

Medizinische Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin  
Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie  
Abteilung Toxikologie  
Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. Ralf Stahlmann

**Die Bedeutung des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors bei  
der Reendothelialisierung nach Mikrogefäßanastomosen**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung der medizinischen Doktorwürde  
an der Charité - Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von  
Siri M. E. Hollenberg  
Chirurgin aus Bremen

Referent: Priv. - Doz. Dr. med. D.-G. Grimm

Koreferent: Priv. - Doz. Dr. rer. nat. J. Jankowski

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin  
Franklin

Promoviert am: 7. Dezember 2007

In Liebe und Dankbarkeit für meine Eltern

Siri und Karl-Heinz Hollenberg

# Inhaltsverzeichnis

	<b>Seite</b>
1 Einleitung	1
1.1 Einführung	2
1.1.1 Gefäßanastomose	2
1.1.2 Endothel	3
1.1.3 Operationsmikroskop	4
1.2 Mikrochirurgie	5
1.2.1 Replantationschirurgie	6
1.2.2 Transplantationschirurgie	7
1.3 Vascular Endothelial Growth Factor	8
1.3.1 VEGF-Erstbeschreibung	8
1.3.2 VEGF Typen	9
1.3.3 VEGF Rezeptoren	9
1.3.4 Regulation von VEGF	10
1.3.5 Biologische Aktivität von VEGF	11
1.3.6 Permeabilität	11
1.4 Extrazelluläre Matrix	12
1.4.1 Kollagene	12
1.4.2 Fibronectin	14
1.4.3 Osteopontin	15
1.4.4 Laminin	16
1.4.5 TGF- $\beta_1$	17
1.4.5.1 SMAD Pathway	17
1.4.5.2 DAXX Pathway	17
1.5 Zielsetzung	18
2 Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.1.1 Geräte	20
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	22
2.1.3 Gebrauchsfertige Kits	23

2.1.4 Tiere	23
2.1.5 Chemikalien	23
2.1.6 Antikörper	26
2.1.7 Lösungen und Puffer	27
2.2 Methoden	31
2.2.1 Tiermodell	31
2.2.2 Operationstechnik	32
2.2.3 Histologische Untersuchung	37
2.2.3.1 Fixierung der Präparate	37
2.2.3.2 Einbettung	37
2.2.3.3 Anfertigung silanisierter Objektträger	38
2.2.3.4 Anfertigung von Paraffinschnitten	38
2.2.3.5 Standardfärbung Sirius-Rot	39
2.2.4 Immunhistochemie	39
2.2.4.1 Entparaffinierung von Schnitten	40
2.2.4.2 Immunhistochemische Färbung	40
2.2.4.3 Bildanalyse der immunhistochemischen Färbungen	42
2.2.5 Gelelektrophorese und Western Blot Analyse	43
2.2.5.1 Proteinextraktion	43
2.2.5.2 Gesamtproteinbestimmung	44
2.2.5.3 SDS-Page (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)	45
2.2.5.4 Western Blot	46
2.2.5.5 Immunmarkierung	46
2.2.5.6 Densitometrische Auswertung	48
2.2.6 Transmissionselektronenmikroskopie	48
2.2.6.1 Fixierung der Gewebeproben	48
2.2.6.2 Einbettung der Gewebeproben	48
2.2.6.3 Vorbereitung der Objektträger	49
2.2.6.4 Anfertigung transmissionselektronenmikroskopischer Schnitte	49
2.2.6.5 Nachkontrastierung transmissionselektronenmikroskopischer Schnitte	49
2.2.6.6 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme	40
2.2.7 Statistik	50
3. Ergebnisse	52
3.1 Operationstechnik	52

3.1.1	Durchflussrate	52
3.1.2	Effekt von VEGF auf die Überlebensrate	52
3.1.3	VEGF verbessert die Reendothelialisierung	52
3.2	Morphologie	53
3.2.1	Transmissionselektronenmikroskopie	53
3.2.2	Sirius Rot Färbung	54
3.3	VEGF-A	60
3.3.1	Semiquantitativer Nachweis der Proteinsynthese von VEGF-A mittels Western Blot Analyse	60
3.4	flk-1	62
3.4.1	Semiquantitativer Nachweis der Proteinsynthese von VEGF-A mittels Western Blot Analyse	62
3.5.	Tumour Growth Factor (TGF- $\beta_1$ )	64
3.5.1	Semiquantitativer Nachweis der Proteinsynthese von TGF- $\beta_1$ mittels Western Blot Analyse	64
3.6	Osteopontin	66
3.6.1	Immunhistochemische Färbung von Osteopontin	66
3.6.2	Semiquantitativer Nachweis der Proteinsynthese von Osteopontin mittels Western Blot Analyse	67
3.7	Kollagen Typ I	69
3.7.1	Immunhistochemische Färbung von Kollagen Typ I	69
3.7.2	Semiquantitativer Nachweis der Proteinsynthese von Kollagen Typ I mittels Western Blot Analyse	70
3.8	Kollagen Typ III	72
3.8.1	Semiquantitativer Nachweis der Proteinsynthese von Kollagen Typ III mittels Western Blot Analyse	72
3.9	Kollagen Typ IV	74
3.9.1	Semiquantitativer Nachweis der Proteinsynthese von Kollagen Typ IV mittels Western Blot Analyse	74
3.10	Fibronectin	75
3.10.1	Immunhistochemische Färbung von Fibronectin	75
3.10.2	Semiquantitativer Nachweis der Proteinsynthese von Fibronectin mittels	76
3.11	Laminin	78
3.11.1	Immunhistochemische Färbung von Laminin	78

4.	Diskussion	79
4.1	Die Wirkung von VEGF im Bereich der Mikrochirurgie	79
4.2	Effekte von VEGF auf das mikrovaskuläre Remodeling	82
4.3	VEGF induziert Transforming Growth Factor $\beta_1$ und Osteopontin	84
4.4	Schlussfolgerung	85
5	Zusammenfassung	86
6	Literaturverzeichnis	87
7	Abbildungsverzeichnis	95
8	Tabellenverzeichnis	96
9	Abkürzungen	97
10	Anhang	99
10.1	Danksagung	99
10.2	Wissenschaftliche Publikationen	101
10.3	Lebenslauf	106
10.4	Eidesstattliche Erklärung	110

# 1 Einleitung

Der Verlust des Endothels, wie er nach Gefäßverletzungen, mikrochirurgischen Transplantationen, Replantationen und rekonstruktiven Eingriffen auftritt, geht mit einer erhöhten Thrombosegefahr, Muskelzellproliferation und Neointimabildung einher. Diese Prozesse führen häufig zur Bildung von Stenosen und zum Gefäßverschluss. Es ist klinisch sehr wichtig eine schnelle und fast perfekte Regeneration des Endothels nach mikrochirurgischer Anastomosierung zu erreichen, um so die Überlebensrate des replantierten oder transplantierten Gewebes zu verbessern.

Die Kinetik der Reendothelialisierung (rET) nach mikrochirurgischer Anastomosierung von Gefäßen ist bisher noch nicht ganz verstanden. Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) ist einer der potentesten Mediatoren der vaskulären Regulation von Angiogenese und Gefäßpermeabilität (Bates et al., 2003; Ferrara, 2000; Ferrara et al., 2001; Ferrara, 2003). VEGF, auch als vaskulärer Permeabilitätsfaktor bezeichnet, ist ein endothel-spezifisches Mitogen. Es handelt sich um ein 45 kDa Protein, das aus zwei Subeinheiten besteht. Es existieren 5 humane Isoformen mit unterschiedlicher Anzahl von Aminosäuren (VEGF<sub>121</sub>, 145, 165, 189, 206), die durch alternative Abspaltung der mRNA von einem Gen mit 4 Exonen entstehen (Ferrara, 2000). VEGF<sub>121</sub> und VEGF<sub>165</sub> sind die einzigen löslichen Isoformen und sind am häufigsten vorhanden. VEGF<sub>165</sub> ist der stärkste Stimulator der endothelialen Zellproliferation (Roberts und Palade, 1995). VEGF<sub>121</sub> ist für die erhöhte Gefäßpermeabilität verantwortlich (Wang et al., 2001). Bis heute sind 5 verschiedene VEGF Typen bekannt: VEGF-A (165), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und VEGF-E. Lediglich VEGF-A, -B und E modulieren Angiogenese und Gefäßpermeabilität. VEGF-C und VEGF-D modulieren die lymphatische Angiogenese. Zusätzlich zu dem mitogenen Effekt konnte gezeigt werden, dass VEGF die Permeabilität in der peripheren Zirkulation und dem Endothel erhöht (Roberts und Palade, 1995; Wang et al., 2001). Der Hauptfaktor scheint VEGF zu sein und wird VEGF-A genannt. Die Expression von VEGF wird durch Differenzierung, Transformation und Sauerstoffzufuhr beeinflusst. Die Effekte von VEGF werden durch die zwei Rezeptor-Tyrosin Kinasen VEGFR-1/flt-1 und VEGFR-2/flk-1/KDR reguliert, die fast ausschließlich an Endothelzellen vorkommen.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation ist es festzustellen, ob die lokale Gabe von VEGF die rET nach mikrochirurgischer Anastomose verbessert. Der Einfluss von VEGF auf den vaskulären Remodelling-Prozess mit und ohne VEGF Behandlung soll untersucht werden.

## 1.1 Einführung

### 1.1.1 Gefäßanastomose

Als Beispiel für bekannte, natürliche Anastomosen kann man die Corona mortis ansehen, eine Verbindung zwischen der Arteria epigastrica inferior und der Arteria obturatoria (Karakurt et al., 2002), sowie die unsteril ausgebildete Riolan-Anastomose zwischen der Arteria colica media und der Arteria colica sinistra (Neglen et al., 1987).

Pathologische Umgehungskreisläufe liegen gelegentlich bei Zwillingen vor, beispielsweise Anastomosen in den Plazentagefäßen als Ursache des fetofetalen Transfusionssyndroms bei Zwillingen. Bei länger andauernden Stauungen des Lebervenenabflusses kommt es zur Ausbildung von portokavalen Anastomosen.

Laut Definition handelt es sich bei der chirurgischen Anastomose um eine chirurgisch-operative Vereinigung der Lumen zweier Blutgefäße, wie bei der End-zu-End-Anastomose im Falle der Aortenisthmusstenose oder der seitlichen Anastomose, wie zum Beispiel bei der freien Transplantation eines Muskellappens.

Mit Ausnahme der Kapillaren bestehen alle Blutgefäße aus drei Schichten. Die Tunica intima besteht aus dem Endothel und einem variablen Anteil von Bindegewebe, welches bei der Arterie auch die Elastica interna beinhaltet. Die Tunica media besteht aus zirkulär angeordneten glatten Muskelzellen. Am Übergang zwischen der Tunica media und dem äußerem Bindegewebe, der Tunica adventitia, liegt die Elastica externa. Die großen Arterien, wie die Aorta, haben in der Tunica media auch elastische Fasern zwischen den glatten Muskelfasern. Venen haben eine wesentlich dünnere Tunica media als die entsprechenden Arterien und besitzen keine Elastica interna und die Vena cava inferior hat keine Tunica media. Aufgrund der starken Wanddicken bei großen Gefäßen haben diese ihre eigenen versorgenden Blutgefäße, die Vasa vasorum (McMinn, 1990).

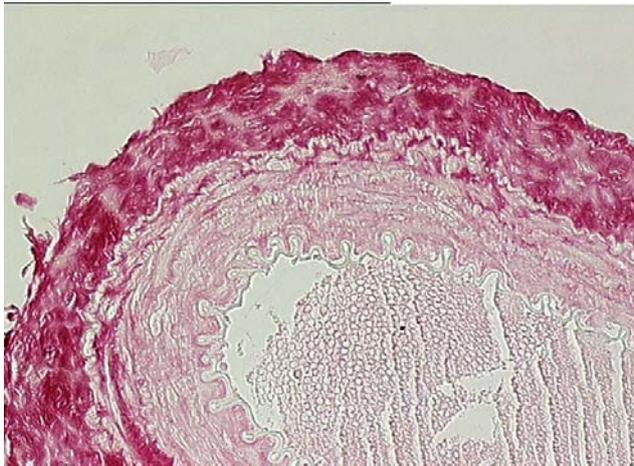


Abb. 1: Querschnitt durch Arterienwand,  
Sirius Rot Färbung Vergrößerung 1:100

### 1.1.2 Endothel

Das Endothel ist die innerste Schicht der Gefäßwand und reguliert den Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe. Es reguliert durch die Produktion wichtiger Substanzen wie NO den Blutdruck durch die Regulation des Gefäßtonus. Auch die Angiogenese wird von Endothelzellen initiiert. Die Hemmung und Aktivierung der Gerinnungsfaktoren durch das Endothel beeinflusst die Viskosität des Blutes. Durch die Aktivierung des Endothels spielt es eine Rolle bei Entzündungsvorgängen. Eine Aktivierung führt zur Bindung weißer Blutkörperchen (neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen) aus dem Blut an das Endothel. Die so aktivierten Leukozyten wandern dann bei der Transmigration durch das Endothel in das darunter liegende Gewebe und bekämpfen dort Infektionen.

Alle Gefäße des Herz-Kreislauf-Systems werden von einer einzelligen Endothelzellschicht ausgekleidet.

Man unterscheidet prinzipiell drei verschiedene Arten des Endothels:

Zum einen das kontinuierliche Endothel, welches zum Beispiel eine wichtige Rolle in der Blut-Hirn-Schranke einnimmt (Gonzalez Santander et al., 1992), da es für im Blut gelöste Stoffe nahezu undurchlässig ist. Der Stoffaustausch zwischen Gewebe und Blut ist strikt durch Transportmechanismen reguliert.

Des Weiteren kommt das fenestrierte Endothel vor (Rosivall et al., 1999). Die hier entstandenen „Fenster“ sind etwa 70 nm groß und besitzen so genannte Diaphragmata, die man sich wie

Speichen in einem Rad vorstellen kann. Charakteristisch für diese Endothelart ist die kontinuierliche Basalmembran.

Drittens gibt es das diskontinuierliche Endothel, welches sogar für Zellen durchlässig ist. Zusätzlich fehlt hier stellenweise die Basalmembran. Der diskontinuierliche Endotheltyp kommt beispielsweise in der Leber vor.

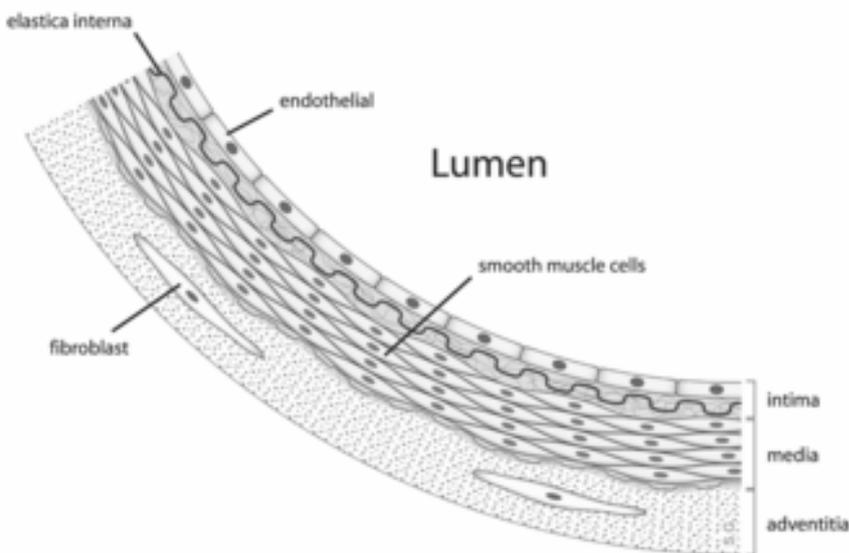


Abb. 2: Schematische Darstellung der Arterienwand

### 1.1.3 Operationsmikroskop

Die Entwicklung des Operationsmikroskops und die Einführung 1921 durch C.O. Nylén bildete die Voraussetzung für die mikrochirurgische Chirurgie (Nylén, 1972). Bis zur Entwicklung entsprechend kleiner Operationsinstrumente und Fäden dauerte es jedoch noch einige Jahrzehnte. Die erste dokumentierte mikrochirurgische Gefäßanastomose mit Operationsmikroskop wurde 1960 durch Jacobson und Suarez durchgeführt. Die erste dokumentierte erfolgreiche Daumenreplantation erfolgte 1965 durch Komatsu. Im August 1975 wurde die erste erfolgreiche Replantation in Deutschland durchgeführt.

Je nach Literaturangabe liegt die Erfolgsquote der mikrovaskulären Anastomosen bei 80% - 95% (Bach et al., 2002). Aus der empirischen Erfahrung der Pioniere der Mikrochirurgie wissen wir, dass die Anastomosen der Arterien nach 5 Tagen und die venösen Anastomosen nach 10 Tagen als sicher funktionstüchtig angesehen werden können. Die molekularen Mechanismen der

Gefäßregeneration nach Anastomosen sind derzeit nicht bekannt. Das Ziel dieser Untersuchung ist es, mehr Informationen über die strukturellen und molekularen Regenerationsmechanismen nach Gefäßanastomosen zu gewinnen. Ein weiteres Ziel war es festzustellen, ob eine Verbesserung der Ergebnisse mit der Gabe von VEGF erzielt werden kann.



Abb. 3: Operationsmikroskop (Zeiss)

## 1.2 Mikrochirurgie

Die Vorteile der Techniken und Technologien, welche die Mikrochirurgie populär gemacht haben, begannen in den frühen 60ern. Die erste mikrovaskuläre Operation bei der ein Mikroskop benutzt wurde, um Blutgefäße zu reparieren, wurde von dem Gefäßchirurgen Jules Jacobson, Universität Vermont, 1960 beschrieben (Jacobson, 1997). Er benutzte ein otolaryngologisches Mikroskop um Gefäße zu anastomosieren, die gerade einmal 1,4 mm groß waren, und gründete den Begriff der Mikrochirurgie. Nakayama, ein japanischer Herz-Thorax-Chirurg, berichtete über die erste Serie mikrochirurgischer freier Gewebetransplantate, bei denen er vaskularisierte

Intestinalsegmente verwendete, um nach Carcinomresektionen den Ösophagus zu rekonstruieren, wobei er 3-4 mm durchmessende Gefäße verwendete (Nakayama et al., 1968).

Eine große Anzahl von Chirurgen verwendet heutzutage die Mikrochirurgie. Otolaryngologen (Hals-, Nasen-, Ohrenärzte) nutzen die Mikrochirurgie am Innenohr oder den Stimmbändern. Bei ophthalmologischen Operationen am Katarakt, Korneatransplantationen und Behandlungen wie dem Glaukom wird die Mikrochirurgie genutzt. Insbesondere in der plastisch rekonstruktiven Chirurgie wird das Operationsmikroskop vielfältig eingesetzt.

Das erweiterte Verständnis der Reparationsvorgänge nach Gefäßtrauma hat in der Therapie und Behandlung von Amputationen, Transplantationen und Ischämie herausragende Bedeutung für den Menschen.

Das vertiefte Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge der Vaskularisation, mit speziellem Bezug auf die posttraumatische Endothelzellproliferation nach Gefäßtrauma und Gefäßanastomosen, soll neue therapeutische Ansätze zur Behandlung bei Replantationen, Transplantationen und Tissue engineering ermöglichen, um einerseits die Erfolgsrate nach Anastomosen und rekonstruktiven Eingriffen zu verbessern und andererseits neue Techniken beim Tissue engineering weiter entwickeln zu können.

### **1.2.1 Replantationschirurgie**

Replantation bedeutet das operative Annähen eines völlig abgetrennten Körperteils. Am häufigsten kommt dies bei Fingern und Daumen vor, aber auch Ohren, Nasen, Wangen (Infanger et al., 2006). Unter anderem wurden bereits Finger, Hände, Arme, Beine, Wangen und Penis replantiert. Im Allgemeinen beinhaltet eine Replantation die Wiederherstellung des Blutflusses durch Arterien und Venen, des knöchernen Skeletts, die Coadaptation von Nerven und Naht von Sehnen.

Zu Anfang wurde der Erfolg einer Replantation dadurch definiert, dass das amputierte Körperteil überlebte. Als man mehr Erfahrungen auf diesem Gebiet gesammelt hatte, begannen die Chirurgen, die sich auf Replantation spezialisiert hatten, zu verstehen, dass das alleinige Überleben des Amputats nicht den Erfolg der Operation darstellte. Sie begannen zu selektieren, welche Amputate wieder replantiert wurden und welche nicht. Kriterium hierbei war die Wiederherstellung der ursprünglichen Funktion.

Trotz euphorischer Anfänge bleiben die Probleme bei der Replantation. Insbesondere die Gefäßanastomosen bereiten die häufigsten Komplikationen nach Replantation mit einer Inzidenz von 1: 6 (Bach et al., 2002). Die Ursachen hierfür sind vielfältig. Technische Mängel der Anastomose, traumatische oder degenerative Gefäßwandschäden abseits der Anastomose, Zirkulationsstörungen, Postischämieschäden, Kompression der Gefäße von außen, Intimaödeme und die daraus resultierenden rheologischen Veränderungen können über die Virchow'sche Trias Thrombosen insbesondere dieser kleinen Gefäße induzieren (Atiyeh et al., 1999). Aus der klinischen Erfahrung ist bekannt, dass die Re-endothelialisierung der Arterie 5 Tage und der Vene 10 Tage dauert. Aus diesem Grunde wird in den ersten 10 Tagen nach einer Replantation die rheologische Therapie mit Heparin und Kolloiden wie z.B. Hydroxyethylstärke durchgeführt. Dies gilt sowohl für die Mikroreplantation (distal des Handgelenkes) als auch für die Makroreplantation (proximal des Handgelenkes). In diesen 10 Tagen ist der Erfolg der Replantation durch Versagen der Funktionalität der Anastomosen jederzeit gefährdet.

### **1.2.2 Transplantationschirurgie**

Die mikrochirurgischen Techniken haben eine tragende Rolle in der Entwicklung von Transplantationen gespielt. Zuvor waren Transplantationen an Nagern erforscht worden, wobei man das „Skin Transplantation Model“ nutzte, welches den Nachteil hatte, das es nicht vaskularisiert war. Hier repräsentiert die Mikrochirurgie die Verbindung zwischen Chirurgie und Transplantation. Die ersten mikrochirurgischen Experimente (porto-cavale Anastomosen bei der Ratte) wurden von Dr. Sun Lee an der Universität Pittsburgh 1958 durchgeführt (Lee and Fisher, 1961). Schon nach kurzer Zeit waren diverse Transplantationsmodelle von Organen an Ratten und Mäusen etabliert. Heutzutage kann nahezu jedes Organ einer Ratte oder Maus mit einer sehr hohen Erfolgsrate transplantiert werden. Die Mikrochirurgie war auch wichtig, um neue Techniken für die Transplantation zu entwickeln, um sie später am Menschen einsetzen zu können. Darüber hinaus ermöglicht sie die Rekonstruktion kleiner Arterien in der klinischen Organ-Transplantation.

Die Fortschritte in der Wiederherstellungschirurgie haben dazu geführt, dass freie mikrovaskuläre Lappen-Transplantationen standardmäßig zur Deckung von Hautweichteildefekten und somit zum Erhalt der verletzten Extremität durchgeführt werden. Der Erhalt der Extremität wird durch Hebedefekte am Körper erkaufte. Sowohl der Hebedefekt

als auch die Transplantat-Empfängerstelle haben Morbiditätsrisiken (Nachblutung, Serom, Wundinfektion, Wundheilungsstörung, Narbenbildung, Hautnekrose, Lappennekrose).

### **1.3 Vascular Endothelial Growth Factor**

Die Angiogenese und Neovaskularisation wird maßgeblich durch VEGF gesteuert. Einerseits ist VEGF ein potentes Zellmitogen der Angiogenese, andererseits erhöht es die Gefäßpermeabilität. Untersuchungen von geschädigtem Endothel nach Ballondilatation im Tierversuch haben gezeigt, dass durch lokale Applikation von VEGF die Endothelzellproliferation stark erhöht werden kann (Asahara et al., 1995). Dies führt zu einer schnelleren Regeneration des Gefäßendothels und vermindert eine Hyperplasie der Neointima, was zu einer verbesserten Durchgängigkeit der Gefäße und verminderter Thrombosegefahr führt. Inwieweit VEGF bei der Endothelzellregeneration beim Gefäßtrauma und der Anastomosierung eine Rolle spielt ist bisher unbekannt und noch nicht untersucht worden. Sollte die lokale VEGF Applikation an der Gefäßanastomose auch zu einer schnelleren Regeneration der Endothelzellen führen, kann damit eine schnellere Gefäßheilung und somit eine reduzierte Gefäßthrombosegefahr nach chirurgischen Eingriffen erreicht werden.

#### **1.3.1 VEGF Erstbeschreibung**

1983 fanden Senger et al. ein Protein, welches durch Injektion in die Haut von Meerschweinchen die Permeabilität erhöhte (Senger et al., 1983). Bezeichnet wurde dieser neue Faktor aufgrund seiner spezifischen Regulation der Permeabilität von Tumorblutgefäßen als Vaskulärer Permeabilitätsfaktor (VPF). 1989 fanden Ferrara et al. und Ploüet et al. unabhängig voneinander ein Endothelzell-spezifisches Mitogen, welches sie vaskulärer endothelialer growth factor (VEGF) und Vaskulotropin nannten (Ferrara und Henzel, 1989). Die Klonierung und Expression von VEGF, VPF und Vaskulotropin zeigte, dass es sich um ein und dasselbe Protein handelte. Diese Untersuchungen zeigten, dass das VEGF potent und spezifisch an den Endothelzellen wirkte, was zur Hypothese führte, dass dieses Molekül eine zentrale Rolle in der Regulation des physiologischen und pathophysiologischen Wachstums von Blutgefäßen spielt.

### 1.3.2 VEGF Typen

In den vergangenen Jahren wurde VEGF intensiv untersucht und weitere verschiedene VEGF Proteine (A, B, C, D, E) identifiziert. Die VEGF Ligandenfamilie umfasst zurzeit 6 verwandte Proteine: VEGF-A, PlGF, VEGF-B und VEGF-E wirken an den vaskulären Endothelzellen, während VEGF-C und VEGF-D an den lymphatischen Endothelzellen wirken. Das menschliche VEGF-Gen ist auf dem Chromosom 6p21.3 lokalisiert (Vincenti, 1996). Es ist in acht Exone organisiert und von sieben Introns separiert. Die Kodierungsregion umfasst ungefähr 14 kb. Die Exone 1 bis 5 sind in jeder VEGF mRNA vorhanden. Durch alternatives Splicing der Exone 6 bis 8 eines einzelnen VEGF-Gens resultieren zurzeit sechs verschiedene VEGF Isoformen (121, 145, 165, 189 und 206 Aminosäuren). Diese Isoformen unterscheiden sich nur in der Länge der Polypeptidketten. Das native VEGF ist ein basisches, Heparin bindendes, homodimeres Glykoprotein mit einer Größe von 45 kDa (Ferrara et al. 1989). Diese Eigenschaften sind mit der häufigsten VEGF Isoform, dem VEGF<sub>165</sub>, vergleichbar. Dieses VEGF<sub>165</sub> ist auch das prädominante Protein, welches durch verschiedene normale oder transformierte Zellen produziert wird. VEGF<sub>121</sub> und VEGF<sub>189</sub> finden sich in den meisten Zellen und Geweben, welche das VEGF-Gen exprimieren. Im Gegensatz dazu ist VEGF<sub>206</sub> sehr selten (Houck et al., 1991). Diese Isoformen unterscheiden sich weiter in der Heparinbindungsfähigkeit. Während VEGF<sub>121</sub> als saures Polypeptid Heparin nicht binden kann, haben die basischen VEGF<sub>189</sub> und VEGF<sub>206</sub> noch eine größere Affinität zu Heparin als VEGF<sub>165</sub>. VEGF<sub>121</sub> ist ein frei diffundierendes Protein. VEGF<sub>165</sub> wird auch sezerniert, obwohl ein signifikanter Anteil an die Zelloberfläche und an die Extrazelluläre Matrix gebunden wird. Im Gegensatz dazu sind VEGF<sub>189</sub> und VEGF<sub>206</sub> fast ausschließlich an der EZM gebunden und werden nur in geringstem Maße sezerniert.

### 1.3.3 VEGF Rezeptoren

VEGF Rezeptoren gehören der Tyrosin-Kinase Rezeptorfamilie an, welche bisher identifiziert und geklont werden konnten: der VEGFR-1 und VEGFR-2 Rezeptor (Devries et al., 1992; Termann et al., 1992). Diese Rezeptoren sind charakterisiert durch das Vorhandensein von sieben Immunglobulin ähnlichen Domänen im extrazellulären Anteil, und einer Split Tyrosin-Kinase Domäne intrazellulär. Ein weiterer VEGF Rezeptor, VEGFR-3, ist im lymphatischen System exprimiert. Die VEGFR-1 und VEGFR-2 Rezeptoren sind hauptsächlich in Endothelzellen exprimiert. Der VEGFR-1 Rezeptor wird von Trophoblasten, Monozyten (Barleon et al., 2001), und von renalen mesangialen Zellen exprimiert (Takahashi et al., 1995).

VEGFR-2 Rezeptoren werden von hämatopoetischen Stammzellen, Megakaryozyten und Retinazellen exprimiert. Zusätzlich sind die VEGFR-1 und 2 Rezeptoren von Tumorzellen exprimiert (Fournier et al., 1997).

