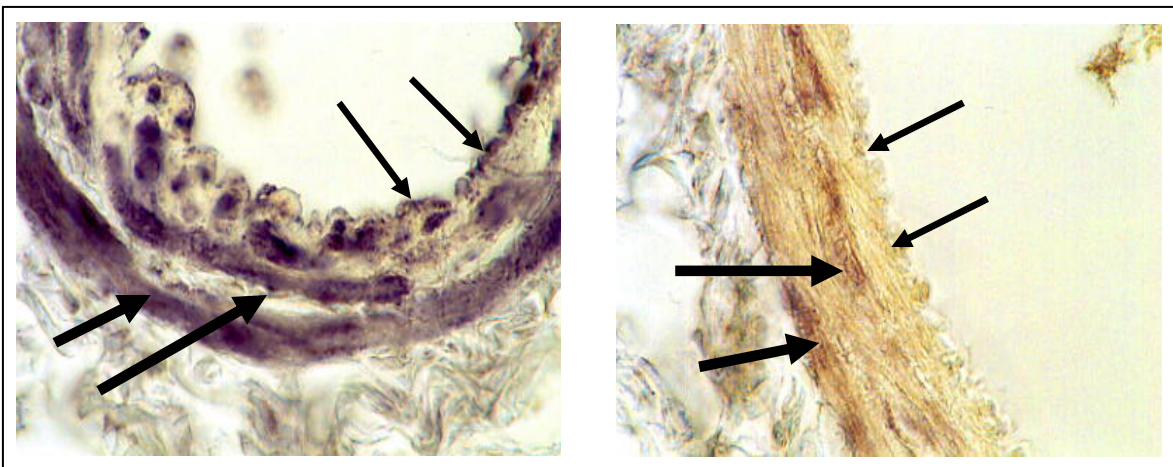


Abb. 5.2.1.3: Kollateralgefäß, 12 h nach Ligatur, anti-eNOS, Paraffinschnitt, 100x

Abb. 5.2.1.4: Kontrollgefäß, unbehandelte Seite, anti-eNOS, Paraffinschnitt, 100x



Abb. 5.2.1.5: Kollateralgefäß, 12 h nach Ligatur, anti-iNOS, Gefrierschnitt, 40x

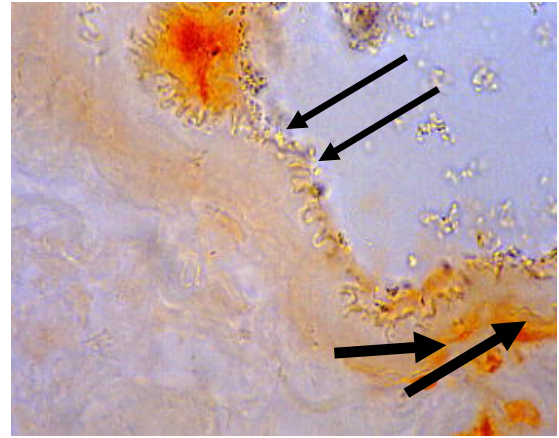


Abb. 5.2.1.6: Kontrollgefäß, unbehandelte Seite, anti-iNOS, Gefrierschnitt, 100x

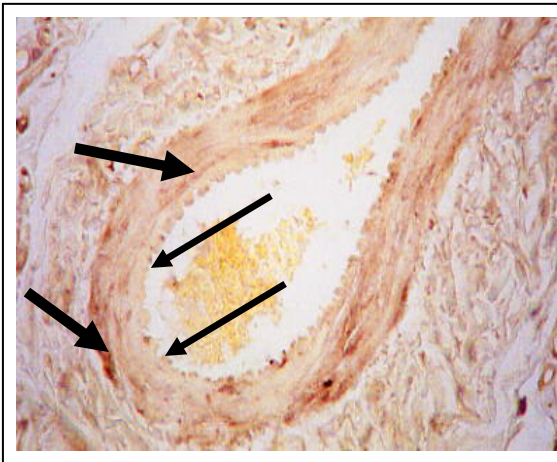


Abb. 5.2.1.7: Kollateralgefäß, 12 h nach Ligatur, anti- α 2-sGC, Paraffinschnitt, 40x

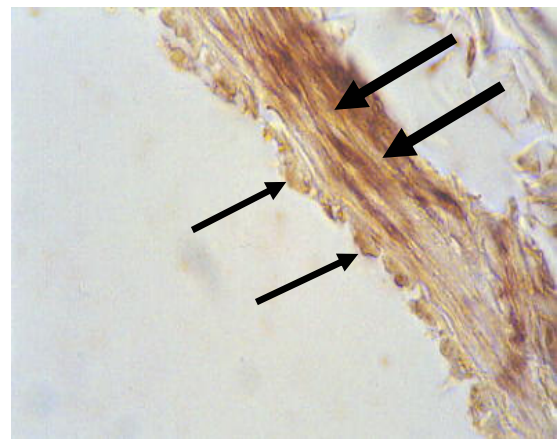


Abb. 5.2.1.8: Kontrollgefäß, unbehandelte Seite, anti- α 2-sGC, Paraffinschnitt, 100x

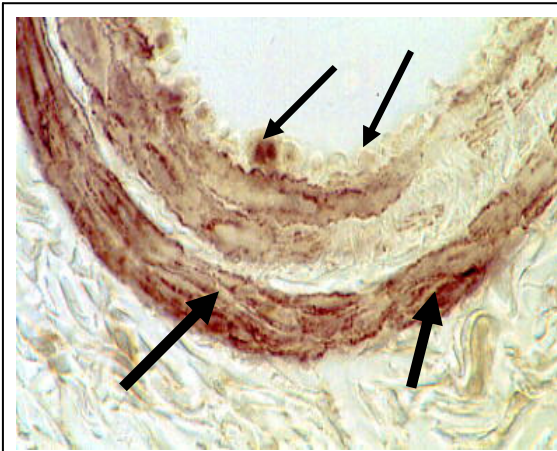


Abb. 5.2.1.9: Kollateralgefäß, 12 h nach Ligatur, anti-PKG, Paraffinschnitt, 100x

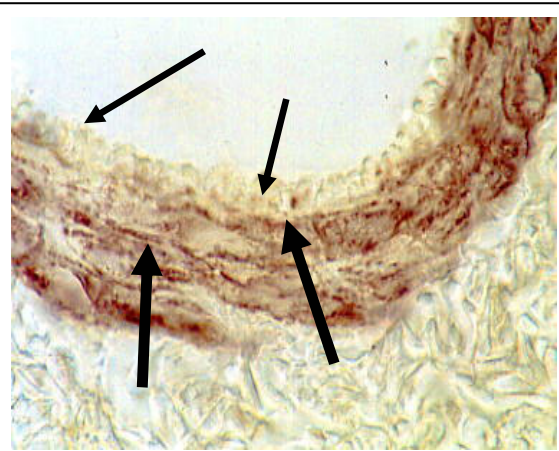


Abb. 5.2.1.10: Kontrollgefäß, unbehandelte Seite, anti-PKG, Paraffinschnitt, 100x

Zwölf Stunden nach Femoralarterienligatur war die eNOS im Kollateralgefäß gleichermaßen in der Tunica intima (dünne Pfeile) wie auch der Tunica media (dicke Pfeile) exprimiert (Abb. 5.2.1.3). Selbiges gilt auch für die Arteriole als Kontrollgefäß (Abb. 5.2.1.4). Die iNOS befindet sich im Kollateral- (Abb. 5.2.1.5) wie auch im Kontrollgefäß (Abb. 5.2.1.6) vernehmlich in der Tunica intima (dünne Pfeile). Die $\alpha 2$ -Untereinheit der löslichen Guanylat-Cyclase ist hauptsächlich in der Tunica media lokalisiert (dicke Pfeile). Auch hier unterscheidet sich das Kollateral- (Abb. 5.2.1.7) nicht vom Kontrollgefäß (Abb. 5.2.1.8). Die Proteinkinase G wird fast ausschließlich in der glatten Muskulatur der Tunica media exprimiert (dicke Pfeile). Das Endothel und die Tunica adventitia sind fast komplett von ihr ausgespart. Wiederum unterscheiden sich Kollateral- (Abb. 5.2.1.9) und Kontrollgefäß (Abb. 5.2.1.10) hier nicht.

Weiter folgen Bilder der Gefäße mit 3 d nach Femoralarterienligatur. Wiederum sind zunächst die HE-Färbungen, danach die Immunfärbungen dargestellt.

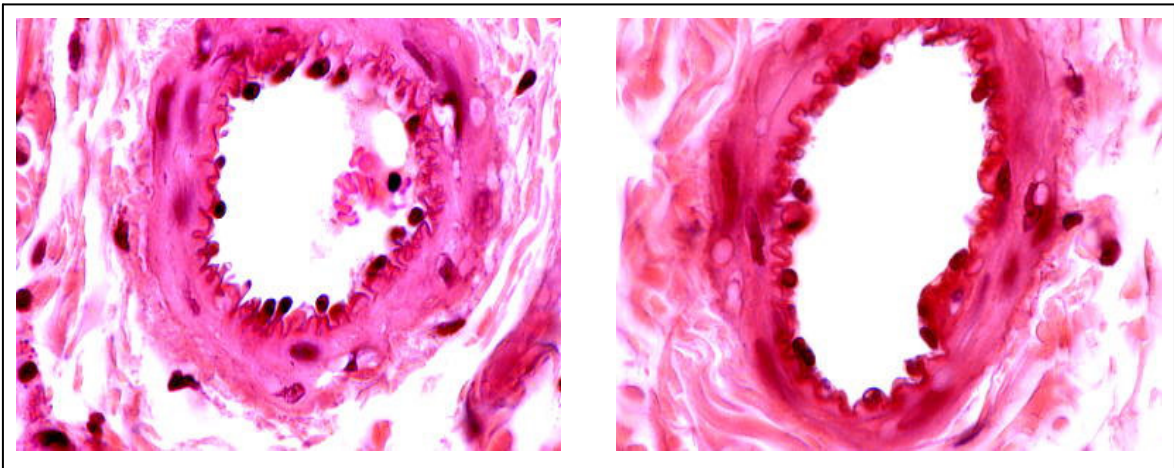


Abb. 5.2.1.11: Kollateralgefäß, 3 d nach Ligatur, HE, Paraffinschnitt, 100x

Abb. 5.2.1.12: Kontrollgefäß, unbehandelte Seite, HE, Paraffinschnitt, 100x

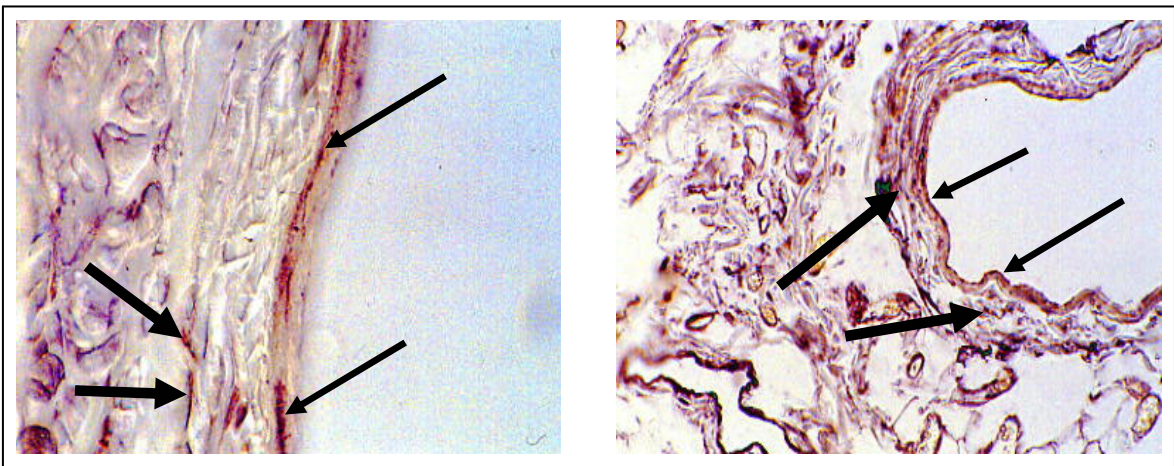


Abb. 5.2.1.13: Kollateralgefäß, 3 d nach Ligatur, anti-eNOS, Paraffinschnitt, 100x

Abb. 5.2.1.14: Kontrollgefäß, unbehandelte Seite, anti-eNOS, Paraffinschnitt, 40x

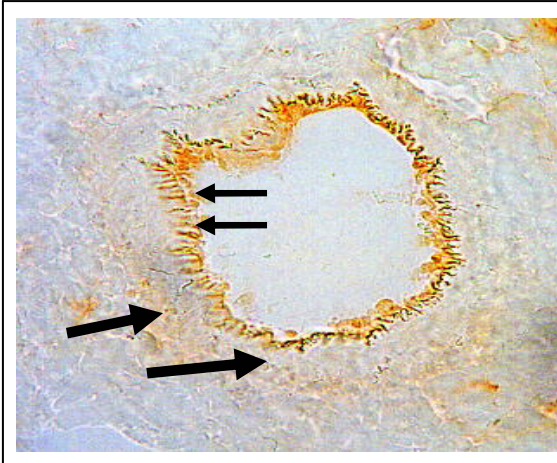


Abb. 5.2.1.15: Kollateralgefäß, 3 d nach Ligatur, anti-iNOS, Gefrierschnitt, 40x

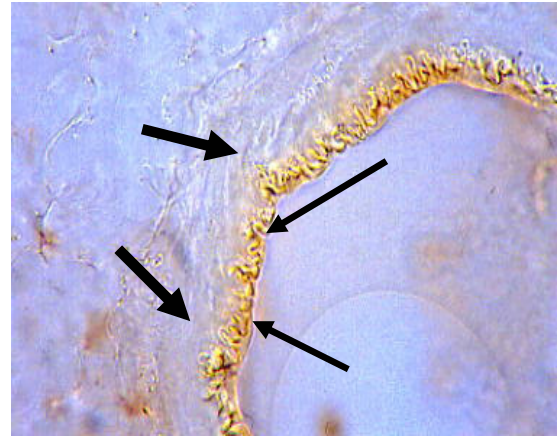


Abb. 5.2.1.16: Kontrollgefäß, unbehandelte Seite, anti-iNOS, Gefrierschnitt, 100x

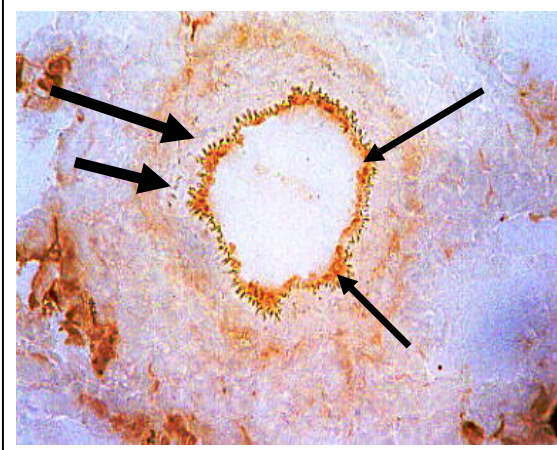


Abb. 5.2.1.17: Kollateralgefäß, 3 d nach Ligatur, anti-β1-sGC, Gefrierschnitt, 40x

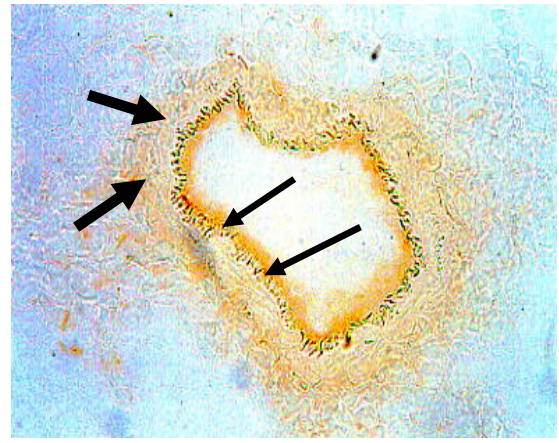


Abb. 5.2.1.18: Kontrollgefäß, unbehandelte Seite, anti-β1-sGC, Gefrierschnitt, 40x

