

Aus der
Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie
Charité, Universitätsmedizin Berlin
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Rainer Dietz

**Induktion von Kollateralwachstum über
Monozyten vermittelte parakrine Mechanismen:
Von der adaptiven und therapeutisch induzierten
Arteriogenese im Tiermodell zur klinischen Studie**

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Venia legendi der
Hohen Medizinischen Fakultät der
Charité, Universitätsmedizin Berlin

**vorgelegt von
Ivo Buschmann**

2005

eingereicht: 30.09.2005
Dekan: Professor Dr. Martin Paul
1. Gutachter: Professor Dr. Thomas Meinertz
2. Gutachter: Professor Dr. Harald Tillmanns

Danksagung:

Herrn Professor Dr. Rainer Dietz danke ich für die umfassende wissenschaftliche und persönliche Förderung meiner Arbeit in der Charité. Besonders danke ich ihm für die Begleitung und viele Anregungen bei der Überleitung und Fortführung der Forschergruppe Arteriogenese in der Medizinischen Klinik der Charité.

Herrn Professor Dr. Christoph Bode gilt mein Dank für die exzellente produktive Zusammenarbeit an der Universitätsklinik Freiburg sowie besonders für die intensive Unterstützung beim Aufbau der Forschergruppe für Arteriogenese.

Herrn Professor Dr. Dr. Wolfgang Schaper, der die experimentellen Grundlagen im Bereich der Arteriogenese gelegt hat, verdanke ich die Einführung in dieses Forschungsgebiet. Er war mein wissenschaftlicher Lehrer. Ohne seine Begleitung und seine vielfältige Unterstützung in den vergangenen Jahren hätte diese Schrift nicht vorgelegt werden können. Ihm danke ich sehr herzlich.

Herrn Professor Dr. Konstantin Hossmann danke ich sehr herzlich für die fortwährende Förderung unserer Forschung, für die intensiven wissenschaftlichen Diskussionen sowie für die seit etlichen Jahren bestehende enge Kooperation.

Herrn Professor Dr. Peter Jonas danke ich sehr herzlich für die Möglichkeit der Lehrtätigkeit am Physiologischen Institut der Universität Freiburg sowie für die vielfache hilfreiche Unterstützung während meiner Zeit in Freiburg.

Herrn Professor Dr. Thomas Meinertz danke ich sehr herzlich für die frühe Förderung in meiner Ausbildungszeit in Hamburg sowie insbesondere für die Unterstützung bei der Erlangung des Stipendiums am Max-Planck-Institut in Bad Nauheim.

Meinen Kollegen Herrn Dr. Imo Höfer, Dr. Niels van Royen, Dr. Jörg Busch sowie Frau Dr. Elena Ninci danke ich für die tatkräftige Unterstützung beim Aufbau unserer Forschergruppe.

Den Doktoranden und Doktorandinnen Sebastian Grundmann, Stephan Schirmer, Jing Hua, Benjamin Meder, Karoline Kempf, Edda Schneeloch, Caroline Bergmann, die mit ihrem Eifer zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, danke ich ganz herzlich.

Die vorliegende Arbeit wurde umfassend von der VolkswagenStiftung sowie von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Inhaltsverzeichnis	Seite
Kurzfassung der Ergebnisse:	4
1. Einführung Arteriogenese	4
2. Mechanismen der Arteriogenese:	6
a. In vivo-Studien Peripherie.....	7
1. Experimentelle Studie über den Effekt von GM-CSF auf die periphere Arteriogenese im Kaninchenhinterlauf	7
2. Experimentelle Studie zur Bedeutung des primären Endpunkts Perfusion bei der Identifikation von pro-arteriogenen Faktoren..	10
3. Etablierung eines Großtiermodells als prä-klinisches Arteriogenese Modell mit Vergleichbarkeit zum Patienten.....	13
4. Induktion von Arteriogenese im Großtiermodell mittels CC- Chemokinen.....	16
b. Molekulare Studien.....	18
1. Molekulare Analyse von pro-arteriogen behandelten Monozyten in-vitro.....	18
2. Identifikation von ICAM-1 als Schlüssel-molekül der Arteriogenese.....	20
c. Pharmakologische Interaktionen mit Standardtherapeutika.....	22
1. Einfluß der täglichen Standardmedikation Aspirin versus Clopidogrel auf die Arteriogenese	22
2. Einfluß von anti-inflammatorischem Etanercept auf adaptives Kollateralwachstum.....	22
d. Zerebrale Arteriogenese.....	25
1. Induktion von zerebraler Arteriogenese bei experimenteller Hypoperfusion.....	25
2. Therapeutische Induktion der zerebralen Arteriogenese mit GM-CSF.....	28
3. Klinische Studien	30
a. Kolonie-Stimulierende Faktoren	
1. Klinische Pilot Studie zur Evaluation von GM-CSF in pAVK Patienten (START-Trial)	30
b. Aspirin versus Thienopyridine	
1. Klinische Studie zur Evaluation von Aspirin versus Clopidogrel in pAVK Patienten (Art.Net. 01 Studie)	34
4. Zusammenfassung	37
5. Literatur	42

Kurzfassung der Ergebnisse

1. Einführung Arteriogenese

Der menschliche Körper verfügt über unterschiedliche Mechanismen der Gefäßneubildung. Die Vaskulogenese ist der Prozeß der Entstehung von Blutgefäßen während der Embryonalzeit. Die Angiogenese stellt die Kapillaraussprossung aus Kapillarendigungen dar und tritt sowohl unter physiologischen Bedingungen (Ovulation) (Risau et al.) als auch unter pathologischen Bedingungen auf (Tumorwachstum) (Folkman et al.). Die Arteriogenese ist die rapide Proliferation von prä-existent angelegten Kollateralanastomosen (Buschmann, Schaper et al.). Im Falle von atherosklerotisch bedingten Stenosen im natürlichen arteriellen Gefäßverlauf kommt insbesondere dem dritten Mechanismus -der Arteriogenese- eine ausschlaggebende Rolle zu. Entwickelt sich im arteriellen Gefäßbaum eine hämodynamisch relevante Stenose, fällt der post-stenotische Druck analog zum Grad der proximalen Stenosierung ab. In diesem Falle stellen prä-existent angelegte kollaterale Anastomosen die einzige Verbindung mit der minderperfundierten peripheren Gefäßregion dar. Da der Blutfluß dem niedrigsten peripheren Widerstand folgt, nimmt konsekutiv die Flussgeschwindigkeit in den Kollateralgefäßen signifikant zu. Durch biomechanische Kräfte (Schubspannung, tangentielle Wandspannung) werden die arteriolären Anastomosen aktiviert und der Prozeß der Arteriogenese induziert (Schaper et al.). Die funktionelle und somit klinische Bedeutung von Kollateralarterien wurde im vorangegangenen Jahrhundert von Morphologen, Anatomen sowie Gefäßmedizinern kontrovers diskutiert. Während Baroldi davon ausging, dass insbesondere im Herzen die Koronargefäße funktionelle Endgefäße darstellen, konnten andere Untersucher eindeutige Hinweise auf arterioläre Arkaden zwischen zwei arteriellen Stromgebieten demonstrieren (Fulton et al.).

Mittlerweile steht die klinische Bedeutung von Kollateralarterien außer Frage: in zahlreichen Beispielen an Patienten zeigen sich z.T. komplette arterielle Verschlüsse, die von kollateralen Anastomosen sehr effizient kompensiert werden, so dass es in einigen Fällen zu keinerlei Funktionsausfällen durch das Perfusionsdefizit des verschlossenen Hauptgefäßes kommt. Sowohl im Herzen, in der Peripherie als auch im Gehirn spielt somit die kollaterale Zirkulation im Falle von chronisch progredienten Gefäßstenosen eine wichtige Rolle. Im Gegensatz zur Angiogenese kommt der Arteriogenese, insbesondere auf makrozirkulatorischer Ebene, eine wichtige Rolle zu. Durch zunehmende Stenosierung oder auch eine komplette Okklusion kommt es – im distal der Stenose / Okklusion gelegenen Stromgebiet - zu einem Abfall der Sauerstoffspannung sowie damit verbunden zu einem Anstieg anaerober Metabolite. Dieses Perfusionsdefizit kann (insbesondere am Herzen oder auch Gehirn) lediglich durch die Wiederherstellung des arteriellen Strombettes (sogenannten arterieller „in-flow“) kompensiert werden. Daher sind alle klinischen Verfahren, die zu einer Wiederherstellung des „in-flow“ führen, sinnvoll und auch klinisch effizient (Bypass-Operation mit Anlegung eines arteriellen Umgehungsgefäßes oder die Ballondilatation mit Beseitigung der Stenose / Okklusion).