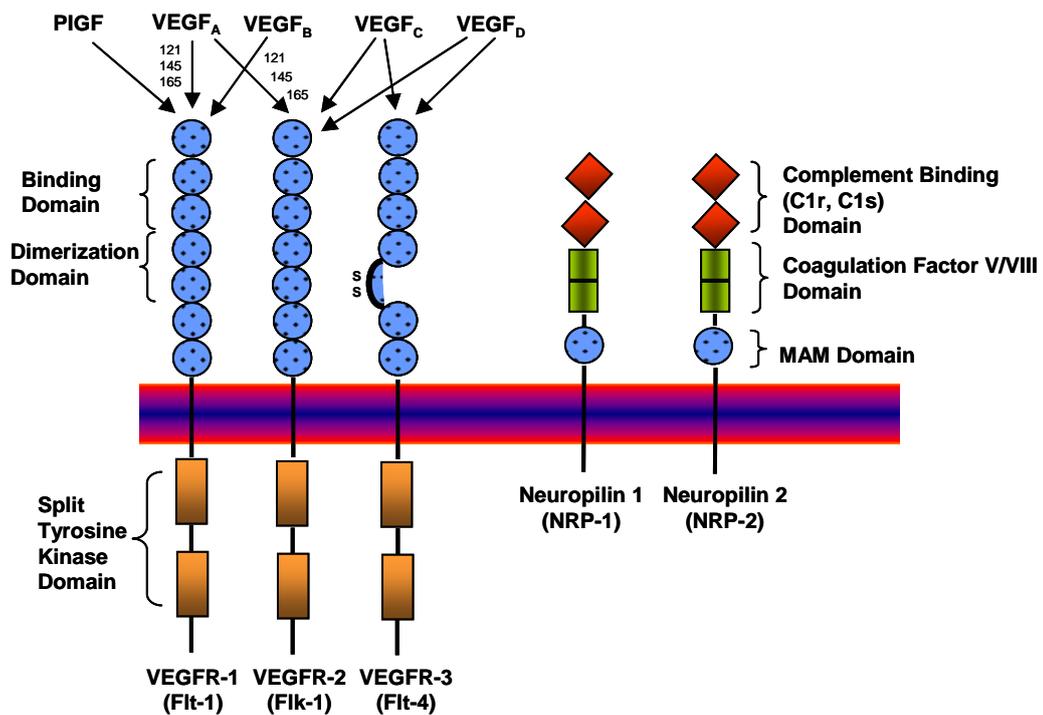


Abb. 4: VEGF und seine Rezeptoren

### 1.3.4 Regulation von VEGF

VEGF ist ein zentraler Regulator der Angiogenese. Die VEGF exprimierenden Zellen werden durch eine Vielzahl von äußeren Faktoren beeinflusst. Zytokine, Wachstumsfaktoren und Gonadotropine können die Angiogenese indirekt durch Modulierung der VEGF Expression in spezifischen Zellen beeinflussen. Faktoren, die die VEGF Expression stimulieren sind der Fibroblast Growth Factor (FGF-4) (Deroanne et al., 1997), Platelet derived Growth Factor (PDGF) (Finkenzeller et al., 1992), Tumornekrosefaktor (TNF- $\alpha$ ) (Ryuto et al., 1996), Transforming Growth Factor (TGF- $\beta_1$ ) (Pertovaara et al., 1994), Keratinocyte Growth Factor (KGF) (Frank et al., 1999), IGF-I Insulin-like Growth Factor (IGF) (Goat et al., 1996), Interleukin-1b (IL-1b) (Li J et al., 1995), und Interleukin-6 (IL-6) (Cohen et al., 1996). Andere Zytokine wie IL-10 und IL-13 hemmen die Freisetzung von VEGF (Matsumoto et al., 1997). Ein

interessantes Beispiel, welches die Komplexität der VEGF Regulation widerspiegelt ist die Wundheilung. Die Expression von KGF ist stark während der Wundheilung erhöht (Werner et al., 1998). KGF wiederum induziert die VEGF Produktion in Keratinozyten. Ebenso stimuliert die UV-B Strahlung die Produktion von VEGF in Keratinozyten (Brauchle et al., 1996). Ein anderes kleines Molekül ist Stickstoffmonoxid (NO). NO induziert eine Vasodilatation und Permeabilitätssteigerung in Blutgefäßen durch VEGF (Murohara et al., 1998). Als positives Feedback wird NO durch VEGF stimuliert (Murohara et al., 1998). Hypoxie und Hypoglykämie sind maßgebliche Stimulatoren der VEGF Expression (Shweiki et al., 1995).

### **1.3.5 Biologische Aktivität von VEGF**

VEGF wurde charakterisiert als ein zentraler Mediator der Endothelzellen von Arterien, Venen und Lymphbahnen (Plouet, Bayard, 1994). Weitere Studien zeigten, dass der mitogene Effekt auch von einigen nicht endothelialen Zellen ausgehen könne, wie von Pigmentzellen der Retina (Guerrin et al., 1995), oder duktaalen Pankreaszellen (Oberg et al., 1994) und Schwannzellen (Sondell et al., 1999). Übereinstimmend mit der anti-apoptotischen Aktivität induziert VEGF die Expression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und A1 in humanen Endothelzellen (Gerber et al., 1998). Dieser Mechanismus ist durch den Phosphatidyl-Inositol (PI) 3-Kinase Weg vermittelt (Gerber et al., 1998). Interessanterweise haben einige Studien aufgezeigt, dass VE Cadherin zur Übermittlung der VEGF Überlebenssignale an Bcl-2 über eine komplexe Formation mit KDR Rezeptoren und  $\beta$ -catenin und PI 3 Kinase braucht (Carmeliet et al., 2000).

### **1.3.6 Permeabilität**

VEGF induziert die Hyperpermeabilität von Gefäßen über einen direkten Signaltransduktionsweg durch die VEGF Rezeptoren der Endothelzellen (Hippenstiel et al. 1998, Roberts, Palade, 1995, Infanger et al., 2004). Der VEGF Rezeptor ist verantwortlich für die erhöhte Gefäßpermeabilität (Bates et al, 2003). Es sind 5 verschiedene Rezeptoren für die VEGF Familie bekannt. VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, Neuropillin-1 und Neuropillin-2. VEGFR-3 Rezeptoren sind hauptsächlich im lymphatischen System exprimiert. VEGF stimuliert die Hyperpermeabilität mehr über den VEGFR-1 als über den VEGFR-2 Rezeptor. Dies konnte durch spezifische Inhibition von VEGFR-2 Rezeptoren mit ZM323881 nachgewiesen werden (Whittles et al., 2002).

## 1.4 Extrazelluläre Matrix

Durch eine ausgewogene Regulation und Gegenregulation werden die Bestandteile der EZM im Gleichgewicht gehalten und lassen sich nach funktionellen Kriterien und strukturellen Eigenschaften unterscheiden.

Beim Aufbau des Interstitiums unterscheidet man die am Aufbau beteiligten Bestandteile, sowie die Proteine, die zur Zelloberfläche gehören, von den fibrillären EZM-Komponenten.

Unterscheidet man nach strukturellen Eigenschaften differenzieren sich die Vertreter der Kollagene, Proteoglykane und Glykoproteine.

### 1.4.1 Kollagene

Mindestens 18 unterschiedliche Glykoproteine gehören der Gruppe der Kollagene an, die einen Großteil des menschlichen Gesamtproteins ausmachen. Es ist eines der langen faserförmigen Strukturproteine, dessen Funktion sich sehr von der globulärer Proteine, wie den Enzymen, unterscheidet. Strapazierfähige Bündel aus Kollagen, die so genannten kollagenen Fasern, sind eine Hauptkomponente der EZM, werden aber auch im Inneren der Zelle gefunden. Kollagen besitzt eine große Zugbelastbarkeit und ist Hauptbestandteil von Knorpel, Bändern, Sehnen, Knochen und Zähnen. Zusammen mit Keratin ist es verantwortlich für die Beanspruchbarkeit und Elastizität der Haut. Es festigt Blutgefäße und spielt eine Rolle in der Entwicklung von Gewebe. Kollagen kommt in der Kornea und der Linse des Auges in kristalliner Form vor. Es wird auch in der ästhetischen und Verbrennungschirurgie benutzt.

Das Tropokollagen oder die "Kollagen Molekül"- Untereinheit ist ein ca. 300 nm langes Stäbchen mit einem Durchmesser von 1,5 nm und besteht aus drei Polypeptidsträngen, wobei jeder Strang von einer linksdrehenden Helix gebildet wird. Diese drei linksdrehenden Helices werden zu einer rechtsdrehenden verwickelten Spirale, einer Trippelhelix, verbunden. Es handelt sich um eine quaternäre Struktur, die von zahlreichen hydrogenen Bändern gefestigt wird. Tropokollagene Untereinheiten bauen sich spontan, mit gleichmäßig versetzten Enden, in größere Bereiche der extrazellulären Zwischenräume im Gewebe selbst zusammen. Es gibt kovalente Bindungen im Inneren der Trippelhelix sowie eine große Anzahl kovalenter Bindungen zwischen verschiedenen Trippelhelices, um die unterschiedlichen Kollagenarten zu bilden, die in den verschiedenen Geweben vorkommen.

Kollagenfibrillen sind Kollagenmoleküle die in einem organisierten überlappenden Bündel verpackt sind.

Ein Merkmal von Kollagen ist die regelmäßige Anordnung der Aminosäuren in jeder der drei Ketten der Kollagen-Untereinheiten. Die Sequenz lautet meist wie folgt: Gly-X-Pro oder Gly-X-Hyp, wobei X jede beliebige andere Aminosäure sein kann. Gly-Pro-Hyp kommt häufig vor. Diese Art der gleichmäßigen Anordnung und der hohe Glycin Anteil wird nur in sehr wenigen anderen faserförmigen Proteinen, und niemals in globulären Proteinen, gefunden. Der hohe Gehalt von Pro und Hyp Ringen mit ihrer geometrisch abhängigen Carboxyl und sekundären Aminogruppe erklärt die Tendenz der individuellen Polypeptidstränge spontan linksgerichtete Helices zu bilden, ohne hydrogene Verbindungen zwischen den Ketten. Die Trippelhelix verengt sich unter Anspannung, widersteht Dehnung und macht Kollagen undehnbare.

Kollagen Typ I ist das wichtigste Kollagen, welches in allen Organen, insbesondere im Bindegewebe, vorkommt. Es macht 90% des Gesamtkollagens aus. Darüber hinaus kommt es in Narbengewebe vor, in Sehnen, dem Endomysium von Myofibrillen und in den organischen Anteilen von Knochen.

Die meisten Kollagene werden in einer speziellen Weise gebildet, wobei der folgende Prozess typisch für Kollagen I ist:

Im Inneren der Zelle: Drei Peptidketten werden in den Ribosomen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) gebildet (zwei alpha-1 und eine alpha-2 Kette). Diese Peptidketten (auch als Präprokollagen bezeichnet) besitzen „Registrierungs-Peptide“ an jedem Ende. Ein Signalpeptid ist ebenfalls an jedem Ende angehängt. Die Peptidketten werden in das Lumen des ER entlassen. Die Signalpeptide bleiben im Inneren des ER kleben und die Ketten werden nun als Prokollagen bezeichnet. Im Lumen kommt es zur Hydroxylierung von Lysin und Prolin. Dieser Prozess benötigt Ascorbinsäure (Vitamin C) als Kofaktor. Es kommt zur Glykosylierung der spezifischen hydroxylierten Aminosäuren. Die Trippelhelixstruktur wird im ER gebildet. Prokollagen wird an den Golgi-Apparat verbracht, wo es gebündelt und mittels Exozytose sezerniert wird.

Außerhalb der Zelle: Die „Registrierungs-Peptide“ werden gespalten und Tropokollagen wird durch die Prokollagen Peptidase gebildet. Verschiedene Tropokollagen-Moleküle bilden Kollagenfibrillen, und mehrere Kollagenfibrillen bilden Kollagenfasern. Kollagen wird mittels verschiedener Proteine an die Zellwand angeheftet, unter anderem von Fibrin und Integrin.

Kollagen Typ III ist Bestandteil der größeren Blutgefäßwände, der lymphatischen Organe und des Coriums der Haut. Es ist ein faserförmiges Skleroprotein und kommt darüber hinaus im Knochen, Knorpel und Sehnen, sowie in der Linse des Auges vor.

Kollagen Typ IV ist ausschließlich in der Basalmembran vorhanden und liegt in geknäuelter Form vor (Alberts et al., 1994). Es gibt sechs Gene, die damit assoziiert sind: COL4A1, COL4A2, COL4A3, COL4A4, COL4A5 und COL4A6.

Nicht-kollagene Glykoproteine haben die Fähigkeit zur direkten Bindung an die Zelle und sind ein wichtiges Bindeglied zwischen Zellen und der EZM. Zu ihnen gehören Fibronectin und Laminin.

### **1.4.2 Fibronectin**

Fibronectin ist ein hochmolekulares Glykoprotein (Molekulargewicht ca. 500 000 Da), das u. a. von Fibroblasten, Myoblasten, Chondrozyten sowie verschiedenen Epithelzellen gebildet wird. Fibronectin findet sich im perizellulären Bereich von Fibroblasten und anderen adhärenen Zellen, aber auch sonst im Bindegewebe in Form dünner Fibrillen. Es besitzt einerseits Affinität zu Zelloberflächen, andererseits zu Matrixsubstanzen, z.B. Kollagen; dadurch werden diese Strukturen miteinander verbunden, auch dort, wo keine Basalmembran vorhanden ist, z.B. bei Fibroblasten. Wie Laminin ist auch Fibronectin in der Lage, diverse Matrixkomponenten sowie angrenzende Zellen zu verbinden (Alberts et al., 1994).

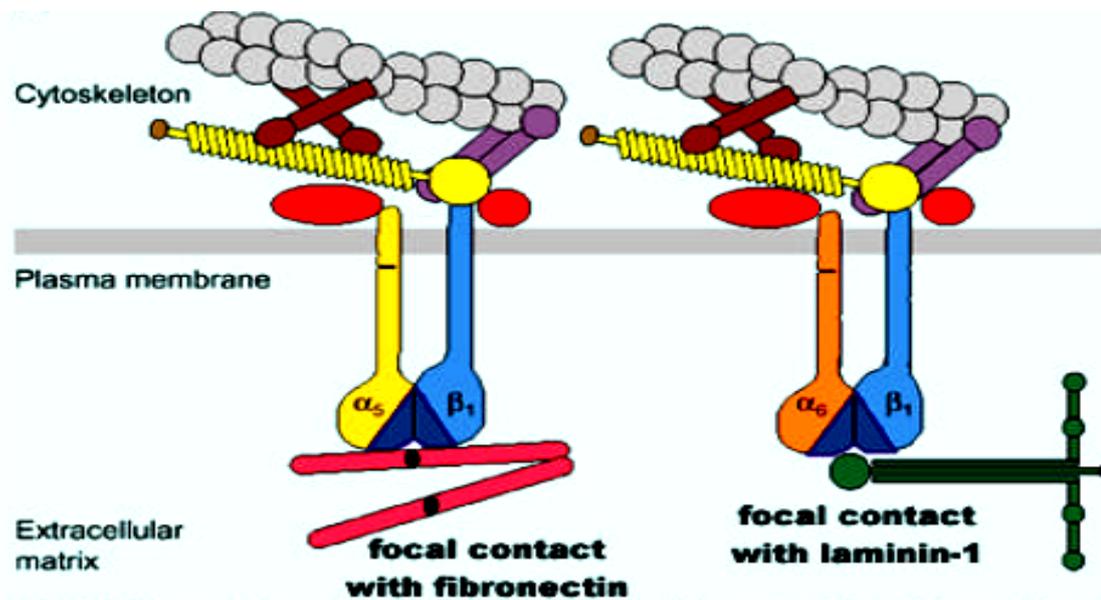


Abb. 5: Schematischer Aufbau eines Fokalkontaktes. Die Verbindung zwischen den Aktinfilamenten des Zytoskeletts und den Proteinen der Extrazellulären Matrix wird über Cluster verschieden kombinierter Integrin-Dimere vermittelt. Dabei entscheidet der Ligand auf der EZM über die Zusammensetzung der Integrin-Rezeptoren. (Quelle: <http://darwin.bio.uci.edu>).

### 1.4.3 Osteopontin

Osteopontin (OPN) wurde erstmals als Knochen-Strukturprotein beschrieben (Senger et al., 1979). OPN ist zwischen 44 und 75 kDa groß. Heute zählt OPN als wichtiger Faktor für die zelluläre Immunantwort. Es wird auch als Eta-1 (early T-lymphocyte activation 1) bezeichnet, der Genort heißt *spp-1* (secreted phosphoprotein 1) (Patarca et al., 1989). Das Protein enthält Kalzium- und Heparin-Bindungsstellen. Hinzu kommt eine Arginin-Glycin-Aspartat (RGD)-Sequenz, wie man sie auch in anderen EZM-Proteinen wie Fibronectin und Kollagen findet (Patarca et al., 1989). Die RGD-Sequenz ist Ligand von Integrinen ( $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta1$ ,  $\alpha\beta5$ ) (Denhardt et al., 2001). Durch Thrombinspaltung wird eine kryptische Bindungsstelle (SVVYGLR) für Integrine ( $\alpha4\beta1$ ,  $\alpha9\beta1$ ) freigelegt, sodass sich die Aktivität der Fragmente im Vergleich zum Gesamtprotein erhöhen kann. Ein weiterer Rezeptor für OPN ist CD 44. Er vermittelt OPN-induzierte Migration RGD-unabhängig (Weber et al., 1996). OPN wird in Knochen (Osteoklasten), von Epithelzellen (z. B. aus Gastrointestinaltrakt, Lunge, Speichel- und Schweißdrüsen) und in Körperflüssigkeiten wie Serum, Urin und Muttermilch exprimiert. Induzierbare Quellen (*in vivo* und *in vitro*) sind Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen, Immunzellen (Makrophagen, T-Lymphozyten, NK-Zellen) und verschiedene Tumorzellen (Denhardt et al., 2001). OPN liegt als Monomer und als Polymer vor. Als Polymer interagiert es

mit EZM-Komponenten wie Kollagenen und Fibronectin (Kaartinen et al., 1999). Als Monomer hat es zytokinartige Wirkung und lockt Monozyten zum Entzündungsgeschehen, stimuliert chemotaktische Migration von Endothelzellen und zieht glatte Muskelzellen an (Senger et al., 1996). Weitere Organsysteme sind das Gefäßsystem, wo OPN an Angiogenese und Atherosklerose beteiligt ist (Denhardt et al., 2001) sowie das Immunsystem. Hier wirkt OPN chemotaktisch und antiapoptotisch auf Monozyten und Endothelzellen (Senger et al., 1996). Bei Osteopontin-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese im Unterschied zu normalen Mäusen keine Osteoporose nach Ovariectomie entwickelten (Yoshitake et al., 1999). Sie besaßen ferner Effekte in der Wundheilung (Liaw et al., 1998) und zeigten eine Veränderung des Wachstums- und Metastasierungsverhalten von Osteopontin-produzierenden Tumorzellen (Crawford et al., 1998).

#### **1.4.4 Laminin**

Laminin ist das wichtigste Glykoprotein der Basalmembran. Basalmembranen und Basallaminae gehören zur Extrazellulären Matrix. Sie fehlen bei beweglichen Zellen, z.B. bei Blutzellen, Spermatozoen, Fibroblasten (Junqueira. Carneiro; 4. Auflage). Die Basalmembran besteht aus: Lamina rara externa, Lamina densa, Lamina rara interna und Lamina fibroelastica. Es dominiert in der Lamina rara interna. Laminin bindet einerseits an Lamininrezeptoren (Integrine) der Plasmamembran, andererseits in der Lamina densa an Typ-IV-Kollagen (über das Protein Nidogen) sowie an Proteoglykane bzw. deren Glykosaminglykanseitenketten. Außer dem Laminin kommen weitere Haftproteine vor, wie beispielsweise Fibronectin. Die Glykoproteine der Basalmembran regeln die Adhäsion der Zellen an ihre Umgebung (Alberts et al., 1994). Laminin kann als feine Begrenzung der Myozyten, der Epithel- und der glatten Muskelzellen beobachtet werden.

Man unterscheidet 15 verschiedene Laminin Formen. Die Laminine-1, -3, -5, -6, -7, -10 und 11 sind in epithelialen Strukturen zu finden. Die Isoformen 2, 4 und 12 wurden in der Plazenta (Paulsson et al., 1991), in Basalmembranen um Skelett- und Herzmuskulatur herum (Leivo und Engvall, 1988) gefunden. Dabei ist die Expression der unterschiedlichen Laminin-Isoformen spezifisch für das umgebende Gewebe. Über die genaue Verteilung der einzelnen Isoformen ist dennoch sehr wenig bekannt. Eine der Hauptfunktionen der Laminine besteht in der Vermittlung von Adhäsion. Mutation der Laminin-Gene verursacht z.B. Epidermolysis bullosa oder kongenitale muskuläre Dystrophie (Aumailley und Smyth, 1998).

Eine Mehrexpression von Laminin, Fibronectin und Kollagenen hat einen signifikanten Einfluss auf die systolische und auch diastolische Funktion des Herzens (Grimm et al., 1998), besonders im Fall der adaptiven oder reaktiven Fibrose.

### **1.4.5 Transforming Growth Factor- $\beta$ 1**

TGF- $\beta_1$  ist ein biologisches Protein. Es ist ein Mitglied der TGF- $\beta_1$  Superfamilie, die auch Inhibin, Aktivin, anti-müllersches Hormon, bone-morphogenetic protein, und andere Mitglieder beinhaltet. TGF- $\beta_1$  kontrolliert die Proliferation, Differenzierung und andere Funktionen in den meisten Zelltypen. Es kann auch als negativer autokriner Wachstumsfaktor agieren.

TGF- $\beta_1$  induziert Apoptose in verschiedenen Zelltypen. Es kann Apoptose entweder über den SMAD Pathway (Engel et al., 1998) oder über den DAXX Pathway auslösen (Perlmann et al., 2001).

#### 1.4.5.1 Der SMAD Pathway:

Es ist der klassische Signalweg, über den die Mitglieder der TGF-Familie agieren. TGF- $\beta_1$  Dimere binden an einen Typ II Rezeptor, welcher dann einen Typ I Rezeptor rekrutiert und phosphoryliert. Dieser wiederum rekrutiert und phosphoryliert dann ein Rezeptor-reguliertes SMAD (R-SMAD), SMAD-3. SMAD-3 ist in die Induktion von Apoptose eingebunden.

R-SMAD bindet nun an ein coSMAD, SMAD4, und bildet einen heteromeren Komplex. Dieser Komplex gelangt in den Zellkern, wo er den Mitogen-aktivierten Protein Kinase 8 Pathway aktiviert. Dieser löst Apoptose aus.

#### 1.4.5.2 Der DAXX Pathway:

TGF- $\beta_1$  kann Apoptose auch über den death associated protein 6 (DAXX) Pathway auslösen. Es wurde nachgewiesen, dass DAXX mit der Typ II TGF- $\beta_1$  Rezeptor Kinase assoziiert und an sie bindet.

## 1.5 Zielsetzung

Das Ziel dieser Dissertation ist die Untersuchung des Einflusses von lokal appliziertem VEGF auf das Endothel nach mikrochirurgischer Anastomosierung von Arterien und die pathophysiologische Bedeutung von VEGF.

Zu diesem Zweck wurden in einem standardisierten Modell der Gefäßanastomose an der Ratte 40 Tiere operiert. Die Ratten wurden in die Gruppe mit VEGF Behandlung oder die Gruppe mit physiologischer NaCl (Vehikel) Behandlung randomisiert verteilt. Die Femoralarterien wurden dann zu definierten Zeitpunkten entnommen, untersucht und miteinander verglichen:

1. Tag 0        ohne VEGF
2. Tag 0        mit VEGF
3. Tag 5        ohne VEGF
4. Tag 5        mit VEGF
5. Tag 10       ohne VEGF
6. Tag 10       mit VEGF

Zu jedem Zeitpunkt wurden die rechte Femoralarterie ohne Anastomose und die linke Femoralarterie mit Anastomose entnommen.

Durch histologische, elektronenmikroskopische und immunhistochemische Untersuchungen soll festgestellt werden, ob die lokale Applikation von VEGF am anastomosierten Mikrogefäß die Reendothelialisierung fördert und/oder beschleunigt, sowie die Thrombosegefahr, Intimahyperplasie und Adventitiahyperplasie reduziert.

Es soll die Wirkung von lokal appliziertem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) an der Gefäßanastomose (Angiogenese / Revaskularisation) überprüft werden. Die Pathophysiologie der Angiogenese ist sehr komplex. Wissenschaftliche Anstrengungen der letzten Jahre haben die Bedeutung von VEGF im Zusammenhang mit Angiogenese nachgewiesen. VEGF ist ein potentes Zellmitogen, welches Angiogenese induziert und die Gefäßpermeabilität erhöht. VEGF wird in Monozyten und Makrophagen unter verschiedenen pathologischen Bedingungen wie Hypoxie, Ischämie in peritumoralem Gewebe und Trauma oder Verbrennung synthetisiert.

Der Verlust des Endothels durch Gefäßtrauma bei z. B. Amputation ist mit einer erhöhten Zellproliferation der glatten Gefäßmuskulatur und einer Neointimabildung verbunden. Fehlendes

Endothel ist die Grundlage für Gefäßthrombosierungen. Diese Prozesse führen oft im Verlauf zu Stenosen oder Thrombosierung der Gefäße nach chirurgischer Revaskularisation. Die schnelle Regeneration der endothelialen Zellschicht ist wichtig um einerseits die Thrombosierung des Gefäßes zu vermeiden und andererseits ein überschießendes Wachstum der Neointima und der glatten Muskelzellen nach vaskulärem Trauma zu vermindern.

Die verantwortlichen Faktoren der endothelialen Regeneration nach Gefäßtrauma sind bislang unbekannt. Es soll einerseits geprüft werden, ob VEGF lokal eine wichtige Rolle in der Regeneration der Endothelzellen (EC) spielt, und wenn ja, ob die Regeneration der EC speziell durch lokale Gabe von VEGF beschleunigt werden kann (Mitoseraten und Morphologie der EC).

Die Arbeitshypothese ist es zu prüfen, ob die lokale Applikation von VEGF an der Gefäßanastomose zu einer schnelleren Regeneration der Endothelzellschicht führt, was indirekt die überschießende Regeneration der Neointima unterdrückt und andererseits die Gefahr der Gefäßthrombosierung vermindert.

## 2 Material und Methoden

In diesem Kapitel werden der angewendete Versuchsablauf, molekularbiologische und immunhistologische Methoden erläutert sowie die hierbei eingesetzten Materialien aufgelistet.