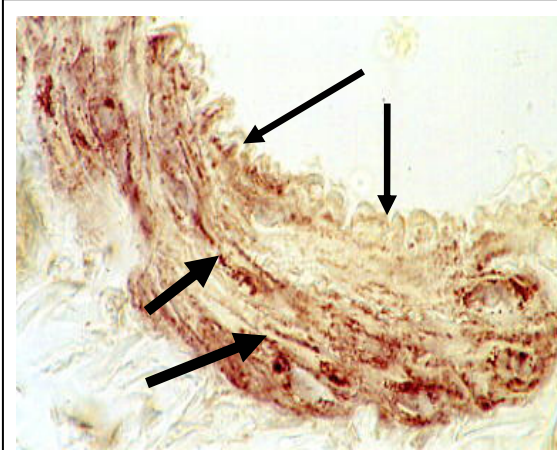


Abb. 5.2.1.19: Kollateralgefäß, 3 d nach Ligatur, anti-PKG, Paraffinschnitt, 100x

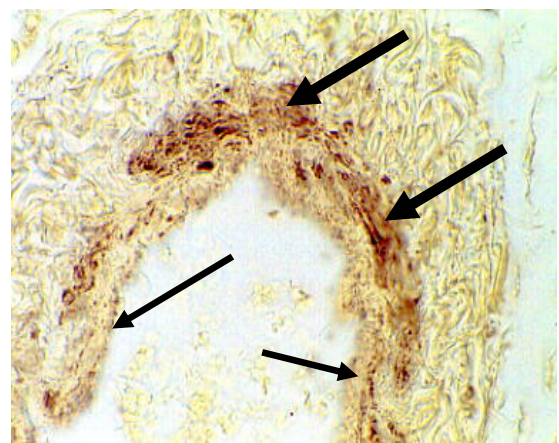


Abb. 5.2.1.20: Kontrollgefäß, unbehandelte Seite, anti-PKG, Paraffinschnitt, 40x

Drei Tage nach Femoralarterienligatur war die eNOS und die iNOS des Kollateralgefäßes wie erwartet hauptsächlich im Endothel lokalisiert (dünne Pfeile, Abb. 5.2.1.13 bzw. 15). Dies gilt auch für das Kontrollgefäß (dünne Pfeile, Abb. 5.2.1.14 bzw. 16). Die β 1-Untereinheit der löslichen Guanylat-Cyclase ist im Kollateralgefäß vornehmlich in der glatten Muskulatur lokalisiert (dicke Pfeile, Abb. 5.2.1.17). Auch hier ergibt der Vergleich mit dem Kontrollgefäß (Abb. 5.2.1.18) keinen Unterschied. Die Proteinkinase G zeigt eine starke Expression in den glatten Muskelzellen (dicke Pfeile), aber auch der Tunica intima ist eine Expression zu verzeichnen. Die Expression verhält sich zwischen Kollateral- (Abb. 5.2.1.19) und Kontrollgefäß (Abb. 5.2.1.20) aber wiederum gleich.

Die Auswertungen der immunhistochemischen Färbungen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. med. R. Middendorff, Anatomisches Institut der Universität Hamburg, vorgenommen. Die Auswertungen erfolgten dabei mikroskopisch nach qualitativen Gesichtspunkten. Es ist immer das Kollateralgefäß mit dem Kontrollgefäß verglichen worden.

Zusammenfassend geht aus allen immunhistochemischen Bildern (Paraffinschnitte und Gefrierschnitte) hervor, dass sich die Expression der untersuchten Enzyme im Verlauf der Arteriogenese nicht verändert hat. Die Expression der Enzyme ist im Vergleich zwischen behandelten und unbehandelten Gefäßen stets gleich geblieben. Zudem kam es zu keinerlei Veränderungen im Ort der Expression.

5.2.2 Western Blot-Analysen

Die immunhistochemischen Untersuchungen ermöglichten eine qualitative Analyse der Enzymexpression. Diese sollten nun auch durch quantitative Versuche ergänzt werden. Mittels der Western Blot Technik und einer densitometrischen Auswertung der Proteinbanden war dies möglich (3.6 und 4.6). Um zusätzlich zur Expression auch Aussagen über Aktivität und Aktivierungswege zu erhalten, sind zusätzlich Enzyme (p-Akt, p-VASP) untersucht worden, die über De-/Phosphorylierungen regulatorisch in die NO-Signalkaskade eingreifen können.

Es wurden Kollateral- und Kontrollgefäße (präexistente Anastomose) aus fünf Tieren 12 h, fünf Tieren 24 h und fünf Tieren 72 h nach einseitiger Femoralarterienligatur isoliert und untersucht. Die Expressionen der Enzyme eNOS, iNOS, phospho-VASP, PKG-I, phospho-Akt und α -Aktinin wurden densitometrisch analysiert. Eine gleichmäßige Proteinbeladung und der Transfer auf die Nitrozellulosemembranen wurden durch eine Ponceau S Färbung kontrolliert. Die erhaltenen Banden wurden stets in einer parallel laufenden Immunreaktion gegen α -Aktinin abgeglichen.

Die Abb. 5.2.2.1 zeigt exemplarisch eine immunologische Darstellung von Proteinbanden (eNOS, α -Aktinin, PKG-I, p-VASP) auf einer Nitrozellulosemembran. Mittels einer densitometrischen Auswertung der einzelnen Proteinbanden konnte die „area under curve“ berechnet werden. Sie ist in Abb. 5.2.2.2 graphisch dargestellt.

Die endothelialen NO-Synthasen sind 12 h nach Okklusion zunächst herunterreguliert, 24 h nach Okklusion aber überschießend hochreguliert. Sie erreichen dabei eine Enzymexpression, die eineinhalb Mal so groß ist wie die der Kontrollgefäße. 3 Tage nach Okklusion ist die Expression dann nicht mehr von der der Kontrollgefäße verschieden. Die Expression der PKG-I ist zu jedem Beobachtungszeitpunkt signifikant niedriger als die der Kontrollgefäße. Für die p-VASP-Expression gilt, dass sie nach 12 h zunächst herunterreguliert ist, sich zu den späteren Zeitpunkten dann aber wieder um das Expressionsniveau der Kontrollgefäße einpendeln kann.

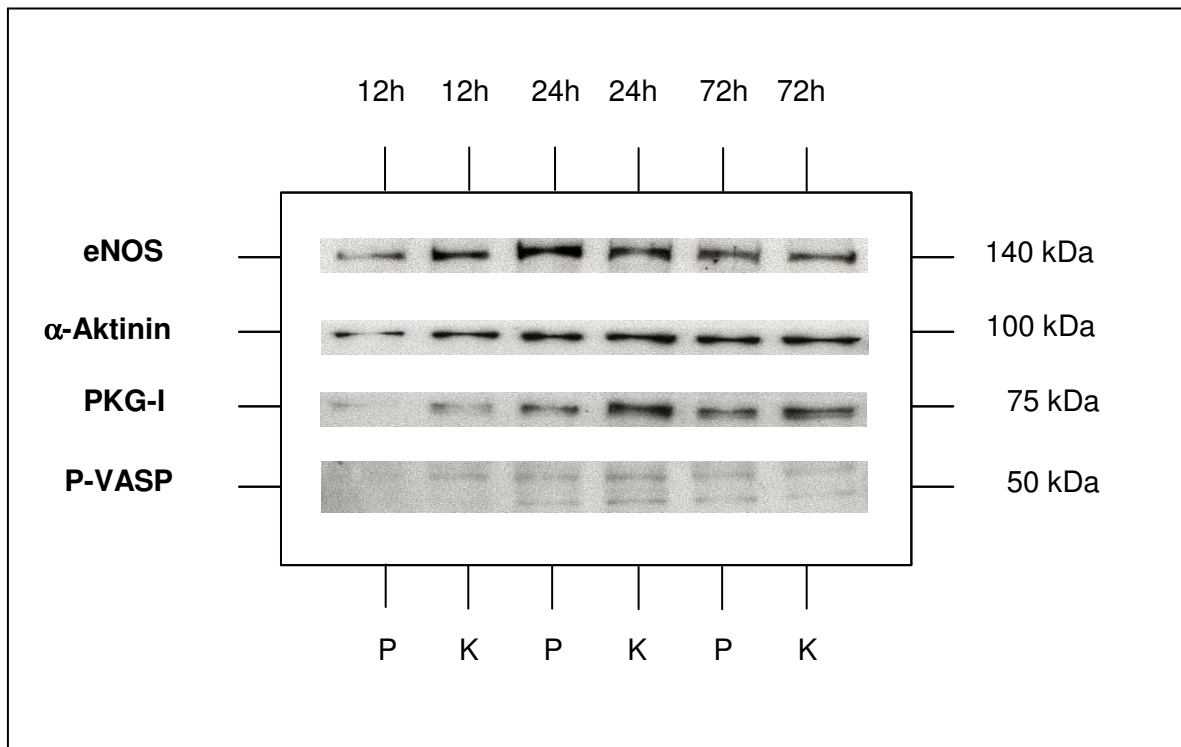


Abb. 5.2.2.1: repräsentativer Originalblot zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Ligatur, P (Kollateralgefäß), K (Kontrollgefäß)

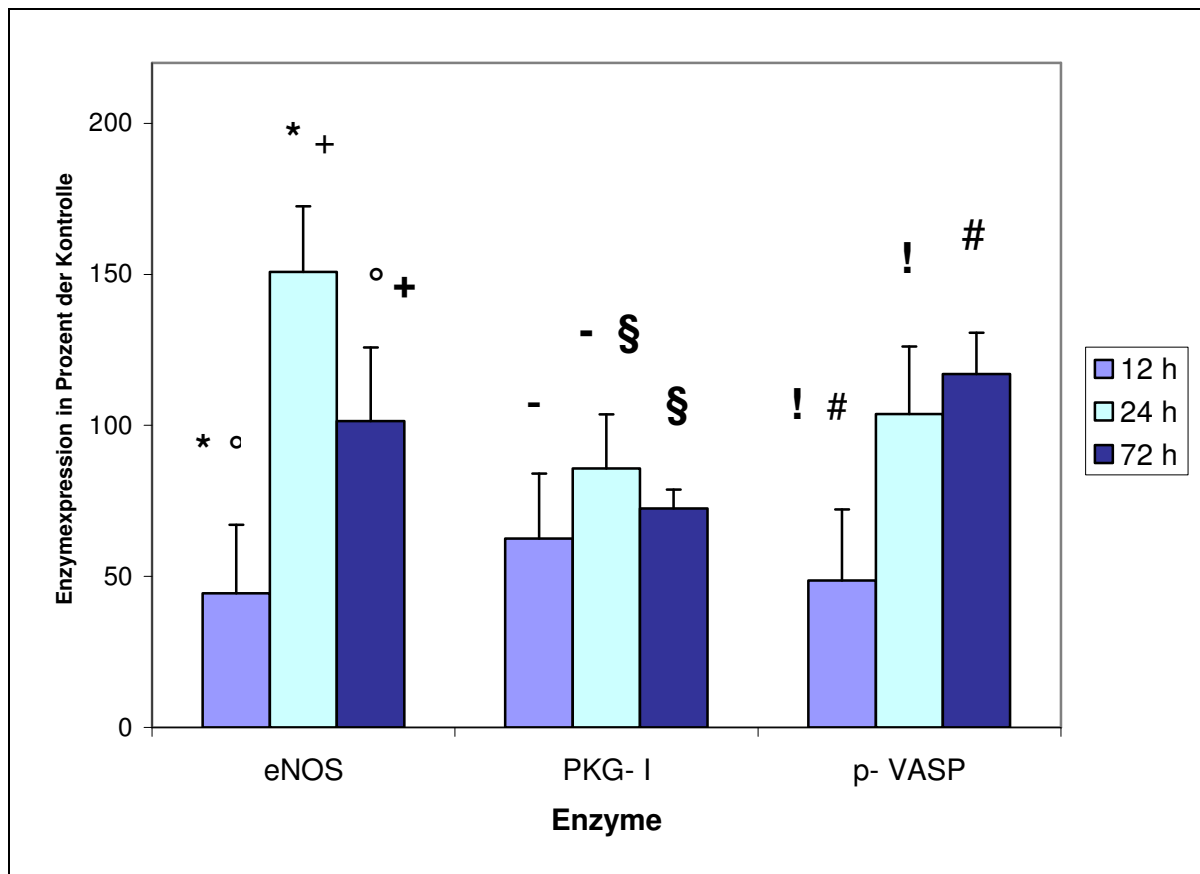


Abb. 5.2.2.2: Expression der Enzyme des Kollateralgefäßes in Prozent der Expression des Kontrollgefäß, 12 h, 24 h, 72 h nach Okklusion, densitometrische Auswertungen, $p < 0,05$ bei *, +, °, -, §, !, #

Die Abb. 5.2.2.3 zeigt eine immunologische Darstellung der iNOS-, α -Aktinin-, sGC-, p-Akt-Banden mit ihren unterschiedlichen Molekulargewichten. Die densitometrische Auswertung ist in Abb. 5.2.2.4 dargestellt.

Die induzierbaren NO-Synthasen verhalten sich wie die eNOS; zunächst ist ihre Expression herunter-, dann hochreguliert, um nach 3 Tagen auf den Ausgangswert zurückzukommen. Die Expression der löslichen Guanylat-Cyclase ist zu keinem Zeitpunkt nach Okklusion von der der Kontrollgefäße verschieden. Die p-Akt ist zum ersten Zeitpunkt herunterreguliert, nach 24 h im Vergleich zum Kontrollgefäß erhöht, nach 72 h sogar bis auf 160 % des Ausgangswertes hochreguliert.

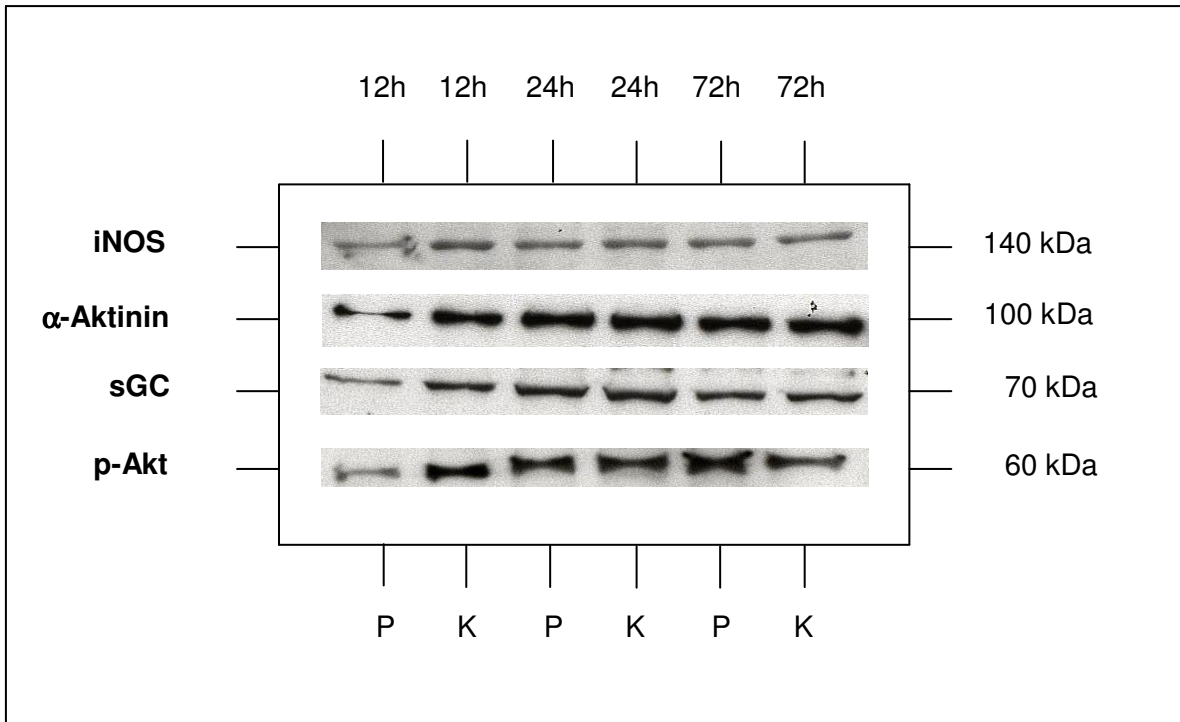


Abb. 5.2.2.3: repräsentativer Originalblot zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Ligatur, P (Kollateralgefäß), K (Kontrollgefäß)