Die therapeutische Strategie, durch Steigerung der Kapillarisation (Angiogenese) eine Perfusionsverbesserung im betroffenen Endstromgebiet zu erreichen, hat sich bisher klinisch (Henry et al.) als auch experimentell (Lazarous et al.) nicht eindeutig bestätigt. Für den Faktor *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)* liegt bis heute keine eindeutige Evidenz für eine therapeutische Perfusionssteigerung vor. Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass ein - durch eine proximale Stenose bedingtes - Blutflussdefizit nicht durch eine Erhöhung der post-stenotischen Kapillarisation kompensiert werden kann. Selbst bei maximaler Vasodilatation ist nach dem Poiseuille-Gesetz der Radius eines Gefäßes der ausschlaggebende Parameter für die Flussregulation. Dieses physiologische

Grundprinzip ist zwischenzeitlich allgemein anerkannt und international publiziert (Carmeliet et al. in Nature).

2. Mechanismen der Arteriogenese:

In den letzten Jahren konnten grundlegende Kennzeichen des Kollateralenwachstums sowohl in experimentellen in vivo-Studien als auch von molekularer Seite identifiziert werden (Pipp et al; Deindl et al.; Arras et al.) . Die Einwanderung von zirkulierenden mononukleären Zellen und von deren pluripotenten Vorläufern (mononukleäre Stammzellen/ Subpopulationen), nimmt unter den arteriogenen Mechanismen, bei denen der kontrollierte Umbau eines Widerstandsgefäßes in ein Konduktanzgefäß erfolgt, eine Schlüsselstellung ein (Heil et al.): Bei zunehmender arterieller Stenose kommt es zu einem Blutflussanstieg in Kollateralen, die mit dem betroffenen Niederdruckgebiet verbunden sind. In tierexperimentellen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass durch die analoge Zunahme von Scherkräften in diesen Kollateralgefäßen das Endothel aktiviert und somit die schubspannungs-getriggerte Freisetzung von chemotaktischen Faktoren induziert wird. Es erfolgt die Heraufregulation von Zelladhäsionsmolekülen (z.B. ICAM-1) (Deindl et al., Scholz et al.), die Adhäsion und Invasion von zirkulierenden Monozyten und mononukleären Vorläuferzellen sowie die Maturation in Gewebsmakrophagen mit konsekutiver Produktion zahlreicher Wachstums- und anderer trophischer Faktoren. Insgesamt wird ein umfassender Gefäßumbau initiiert, der schließlich zu einem komplett funktionellen arteriellen Konduktanzgefäß mit deutlich größerem Gefäßdiameter führt. Aus therapeutischer Sicht konnte in experimentellen und klinischen Studien gezeigt werden, dass der Prozess der Arteriogenese durch unterschiedlichste Zytokine wie z.B. die CC-Chemokine (MCP-1) erheblich beschleunigt werden kann (Ito et al.) .

2 a. In vivo-Studien Peripherie:

1. Experimentelle Studie über den Effekt von GM-CSF auf die periphere

Arteriogenese im Kaninchenhinterlauf

Neben den oben erwähnten Mechanismen der Arteriogenese - wie der gesteigerten Monozytenadhäsion durch CC-Chemokine - spielt bei der effizienten Transmigration von Monozyten zu Makrophagen auch das "Survival" dieser Zellen eine wichtige Rolle. Walsh und Mitarbeiter konnten zeigen, dass der Fas-Ligand schon während der transendothelialen Migration (TEM) zum kontrollierten Zelltod von Monozyten führen kann und somit eine regulatorische Rolle bei der TEM einnehmen kann (Sata et al.). Die Frage, inwieweit die Überlebensrate von Monozyten bei der Induktion der Arteriogenese eine Rolle spielt, konnten wir anhand eines in vivo-Versuchs mit Kolonie-Stimulierenden Faktoren untersuchen. Von dieser Substanzgruppe ist bekannt, dass sie einen effizienten Schutz vor Apoptose bei Monozyten hervorrufen kann, der insbesondere über die Bcl-1-medierte Signaltransduktionskaskade in Monozyten vermittelt wird (Hashimoto et al.). Nach 7-tägiger intra-arterieller Applikation von GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen Kolonie-Stimulierender Faktor) zeigte sich in der invasiven Konduktanzbestimmung unter maximaler Vasodilatation mit Adenosin eine Zunahme der kollateralabhängigen Gewebsperfusion um 15% in der GM-CSF-Gruppe. Rein chemotaktisch - mit dem Monozyten-Chemoattraktiven Protein-1 (MCP-1) - behandelte Tiere zeigten eine Perfusionsverbesserung von 22%. Die Kombination einer monozyten-antiapoptotischen Substanz wie GM-CSF mit einer rein chemoattraktiven Substanz führte zu einem additiven Effekt von 45% Perfusionswiederherstellung nach 1 Woche Ligatur der Arteria femoralis im Vergleich zu 3% Perfusionsniveau nach normaler Gabe einer Kontrollsubstanz (PBS Puffer). Immunhistochemisch bestätigte sich eine signifikant reduzierte Apoptoserate von vornehmlich in der Adventitia lokalisierten Makrophagen in der GM-CSF Gruppe im Vergleich zu der reinen chemoattraktiven Substanzgruppe.

Die transendotheliale Migration wurde hingegen von GM-CSF im in vitro-Migrationsassay nicht beeinflusst. Diese Daten belegen somit zwei wichtige Mechanismen: Monozyteninflux sowie gleichzeitige Protektion dieser Zellen vor Apoptose sind einflußreiche Regulationsprozesse während der adaptiven als auch der therapeutischen Arteriogenese.

Buschmann IR, Hoefler IE, van Royen N, Katzer E, Braun-Dulleaus R,
Heil M, Kostin S, Bode C, Schaper W.

GM-CSF: a strong arteriogenic factor acting by amplification of
monocyte function.

Atherosclerosis. 2001 Dec;159(2):343-56.

2.a.2. Experimentelle Studie zur Bedeutung des primären Endpunkts Perfusion bei der Identifikation von pro-arteriogenen Faktoren

Bei der funktionellen Beurteilung, inwieweit eine therapeutische Substanz einen möglichen pro-arteriogenen Effekt aufweist, wird in der Literatur nur sehr unscharf zwischen den einzelnen Neovaskularisationsarten unterschieden. Kommt es im Falle von hämodynamisch relevanten Stenosen zu einer Rekrutierung von Kollateralgefäßen, sind diese arteriolären / arteriellen Verbindungen (insbesondere im Falle von kompletten Okklusionen) zumeist die einzige Verbindung mit dem Niederdrucksystem. Typischerweise finden sich diese Kollateralen häufig außerhalb der ischämischen Zone, die Proliferation dieser Gefäße findet zumeist in sauerstoffreichem Gewebe statt (Pipp et al.). Die häufig benutzte Kapillärzählung oder -auf makroskopischer Ebene- die Gefäßangiographie ist daher keine optimale Methodik, um eine qualifizierte Aussage über die pro-Arteriogenität einer Substanz zu erhalten (Banai et al.). Bei der Angiographie führen nach dem Hagen-Poiseuille-Gesetz insbesondere schon minimale Änderungen (Über- bzw. Unterschätzungen im Gefäßdiameter r) zu hochsignifikanten Fehlbeurteilungen des Perfusionsniveaus. Alle anderen Faktoren wie Blutviskosität η , Druckdifferenz ΔP sowie Längendifferenz Δl und Volumenfluß V verhalten sich einfach proportional innerhalb der Gleichung.

