

**Zentrum für innere Medizin**

**Medizinische Klinik III/Abteilung für Kardiologie und Angiologie**

**Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**

**DIREKTOR: PROFESSOR DR. MEINERTZ**

**Thema:**

Untersuchungen zu den Mechanismen der MCP 1 vermittelten Arteriogenese unter besonderer Berücksichtigung der Bedeutung zirkulierender Zellen beim Kollateralwachstum nach Ligatur der Arteria femoralis bei Ratten.

**DISSERTATION:**

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von:

**EUGEN KHMELEVSKI**

**Kischinjow, Moldawien**

**Hamburg, 2003**

**Betreuer: PROFESSOR DR. MEINERTZ und Dr. WD Ito**

**Medizinische Klinik III/ Kardiologie und Angiologie**

**Zentrum für Innere Medizin**

**Universitätsklinikum Eppendorf**

<b>1. Zusammenfassung der Arbeit</b>	<b>6</b>
<b>1. Einteilung:</b>	<b>9</b>
1. Erläuterung zur Problematik	8
2. Gefäßwachstum:	9
2.1 alternativer Weg der Blutversorgung	9
2.2 Vaskulogenese	10
2.3 Angiogenese	12
2.4 Arteriogenese:	17
Entdeckung	17
Arteriogenese: eine akute Antwort	18
Vaskuläre Modelle zur Erforschung der Arteriogenese	19
Biphasisches Kollateralarterienwachstum	20
Initiation der Arteriogenese	21
Morphologie der Arteriogenese	25
Makrophagen und Arterienremodeling	27
Angiogenese versus Arteriogenese	27
Modulation der Arteriogenese	30
Probleme des Studiumdesigns	32
Arteriogenese, MCP-1, und Monozyten/Makrophagenakkumulation	34
3. Zytokine/MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1)	43
3.1 Physiologische Rolle von MCP-1	45
3.2 CCR-2 Rezeptor	46
3.3 Pathophysiologische Rolle von MCP-1	48
4. Ziel der Arbeit	52
<b>2. Material und Methoden:</b>	<b>53</b>
1. Tiermodell und Studiendesign	54
2. Beschreibung des Experimentes	55
3. Schema des Experimentes	56
4. Beschreibung für einzelne Gruppen	57
5 Vorbereitung osmotischer Minipumpen	59
6. Narkose	60

<b>7. Operativer Teil:</b>	<b>60</b>
<b>7.1 Operative Phase 1: Induktion der Arteriogenese</b>	<b>60</b>
<b>7.2 operative Phase 2: radiologische Darstellung oder histologische Entnahme der Kollateralarterien</b>	<b>62</b>
<b>8. Immunhistologische Aufarbeitung</b>	<b>63</b>
<b>BRDU-Färbung</b>	<b>65</b>
<b>Makrophagenfärbung</b>	<b>66</b>
<b>9. Knochenmarkdepletion; Blutentnahme; Differentialblutbild</b>	<b>68</b>
<b>10. Statistik</b>	

<b>3. Ergebnisse:</b>	<b>69</b>
-----------------------	-----------

<b>► Teil : Einfluss von MCP-1 auf Arteriogenese 7 Tage nach Ligatur</b>	<b>70</b>
--	-----------

<b>1. post mortem Angiographien</b>	<b>70</b>
<b>PBS-Gruppe</b>	<b>71</b>
<b>MCP-Gruppe</b>	<b>72</b>
<b>Vergleich beider Gruppen</b>	<b>73</b>
<b>2. anti-BrdU-Proliferationsfärbung</b>	<b>74</b>
<b>PBS-Gruppe</b>	<b>75</b>
<b>MCP-Gruppe</b>	<b>76</b>
<b>Vergleich beider Gruppen</b>	<b>77</b>
<b>3. Makrophagenfärbung</b>	<b>78</b>
<b>PBS-Gruppe/Kontrollgruppe</b>	<b>79</b>
<b>MCP-Gruppe</b>	<b>80</b>
<b>Vergleich beider Gruppen</b>	<b>81</b>
<b>4. Zusammenfassung aller Ergebnisse in den +7 Tage Gruppen</b>	<b>84</b>

<b>► Teil 2: Makrophagenkinetik 3 Tage nach Ligatur</b>	<b>85</b>
---	-----------

<b>5. Makrophagensubpopulationen im legierten Bein 3 Tage nach der Ligatur</b>	<b>86</b>
<b>6. Makrophagenquantifizierung: 3 Tage versus 7 Tage</b>	<b>87</b>
<b>7. Legiertes Bein versus Kontrollbein</b>	<b>88</b>
<b>PBS-Gruppe 7 Tage nach Ligatur</b>	<b>88</b>
<b>MCP-1 Gruppe 7 Tage nach Ligatur</b>	<b>89</b>
<b>Ligiertes Bein versus Kontrollbein 3 Tage nach Ligatur</b>	<b>90</b>

<b>► Teil 3: Einfluss von zirkulierenden Zellen auf Arteriogenese</b>	<b>91</b>
8. Leukozytendepletion	92
9. Makrophagenfärbung nach Knochenmarkdepletion	93
10. Proliferation in Kollateralarterien: 3 Tage <i>ohne</i> versus <i>mit</i> KM-Depletion	94
11. Makrophagensubpopulationen: 3 Tage <i>ohne</i> versus <i>mit</i> KM-Depletion	95
12. Zusammenfassung der Ergebnisse	98
<b>4. Diskussion:</b>	<b>99</b>
1. Arterienremodeling und Monozyten/Makrophagen:	100
2. Arterienremodeling und Makrophagenakkumulation: 7 Tage versus 3 Tage	101
3. Mögliche Mechanismen der Makrophagenbeteiligung an der Arteriogenese	102
4. Shear Stress oder Makrophagen	104
5. Hypothesen über Makrophagenakkumulation:	105
6. Auswirkung der Knochenmark-Depletion auf den <i>Proliferationsquotzienten</i>	106
7. Auswirkung der Knochenmark-Depletion auf Makrophagensubpopulationen	107
8. Leukozytäres Reboundphänomen und Makrophagenakkumulation	108
9. 3 Tage versus 7 Tage	109
10. MCP-1 und Arteriogenese	110
11. Intima- und Mediaremodeling ohne Schubspannung	113
12. MCP-1 und einzelne Makrophagensubpopulationen	113
13. MCP-1 aktiviert Makrophagen	114
14. Mechanismen der MCP-1 Wirkung auf die Arteriogenese	116
<b>6. Referenzen</b>	<b>118</b>
<b>7. Danksagung</b>	<b>135</b>

# 1. Einleitung

## Zusammenfassung der Arbeit

Die normale physiologische Funktion der Organe und der Gewebe ist von einer adäquaten Blutversorgung abhängig. Stenosierende Prozesse der Magistralarterien, wie z.B. infolge der Atherosklerose, können akut oder langfristig die Vitalität einzelner Organe und damit des gesamten Organismus gefährden. Der Körper verfügt über einen Mechanismus, der eine akute oder chronische Reduktion der Durchblutung effektiv kompensieren kann. Durch Weiterentwicklung präexistenter arteriöler Shunts zu Kollateralarterien kann eine betroffene Region unter bestimmten Umständen versorgt werden. Dieser Mechanismus wird als Arteriogenese bezeichnet.

Die Arteriogenese (Kollateralarterienwachstum) ist mit der Akkumulation von Makrophagen assoziiert. Einer der stärksten Stimulatoren der Arteriogenese ist das monozytenaktivierende- und anlockende Chemokin MCP-1. Seine Wirkung auf die Kollateralarterienentwicklung wurde von Ito et al. beschrieben. Der genaue Mechanismus, über den MCP-1 zu einer Steigerung der Kollateralkonduktanz führt, blieb jedoch bisher unbekannt. Es lag zuerst nahe, dass MCP-1 über eine vermehrte Rekrutierung zirkulierender Monozyten indirekt das Kollateralarterienwachstum fördert. Eine kürzlich veröffentlichte Studie (Salzedo et al.) zeigt jedoch, dass MCP-1 auch eine direkte Wirkung auf Endothelzellen hat. Zudem war die Rolle, die Monozyten/Makrophagen beim Kollateralarterienwachstum spielen, unbekannt. Die Herkunft der Makrophagen um das wachsende Kollateralgefäß war ebenfalls nicht gesichert. Es wurde angenommen, dass diese aus einwandernden Monozyten entstehen. Gezeigt wurde dies für das Kollateralarterienwachstum jedoch nicht.

Ziel der Arbeit war es die Akkumulation von exsudativen und Gewebsmakrophagen während des Kollateralarterienwachstums zu quantifizieren und die Kinetik der Makrophagenakkumulation und Kollateralarterienproliferation in Beziehung zu setzen. Weiterhin sollte die Auswirkung einer Behandlung mit MCP-1 auf die Proliferation der Kollateralarterien und die Akkumulation exsudativer und gewebsständiger Makrophagen um die Kollateralarterie untersucht werden. Zudem sollte die Rolle monozytärer Zellen für die Akkumulation von perivaskulärer Makrophagen während des Kollateralwachstums und die Proliferation von Kollateralarterien nach Reduktion dieser Zellen durch Zyklophosphamid bestimmt werden.

Nach Ligatur der Femoralarterie wurde PBS bzw. MCP-1 über eine osmotische Minipumpe für 7 Tage in die Kollateralarterienzirkulation infundiert. Die Gefäßproliferation wurde nach kontinuierlicher Gabe von BRDU (Bromdesoxyuridin), das sich in teilende Zellen einbaut, bestimmt. Die Anzahl der Kollateralarterien wurde nach Anfertigung von post mortem Angiographien in zwei Ebenen dreidimensional unter stereoskopischer Sicht ermittelt. Zur Bestimmung der Anzahl der exsudativen und residenten Makrophagen wurde 4-5 Schnitte mit entsprechendem Marker (ED2 und KI-M2R für residente Makrophagen; ED 3 und TRPM-3 für exsudative Makrophagen) gefärbt und die um das Gefäß akkumulierende Makrophagen ausgezählt.

## Zusammenfassung der Arbeit

Die Proliferation der Kollateralarterien unterliegt einer zeitlichen Kinetik. 7 Tage nach Ligatur der Femoralarterie bei Ratten kommt es zu einem Anstieg der Proliferationsgeschwindigkeit in den Kollateralarterien (80% des sieben Tagewertes). Dabei konnten wir zeigen, dass die parallel dazu ablaufende Akkumulation verschiedener Makrophagenimmunphänotypen um die Kollateralarterie ihr Maximum (ca. 120%) zum gleichen Zeitpunkt erreicht. Nach MCP-1 Gabe konnten wir eine Steigerung der Anzahl der rekrutierten Kollateralarterien um 25% zeigen. Während in der PBS Gruppe (Kontrollgruppe) im Durchschnitt 59% der Gefäßwandzellen proliferierten, steigerte MCP-1 die Proliferation in der Gefäßwand der Kollateralarterien um weitere 15 %. Die in früheren Arbeiten beschriebene Assoziation zwischen Arteriogenese und perivaskulärer Akkumulation von Monozyten/Makrophagen wurde erstmalig immunphänotypisiert und außerdem für einzelne Makrophagensubpopulationen quantifiziert. MCP-1 steigerte im Vergleich zur PBS- Kontrollgruppe die Akkumulation perivaskulärer Makrophagen aller Immunphänotypen um die Kollateralarterie um weitere 24-33% für alle Subpopulationen (exsudative und residente Makrophagen).

Die strenge Assoziation der Arteriogenese mit der perivaskulären Makrophagenakkumulation hat die Frage nach ihrer Herkunft aufgeworfen. In diesem Zusammenhang wurde die Rolle von Blutzellen und speziell von Monozyten während der Arteriogenese kontrovers diskutiert. Wir haben 7 Ratten einer chemischen Knochenmarkdepletion mit Zyklophosphamid (120 mg/KgKG) vor der Induktion der Arteriogenese unterzogen, um die Rolle blutzirkulierender Zellen auf die Schlüsselprozesse der Arteriogenese (Gefäßwandproliferation und perivaskuläre Makrophagenakkumulation) zu untersuchen. 5 Tage vor Femoralarterienverschluß behandelten wir Ratten mit Zyklophosphamid und erreichten dadurch eine Absenkung der zirkulierenden weißen Blutzellen auf unter 1% der ursprünglichen Population. Überraschenderweise konnten wir weder einen Einfluss auf die Proliferation von Kollateralarterien noch auf die parallel dazu verlaufende Makrophagenakkumulation 3 Tage nach Femoralarterienligatur feststellen. Die fehlende Minderung in der Proliferationsrate der Intima/Media der Kollateralarterien trotz maximaler Reduktion der zirkulierenden Monozyten, zeigt, dass die Monozytenmigration keinen limitierenden Schritt in der Proliferation der Kollateralarterien darstellt.

Die Funktionen, die den Monozyten zugesprochen wurden, wie Produktion der Zytokinen und proteolytische Fähigkeiten können von perivaskulären Makrophagen, die in großen Quantitäten auch vor der Arteriogeneseinduktion vorhanden sind und deren Akkumulation unabhängig von zirkulierenden Monozyten ist, übernommen werden. Diese Arbeit weist erstmalig die dominierende Rolle residenter Makrophagen während des Kollateralwachstums nach und relativiert die Bedeutung zirkulierender Zellen für die Arteriogenese.

## 1. Erläuterung zu der Problematik

Herz- und Gefäßkrankheiten stehen weiterhin mit weitem Abstand, nämlich mit über **50%**, an erster Stelle der Morbiditäts- und Mortalitätsstatistik in allen zivilisierten Ländern. Dabei stellt die Arteriosklerose mit etwa 95% den Hauptanteil in o.g. Statistiken dar.

Die normale physiologische Funktion der Organe und der Gewebe ist von der adäquaten Blutversorgung und damit auch Oxygenation abhängig. Die Atherosklerose stellt einen stenosierenden und letztendlich auch einen okkludierenden Prozess der magistralen Gefäße dar. Dabei kommt es je nach Körperregion zu einem partiellen oder kompletten Ausfall von Vitalfunktionen. Obwohl sich die Atherosklerose bevorzugt in Koronargefäßen entwickelt, tritt Plaquentwicklung auch in anderen vaskulären Regionen auf. Je nach Region und Grad der Minderperfusion kommt es so zum Beispiel zur Entwicklung von Herzinfarkt, Schlaganfall, pAVK oder renaler Hypertonie.

Die gegenwärtigen therapeutischen Optionen sehen überwiegend eine operative Intervention an Magistralgefäßen als Methode der Wahl vor. Die gängigsten revaskularisierenden Techniken wie PTCA mit oder ohne Stentimplantation, sowie Bypassoperationen haben neben offensichtlichen Vorteilen auch einige Nachteile, die unten aufgelistet wurden:

1. „Ausoperierte“ Patienten: Trotz eines erfolgreichen Eingriffs an Magistralgefäßen, schreitet der generalisierte Arterioskleroseprozess in anderen Abschnitten weiter fort. Nach wiederholten Eingriffen wird die anatomische Situation so komplex, dass weder operativer Eingriff, noch Ballondilatation mehr möglich sind.
2. Restenosen: z.B. 20-30% Restenoserate nach PTCA und 10-20% nach Stentimplantation bei KHK
3. „Ungünstige“ Stenosen / Lokalisationen: z.B. langstreckige/multiple Stenosen
4. Verfügbarkeit der Intervention : z.B. in abgelegenen Gebieten und Drittländern.

Die Nachteile der direkten revaskularisierenden Techniken haben Anlass zur Entwicklung von neuen Konzepten in der Therapie der okkludierenden Durchblutungsstörungen infolge von Arteriosklerose gegeben.

Wachsende Erkenntnisse über molekulare Mechanismen des Gefäßwachstums und die Verfügbarkeit chemischer Verbindungen mit einem positiven oder negativen Einfluss auf die Gefäßentwicklung, die in den letzten Jahren gewonnen wurden, haben die Anwendung von Wachstumsfaktoren bzw *Zytokinen* für die therapeutische Angiogenese, Arteriogenese oder Vaskulogenese zunehmend möglicher erscheinen lassen. Dabei wird versucht, den Wachstumsprozess der Gefäße entweder zu stimulieren (z.B. während der Ischämie) oder zu drosseln (während der Tumor- oder Diabetesangiogenese).

## 2.1. Gefäßwachstum - alternativer Weg der Blutversorgung (1-3)

Es wird geschätzt, dass die Zahl von Patienten, die von der medikamentösen Therapie mit proangiogenen oder antiangiogenen Substanzen profitieren könnten, sich auf **500.000.000** Fälle in westlichen Nationen beläuft.

Mit der Erkenntnis, dass die Gefäßentwicklung eine der zentralen Komponenten in vielen pathologischen Prozessen ist, ist auch die Bereitschaft die Grundlagen vaskulärer Mechanismen vor und nach der Geburt zu erforschen, deutlich gestiegen.

Nach der Geburt werden zumindest drei Formen der Gefäßentwicklung **als Adaptationsmechanismus** bei einer Mangeldurchblutung diskutiert:

1. Vaskulogenese: Entstehung von Gefäßen aus unreifen Vorläuferzellen
2. Angiogenese: Neubildung von Kapillarnetzen durch Kapillarsprossung:
3. Arteriogenese: Wachstums von Kollateralarterien aus präexistenten arteriolären Anastomosen

Interessanterweise sind alle drei Prozesse in unterschiedlicher Ausprägung sowohl während einer *pränatalen* als auch einer *postnatalen* Phase der Gefäßentwicklung präsent. Bei allen drei Typen des Gefäßwachstums sind prä und postnatal häufig gemeinsame Mechanismen und Rezeptor-Ligandsysteme involviert.

**Embryonal** erfolgt zuerst durch die Vaskulogenese die Formation einer primären Gefäßanlage. Die primäre Gefäßanlage entwickelt sich später durch Prozesse der Angiogenese (Neubildung von Gefäßen) und Arteriogenese (Remodeling an Gefäßen) zu dem sekundären vaskulären Gefäßnetzwerk.

**Im Erwachsenenalter** kommt es unter pathologischen Bedingungen zu einem Kompensationsremodeling von diesem sekundären Gefäßnetzwerk durch Angio- und Arteriogenese. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass Vaskulogenese auch postnatal zur Modulierung des Gefäßwachstums beitragen kann und nicht nur im embryonalen Stadium eine wichtige Rolle bei der Gefäßbildung spielt.

## 2.2. Vaskulogenese

Vaskulogenese ist definiert als Entstehung von Gefäßen aus unreifen Endothelzellen. Pränatal führt die Vaskulogenese zur Formation des kardiovaskulären und hämatopoetischen Systems in einem Embryo. Die postnatale Vaskulogenese zeichnet sich durch Teilnahme endothelialer Progenitorzellen aus dem Knochenmark an der Gefäßbildung aus.

Schon in den ersten vier Entwicklungswochen benötigt der menschliche Embryo zwecks eines nutritiven Austausches im multizellulären Organismus ein System jenseits einer einfachen Diffusion. Dieser Prozess wird durch aus dem **Mesoderm** abstammende Zellen-**Angioblasten**- ermöglicht. (4-7)

Als hochinvasive Zellen migrieren **Angioblasten** in verschiedene Teile des Embryos und führen durch Proliferation und Fusion zur Entstehung des vaskulären **Primärplexus**. Diese Formation des primären vaskulären Plexus geschieht ohne Einfluss seitens der Zirkulation. Im Prozess pränataler Vaskulogenese kommt es nicht nur zur Etablierung eines primären vaskulären Plexus, sondern auch zur Entstehung einer extraembryonalen Dottersack-Zirkulation. Während sich der primäre vaskuläre Plexus aus Angioblasten formiert, sind die ersten Anzeichen sekundärer Prozesse in Form von Plexusremodeling schon sichtbar. Nach der Entstehung des homogenen primären vaskulären Netzwerkes zeigen sich erste Anzeichen des Gefäßumbaus in diesem Netzwerk.

Der Umbau im primären Plexus geschieht mit Hilfe von zwei Mechanismen: Angiogenese und Arteriogenese. Durch die **Angiogenese** kommt es zur Expansion des primären Plexus in avaskuläre Regionen. Im Gegensatz zur Vaskulogenese kommt es bei der Angiogenese im reifenden Embryo zur Sprossung von Endothelzellen aus dem primären vaskulären Plexus und nicht zu einer *de novo* Migration von endothelialen Progenitorzellen (unreife Endothelzellen) aus dem Mesoderm. Infolge späterer Segmentenfusion formieren sich in bestimmten Regionen große Gefäße, die im weiteren Prozess der **Arteriogenese** zur großen Arterien umgebaut werden.

Unterschiedliche Mechanismen der Gefäßbildung sind im unterschiedlichen Maß an der Formation der Organzirkulation beteiligt. Die Bildung des vaskulären Netzwerkes während der Organogenese geschieht in einigen Organen hauptsächlich durch Vaskulogenese (Lunge und Milz) in anderen überwiegend durch den Prozess der Angiogenese (Gehirn).

Das vaskuläre System und das blutbildende System scheinen in ihrer embryonalen Entstehung vieles gemeinsam zu haben. Nach heutigem Wissenstand haben endotheliale und hämatopoetische Progenitorzellen ( aus denen sich das kardiovaskuläre und hämatopoetische Systemen entwickeln) einen gemeinsamen Vorfahren: den **Hämangioblasten**. Diese Zellen stammen aus dem Mesoderm des Embryos. Im Prozess der Vaskulogenese entstehen infolge der Differenzierung der

**Hämangioblasten** zu **endothelialen Progenitorzellen** ausserdem auch **haematopoetische Stammzellen**, aus denen sich das blutbildenden System entwickelt.

#### Postnatale Vaskulogenese und Gefäßwachstum (8-16):

Das Knochenmark des Erwachsenen besteht aus mehreren Zellpopulationen inklusive endothelialer Progenitorzellen, die in der Lage sind, sich am Ort der Neovaskularisation einzunisten und sich dort zu Endothelzellen zu differenzieren. Die Präsenz von endothelialen Progenitorzellen im blutbildenden System des Körpers (Knochenmark) ist nicht rein zufällig. Wie oben beschrieben haben beide Systeme während der embryonalen Entwicklung den gleichen genetischen Ursprung.

Das Vorhandensein beider Zell-Linien (EPCs und HSCs) sowohl im Knochenmark und als auch im peripheren Blut eines Erwachsenen wurde in mehreren Studien bestätigt. Aus hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) des Knochenmarkes werden bei Erwachsenen Zellen des peripheren Blutes nachgebildet. Endotheliale Progenitorzellen (EPCs) sind im Erwachsenenalter zur Inkorporation und zur Differenzierung zu Endothelzellen im Gebiet der Neovaskularisation fähig. Im tierexperimentellen Modell konnte eine erhöhte Mobilisation von zirkulierenden EPCs und ihre Inkorporation im Gebiet der Neovaskularisation demonstriert werden.

Mobilisation von endothelialen Progenitorzellen aus dem Knochenmark bei Erwachsenen scheint von der Ischämie abhängig zu sein. So konnte gezeigt werden, dass unter Gabe vom Ischämieschlüsselfaktor VEGF die Zahl von zirkulierenden EPCs ansteigt. Ein Anstieg von zirkulierenden EPCs unter Ischämiebedingungen (pAVK, KHK) wurde auch bei Menschen gezeigt. Der genaue Mechanismus der Mobilisation von endothelialen Progenitorzellen aus dem Knochenmark und ihre Beteiligung an der Neovaskularisation scheint jedoch noch weitgehend offen zu sein.

**2.3. Angiogenese (4, 6, 17):**

Unter Angiogenese versteht man die Formation von neuen Blutgefäßen (Kapillarnetze) aus präexistenten Blutkapillaren durch Neoendotheliogenese. Genauso wie Vasculogenese findet sie sowohl pränatal als auch postnatal statt.

**Die pränatale Angiogenese** dient der Gefäßformation und den Remodelingsprozessen im primären vaskulären Netzwerk, das durch den Prozess der embryonalen Vasculogenese entstanden ist. Im Gegensatz zur Vasculogenese erfolgt der Umbau und die Expansion von Gefäßen während der pränatalen Angiogenese durch Teilung und Fusion von ausgereiften Endothelzellen und nicht endothelialer Vorläuferzellen aus dem Mesoderm. Die Expansion der Gefäße erfolgt durch den vaskulären Umbau im primären vaskulären Plexus, wobei Blutzirkulation in avaskulären Regionen etabliert und funktionell angepasst wird.

**Die postnatale Angiogenese** ist ein adaptiver Vorgang und kann als ein Fundament der physiologischen und pathologischen Prozesse fungieren. Die physiologische Angiogenese findet z.B. bei der Wundheilung statt. Die Entstehung der neuen Kapillarnetze trägt wesentlich zur Etablierung von nutritiver Perfusion und Reoxygenierung in Wundrändern bei. Physiologische Angiogenese dient in diesem Fall der Erhaltung der Homeostase des Organismus. Die pathologische Angiogenese hat einen destruktiven Charakter und tritt bei mehreren weitverbreiteten Erkrankungen wie Malignome, Diabetes mellitus und Ischämie auf.

Im Falle einer Minderdurchblutung (wie in unserer Studie) stellt die Angiogenese einen lokalen Kompensationsmechanismus bei verminderter Blutversorgung durch Stenose/Okklusion von Magistralarterien dar. Sie findet hauptsächlich in einer Hypoxie/Ischämie-region statt und dient mehr der metabolischen Anpassung des ischämischen Gewebes als einer tatsächlichen Kompensation der Minderdurchblutung.

**Zelluläre Mechanismen der Angiogenese (4):**

Zwei unterschiedliche Mechanismen der Kapillarbildung sind an der Angiogenese beteiligt:

**1. Kapillarsprossungsmechanismus:**

Dieser Mechanismus besteht aus mehreren auf einander abgestimmten Schritten, die in mehreren Studien gut dokumentiert sind. Alle Schritte finden in Abwesenheit der Blutzirkulation statt. Sie wird erst nach der Fusion neuer Kapillargefäße etabliert.

Neue Kapillare entstammen kleinen Venolen und anderen Kapillaren. Dabei kommt es zu:

- einer lokalen proteolytischen Degradation der kapillaren/venösen Basalmembran auf der Seite, die am nächsten zum angiogenen Stimulus liegt
- einer Migration der Endothelzellen in Richtung des chemotaktischen Gradienten
- einer Einreihung der Endothelzellen im bipolaren Modus
- einer Proliferation und tubulären Organisation der Endothelzellen
- einer Schleifen-Formation bei Zusammenführung der benachbarten Zellproliferaten
- einem Beginn der Blutzirkulation durch die neuentstandenen Kapillare
- einer Basalmembranbildung und Perizytenakkumulation um die neue Kapillare (Kapillarreifung)

**2. Invaginationsmechanismus:**

Im Gegensatz zum Sprossungsmechanismus findet bei diesem Mechanismus primär die Ausbildung von IST (intervaskuläre Strukturen aus Bindegewebe) statt und dann die Überschichtung des Invaginates mit Endothelzellen. Alle Schritte finden in perfundierten Gefäßen statt.

Die Bildung vom Kapillarnetz erfolgt nicht durch die Fusion einzelner Proliferate (wie beim Sprossungsmechanismus), sondern ist vor der endothelialen Überschichtung des IST schon präsent.

Obwohl beide Mechanismen viele Parallelen zeigen, besitzen sie einen kardinalen Unterschied. Der Unterschied liegt in der Betonung der primären Lumenexpansion mit endothelialer Migration (Sprossungsmechanismus) versus primärer Formation von extrazellulärer Matrix (IST) (Invaginationsmechanismus) mit nachfolgender Endothelüberschichtung und Lumenexpansion.

**Molekulare Regulatoren der Angiogenese: (4, 6, 17) (18)**

Die unten kurz erwähnten positiven Regulatoren der prä- und postnatalen Angiogenese sind auf mehreren Ebenen der Gefäßbildung involviert und kooperieren miteinander synergetisch. Es wurden mehrere proangiogene Wachstumsfaktoren identifiziert. Zu den meistbekanntesten gehören VEGF-A, B, C, FGF1-2, PDGF, HGF, TGF, IL-8.

**-VEGF und seine Liganden (flk-1,flt-1)**

Zu den potentesten Modulatoren der Angiogenese, sowohl pränatal als auch postnatal, gehört die Interaktion zwischen VEGF und seinen Rezeptoren.

Interaktion zwischen diesem Zytokin und seinen Rezeptoren (FLT-1, FLK-1) wird als obligatorisch zunächst für das Überleben des Embryos und auch für die korrekte Gefäßformation im Fetus angesehen. Föten mit inaktivem VEGF oder FLT-1 (einem seiner Rezeptoren) sind nicht überlebensfähig und sterben schon in den ersten Wochen. Der Mangel am zweiten Typ von VEGF Rezeptor macht sich primär in mangelnder Organisation von sog. Gefäßinseln bemerkbar.

Postnatal ist die Interaktion von VEGF und seinen Rezeptoren sowohl für die Angiogenese als auch die Vasculogenese wichtig. Im Falle der Angiogenese fördert dieses Zytokin die Migration, Proliferation und tubuläre Formation endothelialer Zellen. In diesem Prozess ist besonders der FLT-1/VEGFR1 Rezeptor involviert.

Die Rolle des zweiten VEGF-Rezeptors/FLK-1 scheint während der Vasculogenese bei der Mobilisierung der endothelialen Progenitorzellen aus dem Knochenmark wichtig zu sein, die dann ihrerseits zur Gefäßneubildung beitragen (besonders an der Tumorangiogenese deutlich gezeigt).

**-Angiotensin/Tie - System (Ang-1/Tie2 - Rezeptor) (19-21)**

Ein anderer wichtiger Mechanismus in der Angiogeneseregulation ist die Interaktion zwischen Angiotensin-1 und seinem Tie2-Rezeptor. Tie-Rezeptoren gehören wie die VEGF-Rezeptoren zu den endothelialen Tyrosinkinase-Rezeptoren.

Die Bedeutung dieser Rezeptoren wurde aus Studien mit **Tie2-Rezeptor-Mangel** abgeleitet, was in einer mangelnden endokardo-myokardialer Interaktion und in der Entwicklung von abnormal großen Gefäßen resultierte.

Eine Endothelfunktionsanalyse bei diesem Rezeptormangel ergab eine deutlich gestörte Interaktion zwischen Endothelzellen und extrazellulärer Matrix. Obwohl Angiotensin-1 eine chemotaktische Wirkung auf Endothelzellen zeigt, bewirkt es aber keine Endothelproliferation und tubuläre Formation *in vitro*. Die hauptsächliche Auswirkung dieses Systems liegt bei der Ausreifung und Stabilisierung von Kapillarnetzen. In mehreren Studien konnte auch die synergetische Kooperation zwischen Ang-1 und VEGF während der Angiogenese beobachtet werden, die außer Kapillardichte auch die Kapillararchitektur beeinflusste. Im Gegensatz zu Tie2-Rezeptoren scheinen die **Tie-1 Rezeptoren** inhibitorisch auf die Angiogenese zu wirken. Der Mangel an Tie-1 Rezeptoren wirkt sich in einer „ungebremsten“ Angiogenese mit hyperaktivem Endothel.

**NO und Angiogenese (22-24)**

NO ist ein endothelialer Überlebensfaktor, der in der Lage ist, Zellapoptose zu inhibieren und Proliferation/ Migration von Endothelzellen zu fördern. Vom Endothelium sezerniertes NO ist einer der Mediatoren der Angiogenese. VEGF ist ein Stimulator der NO-Produktion und NOS-Expression in Endothelzellen. NO-Produktion spielt eine kritische Rolle in der angiogenen Antwort nicht nur während der Angiogenese, sondern auch während Prozessen in den Arterien wie bei der Atherosklerose und der Arteriogenese. Experimente mit Inhibitoren der NO-Synthese (LNAME als NOS-Blocker) zeigen eine abgeschwächte Angiogenese aber auch einen abgeschwächten Progress der Atherosklerose (LDL schwächt die NO-Synthese ab) und des kardiovaskulären Remodeling

**Ephrin-B2/Eph-B4 System**

Eph-B4 mit seinem Ligand Ephrin-B ist das nächste Mitglied der Tyrosinkinase-Rezeptoren, das in die Modulation der Angiogenese involviert ist. Interessanterweise sind die Bestandteile dieses Systems an unterschiedlichen Teilen des Gefäßsystems positioniert, entweder am arteriellen Ende (Ephrin B2-Ligand) oder venösen Teil (eph4-Rezeptor).

**Pränatal** unterstützt diese Ligand-Rezeptor Interaktion die Ausbildung eines sekundären Gefäßplexus (arterio-venöse Demarkation) aus einem primären Gefäßplexus, wo die Trennung in einen venösen und arteriellen Schenkel noch nicht stattgefunden hat.

Postnatal wurde eine arterio-venöser Interaktion bei Ausbildung neuer Gefäßnetze noch nicht untersucht. Es spricht aber viel dafür, dass derselbe Mechanismus den von der Angiogenese abhängigen pathologischen Prozessen (Tumorwachstum) zugrundeliegen könnte.

Die Angiogenese wird durch Balance von Aktivatoren und Inhibitoren kontrolliert. Zusätzlich zu den oben beschriebenen Aktivatoren der Angiogenese spielen auch die Inhibitoren wie z.B Endostatin, Angiostatin, PF4, Antithrombin-3 und andere eine wichtige Rolle.

**Angiogenese ist mit Makrophagen assoziiert (25-27)**

Der Prozess der Angiogenese scheint nicht nur von Zytokinen sondern auch von dem Vorhandensein von Makrophagen im Bereich der Neoangiogenese abhängig zu sein. Die Rolle von Makrophagen wurde durch ihre Depletion im Bereich der neoplastischen Angiogenese untersucht, wobei sich mit der deutlichen Verminderung der Makrophagenanzahl auch eine deutlich verminderte Endothelzellteilung zeigte.

**Therapeutische Angiogenese bei Ischämie?**

Angiogenese wird bis heute als eine therapeutische Option bei verschiedenen Ischämie-basierten pathologischen Prozessen diskutiert. Der Versuch z.B. durch lokale Gabe von Wachstumsfaktoren (FGF-1 und VEGF-A) Mangel durchblutung zu kompensieren, ist ein Versuch den Verschluss von einigen wenigen großen/magistralen Arterien durch Neuentwicklung von einer Vielzahl an kleinen Gefäßen/Kapillarnetzen zu kompensieren, dabei konnte keine signifikante Besserung der Symptomatik trotz Neuentstehung von Kapillarnetzen festgestellt werden. Man braucht eine enorme Anzahl an Kapillargefäßen, um ein magistrales Gefäß durch eine Vielzahl an kleinen Gefäßen (10µm) zu ersetzen. Die Natur von Kapillargefäßen ist das Gewebe zu ernähren und mit Sauerstoff zu versorgen und nicht das Gewebe mit großem Blutvolumen zu versorgen.

Fazit: Eine therapeutische Stimulation der Angiogenese kann aus hämodynamischer Sicht eine Stenose/Verschluss von Magistralarterien **nicht** ausreichend kompensieren und bietet keinen signifikanten funktionalen Gewinn im Vergleich zur Arteriogenese.

**2.4 Arteriogenese - „Physiologischer Bypass“: (28, 29) (2, 3, 30, 31)**

Arteriogenese bezieht sich auf das Wachstum der präexistenten Gefäße zu vollfunktionierenden Arterien.

**Entdeckung (31):**

Die Präexistenz von Kollateralarterien wurde schon 1669 von Richard Lower an der Oxford Universität beobachtet. Richard Lower konnte nicht nur die Präexistenz von kollateralen Verbindungen zwischen verschiedenen vaskulären Regionen genau beschreiben, sondern hat auch richtig ihre Funktion als ein alternativer Weges der Blutversorgung im Falle eines Mangels in der Blutversorgug erkannt.

Das Phänomens der Blutversorgung durch Kollateralgefäße wurde in einem unüblichen anatomischen Gebiet vor 200 Jahren durch John Hunter entdeckt. Nach Ligatur der magistralen Arterie im Hirsch-Geweih merkte er, das es nach der anfänglichen Retardierung im Wachstum des Geweihs, es zu einem erneuten Wachstum des Geweihs kam. Das Phänomen der alternativen Blutversorgung durch Kollateralarterienversorgung wurde erkannt.

Die Reproduktion dieses Phänomens im Hunde Model (Ligatur der A. femoralis) konnte die Vermutungen der Existenz einer alternativen Blutversorgung bestätigen.

Die Übertragung dieser Ergebnisse auf den Menschen bei Ligatur der Arteria femoralis über einem Aneurysma machte durch Entwicklung der bereits vorhandenen Kollateralarterien die Amputation der unteren Extremität überflüssig. Das Phänomen funktionierte also auch spezienunabhängig.

Die Untersuchungen in anderen Gefäßregionen ergaben ähnliche Ergebnisse. 1930 wurde z.B. die funktionelle Rolle der renalen Kollateralarterien erkannt. In klassischen Experimenten mit einer Arteria renalis Ligatur wurde mit der Zeit eine allmähliche Abnahme der hypertensiven Reaktion beobachtet. Operative Exploration der Nieren im Hunde-Modell ergab eine starke Entwicklung der Kollateralarterien, deren Ligatur zu einer erneuten Zunahme der Hypertonie führte.

1971 wurde zum ersten Mal auch der Basismechanismus des Kollateralarterienwachstums beschrieben. Im Hunde-Modell wurde demonstriert, dass die Entwicklung der präexistenten Gefäßen zu vollständigen Arterien durch eine Proliferation der endothelialen und glatten Muskelzellen der Gefäßwand geschieht und nicht das Resultat des bloßen „Aufpumpens“ der Arterien nach Kontrastmittelgabe bei Anfertigung der Angiografien ist.

**Arteriogenese: eine akute Antwort (1, 3, 31-33)**

Das Überleben des Gewebes nach einem akuten Verschluss eines Magistralgefäßes hängt von der sofortigen Verfügbarkeit der alternativen Blutversorgung. Solche alternative Blutversorgung wird nur durch die präexistenten Kollateralarterien gewährleistet, die auch sofort verfügbar sind.

Im Gegensatz dazu werden durch den Prozess der Angiogenese nicht sofort Gefäße zu einer akuten Kompensation der Minderdurchblutung, da die Endothelzellen sich zuerst teilen und zu Kapillarnetzen formieren müssen.

Obwohl die Arteriogenese ein einheitlicher Prozess ist, bestehen fundamentale Unterschiede in der Kompensationskapazität- und geschwindigkeit der Kollateralzirkulation nach einer akuten Ligatur in verschiedenen Körperregionen. Untersuchungen im Hundemodell in drei Zirkulationsregionen (untere Extremitäten, Herz, Hirn) nach der akuten Ligatur der zuführenden Arterie (Art. femoralis, Koronararterie, Art. Carotis) ergaben signifikante Unterschiede zwischen den drei Gefäßregionen im Stundenbereich. Die Kollateralarterien der unteren Extremitäten zeigten die größte Erholung in der Blutversorgung (~50% des initialen Blutflusses) nach der Ligatur. Die kardiale Kollateralzirkulation zeigte dagegen die kleinste Kompensationskapazität im Blutfluss im Stundenbereich nach der Ligatur. Das Kompensationsvermögen in der Carotiden-Region lagen dazwischen. Der gleiche Unterschied in der Kompensation wurde auch nach einer Woche festgestellt, aber mehrere Wochen nach der Ligatur der Magistralarterien stieg der Blutfluss kontinuierlich an und erreichte in allen drei Zirkulationsregionen ähnliche Werte.

**Vaskuläre Modelle zur Erforschung der Arteriogenese (31):**

Kollateralarterien können den Ausfall von Magistralarterien in verschiedenen Körperregionen kompensieren. So zum Beispiel an Herz, den unteren Extremitäten, dem ZNS, dem Darm und den Nieren. Dementsprechend wird das Phänomen der Arteriogenese in verschiedenen Körperregionen durch Ligatur der entsprechenden nutritiven Arterie erforscht.

Es existieren verschiedene **Extremitätenischämie Modelle**, die alle auf der Ligatur oder Exzision der Arteria femoralis basieren. Im Kaninchen-Ligatur Modell sind die präexistenten Kollateralen erst nach drei Tagen sichtbar, was mehr eine quantitative als eine qualitative Aussage über die Arteriogenese als Prozess erlaubt. Im Ratten-Ligatur Modell kann man die präexistenten Kollateralgefäße schon gleich nach der akuten Okklusion beobachten. Der offensichtliche Vorteil des Rattenmodell besteht darin, dass die Arteriogenese gleich innerhalb der ersten 3 Tagen erforscht werden kann.

**Das Darmischämie Modell**, das auf der Ligatur von Mesenterialarterien und ihrer Marginalästen in Ratten basiert, erlaubt die Beobachtung der Arteriogenese Phänomene an einer Vielzahl von identischen Arterien unter verschiedenen Bedingungen im gleichen Tier (besonders in Abhängigkeit vom Grad der Schubspannung).

Zudem existieren andere Ischämie Modelle, wie z.B. Herzischämie Modell, Nierenischämie Modell und Modell der zerebralen Ischämie, die gebietsabhängig die Arteriogenese zu erforschen erlauben

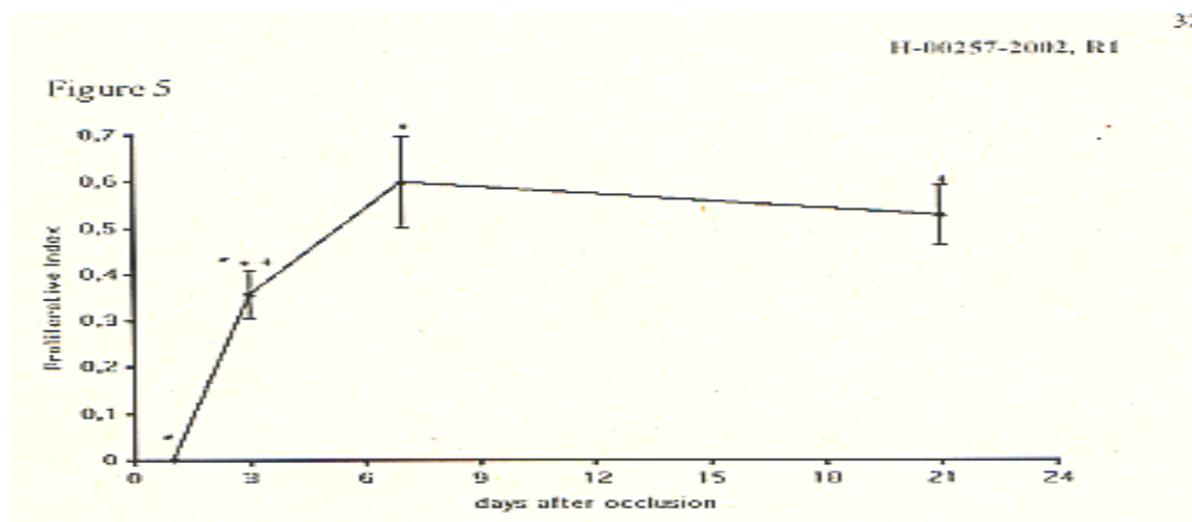
Das für die aktuelle Studie ausgewählte Extremitätenischämie Modell an Ratten bietet die Möglichkeit, gemeinsame Grundmechanismen (trotz regionaler Unterschiede) zu studieren. Das Extremitätenischämie Modell zeigt dabei die größte Kompensation des Durchblutungsausfalls nach Okklusion der Magistralarterie (~40-50%) und keinen Ausfall der Vitalfunktionen.

### Biphasisches Wachstum der Kollateralarterien (34)

Die Arteriogenese ist ein zeitlich limitierter Prozess. Man kann sie grob in zwei große Phasen unterteilen. Der Prozess der Arteriogenese beginnt mit einer schnellen proliferativen Phase (expansives Wachstum). Dieser folgt dann eine langsamere zweite Phase mit überwiegend longitudinalem Wachstum.

Die **erste schnelle Phase** findet in der ersten Woche nach Okklusion statt. Dabei erreicht die Proliferation von Intima/Media und der Diameterzuwachs der Kollateralarterien ihr Maximum. Neointimaformation und das zentrifugale Wachstum verlangsamen sich dann kontinuierlich nach sieben Tagen.

Innerhalb der ersten schnellen Phase selbst sind die ersten drei Tage durch die markantesten Veränderungen gekennzeichnet. Während dieser Zeit findet zweidrittel der Proliferation der Kollateralarterien statt.



**Abb. 1.** Die Grafik demonstriert den zeitlichen Verlauf der Proliferation in der Intima/Media der Kollateralarterien im legierten Bein in Abhängigkeit von der Okklusionszeit.(34)

In der zweiten langsamen Phase (während der zweiten und der dritten Woche nach der akuten Okklusion) kommt es hauptsächlich zum longitudinalen Wachstum der Kollateralarterien, was zur Veränderung seiner Architektur führt. Das Kollateralgefäß nimmt eine charakteristische korkenziehartige Form im mittleren Segment an.