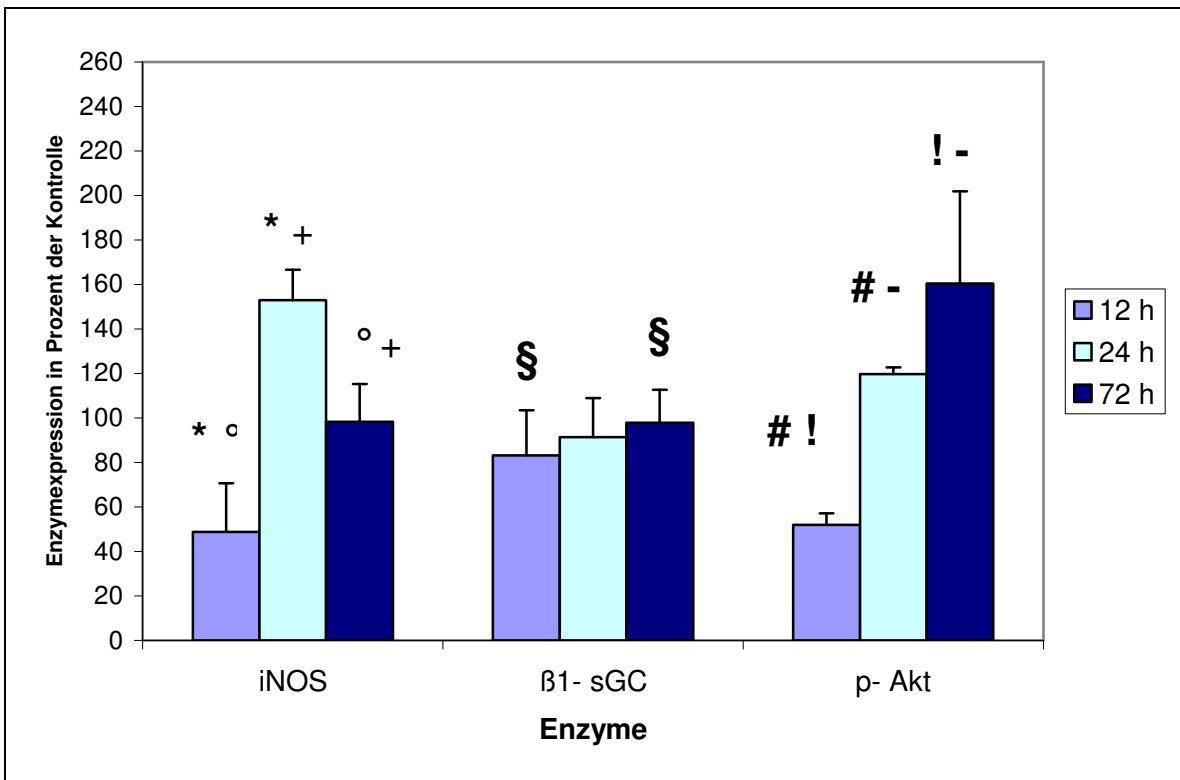


Abb. 5.2.2.4: Expression der Enzyme des Kollateralgefäßes in Prozent der Expression des Kontrollgefäß, 12 h, 24 h, 72 h nach Okklusion, densitometrische Auswertungen, $p < 0,05$ bei *, +, °, -, §, !, #

5.3 Enzymaktivität

Die vorher beschriebenen Versuche erlaubten lediglich die Enzymexpression zu analysieren. Aussagen über die Enzymaktivität konnten hier nur indirekt getroffen werden. Um hier weiter Aufschluss zu geben, wurde ein Enzym-Assay herangezogen, der ermöglichte, die Aktivität der löslichen Guanylat-Cyclase zu messen. Das Grundprinzip dabei war die Gabe von radioaktiv markiertem Substrat ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-GTP}$) und die Messung des umgesetzten radioaktiven Produktes ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-cGMP}$). Die Versuche entstanden in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. med. Behrends, Pharmakologisches Institut der Universität Hamburg.

Es wurden zwei Assays durchgeführt. Dabei wurden einmal 6 Tiere 12 h nach Femoralarterienligatur und einmal 6 Tiere 4 h nach Femoralarterienligatur untersucht. Es wurde die Aktivität der sGC in den Kollateralgefäßen mit der der Kontrollgefäße (präexistente Anastomose) verglichen.

Wie beschrieben ist die Aktivität der Guanylat-Cyclase unter 3 verschiedenen Bedingungen bestimmt worden (siehe Punkt 3.5 und 4.5): Zunächst einmal unter basalen Bedingungen mit Zugabe von MnCl_2 , dann unter stimulierten Bedingungen einmal in Anwesenheit von DEA/NO und MgCl_2 und in Anwesenheit von DEA/NO, MgCl_2 und YC-1.

Die Ergebnisse der zwei Assays sind in folgender Tabelle dargestellt.

	4 h nach Ligatur		12 h nach Ligatur	
	Kollateralarterie	Kontrollgefäß	Kollateralarterie	Kontrollgefäß
Basal/MnCl₂	42,66	101,29	35,38	38,03
NO/Mg	1837,60	887,82	377,31	415,26
NO+YC-1/Mg	1891,55	1384,88	465,97	573,40
alle Werte in pmol cGMP/min * mg Protein				

Abb. 5.4.1: Aktivität der löslichen Guanylat-Cyclase

Eine graphische Darstellung dieser Daten ergab:

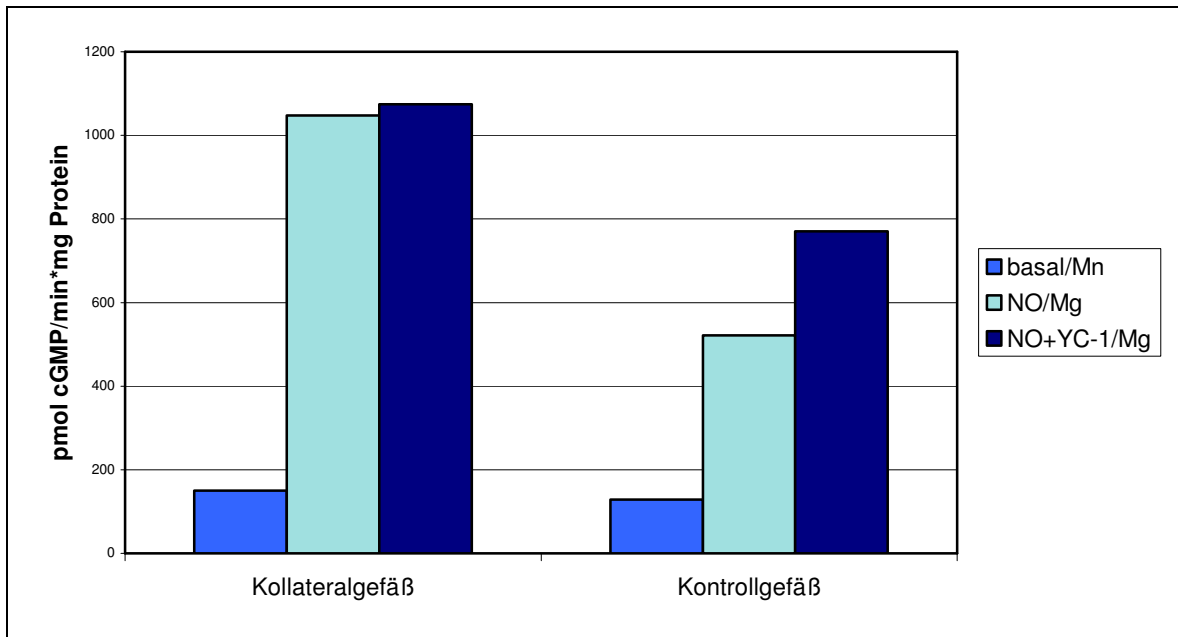


Abb. 5.4.2: sGC-Aktivität 4 h nach Femoralarterienligatur

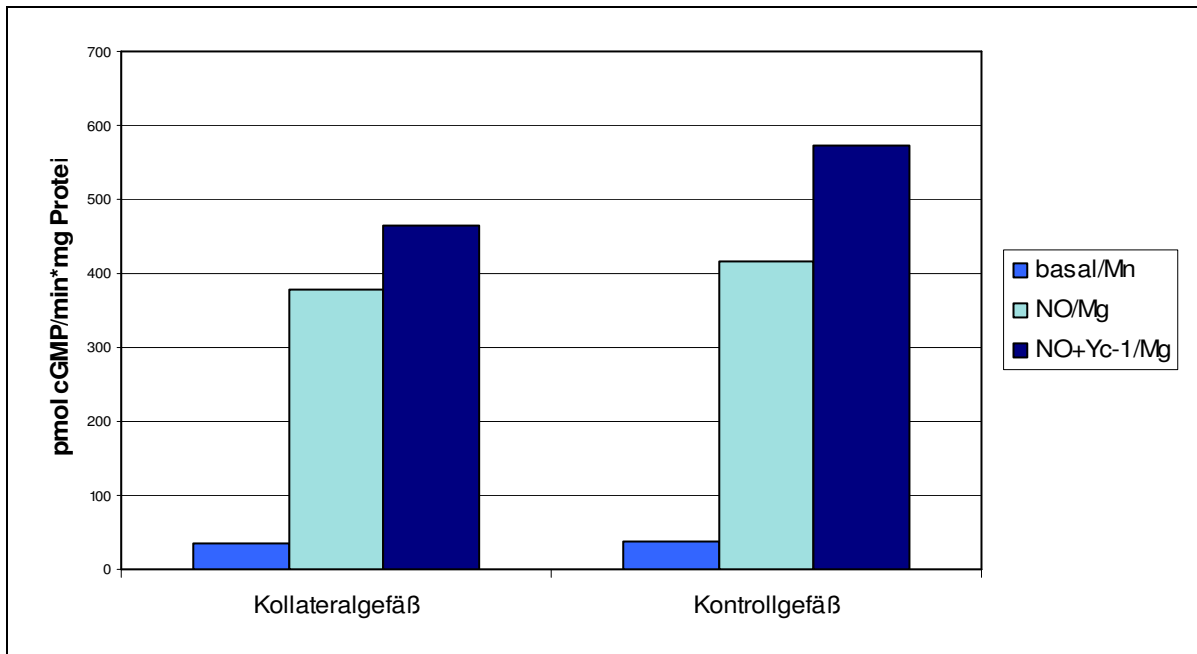


Abb. 5.4.3: sGC-Aktivität 12 h nach Femoralarterienligatur

Die Aktivität der sGC vier Stunden nach Ligatur ist zumindest unter stimulierten Bedingungen höher als die der Kontrollgefäße (Abb. 5.4.2). Die Aktivität erreicht eine Art Plateau; sie läßt sich auch durch eine zusätzliche Gabe von YC-1 (NO-unabhängiger

Aktivator der sGC), wie eigentlich zu erwarten gewesen wäre, nicht weiter steigern. Die basalen Aktivitäten hingegen sind im Kollateral- und Kontrollgefäß gleich.

12 Stunden nach der Ligatur ist die Aktivität der löslichen Guanylat-Cyclase im Kollateralgefäß im Vergleich zum Kontrollgefäß unverändert (Abb. 5.4.3). Dies gilt sowohl für die basalen Werte, wie auch unter stimulierten Bedingungen.

Alle hier genannten Ergebnisse zeigen lediglich Tendenzen. Um eine echte Statistik mit Ermitteln von Mittelwerten, Standardabweichungen und Signifikanzen zu betreiben, mangelt es an Werten. Es wurden jeweils sechs Gefäße gepoolt und dann wie ein Gefäß behandelt. Man verglich damit nur zwei Werte (Kollaterale gegen Kontrolle) miteinander. Das Ermitteln von Einzelwerten scheiterte leider an der zu geringen Proteinmenge der einzelnen Gefäße.

5.4 Post mortem Angiographien

Alle 14 untersuchten Tiere bekamen ab zwei Tage vor Pumpenimplantation täglich den NO-Synthase-Hemmer N_{ω} -Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester (L-NAME) verabreicht. Alle Tiere erhielten eine einseitige Femoralarterienligatur und eine osmotische Pumpe; sieben Ratten erhielten dabei eine mit MCP-1 gefüllte Pumpe, weiteren sieben wurde eine nur mit PBS gefüllte Pumpe (Kontrolle) eingebaut. Die Pumpen förderten die Substanzen über einen Katheter in der Arteria femoralis proximal der Ligatur direkt in den Kollateralkreislauf. Sieben Tage nach Pumpenimplantation wurden bei allen Ratten die Aorta kanüliert, Kontrastmittel appliziert und Angiographien erhoben.

Von den Angiographien konnten mit Hilfe des Stereoskops die Gefäßbäume der unteren Extremität drei dimensional dargestellt werden. Dies erleichterte das Auszählen der Kollateralgefäße auf der jeweils ligierten Seite. Es wurden nur Gefäße mit eindeutig sichtbarem Gefäßstamm, Mittelteil und Wiederanschluss teil gewertet. Exemplarisch werden nun einige Angiographien gezeigt. Es folgt zunächst zwei Angiogramme aus der mit PBS behandelten Gruppe (Abb. 5.3.1 und 5.3.2), danach zwei weitere aus der mit MCP-1 behandelten Gruppe (Abb. 5.3.3.und 5.3.4).

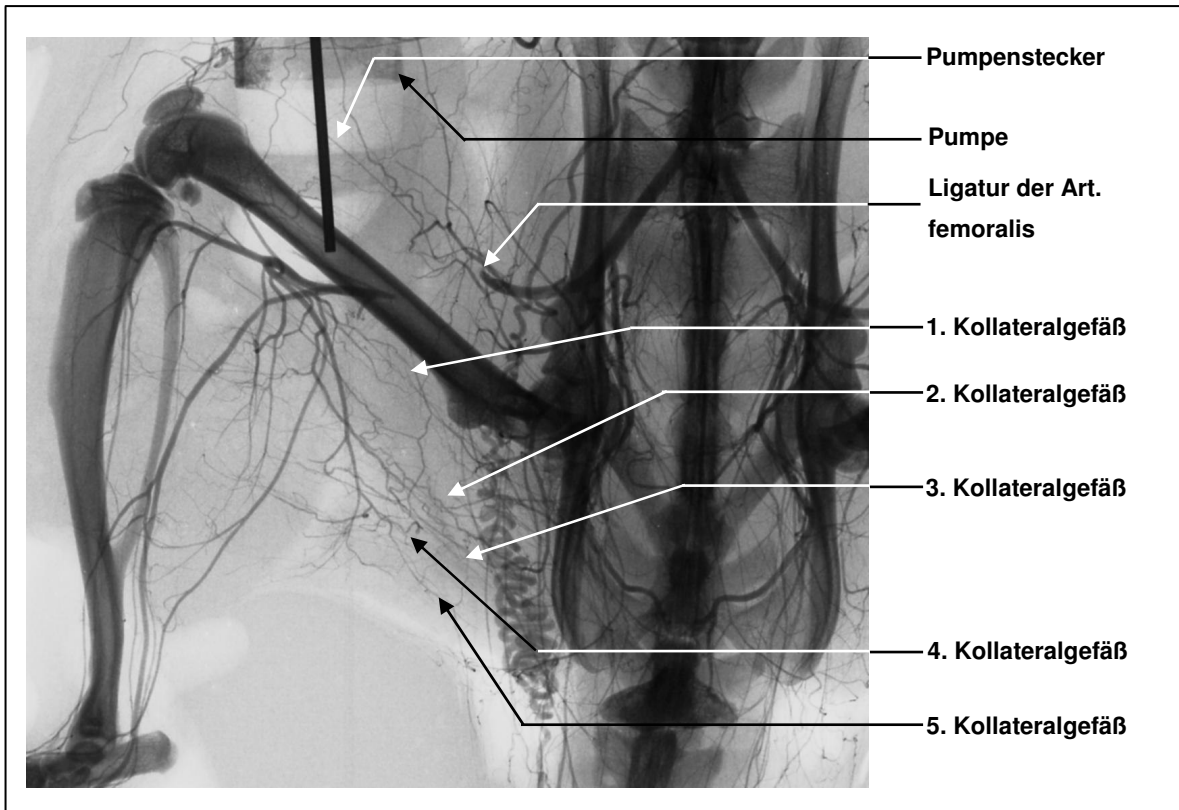


Abb. 5.3.1: Angiogramm vom rechten Hinterlauf, PBS + L-NAME-Behandlung, 7 d nach Okklusion