Gesetz von Hagen Poiseuille:

$$\frac{\pi * r^4 * \Delta P}{8 * \eta * \Delta l} = \dot{V}$$

Bei der invasiven Instrumentierung von pro-arteriogen behandelten weissen Neuseeländer Kaninchen deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass die bei der

Dopplerfluss-Messung der Blutflußgeschwindigkeit erhobenen Daten zu falschen positiven Befunden führen. In einer Vergleichsstudie benutzten wir auf der einen Seite den Goldstandard der Mikrosphärperfusionsmessung, bei der nach pro-arteriogener Therapie im instrumentierten Tier ein autologer Shunt angelegt wird (Carotis zu distaler Aorta), über den dann konsekutiv Mikrosphären bei sechs unterschiedlichen Druckkurven druck- und volumengesteuert in die periphere Vaskulatur infundiert werden. Dieser Shunt ist insofern ausgesprochen wichtig, da er eine physiologische Perfusion bei maximaler Vasodilatation mit Adenosin unter in vivo-Bedingungen erlaubt. Die komplette Vasodilatation wäre ansonsten nicht mit einem in vivo-Experiment durchführbar und erlaubt daher den Vergleich der kollateralen Konduktanz im „Null“-Zustand aller Gefäße. Als Vergleich benutzten wir auf der anderen Seite die weniger invasiv durchführbare Dopplerflußmessung nach Hyperämie im Hinterlauf. Für den als stark angiogen bekannten adipozytischen Faktor Leptin zeigte sich zwar zunächst eine Zunahme des Blutflusses im dopplersonographischen Signal nach Hyperämie im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der Gewebsanalyse auf Mikrosphären ergab sich jedoch keine kollateral-fördernde Wirkung von Leptin. Ähnliche Ergebnisse erzielten wir mit dem Faktor VEGF-135, der bereits in zahlreichen klinischen Studien, trotz positiver Ergebnisse aus tierexperimentellen Untersuchungen, keine wegweisende Zunahme der Kollateralisierung ergeben hatte. Bei der Frage, inwiefern pharmazeutische Substanzen eine pro-arteriogene Wirkung haben, sollten daher immer Goldstandard-Verfahren als Kontrolle mitgeführt werden, um falsche positive in vivo- Daten in der Prä-Klinik zu vermeiden.

Schirmer SH*, Buschmann IR*, Jost MM, Hofer IE, Grundmann S,
Andert JP, Ulusans S, Bode C, Piek JJ, van Royen N.

Differential effects of MCP-1 and leptin on collateral flow and
arteriogenesis.

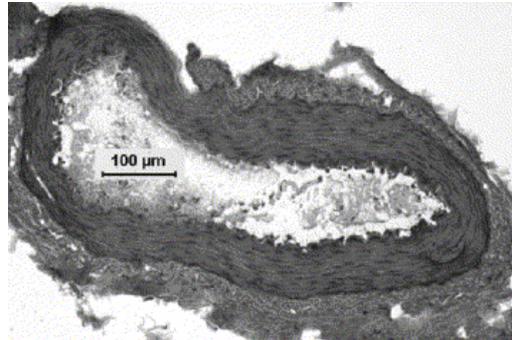
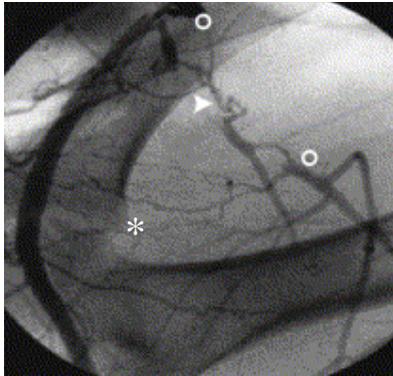
Cardiovasc Res. 2004 Nov 1;64(2):356-64.

2.a.3. Etablierung eines Großtiermodells als prä-klinisches Arteriogenese Modell mit Vergleichbarkeit zum Patienten

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass durch die akute Ligatur der Arteria femoralis im Kaninchenhinterlauf zahlreiche kollaterale Anastomosen im Bereich der Adduktorenmuskulatur rekrutiert werden konnten, die im weiteren zeitlichen Verlauf sowohl ohne Wachstumsfaktorgabe (adaptive Arteriogenese) als auch mit therapeutischer Stimulation zu einer effektiven Blutversorgung des Hinterlaufes unter Ruhebedingungen führten (Ito et al.). Histologisch handelt es sich bei diesen Gefäßen durchweg um prä-existent angelegte Arteriolen mit ein bis zwei Schichten von glatten Gefäßmuskelzellen.

Während bei Kleintiermodellen eine deutlich eingeschränkte Übertragbarkeit auf den Menschen vorliegt, existierten im Großtierversuch keinerlei Aussagen darüber, ob auch eine prä-existente Kollateralisierung a) speziespezifisch vorhanden ist, b) der humanen Situation ähnelt und c) therapeutisch stimulierbar ist. Dabei ist festzuhalten, dass das Ausgangssubstrat -das nicht rekrutierte Kollateralgefäß- sowohl bei der Maus als auch beim Menschen die gleiche Ausgangsgröße besitzt (auch die Zellgröße ist bei Mensch und Maus identisch), eine Maus kollaterale benötigt jedoch lediglich 1-2 Zellteilungen ihrer glatten Gefäßmuskelzellen, um im Diameter die finale Größe zu erreichen. In einem „*human like*- Tiermodell“ bzw. am Patienten hingegen sind hundertfache Zellteilungen notwendig, um dem erhöhten Strömungsprofil nach dem Laplace-Gesetz durch eine Zunahme des Wanddurchmessers gerecht zu werden (Schaper et al.) (siehe rechte Abb. unten, Histologie eines maturierten Kollateralgefäßes aus dem Schwein). In unserem neu entwickelten Tiermodell am Schwein zeigte sich eine der humanen pAVK-Situation sehr ähnliche Kollateralisierung mit sowohl Brückenkollateralen (linke Abb. Angiographie des Schweinehinterlaufs; Pfeil), die die Okklusion prä-stenotisch mit post-stenotisch verbinden, als auch Kollateralen

aus dem Versorgungsgebiet der Arteria profunda femoris (linke Abbildung siehe Stern).



Funktionell konnte in dem o.g. Tiermodell die präzise Leitfähigkeit der Kollateralen (berechnet als reziproker Wert des Widerstandes = Konduktanz) mittels invasiver Druck- und Flußbestimmung ermittelt werden. So zeigte sich nach 2 Wochen in Landschweinen eine Zunahme um 22,4 % der Konduktanz im Vergleich zu einem niedrigeren Wert von 12.7% bei Göttinger Minischweinen.

Funktionelle Beeinträchtigungen in den Versuchstieren waren aufgrund des guten Kollateralstatus nicht vorhanden.

Buschmann IR, Voskuil M, van Royen N, Hoefer IE, Scheffler K,
Grundmann S, Hennig J, Schaper W, Bode C, Piek JJ.

Invasive and non-invasive evaluation of spontaneous arteriogenesis in
a novel porcine model for peripheral arterial obstructive disease.

Atherosclerosis. 2003 Mar;167(1):33-43.

2.a.4. Induktion von Arteriogenese im Großtiermodell mittels CC-Chemokinen

Im zweiten Teil der Untersuchungen stellten wir die Hypothese auf, ob - basierend auf den oben genannten Werten - für die natürliche Arteriogenese Kollateralwachstum im Großtiermodell durch Applikation von CC-Chemokinen therapeutisch induziert werden kann. Gerade vor dem Hintergrund des Spezies-Größen-Unterschiedes war diese Untersuchung von Bedeutung für zukünftige klinische Ansätze. Um Wachstumsunterschiede während des experimentellen Verlaufs durch die Größenzunahme von Landschweinen zu umgehen, wurde auf Minipigs mit einem konstanten Körpergewicht zurückgegriffen. Nach intraarterieller konstanter Infusion von MCP-1 über implantierbare sowie auch externe Pumpensysteme (2.0 µg/h über einen Zeitraum von 2 Wochen) wurde die vaskuläre Konduktanz des kollateralen Gefäßbettes invasiv unter kompletter Vasodilatation mittels Druck- und Flußkathetermessung detektiert. In nicht behandelten Tieren ergab sich ein Wert von 645 ml/ min · mmHg im Vergleich zu einem signifikanten Anstieg der Werte nach MCP-1-Gabe (1070 ml/ min · mmHg). Die kollaterale Perfusionsverbesserung liess sich in diesem Modell nur unter kompletter Vasodilatation nachweisen. Messungen unter Ruhebedingungen ergaben keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Somit unterstreichen diese Daten die eingeschränkte Aussagekraft des Ankle-Brachial-Index (ABI) in klinischen Studien unter Ruhebedingungen. Sie zeigen erstmals, dass die Leitfähigkeit von Kollateralen nach experimenteller Ligatur der Arteria femoralis auch im Großtiermodell therapeutisch steigerbar ist.

Voskuil M, van Royen N, Hoefer IE, Seidler R, Guth BD, Bode C,
Schaper W, Piek JJ, Buschmann IR.

Modulation of collateral artery growth in a porcine hindlimb ligation
model using MCP-1.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003 Apr;284(4):H1422-8. Epub
2002

b. Molekulare Studien:

2.b.1.

Molekulare Analyse von pro-arteriogen behandelten Monozyten in-vitro

Von mechanistischer Seite ist die bedeutende Rolle von Makrophagen zur Induktion als auch zur Aufrechterhaltung der Arteriogenese intensiv untersucht worden. Neben dem bekannten Befund der Schaper-Gruppe aus den 70er Jahren, dass zirkulierende Monozyten am Endothel von neu rekrutierten Kollateralen aus dem Hundeherzen vermehrt anhaften (Schaper et al.), wurden bereits die o.g. beschriebenen Induktionswege der Arteriogenese über eine Hemmung der Monozytenapoptose sowie Steigerung der transendothelialen Migration erwähnt. Um das Expressionsmuster von Makrophagen unter einer GM-CSF-Stimulation in-vitro zu untersuchen, wurden Makrophagen aus dem Knochenmark von Mäusen gewonnen und in Zellkulturbeutel aus Teflon verbracht (Munder et al.). Nach Aufreinigung der Zellen zeigte sich auf der mRNA-Ebene hierbei insbesondere eine signifikant hohe Expression vom Monozyten chemoattraktivem Protein-1 (MCP)-1, der Matrixmetalloproteinase (MMP)-12 sowie der Arginase-1 aus dem Kollagen und NO-Stoffwechsel. Für die MMP-12 sowie für die Arginase konnte auf Proteinebene in immunhistochemischen Schnitten von wachsenden Kollateralarterien das Signal für die MMP-12 sowie für die Arginase bestätigt werden. Diese Daten belegen somit, dass multiple ineinandergreifende mechanistische Schritte bei der Arteriogenese von Bedeutung sind: Rekrutierung von zirkulierenden Monozyten über die CC-Chemokin-Gruppe (hier insbesondere MCP-1), Expression von Metalloproteinasen zur Reorganisation der Lamina Elastica (Lyse sowie konsekutive Neu-Ausbildung im vergrößerten Kollateralgefäß) sowie die Schaffung von „Platz“ für das sich vergrößernde Gefäß (Scholz et al.) in einer gewebssoliden Umgebung. Die signifikante Expression der Arginase-1 wird derzeit als Substratlieferant für die Proliferation des Gefäßes (Prolinsubstitution für Kollagenproduktion) sowie auch als konkurrierendes Substrat für die vasodilatierende NO-Synthese gesehen.

Jost MM, Ninci E, Meder B, Kempf C, Van Royen N, Hua J, Berger B,
Hofer I, Modolell M, Buschmann IR.

Divergent effects of GM-CSF and TGFbeta1 on bone marrow-derived
macrophage arginase-1 activity, MCP-1 expression, and matrix
metalloproteinase-12: a potential role during arteriogenesis.

FASEB J. 2003 Dec;17(15):2281-3. Epub 2003 Oct 2.

2.b.2 ICAM-1 ist das Schlüsselmolekül bei den initialen Schritten der adaptiven Arteriogenese

Neben den pro-arteriogenen Mechanismen des Kollateralwachstums galt unser Interesse ferner den Schlüsselmolekülen der transendothelialen Migration, die die Adhäsion sowie Transmigration von Monozyten primär vermitteln. Dabei verfolgten wir zwei Ansätze, um die Bedeutung des zentralen Moleküls ICAM-1 näher zu untersuchen: 1) Blockade des ICAM-1-Rezeptors durch einen spezifischen Antikörper im in vivo-Experiment sowie 2) Induktion von adaptiver Arteriogenese im ICAM-1 sowie Selektin-*knock-out*-Mausmodell.

Mittels selektiver Antikörper-Blockade des ICAM-Rezeptors auf dem Endothel (Schneider et al.) zeigte sich eine signifikante Hemmung der MCP-1-induzierten Arteriogenese (MCP-1 plus ICAM-1 Antikörper Gabe über 7 Tage nach Femoralisligatur bei weissen Neuseeländer Kaninchen).

In ICAM-1^{-/-}-sowie Mac-1^{-/-}-knock out-Mäusen (Dunne et al.) war zudem der Grad der adaptiven Arteriogenese ohne therapeutische Stimulation signifikant gehemmt. Hingegen führte der hereditäre Mangel an Selektinen zu keiner wesentlichen Reduktion des Kollateralarterienwachstums. Somit belegen diese Daten die Bedeutung des ICAM-1-Rezeptors während der transendothelialen Migration bei arteriogen induzierten Tieren. Ebenso zeigen die Experimente, dass die Wirkung von MCP-1 unter Gabe von ICAM-1-Antikörpern komplett aufgehoben ist, welches somit zusätzlich einen direkten pro-arteriogenen Effekt von MCP-1 auf die Proliferation der kollateralen Gefäßwand ausschließt. Selektine, die insbesondere das primäre Rolling bei der transendothelialen Migration vermitteln, scheinen in den frühen Stadien der Arteriogenese keine bedeutende Rolle zu spielen.

Hoefer IE, van Royen N, Rectenwald JE, Deindl E, Hua J, Jost M,
Grundmann S, Voskuil M, Ozaki CK, Piek JJ, Buschmann IR.

Arteriogenesis proceeds via ICAM-1/Mac-1- mediated mechanisms

Circ Res. 2004 May 14;94(9):1179-85. Epub 2004 Apr 1.

C. Pharmakologische Interaktionen mit Standardtherapeutika

1. und 2. Anti-Inflammatorische Moleküle wie Anti-TNF α -Antikörper oder systemische COX-Hemmer wie Aspirin haben einen deutlich hemmenden Effekt auf adaptives Kollateralwachstum

Von pharmazeutischer Seite sind in den letzten Jahren zahlreiche selektive Substanzen entwickelt worden, die darauf abzielen, inflammatorische Vorgänge bei pathologischen Prozessen zu blockieren (TNF α -Antikörper beim Morbus Crohn, ICAM-1-Antikörper beim Schlaganfall, Transplantationsmedizin etc.) (Hochberg et al., Salmela et al., Vuorte et al., Schneider et al.). Neben diesen Molekülen sind allerdings auch weit verbreitete anti-inflammatorische Substanzgruppen wie die Acetylsalicylsäure bei der chronisch-medikamentösen Behandlung von Gefäßkrankheiten im klinischen Alltagsgebrauch (Gibson et al.). Aus den neueren Daten der Stammzellbiologie sowie der therapeutisch induzierten Arteriogenese kristallisiert sich jedoch ein entscheidender Behandlungsgegensatz heraus, dem eine wichtige Bedeutung in der klinischen Medizin zukommen könnte. Es wird vermutet, dass die anti-inflammatorische Behandlung von Patienten mit z.B. chronischen rheumatischen Erkrankungen zu einer gleichzeitigen Hemmung von reparativen monozyten-induzierten Prozessen wie der Arteriogenese führen könnte. Aus diesem Grunde untersuchten wir den Effekt von klinisch verwendeten anti-inflammatorischen Substanzen wie Aspirin (im Vergleich zum Thienopyridin Clopidogrel) sowie vom bekannten TNF α -Antikörper (z.B. Etanercept, Infliximab). Für die letzteren bestätigte sich die Hypothese, dass sowohl die chronische Infusion von Infliximab als auch von Etanercept zu einer deutlichen Reduktion der Arteriogenese führte (Konduktanz der Kontrollsubstanz 7 Tage nach Femoralisligatur: 52.4 ml/min/100mmHg, Abfall der Konduktanz nach Infliximab-Behandlung auf 35.2, nach Etanercept-Behandlung auf 33.3 ml/min/100mmHg). Mechanistisch zeigte sich in beiden Behandlungsgruppen eine drastische

Reduktion der para-adventitiellen Makrophagenanzahl in den behandelten Tieren sowie eine deutliche Reduktion der glatten Gefäßwandmuskelzellen. In der Infliximab-Gruppe lag darüber hinaus eine erhöhte Monozyten-Apoptoserate vor. In der zweiten Substudie zeigten sich analoge Effekte für die Acetylsalicylsäure, die über eine systemische COX-Hemmung zu einer signifikanten Monozyteninflux-Reduktion in die kollaterale Wand führte. Eine Clopidogrel-Behandlung hingegen hatte keinerlei Einfluß auf das Konduktanzverhalten nach Femoralarterienligatur.

Grundmann S, Hoefler IE, Ulusans S, van Royen N, Schirmer SH,
Ozaki CK, Bode C, Piek JJ, Buschmann IR

Anti-Tumor Necrosis Factor- α Therapies Attenuate Adaptive
Arteriogenesis in the Rabbit

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005 Oct;289(4):H1497-505

Aspirin but not Clopidogrel Reduces Collateral Conductance in a
Rabbit Model of Femoral Artery Occlusion

Imo E. Hoefler, Sebastian Grundmann, Stephan Schirmer, Niels van
Royen, Benjamin Meder, Christoph Bode, Jan J. Piek and IR.
Buschmann

J Am Coll Cardiol. 2005 Sep 20;46(6):994-1001.

2.d.1. Zerebralen Arteriogenese: Induktion von zerebraler Arteriogenese bei experimenteller Hypoperfusion

Nach den Untersuchungsergebnissen kann festgestellt werden, dass die Arteriogenese bei Gefäßstenosierungen eine ausgesprochen wichtige Rolle in der Peripherie als auch im Myokard spielen kann.

Bisher lagen jedoch noch keine Daten darüber vor, ob die Arteriogenese auch im Gehirn funktionell bedeutsam ist. Dabei sind die therapeutischen Möglichkeiten beim ischämisch induzierten Schlaganfall nach wie vor ausgesprochen limitiert. Hinzu kommt, dass das Schlaganfallrisiko bei Patienten mit höhergradigen Karotisstenosen gegenüber der Normalbevölkerung deutlich erhöht ist (Szilagyi et al., Hedde et al.). Aufgrund der herabgesetzten zerebrovaskulären CO₂-Reaktivität kann es bei veränderten hämodynamischen Verhältnissen zu einer Verstärkung der zerebralen Hypoperfusion bis hin zur zerebralen Ischämie kommen.

Zur Erforschung des zerebralen Kollateralgefäßwachstums ist ein reproduzierbares experimentelles Modell, in welchem eine stabile Scherkrafterhöhung in einem zerebralen Kollateralgefäß erreicht werden kann, eine wesentliche Voraussetzung. Tierexperimentell kann durch die Okklusion von drei der vier grossen extrakraniellen, hirnversorgenden Gefässen (Drei-Gefässokklusion, 3-VO) eine zerebrale Minderperfusion einer Hemisphäre erreicht werden, die zwar zum Verlust der hämodynamischen Reserve, nicht aber zu Funktionsausfällen oder zu zerebralen Infarkten bzw. zu disseminierten Nervenzellnekrosen führt. In Messungen des zerebralen Blutflusses (CBF) nach Okklusion der drei grossen extrakraniellen, hirnversorgenden Gefässe zeigte sich eine durchschnittliche Reduktion der Durchblutung von ca. 40% - 50% in der betroffenen Hemisphäre; die CO₂-Reaktivität als Ausdruck der zerebrovaskulären hämodynamischen Reserve war unmittelbar nach 3-VO fast vollständig aufgehoben. Die CO₂-Reaktivität der zerebralen Gefässe ist ein wichtiger klinisch-erfassbarer Parameter, der den Spielraum einer möglichen Gefässregulation auf

funktionell bedingte Stoffwechselaktivierungen widerspiegelt und bei Verschlüssen bzw. Einengungen der extrakraniellen Gefäße deutlich herabgesetzt ist.

Wird die zerebrale Gefäßmorphologie bei Tieren mittels Latex-Infusion dargestellt, zeigte sich diese unmittelbar nach Drei-Gefäßokklusion im Vergleich zu Normaltieren nicht verändert. Im weiteren Verlauf kam es jedoch zu einer spontanen Arteriogenese der Arteria cerebri posterior (PCA), einer wichtigen arteriellen Kollateralverbindung an der Hirnbasis. Die Arteriogenese führte an den Versuchstieren innerhalb einer Woche zu einer Zunahme des äußeren Durchmessers dieses Gefäßes um 39% und innerhalb von drei Wochen zu einer Zunahme um 72%.

Busch HJ*, Buschmann IR*, Mies G, Bode C, Hossmann K

Arteriogenesis in hypoperfused rat brain.

J Cereb Blood Flow Metab. 2003 May;23(5):621-8.

2.d.2. Therapeutische Induktion der zerebralen Arteriogenese mit GM-CSF

Die therapeutische Behandlung von Versuchstieren mit Kolonie-Stimulierenden-Faktoren nach Drei-Gefäßokklusion führte zu einer erheblichen Steigerung des Wachstums der Arteria cerebri posterior, verbunden mit einer Wiederherstellung der zerebrovaskulären Reserve. Das neuroprotektive Potential der zerebralen Arteriogenese und der damit verbesserten hämodynamischen Reserve konnte in einem hämodynamischen Infarkt-Modell nachgewiesen werden. In diesem Modell wurde im Anschluss an die Drei-Gefäßokklusion der arterielle Blutdruck akut abgesenkt und das daraus resultierende Energiedefizit mit einer regionalen ATP-Biolumineszenz-Methode gemessen. Der prozentuale Anteil der Hemisphäre, in dem es zu einem Zusammenbruch des Energiestoffwechsels kam (das potentielle Infarktvolumen), konnte durch GM-CSF-Behandlung signifikant um ca. 2/3 von 48.8% auf 15.8 % verringert werden. Dies spiegelte exakt die zuvor erhobenen morphologischen und hämodynamischen Ergebnisse wider. Messungen des zerebralen Blutflusses zeigten eine deutliche Durchblutungsverbesserung nach GM-CSF-Behandlung, und zwar sowohl unter Normotension wie unter hypotensiven Bedingungen. Die Zunahme des Gefäßdurchmessers der Arteria cerebri posterior führte somit nicht nur zu einer Verbesserung der Ruhedurchblutung, sondern auch zu einer Wiederherstellung der hämodynamischen Reserve, die wiederum einen effektiven Kompensations- bzw. Schutzmechanismus bei zusätzlicher Hypotension darstellt. Tiere, die eine Drei-Gefäßokklusion erhalten hatten, zeigten in der unbehandelten Gruppe eine deutliche Einschränkung der zerebrovaskulären Reserve. Eine identische Tiergruppe mit Drei-Gefäßokklusion wies mit GM-CSF behandelt eine CO₂-Reaktivität auf, die mit der gesunden Normalgruppe vergleichbar war und somit keinerlei Einschränkung aufwies. Die hier dargestellten Ergebnisse haben große Beachtung gefunden, da es sich um die erste Beschreibung eines neuen Paradigmas zur Schlaganfallbehandlung handelt.

Buschmann IR, Busch HJ, Mies G, Hossmann KA

Therapeutic induction of arteriogenesis in hypoperfused rat brain via
granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

Circulation. 2003 Aug 5;108(5):610-5. Epub 2003 Jun 30.

3. Klinische Studien

Basierend auf den tierexperimentellen Ergebnissen zu

- a) der Wirkung der Kolonie-Stimulierenden Faktoren auf die Arteriogenese sowie
 - b) dem hemmenden Einfluß von Aspirin im Vergleich zu den Thienopyridinen,
- initiierten wir zwei klinische Studien, um diese Effekte auf funktionelle klinische Relevanz zu überprüfen:

3.a.1. In der ersten Pilot-Studie (START Trial "*A Pilot study on stimulation of arteriogenesis using subcutaneous application of GM-CSF as a new treatment for peripheral vascular disease*") wurden 40 Patienten doppelblind sowie randomisiert mit einer moderaten oder schweren peripheren Verschußkrankheit (pAVK) eingeschlossen. Die Patienten erhielten entweder GM-CSF (10 µg pro Kilogramm Körpergewicht) oder eine Placebosubstanz ebenfalls subkutan verabreicht über 14 Tage (insgesamt 7 Injektionen). Unter dieser Behandlung zeigte sich in der mit GM-CSF behandelten Gruppe zunächst ein deutlicher Anstieg der Monozytenfraktion, der jedoch im weiteren Verlauf rasch wieder auf das Ausgangsniveau zurückfiel. Sowohl in der Placebo-Gruppe als auch in der GM-CSF-Gruppe zeigte sich eine deutliche Verbesserung in der Gehstrecke nach 14 Tagen (Placebo: 127 ± 67 Meter Laufstrecke zu Beginn versus 184 ± 87 Meter nach 14 Tagen, P=0.03, GM-CSF: 126 ± 66 Meter Laufstrecke zu Beginn versus 189 ± 141 nach 14 Tagen, P=0.04) als auch zum zweiten Kontrollpunkt nach 90 Tagen. Bezüglich des primären Endpunkts der Studie (Unterschied in der Gehstrecke) konnte somit kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen gezeigt werden. Ebenso zeigten sich keine Unterschiede bezüglich des ABI-Index (*Ankle-Brachial-Index*) nach 14 bzw. 90 Tagen.

Im sekundären Endpunkt der Studie ließ sich hingegen eine signifikante Verbesserung bezüglich der mikrozykulatorischen Laser-Doppler-Flußreserve erkennen. Diese Technik analysiert die lokale Hautdurchblutung mittels Laser-

Doppler und ist zu einem wertvollen diagnostischem Werkzeug bei der Diagnose der pAVK geworden. In der Placebo-Gruppe kam es zu einer deutlichen Abnahme im Verlauf der beiden Kontrollpunkte bezüglich der Flußreserve, hingegen in der GM-CSF-Gruppe blieb die Flußreserve weitgehend erhalten.

Zusammenfassend konnte in dieser Pilotstudie gezeigt werden, dass die Applikation von Kolonie-Stimulierenden-Faktoren sicher durchführbar ist und sich nicht vom Nebenwirkungsprofil der großen Zulassungsstudien von GM-CSF unterscheidet. Da die Endpunkte dieser Studie -die Gehstrecke- keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen aufzeigte, bzw. die Verbesserung der Gehstrecke in der Placebo-Gruppe ausgesprochen hoch war, lassen sich darauf – auch in Hinblick auf andere klinische Studien in diesem Bereich - zwei wesentliche Punkte ableiten: Der ausgesprochen hohe Placebo-Effekt erfordert klinische Endpunkte, die einer geringeren Streuung unterliegen als der ABI-Index bzw. kollateralspezifischer eine Aussage über die Verbesserung der Arteriogenese erlauben. Zum anderen zeigte sich in der Kontrollgruppe, dass einige Patienten innerhalb des Behandlungszeitraumes deutlich mehr trainiert hatten als im Zeitraum zuvor. Da die START-Studie kein kontrolliertes Trainingsprogramm zugrundelegte, leiten wir daraus ab, dass körperliches Training während der Behandlungsperiode unter strikt kontrollierten Maßnahmen erfolgen muss, um so eine bessere Vergleichbarkeit der Kohorten zu erreichen. Diese Einwände wurden daher in dem zweiten klinischen Ansatz zur Überprüfung der Effizienz von Aspirin versus Clopidogrel in der Art.Net. 01-Studie berücksichtigt. Ein dritter Punkt der START-Studie betrifft die Analyse der Monozyten-Fraktion bei GM-CSF behandelten Patienten. Durch die Behandlung mit GM-CSF liess sich ein Anstieg der Monozytenzahlen im peripheren Blut beobachten, der seinen Maximalwert am 4. Tag nach GM-CSF Behandlung zeigte und danach im weiteren Verlauf allerdings unterhalb der initialen Werte zu Beginn der Studie lag. Diese Daten entsprechen den verfügbaren Patientenprofilen aus den Kontrollstudien an

Gesunden, bei denen ebenfalls der „peak-value“ nach 3-5 Tagen zu sehen war. In der Placebo-Gruppe der START-Studie kam es zu keinem signifikanten Anstieg der Monozyten-Fraktion. Wir konnten bei der molekularen m-RNA und Protein-Analyse der Monozytenfraktion eine signifikante Herunter-Regulation von CIS (*cytokine inducible SH2-containing protein*) verifizieren, welches eine Erklärung für die Abnahme der Monozytenfraktion trotz Weiterbehandlung mit GM-CSF sein könnte. Dieses Molekül ist ein effizienter Hemmer der GM-CSF Signaltransduktion und wird bei längeranhaltender Gabe von GM-CSF exprimiert. Weiterführende klinische Studien müssen zeigen, inwieweit eine intermittierende GM-CSF Gabe diese Hemmung durch CIS umgehen kann (unpublizierte Daten).

Niels van Royen, Stephan H. Schirmer, Bektas Atasever, Casper Y.H. Behrens, Dirk Ubbink, Eva E. Buschmann, Michiel Voskuil, Pieter Bot, Imo Hoefer, Reinier O. Schlingemann, Bart J. Biemond, Christoph Bode, Wolfgang Schaper, Jacques Oskam, Dink A. Legemate, Jan J. Piek, Buschmann IR

The START-Trial: A Pilot study on stimulation of arteriogenesis using subcutaneous application of GM-CSF as a new treatment for peripheral vascular disease

Circulation 2005 2005 Aug 16;112(7):1040-6.

3.b.1. Art.Net.01: Klinischer Proof-of-Concept zum Einfluß von Aspirin und Clopidogrel auf die Gehstreckenentwicklung von Patienten mit einer Claudicatio intermittens: doppelblinde, randomisierte, multinationale Vergleichsstudie (Labs et al.)

Auf der Grundlage der oben erwähnten Untersuchungen wurde von uns das Art.Net. (Arteriogenesis Competence Network), als ein präklinisch / klinischer Forschungsverbund der Charité Berlin, der Universität Freiburg/Breisgau sowie der Universität Basel, Schweiz gegründet. Basierend auf den o.g. Daten zum hemmenden Effekt von Aspirin auf die Arteriogenese untersuchten wir hier ebenfalls die klinische Relevanz dieser Daten am Patientenkollektiv mit pAVK. Da das relative Risiko (RR) einer kardiovaskulären- bzw. koronaren Mortalität bei pAVK-Patienten, selbst im asymptomatischen Stadium I, Werte von $RR=4,0$ übersteigt, ein Aggregationshemmer damit zur Standardmedikation für alle pAVK Patienten gehört, wären die präklinisch erhobenen Befunde auch klinisch hoch relevant, da Aspirin als relativ kontraindiziert eingestuft werden müßte. Um den humanen Wert der präklinischen Daten zu verifizieren, randomisieren wir derzeit in einer binationalen multizentrischen ($n=20$), randomisierten, prüferinitiierten Doppelblindstudie 250 Pat. mit Claudicatio intermittens auf ein Behandlungsschema mit entweder Aspirin oder Clopidogrel. Zur Arteriogenese-Induktion absolvieren alle Patienten ein 3-monatiges, systematisches, tägliches Gehtrainingsprogramm, welches zwar als Heimtraining organisiert ist, aber durch ein Aktivitätsmonitoringsystem mit hochfrequenter Akzelerationsmessung am Fuß elektronisch überwacht wird (PACER TM, FitSense Techn). Das System erlaubt nicht nur eine detaillierte Aufzeichnung der Trainingsaktivität mit Schrittzahl, exakter Lauf- und Geschwindigkeitskinetik, Pausenzeiten, Gesamttagesaktivität, sondern gibt gleichzeitig Information zum Fußabrollablauf des Einzelschrittes und damit zur Laufdynamik. Das Trainingsprogramm wird somit exakt überwacht und

gesteuert, ohne dass damit für Patienten die häufig schwierige Logistik eines institutionsgebundenen Trainingsprogrammes damit verbunden ist. Art.Net. 01 hat im Mai 2005 mit der Randomisation papierlos mit direkter Dateneingabe in einen elektronischen case record form, online Monitoring und Datenbankverwaltung begonnen und wird voraussichtlich im Dezember 2007 klinisch abgeschlossen sein.

Singer E, Imfeld S, Hoffmann U, Buschmann I, Labs KH, Jaeger KA.

Aspirin in peripheral arterial disease: breakthrough or pitfall?

Vasa 2006 Aug;35(3):174-7.

4. Zusammenfassung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehen die physiologischen und molekularen Mechanismen des Kollateralarterienwachstums (Arteriogenese). Es werden einerseits unterschiedliche Regulationsmechanismen dieses Prozesses beschrieben. Andererseits wird auf die therapeutische Beeinflussung dieses Mechanismus eingegangen.

Methodisch kommt ein breites Spektrum verschiedener Techniken zum Einsatz: Die hämodynamische Etablierung eines neues Mikrosphären-basierten Tiermodells zur effizienten Erfassung der Perfusion sowie konsekutiv der kollateralen Konduktanz mit Ermöglichung zahlreicher physiologischer Blutfluss- und Druckmessungen in der Peripherie vom Kaninchen und der Maus. Ferner werden zahlreiche molekularbiologische Methoden wie quantitative PCR, Northern- und Westernblot-Technik, m-RNA-Profil-Untersuchungen, immunhistochemische Analysen, zellbiologische Assays sowie durchfluß-zytometrische Analysen angewandt.

Im ersten Teil der Arbeit liegt der Schwerpunkt auf der Etablierung von adäquaten in vivo-Modellen zur Erfassung der Arteriogenese im Versuchstier. Erstmals kann gezeigt werden, dass der Kolonie-Stimulierende-Faktor GM-CSF zu einer signifikanten Beschleunigung der Arteriogenese führt. Der Wirkmechanismus dabei liegt in einer effizienten Hemmung der monozytären Apoptose während der transendothelialen Migration in die kollaterale Gefäßwand. Eine vergleichende Untersuchung zeigt darüber hinaus, dass andere Surrogatparameter, wie die Laserdopplermessung zu falschen positiven Befunden bei der Identifikation von pro-arteriogenen Faktoren führen können. Daraus ergibt sich, dass gerade bei Perfusionsstudien in der Peripherie auf klassische Goldstandardverfahren wie die Mikrosphärenperfusion zurückgegriffen werden sollte. Eine weitere Studie untersucht schließlich das Potential von adaptiver Arteriogenese im Schweinehinterlauf. Hier kann mittels therapeutischer Induktion über CC-

Chemokine (MCP-1) gezeigt werden, dass das Arterien-Ligatur-Modell im Minipig ein geeignetes Kollateralmodell mit hoher Übertragbarkeit auf den Patienten darstellt.

Der zweite Teil der Arbeit konzentriert sich auf die molekularen Grundlagen der Arteriogenese und identifiziert hierbei - über eine m-RNA-Profiluntersuchung mit anschließender Proteinkontrolle der Daten – wichtige arteriogene Mediatoren in GM-CSF-stimulierten Makrophagen. Insbesondere den CC-Chemokinen wie dem MCP-1, aber auch den Metalloproteinasen kommt hier eine bedeutende Rolle zu. Als primäres endotheliales Schlüsselmolekül kann schließlich das ICAM-1 identifiziert werden, das in sehr frühen Phasen der Arteriogenese auf dem kollateralen Endothel heraufreguliert ist und den Monozyteninflux wesentlich reguliert. Die pharmakologische als auch die hereditäre Ausschaltung dieses Moleküls führt zu einer drastischen Hemmung des Kollateralwachstums. Diese Daten unterstützen die Monozyten-Theorie der Arteriogenese.

Der dritte Teil der Arbeit untersucht Interaktionen einer Standardmedikation, wie Aspirin auf die Arteriogenese. Sowohl immunhistochemisch als auch hämodynamisch zeigt sich, dass Thienopyridine keinen wesentlichen Einfluß auf das Proliferationsverhalten von neu rekrutierten Kollateralarterien haben. Hingegen ist unter einer Aspirintherapie der proliferative Index von Kollateralen signifikant gehemmt sowie die Konduktanz, als reziproker Wert des Kollateralwiderstands, deutlich reduziert. Diese Daten sind erstmals ein wichtiger Hinweis darauf, dass Aspirin als relativ kontraindiziert eingestuft werden müßte, sollten sich diese Daten in der klinischen Prüfung bestätigen.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit zeigt erstmals Daten zur therapeutischen Stimulation der Arteriogenese im Gehirn. In Analogie zur peripheren Applikation von GM-CSF können wir hier in einem neuen Tiermodell mit 3-Gefäßverschlussmodus in der Ratte zeigen, dass die GM-CSF-induzierte Arteriogenese effektiv die eingeschränkte zerebrovaskuläre Reserve komplett wiederherstellen kann. Diese

Ergebnisse finden Beachtung, da sie eine neue Möglichkeit darstellen, Patienten mit intrazerebralen Gefäßstenosen ggf. schon frühzeitig vor einem Schlaganfall zu schützen.

Im letzten Teil der Arbeit werden zwei klinische Studien vorgestellt, die auf den experimentell erhobenen Daten basieren. In der START-Studie wurde der Effekt von GM-CSF auf die Kollateralisierung bei pAVK-Patienten im Vergleich zu einer Kontrollsubstanz untersucht. Dabei zeigte sich bei diesen Patienten in Bezug auf den primären Endpunkt der Gehstrecke zwar keine signifikante Erhöhung der Gehstrecke, lediglich im sekundären Endpunkt lag eine Verbesserung der Laser-Doppler-gemessenen mikrozirkulatorischen Reserve vor. Da sowohl das Trainingsprofil der Patienten, insbesondere in der Kontrollgruppe, als auch der Placeboeffekt in dieser Studie ausgesprochen hoch waren, mündeten die Erfahrungen dieser Studie in der Schaffung eines interdisziplinären kardiologisch - angiologischen Netzwerkes (Arteriogenesis Network [Art.Net.]), welches derzeit in einer binationalen multizentrischen (n=20), randomisierten, präferinitiierten Doppelblindstudie 250 Patienten mit Claudicatio intermittens auf ein Behandlungsschema mit entweder Aspirin oder Clopidogrel untersucht. Hierbei liegt der Schwerpunkt auf einem streng überprüften Trainingsprogramm der Patienten sowie auf fokussierten Kollateralen-Endpunkten (computergestütztes Aktivitätsmonitoringsystem mit hochfrequenter Akzelerationsmessung am Fuß).

Ziel dieser Studien wird die Identifikation von geeigneten, primären Endpunkten zur effektiven Erfassung von Kollateralen-Parametern bei Patienten sein.

Zusammenfassend konnten wir mit den vorliegenden Daten dieser Habilitationsarbeit zahlreiche Aspekte der molekularen und physiologischen Grundlagen der Arteriogenese beleuchten. Es ergab sich, dass die zugrundeliegende Physiologie ausschlaggebend für ein potentiell zu erwartendes klinisches Ergebnis ist und hier im besonderen, dass eine poststenotische

Steigerung der Kapillarisation nicht den Blutfluss eines proximal stenosierte Konduktanzgefäßes kompensieren kann. Gerade bei der zerebralen Arteriogenese findet sich hier eine gute Beweisführung für das Konzept der Arteriogenese: Versorgung des von einer Minderperfusion bedrohten peripheren Gewebes durch Kollateralarterien, die wiederum ausserhalb der „region at risk“ liegen. Somit dürfen sich klinische Ansätze nicht nur auf das ischämische Gebiet (z.B. die Penumbra) konzentrieren, sondern sollten auch den Fokus auf der kollateralen Zirkulation haben.

Die wesentliche Rolle der Monozyten bei frühen Phasen adaptiver Arteriogenese bestätigt sich auch in dieser Arbeit. Neben zellbiologischen Aspekten, wie Hemmung der Monozyten-Apoptose, gehen wir derzeit davon aus, dass zirkulierende mononukleäre Zellen ein umfassendes parakrines Programm einleiten, das den kontrollierten Umbau einer Kollateralarterie garantiert. Hierbei spielen, wie auch von Schaper et al. gezeigt, Metalloproteasen sowie weitere Enzyme aus dem Kollagenstoffwechsel eine wichtige Rolle (Arginase).

Dennoch führt die Rolle der Monozyten auch zu einem „ying-yang“ Aspekt, dem gerade vor dem Hintergrund einer möglichen klinischen Anwendung eine wesentliche Bedeutung zukommen kann: Es bleibt zu untersuchen, ob die Applikation von zirkulierenden Monozyten (oder Vorläuferzellen aus Monozytenfraktionen) zu einer Aggravation der Atherosklerose führt. Für das CC-Chemokin MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) konnten wir belegen, dass sich die Atheroskleroseentwicklung in der Apo-E-Maus drastisch beschleunigte (van Royen et al.). Eine Applikation von GM-CSF hingegen ist im Atherosklerosemodell des Kaninchens (Watanabe Kaninchen) nicht pro-atherogen (Schaub et al.).

Aufgrund der breiten klinischen Anwendung von GM-CSF liegt derzeit kein Hinweis auf eine Erhöhung von mitogenen Prozessen vor (Tumorprogression, Retinopathie). Dennoch müssen diese sicherheitsrelevanten Fragen experimentell und klinisch beantwortet werden, bevor weitere zukünftige Phase 1 und 2 Studien begonnen werden.

Literatur:

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 Jan 1;101(1):40-50.

Baroldi G, Mantero O, Somazzoni G.

The collaterals of the coronary arteries in normal and pathologic hearts.

Circ Res. 1956 Mar;4(2):223-9.

Banai S, Jaklitsch MT, Casscells W, Shou M, Shrivastav S, Correa R, Epstein SE, Unger EF.

Effects of acidic fibroblast growth factor on normal and ischemic myocardium.

Circ Res. 1991 Jul;69(1):76-85.

Carmeliet P.

Angiogenesis in life, disease and medicine.

Nature. 2005 Dec 15;438(7070):932-6. Review.

Deindl E, Hoefler IE, Fernandez B, Barancik M, Heil M, Strniskova M, Schaper W.

Involvement of the fibroblast growth factor system in adaptive and chemokine-induced arteriogenesis.

Circ Res. 2003 Mar 21;92(5):561-8. Epub 2003 Feb 13.

Deindl E, Hoefler IE, Fernandez B, Barancik M, Heil M, Strniskova M, Schaper W.

Involvement of the fibroblast growth factor system in adaptive and chemokine-induced arteriogenesis.

Circ Res. 2003 Mar 21;92(5):561-8. Epub 2003 Feb 13.

Deindl E, Buschmann I, Hoefler IE, Podzuweit T, Boengler K, Vogel S, van Royen N, Fernandez B, Schaper W.

Role of ischemia and of hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit.

Circ Res. 2001 Oct 26;89(9):779-86.

Dunne JL, Collins RG, Beaudet AL, Ballantyne CM, Ley K.

Mac-1, but not LFA-1, uses intercellular adhesion molecule-1 to mediate slow leukocyte rolling in TNF-alpha-induced inflammation.

J Immunol. 2003 Dec 1;171(11):6105-11.

Folkman J. Related Articles, Links

Tumor angiogenesis: therapeutic implications.

N Engl J Med. 1971 Nov 18;285(21):1182-6. Review.

Fulton WF

Chronic generalized myocardial ischaemia with advanced coronary artery disease.

Br Heart J. 1956 Jul;18(3):341-54. No abstract available.

Gibson RS.

Management of acute non-Q-wave myocardial infarction: role of prophylactic pharmacotherapy and indications for predischARGE coronary arteriography.

Clin Cardiol. 1989 Jul;12(7 Suppl 3):III26-32. Review.

Hashimoto SI, Komuro I, Yamada M, Akagawa KS.

IL-10 inhibits granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent human monocyte survival at the early stage of the culture and inhibits the generation of macrophages.

J Immunol. 2001 Oct 1;167(7):3619-25.

Hedde JP, Claussen C, Fiegler W, Langer M, Becker E, Felix R.

Measurement of regional cerebral blood flow as a supplement to carotid angiography in assessing cerebrovascular insufficiency

Rofo. 1985 Feb;142(2):159-66.

Heil M, Ziegelhoeffer T, Pipp F, Kostin S, Martin S, Clauss M, Schaper W.

Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002 Dec;283(6):H2411-9. Epub 2002 Oct 3.

Henry TD, Annex BH, McKendall GR, Azrin MA, Lopez JJ, Giordano FJ, Shah PK, Willerson JT, Benza RL, Berman DS, Gibson CM, Bajamonde A, Rundle AC, Fine J, McCluskey ER; VIVA Investigators.

The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis.

Circulation. 2003 Mar 18;107(10):1359-65.

Hochberg MC, Lebowitz MG, Plevy SE, Hobbs KF, Yocum DE.

The Benefit/Risk Profile of TNF-Blocking Agents: Findings of a Consensus Panel.

Semin Arthritis Rheum. 2005 Jun;34(6):819-36.

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 Jun;80(6):829-37

K.-H. Labs, C. Hecker, L. Singer, S. Degischer, I. Buschmann, K. Jäger; on behalf of Arteriogenesis Competence Network

Art.Net.01 Study: Clinical Proof-of-Concept to evaluate the effect of Aspirine and Clopidogrel on the walking capacity in patients with intermittand claudication: doubleblind, randomized multinational comparative study

European Heart Journal 2005 Suppl in press

Lazarous DF, Shou M, Scheinowitz M, Hodge E, Thirumurti V, Kitsiou AN, Stiber JA, Lobo AD, Hunsberger S, Guetta E, Epstein SE, Unger EF.

Comparative effects of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on coronary collateral development and the arterial response to injury.

Circulation. 1996 Sep 1;94(5):1074-82.

Munder M, Eichmann K, Moran JM, Centeno F, Soler G, Modolell M.

Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells.

J Immunol. 1999 Oct 1;163(7):3771-7.

Pipp F, Boehm S, Cai WJ, Adili F, Ziegler B, Karanovic G, Ritter R, Balzer J, Scheler C, Schaper W, Schmitz-Rixen T.

Elevated fluid shear stress enhances postocclusive collateral artery growth and gene expression in the pig hind limb.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004 Sep;24(9):1664-8. Epub 2004 Jul 8.

Risau W.

Endothelium, angiogenesis and metastasis

Onkologie 1987 Aug;10(4):260-2.

Buschmann I, Schaper W.

The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis).

J Pathol. 2000 Feb;190(3):338-42. Review. 1987 Aug;10(4):260-2. German.

Salmela K, Wramner L, Ekberg H, Hauser I, Bentdal O, Lins LE, Isoniemi H, Backman L, Persson N, Neumayer HH, Jorgensen PF, Spieker C, Hendry B, Nicholls A, Kirste G, Hasche G.

A randomized multicenter trial of the anti-ICAM-1 monoclonal antibody (enlimomab) for the prevention of acute rejection and delayed onset of graft function in cadaveric renal transplantation: a report of the European Anti-ICAM-1 Renal Transplant Study Group.

Transplantation. 1999 Mar 15;67(5):729-36.

Sata M, Walsh K.

Fas ligand-deficient mice display enhanced leukocyte infiltration and intima hyperplasia in flow-restricted vessels.

J Mol Cell Cardiol. 2000 Aug;32(8):1395-400.

Schaub RG, Bree MP, Hayes LL, Rudd MA, Rabbani L, Loscalzo J, Clinton SK.

Recombinant human macrophage colony-stimulating factor reduces plasma cholesterol and carrageenan granuloma foam cell formation in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits.

Arterioscler Thromb. 1994 Jan;14(1):70-6.

Schneider D, Berrouschot J, Brandt T, Hacke W, Ferbert A, Norris SH, Polmar SH, Schafer E.

Safety, pharmacokinetics and biological activity of enlimomab (anti-ICAM-1 antibody): an open-label, dose escalation study in patients hospitalized for acute stroke.

Eur Neurol. 1998 Aug;40(2):78-83.

Scholz D, Cai WJ, Schaper W.

Arteriogenesis, a new concept of vascular adaptation in occlusive disease.

Angiogenesis. 2001;4(4):247-57. Review.

Scholz D, Ito W, Fleming I, Deindl E, Sauer A, Wiesnet M, Busse R, Schaper J, Schaper W.

Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis).

Virchows Arch. 2000 Mar;436(3):257-70.

Seiler C, Pohl T, Wustmann K, Hutter D, Nicolet PA, Windecker S, Eberli FR, Meier
Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study.

Circulation. 2001 Oct 23;104(17):2012-7.

Schaper J, König R, Franz D, Schaper W.

The endothelial surface of growing coronary collateral arteries. Intimal margination and diapedesis of monocytes. A combined SEM and TEM study.

Virchows Arch A Pathol Anat Histol. 1976 Jun 22;370(3):193-205.

Schaper Wolfgang

Arteriogenesis by Kluwer Publishers

ISBN 1-4020-8125-1

Schneider D, Berrouschot J, Brandt T, Hacke W, Ferbert A, Norris SH, Polmar SH, Schafer E.

Safety, pharmacokinetics and biological activity of enlimomab (anti-ICAM-1 antibody): an open-label, dose escalation study in patients hospitalized for acute stroke.

Eur Neurol. 1998 Aug;40(2):78-83.

Szilagyi G, Szamosi T, Sarai A, Szemerédi P, Nagy Z.

The cumulative risk index in stroke prevention

Orv Hetil. 2000 Apr 23;141(17):901-3.

van Royen N, Hoefler I, Bottinger M, Hua J, Grundmann S, Voskuil M, Bode C, Schaper W, Buschmann I, Piek JJ.

Local monocyte chemoattractant protein-1 therapy increases collateral artery formation in apolipoprotein E-deficient mice but induces systemic monocytic CD11b expression, neointimal formation, and plaque progression.

Circ Res. 2003 Feb 7;92(2):218-25.

Vuorte J, Lindsberg PJ, Kaste M, Meri S, Jansson SE, Rothlein R, Repo H.

Anti-ICAM-1 monoclonal antibody R6.5 (Enlimomab) promotes activation of neutrophils in whole blood.

J Immunol. 1999 Feb 15;162(4):2353-7.

ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....
Datum

.....
Unterschrift