**Initiation der Arteriogenese:****Metabolische Initiation? (31, 35)**

Als Stimulatoren der Arteriogenese wurden mehrere „offensichtliche“ Faktoren angesehen, wie intralumenaler Druck und sein Gradient im Gefäßverlauf, Blutviskosität und Produkte des ischämischen Metabolismus.

Eine primäre metabolische Initiation des neointimalen Remodelings erscheint aus mehreren Gründen unwahrscheinlich.

1. Obwohl es nach einer akuten Okklusion zur schnellen Rekonstitution des metabolischen Defizites kommt, wachsen die Kollateralarterien weiter noch tage- und wochenlang. Messung des Sauerstoffgehaltes und der Ischämiemediatoren im Bereich der Kollateralarterien hat Hypoxie als Stimulus ausgeschlossen. Im Gegensatz zur Angiogenese findet die Arteriogenese unter normoxämischen Bedingungen statt.

2. Wenn Ischämie die Arteriogenese initiieren sollte, dann würden wir auch eine zentrifugale Verteilung der Endothelzellhyperplasie mit Maximum an Proliferation im Ischämiebereich und Abnahme der Proliferation mit der Entfernung vom Hypoxieareal erwarten.

Das renale Modell (mit der Ligatur der Arteria renalis und Untersuchung der periuretralen vaskulären Versorgung) ergab im Gegensatz zur Erwartung einen zentripetalen Proliferationsgradient des Endothelwachstums, was auch gegen Ischämie als Initiator der Arteriogenese spricht. In anderen Modellen wurde auch gezeigt, dass der zentripetale Proliferationsgradient in der Arterienwand ausserdem nicht ischämiespezifisch ist.

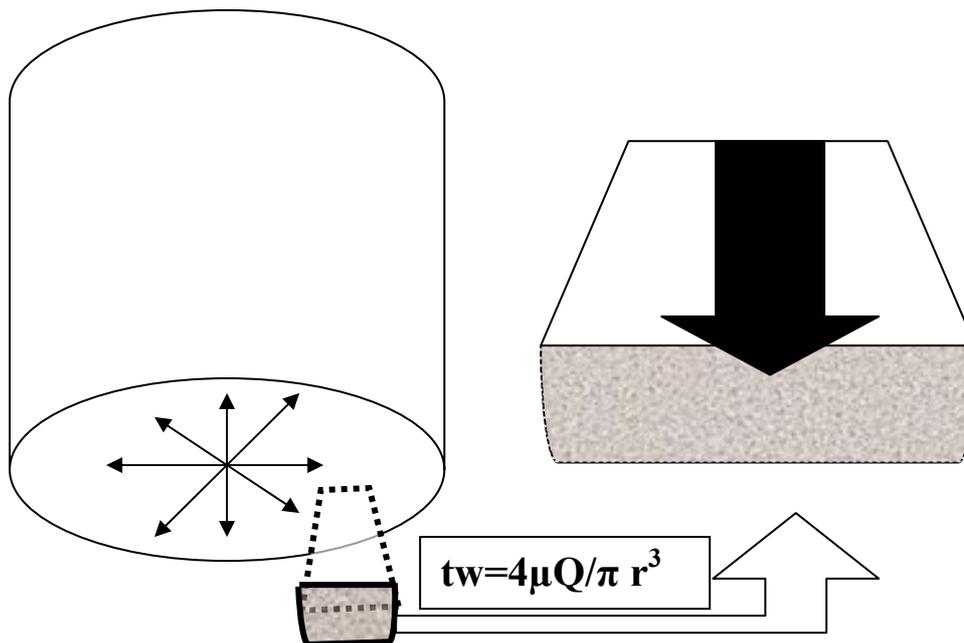
3. In anderen Experimenten mit proangiogenen Wachstumsfaktoren (FGF, MCP-1) konnte ein positiver Effekt nur im ligierten Bein gezeigt werden. Das Kontrollbein dagegen blieb völlig intakt (keine vermehrte Proliferation der Intima/Media).

Der ausbleibende Effekt von Zytokinen auf das nicht ligierte Bein suggeriert uns, dass Wachstumsfaktoren erst sekundär nach der Aktivierung des Endothels durch z.B. Schubspannung ihre Wirkung entfalten können.

**Schubspannung als Initiator der Arteriogenese: (2, 36-40)**

Die Schubspannung wird als Initiator der Arteriogenese angesehen. Sie stellt einen mechanischen/physikalischen Faktor dar, der später von den Endothelzellen der Arterien in ein biochemisches Signal umgewandelt wird.

Schubkraft repräsentiert den Gradienten der Flussgeschwindigkeit in der Nähe der Arterienwand. Diese Kraft tendiert dazu, die intimale Schicht der arteriellen Wand in Flussrichtung zu deplazieren.



**Abb. 2.:** Das Diagramm zeigt Wirkungsmechanismus der Schubspannung an der Arterienwand. Der schwarze Pfeil rechts repräsentiert die Richtung der Einwirkung von Shear Stress auf die Arterienwand. Die in Mitte angegebene Formel zeigt die für die Berechnung von Schubspannung relevanten Parameter. (Radius (r), Blutfluss (Q))

Während der Arteriogenese kommt es zur Erhöhung von Blutflüssen in den Kollateralarterien nach der Ligatur der Magistralarterie und zwangsläufig auch zur Erhöhung der Schubkraft. In diesem Zusammenhang wurde im Modell der mesenterialen Ligatur auch eine Zunahme des Gefäßlumens, der Arterienwanddicke und einer erhöhten enzymalen Aktivität des Endothels der Arterienwand, die proportional zur Zunahme von Blutflüssen und Schubkraft war registriert.

Für die Berechnung der Schubspannung relevante Parameter finden in der folgenden Formel Ausdruck:

$$\tau_w = 4\mu Q / \pi r^3$$

Wobei Veränderungen **im Radius (r)** der Arterie zu starken Schwankungen im Shear Stress führen. Mit Zunahme des Arterienlumens sinkt das Schubspannungslevel und die Arteriogenese nimmt ab. Die Schubspannung ist auch vom **Blutfluss (Q)** abhängig. Mehr Blutfluss bedeutet mehr Schubspannung, was zu einer stärkeren Initiation der Arteriogenese führt.

Schubspannung ist ausserdem von der **Architektur** der Arterie abhängig. An Bifurkationen und konvexen Stellen nimmt der Shear stress zu und an konkaven Stellen und an der lateralen Wand der Bifurkation nimmt das Schubspannungslevel ab. Da die in unserem Experiment rekrutierten Kollateralarterien eine korkenzieheartige Form annehmen, ist auch der Shear Stress ungleich im Verlauf dieser Kollaterale verteilt.

**Drei Komponenten verändern sich während der Arteriogenese.** Der Radius der Kollateralarterien nimmt zu, der Blutfluss nimmt ab und die Gefäßarchitektur zeigt longitudinales/korkenzieheartiges Wachstum der betreffenden Kollateralarterien. Dies führt zur Abnahme der Schubspannung. Man kann sagen, dass während der Arteriogenese eine Anpassung an den Shear Stress durch Lumenexpansion und durch neointemaler Proliferation in der Gefäßwand stattfindet.

In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Schubspannung einen Einfluss auf den Endothelzellestoffwechsel ausübt. Dabei kommt es in den dem Shear Stress ausgesetzten Endothelzellen zu einer erhöhten Synthese von vasoaktiven Substanzen wie z.B. NO, Metaloproteinase und Wachstumsfaktoren (FGF, TGF-β), die die Arteriogenese positiv beeinflussen können.

Laut einigen Studien, die den Einfluss von Schubspannung auf das Gefäßwandremodeling untersucht haben, kommt es nach einer initialen Proliferation in der Intima/Media auch zur Erhöhung der Zelldichte in beiden Schichten in den ersten Wochen nach Ligatur der Magistralarterien. zwölf Wochen nach der Okklusion aber zeigt sich dann eine Rarifizierung der Zelldichte in beiden Gefäßwandschichten, was einen dynamischen Charakter der Arterienwandanpassung an Shear Stress unterstreicht.

Der genaue Transduktionsmechanismus dieser mechanischen Kraft (Shear Stress) in die biochemischen Prozesse und die Beeinflussung der Funktion und Form einer Zelle bleiben weitgehend ungeklärt.

**Transduktion von mechanischer Kraft in biochemische Effekte: (41)**

Der Remodelingsprozess im vaskulären und perivaskulären Kompartiment während der Arteriogenese könnte man als eine **biochemische Antwort auf den mechanischen Stimulus** ansehen. Der genaue molekulare Weg der Transduktion der mechanischen Kraft (Shear Stress) in Proliferation der Kollateralarterien während Arteriogenese ist noch nicht bekannt.

Einige gut dokumentierte Studien haben jedoch das Phänomen der Transduktion mechanischer Kraft auf die Form und die Enzymkinetik der Zellen nachgewiesen. Die Veränderungen, die die Transduktion mechanischer Kraft in biochemische Prozesse ermöglichen, laufen auf der **Zytoskelett- und Enzymebene** ab. Auf der Zellebene kommt es infolge der mechanischen Krafteinwirkung zum Umbau im Zytoskelett mit konsekutiver Veränderung der Lokalisation und Aktivität der daran anheftenden Zellorganellen und Proteinkomplexen.

Das Zytoskelett ist ein dynamisches Gebilde in der Zelle, das zu einer raschen Änderung seiner Form und Struktur und damit auch der enzymatischen Zellfunktion fähig ist.

So sind zum Beispiel Actin-Filamente durch Zelloberflächenrezeptoren (**Integrine**) in der Zellmembran eng mit der extrazellulären Matrix verbunden und können die mechanischen Einwirkungen von außen auf die Zellmembran strukturell auch mit Polymerisation und Depolymerisation beantworten. Das führt zur Verformung der Zelle und zu ihrer Bewegung..

Die Schubspannung wird von einigen Autoren nicht nur als Initiator der Arteriogenese, sondern auch als der Hauptmodulator angesehen. Am Darmischämiemodell bei Ratten konnte in Abhängigkeit vom Grad des Shear Stress Veränderungen in den Kollateralarterien festgestellt werden. (Lumenexpansion der rekrutierten Kollateralarterie, verstärkte Reorganisationsprozesse in der Gefäßwand (Zellteilung in Intima/Media), und eine deutliche Hochregulierung der endothelialen Produktion für Zytokine (FGF, TGF) und NO)

Mit der Abnahme der Schubspannung infolge luminaler Anpassung an den erhöhten Blutfluss, kam es zum Remodelingsstop in den Kollateralarterien. Daraus wurde postuliert, dass die Umbauprozesse in der Arterienwand durch erhöhten Blutfluss und damit durch den Schubspannungsgrad beeinflusst werden.

**Morphologie der Arteriogenese (1-3, 32, 33, 42):****Arteriogenese im Angiogramm:**

Im Vergleich zum Kontrollbein können wir eine Zunahme der Anzahl und des Lumens der rekrutierten Kollateralarterien nach Ligatur der Magistralarterie feststellen.

Die Anzahl und Lumenzunahme der rekrutierten Arterien variiert je nach Spezies: Zwanzigfach im Hund, zehnfach im Kaninchen, zweifach bei der Maus.

Außerdem fällt die **veränderte Architektur** der neurekrutierten Kollateralen auf. Hierbei verändert sich nicht nur die Größe der Gefäße, sondern auch die Form (korkenzieheartiger Verlauf), was einen entscheidenden Einfluss auf Flusseigenschaften der Arterien hat.

Architekturveränderungen in den Kollateralarterien beeinflussen zwangsläufig auch die Blutflüsse in den Kollateralarterien und damit ebenfalls zwangsläufig die Schubspannung, der als Initiator und Hauptmodulator des Kollateralwachstums angesehen wird.

**Vaskuläre Veränderungen:**

Parallel zu den angiographischen Veränderungen in Radiogrammen findet man auch Umbauprozesse in der Gefäßwand selbst. Auswirkungen einer akut veränderten Hämodynamik zeigen sich in der Aktivierung und Teilung der Endothel- und glatten Muskelzellen (**Positives Remodeling**).

Die Teilung von Endothel- und glatten Muskelzellen unterliegt einer biphasischen Dynamik (s.o.) und nach neuesten Studien erreicht sie ihren Maximum um den dritten Tag.

**Perivaskuläre Veränderungen (32, 36, 38-40, 42-44):**

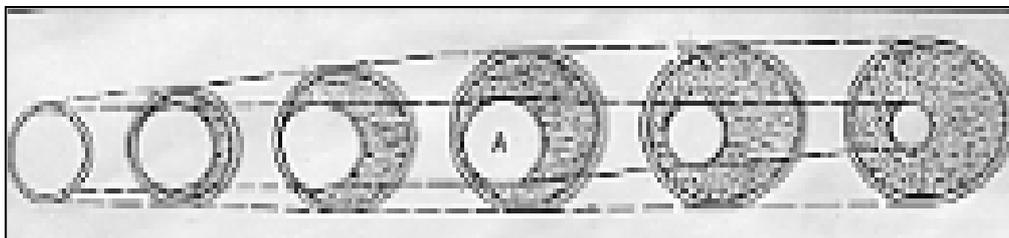
In mehreren Arbeiten wurde zudem eine Assoziation zwischen der Endothelzellteilung und der Akkumulation von **Monozyten/ Makrophagen** demonstriert. Auch die Wirkung von MCP-1 auf die Arterienwand (das bisher potenteste proarteriogene Zytokin) mit deutlich verstärkter Proliferation der Intima/Media und gleichzeitiger Akkumulation von Monozyten und Makrophagen bestätigt die Hypothese der Beteiligung von Monozyten/Makrophagen am Umbau der Arterien in verschiedenen vaskulären Prozessen. (Arteriogenese, Atherosklerose, Arterienremodeling nach Ballondilatation).

Inzwischen wird zunehmend die Rolle der **Adventitia** in den Arterienumbauprozessen diskutiert. Vor kurzem wurde demonstriert, dass Kollateralarterienwachstum von der gestiegener Aktivität bestimmter Enzyme/Proteine begleitet wird (Metalloproteinasen/MMP2, MMP9, Fibronectin, PAI-1, T-PA).

**Positives und negatives Remodeling der Arterien. (33, 37)**

Wir unterscheiden zwei Arten von struktureller Adaptation (Remodeling) in der Arterienwand:

**Negatives oder konstriktives Remodeling:** Durch die rasche Neointimabildung und Proliferation der glatten Muskelzellen kommt es zu einem Gefäßwachstum. Die Arterienexpansion verläuft biphasisch in entgegengesetzten Richtungen, zuerst nach außen und dann nach innen gerichtet. Das anfängliche positive Remodeling in atherosklerotischen Gefäßen (expansives Wachstum) geht in das negative Remodeling über (konstriktives Wachstum), was zur bekannten Arterienstenose führt. Die Vaskuläre Adaptation in atherosklerotischen Arterien führt zu Verschlechterung der Durchblutung.



**Abb. 3:** Das Bild zeigt die initiale Plaqueformation in einer Arterienwand während der Atherosklerose mit zuerst expansivem (Wachstum nach außen) und dann mit konstriktivem (Wachstum nach innen mit Einengung des Gefäßes) Remodeling der Arterienwand. (37)

**Positives oder expansives Remodeling:** Im Falle der Arteriogenese kommt es auch zu einer Neointimaneubildung und Teilung der glatten Muskelzellen wie bei der Atherosklerose. Nur in diesem Fall erfolgt die Expansion der Kollateralarterie überwiegend nach Außen, was zu einer Lumenvergrößerung und Verbesserung der Durchblutung führt. Im Darmischämie-Modell nach Okklusion der Mesenterialarterien und ihren Marginalästen wurde demonstriert, dass der **Remodelinggrad** während der Arteriogenese proportional dem Grad der Flussgeschwindigkeit und der Schubspannung ansteigt. Mit Blutfusszunahme und damit konsekutiv von Shear Stress in Kollateralarterien konnte auch eine Zunahme von allen drei **Parametern des Remodelings** (Gefäßlumen, Wanddicke, synthetische Aktivität der EC für eNOS) demonstriert werden.

Mit dem Fortschreiten der Arteriogenese in den Mesenterialgefäßen kam es zu einer Vergrößerung des Gefäßlumens mit daraus resultierender Abnahme der Blutflüsse (damit auch der Schubspannung) und deutlicher Verlangsamung im Remodelingsprozess. Daraus wurde eine bestimmende Rolle von hämodynamischen Faktoren (Blutfluss und Schubkraft) für die Arteriogenese abgeleitet. Die vaskuläre Adaptation in Kollateralarterien führt in diesem Fall zu einer perfekten Anpassung an eine neue hämodynamische Situation und Verbesserung der Durchblutung.

**Makrophagen und Arterienremodeling: (1, 23, 31, 32, 44-50)**

Umbauprozesse in einer Arterienwand sind in makrophagenreichen Bezirken wesentlich stärker ausgeprägt als in makrophagenarmen Regionen, was die Assoziation zwischen Endothelzellteilung und Makrophagen nicht nur während der Angiogenese, sondern auch während der Arterienreorganisation unterstreicht. An mehreren arteriellen Gefäßprozessen wurde demonstriert, dass eine verminderte Akkumulation von perivaskulären Makrophagen mit einer verminderten Proliferation in der Arterienwand einhergeht. Im Falle der Atherosklerose kam es zum Beispiel zu einer Verlangsamung in der Plaquentwicklung und in der Endothelproliferation der Arterie bei Tieren mit defekter Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen. Damit stimmen auch die Angaben über eine verminderte Neointimabildung in Arterien nach einem Ballon-Trauma überein.

Auch am Beispiel der Arteriogenese nach Arteria femoralis Ligatur wurde eine Assoziation zwischen der Akkumulation von perivaskulären Monozyten/Makrophagen und Intima/Media- Umbau demonstriert. Ähnliche Ergebnisse in mehreren Studien bestätigen wiederholt eine strenge Assoziation der Akkumulation von Monozyten/ Makrophagen mit der Arterienremodeling in diversen vaskulären Modellen.

**Angiogenese versus Arteriogenese: (1-3, 51)**

**Arteriogenese und Angiogenese sind zwei räumlich und zeitlich voneinander abgegrenzte Prozesse.** Obwohl Arteriogenese und Angiogenese einige Mechanismen miteinander teilen, weisen beide Prozesse viele Diskrepanzen auf. Die unten aufgeführten Unterschiede betonen, dass es sich dabei um zwei unterschiedliche Adaptationsmechanismen während Ischämie handeln soll.

**1. unterschiedliche Lokalisation beider Prozesse:**

**Angiogenese:** in hypoxischen Arealen (z.B. Unterschenkel) mit obligatorischer Erhöhung von ischämiepflichtigen Abbauprodukten (LDH-A, Laktat, Hypoxantine, Adenosine, Jonosine, ADP und AMP). **Arteriogenese:** im normoxämischen Areal. Transkutane Messungen des Sauerstoffgehaltes im Oberschenkelbereich und Versuche Ischämieabbauprodukte nachzuweisen, ergaben normoxämisches Milieu im Arteriogenesebereich.

**2. Unterschiedlicher Gefäßtyp:**

**Angiogenese:** Neubildung von Kapillaren aus schon präexistierenden Kapillaren. **Arteriogenese:** Weiterentwicklung von präexistenten Gefäßen zu vollwertigen Arterien

### **3. Unterschiedliche *Initiation*:**

**Angiogenese** wird chemisch durch *Hypoxie / Ischämie* induziert. Sauerstoffmangel wird einstimmig als der Hauptauslöser der vaskulären Anpassung im Ischämiegebiet einstimmig angesehen.

**Arteriogenese** wird dagegen physikalisch durch *Shear Stress* induziert. Der massive Anstieg des Blutflusses in einigen wenigen Kollateralarterien wird als Hauptinitiator und wichtiger Modulator der Architekturveränderungen und Umbauprozesse in der Gefäßwand diskutiert.

### **4. Unterschiedliche Wachstumsmuster:**

**Angiogenese:** Wachstum ausgehend von schon bestehenden Kapillarnetzen durch zwei Mechanismen: durch a) Kapillarsprossung und b) durch Invagination mit Neubildung von weiteren Kapillarnetzen im Bedarfsgebiet. **Arteriogenese:** Maximalentwicklung von schon nach der Geburt vorhandenen Gefäßen. Es wird davon ausgegangen, dass die Anzahl sich von Kollateralarterien nach der Geburt nicht ändert. Die Tatsache, dass nach der Induktion der Arteriogenese radiografisch mehr Arterien gesehen werden, erklärt sich nicht durch die Neuentstehung von Arterien, sondern durch die Weiterentwicklung von schon vorhandenen Arterien.

### **5. Unterschiedliche Beteiligung von Chemokinen und Wachstumsfaktoren:**

**Angiogenese:** Hauptwachstumsfaktor ist VEGF. Die Interaktion mit seinen Rezeptoren (FLT-1 FLK-1) führt zur Auslösung einer ganzen Kaskade von Prozessen im Ischämiegebiet. **Arteriogenese:** Der potenteste Wachstumsfaktor ist MCP-1.

### **6. Angio- und Arteriogenese reagieren unterschiedlich auf gleiche Wachstumsfaktoren:**

Die Hypothese der Arteriogenese wird durch eine unterschiedliche Reaktion beider Prozesse auf provaskuläre Faktoren untermauert: Eine unterschiedliche Reaktion auf den gleichen angiogenen Faktor suggeriert uns, dass es sich um zwei verschiedene Grundprozesse der Gefäßproliferation handeln muss. Einigen Beispiele sind unten aufgeführt. **a. Arterio und Angiogenese reagieren unterschiedlich auf TGF-β1.** Ein eindeutig *proarteriogen* Faktor wie TGF-β1 hat keine Wirkung auf den Prozess der Angiogenese und hemmt sogar die VEGF-Wirkung auf die Angiogenese. **b. Unterschiedliche Reaktion auf VEGF bei Angio- und Arteriogenese (35).** VEGF ist einer der potentesten Angiogenesefaktoren. Während der Arteriogenese zeigt dieses Zytokin aber keine Wirkung auf Kollateralarterien. **c. NO-Blockade und übungsinduzierte Arterio- und Angiogenese: (22-24)** Es konnte gezeigt werden, dass *körperliches Training* im Rattenmodell zur Induktion von Arteriogenese (↑ Blutfluss als Hauptparameter) und Angiogenese (↑ Kapillarenzahl) führt. Beide Prozesse reagieren aber unterschiedlich auf Blockade der NO-Synthasen. Bei 1.

übungsinduzierter Angiogenese: Blockade der NO-Synthasen mit Hilfe von L-NAME im Extremitätenischämiemodell bei Ratten ergab keine Auswirkung auf das Ausmaß der übunginduzierter Angiogenese (kein Zuwachs der Kapillarenzahl). Bei übungsinduzierter Arteriogenese im gleichen Modell konnte nach der NOS-Blockade mit L-NAME eine deutliche Reduktion der übunginduzierten Arteriogenese (gemessen am Blutfluss) festgestellt werden.

### **7. Unterschiedliche Blutzellenbeteiligung:**

**Angiogenese:** mehr Lymphozyten sind involviert. **Arteriogenese:** Beteiligung von Monozyten/Makrophagen an dem Arterienremodeling und damit Arterienwachstum wird von der Mehrheit der Autoren als essentiell angesehen.

### **8. Unterschiedliche hämodynamische Auswirkung:**

**Angiogenese:** Durch Neoendotheliogenese ausgebildete Kapillare erfüllen hauptsächlich eine *nutritive* Funktion ohne Besserung der Blutflüsse. **Arteriogenese:** Rekrutierte Arterien gewährleisten einen besseren Volumentransport und haben keine direkten nutritiven Effekte.

Präexistente Arterien haben in verschiedenen Stromgebieten das Potential zur Entwicklung zu großen Kollateralarterien durch Teilung von Endothel- und glatten Muskelzellen. Im Gegensatz zu Angiogenese sind es einzelne muskulären Arterien. Solche Arterien können große Blutvolumina mit minimalem Verlust an Energie weiterleiten. Nur solche neurekrutierte Arterien sind in der Lage große Blutvolumina weiterzuleiten.

Aus ergonomischer Sicht bieten präexistente Gefäße die beste Möglichkeit große Blutvolumina zu transportieren. Allerdings schränken die Architekturveränderungen dieses Vermögen ein. Durch die Korkenzieherformation der Gefäße erhöht sich der Widerstand in den Kollateralarterien.

Interessanterweise findet spontane Arteriogenese solange statt, bis ~ 60% der Perfusion kompensiert wird. Danach findet unter Normalbedingungen kein spontaner nennenswerter Zuwachs an Perfusion mehr statt. Die Hypothese der Arteriogenese ist immer noch für zahlreiche Interpretationen offen und wird weiterhin noch kontrovers diskutiert. Die Frage, ob Arteriogenese als Adaptationsmechanismus eine selbstständige Entität ist oder die Angiogenese der Arteriogenese vorangeht oder sie initiiert, wird noch weiter diskutiert. Obwohl Arterio- und Angiogenese gemeinsame Mechanismen besitzen, kann man noch nicht mit letzter Sicherheit sagen, ob beide Prozesse komplett räumlich und zeitlich unabhängig voneinander ablaufen und ob Angiogenese nicht doch als eine Komponente der Arteriogenese eine Rolle spielen könnte.

**Modulation der Arteriogenese:**

Der Prozess der Arteriogenese kann durch mehrere Faktoren positiv beeinflusst werden.

**1) Durch hämodynamische Einflüsse:**

**-Schubspannung:** Ausmaß der Arterienlumenexpansion und des positiven Remodelings (Verdickung der Arterienwand und Erweiterung des Arterienlumens) hängt vom Grad der Schubspannung ab. In einigen Arteriogenesemodellen scheint der Shear Stress das Ausmaß der Umbauprozesse in der Arterienwand maßgeblich zu bestimmen. (38, 39)

**2) Durch proarteriogene Zytokine:**

**MCP-1: (52, 53)** Schon in früheren Experimenten konnte radiologisch, immunhistologisch und hämodynamisch eine sehr potente Wirkung von MCP-1 auf die Arteriogenese demonstriert werden.

Es wurde gezeigt, dass MCP-1 über ein normales Maß hinaus im Vergleich zur Kontrollgruppe zur Teilung von Intima und Mediazellen der Kollateralarterienwand führt, was auch mit Veränderungen in der Architektur einzelner Kollateralarterie (Elongation der Kollateralen und korkenzieheartige Veränderungen ihrer Architektur) korreliert. In anderen Studien konnte auch die Auswirkung von MCP-1 auf Blutflüsse im ligierten Bein mit Hilfe von Fluoreszenz Mikrosphären dokumentiert werden. Lokale MCP-1 Infusion führte zu einer deutlichen Verbesserung der Durchblutung in der legierten Extremität. Systemische Gabe von MCP-1 konnte aber keine stimulierende Wirkung im Kontrollbein zeigen, was erneut auf die Abhängigkeit der MCP-1 Wirkung von der Initiation durch die Schubspannung hinweist.

Als Fazit kann man sagen, dass MCP-1 eine sehr potente lokale Wirkung auf Kollateralarterien entfaltet, was radiologisch, immunhistochemisch und physiologisch nachgewiesen werden konnte.

**FGF (basic fibroblast growth factor): (54) (55, 56)** In einer ähnlichen Studie im Rattenligaturmodell konnte durch die Gabe von bFGF (lokal intraarterial via osmotische Minipumpe, i/v, s/c) eine deutliche Zunahme des Blutflusses im legierten Bein unter dem Einfluss von bFGF im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Hierbei wurde immer der gleiche positive Effekt von FGF unabhängig von der Art der FGF-Gabe (lokal intraarteriell, i/v, s/c) beobachtet. Interessanterweise konnte auch bei FGF-Applikation keine Veränderungen im Blutfluss im Kontrollbein gemessen werden, was erneut auf die initiierende Rolle von Shear Stress auf die Arteriogenese hinweist.

**TGF-β1 (transforming growth factor ] (57) :** TGF-β1 wird als eine spezifische proarteriogene Substanz beschrieben, die eine gewisse Ähnlichkeiten mit MCP-1 aufweist. Im Experiment mit kontinuierlicher, intraarterieller Gabe von TGF-β1 via osmotische Pumpe konnte ein deutlicher Zuwachs an rekrutierten Kollateralarterien in Radiogrammen demonstriert werden. Vermehrte Rekrutierung von Kollateralarterien wurde dabei von einem deutlich gestiegenen Blutfluß im ligierten Bein begleitet. Auch die erhöhte TGF-β1 Expression um die proliferierenden Kollateralarterien und seine positive chemotaktische Wirkung auf Monozyten/Makrophagen mit kompetitiver Überexpression von MAC-1 (Monozytenadhäsionsmolekül für EC) suggeriert uns seine Bedeutung während der Arteriogenese.

Interessanterweise besitzt TGF-β1 aber keine angiogene Potenz während der Angiogenese (Kapillarsprossung) und scheint sogar die proangiogene Wirkung von VEGF zu inhibiert.

**GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony forming cells ) (49):** GMCSF als ein antiatherogener Faktor zeichnet sich durch seine potente positive Wirkung auf Arteriogenese. Die in einer ähnlichen Studie (wie bei MCP-1, FGF, TGF-β1) führte eine lokale intraarterielle Gabe von GM-CSF zu einer erhöhten Rekrutierung von Kollateralgefäßen und einem deutlichen Anstieg der Blutflüsse im ligierten Bein. Auch prolongierende Effekte auf die Überlebenszeit von Monozyten/Makrophagen konnten demonstriert werden. Es wäre wichtig zu betonen, dass mehrere potente proarteriogene Zytokine (MCP-1, TGF-β1, GM-CSF), die den Arteriogeneseprozess stark stimulieren, auch einen starken Einfluss auf Monozyten und Makrophagen ausüben.

**VEGF (vascular endothelial growth factor ] (58) (35, 59):** Die zeitliche und räumliche Korrelation von VEGF Überexpression mit der Angiogenese während des Tumorwachstums, einer Entzündung oder Wundheilung beweist die wichtige Rolle von VEGF als eines Schlüsselregulators im Angiogeneseprozess. Hierbei wurden verschiedene VEGF-Subpopulationen und unterschiedliche VEGFR-Rzeptortypen in der Angiogenese im großen Umfang erforscht.

Die Assoziation von VEGF und Arteriogenese ist dagegen weitgehend unbekannt und wird noch kontrovers diskutiert. Die lokale intraarterielle Gabe von VEGF via osmotische Minipumpe konnte erstmal keine verstärkte Arteriogenese zeigen. Eine erhöhte VEGF-Expression in Kollateralarterien und im Muskelgewebe konnte nicht ebenfalls demonstriert werden. Auch eine erwartete Erhöhung von VEGF-Rezeptoren (Flt-1 und Flk-1) auf Endothelzellen in Kollateralarterien blieb aus.

Man muss dabei aber bedenken, dass die Angiogenese unter ischämischen Bedingungen stattfindet. Im Gegensatz hierzu erfolgt Arteriogenese unter normoxämischen Bedingungen.

**TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor)(60):** Obwohl eine Koinzidenz der TNF- $\alpha$  Expression in perivaskulären Monozyten mit der maximalen Proliferation in den Kollateralarterien demonstriert wurde, gibt es zur Zeit noch keine glaubwürdige Studie, die eine direkte stimulierende oder Inhibierende Wirkung von TNF-  $\alpha$  während der Arteriogenese demonstriert hat.

### 3) Durch Heparin (61)

Eine positive Auswirkung von Heparin auf das Kollateralarterienwachstum konnte in verschiedenen Modellen beobachtet werden. Obwohl es noch keine Beweise für eine direkte Wirkung von Heparin auf die Arteriogenese vorliegen, konnte trotzdem seine positive modulierende Wirkung auf die Arteriogenese nachgewiesen werden. Im Modell der Kardialischämie an Hunden erhöht Heparingabe die Formation von Kollateralarterien nach repetetiver Okklusion der linken Kranzarterie. Bei Patienten, die einer Kombinationstherapie (Heparingabe und Training) unterzogen wurden, stieg die Anzahl der Kollateralarterien in der angiographischen Darstellung im Vergleich zur Monotherapiegruppe (nur körperliches Training) deutlich an. Vergleichbare Effekte auf das Kollateralarterienwachstum zeigten auch niedermolekulare Heparine.

### 4) Durch Training (62):

Publizierte Meta-Analysen haben gezeigt, dass körperliche Übungen (z.B. Gehtraining) im Vergleich zu anderen Maßnahmen (medikamentöse Therapie, Unterlassen des Rauchens) die effektivste Methode ist, um Claudikatio intermitans zu verbessern und die Gehstrecke bei der Behandlung der pAVK zu verlängern. Der kompensatorische Effekt der Kollateralarterien wird von einigen Autoren aber kritisch bewertet. Obwohl im *Ruhezustand* die neuentwickelten Kollateralarterien einen annähernd gleichen Durchblutungslevel gewährleisten, zeigt sich während der *Gehebelastung* eine Demaskierung der kritischen Ischämie. In der ischämischen Extremität kommt es zu einer signifikanten Muskelatrophie und damit fällt der metabolische Soll während der Übung dementsprechend geringer aus. Auch die funktionale Belastung der Extremität wegen ihrer Schonung fällt geringer aus. Ausserdem ist der Skelettmuskel sehr ischämietolerant im Vergleich zum z.B. Myokard. Alle drei Faktoren führen zu einer inadäquaten Abschätzung des „funktionalen Gewinns“ durch Kollateralarterienentwicklung.

**Fazit:** Trotz mehrerer bekannter eindeutig proarteriogener Faktoren besitzt *MCP-1* die stärkste Wirkung auf Arteriogenese und zeigt ausserdem die potenteste chemotaktische Wirkung auf Monozyten/Makrophagen.

**Einige Probleme des Studiendesigns (63):**

1. Die Probleme der therapeutischen Arteriogenese liegen zum Teil daran, dass die meisten Arteriogenese-Studien sogenannte Single-Faktor-Studien sind. Die Arteriogenese ist aber ein komplexer Prozess, der mehreren Einflüssen unterliegt. Die genaue Einordnung der Rolle eines einzelnen Zytokins müsste man in Studien mit simultaner Gabe von mehreren Zytokinen (wie z.B. GM-CSF und MCP-1) beurteilt werden.
2. Der Effekt vieler Wachstumsfaktoren hängt ausserdem von ihrer *lokalen Konzentration im Zielorgan* ab, was auf die Bedeutung ihrer Applikation hinweist. Es wäre deswegen sehr wichtig, verschiedene Applikationsformen gegeneinander zu validieren. Hiermit könnte auch der Misserfolg einiger Studien erklärt werden.

**Adulte Vasculogenese (64) (65) (12) (10, 15, 66):**

Erkenntnisse über den Beitrag von **endothelialen Progenitorzellen** zum Gefäßwachstum während der Tumorangio-genese und damit zur Beschleunigung der Tumorprogression haben die systematische Erforschung der Rolle von Stammzellen hinsichtlich der Kontribution zum Gefäßwachstum (Angiogenese, Arteriogenese, Atherogenese) eingeleitet.

In mehreren **Ischämie-Studien** konnte eine günstige Auswirkung von endothelialen Progenitorzellen (EPCs) auf die lokale Durchblutung gezeigt werden. So konnte z.B. in einem Extremitätenischämiemodell bei Mäusen eine wesentlich schnellere Erholung der Extremitätenperfusion nach i/v Gabe von hEPCs exploriert werden.

Auch in einer anderen klassischen Arteriogenesestudie (Kardioischämiestudie durch LAD-Ligatur bei Ratten) konnte bessere LV-Funktion mit geringerer Myokardvernarbung und verstärkter Neovaskularisation (↑ Kapillardichte mit EPC-Inkorporation im Ischämiegebiet) beobachtet werden.

Endotheliale Progenitorzellen werden von einigen Autoren sogar als Ressource von endothelialen Zellen betrachtet, die im Bedarfsfall mobilisiert werden könnten. Ihre direkte Bedeutung während der Arteriogenese bleibt aber weiterhin unklar.

**Arteriogenese, MCP-1, und Monozyten/Makrophagenakkumulation:(32, 67, 68)**

Ergebnisse früherer Studien deuten daraufhin, dass zum Zeitpunkt der Proliferation von glatten Muskel- und Endothelzellen in Kollateralarterien, auch eine vermehrte Adhäsion und endotheliale Transmigration von Monozyten erfolgt.

Die vermehrte Akkumulation von Makrophagen war auf proliferierende Kollateralarterien beschränkt. Später konnte auch die Koinzidenz zwischen Endothelzellteilung und Akkumulation von Makrophagen demonstriert werden.

Eine solche Assoziation zwischen Gefäßremodeling (sowohl während der Angiogenese und der Atherogenese als auch während Arteriogenese) mit vermehrter Ansammlung von Makrophagen um die proliferierenden Gefäße, suggeriert eine essentielle Bedeutung von mononukleären Zellen im strukturellen Umbauprozess der Gefäßwand.

**Immunphenotypisierung von Monozyten/Makrophagen: (69-73)**

In mehreren Arbeiten wurde demonstriert, dass Makrophagen eine heterogene Gruppe von Zellen sind und dass sie aus verschiedenen Subpopulationen und Immunphänotypen bestehen. Für Studien zur Makrophagenakkumulation bei Ratten wurden 5 Antikörper charakterisiert. (siehe Tabelle unten)

**Tabelle 1. Charakteristika und Reaktivität von einigen Anti-Rat Makrophagen Antikörpern:**

Antikörpertyp	Isotyp	Ag-Erkennung	Zelltyp
<b>ED1</b>	IgG1	Zytoplasma	Monozyten und früh rekrutierte Makrophagen;
<b>ED2</b>	IgG2a	Zellmembran	<u>residente</u> /gewebefixierte Makrophagen
<b>KI-M2R</b>	IgA	Zellmembran	<u>residente</u> /gewebefixierte Makrophagen
<b>ED3</b>	gG2a	Zellmembran	<u>exsudative/rekrutierte</u> Makrophagen
<b>TRPM-3</b>	gG2a	Zellmembran	<u>exsudativen /rekrutierte</u> Makrophagen

**Zwei große Subpopulationen von Makrophagen (69-71, 74):**

MCP-1 führt sowohl zu einer Akkumulation von Monozyten von Makrophagen. Monozyten besitzen ausserdem die Fähigkeit, sich *in vitro* zu Makrophagen zu differenzieren. Diese zwei Beobachtungen (über Akkumulation und Transformation) veranlasste einige Arbeitsgruppen zu der Annahme, dass zumindest ein Teil der Makrophagen aus Monozyten abstammen. Daraufhin wurde versucht einen solchen „monozytären“ (exsudativen) Makrophagenanteil mit Hilfe von makrophagenspezifischen Antikörpern herauszufärben. Laut dieser Ansichten, ist es möglich mit Hilfe von **ED3/TRPM-3** Antikörpern den rekrutierten Anteil (höchstwahrscheinlich aus Blutmonozyten abstammend) mit großer Wahrscheinlichkeit zu identifizieren:

**-residente/gewebsständige** Makrophagen: positiv für ED2 / Ki-M2R (75-78)

**-exsudative/rekrutierte** Makrophagen: positiv für ED1/ED3/ TRPM3 (79-84)

Die Unterteilung von Makrophagen in exsudative und residente Phänotypen im Hinblick auf die MCP-1 Wirkung während der Arteriogenese erscheint sehr sinnvoll. Sie erlaubt uns die Hypothese der monozytenvermittelten Arteriogenese (nach MCP-1 Infusion) zu überprüfen.

Wir beabsichtigen dabei die Proliferation der Endothel- und glatten Muskelzellen in der Gefäßwand und der Akkumulation von perivaskulären Zellen zu untersuchen. (Ob diese Prozesse in Abwesenheit der Monozyten stattfinden können und ob die Monozytenpräsenz ein limitierender Schritt sein könnte).

**MCP-1-Wirkung auf Monozyten und Makrophagen :****MCP-1 und Makrophagensubpopulationen:**

Die lokale Infusion von MCP-1 via osmotische Minipumpe stimuliert einerseits die Arteriogenese in den ersten sieben Tagen. (49, 52). Andererseits ist der Zusammenhang zwischen lokaler MCP-1 Applikation/Produktion und vermehrter Akkumulation von bestimmten Makrophagensubpopulationen bekannt. (69) (70) (71) In den drei unten aufgeführten Studien wird ein kurzer Überblick über Assoziation von bestimmten Makrophagensubpopulationen und lokaler MCP-1 Applikation gegeben. Allerdings wurde dieser Zusammenhang noch nicht in Arteriogenesestudien untersucht.

1. Nach einmaliger intradermaler Applikation von MCP-1 bei Mäusen innerhalb von 7 Tagen konnte ein deutlicher Anstieg von ED-1 positiven Zellen (Monozyten) in den ersten 12 Stunden festgestellt werden. Bis zum Tag 3 waren auch ED3/TRPM3 positive Zellen (exsudative Makrophagen) deutlich angestiegen. ED2/Ki-M2R positive Zellen (residenten Makrophagen) waren bis zum Tag 7 nicht wesentlich angestiegen.

2. Die Verteilung verschiedener Subpopulationen von Makrophagen im Rattenmodell konnte auch an transplantierten Tumoren mit lokaler Überexpression von MCP-1 (9L Gliosarkom in Ratten, AD2 Mammacarcinom in Ratten) beobachtet werden. Zwei Wochen nach der Tumortransplantation konnte eine deutliche intratumorale Vermehrung von ED3/TRPM3 positiven Zellen (Anstieg von exsudativen Makrophagen) in beiden MCP-1 produzierenden Tumoren beobachtet werden. Bei ED2/Ki-M2R positiven Zellen (residenten Makrophagen) konnte nur in einem Tumortyp (AD2) ein signifikanter Anstieg festgestellt werden. Im Kontrolltumor (keine MCP-1 Produktion) wurde weder ein Anstieg von exsudativen noch von residenten Makrophagen gesehen.

3. Bei Ratten kommt es vierundzwanzig Stunden nach einer intratrachealen Instillation von Bleomycin zur Entwicklung eines „pulmonalen Traumas“ dabei wurde um die Areale mit pulmonalen Läsionen eine vermehrte MCP-1 mRNA Expression und auch eine vermehrte Akkumulation von Monozyten und exsudativen Makrophagen beobachtet. In den ersten sieben Tagen kam es zu einem rapiden Anstieg von ED3/TRPM3 Zellen (exsudative Makrophagen). Zwischen dem siebten und vierzehnten Tag konnte ein Anstieg von ED2/Ki-M2R positiven Zellen (residenten Makrophagen) festgestellt werden.

Das heißt, in diesem Modell kommt es in der Frühphase (Tag null bis sieben) überwiegend zur Infiltration von exsudativen Makrophagen und in der Spätphase (Tag sieben bis vierzehn) auch zur Infiltration von residenten Makrophagen.

In allen 3 Studien wurde eine lokale Infiltration von exsudativen Makrophagen (ED3 und TRPM-3 positive Zellen) im Zusammenhang mit lokaler der MCP-1 Wirkung gezeigt. Der maximale Anstieg der exsudativen Makrophagen fand schon am dritten Tag statt.

In weiteren Experimenten war auch ein deutlicher Anstieg von residenten Makrophagen (ED2 und Ki-M2R positive Zellen) festzustellen. Dieser fand aber überwiegend in der Spätphase (Tag sieben bis vierzehn) statt.

In der ersten Studie (mit intradermaler MCP-1 Injektion) wurde nur die Frühphase (ersten sieben Tage) untersucht. Vielleicht konnte deswegen der Anstieg residenter Makrophagen, die zwischen siebtem und vierztem Tag stattfindet, nicht beobachtet werden.

Obwohl eine Akkumulation von Monozyten/Makrophagen während einer normalen Arteriogenese bekannt ist, bleibt es weitgehend offen, welche Immunphänotypen von Makrophagen überwiegend in der Arteriogenese involviert sind.

Außerdem wäre es von Bedeutung die Frage zu beantworten, ob sich die schon bekannte proarteriogene MCP-1 Wirkung auf Arteriogenese auch auf bestimmte Immunphänotypen von Makrophagen zurückführen lässt.

#### **MCP-1 Aktiviert Makrophagen (50, 85, 86):**

MCP-1 scheint nicht nur chemotaktisch auf Monozyten und Makrophagen zu wirken, sondern auch eine aktivierende Wirkung auf Makrophagen zu besitzen.