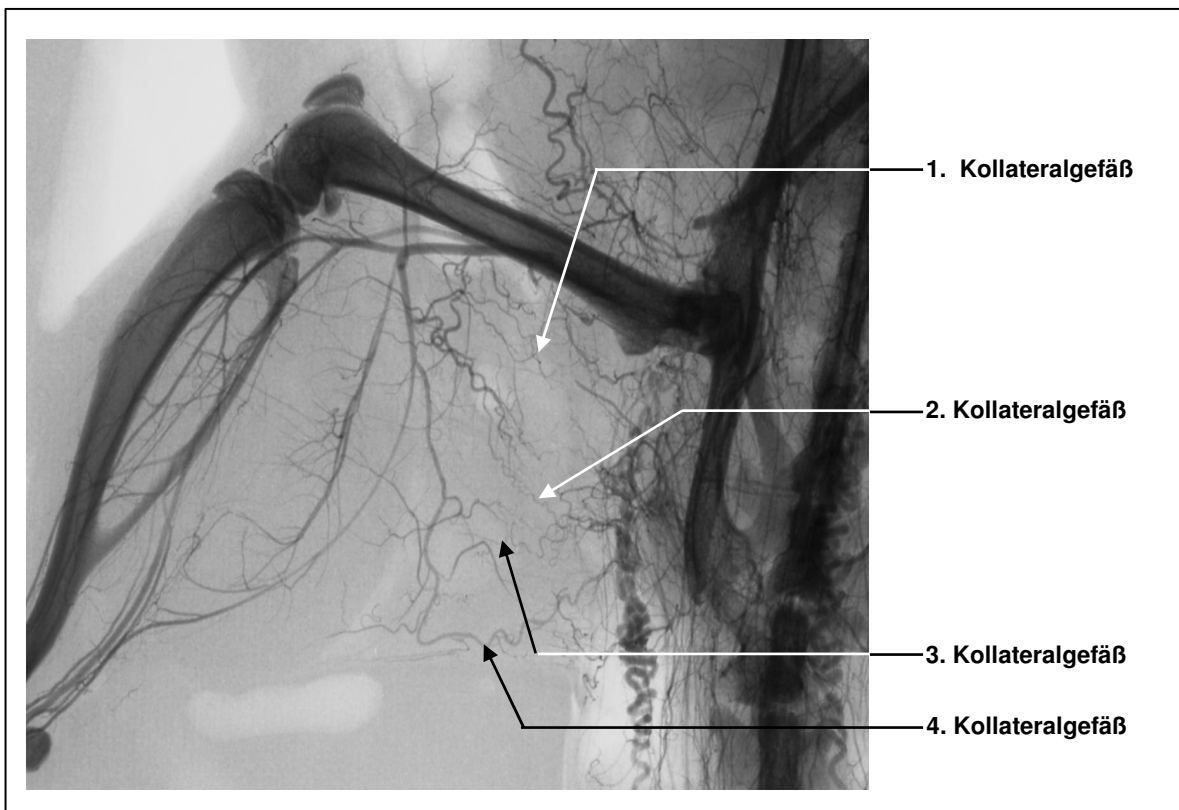


Abb. 5.3.2: Angiogramm vom rechten Hinterlauf, PBS + L-NAME-Behandlung, 7 d nach Okklusion

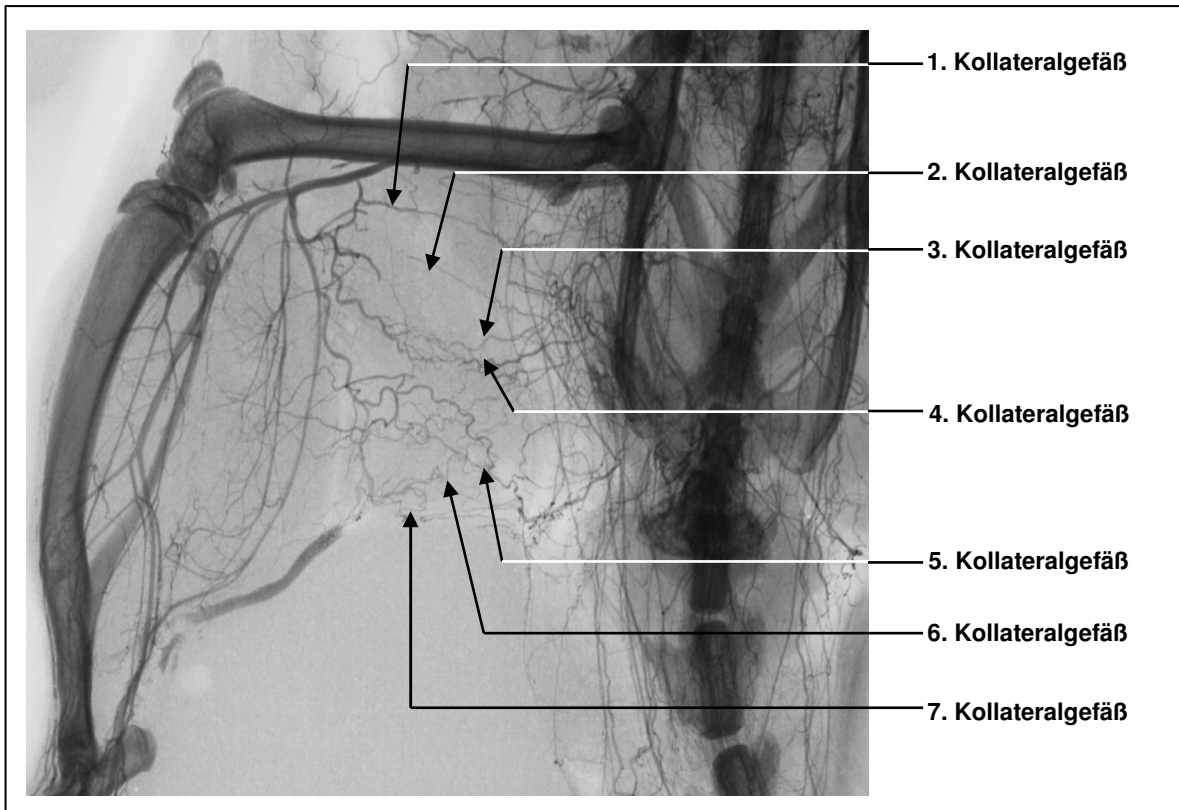


Abb. 5.3.3: Angiogramm vom rechten Hinterlauf, MCP-1 + L-NAME-Behandlung, 7 d nach Okklusion

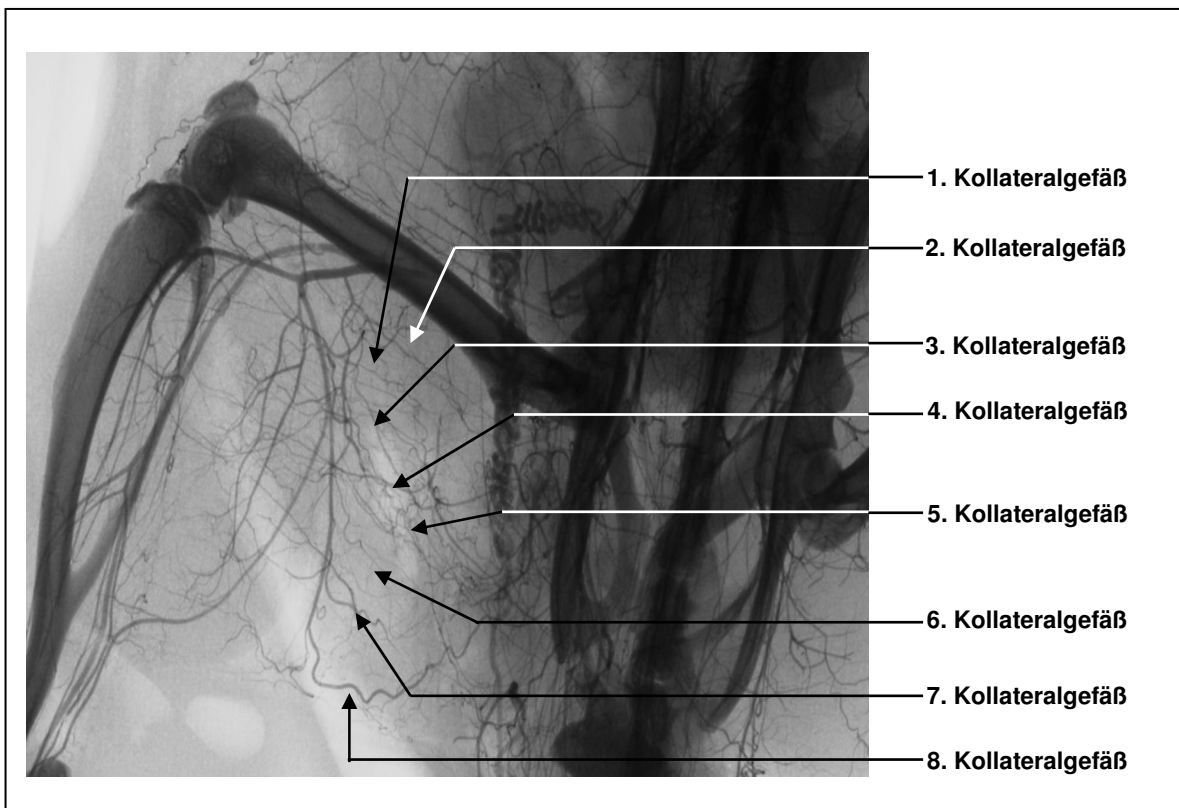


Abb. 5.3.4: Angiogramm vom rechten Hinterlauf, MCP-1 + L-NAME-Behandlung, 7 d nach Okklusion

Die Ergebnisse der ausgewerteten 14 Angiographien sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

Tier Nr.	Füllung der osmotischen Pumpe	Anzahl der Kollateralgefäße auf der ligierten Seite	Mittelwert und Standardabweichung
1	PBS	4	Mittlere Gefäßanzahl: 4,7 Gefäße Standardabweichung: 0,76
2	PBS	4	
3	PBS	5	
4	PBS	5	
5	PBS	6	
6	PBS	5	
7	PBS	4	
8	MCP-1	7	Mittlere Gefäßanzahl: 7,3 Gefäße Standardabweichung: 0,49
9	MCP-1	7	
10	MCP-1	8	
11	MCP-1	8	
12	MCP-1	7	
13	MCP-1	7	
14	MCP-1	7	

Abb. 5.3.5: Auswertung der Angiographien

Die graphische Darstellung dieser Ergebnisse ergibt:

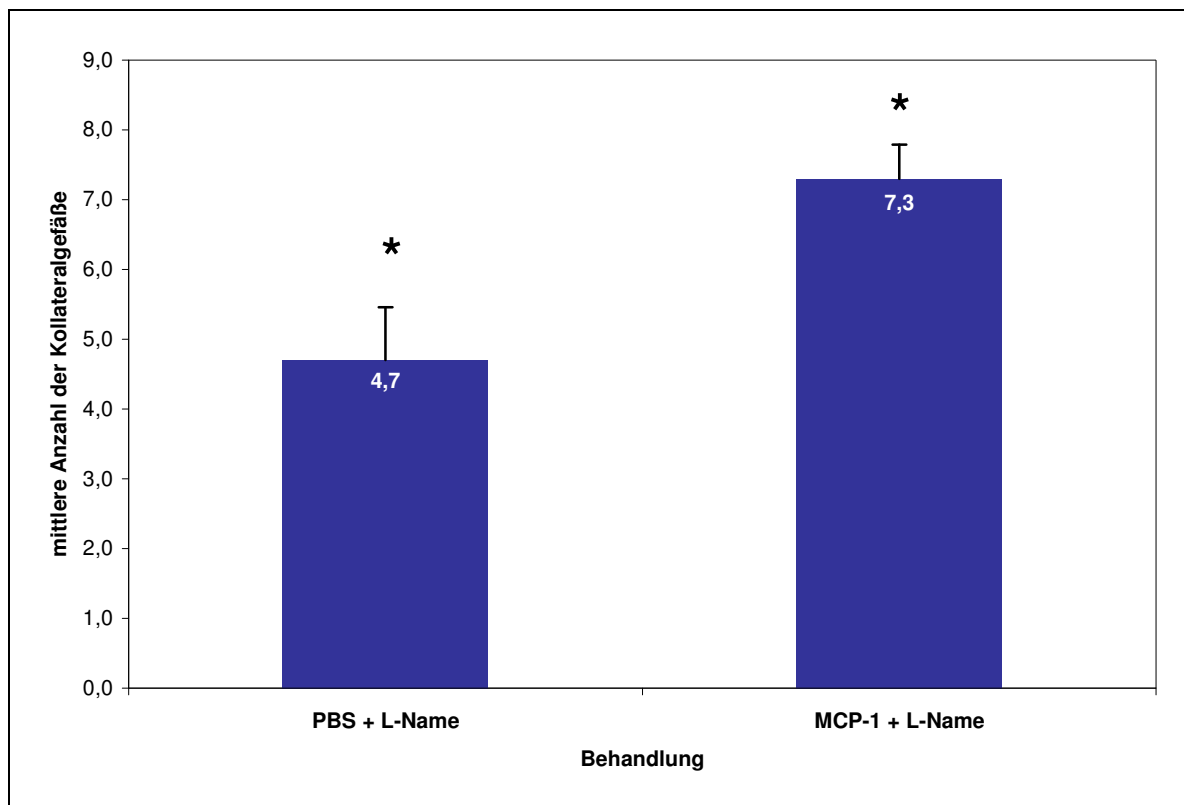


Abb. 5.3.6: Anzahl der Kollateralgefäße auf der ligierten Seite, $p < 0,05$ bei *

Die Gruppe mit PBS und L-NAME Behandlung hat signifikant weniger sichtbare Kollateralarterien im Angiogramm als die mit MCP-1 und L-NAME Behandlung (Abb. 5.3.6).

Zusätzlich wurden ergänzende p. m. Angiographien von Tieren mit PBS Pumpen und MCP-1 Pumpen ohne L-NAME-Applikation erhoben. Zusammenfassend ergab sich folgende Tabelle:

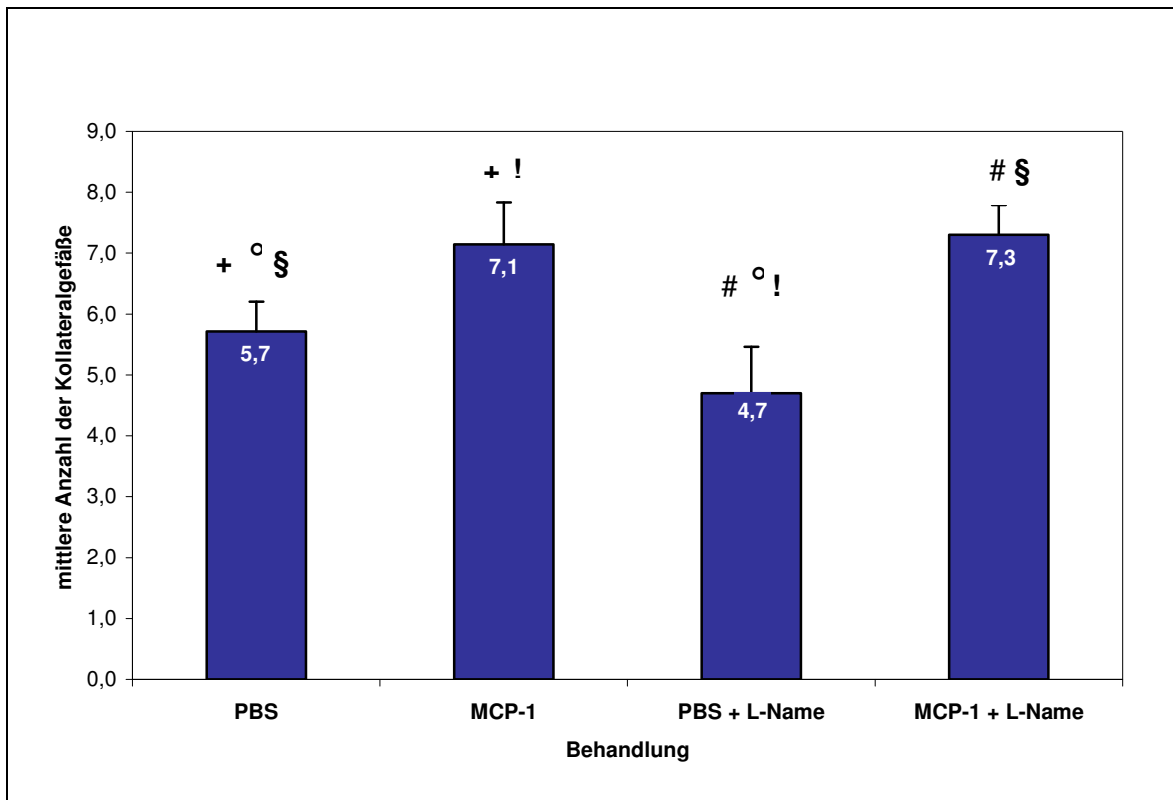


Abb.: 5.3.7: Anzahl der Kollateralgefäße auf der ligierten Seite, $p < 0,05$ bei *, °, #, §, !