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

ASM555/OSM3 Analysesystem	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Durchlauferhitzer	Haake/Thermo Electron, Karlsruhe, Deutschland
Elektronenmikroskop EM10 A	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Färbekammer „feucht“	Eigenbau
Fotoapparat DSC-P92	Sony, Tokio, Japan
Gefrierschrank (-20 °C)	Linde, Bad Herfeld, Deutschland
Gefrierschrank Thermo Forma ULT (-80 °C)	Klatt, Berlin, Deutschland
Heiz-/Rührplatte Ika Combimag Ret	Janke & Kunkel, Staufen im Breisgau, Deutschland
Kolbenhubpipetten (versch. Volumina)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kühlschrank Küleg 0-15 °C	Münchhoff, Berlin, Deutschland
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Leica EM TRIM	Leica Mikrosysteme, Wien, Österreich
Lichtmikroskop Axiophot	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Microm Färbeautomat HMS	Microm International, Walldorf, Deutschland
Robotstainer	

Microplate Reader Model 3550	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Mikrotom HM 355	Microm International, Walldorf, Deutschland
Mikrowelle MICROMAT	AEG, Zürich, Schweiz
Mini PROTEAN 3	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Mini Trans-Blot	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
OP-Instrumentarium	S&T, Neuhausen, Schweiz
OP-Mikroskop Type 355110	Wild, Heerbrugg, Schweiz
Histokinette-Einbett-Automat E7326	British American Optical Co., Bucks, England
pH-Meter	Knick, Berlin, Deutschland
PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Rollenpumpe 505U	Watson Marlow, Falmouth, England
Saughilfen	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Scanner GT 7000	EPSON, Meerbusch, Deutschland
Schüttler IKA-VIBRAX-VXR	Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen im Breisgau, Deutschland
Standard Rattenkäfig H1003	Alma KG, Kempten, Deutschland
Thermometer Haake/Thermo Electron	Karlsruhe, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischwaage 1602 MP	Satorius, Göttingen, Deutschland
ULTRACUT E	Reichert-Jung Optische Werke, Wien, Österreich
Ultra-Turrax T25	Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen im Breisgau, Deutschland
Videokamera 3CCD	Sony, Tokio, Japan

Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
Wärmeplatte	MEDAX Nagel, Kiel, Deutschland
Wärmeschrank (37 °C) UT6	Heraeus, Langenselbold, Deutschland
Wärmeschrank (60 °C)	Memmert, Schwabach, Deutschland
Wärmeschrank (98 °C)	Memmert, Schwabach, Deutschland

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

DAKO PEN S2002	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Deckglaspinzette	VWR, Darmstadt, Deutschland
Disposable Scalpell No. 11	Feather Safety Co., Osaka, Japan
Dreiwegehahn Discifix	B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
Elka Objektträger 2406	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim, Deutschland
Flacheinbettungsgießform	Plano, Wetzlar, Deutschland
Gel-Blotting-Papier	Satorius, Göttingen, Deutschland
Haltungsfutter für Ratten und Mäuse	(Normalfutter) Altromin
KODAK SO-163	Plano, Wetzlar, Deutschland
Kunststoffwanne	VWR, Darmstadt, Deutschland
Kupfer-Grids	Plano, Wetzlar, Deutschland
Küvetten Typ-Nr. 105.202-QS	Hellma, Müllheim, Deutschland
Nitrocellulose-Membran 0,45 µm	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Pasteurpipette	Brand, Wertheim, Deutschland

Petrischale 120 mm	VWR, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen (versch. Größen)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen für Western Blot	VWR, Darmstadt, Deutschland
Rasierklinge (einkantig)	Plano, Wetzlar, Deutschland
Reaktionsgefäß 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vicryl 3-0 PS-2S	Ethicon, Norderstedt, Deutschland
Schläuche INFUS	Baxter Healthcare Corporation, Renal Division, Illinois, USA
96 Well-Platte 167008	Nunc, Roskilde, Dänemark

### **2.1.3 Gebrauchsfertige Kits**

BC Assay UP40840A	Uptima, Interchim, Montlucon, Frankreich
Laminin Immunhistology Kit	Sigma, Taufkirchen, Deutschland

### **2.1.4 Tiere**

männliche Sprague Dawley Ratten	FEM / FU; amtl. Registriernummer G 0368/97 Charles Riva Wiga (Sulzfeld, Deutschland)
---------------------------------	--

### **2.1.5 Chemikalien**

Acetat Puffer (2,5 mol/l, pH 5,0)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Aceton	J. T. Baker, Deventer, Holland
30 % Acrylamide/Bis Solution 37,5:1	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA

---

3-Amino-9-ethylcarbazol	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
(AEC)-Chromogen	
3-Aminopropyl-Triethoxysilane	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
BCIP/NBT Solution UP099851	Uptima, Interchim, Montlucon, Frankreich
Bic 8,4 %	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Bleicitrat(II)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bromphenol Blue	Biomol, Hamburg, Deutschland
BSA Standard for Protein Assay	Uptima, Interchim, Montlucon, Frankreich
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
3,3-Diaminobenzidin (DAB) Tabletten	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Eiweiß-Glycerin aus Hühnereiweiß	Waldeck, Münster, Deutschland
Entellan Schnelleindeckmittel	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eosin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Epon (Glycidether 100)	Plano, Wetzlar, Deutschland
Essigsäure	J. T. Baker, Deventer, Holland
Ethanol (versch. Konzentrationen)	J. T. Baker, Deventer, Holland
ExtrAvidin (Peroxidase Reagent)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Formvar 1 %	Plano, Wetzlar, Deutschland
25 % Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Goatserum (Ziegenserum)	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Hydrogen Peroxid (3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Isopropanol	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Kaiser's Glyceringelatine Microscopy	Merck, Darmstadt, Deutschland

---

Kaleidoscope Prestained Standards	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Mayer's Hematoxylin Solution 0,1 %	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Methanol	J. T. Baker, Deventer, Holland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
0,9 % Natrium-Chlorid-Infusionslösung	Berlin-Chemie, Berlin, Deutschland
Natronlauge (NaOH)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Neoclear	Merck, Darmstadt, Deutschland
Osmiumtetroxid 2 %	Plano, Wetzlar, Deutschland
Paraffin Paraplast Plus	Sherwood Medical Company, Norfolk, Madison County, Nebraska, USA
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pepstatin A	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Phosphat-Buffered-Saline (PBS)	GIBCO™, Invitrogen, Paisley, UK
0,2 M Phosphatpuffer	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Sirius-Rot F3BA	BDH Laboratory Supplies, Poole, England
Skim Milk Powder	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Styrol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Suprapur 30 % Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
SW 239 A	B. Braun, Melsungen, Deutschland

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamid)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Trizma Base	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Trizma-Hydrochlorid	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin-EDTA (1x) in HBSS W/O	GIBCO™, Invitrogen, Paisley, UK
Tween 20	Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA
Uranylacetat 1 % EM-Klasse	Plano, Wetzlar, Deutschland
VEGF <sub>165</sub>	Chemicon International, Temecula, California
Vulcite M2	Fina Europe, Brüssel, Belgien
Xylol	J. T. Baker, Deventer, Holland
Zitronensäuremonohydrat 99,5 % p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

### 2.1.6 Antikörper

#### Primärantikörper

Flk-1 (C-1158) Rabbit Polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA
Flt-1 (H-225) Rabbit Polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA
Integrin $\beta_1$ Mouse IgG	BD Transduction Laboratories, San Jose, California, USA
Monoclonal Anti- $\alpha$ -Actin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Monoclonal Mouse Anti- Collagen Typ I (C2456)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Monoclonal Mouse Anti-Human	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

## Collagen IV

Monoclonal Mouse Anti Osteopontin	Developmental Studies Hybridoma Bank, MPIIB10 University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa, USA
Rabbit Anti-Laminin (L9393)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Rabbit Anti-Laminin (prediluted)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
VEGF (A-20) Rabbit Polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA

**Sekundärantikörper**

Biotinylated Goat Anti-Rabbit IgG	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Polyclonal Swine Anti-Rabbit IgG/HRP	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Rabbit Anti-Mouse IgG/HRP	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Sheep Anti-Mouse IgG alkaline phosphatase conjugated	Chemicon International, Temecula, California, USA
Sheep Anti-Rabbit IgG alkaline phosphatase conjugated	Chemicon International, Temecula, California, USA

**2.1.7 Lösungen und Puffer****Karnowski-Lösung (pH 7,4)**

- 15 ml 25 % Glutaraldehyd
- 45 ml 0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,4)
- 40 ml 3 % Paraformaldehyd

**Methacarn**

- 60 ml Methanol (100 %)
- 30 ml Chloroform (100 %)
- 10 ml Essigsäure (100 %)

**Paraformaldehyd (3 %)**

30 g Paraformaldehyd  
1000 ml Aqua bidest.

**0,01 M Citratpuffer (pH 6,0)**

2,1 g Zitronensäuremonohydrat 99,5 % p.a. MW=210,14  
1 l Aqua bidest.

**AEC-Chromogen-Lösung**

4 ml Aqua bidest.  
2 Tropfen Acetat Puffer (2,5 mol/l, pH 5,0)  
1 Tropfen 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC)-Chromogen  
1 Tropfen Hydrogen Peroxid (3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

**Lysis-Puffer (Herstellung auf Eis)**

1 ml Triton X-100  
0,5 ml 20 % Sodiumdodecylsulfat (SDS) MG=288,38  
876 mg Natriumchlorid (NaCl)  
5 ml 1 M Trizma-Hydrochlorid (pH 7,2) MW=157,6  
Pepstatin A  
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) MW=174,2

**Sodiumdodecylsulfat (SDS)-Lösung (20 %)**

20 g SDS  
100 ml Aqua bidest.

**Stock-Solution Pepstatin A (Lagerung bei -20 °C)**

1 mg Pepstatin A MW=685,9  
1 ml Methanol

**Stock-Solution Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Lagerung bei -20 °C)**

0,1742 g Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) MW=174,2  
10 ml Methanol

**Proben-Puffer (pH 6,8)**

10 g SDS MG=288,38  
23,64 g Trizma-Hydrochlorid MW=157,6  
25 ml Ethanol  
38,9 mg Glycin MW=75,07  
25 mg Bromphenol Blue  
Aqua bidest. auffüllen auf 100 ml

**Tris-Gel-Puffer für Laufgel (1 M, pH 8,8)**

60,55 g Trizma Base MW=121,14  
500 ml Aqua bidest.

**Tris-Gel-Puffer für Sammelgel (1 M, pH 6,8)**

78,8 g Trizma-Hydrochlorid MW=157,6  
500 ml Aqua bidest.

**Ammoniumpersulfat-Lösung (5 %)**

25 mg Ammoniumpersulfat (APS) MW=228,2  
500 µl Aqua bidest.

**Lauf-Puffer**

3 g Trizma Base MW=121,14  
14,42 g Glycine MW=75,07  
1 g SDS  
Aqua bidest. auffüllen auf 1000 ml

**Transfer-Puffer**

5 g Trizma Base MW=121,14  
24,5 g Glycine MW=75,07  
100 ml Methanol  
2000 ml Aqua bidest

**Block-Puffer**

50 g Skim Milk Powder

1 ml Tween 20

1000 ml PBS (Phosphate buffered Saline = phosphatgepufferte Salzlösung)

**Tris-Puffer (pH 9,5)**

5,85 g Natriumchlorid (NaCl)

12,11 g Trizma Base MW=121,14

10,17 g Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>)

Aqua bidest. auffüllen auf 1000 ml

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Tiermodell

Für die Experimente wurden speziell für Tierversuche gezüchtete männliche Sprague Dawley Ratten von ca. 200-250 g der Firma Charles Riva Wiga (Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Ratten wurden nicht speziell auf die Versuche vorbereitet. Die Markierung der Tiere erfolgte über Käfigbeschriftungen. Jedes Tier hatte seinen eigenen Käfig (Standard Rattenkäfig H1003, Alma KG, Kempten, Deutschland) in dem Wasser und Futter zu jederzeit vor und nach den Versuchen zur freien Verfügung stand. Die Käfige waren in einem mit einem zwölf Stunden Hell – Dunkel - Zyklus Raum untergebracht. Die Protokolle sind vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin (Tierversuchsnr: FEM / FU; amtl. Registriernummer G 0368/97) genehmigt worden und entsprechen den Richtlinien im „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ vom US National Institute of Health (NIH Publication No. 85-23, revidiert 1985). Die Operation wurde, wie unten beschrieben, durchgeführt.

Als Abbruchkriterien wurden die Infektion der Wunde und die Thrombosierung der Femoralarterie definiert. Die Ratten wurden zu definierten Zeitpunkten bis zum zehnten Tag nach der Gefäßanastomose durch intrakardiale KCl-Injektion in Narkose getötet, worauf die Femoralgefäße zur weiteren Analyse entnommen wurden.

Die folgenden Gruppen wurden untersucht:

Tag 0: n = 5 je Gruppe

Die Ratten werden zehn Minuten nach der Gabe von intraluminalem VEGF oder 0.9 % NaCl Lösung getötet.

Tag 5: n = 5 je Gruppe

Die Ratten werden fünf Tage nach der Operation und Behandlung mit VEGF oder 0.9 % NaCl Lösung getötet.

Tag 10: n = 10 je Gruppe

Die Ratten werden zehn Tage nach der Operation und Behandlung mit VEGF oder 0.9 % NaCl Lösung getötet.

Zu jedem Zeitpunkt werden die rechte Femoralarterie ohne Anastomose und die linke Femoralarterie mit Anastomose entnommen und für histologische, immunhistochemische und Western Blot Analyse vorbereitet.

### 2.2.2 Operationstechnik

Für die Versuche wurden die Tiere in ihren Käfigen in das Mikrochirurgische Labor gebracht und die Tiere in der Hand auf den Rücken gedreht. Es erfolgte die intraperitoneale Gabe von Thiopental Natrium (Brevimytal) in einer Dosierung von 100 mg/kg als Narkose. Im weiteren Verlauf wurde die Narkosetiefe durch Umdreh-, Klammer- und Zwischenzehenreflexe überprüft und bei zu leichter Anästhesie Ketanest 0,2 ml intraperitoneal nachgespritzt. Die Ratte wurde dann auf dem Rücken liegend auf einem Korkbrett mit Pflasterstreifen fixiert, beide Leisten rasiert, mit 70% Alkohol desinfiziert und unter die Lichtquelle und das Operationsmikroskop positioniert.



Abb.6: Operationsmikroskop (Stereomikroskop im Labor), Ratte in Rückenlage fixiert.

Die Inzision wurde mit der Schere unter Hochhalten der Haut in Längsrichtung über dem linken Oberschenkel durchgeführt. Es folgte anschließend das stumpfe Präparieren des subkutanen Fettgewebes und nach cranial die Darstellung des Fettpolsters. Das Weichteilgewebe wurde

zunächst mit dem Mini-Selbstspreitzer und dann mit Fischhaken zur Seite gehalten. Die Austrocknung des Gewebes durch die Hitze der Lichtquelle und der Exposition gegenüber der Luft wurde durch häufiges Spülen mit physiologischer Kochsalzlösung verhindert.

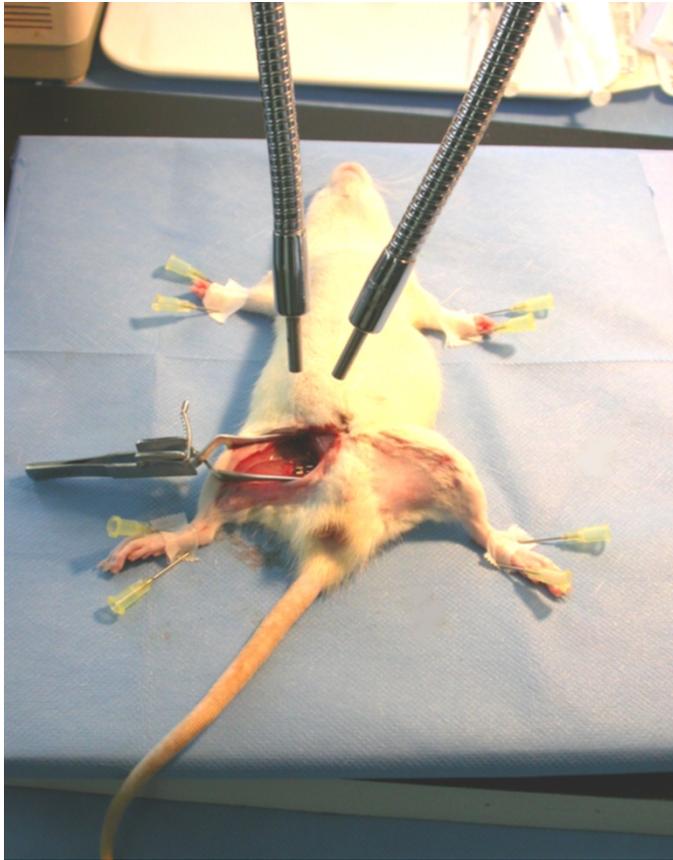


Abb. 7: Operationssituation, die Ratte liegt fixiert in Rückenlage. Halogenlampen illuminieren den Operationssitus.

Nun erfolgte die Darstellung des Leistenbandes und der Leistengefäße mit der Arteria epigastrica, die ligiert wurden. Mit der Milesi-Schere wurden nun die Arterie und Vene femoralis von dem umgebenden Bindegewebe befreit und separat dargestellt. Nach der mikrochirurgischen Darstellung der Arteria femoralis erfolgte das Ankleben des mittleren dargestellten Abschnittes der Arterie mit der Aclandklemme (Acland, S+T, Deutschland, Größe V2).

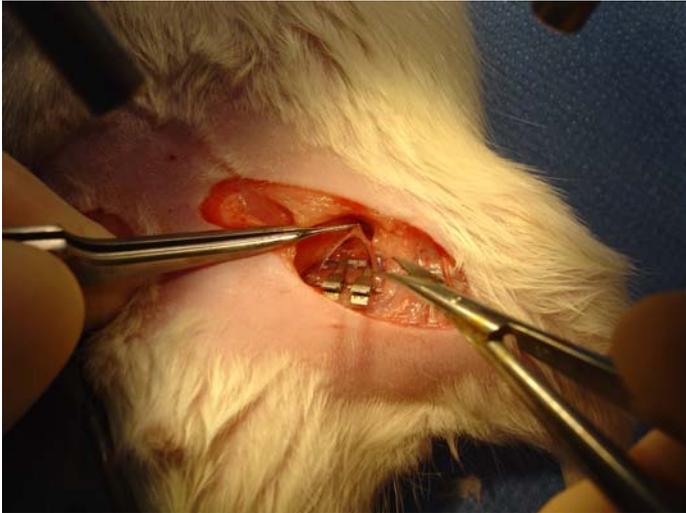


Abb. 8: Operationssitus 1, die Arterie femoralis ist in der Aclandklemme eingespannt

Die Adventitia wurde um die Arterie mikrochirurgisch entfernt und die Arteriotomie mit der geraden Mikroschere durchgeführt. Der distale und proximale Gefäßschenkel wurden mit Heparin Lösung (1:1000) ausgespült. Mit der Aclandklemme erfolgte nun die Approximation der beiden Gefäßstümpfe. Die Anastomose der Arterie wurde mit 11/0 Ethilon Einzelknopfnähten unter dem Operationsmikroskop durchgeführt.

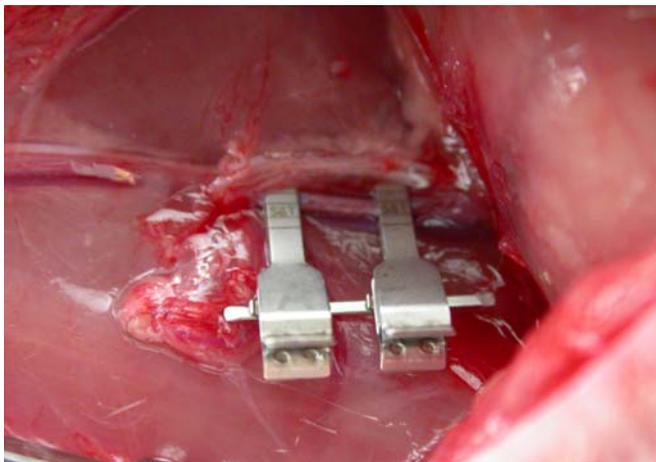


Abb. 9: Operationssitus 2, die Arteria femoralis ist in der Aclandklemme eingespannt

Bevor die letzte Naht gesetzt wurde, wurden 10 ng/ml VEGF 164 oder 0,9 % NaCl Lösung (je nach Gruppe) mit einer feinen Kanüle in das Gefäßlumen instilliert und für zehn Minuten belassen, während die letzte Naht durchgeführt wurde. Nach Freigabe der Aclandklemmen zeigt sich sofort, dass die Anastomose durchgängig war, in dem sich der distale Arterienanteil füllte.

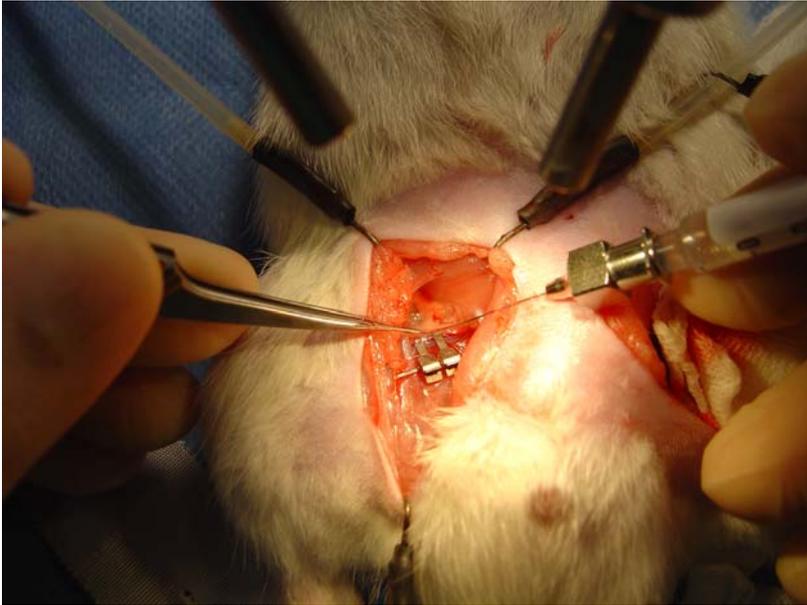


Abb. 10: Operationssitus, Durchführung der intraluminalen Gabe von VEGF

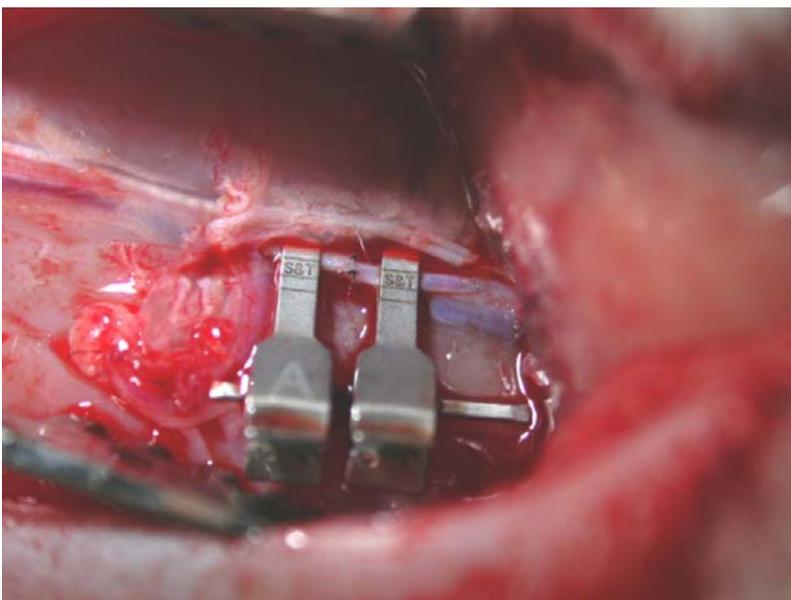


Abb. 11: Operationssitus, die Anastomose ist durchgeführt

Die Durchgängigkeit der Anastomose wurde auch durch den Mikropinzettentest geprüft. Hierzu wurde die Arterie distal der Anastomose durch eine Mikropinzette so stark gedrückt, dass der Blutfluss unterbrochen war. Eine zweite Mikropinzette wurde etwas distal von der ersten Mikropinzette angelegt und das Lumen durch die Pinzette verschlossen. Die proximale Pinzette wurde geöffnet und die Füllung des Gefäßabschnittes beobachtet. Sofortige Füllung zeigte die Durchgängigkeit der Anastomose an. Eine langsame Füllung zeigte sich bei Gefäßspasmus, partieller Thrombose oder technischem Fehler. Keine Füllung bedeutet komplette Thrombose

oder eine groben technischen Fehler. Nachdem die Durchgängigkeit der Anastomose gesichert war, erfolgte die ausführliche Spülung des Wundgebietes und eine intradermale Naht mit 3/0 Nylon Nähten durchgeführt und mit Jod desinfiziert, um eine Selbstverstümmelung durch die Ratte zu vermeiden.

Während der Operation und der Aufwachphase wurde eine Wärmelampe benutzt, um die Körpertemperatur des Tieres bei 37 °C zu halten. Nach der Operation wurde die Ratte in einen mit weichen Tüchern ausgekleideten Käfig gelegt, in den zur supportiven Therapie 100 % Sauerstoff über eine Leitung eingeleitet wurde. Ebenso wurde eine Wärmelampe an den Käfig gestellt, um ein Auskühlen des Tieres zu vermeiden.

Zur postoperativen Schmerzbehandlung wurden intraperitoneal 0.05 mg/kg Buprenorphin (Temgesic) injiziert. Nach dem völligen Aufwachen der Ratte wurde diese wieder in ihrem eigenen Käfig in den Tierstall gebracht und dort engmaschig überwacht. Postoperativ wurden die Tiere engmaschig kontrolliert um eine Beeinträchtigung frühzeitig zu bemerken und gegebenenfalls den Versuch abubrechen, um unnötiges Leiden des Tieres zu verhindern.

## 2.2.3 Histologische Untersuchung

### 2.2.3.1 Fixierungen der Präparate

Die Ratten wurden zu definierten Zeitpunkten bis zum zehnten Tag nach der Gefäßanastomose durch intrakardiale KCl-Injektion in Narkose getötet, worauf die Femoralgefäße zur weiteren Analyse entnommen wurden.

Sofort nach der Entnahme der rechten Femoralarterie ohne Anastomose und die der linken Femoralarterie mit Anastomose nach unterschiedlicher Behandlung mit VEGF oder 0.9 % NaCl Lösung wurden diese fixiert.

Abhängig von der weiteren Verwendung wurden die Präparate in unterschiedlichen Lösungen fixiert.

Um die Strukturen der Arterie, insbesondere der Femoralgefäße, möglichst natürlich in ihrer Architektur beurteilen zu können, wurden die Präparate zum einen über Nacht in frisch angesetzter Methacarn-Lösung (60 ml 100 % Methanol, 30 ml 100 % Chloroform, 10 ml 100 % Essigsäure) fixiert (Shibutani et al., 2000), zum anderen mit Karnowski-Lösung (15 ml 25 % Glutaraldehyd, 45 ml 0,2 M Phosphatpuffer, 40 ml 3 % Paraformaldehyd) (Uneyama et al., 2002).

Die Fixierung mit Methacarn eignet sich insbesondere für immunhistochemische Untersuchungen. Die Fixierung mit Karnowski-Lösung eignet sich besonders für die elektronenmikroskopische Untersuchung.

Beide Fixierungslösungen müssen gekühlt aufbewahrt werden. Methacarn sollte direkt nach der Herstellung verwendet und danach verworfen werden.

Ist eine längere Fixierungszeit notwendig oder vorgesehen, sollte anstelle der Methacarn-Lösung Formalin verwendet werden.

### 2.2.3.2 Einbettung

Bevor die in Methacarn fixierten Arterien in dünne Schnitte auf Objektträger gezogen werden können, erfolgt die Einbettung in Paraffin. Hierfür werden sie zunächst über Nacht in 80 % Ethanol gelegt, um mittels des Histokinette-Einbett-Automaten (Fa. British American Optical, Bucks, England) in einer aufsteigenden Ethanolreihe, Isopropanol, einer Intermediümlösung sowie dem 60 °C heißen Paraffin gemäß dem Standardprotokoll behandelt zu werden: Je zwei Stunden 90% Ethanol, 95 % Ethanol, zweimal zwei Stunden 100 % Ethanol, drei Stunden 100 %

Isopropanol, dreimal drei Stunden Vulcite (Intermediumslösung), fünf Stunden Paraffin und Vulcite (1:1), 14 Stunden Paraffin.

Zuerst wurden die Proben entwässert, anschließend wurde der Alkohol entfernt um im letzten Schritt die Proben in flüssigem Paraffin einzubetten.

Nach der Inkubation der Proben über Nacht in flüssigem Paraffin werden diese im Anschluss in 60 °C heißem Paraffin eingeblockt und nach der Abkühlung auf Raumtemperatur zur vollständigen Durchhärtung über Nacht bei -20 °C gelagert. Danach werden die Paraffinblöcke bei Raumtemperatur aufbewahrt.

### 2.2.3.3 Anfertigung silanisierter Objektträger

Um ein festes Haften der geschnittenen Präparate zu gewährleisten, müssen die Objektträger mit einem Adhaesivum behandelt werden. Für die histologischen Standardfärbungen (Sirius-Rot-Färbung), wird auf die Objektträger vor dem Aufziehen der Schnitte eine dünne Schicht Eiweiß-Glycerin aufgetragen.

Die Methode der Wahl für die immunhistochemischen Färbungen stellt die Behandlung mit APTS-Lösung (3-Aminopropyl-Triethoxysilane) dar. Hierzu werden die Objektträger zunächst für fünf Minuten in einem Aceton-Bad gereinigt und entfettet um anschließend mit der APTS-Lösung (196 ml Aceton, 4 ml APTS) ebenfalls für fünf Minuten behandelt um dann zweimal für je fünf Minuten mit Aqua bidest. gespült zu werden.

Die Trocknung der silanisierten Objektträger erfolgte über Nacht im Wärmeschrank bei 37 °C.

### 2.2.3.4 Anfertigung von Paraffinschnitten

Die Schnitte werden mit einem Mikrotom angefertigt. Nachdem die Paraffinblöcke für drei Minuten auf einem Bad flüssigen Stickstoffs gekühlt worden sind, um einen homogenen Schnitt zu gewährleisten, wird der Paraffinblock in den Schlitten des Mikrotoms eingespannt und getrimmt. Sobald die geeignete Schnittebene erreicht ist, werden 3 µm dicke Schnitte angefertigt, die in einem Warmwasserbad (37 °C) aufgefangen werden. Hier werden sie gestreckt, um glatt auf einen mit Eiweiß-Glycerin beschichteten Objektträger für die immunhistochemischen Färbungen aufgezogen werden zu können. Die aufgezogenen Schnitte werden zunächst auf einer Wärmeplatte (40 °C) vorgetrocknet. Anschließend werden sie im Wärmeschrank über Nacht getrocknet (Schnitte für die Standardfärbung bei 60 °C, Schnitte für immunhistochemische Färbungen bei 37 °C).

#### 2.2.3.5 Standardfärbung: Sirius-Rot

Die Sirius-Rot-Färbung wurde mit einem Färbeautomat gemäß dem folgenden Protokoll durchgeführt.

Zunächst erfolgte eine Inkubation der Schnitte für 3 Minuten in Neoclaer. Danach erfolgt die Reinigung mittels einer absteigenden Alkoholreihe; (100 % Ethanol, 90 % Ethanol, 80 % Ethanol, 70 % Ethanol für je fünf Minuten), eine Spülung mit fließendem Wasser für drei Minuten und eine mit Aqua dest. für zwei Minuten.

Die Färbung erfolgt mit Sirius-Rot F3BA für 60 Minuten. Danach wird für vier Minuten mit einer 0,01 M HCl die Fixierung begonnen. Des Weiteren erfolgt mittels der aufsteigenden Alkoholreihe (70 % Ethanol, 90 % Ethanol für je drei Minuten, zweimal 95 % Isopropanol, zweimal 100 % Isopropanol für je fünf Minuten) die Entwässerung der Schnitte.

Abschließend erfolgt die endgültige Fixierung mit Neoclaer für 30 Minuten.

Im Anschluss werden die Präparate mit Entellan eingedeckelt, lichtmikroskopisch aufgenommen und mittels Videokamera digitalisiert.

### 2.2.4 Immunhistochemie

Immunhistochemische Techniken beruhen auf dem Prinzip der Bindung eines spezifischen Antikörpers an das darzustellende Antigen und der anschließenden Sichtbarmachung des gebundenen Antikörpers.

Spezifische Antigene werden lichtmikroskopisch mittels indirekter Immunhistochemie nachgewiesen. Antikörper, die gegen das zu detektierende Antigen (z.B. Substruktur eines Proteins) gerichtet sind und an diesen Strukturen haften, werden als Primärantikörper bezeichnet. Bei der indirekten Immunhistochemie wird ein gegen den Primärantikörper gerichteter und enzymgekoppelter Sekundärantikörper verwendet, während bei der direkten Immunhistochemie der Primärantikörper selbst enzymgekoppelt ist. Da der Sekundärantikörper an verschiedene Epitope des Primärantikörpers binden kann und somit die Bindung mehrerer Sekundärantikörper an einen Primärantikörper möglich ist, ist die indirekte immunhistochemische Methode durch Amplifizierung der Färbung bei der Entwicklung deutlich sensitiver als die direkte Methode. Die Entwicklung erfolgt durch enzymatische Umsetzung eines farblosen Substrates, das zu einem farbigen Niederschlag umgebaut wird und die Strukturen anfärbt, an die der Primärantikörper gebunden hat (Noll und Schaub-Kuhnen, 2000).

### 2.2.4.1 Entparaffinierung von Schnitten

Die zuvor hergestellten Paraffinschnitte werden zur vollständigen Trocknung über Nacht bei 37 °C in einem Wärmeschrank gelagert, am nächsten Tag in einer absteigenden Alkoholreihe (jeweils zehn Minuten lang: Xylol, 100 % Ethanol, 96 % Ethanol, 70 % Ethanol) entparaffiniert und dreimal mit PBS gewaschen und rehydriert. Anschließend werden die Präparate zehn Minuten lang in Aceton bei –20 °C nachfixiert und dreimal mit PBS gewaschen. Um zu gewährleisten, dass sich die in den folgenden Schritten auf das Präparat pipettierten Flüssigkeiten nicht auf dem gesamten Objektträger verteilen und somit verdünnt werden, wird das Präparat nach der Entparaffinierung mit einem DAKO PEN markiert.

Da die zu detektierenden Antigene teilweise durch Proteinvernetzung infolge der Fixierung und Einbettung in ihrer dreidimensionalen Struktur verändert und somit für den Antikörper nicht mehr erkennbar sind, müssen die antigenen Epitope entweder enzym- oder hitze-induzierte oder durch Kombination beider Methoden demaskiert werden.

Für die enzymatische Demaskierung werden die Schnitte 20 Minuten mit Trypsin/EDTA inkubiert. Nach der Inkubation werden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen.

Für die hitze-induzierte Demaskierung werden die Schnitte in der Mikrowelle, vollständig von Citratpuffer bedeckt, 20 Minuten gekocht. Nach der Inkubation werden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen.

### 2.2.4.2 Immunhistochemische Färbung

Die zuvor entparaffinierten Schnitte inkubieren für 30 Minuten in einer 1 % Ziegen-Serumlösung (Konzentration 1:100, verdünnt in PBS), auf diese Weise werden elektrostatische Ladungen der Proteine gesättigt, hydrophobe Bindungen blockiert und damit die unspezifische Bindung der später aufgebrauchten Antikörper verhindert.

Das Serum wird abgekippt und die Schnitte werden mit dem zuvor mit PBS verdünnten Primäantikörper beschichtet. Bei allen verwendeten Primäantikörpern wurde eine Inkubationszeit von 60 Minuten gewählt. Da sowohl der Sekundäantikörper als auch die Konzentration antikörperspezifisch ist variiert diese und ist der Tabelle 1 zu entnehmen.

<b>Primärantikörper</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Sekundärantikörper</b>
Monoclonal Mouse Anti-Collagen I	1:100	Rabbit Anti-Mouse IgG/HRP
Polyclonal Rabbit Anti-Fibronektin	1:500	Goat Anti-Rabbit IgG (biotinyliert)
Polyclonal Rabbit Anti-Laminin	prediluted	Goat Anti-Rabbit IgG (biotinyliert)
Monoclonal Mouse Anti-Osteopontin	1:50	Rabbit Anti-Mouse IgG/HRP

Tab. 1: Übersicht der Primärantikörper mit den entsprechenden Konzentrationen und verwendeten Sekundärantikörper

Es wurden zwei methodisch unterschiedliche Sekundärantikörper verwendet. Zum einen ein HRP-gekoppelter Sekundärantikörper (indirekte Peroxidase Methode), zum anderen ein HRP-gekoppelter, biotinylierter Sekundärantikörper (Streptavidin-Biotin Technik).

Bei Verwendung eines gegen den Primärantikörper gerichteten, HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers wird das Präparat für 60 Minuten mit diesem inkubiert. Auch hier gilt, dass die Konzentration antikörperspezifisch ist und aus der Tabelle 2 zu entnehmen ist.

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Inkubationszeit</b>	<b>Entwicklungssubstrate</b>
Rabbit Anti-Mouse IgG/HRP	1:40	60 Minuten	DAB
Goat Anti-Rabbit IgG (biotinyliert)	prediluted	20 Minuten	AEC

Tab. 2: Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper und der entsprechenden Konzentrationen, Inkubationszeiten und Entwicklungssubstrate

Nachdem der überschüssige Sekundärantikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt worden ist, erfolgte die fünfminütige Entwicklung mit 40 ml 3,3-Diaminobenzidin (DAB)-Entwicklungslösung (10 mg DAB = 1 Tablette gelöst in 20 ml PBS) und 800 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (100 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verdünnt in 10 ml PBS) je Küvette. Das durch die Horsesadish Peroxidase enzymatisch umgesetzte Farbprodukt, das an Bindungsstellen des Primärantikörpers sichtbar wird, ist von braunem Kolorit.

Nach fließender Wässerung mit Aqua dest. für fünf Minuten zur Entfernung des Entwicklungssubstrates erfolgt die blaue Gegenfärbung der Zellkerne für zwei Minuten mit Mayer's Hämatoxylin, das zuvor im Verhältnis 1:5 mit sterilem Aqua dest. verdünnt worden ist.

Um das überschüssige Hämatoxylin zu entfernen wurden die Schnitte erneut für fünf Minuten in Aqua dest. fließend gewässert. Danach wurden die Präparate mittels einer aufsteigenden

Alkoholreihe entwässert (je eine Minute: 70 % Ethanol, 96 % Ethanol, 100 % Ethanol, abschließend fünf Minuten Xylol) und mit Entellan eingebettet.

Bei Verwendung eines gegen den Primärantikörper gerichteten HRP-gekoppelten, biotinylierten Sekundärantikörpers wird das Präparat für 20 Minuten in diesem inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wird der Schnitt für weitere 20 Minuten in einer Avidin gekoppelten Peroxidase Reagent gegeben. Auf Grund der sehr großen Affinität von Streptavidin (aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isoliertes tetrameres Glykoprotein) zu Biotin (Vitamin B7, Vitamin H) bilden sich Streptavidin-Biotin-Enzymkomplexe. Nachdem die Präparate dreimal mit PBS gewaschen worden sind, erfolgt zur Entwicklung die Inkubation mit AEC-Chromogen-Lösung direkt auf dem Schnitt. Die Inkubation findet unter mikroskopischer Kontrolle statt und dauert etwa 18 Minuten.

Auch bei dieser Methode erfolgte die Gegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin (Kernfärbung). Nach erneuter Wässerung werden die Schnitte mit Kaiser's Glyceringelatine eingebettet.

Um die Spezifität der indirekten immunhistochemischen Färbungen zu kontrollieren, wird für jedes Präparat eine Negativkontrolle angefertigt, die das gesamte Färbeprotokoll parallel zu den zu untersuchenden Schnitten durchläuft, ohne jedoch mit dem antigenspezifischen Primärantikörper inkubiert zu werden. Demzufolge ist jedes in der Negativkontrolle auf eine unspezifische Reaktion zurückzuführen, die korrigiert werden muss.

Grundsätzlich findet jede Inkubation in einer feuchten Kammer statt, das bedeutet bei gesättigter Luftfeuchtigkeit und ohne Lichtexposition, um zu verhindern, dass die Schnitte austrocknen.

### 2.2.4.3 Bildanalyse der immunhistochemischen Färbungen

Um die morphologischen Veränderungen semiquantitativ beurteilen zu können, werden die immunhistochemisch gefärbten Präparate bildanalytisch ausgewertet.

Für die automatische Bildanalyse wird ein Photomikroskop Axiophot der Firma Carl Zeiss verwendet, welches mit einem Videosystem der Firma AVT-HORN verbunden ist. Dieses Videosystem beinhaltet eine Farb-Videokamera mit drei 1/2"-CCD-Chips, ein externes Kamerasteuergerät und einen Frame Grabber. Um von dem angegebenen Bereich in der Femoralarterie digitale Bilder zu erhalten, wurde die Farb-Videokamera mit dem externen Kamerasteuergerät an einen Computer, Power Macintosh 8200/120, und dem Frame Grabber angeschlossen. Mit Hilfe des Analyseprogrammes Scion Image (Version 1.63 Mac Os, Scion Corporation, Washington D.C, USA) werden alle Präparate am Computer ausgewertet.

Von jedem Gefäßwand-Schnitt werden 10 Gesichtsfelder (Fläche pro ausgezähltem Feld:  $75286,74 \mu\text{m}^2$ ) unter dem Lichtmikroskop (Vergrößerung 200x) zufällig ausgewählt und ausgewertet. Hierfür wird zunächst die Farbeaufnahme in eine Schwarz-Weiß-Aufnahme umgewandelt. Durch Justierung eines Schwellenwertes (Threshold) werden die in der Farbaufnahme angefärbten Areale geschwärzt, während nicht-angefärbte Areale weiß bleiben. Die geschwärzte Fläche wird in Relation zur Gesamtfläche der Aufnahme gesetzt.

Die Aufnahme findet bei diesen immunhistochemischen Färbungen mit 400x Vergrößerung statt. Die Umwandlung in eine Schwarz-Weiß-Aufnahme sowie die Justierung eines Schwellenwertes entfallen. Die Schichtdicke der immunhistochemisch angefärbten Areale wird unter Verwendung des Bildanalyseprogrammes Scion Image direkt gemessen.

Alle Messungen werden im Doppelblindversuch durch zwei unabhängige Untersucher durchgeführt.

## **2.2.5 Gelelektrophorese und Western Blot Analyse**

Um die mittels Immunhistochemie gewonnenen Daten zu verifizieren, werden definierte Proteinmengen nach Extraktion aus den Segmenten der Gefäßwänden mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen. Da die Antigene der immobilisierten Proteine noch ihre Immunreaktivität besitzen, können sie mit Hilfe von Antikörpern und Enzymsubstraten qualitativ und semiquantitativ bestimmt werden. Es können Aussagen zu Mengenverhältnissen der Proteine, jedoch keine Aussagen über Gesamtproteinkonzentrationen getroffen werden. In Korrelation zur immunhistochemischen Untersuchung handelt es sich um eine indirekte Immunmarkierung; der Primärantikörper ist gegen das zu detektierende Antigen, der markierte Sekundärantikörper gegen den Primärantikörper gerichtet. Der Sekundärantikörper ist wiederum mit einer alkalischen Phosphatase konjugiert, die mittels Substrat-Umsetzung eine Detektion ermöglicht.

### **2.2.5.1 Proteinextraktion**

Um aus den Gefäßwänden aller vier Gruppen eine lösliche Proteinfraction zu extrahieren, werden diese zunächst in je 1 ml eisgekühltem Lysis-Puffer mittels Ultra-Turrax unter ständiger Kühlung für 30 Minuten homogenisiert und lysiert. Die Zellmembranen werden aufgeschlossen, die dabei freiwerdenden Proteasen, die den Nachweis der Proteine durch deren Destruktion qualitativ und quantitativ beeinträchtigen, werden durch die Zugabe von  $10 \mu\text{l}$

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 5 µl Pepstatin A je Milliliter Lysispuffer inhibiert. Die Homogenate werden für 30 Minuten bei 4 °C mit 10.000 U/min zentrifugiert. Die Überstände werden in Eppendorfgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei - 80 C gelagert.

### 2.2.5.2 Gesamtproteinbestimmung

Im weiteren Verlauf muss die Gesamtproteinkonzentration der Proben bestimmt werden. Dieses erfolgt mit dem BC-Assay-Kit (Uptima, Interchim, Montlucon, Frankreich) per Extinktion.

Von jeder Probe werden 10 µl der Proteinfraction mit 200 µl Bestimmungsreagenz (bestehend aus 196 µl Reagenz A und 4 µl Reagenz B) in je ein Well einer auf Eis stehenden 96 Well-Platte pipettiert. Als Referenzwert werden je 10 µl einer Standardverdünnungsreihe (S<sub>1</sub> 2000 µg/ml, S<sub>2</sub> 1000 µg/ml, S<sub>3</sub> 500 µg/ml, S<sub>4</sub> 250 µg/ml, S<sub>5</sub> 125 µg/ml, S<sub>6</sub> 62,5 µg/ml, S<sub>7</sub> 31,25 µg/ml) aus bovinem Serumalbumin (BSA) eingesetzt. Als Nullwert (Blank) werden 10 µl Lysis-Puffer mit 200 µl Bestimmungsreagenz pipettiert. Um Pipettier- und Messfehler auszugleichen, erfolgt die Proteinbestimmung einer jeden Probe im Dreifachansatz.

Anschließend wird die 96 Well-Platte abgedeckt, 30 Sekunden geschüttelt und 30 Minuten bei 60°C im Wärmeschrank inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, werden die Proben anschließend fünf Minuten im Kühlschrank bei 4°C abgekühlt. Die Messung der Farbstoffintensitäten von Proben, Standards und Nullwert werden im Spektrometer bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen.

Die Auswertungssoftware Mikroplate Manager PC (Version 4.0, Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) errechnet anhand der Kurve der Extinktionswerte der definierten Standards die jeweilige Gesamtproteinkonzentration der Proben. Nach Kontrolle der Standardabweichung der Dreifachansätze wird der Mittelwert als Gesamtproteinkonzentration der Konzentrationsangleichung zugrunde gelegt.

Die anschließende Reduzierung der Proteinfractionen dient der Spaltung von Disulfidbindungen, um die Bindungsstellen den Antikörpern frei zugänglich zu machen. Hierzu wird in einem Eppendorf-Gefäß je 1 ml Proteinsuspension mit 250 µl Proben-Puffer und 62,5 µl 2-Mercaptoethanol versetzt und für 15 Minuten im Thermomixer bei 95 C denaturiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur können die Proben bis zur weiteren Verwendung bei - 20°C aufbewahrt werden.

Um bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) gleiche Probenvolumina auftragen zu können, werden die unterschiedlichen

Gesamtproteinkonzentrationen der einzelnen Proben mit Lysispuffer auf eine einheitliche Gesamtproteinkonzentration eingestellt.

### 2.2.5.3 SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Die Auftrennung der Proteine erfolgt mit dem Mini-PROTEAN 3-System, Aufbau und Verwendung der Apparatur erfolgen gemäß der Angabe des Herstellers.

Das Polyacrylamidgel, dass vor jedem Versuch neu angesetzt werden muss, wird zwischen zwei Glasplatten, die zuvor mit 80 % Ethanol gereinigt worden sind, gegossen. Je nach Molekulargewicht des zu detektierenden Proteins wird ein Trenngel mit unterschiedlicher Dichte verwendet: Für die Detektion von Kollagen Typ I, III, IV , flk-1, und Fibronectin wird ein 7,5 %iges Trenngel verwendet, die Proteine des Osteopontins in einem 10 %igen und TGF- $\beta$ 1 und VEGF werden in einem 12 %igen Trenngel detektiert.

Nach dem Ansetzen der Trenngel-Lösung (Zusammensetzung siehe Tab.3) werden je Gel 100  $\mu$ l einer 5 % Ammoniumpersulfat-Lösung (APS) und 10  $\mu$ l TEMED als Polymerisationsbeschleuniger hinzu gegeben. Die Lösung wird mit einer Pasteurpipette zwischen die Glasplatten gefüllt und mit Aqua bidest. überschichtet, um eine ebene Oberfläche zu gewährleisten. Nach der Polymerisation (ca. 30 Minuten) wird die überschichtende Flüssigkeit vollständig entfernt und das Trenngel mit einem weiteren so genannten Sammelgel (Herstellung siehe Tab. 3) überschichtet, in dem ein Kamm platziert wird, der nach der Polymerisation entfernt wird. Dies dient zur Erzeugung von Kammern, in die später die verschiedenen Proben eingebracht werden.

Substanzen	Trenngel			Sammelgel
	7,5 %	10 %	12 %	4 %
30 % Acrylamid [ml]	2,5	3,3	4,0	0,67
Tris-Gel-Puffer [ml]	2,5 (pH 8,8)	2,5 (pH 8,8)	2,5 (pH 8,8)	1,25 (pH 6,8)
20 % SDS [ml]	50	50	50	25
Aqua bidest. [ml]	4,85	4,05	3,35	3
5 % APS [ $\mu$ l]	100	100	100	50
TEMED [ $\mu$ l]	10	10	10	5

Tab. 3: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele; Mengenangaben für jeweils zwei Gele

Das so entstandene Gel wird in die Elektrophoresekammer eingebracht und diese mit Laufpuffer gefüllt. In jede der oben beschriebenen Kammern werden 10  $\mu$ l der jeweiligen Probe (Proteinextrakt) pipettiert. Zusätzlich wird noch in eine der Kammern 10  $\mu$ l eines Markers

gegeben. Der Marker besteht aus einer definierten Mischung farblich markierter Proteine unterschiedlichen Molekulargewichtes. Auf diese Weise lassen sich die Qualität von Elektrophorese und Transfer beobachten, sowie später das Molekulargewicht der detektierten Banden abschätzen.

Nach Auftragen der Proben werden über eine Spannungsquelle für 15 Minuten konstant 80 Volt angelegt, um die Proben an dem Übergang zwischen Sammel- und Trenngel auf ein Niveau zu bringen. Anschließend werden die Proben für weitere 60 Minuten bei konstant 120 Volt aufgetrennt.

### 2.2.5.4 Western Blot

Nach Abschluss der Elektrophorese wird das Gel aus der Apparatur herausgenommen. Für die Übertragung und Fixierung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf Nitrocellulosemembran wird das Mini Trans-Blot-System verwendet.

Im so genannten Sandwich-Verfahren werden Filterpapier, Gel, Nitrocellulosemembran und ein weiteres Filterpapier zwischen zwei Fiber-Pads geschichtet und in die Blotkammer eingespannt, die mit Transferpuffer gefüllt wird.

Um den Transfer der Proteine vom Trenngel auf die Nitrocellulosemembran zu gewährleisten wird für eine Stunde eine Spannung von konstant 120 Volt angelegt. Durch die hohe Stromstärke kommt es zu einer Wärmentwicklung, welches die Proteine schädigen könnte, deshalb werden Kühlakkus in das System eingebracht

### 2.2.5.5 Immunmarkierung

Nach Abschluss des Transfers wird die Nitrocellulosemembran aus der Blotkammer genommen in eine Petrischale gegeben und zur Absättigung unspezifischer Bindungen über Nacht bei 4°C in Blockpuffer inkubiert.

Der Primärantikörper zur Markierung des zu detektierenden Antigens wird in Blockpuffer aufgenommen (Verhältnis 1:1000) und die Nitrocellulosemembran, die zuvor in eine Petrischale überführt wurde damit überschichtet. (Tab.: 4)

Primärantikörper	Sekundärantikörper
Monoclonal Mouse Anti-Kollagen Typ I	Sheep Anti-Mouse IgG
Monoclonal Mouse Anti-Kollagen Typ III	Sheep Anti-Mouse IgG
Monoclonal Mouse Anti-Kollagen Typ IV	Sheep Anti-Mouse IgG
Monoclonal Mouse Anti-Fibronektin	Sheep Anti-Mouse IgG
Polyclonal Rabbit Anti-flk-1	Sheep Anti-Rabbit IgG
Monoclonal Mouse Anti-Osteopontin	Sheep Anti-Mouse IgG
Polyclonal Rabbit Anti-TGF- $\beta$ 1	Sheep Anti-Rabbit IgG
Polyclonal Rabbit Anti-VEGF	Sheep Anti-Rabbit IgG

Tab. 4: Übersicht der verwendeten Primärantikörper mit Konzentrationen und verwendeten Sekundärantikörper

Die Inkubation wird bei Raumtemperatur für eineinhalb Stunden bei Schwenkbewegungen auf einem Schüttler vorgenommen, um eine gleichmäßige Verteilung des Antikörpers zu gewährleisten. Im Anschluss wird die Membran dreimal jeweils 10 Minuten mit antikörperfreiem Blockpuffer unter Schwenkbewegungen gewaschen.

Daraufhin erfolgt für eine Stunde bei Raumtemperatur eine Inkubation des in Blockpuffer aufgenommenem Sekundärantikörpers (Verhältnis 1:5000), der zum einen gegen den Primärantikörper gerichtet ist, zu anderen mit einer alkalischen Phosphatase konjugiert ist.

Für monoklonale in der Maus produzierte Primärantikörper wird ein entsprechender gegen Mausantigene gerichteter Sekundärantikörper, für polyklonale im Kaninchen entwickelten Primärantikörper wird ein gegen Kaninchenantigene gerichteter Sekundärantikörper verwendet.

Nach der Inkubation wird die Membran dreimal jeweils 10 Minuten mit Tris-Puffer unter Schwenkbewegungen gewaschen.

Nach Zugabe des Entwicklers BCIP/NBT (5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphat und Nitroblautetrazolium) werden die spezifischen Bindungen der Antikörper durch das enzymatische Umsetzen der Substrate durch die alkalischen Phosphatase in Farbprodukte sichtbar. Die Entwicklung erfolgt lichtgeschützt auf dem Schüttler bis die Bandenfärbung die gewünschte Intensität erreicht hat.

Nach Abschluss der Entwicklung wird die Membran mit Aqua dest. gespült, um ein weiteres Nachdunkeln zu verhindern. Anschließend werden die Membranen lichtgeschützt bei Raumtemperatur auf einem Filterpapier getrocknet.

### 2.2.5.6 Densitometrische Auswertung

Um Veränderungen des spezifischen Proteingehalts semiquantitativ beurteilen zu können, werden die getrockneten Nitrocellulosemembranen mit einem Scanner digitalisiert und mit dem Programm AIDA (Aida Advanced Image Data Analyser, Version 2.11, Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt, Deutschland) densitometrisch quantifiziert. Hierzu werden gleich große Messfelder über die einzelnen Banden gelegt, die Hintergrundfärbung wird von dem Integral der einzelnen Farbflächen und -intensitäten abgezogen, die zueinander in Relation gesetzt werden (Integral-Bkg [%]).

## 2.2.6 Transmissionselektronenmikroskopie

### 2.2.6.1 Fixierung der Gewebeproben

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wird die Femoralarterie der Versuchstiere sowohl in nativem Zustand als auch null, fünf und zehn Tage nach Anastomose bzw. Behandlung mit VEGF unter dem Operationsmikroskop unter Zuhilfenahme des mikrochirurgischen Operationsinstrumentariums herauspräpariert und in frisch angesetzter, gekühlter Karnowski-Lösung über Nacht fixiert.

### 2.2.6.2 Einbettung der Gewebeproben

Nach dreimaliger Spülung mit PBS (0,1 M) für jeweils 15 Minuten, werden die Präparate zur Kontrastierung mit 2 ml frisch angesetzter Lösung aus 2 % Osmiumtetroxid und PBS (0,2 M) im Verhältnis 1:1 für zwei Stunden beschichtet, um Lipid- und Proteinstrukturen elektronenmikroskopisch sichtbar zu machen. Nach Entfernung der Osmiumtetroxid-Lösung erfolgt eine erneute dreimalige Spülung mit PBS (0,1 M) für je 15 Minuten. Der Entwässerung des Gewebes in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Jeweils 10 Minuten 30 % Ethanol und 50 % Ethanol, zweimal 20 Minuten 70 % Ethanol, 10 Minuten 90 % Ethanol, dreimal 20 Minuten 100 % Ethanol) schließt sich die Beschichtung der Arterien mit der Intermediumslösung Styrol für weitere 15 Minuten, mit einer Mischung aus Epon und Styrol im Verhältnis 1:1 für 24 Stunden und mit reinem Epon für weitere 24 Stunden an. Das Gewebe wird in eine Flacheinbettungsgießform gegeben, zur Vermeidung von Luftblasen für eine Stunde mit Epon

beschichtet und im Folgenden für 72 Stunden im Wärmeschrank bei 60 °C bis zur vollständigen Polymerisation des Epons gelagert.

### 2.2.6.3 Vorbereitung der Objektträger

Um ein festes Haften und gerades Aufliegen der geschnittenen Präparate auf dem Kupfernetz zu gewährleisten, müssen die Kupfer-Grids mit einem dünnen Film eines Elektronenstrahl-durchlässigen Adhaesivums überzogen werden, das gleichzeitig den Schnitt stabilisiert.

Die Methode der Wahl ist die Beschichtung der Kupfer-Grids mit Formvar. Gereinigte Objektträger werden luftblasenfrei in die gefilterte 1 % Formvar-Lösung gegeben, die darauf langsam ablaufen muss bis ein silber-grauer Film entsteht. Randständiges Formvar wird mit einer Rasierklinge entfernt. Der Formvar-Film wird im Folgenden durch Eintauchen in Aqua bidest. vom Objektträger gelöst. Die Kupfer-Grids werden auf den abgelösten Formvar-Filmgelegt, wieder aufgenommen und bis zur vollständigen Trocknung bei Raumtemperatur gelagert.

### 2.2.6.4 Anfertigung transmissionselektronenmikroskopischer Schnitte

Der fertige Epon-Block wird mit einer Rasierklinge zugeschnitten und mit der Fräse Leica EM TRIM getrimmt, bis die zu untersuchende Ebene erreicht ist. Die elektronenmikroskopischen Schnitte des in Epon eingebetteten Gewebes werden mit dem Mikrotom ULTRACUT E zunächst als lichtmikroskopisch beurteilbarer Dickschnitt (5 µm) und anschließend als Dünnschnitt (50 nm) angefertigt. Der Dünnschnitt wird auf einem Wasserbad aufgefangen und auf einem Formvar beschichteten Kupfer-Grid aufgezogen. Die aufgezogenen Schnitte werden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

### 2.2.6.5 Nachkontrastierung transmissionselektronenmikroskopischer Schnitte

Um eine detaillierte Darstellung der morphologischen Verhältnisse bei den elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu erhalten, wird der aufgezogene Schnitt nachkontrastiert.

Der Schnitt wird für 15 Minuten mit einer 1 % Uranylacetat-Lösung beschichtet, zweimal in gefiltertem Aqua bidest. gespült und darauf bis zur völligen Trocknungstaubfrei verwahrt.

Anschließend wird das Präparat für fünf Minuten mit Bleicitrat beschichtet, erneut zweimal in gefiltertem Aqua bidest. gespült und vor der elektronenmikroskopischen Untersuchung für mindestens einen Tag unter sterilen Kautelen getrocknet.

### 2.2.6.6 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme

Die Probeschnitte werden mit einem Transmissionselektronenmikroskop beurteilt und auf einen speziellen EM-Film für die Transmissionselektronenmikroskop aufgenommen. Nach dessen Entwicklung werden die Bilder via Scanner digitalisiert und mit dem Bildbearbeitungsprogramm Adobe Photoshop CS2 (Adobe Photoshop CS2, Version 9.0, Adobe Systems, San Jose, California, USA) nachkontrastiert.

### 2.2.7 Statistik

Zur statistischen Auswertung werden die durch die beschriebenen Untersuchungsmethoden erhobenen Einzelwerte der jeweiligen Versuchsgruppe zugeordnet. Im Folgenden werden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung errechnet.

Die Durchführung eines statistischen Lagetestes ermöglicht den Vergleich der Versuchsgruppen.

Die Überprüfung der Einzelwerte auf das Vorliegen einer Normalverteilung ist der geringen Fallzahl je Gruppe ( $n = 5$ ) wegen nicht möglich. Der Wertebereich realer Daten ist in der Natur stets beschränkt und besteht dementsprechend aus endlich vielen diskreten Werten. Dies widerspricht der Normalverteilungsannahme (Trampisch et al., 2000), somit kann davon ausgegangen werden, dass in der Natur keine Normalverteilung vorliegt.

Für den Vergleich von jeweils zwei unabhängigen Stichproben wird als nichtparametrisches Verfahren der U-Test nach Mann und Whitney (Mann und Whitney, 1947) durchgeführt. Um den Einfluss des intraluminal verabreichten VEGF in der anastomosierten Arterie zu untersuchen, werden zum einen die Gruppen ohne Gefäßanastomose mit und ohne Behandlung mit VEGF verglichen; zum anderen wird der Einfluss der Behandlung mit VEGF in den anastomosierten Gefäßen untersucht, indem die vier Gruppen miteinander verglichen werden.

Anhand der Berechnung der Überschreitungswahrscheinlichkeit (p-Wert) soll statistisch gezeigt werden, wie signifikant sich die verglichenen Untersuchungsgruppen voneinander unterscheiden. Eine statistische Signifikanz wird akzeptiert, wenn bei einer angenommenen Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 5\%$  der p-Wert  $< 0,05$  ist.

Für die Berechnung der arithmetischen Mittelwerte und der jeweiligen Standardabweichungen sowie für den statistischen Lagetest wird das Programm SPSS für Windows (Version 11.5, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) verwendet. Die graphischen Darstellungen der Einzelwerte als

vertical points-scatter plots werden mit dem Programm SigmaPlot für Windows (Version 8.0, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) durchgeführt.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Operationstechnik**

#### **3.1.1 Durchflussrate**

Der Pinzettendurchflusstest zeigte eine Durchgängigkeit von 100% bei allen operierten Ratten nach der Anastomose. Ein Gefäß bei den mit Vehikel (0,9% NaCl Lösung) behandelten Tieren war in der Anastomose thrombosiert.

#### **3.1.2 Effekt von VEGF auf die Überlebensrate**

Alle VEGF behandelten Tiere, die mikrochirurgisch operiert wurden haben die gesamte Beobachtungszeit von zehn Tagen überlebt.

In der mit Vehikel behandelten Gruppe starben zwei Tiere. Ein Tier verstarb am zweiten postoperativen Tag an Hypovolämie nach einer Blutung aus einem Defekt in der Anastomose, das andere Tier verstarb an einer Pneumonie am achten postoperativen Tag. Beide Todesfälle sind unabhängig von der Behandlung mit VEGF aufgetreten.

#### **3.1.3 VEGF verbessert die Reendothelialisierung (rET)**

Es zeigt sich eine verbesserte Reendothelialisierung fünf Tage nach der Behandlung mit VEGF im Vergleich zur mit Vehikel behandelten Gruppe.

In der Elektronenmikroskopie fand sich die vollständige rET und Heilung der mit VEGF behandelten Gefäße am zehnten postoperativen Tag (Abb. 12). Die mit Vehikel behandelten Gefäße weisen in der Elektronenmikroskopie eine Defektheilung auf, wie in Abbildung 12 zu sehen ist.

## 3.2 Morphologie

### 3.2.1 Transmissionselektronenmikroskopie

Die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen der femoralen Arterien zeigen in allen Gruppen eine normale Zellmorphologie. Die mit VEGF behandelten anastomosierten Arterien weisen keinen Defekt in der Basalmembran nach Abschluss der Heilung nach zehn Tagen auf. Die mit Vehikel behandelten anastomosierten Arterien zeigen eine deutliche Defektheilung in der Basalmembran.