#### **Das perivaskuläre Kompartiment ist wichtig für die Arteriogenese (32) (42).**

Die Bedeutung des perivaskulären Kompartiments für den Prozess der Arteriogenese wird aus folgenden mit der Arteriogenese assoziierten Prozessen evident:

1. Im perivaskulären Raum findet eine vermehrte Akkumulation von Monozyten und Makrophagen statt.
2. Es zeigt sich auch eine vermehrte Fibroblastenteilung und eine deutlich angestiegene adventitielle proteolytische Aktivität in Form einer erhöhten Expression des MMPs zwei und neun, was zur Degradation von Elastin und anderen Komponenten der Extrazellulärmatrix führt.

**Initiation der Monozyten/Makrophagenmigration (87):**

Die Migration der Monozyten und Makrophagen, die schon nach drei bis sechs Stunden erfolgen kann, ist ein Komplex der zeitlich aufeinander abgestimmten Prozesse. Am Beispiel der **Reperfusion nach der Myokardischämie** wurde demonstriert, dass in der Rekrutierung von mononukleären Zellen mehrere chemotaktische Faktoren eine wichtige Rolle spielen: C5a, TGF- $\beta$ 1, MCP-1.

In der **ersten Stunde** nach der Reperfusion kam es zu einer signifikanten Erhöhung der Monozyten und Neutrophilen. Diese Migration wurde in der ersten Stunde durch die Wirkung des Komplementes **C5a** moduliert. (C5a hat einen starken, aber kurzfristigen chemotaktischen Effekt auf die Monozyten- und Neutrophilenmigration). In der **zweiten und dritten Stunde** nach der Myokardreperfusion wird ein anderes Zytokin - der **TGF- $\beta$ 1** (chemotaktisch für Granulozyten und Monozyten) exprimiert. Erst **drei bis sechs Stunden** nach der Reperfusion des Myokards erscheint der dritte für Monozyten chemotaktisch wirkende Faktor **MCP-1**.

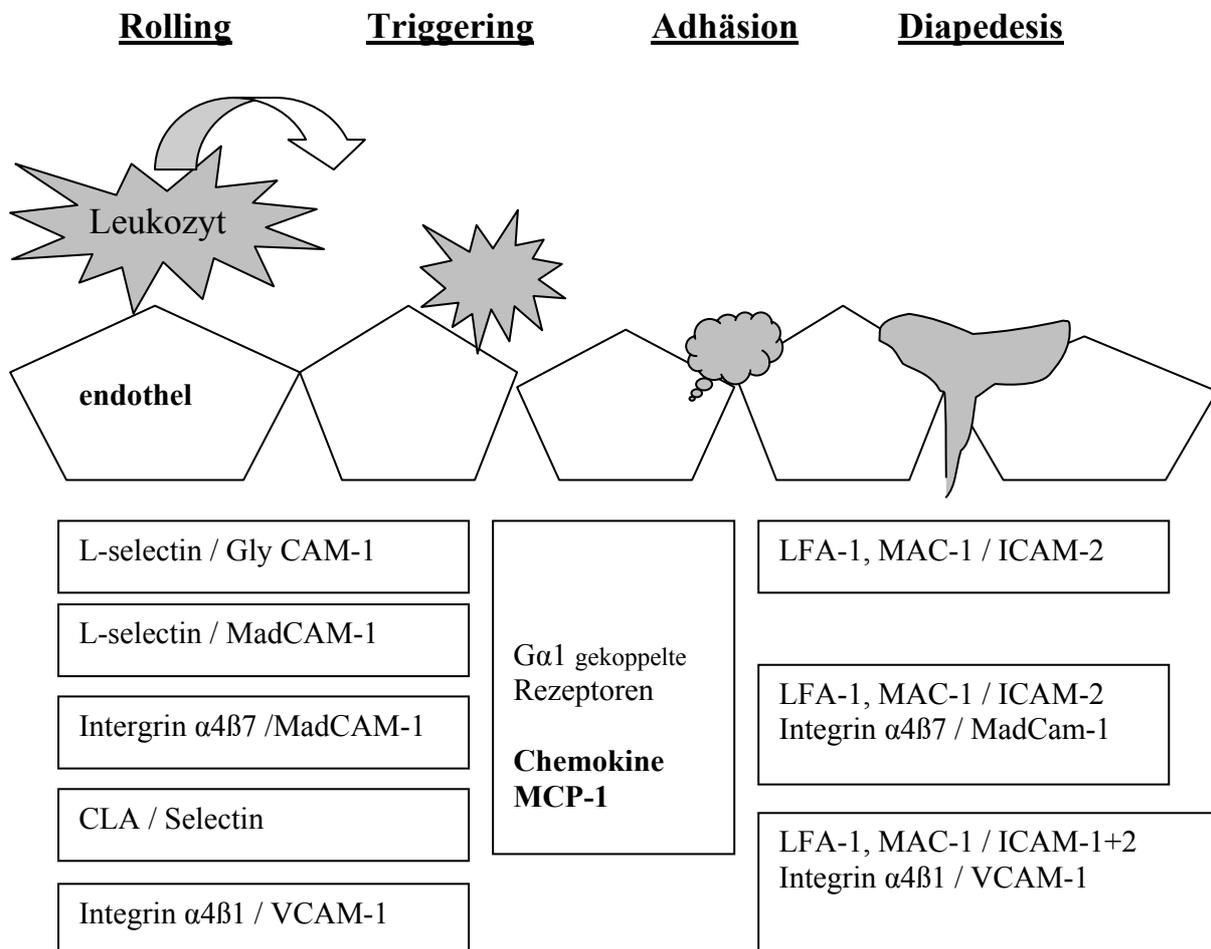
In dieser Studie wurde gezeigt, dass die Initiation der kontinuierlichen Monozytenmigration durch eine Kaskade von verschiedenen aufeinander abgestimmten Faktoren moduliert wird. Der Mechanismus der Zellrekrutierung wurde speziell bei der Arteriogenese noch nicht untersucht.

### Rekrutierung der Leukozyten: (88-90)

Der Remodelingsprozess der Kollateralen (Teilung der Endothelzellen und glatten Muskelzellen) steht im zeitlichen Zusammenhang mit einer vermehrten Akkumulation von aus dem Blut rekrutierten Leukozyten (speziell von Monozyten).

Unten ist der allgemeine Mechanismus der Rekrutierung von Blutzellen dargestellt, welcher mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Arteriogenese übertragen werden kann.

Die Rekrutierung von Leukozyten aus der Blutbahn erfolgt in mehreren aufeinander abgestimmten Schritten:



**Abb. 6.:** Schematische Darstellung der vier Phasen der Leukozyten-Rekrutierung: Rolling, Triggering, Adhäsion und Diapedesis mit entsprechender Beteiligung von Adhäsionsmolekülen: Selektine, Integrine, CAMs (Kästchen in der unteren Hälfte).

Im ersten Schritt kommt es zu einer lockeren Interaktion zwischen den Adhäsionsmolekülen der Leukozyten und ihren Liganden auf den Endothelzellen, was zum Rolling und Verlangsamung der Leukozyten in der Blutbahn führt. Das erlaubt den auf den Endothelzellen präsenten Chemokinen die leukozytären Chemokinrezeptoren zu binden, was zu einer Aktivierung von leukozytären Integrinen führt. Die aktivierten Integrine binden dann an ihre respektive Liganden auf den Endothelzellen, was zum Arrest der Leukozyten und dann auch zur transendothelialen Diapedese führt. In dieser Kaskade ist jeder Schritt ist von den vorherigen Schritten abhängig. Deswegen erlaubt nur eine bestimmte **Kombination von endothelealen/leukozyteren Chemokinrezeptoren** und Zelladhäsionsmolekülen eine Adhäsion und transendotheliale Migration von Leukozyten.

### Monozytenrekrutierung:

**1. via Adhäsionsmoleküle auf den Endothelzellen und Monozyten (32, 44, 91-95):** Die Monozytenrekrutierung erfolgt in den obenbeschriebenen Schritten: Rolling, Triggering, Adhäsion, Diapedesis. Die Schubspannung scheint die Regulation von Adhäsionsmolekülen zu beeinflussen. Die ist in mehreren Studien gezeigt worden. Diskrepanzen bestehen allerdings darin, ob eine höhere oder niedrige Schubspannung zur Hochregulation der Adhäsionsmoleküle führt. In einer Arbeit konnte gezeigt werden, dass Monozyten eher unter niedriger als unter hoher Schubspannung rekrutiert werden. Während in einer anderen Arbeit (Scholz et al) gezeigt werden konnte, dass ICAM in wachsenden Kollateralarterien hochreguliert wird. Zu den Faktoren, die zur Monozytenrekrutierung beitragen können, gehören vier Gruppen von Adhäsionsmolekülen: CAMs, Selektine, Integrine, Cadherine.

**-CAMs: ICAM-1.** Eine vermehrte Expression von ICAM-1 auf den Endothelzellen der Kollateralarterien während der Arteriogenese steht im zeitlichen Zusammenhang mit der vermehrten Monozytenakkumulation und ihrer endothelialen Adhäsion. In *in vitro* Experimenten wurde schon nach vier bis sechs Stunden Schubkrafteinwirkung (Initiator der Arteriogenese) eine vermehrte ICAM-1 Expression auf den Endothelzellen gesehen. Im Folgenden wurde die Expression von ICAM-1 jedoch wieder herunterreguliert unter das konstitutiv vorhandene Maß. In mehreren Studien wurde auch eine positive Korrelation zwischen MCP-1 Hochregulierung und vermehrter Expression von leukozytären Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1, Selektine) bei unterschiedlichen pathologischen Prozessen (Atherosklerose, arterieller Hypertonus, KHK) beobachtet. Allerdings muss die direkte Rolle von MCP-1 auf die Expression von leukozytären Adhäsionsmolekülen während der Arteriogenese noch untersucht werden.

**-Selektine:** *P-Selektin, L-Selektin, E-Selektin.* Die Beteiligung von Selektinen an der Monozytenadhäsion konnte ebenfalls dokumentiert werden. Der Beitrag von verschiedenen Selektinsubpopulationen wird noch kontrovers diskutiert und unterschiedlich bewertet. Es scheint aber so zu sein, dass L-Selektin die größte Rolle spielt. In Studien mit blockierenden Antikörper wurde auch der Beitrag von P-Selectin evident. E-Selectin alleine scheint keine eigenständige Wirkung auf die Monozytakkumulation zu haben, aber es ist in der Lage die Wirkung von P-Selektin zu potenzieren.

**-Integrine:**  *$\beta 1$  bis  $\beta 8$*  und *-Cadherine* scheinen auch eine Rolle in der Rekrutierungskaskade zu spielen. Ihre Rolle in der Monozytenrekrutierung wird noch kontrovers diskutiert.

**2. via CCR2 Rezeptor: (96) (97) (98) (46)** Eine weitere Rolle spielen: MCP-1 und der CCR-2-Rezeptor, der hauptsächlich auf Monozyten exprimiert wird. Die Rolle des MCP-1 Rezeptors in der Monozytenakkumulation wurde z.B. in Studien mit blockierenden Antikörpern gegen CCR-2 (MCP-1 Rezeptor) Rezeptor in Mäusen festgestellt. Dabei zeigte sich eine signifikant geringere Monozytenakkumulation in atherosklerotischen Plaques in der Aorta. Auch in *in vitro* Studien konnte eine verminderten Monozytenchemotaxis nach der Blockade des CCR-2 Rezeptors demonstriert werden.

**-NO (23):** Ein wichtiger Gegenregulator der Monozytenrekrutierung ist NO. Die chronische Blockade der endothelialen NO-Synthese nach Gabe von L-NAME induziert entzündliche Veränderungen im Gefäß in Form von MCP-1 Überexpression und monozytären Infiltration.

**Transformation von Monozyten zu Makrophagen: (74):**

In *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass es während der Transformation von Monozyten zu Gewebemakrophagen zur Abschwächung der CCR-2 m-RNA Synthese in Monozyten und damit zur verminderten CCR-2-Rezeptorexpression kommt. Daraus resultiert zwangsläufig eine abgeschwächte chemotaktische MCP-1 Wirkung auf reifende Makrophagen. Interessant ist, dass die biologische Antwort von reifenden Makrophagen auf MCP-1 (an ionisierten Ca gemessen) trotzdem ansteigt.

Im Prozess der Transformation von Monozyten zu Makrophagen vermindert sich die Expression des CCR-2 Rezeptors und die chemotaktische Antwort von Makrophagen auf MCP-1 Gabe. Gleichzeitig steigt die MCP-1 Sezernierung durch Makrophagen und ihre Empfindlichkeit MCP-1 gegenüber an.

Im dritten Teil unserer Studie versuchten wir mit Hilfe von chemischer Knochenmarkdepletion die Frage zu beantworten, ob die gleiche Transformation von Monozyten zu Makrophagen auch während der Arteriogenese stattfindet.

**Makrophagenakkumulation und Adhäsionsmoleküle (43, 44, 99, 100):**

Es gibt mehrere Studien, die darauf hinweisen, dass auch die Makrophagenakkumulation durch Hochregulation von Adhäsionsmolekülen beeinflusst wird.

Im Falle der Tumorangiogenese konnte eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1, P-Selektin) mit einer erhöhten Makrophagenakkumulation festgestellt werden, was auf eine mögliche Rolle der Adhäsionsmoleküle bei der Rekrutierung von Makrophagen schließen lässt.

Auch im Model der renalen Hypertension bei Ratten wurde eine positive Korrelation zwischen der erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen und verstärkter Migration von Monozyten/Makrophagen beobachtet. Interessanterweise wurde dabei eine breite Distribution der Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1) nicht nur in Gefäßen (Intima, Adventitia), sondern auch im perivaskulären Kompartiment gesehen.

Eine selektive Blockade von  $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptoren auf den glatten Muskelzellen im Atherosklerosemodell bei Kaninchen konnte zu einer verminderten Rekrutierung von Makrophagen im Plaquebereich führen.

Auch die CCR-2 Rezeptor Expression korreliert positiv mit der Akkumulation von Makrophagen in der Arterienwand.

### 3. Zytokine / MCP-1 (96)

#### Zytokine:

Zytokine werden als extrazelluläre lösliche Proteine mit Mediatorfunktionen beschrieben, die von verschiedenen Zellen während einer Entzündung, Immunantwort, Zelldifferenzierung usw. produziert und sezerniert werden.

Einige dieser Zytokine spielen auch als Signalmoleküle auf der Zelloberfläche eine Rolle. Diese Proteine modulieren Interaktionen zwischen einzelnen Zellen und regulieren Prozesse in der extrazellulären Matrix.

#### Zytokine und Wachstumsfaktoren:

Der ursprünglich verwendete Begriff der Zytokine wurde eingeführt, um die Gruppe der immunmodulierenden Proteine (sogenannte Immunmodulatoren wie Lymphokine, Interleukine, Monokine und CSF) von sog. Wachstumsfaktoren abzugrenzen, die eine modulierende Wirkung auf die Proliferation von nichtimmunkompetentes Gewebe ausüben. Solche strikte Unterscheidung zwischen Modulation von immunen und nichtimmunen Prozessen erscheint heute nicht mehr sinnvoll.

Es sind mehr als hundert Zytokine bekannt. Obwohl die physikalischen Eigenschaften der Zytokine variieren, sind sie alle Proteine. Ein wichtiges Merkmal von Zytokinen ist, dass sie normalerweise nicht kontinuierlich produziert werden, sondern als Antwort auf einen Stimulus gebildet werden. Typischerweise liegt ihre Produktionsdauer unter normalen Bedingungen zwischen einigen Stunden und einigen Tagen. Unter pathologischen Bedingungen ist eine prolongierte Zytokinproduktion möglich.

Eine andere Schlüsseleigenschaft der Zytokine ist, dass sie biologisch sehr potent sind. Das heißt, dass sie ihre Wirkung in sehr geringen Konzentrationen entfalten ( $10^{-10}$  bis  $10^{-13}$  mol/L). Dies erklärt sich durch die sehr hohe Affinität der Zytokine zu ihren Rezeptoren. Dabei wird für die Signaltransduktion nur eine geringe Konzentration von Zytokinen und eine minimale Rezeptorbesetzung der Zelloberfläche (unter 10%) benötigt.

Eine Klassifikation von Zytokinen schließt **Interferone, Interleukine, Chemokine, Haematopoetine** und andere Wachstumsfaktoren ein.

<b>Unterschied zu Hormonen: (96)</b>
--------------------------------------

Obwohl Zytokine einige gemeinsame Eigenschaften (potentes Signal in geringen Konzentrationen, homologe Rezeptoren) mit Hormonen haben, gibt es auch einige Unterschiede zwischen Hormonen und Zytokinen:

<u>Zytokine</u>	<u>Hormone</u>
<b>mehr <u>lokale</u> Wirkung auf benachbarte Zellen</b>	<b>Zielorgan ist weit entfernt</b>
<b>ubiquitäre Zellproduktion</b>	<b>Produktion nur in spezialisierten/glandulären Zellen</b>
<b>häufig inaktiv in Plasma/Serum</b>	<b>bioaktiv im Serum/Plasma</b>
<b>breites Zellspektrum</b>	<b>enges Zellspektrum</b>

Zytokine werden in verschiedene Familien gruppiert. Die Klassifikation basiert auf identischen oder ähnlichen Funktionen, die von Zytokinen einer Gruppe geteilt werden.

BCDF (B-cell differentiation factors ), BCGF (B-cell growth factors ), mitogenic cytokines , chemotactic cytokines , CSF (colony stimulating factors ), angiogenesis factors, or TRF (T-cell replacing factors ).

**Physiologie von MCP-1 (96, 101)**

Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) ist ein Mitglied der CC Chemokinfamilie, das 1983 entdeckt worden ist. Die MCP-Gruppe schließt 5 Mitglieder ein: MCP 1-5.

Alle MCP Homologen sind niedermolekulare Proteine und binden an den **CCR-2 Rezeptor**. MCP 2, 3, 5 binden außerdem auch an den CCR3 Rezeptor auf den Eosinophilen.

MCP-1, wie auch andere Zytokine, wird ubiquitär von mehreren Zellarten produziert:

- Fibroblasten - Endothelzellen - glatten Muskelzellen – Monozyten/Makrophagen
- Keratinozyten - Synovial Zellen - Pneumozyten - Mesangialzellen - Astrozyten

Basierend auf Daten aus Versuchen mit knockout Mäusen geht man davon aus, dass die primäre biologische Funktion von MCP-1 von der chemotaktischen Wirkung auf Monozyten in inflammatorischen Arealen abhängt. Dieses Zytokin ist in der Lage Chemotaxis, Aktivation und Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen unter Flussbedingungen zu triggern und damit die Extravasation von Monozyten zu fördern. Obwohl es mehrere Phänotypen von MCP gibt, zeigt MCP-1 die stärkste chemotaktische Wirkung und die stärksten proangiogenen Eigenschaften. MCP-1 entfaltet seine Wirkung über einen spezifischen Rezeptor (CCR2-Rezeptor), der hauptsächlich auf Monozyten exprimiert wird. Aufgrund der Tatsache, dass die Mehrheit der Zytokine ihre biologische Wirkung im Gewebe und nicht im Blutplasma entfaltet, ist die Plasmabestimmung nur für wenige Zytokine möglich. Bis jetzt ist es nur bei menschlichen Probanden gelungen den MCP-1 Plasmaspiegel zu bestimmen. Unter normalen Bedingungen im Tiermodell gelingen MCP-1 Plasmamessungen nur sporadisch. Der MCP-1 Plasmaspiegel bei gesunden menschlichen Probanden scheint altersabhängig und z.T. auch geschlechtsabhängig zu sein. Mit zunehmendem Alter steigt der Plasmaspiegel von MCP-1 an. Bei Männern ist der Plasmaspiegel etwas höher als bei gesunden Frauen. Unter pathologischen Bedingungen steigt der Plasmaspiegel für MCP-1 um das Vielfache.

**Faktoren, die zu einer ↓↑ Expression von MCP-1 RNA führen (96) :**

1. **physiologische Auslöser**: shear stress (102)
2. **Ischämie** (103, 104)
3. **Eine Reihe von Chemokinen und Toxinen**: PDGF; IL-1; TNFalpha, LPS; cholera toxin (96)
4. **Homocystein** (105)
5. **freie Radikale** (106)

<b>CCR-2-Rezeptor (96) (107-109) (110, 111)</b>
---

MCPs       $\longrightarrow$       CCR-2-Rezeptor

Durch CCR-2 Rezeptoren (CCR-2A und CCR-2B) wird die Migration unterschiedlicher Zellen (vor allem Monozyten) als Antwort auf die MCP-1 Stimulation vermittelt. Alle MCPs reagieren mit den CCR-2 Rezeptoren. MCP-2, 3, 4 reagieren außerdem auch mit CCR3 Rezeptoren. Die MCP-1-Isoform scheint eine hohe Affinität nur zum CCR-2 Rezeptor zu haben. Die biologische Funktion von zwei Isoformen der CCR-2 Rezeptoren (CCR-2a und CCR-2b) wurde noch nicht geklärt.

Zu den Zellen, die positiv auf einen chemotaktischen Stimulus durch den CCR-2 Rezeptor reagieren gehören: -Monozyten-Makrophagen, T und B Lymphozyten, NK-Zellen, dendritische Zellen, Basophile, Eosinophile und Mastzellen.

Eine CCR-2 mRNA Expression wurde auch in Endothelzellen unter entzündlichen Bedingungen, in glatten Muskelzellen, in pulmonalen Fibroblasten und in Astrozyten gezeigt. Die CCR-2 mRNA-Expression wurde ausserdem auch in mehreren Organen nachgewiesen: Lungen, Nieren, Herz, Knochenmark, Milz und Thymus. Die Antwort einer Zelle auf MCP kann vom Differenzierungsgrad und Aktivierung durch andere Zytokine abhängen, was sich auf die Expression von CCR-2-Rezeptoren auf der Zelloberfläche auswirkt. So exprimieren z.B. periphere T-Lymphozyten keinen CCR-2-Rezeptor im Ruhezustand. Nur nach der Stimulation durch IL-2 kommt es zu seiner Expression.

In der Tabelle unten sind einige Faktoren aufgeführt, die einen Einfluss auf die CCR-2-Rezeptor Expression auf der Zelloberfläche und damit auf die Empfindlichkeit gegenüber MCP-1 haben.

<b>CCR-2 Hochregulierung durch:</b>	<b>CCR-2 Runterregulierung durch:</b>
IL2	LPS
IL4, 15	TNF- $\alpha$
Dexametason bei Monozyten	TCR und anti-CD3-Ab
LDL	HDL
INF $\gamma$	Aber auch INF $\gamma$

**Vaskuläre Prozesse und CCR-2 Expression (110-113)**

Aus verschiedenen *in vivo* und *in vitro* Studien wissen wir, dass alle in die Arteriogenese involvierte Zelltypen, den CCR2 Rezeptor exprimieren können. Dazu gehören Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Monozyten und Makrophagen. Dies erlaubt uns die logische Schlußfolgerung, dass alle diese Zellen als Zielgewebe für MCP-1 dienen können.

Durch *In vitro* Studien konnte der positive chemotaktische Einfluss von MCP-1 auf Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Monozyten und Makrophagen demonstriert werden. Praktisch alle an der Arteriogenese beteiligte Zelltypen zeigen eine deutliche Reaktion auf MCP-1. Von besonderem Interesse für unsere Studie ist die Fähigkeit von MCP-1 Makrophagen und Monozyten zu aktivieren.

Experimente mit CCR-2 defizienten Mäusen zeigten einen Defekt in der Rekrutierung von Makrophagen in die Arterienwand nach Ballon-Trauma. Damit war auch eine verminderte Neointimaformation verbunden. Solche Experimente demonstrieren die wichtige Rolle von CCR-2 Rezeptoren als vereinigendes Element in der Modulation der Umbauprozesse in der Arterienwand.

Oben erwähnte CCR-2 rezeptorvermittelte Phänomene in verschiedenen vaskulären Modellen kann man mit gewisser Vorsicht auf den Prozess der Arteriogenese übertragen. Allerdings muss die CCR-2 Rezeptorexpression speziell während der Arteriogenese noch untersucht werden.

MCP-1 spielt in mehreren pathologischen **vaskulären, entzündlichen, prokoagulatorischen** und **malignen** Prozessen eine wichtige Rolle. Unten sind Beispiele für eine solche Beteiligung aufgeführt.

### 1. MCP-1 in pathologischen vaskulären Prozessen (50)

MCP-1 Beteiligung an vaskulären Prozesse beruht auf:

1. **chemotaktischer Wirkung auf Monozyten/Makrophagen**
2. **proliferationsfördernder Wirkung**
3. **prokoagulatorischer Wirkung**

### MCP-1 als Atherosklerosemediator: (114) (50) (113) (115) (116)

#### a) MCP-1 Expression und Hypercholesterinämie verstärken die Plaqueentwicklung.

Mäuse mit Überexpression von MCP-1 zeigten eine dreifache Lipideinlagerung in atherosclerotischen Plaques in die Aorta. LDL und MCP-1 defiziente Mäuse zeigten 83% weniger Lipiddisposition im Vergleich zu LDL defizienten Mäusen mit normaler MCP-1 Produktion. In einem anderen Tierexperiment (Schweinemodell) wurde parallel zur Reduktion von Cholesterinspiegel auch eine deutliche Reduktion der MCP-1-Expression und der CCR-2 Rezeptoren in der Aorta bzw. anderen Arterien (Carotiden, Art. femoralis) festgestellt. Mit der verminderten Expression von MCP-1 und seines CCR-2 Rezeptors in der Aorta und in den Arterien war auch eine deutlich reduzierte Neointimabildung und Rekrutierung von Monozyten/Makrophagen verbunden. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in Experimenten mit MCP-1 Gentransfektion bei hypercholesterinämischen Kaninchen gezeigt. Nach der Gentransfektion im Zusammenhang mit Hypercholesterinämie konnte die Entwicklung von atherosclerotischen Plaques in den Carotiden eines Kaninchens beobachtet werden. Bei Kontrolltieren führen die Transfektion oder Hypercholesterinämie alleine zu keiner Plaqueentwicklung.

#### b) CCR2 Rezeptor- Blockade reduziert Plaqueentwicklung.

Nach der Blockade des MCP-1 spezifischen Rezeptors zeigten apoE defiziente Mäuse dreimal weniger atherosclerotische Läsionen in der Aorta im Vergleich zu apoE defizienten Mäusen ohne CCR2 Blockierung.

**c) Östrogene reduzieren die MCP-1 Expression und die Plaqueentwicklung:**

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Östrogene unter anderem zu einer verminderten Expression von MCP-1 und seines CCR2 Rezeptors bei gleichzeitiger Reduktion des LDL-Cholesterins führen. Dabei werden auch makrophagale Akkumulation, Lipidablagerungen und des Wachstum von atherosklerotischen Plaques reduziert.

**MCP-1 korreliert mit Restenoseraten nach Angioplastie (48, 117-119):**

Entzündliche Veränderungen mit Infiltration von Monozyten/Makrophagen in die Arterienwand werden als Hauptursache eines frühen Restenoseprozesses nach einer Angioplastie oder Stentimplantation angesehen. Interaktion zwischen MCP-1 mit seinen CCR-2 Rezeptoren scheint eine zentrale Rolle in diesem Prozess zu spielen.

Auch die Koinzidenz zwischen MCP-1 Anstieg im Blut und Restenosen nach einer Stentimplantation ist evident. MCP-1 Plasmaspiegel bei Patienten mit einer Restenose war 48 Stunden und 6 Monate nach Stentimplantation deutlich erhöht. Dieser Befund suggeriert, dass erhöhte MCP-1 Produktion mit einem höheren Restenoserisiko verbunden ist.

Die zentrale Rolle von MCP-1 in der Restenose konnte auch in Experimenten nach Transfektion eines mutanten MCP-1 Gens im Kaninchenmodell demonstriert werden, wobei nach Ballon-Trauma der Carotiden eine verminderte Monozyten/Makrophagen Infiltration in die Arterienwand und eine verminderte Neointimabildung zu beobachten waren.

Genauso wie bei der Atherosklerose spielen frühentzündlichen Vorgänge mit begleitender Monozyten/Makrophagen Infiltration in die Gefäßwand auch bei einer frühen Restenose eine zentrale Rolle.

**MCP-1 und arterieller Hypertonus: (120)**

Bei Patienten mit arteriellem Hypertonus steigt der MCP-1-Plasmaspiegel ebenfalls an. Wenn der Hypertonus mit einer Hypercholesterinämie assoziiert war, lag der Blutspiegel für MCP-1 noch höher. Interessanterweise waren auch Blutspiegel für lösliche Adhäsionsmoleküle für Monozyten und Endothelzellen (ICAM-1, VCAM) erhöht.

**MCP-1, ACE-Aktivität und Angiotensin (121) (122):**

Die Gabe von ACE-Hemmern führte zur Reduktion des MCP-1 Plasmaspiegels, Senkung der prokoagulatorischen Aktivität ( $\downarrow$ tissue factor,  $\downarrow$ TFPI) und Verminderung der Akkumulation/Aktivierung von Monozyten/Makrophagen bei Patienten mit Myokardinfarkt.

Im Kaninchenmodell (mit induzierter Hypercholesterinämie) war die Blockade des AT-1 Rezeptors (mit Losartan) mit einer verminderten MCP-1 Expression in der Aorta mit konsekutiver Minderung der Neointimabildung verbunden.

**Propagermanium als Gegenspieler von MCP-1: (123)**

Propagermanium ist ein Medikament, das in Japan zur Behandlung einer chronischen Hepatitis eingesetzt wird. Dieses Medikament blockiert die CCR-2 Rezeptor vermittelte Effekte von MCP-1 mit konsekutiver Reduzierung der Monozyten/Makrophagen Infiltration. Nach der Gabe von Propagermanium entwickelten Apolipoprotein E knockout Mäuse während einer hypercholesterinämischer Diät signifikant weniger atherosclerotische Plaque in der Aorta als ohne Medikamenteinnahme. Die begleitenden Monozyten/Makrophagen-Infiltration in Plaqueregionen war ebenfalls signifikant niedriger in der behandelten Gruppe. Diese Erkenntnisse machen Propagermanium für die medikamentöse Prävention der Atherosklerose interessant.

**2. MCP-1 fördert die Hyperkoaguabilität und Entzündung:**

Entzündung und Hyperkoaguabilität sind häufig zwei miteinander verbundene Prozesse. Die positive Korrelation zwischen MCP-1, als ein ausgesprochen proentzündlicher Faktor, und die Erhöhung von prokoagulatorischen Parameter/Faktoren wurden in mehreren Studien (*in vivo* und *in vitro*) beobachtet. MCP-1 induziert Tissue Faktor (TF) (124) (125). TF (tissue factor) ist ein Initiator der Gerinnung und wird an mehreren Orten exprimiert: im atherosklerotischen Plaque, in Makrophagen und glatten Muskelzellen. TF-Exposition während der Plaqueruptur führt zu einer Thrombose und z.B. zu einem Herzinfarkt oder Insult. MCP-1 ist in der Lage die TF Produktion zu induzieren und die TF-Aktivität in glatten Muskelzellen zu erhöhen. Erhöhter MCP-1 Plasmaspiegel ist ausserdem mit Venenthrombosen assoziiert (126). Interessant ist auch der Fakt, dass die Thrombusbildung mit einer lokalen MCP-1 Produktion im thrombotischen Material und in der angrenzenden Gefäßwand assoziiert ist. (127). Die Präsenz von Antiphospholipid-Antikörper (APL-AK) ist mit einem erhöhten Risiko einer Thrombose oder Embolie assoziiert. Es konnte gezeigt werden, dass der APL-AK auch zu einer vermehrten MCP-1 Produktion in den Endothelzellen führen kann (128).

Auch die Beteiligung des MCP-1 an mehreren inflammatorischen Prozessen wie zum Beispiel Asthma bronchiale (129), Arthritis (130), Glomerulonephritis/diabetische Nephropatie (131, 132), mehreren autoimmunen Prozessen (133) (134) (135) wurde in mehreren Studien demonstriert.

Von großem Interesse ist die Assoziation von erhöhten MCP-1 Plasmaspiegel mit kardiovaskulären Ereignissen wie arteriellem Hypertonus, Herzinfarkt und Angina Pectoris(136) (47)

CC- Chemokine können auch auf das Wachstum der Tumore einen großen Einfluss haben (137). Überexpression von MCP-1 in Tumoren führte zu einer Suppression des Tumorwachstums *in vivo*. Dieser Effekt ist offensichtlich auf die vermehrte Akkumulation von Makrophagen und T-Lymphozyten zurückzuführen.

In einer japanischen Studie an vierhundertfünf gesunden Probanden wurde die Abhängigkeit des MCP-1 Plasmaspiegels vom Alter und Geschlecht untersucht (108). Es stellte sich heraus, dass mit fortgeschrittenem Alter auch der MCP-1 Blutspiegel deutlich anstieg. Der Plasmaspiegel war dabei in männlichen Probanden höher, jedoch statistisch nicht signifikant erhöht.

# 1. Einleitung

## 4. Ziele der Arbeit:

MCP-1 ist wie zuvor beschrieben der stärkste bisher bekannte proarteriogenetische Faktor.

Ziel dieser dreiteiligen Arbeit ist die Untersuchung der Mechanismen der MCP-1 vermittelten Arteriogenese, insbesondere im Hinblick auf die Rolle zirkulierender Zellen beim Kollateralwachstum. Zu diesem Zweck wurden drei Fragestellungen bearbeitet:

### Teil 1 ► Welchen Einfluss hat MCP-1 auf die Makrophagen während des Kollateralarterienwachstum?

Im ersten Teil der Arbeit wurden die vaskulären und perivaskuläre Phänomene der spontanen und MCP-1 vermittelten Arteriogenese eine Woche nach der Ligatur der Magistralarterie dargestellt und quantifiziert. Besonderer Wert wurde dabei auf radiologische und histologische Quantifizierung sowohl von **vaskulären** als auch **perivaskulären** Prozessen gelegt.

Im Hinblick auf die MCP-1 Wirkung wurde quantitativ beurteilt: die Anzahl der Kollateralarterien, die Proliferation der Gefäßwand und die zelluläre Zusammensetzung des perivaskulären Infiltrates.

### Teil 2 ► Wie verhält sich die Makrophagenakkumulation zum Ausmaß der Proliferation?

Im zweiten Teil der Arbeit verglichen wir die Proliferationskinetik in der Kollateralarterienwand mit der Kinetik der Akkumulation verschiedener Makrophagensubpopulationen. Während der ersten Woche nach der Okklusion, um die indirekt Aufschlüsse über die Rolle der verschiedenen Makrophagensubpopulationen bei der Gefäßproliferation zu erhalten.

### Teil 3 ► Welche Rolle spielen zirkulierende Zellen bei der Arteriogenese?

Im dritten Teil der Studie haben wir mit Hilfe einer medikamentösen Depletion des Knochenmarks die Rolle von blutzirkulierenden Zellen (und speziell Monozyten) während der Arteriogenese untersucht.

## 2. Material und Methoden

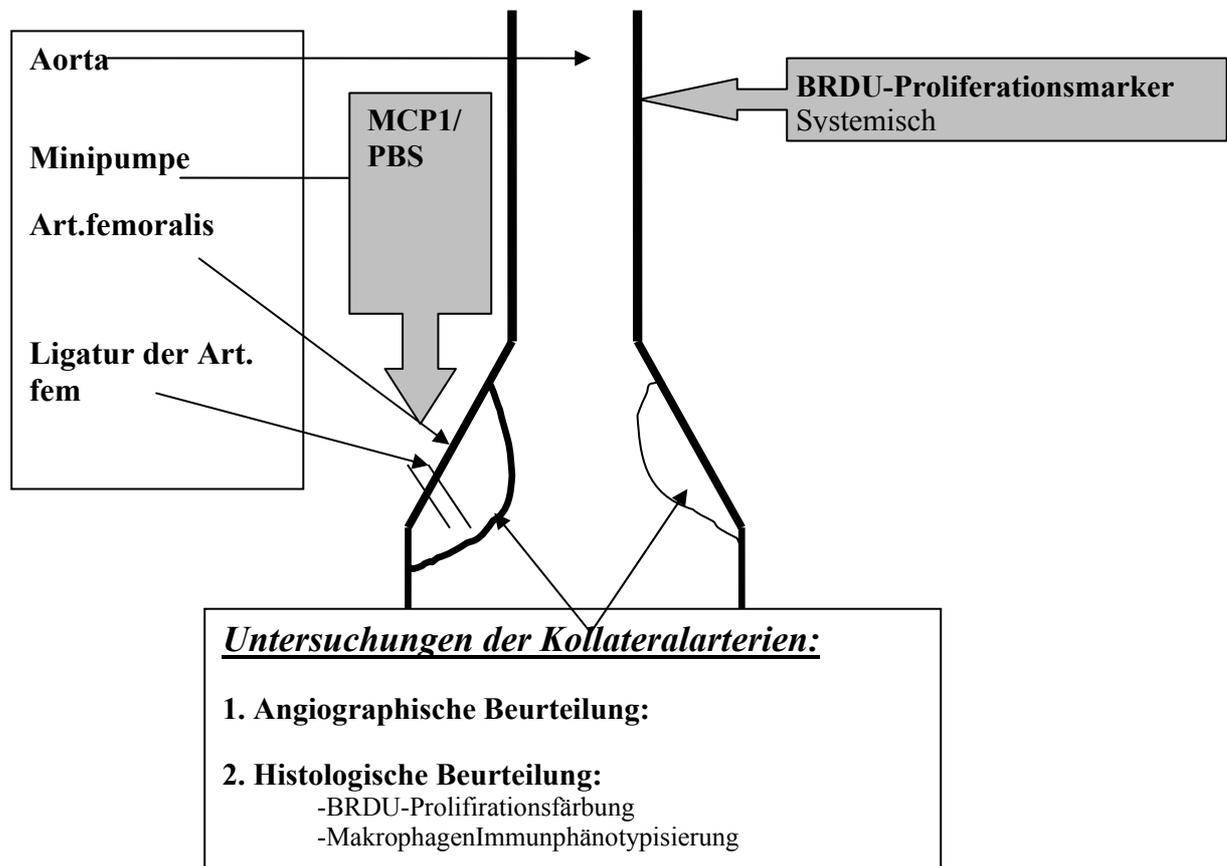
## 2. Material und Methoden:

### 1. Tiermodell und Studiendesign:

Tiermodell: Für unsere Experimente verwendeten wir ein Extremitätenischämie-Modell bei Ratten. Durch Ligatur der Arteria femoralis und lokale intraarterielle Infusion von MCP-1 bzw. PBS wurde das Kollateralwachstum induziert. Die Gabe von MCP-1 bzw. PBS erfolgte dann nach Katheterisierung der Art. femoralis.

#### Vier Argumente haben uns zur Auswahl von Experimentdesign und Tiermodell verholfen:

1. hohe Kompensationspotenz der Kollateralarterien der unteren Extremitäten
2. kein Ausfall von Vitalfunktionen nach Ligatur von Arteria femoralis
3. Möglichkeit die Arteriogenese in der Frühphase zu studieren,
4. Minimalinvasiver Eingriff



**Abb. 7.:** Dieses Schema stellt das Experiment-Design dar. Im linken Kästchen sind relevante anatomische Strukturen gezeigt. Das graue Pfeilkästchen links demonstriert die Mini-Pumpe für die lokale i/a Infusion von MCP-1 oder PBS. Das graue Pfeilkästchen rechts demonstriert BRDU-Minipumpe, die subkutan implantiert wurde. Das untere Kästchen gibt Auskunft über die Untersuchungen an Kollateralarterien (Pfeile) des legierten und des Kontrollbeins.

## 2. Material und Methoden:

### 2. Beschreibung des Experimentes:

Zunächst wurde die Arteriogenese durch eine monolaterale Ligatur der Arteria femoralis induziert. Dabei wurde neben der Arteria femoralis auch der Hautast ligiert, der die Femoralarterie drainiert. Jedes der Tiere bekam 2 osmotische Minipumpen. Eine der beiden Minipumpen beinhaltet die proarteriogene Substanz MCP-1 oder PBS als eine inerte Substanz als Kontrolle. Die in der osmotischen Minipumpe befindlichen Substanzen (proarteriogenes MCP-1 oder sein inertes Äquivalent PBS) wurden retrograd proximal der Ligatur der Arteria femoralis kontinuierlich infundiert. Auf diese Weise passierten MCP-1 oder PBS antegrad die präexistenten Kollateralarterien des ligierten Beines. Durch den Fluss der Substanzen kam es zu einem direkten Kontakt der zu untersuchenden Substanzen mit der Endothelzellschicht der Kollateralarterien. Dabei fanden in der Gefäßwand und im perivaskulären Gewebe morphologische Veränderungen statt, die in der zweiten Phase untersucht wurden.

Die zweite Pumpe, die ins Nackenfell implantiert wurde, beinhaltete als Thymidinanaloga BRDU als Proliferationsmarker. Diese Substanz wird in die DNA proliferierender Zellen integriert, was die mikroskopische (immunfluoreszenz) Identifizierung ermöglicht. Mit Hilfe von BRDU markierte Zellen wurden im ligierten und Kontrollbein quantifiziert.

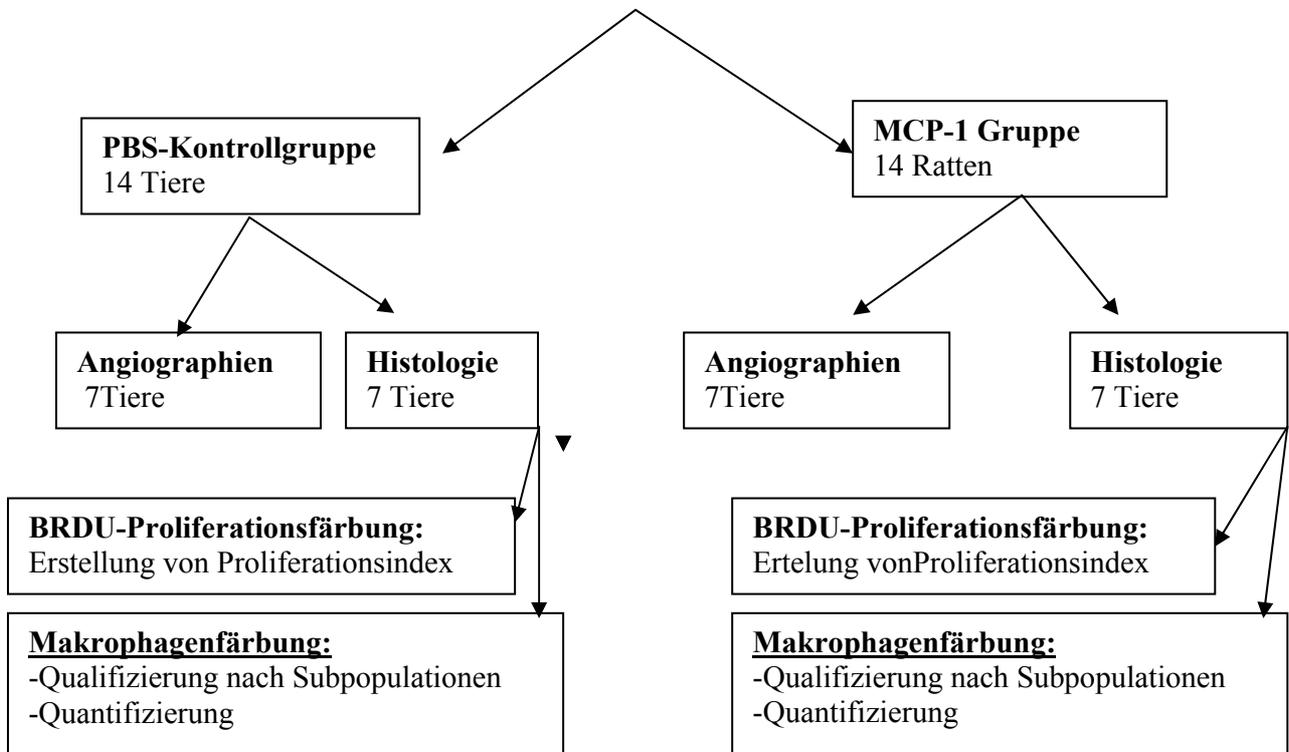
Nach Abschluß des Beobachtungszeitraumes von 7 Tagen wurden die Kollateralarterien auf der ligierten Seite und der kontralateralen Seite (Kontrolle) histologisch und radiologisch beurteilt. Radiologisch wurde die Anzahl neurekrutierter Kollateralarterien im ligierten gegen Kontrollbein nach intraarterieller MCP-1 oder PBS Infusion bestimmt. Histologisch wurde die Proliferation in der Gefäßwand quantifiziert, wobei BRDU-markierte Zellen in Verhältnis zur Gesamtzellenanzahl gesetzt wurden. Der daraus errechnete Proliferationsquotient erlaubte Aussage über Einfluss von MCP-1 auf die Proliferation. Außerdem wurde das zelluläre Infiltrat um die Kollateralarterien phänotypisiert und quantifiziert, wobei die ligierte Seite mit nichtligierter Seite als Kontrolle verglichen wurde.