Wie erwartet vermag die alleinige MCP-1 Gabe die Anzahl sichtbarer Kollateralgefäße signifikant zu erhöhen (Abb. 5.3.7). Auch die Kombination von MCP-1 und L-NAME kann die Kollateralgefäßanzahl im Vergleich zur PBS + L-NAME Gruppe erhöhen, ist aber nicht signifikant verschieden von der MCP-1 Gruppe ohne L-NAME. In der PBS Gruppe kann durch L-NAME Applikation die Anzahl sichtbarer Kollateralgefäße signifikant gemindert werden.

6. Diskussion

6.1 Ein in vivo Modell für Arteriogenese

In unseren Studien konnte zum allerersten Mal gezeigt werden, dass Kollateralarterien aus kleinen präexistenten Anastomosen eines Umgehungskreislaufes wachsen. Dieser Vorgang der Arteriogenese fand ohne eine vorausgegangene Angiogenese statt.

Die Frage bleibt aber, in wieweit kann das Modell am Hinterlauf der Ratte auch Erkrankungen im menschlichen Organismus reflektieren und ob die Ergebnisse von unserem Tiermodell auch auf den Menschen übertragen werden können.

Studien aus den sechziger Jahren zeigten, dass sich auch am menschlichen Herzen kollaterale Netzwerke befinden [166, 167]. Das Substrat der Arteriogenese lässt sich demnach am Menschen finden. 1989 konnten Rentrop et al. in Patienten mit Myokardinfarkt mit Hilfe von konsekutiven Angiographien demonstrieren, dass 30 % aller Patienten zum Zeitpunkt der Koronararterienokklusion bereits über ein kollaterales Netzwerk verfügten [168]. Zwei Wochen später fanden sich im selben Patientenkollektiv bei 90 % der Patienten Kollateralen. In unserem Tiermodell war der höchste Anstieg der kollateralen Konduktanz auch innerhalb der ersten Woche nach Femoralarterienokklusion zu verzeichnen [39]. Die Proliferation des Hauptkollateralgefäßes begann 24 Stunden nach Okklusion, steigerte sich nach drei Tagen auf das Maximum, und war nach sieben Tagen noch bei 60 % [150].

Diese zeitlichen Analogien deuten darauf hin, dass die Mechanismen für das Gefäßwachstums nach Koronararterienokklusion im Menschen, denen am Hinterlauf der Ratte nach Femoralarterienokklusion ähnlich sind. Im Gegensatz zum Herzen, dauert das Kollateralwachstum bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit im Menschen aber bis zu mehreren Monaten [169].

Die Tatsache, dass die Proliferation strikt auf die Kollateralgefäße beschränkt war, deutet darauf hin, dass die Stimulation des Kollateralgefäßwachstums vom Gefäß selber, als vom umgebenden Gewebe ausging. Dies unterstützte die These, dass hämodynamische Kräfte eher als chemische Reize aus dem umgebenden Gewebe die Hauptstimuli der Arteriogenese sind. Die Scherkraft auf das Endothel ist eine dieser hämodynamischen Faktoren, die wie bisher angenommen nach Okklusion eines Hauptversorgungsgefäßes in den kleinen präexistenten Shunts rapide ansteigt. Glagov et al. [170] konnten in zahlreichen Experimenten zeigen, dass im Remodeling begriffene Gefäße ein gewisses Scherkraftniveau benötigen. Dieses könnte auch für Kollateralarterien gelten. Ähnlich wie die Proliferation verhielt sich auch der Gefäßlumendurchmesser. Sein maximaler Zuwachs war in der ersten Woche post Okklusion zu verzeichnen, sistierte dann aber und

war unter dem Gefäßremodeling sogar rückläufig. In unseren Studien konnten wir zudem eine Längenzunahme des Hauptkollateralgefäßes beobachten, die sich in einer Zunahme der Gefäßverwindung widerspiegelte. Diese longitudinale Längenzunahme steigerte sich nach Okklusion und erreichte nach 21 Tagen signifikante Werte.

All jenes deutet darauf hin, dass die Arteriogenese ein Mehr-Phasen-Prozess ist. Die erste Phase ist durch eine starke Gefäßzellproliferation innerhalb der ersten drei Tage charakterisiert. Die zweite Phase ist durch ein intensives Gefäßremodeling gekennzeichnet; nach 3 Tagen ist sie die dominierende Phase. Hier formiert sich eine Neointima und der Gefäßwanddurchmesser steigt an. Diese Mehr-Phasen-Hypothese wurde von Ito et al. schon in früheren Studien formuliert [21] und konnte durch unsere Ergebnisse erhärtet werden.

Das hier präsentierte Tiermodell ermöglicht uns, den Prozess der Arteriogenese weiter im Detail zu studieren. Alle Placebo kontrollierten klinischen Studien mit dem Konzept, durch induzierte Angiogenese die Vaskularisierung ischämischen Gewebes zu verbessern, schlugen fehl [88, 171]. Vielleicht kann die Arteriogenese helfen, mehr Erfolg versprechende therapeutische Ansätze zu finden.

6.2 Arteriogenese und Stickstoffmonoxid

Die Rolle von zirkulierenden Zellen in der Arteriogenese

Ito et al. demonstrierten 1998, dass die initiale, proliferative Phase des Kollateralwachstums assoziiert war mit einer Makrophagenakkumulation um das wachsende Gefäß herum [21]. Diese Entdeckung unterstützte die These, dass die Monozytenakkumulation eine wichtige Rolle in der Arteriogenese spielt: Monozyten adhären an die gestresste Gefäßwand, transmigrieren, werden zu Makrophagen und produzieren Wachstumsfaktoren, Metalloproteinasen und Zytokine, die über einen autokrinen Effekt weitere Monozyten anlocken können [172]. So weiß man von Monozyten, dass sie nach Aktivierung z. B. bFGF und TNF- α produzieren können.

Das Chemokin MCP-1 ist ein potenter chemotaktischer Faktor für Monozyten; die Bindung an sie erfolgt über den CCR-2 Rezeptor [15]. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung von MCP-1 die Anzahl der sichtbaren Kollateralarterien am Hinterlauf des Kaninchen signifikant erhöht werden konnte [4, 21]. Neben dieser chemotaktischen Wirkung begünstigt MCP-1 auch die Migration der Monozyten durch das Endothel [65], es akzeleriert Arteriogenese [42] und Arteriosklerose [97]. MCP-1 wird konstitutiv produziert oder nach Induktion durch oxidativen Stress, Zytokine oder Wachstumsfaktoren und zwar vor allem durch Monozyten, glatte Muskelzellen und Endothelzellen.

MCP-1 führt also über eine Rekrutierung von Monozyten zu gesteigertem Kollateralwachstum. In den meisten Studien aber führte eine erhöhte Schubspannung, wie sie ja vermutlich Hauptstimulus der Arteriogenese ist, eher zu einer Herunterregulation von Zelladhäsionsmolekülen und Chemokinen. Auch eine Monozytenmigration wurde in erster Linie unter niedrigen Scherkraftbedingungen beobachtet [17, 173, 174].

Die Rolle von NO in der Arteriogenese

Die Scherkräfteeffekte am Endothel können an die darunter gelegenen, glatten Muskelzellschichten weitergegeben werden. Einer dieser Transmitter, die vom gestressten Endothel an die Muskelzellen abgegeben werden, ist das Stickstoffmonoxid. Die Rolle von NO in der Arteriogenese ist aber weiter unklar und wird kontrovers diskutiert [14].

Einerseits erhöht NO signifikant den Blutfluss durch Kollateralarterien [6, 7]. NO stimuliert zudem die Proliferation und Migration von Endothelzellen in vitro [8, 9]. Auch transgene Mäuse, denen die eNOS fehlt, zeigen verminderte arteriogene Eigenschaften [10, 11]. Auch die arteriogenen und angiogenen Effekte der Gefäßwachstumsfaktoren VEGF-121 und bFGF setzen eine normale NO-Produktion voraus. Beide Faktoren wirken hierbei über NO [12, 13].

Andererseits vermindert NO die MCP-1 Produktion in Makrophagen und Endothelzellen [14, 15]. Auch führt NO zu einer verminderten Expression von Zell-Adhäsions-Molekülen (wie z. B. CD11, CD18, VCAM- und ICAM-1) [16, 17].

In dieser Arbeit wurden die in der Literatur bestehenden Widersprüche aufgelöst.

1. Widerspruch

MCP-1 wirkt über eine Makrophagenakkumulation proarteriogen [21]. Der Hauptstimulus der Arteriogenese ist eine erhöhte Scherkraft [3]. Monozytenadhäsionen und -migrationen sind bisher aber nur unter niedrigen Schubspannungsverhältnissen beobachtet worden [20].

Um diesen Widerspruch zu verstehen, muss ein näherer Blick auf die Makrophagen-Kinetik geworfen werden. Man weiß, dass Makrophagen 12 h nach Initiierung der Arteriogenese an die Gefäßwand adhären und durch das Endothel migrieren [18]. Hierzu sind niedrige Scherkraftverhältnisse nötig [20]. Drei Tage nach Initiierung der Arteriogenese vermindert sich die Makrophagenanzahl in der Gefäßwand wieder, nach 7 d finden sich annähernd so viele wie in Kontrollgefäßen [22]. Diese Kinetik muss mit einer Kinetik der Schubspannungsverhältnisse in Beziehung gesetzt werden. Eine solche Kinetik existiert bisher nicht und wird von uns hergeleitet.

2. Widerspruch

Von uns durchgeführte Versuche zeigten, dass NO proarteriogen wirkt. Das steht im Einklang mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen [6, 7]. Da NO aber die Adhäsion, Migration und damit die Akkumulation von Makrophagen durch eine verminderte MCP-1 Produktion verhindert, ergibt sich hier ein Widerspruch. Zum besseren Verständnis muss auch hier eine Kinetik herangezogen werden. Eine NO-Kinetik im Kollateralwachstum fehlt bisher. Da NO über eine Regulierung des Vasotonus auch die Schubspannung steuert, bildet eine NO-Kinetik auch gleichzeitig die Schubspannungsverhältnisse in Kollateralen mit ab. Eine entsprechende Kinetik wird von uns hergeleitet.

Dazu analysierten wir die Expression der Produzenten von NO (iNOS und eNOS), ihrer Aktivatoren (pAkt), des zellulären NO-Rezeptors (sGC) und weiterer Enzyme der NO-Signalkaskade (PKG, p-VASP) mittels Immunhistochemie, Western-Blotting und Enzym-Assays zu verschiedenen Zeiten nach Femoralarterienokklusion. Damit wurde indirekt auf die NO-Konzentration geschlossen und eine Kinetik aufgestellt. Im Anschluss leiteten wir anhand dieser Daten in einem hypothetischen Ansatz einen zeitlichen Ablauf der Arteriogenese ab und teilten diesen weiter in zeitlich versetzte Phasen auf.

Stickstoffmonoxid kann in aufwendigen Verfahren auch direkt gemessen werden. In Zusammenarbeit mit Herrn Professor Dr. med. T. Münzel wurden mit der Spin Trapping Methode [175-177] initial auch Versuche unternommen worden, diese scheiterten aber an einer zu geringen Probenmenge.

Entgegen aller Erwartungen veränderte sich die Expression der eNOS, iNOS, PKG-I und sGC in den immunhistochemischen Analysen über den gesamten Zeitraum der Arteriogenese nicht. Die Expression der konsekutiv vorliegenden eNOS war nicht hochreguliert. Die iNOS war auch nach ihrer Induktionszeit von sechs Stunden in ihrer Expression unverändert.

In Analogie zu den NO-Synthasen war auch die Expression des NO-Rezeptors (die sGC) gleich geblieben. In der neonatalen Entwicklungsperiode konnte am Rattenherzen eine Ortsveränderung der sGC-Enzymexpression beobachtet werden [162]. Im neonatalen Herzen war die sGC vornehmlich in der glatten Muskulatur der Gefäßwand exprimiert; im adulten Herzen verschob sich die Expression dann zum Endothel hin. Man nimmt daher an, dass der NO-Rezeptor (die sGC) eher einer dynamischen Regulation als einer rein konstitutiven Expression unterworfen ist.

Dieses war in unseren Beobachtungen nicht der Fall. Bei allen Enzymexpressionen kam es in unserem Modell zu keiner Zeit zu einer topographischen Veränderung. Dieses passte zum Konzept, dass Arteriogenese keine Rekapitulation des frühen embryonalen Gefäßwachstums ist.

Es gilt aber zu berücksichtigen, dass es sich hierbei um Aussagen auf dem Boden von lediglich qualitativen Auswertungen handelt. Expressionsveränderungen sind qualitativ schwer zu beurteilen.

Um die Ergebnisse zu ergänzen, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt und diese quantitativ mittels densitometrischer Messungen ausgewertet. Um zusätzlich zur Expression auch Aussagen über Aktivität und Aktivierungswege zu erhalten, wurden zusätzlich Enzyme (p-Akt, p-VASP) untersucht, die über De-/Phosphorylierungen regulatorisch in die NO-Signalkaskade eingreifen können.

Interessanterweise waren 12 Stunden nach Femoralarterienokklusion alle Enzymexpressionen (p-Akt, iNOS, eNOS, sGC, PKG-I, p-VASP) auf 60 bis 80 % des Ausgangswertes gefallen. Es waren zu diesem Zeitpunkt also signifikant weniger Enzyme als im Vergleich zum Kontrollgefäß vorhanden. Dieses verhielt sich also anders als in der Immunhistochemie und war am ehesten durch ein mehr objektives Verfahren begründet.

Auch diese Ergebnisse sind gerade in Bezug auf die NO-Synthasen zunächst schwierig zu interpretieren, da man bisher allgemein angenommen hatte, dass mit der Okklusion sofort auch die Schubspannung als Hauptstimulus für die Arteriogenese hochreguliert sein würde. Diese erhöhten Scherkräfte müssten dann die NOS über eine erhöhte Expression bzw. Aktivität zur vermehrten NO-Produktion stimulieren [149]. Dieses wirft wieder einmal die Frage auf, ob die Schubspannung und die Scherkraft am Endothel nach Femoralarterienokklusion überhaupt hochreguliert sind. Dies wäre zwar auf den ersten Blick logisch, es gibt aber bisher keine Studie, in der eine erhöhte kollaterale Schubspannung direkt gemessen werden konnte.

Diese Ergebnisse sind unterschiedlich zu interpretieren:

Zum einen könnten sie schon mit einer, durch den plötzlich ansteigenden Blutfluss, erhöhten Scherkraft am Endothel erklärt werden. Die Schubspannung wäre allerdings unphysiologisch hoch und könnte mit anderen Studien nicht verglichen werden (schon gar nicht mit einer in vitro Stimulation der eNOS durch erhöhte Scherkraft [149]). Die plötzliche Druckerhöhung im Gefäßlumen wäre derartig hoch, dass das Endothel und die darunter liegenden Muskelschichten nachgeben. Die interzellulären Verbindungen reißen auf, die einzelnen Zellen in den Schichten werden beschädigt und die intrazellulär gelegenen Enzyme gehen zugrunde. 24 Stunden nach Okklusion könnte sich das Endothel dann langsam an die neuen Flussverhältnisse adaptieren und kompensatorisch hyperregenerieren. Die erhöhte NOS-Expression 24 h nach Okklusion ließe sich hiermit erklären.

Als plausibelste Erklärung kommt jedoch eine vollkommen andere in Frage. Groebe konnte 1996 ein mathematisches Modell zum besseren Verständnis der Mechanismen in der lokalen Perfusionsregulation vorlegen [178]. Hier wurde eindrucksvoll gezeigt, dass nicht wie bisher angenommen den Arteriolen, sondern den Venolen eine Hauptkontrollfunktion in der Regulation der Gewebepfusion zukommt:

Der Blutfluss in den Organen ist an ihre nutritiven Anforderungen angepasst. Eine Blutminderperfusion hat zunächst einmal eine Ischämie des Gewebes zur Folge, welches vom distalen Anteil der Kapillaren versorgt wird (im Gebiet der Arteriolen, wo die Arteriogenese stattfindet, lässt sich keine Ischämie nachweisen). Hier werden auf den ischämischen Reiz hin vasoaktive Substanzen freigesetzt. Diese dilatieren die weiter stromabwärts gelegen Venolen und reduzieren damit den postkapillären Widerstand. Hierdurch fällt der hydrostatische Druck in den Kapillaren und der Blutfluss erhöht sich leicht. Dieses zeigt Auswirkungen auf die Arteriolen. Durch den gesteigerten Blutfluss erhöht sich die Scherkraft am Endothel der Arteriolen. Dieses wiederum ist der Mechanismus, welcher die Arteriolen anschließend dilatiert und damit den präkapillären Widerstand erniedrigt. Der Blutfluss wird also in erster Linie durch Venolen an die metabolische Nachfrage des Gewebes angepasst.