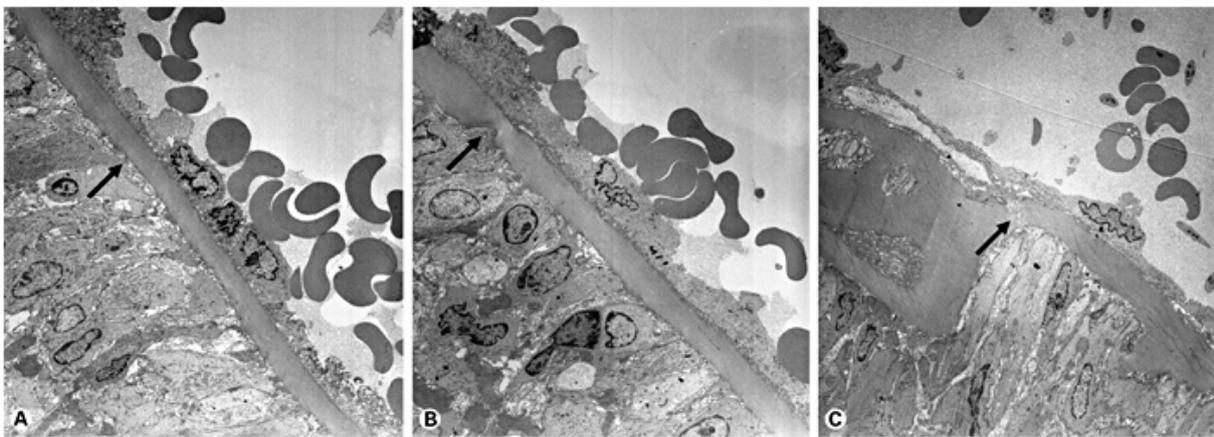


Abb. 12: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der Femoralarterie (Vergrößerung 1:4000)

- A: Kontrolle: Die unbehandelte Kontrollarterie weist eine normale Basalmembran auf (Pfeil).
- B: Anastomose mit VEGF: Die mit VEGF behandelte anastomosierte Arterie weist nach zehn Tagen einen verschlossenen Basalmembranedefekt (Pfeil) auf, die Heilung ist deutlich sichtbar und das rET ist klar nachweisbar.
- C: Anastomose mit Vehikel: Nach zehn Tagen zeigt sich eine deutliche Defektheilung. Die Basalmembran ist weiterhin offen (Pfeil).

### 3.2.2 Sirius-Rot-Färbung

Die Sirius-Rot-Färbung nach Junqueira et al. (1978) zeigt eine normale Gefäßmorphologie der Femoralarterien in allen untersuchten Gruppen.

Da Osteopontin die Kollagenorganisation beeinflusst, wurde auch die Expression von Kollagen in den Gefäßen mit und ohne Anastomose untersucht. Anhand der Sirius-Rot-Färbung kann ein klarer Anstieg von Kollagen Typ I im perivaskulären Bindegewebe (Abb. 14A) fünf Tage nach der Anastomosierung im Vergleich zur Kontrollgruppe (Gefäß ohne Anastomose) nachgewiesen werden (Abb. 13A, B).

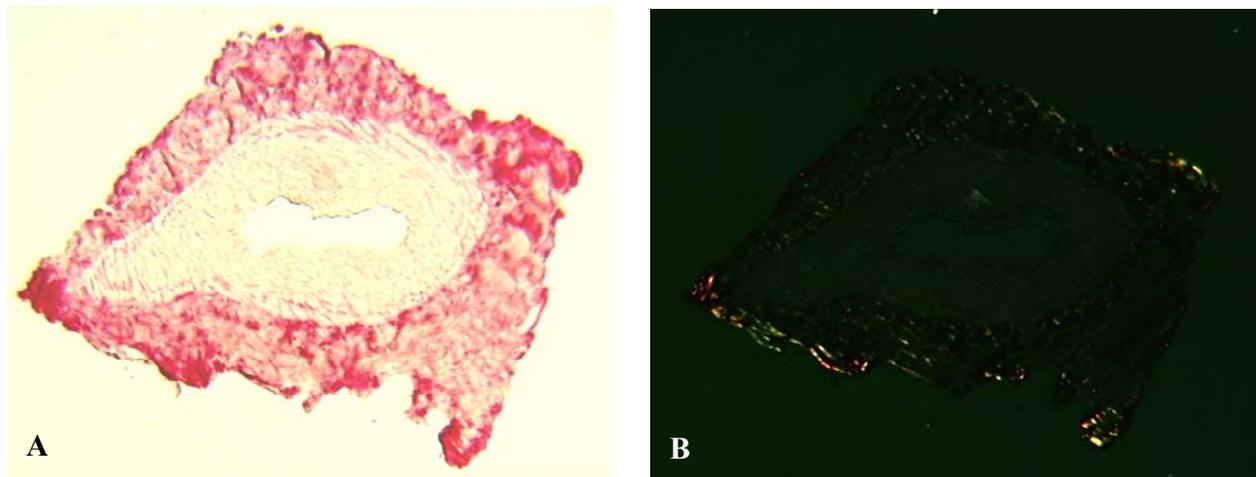


Abb. 13: Lichtmikroskopische Aufnahmen (LM) der Sirius-Rot-Färbung und polarisationsmikroskopische Aufnahmen (PM) fünf Tage nach der Anastomosierung

- A: LM: Kontrollgefäß ohne Anastomose mit Vehikel (NaCl-Lösung) behandelt
- B: PM: Kontrollgefäß ohne Anastomose mit Vehikel (NaCl-Lösung) behandelt

Durch die mikroskopische Aufnahme mit Polarisationslicht ist eine Differenzierung der Kollagentypen I und III möglich. Kollagen I besitzt unter polarisiertem Licht eine gelbe bis rötliche Färbung, während sich Kollagen Typ III mit grünlicher Färbung präsentiert.

Die Gabe von VEGF führt zu einem Anstieg von Kollagen Typ III in den Kontrollgefäßen (Abb. 14C, D) und einer extrem hohen Anhäufung in den anastomosierten Gefäßen (Abb. 14 E, F). Kollagen Typ I ist auch in den anastomosierten Gefäßen nachweisbar (gelbe, orange und rote Färbung).

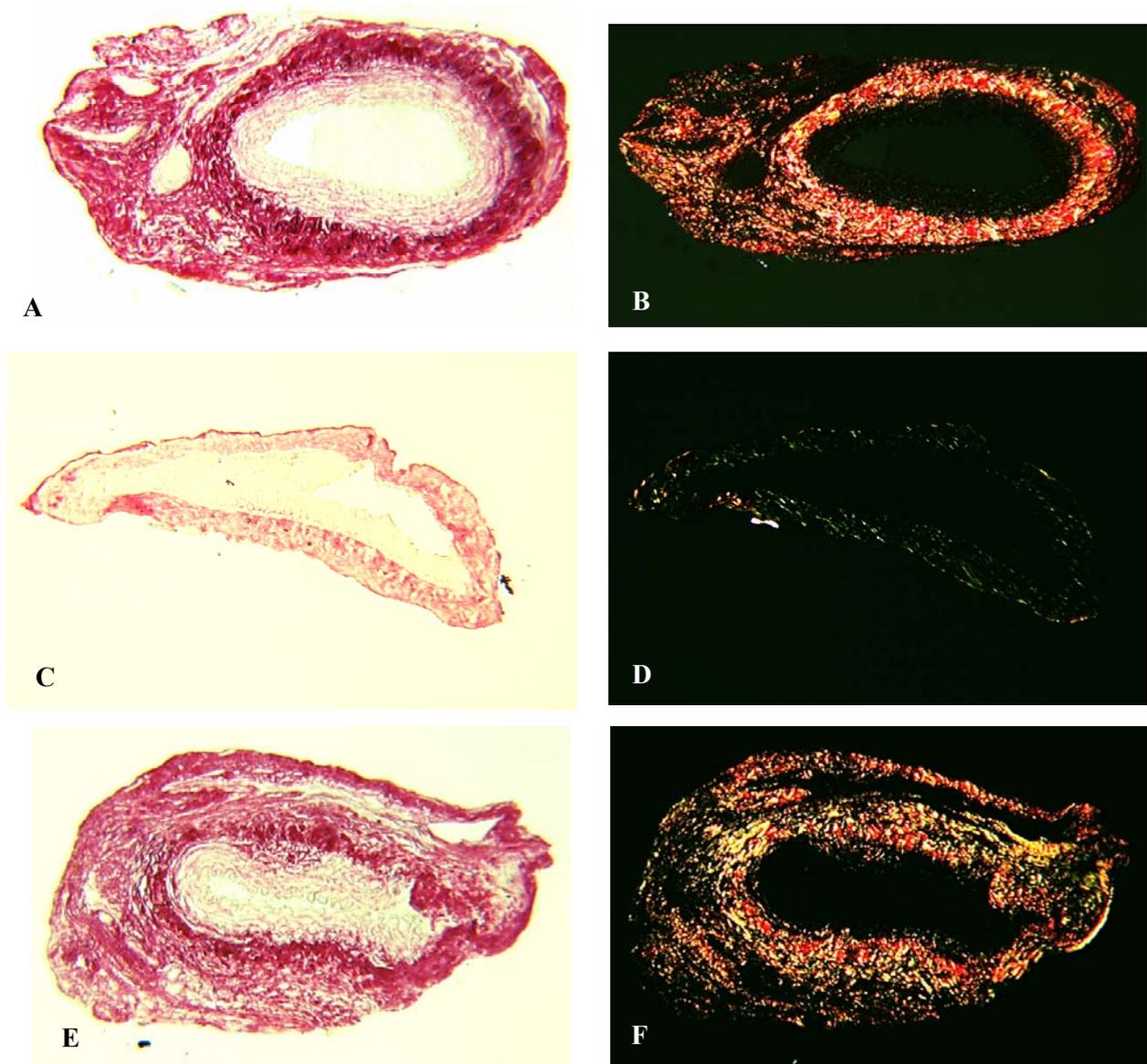


Abb. 14: Lichtmikroskopische Aufnahmen (LM) der Sirius-Rot-Färbung und polarisationsmikroskopische Aufnahmen (PM) fünf Tage nach der Anastomosierung

- A: LM: Gefäße nach Anastomosierung mit Vehikel (NaCl-Lösung) behandelt
- B: PM: Gefäße nach Anastomosierung mit Vehikel (NaCl-Lösung) behandelt
- C: LM: Kontrollgefäße ohne Anastomose mit VEGF behandelt
- D: PM: Kontrollgefäße ohne Anastomose mit VEGF behandelt
- E: LM: Gefäße nach Anastomosierung mit VEGF behandelt
- F: PM: Gefäße nach Anastomosierung mit VEGF behandelt

Die Procente der Mediafibrose zur Gefäßlumen Ratio ist in Abb. 15 dargestellt.

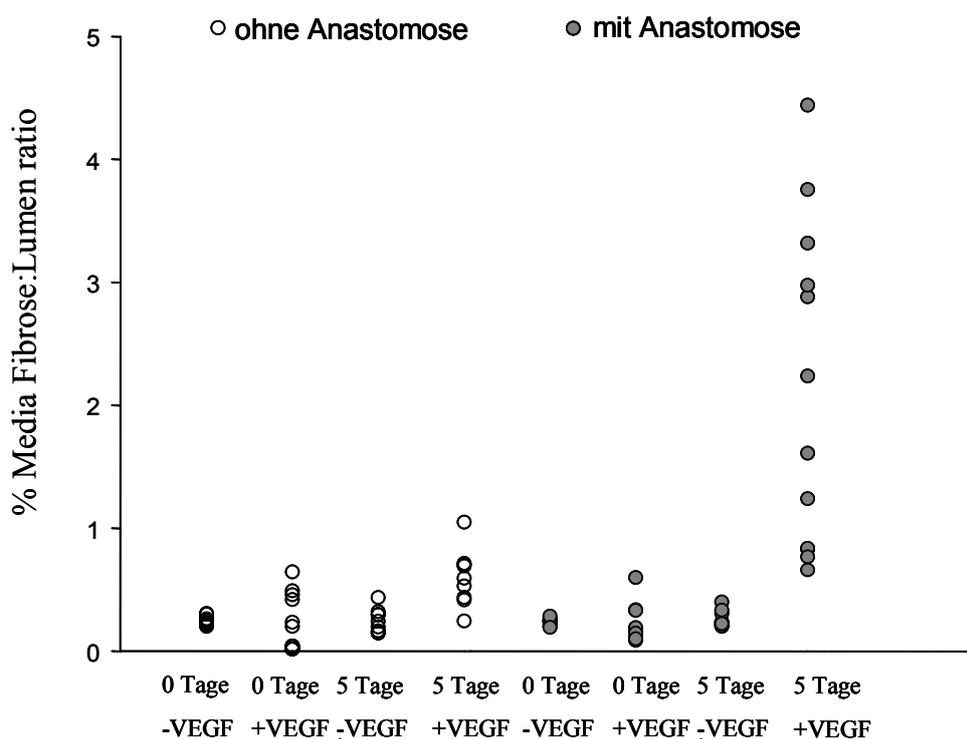


Abb. 15: Darstellung der prozentualen Verhältnisse der Mediafibrose zum Lumen nach Behandlung mit VEGF Vergleich Tag Null und fünf Tage ohne und mit einer Anastomosierung

	ohne Anastomose			mit Anastomose		
	0 Tag -VEGF	0 Tag +VEGF	5 Tag -VEGF	0 Tag -VEGF	0 Tag +VEGF	5 Tag -VEGF
0 Tag +VEGF	n.s.			n.s.		
5 Tag -VEGF	n.s.			n.s.		
5 Tag +VEGF	0,002	0,004	0,003	0,001	0,001	0,001

Tab. 5: Darstellung der statistischen Auswertung der Sirius Rot Färbung % Media Fibrose: Lumen Ratio. Der Signifikanzwert (p =); Signifikanz bei  $p < 0.05$

Am fünften Tag hat VEGF die Mediafibrose in den anastomosierten und den nicht anastomosierten Gefäßen signifikant erhöht. Die Media / Lumen Ratio (Verhältnis Media zum Lumen) ist klar in den mit VEGF anastomosierten Gefäßen erhöht (Abb. 16).

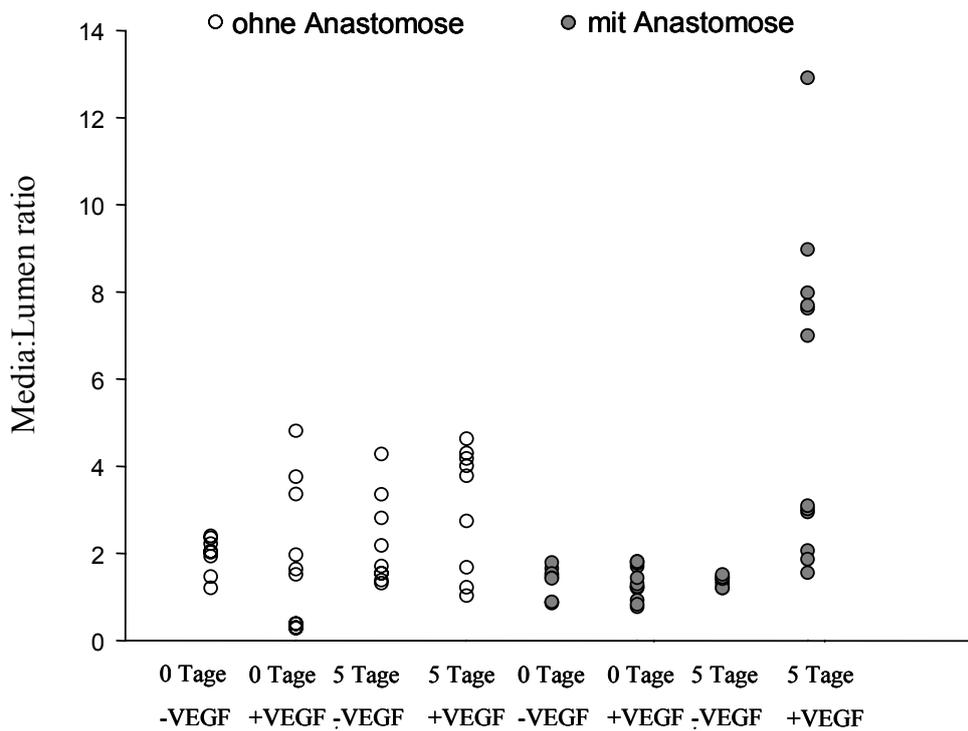


Abb.16: Darstellung der prozentualen Verhältnisse Media zu Lumen nach Behandlung mit VEGF. Vergleich zehn Minuten und fünf Tage ohne und mit einer Anastomosierung.

	ohne Anastomose			mit Anastomose		
	0 Tag -VEGF	0 Tag +VEGF	5 Tag -VEGF	0 Tag -VEGF	0 Tag +VEGF	5 Tag -VEGF
0 Tag +VEGF	n.s.			n.s.		
5 Tag -VEGF	n.s.			n.s.		
5 Tag +VEGF	n.s.	0,033	n.s.	0,001	0,001	0,001

Tab. 6: Darstellung der statistischen Auswertung der Sirius Rot Färbung Media : Lumen Ratio. Der Signifikanzwert ( $p =$ ); Signifikanz bei  $p < 0.05$

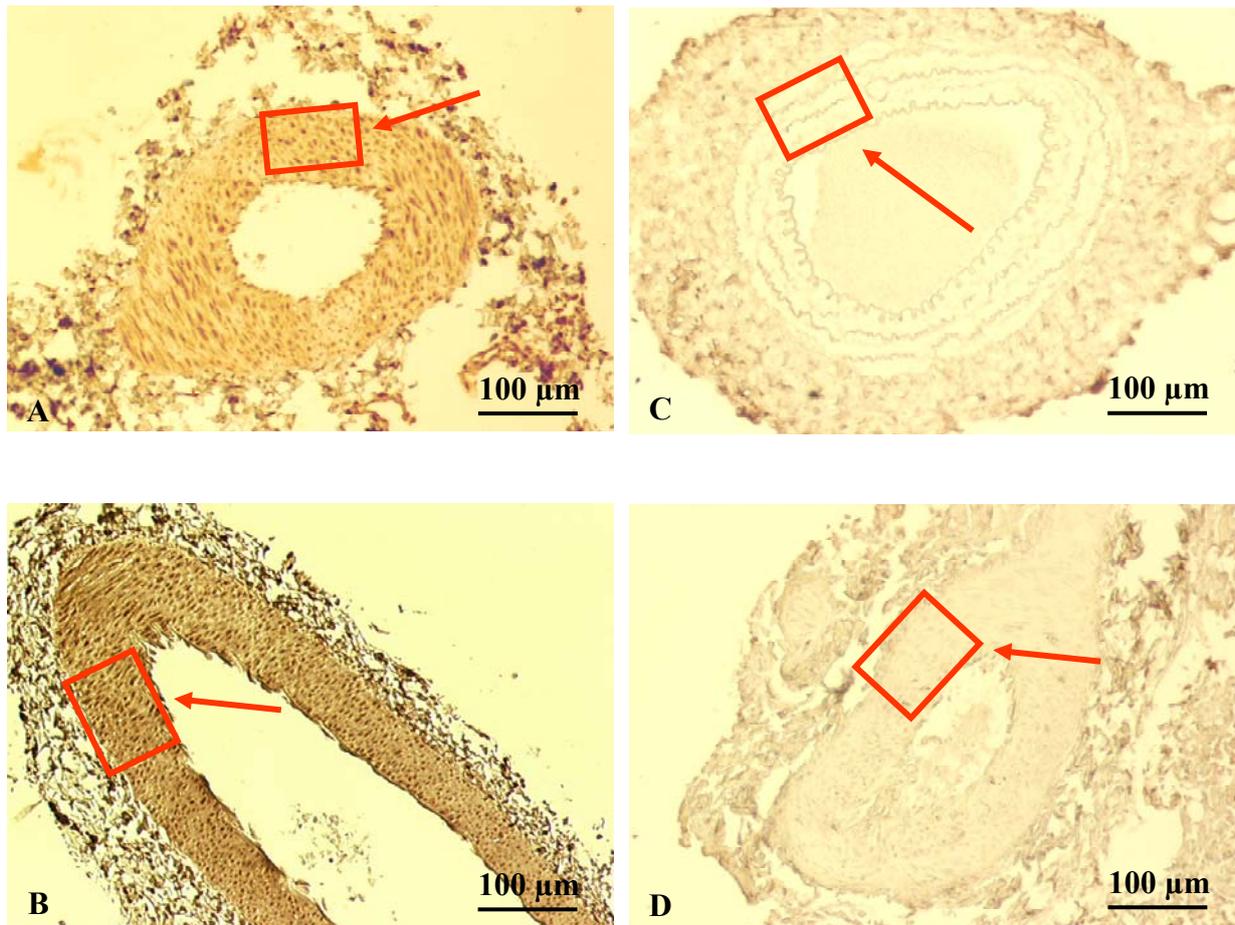


Abb. 17: Mikroskopische Aufnahmen der immunhistochemischen Färbung von Osteopontin

- A: Kontrollgefäße ohne Anastomose mit VEGF behandelt
- B: Gefäße nach Anastomosierung mit VEGF behandelt
- C: Kontrollgefäß ohne Anastomose mit Vehikel (NaCl-Lösung) behandelt
- D: Kontrollgefäß ohne Anastomose mit Vehikel (NaCl-Lösung) behandelt nach fünf Tagen

Die quantitative Bildanalyse zeigt einen klaren Anstieg von Osteopontin in den mit VEGF behandelten Gefäßen, sowohl mit als auch ohne Anastomose (Abb. 17).

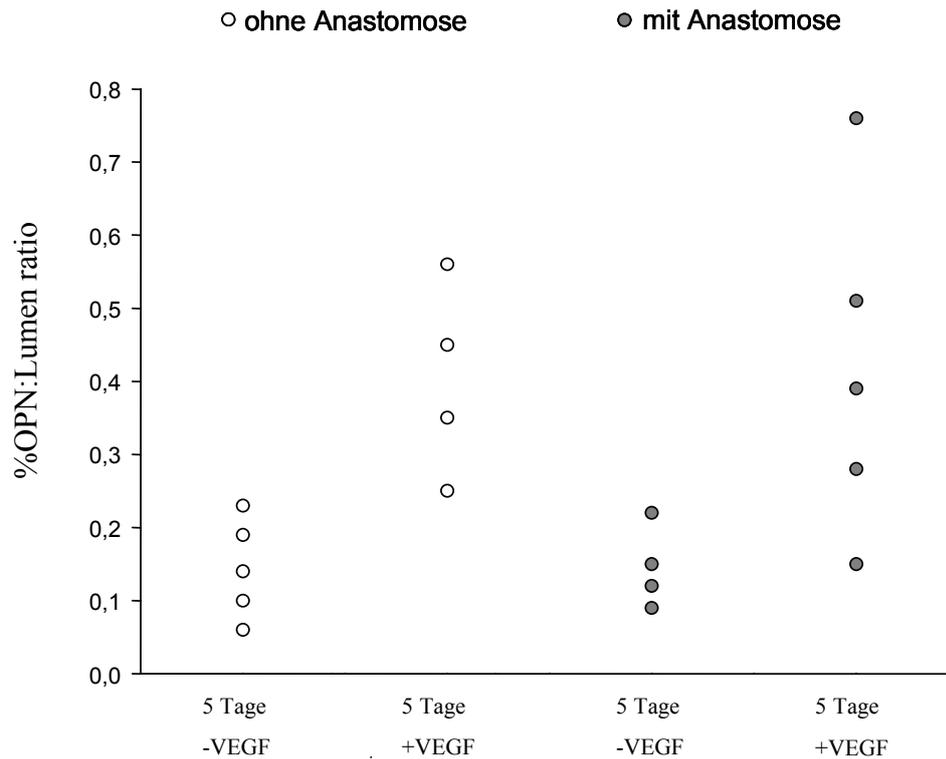


Abb. 19: Darstellung mittels der indirekten Immuno-Peroxidase Methode. Gezeigt wird das prozentuale Verhältnis Osteopontin zu Lumen im Vergleich fünf Tage ohne und mit Anastomosierung und mit und ohne VEGF Behandlung

	ohne Anastomose -VEGF	ohne Anastomose +VEGF	mit Anastomose -VEGF
ohne Anastomose +VEGF	0,014		
mit Anastomose -VEGF	n.s.	0,021	
mit Anastomose +VEGF	0,028	n.s.	0,05

Tab. 7: Darstellung der statistischen Auswertung der Osteopontin Färbung fünf Tage nach Behandlung. Der Signifikanzwert ( $p =$ ); Signifikanz bei  $p < 0,05$

### **3.3 VEGF-A**

#### **3.3.1 Semiquantitativer Nachweis der Proteinsynthese von VEGF-A mittels Western Blot Analyse**

Für den semiquantitativen Nachweis der Proteinsynthese von VEGF-A mittels Western Blot Analyse werden je Gruppe  $n = 4$  femorale Arterien untersucht.

Die Western Blot Analyse der Proteinsynthese von VEGF-A zeigt eine signifikante Reduzierung in der anastomosierten Kontrollgruppe im Vergleich zur nicht behandelten Kontrollgruppe am Tag Null. In der anastomosierten Gruppe ist ein deutlicher Anstieg vom VEGF-A Protein in der mit VEGF behandelten Gruppe im Vergleich zur Vehikel behandelten Gruppe, sowohl am Tag Null als auch am Tag zehn nach Behandlung. Ebenso zeigt sich ein signifikanter Anstieg des Proteins zwischen den beiden VEGF behandelten Gruppen. (Tag Null gegen Tag zehn). Die maximale VEGF-A Proteinmenge konnte zehn Tage nach VEGF Gabe und Operation detektiert werden.

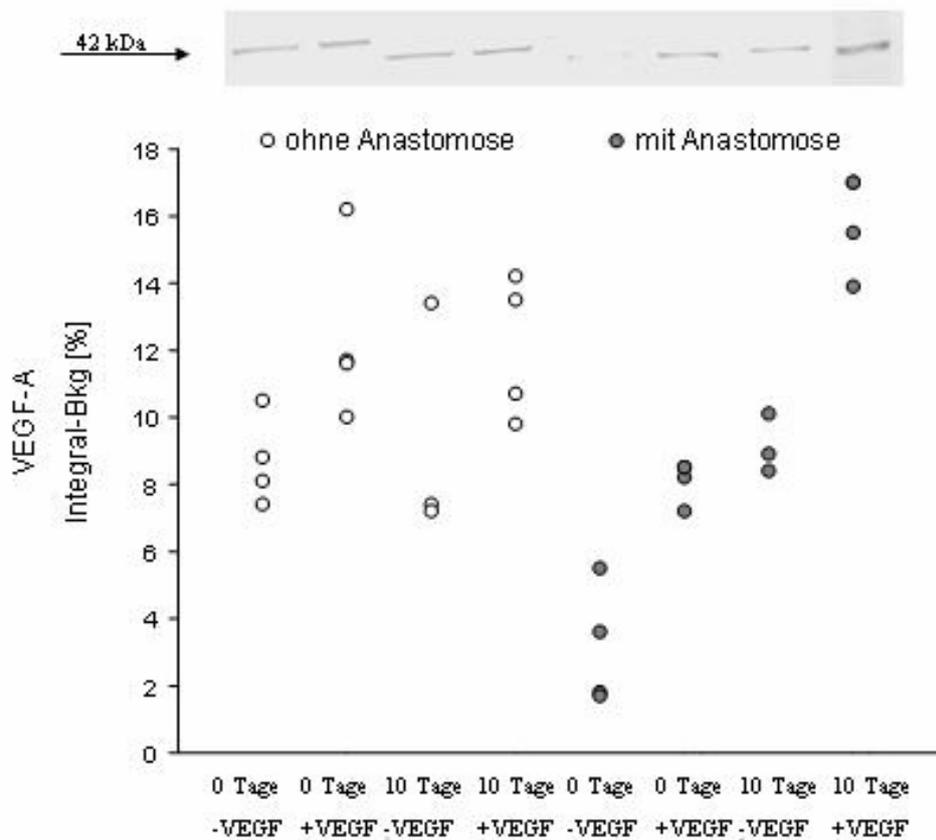


Abb. 19: Graphische Darstellung der Western Blot Analyse von VEGF-A. Einzelwerte der Densitometrie und Abbildung eines Beispielblots (n = 4)

		ohne Anastomose				mit Anastomose			
		0 Tage -VEGF	0 Tage +VEGF	10 Tage -VEGF	10 Tage +VEGF	0 Tage -VEGF	0 Tage +VEGF	10 Tage -VEGF	10 Tage +VEGF
- A n a s t	0 Tage -VEGF		0,043		0,043	0,021			0,020
	0 Tage +VEGF	0,043				0,021	0,020		
	10 Tage -VEGF					0,034			0,032
	10 Tage +VEGF	0,043				0,021	0,020		0,042
+ A n a s t	0 Tage -VEGF	0,021	0,021	0,034	0,021		0,020	0,034	0,020
	0 Tage +VEGF		0,020		0,020	0,020			0,019
	10 Tage -VEGF					0,034			0,032
	10 Tage +VEGF	0,020		0,032	0,042	0,020	0,019	0,032	

Tab. 8: Darstellung der statistischen Auswertung der Western Blot Analyse von VEGF-A. Angabe der Signifikanzwerte ( $p =$ ); Signifikanz bei  $p < 0,05$ .

### 3.4 flk-1

#### 3.4.1 Semiquantitativer Nachweis der Proteinsynthese von flk-1 mittels Western Blot Analyse

Für den semiquantitativen Nachweis der Proteinsynthese von flk-1 mittels Western Blot Analyse werden je Gruppe n = 4 Femoralarterien untersucht.

Die Western Blot Analyse der Proteinsynthese von flk-1 ergab eine signifikante Reduktion in der anastomosierten Kontrollgruppe im Vergleich zur nicht behandelten Kontrollgruppe am Tag Null. Es zeigten sich signifikante Erhöhungen von flk-1 Protein in der anastomosierten Gruppe in allen Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

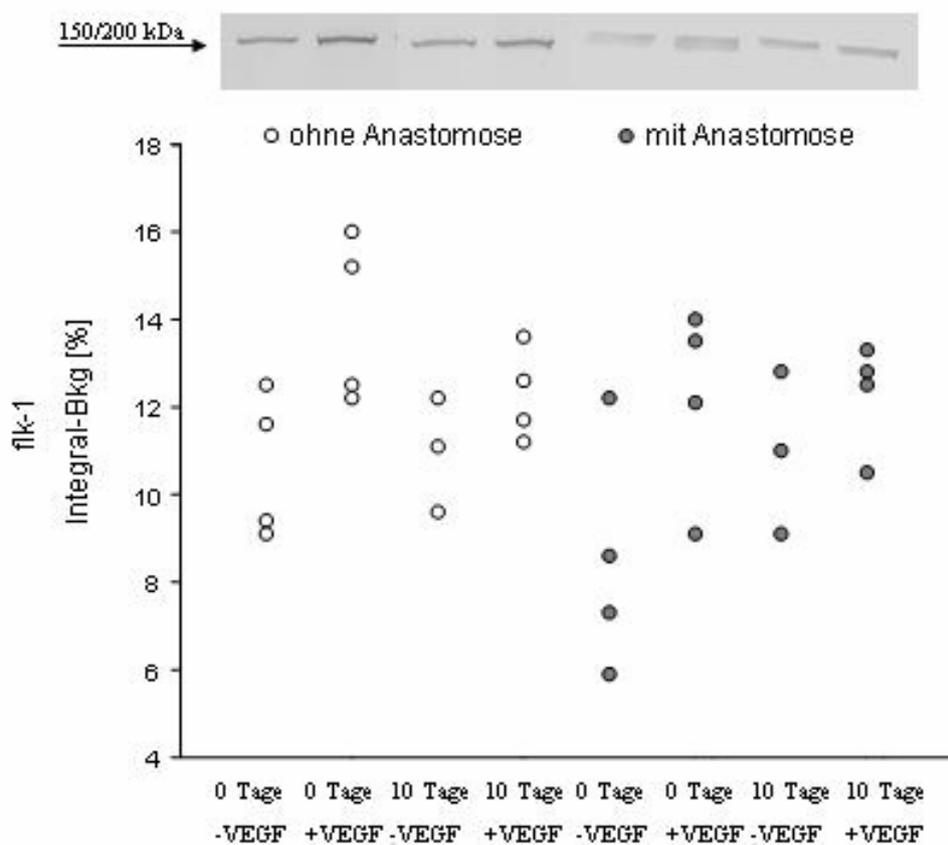


Abb. 20: Graphische Darstellung der Western Blot Analyse von flk-1. Einzelwerte der Densitometrie und Abbildung eines Beispielblots (n = 4)

		ohne Anastomose				mit Anastomose			
		0 Tage -VEGF	0 Tage +VEGF	10 Tage -VEGF	10 Tage +VEGF	0 Tage -VEGF	0 Tage +VEGF	10 Tage -VEGF	10 Tage +VEGF
- A n a s t	0 Tage -VEGF								
	0 Tage +VEGF			0,050		0,029			
	10 Tage -VEGF		0,050						
	10 Tage +VEGF								
+ A n a s t	0 Tage -VEGF		0,029						0,043
	0 Tage +VEGF								
	10 Tage -VEGF								
	10 Tage +VEGF					0,043			

Tab. 9: Darstellung der statistischen Auswertung der Western Blot Analyse von flk-1.  
Angabe der Signifikanzwerte ( $p =$ ); Signifikanz bei  $p > 0,05$ .

### 3.5 TGF- $\beta_1$

#### 3.5.1 Semiquantitativer Nachweis der Proteinsynthese von TGF- $\beta_1$ mittels Western Blot Analyse

Für den semiquantitativen Nachweis der Proteinsynthese von TGF- $\beta_1$  mittels Western Blot Analyse werden je Gruppe n = 4 Femoralarterien untersucht.

Die Western Blot Analyse der Proteinsynthese von TGF- $\beta_1$  zeigte eine signifikante Erhöhung der jeweils mit VEGF behandelten Gruppen im Vergleich zur mit Vehikel behandelten Gruppe. Dies gilt sowohl für die Gruppen mit und ohne Anastomose. Zusätzlich konnte ein signifikanter Anstieg innerhalb der anastomosierten Gruppe von Tag Null zu Tag zehn (mit und ohne VEGF Behandlung) nachgewiesen werden. Die maximale TGF- $\beta_1$  Proteinmenge konnte zehn Tage nach VEGF Gabe und Operation detektiert werden.

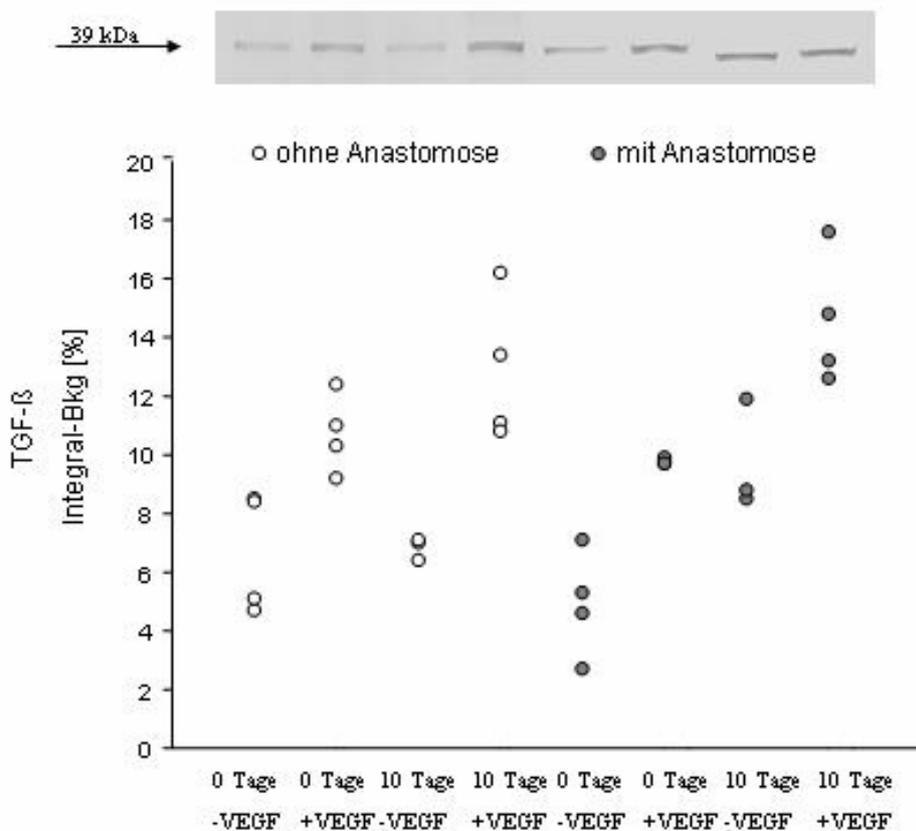


Abb. 21: Graphische Darstellung der Western Blot Analyse von TGF- $\beta_1$  Einzelwerte der Densitometrie und Abbildung eines Beispielblots (n = 4)

		ohne Anastomose				mit Anastomose			
		0 Tage -VEGF	0 Tage +VEGF	10 Tage -VEGF	10 Tage +VEGF	0 Tage -VEGF	0 Tage +VEGF	10 Tage -VEGF	10 Tage +VEGF
- A n a s t	0 Tage -VEGF		0,021		0,021		0,020	0,05	0,021
	0 Tage +VEGF	0,021		0,034		0,021			0,021
	10 Tage -VEGF		0,034		0,034		0,032	0,050	0,034
	10 Tage +VEGF	0,021		0,034		0,021	0,020		
+ A n a s t	0 Tage -VEGF		0,021		0,021		0,020	0,034	0,021
	0 Tage +VEGF	0,020		0,032	0,020	0,020			0,020
	10 Tage -VEGF	0,05		0,050		0,034			0,034
	10 Tage +VEGF	0,021	0,021	0,034		0,021	0,020	0,034	

Tab. 10: Darstellung der statistischen Auswertung der Western Blot Analyse von TGF- $\beta_1$ .  
Angabe der Signifikanzwerte (p =); Signifikanz bei  $p < 0,05$ .

## 3.6 Osteopontin

### 3.6.1 Immunhistochemische Färbung von Osteopontin

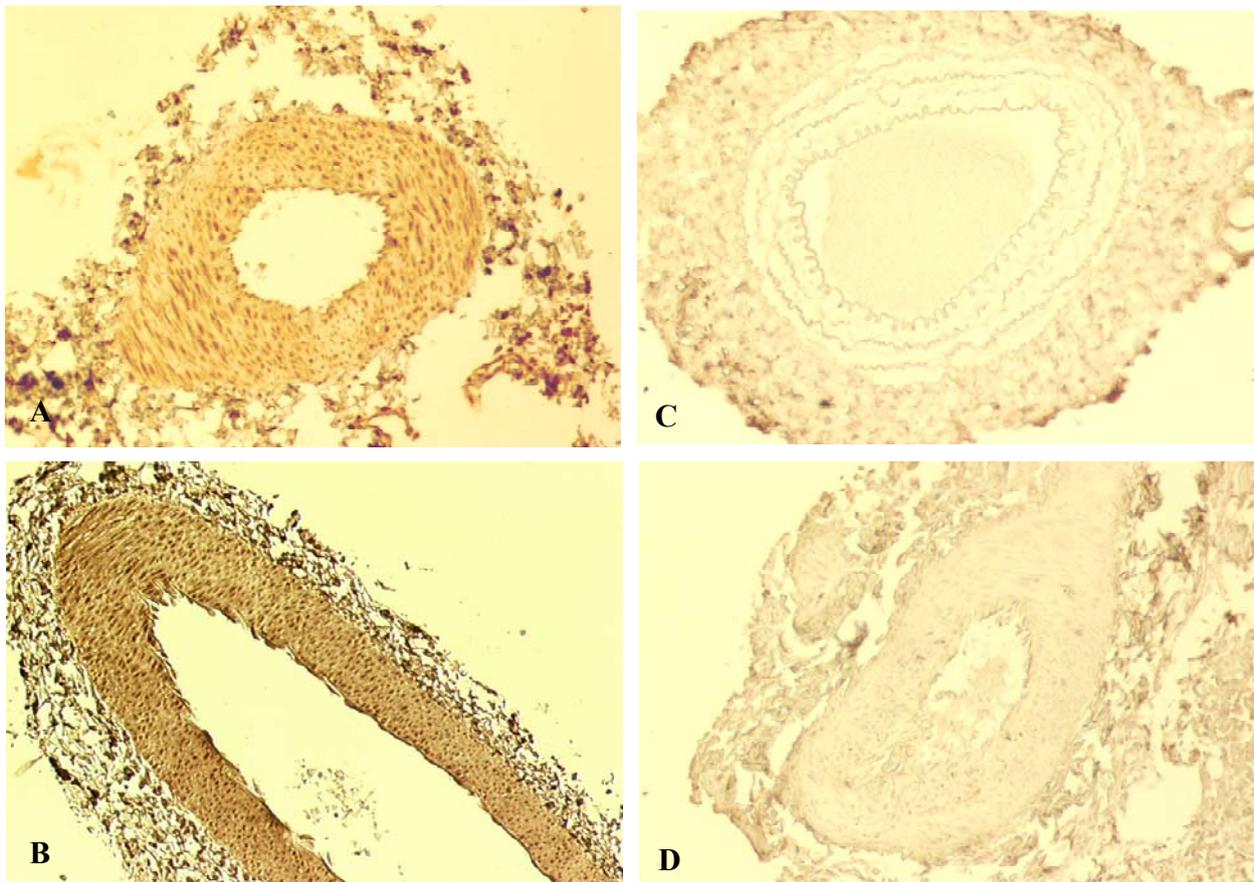


Abb. 22: Mikroskopische Aufnahme der immunhistochemischen Färbung Osteopontin

- A: Kontrollgefäße ohne Anastomose mit VEGF behandelt
- B: Gefäße nach Anastomosierung mit VEGF behandelt
- C: Kontrollgefäß ohne Anastomose mit Vehikel (NaCl-Lösung) behandelt
- D: Kontrollgefäß ohne Anastomose mit Vehikel (NaCl-Lösung) behandelt nach fünf Tagen

Die quantitative Bildanalyse zeigt in der Abbildung 22 einen klaren Anstieg von Osteopontin in den mit VEGF behandelten Gefäßen, sowohl mit als auch ohne Anastomose.

### 3.6.2 Semiquantitativer Nachweis der Proteinsynthese von Osteopontin mittels Western Blot Analyse

Für den semiquantitativen Nachweis der Proteinsynthese von Osteopontin mittels Western Blot Analyse werden je Gruppe n = 4 Femoralarterien untersucht.

Die Western Blot Analyse der Proteinsynthese von Osteopontin zeigt eine signifikante Erhöhung der jeweils mit VEGF behandelten Gruppen im Vergleich zur mit Vehikel behandelten Gruppe. Dies gilt sowohl für die Gruppen mit und ohne Anastomose. Zusätzlich konnte ein signifikanter Anstieg innerhalb der anastomosierten Gruppe von Tag Null zu Tag zehn nachgewiesen werden (sowohl mit als auch ohne VEGF Behandlung). Die maximale Osteopontinproteinmenge konnte zehn Tage nach VEGF Gabe und Operation detektiert werden.

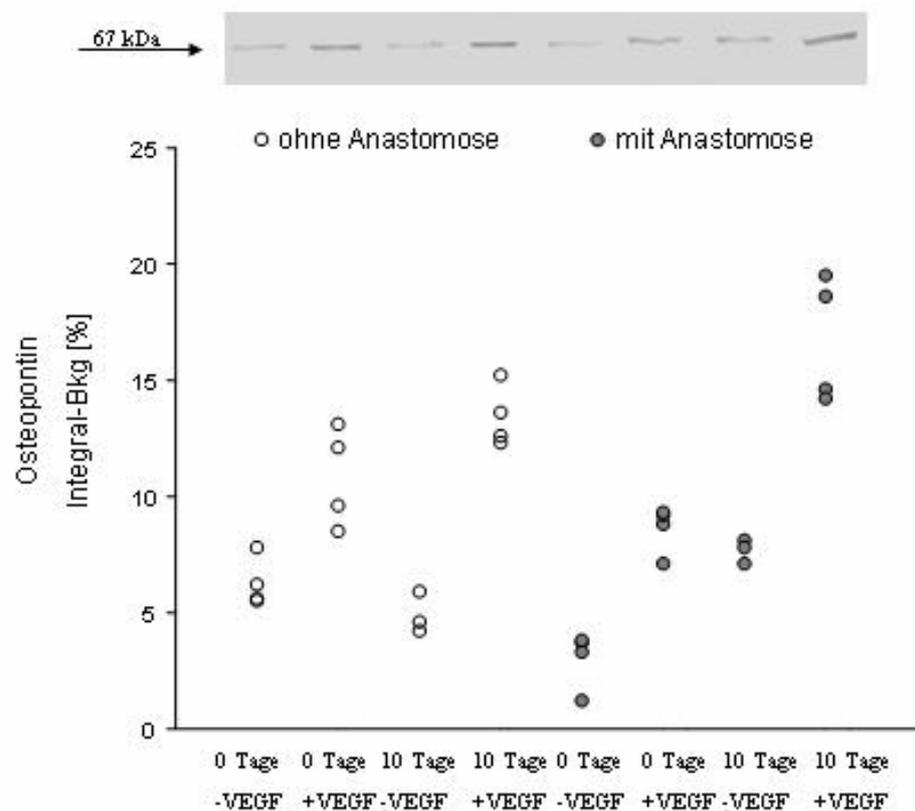


Abb. 23: Graphische Darstellung der Western Blot Analyse von Osteopontin. Einzelwerte der Densitometrie und Abbildung eines Beispielblots (n = 4)

		ohne Anastomose				mit Anastomose			
		0 Tage -VEGF	0 Tage +VEGF	10 Tage -VEGF	10 Tage +VEGF	0 Tage -VEGF	0 Tage +VEGF	10 Tage -VEGF	10 Tage +VEGF
- Anast	0 Tage -VEGF		0,021		0,021	0,021	0,043		0,021
	0 Tage +VEGF	0,021		0,034		0,021		0,034	0,021
	10 Tage -VEGF		0,034		0,034	0,034	0,034	0,05	0,034
	10 Tage +VEGF	0,021		0,034		0,021	0,021	0,034	
+ Anast	0 Tage -VEGF	0,021	0,021	0,034	0,021		0,021	0,034	0,021
	0 Tage +VEGF	0,043		0,034	0,021	0,021			0,021
	10 Tage -VEGF		0,034	0,050	0,034	0,034			0,034
	10 Tage +VEGF	0,021	0,021	0,034		0,021	0,021	0,034	

Tab. 11: Darstellung der statistischen Auswertung der Western Blot Analyse von Osteopontin.  
Angabe der Signifikanzwerte (p = ); Signifikanz bei  $p < 0,05$ .

## 3.7 Kollagen Typ I

### 3.7.1 Immunhistochemische Färbung von Kollagen Typ I

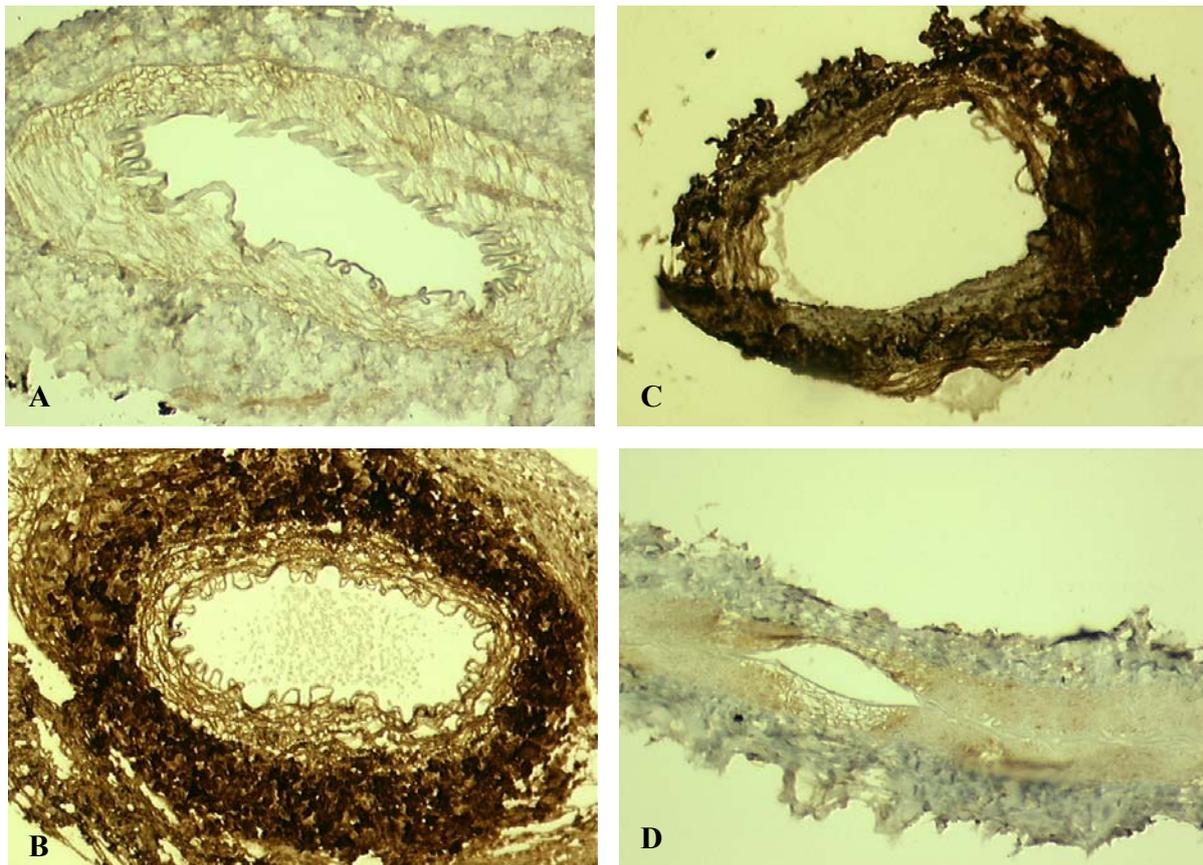


Abb. 24: Mikroskopische Aufnahme der immunhistochemischen Färbung Kollagen Typ I

- A: Kontrollgefäß ohne Anastomose mit Vehikel (0,9% NaCl-Lösung) behandelt
- B: Gefäß nach Anastomosierung und VEGF Behandlung
- C: Gefäß nach Anastomosierung und Vehikel (0,9% NaCl-Lösung) behandelt
- D: Gefäß ohne Anastomosierung und VEGF Behandlung

Die mit VEGF behandelten Gefäße zeigen eine deutliche positive Färbung des Kollagen Typ I im Vergleich zu den mit Vehikel behandelten Gefäßen.

### 3.7.2 Semiquantitativer Nachweis der Proteinsynthese von Kollagen Typ I mittels Western Blot Analyse

Für den semiquantitativen Nachweis der Proteinsynthese von Kollagen Typ I mittels Western Blot Analyse werden je Gruppe n = 4 Femoralarterien untersucht.

Die Western Blot Analyse der Proteinsynthese von Kollagen Typ I zeigt eine signifikante Erhöhung innerhalb der nicht anastomosierten Gruppen (Tag Null und Tag zehn) der Vehikel zur VEGF behandelten Gruppen. Auch in der anastomosierten Gruppe konnte gezeigt werden, dass zehn Tage nach Behandlung mit VEGF eine signifikante Erhöhung im Vergleich zur Vehikel behandelten Gruppe auftritt.

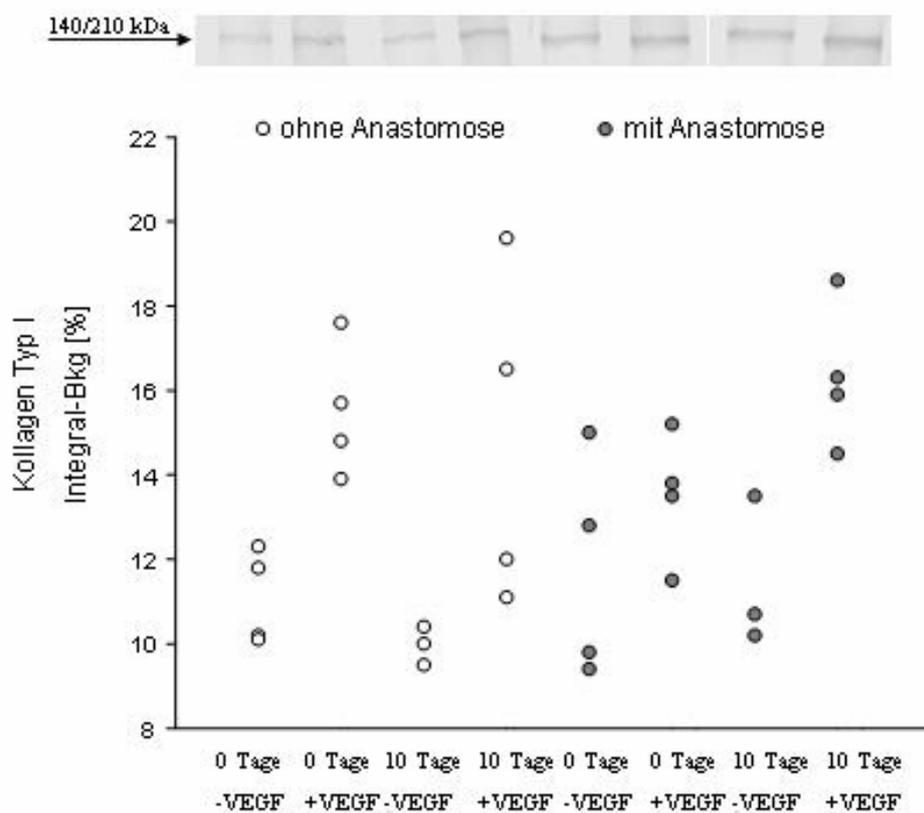


Abb. 25: Graphische Darstellung der Western Blot Analyse von Kollagen Typ I. Einzelwerte der Densitometrie und Abbildung eines Beispielblots (n = 4)

		ohne Anastomose				mit Anastomose			
		0 Tage -VEGF	0 Tage +VEGF	10 Tage -VEGF	10 Tage +VEGF	0 Tage -VEGF	0 Tage +VEGF	10 Tage -VEGF	10 Tage +VEGF
- Anast	0 Tage -VEGF		0,021						0,021
	0 Tage +VEGF	0,021		0,034				0,034	0,021
	10 Tage -VEGF		0,034		0,034		0,034		0,034
	10 Tage +VEGF			0,034					
+ Anast	0 Tage -VEGF								0,043
	0 Tage +VEGF			0,034					0,043
	10 Tage -VEGF		0,034						0,034
	10 Tage +VEGF	0,021		0,034		0,043	0,043	0,034	

Tab. 12: Darstellung der statistischen Auswertung der Western Blot Analyse von Kollagen Typ I.  
Angabe der Signifikanzwerte ( $p =$ ); Signifikanz bei  $p < 0,05$ .

## 3.8 Kollagen Typ III

### 3.8.1 Semiquantitativer Nachweis der Proteinsynthese von Kollagen Typ III mittels Western Blot Analyse

Für den semiquantitativen Nachweis der Proteinsynthese von Kollagen Typ III mittels Western Blot Analyse werden je Gruppe n = 4 Femoralarterien untersucht.

Die Western Blot Analyse der Proteinsynthese von Kollagen Typ III zeigt sowohl zehn Tage ohne als auch mit Anastomose einen signifikanten Anstieg der VEGF Gruppen zu den Vehikel behandelten Gruppen. Ebenso zeigt sich eine signifikante Erhöhung in der anastomosierten Gruppe zwischen Null Tagen und zehn Tagen nach VEGF Behandlung. Die maximale Kollagen Typ III Proteinmenge konnte zehn Tage nach VEGF Gabe und Operation detektiert werden.

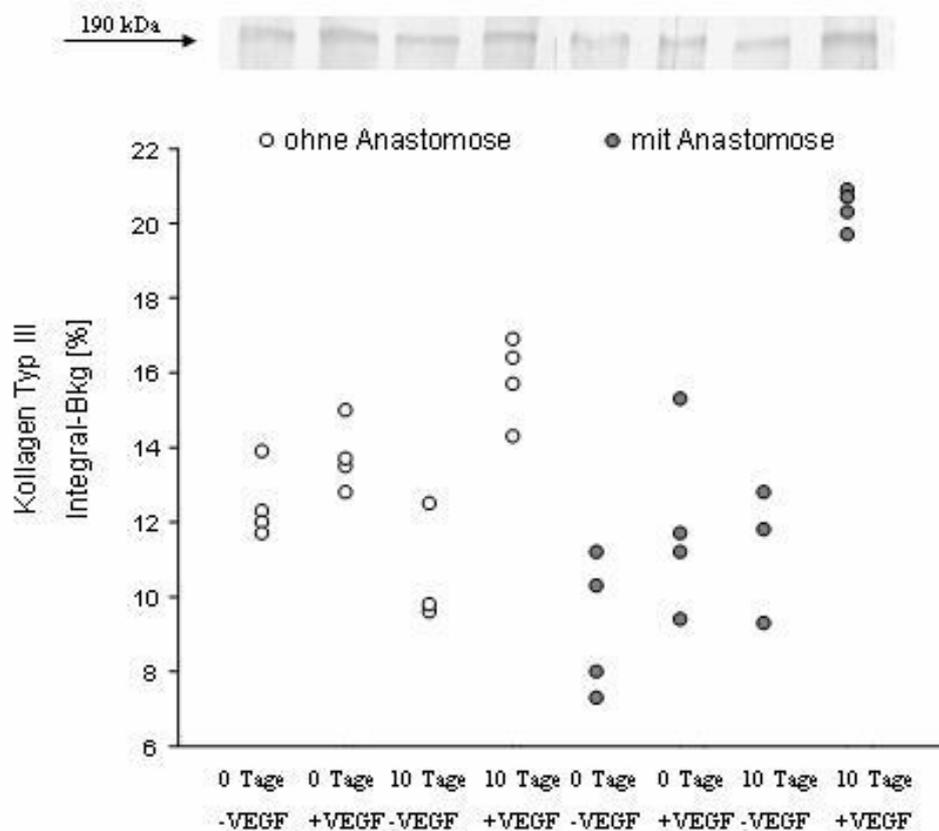


Abb. 26: Graphische Darstellung der Western Blot Analyse von Kollagen Typ III. Einzelwerte der Densitometrie und Abbildung eines Beispielblots (n = 4)

		ohne Anastomose				mit Anastomose			
		0 Tage -VEGF	0 Tage +VEGF	10 Tage -VEGF	10 Tage +VEGF	0 Tage -VEGF	0 Tage +VEGF	10 Tage -VEGF	10 Tage +VEGF
- A n a s t	0 Tage -VEGF				0,021	0,021		0,034	0,021
	0 Tage +VEGF			0,034	0,043	0,021		0,050	0,021
	10 Tage -VEGF		0,034		0,034				0,034
	10 Tage +VEGF	0,021	0,043	0,034		0,021	0,043	0,043	0,021
+ A n a s t	0 Tage -VEGF	0,021	0,021		0,021				0,021
	0 Tage +VEGF				0,043				0,021
	10 Tage -VEGF	0,034	0,050		0,043				0,034
	10 Tage +VEGF	0,021	0,021	0,034	0,021	0,021	0,021	0,034	

Tab. 13: Darstellung der statistischen Auswertung der Western Blot Analyse von Kollagen Typ III.  
Angabe der Signifikanzwerte (p = ); Signifikanz bei  $p < 0,05$ .

### 3.9 Kollagen Typ IV

#### 3.9.1 Semiquantitativer Nachweis der Proteinsynthese von Kollagen Typ IV mittels Western Blot Analyse

Für den semiquantitativen Nachweis der Proteinsynthese von Kollagen Typ IV mittels Western Blot Analyse werden je Gruppe n = 4 Femoralarterien untersucht.

Die Western Blot Analyse der Proteinsynthese von Kollagen Typ IV zeigt nur eine leichte Erhöhung aller VEGF behandelten Gruppen untereinander. Die maximale Kollagen Typ IV Proteinmenge konnte zehn Tage nach VEGF Gabe und Operation detektiert werden.

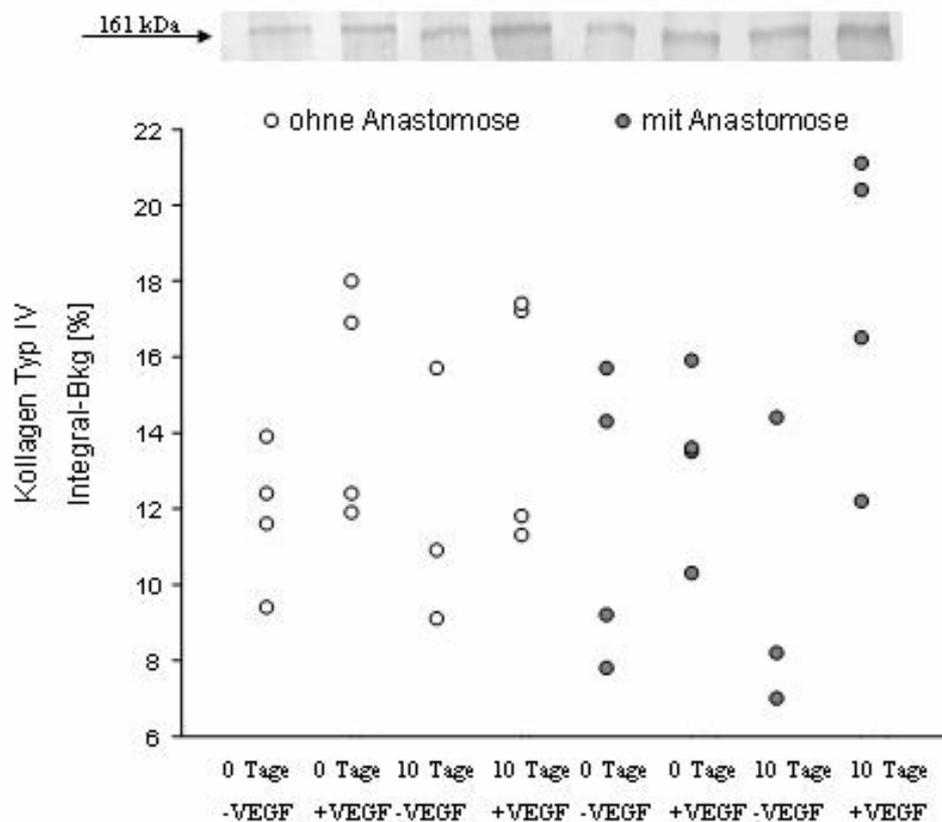


Abb. 27: Graphische Darstellung der Western Blot Analyse von Kollagen Typ IV. Einzelwerte der Densitometrie und Abbildung eines Beispielblots (n = 4)

## 3.10 Fibronektin

### 3.10.1 Immunhistochemische Färbung von Fibronektin

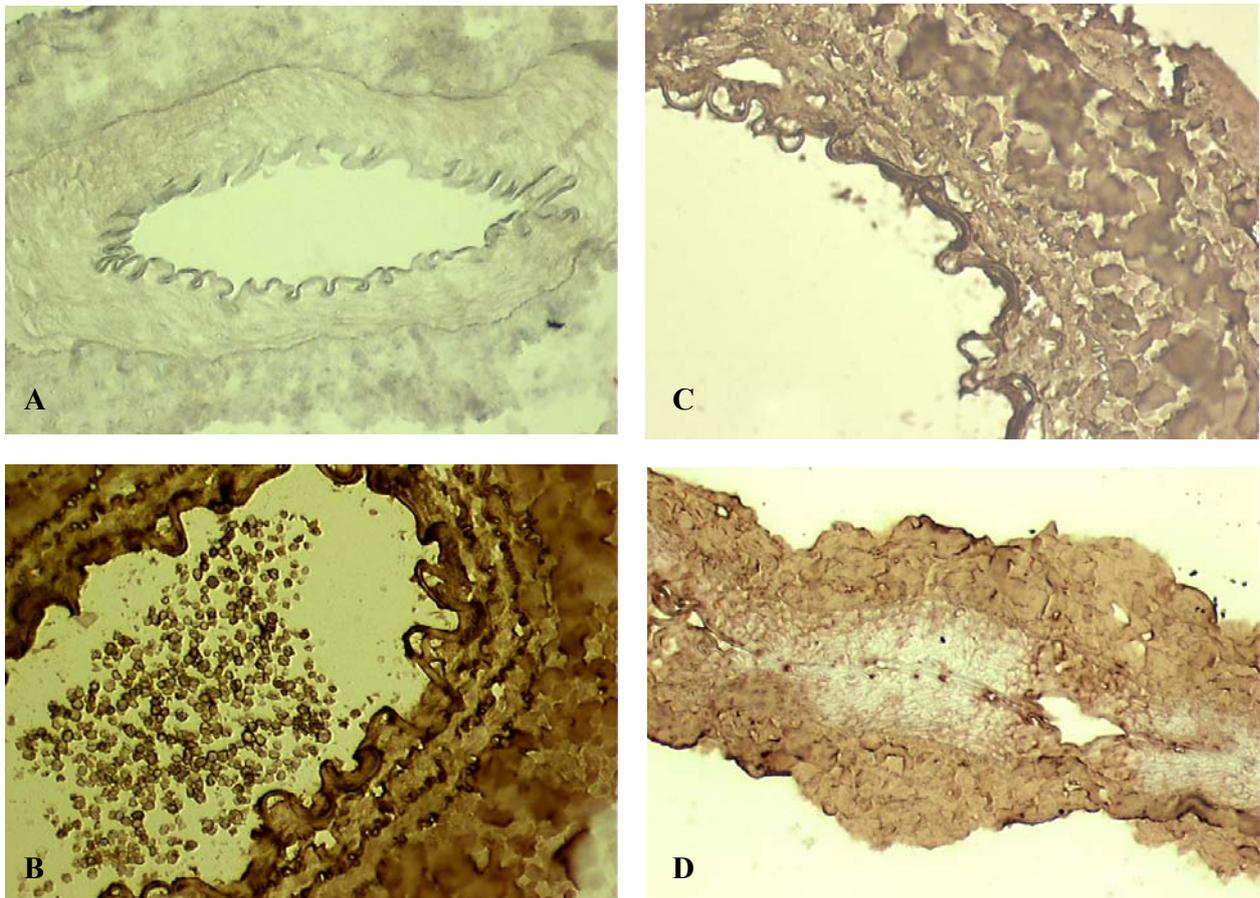


Abb. 28: Mikroskopische Aufnahme der immunhistochemischen Färbung Fibronektin

- A: Kontrollgefäß ohne Anastomose mit Vehikel (0,9% NaCl-Lösung) behandelt
- B: Gefäß nach Anastomosierung und VEGF Behandlung
- C: Gefäß nach Anastomosierung und Vehikel (0,9% NaCl-Lösung) behandelt
- D: Gefäß ohne Anastomosierung und VEGF Behandlung

Anhand der mikroskopischen Aufnahmen lässt sich deutlich eine Zunahme des Fibronektin Proteins nach Anastomosierung und VEGF Behandlung erkennen.

### 3.10.2 Semiquantitativer Nachweis der Proteinsynthese von Fibronektin mittels Western Blot Analyse

Für den semiquantitativen Nachweis der Proteinsynthese von Fibronektin mittels Western Blot Analyse werden je Gruppe n = 4 Femoralarterien untersucht.

Die Western Blot Analyse der Proteinsynthese von Fibronektin zeigt in der nicht anastomosierten Gruppe keine signifikanten Veränderungen. Lediglich kann ein geringer Anstieg der VEGF behandelten Gruppen beobachtet werden. Bei der anastomosierten Gruppe kann ein signifikanter Anstieg des Fibronektin Proteins sowohl am Tag Null als auch zehn Tage nach VEGF Behandlung im Vergleich zur jeweiligen Vehikel behandelten Gruppe gezeigt werden. Die maximale Fibronektin Proteinmenge konnte zehn Tage nach VEGF Gabe und Operation detektiert werden.

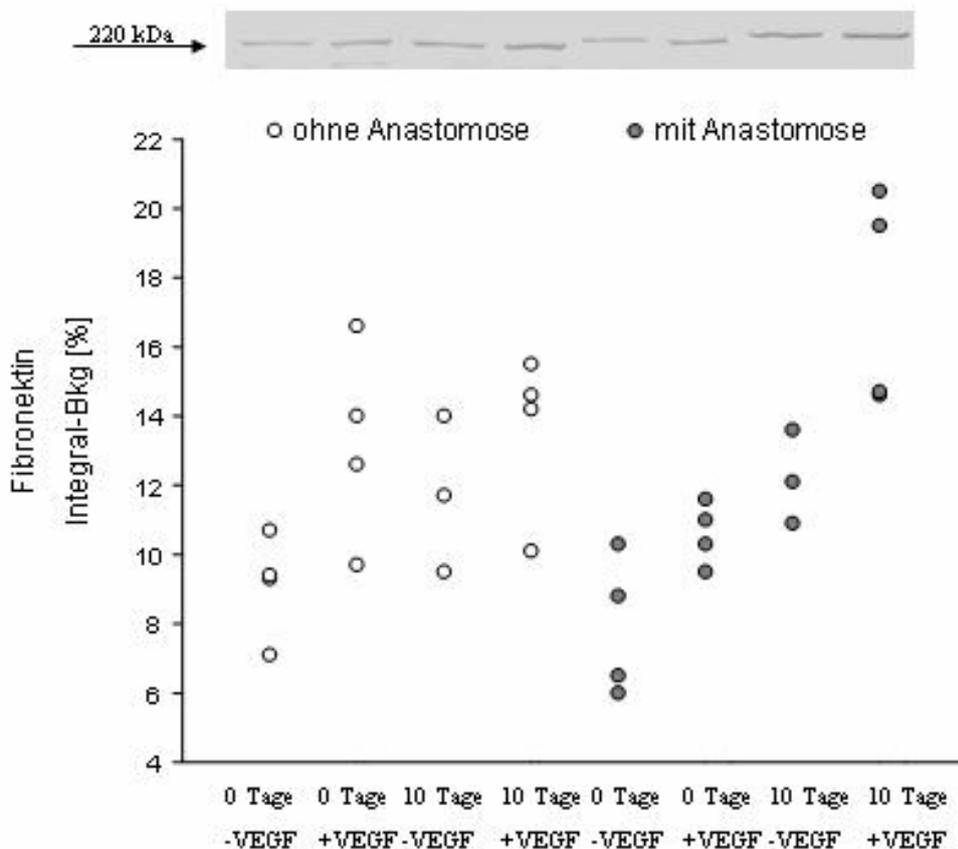


Abb. 29: Graphische Darstellung der Western Blot Analyse von Fibronektin. Einzelwerte der Densitometrie und Abbildung eines Beispielblots (n = 4)

		ohne Anastomose				mit Anastomose.			
		0 Tage -VEGF	0 Tage +VEGF	10 Tage -VEGF	10 Tage +VEGF	0 Tage -VEGF	0 Tage +VEGF	10 Tage -VEGF	10 Tage +VEGF
- Anast	0 Tage -VEGF		0,043		0,043			0,034	0,021
	0 Tage +VEGF	0,043				0,043			
	10 Tage -VEGF								0,034
	10 Tage +VEGF	0,043				0,043			
+ Anast	0 Tage -VEGF		0,043		0,043			0,034	0,021
	0 Tage +VEGF								0,021
	10 Tage -VEGF	0,034				0,034			0,034
	10 Tage +VEGF	0,021		0,034		0,021	0,021	0,034	

Tab. 14: Darstellung der statistischen Auswertung der Western Blot Analyse von Fibronektin.  
Angabe der Signifikanzwerte ( $p =$ ); Signifikanz bei  $p < 0,05$ .

## 3.11 Laminin

### 3.11.1 Immunhistochemische Färbung von Laminin

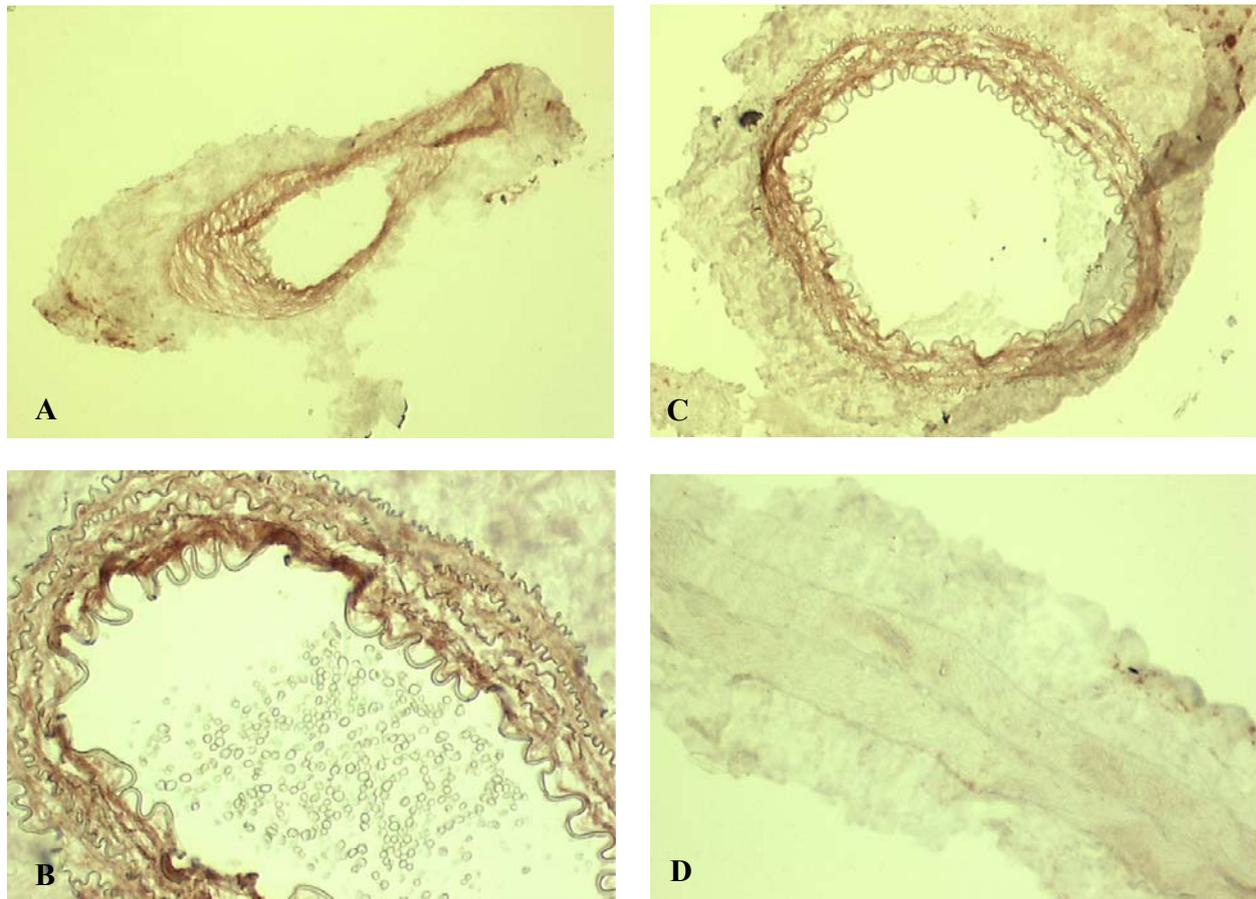


Abb. 30: Mikroskopische Aufnahme der immunhistochemischen Färbung Laminin

- A: Kontrollgefäß ohne Anastomose mit Vehikel (0,9% NaCl-Lösung) behandelt
- B: Gefäß nach Anastomosierung und VEGF Behandlung
- C: Gefäß nach Anastomosierung und Vehikel (0,9% NaCl-Lösung) behandelt
- D: Gefäß ohne Anastomosierung und VEGF Behandlung

Anhand der mikroskopischen Aufnahmen lässt sich deutlich eine Zunahme des Laminin Proteins nach Anastomosierung und VEGF Behandlung erkennen.

## 4 Diskussion

Das vorrangige Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von VEGF auf die Reendothelialisierung (rET) nach mikrochirurgischen Gefäßtrauma zu untersuchen.

### 4.1 Die Wirkungen von VEGF im Bereich der Mikrochirurgie

Angiogenese und Neovaskularisation werden maßgeblich durch VEGF gesteuert. VEGF ist auch als vaskulärer Permeabilitätsfaktor bekannt. Es ist gezeigt worden, dass VEGF *in vitro* ein endotheliales zellspezifisches Mitogen darstellt und *in vivo* ein bedeutender Mediator der Angiogenese ist (Leung et al. 1989, Keck et al. 1989). Natives VEGF ist ein basisches, Heparinbindendes, homodimeres Glykoprotein und besitzt eine Größe von 45 kDa (Schönberger et al. 2004). Diese Eigenschaften sind mit der häufigsten VEGF-Isoform, dem VEGF<sub>165</sub>, vergleichbar. VEGF<sub>165</sub> ist auch das prädominante Protein, welches durch verschiedene normale oder transformierte Zellen produziert wird.

Kürzlich wurde durch Infanger und Mitarbeiter gezeigt, dass der Serumspiegel von VEGF mit dem Ausmaß des Gewebeödems bei Verbrennungsverletzungen korreliert (Infanger et al. 2004).

Weitere Studien haben ergeben, dass VEGF mRNA und VEGF-Protein im normalen Rattengewebe und in verschiedenen Organen weit verbreitet ist, was die Hypothese unterstützt, dass VEGF eine wichtige Rolle in der Kontrolle und Erhaltung von Gefäßfunktionen spielt (Monacci et al 1993, Jakeman et al. 1992). Bei mikrochirurgischen arteriellen Rekonstruktionen mit venösen Interponaten ist VEGF signifikant nach 48 Stunden in den Veneninterponaten und an der arteriellen Anastomose erhöht. Die VEGF-Expression in den Veneninterponaten normalisiert sich innerhalb von 4 Wochen, bleibt aber signifikant erhöht in den angrenzenden arteriellen Segmenten. Eine erhöhte VEGF-Produktion nach venösen Interponaten in Arterien kann die rET unterstützen und ist so mindestens teilweise für die guten Durchgängigkeitsraten nach autologen Veneninterponaten verantwortlich.

Unsere Daten ermöglichen das erste Mal eine umfassende Analyse des Effektes von VEGF auf die arterielle rET und das vaskuläre Remodeling nach mikrochirurgischer Anastomose.

Die genauen Mechanismen, die die Regulation des vaskulären Remodelingprozesses nach arterieller Verletzung beeinflussen, sind bisher nur wenig verstanden. In dieser Arbeit wurde

erstmals gezeigt, dass 10 Tage nach arterieller Anastomosierung der Arteria femoralis der Ratte der Gehalt an VEGF signifikant erhöht war. Da der VEGF-spezifische Rezeptor flk-1, der in der Femoralarterie der Ratte nachweisbar ist, eindeutig 10 Tage nach der Operation hochreguliert ist, ergibt sich unsere Hypothese, dass durch die lokale Applikation von VEGF nach Gefäßverletzung das vaskuläre Remodeling und der Heilungsprozess im Wundgebiet verbessert werden kann. Des Weiteren konnten wir eine Reduktion des Gehalts an VEGF- und flk-1-Protein am Tag 0 in den mit Vehikel behandelten anastomosierten Gefäßen nachweisen. Dies lässt sich durch die Denudation des Gefäßes erklären, da die Endothelzellen VEGF und flk-1 exprimieren. Nach der Heilung am Tag 10 zeigten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe vergleichbare Werte. Am Tag 0 war in den anastomosierten und mit VEGF behandelten Tieren der Gehalt an VEGF-Protein mit der Kontrollgruppe ohne Anastomose vergleichbar. Dies kann durch die Hochregulation von VEGF in den verbliebenen Endothelzellen erklärt werden.

In den mit VEGF behandelten Ratten konnte postoperativ nach 5 Tagen eine vollständige Heilung ermittelt werden. Ferner war das Remodeling des Gefäßes komplett abgeschlossen.

Frühere Untersuchungen über die Effizienz von VEGF die rET zu fördern sind nach arterieller Ballonangioplastie veröffentlicht worden, die allerdings widersprüchlich sind (Asahara et al. 1996, Lindner et al. 1996). Asahara et al. zeigten, dass der arterielle Gentransfer von phVEGF165 die rET beschleunigen kann, sowohl lokal als auch im Remotebereich, was zur Verdickung der Neointima und einer Reduzierung der Thrombogenese führt. Im Gegensatz berichteten Lindner und Reidy, dass es nicht zu einem erhöhten endothelialen Wachstum unter dem Einfluss von VEGF kommt. In einer weiteren Studie konnten sie zeigen, dass vaskuläre glatte Muskelzellen nach arterieller Verletzung funktionale flt-1-Rezeptoren exprimieren und dass VEGF einen synergistischen Effekt mit FGF-2 auf die glatte Muskelzellproliferation *in vivo* hat (Lindner et al. 1996). Wahrscheinlich werden diese Effekte durch den durch VEGF induzierten Anstieg der Permeabilität als auch über die direkte Aktion von VEGF und FGF im Signalweg vermittelt. Unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit den Untersuchungen von Asahara et al., die ein anderes Versuchsmodell (Kaninchen-Modell für Ballonangioplastie) verwendeten.

Das mechanische Gefäßtrauma induziert eine Endothelzellproliferation (Couper et al. 1997). Der zeitliche Ablauf wurde durch Schwartz und Benditt (1973) exakt beschrieben. Es zeigte sich keine Proliferation in den ersten 20-24 Stunden nach Ballon-vermitteltem Gefäßlumentrauma, allerdings wurde nach 48 Stunden ein Maximum der Endothelzellproliferation erreicht. Die Proliferationsrate normalisierte sich bis 96 Stunden nach Setzung des Traumas wieder. Eine

intravasale VEGF-Infusion für 3 Minuten verursachte sofort nach dem Trauma eine Erhöhung der Endothelzellproliferationsrate im geschädigten Gefäß (Burke et al. 1995).

Vor kurzem zeigten Gennaro et al. (2003), dass beim Kaninchen ein adenoviraler Gentransfer von VEGF<sub>165</sub> signifikant die VEGF-Expression im verletzten Gefäß erhöht, wodurch die Re-endothelialisierung beschleunigt wird, und somit die Neointima reduziert werden kann. Darüber hinaus reduziert eine einmalige Applikation von VEGF die Hyperplasie der Intima und verbessert die Funktion des Endothels in einem Kaninchen-Venentransplantat-Model (Luo et al. 1998).

Die genaue Untersuchung der pathophysiologischen Vorgänge bei der Angiogenese und Neovaskularisation hinsichtlich einer posttraumatischen Endothelzellproliferation nach artifiziellem Gefäßtrauma und nachfolgenden Gefäßanastomosen ermöglicht neue therapeutische Ansätze zur Behandlung bei Replantationen, Transplantationen und im Bereich des Tissue engineering. Einerseits helfen uns diese Untersuchungen die Erfolgsrate nach Anastomosen und rekonstruktiven Eingriffen zu verbessern, andererseits bieten sie uns die Möglichkeit neue Techniken beim Tissue Engineering weiter entwickeln zu können.

## 4.2 Effekte von VEGF auf das mikrovaskuläre Remodeling

Der Heilungsprozess nach Gefäßtrauma ist überwiegend von der Existenz und Verbindung extrazellulärer Matrixproteine wie Kollagene abhängig. Verschiedene Kollagene sind für die Zusammensetzung der Gefäßwand notwendig und bilden bis zu 80 % des Trockengewichts der Blutgefäße (Kucharz, 1992). Die Gefäße bestehen überwiegend aus Kollagen Typ I und Kollagen Typ III (Kuhn, 1987). Kollagen Typ I ist vor allem in der Adventitia identifiziert worden, während Kollagen Typ III vorwiegend im Bereich der Intima und Media nachgewiesen wurde (Farquharson und Robbins, 1989). Kollagen Typ IV und Laminin können in Basalmembranen detektiert werden, die in allen epithelialen und endothelialen Zellmembranen vorhanden sind sowie in Muskelfasern und Nerven. Immunhistochemisch lassen sich Laminin und Kollagen Typ IV im Bereich der subendothelialen Basalmembran und in Basalmembranen, die die vaskulären Gefäßmuskelzellen umgeben, nachweisen (Friedrich et al. 2000). Die subendotheliale Basalmembran ist für den Reendothelialisierungsprozess von alterierten Gefäßen notwendig. Friedrich und Team (2000) entdeckten Kollagen Typ III und IV in experimentellen mikrochirurgischen Anastomosen von Rattenarterien. Kollagen IV war netzartig in der Media verteilt und Kollagen III wurde in der Adventitia nachgewiesen. Wir fanden einige wenige positive Kollagen-III Fasern in normalen mit Vehikel behandelten Kontrollgefäßen. Die Gabe von VEGF führte zu einem vermehrten Gehalt an Kollagen III in der Adventitia bei Kontrollgefäßen. In anastomosierten Gefäßen kam es in Media und Adventitia zu einem beeindruckenden Anstieg von Kollagen Typ I. Bis heute existierten noch keine Daten über die Effekte von VEGF auf die Expression extrazellulärer Matrixproteine beim Prozess des vaskulären Remodeling. In dieser Arbeit wird erstmals gezeigt, dass VEGF signifikant verschiedene Kollagentypen und Fibonektin hoch reguliert. Im Gegensatz zu unbehandelten anastomosierten Gefäßen findet man bei VEGF-behandelten Gefäßen eine Vermehrung von Kollagen Typ III im Bereich der Media und der Adventitia. Vor kurzem wurde gezeigt, dass VEGF die Fibronektin-Sekretion von kultivierten bronchialen glatten Gefäßmuskelzellen erhöht (Kazi et al. 2004). Unsere Gruppe (Schönberger et al. 2004) konnte vor kurzem zeigen, dass die Hemmung der VEGF-Aktivität durch PTK787/ZK222584, einem spezifischen Blocker beider VEGF-Rezeptor Tyrosinkinase, das Wachstum eines niedrig differenzierten Schilddrüsenkarzinoms inhibiert. Wir verwendeten ein Xenografttumormodell der Nacktmaus. Extrazelluläre Matrixproteine sind in verschiedenen Xenografttumormodellen vermehrt, während Tyrosinkinasehemmung die Ablagerung von extrazellulären Matrixproteinen im Interstitium und

im perivaskulären Bereich reduziert. Die genauen Mechanismen für diese Befunde sind bislang unklar, allerdings wird ein Anstieg von Apoptose in den Tumorzellen diskutiert.

### **4.3 VEGF induziert Transforming Growth Factor- $\beta_1$ und Osteopontin**

Weiterhin konnte eine Erhöhung von TGF- $\beta_1$  in VEGF behandelten Tieren sofort und bis zum 10. Tag nach Reanastomose nachgewiesen werden. Diese Daten deuten darauf hin, dass VEGF möglicherweise eine Rolle bei der weiteren Stimulation des vaskulären Remodelings nach Gefäßtrauma spielt. Dies könnte entweder direkt durch VEGF geschehen oder indirekt durch Induktion anderer Wachstumsfaktoren, die zur Induktion der extrazellulären Matrixproteine führen. TGF- $\beta_1$  ist ebenfalls in der Gefäßwand nach Ballonverletzung erhöht gefunden worden (Miano et al. 1993).

Ein sehr interessanter und neuer Befund ist die frühe Hochregulation von Osteopontin nach Gefäßtrauma. Osteopontin wird noch stärker bei den mit VEGF behandelten mikroanastomisierten Tieren erhöht, was auf eine spezifische Rolle dieses zelladhäsiven Moleküls in der frühen Phase der vaskulären Wundheilung hindeutet. Osteopontin ist bekannt als Wachstumsfaktor. Das Zytokin und extrazelluläre Matrixprotein Osteopontin (Eta-1) spielt eine wichtige Rolle bei der zellulären Immunität und bei Entzündungen. Es wirkt als Überlebens-, zelladhäsiver und chemotaktischer Faktor der Endothelzellen (Leali et al. 2003). Isoda et al. (2002) verwendete ein transgenes Mausmodell, welches das Osteopontin-Gen überexprimierte, und zeigte, dass Osteopontin eine Verdickung der Media ohne Trauma und eine Neointimabildung nach Gefäßtrauma bewirkt. Osteopontin scheint daher eine wichtige Funktion für den vaskulären Remodelingprozess nach Ballondilatation in vivo zu spielen.

Ferner wurde gezeigt, dass neutralisierende Antikörper gegen Osteopontin im Ratten-Karotismodell die Neointimabildung nach endothelialer Denudation hemmen, was wiederum auf eine aktive Rolle des Osteopontins beim vaskulären Remodeling hindeutet.

## 4.4 Schlussfolgerungen

Die Wiederherstellung des endothelialen Monolayers (Intima) ist für den Bereich der rekonstruktiven Gefäßchirurgie bei Gefäßtrauma von großer Bedeutung. Die Daten dieser Dissertation sind von signifikanter klinischer Relevanz. Das Endothelium spielt eine kritische Rolle bei der Thrombogenität, dem vaskulären Tonus und bei einer verzögerten endothelialen Heilung nach Verletzungen oder Alterationen wie nach chirurgischen Eingriffen (Transplantation, Replantation, Rekonstruktive Chirurgie).

Darüber hinaus scheint Osteopontin eine Schlüsselrolle für den vaskulären Remodelingprozess im Bereich der Mikrochirurgie zu spielen. Diese Arbeit präsentiert neue Ergebnisse über die Rolle von Osteopontin im Remodelingprozess.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass die lokale Applikation von VEGF eine sehr nützliche Methode darstellt, um die Reendothelialisierung zu beschleunigen sowie den Heilungsprozess nach Gefäßtrauma und nachfolgender Reanastomose im Bereich der Gefäßwand der A. femoralis der Ratte zu fördern.

## 5 Zusammenfassung

Die frühe Rekonstruktion nach Verletzung des Endotheliums ist für die Reduktion der Anzahl an Gefäßwandschäden sehr bedeutend. Diese Dissertation untersuchte daher den Effekt des Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) auf den vaskulären Remodelingprozess und die Reendothelialisierung nach Gefäßtrauma.

Es wurden Gefäßtrauma und anschließend mikrovaskuläre Anastomosen an den Femoralgefäßen von erwachsenen männlichen Sprague-Dawley Ratten durchgeführt. Eine anastomosierte Gruppe wurde mit einer intraluminalen Applikation von VEGF behandelt. Eine weitere anastomosierte Gruppe erhielt als Vehikel (NaCl 0.9% Lösung). Es wurden morphologische, ultrastrukturelle und immunhistochemische Veränderungen der Gefäßwand sowie des Reendothelialisierungsprozesses untersucht. Darüber hinaus wurden Western Blot Analysen und nachfolgende semiquantitative Auswertungen mittels Densitometrie durchgeführt.

Nach 10 Tagen konnte in der VEGF-Gruppe eine signifikant schnellere Reendothelialisierung ermittelt werden. Die Transmissionselektronenmikroskopie ergab in der VEGF-Gruppe eine komplette Heilung, während in der Vehikelgruppe eine Defektheilung zu verzeichnen war. Ferner waren extrazelluläre Matrixproteine wie Fibronectin, die Kollagen Typen I, III und IV signifikant in der VEGF-Gruppe vermehrt. Darüber hinaus induzierte die intraluminale Gabe von VEGF den VEGF-Rezeptor flk-1, sowie Osteopontin und TGF- $\beta_1$ .

Diese Arbeit zeigt zum ersten Mal, dass die intraluminale Applikation von VEGF beim artifiziell erzeugten Gefäßtrauma sich günstig auf den Heilungsprozess postoperativ auswirkt. Osteopontin und TGF- $\beta_1$  werden beide durch VEGF induziert. Sie besitzen möglicherweise eine sehr bedeutende Rolle für den vaskulären Remodelingprozess.

Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen sehr klar, dass die Gabe von VEGF eine sehr nützliche Strategie darstellt, um die Reendothelialisierung nach Gefäßtrauma zu beschleunigen und den Heilungsprozess im Bereich der Mikrogefäßchirurgie zu verbessern.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Asahara T, Bauters C, Pastore C, Kearney M, Rossow S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery, *Circulation* 1995;91:2793-2801.
2. Asahara T, Chen D, Tsurumi Y, Kearney M, Rossow S, Passeri J, Symes JF, Isner JM Accelerated restitution of endothelial integrity and endothelium-dependent function after phVEGF165 gene transfer. *Circulation* 1996;94:3291-3302.
3. Atiyeh BS, Hashim HA, Hamdam AM, Musharafieh RS Local recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) thrombolytic therapy in microvascular surgery, *Microsurgery* 1999; 19: 265-271.
4. Bach O, Friedel R, Dönicke T, Nestmann H, Markgraf E Mikrovaskuläre Komplikationen nach Replantationen und Revaskularisationen; *Handchirurgie Mikrochirurgie Plastische Chirurgie* 2002; 363-368.
5. Barleon B, Reusch P, Totzke F, Herzog C, Keck C, Martiny-Baron G, Marme D Soluble VEGFR-1 secreted by endothelial cells and monocytes is present in human serum and plasma from healthy donors, *Angiogenesis* 2001;4:143-154.
6. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich H A, Mantovani A, Marme D Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor is mediated via the VEGF receptor flt-1, *Blood* 1996;87:3336-3343.
7. Bates DO, Harper SJ Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. *Vascular Pharmacology* 2003;39:225-237.
8. Brauchle M, Funk JO, Kind P, Werner S Ultraviolet B and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> are potent inducers of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes; *The Journal of biological chemistry* 1996;271:21793-21797.
9. Burke PA, Lehmann-Bruinsma K, Powell JS Vascular endothelial growth factor causes endothelial proliferation after vascular injury. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;207:348-354.
10. Carmeliet P, Collen D Molecular basis of angiogenesis. Role of VEGF and VE-cadherin; *Annals of the New York Academy of Science* 2000;902:249-262.
11. Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor; *The Journal of biological chemistry* 1996; 271:736-741.

12. Couper LL, Bryant SR, Eldrup-Jorgensen J, Bredenberg CE, Lindner V Vascular endothelial growth factor increases the mitogenic response to fibroblast growth factor-2 in vascular smooth muscle cells in vivo via expression of fms-like tyrosine kinase-1. *Circ Res* 1997;81:932-939.
13. de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor, *Science* 1992; 255: 989-991.
14. Deroanne CF, Hajitou A, Calber-Bacq CM, Nusgens BV, Lapiere CM Angiogenesis by fibroblast growth factor 4 is mediated through an autocrine up-regulation of vascular endothelial growth factor expression; *Cancer Research* 1997; 57:5590-5597.
15. Engel ME, Datta PK, Moses HL. Signal transduction by transforming growth factor-beta: a cooperative paradigm with extensive negative regulation. *J Cell Biochem Suppl.* 1998;30-31:111-122.
16. Farquharson C, Robins SP. Immunolocalization of collagens type I and III in the arterial wall of the rat. *Histochem J* 1989;21:172-178.
17. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J: The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-976.
18. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:851-858.
19. Ferrara N Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:1358-1366.
20. Ferrara N VEGF: An update on biological and therapeutic aspects. *Curr Opin Biotechnol* 2000;11:617-624.
21. Finkenzeller G, Marme D, Weich HA, Hug H Platelet-derived growth factor-induced transcription of the vascular endothelial growth factor gene is mediated by protein kinase C; *Cancer Research* 1992; 52:4821-4823.
22. Fournier E, Birnbaum D, Borg JP Receptors for factors of the VEGF (Vascular Endothelial Growth Family); *Bulletin du cancer* 1997;84:397-405.
23. Frank S, Stallmeyer B, Kampfer H, Kolb N, Pfeilschifter J Nitric oxide triggers enhanced induction of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes (HaCaT) and during cutaneous wound repair. *The FASEB Journal* 1999;13:2002-2014.
24. Friedrich RE, Bartel-Friedrich S, Plambeck K The presence of collagen III and IV in experimental microsurgical anastomoses of arteries. *J Oral Maxillofac Surg* 2000;58:1125-1128.

25. Gennaro G, Menard C, Michaud SE, Rivard A Age-dependent impairment of reendothelialization after arterial injury: role of vascular endothelial growth factor. *Circulation* 2003;107:230-233.
26. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells; *The Journal of biological chemistry* 1998;273:13313-13316.
27. Gerber HP, Mc Murtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3`-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for flk-1/KDR activation; *The Journal of biological chemistry* 1998; 273:30336-30343.
28. Goad DL, Rubin J, Wang H, Tashjian AHjr, Patterson C Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human SaOS-2 osteoblast-like cells and murine osteoblasts induced by insulin-like growth factor I; *Endocrinology* 1996;137:2262-2268.
29. Gonzalez SR, Martinez C G, Gonzalez-Santander Martinez M, Toledo Lobo MV, Martinez Alonso FJ. Hematoencephalic barrier. Ultrastructure and histophysiology of the endothelium capillary of the neuronal nuclei of the mesencephalon. *Histol Histopathol* 1992 ;7:353-361.
30. Grimm D, Cameron D, Griese DP, Riegger GA, Kromer EP Differential effects of growth hormone on cardiomyocyte and extracellular matrix protein remodeling following experimental myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 1998;40:297-306.
31. Grimm D, Huber M, Jabusch HC, Shakibaei M, Frederdorf S, Paul M, Riegger GA, Kromer EP Extracellular matrix proteins in cardiac fibroblasts derived from rat hearts with chronic pressure overload: effects of beta-receptor blockade. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:487-501.
32. Guerrin M, Moukadiri H, Chollet P, Moro F, Dut K, Malecaze F, Plouet J Vasculotropin/vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor for human retinal pigment epithelial cells cultured in vitro; *Journal of cellular Physiology* 1995;164:385-394.
33. Hamdan AD, Aiello LP, Misare BD, Contreras MA, King GL, LoGerfo FW, Quist WC Vascular endothelial growth factor expression in canine peripheral vein bypass grafts. *J Vasc Surg* 1997;26:79-86.
34. Hippenstiel S, Krull M, Ikemann A, Risau W, Clauss M, Suttorp N VEGF induces hyperpermeability by a direct action on endothelial cells; *The American Journal of Physiology* 1998;27:678-684.
35. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G., Leung DW The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA, *Molecular Endocrinology* 1991;5:1806-1814.

36. Infanger M, Schmidt O, Kossmehl P, Grad S, Ertel W, Grimm D Vascular endothelial growth factor serum level is strongly enhanced after burn injury and correlated with local and general tissue edema. *Burns* 2004;30:305-311.
37. Infanger M, Kossmehl P, Grimm D Successful microsurgical replantation of amputated cheek. *Acta Otolaryngol* 2006;126:432-434.
38. Isoda K, Nishikawa K, Kamezawa Y, Yoshida M, Kusuhara M, Moroi M, Tada N, Ohsuzu F Osteopontin plays an important role in the development of medial thickening and neointimal formation. *Circ Res* 2002; 91:77-82.
39. Jacobson JH 2nd. The early days of microsurgery in Vermont. *Mt Sinai J Med* 1997;64:160-163.
40. Jakeman LB, Winer J, Bennett GL, Altar CA, Ferrara N Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *J Clin Invest* 1992;89:244-253.
41. Junqueira LCU, Cossermelli W, Brentani R Differential staining of collagens type I, II and III by sirius red and polarization microscopy. *Arch Histol Jap* 1978;41:267-274.
42. Karakurt L, Karaca I, Yilmaz E, Burma O, Serin E. Corona mortis: incidence and location. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2002;122:163-164.
43. Kazi AS, Lotfi S, Goncharova EA, Tliba O, Amrani Y, Krymskaya VP, Lazaar AL Vascular endothelial growth factor-induced secretion of fibronectin is ERK dependent. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;286:539-545.
44. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 1989;246:1309-1312.
45. Kucharz E The collagens: Biochemistry and pathophysiology. New York, NY Springer-Verlag, 1992; 10.
46. Kuhn K The classical collagens: Types I, II and III, in Mayne R, Burgeson RE (eds): Structure and function of collagen types. Orlando, FL, Academic Press. 1987; 1-42.
47. Leali D, Dell'Era P, Stabile H, Sennino B, Chambers AF, Naldini A, sozzani S, Nico B, Ribatti D, Presta M Osteopontin (Eta-1) and fibroblast growth factor-2 cross-talk in angiogenesis. *J Immunol* 2003; 171:1085-1093.
48. Lee SH, Fisher B. Portacaval shunt in the rat. *Surgery* 1961;50:668-672.
49. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246:1306-1309.

50. Li J, Perrella MA, Tsai JC, Yet SF, Hsieh CM, Yoshizumi M, Patterson C, Endege WO, Zhou F, Lee ME Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells; *The Journal of biological chemistry* 1995;270:308-312
51. Lindner V, Reidy MA: Expression of VEGF receptors in arteries after endothelial injury and lack of increased endothelial regrowth in response to VEGF. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1399-1405.
52. Luo Z, Asahara T, Tsurumi Y, Isner JM, Symes JF Reduction of vein graft intimal hyperplasia and preservation of endothelium-dependent relaxation by topical vascular endothelial growth factor. *J Vasc Surg* 1998;27:167-173.
53. Mann HB, Whitney DR On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann Math Statist.* 1947;18:50-60
54. Matsumoto K, Ohi H, Kanmatsuse K: Interleukin 10 and interleukin 13 synergize to inhibit vascular permeability factor release by peripheral blood mononuclear cells from patients with lipid nephrosis; *Nephron* 1997;77:212-218
55. McMinn R, Last's Anatomy, 8. Edition, 1990;15
56. Miano JM, Vlasic N, Tota RR, Stemermann MB Smooth muscle cell immediate-early gene and growth factor activation follows vascular injury. A putative in vivo mechanism for autocrine growth. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1993;13:211-219.
57. Monacci WT, Merrill MJ, Oldfield EH Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in normal rat tissues. *Am J Physiol* 1993;264:995-1002.
58. Murohara T, Horowitz JR, Silver M, Tsurumi Y, Chen D, Sullivan A, Isner JM Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin.; *Circulation* 1998;97:99-107.
59. Nakayama K, Hanyu F, Yamaguchi K, Kinoshita Y, Nomoto S. Evaluation of reconstruction of the esophagus by transplantation of pedicled flaps of the stomach or the right colon in the anterior chest, *Geka Chiryo* 1968;19:761-768.
60. Neglen P, Eklof B, Shuhaiber H, Berntman L. Related Articles, Temporary extracorporeal perfusion of the splanchnic circulation dependent on the Riolan anastomosis. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 1987;28:249-252.
61. Noll S, Schaub-Kuhnen S. *Praxis der Immunhistochemie*. 1. Auflage . Fischer und Urban Verlag, München, Jena, 2000
62. Nylen CO. The otomicroscope and microsurgery 1921-1971. *Acta Otolaryngol.* 1972;73:453-454.

63. Oberg C, Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Welsh M Expression of protein tyrosine kinase in islet cells: possible role of the Flk-1 receptor for beta-cell maturation from duct cells; *Growth Factors* 1994;10:115-126.
64. Oloffson B, Korpelainen E, Pepper M S, Mandriota SJ, Aase K., Kumar V, Gunki Y, Jeltsch M M, Shibuya M, Alitalo K., Eriksson U. Vascular endothelial growth factor B binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 11709-11714
65. Park J. E., Chen H. H., Winer J, Houck K. A., Ferrara N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flk-1 but not to Flk/KDR. *J Biol Chem* 1994; 269:25646-25654.
66. Perlman R, Schiemann WP, Brooks MW, Lodish HF, Weinberg RA. TGF-beta-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. *Nat Cell Biol.* 2001;3:708-714.
67. Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O, Alitalo K Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells; *The Journal of biological chemistry* 1994;269:6271-6274.
68. Plouet J, Bayard F Regulation of vasculotropin/vascular endothelial growth factor bioavailability; *Hormone Research*1994;42:14-19.
69. Roberts WG, Palade GE: Increase microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor; *Cancer Research* 1993;53:153-157.
70. Roberts WG, Palade GE: Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci* 1995;108:2369-2379.
71. Rosivall L, Razga Z, Mirzahosseini S, Tornoci L Endothelial permeability of the afferent arteriole and its changes as the result of alteration in the activity of the renin-angiotensin system. *J Am Soc Nephrol* 1999; 11:172-177.
72. Ryuto M, Ono M, Izumi H, Yoshida S, Weich HA, Kohno K, Kuwano M Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha in human glioma cells. Possible roles of SP-1; *The Journal of biological chemistry* 1996; 271:28220-28228.
73. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219:983-985.
74. Schoenberger J, Grimm D, Kossmehl P, Infanger M, Kurth E, Eiles C Effects of PTK787/ZK222584, a tyrosine kinase inhibitor, on the growth of a poorly differentiated thyroid carcinoma: an animal study. *Endocrinology* 2004;145:1031-1038.

75. Schwartz SM, Benditt EP Cell replication in the aortic endothelium: a new method for study of the problem. *Lab Invest* 1973;28:699-707.
76. Shakibaei M, John T, De Souza P, Ramanzadeh M, Merker HJ Signal transduction by beta1 integrin receptors in human chondrocytes in vitro: collaboration with the insulin-like growth factor-I receptor. *Biochem J* 1999;342:615-623.
77. Shibutani M, Uneyama C, Miyazaki K, Toyoda K, Hirose M Methacarn fixation: anovel tool for analysis of gene expression in paraffin-embedded tissue specimens. *Lab Invest* 2000; 80:199-208.
78. Shweiki D, Neeman M, Itin A, Keshet E: Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications fpr tumor angiogenesis; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995;92:768-772.
79. Sondell M, Lundborg G, Kanje M Vascular endothelial growth facor stimulates Schwann cell invasion an neovascularisation of acellular nerve grafts; *Brain Research* 1999;846:219-228.
80. Takahashi T, Shirasawa T, Miyake K, Yahagi Y, Maruyama N, Kasahara N, Kawamura T, Matsumara O, Mitarai T, Sakai O Protein tyrosine kinases expressed in glomeruli and cultured glomerular cells: Flt-1 and VEGF expression in renal mesangial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1995;209:218-226.
81. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bohlen P Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;187: 1579-1586.
82. Trampisch HJ, Windeler J, Ehle B, Lange S, *Medizinische Statistik*. 2. Auflage. Springer Verlag. 2000
83. Uneyama C, Shibutani M Methacarn fixation for genomic DNA analysis in microdissected, paraffin-embedded tissue specimens. *J Histochem Cytochem* 2002; Vol 50:1237-1245.
84. Vincenti V, Cassano C, Mariano Rocchi M, Persico G Assignment of the Vascular Endothelial Growth Factor Gene to Human Chromosome 6p21.3, *Circulation* 1996;93:1493-1495.
85. Wang W, Dentler WL, Borchardt RT VEGF increases BMEC monolayer permeability by affecting occluding expression and tight junction assembly. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:434-440.
86. Werner S, Munz B Molecular biology contributions to wound healing and practical applications; *Langenbecks Archiv für Chirurgie, Supplement Kongreßband, Deutsche Gesellschaft für Chirurgie, Kongreß* 1998;115:678-682.

87. Whittles CE, Pocock TM, Wedge SR, Kendrew J, Hennequinn LF, Harper SJ, Bates DO  
ZM323881, a novel inhibitor of vascular endothelial growth factor-receptor-2 tyrosine  
kinase activity, *Microcirculation* 2002;9:513-522.

## 7 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung</b>		<b>Seite</b>
Abb. 1	Querschnitt durch Arterienwand, Sirius Rot Färbung	3
Abb. 2	Schematische Darstellung der Arterienwand	4
Abb. 3	Operationsmikroskop	5
Abb. 4	VEGF und seine Rezeptoren	10
Abb. 5	Schematischer Aufbau eines Fokalkontaktes	15
Abb. 6	Operationsmikroskop (Stereomikroskop im Labor)	32
Abb. 7	Operationssituation	33
Abb. 8	Operationssitus 1, Arterie femoralis in Aclandklemme eingespannt	34
Abb. 9	Operationssitus 2, Arterie femoralis in Aclandklemme eingespannt	34
Abb. 10	Operationssitus , Durchführung der intraluminalen Gabe von VEGF	35
Abb. 11	Operationssitus, die Anastomose ist durchgeführt	35
Abb. 12	Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme	53
Abb. 13	Lichtmikroskopische und polarisationsmikroskopische Aufnahmen	54
Abb. 14	Lichtmikroskopische und polarisationsmikroskopische Aufnahmen	55
Abb. 15	Darstellung der Prozentualen Verhältnisse der Mediafibrose zu Lumen	56
Abb. 16	Darstellung der Prozentualen Verhältnisse der Media zu Lumen	57
Abb. 17	Mikroskopische Aufnahme der immunhistochemischen Färbung von Osteopontin	58
Abb. 18	Darstellung der prozentualen Verhältnisse Osteopontin zu Lumen	59
Abb. 19	Graphische Darstellung der Western Blot Analyse von VEGF-A	61
Abb. 20	Graphische Darstellung der Western Blot Analyse von flk-1	62
Abb. 21	Graphische Darstellung der Western Blot Analyse von TGF- $\beta_1$	64
Abb. 22	Mikroskopische Aufnahme der Osteopontinfärbung	66
Abb. 23	Graphische Darstellung der Western Blot Analyse von Osteopontin	67
Abb. 24	Mikroskopische Aufnahme der Kollagen Typ I Färbung	69
Abb. 25	Graphische Darstellung der Western Blot Analyse von Kollagen Typ I	70
Abb. 26	Graphische Darstellung der Western Blot Analyse von Kollagen Typ III	72
Abb. 27	Graphische Darstellung der Western Blot Analyse von Kollagen Typ IV	74
Abb. 28	Mikroskopische Aufnahme der Fibronektinfärbung	75

Abb. 29	Graphische Darstellung der Western Blot Analyse von Fibronectin	76
Abb. 30	Mikroskopische Aufnahmen der Lamininfärbung	78

## 8 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle</b>		<b>Seite</b>
Tab. 1	Übersicht der Primärantikörper mit den entsprechenden Konzentrationen und verwendeten Sekundärantikörper	41
Tab. 2	Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper und der entsprechenden Konzentrationen, Inkubationszeiten und Entwicklungssubstrate	41
Tab. 3	Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele	45
Tab. 4	Übersicht der verwendeten Primärantikörper mit Konzentrationen verwendeten Sekundärantikörper	47
Tab. 5	Statistische Auswertung der prozentualen Media Fibrose : Lumen Ratio	56
Tab.6	Statistische Auswertung der Media : Lumen Ratio	57
Tab. 7	Statistische Auswertung der Osteopontin Färbung	59
Tab. 8	Statistische Auswertung der Western Blot Analyse von VEGF-A	61
Tab. 9	Statistische Auswertung der Western Blot Analyse von flk-1	63
Tab. 10	Statistische Auswertung der Western Blot Analyse von TGF- $\beta_1$	65
Tab. 11	Statistische Auswertung der Western Blot Analyse von Osteopontin	68
Tab. 12	Statistische Auswertung der Western Blot Analyse von Kollagen Typ I	71
Tab. 13	Statistische Auswertung der Western Blot Analyse von Kollagen Typ III	73
Tab. 14	Statistische Auswertung der Western Blot Analyse von Fibronectin	77

## 9 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat Lösung
BCIP/NBT	5-Bromo-4chloro-3inodyl-phosphat und Nitroblautetrazolium
BSA	bovines Serumalbumin
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
EC	Endothelzellen
EZM	Extrazelluläre Matrix
Fa.	Firma
FGF	Fibroblast Growth Factor
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kilo Dalton
LM	Lichtmikroskopie
Lsg.	Lösung
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natrium Chlorid
NO	Stickstoff
OPN	Osteopontin
PBS	Phosphat Buffered Saline

PI	Phosphatidyl-Inositol
PIGF	Platelet induced Growth Factor
PM	Polarisationsmikroskopie
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rET	Reendothelialisierung
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyarylamid-Gelelektrophorese
Std.	Stunden
Tab.	Tabelle
TGF- $\beta_1$	Tumour Growth Factor
V.	Vena
VEGF	Vaskulärer Endothelialer Growth Factor
VPF	Vaskulärer Permeabilitätsfaktor

## 10 Anhang

### 10.1 Danksagungen

Diese Doktorarbeit wurde am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Campus Benjamin Franklin der Charité-Universitätsmedizin Berlin angefertigt. Ich möchte hiermit die Gelegenheit nutzen, mich bei allen herzlich zu bedanken, die mir bei der Durchführung und Anfertigung dieser Dissertation behilflich waren.

Frau PD. Dr. Daniela Grimm danke ich ganz besonders für die Betreuung meiner Doktorarbeit und die freundliche Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe. Sie hat mich in der interessanten Zeit während meiner wissenschaftlichen Arbeit immer neu motiviert und mich beratend unterstützt. Hier nochmals mein herzlicher Dank.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Dr. Manfred Infanger für die Auswahl dieses interessanten Themas. Trotz seiner hohen Arbeitsbelastung hatte er immer ein offenes Ohr und hat mich jederzeit ermutigt. Ihm verdanke ich nicht nur die Einführung in die Wissenschaft, sondern auch die Fortsetzung meiner mikrochirurgischen Ausbildung. Mein ganz besonders herzlicher Dank gilt ihm.

Danken möchte ich auch Prof. Dr. Mehdi Shakibaei für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Bedanken möchte ich mich bei Dr. Ekkehard Kurth und Dr. Peter Koßmehl für die Unterstützung bei der Sorge um die Tiere und Vorbereitung der Untersuchungen.

Ein großer Dank gilt den Mit-Doktoranden Shideh Famarzi und Jirka Grosse für die Unterstützung in der Durchführung der Färbungen und Western Blots.

Ebenso ein riesiges Dankeschön an Kriss Westphal und Claudia Ulbrich für die Unterstützung in der Konfiguration des Layouts und das Korrekturlesen.

Mein Dank gilt auch Frau Ulla Schwikowski für das Einscannen der Blots.

Für die Anfertigung der histologischen Schnitte danke ich Herrn Norbert Hinz.

Zum Schluss möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern Siri und Karl-Heinz Hollenberg und meinen Geschwistern Jutta mit Klaus und Niels mit Doris, Lukas und Ellen, bedanken. Ohne

meine Familie, die mich immer ermutigend unterstützt, und auch bei manch „schlechter Phase“ nicht den Glauben an mein Gelingen verloren haben, wäre mir mein bisheriger Lebensweg nicht möglich gewesen.

## 10.2 Wissenschaftliche Publikationen

### Publikationen:

- 2005 Verätzung mit Flusssäure  
Anästhesist. 2005 Feb;54(2):123-6  
Richter H, Hollenberg S, Sachs HJ, Oeltjebruns J, Weimann J
- 2005 Intraluminal application of vascular endothelial growth factor enhances healing of microvascular anastomosis in a rat model.  
J Vasc Res. 2005 May-Jun;42(3):202-13. Epub 2005 04 14  
Infanger M, Shakibaei M, Kossmehl P, Hollenberg SM, Grosse J, Faramarzi S, Schulze-Tanzil G, Paul M, Grimm D

### Publizierte Abstracts:

- 2006 Electrical Stimulation enhances distal reinnervation without increasing regeneration speed  
FENS Forum Abstracts, Vol.3, A181.13, 2006  
Witzel C, Hollenberg S, Koulaxouzidis G, Brushart TM, Infanger M.
- 2006 VEGF erhöht die extrazellulären Matrixproteine Osteopontin, Kollagen I und III und Fibronectin.  
Chirurgisches Forum 2006, Band 35, 399-400  
Hollenberg S, Infanger M, Grosse J, Kossmehl P, Shakibaei, Paul M und Grimm D.

### Vorträge:

- 12.06.1996 Acute deterioration of infrarenal aortic disease at the time of colonic investigation  
Annual Meeting of the West Midlands Surgical Society  
Shrewsbury, England  
Hollenberg S, Houghton A

- 25.02.2000 Triscaphe Arthrodesis, Experience in 122 Operations  
Joint Israeli-Hellenic International Meeting for the 10<sup>th</sup>  
Anniversary of the Israeli Society for Surgery of the Hand  
Jerusalem, Israel  
Hollenberg S, Kalb K, Fuchs V, Schmitt R, Landsleitner B
- 12.06.2001 Treatment Choice of Kienböck's Disease  
8<sup>th</sup> Congress of the International Federation of Societies for  
Surgery of the Hand  
Istanbul, Türkei  
Hollenberg S, Bartelmann U, Kalb K
- 12.06.2001 Intraosseus Ganglia of the Carpus, Results after Exstirpation  
8<sup>th</sup> Congress of the International Federation of Societies for  
Surgery of the Hand  
Istanbul, Türkei  
Hollenberg S, Kalb K, Bartelmann U, Landsleitner B
- 14.09.2002 CRPS, aktuelle Diagnostik und Therapie  
7. Benjamin Franklin Schmerztag  
Berlin  
Hollenberg S, Infanger M
- 08.10.2004 Minimally invasive palmar reduction and internal fixation for  
displaced intraarticular fracture of the distal radius with locking  
compression plate  
20<sup>th</sup> Annual Meeting of the Orthopaedic Trauma Association  
Florida, USA  
Hollenberg S, Baum E, Stahel PM, Benicke M, Ertel W,  
Infanger M

- 23.11.2004 Update in der Handchirurgie  
Facharztseminar Berlin 2004  
Stiftung Akademie Deutscher Orthopäden  
Berlin  
Hollenberg S, Infanger M
- 10.09.2005 Die Bedeutung von VEGF für Gefäßanastomosen bei der Ratte  
Symposium Mikrochirurgie  
Linz, Österreich  
Hollenberg S, Grimm D, Infanger M
- 8.11.2005 Update in der Handchirurgie  
Facharztseminar Berlin 2005  
Stiftung Akademie Deutscher Orthopäden  
Berlin  
Hollenberg S, Infanger M
- 04.05.2006 Einfluss von VEGF auf die Reendothelialisierung  
123. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie  
Berlin  
Hollenberg S, Grimm D, Kossmehl P, Shakibaei M, Paul M,  
Infanger M
- 11.05.2006 Der Latissimus dorsi Lappen  
1. Berliner Mikrochirurgie Kurs  
Berlin  
Hollenberg S, Infanger M
- 13.10.2006 The latissimus dorsi flap  
International Microsurgery Course  
Linz, Österreich  
Hollenberg S, Infanger M

- 13.09.2006 Update in der Handchirurgie  
Facharztseminar Berlin 2006  
Stiftung Akademie Deutscher Orthopäden  
Berlin  
Hollenberg S, Infanger M
- Poster:**
- 22.05.2002 Intraosseus Ganglia of the Carpus, Results after Exstirpation  
8<sup>th</sup> Congress of the Federation of the European Societies for  
Surgery of the Hand  
Amsterdam, Niederlande  
Hollenberg S, Kalb K, Bartelmann U, Landsleitner B
- 24.11.2005 Die Rolle von VEGF bei der mikrovaskulären Anastomose im  
Rattenmodell  
29. Wissenschaftlicher Kongress Hypertonie 2005  
Hollenberg S, Infanger M, Kossmehl M, Grosse J, Paul M,  
Grimm D
- 11.07.2006 Electrical Stimulation enhances distal reinervation without  
increasing regeneration speed  
FENS Forum, Wien, Österreich  
Witzel C, Hollenberg S, Koulaxouzidis G, Brushart TM,  
Infanger M
- 30.09.2006 Elektrische Stimulation unterstützt die distale Reinervation ohne  
die Regenerationsgeschwindigkeit zu erhöhen  
37. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft der Plastischen,  
Rekonstruktiven und Ästhetischen Chirurgen (vormals Vereinigung  
der deutschen Plastischen Chirurgen)  
Aachen  
Witzel C, Hollenberg S, Koulaxouzidis G, Brushart TM,  
Infanger M

## 10.3 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.







## **10.4 Eidesstattliche Erklärung**

Ich, Siri M. E. Hollenberg, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Die Bedeutung des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors bei der Reendothelialisierung nach Mikrogefäßanastomosen selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, im Juni 2007

Siri M. E. Hollenberg