Zur Behandlung der dritten Fragestellung der Arbeit, die sich mit der Erfassung der Rolle der Blutzellen (speziell Monozyten) auf die Arteriogenese befasste, wurde vor der eigentlichen Induktion der Arteriogenese das Knochenmark chemisch (Zyklophosphamid) depletiert, was zu einer Aplasie vor dem Experiment führt. Nach der Induktion der Arteriogenese wurden die Kollateralarterien und ihr perivaskuläres Gewebe untersucht.

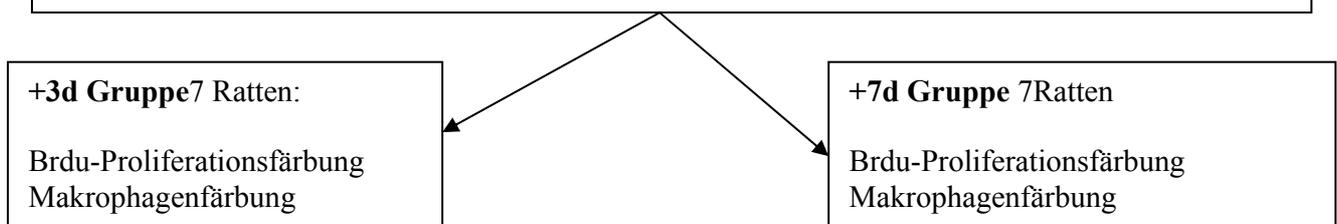
## 2. Material und Methoden:

### 3. Schema des Experimentes

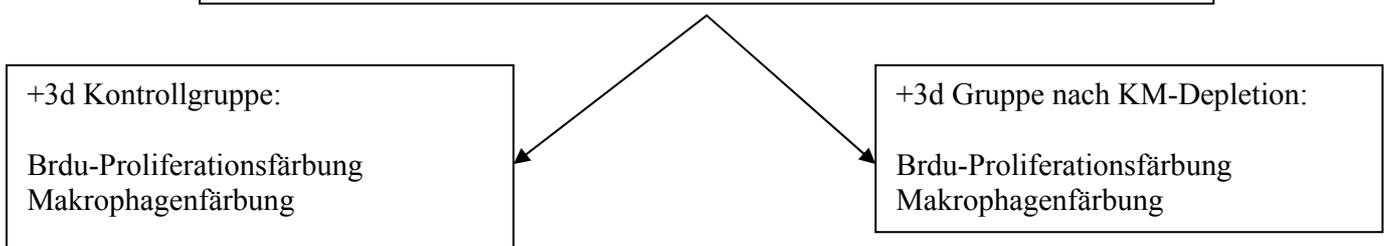
#### Teil 1: Einfluß von MCP-1 7 Tage nach Femoralarterienligatur



#### Teil 2: Makrophagenkinetik +3Tage versus +7 Tage nach der Femoralarterienligatur



#### Teil 3: Einfluß von zirkulierenden Zellen auf die Arteiogenese



## 2. Material und Methoden:

### 4. Beschreibung einzelner Gruppen

**Teil 1: Quantifizierung der Wirkung von MCP-1 auf Arteriogenese:** Um den Einfluss von MCP-1 auf Arteriogenese zu reproduzieren und zum ersten Mal morphologisch zu quantifizieren wurden eine Kontroll- und eine Referenzgruppen verwendet.

1. In der ersten Gruppe (Kontrollgruppe) wurde bei 14 Tieren nach der Ligatur und Katheterisierung der Arteria femoralis die Kollateralarterien mit PBS via einer osmotischen 2 ml Minipumpe (2ML-2; Alza Corp, Palo Alto, CA) für die Dauer 7 Tage direkt perfundiert. Zur Markierung von geteilten Zellen der Kollateralarterienwand wurde BRDU als Proliferationsmarker durch eine osmotische 2 ml Minipumpe (Proliferationsmarker; BrdU, Sigma Chemical Co., St.Louis, MO) systemisch verabreicht. Im zweiten Schritt (sieben Tage nach der Ligatur) wurde die Hälfte der Tiere aus der ersten Gruppe (7 Ratten) angiographisch und die andere Hälfte (7 Ratten) histologisch (BRDU-Priliferationsfärbung und Makrophagenfärbung nach Subpopulationen) untersucht.

2. Auch in der zweiten Gruppe wurden bei 14 Tieren nach der Ligatur und Katheterisierung der Arteria femoralis die Kollateralarterien mit MCP-1 (1µg Recombinant Rat MCP-1 auf 2,2 ml 1fach PBS) durch eine osmotische 2 ml Minipumpe (2ML-2; Alza Corp, Palo Alto, CA) für die Dauer von 7 Tagen direkt perfundiert. Genauso wie in der ersten Gruppe wurden die proliferierenden Zellen mittels BRDU-Infusion (Proliferationsmarker) durch eine osmotische Minipumpe markiert. In der zweiten Gruppe (genauso wie in der ersten) wurden 7 Ratten einer angiographischen und 7 Ratten einer histologischen Evaluation (BRDU-Priliferationsfärbung und Makrophagenfärbung nach Subpopulationen) unterzogen.

**Teil 2: Makrophagenkinetik.** Da die maximale Proliferationsgeschwindigkeit in der Kollateralarterienwand im Rattenmodell schon 3 Tage nach der akuten Okklusion der Arteria femoralis erreicht wird, war es für uns wichtig, die Assoziation der Proliferationskinetik in der Kollateralarterienwand mit der Kinetik der perivaskulären Zellakkumulation zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden 7 Ratten einer dreitägigen Ligatur und Katheterisierung der Arteria femoralis mit kontinuierlicher Perfusion der Kollateralarterien mit inertem Stoff (PBS) via eine osmotische 2 ml Minipumpe (2ML-2; Alza Corp, Palo Alto, CA) unterzogen. Als Kontrollgruppe wurden Tiere 7 Tage nach der Ligatur und kontinuierlicher Perfusion der Kollateralarterien mit PBS verwendet. Zur Untersuchung der Makrophagenkinetik wurden die Ergebnisse in 3 Tage Gruppe mit denen in der 7 Tage Gruppe verglichen. Um die proliferierten Zellen der Kollateralarterienwand zu markieren, wurde BRDU als Proliferationsmarker durch eine osmotische 2 ml Minipumpe (Proliferationsmarker; BrdU, Sigma Chemical Co., St.Louis, MO) systemisch verabreicht.

## 2. Material und Methoden:

Im zweiten Schritt (3 Tage nach Ligatur und Katheterisierung der Arteria femoralis) wurden Kollateralarterien des ligierten und Kontrollbeines nach der Aorten Katheterisierung und Kontrastmittelfüllung des Gefäßsystems der unteren Extremitäten entnommen. Der Proliferationsindex der Kollateralarterien und Quantität verschiedener Makrophagensubpopulationen wurden histologisch ermittelt.

### **Teil 3: Einfluss von zirkulierenden Zellen auf Arteriogenese**

Zur Behandlung der Frage nach dem Einfluss von Monozyten auf Arteriogenese, haben wir 7 Ratten vor der Induktion der Arteriogenese chemisch mit 120mg/kg KG Zyklophosphamid (Zeitschema: -5d 80mg/kgKG i/v -3d 40mg/kgKG i/v) knochenmarkdepletiert. Zur Feststellung der Knochenmarkdepletion wurde am Tag -5, am Tag 0 (Tag der Okklusion der Arteria femoralis) und am Tag +3 (Experimentende) aus dem Plexus retrobulbaris 0.4 ml in pädiatrische EDTA-Röhrchen Blut entnommen. Die Gesamtleukozytenzahl wurde maschinell (ADVIA 120) bestimmt. Zur Differenzierung einzelner Leukozytensubpopulationen wurde Ausstriche angefertigt, die dann lichtmikroskopisch ausgewertet wurden. Die prozentuellen Anteile einzelner Leukozytensubpopulationen (auf 100 Zellen) wurden dann auf die absolute Leukozytenzahl übertragen.

Das tierexperimentelle Prozedere entspricht den vorausgegangenen Experimenten. Zu diesem Zweck wurden 7 Ratten einer dreitägigen Ligatur und Katheterisierung der Arteria femoralis mit kontinuierlicher Perfusion der Kollateralarterien mit inertem Stoff (PBS) durch eine osmotische 2 ml Minipumpe (2ML-2; Alza Corp, Palo Alto, CA) unterzogen. Als Kontrollgruppe wurden Tiere ohne Knochenmarkdepletion 3 Tage nach der Ligatur und kontinuierlicher Perfusion der Kollateralarterien mit PBS verwendet. Im zweiten Schritt (3 Tage nach der Ligatur und Katheterisierung der Arteria femoralis) wurden Kollateralarterien des ligierten und Kontrollbeines nach der Aortakatheterisierung und Kontrastmittelfüllung des Gefäßsystems der unteren Extremitäten entnommen.

Die Bestimmung des BRDU-Proliferationsindex der Kollateralarterienwand und parallele Quantifizierung verschiedener perivaskulärer Makrophagensubpopulationen wurden histologisch vorgenommen und mit der Leukozytenzahl im Blut in Korrelation gebracht.

## 2. Material und Methoden:

### 5. Vorbereitung osmotischer Minipumpen:

Jedes Tier in dieser Arbeit hat je 2 osmotische Minipumpen implantiert bekommen. Eine der beiden Minipumpen beinhaltete Inerte Substanz (PBS) oder MCP-1 als Referenzsubstanz. Diese Minipumpe wurde subkutan und infraabdominell implantiert. Das an die Minipumpe angeschlossene Kathetersystem war mit einem Ende mit der Minipumpe verbunden und das zweite Ende, das später retrograd in das Gefäßsystem implantiert wurde, war mit einer 3 ml Spritze verbunden. Die andere osmotische Minipumpe beinhaltete das im alkalischen Puffer gelöste BRDU und wurde ins Nackenfell implantiert.

#### Verwendete Substanzen:

Die Füllung von 2 ml osmotischen Minipumpen (2ML-2; Alza Corp, Palo Alto, CA) erfolgte mit einer speziellen Metalnadel (in Lieferungsschachtel mitgeliefert) und 3 ml Spritzen mit folgenden Wirkstoffen:

**1. BrdU** (Proliferationsmarker): 68 mg BrdU-Pulver wurde in 3 ml eines 0.5 Molaren BrdU-Puffers mit PH 9.8 aufgelöst. Anschließend wurde die Minipumpe mit 2.2 ml des gelösten BRDU gefüllt.

Rezept vom 200 ml 0.5 Molaren BrdU-Puffer mit PH 9.8: 8.2 Gramm NaHCO<sub>3</sub> (Molargewicht 8.2) wurde in 170 ml Aqua dest. gegeben – PH mit Natronlauge auf PH 9.8 einstellt – auffüllt mit Aqua dest bis 200 ml Marke

**2. MCP-1** (proarteriogener Zytokin): 1 µl Recombinant Rat-MCP-1 (Serotec) wurde in 3 ml einfach PBS aufgelöst. Anschließend erfolgte die Füllung der Pumpen und des daran angeschlossenen Katheters mit aufgelöstem MCP-1.

**3. PBS (1 x fach):** (inertter Wirkstoff für die Kontrollgruppen): Die Minipumpe wurde mit 2.2 ml einfach PBS gefüllt.

Nach der Füllung der Minipumpen mit dem jeweiligen Wirkstoff, erfolgte ihre Überführung in eine mit 0.9% NaCl gefüllte 50/250 ml Falkonflasche. Anschließend erfolgte die vorgeschriebene Inkubation der Minipumpen bei 37 Grad im Wasserbad für 5-6 Stunden.

**Wirkungsprinzip der osmotischen Minipumpen:** Durch das Quellen von der Gelatinmembran im Inneren der Minipumpe kommt es zum kontinuierlichen Verdrängen des Pumpeninhalts. Die verdrängte Flüssigkeit (enthält BRDU, MCP-1, PBS) wird durch das ableitende System ins Gewebe oder in das Gefäßsystem durch ein ableitendes Schlauchsystem geführt.

## 2. Material und Methoden:

### 6. Narkose:

Alle Tiere wurden einheitlich narkotisiert. Zu diesem Zweck wurden zur Narkoseeinleitung Ether (30-90 Sec. Im Ethertopf) verwendet. Die Narkose wurde durch die intraperitoneale Gabe eines Gemischs aus Ketamin und Rompun (in einer 1 ml Mischspritze i/p 0.5 ml vom 10% Ketamin / Ketanest + 0.1 ml vom 2% Rompun / Xylazin (Muskelrelaxanz/Sedativum) fortgeführt. Alle Tiere haben zusätzlich zur Thromboseprophylaxe in der Arteria femoralis 0.2 ml Liquemin subkutan erhalten.

Es besteht eine relativ breite Empfindlichkeit gegenüber Ketamin/Rompun i/p Narkose, die sich nicht allein durch das Gewicht des einzelnen Tieres erklären lässt. Stressfaktoren und allgemeines Wohlbefinden (gestört durch z.B. Medikamentengabe) haben auch einen großen Einfluss auf Verlauf der Narkose. Aus diesem Grund wurde die i/p Gabe von 10% Ketamin je 0.2-0.4 ml Schritten alle 7-10 min solange fortgesetzt, bis das Tier sich tief in der Narkose befand und auf Schmerzreize (Zusammendrücken der Hinterpfote ) nicht mehr reagierte. Bei einzelnen Tieren war auch eine intraoperative Gabe von 0.2 ml Ketamin in Einzelschritten (bis zur Gesamtmenge 1 ml) notwendig.

**Postoperativ** erhielten die Tiere mit dem Trinkwasser für 24 Stunden ein Schmerzmittel (Novamin sulfon 150 Tropfen auf 750 ml Trinkwasser).

### 7. Operativer Teil:

Der operative Teil bestand prinzipiell aus zwei Phasen. In der ersten Phase wurde die Arteriogenese induziert und in der zweiten wurden die Kollateralarterien nach Kontrastmittelfüllung entnommen oder für die angiographische Darstellung verwendet.

#### Operative Phase 1: Induktion der Arteriogenese

In der ersten Phase wurden zwei Operationseingriffe durchgeführt. Zuerst wurde eine Minipumpe mit MCP-1/PBS subkutan im Abdomenbereich implantiert. Das daran angeschlossene Kathtersystem wurde nach der Ligatur der Arteria femoralis mit einem Ende retrograd ins Lumen der Femoralarterie eingeführt, was eine kontinuierliche Perfusion der Kollateralarterien mit Substanzen aus der Minipumpe (MCP-1/PBS) ermöglichte. Die zweite Minipumpe, die den Proliferationsmarker BRDU enthielt, wurde anschließend ins Nackenfell implantiert.

## 2. Material und Methoden:

### **OP-1. Arteria femoralis Ligatur/ Katheterisierung und Minipumpenimplantation:**

Die OP wurde in stabiler Rückenlage mit Fixierung aller 4 Pfoten durchgeführt. Der Hautschnitt erfolgte auf der medialen Seite des rechten Oberschenkels parallel der Arterie und Vene femoralis. Danach wurde die Präparation, Ligatur und Durchtrennung des Hautastes (enthält venöses und arterielles Gefäß und verbindet Arteria femoralis mit Arterie Iliaca interna) im inguinalen Fettgewebe vorgenommen. Im darauf folgenden Schritt erfolgte die Präparation und Umschlingung der Arteria femoralis mit 2 Fäden. Als nächstes wurde eine subkutane Pumpen-Tasche re. abdominal für die Platzierung der Minipumpe schräg nach links präpariert. Die Minipumpe wurde nach der Einführung in die subkutan präparierte Pumpentasche, mit einer transkutanen Naht stabilisiert.

Die aus dem Gefäßbündel präparierte Arteria femoralis wurde einmal ligiert und nach der Präparation der kleinen Öffnung proximal der ersten Ligatur nach proximal katheterisiert. Dabei wurde das distale Ende des an die Minipumpe angeschlossenen Kathetersystems nach der Einführung in das Lumen der Arteria femoralis mit der zweiten Ligatur fixiert. Anschließend erfolgte der Wundverschluss mit Einzelknopfnähten (5/0 Resolon Faden)/ oder Wundklammern.

### **OP-2. BrdU-Minipumpenimplantation ins Nackenfell :**

Dreht nach der OP-1 erfolgte der zweite Eingriff mit Implantation der BRDU-Minipumpe ins Nackenfell, die während der Ligaturzeit kontinuierlich BRDU ins Gewebe sezernierte und damit die sich teilenden Zellen markierte. Nach der Rasur und Desinfektion der Nackenhaut wurde ein 4 cm Querschnitt gemacht.

Anschließend wurde für die Minipumpe eine subkutane Pumpentasche nach kaudal (zum Schwanz) präpariert. Die 2ml Minipumpe wurde in die Tasche eingeführt und die Wunde mit einem 5/0 Resolonfaden mit Einzelknopfnähten verschlossen.

Der zeitliche Aufwand für die beiden Operationen der ersten Phase betrug im Durchschnitt ~20 Minuten.

## 2. Material und Methoden:

### Zweite Phase: radiologische Darstellung oder histologische Entnahme der Kollateralarterien

#### OP-3. Kontrastierung des Gefäßsystems der unteren Extremitäten – Angiographien /

**Probeentnahme:** Nach der Fixierung der Ratte in stabiler Rückenlage wurde das Abdomen mit einem linksseitigen longitudinalen Schnitt eröffnet. Daraufhin erfolgte die stumpfe Präparation der Aorta mit proximaler Aortenligatur und distaler Aortenkatheterisierung mit einem 0.9 mm dicken Plastikkatheter, der an eine 0.85 mm dicke Kanüle angeschlossen ist. Nach der Aortenkatheterisierung wurde die Vena Cava inferior eingeschnitten, wodurch das Tier entblutete. Durch den in die Aorta eingeführten Katheter wurde das Gefäßsystem vom Blut mit Ringer-Lösung 3-5 min unter 120-160 mmHg Druck gespült ( bis aus der eingeschnittenen Vena Cava blutfreie Flüssigkeit herausströmt ) und anschließend mit Kontrastmittel (45 Gramm Barium Sulfat und 10 Gramm Gelatine auf 100 ml Aqua dest.) unter 240-260 mmHG Druck) gefüllt. Zur besseren Füllung des arteriellen Systems mit Kontrastmittel wurde die Ratte ins warme Wasserbad (40-45 Grad) für 5-10 Minuten überführt. Damit wurde eine bessere Verteilung des Kontrastmittels in den Gefäßen erreicht. Nach der Kontrastierung der Arterien wird das Tier aus dem Wasserbad für 45 min auf Eis gelegt, was die Erhärtung des Kontrastmittels in den Gefäßen herbeiführte. Nach der Aushärtung des Kontrastmittels im Gefäßsystem der unteren Extremitäten wurden die Kollateralarterien entweder radiologisch dargestellt oder in konstanter Lokalisation für die histologische Aufarbeitung (BRDU-Proliferationsfärbung und Makrophagenfärbung) entnommen.

#### **Post mortem Angiographien:**

Sieben Tage nach Femoralarterienligatur mit lokaler intraarterieller Perfusion der Kollateralarterien mit MCP-1 oder PBS wurde das arterielle Gefäßsystem der Unteren Extremitäten angiographisch qualitativ und quantitativ beurteilt. Zu diesem Zweck wurde die Ratte nach der Kontrastmittelfüllung der Gefäße und 30 minütiger Lagerung der Ratte auf Eis (OP-3) aus dem Eiskasten in eine Plastikschiene mit Gelatinelösung (60 Gramm Gelatine auf 1000 ml Leitungswasser) überführt. Die Plastikschiene mit der Ratte (in noch flüssiger Gelatine) wurde bei -10 Grad 30-45 min bis zur Erstarrung der Gelatinelösung gelagert. Dabei kam es zur Bildung einer glatten Gelatinoberfläche, von der die Röntgenstrahlen gleichmäßig abstrahlen. Für die dreidimensionale Arteriendarstellung wurden zwei Aufnahmen im 45 Grad Winkel ( Röntgen-Kammer Faxitron X-Ray Model 43855D; Kodak Röntgen-Filmtaschen X-OMAT MA Film 13 x 18 cm; Einstellungen: 33-36 KV 6 min) angefertigt. Die Auswertung (Auszählung der sichtbaren Kollateralarterien) erfolgte anschließend 3-dimensional unter dem Stereoskop. MCP-1 und PBS Gruppen wurden dabei miteinander verglichen.

## 2. Material und Methoden:

### 8. Immunhistologische Aufarbeitung:

#### Gewebepräparation:

Nach der Kontrastierung der Kollateralarterien der unteren Extremitäten und Lagerung der Ratte auf Eis (OP-3) erfolgte eine Präparation der Kollateralarterien und Fixierung histologischer Proben in Hexan/Stickstoff.

Als erstes wurde die Haut beider unteren Extremitäten vom Muskelgewebe abpräpariert und die Adduktoren auf Kniegelenkebene durchtrennt. Dabei wurde das distale Segment der Kollateralarterie im Kniefettgewebe (Orientierungspunkt) freigelegt und fixiert. Anschließend wurde die gesamte Oberschenkelmuskulatur (mit der Kollateralarterie) von Femorknochen und von Beckenknochen abgetrennt. Orientierend am Kniesegment der Kollaterale wurde dann die gesamte Kollateralarterie mit 0.3 mm Muskelgewebe um das Kollateralgefäß (Muskel dient als Stützgewebe für das Gefäß) herum abpräpariert. Histologische Proben wurden auf Korkplättchen fixiert und mit Tissue tec komplett bedeckt. Die Fixierung der Proben erfolgte im tiefgekühlten Hexan (Gefäß mit Hexan befindet sich dann in einem Behälter mit Stickstoff) 20 sec. lang. (bis Tissue tec weiß wird). Auf diese Weise fixierte Gewebeproben bis zur ihren histologischen Aufarbeitung im Tiefkühlschrank bei -80 Grad gelagert.

#### Anfertigung der Gefrierschnitte am Frigocut und ihre Fixierung:

Anfertigung von 7µm dicken Gefrierschnitten und ihre Übertragung auf Objektträger (SuperFrost Plus) erfolgte in einem Frigocut (Frigocut N 2800) bei minus 26 Grad.

1. Fixierung für BrdU-Immunfluoreszenzfärbung (138) : Gefrierschnitte wurden in Ethanol/Glycin Lösung mit PH 2.0 für 30 min bei -20 Grad fixiert. (70 ml Ethanol + 30 ml 50 mM Glycin-Puffer. Mit HCL auf PH 2.0 einstellen)

2. Fixierung für Monozyten/Makrophagen Immunhistologische Färbung: im eiskalten Aceton 5-7 min bei minus 20 Grad fixiert im Kühlschrank .

Bis zur Färbung wurden die fixierten Gefrierschnitte bei minus 80 Grad im Tiefkühlschrank aufbewahrt.

## 2. Material und Methoden:

### Immunhistologische Aufarbeitung:

#### Erstantikörper:

Zur Untersuchung der Proliferation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen der Gefäßwand der zu untersuchenden Kllateralarterie haben wir einen *Anti-BrdU-Ak* (anti -BrdU Kit 2 in Verdünnung 1:10) als Proliferationsmarker ausgewählt.

Für die Rolle der perivaskulären Monozyten und Makrophagen, deren vermehrte Akkumulation während einer normalen und MCP-1 stimulierter Arteriogenese in früheren Studien beobachtet wurde, haben wir folgende Anti-rat macrophages monoclonal antibodies verwendet:

-Mous-Anti-Rat-ED-1; ED-2; ED-3 (Serotec; Oxford; UK) Konzentration 1:100

-Mous-Anti-Rat-Ki-M2R (Peninsula Laboratories, Inc.) Konzentration 1:100

-Mous-Anti-Rat-TRPM-3 (Reseach Diagnostics Inc.) Konzentration 1:100

#### Zweitantikörper:

a) Gam-CY (leuchtet grün) für BrdU-Immunhistologische Färbung und

b) peroxidase markierten Gout Anti-Mous-AK, (Gam-PO) für Immunhistologische Färbung von Monozyten/Makrophagen ausgewählt.

## 2. Material und Methoden:

### BRDU – Immunfluoreszenz – Färbungsprotokoll:

#### **Folgende Reagenzien wurden verwendet:**

PBS-Lösung: PBS 10 fach: NaCL 80 Gramm (Merck) +KCL 2 Gramm (Merck) +KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2Gramm (Merck) +Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 Gramm (Merck) + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7.63 Gramm (Merck) bis zu einem Liter mit Aqua dest auffüllen; Die 10fach PBS-Lösung wird mit Aqua dest. 1:10 verdünnt.

1% BSA/PBS-Lösung

Erstantikörper aus dem BrdU-Kit 2 (Flasche 4) (Roche)

Zweitantikörper GAM-CY (Dianova)

Propidium Jodid Stock-Lösung

Medium zu Eindeckeln

Einbetungsmedium für Kryoschitte

Ethanol (Merck)

Glycin (Sigma)

10% BSA

Propidium Jodid-Stocklösung

Medium zum Eindeckeln/ Deckgläser

#### **BrdU-Färbe-Protokoll:**

1. **Fixierung**: Die Fixierung der Gefrierschnitte (Ziel ist die Denaturierung der DNA) erfolgte über 30 min bei -20 Grad in 50 mM Ethanol/Glycin Lösung: (70 ML Ethanol pur + 30 ML vom 50mM Glycin-Puffer.(380 mg Glycin-Pulver auf 100 ML Aqua dest)
2. **Rehydratation der Schnitte**: Die Rehydratation der Schnitte 3 Mal je 5 Min in 1fach PBS
3. **Blocken**: Das Blocken der Schnitte erfolgte über 30 min in einer Feuchteammer bei 37 Grad/Brutschrank mit 1%BSA/PBS.
4. **Inkubation mit dem Erstantikörper**: Die Inkubation mit dem Erstantikörper (anti-BrdU Antikörper in der Konzentration 1:10) erfolgte für 30 min bei 37 Grad im Brutschrank. Das Lösungsmedium für den Erstantikörper enthält spezifische Nukleasen, die nach Ethanol-Fixierung die DNA denaturieren und BRDU dadurch zugänglich machen)
5. **Waschen**: Anschließend wurden die Schnitte 3 mal je 5 Min in 1fach PBS gewaschen
6. **Inkubation mit dem Zweitantikörper**: Die Inkubation mit dem Zweitantikörper Gam-Cy (leuchtet grün) in Konzentration 1:200, Verdünnungsmedium: 1%BSA/PBS (der Blocker aus dem Schritt 3) für 60 min bei 37 Grad im Brutschrank.
7. **Waschen**: anschließend wurden die Schnitte 3 Mal je 5 Min in PBS gewaschen

## 2. Material und Methoden:

8. **Kernfärbung**: Die Kernfärbung erfolgte mit Propidium Jodid 15 min bei 37 Grad. Propidium Jodid in Konzentration 1:100. Verdünnungsmedium-PBS
9. **Waschen**: anschließend wurden die Schnitte 3 Mal je 5 Min in PBS gewaschen
10. **Eindeckelt** wurde mit einer Mischung aus Moviol und PPD: 15µl pro 1 Schnitt dann mit dem Deckglas abgedeckt und mit Nagellack umrandt.
11. Danach wurden die Schnitte eine Stunde bei +4 Grad in Kühlschrank(eine Art Dunkelkammer) zum Trocknen gelegt.
12. Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenz-Mikroskop abwechselnd mit dem rotem und grünen Filter.

## Immunhistologische Aufarbeitung:

### Indirekte Immunoperoxidase Färbung:

#### **Reagenzien:**

Eibettungsmedium für Kryoschitte: Tissue tec (Sakura)

Aceton (Merck)

**PBS 10 fach**: NaCL 80 Gramm (Merck) +KCL 2 Gramm (Merck) +KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2Gramm (Merck) +Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 Gramm (Merck) + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7.63 Gramm (Merck) bis zu einem Liter mit Aqua dest auffüllen;

**1% Gelatine**: 1 Gramm Gelatine (Sigma Typ A) auf 100 ml 1fach PBS und auf 60 Grad erhitzen

**Tween 20**: 40 ml von Tween 80 (Merck) + 40 ml Aqua dest

**Lösung A 1000 ml**: 100 ml PBS + 20 ml 1% Gelatine + 1 ml Tween 20 + auf 1000 ml mit Aqua dest auffüllen

**Primärantikörper**: monoklonaler mous anti rat Antikörper: ED1 (Serotec), ED2 (Serotec), ED3 (Serotec), Ki-M2R (BMA), TRPM-3 (Peninsula Laboratories); **Sekundärer Antikörper**: Gam-PO (Dianova)

Natrium Acetat (Merck)

Dimethylformamid AEC-Stocklösung (Sigma)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck)

Färbelösung (Sigma)

EDTA (Sigma)

Mayer's Hemalaun (Merck)

Objektträger Superfrost (Menzel-Gläser)

Deckgläser (Marienfeld)

## 2. Material und Methoden:

### Färbungsprotokoll:

1. Acetonfixierte Gefrierschnitte wurden in Lösung A 15 min rehydriert.
2. Der entsprechende Erstantikörper (ED1, ED2, Ki-M2R, ED3, TRPM-3) wurden in Verdünnung 1:100, (Verdünnungsmedium. Lösung A) aufpepitiert und 90 min bei Raumtemperatur inkubiert.
3. Die Schnitte wurden anschließend in Lösung A 3 mal je 5 min gewaschen.
4. Der Zweitantikörper (Gam-Po) wurde in Verdünnung 1:500 (Verdünnungsmedium-Lösung A) aufpepitiert und 90 min lang inkubiert.
5. Die Schnitte wurden anschließend in Lösung A 3 mal je 5 min gewaschen.
6. Die Schnitte wurden in die mit Natrium Acetat gefüllte Stechküvette für 3 min überführt.
7. anschließend erfolgte eine Inkubation mit Färbelösung in dunkler feuchter Kammer für 7-10 min. Positive Färbereaktion zeigt sich in der leichten Braunfärbung der Schnitte. Zusammensetzung der Färbelösung: 5 ml Natrium Acetat + 250 µl AEC Stammlösung + 2 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
8. Die Färbung wurde mittels der EDTA-Lösung (Stechküvette) in 5 min gestoppt.
9. Schnitte wurden in 1xfachem PBS für 5 min gespült.
10. Die Kernfärbung erfolgte mit Mayers Hemalaun für 12 Sekunden.
11. Schnitte wurden in eine Küvette mit Leitungswasser überführt und vorsichtig mit fließendem Leitungswasser gewässert.
12. Eindeckelt wurde mit DAKO Faramount Einbettungsmedium.
13. Die Schnitte wurden 1 Stunde bei Raumtemperatur getrocknet.

## 2. Material und Methoden:

### 9. Zytostatika-Behandlung und Depletionskontrolle

Für die Untersuchung der Rolle von blutzirkulierenden Zellen im Prozess der Arteriogenese wurden 7 Ratten einer chemischen Knochenmarkdepletion unterzogen. Zweck der Depletion war, dass zum Zeitpunkt der Ligatur der Arteria femoralis eine minimale Anzahl von Blutleukozyten vorhanden sein sollte. Zu diesem Zweck wurde 120 mg Zyklophosphamid i/v injiziert:

am Tag -5: 80mg/kg KG i/v (Schwanzvene)

am Tag -3: 40 mg/kg KG i/v (Schwanzvene)

Am Tag 0 wurde dann die Arteria femoralis zwecks Induktion der Arteriogenese unterbunden.

Zur Kontrolle der Depletion der Blutzellen wurden an Tagen -5, 0, +3 Blutentnahmen je 0,5 ml in pädiatrischen EDTA-Röhrchen aus dem Plexus retroorbitalis in Ethernarkose durchgeführt. Das entnommene Blut wurde einer maschinellen Zählung unterzogen und anschließend ausgestrichen.

Die Ausstriche wurden lichtmikroskopisch (unter 100er Vergrößerung) auf unterschiedliche Subpopulationen von Leukozyten untersucht. Es wurden jeweils 100 Leukozyten ausgezählt und der prozentuelle Anteil einzelner Subpopulationen bestimmt. Der prozentuelle Anteil für einzelne Leukozytensubpopulation wurde dann auf die absolute Leukozytenzahl übertragen.

Ergebnisse (Proliferationsindex der Kollateralarterienwand und Anzahl der Makrophagen in den einzelnen Immunphänotypen) an Tagen -5, 0, +3 wurden anschließend in der KM-Depletions- und Kontrollgruppen miteinander verglichen.

### 10. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung führten wir eine einfaktorielle Varianzanalyse mit Hilfe der ANOVA Prozedur durch. Paarweise Mehrfachvergleiche wurden mit Hilfe des Bonferroni Tests durchgeführt. Gruppenmittelwerte die auf einem Alpha-Niveau von 0,05 oder kleiner voneinander abwichen wurden als signifikant unterschiedlich betrachtet.

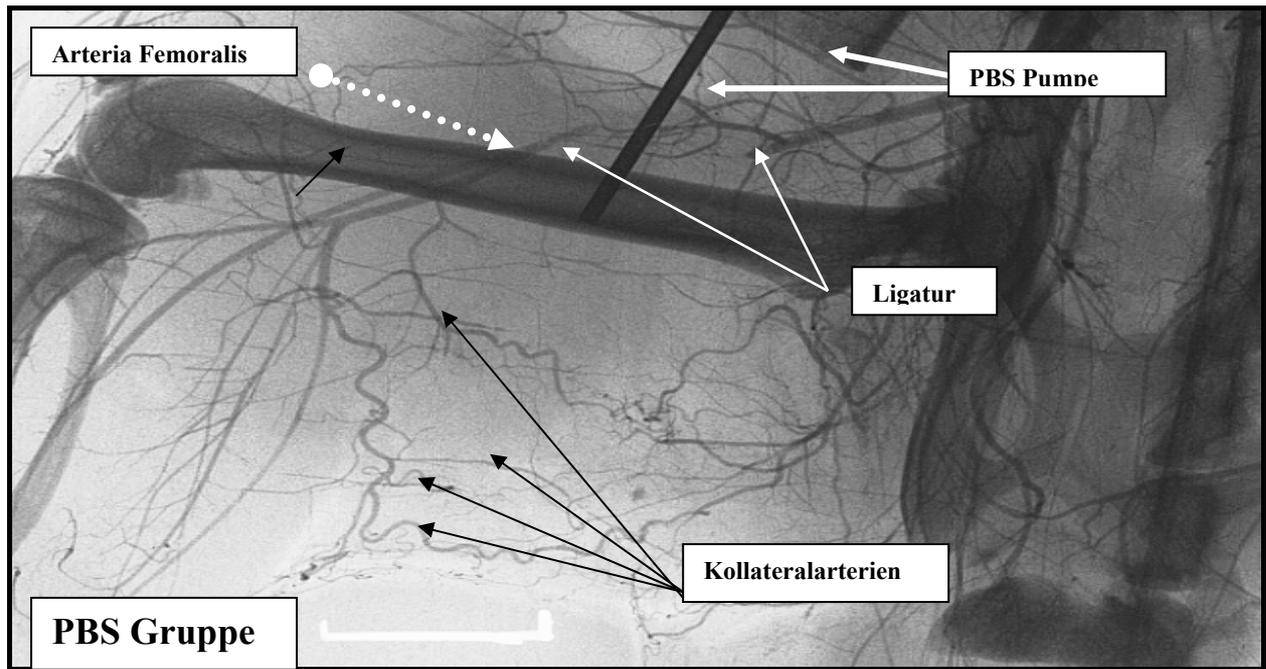
# 3. Ergebnisse

**Angiographische Befunde nach MCP-1 Gabe**

Die Anzahl angiographisch sichtbarer Kollateralen war eine Woche nach Femoralisokklusion in MCP-1 behandelten Tieren deutlich höher als in PBS behandelten Tieren (**Abb.10**). Während in der Kontrollgruppe (Kollateralarterien wurden mit PBS perfundiert) 5-6 Kollateralarterien (**Abb.8**) im ligierten Bein unter stereoskopischer Sicht sichtbar waren, wurden in MCP-1 behandelten Tieren 7-8 Kollateralarterien im ligierten Bein (**Abb.9**) ausgezählt. Da wir in früheren Studien zeigen konnten, dass in der Ratte Kollateralarterien aus präexistenten Anastomosen entstehen, müssen wir davon ausgehen, dass MCP-1 zu einer deutlichen Größenzunahme der Kollateralarterien führte, sodass Kollateralarterien in ihrem Durchmesser die Auflösungsgrenze der Angiographie erreichten.

**Post mortem Angiographien in der PBS-Gruppe 7 Tage nach der Ligatur:**

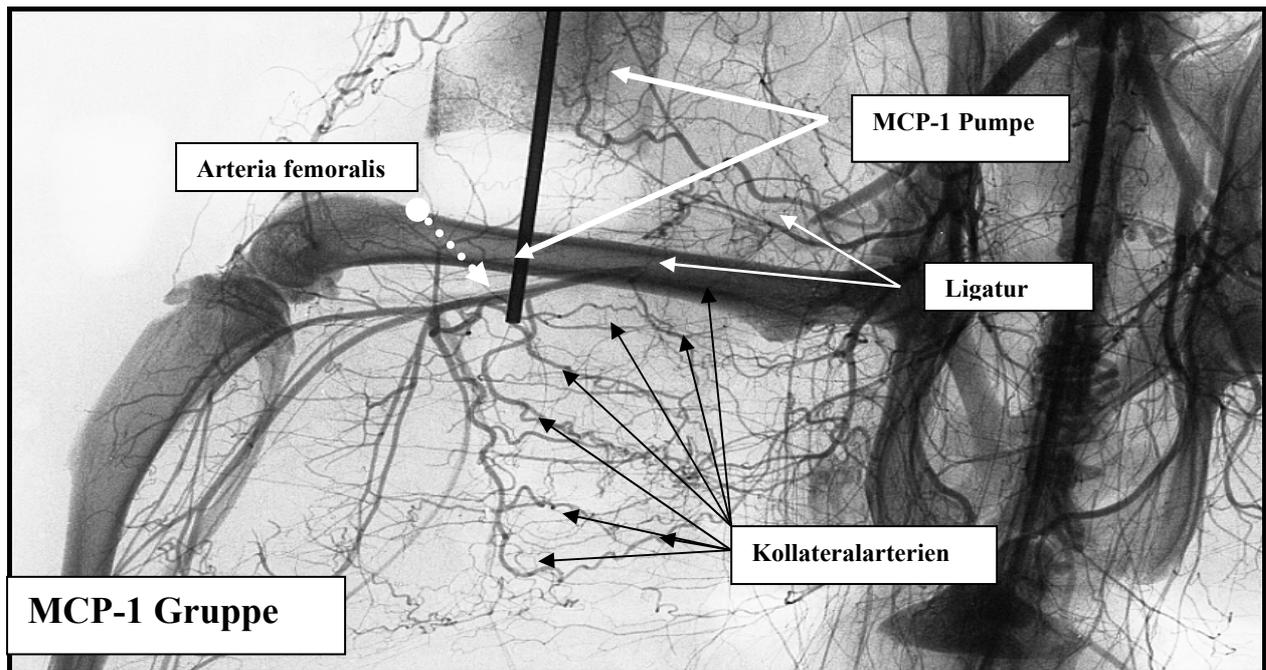
<i>R 1</i>	<i>R 2</i>	<i>R 31</i>	<i>R 33</i>	<i>R 35</i>	<i>R 107</i>	<i>R 109</i>
6 Gefäße	6 Gefäße	5 Gefäße	5 Gefäße	6 Gefäße	6 Gefäße	6 Gefäße



**Abb. 8.:** Die Tabelle zeigt die Anzahl der neurekrutierten Kollateralarterien für die einzelnen Tiere der PBS Gruppe. Das Radiogramm demonstriert das Kollateralarterienwachstum in der PBS Gruppe. Alle relevanten Strukturen sind gekennzeichnet. Im Vergleich zur MCP-1 Gruppe (Abb. 9 Seite 72) sind deutlich weniger radiologisch sichtbaren Kollateralarterien vorhanden.

**Post mortem Angiographien in der MCP1 Gruppe 7 Tage nach der Ligatur:**

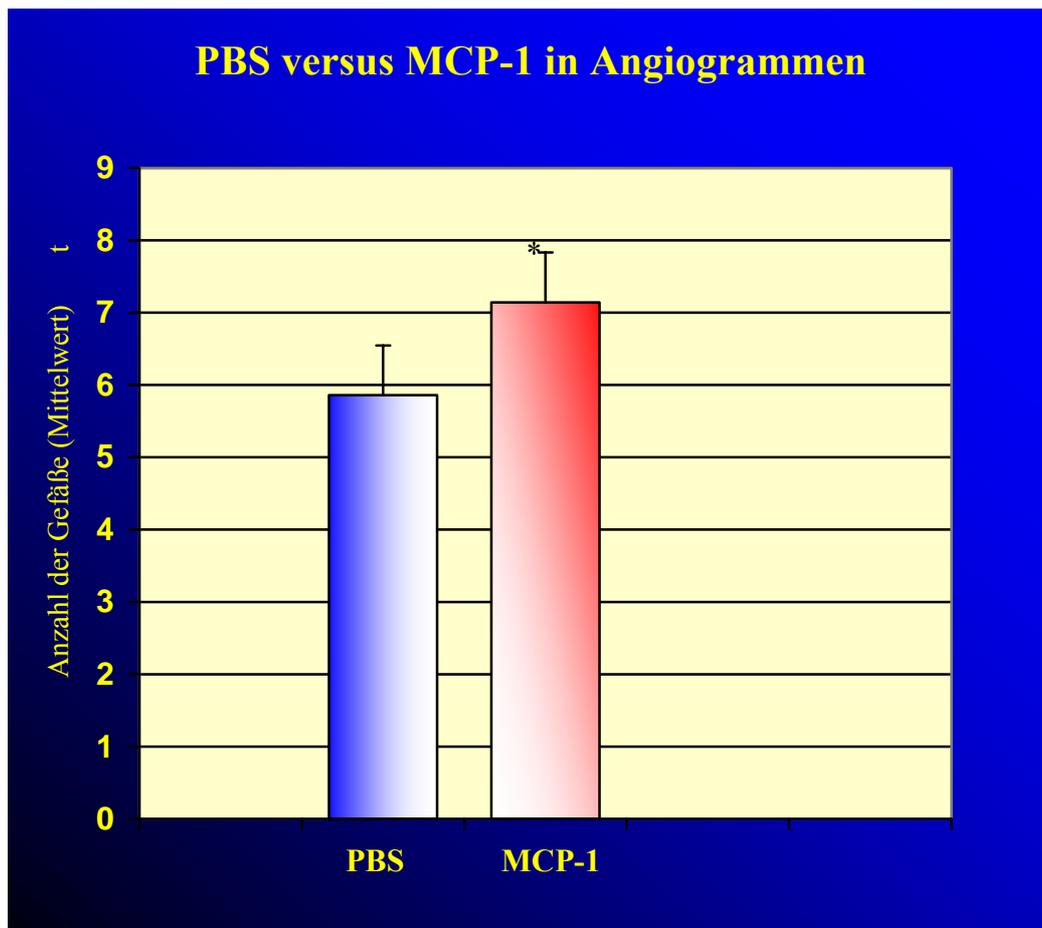
<i>R164</i>	<i>R165</i>	<i>R229</i>	<i>R230</i>	<i>R244</i>	<i>R257</i>	<i>R7</i>
7 Gefäße	7 Gefäße	7 Gefäße	8 Gefäße	6 Gefäße	8 Gefäße	7 Gefäße



**Abb. 9.:** Die Tabelle zeigt die Anzahl der neurekrutierten Kollateralarterien für die einzelnen Tiere der MCP-1 Gruppe. Das Radiogramm demonstriert Kollateralarterienwachstum in der MCP-1 Gruppe. Alle relevanten Strukturen sind gekennzeichnet. Im Vergleich zur PBS Gruppe (Abb. 8 Seite 71) sind deutlich mehr radiologisch sichtbaren Kollateralarterien vorhanden.

**Post mortem Angiographien 7 Tage nach der Ligatur im Vergleich:**

-Zuwachs von 25 % der Anzahl der Kollateralarterien innerhalb einer Woche nach Ligatur der Arteria femoralis mit simultaner intraarterieller Perfusion mit MCP-1



**Abb. 10:** Die Grafik vergleicht die Anzahl von radiologisch sichtbaren Kollateralarterien in beiden Gruppen (PBS/blau und MCP-1/rot) 7 Tage nach Okklusion der Arteria femoralis. In der MCP-1 Gruppe ließ sich eine deutlich größere Anzahl (25% mehr) an sichtbaren Kollateralen eruieren. (\*  $P < 0,05$ )

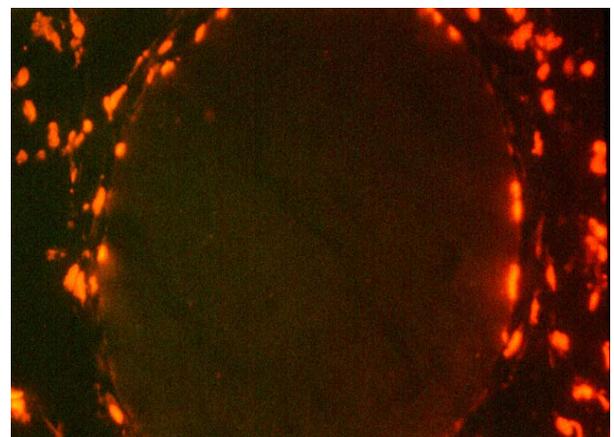
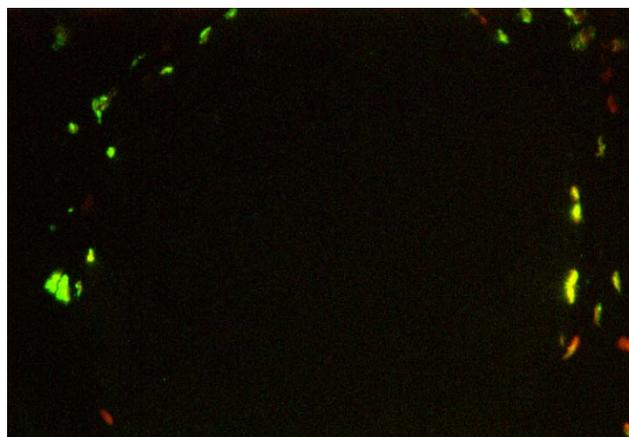
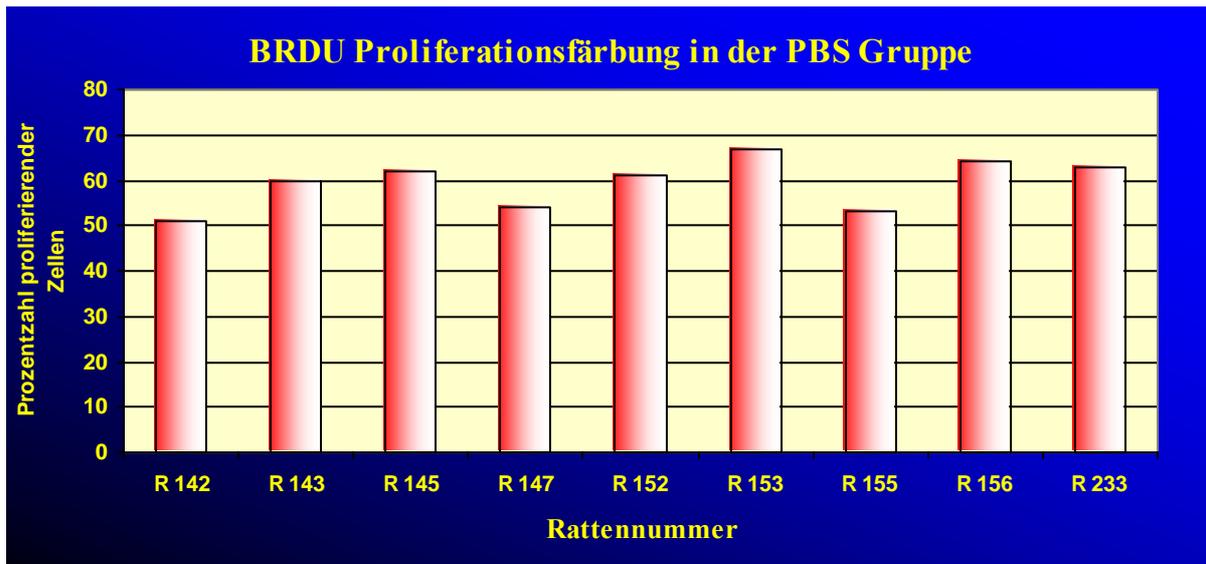
**Ergebnisse der BRDU-Proliferationsfärbung nach MCP-1 Gabe:**

Wie schon andere Studien demonstrierten, kommt es während der Arteriogenese zur Proliferation in der Gefäßwand. MCP-1 ist in der Lage diese Proliferation zu steigern. **(52)** In der aktuellen Arbeit ist es zum ersten Mal gelungen, diesen Prozess durch die Erstellung von Proliferationsquotienten zu quantifizieren. Dabei konnten wir zeigen, dass sieben Tage nach der Okklusion der Arteria femoralis und kontinuierlicher Perfusion der Kollateralarterien mit MCP-1 es zu einem signifikanten Anstieg des Proliferationsquotienten (ca. 15%) kam. **(Abb.13)** Während in der PBS Gruppe im Durchschnitt 59% der Gefäßwandzellen proliferierten **(Abb.11)**, steigerte MCP-1 die Proliferation in der Gefäßwand der Kollateralarterien um weitere 15 % **(Abb.12)**.

Im Zusammenhang mit den radiographischen Befunden ergaben diese Ergebnisse ein einheitliches Bild der MCP-1 Wirkung auf Kollateralarterien. Durch Steigerung der Proliferation (entweder direkt oder indirekt) von Gefäßzellen um 15% kam es zu einer Lumenzunahme aller rekrutierten Kollateralarterien, sodass angiographisch 25 % mehr Kollateralarterien sichtbar wurden.

**BRDU-Proliferationsfärbung in der PBS-Gruppe 7 Tage nach der Ligatur:**

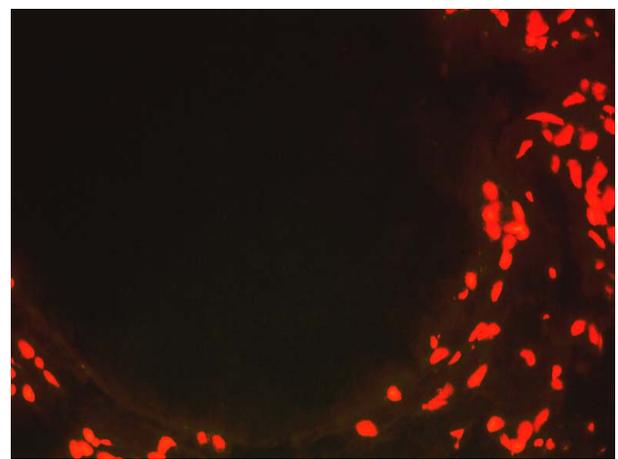
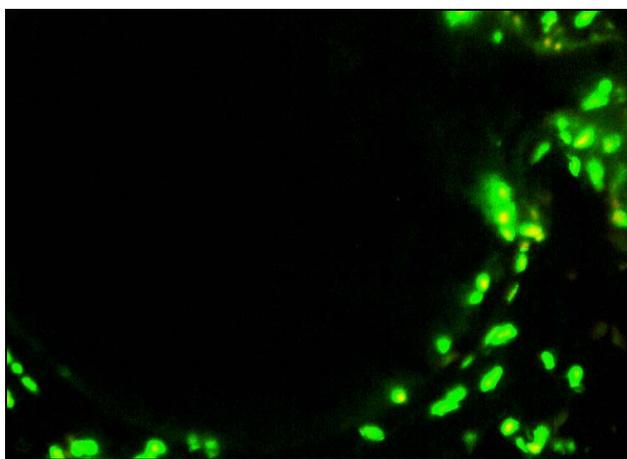
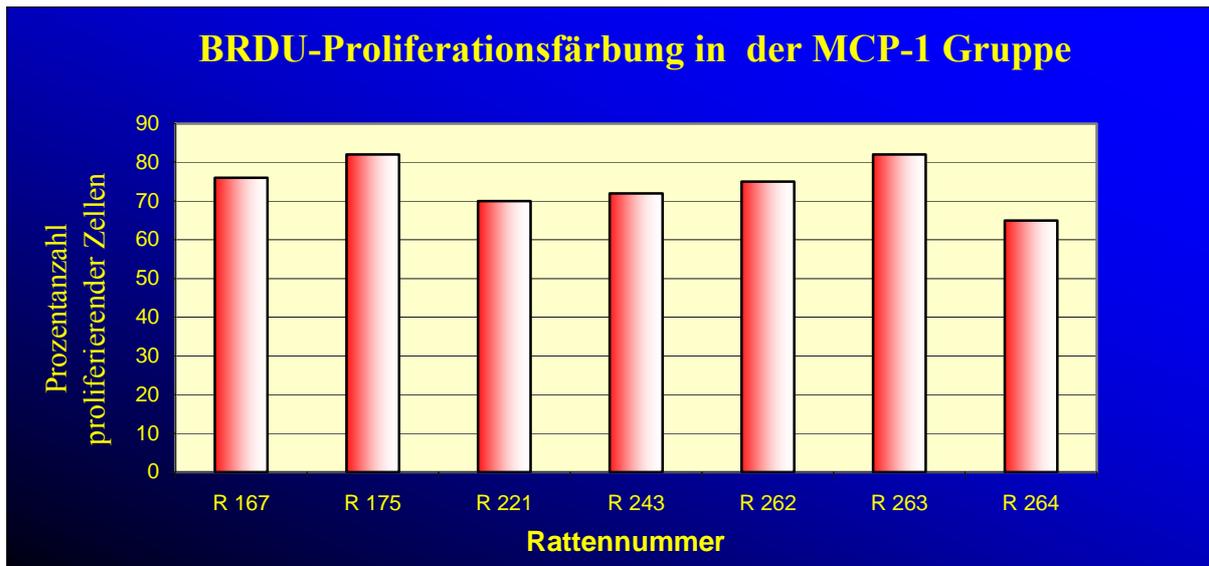
Mittlere Proliferation	59% der proliferierenden Endothel- und glatten Muskelzellen
Maximale Proliferation	67% der proliferierenden Endothel- und glatten Muskelzellen
Miniale Proliferation	51% der proliferierenden Endothel- und glatten Muskelzellen



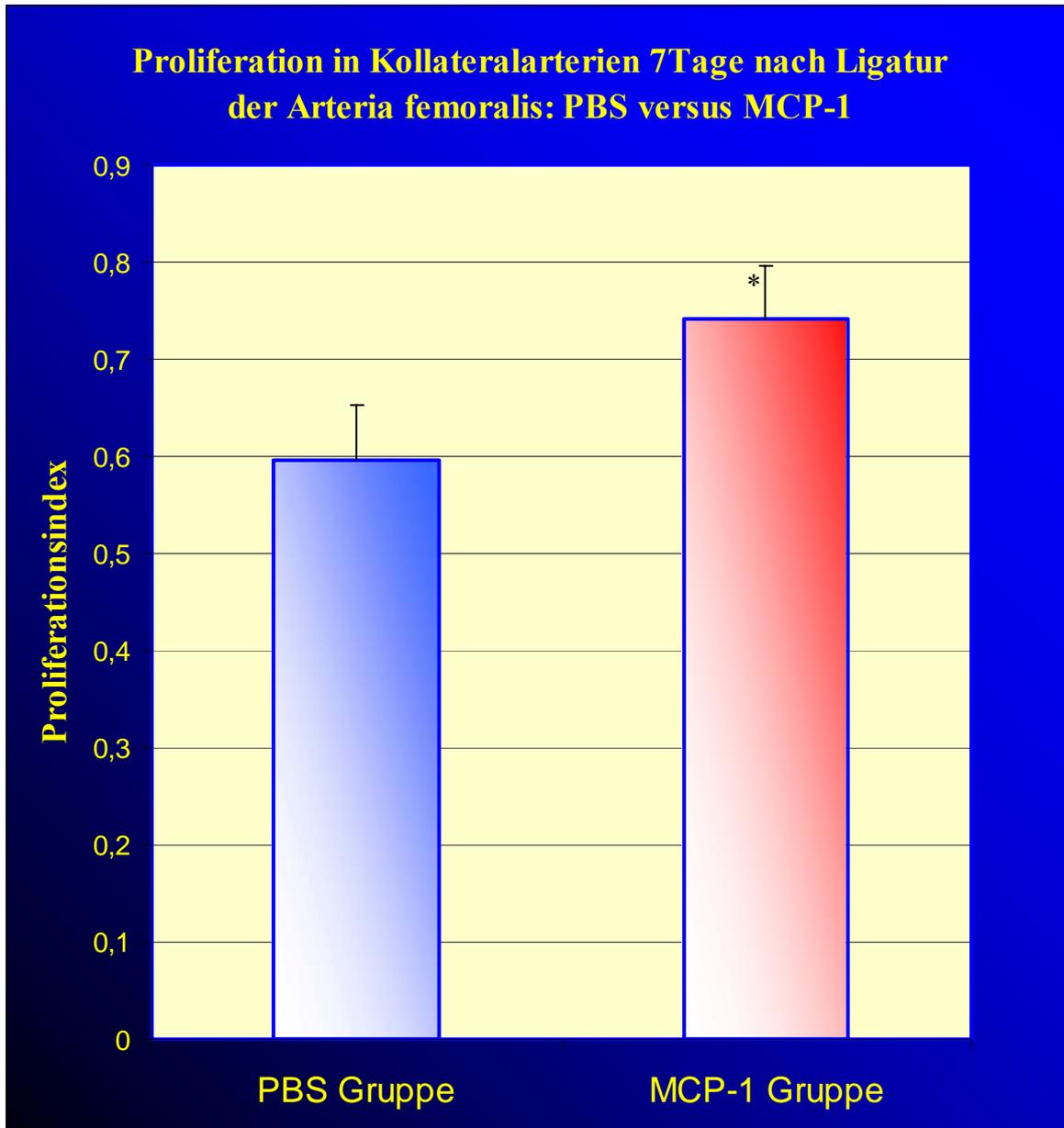
**Abb. 11:** Die **Tabelle** zeigt den *prozentuellen* Anteil der proliferierenden Zellen in der Gefäßwand der Hauptkollateralarterie in den Tieren der *PBS-Gruppe*. **Das Diagramm** zeigt die Ergebnisse für die einzelnen Tiere. **Die Photos** demonstrieren Proliferatin verschiedener Zellpopulationen in der Gefäßwand (rot leuchtende Zellen im rechten Photo stellen alle kernhaltigen Zellen dar; grün leuchtende Zellen links stellen proliferierende Zellen dar). Im Vergleich zur MCP-1 Gruppe (Fig. 12) sieht man deutlich weniger Proliferation in der Gefäßwand.

**BrdU-Proliferationsfärbung in der MCP-1 Gruppe 7 Tage nach der Ligatur:**

Mittlere Proliferation	74,5% der proliferierenden Endothel- und glatten Muskelzellen
Maximale Proliferation	82% der proliferierenden Endothel- und glatten Muskelzellen
Miniale Proliferation	65% der proliferierenden Endothel- und glatten Muskelzellen



**Abb. 12.:** Die **Tabelle** zeigt den *prozentuellen* Anteil der proliferierenden Zellen in der Gefäßwand der Hauptkollateralarterie in den Tieren der *MCP1-Gruppe*. **Im Diagramm** sind die Ergebnisse für die einzelnen Tiere der Gruppe dargestellt. **Die Photos** demonstrieren Proliferation verschiedener Zellpopulationen der Gefäßwand (rot leuchtende Zellen im rechten Photo stellen alle kernhaltigen Zellen dar; grün leuchtende Zellen links stellen proliferierende Zellen dar). Im Vergleich zur PBS Gruppe (Fig. 11) sieht man deutlich mehr Proliferation in der Gefäßwand.

**MCP-1 versus PBS in BRDU Proliferationsfärbung 7 Tage nach der Ligatur:**

**Abb. 13.:** Die Grafik vergleicht das proliferative Verhalten der Kollateralarterien in beiden Gruppen (PBS/blau und MCP-1/rot) 7 Tage nach Okklusion der Arteria femoralis. In der MCP-1 Gruppe haben sich deutlich mehr (~15%) Zellen der Kollateralarterienwand geteilt. (\* P < 0,05)

**Ergebnisse: der Makrophagenfärbung nach Gabe von MCP-1**

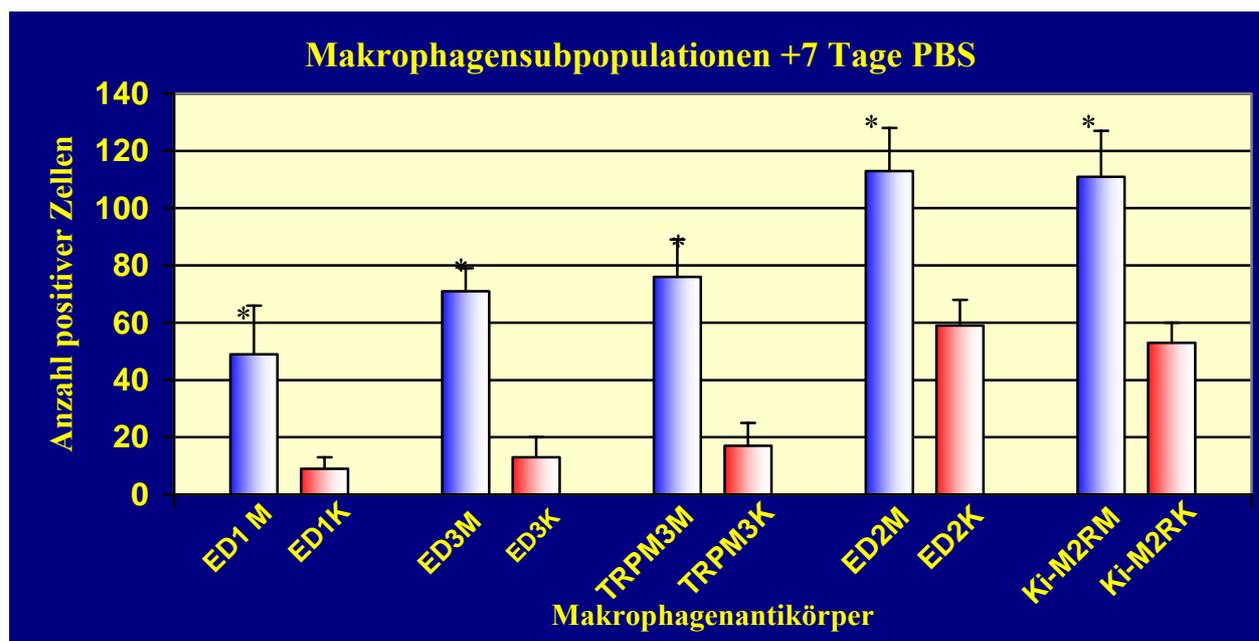
In der aktuellen Arbeit wurde erstmalig die Akkumulation von perivaskulären Makrophagen unter spontanen Bedingungen und nach Behandlung mit MCP-1 während der Arteriogenese quantifiziert. Dabei konnte gezeigt werden, dass 7 Tage nach Ligatur der Femoralarterie es zu einem signifikanten Anstieg der Makrophagen kommt. Mehrere Makrophagenphänotypen waren an diesem Prozess beteiligt (**Abb.14**). MCP-1 steigerte im Vergleich zur Kontrollgruppe die Akkumulation der perivaskulären Makrophagen aller Immunphänotypen um die Kollateralarterie um 24-33%. Entgegen unserer Erwartungen konnten wir keine Bevorzugung einzelner Immunphänotypen der Makrophagen nach MCP-1 Gabe feststellen, wie es für andere pathologische Prozesse beschrieben wurde (**Abb.16, Abb.17, Abb.18**).

Alle in dieser Arbeit festgestellten Effekte von MCP-1 auf Kollateralarterienwachstum im Vergleich zur Kontrollgruppe, zeigen einen komplexen Einfluss dieses Zytokins auf die Arteriogenese. (**Abb.19**)

Wir konnten zum ersten Mal die Präsenz von Makrophagen auch im Kontrollbein zeigen. Ihre Anzahl liegt für alle Subpopulationen deutlich niedriger als im ligierten Bein (**Abb.22**). Die Gabe von MCP-1 steigerte die Anzahl von Makrophagen nicht nur im ligierten Bein sondern auch im Kontrollbein, allerdings auf einem wesentlich geringeren Niveau (**Abb.23**).

**Makrophagensubpopulationsfärbung in der PBS Gruppe 7 Tage nach Ligatur**

<i>Antikörper</i>	142	145	147	152	153	155	156	233	MW	Max	MIN	STABW
<b>ED1 M</b>	50	70	50	75	26	50	34	37	49	75	26	17
<b>ED1K</b>	5	15	15	6	4	10	12	8	9	15	4	4
<b>ED3M</b>	67	60	68	71	80	80	63	80	71	80	60	8
<b>ED3K</b>	5	14	10	21	3	17	24	17	13	24	3	7
<b>TRPM3M</b>	63	68	65	90	85	98	80	65	76	98	63	13
<b>TRPM3K</b>	5	24	12	17	10	28	22	24	17	28	5	8
<b>ED2M</b>	142	112	112	120	100	116	89	117	113	142	89	15
<b>ED2K</b>	62	70	50	50	60	50	65	70	59	70	50	8
<b>Ki-M2RM</b>	138	92	130	105	110	114	100	100	111	138	92	15
<b>Ki-M2RK</b>	57	58	44	45	45	55	60	60	53	60	44	7,0

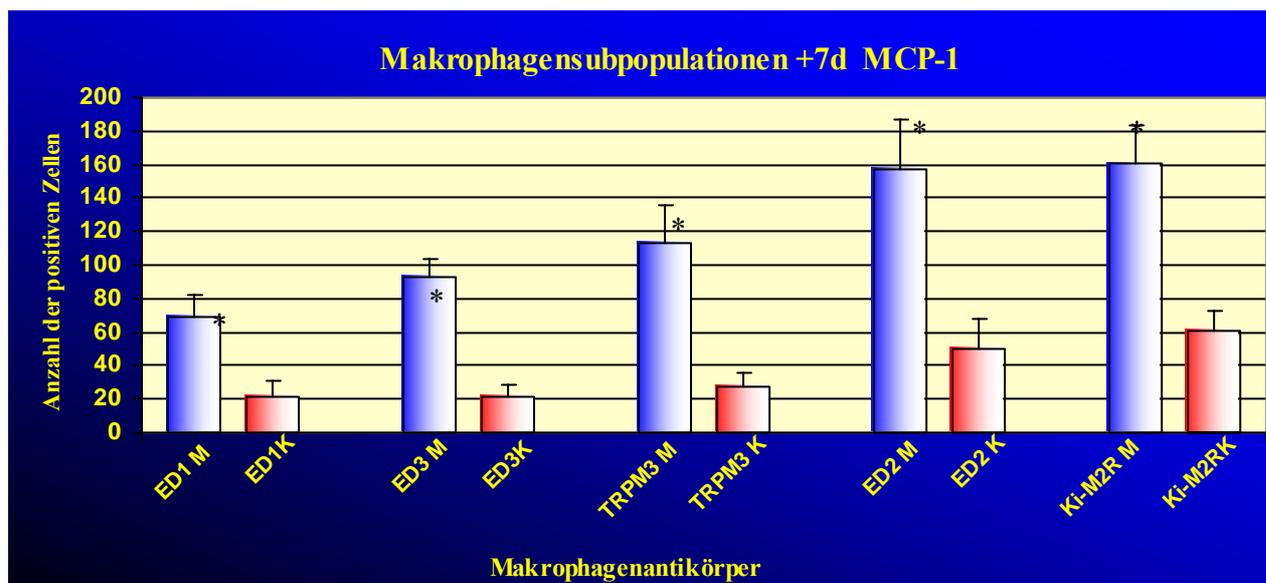


**Abb. 14.:** Die **Tabelle** präsentiert die Daten der Makrophagenfärbung in der **PBS-Gruppe** 7 Tage nach Okklusion der Arteria femoralis in den einzelnen Tieren der Gruppe. In der linken Spalte der Tabelle sind einzelne makrophagenspezifische Antikörper dargestellt. Die **Grafik** vergleicht die absolute Anzahl (Mittelwerte) der Makrophagen (Y) für einzelne Makrophagen-Antikörper (X) im ligierten Bein (blau) und Kontrollbein (rot).

**M**-bezeichnet das ligierte Bein - **rot**; **K**-bezeichnet das Kontrollbein- **blau**; **MW**-Mittelwert; **Max**-maximalwert; **Min**-Minimalwert; **STABW**- Standardabweichung. (ligiertes Bein (M) versus Kontrollbein (K): \* P< 0,05)

**Makrophagensubpopulationsfärbung in MCP-1 Gruppe 7 Tage nach Ligatur**

<i>Antikörper</i>	167	175	221	234	262	263	264	<i>MW</i>	<i>Max</i>	<i>MIN</i>	<i>STABW</i>
<b>ED1 M</b>	78	61	55	70	90	50	77	68,7	90	50	14
<b>ED1K</b>	34	8	20	22	30	25	11	21,4	34	8	9
<b>ED3 M</b>	95	105	97	80	100	75	100	93,1	105	75	11
<b>ED3K</b>	28	11	25	20	30	22	17	21,8	30	11	7
<b>TRPM3 M</b>	137	110	116	85	95	98	150	113	150	85	23
<b>TRPM3 K</b>	40	20	22	18	30	30	32	27,4	40	18	8
<b>ED2 M</b>	160	197	161	113	128	163	180	157,4	197	113	29
<b>ED2 K</b>	28	45	30	50	70	70	60	50,4	70	28	17
<b>Ki-M2R M</b>	164	175	170	130	130	165	190	160,5	190	130	23
<b>Ki-M2RK</b>	62	65	45	45	70	75	60	60,2	75	45	12

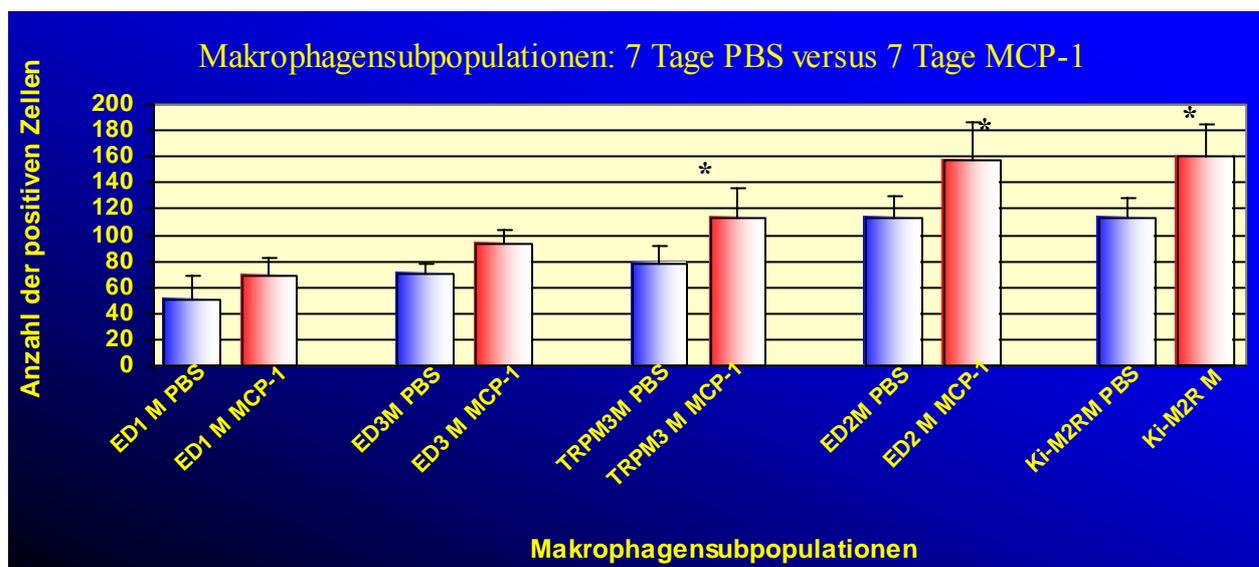


**Abb. 15.:** Die **Tabelle** präsentiert die Daten der Makrophagenfärbung in der **MCP-1-Gruppe** 7 Tage nach der Okklusion der Arteria femoralis in den einzelnen Tieren der Gruppe. In der rechten Spalte der Tabelle sind einzelne makrophagenspezifische Antikörper dargestellt. Die **Grafik** vergleicht die absolute Anzahl (Mittelwerte) der Makrophagen (Y) für einzelne Makrophagen-Antikörper (X) im ligierten Bein (blau) und Kontrollbein (rot).

**M**-bezeichnet das ligierte Bein - **rot**; **K**-bezeichnet das Kontrollbein - **blau**; **MW**-Mittelwert; **Max**-maximalwert; **Min**-Minimalwert; **STABW**- Standardabweichung. (ligiertes Bein (M) versus Kontrollbein (K): \* P< 0,05)

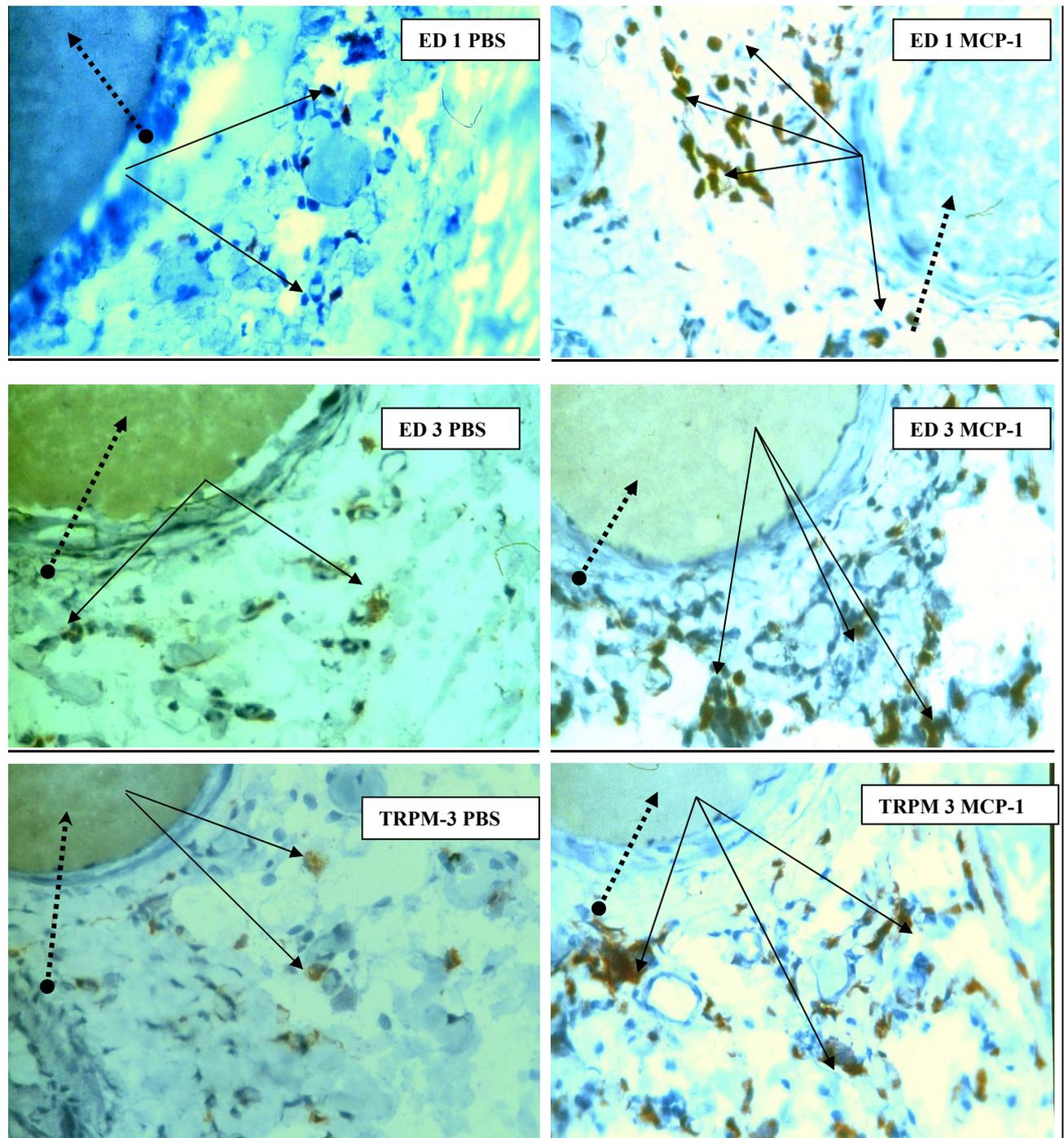
**Makrophagensubpopulationen: +7d PBS Gruppe versus +7d MCP-1 Gruppe:**

<i>Antikörper</i>	1	2	3	4	5	6	7	MW	Zuwachs %	STABW
<b>ED1 M PBS</b>	50	70	50	75	26	50	34	49		18
<b>ED1 M MCP-1</b>	78	61	55	70	90	50	77	69	28%	14
<b>ED3M PBS</b>	67	60	68	71	80	80	63	70		8
<b>ED3 M MCP-1</b>	95	105	97	80	100	75	100	93	24%	11
<b>TRPM3M PBS</b>	63	68	65	90	85	98	80	78		13
<b>TRPM3 M MCP-1</b>	137	110	116	85	95	98	150	113	33%	23
<b>ED2M PBS</b>	142	112	112	120	100	116	89	113		17
<b>ED2 M MCP-1</b>	160	197	161	113	128	163	180	157	28%	29
<b>Ki-M2RM PBS</b>	138	92	130	105	110	114	100	113		16
<b>Ki-M2R M MCP-1</b>	164	175	170	130	130	165	190	161	31%	23



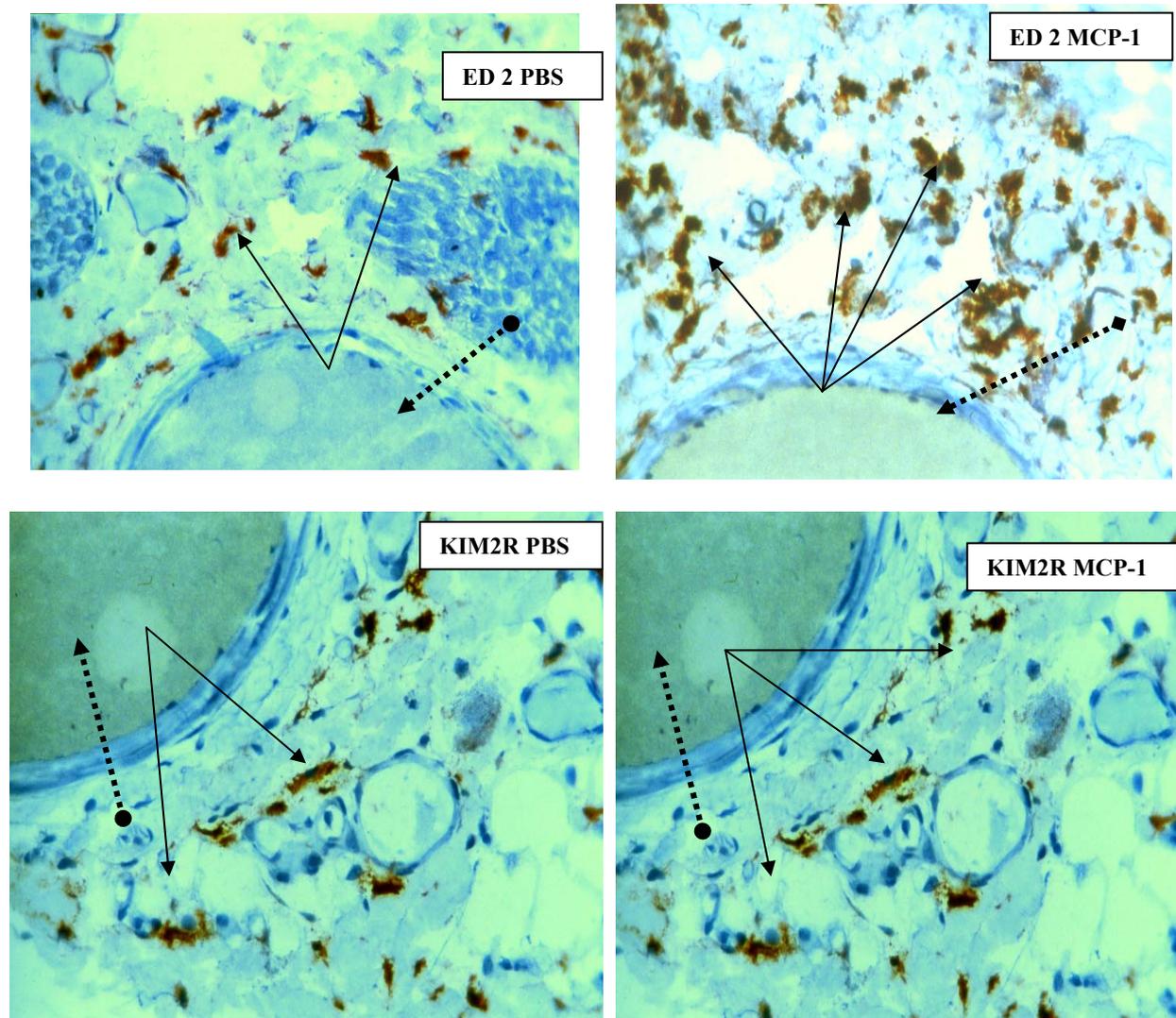
**Abb. 16.:** Die **Tabelle** vergleicht die mittleren Makrophagenanzahlen im ligierten Bein für einzelne Makrophagensubpopulationen in beiden Gruppen (PBS/blau und MCP-1/rot) 7 Tage nach Okklusion der Arteria femoralis. Die **Grafik** demonstriert die Mittelwerte (Y) für einzelne Makrophagen-Antikörper (X) in den MCP-1 und PBS Gruppen. Ligiertes Bein versus Kontrollbein: \* P< 0,05. **M**-bezeichnet das ligierte Bein; **MW**-Mittelwert; **Zuwachs%**- prozentueller Zuwachs an rekrutierten Makrophagen; **STABW**- Standardabweichung.

Exsudativen Makrophagen: PBS Gruppe versus MCP-1 Gruppe:



**Abb. 17:** Auf den Abbildungen sind perivaskuläre Makrophagen (braun-rote Färbung) (x400) um die Kollateralarterie (schwarzer punktierter Pfeil) für entsprechende Subpopulationen von **exsudativen** Makrophagen (weiße Kästchen) dargestellt. Im Vergleich kann man eine höhere Anzahl an Makrophagen in der MCP-1 Gruppe (rechts) als in der PBS-Gruppe (links) für einzelne Makrophagen-Antikörper erkennen. (Gefrierschnitte 7 µm)

**Residente Makrophagen: PBS Gruppe versus MCP-1 Gruppe:**



**Abb. 18:** Auf den Abbildungen sind perivaskuläre Makrophagen (braun-rote Färbung) (x400) um die Kollateralarterie (schwarzer punktierter Pfeil) für entsprechende Subpopulationen von **residenten** Makrophagen (weiße Kästchen) dargestellt. Im Vergleich kann man eine höhere Anzahl an Makrophagen in der MCP-1 Gruppe (rechts) als in der PBS-Gruppe (links) für einzelne Makrophagen-Antikörper erkennen. (Gefrierschnitte 7 µm)

**Zusammenfassung aller Ergebnisse in + 7 Tage (MCP-1 und PBS ) Gruppen:**

**1. Angiographien PBS versus MCP-1 in +7d Gruppen:**

-25%er Zuwachs an Kollateralarterienzahl in der MCP-1 Gruppe

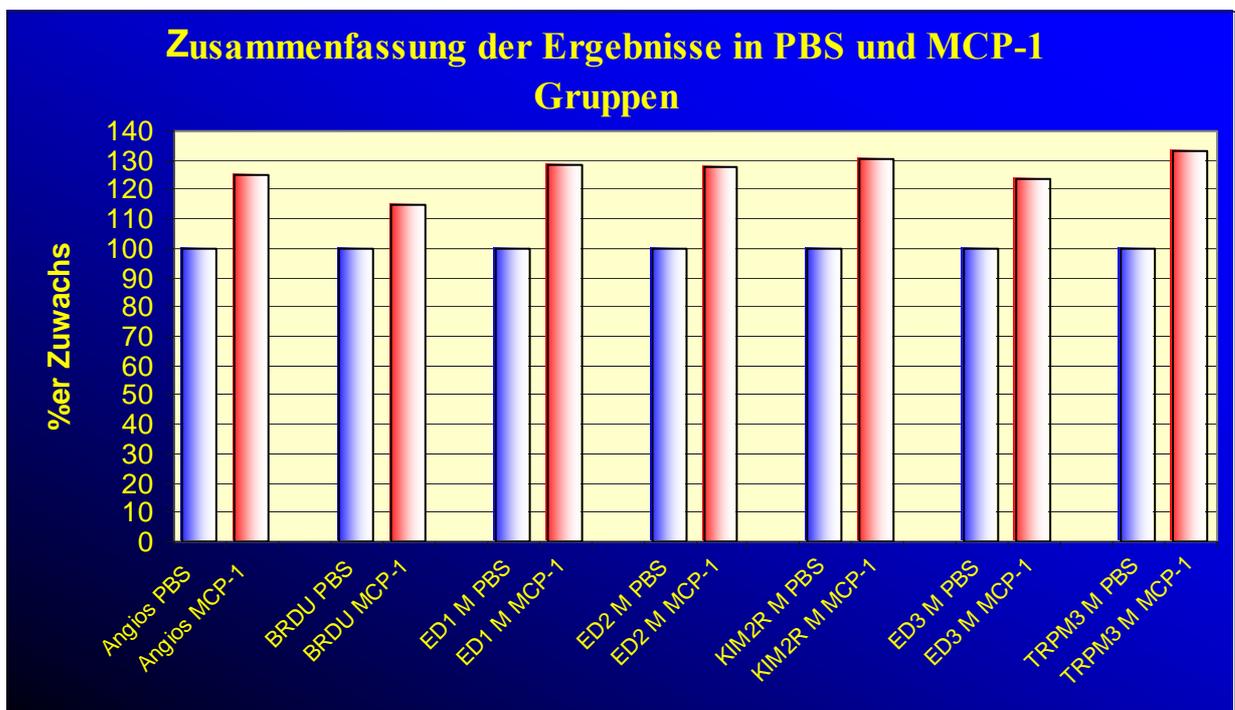
**2. BrDU Proliferations-Färbung PBS versus MCP-1 in +7d Gruppen:**

-15%er Zuwachs in der Proliferation der Endothel- und glatten Muskelzellen

**3. Monozyten/Makrophagen-Färbung PBS versus MCP-1 in +7d Gruppen:**

-Exudative Makrophagen (ED3, TRPM3): 23-33%er Zuwachs in der MCP-1 Gruppe.

-Residente Makrophagen (ED2, KIM2R): 27-30%er Zuwachs in der MCP-1 Gruppe



**Abb. 19:** Das Diagramm fasst **alle** Ergebnisse (Anzahl der Kollateralarterien in Angiographien, Proliferation der Arterienwand in BRDU-Färbung, Anzahl perivaskulärer Makrophagen nach Subpopulationen) in PBS und MCP-1 Gruppen zusammen. Man kann erkennen, das in der MCP-Gruppe mehr Gefäße radiologisch sichtbar sind (25% mehr), mehr Zellen in der Kollateralarterienwand proliferieren (~15% mehr) und das mehr Makrophagen perivaskulär akkumulieren (24-33%). Die **Y-Achse** stellt die Werte in Prozent der Kontrollwerte (PBS) dar.

Die **X-Achse** zeigt die einzelnen Untersuchungsmethoden (Angiographien, BRDU-Färbung, einzelne Makrophagen-AK) in beiden Gruppen (PBS MCP-1)

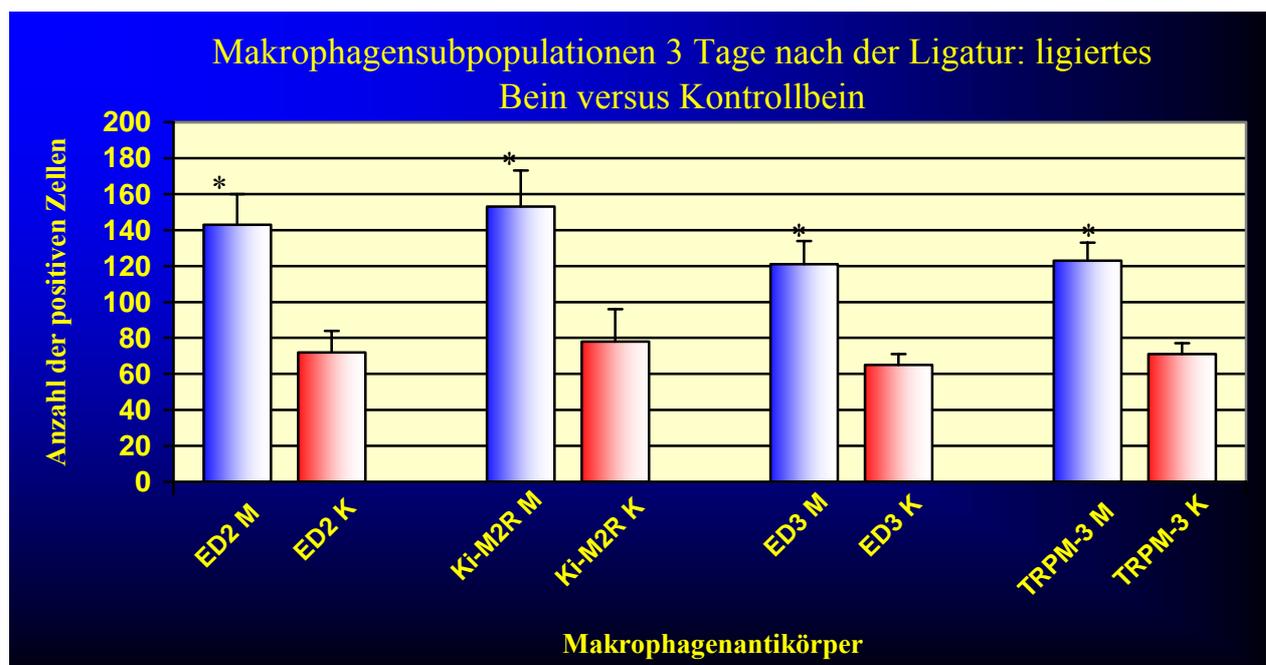
**Ergebnisse der Makrophagenfärbung 3 Tage nach der Ligatur:**

In einer aktuellen Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Proliferationsgeschwindigkeit in der Gefäßwand der Kollateralarterien im Rattenmodell während der ersten 3 Tage nach Ligatur der Arteria femoralis ihr Maximum erreicht **(34)**. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Kinetik der Makrophagenakkumulation mit der Kollateralarterienproliferation zu vergleichen. Es zeigte sich 3 Tage nach Ligatur eine intensive Makrophagenakkumulation um die proliferierende Kollateralarterie. Die Immunphänotypisierung ergab das gleiche Makrophagenspektrum ohne Betonung einzelner Subpopulationen. **(139)** Die Akkumulation im ligierten Bein war 3 Tage nach Ligatur ebenso wie 7 Tage nach Ligatur (PBS-Kontrollgruppe und MCP-1 Gruppe) wesentlich höher als im Kontrollbein **(140-142)**. Der Anstieg der Makrophagenakkumulation war jedoch 3 Tage nach Ligatur in allen Subpopulationen wesentlich höher als nach 7 Tagen **(143)**.

Somit lässt sich eine positive Korrelation zwischen der Proliferationsgeschwindigkeit in der Kollateralarterienwand und dem Ausmaß der Makrophagenakkumulation feststellen. Zum Zeitpunkt der maximalen Proliferation der Kollateralarterien (Tag 3) findet sich auch die maximale Akkumulation von perivaskulären Makrophagen. Mit der Verlangsamung der Proliferationsgeschwindigkeit in der Kollateralarterie (7 Tage nach Femoralisokklusion) kommt es zur Reduktion der Makrophagenanzahl **(144)**.

**Makrophagensubpopulationen im ligierten Bein 3 Tage nach Ligatur :**

<i>Antikörper</i>	<i>R</i> 245	<i>R</i> 246	<i>R</i> 248	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>R4</i>	<i>MW</i>	<i>Max</i>	<i>Min</i>	<i>STABW</i>
<b>ED2 M</b>	109	160	160	145	150	140	140	143	160	109	17
ED2 K	52	90	85	70	70	68	72	72	90	52	12
<b>Ki-M2R M</b>	115	155	170	150	170	140	170	153	170	115	20
Ki-M2R K	57	105	100	75	74	67	68	78	105	57	18
<b>ED3 M</b>	107	135	127	115	110	120	140	121	140	107	13
ED3 K	65	75	65	65	55	65	65	65	75	55	6
<b>TRPM-3 M</b>	125	140	123	105	120	120	125	123	140	105	10
TRPM-3 K	75	80	70	65	75	70	65	71	80	65	6

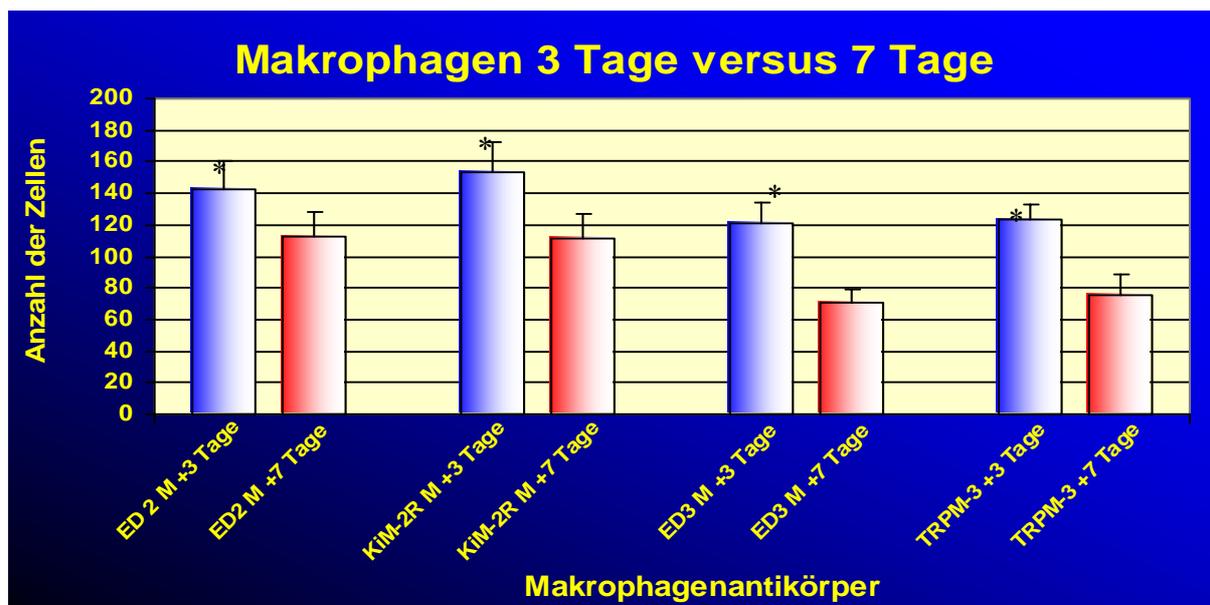


**Abb. 20.:** Die **Tabelle** präsentiert die Makrophagenfärbung 3 Tage nach Okklusion der Arteria femoralis bei einzelnen Tieren. In der linken Spalte der Tabelle sind einzelne makrophagenspezifische Antikörper dargestellt. Die **Grafik** demonstriert die absolute Anzahl der Makrophagen (Y) für einzelne Makrophagen-Antikörper (X). Im ligierten Bein (blau) ist die Anzahl der Makrophagen signifikant höher als im Kontrollbein (rot).

**M**-bezeichnet das ligierte Bein; **K**-bezeichnet das Kontrollbein; **MW**-Mittelwert; **Max**-maximalwert; **Min**-Minimalwert; **STABW**- Standardabweichung. Ligiertes Bein versus Kontrollbein: \* P< 0,05

**Makrophagen im ligierten Bein: 3 Tage versus 7 Tage nach Okklusion :**

<i>Antikörper</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Reduktion absolut</i>	<i>Reduktion %</i>
<b>ED 2 M +3 Tage</b>	143		
<b>ED2 M +7 Tage</b>	113	-30 Zellen	-21%
<b>KiM-2R M +3 Tage</b>	153		
<b>KiM-2R M +7 Tage</b>	111	-42 Zellen	-27%
<b>ED3 M +3 Tage</b>	121		
<b>ED3 M +7 Tage</b>	71	-50 Zellen	-41%
<b>TRPM-3 M +3 Tage</b>	123		
<b>TRPM-3 M +7 Tage</b>	76	-47 Zellen	-38%

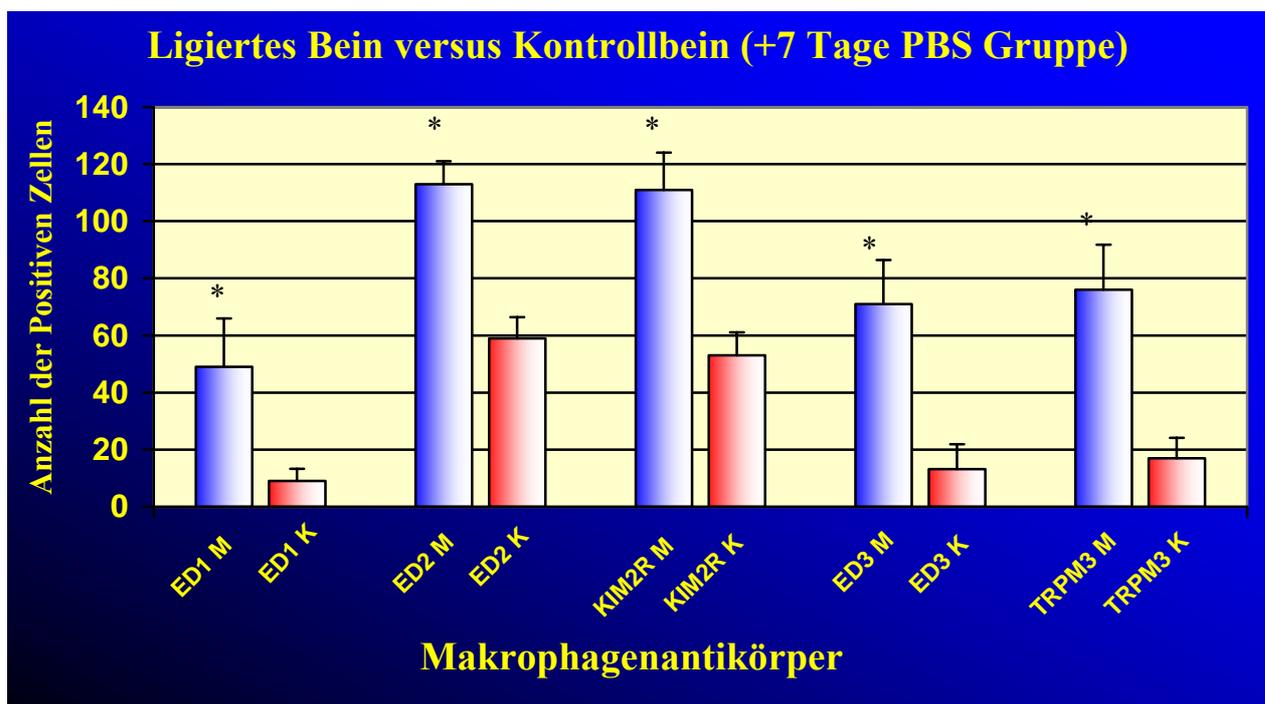


**Abb. 21.:** Die **Tabelle** vergleicht die mittleren Makrophagenanzahlen für einzelne makrophagenspezifische Antikörper 3 Tage/**blau** und 7 Tage/**rot** nach der Okklusion der Arteria femoralis für einzelne Tiere. Die **Grafik** vergleicht Mittelwerte (Y) für einzelne Makrophagen-Antikörper (X) in den 3 Tage und 7 Tage Gruppen. In der 3 Tage Gruppe sind wesentlich mehr Makrophagen für einzelne Makrophagen-AK als in der 7 Tage Gruppe zu sehen. 3 Tage nach Ligatur akkumulieren signifikant mehr Makrophagen um die Kollateralarterie als 7 Tage nach Ligatur.

**M**-bezeichnet das ligierte Bein; **MW**-Mittelwert; **Reduktion%**- prozentuelle Reduktion der Anzahl der rekrutierten Makrophagen; **STABW**- Standardabweichung. Ligiertes Bein versus Kontrollbein: \* P< 0,05

**Ligiertes Bein versus Kontrollbein in der PBS-Gruppe 7 Tage nach Ligatur:**

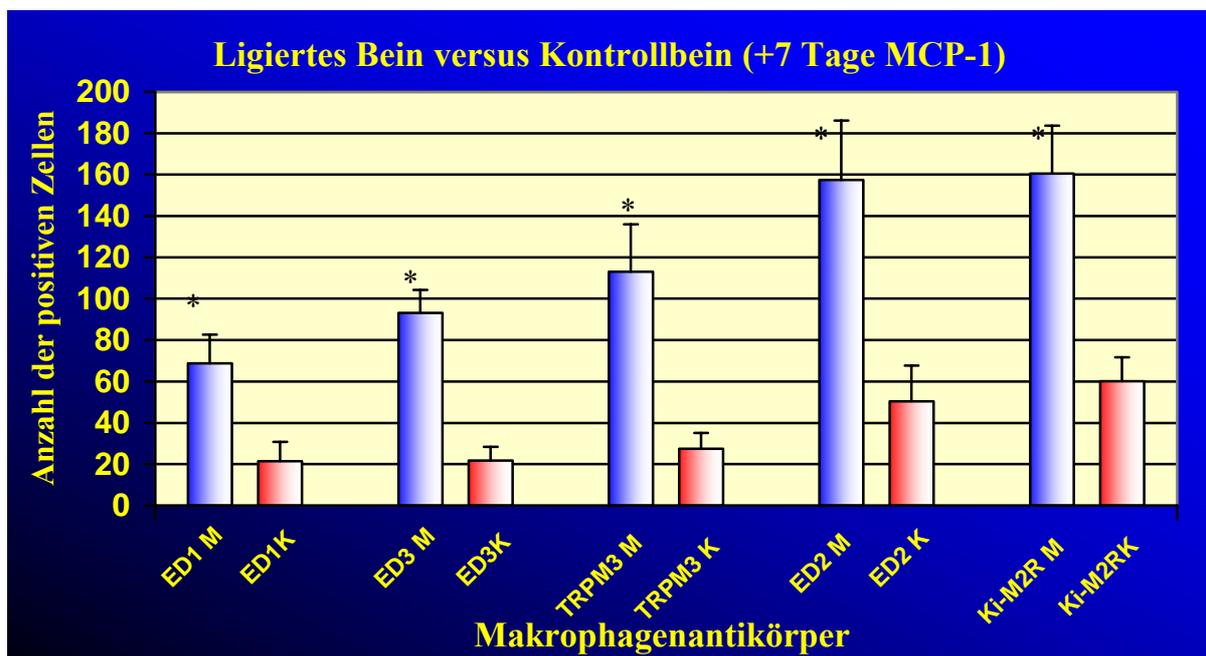
<i>Makrophagen-Antikörper</i>	<i>MW</i>	<i>STABW</i>	<i>%er Zuwachs</i>	<i>Faktor</i>
<b>ED1 M</b>	<b>49</b>	<b>17,0</b>	540%	5,4
<b>ED1 K</b>	9	4,3		
<b>ED2 M</b>	<b>113</b>	<b>8,0</b>	191%	1,91
<b>ED2 K</b>	59	7,4		
<b>KIM2R M</b>	<b>111</b>	<b>13,3</b>	209%	2,09
<b>KIM2R K</b>	53	8,1		
<b>ED3 M</b>	<b>71</b>	<b>15,4</b>	546%	5,46
<b>ED3 K</b>	13	8,7		
<b>TRPM3 M</b>	<b>76</b>	<b>15,8</b>	584%	5,84
<b>TRPM3 K</b>	17	7,1		



**Abb. 22:** Die **Tabelle** und die Grafik vergleichen die Makrophagenanzahl (Y) für einzelne Makrophagen-AK (X) im ligierten Bein und Kontrollbein 7 Tage nach Okklusion der Arteria femoralis in der **PBS-Gruppe**. Man kann einen deutlichen Anstieg von Makrophagen im ligierten Bein (blau) im Vergleich zum Kontrollbein (rot) für einzelne AK erkennen. **M**-ligiertes Bein/**blau**; **K**-Kontrollbein/**rot**. Ligiertes Bein versus Kontrollbein: \* P< 0,05

**Ligiertes Bein versus Kontrollbein bei MCP-1 Gruppe 7 Tage nach Ligatur**

<i>Makrophagen -AK</i>	<i>MW</i>	<i>STABW</i>	<i>% Zuwachs</i>	<i>Faktor</i>
<b>ED1 M</b>	<b>68,7</b>	<b>14,1</b>	323%	3,23
<b>ED1K</b>	21,4	9,4		
<b>ED3 M</b>	<b>93,1</b>	<b>11,2</b>	442%	4,42
<b>ED3K</b>	21,8	6,5		
<b>TRPM3 M</b>	<b>113</b>	<b>23,4</b>	418%	4,18
<b>TRPM3 K</b>	27,4	7,8		
<b>ED2 M</b>	<b>157,4</b>	<b>28,7</b>	314%	3,14
<b>ED2 K</b>	50,4	17,3		
<b>Ki-M2R M</b>	<b>160,5</b>	<b>23,2</b>	266%	2,66
<b>Ki-M2RK</b>	60,2	11,5		



**Abb. 23:** Die Tabelle und die Grafik vergleichen die Makrophagenanzahl (Y) im ligierten Bein und Kontrollbein 7 Tage nach Okklusion der Arteria femoralis für einzelne Makrophagen-AK (X) in der **MCP-1-Gruppe**. Man kann einen deutlichen Anstieg von Makrophagen im ligierten Bein (blau) für einzelne AK im Vergleich zum Kontrollbein (rot) erkennen. **M**-ligiertes Bein/**blau**; **K**-Kontrollbein/**rot**. Ligiertes Bein versus Kontrollbein: \* P< 0,05

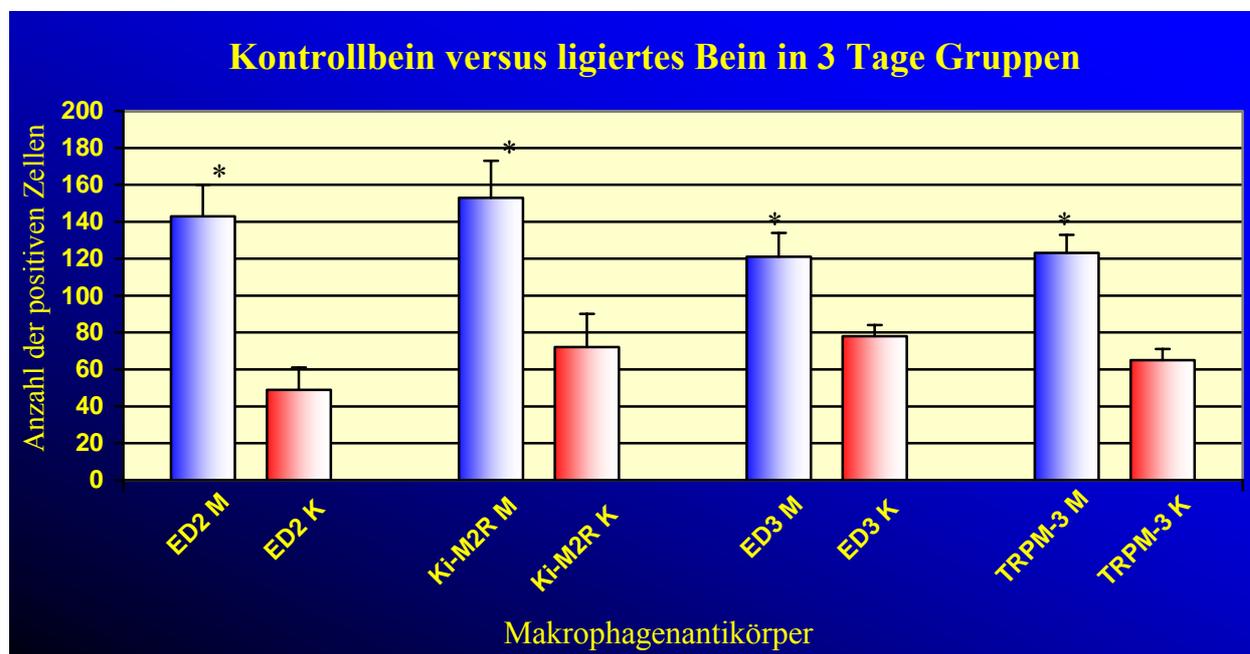
**Ligiertes Bein versus Kontrollbein 3 Tage nach Ligatur:**

<i>Makrophagen Subpopulationen</i>	<i>Mittelwerte</i>	<i>STABW absolut</i>	<i>% Zuwachs im ligierten Bein</i>
<b>ED2 M</b>	<b>143</b>	<b>17</b>	198%
ED2 K	72	12	
<b>Ki-M2R M</b>	<b>153</b>	<b>20</b>	196%
Ki-M2R K	78	18	
<b>ED3 M</b>	<b>121</b>	<b>13</b>	186%
ED3 K	65	6	
<b>TRPM-3 M</b>	<b>123</b>	<b>10</b>	173%
TRPM-3 K	71	6	

In beiden großen Makrophagen-Subpopulationen kommt es infolge einer Ligatur mit PBS Pumpenimplantation zu einem deutlichen Zuwachs:

Bei exsudativen Makrophagen (ED3 und TRPM3 positive Zellen) ist der Zuwachs an Makrophagen um Faktor 2 erhöht.

Bei residenten Makrophagen (ED2 und KIM2R positive Zellen) ist der Zuwachs an Makrophagen um den Faktor 1.8 erhöht.



**Abb. 24:** Die **Tabelle** und die **Grafik** vergleichen die Makrophagenanzahl (Y) im ligierten Bein und Kontrollbein 3 Tage nach Okklusion der Arteria femoralis für einzelne Makrophagen-AK (X). Man kann einen deutlichen Anstieg von Makrophagen im ligierten Bein (blau) im Vergleich zum Kontrollbein (rot) für einzelne AK erkennen. **M**-ligiertes Bein/**blau**; **K**-Kontrollbein/**rot**. Ligiertes Bein versus Kontrollbein: \* P< 0,05

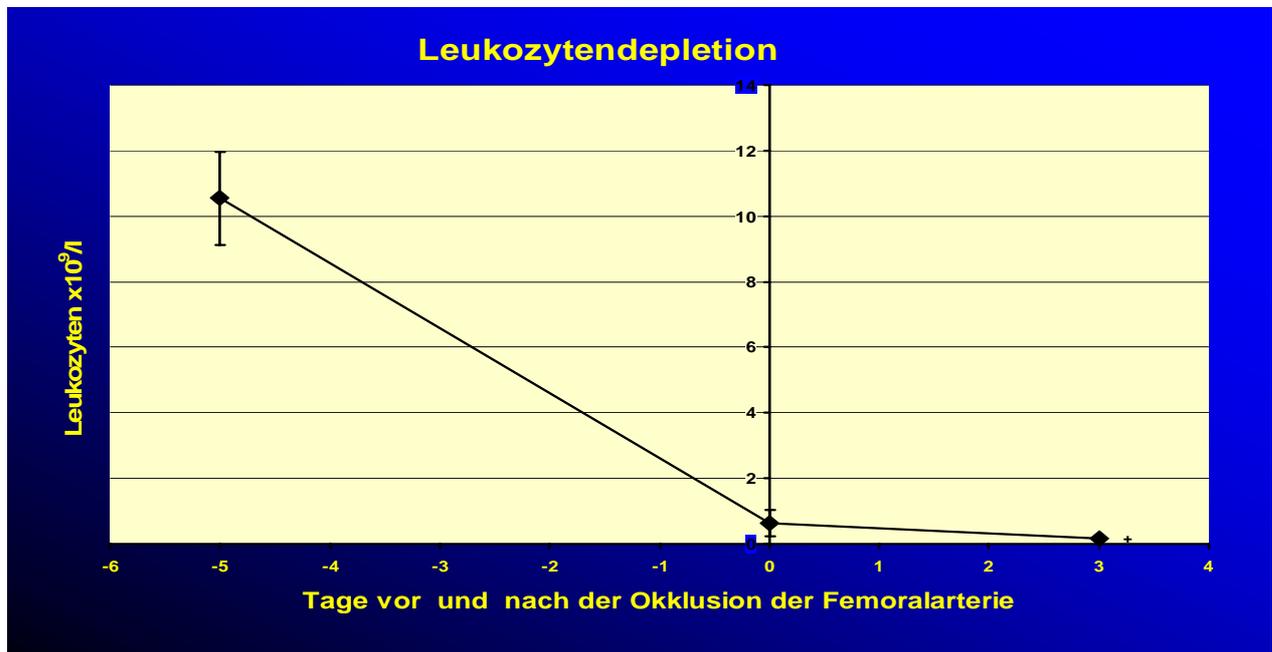
#### **Ergebnisse der Makrophagenfärbung und BRDU-Proliferationsfärbung in den Kollateralarterien nach Knochenmarkdepletion**

Über den Einfluss von Monozyten auf die Arteriogenese wird kontrovers diskutiert. Um die Rolle von Monozyten auf die Arteriogenese zu klären, haben wir vor der Induktion der Arteriogenese die Leukozyten mit Hilfe von Zyklophosphamid auf unter 5% der ursprünglichen Population zum Tag 0 und auf 1% drei Tage nach Ligatur der Arteria femoralis reduziert. Die Arteriogenese hat nach dieser Therapie in den ersten 3 Tagen (Zeitpunkt der maximalen Proliferationsgeschwindigkeit in Kollateralarterien) unter aplastischen Bedingungen stattgefunden (**Abb.25**).

Neben der Proliferationsgeschwindigkeit in einzelnen Kollateralarterie (**34**) wurden auch einzelne Makrophagensubpopulationen beurteilt (**Abb.26**). Nach der Reduktion der Monozytenpopulation konnte kein Unterschied in der Anzahl der um das Kollateralgefäß akkumulierten Makrophagen verschiedener Subpopulationen festgestellt werden. Der Proliferationsindex für einzelne Kollateralarterien wurde nach der Leukozyten- und speziell Monozytendepletion ebenfalls nicht beeinflusst (**Abb.27**). Ausserdem akkumulierten die gleichen Makrophagensubpopulationen in gleichen Quantitäten nach der Leukozytendepletion um die proliferierende Kollateralarterie (**Abb.28**).

## ► Teil 3: Einfluss von zirkulierenden Zellen auf die Arteriogenese

### Leukozytendepletion:



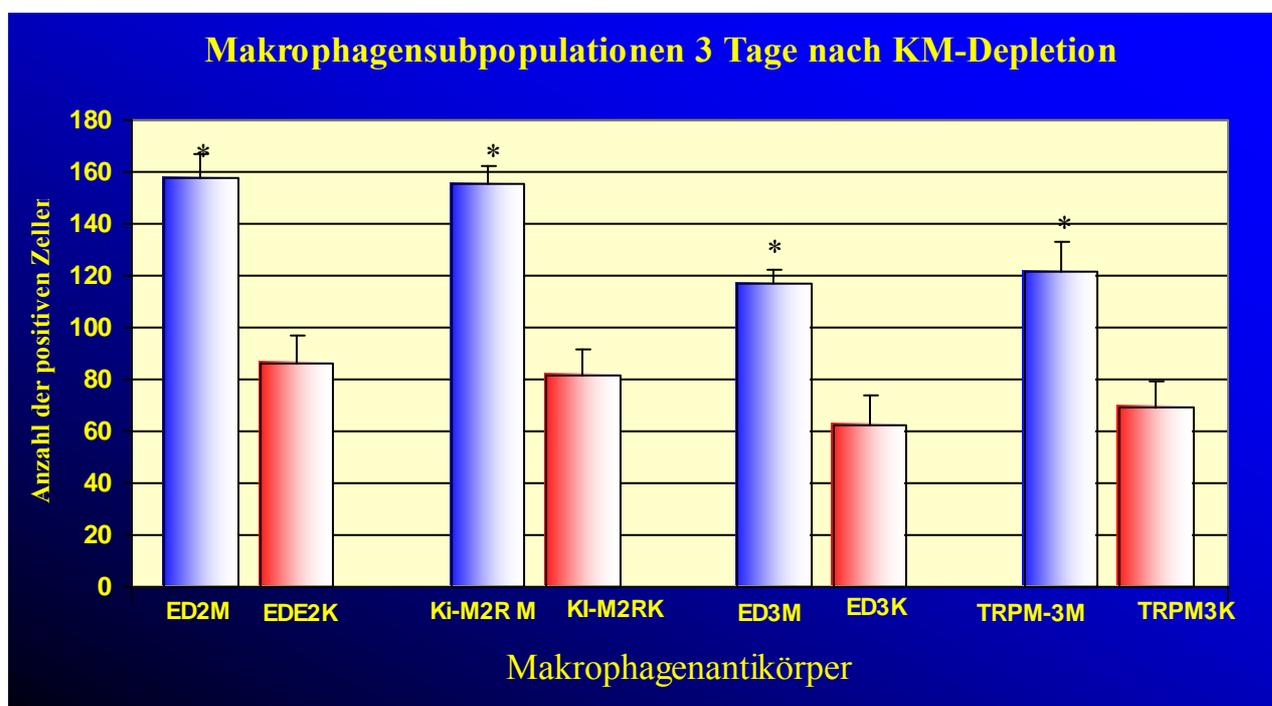
Tag	Neutrophile	Eosinophile	Basophile	Monozyten	Lymphozyten
<b>Tag -5</b>	20.6±/ 8.7 % (2.1x10 <sup>9</sup> /l)	0.8±/ 0.08 % (0.08 x10 <sup>9</sup> /l)	0±/0 % (0 x10 <sup>9</sup> /l)	<b>9.4±/0.9 %</b> <b>(0.9 x10<sup>9</sup>/l)</b>	69.0±/7.2 % (7.2 x10 <sup>9</sup> /l)
<b>Tag 0</b>	10.6±/ 9.5 % (6.1 x10 <sup>9</sup> /l)	1.4±/1.5 % (0.008 x10 <sup>9</sup> /l)	2.4±/2.5 % (0.01 x10 <sup>9</sup> /l)	<b>10.6±/2.7 %</b> <b>(0.06 x10<sup>9</sup>/l)</b>	73.2±/10.1 % (0.4 x10 <sup>9</sup> /l)
<b>Tag +3</b>	2.0 ±/ 2.8 % (0.002 x10 <sup>9</sup> /l)	2.5±/3.5 % (0.003 x10 <sup>9</sup> /l)	5.0±/1.4 % (0.006 x10 <sup>9</sup> /l)	<b>7.0±/2.8 %</b> <b>(0.009 x10<sup>9</sup>/l)</b>	86.0±/4.2 % (0.1 x10 <sup>9</sup> /l)

**Abb. 25** Die **Grafik** demonstriert den subtotalen Abfall der Gesamtleukozytenzahl nach zweimaliger Zyklophosphamid-Gabe am Tag -5 und am Tag -3. Am Tag -5, 0 (Tag der Ligatur der Arteria femoralis) und Tag +3 (Kollateralarterienentnahme) wurde die Gesamtleukozytenzahl bestimmt und Blutaussstriche für das Differenzialblutbild angefertigt. In der **Tabelle** unten sind die Daten für die einzelnen Leukozytensubpopulationen vor der Zyklophosphamidgabe (-5d), am Tag der Ligatur der Arteria femoralis (Tag 0) und am Tag der Kollateralarterienentnahme (Tag +3) gezeigt. In Klammern wird die errechnete absolute Leukozytenzahl dargestellt. Dabei kann die signifikante Abnahme in allen Leukozytensubpopulationen (auch Monozyten) festgestellt werden. Das bedeutet, dass die Arteriogenese unter aplastischen Bedingungen stattgefunden hat.

► Teil 3: Einfluss von zirkulierenden Zellen auf die Arteriogenese

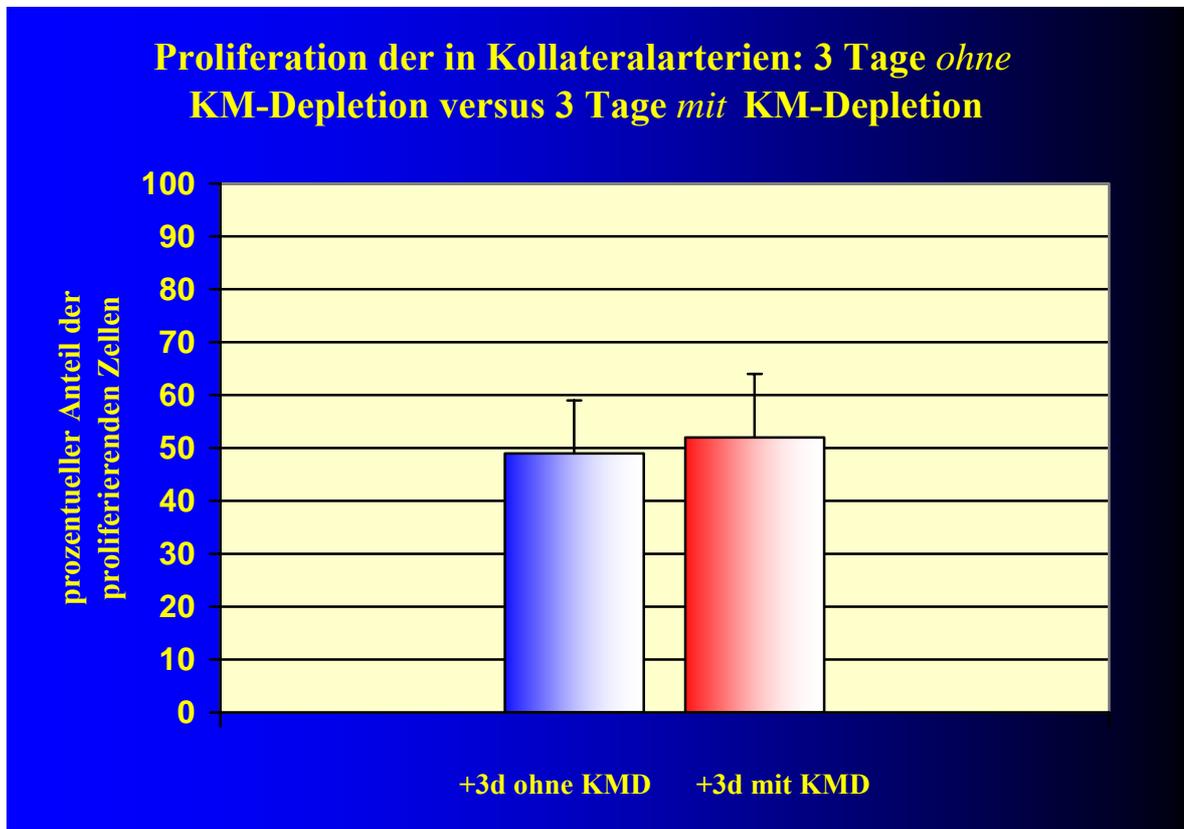
**Makrophagensubpopulationen nach KM-Depletion (3Tage nach Ligatur):**

<i>Antikörper</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>R4</i>	<i>R5</i>	<i>MW</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>	<i>STABW</i>
<b>ED2M</b>	<b>165</b>	<b>165</b>	<b>155</b>	<b>144</b>	<b>160</b>	<b>158</b>	<b>144</b>	<b>165</b>	9
<b>EDE2K</b>	91	95	87	68	90	86	68	95	11
<b>Ki-M2R M</b>	<b>150</b>	<b>160</b>	<b>160</b>	<b>160</b>	<b>146</b>	<b>155</b>	<b>146</b>	<b>160</b>	7
<b>KI-M2RK</b>	80		80	70	95	81	70	95	10
<b>ED3M</b>	<b>120</b>	<b>120</b>	<b>121</b>	<b>115</b>	<b>107</b>	<b>117</b>	<b>107</b>	<b>121</b>	6
<b>ED3K</b>	79	66	52	48	65	62	48	79	12
<b>TRPM-3M</b>	<b>120</b>	<b>140</b>	<b>110</b>	<b>124</b>	<b>112</b>	<b>121</b>	<b>110</b>	<b>140</b>	12
<b>TRPM3K</b>	78	55	78	61	73	69	55	78	10



**Abb. 26.:** Die **Tabelle** präsentiert die Daten der Makrophagenfärbung nach Knochenmarkdepletion mit Zyklophosphamid (120mg/kgKG i/v) im ligierten Bein und Kontrollbein 3 Tage nach Okklusion der Arteria femoralis bei einzelnen Tieren. In der linken Spalte der Tabelle sind einzelne makrophagenspezifische Antikörper aufgeführt. Die **Grafik** demonstriert die absolute Anzahl der Makrophagen (Y) für einzelne Makrophagen-Antikörper (X). Im ligierten Bein (blau) akkumulieren signifikant mehr Makrophagen als im Kontrollbein (rot). Ligiertes Bein versus Kontrollbein: \* P< 0,05 **M**-bezeichnet das ligierte Bein/**blau**; **K**-bezeichnet das Kontrollbein/**rot**; **MW**-Mittelwert; **Max**-maximalwert; **Min**-Minimalwert; **STABW**- Standardabweichung

**Proliferation in Kollateralarterien: 3 Tage *ohne* KM-Depletion versus 3 Tage *mit* KM-Depletion ( BRDU-Färbung )**

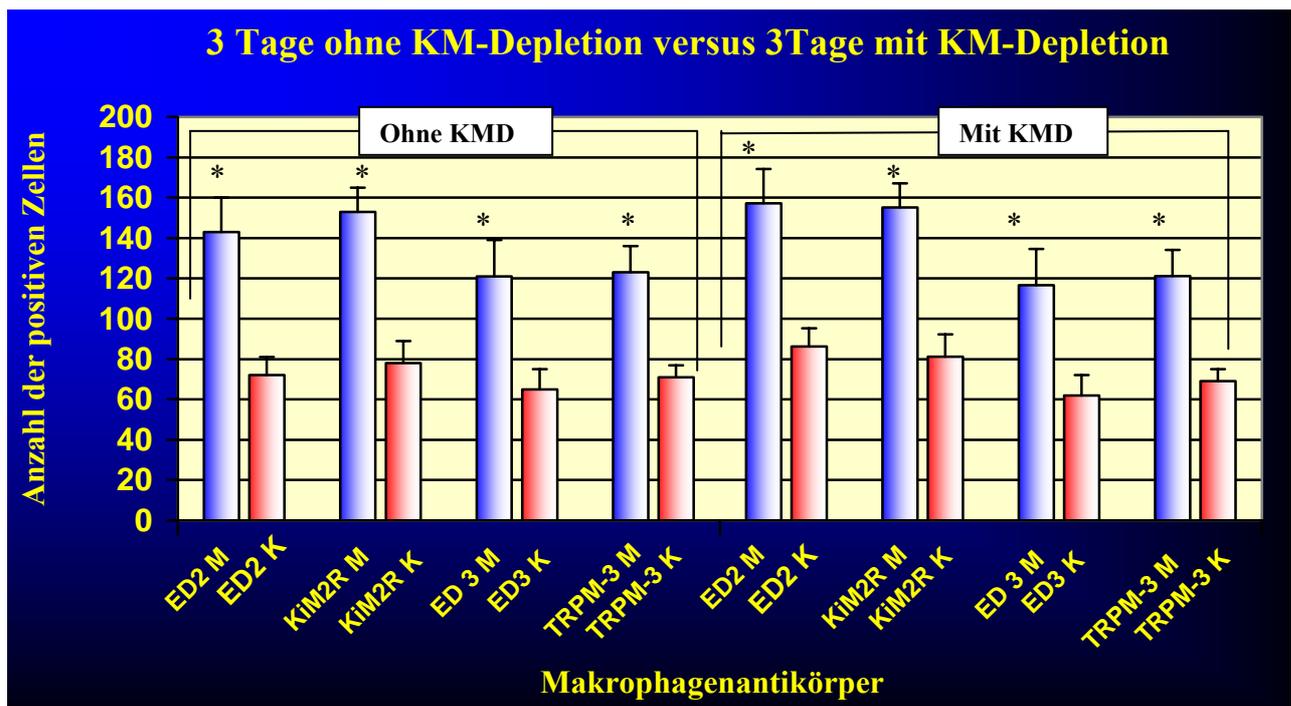


**Abb 27.:** Die **Grafik** demonstriert den Vergleich zwischen Proliferation in den Kollateralarterien 3 Tage nach Ligatur der Arteria. femoralis: ohne Knochenmarkdepletion (blau) und nach Knochenmarkdepletion (rot). Wir konnten keinen nennenswerten Unterschied im proliferativen Verhalten nach r Knochenmarkdepletion im Vergleich zu Gruppen ohne Knochenmarkdepletion feststellen. **KMD-** Knochenmarkdepletion.

## ► Teil 3: Einfluss von zirkulierenden Zellen auf die Arteriogenese

### Makrophagensubpopulationen +3 Tage ohne KMD versus +3 Tage mit KMD (KMD Knochenmarkdepletion)

<i>Antikörper</i>	<i>MW ohne KMD</i>	<i>MW nach KMD</i>	<i>STABW ohne KMD</i>	<i>STABW mit KMD</i>
<b>ED2 M</b>	<b>143</b>	157	<b>17</b>	<b>9</b>
<b>ED2 K</b>	72	86	12	<b>11</b>
<b>KiM2R M</b>	<b>153</b>	155	<b>20</b>	<b>7</b>
<b>KiM2R K</b>	78	81	18	10
<b>ED 3 M</b>	<b>121</b>	117	<b>13</b>	<b>6</b>
<b>ED3 K</b>	65	62	6	12
<b>TRPM-3 M</b>	<b>123</b>	121	<b>10</b>	12
<b>TRPM-3 K</b>	71	69	6	10



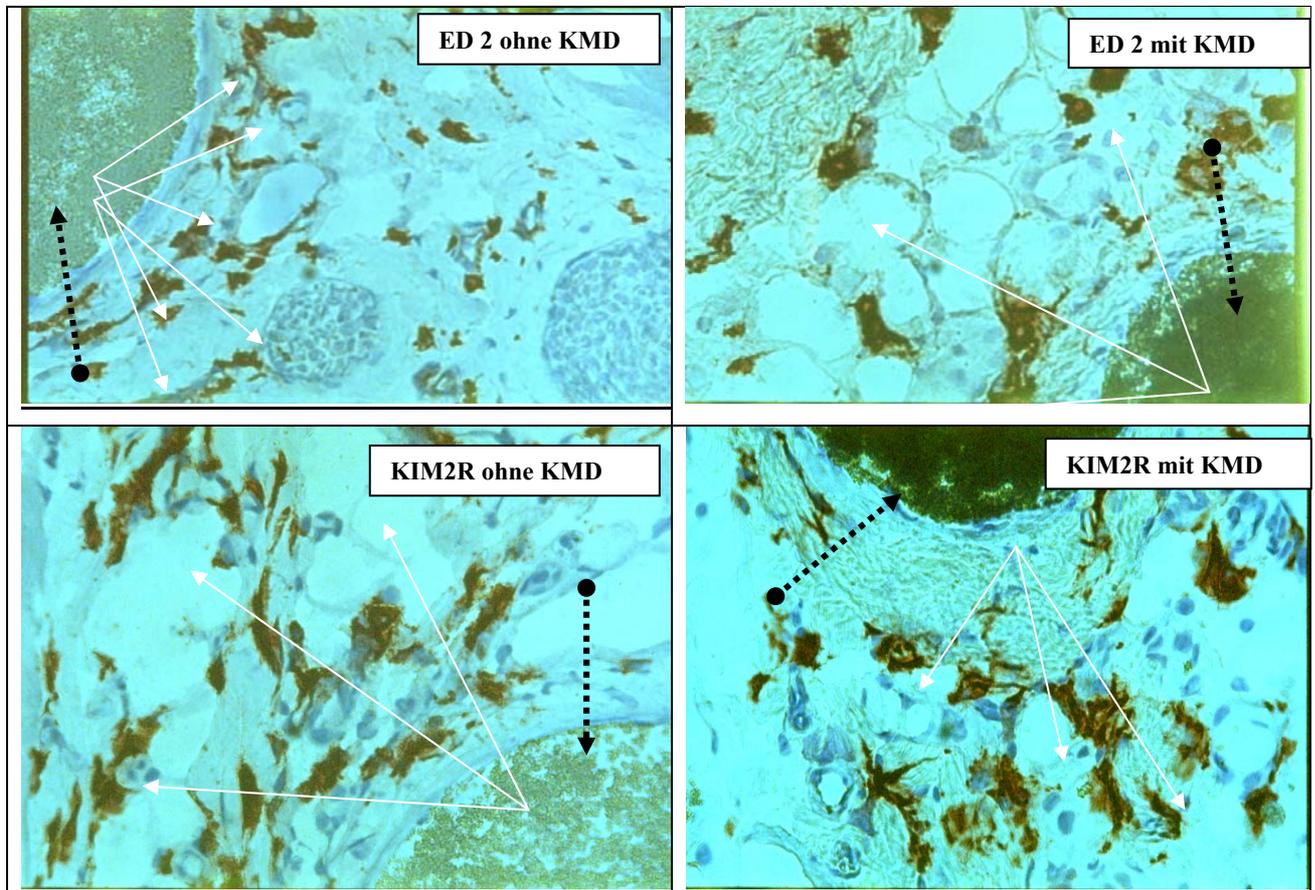
**Abb. 28:** Die **Tabelle** vergleicht die mittlere Makrophagenanzahl für einzelne Makrophagensubpopulationen in Gruppen mit KM-Depletion und ohne KM-Depletion 3 Tage nach Okklusion der Arteria femoralis für einzelne Tiere. Die **Grafik** vergleicht Mittelwerte (Y) für einzelne Makrophagen-Antikörper (X) in beiden Gruppen. Ligiertes Bein versus Kontrollbein: \* P < 0,05. **M**-bezeichnet das ligierte Bein/**blau**; **K**-bezeichnet das Kontrollbein/**rot**; **MW**-Mittelwert; **Zuwachs**%-prozentueller Zuwachs an rekrutierten Makrophagen; **STABW**- Standardabweichung.

## ► Teil 3: Einfluss von zirkulierenden Zellen auf die Arteriogenese

### Residente Makrophagensubpopulationen mit /ohne KMD 3 Tage nach Ligatur (KMD Knochenmarkdepletion)

+3 Tage ohne KM-Depletion

+3Tage mit KM-Depletion



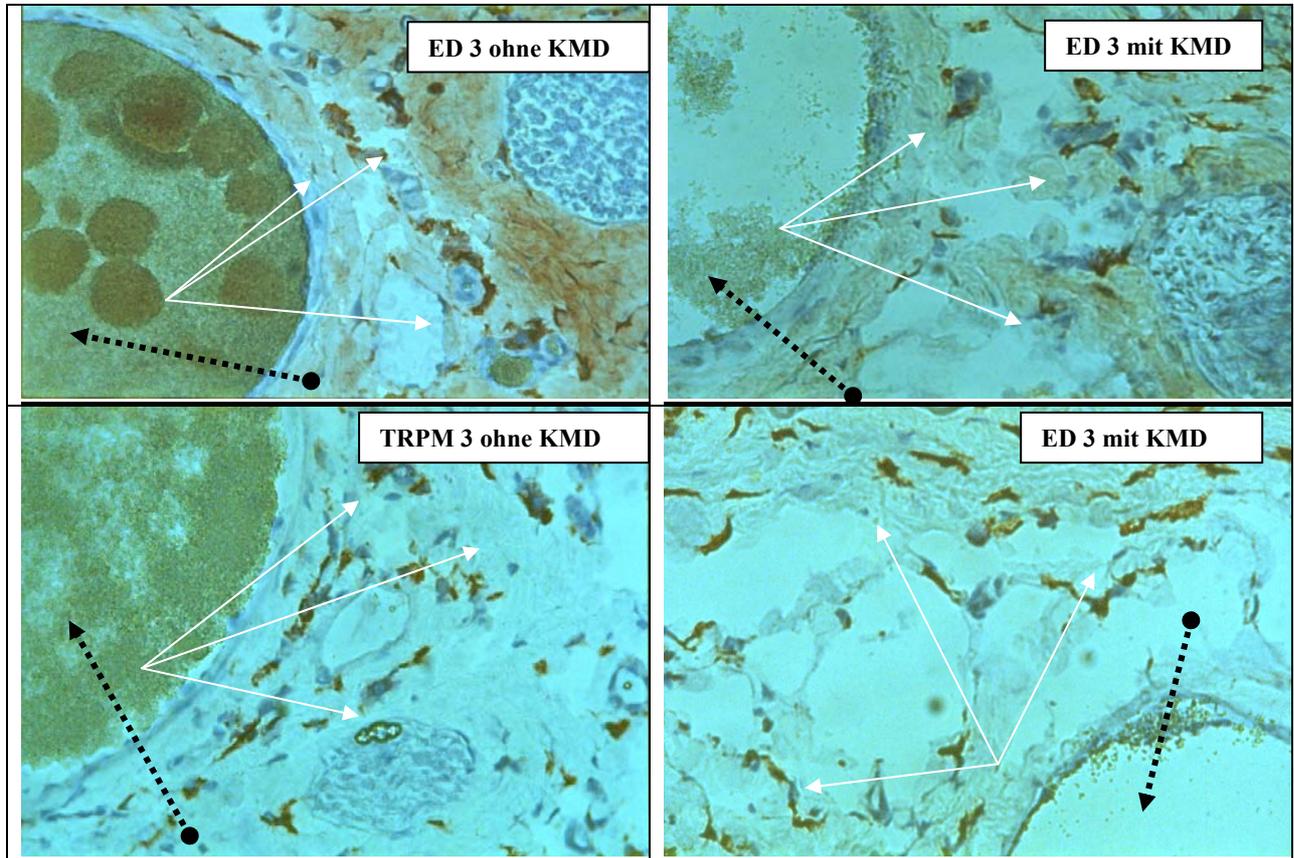
**Abb. 29.:** Auf den Abbildungen werden **residente** Makrophagen (braune Färbung) (x400) im ligierten Bein 3 Tage nach Ligatur der Arteria femoralis in den Gruppen nach KMD und ohne KMD verglichen. Die weißen Pfeile zeigen auf einzelne Makrophagen, die dickeren punktierten Pfeile auf das Gefäßlumen der Kollateralarterien. **KMD**-Knochenmarkdepletion

## ► Teil 3: Einfluss von zirkulierenden Zellen auf die Arteriogenese

### Exsudative Makrophagensubpopulationen mit /ohne KMD 3 Tage nach Ligatur

#### +3 Tage ohne KM-Depletion

#### +3Tage mit KM-Depletion



**Abb. 30.:** Auf den Abbildungen werden **exsudative** Makrophagen (braune Punkte) (x400) im ligierten Bein 3 Tage nach Ligatur der Arteria femoralis in den Gruppen nach KMD und ohne KMD verglichen. Die weißen Pfeile zeigen auf Makrophagen, die dickeren punktierten Pfeile auf das Gefäßlumen der Kollateralarterien. **KMD**-Knochenmarkdepletion

## Zusammenfassung der Ergebnisse:

In dieser **dreiteiligen** Arbeit wurden beurteilt:

### ► *morphologische Prozesse während der MCP-1 stimulierter und spontaner Arteriogenese:*

1. Radiologische Quantifizierung: Die angiographische Darstellung zeigte einen 25 % igen Zuwachs an Kollaterallarterienzahl in der MCP-1 Gruppe.
2. Quantifizierung des positiven Remodelings: Die BrdU-Färbung zeigte, dass 15% mehr Zellen der Gefäßwand (Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Adventitiazellen) sich in der MCP-1 Gruppe geteilt haben.
3. Immunphenotypisierung und Quantifizierung der Makrophagenakkumulation: in der MCP-1 Gruppe konnte ein deutlicher Anstieg sowohl an exsudativen als auch an residenten Makrophagen festgestellt werden.
4. Der KM-Depletionsversuch (im Teil 3) demonstrierte eine untergeordnete Rolle von blutzirkulierenden Zellen (speziell Monozyten) in der Vermittlung von MCP-1 Wirkung während der Arteriogenese.

### ► *Makrophagenkinetik:*

Unsere Ergebnisse deuten auf eine essentielle Rolle der Makrophagen in der Frühphase (+3d) der Arteriogenese demonstrieren. Die maximale Proliferation von Kollateralarterien (~80%) wurde von einer deutlichen perivaskulären Makrophagenakkumulation in allen Subpopulationen (~120%) begleitet.

### ► *Die Rolle von zirkulierenden Zellen im Prozess der Arteriogenese :*

Nach einer chemischen Knochenmarkdepletion (bis zur Aplasie) konnte kein Unterschied in beiden Schlüsselprozessen während der Arteriogenese (positives Arterienwandremodeling und perivaskuläre Makrophagenakkumulation) festgestellt werden.

Diese Ergebnisse unterstützen das Konzept der Arteriogenese als einen lokalen Prozess, der eher von der Mobilisierung lokaler Ressourcen als vom Einfluss blutzirkulierender Zellen abhängt.

## 4. Diskussion

### Arterienremodeling und Monozyten/Makrophagen:

Die Arteriogenese und andere angiologische Prozesse (Atherosklerose, Angiogenese, Arterienremodeling nach Ballon-Trauma) sind mit einer signifikanten perivaskulären Infiltration von mononukleären Zellen im ligierten Bein assoziiert. Immunhistochemische Färbungen zeigten dabei eine überwiegende Präsenz von Zellen mit monozytärem Antigenmuster. **(1, 31, 32, 45, 49, 51, 57, 67, 68, 112, 145)**

In der aktuellen Arbeit konnte das gleiche Phänomen einer vermehrten perivaskulären Zellinfiltration um die Kollateralarterie beobachtet werden. Die detailliertere Immunphänotypisierung dieser perivaskulären Zellen ergab, dass es sich immunphenotypisch um zwei große Makrophagensubpopulationen handelt **(69-71)**:

- exsudative/rekrutierte Makrophagen (ED3 oder TRPM-3 positive Zellen)
- residente/gewebsständige Makrophagen (ED2 Ki-M2R positive Zellen)

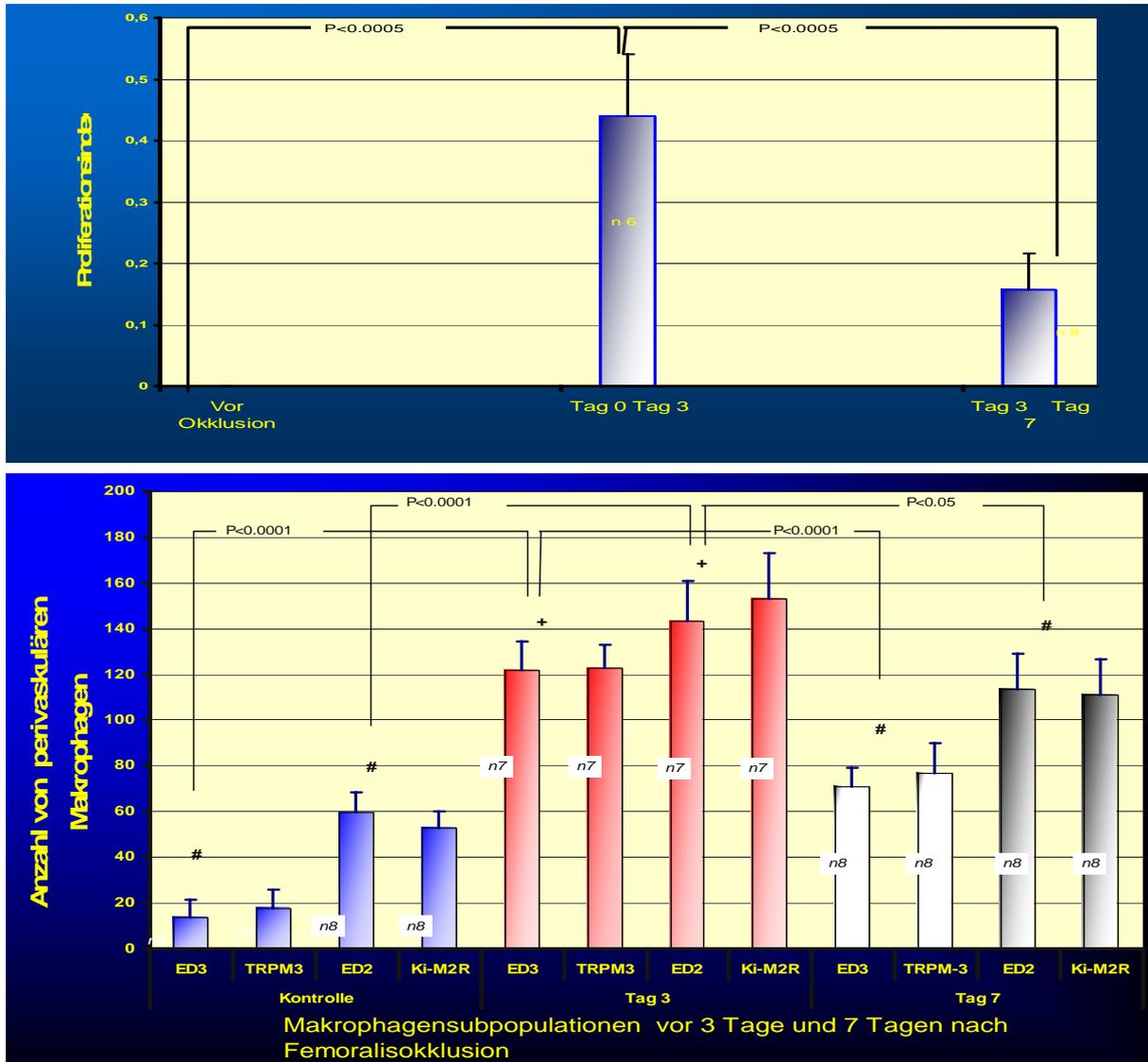
Neu in dieser Arbeit ist nicht nur die Phänotypisierung der perivaskulären Makrophagen während der Arteriogenese, sondern auch die **Quantifizierung** einzelner Immunphänotypen von Makrophagen. **(146-148)**

Interessanterweise wurde im ligierten und nicht ligierten Bein die Präsenz der gleichen Makrophagensubpopulationen festgestellt. Im ligierten Bein war aber die Anzahl der einzelnen Makrophagensubpopulationen deutlich höher als im nicht ligierten Bein. (140-143)

Die Präsenz der gleichen Makrophagensubpopulationen im nicht ligierten Bein, in dem kein Prozess der Arteriogenese stattfindet, zeigt uns eine Präsenz dieser Zellen vor der Induktion der Arteriogenese. Nach der Initiation der Arteriogenese durch Okklusion des Magistralgefäßes haben wir einen deutlichen Anstieg in allen vier Subpopulationen beobachten können. Hierbei ist der Anstieg für ED2 und Ki-M2R positive Zellen (so genannte residente Makrophagen) deutlich stärker ausgefallen als für ED3 und TRPM3 positive Zellen (so genannte exsudative Makrophagen).

Der parallele Anstieg von allen vier Makrophagensubpopulationen im perivaskulären Gewebe ohne Bevorzugung der exsudativen Makrophagen und die Proliferation in der Arterienwand der Kollateralarterie betonen die essentielle Rolle von allen vier Immunphänotypen für die Arteriogenese.

Arterienremodeling und Makrophagenakkumulation: 7 Tage versus 3 Tage



**Abb 31.** Die Abbildung zeigt uns die Gegenüberstellung der Proliferation in der Kollateralarterienwand (das obere Diagramm) und der Akkumulation der perivaskulären Makrophagen (das untere Diagramm) zu verschiedenen Zeitpunkten: **a)** vor Ligatur der Arteria femoralis als Ausgangspunkt (die blauen 4 Säulen des unteren Diagramms), **b)** 3 Tage nach der Ligatur (die roten 4 Säulen) und **c)** 7 Tage nach Ligatur der Arteria femoralis (die grauen 4 Säulen rechts). Der größte Anstieg der Proliferation in der Kollateralarterie 3 Tage nach Ligatur geht mit der intensivsten Akkumulation perivaskulärer Makrophagen (die roten 4 Säulen) in allen 4 Immunphänotypen einher. Die Proliferationsration der Kollateralarterien verlangsamt sich zum siebten Tag und parallel dazu nimmt die Anzahl der Makrophagen in allen Subpopulationen (die grauen 4 Säulen) ab.

In einer vor kurzem veröffentlichten Studie konnten wir zeigen, dass die Arteriogenese ihren submaximalen Entwicklungsgrad (70-80%) schon 3 Tagen nach Okklusion der Arteria femoralis erreicht. (34) Dabei kann eine frühe Phase ( die ersten 3 Tage ), in der die maßstabgebenden Initiationsprozesse stattfinden, von einer späteren Phasen (zwischen drittem und siebtem Tag), in der es überwiegend zur Reifung des expandierten Kollateralarteriennetzes kommt, unterschieden werden.

Als einer der ersten Schritte in der Untersuchung der Arteriogeneseinitiation wurde in der aktuellen Arbeit außer der Intima/Media-Proliferation auch die Beteiligung perivaskulärer Zellen am Kollateralenwachstum untersucht. Dabei konnte eine massive makrophageale Akkumulation um die Kollateralarterien nach der Induktion der Arteriogenese festgestellt werden. Die Immunphänotypisierung der Makrophagen zu verschiedenen Zeitpunkten (+3d und +7d) ergab das gleiche Subpopulationenspektrum ohne Beteiligungsprävalenz bestimmter Immunphänotypen.

Interessanterweise zeigte sich auch die Präsenz der Makrophagen aller vier Immunphänotypen im Kontrollbein. Sie könnten als Ausgangspopulation für die lokale Makrophagenteilung dienen. Dies war ein erster Hinweis, dass der Anstieg von perivaskulären Makrophagen nach Ligatur der Magistralarterien überwiegend durch ihre lokale Teilung geschieht und nicht durch die Rekrutierung der Leukozyten (Monozyten).

In den ersten 3 Tagen nach Ligatur der Arteria femoralis erreicht die Proliferationsgeschwindigkeit ihren maximalen Wert. Die begleitende Akkumulation von perivaskulären Makrophagen erreicht zum gleichen Zeitpunkt ihr Maximum. Mit der Verlangsamung der Proliferationsgeschwindigkeit zum siebten Tag kommt es parallel zur Abnahme der perivaskulären Makrophagenanzahl aller Phänotypen um 21-40%. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, das „Schicksal“ der perivaskulären Makrophagen abzuklären. Geht ein Teil der Makrophagen den apoptotischen Tod ein? Oder transformiert sich ein Teil der Makrophagen in Zellen anderer Art z.B. Endothelzellen?

Die Parallelität zwischen der Proliferationsgeschwindigkeit in Kollateralarterien und der Anzahl perivaskulärer Makrophagenakkumulation weist auf die essentielle Rolle der Makrophagen verschiedener Subpopulationen im Prozess der Arteriogenese hin.

### **Mögliche funktionelle Mechanismen der Makrophagenbeteiligung an der Arteriogenese (74, 101)**

Es gibt mehrere mögliche Mechanismen, über die Makrophagen sich am Kollateralarterienwachstum beteiligen können.

Die Assoziation zwischen der Proliferation in der Gefäßwandzellen und der deutlichen Makrophagenakkumulation kann man mit den lytischen und phagozytären Eigenschaften der Makrophagen begründen. Während der Arteriogenese kommt es zu einer massiven räumlichen Expansion der Kollateralarterien, wobei alte Strukturen ab- und neue aufgebaut werden. Abgebaute Bestandteile werden dann abtransportiert und reutilisiert. Makrophagen könnten in dieser räumlichen Anpassung eine führende Rolle spielen.

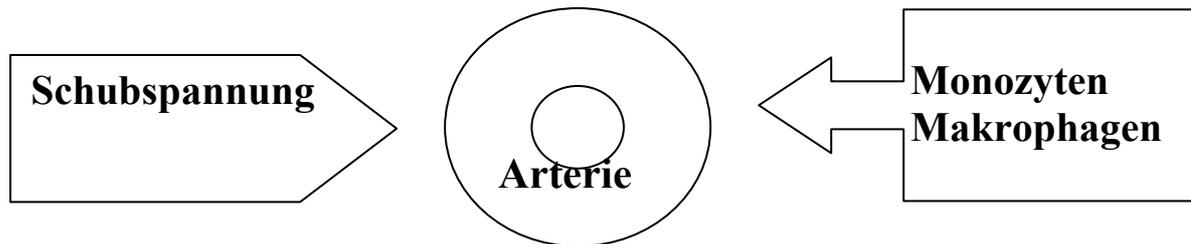
Zudem ist bekannt, dass perivaskuläre Makrophagen in der Lage sind mehrere Zytokine (wie bFGF, MCP-1 MIP-1 und TNF alfa) zu sezernieren und damit die Umbauvorgänge in der Gefäßwand zu modulieren. Zytokine dienen in diesem Prozess als lokales „Kommunikationsmittel“.

Weiterhin könnten Makrophagen sich in Zellen anderer Art (z.B. Endothelzellen) transformieren. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass eine Subpopulation von Monozyten als Progenitorzellen für Endothel und andere Zelltypen fungieren kann. **(149)**

Der Versuch, die Rolle der Makrophagen durch ihre lokale Depletion mit Hilfe von Chlodronat-Liposomen abzuklären, ist in unserer Studie fehlgeschlagen. Nach i/v Gabe von Liposomen kam es wegen der schlechten Endothelgängigkeit zu keiner nennenswerten Depletion der perivaskulären Makrophagen. Auch ihre lokale s/c Gabe im Gebiet der Kollateralarterien zeigte wegen der inhomogenen Verteilung keine wesentliche Wirkung auf die Makrophagen. Außerdem wurde durch die lokale Gabe auch das perivaskuläre Gewebe zerstört, was die adäquate Makrophagenauszählung unmöglich gemacht hätte.

Der genaue Einfluss und die molekularen Mechanismen der Makrophagenbeteiligung im neointimalen Umbau der Arterienwand sind Gegenstand zukünftiger Studien.

**Schubspannung oder Makrophagen?**



Einige Autoren sehen die Schubspannung einzig und allein als den Hauptfaktor der Arteriogenese an. Sie postulieren, dass der ganze Arteriogeneseprozess nur durch Anpassung der Arterienarchitektur und die neointimaler Proliferation an die Schubspannung geprägt wird. **(38, 39, 145)**

In Studien dieser Art (Darmischämiemodell bei Ratten) konnte eine gewisse Dynamik der Arterienwand Anpassung an der Schubspannung festgestellt werden. Mit der abrupten Zunahme der Schubspannung in den Kollateralen nach der Okklusion des Magistralgefäßes wurde eine deutliche Hypertrophie und Hyperplasie der Endothel- und glatten Muskelzellen in betreffenden Kollateralarterien in der ersten Woche festgestellt, was in einer erhöhten Zelldichte in der Arterienwand resultierte. Mit der Normalisierung der Schubspannung nach zwölf Wochen, sind Intima- und Mediahyperplasie und deren Zelldichte rückläufig gewesen. Diese Ergebnisse führten einige Autoren zu dem Schluss, dass die Arteriogenese einzig und alleine eine Anpassung der Intima und Media an die Flussverhältnisse (und damit auch Shear Stress) darstellt. Die perivaskulären Makrophagen dürften laut dieser Arteriogenese-Studien eigentlich keine wesentliche Rolle während des Remodelingsprozesses spielen. **(37, 40)**

Unsere Ergebnisse zeigen aber, dass nach Ligatur der Arteria femoralis, es zu einem statistisch signifikanten Anstieg aller Makrophagsubpopulationen kommt. Dieser Anstieg ist besonders ausgeprägt in den ersten drei Tagen nach Okklusion. In dieser Zeit findet ca 80% der neointimalen Proliferation der Kollateralen statt. Es ist unwahrscheinlich, dass die strenge Assoziation der gesteigerten Umbauvorgänge in der Gefäßwand mit der vermehrten Makrophagenakkumulation zufällig ist. Der mehrfache Anstieg der perivaskulären Makrophagen deutet auf ihre wichtige Rolle für das Arterienwandremodeling und damit für die Anpassung an die neuen Flussverhältnisse und Shear Stress hin. Diskrepanzen in der Beurteilung der Rolle von Makrophagen im Arterienremodeling könnten modellbedingt sein. (Darmischämiemodell und Extremitätenischämiemodell).

In mehreren Studien ist gezeigt worden, dass aktivierte Makrophagen einen Einfluss auf das Gefäßwachstum haben. Dies bedeutet, wenn Makrophagen während des Kollateralarterienwachstums akkumulieren, dann hat dies sehr wahrscheinlich auch einen Einfluss auf den Prozess der Proliferation in den Kollateralarterien.

## Hypothesen über Makrophagenakkumulation:

Zur Erklärung der Genese des Anstiegs von perivaskulären Makrophagen im ligierten Bein kommen zwei Mechanismen in Betracht.

**1.** Rekrutierung von zirkulierenden Zellen bzw. Makrophagen durch lokale Überexpression von Adhäsionsmolekülen und MCP-1. Diese Zellen können sich in den ersten drei Tagen nach ihrer Einwanderung ins Zielgewebe zu Makrophagen differenzieren. **(32, 67-69, 74).**

Diese Annahme stützt sich sowohl auf Arteriogenesestudien als auch auf zahlreiche Arbeiten aus anderen vaskulären Gebieten (Artherosklerose, Ballon-Trauma nach Angioplastie, Angiogenese).

Die Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, dass es während der Arteriogenese (aber auch in mehreren anderen vaskulären Prozessen) zu einer endothelialen Hochregulierung von leukozytären Zelladhäsionsmolekülen wie ICAM-1/VCAM-1 kommt, die in der Leukozytenrekrutierung involviert sind. **(32)** Auch die lokale Hochregulation von anderen Adhäsionsmolekülen (wie P-Selektin und  $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptoren), die in anderen vaskulären Modellen relevant sind, könnten eine Rolle spielen. Interessanterweise umfasst die Distribution von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1, P-Selektin) sowohl die Gefäßwand (Intima und Adventitia) als auch das perivaskuläre Gewebe.

Ob diese Assoziation zwischen Makrophagenakkumulation und Hochregulation von Adhäsionsmolekülen (vaskulär und perivaskulär) auch auf den Fall der Arteriogenese zutrefte, muss in weiteren Studien geklärt werden. **(33, 44, 90-92, 94, 95, 122).**

Außerdem würde sowohl die lokale Überexpression von MCP-1 in der Arterienwand und Makrophagen (Atherosklerosestudien, Angiogenesestudien, Ballon-Trauma-Studien) als auch eine CCR-2 Rezeptor Expression von Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Makrophagen diese Hypothese unterstützen **(43, 50, 89, 97-100, 110-112, 114, 137, 150, 151).**

Die Abhängigkeit der Rekrutierung von Monozyten aber **auch von Makrophagen** durch Adhäsionsmoleküle (CCR-2, VCAM-1, ICAM-1, E- und P-Selektine) und lokale MCP-1 Überexpression wurde in mehreren Studien gezeigt. **(44, 50, 95, 98, 99, 112, 150, 151)**

**2.** Der Anstiegs von perivaskulären Makrophagen während der Arteriogenese könnte **auf eine lokale Proliferation von präexistenten Makrophagen** in allen Subpopulationen zurückzuführen sein. Dieser Weg erscheint aus ergonomischer und zeitlicher Sicht sinnvoller, da die Makrophagen sich direkt vor Ort teilen können und nicht erst als Monozyten einwandern und dann noch in die Makrophagen transdifferenzieren müssen. Die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen *in vitro* beansprucht eine Woche. In unserem Experiment sind sie schon nach drei Tagen im perivaskulären Raum in großen Quantitäten vorhanden.

Diese Hypothese wird durch die Beobachtung aus der aktuellen Studie unterstützt, dass wir in den BRDU gefärbten Schnitten (Proliferationsmarker) ein sogenanntes Sternhimmelphänomen um das proliferierende Gefäß beobachten konnten, das auf die Teilung von perivaskulären Zellen hinweist. Da der größte Anteil von perivaskulären Zellen das Antigenmuster von verschiedenen Phänotypen von Makrophagen aufweisen, kann man indirekt auf eine sehr starke lokale proliferative Aktivität der Makrophagen um die proliferierende Arterie schließen.

Der genauere Beweis der Proliferation von perivaskulären Makrophagen muss in weiteren Studien geklärt werden. Besonders interessant ist, ob die Proliferation in allen Makrophagensubpopulationen stattfindet. Vorläufige Ergebnisse aus einer noch laufenden Studie mit einer Doppelfärbung von perivaskulären Makrophagen mit BRDU als Proliferationsmarker und ED2 als Makrophagenmarker unterstützen weiterhin unsere Annahme der lokalen Teilung von Makrophagen (aktive Teilung der ED2-markierten Zellen). Zur Beantwortung der kardinalen Frage nach der Herkunft der Makrophagen, insbesondere von ED3 und TRPM3 positiven Zellen (sog. exsudativen Makrophagen), während der Arteriogenese haben wir Ratten vor der Femoralarterienligatur mit Hilfe von Cyclophosphamid Knochenmark depletiert und nach 3 Tagen zum Zeitpunkt maximaler Makrophagenakkumulation die Anzahl der exsudativen und residenten Makrophagen bestimmt.

### **Knochenmark-Depletion hatte keine Auswirkung auf den *Proliferationsquotienten* der Arterie:**

Überraschenderweise hat sich das proliferative Verhalten der wachsenden Kollateralarterien (Endothel- und glatte Muskelzellen) nach der vollständigen Knochenmarkeradikation (bis zur Aplasie) nicht verändert. Die fehlende Minderung in der Proliferationsrate der Intima/Media der Kollateralarterien trotz maximaler Reduktion der zirkulierenden Monozyten, zeigt, dass die Monozytenmigration keinen limitierenden Schritt in der Proliferation der Kollateralarterien darstellt. Zwar kann die Intima- und Media-Neubildung mit einer Monozytenakkumulation assoziiert sein, Ihre Funktion scheint aber hinsichtlich der Arteriogenese nicht spezifisch zu sein.

Die Funktionen, die den Monozyten zugesprochen wurden, wie Produktion der Zytokinen und proteolytische Fähigkeiten können von anderen Zellen übernommen werden.

Zytokine können ubiquitär produziert werden. Speziell das stärkste proarteriogene Zytokin MCP-1 kann von den Gefäßkomponenten (Endothelzellen und Mediazellen) selbst und von perivaskulären Zellen (Makrophagen) produziert werden und auch direkt auf diese wirken (96). Die proteolytischen Aktivitäten, die für die Umbauprozesse in der Gefäßwand unabdingbar sind, können auch von Makrophagen gewährleistet werden.

**Knochenmark-Depletion hat keine Auswirkung auf Makrophagensubpopulationen:**

In vielen Studien über neointimaproliferative Prozesse (Atherosklerose, Arteriogenese, Angiogenese) wurde parallel zur Endothellaktivierung/Teilung auch eine Akkumulation von Monozyten oder Makrophagen beobachtet. (45, 50, 98, 145, 151)

Die Tatsache, dass sich Monozyten zu Makrophagen transformieren können und sich im Bereich der neointimaler Proliferation ansammeln, haben zur logischen Annahme geführt, dass Monozyten sich auch während der Arteriogenese zu Makrophagen umwandeln müssten. Dieses Erkenntnis hat einige Autoren zur Unterteilung der Makrophagen in zwei große Subgruppen nämlich residente und exsudative Makrophagen veranlasst. Eine solche Unterteilung berechtigt uns zur Annahme, dass zumindest die exsudativen Phänotypen (ED3 und TRPM3 positive Zellen) Monozyten als Vorstufe haben könnten. Unsere Idee war, mit der chemischen Knochenmarkdepletion (bis zur völligen Aplasie) die Rolle der Blutleukozyten (und ganz speziell Monozyten) hinsichtlich ihrer Kontribution an den exsudativen Immunphänotypen zu untersuchen.

Die Auszählung nach einzelnen Phänotypen zeigte überraschenderweise (genauso wie bei der Bestimmung des Proliferationsquotienten für Intima/Media) keine signifikante Abweichung in allen vier Phänotypen der Makrophagen von der Kontrollgruppe. (152-154) Unser Depletionsversuch relativiert die Vermutung einiger Autoren, dass man mit zwei makrophagenspezifischen Antikörpern (ED3 und TRPM-3) aus vielen Immunphänotypen der Makrophagen den von den Monozyten abstammenden Anteil (zumindest während der Arteriogenese) herausfärben könnte. Der exsudative Makrophagenanteil blieb in unseren Experimenten nach KM-Depletion unbeeinflusst. Auch die vorherige Präsenz aller vier Immunphänotypen der perivaskulären Makrophagen vor der Arteria femoralis Ligatur (im Kontrollbein) betont, dass keine Zellen aktiv rekrutiert wurden. Eine solche vorherige Präsenz aller Makrophagenphänotypen suggeriert den lokalen Charakter der Zellproliferation. Blutmonozyten könnten einen zusätzlichen Einfluss auf die Endothel- und glatte Muskelzellproliferation ausüben, sie sind aber für die Kollateralarterienentwicklung entbehrlich.

**Leukozytäres Reboundphänomen und Makrophagenakkumulation**

Dies bedeutet nicht, dass die zusätzliche Gabe oder Aktivierung von Monozyten keinen Einfluss auf Arteriogenese hat. Es bedeutet lediglich, dass Monozyten offensichtlich für die Arteriogenese und die gleichzeitige Akkumulation von Makrophagen nicht essentiell sind.

An zwei Tieren, die nach der Vorbehandlung mit Zytostatika ein massives Reboundphänomen (36.000-48.000 Leukozyten bei einem Normalwert von 12.000-15.000) nach sieben Tagen entwickelt haben, konnten wir auch einen ca. zwanzigprozentigen Zuwachs an perivaskulären Makrophagen beobachten. Dieses Ergebnis lässt einen Beitrag zirkulierender Zellen an den perivaskulären Makrophagen erkennen. Ein vergleichbares Reboundphänomen nach KM-Depletion mit Verbesserung der Durchblutung wurde auch von der Arbeitsgruppe Schaper beschrieben.(68)

Die Charakterisierung von ED3 bzw. TRPM-3 positiven Zellen als „exsudativen“ Makrophagen basiert auf zwei Befunden:

- a) Einerseits auf der Fähigkeit der Monozyten sich *in vitro* zu Makrophagen zu entwickeln. (74)
- b) Andererseits auf den Ergebnissen mit der lokalen MCP-1 Überexpression, wobei es nach einem raschen Anstieg von Monozyten (ED1 positiven Zellen) zu einem um wenige Stunden versetzten Anstieg von exsudativen Makrophagen (ED3 und TRPM3 positiven Zellen) kam. (69)

Diese Studien führen logischerweise zur Annahme, dass die Monozyten sich nach ihrem Einwandern ins Gewebe zu Makrophagen transformieren. Dabei wurde eine absolute Abhängigkeit der exsudativen Makrophagen vom Nachschub an Monozyten angenommen.

Die Ergebnisse unserer Depletionsversuche erlauben uns Spekulationen darüber, dass die Vermehrung von „exsudativen“ Makrophagen nicht nur auf dem „monozytären“ Wege möglich ist. Die Untersuchung der perivaskulären Makrophagen im Kontrollbein ergab das gleiche makrophagale Antigenmuster mit Prädominanz von residenten Immunphänomenen der Makrophagen. Diese exsudativen und residenten Makrophagen des Kontrollbeins könnte man als Ausgangspopulation bezeichnen, die interessanterweise schon vor der Initiation der Arteriogenese durch Okklusion vorhanden sind. Durch Okklusion kommt es zu einer deutlichen Intensivierung aller vaskulären und perivaskulären Prozesse. Die Vermehrung einzelner Ausgangssubpopulationen von Makrophagen geschieht dabei höchstwahrscheinlich unmittelbar vor Ort durch Teilung von präokklusiv bereits vorhandenen Makrophagen.

Ob die Erneuerung dieser perivaskulären Grundsubpopulation unter normalen Bedingungen (ohne Okklusion) von den blutzirkulierenden Zellen (und speziell Monozyten) abhängig ist, kann man aus

dem Depletionsversuch mit starkem Reboundphänomen nur vermuten. Dabei zeigte sich proportional zur Leukozytose auch eine vermehrte Akkumulation von perivaskulären Makrophagen um das Kollateralgefäß.

Unsere Ergebnisse erlauben uns die Annahme von mehreren alternativen Wegen der zellvermittelten Arteriogenese. Diese Aussage stützt sich auf zwei gegensätzliche Phänomene. Einerseits zeigt die totale Knochenmark-Depletion keinen Unterschied im Proliferationsindex von Intima/Media und der Anzahl einzelner Makrophagenphänotypen zur Kontrollgruppe und andererseits geht das massive leukozytäre Reboundphänomen mit einer deutlichen Vermehrung von perivaskulären Makrophagen einher. Der ausbleibende Effekt der Monozytendepletion auf die Neointimabildung und auf die Makrophagenakkumulation erlaubt uns die Vermutung, dass Monozyten während der Arteriogenese zwar entbehrlich sind, können aber einen zusätzlichen Einfluss auf die Endothel- und glatte Muskelzellproliferation ausüben.

### 3 Tage Ligatur versus 7 Tage Ligatur

Wie bereits beschrieben, beobachteten wir zwischen dem Tag +3 und dem Tag +7 nach Ligatur der Arteria femoralis eine signifikante Abnahme der perivaskulären Makrophagenakkumulation. Über die Genese der Abnahme in allen Subpopulationen nach dem dritten Tag kann zu diesem Zeitpunkt nur spekuliert werden. Einerseits könnten die Makrophagen einen apoptotischen Tod nach intensiver Beanspruchung eingehen. Andererseits wären die intensiven Umbauprozesse mit mehrfacher Lumen- und Wanddickezunahme in den rekrutierten Kollateralen schon nach einer Woche abgeschlossen und der Bedarf an Aufräumaktionen und Zytokinmodulation wäre dann nicht so groß wie in der Frühphase. Die Apoptose von Makrophagen während des Kollateralwachstums ist bisher *in vivo* nicht gezeigt worden. (49)

Unsere Ergebnisse widersprechen nicht den Arbeiten, in denen die Assoziation zwischen der Arteriogenese und Monozyten demonstriert werden konnte. (32, 68) Wie bereits erwähnt, bedeutet eine Verbesserung des Kollateralarterienwachstums durch Aktivierung von Monozyten nicht zwangsläufig, dass diese Zellen eine Rolle im natürlichen Prozess spielen. In einer Arbeit konnte gezeigt werden, dass Laserdopplerfluss und Oxygenierung nach 5 FU-Behandlung deutlich niedriger waren. (68) Die Behandlung mit Zytostatika führt zur erheblichen Beeinträchtigung der Hämodynamik und des Blutbildes. Sowohl Laserdopplerfluss als auch Oxygenierung sind jedoch abhängig von der allgemeinen hämodynamischen Situation und vom Hämatokrit. Zudem kann auch ein deutlicher Einfluss des Zytostatikums auf das Kollateralwachstum nicht ausgeschlossen werden. In der zitierten Studie blieben trotz eines massiven Reboundeffektes, der zu einer wesentlich höheren Monozyten Zahl führte, Laserdopplerfluss und Oxygenierung in behandelten Tieren niedriger als in unbehandelten Tieren, was für einen deutlichen Effekt des Zytostatikums selber auf das Kollateralarterienwachstum spricht. In unserer Studie kann so ein direkter Einfluss ausgeschlossen werden, da man ansonsten postulieren müsste, dass Zyklophosphamid eine proinflammatorische, proliferative und damit proangiogenetische Substanz ist. Dies ist definitiv nicht der Fall.

Durch unsere Untersuchung konnten wir zur Klärung der Frage über die Rolle der im Blut zirkulierenden Zellen (speziell Monozyten) beitragen. Unsere Ergebnisse deuten daraufhin, dass obwohl Monozyten mit der Arteriogenese assoziiert sind und zur Verbesserung der Durchblutung beitragen können, ihre Abwesenheit kein limitierender Schritt im Prozess der Arteriogenese ist. Der Prozess der Kollateralarterienentwicklung findet nach der Monozytendepletion unvermindert weiter statt.

## MCP-1 und Arteriogenese

Es konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass MCP-1 einen Einfluss auf die Arteriogenese hat. Dies wurde als ein weiteres Indiz dafür gewertet, dass zirkulierende Monozyten eine bedeutende Rolle beim Kollateralwachstum spielen. Die Ergebnisse unserer Depletionsversuche lassen die Frage aufkommen, ob MCP-1 auch einen direkten Einfluss auf das Gefäßwachstum bzw die Makrophagenakkumulation hat.

Um die Auswirkung der lokalen MCP-Applikation auf die Arteriogenese und damit auf die Durchblutung des Ischämiegebietes einzuschätzen zu können, muss man sich mit funktionellen und morphologischen Aspekten der Arteriogenese als Ganzes auseinandersetzen. **(2, 28-33, 49, 51, 52, 155)** Der funktionelle Aspekt (Messung der Blutflüsse mit radioaktiven/fluoreszierenden Mikrosphären) in der MCP-1 modulierten Arteriogenese wurde in früheren Studien qualitativ und quantitativ erfasst. In diesen Studien konnte MCP-1 einen deutlichen Zuwachs an Durchblutung nach der Okklusion der Magistralarterie im ligierten Bein bewirken.**(53)**

Die damit korrelierenden morphologischen Prozesse während einer spontanen und einer mit MCP-1 stimulierten Arteriogenese wurden dagegen in verschiedenen Tiermodellen zum Teil gut qualifiziert aber nicht quantifiziert.

Der Einfluss von MCP-1 auf morphologische Prozesse während der Arteriogenese in unserem Ratten-Modell lässt sich durch Quantifizierung folgender Phänomene erfassen:

**1. Durch radiologische Quantifizierung** der Anzahl der rekrutierten Kollateralarterien im okkludierten Bein. Wir beobachteten die Zunahme der rekrutierbaren Kollateralarterien um 25 % nach MCP-1 Infusion. Unsere Ergebnisse liegen im Einklang mit anderen vergleichbaren MCP-1 Studien. Allerdings variiert die Anzahl der rekrutierten Kollateralarterien von Tiermodell zu Tiermodell. Je kleiner das Tier ist (Hund-Kaninchen-Ratte-Maus) desto geringer ist die Anzahl der rekrutierbaren Kollateralen. **(1)** Daher ist die Gesamtanzahl der rekrutierten Kollateralarterien in der Ratte geringer als im Kaninchen, in dem die meisten Studien zur Wirkung von MCP-1 durchgeführt wurden.

**2. Durch Quantifizierung des Remodelingsverhaltens** der arteriellen Gefäßwand ( Proliferation von Endothel- und glatten Muskelzellen ) während einer normalen und einer stimulierten (durch lokale kontinuierliche MCP-1 Infusion) Arteriogenese. Während einer spontanen Arteriogenese proliferieren sieben Tage nach der Okklusion der Magistralarterie ca. 59% der Gefäßwandzellen in referenten Kollateralarterien. In den Kollateralarterien des Kontrollbeines fand dagegen keine Proliferation des Endothels oder der glatten Muskelzellen statt.

Durch kontinuierliche intraarterielle MCP-1 Infusion nach der Okklusion der Magistralarterie konnte dieser Proliferationsquotient deutlich um weitere ~15% (insgesamt ~75% der Zellen der Arterienwand) angehoben werden, was auf eine sehr deutliche proliferative Wirkung hinweist.

### *3. Durch Quantifizierung der perivaskulären Zellen um die Kollateralarterie.*

Die Relevanz des perivaskulären Kompartimentes in der Arteriogenese ergibt sich aus den Beobachtungen vorheriger Studien, wobei der Prozess der Arteriogenese streng mit einer vermehrten perivaskulären Ansammlung von Monozyten, Makrophagen und einer erhöhten adventitiellen Protiolyse assoziiert ist. **(32, 42, 146-148)**

In der aktuellen Arbeit wurde das perivaskuläre Infiltrat um die proliferierende Arterie weiter phänotypisiert und zum ersten Mal auch quantifiziert. Die Phänotypisierung des Infiltrates zeigte, dass es sich bei der MCP-1 modulierten Arteriogenese, wie bei der spontanen Arteriogenese, um die gleichen vier Makrophagensubpopulationen handelt.

Die Quantifizierung ergab nach Behandlung mit MCP-1 allerdings eine wesentlich höhere Makrophagenzahl in allen vier Subpopulationen im Vergleich zur spontan ablaufenden Arteriogenese. Wie bei dem spontanen Prozess überwiegen die residenten Makrophagen (ED2; Ki-M2R positive Zellen).

Entgegen unseren Erwartungen kam es nach lokaler MCP-1 Gabe nicht zu einem isoliertem Anstieg der sog. exsudativen Immunphänotypen (ED3 und TRPM-3 positive Zellen). Ein solcher Anstieg in anderen MCP-1 Studien (keine Arteriogenesestudien) wurde im Zusammenhang mit den vier Makrophagenimmunphänotypen beschrieben. **(69-71)**

Eine mögliche Erklärung ist, dass zur Monozytenrekrutierung durch MCP-1 es zusätzlicher Faktoren bedarf, wie die Hochregulation von endothelialen Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1). **(50)** Unsere Studie zeigt jedoch erstmalig, dass MCP-1 einen direkten proliferativen Einfluss auf residente Makrophagen hat.

### Intima- und Mediaremodeling ohne Schubspannung?

Eine wichtige Beobachtung dieser Studie ist, dass eine deutlich gesteigerte Intima- und Media-Proliferation der Arterienwand (15%) und eine deutlich vermehrte perivaskuläre Makrophagenakkumulation (23-33%) während der MCP-1 modulierter Arteriogenese höchstwahrscheinlich ohne die Erhöhung der Schubspannung zustande kam.

Der Grad der Schubspannung sollte eigentlich im Prozess der MCP-1 modulierten Arteriogenese durch eine erhöhte Anzahl von rekrutierten Kollateralarterien (25%) und durch intensiveres Gefäßwandremodeling (15%) mit Lumenvergrößerung abnehmen!

Trotz dieser Prozesse, die zur Minderung der Schubspannung beitragen, kam es zu einem weiteren Progress der Arteriogenese bei lokaler MCP-1 Gabe! Dieser Prozess war offensichtlich mit einer deutlichen Akkumulation von Makrophagen assoziiert und nicht mit dem Anstieg der Schubspannung.

Unsere Ergebnisse sprechen gegen die Meinungen einiger Autoren, die die Schubspannung als den einzigen Faktor im Remodeling während der Arteriogenese betrachten und die Rolle von perivaskulären Makrophagen in der Neointimabildung als unwesentlich abgestuft haben. **(36, 38, 39)**

Die Schubspannung mag die Arteriogenese initiieren, aber eine massive Makrophagenbeteiligung scheint zumindest den Umbauprozess in der Kollateralarterie mitzumodulieren.

Diskrepanzen sind höchstwahrscheinlich modellbedingt und demonstrieren noch einmal, dass die Übertragung der Ergebnisse von einem Ischämiemodell auf das andere zurückhaltend erfolgen muss.

**MCP-1 und einzelne Makrophagensubpopulationen :**

Die chemotaktischen Eigenschaften von MCP-1 wurden ursprünglich vor allem auf die chemoattraktive Wirkung auf mononukleäre Zellen (speziell Monozyten) zurückgeführt, die *in vitro* beobachtet wurden. (96) Experimente mit lokaler MCP-1 Überexpression (Tumor, Injektion) konnten eine biphasische Wirkung auf die Makrophagensubpopulationen zeigen : (69-71, 73)

In der frühen Phase ( während der ersten drei bis fünf Tage) kam es hauptsächlich zur Akkumulation von sog. exsudativen/rekrutierten Makrophagen (ED3 und TRPM-3 positive Zellen )

In der späteren Phase (ca. in der zweiten Woche) zeigt sich auch ein Anstieg an residenten/gewebsständigen Makrophagen (ED2 und Ki-M2R positive Zellen)

Nach einer einmaligen intradermalen MCP- 1 Injektion und in Tumoren mit lokaler Überproduktion von MCP-1 wurde zunächst ein schneller Anstieg an ED3 und TRPM3 positiven Zellen (exsudative Makrophagen) in der ersten Woche beobachtet. In drei der vier Studien konnte zusätzlich auch ein zeitlich versetzter Anstieg an residenten Subpopulationen (der ED2 und Ki-M2R Immunphänotypen) in der zweiten Woche demonstriert werden.

Die exsudative Makrophagen erscheinen schon nach wenigen Stunden (ED1) im Bereich der lokaler MCP-1 Überexpression/Injektion und steigen kontinuierlich bis zum dritten Tag an (ED3, TRPM3). Die residenten Makrophagen (ED2, Ki-M2R) haben ihren maximalen Anstieg in der zweiten Woche erreicht. In unseren Experimenten mit lokaler i/a MCP-1 Infusion kam es nicht nur zu einem deutlichen Anstieg der neointimalen Proliferation und der Anzahl an exsudativen Makrophagen, sondern ebenfalls zu einer starken Vermehrung von residenten Makrophagen in der ersten Woche. Residente Immunphänotypen dominierten sogar das Bild. (148, 156, 157)

Der ausgebliebene „exklusive“ Anstieg an exsudativen Makrophagen nach der MCP-1 Infusion deutet auf die Entstehung der Makrophagen mit diesem Antigenmuster nicht nur durch Monozytenkontribution, sondern auch durch lokale Proliferation von ortsständigen Makrophagen, die schon vor der Ligatur präsent waren. Diese lokale Proliferation residenter Makrophagen wird offensichtlich durch MCP-1 zusätzlich stimuliert.

Auch bei Atherosklerose-Studien sehen wir eine stärkere Neointimaproliferation in makrophagenreichen Läsionen als in makrophagen-ärmeren Läsionen. Diese Parallele zeigt uns, dass ein gesteigertes Remodeling der Arterienwand und Makrophagenakkumulation nicht spezifisch für die Arteriogenese sind. Auch die MCP-1 Überexpression während des Remodeling ist nicht arteriogenesespezifisch.

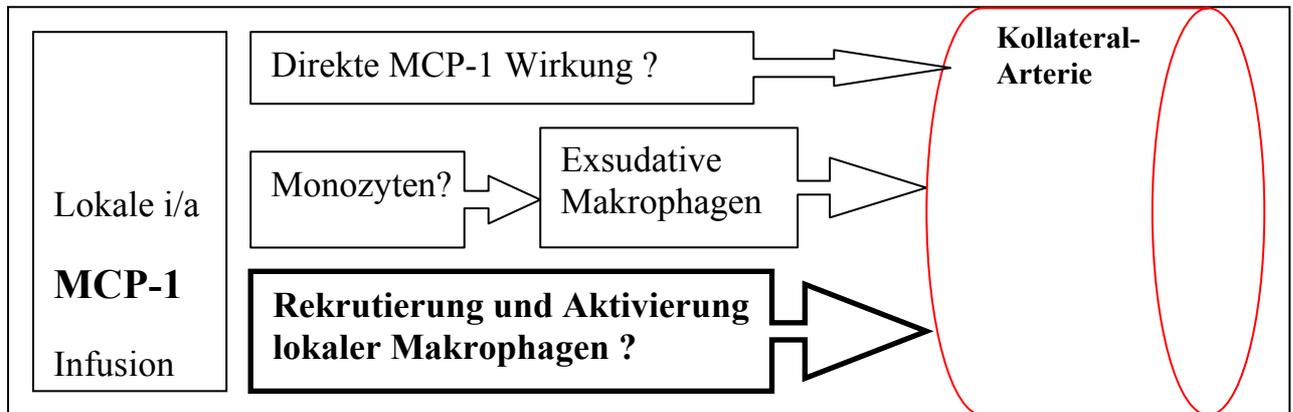
**MCP-1 aktiviert Makrophagen (85, 86):**

MCP-1 zeigt nicht nur eine ausgeprägte chemotaktische Wirkung auf Monozyten und Makrophagen, sondern kann auch Makrophagen aktivieren, was unsere Hypothese über die lokale Proliferation von perivaskulären Makrophagen während der MCP-1 vermittelter Arteriogenese unterstützen würde.

Die vermehrte Akkumulation von Makrophagen wird sowohl zu einer gesteigerten proteolytischen und phagozytischen Aktivität als auch zu einer vermehrten Produktion von Wachstumsfaktoren und damit auch zu einer verstärkten Gefäßproliferation führen, wie frühere Studie gezeigt haben. **(32, 158)**

**MCP-1 Wirkung auf die Arteriogenese:**

Aufgrund der Ergebnisse dieser Studie postulieren wir folgende Modelle über die Wirkung von MCP-1 auf die Arteriogenese:



**Abb. 32:** Das Schema zeigt drei Mechanismen der MCP-1 Wirkung auf die Proliferation der Intima/Media der Kollateralarterien im ligierten Bein. **1:** Eine direkten Wirkung von MCP-1 auf die Proliferation von Intima/Media der Kollateralarterien. **2:** MCP-1 wirkt über Monozytenrekrutierung (indirekt), die sich nach Einwandern in das perivaskuläre Gewebe zu exsudativen Makrophagen transphormieren. **3:** MCP-1 wirkt zudem über die Rekrutierung und Aktivierung lokaler Makrophagen.

MCP-1 führt zum einen zu einer direkten Stimulation von Endothelzellen. Dies ist bereits von Salcedo at all gezeigt worden. Andere Arbeiten, die einen solchen direkten Einfluss bezweifeln, basieren lediglich auf histologischen Daten, die zeigen, dass eine MCP-1 vermittelte Angiogenese immer mit einem zellulärem Infiltrat verbunden ist.(159) Zudem entfaltet MCP-1 seine Wirkung durch die Rekrutierung von Blutmonozyten über den CCR-2 Rezeptor. Diese Monozyten migrieren in die wachsenden Kollateralarterien und transformieren (31, 32, 68) im perivaskulären Gewebe zu exsudativen Makrophagen (69), die ihrerseits zur Proliferation der Intima/Media beitragen . Im Licht unserer Ergebnisse spielt dieser Mechanismus nur eine untergeordnete Rolle. Keiner der vier Makrophagenphänotypen, die im Zusammenhang mit MCP-1 früher untersucht wurden, konnte durch die Monozytendepletion negativ beeinflusst werden. Ein weiterer Mechanismus über den MCP-1 die Proliferation der Kollateralarterien stimuliert wäre die chemotaktische Wirkung auf die CCR-2 Rezeptoren der Makrophagen, die nach lokaler Aktivierung und Proliferation dann ihrerseits zur Intima/Media-Proliferation beitragen.

In mehreren *in vivo* Studien konnte eine deutlich verstärkte Rekrutierung von Makrophagen via MCP-1-CCR2-Interaktionen gezeigt werden **(151) (150) (98) (112)** .

Es ist schwierig jeden einzelnen Mechanismus der MCP-1 vermittelten Arteriogenese getrennt zu untersuchen. Sowohl MCP-1 als auch der CCR-2 Rezeptor können in allen an der Arteriogenese beteiligten Zellen exprimiert werden: Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Makrophagen, Monozyten. **(110, 111, 137, 160)** Unsere Studie weist darauf hin, dass alle Zellen bzw. o.g Mechanismen an der Wirkung von MCP-1 beteiligt sind.

Es gelang uns zirkulierende Monozyten durch Zyklophosphamid deutlich zu reduzieren und wir sind derzeit dabei die MCP-1 Wirkung unter Knochenmarkdepletion zu untersuchen. Eine gezielte Depletion residenter Makrophagen durch chlodronatgefüllte Liposomen gelang jedoch nicht. Daher war es nicht möglich den direkten Einfluss von MCP-1 auf Gefäßzellen von der indirekten Wirkung über die Rekrutierung von Gefäßmakrophagen zu trennen. Unsere Studie weist darauf hin, dass alle Zellen bzw o.g. Mechanismen an der Wirkung von MCP-1 beteiligt sind.

## Referenzen

1. **van Royen N, Piek JJ, Buschmann I, Hofer I, Voskuil M, Schaper W.** Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. *Cardiovasc Res.* 2001;49(3):543-53.
2. **Carmeliet P.** Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 2000;6(4):389-95.
3. **Lindner V, Maciag T.** The putative convergent and divergent natures of angiogenesis and arteriogenesis. *Circ Res.* 2001;89(9):747-9.
4. **Patan S.** Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J Neurooncol.* 2000;50(1-2):1-15.
5. **Eichmann A, Pardanaud L, Yuan L, Moyon D.** Vasculogenesis and the search for the hemangioblast. *J Hematother Stem Cell Res.* 2002;11(2):207-14.
6. **Leach L, Babawale MO, Anderson M, Lammiman M.** Vasculogenesis, angiogenesis and the molecular organisation of endothelial junctions in the early human placenta. *J Vasc Res.* 2002;39(3):246-59.
7. **Gepstein L.** Derivation and potential applications of human embryonic stem cells. *Circ Res.* 2002;91(10):866-76.
8. **Asahara T, Isner JM.** Endothelial progenitor cells for vascular regeneration. *J Hematother Stem Cell Res.* 2002;11(2):171-8.
9. **Hirata K, Li TS, Nishida M, et al.** Implantation of Autologous Bone Marrow Cells as a Therapeutic Angiogenesis for Ischemic Hindlimbs in Diabetic Rats Model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002.
10. **Murohara T.** Therapeutic vasculogenesis using human cord blood-derived endothelial progenitors. *Trends Cardiovasc Med.* 2001;11(8):303-7.

11. **Isner JM, Kalka C, Kawamoto A, Asahara T.** Bone marrow as a source of endothelial cells for natural and iatrogenic vascular repair. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;953:75-84.
12. **Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, et al.** Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation.* 2002;105(6):732-8.
13. **Levenberg S, Golub JS, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Langer R.** Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(7):4391-6.
14. **Murayama T, Asahara T.** Bone marrow-derived endothelial progenitor cells for vascular regeneration. *Curr Opin Mol Ther.* 2002;4(4):395-402.
15. **Lyden D, Hattori K, Dias S, et al.** Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med.* 2001;7(11):1194-201.
16. **Sata M, Saiura A, Kunisato A, et al.** Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med.* 2002;8(4):403-9.
17. **Yancopoulos GD, Klagsbrun M, Folkman J.** Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border. *Cell.* 1998;93(5):661-4.
18. **Kuwano M, Fukushi J, Okamoto M, et al.** Angiogenesis factors. *Intern Med.* 2001;40(7):565-72.
19. **Gurunluoglu R, Lubiowski P, Goldman CK, Carnevale K, Siemionow M.** Enhancement of muscle flap hemodynamics by angiopoietin-1. *Ann Plast Surg.* 2002;48(4):401-9.
20. **Hansbury MJ, Nicosia RF, Zhu WH, Holmes SJ, Winkler JD.** Production and characterization of a Tie2 agonist monoclonal antibody. *Angiogenesis.* 2001;4(1):29-36.
21. **Scott BB, Zaratini PF, Colombo A, Hansbury MJ, Winkler JD, Jackson JR.** Constitutive expression of angiopoietin-1 and -2 and modulation of their expression by inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *J Rheumatol.* 2002;29(2):230-9.

22. **Cooke JP, Losordo DW.** Nitric oxide and angiogenesis. *Circulation*. 2002;105(18):2133-5.
23. **Koyanagi M, Egashira K, Kitamoto S, et al.** Role of monocyte chemoattractant protein-1 in cardiovascular remodeling induced by chronic blockade of nitric oxide synthesis. *Circulation*. 2000;102(18):2243-8.
24. **Lloyd PG, Yang HT, Terjung RL.** Arteriogenesis and angiogenesis in rat ischemic hindlimb: role of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;281(6):H2528-38.
25. **Polverini PJ, Leibovich SJ.** Effect of macrophage depletion on growth and neovascularization of hamster buccal pouch carcinomas. *J Oral Pathol*. 1987;16(9):436-41.
26. **Leibovich SJ, Polverini PJ, Shepard HM, Wiseman DM, Shively V, Nuseir N.** Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. *Nature*. 1987;329(6140):630-2.
27. **Moldovan NI, Goldschmidt-Clermont PJ, Parker-Thornburg J, Shapiro SD, Kolattukudy PE.** Contribution of monocytes/macrophages to compensatory neovascularization: the drilling of metalloelastase-positive tunnels in ischemic myocardium. *Circ Res*. 2000;87(5):378-84.
28. **Scholz D, Cai WJ, Schaper W.** Arteriogenesis, a new concept of vascular adaptation in occlusive disease. *Angiogenesis*. 2001;4(4):247-57.
29. **Buschmann I, Schaper W.** The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis). *J Pathol*. 2000;190(3):338-42.
30. **Scholz D, Ziegelhoeffer T, Helisch A, et al.** Contribution of arteriogenesis and angiogenesis to postocclusive hindlimb perfusion in mice. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34(7):775-87.
31. **Schaper W, J.** *Collateral Circulation*. Vol. 1; 1993.
32. **Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W.** Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest*. 1998;101(1):40-50.

33. **Scholz D, Ito W, Fleming I, et al.** Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis). *Virchows Arch.* 2000;436(3):257-70.
34. **Herzog S, Sager H, Khmelevski E, Deylig A, Ito WD.** Collateral arteries grow from preexisting anastomoses in the rat hindlimb. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283(5):H2012-20.
35. **Deindl E, Buschmann I, Hoefler IE, et al.** Role of ischemia and of hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit. *Circ Res.* 2001;89(9):779-86.
36. **Tuttle JL, Nachreiner RD, Bhuller AS, et al.** Shear level influences resistance artery remodeling: wall dimensions, cell density, and eNOS expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;281(3):H1380-9.
37. **Glagov S, Zarins C, Giddens DP, Ku DN.** Hemodynamics and atherosclerosis. Insights and perspectives gained from studies of human arteries. *Arch Pathol Lab Med.* 1988;112(10):1018-31.
38. **Unthank JL, Fath SW, Burkhart HM, Miller SC, Dalsing MC.** Wall remodeling during luminal expansion of mesenteric arterial collaterals in the rat. *Circ Res.* 1996;79(5):1015-23.
39. **Fath SW, Burkhart HM, Miller SC, Dalsing MC, Unthank JL.** Wall remodeling after wall shear rate normalization in rat mesenteric arterial collaterals. *J Vasc Res.* 1998;35(4):257-64.
40. **Lehoux S, Tronc F, Tedgui A.** Mechanisms of blood flow-induced vascular enlargement. *Biorheology.* 2002;39(3-4):319-24.
41. **Khan S, Sheetz MP.** Force effects on biochemical kinetics. *Annu Rev Biochem.* 1997;66:785-805.
42. **Cai WJ, Koltai S, Kocsis E, et al.** Remodeling of the adventitia during coronary arteriogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002.

43. **Bishop GG, McPherson JA, Sanders JM, et al.** Selective alpha(v)beta(3)-receptor blockade reduces macrophage infiltration and restenosis after balloon angioplasty in the atherosclerotic rabbit. *Circulation*. 2001;103(14):1906-11.
44. **Mervaala EM, Muller DN, Park JK, et al.** Monocyte infiltration and adhesion molecules in a rat model of high human renin hypertension. *Hypertension*. 1999;33(1 Pt 2):389-95.
45. **Ivan E, Khatri JJ, Johnson C, et al.** Expansive arterial remodeling is associated with increased neointimal macrophage foam cell content: the murine model of macrophage-rich carotid artery lesions. *Circulation*. 2002;105(22):2686-91.
46. **Weber KS, Draude G, Erl W, de Martin R, Weber C.** Monocyte arrest and transmigration on inflamed endothelium in shear flow is inhibited by adenovirus-mediated gene transfer of IkappaB-alpha. *Blood*. 1999;93(11):3685-93.
47. **Ikeda U, Matsui K, Murakami Y, Shimada K.** Monocyte chemoattractant protein-1 and coronary artery disease. *Clin Cardiol*. 2002;25(4):143-7.
48. **Mori E, Komori K, Yamaoka T, et al.** Essential role of monocyte chemoattractant protein-1 in development of restenotic changes (neointimal hyperplasia and constrictive remodeling) after balloon angioplasty in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation*. 2002;105(24):2905-10.
49. **Buschmann IR, Hofer IE, van Royen N, et al.** GM-CSF: a strong arteriogenic factor acting by amplification of monocyte function. *Atherosclerosis*. 2001;159(2):343-56.
50. **Namiki M, Kawashima S, Yamashita T, et al.** Local overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 at vessel wall induces infiltration of macrophages and formation of atherosclerotic lesion: synergism with hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(1):115-20.
51. **Buschmann I, Schaper W.** Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth. *News Physiol Sci*. 1999;14:121-125.

52. **Ito WD, Arras M, Winkler B, Scholz D, Schaper J, Schaper W.** Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ Res.* 1997;80(6):829-37.
53. **Hoefler IE, van Royen N, Buschmann IR, Piek JJ, Schaper W.** Time course of arteriogenesis following femoral artery occlusion in the rabbit. *Cardiovasc Res.* 2001;49(3):609-17.
54. **Yang HT, Feng Y, Allen LA, Protter A, Terjung RL.** Efficacy and specificity of bFGF increased collateral flow in experimental peripheral arterial insufficiency. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278(6):H1966-73.
55. **Doukas J, Blease K, Craig D, et al.** Delivery of FGF genes to wound repair cells enhances arteriogenesis and myogenesis in skeletal muscle. *Mol Ther.* 2002;5(5 Pt 1):517-27.
56. **Nabel EG, Yang ZY, Plautz G, et al.** Recombinant fibroblast growth factor-1 promotes intimal hyperplasia and angiogenesis in arteries in vivo. *Nature.* 1993;362(6423):844-6.
57. **van Royen N, Hoefler I, Buschmann I, et al.** Exogenous application of transforming growth factor beta 1 stimulates arteriogenesis in the peripheral circulation. *Faseb J.* 2002;16(3):432-4.
58. **Hershey JC, Baskin EP, Glass JD, et al.** Revascularization in the rabbit hindlimb: dissociation between capillary sprouting and arteriogenesis. *Cardiovasc Res.* 2001;49(3):618-25.
59. **Berse B, Brown LF, Van de Water L, Dvorak HF, Senger DR.** Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell.* 1992;3(2):211-20.
60. **Hoefler IE, van Royen N, Rectenwald JE, et al.** Direct evidence for tumor necrosis factor-alpha signaling in arteriogenesis. *Circulation.* 2002;105(14):1639-41.

61. **Fujita M, Kihara Y, Hasegawa K, Nohara R, Sasayama S.** Heparin potentiates collateral growth but not growth of intramyocardial endarteries in dogs with repeated coronary occlusion. *Int J Cardiol.* 1999;70(2):165-70.
62. **Brevetti LS, Paek R, Brady SE, Hoffman JI, Sarkar R, Messina LM.** Exercise-induced hyperemia unmasks regional blood flow deficit in experimental hindlimb ischemia. *J Surg Res.* 2001;98(1):21-6.
63. **Kornowski R, Fuchs S, Leon MB, Epstein SE.** Delivery strategies to achieve therapeutic myocardial angiogenesis. *Circulation.* 2000;101(4):454-8.
64. **Hattori K, Dias S, Heissig B, et al.** Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med.* 2001;193(9):1005-14.
65. **Luttun A, Carmeliet G, Carmeliet P.** Vascular progenitors: from biology to treatment. *Trends Cardiovasc Med.* 2002;12(2):88-96.
66. **Carmeliet P, Luttun A.** The emerging role of the bone marrow-derived stem cells in (therapeutic) angiogenesis. *Thromb Haemost.* 2001;86(1):289-97.
67. **Schaper J, Konig R, Franz D, Schaper W.** The endothelial surface of growing coronary collateral arteries. Intimal margination and diapedesis of monocytes. A combined SEM and TEM study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol.* 1976;370(3):193-205.
68. **Heil M, Ziegelhoeffer T, Pipp F, et al.** Blood Monocyte Concentration is Critical for the Enhancement of Collateral Artery Growth (Arteriogenesis). *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002.
69. **Yamashiro S, Takeya M, Kuratsu J, Ushio Y, Takahashi K, Yoshimura T.** Intradermal injection of monocyte chemoattractant protein-1 induces emigration and differentiation of blood monocytes in rat skin. *Int Arch Allergy Immunol.* 1998;115(1):15-23.

70. **Yamashiro S, Takeya M, Nishi T, et al.** Tumor-derived monocyte chemoattractant protein-1 induces intratumoral infiltration of monocyte-derived macrophage subpopulation in transplanted rat tumors. *Am J Pathol.* 1994;145(4):856-67.
71. **Sakanashi Y, Takeya M, Yoshimura T, Feng L, Morioka T, Takahashi K.** Kinetics of macrophage subpopulations and expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in bleomycin-induced lung injury of rats studied by a novel monoclonal antibody against rat MCP-1. *J Leukoc Biol.* 1994;56(6):741-50.
72. **Nakamura K, Sahara N, Deguchi T.** Temporal changes in the distribution and number of macrophage-lineage cells in the periodontal membrane of the rat molar in response to experimental tooth movement. *Arch Oral Biol.* 2001;46(7):593-607.
73. **Kobayashi H, Orikasa M, Naito M, et al.** Detailed analysis of phenotypes of macrophages infiltrating glomeruli in rat anti-Thy1 nephritis. *Nephron.* 1997;77(3):333-9.
74. **Fantuzzi L, Borghi P, Ciolli V, Pavlakis G, Belardelli F, Gessani S.** Loss of CCR2 expression and functional response to monocyte chemotactic protein (MCP-1) during the differentiation of human monocytes: role of secreted MCP-1 in the regulation of the chemotactic response. *Blood.* 1999;94(3):875-83.
75. **Wacker HH, Radzun HJ, Parwaresch MR.** Ki-M2R, a new specific monoclonal antibody, discriminates tissue macrophages from reticulum cells and monocytes in vivo and in vitro. *J Leukoc Biol.* 1985;38(4):509-20.
76. **Barbe E, Damoiseaux JG, Dopp EA, Dijkstra CD.** Characterization and expression of the antigen present on resident rat macrophages recognized by monoclonal antibody ED2. *Immunobiology.* 1990;182(1):88-99.
77. **Whiteland JL, Nicholls SM, Shimeld C, Easty DL, Williams NA, Hill TJ.** Immunohistochemical detection of T-cell subsets and other leukocytes in paraffin-embedded rat and mouse tissues with monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem.* 1995;43(3):313-20.

78. **Dijkstra CD, Damoiseaux JG.** Macrophage heterogeneity established by immunocytochemistry. *Prog Histochem Cytochem.* 1993;27(2):1-65.
79. **Dijkstra CD, Dopp EA, Joling P, Kraal G.** The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology.* 1985;54(3):589-99.
80. **van den Berg TK, Breve JJ, Damoiseaux JG, et al.** Sialoadhesin on macrophages: its identification as a lymphocyte adhesion molecule. *J Exp Med.* 1992;176(3):647-55.
81. **Takeya M, Hsiao L, Takahashi K.** A new monoclonal antibody, TRPM-3, binds specifically to certain rat macrophage populations: immunohistochemical and immunoelectron microscopic analysis. *J Leukoc Biol.* 1987;41(3):187-95.
82. **Yamaguchi Y, Misumi M, Mori K, et al.** Effect of cyclosporine on distribution of macrophage subpopulations in rat hepatic allograft. *Dig Dis Sci.* 1993;38(4):619-25.
83. **Bauer J, Sminia T, Wouterlood FG, Dijkstra CD.** Phagocytic activity of macrophages and microglial cells during the course of acute and chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res.* 1994;38(4):365-75.
84. **Damoiseaux JG, Dopp EA, Calame W, Chao D, MacPherson GG, Dijkstra CD.** Rat macrophage lysosomal membrane antigen recognized by monoclonal antibody ED1. *Immunology.* 1994;83(1):140-7.
85. **Sodhi A, Biswas SK.** Monocyte chemoattractant protein-1-induced activation of p42/44 MAPK and c-Jun in murine peritoneal macrophages: a potential pathway for macrophage activation. *J Interferon Cytokine Res.* 2002;22(5):517-26.
86. **Biswas SK, Sodhi A.** Tyrosine phosphorylation-mediated signal transduction in MCP-1-induced macrophage activation: role for receptor dimerization, focal adhesion protein complex and JAK/STAT pathway. *Int Immunopharmacol.* 2002;2(8):1095-107.

87. **Birdsall HH, Green DM, Trial J, et al.** Complement C5a, TGF-beta 1, and MCP-1, in sequence, induce migration of monocytes into ischemic canine myocardium within the first one to five hours after reperfusion. *Circulation*. 1997;95(3):684-92.
88. **Wiedle G, Dunon D, Imhof BA.** Current concepts in lymphocyte homing and recirculation. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2001;38(1):1-31.
89. **Ley K.** Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovasc Res*. 1996;32(4):733-42.
90. **Reinhardt PH, Kubes P.** Differential leukocyte recruitment from whole blood via endothelial adhesion molecules under shear conditions. *Blood*. 1998;92(12):4691-9.
91. **Walter UM, Issekutz AC.** Role of E- and P-selectin in migration of monocytes and polymorphonuclear leucocytes to cytokine and chemoattractant-induced cutaneous inflammation in the rat. *Immunology*. 1997;92(2):290-9.
92. **Luscinskas FW, Ding H, Tan P, Cumming D, Tedder TF, Gerritsen ME.** L- and P-selectins, but not CD49d (VLA-4) integrins, mediate monocyte initial attachment to TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow in vitro. *J Immunol*. 1996;157(1):326-35.
93. **Semaan HB, Gurbel PA, Anderson JL, et al.** Soluble VCAM-1 and E-selectin, but not ICAM-1 discriminate endothelial injury in patients with documented coronary artery disease. *Cardiology*. 2000;93(1-2):7-10.
94. **Vallien G, Langley R, Jennings S, Specian R, Granger DN.** Expression of endothelial cell adhesion molecules in neovascularized tissue. *Microcirculation*. 2000;7(4):249-58.
95. **Naruse T, Yuzawa Y, Akahori T, et al.** P-selectin-dependent macrophage migration into the tubulointerstitium in unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int*. 2002;62(1):94-105.
96. **Oppenheim jJ.** *Cytokine Reference*. Vol. 1 and 2; 2001.
97. **Mack M, Cihak J, Simonis C, et al.** Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. *J Immunol*. 2001;166(7):4697-704.

98. **Kurihara T, Warr G, Loy J, Bravo R.** Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J Exp Med.* 1997;186(10):1757-62.
99. **Hemmerlein B, Scherbening J, Kugler A, Radzun HJ.** Expression of VCAM-1, ICAM-1, E- and P-selectin and tumour-associated macrophages in renal cell carcinoma. *Histopathology.* 2000;37(1):78-83.
100. **Hofmann N, Lachnit N, Streppel M, et al.** Increased expression of ICAM-1, VCAM-1, MCP-1, and MIP-1alpha by spinal perivascular macrophages during experimental allergic encephalomyelitis in rats. *BMC Immunol.* 2002;3(1):11.
101. **Kakio T, Matsumori A, Ono K, Ito H, Matsushima K, Sasayama S.** Roles and relationship of macrophages and monocyte chemoattractant and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 in the ischemic and reperfused rat heart. *Lab Invest.* 2000;80(7):1127-36.
102. **Yu H, Zeng Y, Hu J, Li C.** Fluid shear stress induces the secretion of monocyte chemoattractant protein-1 in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2002;26(3):199-207.
103. **Negus RP, Turner L, Burke F, Balkwill FR.** Hypoxia down-regulates MCP-1 expression: implications for macrophage distribution in tumors. *J Leukoc Biol.* 1998;63(6):758-65.
104. **Sung FL, Zhu TY, Au-Yeung KK, Siow YL, O K.** Enhanced MCP-1 expression during ischemia/reperfusion injury is mediated by oxidative stress and NF-kappaB. *Kidney Int.* 2002;62(4):1160-70.
105. **Wang G, Siow YL, O K.** Homocysteine induces monocyte chemoattractant protein-1 expression by activating NF-kappaB in THP-1 macrophages. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280(6):H2840-7.
106. **Xu Y, Rojkind M, Czaja MJ.** Regulation of monocyte chemoattractant protein 1 by cytokines and oxygen free radicals in rat hepatic fat-storing cells. *Gastroenterology.* 1996;110(6):1870-7.

107. **Franci C, Wong LM, Van Damme J, Proost P, Charo IF.** Monocyte chemoattractant protein-3, but not monocyte chemoattractant protein-2, is a functional ligand of the human monocyte chemoattractant protein-1 receptor. *J Immunol.* 1995;154(12):6511-7.
108. **Combadiere C, Ahuja SK, Van Damme J, Tiffany HL, Gao JL, Murphy PM.** Monocyte chemoattractant protein-3 is a functional ligand for CC chemokine receptors 1 and 2B. *J Biol Chem.* 1995;270(50):29671-5.
109. **Sozzani S, Zhou D, Locati M, et al.** Receptors and transduction pathways for monocyte chemotactic protein-2 and monocyte chemotactic protein-3. Similarities and differences with MCP-1. *J Immunol.* 1994;152(7):3615-22.
110. **Hayes IM, Jordan NJ, Towers S, et al.** Human vascular smooth muscle cells express receptors for CC chemokines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18(3):397-403.
111. **Weber KS, Nelson PJ, Grone HJ, Weber C.** Expression of CCR2 by endothelial cells : implications for MCP-1 mediated wound injury repair and In vivo inflammatory activation of endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(9):2085-93.
112. **Roque M, Kim WJ, Gazdoin M, et al.** CCR2 deficiency decreases intimal hyperplasia after arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(4):554-9.
113. **Han KH, Han KO, Green SR, Quehenberger O.** Expression of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 is increased in hypercholesterolemia. Differential effects of plasma lipoproteins on monocyte function. *J Lipid Res.* 1999;40(6):1053-63.
114. **Rayner K, Van Eersel S, Groot PH, Reape TJ.** Localisation of mRNA for JE/MCP-1 and its receptor CCR2 in atherosclerotic lesions of the ApoE knockout mouse. *J Vasc Res.* 2000;37(2):93-102.
115. **Kowala MC, Recce R, Beyer S, Gu C, Valentine M.** Characterization of atherosclerosis in LDL receptor knockout mice: macrophage accumulation correlates with rapid and sustained expression of aortic MCP-1/JE. *Atherosclerosis.* 2000;149(2):323-30.

116. **Martinez-Gonzalez J, Alfon J, Berrozpe M, Badimon L.** HMG-CoA reductase inhibitors reduce vascular monocyte chemoattractant protein-1 expression in early lesions from hypercholesterolemic swine independently of their effect on plasma cholesterol levels. *Atherosclerosis*. 2001;159(1):27-33.
117. **Oshima S, Ogawa H, Hokimoto S, et al.** Plasma monocyte chemoattractant protein-1 antigen levels and the risk of restenosis after coronary stent implantation. *Jpn Circ J*. 2001;65(4):261-4.
118. **Economou E, Tousoulis D, Katinioti A, et al.** Chemokines in patients with ischaemic heart disease and the effect of coronary angioplasty. *Int J Cardiol*. 2001;80(1):55-60.
119. **Hokimoto S, Oike Y, Saito T, et al.** Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 in atherectomy specimens from patients with restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Circ J*. 2002;66(1):114-6.
120. **Parissis JT, Korovesis S, Giazitzoglou E, Kalivas P, Katritsis D.** Plasma profiles of peripheral monocyte-related inflammatory markers in patients with arterial hypertension. Correlations with plasma endothelin-1. *Int J Cardiol*. 2002;83(1):13-21.
121. **Soejima H, Ogawa H, Yasue H, et al.** Angiotensin-converting enzyme inhibition reduces monocyte chemoattractant protein-1 and tissue factor levels in patients with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 1999;34(4):983-8.
122. **Chen HJ, Li DY, Saldeen T, Phillips MI, Mehta JL.** Attenuation of tissue P-selectin and MCP-1 expression and intimal proliferation by AT(1) receptor blockade in hyperlipidemic rabbits. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;282(2):474-9.
123. **Yamashita T, Kawashima S, Ozaki M, et al.** Propagermanium reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice via inhibition of macrophage infiltration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(6):969-74.
124. **Schechter AD, Rollins BJ, Zhang YJ, et al.** Tissue factor is induced by monocyte chemoattractant protein-1 in human aortic smooth muscle and THP-1 cells. *J Biol Chem*. 1997;272(45):28568-73.

125. **Murugesan G, Rani MR, Ransohoff RM, Marchant RE, Kottke-Marchant K.** Endothelial cell expression of monocyte chemotactic protein-1, tissue factor, and thrombomodulin on hydrophilic plasma polymers. *J Biomed Mater Res.* 2000;49(3):396-408.
126. **van Aken BE, den Heijer M, Bos GM, van Deventer SJ, Reitsma PH.** Recurrent venous thrombosis and markers of inflammation. *Thromb Haemost.* 2000;83(4):536-9.
127. **Humphries J, McGuinness CL, Smith A, Waltham M, Poston R, Burnand KG.** Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) accelerates the organization and resolution of venous thrombi. *J Vasc Surg.* 1999;30(5):894-9.
128. **Cho CS, Cho ML, Chen PP, et al.** Antiphospholipid antibodies induce monocyte chemoattractant protein-1 in endothelial cells. *J Immunol.* 2002;168(8):4209-15.
129. **Conti P, DiGioacchino M.** MCP-1 and RANTES are mediators of acute and chronic inflammation. *Allergy Asthma Proc.* 2001;22(3):133-7.
130. **Ellingsen T, Buus A, Stengaard-Pedersen K.** Plasma monocyte chemoattractant protein 1 is a marker for joint inflammation in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2001;28(1):41-6.
131. **Banba N, Nakamura T, Matsumura M, Kuroda H, Hattori Y, Kasai K.** Possible relationship of monocyte chemoattractant protein-1 with diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2000;58(2):684-90.
132. **Corsi MM, Leone G, Fulgenzi A, Wasserman K, Leone F, Ferrero ME.** RANTES and MCP-1 chemokine plasma levels in chronic renal transplant dysfunction and chronic renal failure. *Clin Biochem.* 1999;32(6):455-60.
133. **Ellingsen T, Elling P, Olson A, et al.** Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in temporal arteritis and polymyalgia rheumatica. *Ann Rheum Dis.* 2000;59(10):775-80.
134. **Asano T, Ogawa S.** Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in Kawasaki disease: the anti-inflammatory effect of gamma globulin therapy. *Scand J Immunol.* 2000;51(1):98-103.

135. **Devalaraja MN, McClain CJ, Barve S, Vaddi K, Hill DB.** Increased monocyte MCP-1 production in acute alcoholic hepatitis. *Cytokine*. 1999;11(11):875-81.
136. **Mazzone A, De Servi S, Mazzucchelli I, et al.** Increased concentrations of inflammatory mediators in unstable angina: correlation with serum troponin T. *Heart*. 2001;85(5):571-5.
137. **Tang KF, Tan SY, Chan SH, et al.** A distinct expression of CC chemokines by macrophages in nasopharyngeal carcinoma: implication for the intense tumor infiltration by T lymphocytes and macrophages. *Hum Pathol*. 2001;32(1):42-9.
138. **McGinley JN, Knott KK, Thompson HJ.** Effect of fixation and epitope retrieval on BrdU indices in mammary carcinomas. *J Histochem Cytochem*. 2000;48(3):355-62.
139. **Abb.20.** Makrophagenfärbung in der 3 Tage nach der Okklusion der Arteria femoralis. *Seite 95; 2002.*
140. **Abb.22.** Vergleich der Makrophagenanzahl im legierten Bein und Kontrollbein 7 Tage nach der Okklusion der Arteria femoralis für einzelne Makrophagen-AK in der PBS-Gruppe. *Seite 97; 2002.*
141. **Abb.23.** Vergleich der Makrophagenanzahl im legierten Bein und Kontrollbein 7 Tage nach der Okklusion der Arteria femoralis für einzelne Makrophagen-AK in der MCP-1-Gruppe. *Seite 98; 2002.*
142. **Abb.24.** Vergleich der Makrophagenanzahl im legierten Bein und Kontrollbein 3 Tage nach der Okklusion der Arteria femoralis für einzelne Makrophagen-AK. *Seite 99; 2002.*
143. **Abb.21.** Vergleich mittlerer Makrophagenanzahl für einzelne makrophagenspezifische Antikörper in beiden Gruppen (3 Tage und 7 Tage nach der Okklusion der Arteria femoralis). *Seite 96; 2002.*
144. **Abb.29.** Zeitlicher Verlauf zweier Schlüsselprozesse der Arteriogenese:  
a) Proliferation der Intima/Media und b) Makrophagenakkumulation um die proliferierende Kollateralarterie 3 und 7 Tage nach der Ligatur der Arteria femoralis. *Seite 121; 2002.*

145. **Danenberg HD, Fishbein I, Gao J, et al.** Macrophage depletion by clodronate-containing liposomes reduces neointimal formation after balloon injury in rats and rabbits. *Circulation*. 2002;106(5):599-605.
146. **Abb.14.** Makrophagenfärbung in der PBS-Gruppe 7 Tage nach der Okklusion der Arteria femoralis. *Seite 89*; 2002.
147. **Abb.15.** Makrophagenfärbung in der MCP-1-Gruppe 7 Tage nach der Okklusion der Arteria femoralis. *Seite 90*; 2002.
148. **Abb.16.** Vergleich der mittleren Makrophagenanzahl für einzelne makrophagenspezifische Antikörper in beiden Gruppen (PBS und MCP-1) 7 Tage nach der Okklusion der Arteria femoralis. *Seite 91*; 2002.
149. **Zhao Y, Glesne D, Huberman E.** A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *PNAS*. 2003;100:2426-2431.
150. **Siebert H, Sachse A, Kuziel WA, Maeda N, Bruck W.** The chemokine receptor CCR2 is involved in macrophage recruitment to the injured peripheral nervous system. *J Neuroimmunol*. 2000;110(1-2):177-85.
151. **Dambach DM, Watson LM, Gray KR, Durham SK, Laskin DL.** Role of CCR2 in macrophage migration into the liver during acetaminophen-induced hepatotoxicity in the mouse. *Hepatology*. 2002;35(5):1093-103.
152. **Abb.26.** Vergleich mittlerer Makrophagenanzahl für einzelne makrophagenspezifische Antikörper in beiden Gruppen (mit KM-Depletion und ohne KM-Depletion) 3 Tage nach der Okklusion der Arteria femoralis. *Seite 101*; 2002.
153. **Abb.27.** Vergleich residenter Makrophagen im legierten Bein 3 Tage nach der Ligatur der Arteria femoralis in den Gruppen mit KMD und ohne KMD. *Seite 102*; 2002.
154. **Abb.28.** Vergleich exsudativer Makrophagen im legierten Bein 3 Tage nach der Ligatur der Arteria femoralis in den Gruppen mit KMD und ohne KMD. *Seite 103*; 2002.

155. **Schaper W, Buschmann I.** Arteriogenesis, the good and bad of it. *Eur Heart J.* 1999;20(18):1297-9.
156. **Abb.10.** Vergleich der Anzahl von radiologisch sichtbaren Kollateralarterien in beiden Gruppen (PBS und MCP-1) 7 Tage nach der Okklusion der Arteria femoralis. *Seite 85;* 2002.
157. **Abb.13.** Vergleich des proliferativen Verhalten der Kollateralarterien in beiden Gruppen (PBS und MCP-1) 7 Tage nach Okklusion der Arteria femoralis. *Seite 88;* 2002.
158. **Polverini PJ, Cotran RS, Gimbrone MA, Unanue ER.** Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature.* 1977;269:804-806.
159. **Goede V, Brogelli L, Ziche M, Augustin H.** Induction of inflammatory angiogenesis by monocyte chemoattractant protein-1. *Int J Cancer.* 1999;82:765-770.
160. **Sica A, Saccani A, Bottazzi B, et al.** Defective expression of the monocyte chemotactic protein-1 receptor CCR2 in macrophages associated with human ovarian carcinoma. *J Immunol.* 2000;164(2):733-8.

## Danksagung:

Hiermit möchte ich ganz herzlich **Herrn Professor Meinertz** für die Möglichkeit in seinen Laboren forschen zu dürfen und das Überlassen des Themas danken. Außerdem geht mein Dank an Herrn **Dr. WD Ito**, der mich logistisch durch alle Etappen meines wissenschaftlichen Werdeganges unterstützt hat und in schwierigen Momenten die Kraft zum Weitermachen gegeben hat. Seine langjährigen Erfahrungen auf dem Gebiet der Arteriogenese, exzellentes Studienwissen und der konzeptuelle Blick haben mein Verständnis der Arteriogenese wesentlich geprägt. Die methodische Vielfalt in der Arbeitsgruppe von Herrn Ito haben mir z.T. einzigartige thematische Einsichten in das Kollateralarterienwachstum ermöglicht. Dank der engen Kooperation zwischen einzelnen Forschungsguppen wurde ein breites Meinungsspektrum stets vertreten und ein fruchtbarer Erfahrungsaustausch ermöglicht. Sehr gerne danke ich auch **Herrn Professor Thaiss** für das Rollenverständnis eines Wissenschaftlers, seine Vorbildfunktion für die jüngeren Kollegen und Kooperation im täglichen Forschungsalltag. Eine besondere Anerkennung möchte ich **Herrn Professor Peter von den Driesch** und seinen technischen Mitarbeiterinnen Frau **Pazargard und Frau Malik** für die Unterstützung in Fragen der histologischen Aufarbeitung aussprechen. Ganz besonders möchte ich auch die inspirierenden Diskussionen mit **Dr. Stephan Baldus** hervorheben, die einen bleibenden Eindruck hinterlassen haben. Mit anerkennenden Worten möchte ich **Dr. Timann** und seine Mitarbeiterinnen für die Hilfe und guten praktischen Ratschläge im Umgang mit Tieren und deren Betreuung erwähnen. Für die technische Unterstützung in der Bewältigung des täglichen Forschungsalltages seitens von Frau **Sabine Stübe**, Frau **Anna Mazur** und **Hartwig Wieboldt** bedanke ich mich ganz ganz herzlich. Abschließend wünsche ich allen Kollegen und Mitarbeitern, die mich begleitet und mit Rat und Tat unterstützt haben, weiterhin viel Spaß und Erfolg in der Forschung!

13.09.2003 Euer Eugen Khmelevski