Übertragen auf unser Modell würde dies nun heißen, dass die Scherkraft zunächst noch gar nicht hochreguliert, sondern eher herunterreguliert ist. Die NOS weisen folglich auch noch keine erhöhte Expression bzw. Aktivität auf. Leider ist in der Arbeit von Groebe kein zeitlicher Rahmen genannt, in dem die verschiedenen Phasen stattfinden. In unserem Modell kommt es möglicherweise nach einer Latenz von 24 h zur erhöhten Schubspannung in den Arteriolen (bedingt durch einen Saugeffekt, ausgehend von den dilatierten Venolen). Dies führt dann zur NOS-Stimulation mit der von uns beobachteten NOS-Expressionssteigerung (auf das Eineinhalbfache des Ausgangswertes). NO wird vermehrt gebildet. Dadurch dilatieren die Arteriolen langsam, die Scherkraft nimmt ab und die NOS-Expression fällt ohne diesen Stimulus nach drei Tagen wieder auf den Ausgangswert zurück. Dennoch weisen die vorhandenen Enzyme zu diesem Zeitpunkt eine eineinhalbfach erhöhte Aktivität auf. Die p-Akt, welche die eNOS phosphorylieren und damit aktivieren kann, ist nach 3 d auf 160% hochreguliert.

Wenn NO- und Makrophagenkinetik miteinander korreliert werden, ergibt sich folgender zeitlicher Zusammenhang:

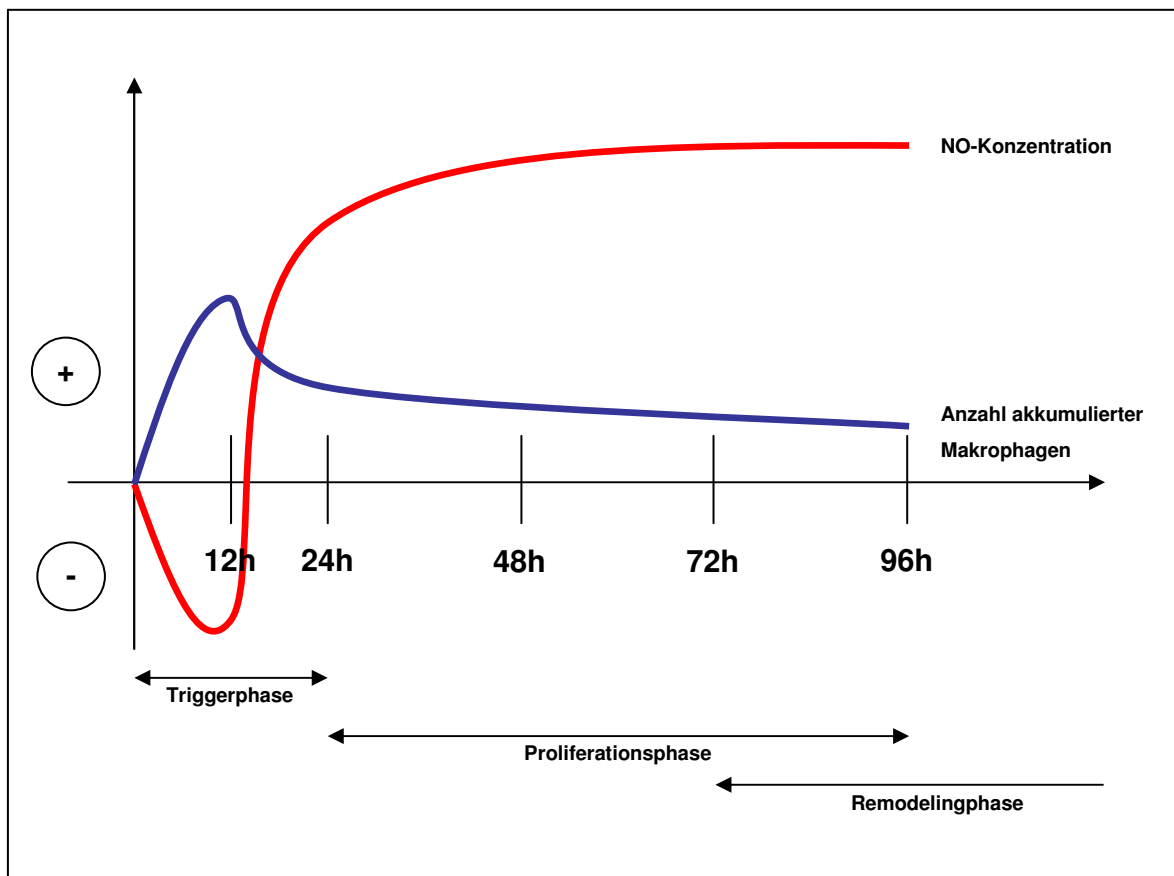


Abb.: 6.1: Hypothese zum zeitlichen Ablauf der Arteriogenese am Beispiel unterschiedlicher Kinetiken, y-Achse: - (bedeutet weniger als im Kontrollgefäß), + (mehr als im Kontrollgefäß)

Zeitpunkt 0 h bis 24 h (Triggerphase):

Innerhalb der ersten 24 h nach Initiierung der Arteriogenese postulieren wir eine Triggerphase, eine Triggerphase für die sich anschließende Proliferation. Sie ist durch eine verminderte NO-Konzentration gekennzeichnet. Dieses hat einen gedrosselten kollateralen Blutfluss zur Folge, welches wiederum in einer niedrigen Scherkraft am Endothel resultiert. Monozyten können sich unter diesen Bedingungen ans Endothel heften [20]. Postkapilläre Venolen beginnen sich innerhalb dieser Phase zu dilatieren. Über eine Art Saugeffekt erhöht sich dann langsam der Blutfluss durch die vorgeschalteten Arteriolen [178].

Zeitpunkt 24 h bis 3 d (Proliferationsphase):

Nach 24 h sind die Makrophagen durch das Endothel in die Gefäßwand migriert und beginnen mit der Produktion von Wachstumsfaktoren und Metalloproteinasen. Die eigentliche Proliferationsphase beginnt. Durch den stetig steigenden Saugeffekt der dilatierten Venolen wirken vermehrt Scherkräfte auf das Endothel, die NOS werden stimuliert und ihre Expression hochreguliert. NO ist vermehrt vorhanden und der kollaterale Blutfluss steigert sich.

Zeitpunkt 3d (Remodelingphase):

Das vermehrt vorhandene NO dilatiert wiederum die Arteriolen. Damit sinken die Scherkraftverhältnisse wieder auf ein normales Niveau ab. Die NOS-Stimulation fällt weg und die Expression normalisiert sich wieder. Die Aktivität der Enzyme, abgeleitet aus der pAkt-Expression, ist aber nach wie vor erhöht. Unsere Western Blot-Analysen zeigen, dass NO in der Remodeling-Phase vermehrt vorhanden ist. Die Makrophagenanzahl in der Gefäßwand reduziert sich zwischen dem 3 bis 7 d langsam; am 7 d entspricht ihre Anzahl annähernd derer in Kontrollgefäßen [22].

Analog bereits publizierter Studien sahen wir ebenfalls eine verminderte Anzahl sichtbarer Kollateralarterien unter Hemmung der NO-Synthasen [6, 7]. In der PBS Gruppe konnte durch L-NAME Applikation die Anzahl der Kollateralgefäße signifikant gemindert werden. Durch eine Hemmung der NO-Synthasen ergab sich somit eine Verminderung angiographisch sichtbarer Kollateralarterien. NO wirkte damit proarteriogen.

Wie erwartet, vermochte auch in dieser Studie die alleinige MCP-1 Gabe die Anzahl sichtbarer Kollateralgefäße signifikant zu erhöhen. Bisher unveröffentlichte Daten zeigten, dass dies über eine vermehrte Makrophagenakkumulation in der Gefäßwand vermittelt wurde. Die Anzahl der in der Arteriogenese rekrutierten Kollateralgefäße war also durch eine MCP-1 Gabe signifikant zu steigern.

Unter Hemmung der NO-Synthasen vermochte MCP-1 jedoch genauso die Anzahl sichtbarer Kollateralarterien zu steigern. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass im Gegensatz zu anderen proarteriogenen Substanzen, insbesondere aus der FGF- und VEGF-Familie, die Kollateralwachstum stimulierende Wirkung von MCP-1 vom NO-Stoffwechsel unabhängig ist. Auf der anderen Seite schien die negative Auswirkung einer Reduktion verfügbaren Stickstoffmonoxids auf das Kollateralwachstum unabhängig von der Rekrutierung von Makrophagen zu sein, da ansonsten die Stimulation durch MCP-1, das über eine gesteigerte Makrophagenaktivierung seine Wirkung entfaltet, alteriert wäre. Auch dieses kann mit unserer Mehrphasen-Hypothese erklärt werden. Die Monozytenadhäsion und -migration findet in der Triggerphase statt. NO hat keinen

Einfluss auf diese Phase und MCP-1s proarteriogener Effekt ist NO unabhängig. Die Wirkung von VEGF und bFGF dagegen ist durch eine NO-Hemmung zu antagonisieren [12, 13]. Dies wiederum würde bedeuten, dass sie ihre Wirkung verstärkt in der Remodeling-Phase entfalten.

In weiteren Untersuchungen, die nicht Gegenstand dieser Dissertation sind, bestimmten wir die kollaterale Proliferation und die kollaterale Makrophagenakkumulation unter MCP-1 und L-NAME Behandlung. Dabei führte die L-NAME Behandlung zur Verstärkung der Akkumulation ED 2 und ED 3 positiver Makrophagen, die in ihrem Ausmaß der Wirkung von MCP-1 entsprach. Dadurch wurde noch einmal für das Kollateralwachstum nachgewiesen, dass NO der Makrophagenakkumulation entgegen wirkt und eine Hemmung von NO die Makrophagenakkumulation fördert. Dies war bereits aus anderen Zusammenhängen bekannt [14, 15]. Im Gegensatz zur MCP-1 Behandlung führte die L-NAME Behandlung jedoch nicht zu einer verstärkten Kollateralproliferation, die jedoch auch nicht gehemmt wurde, wie die Ergebnisse der Angiographien und hämodynamische Daten aus anderen Versuchen vermuten ließen.

Somit ließ sich unter NOS-Hemmung die verminderte Anzahl von Kollateralarterien in Angiographien und der reduzierte Kollateralfluss, wie er in anderen Studien beobachtet wurde [6, 7], nicht auf eine verminderte Proliferation von Kollateralarterien zurückführen. Dies legt nahe, dass der Effekt von NO primär auf einer verbesserten Hämodynamik als auf einem direkt Gefäßwachstums steigernden Effekt beruht.

7. Zusammenfassung

Es war das Ziel zahlreicher Forschungsprojekte im Herz-Kreislauf-Bereich der letzten zehn Jahre, das Wachstum natürlich bestehender Umgehungskreisläufe (Kollateralkreisläufe) zu fördern. Das Wachstum dieser Kollateralgefäße wird dabei als Arteriogenese bezeichnet [1, 2]. Kollateralarterien entstehen dabei aus präexistenten arteriölen Anastomosen.

Anhand von Ausgussmodellen, post mortem Angiographien und immunhistochemischen Analysen zeigen wir hier zum allerersten Mal in einem Modell am Hinterlauf der Ratte, dass das Substrat der Arteriogenese, ein präexistente arteriöle Anastomose, vorhanden ist. 24 h nach unilateraler Femoralarterienligatur fängt diese Anastomose an zu proliferieren, der Proliferation folgt eine Remodeling-Phase. Am Ende dieses mehrphasischen Prozesses steht die Kollateralarterie in ihrer typischen korkenzieherartigen Struktur. Wir können somit zeigen, dass das von uns vorgestellte Tiermodell Studien zur Arteriogenese erlaubt [150].

Pharmakologische Substanzen, die potenziell in der Lage sind die Arteriogenese zu fördern, sind zahlreich. Andererseits ist die Wirkung anderer Substanzen bisher nicht eindeutig geklärt. Stickstoffmonoxid (NO) ist ein gasförmiges Molekül, welches in der Vergangenheit immer wieder mit der Arteriogenese in Verbindung gebracht wurde, seine Rolle aber nach wie vor unklar ist [3]. In der Literatur lassen sich in Bezug auf die Arteriogenese widersprüchliche Eigenschaften von NO finden.

Wir können diesen Widerspruch auflösen, indem wir angiographisch proarteriogene Effekte sowohl von NO als auch von MCP-1 nachweisen konnten. Die proarteriogenen Effekte können wir mittels kinetischer Untersuchungen jeweils unterschiedlichen Phasen der Arteriogenese zuordnen.

Anhand von Western Blot Analysen legen wir zum allerersten Mal Beweise dafür vor, dass NO 12 h nach Initiierung der Arteriogenese vermindert, nach 24 h dann aber vermehrt in Kollateralgefäßen vorhanden ist. Eine NO-Kinetik ist hieraus abgeleitet worden. Aus unseren Vorarbeiten wissen wir, wie sich im Gegenzug die Makrophagenkinetik im Kollateralgefäß verhält [18, 22]. In der Korrelation beider Kinetiken zeigt sich, dass das bisher postulierte 2-Phasen-Modell mit Proliferation- und Remodeling-Phase unzureichend ist.

Wir postulieren eine Art Triggerphase, welche der eigentlichen Proliferationsphase zeitlich vorausgeht. Diese findet innerhalb der ersten 24 h nach Initiierung der Arteriogenese statt. Sie ist durch eine verminderte NO-Konzentration gekennzeichnet. Dieses hat einen gedrosselten kollateralen Blutfluss zur Folge, welches wiederum in einer niedrigen

Scherkraft am Endothel resultiert. Monozyten können sich unter diesen Bedingungen ans Endothel heften [20]. Postkapilläre Venolen beginnen sich innerhalb dieser Phase zu dilatieren, über eine Art Saugeffekt erhöht sich dann langsam der Blutfluss durch die vorgeschalteten Arteriolen [178]. Nach 24 h, also zum Ende der Triggerphase hin, sind die Makrophagen durch das Endothel in die Gefäßwand migriert und beginnen mit der Produktion von Wachstumsfaktoren und Metalloproteinasen. Die eigentliche Proliferationsphase beginnt. Durch den stetig steigenden Saugeffekt der dilatierten Venolen wirken vermehrt Scherkräfte auf das Endothel, die NOS werden stimuliert und ihre Expression hochreguliert. NO erhöht damit den kollateralen Blutfluss. Im weiteren Verlauf (24 h bis 72 h) dilatiert das vermehrt vorhandene NO wiederum die Arteriolen. Damit sinken die Scherkraftverhältnisse wieder auf ein normales Niveau ab. Die NOS-Stimulation fällt weg, und die Expression normalisiert sich wieder (Zeitpunkt 3 d). Die Aktivität der NOS, abgeleitet aus der pAkt-Expression, ist aber nach wie vor erhöht. Unsere Western-Blot-Analysen zeigen, dass NO in der Remodeling-Phase vermehrt vorhanden ist.

Unseren Erkenntnissen nach hat NO demnach keinen Einfluss auf die Phase, in der Makrophagenadhäsion, -migration und -proliferation stattfindet (Triggerphase). Dies bestätigen auch bisher unveröffentlichte Versuche, die zeigen konnten, dass NO keinen Einfluss auf die Proliferation innerhalb der Kollateralgefäße hat.

NO hat aber Einfluss auf die Arteriogenese; dies zeigen unsere angiographischen Analysen. Dieser proarteriogene Effekt wird vorwiegend in der Remodelingphase entfaltet und ist für die Gefäßfunktionalität von großer Bedeutung.

Weitere Beweise für unsere Mehrphasen-Hypothese sind in der Wirkung von Chemokinen und Wachstumsfaktoren zu finden: Wenn die Monozytenadhäsion und -migration in der Triggerphase stattfindet und NO keinen Einfluss auf diese Phase hat, so muss MCP-1s proarteriogener Effekt NO unabhängig sein. Auch dieses kann in unseren angiographischen Analysen bestätigt werden. Die Wirkung von VEGF und bFGF dagegen ist durch eine NO-Hemmung zu antagonisieren [12, 13]. Dies wiederum bedeutet, dass sie ihre Wirkung verstärkt in der Remodeling-Phase entfalten.

All diese Erkenntnisse helfen, neue Einblicke in die molekularen Prozesse der Arteriogenese, als auch in ihre Stimulation zu gewinnen und sie damit besser zu verstehen. Hieraus könnten in Zukunft neue therapeutische Ansätze resultieren.

8. Literaturverzeichnis

1. Schaper, W. and J. Schaper, *Collateral Circulation - Heart, Brain, Kidney, Limbs*, ed. W. Schaper and J. Schaper. 1993, Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers.
2. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. Nature Medicine, 2000 Apr. **6**(4): p. 389-395.
3. Schaper, W. and D. Scholz, *Factors Regulating Arteriogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **3**: p. 3.
4. Ito, W.D., et al., *Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion*. Circ Res, 1997. **80**: p. 829-837.
5. Cai, W., et al., *Altered balance between extracellular proteolysis and antiproteolysis is associated with adaptive coronary arteriogenesis*. Journal of Molecular & Cellular Cardiology, 2000 Jun. **32**(6): p. 997-1011.
6. Unthank, J.L., J.C. Nixon, and J.M. Lash, *Early adaptations in collateral and microvascular resistances after ligation of the rat femoral artery*. J Appl Physiol, 1995. **79**(1): p. 73-82.
7. Yang, H.T., R.W. Ogilvie, and R.L. Terjung, *Training increases collateral-dependent muscle blood flow in aged rats*. Am J Physiol, 1995. **268**(3 Pt 2): p. H1174-80.
8. Dimmeler, S., E. Dernbach, and A.M. Zeiher, *Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration*. FEBS Lett, 2000. **477**(3): p. 258-62.
9. Shizukuda, Y., et al., *Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration and proliferation depend on a nitric oxide-mediated decrease in protein kinase Cdelta activity*. Circ Res, 1999. **85**(3): p. 247-56.
10. Murohara, T., et al., *Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia*. J Clin Invest, 1998. **101**(11): p. 2567-78.
11. Lee, P.C., et al., *Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice*. Am J Physiol, 1999. **277**(4 Pt 2): p. H1600-8.
12. Yang, H.T., et al., *VEGF(121)- and bFGF-induced increase in collateral blood flow requires normal nitric oxide production*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(3): p. H1097-104.
13. Lloyd, P., T. Hsiao, and R. Terjung, *Arteriogenesis and angiogenesis in rat ischemic hindlimb: role of nitric oxide*. Am J Physiol Hear Circ Physiol, 2001. **281**: p. H2528-H2538.
14. Zeiher, A.M., et al., *Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells*. Circ Res, 1995. **76**(6): p. 980-6.
15. Tsao, P.S., et al., *Nitric oxide regulates monocyte chemotactic protein-1*. Circulation, 1997. **96**(3): p. 934-40.
16. De Caterina, R., et al., *Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines*. J Clin Invest, 1995. **96**(1): p. 60-8.
17. Tsao, P.S., et al., *Fluid flow inhibits endothelial adhesiveness. Nitric oxide and transcriptional regulation of VCAM-1*. Circulation, 1996. **94**(7): p. 1682-9.
18. Scholz, D., et al., *Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis)*. Virchows Archiv-An International Journal of Pathology, 2000. **436**: p. 257-270.
19. Busse, R., I. Fleming, and V.B. Schini, *Nitric oxide formation in the vascular wall: regulation and functional implications*. Curr Top Microbiol Immunol, 1995. **196**: p. 7-18.

20. Walpola, P.L., A.I. Gotlieb, and B.L. Langille, *Monocyte adhesion and changes in endothelial cell number, morphology, and F-actin distribution elicited by low shear stress in vivo*. Am J Pathol, 1993. **142**: p. 1392-1400.
21. Arras, M., et al., *Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb*. J Clin Invest, 1998. **101**: p. 40-50.
22. Khmelewski, E., et al., *Tissue resident cells play a dominant role in arteriogenesis and concomitant macrophage accumulation*. Circ Res, 2004. **95**(6): p. E56-64.
23. Siegenthaler, W., *Differentialdiagnose innerer Krankheiten*. 18. Edition ed. 2000: Georg Thieme Verlag. S. 198.
24. Underwood, J.C.E., *General and Systematic Pathology*. 1996: Churchill Livingstone. S. 308.
25. Classen, M., V. Diehl, and K. Kochsiek, *Innere Medizin*. 4. Edition ed. 1998: Urban & Schwarzenberg. S. 1115, 1116, 1124, 1126, 1130.
26. Schaper, W., *Quo vadis collateral blood flow? A commentary on a highly cited paper*. Cardiovasc Res, 2000. **45**(1): p. 220-3.
27. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis*. Nature, 1997. **386**(6626): p. 671-4.
28. Schaper, W. and J. Schaper, *Collateral Circulation*. 1993: Kluwer Academic Publishers.
29. Buschmann, I., E. Katzer, and C. Bode, *Arteriogenesis - is this terminology necessary?* Basic Res Cardiol, 2003. **98**(1): p. 1-5.
30. Epstein, S., et al., *Angiogenesis therapy - Amidst the hype, the neglected potential for serious side effects*. Circulation, 2001 Jul 3. **104**(1): p. 115-119.
31. Folkman, J., *Tumor angiogenesis*. The molecular basis of cancer, ed. J. Mendelsohn, et al. 1995, Philadelphia: W.B. Saunders. 206-232.
32. Dvorak, H.F., et al., *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis*. Am J Pathol, 1995. **146**: p. 1029-1039.
33. Ferrara, N., et al., *Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins*. Endocrine Reviews, 1992. **13**: p. 18-42.
34. Folkman, J., et al., *Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis*. J Exp Med, 1971. **133**(2): p. 275-88.
35. Folkman, J., et al., *Control of angiogenesis with synthetic heparin substitutes*. Science, 1989. **243**(4897): p. 1490-3.
36. Carmeliet, P. and D. Collen, *Transgenic mouse models in angiogenesis and cardiovascular disease*. J Pathol, 2000. **190**(3): p. 387-405.
37. Carmeliet, P., *Basic Concepts of (Myocardial) Angiogenesis: Role of Vascular Endothelial Growth Factor and Angiopoietin*. Curr Interv Cardiol Rep, 1999. **1**(4): p. 322-335.
38. Dvorak, H.F., *VPF/VEGF and the angiogenic response*. Semin Perinatol, 2000. **24**(1): p. 75-8.
39. Ito, W.D., et al., *Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion*. Am J Physiol, 1997. **273**: p. H1255-H1265.
40. Dor, Y. and E. Keshet, *ISCHEMIA-DRIVEN ANGIOGENESIS*. Trends in Cardiovascular Medicine, 1997 Nov. **7**(8): p. 289-294.
41. Iervolino, A., et al., *Bcl-2 overexpression in human melanoma cells increases angiogenesis through VEGF mRNA stabilization and HIF-1-mediated transcriptional activity*. Faseb J, 2002. **16**(11): p. 1453-5.
42. Scholz, D., W.J. Cai, and W. Schaper, *Arteriogenesis, a new concept of vascular adaptation in occlusive disease*. Angiogenesis, 2001. **4**(4): p. 247-57.
43. Basu, S., et al., *The neurotransmitter dopamine inhibits angiogenesis induced by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor*. Nat Med, 2001. **7**(5): p. 569-74.
44. Bautch, V.L., et al., *Characterization of the vasculogenic block in the absence of vascular endothelial growth factor-A*. Blood, 2000. **95**(6): p. 1979-87.

45. Ferrara, N., *Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor*. J Mol Med, 1999. **77**(7): p. 527-43.
46. Jargiello, D.M. and A.I. Caplan, *The fluid flow dynamics in the developing chick wing*. Prog Clin Biol Res, 1983. **110**(Pt A): p. 143-54.
47. Risau, W., *Development and differentiation of endothelium*. Kidney Int Suppl, 1998. **67**: p. S3-6.
48. Yancopoulos, G., M. Klagsbrun, and J. Folkman, *Vasculogenesis, Angiogenesis, and growth factors - ephrins enter the fray at the border*. Cell, 1998 May 29. **93**(5): p. 661-664.
49. Schaper, W., *The collateral circulation of the heart*, ed. W. Schaper. 1971, Amsterdam London: Elsevier North Holland Publishing Company.
50. Schaper, W., *The Pathophysiology of Myocardial Perfusion*. 1979, Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
51. Yang, H.T., et al., *Basic Fibroblast Growth Factor Increases Collateral Blood Flow in Rats With Femoral Arterial Ligation*. Circ. Res., 1996. **79**: p. 62-69.
52. Schaper, W. and W.D. Ito, *Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth*. Circ Res, 1996. **79**: p. 911-919.
53. Schaper, J., M. Borgers, and W. Schaper, *Ultrastructure of ischemia-induced changes in the precapillary anastomotic network of the heart*. Am J Cardiol, 1972. **29**: p. 851-859.
54. Schaper, W., M. DeBrabander, and P. Lewi, *DNA-synthesis and mitoses in coronary collateral vessels of the dog*. Circ Res, 1971. **28**: p. 671-679.
55. Schaper, J., et al., *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**: p. 193-205.
56. Buschmann, I.R., et al., *GM-CSF: a strong arteriogenic factor acting by amplification of monocyte function*. Atherosclerosis, 2001. **159**(2): p. 343-56.
57. Unthank, J.L., et al., *Wall remodeling during luminal expansion of mesenteric arterial collaterals in the rat*. Circ Res, 1996. **79**(5): p. 1015-23.
58. Angus, J.A., et al., *Reactivity of canine isolated epicardial collateral coronary arteries. Relation to vessel structure*. Circ Res, 1991. **69**(5): p. 1340-52.
59. Schwartz, S.M., *The intima : A new soil*. Circ Res, 1999. **85**(10): p. 877-9.
60. Cai, W.J., et al., *Connexin37, not Cx40 and Cx43, is induced in vascular smooth muscle cells during coronary arteriogenesis*. J Mol Cell Cardiol, 2001. **33**(5): p. 957-67.
61. Wolf, C., et al., *Vascular remodeling and altered protein expression during growth of coronary collateral arteries*. J Mol Cell Cardiol, 1998. **30**(11): p. 2291-305.
62. Goede, V., et al., *Induction of inflammatory angiogenesis by monocyte chemoattractant protein-1*. Int J Cancer, 1999. **82**: p. 765-770.
63. Werner, G.S., et al., *Collateral function in chronic total coronary occlusions is related to regional myocardial function and duration of occlusion*. Circulation, 2001. **104**(23): p. 2784-90.
64. Klepzig, H., Jr., et al., *Analysis of 100 emergency aortocoronary bypass operations after percutaneous transluminal coronary angioplasty: which patients are at risk for large infarctions?* Eur Heart J, 1991. **12**(8): p. 946-51.
65. van Royen, N., et al., *Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease*. Cardiovasc Res, 2001. **49**(3): p. 543-53.
66. Unger, E.F., et al., *Basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral flow in a canine model*. Am J Physiol., 1994. **266**: p. H1588-1595.
67. Lazarous, D.F., et al., *Basic fibroblast growth factor in patients with intermittent claudication: results of a phase I trial*. J Am Coll Cardiol, 2000. **36**(4): p. 1239-44.
68. Unger, E.F., et al., *Effects of a single intracoronary injection of basic fibroblast growth factor in stable angina pectoris*. Am J Cardiol, 2000. **85**(12): p. 1414-9.
69. Hedman, M., et al., *Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of*

- postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia: phase II results of the Kuopio Angiogenesis Trial (KAT)*. Circulation, 2003. **107**(21): p. 2677-83.
70. Morishita, R., *Recent progress in gene therapy for cardiovascular disease*. Circ J, 2002. **66**(12): p. 1077-86.
71. Morishita, R., *[Gene therapy in cardiovascular medicine as new pharmacological therapy]*. Nippon Yakurigaku Zasshi, 2002. **120**(4): p. 222-8.
72. Morishita, R., et al., *Gene therapy in vascular medicine: recent advances and future perspectives*. Pharmacol Ther, 2001. **91**(2): p. 105-14.
73. Hammond, H.K. and M.D. McKirnan, *Angiogenic gene therapy for heart disease: a review of animal studies and clinical trials*. Cardiovasc Res, 2001. **49**(3): p. 561-7.
74. Lathi, K.G., et al., *Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease: anesthetic management and results*. Anesth Analg, 2001. **92**(1): p. 19-25.
75. Rosengart, T.K., et al., *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**(5): p. 468-74.
76. Laham, R.J., et al., *Local perivascular delivery of basic fibroblast growth factor in patients undergoing coronary bypass surgery: results of a phase I randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. Circulation, 1999. **100**(18): p. 1865-71.
77. Stegmann, T.J., et al., *[Induction of myocardial neoangiogenesis by human growth factors. A new therapeutic approach in coronary heart disease]*. Herz, 2000. **25**(6): p. 589-99.
78. Helisch, A. and J.A. Ware, *Therapeutic angiogenesis for ischemic heart disease*. Adv Exp Med Biol, 2000. **476**: p. 327-50.
79. Melillo, G., et al., *Gene therapy for collateral vessel development*. Cardiovasc Res, 1997. **35**(3): p. 480-9.
80. Abraham, J.A., et al., *Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor*. Science, 1986. **233**(4763): p. 545-8.
81. Casscells, W., et al., *Isolation, characterization, and localization of heparin-binding growth factors in the heart*. J Clin Invest, 1990. **85**(2): p. 433-41.
82. Asplin, I.R., et al., *Differential regulation of the fibroblast growth factor (FGF) family by alpha(2)-macroglobulin: evidence for selective modulation of FGF-2- induced angiogenesis*. Blood, 2001. **97**(11): p. 3450-7.
83. Burgess, W.H. and T. Maciag, *The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins*. Annu Rev Biochem, 1989. **58**: p. 575-606.
84. Basilico, C. and D. Moscatelli, *The FGF family of growth factors and oncogenes*. Adv Cancer Res, 1992. **59**: p. 115-65.
85. Klagsbrun, M., *The fibroblast growth factor family: structural and biological properties*. Prog Growth Factor Res, 1989. **1**(4): p. 207-35.
86. Baffour, R., et al., *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**(2): p. 181-91.
87. Rajanayagam, M.A., et al., *Intracoronary basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral perfusion in dogs*. J Am Coll Cardiol, 2000. **35**(2): p. 519-26.
88. Simons, M., et al., *Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2; Double-blind, randomized, controlled clinical trial*. Circulation, 2002. **105**: p. 788-793.
89. Quinkler, W., et al., *Isolation of heparin binding growth factors from bovine, porcine, and canine hearts*. Eur J Biochem, 1989. **181**: p. 67-73.

90. Deindl, E., et al., *Role of ischemia and of hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit*. Circulation Research, 2001 Oct 26. **89**(9): p. 779-786.
91. Ferrara, N., et al., *Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins*. Endocr Rev, 1992. **13**(1): p. 18-32.
92. Ferrara, N. and H.P. Gerber, *The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis*. Acta Haematol, 2001. **106**(4): p. 148-56.
93. Bussolati, B., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor-1 modulates vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis via nitric oxide*. Am J Pathol, 2001. **159**(3): p. 993-1008.
94. Bates, D.O. and S.J. Harper, *Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors*. Vascul Pharmacol, 2002. **39**(4-5): p. 225-37.
95. Pipp, F., et al., *VEGFR-1-selective VEGF homologue PlGF is arteriogenic - Evidence for a monocyte-mediated mechanism*. Circulation Research, 2003 Mar 7. **92**(4): p. 378-385.
96. Deindl, E., et al., *Collateral artery growth in rabbit is not dependent on ischemia or an increased expression of VEGF*. Circulation, 2000. **102**.
97. Koyanagi, M., et al., *Role of monocyte chemoattractant protein-1 in cardiovascular remodeling induced by chronic blockade of nitric oxide synthesis*. Circulation, 2000. **102**(18): p. 2243-8.
98. Ignarro, L.J., *Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties*. Faseb J, 1989. **3**(1): p. 31-6.
99. Star, R.A., *Nitric oxide*. Am J Med Sci, 1993. **306**(5): p. 348-58.
100. Palmer, R.M., et al., *L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation*. Biochem Biophys Res Commun, 1988. **153**(3): p. 1251-6.
101. Palmer, R.M., D.S. Ashton, and S. Moncada, *Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine*. Nature, 1988. **333**(6174): p. 664-6.
102. Marletta, M.A., et al., *Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate*. Biochemistry, 1988. **27**(24): p. 8706-11.
103. Li, H. and U. Forstermann, *Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease*. J Pathol, 2000. **190**(3): p. 244-54.
104. Morris, S.M., Jr. and T.R. Billiar, *New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis*. Am J Physiol, 1994. **266**(6 Pt 1): p. E829-39.
105. Alderton, W.K., C.E. Cooper, and R.G. Knowles, *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition*. Biochem J, 2001. **357**(Pt 3): p. 593-615.
106. Fleming, I. and R. Busse, *Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2003. **284**(1): p. R1-12.
107. Hurt, K.J., et al., *Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase mediates penile erection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(6): p. 4061-6.
108. Fleming, I., et al., *Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity*. Circ Res, 2001. **88**(11): p. E68-75.
109. Nathan, C., *Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells*. Faseb J, 1992. **6**(12): p. 3051-64.
110. Nathan, C., *Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make?* J Clin Invest, 1997. **100**(10): p. 2417-23.
111. Thippeswamy, T. and R. Morris, *The roles of nitric oxide in dorsal root ganglion neurons*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **962**: p. 103-10.
112. Stone, J.R. and M.A. Marletta, *The ferrous heme of soluble guanylate cyclase: formation of hexacoordinate complexes with carbon monoxide and nitrosomethane*. Biochemistry, 1995. **34**(50): p. 16397-403.

113. Stone, J.R. and M.A. Marletta, *Heme stoichiometry of heterodimeric soluble guanylate cyclase*. *Biochemistry*, 1995. **34**(45): p. 14668-74.
114. Fulle, H.J. and D.L. Garbers, *Guanylyl cyclases: a family of receptor-linked enzymes*. *Cell Biochem Funct*, 1994. **12**(3): p. 157-65.
115. Drewett, J.G. and D.L. Garbers, *The family of guanylyl cyclase receptors and their ligands*. *Endocr Rev*, 1994. **15**(2): p. 135-62.
116. Koesling, D., et al., *The primary structure of the larger subunit of soluble guanylyl cyclase from bovine lung. Homology between the two subunits of the enzyme*. *FEBS Lett*, 1990. **266**(1-2): p. 128-32.
117. Humbert, P., et al., *Purification of soluble guanylyl cyclase from bovine lung by a new immunoaffinity chromatographic method*. *Eur J Biochem*, 1990. **190**(2): p. 273-8.
118. Lucas, K.A., et al., *Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP*. *Pharmacol Rev*, 2000. **52**(3): p. 375-414.
119. Ignarro, L.J., *Wei Lun Visiting Professorial Lecture: Nitric oxide in the regulation of vascular function: an historical overview*. *J Card Surg*, 2002. **17**(4): p. 301-6.
120. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. *Nature*, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
121. Rapoport, R.M., M.B. Draznin, and F. Murad, *Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation*. *Nature*, 1983. **306**(5939): p. 174-6.
122. Rapoport, R.M. and F. Murad, *Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP*. *Circ Res*, 1983. **52**(3): p. 352-7.
123. Ignarro, L.J., et al., *Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1986. **237**(3): p. 893-900.
124. Forstermann, U., G. Hertting, and B. Neufang, *The role of endothelial and non-endothelial prostaglandins in the relaxation of isolated blood vessels of the rabbit induced by acetylcholine and bradykinin*. *Br J Pharmacol*, 1986. **87**(3): p. 521-32.
125. Aisaka, K., et al., *NG-methylarginine, an inhibitor of endothelium-derived nitric oxide synthesis, is a potent pressor agent in the guinea pig: does nitric oxide regulate blood pressure in vivo?* *Biochem Biophys Res Commun*, 1989. **160**(2): p. 881-6.
126. Rees, D.D., R.M. Palmer, and S. Moncada, *Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(9): p. 3375-8.
127. Gardiner, S.M., et al., *Control of regional blood flow by endothelium-derived nitric oxide*. *Hypertension*, 1990. **15**(5): p. 486-92.
128. Klabunde, R.E. and R.C. Ritger, *NG-monomethyl-L-arginine (NMA) restores arterial blood pressure but reduces cardiac output in a canine model of endotoxic shock*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991. **178**(3): p. 1135-40.
129. Tresham, J.J., et al., *Haemodynamic and hormonal effects of N-nitro-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide biosynthesis, in sheep*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1991. **18**(5): p. 327-30.
130. Huang, P.L., et al., *Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase*. *Nature*, 1995. **377**(6546): p. 239-42.
131. Busse, R., A. Luckhoff, and E. Bassenge, *Endothelium-derived relaxant factor inhibits platelet activation*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1987. **336**(5): p. 566-71.
132. Alheid, U., J.C. Frolich, and U. Forstermann, *Endothelium-derived relaxing factor from cultured human endothelial cells inhibits aggregation of human platelets*. *Thromb Res*, 1987. **47**(5): p. 561-71.

133. Radomski, M.W., R.M. Palmer, and S. Moncada, *The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium*. Biochem Biophys Res Commun, 1987. **148**(3): p. 1482-9.
134. Radomski, M.W., R.M. Palmer, and S. Moncada, *The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide*. Br J Pharmacol, 1987. **92**(3): p. 639-46.
135. Jadeski, L.C. and P.K. Lala, *Nitric oxide synthase inhibition by N(G)-nitro-L-arginine methyl ester inhibits tumor-induced angiogenesis in mammary tumors*. Am J Pathol, 1999. **155**(4): p. 1381-90.
136. Tronc, F., et al., *Role of NO in flow-induced remodeling of the rabbit common carotid artery*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996. **16**(10): p. 1256-62.
137. Ziche, M., et al., *Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis*. J Clin Invest, 1997. **99**(11): p. 2625-34.
138. Hood, J. and H.J. Granger, *Protein kinase G mediates vascular endothelial growth factor-induced Raf-1 activation and proliferation in human endothelial cells*. J Biol Chem, 1998. **273**(36): p. 23504-8.
139. Papapetropoulos, A., et al., *Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells*. J Clin Invest, 1997. **100**(12): p. 3131-9.
140. Zeiher, A.M., B. Schray-Utz, and R. Busse, *Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant Protein 1 in cultured human endothelial cells*. Circ Res, 1995. **76**: p. 980-986.
141. Arndt, H., C.W. Smith, and D.N. Granger, *Leukocyte-endothelial cell adhesion in spontaneously hypertensive and normotensive rats*. Hypertension, 1993. **21**(5): p. 667-73.
142. Kubes, P., M. Suzuki, and D.N. Granger, *Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(11): p. 4651-5.
143. Davenpeck, K.L., T.W. Gauthier, and A.M. Lefer, *Inhibition of endothelial-derived nitric oxide promotes P-selectin expression and actions in the rat microcirculation*. Gastroenterology, 1994. **107**(4): p. 1050-8.
144. Gauthier, T.W., et al., *Nitric oxide protects against leukocyte-endothelium interactions in the early stages of hypercholesterolemia*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(10): p. 1652-9.
145. Garg, U.C. and A. Hassid, *Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells*. J Clin Invest, 1989. **83**(5): p. 1774-7.
146. Nakaki, T., M. Nakayama, and R. Kato, *Inhibition by nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells*. Eur J Pharmacol, 1990. **189**(6): p. 347-53.
147. Nunokawa, Y. and S. Tanaka, *Interferon-gamma inhibits proliferation of rat vascular smooth muscle cells by nitric oxide generation*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **188**(1): p. 409-15.
148. Hogan, M., A. Cerami, and R. Bucala, *Advanced glycosylation endproducts block the antiproliferative effect of nitric oxide. Role in the vascular and renal complications of diabetes mellitus*. J Clin Invest, 1992. **90**(3): p. 1110-5.
149. Dimmeler, S., et al., *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation*. Nature, 1999. **399**(6736): p. 601-5.
150. Herzog, S., et al., *Collateral arteries grow from preexisting anastomoses in the rat hindlimb*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**: p. H2012-H2020.
151. Hossler, F.E., J.E. Douglas, and L.E. Douglas, *Anatomy and morphometry of myocardial capillaries studied with vascular corrosion casting and scanning electron microscopy: a method for rat heart*. Scan Electron Microsc, 1986(Pt 4): p. 1469-75.

152. Hossler, F.E., et al., *Microvascular architecture of the elastase emphysemic hamster lung*. J Electron Microsc Tech, 1991. **19**(4): p. 406-18.
153. Kratky, R.G., et al., *Quantitative measurement from vascular casts*. Scanning Microsc, 1989. **3**(3): p. 937-42; discussion 942-3.
154. Polak, J.M., and Van Noorden, Susan, *Immunohistochemistry. Practical Applications In Pathology And Biology*. 1983: Wright-PSG, Boston.
155. Naish, S.J., *Handbuch II immunhistochemischer Färbemethoden*. 1989: DAKO Corporation.
156. Bourne, J.A., *Handbuch I der Immunperoxidase Färbemethode*. 1983: Immunohistochemistry Laboratory DAKO Corporation.
157. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(259): p. 680-5.
158. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
159. Behrends, S., et al., *The beta 2 subunit of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is developmentally regulated in rat kidney*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2001. **364**(6): p. 573-6.
160. Behrends, S., et al., *Developmental changes of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase expression in pulmonary arteries*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **283**(4): p. 883-7.
161. Behrends, S., et al., *Glycerol trinitrate treatment up-regulates soluble guanylyl cyclase in rat dura mater*. Neuroreport, 2001. **12**(18): p. 3993-6.
162. Behrends, S., et al., *The expression pattern of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase in the rat heart changes during postnatal development*. J Histochem Cytochem, 2002. **50**(10): p. 1325-32.
163. Bamberger, A.M., et al., *Expression and tissue localization of soluble guanylyl cyclase in the human placenta using novel antibodies directed against the alpha(2) subunit*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(2): p. 909-12.
164. Chan, P.S. and M.C. Lin, *Isolation of cyclic AMP by inorganic salt coprecipitation*. Methods Enzymol, 1974. **38**: p. 38-41.
165. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
166. Fulton, W.F.M., *The Coronary Arteries*. 1965, Springfield, Illinois: Charles C Thomas.
167. Baroldi, G. and G. Scomazzoni, *Coronary Circulation in the Normal and the Pathologic Heart*. 1967, Washington: Office of the Surgeon General, Department of the Army.
168. Rentrop, K.P., et al., *Serial angiographic assessment of coronary-artery obstruction and collateral flow in acute myocardial-infarction - report from the 2nd mount- sinai-new-york-university reperfusion trial*. Circulation, 1989. **80**: p. 1166-1175.
169. Piek, J.J., et al., *Clinical, angiographic and hemodynamic predictors of recruitable collateral flow assessed during balloon angioplasty coronary occlusion*. JACC, 1997. **29**: p. 275-282.
170. Glagov, S., et al., *Hemodynamics and atherosclerosis. Insights and perspectives gained from studies of human arteries*. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 1988. **112**(10): p. 1018-31.
171. Freedman, S. and J. Isner, *Therapeutic angiogenesis for ischemic cardiovascular disease*. Journal of Molecular & Cellular Cardiology, 2001 Mar. **33**(3): p. 379-393.
172. Schaper, W., et al., *Collateral Circulation of the Heart*, in *Angiogenesis and Cardiovascular Disease*, J.A. Ware and M. Simons, Editors. 1999, Oxford University Press: New York, NY, Oxford. p. 159-198.

173. Resnick, N. and M.A.J. Gimbrone, *Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression*. FASEB J, 1995. **9**: p. 874-882.
174. Shyy, Y.J., et al., *Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in vascular endothelium*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994. **91**: p. 4678-4682.
175. Kleschyov, A.L., et al., *Spin trapping of vascular nitric oxide using colloid Fe(II)-diethyldithiocarbamate*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **275**(2): p. 672-7.
176. Kleschyov, A.L. and T. Munzel, *Advanced spin trapping of vascular nitric oxide using colloid iron diethyldithiocarbamate*. Methods Enzymol, 2002. **359**: p. 42-51.
177. Munzel, T., et al., *Detection of superoxide in vascular tissue*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(11): p. 1761-8.
178. Groebe, K., *Precapillary servo control of blood pressure and postcapillary adjustment of flow to tissue metabolic status. A new paradigm for local perfusion regulation*. Circulation, 1996. **94**(8): p. 1876-85.

9. Abkürzungsverzeichnis

aFGF	acidic FGF, aFGF, FGF-1
Akt	PKB (Protein-Kinase B), Rac, Serin 473/Threonin 308-Protein-Kinase
bFGF	basic FGF, bFGF, FGF-2
cGMP	Zyklisches Guanosin-Monophosphat
EDRF	endothelium derived relaxing factor
eNOS	endotheliale NO-Synthase, ecNOS, NOS III
FGF	fibroblast growth factor, Fibroblasten Wachstumsfaktoren
GM-CSF	granulocytes/monocytes-colony stimulating factor
HE	Haematoxilin-Eosin
HIF-1	hypoxia inducible factor-1
ICAM-1	intercellular adhesion molecule1, CD 54
ICH	Immunhistochemie
iNOS	Induzierbare NOS, NOS II
KHK	Koronare Herzerkrankung
L-NAME	N _w -Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester (NO-Synthase-Hemmer)
MCP-1	Monocyte Chemotatic/Chemoattractant Protein-1
MMP	Metalloproteinase
nNOS	Neuronale NOS, NOS I
NNS	normal swine serum
NO	nitric oxide, Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NRS	normal rabbit serum
p. m. Angiographien	Post mortem Angiographien
PAP	Peroxidase anti-Peroxidase
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate buffered saline
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	platelet-derived growth factor

PI3-Kinase	Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase
PIGF	placenta growth factor
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase, Protein Kinase A
PKG	Protein Kinase G, cGMP-abhängige Protein-Kinasen vom Typ1, cGK-1, GK-1 c-terminal
SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulfate – Polyacrylamid Gelelektrophorese
sGC	lösliche Guanylat-Cyclase, Guanylyl-Cyclase
TGF- α/β	Transforming Growth Factor- α/β
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
VASP	vasodilator-stimulated phosphoprotein
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR-1	VEGF-Rezeptor-1, Flt-1
VEGFR-2	VEGF-Rezeptor-2, KDR

10. Danksagung

Ich danke vor allem Herrn Dr. med. W. D. Ito, Abteilung für Kardiologie am Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf.

Lieber Wulf, seit dem „Innere-Klopfkurs“ von 1999 kennen wir uns nun schon. Du hast mich seitdem wissenschaftlich und auch klinisch betreut; insbesondere hast Du mich ins wissenschaftliche Arbeiten eingeführt und mich an Deiner Faszination für Gefäßwachstum teilhaben lassen. Du hast mir zudem die Möglichkeit gegeben, unsere Arbeiten nationalen und internationalen Kollegen vorzustellen.

Unsere gemeinsamen Exkursionen ermöglichten mir, Dich nicht nur fachlich, sondern auch persönlich kennen und schätzen zu lernen. Umso mehr bedaure ich, dass sich unsere Wege nun getrennt haben. Ich würde mir wünschen, dass sie sich bald wieder kreuzen werden. Wulf, Dir und Deiner Familie alles, alles Gute!

Herrn Professor Dr. med. T. Meinertz, dem Direktor der Abteilung für Kardiologie am Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf danke ich dafür, dass er die diese Dissertation ermöglicht und gefördert hat.

Ich danke Herrn PD Dr. med. R. Middendorf, Anatomisches Institut der Universität Hamburg, und Herrn PD Dr. med. S. Behrends, Pharmakologisches Institut der Universität Hamburg. Sie und Ihre Mitarbeiter haben mir Labor und Gerätschaften zur Verfügung gestellt und durch diese Gastfreundschaft zur Fertigstellung der Arbeit beigetragen.

11. Lebenslauf

Name Hendrik Sager

Hochschulstudium

Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg, Deutschland und der Universität von Sydney, Australien

Veröffentlichungen

„Collateral arteries grow from preexisting anastomoses in the rat hindlimb“
American Journal Of Physiology (Heart Circ Physiol) 283: H2020, 2002

„Nitric oxide has no impact on the arteriogenic effect of MCP 1 and macrophage recruitment during collateral growth“
Z Kardio 93: Suppl 3 (2004)

12. Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: