

Aus der Klinik für Innere Medizin CC13 Schwerpunkt Kardiologie
Center for Cardiovascular Research (CCR)
Forscherguppe für Experimentelle und Klinische Arteriogenese
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Arteriogenese im Schweineherzen –
eine Analyse und Methodenetablierung**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jonathan-Michael Harnöß

aus Berlin

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. I. Buschmann
 2. Prof. Dr. med. A. R. Pries
 3. Prof. Dr. med. E. S. Debus

Datum der Promotion: 24.02.2012

Meinen Eltern und
Brüdern Johann, Julian und Justin
in Liebe und Dankbarkeit.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Der biologische Bypass	1
1.1. Formen des Gefäßwachstums	2
1.1.1. Vaskulogenese.....	2
1.1.1. Angiogenese.....	2
1.1.2. Arteriogenese	3
1.1.3. Vergleich von Arteriogenese und Angiogenese	6
1.2. Definition und Einteilung von Kollateralen.....	7
1.3. Kollateralen im Schweineherzen	7
1.4. Brückenkollateralen	8
1.5. Zielsetzung der Arbeit	9
2. MATERIAL UND METHODEN	11
I. TEIL: METHODENETABLIERUNG ZUR HERSTELLUNG VON KORROSIONSPRÄPARATEN UND ANFERTIGUNG POSTMORTALER ANGIOGRAPHIEN IN VERBINDUNG MIT DER STEREOSKOPIE.....	
11	
2.1. Tiermaterial.....	11
2.2. Postmortale Kontrastmittelperfusion	11
2.2.1. Versuchsaufbau 1-3	12
2.2.2. Versuchsdurchführung	14
2.2.3. Kontrastmittel	15
2.2.4. Etablierung der Versuchsaufbauten 1-3.....	16
2.2.5. Etablierung der Kontrastmittel.....	18
2.3. Vorbereitung der Herzen auf die radiologische Untersuchung.....	21
2.4. Radiologische Untersuchungen.....	22
2.5. Stereoskopie.....	22
2.5.1. Versuchsaufbauten 1-4	23
2.5.2. Versuchsdurchführung	26
2.5.3. Bearbeitung der stereoskopischen Bilder	26
2.5.4. Auswertung	27
2.6. Korrosionsmethode.....	27
2.6.1. Zusammensetzung des Injektionsmittels.....	27
2.6.2. Versuchsdurchführung bei den Korrosionspräparaten Nr. 1-6	27
II. TEIL: NACHWEIS PRÄEXISTENTER KOLLATERALEN SOWIE INDUKTION UND ANALYSE VON KOLLATERALISIERUNG IM SCHWEINEHERZEN.....	
31	
2.7. Tierexperimente	31
2.7.1. Stent	31
2.7.2. Narkose	31
2.7.3. Stentimplantation	32
2.7.4. Finalisierung	33
2.8. Postmortale-Angiographie	33
2.9. Vorbereitung der Herzen auf die Micro-CT-Untersuchung.....	33
2.10. Micro-CT Untersuchung	34

III. TEIL: URSPRUNG, ZEITLICHER ENTWICKLUNGSVERLAUF UND HISTOMORPHOLOGIE VON BRÜCKENKOLLATERALEN.....	34
2.11. Tierexperiment.....	34
2.12. Histologie und Immunhistologie.....	35
2.12.1. Gewebeentnahme.....	35
2.12.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbungen und Immunhistochemie.....	35
2.12.3. Auswertung der histologischen Schnitte.....	36
2.13. Statistik.....	37
3. ERGEBNISSE	38
I. TEIL: METHODENETABLIERUNG ZUR HERSTELLUNG VON KORROSIONSPRÄPARATEN UND ANFERTIGUNG POSTMORTALER ANGIOGRAPHIEN IN VERBINDUNG MIT DER STEREOSKOPIE.....	38
3.1. Postmortale Kontrastmittelperfusion.....	38
3.1.1. Etablierung der Versuchsaufbauten 1-3.....	38
3.1.2. Etablierung der Kontrastmittel.....	39
3.2. Stereoskopie.....	42
3.3. Korrosionsmethode.....	43
II. TEIL: NACHWEIS PRÄEXISTENTER KOLLATERALEN SOWIE INDUKTION UND ANALYSE VON KOLLATERALISIERUNG IM SCHWEINEHERZEN.....	45
3.4. Korrosionsmethode.....	45
3.5. Tierexperimente.....	46
3.6. Superfizielle Kollateralen.....	46
3.6.1. Interkoronare Kollateralen.....	48
3.6.2. Intrakoronare Kollateralen.....	50
3.6.3. Brückenkollateralen.....	52
3.7. Tiefe Kollateralen.....	54
3.7.1. Subendokardiale Kollateralen auf dem Papillarmuskel.....	54
3.7.2. Intramurale Kollateralen auf dem Moderatorband.....	55
III. TEIL: URSPRUNG, ZEITLICHER ENTWICKLUNGSVERLAUF UND HISTOMORPHOLOGIE VON BRÜCKENKOLLATERALEN.....	57
3.8. Ursprung der Brückenkollateralen.....	57
3.9. Wachstumsprozess der Brückenkollateralen.....	58
3.9.1. Monocyteninvasion.....	58
3.9.2. Gefäßproliferation.....	60
3.9.3. Gefäßwachstum.....	62
3.10. Histomorphologie der Brückenkollateralen.....	64
4. DISKUSSION	66
I. TEIL: METHODENETABLIERUNG ZUR HERSTELLUNG VON KORROSIONSPRÄPARATEN UND ANFERTIGUNG POSTMORTALER ANGIOGRAPHIEN IN VERBINDUNG MIT DER STEREOSKOPIE.....	66
4.1. Postmortale Angiographie.....	67
4.1.1. Rigor mortis.....	67

4.1.2.	Vorperfusion.....	68
4.1.3.	Perfusionstechnik.....	68
4.1.4.	Reihenfolge der Koronarperfusion.....	68
4.1.5.	Perfusionsdruck, Perfusionslänge und Kontrastmittel	69
4.2.	Ausrollen des Herzens	70
4.3.	Stereoskopie.....	70
4.4.	Korrosionsmethode.....	72
II. TEIL: NACHWEIS PRÄEXISTENTER KOLLATERALEN SOWIE INDUKTION UND ANALYSE VON KOLLATERALISIERUNG IM SCHWEINEHERZEN.....		73
4.5.	Superfizielle Kollateralen.....	74
4.5.1.	Interkoronare Kollateralen	75
4.5.2.	Intrakoronare Kollateralen	76
4.5.3.	Brückenkollateralen	77
4.6.	Tiefe Kollateralen	77
4.6.1.	Subendokardiale Kollateralen auf dem Papillarmuskel	77
4.6.2.	Intramurale Kollateralen auf dem Moderatorband	78
4.7.	Kollateralisierung des Schweineherzens.....	79
III. TEIL: URSPRUNG, ZEITLICHER ENTWICKLUNGSVERLAUF UND HISTOMORPHOLOGIE VON BRÜCKENKOLLATERALEN.....		80
4.8.	Ursprung der Brückenkollateralen	81
4.9.	Entwicklungsprozess der Brückenkollateralen	84
4.10.	Histomorphologie der Brückenkollateralen	88
IV. TEIL: BEWERTUNG DES TIERMODELLS UND DER METHODE FÜR DIE EIGNUNG IN DER ARTERIOGENESEFORSCHUNG.....		89
4.11.	Bewertung des Tiermodells.....	89
4.12.	Bewertung der Methoden.....	91
4.12.1.	Korrosionsmethode	92
4.12.2.	Postmortale Angiographie	92
4.12.3.	Micro-CT	93
4.12.4.	Immunhistologie	94
4.13.	Ausblick	95
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	96
6.	QUELLENVERZEICHNIS	99
7.	APPENDIX	I
7.1.	Abkürzungsverzeichnis	I
7.2.	Danksagung.....	III
7.3.	Curriculum Vitae	V
7.4.	Eidesstattliche Erklärung.....	X

1. EINLEITUNG

1.1. Der biologische Bypass

Stenosierende kardiovaskuläre Erkrankungen gehören zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland und anderen Industrienationen ^{43, 46, 102}. Aktuelle Therapieansätze der koronaren Herzkrankheit (KHK) umfassen neben der Förderung eines gesundheitsbewussten und körperlich aktiven Lebensstils die medikamentöse und invasive Therapie. Die medikamentöse Therapie besteht in der pharmakologischen Senkung des Sauerstoffverbrauchs minderversorgter Funktionsareale. Dabei kommt es aber durch die Senkung des myokardialen Energieumsatzes zu einer Reduktion der Herzfunktion. Die invasive Therapie zielt darauf ab, hämodynamisch relevante Gefäßeinengungen oder -verschlüsse zu eröffnen (perkutane Ballonangioplastie) oder operativ zu umgehen (Bypass-Operation), um so eine ausreichende Perfusion herzustellen ¹². Die Limitation der Methoden liegt jedoch in der Pathophysiologie der chronisch progredienten, atherosklerotischen Gefäßerkrankung, die in bis zu 1/3 der Fälle zu Restenosen ⁴⁶ und Verschlüssen der erkrankten Konduktanzarterien und der Bypässe führt. Hinzu kommt, dass die konventionellen Revaskularisationsverfahren bei langstreckigen und diffusen, höhergradigen Stenosierungen, bei schmalkalibrigen Gefäßen und bei Obstruktion der Endstrombahn keine langfristige Therapieoption darstellen ¹².

Eine potentielle Therapiealternative, die in den vergangenen Jahren Gegenstand intensiver Forschung war, stellt die Induktion eines „biologischen Bypasses“ dar. Seit langem ist bekannt, dass Patienten mit einer ischämischen Gefäßerkrankung dazu neigen, natürliche Bypässe, d.h. Kollateralen, die die Stenose oder den Verschluss umgehen, auszubilden ^{8, 33, 95}. Klinische Studien zeigten, dass Patienten mit einem Verschluss einer Koronararterie keine oder nur minimale Symptome aufweisen, wenn Kollateralen vorhanden sind. Kollateralen waren mit einem niedrigerem Risiko, ein linksventrikuläres Aneurysma zu entwickeln, einer besseren linksventrikulären Funktion, einer höheren Überlebensrate nach einem Myokardinfarkt und einer kleineren Infarktausdehnung assoziiert ³². Die therapeutische Stimulation von Kollateralwachstum stellt daher eine interessante Behandlungsoption von stenosierenden, kardiovaskulären Erkrankungen dar. Um einen solchen Ansatz zu entwickeln, ist es wichtig, die Mechanismen des Wachstums von Gefäßen im Allgemeinen und von Kollateralgefäßen im Speziellen zu analysieren ⁴⁶.

1.1. Formen des Gefäßwachstums

Die Bildung eines Netzwerkes von Gefäßen ist eine wesentliche Voraussetzung für die Versorgung und das Wachstum von Geweben und Organen. Es werden drei unterschiedliche Formen der Gefäßbildung (Vaskularisierung) unterschieden: Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese^{14, 15}.

1.1.1. Vaskulogenese

Die Vaskulogenese beschreibt den Entwicklungsprozess eines primitiven, primären Netzwerkes aus Endothelvorläuferzellen (pluripotente Angioblasten)⁷¹. Sie stellt den ersten morphologischen Prozess von Gefäßentwicklung dar und findet zu einem frühen Zeitpunkt während der Embryogenese statt. Das kardiovaskuläre Organsystem ist das erste, das während der Embryonalentwicklung ausgebildet wird^{71, 72}. Hämangioblasten formen im Dottersack Zellgruppen, deren innere Zellpopulation sich zu hämatopoetischen Vorläuferzellen und deren äußere sich zu undifferenzierten Angioblasten entwickeln^{21, 71, 72}. Letztere differenzieren sich unter anderem unter dem Einfluss von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Basic Fibroblast Growth-Factor-2 (bFGF-2) zu Endothelzellen²¹ und bilden ein primitives Netzwerk, das von glatten Muskelzellen (Smooth Muscle Cells (SMC)) umlagert und so stabilisiert wird⁷². Die Weiterentwicklung in ein komplexes Gefäßsystem erfolgt mit dem Einsetzen des Blutflusses durch Angio- und Arteriogenese.

Neuere Studien ergaben, dass Vaskulogenese auch postnatal, zum Beispiel beim Tumorwachstum, vorkommen kann. Aus dem Knochenmark mobilisierte Angioblasten differenzieren sich dabei im Tumor zu Endothelzellen und werden in die Wand von wachsenden Kapillaren eingebaut^{3, 4}.

1.1.1. Angiogenese

Angiogenese ist definiert als das Aussprossen von neuen Kapillaren aus präexistenten Gefäßen oder als Teilung einer Kapillare in zwei gleich starke neue Gefäße (intussusception), welche neue kapilläre Netzwerke bilden^{27, 71}. Kapillaren bestehen aus Röhren von Endothel, denen

zusätzliche Wandstrukturen, wie glatte Muskelzellen, Adventitia oder andere stabilisierende Strukturen oder Zellen fehlen. Hauptstimulus der Angiogenese ist die Hypoxie im umliegenden Gewebe, wie sie z.B. beim Myokardinfarkt entsteht^{15, 45, 93}. Diese führt zur Aktivierung von Hypoxie induzierten Transkriptionsfaktoren (HIFs), die die Expression vieler angiogener Faktoren induzieren: VEGF führt zur Proliferation von Endothelzellen und gesteigerter Gefäßpermeabilität, Nitric Oxide Synthase (NOS) zur Vasodilatation, Platelet-derived Growth Factor (PDGF), Angiopoetin-2, Transforming Growth Factor-Beta (TGF-β), Fibroblast Growth Factor (FGF) und Hepatocyte Growth Factor (HGF)¹⁵. Lokal freigesetzte Wachstums- und Entzündungsfaktoren bewirken eine Vasodilatation, gesteigerte Gefäßpermeabilität und Akkumulation von Monocyten, die wiederum weitere Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren sezernieren^{2, 31, 48}.

Das Aussprossen von Kapillaren führt zur Zunahme der Kapillardichte, während gleichzeitig der Raum zwischen benachbarten Kapillaren reziprok abnimmt. Da Sauerstoff nur über eine kurze Distanz diffundieren kann, steigert die Angiogenese die Durchblutung des hypoxischen Gewebes und sichert das lokale Sauerstoff- und Nährstoffangebot⁴¹.

Im adulten Organismus findet Angiogenese sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen statt: in den weiblichen Geschlechtsorganen während des Ovarialzyklus, bei der Wundheilung, beim Tumorwachstum³⁰ bei der proliferativen Retinopathie, Psoriasis, Haemangiomen und Arteriosklerose⁴⁵.

1.1.2. Arteriogenese

Arteriogenese beschreibt den aktiven Wachstumsprozess von präexistenten kollateralen Anastomosen zu funktionell bedeutsamen Konduktanzgefäßen^{2, 14, 45, 80}. Nach der Okklusion eines Hauptgefäßes stellen kleine, präexistente arterioläre Anastomosen, die einen Innendurchmesser von 30–50 µm haben¹², die einzige Verbindung zwischen dem präokklusiven Hochdruckgebiet und poststenotischen Tiefdruckgebiet dar (Abb. 1). Es entsteht so ein steiler Druckgradient über diesen biologischen Bypässen.

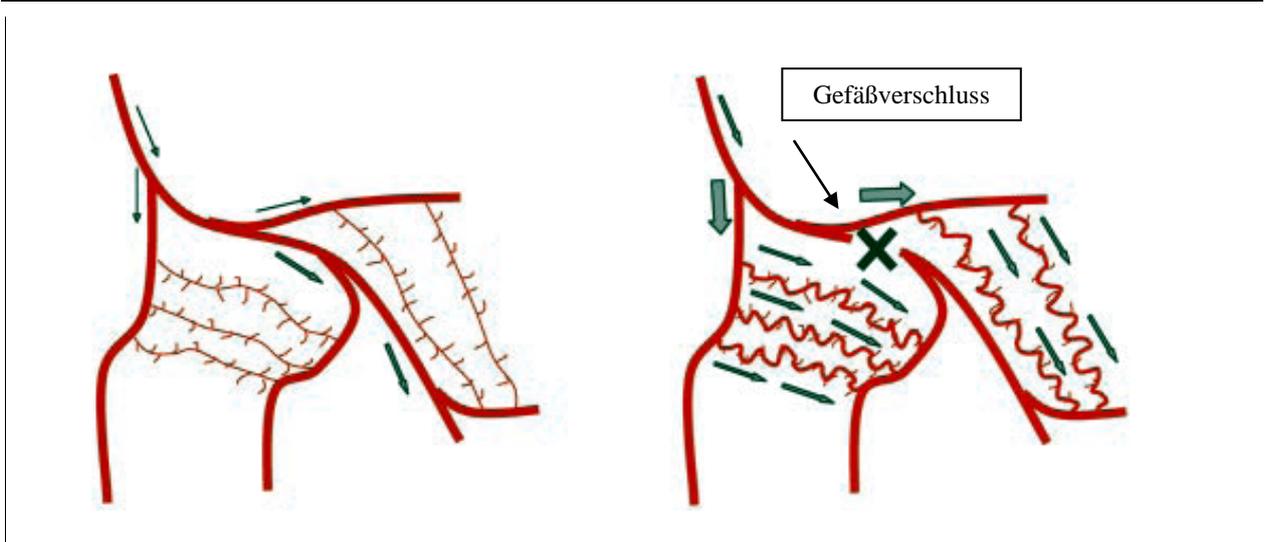


Abb. 1 – Das Prinzip der Arteriogenese, modifiziert nach Heil und Schaper⁴²

Nach dem Gesetz von Hagen-Poiseuille für laminare Strömung, nach dem sich der Volumenstrom \dot{V} proportional zur vierten Potenz des Radius r verändert, führen bereits kleine Änderungen im Gefäßdiameter zu einer wesentlichen Veränderung des Blutflusses.

$$\dot{V} = \frac{\pi r^4 \Delta p}{8\eta l} \left[\frac{m^3}{s} \right] \text{ Hagen- Poiseuille'sches Gesetz für laminare Strömung in Gefäßen}$$

\dot{V} : Volumenstrom, r : Innenradius des Gefäßes, Δp : Druckdifferenz zwischen Anfang und Ende des Gefäßes, η : Viskosität des Blutes, l : Länge des Gefäßes

Je höher der Widerstand im Gefäß durch die Abnahme des Gefäßradius ist, desto kleiner wird die Konduktanz (G) des Gefäßes. Die Konduktanz eines Gefäßes beschreibt die Abhängigkeit des Blutflusses vom Perfusionsdruck und ist definiert als:

$$G = \frac{1}{R} = \frac{\dot{V}}{\Delta p} \left[\frac{cm^5}{Ns} \right] \text{ Definition der Konduktanz}$$

R : Gefäßwiderstand, \dot{V} : Volumenstrom, Δp : Druckdifferenz

So bedingt eine Verengung des Gefäßquerschnitts um 10% einen Rückgang des Blutflusses um ca. 34%, der nur durch eine Steigerung der Druckdifferenz um ca. 52% kompensiert werden kann. Da die arteriolen Anastomosen die gesamte Blutversorgung des Hauptgefäßes

übernehmen, erhöht sich in ihnen die Durchflussgeschwindigkeit des Blutes und verschiedene physikalische Kräfte wirken auf die Gefäßwand ein.

Die wichtigste Kraft ist die Schubspannung, die die Scherung des Blutes an der Gefäßwand darstellt. Nimmt man eine Newton'sche Flüssigkeit an, ist die Schubspannung (τ) definiert als:

$$\tau = \frac{4\eta\dot{V}}{r^3\pi} \left[\frac{N}{m^2} \right] \text{ Definition der Schubspannung}$$

τ : Schubspannung, η : Viskosität des Blutes, \dot{V} : Volumenstrom, r : Innenradius des Gefäßes

Die Schubspannung verhält sich also direkt proportional zur Geschwindigkeit des Blutflusses und reziprok zum Radius. Bereits der Anatom Thoma erkannte vor über 100 Jahren den Zusammenhang zwischen dem Radius eines Gefäßes und der Strömungsgeschwindigkeit des Blutes¹⁰⁰. Eine Veränderung dieses Verhältnisses führt entweder zu Wachstum oder Atrophie¹⁵. Gefäße passen sich also dem Blutfluss in ihnen an, um die Schubspannung, die in ihnen auftritt, zu optimieren⁶⁷. Die Schubspannung gilt heute als wichtigste Kraft zur Induktion und Stimulation von Arteriogenese^{14, 15, 41, 45, 52}. Andere physikalische, Druck abhängige Kräfte, wie circumferentielle, radiale und longitudinale Wandspannung, spielen eine untergeordnete Rolle^{82, 83}.

Die Schubspannung aktiviert die Endothelzellen in der Gefäßwand, was zur Expression von Adhäsionsmolekülen, wie Intercellular Adhesion Molecule-1 und 2 (ICAM-1/2) und Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1)⁵² und Zytokinen, wie Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), führt. Leukozyten, v.a. Monocyten, werden angelockt, lagern sich an das Endothel an und transmigrieren. Nach Invasion in die Kollateralgefäßwand differenzieren sich die Monocyten zu Makrophagen und sezernieren diverse Faktoren. Dies sind zum einen Zytokine, wie u.a. der Tumornekrosefaktor TNF α , der die Tunica media des Gefäßes zerstört und ein lokalinflammatorisches, perivaskuläres Milieu schafft, in dem durch MCP-1 weitere Monocyten angelockt werden, TGF- β , das wiederum weitere Wachstumsfaktoren freisetzt (PDGF, bFGF), die als endotheliales Mitogen wirken¹², und Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor (GM-CSF), der die Lebensdauer von Monocyten verlängert^{14, 15}. Zum anderen werden Gewebe abbauende Proteasen, wie Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (u-PA) und Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sezerniert, die die extrazelluläre

Matrix um die wachsenden Kollateralen herum abbauen und so einen Raum für das proliferierende Kollateralgefäß schaffen^{20,21}. Die das Gefäß umgebenden endothelialen Zellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten werden in der Folge stimuliert, beginnen zu proliferieren und das Gefäß zu vergrößern¹⁹. Nach dem Hagen-Poiseuille'schen Gesetz reichen bereits kleine Änderungen des Gefäßdurchmessers eines präexistenten Gefäßes aus, um relativ schnell den Verschluss eines Gefäßes zu kompensieren.

Arteriogenese hat eine hohe klinische Relevanz, da sie den effektivsten und physiologisch wichtigsten Mechanismus zur Kompensation eines Gefäßverschlusses darstellt²¹. Arteriogenese ist aber nicht nur auf pathophysiologische Situationen beschränkt, sondern spielt auch unter physiologischen Bedingungen eine wichtige Rolle: Der erhöhte Blutbedarf im wachsenden Uterus während der Schwangerschaft wird durch den arteriogenen Umbau uteriner Arterien gewährleistet. Nach der Schwangerschaft nehmen diese Gefäße im Umfang wieder ab⁶⁶.

1.1.3. Vergleich von Arteriogenese und Angiogenese

Die Unterscheidung zwischen Angiogenese und Arteriogenese ist entscheidend, da nur Arteriogenese geeignet ist, einen biologischen Bypass zu entwickeln. Dies sollen folgende drei Überlegungen zeigen:

1. Beide Prozesse finden räumlich getrennt, aber zeitlich parallel statt. Angiogenese läuft in den von Ischämie betroffenen hypoxischen Gebieten distal der Gefäßokklusion ab, Arteriogenese weiter proximal in nicht-ischämischen Gebieten, um die Okklusion herum⁴¹.
2. Die zunehmende Anzahl an Kapillaren in der Ischämierregion kann den Blutfluss zum hypoxischen Gefäßgebiet nicht signifikant steigern, wenn die limitierende Struktur stromaufwärts liegt. Dies wurde in klinischen Studien belegt, in denen therapeutisch induzierte Angiogenese zwar zu einer signifikanten Zunahme der Kapillardichte, aber nicht der Gewebsperfusion geführt hat¹⁰⁷.
3. Nach dem Hagen-Poiseuille'schen Gesetz wäre, um den Blutfluss einer großen Konduktanzarterie zu ersetzen, ein Kapillarbett nötig, dessen Ausmaß das umliegende Funktionsgewebe vollständig verdrängen würde. Hämodynamisch ist es daher günstiger, den Durchmesser einer bereits bestehenden Arteriole zu vergrößern¹².

Die drei wichtigsten Unterschiede zwischen Arteriogenese und Angiogenese sind: Arteriogenese wird induziert über biomechanische Kräfte, ist unabhängig von Ischämie und Hypoxie und ist abhängig von zirkulierenden Monocyten^{14,16}.

1.2. Definition und Einteilung von Kollateralen

Schaper führt in seinem Buch „The collateral circulation of the heart“ aus, dass Verbindungen zwischen den Ästen der Koronararterien, die größer als Kapillaren sind, entweder Anastomosen oder Kollateralen genannt werden würden. Während deutsche Autoren sich in ihrer Nomenklatur nach Spalteholz⁹⁵ gerichtet hätten, der Kollateralen als arterielle Verbindungen zwischen den Ästen derselben Koronararterie, Anastomosen als Verbindungen zwischen den beiden Koronararterien bezeichnete, würde die anglo-amerikanische Literatur diese beiden Wörter synonym gebrauchen⁷⁸. Nach Schaper wird sich die vorliegende Arbeit nach dem anglo-amerikanischen Sprachgebrauch richten.

Nach Rockstroh können vier Typen von koronaren Kollateralen nach ihrer Lokalisation unterschieden werden: interatriale, interkoronare, intraseptale und Brückenkollateralen⁷⁴. Interatriale Kollateralen anastomosieren die Gefäße der Vorhöfe. Interkoronare Kollateralen sind Verbindungen zwischen zwei verschiedenen Koronararterien. Intraseptale Kollateralen, die auch intrakoronar genannt werden, sind Gefäße, die eine Verbindung zwischen Segmenten derselben Koronararterie herstellen⁷⁸. Der Begriff Brückenkollaterale bezeichnet eine intrakoronare Kollaterale, die kurzstreckig eine Stenose oder einen Verschluss überbrückt.

1.3. Kollateralen im Schweineherzen

In der Literatur wird kontrovers diskutiert, ob es präexistente Anastomosen im nativen Schweineherzen gibt. Vastesaegeer et al. meinten, dass die Existenz von Anastomosen im Schweineherzen unzweifelhaft sei (sie sahen in 85% der Schweineherzen Anastomosen)¹⁰³, wobei Bellman et al. ihnen beipflichtete⁹. Robbins et al. beobachteten in 75% der von ihnen untersuchten Herzen Anastomosen⁷³, Lumb et al. in 70%⁶³ und Rodrigues et al. in allen⁷⁵.

Schaper dagegen stellte fest, dass es ihm schwer falle, Anastomosen zu finden⁷⁸ und Blumgart et al. fanden bei ihren Untersuchungen nur äußerst selten Anastomosen (in einem von 44

Schweinen)¹¹. Zoll et al. entdeckten sie in nur 2 von 134 untersuchten Schweineherzen¹⁰⁸, Paul et al. nur in 3 von 161 Schweineherzen⁶⁸. Heil et al. verneinten ihre Existenz ganz⁴¹. Wenn Anastomosen beim Schwein identifiziert wurden, wurden sie als stark vergrößerte Kapillaren beschrieben, die die Funktion von Kollateralen übernehmen könnten. Die Kapillaren bleiben aber dünnwandig, da sie keine glatten Muskelzellen rekrutieren können^{32, 83, 90}.

Es gibt verschiedene Vermutungen darüber, worauf die widersprüchlichen Befunde zurückzuführen sind: Die Ursache könnte einerseits in den verschiedenen Schweinerassen liegen, die verwendet wurden⁷³, andererseits in der unterschiedlichen, angewandten Methodik zum Gefäßnachweis⁷⁸.

Die meisten experimentellen Studien in der Arteriogeneseforschung werden an Kleintieren durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studien sind nicht direkt auf den Menschen übertragbar, da einerseits durch die Größe der Gefäße der Arteriogeneseprozess beim Menschen länger dauert und andererseits die präexistente Kollateralisierung sich unterscheidet¹⁸. Das Schwein hingegen ist zur Untersuchung des Arteriogeneseprozesses gut geeignet, da es in seinem schwach ausgebildeten, koronaren kollateralen Netzwerk dem Menschen sehr ähnlich ist¹⁰⁶.

1.4. Brückenkollateralen

In Studien wurden Brückenkollateralen in chronischen Verschlüssen der Koronararterien^{32, 77, 94}, der A. carotis interna^{22, 55, 65}, der Aorta abdominalis¹ und der peripheren Gefäße⁹⁹ nachgewiesen. Am Herzen stellen nach Cosby et al. Brückenkollateralen einen Schutz gegen ausgeprägte myokardiale Nekrose nach chronischem Gefäßverschluss dar, die vor allem bei Patienten mit Angina pectoris ohne einen Myokardinfarkt gesehen werden²³. Obwohl Brückenkollateralen ein häufiges Phänomen sind, sind ihr Ursprung und ihre Entwicklungsdynamik immer noch unklar.

In diesem Zusammenhang könnten Vasa Vasorum (VV) eine wichtige, aber bis jetzt noch nicht vollständig verstandene Rolle spielen. VV sind funktionelle Endarterien mit einer baumähnlichen Struktur, wobei der Stamm arteriolär ist, die Äste kapillär sind. Präexistente arterioläre Anastomosen verbinden die VV miteinander³⁶. VV werden eingeteilt in Vasa Vasorum interna (VVI), die vom Gefäßlumen entspringen, Vasa Vasorum externa (VVE), die von

großen Gefäßästen entspringen und venösen Vasa Vasorum (VVV), die die arteriellen VV drainieren³⁷. Außerdem klassifizierten Kwon et al. VV nach ihrer Ausrichtung zum Hauptgefäß in zwei unterschiedliche Typen: VV, die longitudinal, parallel zum Hauptgefäß verlaufen (Typ 1) und VV, die zirkumferentiell um das Hauptgefäß herum verlaufen (Typ 2)⁵⁹.

VV haben unterschiedliche Funktionen: Sie versorgen die Adventitia und den äußeren Teil der Media von Gefäßen > 0.5 mm im Durchmesser mit Sauerstoff^{1,60}. Ihre Rolle in der Pathogenese der Arteriosklerose^{6, 26, 57, 60}, der Hypertension⁶⁴ und nach perkutaner Angioplastie^{24, 56, 58, 76} wird diskutiert. Außerdem nehmen VV bei einem chronischen Gefäßverschluss an der Kollateralisierung teil^{22, 32, 96}. Die Vermutung liegt daher nahe, dass sich Brückenkollateralen durch Arteriogenese aus VV entwickeln^{32, 46}. Diese Hypothese konnte bis heute nicht bewiesen werden. Ein vertieftes Wissen über die Entwicklung von Brückenkollateralen könnte wichtige klinische Implikationen für die Therapie der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit und der koronaren Herzkrankheit haben, zum Beispiel durch die therapeutische Stimulation von Arteriogenese.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Der biologische Bypass stellt eine aussichtsreiche Behandlungsalternative bei der Therapie von stenosierenden, kardiovaskulären Erkrankungen dar. Seit vielen Jahrzehnten wird daher intensiv an dem physiologischen Prozess der Arteriogenese geforscht.

Ziel der Arbeit ist die Etablierung eines Großtiermodells, in dem unter ähnlichen Bedingungen wie beim Menschen die Arteriogenese erforscht werden kann. Voraussetzung dafür ist zunächst die Etablierung einer Bildgebung, die präexistente Kollateralen darstellen und den Entwicklungsprozess von Kollateralen durch Arteriogenese abbilden kann. In der vorliegenden Arbeit werden daher die Methode der Korrosionspräparate und die postmortale Angiographie in Verbindung mit der Stereoskopie etabliert (I. Teil).

Weiterhin muss die Frage geklärt werden, ob es im Schweineherzen überhaupt präexistente Anastomosen gibt. Wenn dies bestätigt wird, soll geprüft werden, ob es zum Kollateralwachstum durch Arteriogenese nach Induktion einer Gefäßokklusion kommt, in welchen Schritten die Kollateralisierung im Schwein abläuft und welche Gefäße vornehmlich rekrutiert werden. Die

Gefäßokklusion wird in dieser Studie mit Hilfe eines minimal-invasiv in die linke Koronararterie implantierten Kupferstents induziert (II. Teil).

Anschließend soll die Hypothese geprüft werden, ob sich Brückenkollateralen aus VV entwickeln. Um die Wachstumsdynamik von Brückenkollateralen darzustellen, wird ihre zeitliche Entwicklung im Zeitverlauf über 12 Tage analysiert und mit Hilfe der Immunhistochemie quantifiziert. Abschließend soll der histologische Aufbau der Brückenkollateralen untersucht werden (III. Teil).

Nach der Etablierung der Methode zum Nachweis von Kollateralen am Anfang der Arbeit wird die Bewertung der Methode und des Tierexperimentes in Hinsicht auf ihre Eignung in der Arteriogeneseforschung den Abschluss der Arbeit bilden (IV. Teil).

Zusammenfassend liegt dieser Arbeit folgende Zielsetzung zu Grunde:

1. Methodenetablierung zur Herstellung von Korrosionspräparaten und Anfertigung postmortaler Angiographien in Verbindung mit der Stereoskopie zur Darstellung von Kollateralen am Schweineherzen.
2. Nachweis präexistenter Kollateralen im Schweineherzen, Induktion der Arteriogenese im Tierexperiment und Analyse der Kollateralisierung im Schweineherzen.
3. Ursprung, zeitlicher Entwicklungsverlauf und Histomorphologie von Brückenkollateralen im Schweineherzen.
4. Bewertung der Methode und des Tierexperiments am Schwein in Hinsicht auf ihre Eignung in der Arteriogeneseforschung.

2. MATERIAL UND METHODEN

I. Teil: Methodenetablierung zur Herstellung von Korrosionspräparaten und Anfertigung postmortaler Angiographien in Verbindung mit der Stereoskopie

2.1. Tiermaterial

Für die Etablierung der postmortalen Kontrastmittelperfusion und der Herstellung von Korrosionspräparaten wurden Herzen von Schlachthofschweinen (Teltow-Ruhlsdorf, Berlin) verwendet. Die Etablierung stereoskopischer Aufnahmen mit Hilfe der Mammographietechnik erfolgte mit Herzen der Versuchstiere aus dem II. und III. Teil der Studie.

2.2. Postmortale Kontrastmittelperfusion

Insgesamt wurden zur Methodenetablierung 34 Schweineherzen postmortal mit Röntgenkontrastmittel (KM) perfundiert. Es wurden vier unterschiedliche Kontrastmittel eingesetzt, drei Bariumsulfat-Kontrastmittel (26 Herzen) und ein Bismuth-Kontrastmittel (8 Herzen).

Nach Versuchen zur Etablierung des Versuchsaufbaus und der Versuchsdurchführung wurden folgende Parameter für jedes Kontrastmittel eingestellt:

1. Zeitpunkt der Perfusion (vor oder nach Lösen des Rigor mortis am Herzen)
2. Perfusionsdruck
3. Dauer der Perfusion
4. Reihenfolge der Perfusion (Perfusion aller Koronararterien gleichzeitig oder nacheinander)

2.2.1. Versuchsaufbau 1-3

Insgesamt wurden drei Versuchsaufbauten untersucht. Im Grundaufbau waren alle verwendeten Perfusionssysteme ähnlich. Unterschiede gab es im Mechanismus zur Einstellung des Perfusionsdrucks und in Vorrichtungen zum Entlüften des Systems. Zuerst wird auf die Gemeinsamkeiten eingegangen, anschließend werden die Versuchsaufbauten in ihren Unterschieden getrennt vorgestellt.

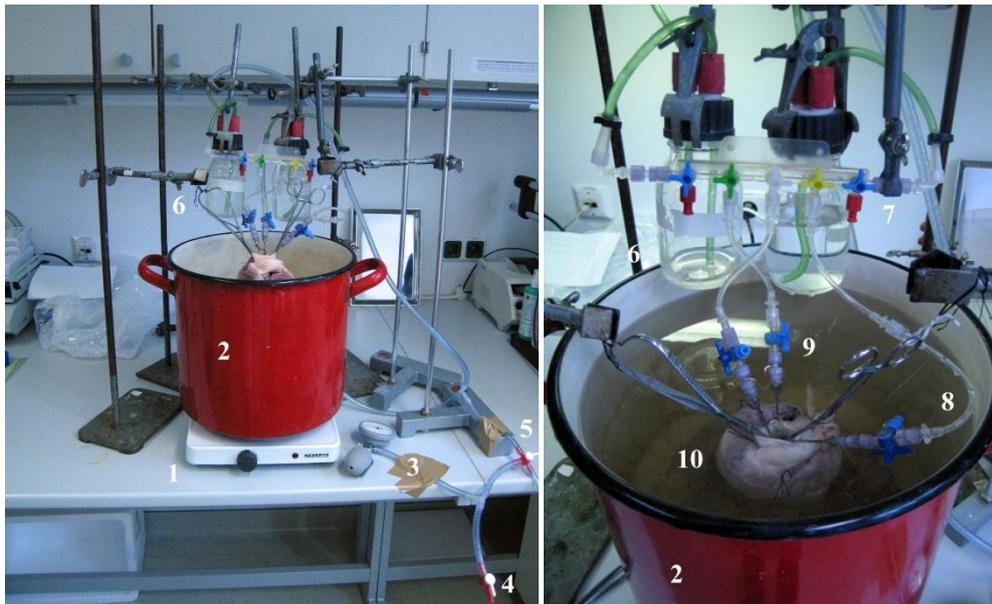


Abb. 2 – Versuchsaufbau 3

1: Heizplatte, 2: Topf, 3: Manometer, 4: Hahn zur Einstellung des Perfusionsdrucks, 5: Hahn zur Einstellung der Luftzufuhr, 6: 250 ml-Flaschen für Kontrastmittel oder 0.9%-iges NaCl, 7: Drei-Wege-Hahn-Bank, 8: Heidelberger Verlängerung, 9: 3-Wege-Hahn zur Entlüftung, 10: Schweineherz mit Knopfkanülen

Allen Versuchsaufbauten gemeinsam war die Perfusion des Schweineherzens in einem mit ca. 10 l, 40-50° C warmem Wasser gefüllten Topf (Abb. 2 – 2). Die Wassertemperatur wurde mit einer Heizplatte (Abb. 2 – 1) eingestellt und kontinuierlich mit einem Thermometer gemessen.

Das Perfusionssystem bestand aus zwei 250 ml-Flaschen (Abb. 2 – 6), in die über je einen zuführenden Schlauch Pressluft gelangte. Der in die Flasche führende Schlauch endete nach 3 cm im Flaschenhals. Ein ableitender Schlauch aus jeder Flasche führte den Flascheninhalt, eine

0.9%-ige NaCl-Lösung (Merck KGaA) oder ein KM, vom Boden der Flasche zu einer Drei-Wege-Hahn-Bank (Smiths Medical Deutschland GmbH) (Abb. 2 – 7), die über Kunststoffschläuche (Heidelberger Verlängerungen, Smiths Medical Deutschland GmbH) (Abb. 2 – 8) mit je einer Knopfkanüle (Abb. 2 – 10) verbunden waren.

Die beiden Schläuche, die die Pressluft in die Flaschen leiteten, führten zu einem gemeinsamen Drei-Wege-Hahn (Carl Roth GmbH) (Abb. 2 – 5). So konnte die Pressluftzufuhr zu den beiden Flaschen eingestellt werden. Über ein T-Stück im Schlauchsystem war ein Barometer (B. Braun Melsungen AG) (Abb. 2 – 3) an das Perfusionssystem angeschlossen.

Folgende Versuchsaufbauten kamen zum Einsatz:

Versuchsaufbau 1:

Bei dem Versuchsaufbau handelte es sich um ein geschlossenes System. Die Pressluft wurde über ein zweischenkliges System zum einen direkt zum Barometer, zum anderen zu den KM-Flaschen geleitet.

Versuchsaufbau 2:

Bei dem Versuchsaufbau handelte es sich um ein offenes System. Die Pressluft wurde über ein dreischenkliges System zum Barometer, zu den KM-Flaschen und zu einem offen endenden Schlauch geleitet.

Versuchsaufbau 3:

Bei dem Versuchsaufbau handelte es sich um ein halb offenes System. Die Pressluft wurde über ein dreischenkliges System zum einen zum Barometer, zum anderen zu den KM-Flaschen sowie zu einem Schlauch geleitet, dessen Öffnungslumen mit einem Hahn (B. Braun Melsungen GmbH) (Abb. 2 – 4) eingestellt wurde. Vor jeder Knopfkanüle befand sich ein Drei-Wege-Hahn (B. Braun Melsungen GmbH) (Abb. 2 – 9), über den die zuführende Heidelberger Verlängerung vor der Perfusion entlüftet werden konnte.

2.2.2. Versuchsdurchführung

Nach der Organentnahme wurden die Herzen von Blutresten gereinigt und die Koronararterien mit einer Lösung (300 ml 0.9%-iges NaCl und 5000 IE Heparin (Heparin-Rotexmedica, Rotexmedica GmbH)) gespült. Anschließend wurden die linke Koronararterie (Left Coronary Artery, LCA), der Ramus circumflexus (RCX), der beim Schwein sehr weit proximal von der LCA abgeht und die oft zusammen aus einem gemeinsamen Ostium entspringen, und die rechte Koronararterie (Right Coronary Artery, RCA) kurz hinter ihrem Abgang aus der Aorta ascendens aufgesucht, frei präpariert, jeweils eine Knopfkanüle über die Ostien in die Koronararterien eingebunden und mit dem Perfusionssystem verbunden. Das Herz befand sich während der Perfusion im Wasserbad. Die Perfusion erfolgte je nach Versuchsaufbau unterschiedlich. Sie wird deswegen für jeden Versuchsaufbau im Einzelnen beschrieben (s.u.).

Im Allgemeinen setzt sich die Perfusion aus zwei Schritten zusammen: einer Perfusion der LCA, des RCX und der RCA mit je 200 ml 0.9%-iger NaCl-Lösung (so genannte „Vorperfusion“) und einer Perfusion mit verschiedenen Kontrastmitteln. Die Vorperfusion erfüllt zwei Aufgaben: erstens dient sie der Entlüftung des Perfusionssystems, damit die zuführenden Leitungen luftleer sind und während der Perfusion keine Luft in die Koronararterien gelangt und dort als Luftblase Gefäße obstruiert, zweitens spült sie die Koronararterien frei von intravasalen Resten an Blutbestandteilen.

Während der anschließenden KM-Perfusion lagen die Flasche, die das KM enthielt, und alle zum Herzen führenden Schläuche des Perfusionssystems im warmen Wasserbad.

Für die Vor- und KM-Perfusion gelangte Druckluft in die Glasflasche, in der sich 0.9%-iges NaCl oder KM befand. Dadurch stieg das 0.9%-ige NaCl oder KM in den Schläuchen auf, die bis zum Boden der Flasche reichten, und gelangte über die Heidelberger Verlängerungen in die Knopfkanülen. Der Druck war bei der Vorperfusion und KM-Perfusion derselbe.

Nach der KM-Perfusion wurden die Herzen in aufrechter Lage in Eis gebettet.

Versuchsdurchführung beim Versuchsaufbau 1:

Es erfolgte keine Vorperfusion, nur eine KM-Perfusion. Die Perfusionszeit wurde nicht bestimmt. Der Perfusionsdruck wurde über die Pressluftzufuhr reguliert.

Versuchsdurchführung beim Versuchsaufbau 2:

Nach der Vorperfusion erfolgte die KM-Perfusion. Das KM wurde mit einer Temperatur von ca. 50°C perfundiert. Der Perfusionsdruck wurde bei konstant bleibender Pressluftzufuhr mit der Hand reguliert, mit der der offene Schlauch halb verschlossen wurde.

Versuchsdurchführung beim Versuchsaufbau 3:

Der Perfusionsdruck wurde durch Öffnen und Schließen des Hahns am Ende des offenen Schenkels des Perfusionssystems eingestellt. Anschließend wurde der Zwei-Wege-Hahn vor dem zu den Flaschen führenden Schlauchabschnitt geöffnet. Die Pressluft gelangte mit dem vorher eingestellten Druck in die Flaschen.

Vor der Vorperfusion und der KM-Perfusion wurden die zuführenden Leitungen über die Drei-Wege-Hähne, die sich direkt vor den drei Knopfkanülen befanden, entlüftet.

2.2.3. Kontrastmittel

Jedem untersuchtem Kontrastmittel wurde Gelatine hinzugefügt, da diese bei Raumtemperatur aushärtet und ein späteres Aufschneiden des Herzens ermöglicht. Um ein vorzeitiges Erstarren der Gelatine zu verhindern, wurden alle KM mit einer Temperatur von ca. 45° C injiziert. Die Herstellung des KMs musste unter vorsichtigem Rühren erfolgen, damit die zugegebene Gelatine nicht klumpte und sich nicht Luftblasen im KM bildeten.

Die Kontrastmittel wurden in folgenden Zusammensetzungen verwendet:

Bariumsulfat-KM 1 (nach Barmeyer⁷):

55g Bariumsulfat (Merck KGaA), 4g Gelatine (Carl Roth GmbH), 100 ml Leitungswasser. Die Bestandteile wurden auf einer Waage abgewogen, in ein Becherglas gegeben und auf einem beheizbaren Magnetrührer bei 45° C (MR82, Heidolph) miteinander vermengt.

Bariumsulfat-KM 2:

20g Bariumsulfat, 6g Gelatine, 50 ml 0.9%-ige NaCl-Lösung. Die Bestandteile wurden abgewogen, zusammen in ein Becherglas gegeben und auf einem Magnetrührer miteinander vermengt.

Bariumsulfat-KM 3:

30g Bariumsulfat, 6g Gelatine, 75 ml Leitungswasser. Die Bestandteile wurden auf einer Waage eingewogen. Das Bariumsulfat und 30 ml Wasser wurden in ein Becherglas gegeben und auf einem Magnetrührer vermengt. Gleichzeitig wurden die Gelatine und 45 ml Wasser auf einem beheizbaren Magnetrührer bei 45° C miteinander vermischt. Anschließend wurden beide Ansätze zusammengeführt und auf einem beheizbaren Magnetrührer bei 45° C durchmischt.

Bismuth-KM:

Das KM wurde nach der Anleitung von Schirmer⁸⁴ hergestellt.

2.2.4. Etablierung der Versuchsaufbauten 1-3

Etablierung des Versuchsaufbaus 1:

Zwei Schweineherzen wurden für den Versuch verwendet. Der Rigor mortis war gelöst. Die Herzen wurden mit Bariumsulfat-KM 3 perfundiert. Die Versuche wurden nach wenigen Sekunden abgebrochen. Der Perfusionsdruck betrug zu diesem Zeitpunkt 40-50 mmHg. Weitere Einzelheiten sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

MATERIAL UND METHODEN

Versuchs - Nr.	Herz - Nr.	Perfusionsdruck (mmHg)	Perfusionszeit (min)	Reihenfolge der Perfusion der Koronararterien	Rigor mortis
1	1	40-50	0.1	nacheinander	gelöst
	2	40-50	0.1	nacheinander	gelöst

Tabelle 1 – Versuchsdurchführung zur Etablierung des Versuchsaufbaus 1

Etablierung des Versuchsaufbaus 2:

Zwei Herzen wurden für den Versuch verwendet. Der Rigor mortis war gelöst. Die KM-Perfusion der Koronararterien erfolgte 3-4 Minuten lang je Koronararterie mit Bariumsulfat-KM 2 (Herz-Nr. 1) und 3 (Herz-Nr. 2) unter wechselnden Drucken. Weitere Einzelheiten sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Versuchs - Nr.	Herz - Nr.	Perfusionsdruck (mmHg)	Perfusionszeit (min)	Reihenfolge der Perfusion der Koronararterien	Rigor mortis
1	1	220-260	3-4	nacheinander	gelöst
	2	190-200	4	nacheinander	gelöst

Tabelle 2 – Versuchsdurchführung zur Etablierung des Versuchsaufbaus 2

Etablierung des Versuchsaufbaus 3:

Die Etablierung des Versuchsaufbaus Nr. 3 erfolgte mit allen weiteren 30 Herzen. Zur Beschreibung des Etablierungsprozesses wird auf die Beschreibung der Etablierung der verwendeten KM verwiesen.

2.2.5. Etablierung der Kontrastmittel

Etablierung des Bariumsulphat-KMs 1:

Insgesamt wurden vier Herzen mit diesem KM untersucht. Mit ihnen wurde der Einfluss des Perfusionsdruckes (150 vs. 200 mmHg) und des Perfusionszeitpunktes (vor vs. nach dem Lösen des Rigor mortis) auf das Perfusionsergebnis untersucht. Weitere Einzelheiten sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

Versuchs - Nr.	Herz - Nr.	Perfusionsdruck (mmHg)	Perfusionszeit (min)	Reihenfolge der Perfusion der Koronararterien	Rigor mortis
1	1	150	2	nacheinander	vorhanden
	2	200	2	nacheinander	vorhanden
2	3	150	2	nacheinander	gelöst
	4	200	2	nacheinander	gelöst

Tabelle 3 – Versuchsdurchführung zur Etablierung des Bariumsulphat-Kontrastmittels 1

Etablierung des Bariumsulphat-KMs 2:

Insgesamt wurden sechs Herzen mit diesem KM untersucht, ein Herz mit dem Versuchsaufbau 2 (s.o.), die anderen fünf mit dem Versuchsaufbau 3.

In einer ersten Versuchsreihe wurde mit vier Herzen der Einfluss des Perfusionsdrucks untersucht (150 mmHg vs. 200 mmHg) und des Perfusionszeitpunktes (vor vs. nach dem Lösen des Rigor mortis).

Nach der Auswertung der Perfusionsergebnisse der vorangegangenen Versuche wurde ein weiterer Versuch mit einer längeren Perfusionszeit von 4 Minuten vorgenommen. Weitere Einzelheiten sind der Tabelle 4 zu entnehmen.

MATERIAL UND METHODEN

Versuchs - Nr.	Herz - Nr.	Perfusionsdruck (mmHg)	Perfusionszeit (min)	Reihenfolge der Perfusion der Koronararterien	Rigor mortis
1	1	150	2	nacheinander	vorhanden
	2	200	2	nacheinander	vorhanden
2	3	150	2	nacheinander	gelöst
	4	200	2	nacheinander	gelöst
3	5	200	4	nacheinander	vorhanden

Tabelle 4 – Versuchsdurchführung zur Etablierung des Bariumsulfat-Kontrastmittels 2

Etablierung des Bariumsulfat-KMs 3:

Insgesamt wurden 16 Herzen mit dem KM untersucht. Zwei Herzen mit dem Versuchsaufbau 1 (s.o.), eines mit dem Versuchsaufbau 2 (s.o.), die anderen 13 Herzen mit dem Versuchsaufbau 3.

Die Etablierung erfolgte in vier Versuchsreihen: Zuerst wurde mit vier Schweineherzen untersucht, ob die sequenzielle und anschließend gleichzeitige Perfusion der Koronararterien bei einem konstanten Druck von 200 mmHg einen Einfluss auf das Perfusionsergebnis hat. Darüber hinaus wurde nach Auswertung der vorherigen Versuche der Einfluss längerer Perfusionszeiten geprüft.

In einem zweiten Versuch wurde mit vier Herzen untersucht, ob die Perfusionsergebnisse durch einen höheren Perfusionsdruck von 240 mmHg noch verbessert werden konnten.

Die Ergebnisse der zweiten Versuchsreihe wurden anschließend in einem weiteren Versuch mit drei Herzen, deren Koronararterien jeweils 5 min nacheinander und 1 min gleichzeitig perfundiert wurden, versucht zu bestätigen.

Abschließend wurden die wichtigsten Schritte der Versuchsdurchführung, wie die Herstellung des KMs, Entlüften des Perfusionssystems und Einstellung eines konstanten Drucks mit Hilfe von zwei Herzen etabliert. Details zu den Versuchen sind der Tabelle 5 zu entnehmen.

MATERIAL UND METHODEN

Versuchs - Nr.	Herz - Nr.	Perfusionsdruck (mmHg)	Perfusionszeit (min)	Reihenfolge der Perfusion der Koronararterien	Rigor mortis
1	1	200	4	nacheinander	vorhanden
	2	200	3/0.5	nacheinander/ gleichzeitig	gelöst
	3	200	3/1	nacheinander/ gleichzeitig	gelöst
	4	200	4/1	nacheinander/ gleichzeitig	gelöst
2	5	240	0.45/4/1	nacheinander/ gleichzeitig/ nacheinander	vorhanden
	6	240	5	nacheinander	vorhanden
	7	240	4/1	nacheinander/ gleichzeitig	gelöst
	8	240	5/1	nacheinander/ gleichzeitig	gelöst
3	9	240	5/1	nacheinander/ gleichzeitig	gelöst
	10	240	5/1	nacheinander/ gleichzeitig	gelöst
	11	240	5/1	nacheinander/ gleichzeitig	gelöst
4	12	240	5/1	nacheinander/ gleichzeitig	gelöst
	13	240	5/1	nacheinander/ gleichzeitig	vorhanden

Tabelle 5 – Versuchsdurchführung zur Etablierung des Bariumsulfat-Kontrastmittels 3

Etablierung des Bismuth-KMs:

Alle acht Herzen wurden mit dem Versuchsaufbau Nr. 3 perfundiert. Die Etablierung des KM erfolgte in vier Schritten.

Nach Auswertung der Perfusionsergebnisse mit Bariumsulfat-KM wurde in einem ersten Versuch mit zwei Herzen der Einfluss eines Perfusionsdrucks von 150 mmHg vs. 200 mmHg auf das Perfusionsergebnis untersucht.

Anschließend wurde in einem nächsten Versuch mit einem Herz der Einfluss einer längeren Perfusion bei 150 mmHg und mit einem weiteren der Einfluss einer kürzeren Perfusion bei

einem mittleren Druck von 170 mmHg geprüft.

In einem dritten Versuch wurde mit zwei Herzen untersucht, ob eine längere Perfusionszeit von 4 min bei einem Druck von 170 mmHg einen Einfluss hat.

Abschließend wurde nach Evaluation der bisherigen Ergebnisse ein Versuch mit zwei weiteren Herzen unternommen. Das erste Herz wurde 2 min lang mit einem Perfusionsdruck von 150 mmHg perfundiert, das zweite 3 min lang mit einem Perfusionsdruck von 200 mmHg. Details zu den Versuchen sind der Tabelle 6 zu entnehmen.

Versuchs - Nr.	Herz - Nr.	Perfusionsdruck (mmHg)	Perfusionszeit (min)	Reihenfolge der Perfusion der Koronararterien	Rigor mortis
1	1	200	5	nacheinander	gelöst
	2	150	5	nacheinander	gelöst
2	3	150	4	nacheinander	vorhanden
	4	170	2	nacheinander	vorhanden
3	5	170	4	nacheinander	gelöst
	6	170	4	nacheinander	gelöst
4	7	150	2	nacheinander	gelöst
	8	200	3	nacheinander	gelöst

Tabelle 6 – Versuchsdurchführung zur Etablierung des Bismuth-Kontrastmittels

2.3. Vorbereitung der Herzen auf die radiologische Untersuchung

Nach Aushärten des KMs wurden die Knopfkanülen entfernt und die Herzen nach der Methode von Reiner und Rodriguez⁷⁰ aufgeschnitten. Hierbei liegen die Koronararterien in einer Ebene, das Kammerseptum und seine Blutversorgung bleiben intakt und die rechte Koronararterie wird kurz nach ihrem Abgang aus der Aorta durchtrennt. Das Moderatorband wird in der Mitte durchgeschnitten. Modifiziert wurde die Methode von Reiner und Rodriguez durch einen Schnitt durch den linken Vorhof entlang des Truncus pulmonalis. Der linke Vorhof ließ sich so besser flach ausbreiten.

Nach dem Aufschneiden wurden die Herzen mit Hilfe eines Stereomikroskops (Leica MZ6, Leica Microsystems GmbH) und einer Kamera (Canon Power Shot S70) dokumentiert. Dann wurden die Herzen in ausgebreitetem Zustand in Gefrierbeutel gelegt und die Beutel unter möglichst wenig Lufteinschluss mit Klebeband verschlossen.

Nach dem Verpacken wurden die Versuchstierherzen der Hauptstudie bis zur radiologischen Untersuchung bei 4° C kühl gelagert. Die Untersuchung fand innerhalb von 12 bis 18 Stunden nach der postmortalen Kontrastmittelperfusion statt.

2.4. Radiologische Untersuchungen

Alle Herzen wurden radiologisch mit der Mammographietechnik untersucht. Während der Methodenetablierung der postmortalen Angiographie wurde mit zwei Instituten zusammengearbeitet:

1. Mit der Radiologischen Abteilung der Charité, Campus Virchow Klinikum, Berlin. Die Aufnahmen wurden mit einem digitalen Gerät (Senographe Essential, GE Health Care) angefertigt. Die Aufnahmeparameter wurden automatisch auf Grundlage der Gewebedicke des aufgeschnittenen Schweineherzens eingestellt.
2. Mit der Radiologischen Abteilung des Martin-Luther-Krankenhauses, Berlin. Die Aufnahmen wurden mit einem analogen Gerät (Senographe DMR, GE Health Care) angefertigt. Folgende Einstellungen wurden bei allen Herzen verwendet: 25 kV, 25 mAs, Film-Fokus-Abstand 610 mm, Molybdän als Filter und Anode, keine Kompression. Das Bildempfängersystem war ein digital auslesbares Speicherleuchtstofffoliensystem CR MM 3.0 (Agfa Health Care).

2.5. Stereoskopie

Die Stereoskopie ermöglicht durch die gleichzeitige Betrachtung zweier Bilder eines Objektes, die aus unterschiedlichen Winkeln aufgenommen werden, einen dreidimensionalen Eindruck des Objektes.

Insgesamt wurden bei 22 Herzen Aufnahmen aus zwei Winkeln, d.h. stereoskopische Aufnahmen, angefertigt. Es kamen dabei vier Versuchsaufbauten zum Einsatz. Ein Herz wurde mit dem ersten Versuchsaufbau, einer Presse aus Acrylglasplatten, deren Seiten mit einem Styroporblock angehoben wurden, untersucht. Mit dem Versuchsaufbau 2 wurde ebenfalls ein Herz untersucht, mit dem Versuchsaufbau 3 neun Herzen von Versuchstieren aus dem II. Teil der Studie. Aufnahmen mit Hilfe eines horizontal verschiebbaren Schiebetisches (Versuchsaufbau 4) wurden bei allen Versuchstieren im III. Teil der Studie angefertigt.

2.5.1. Versuchsaufbauten 1-4

Versuchsaufbau 1:

Es wurde eine Presse gebaut, die aus zwei durchsichtigen Acrylglasplatten bestand. Die Platten waren 4 mm dick, 160 mm breit und 290 mm lang. In jeder Ecke der Platten befand sich eine Bohrung von 6 mm Durchmesser. Vier Zylinderkopfschrauben M4 x 50 aus Stahl mit Mutter wurden durch die Bohrungen geschoben und fixierten die beiden Platten aufeinander. Die Presse wurde mit Hilfe eines 7.51 cm hohen Styroporblockes anguliert, so dass ein Winkel von 15° unter der Platte entstand.

Versuchsaufbau 2:

Die Presse aus dem 1. Versuch wurde zu einer Wippe weiterentwickelt. Eine Acrylglasplatte, die 152 mm lang, 20 mm breit und 10 mm dick war, wurde in die Mitte der Längsseite über die Breite der unteren Acrylglasplatte der Presse hinweg festgeklebt. Die Enden dieser Platte schlossen nicht mit dem Rand der unteren Platte der Presse ab, unter der sie festgeklebt war, sondern es blieben 4 mm zum Rand frei. In beide Enden der Platte wurde ein M5 Gewinde gebohrt. Zwei M5 x 12 mm Zylinderkopfschrauben aus Kunststoff wurden in je ein Gewinde geschraubt und verbanden die Platte mit je einem Fuß. Dieser bestand aus einer Acrylglasplatte, die 4 mm dick war und so mit dem Rand der unteren Platte bündig abschloss. Der Fuß war 80 mm breit und an der Stelle, über die die Wippe gekippt wurde, 40 mm hoch. Beiderseits von dieser Spitze aus war der Fuß um 15° abgeschrägt. Die Füße waren über eine 80 mm breite, 160 mm lange und 4 mm dicke Acrylglasplatte miteinander verbunden.

Versuchsaufbau 3:

Die Wippe des Versuchsaufbaus 2 wurde weiterentwickelt. Es wurde eine größere Presse angefertigt. Die beiden Acrylglasplatten der Presse waren 290 mm lang 179 mm breit und 4 mm dick. In jeder Ecke der Platte befanden sich Bohrungen von 6 mm Durchmesser. Die Platten waren über M4 x 50 mm Zylinderkopfschrauben aus Stahl mit Mutter miteinander verbunden. An der Unterseite der unteren Platte wurde in die Mitte der Längsseite auf jeder Seite ein kleiner Acrylglasblock geklebt. Der Block war 20 mm lang, 10 mm breit und 8 mm dick und befand sich 4 mm vom Rand der unteren Platte entfernt. Ein M5 Gewinde wurde in beide Blöcke gebohrt. Die beiden Füße der Wippe wurden mit jeweils einer M5 x 12 mm Zylinderkopfschrauben aus Kunststoff mit den beiden kleinen Blöcken verbunden. Die Füße hatten dieselben Maße wie bei dem Versuchsaufbau 2, waren aber nicht miteinander verbunden.

Versuchsaufbau 4:

Der Versuchsaufbau 4 bestand aus einer Presse, die auf einem Rahmen auflag und mit Hilfe einer Spindel horizontal in einer Ebene verschoben werden konnte (Abb. 3).

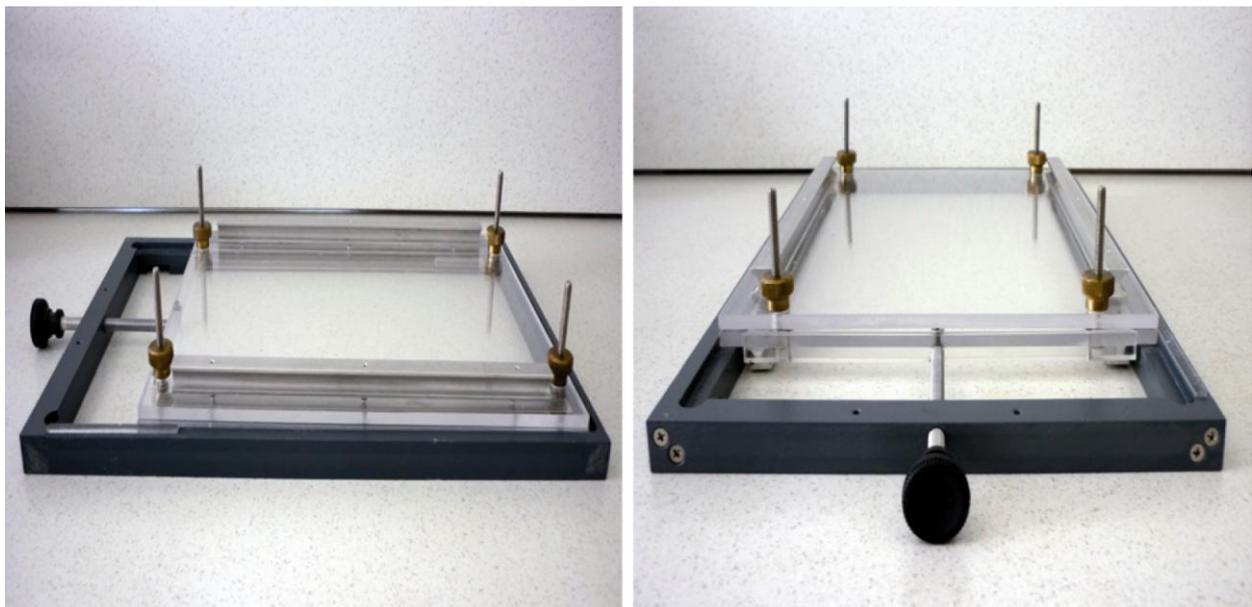


Abb. 3 – Versuchsaufbau 4 zur Anfertigung von stereoskopischen Bildern

Die Presse bestand aus zwei Acrylglasplatten, die 240 mm lang, 190 mm breit und 5 mm dick waren. In jeder Ecke der Platte befand sich eine Bohrung mit einem Durchmesser von 6 mm. Die beiden Platten wurde über vier M4 x 50 mm Zylinderkopfschrauben aus Edelstahl aufeinander fixiert. Mit Rändel-Muttern aus Messing der Größe M4 wurden die Schrauben festgezogen. Aluminiumleisten waren 10 mm vom Rand der Längsseite entfernt zur Verstärkung der Acrylglasplatten auf der Oberseite der oberen Platte und auf der Unterseite der unteren Platte angebracht. Die beiden oberen waren jeweils 210 mm lang, die unteren 220 mm. Sie waren mit jeweils drei M2 x 12 mm Senkkopfschrauben an der Acrylglasplatte befestigt.

Der PVC-Kunststoffrahmen war 320 mm lang, 205 mm breit und 15 mm dick. Der Rahmen bestand aus vier einzelnen PVC-Leisten, die mit jeweils zwei M3 x 25 mm Senkkopfschrauben verbunden waren. Der Innendurchmesser des Rahmens maß 290 x 175 mm. In dem Rahmen befand sich auf beiden Längsseiten eine Ausfräsung von 7 x 4 mm, auf einer Breitseite eine von 11 x 4 mm. Auf diesen Ausfräsungen lag die Presse auf. Dies diente der Führung der Presse.

Die Verschiebung der Presse wurde durch eine M6 x 90 mm Aluminiumspindel erzielt. Die Spindel befand sich in einem M6 Gewinde im PVC-Rahmen und endete in einem M6 Gewinde in der Acrylglasplatte, die an der unteren Platte der Presse angebracht war. An dem Ende der Spindel, das nicht mit der Presse verbunden war, befand sich ein Drehknopf aus Kunststoff zur Feineinstellung der Verschiebung.

Zwei Führungsstangen aus Aluminium waren in die Innenseite der kurzen Seite des Rahmens gegenüber der Spindel zum Verschieben der Presse eingelassen. Die Stangen waren 60 mm lang, hatten einen Durchmesser von 6 mm und waren in ein M5 Durchgangsgewinde im PVC-Rahmen eingelassen. Die Aluminiumstangen führten die beiden Leisten, die unter der unteren Acrylglasplatte angebracht waren. Sie verliehen der Presse dadurch Stabilität. Eine vertikale oder horizontale Abweichung der Presse von der Unterlage war so nicht möglich.

Auf der langen Seite des PVC-Rahmens war eine Maßeinheit aus Kunststoff aufgeklebt. Damit konnte die Verschiebung gemessen werden. Insgesamt war eine maximale Verschiebung der Presse von 46 mm möglich.

2.5.2. Versuchsdurchführung

Die Herzen wurden bei jedem Versuchsaufbau so in die Presse zwischen die beiden Acrylglasplatten gelegt, dass sie flach auf der Seite des Septums lagen, die zum rechten Ventrikel gehört. Die Versuchsaufbauten wurden mittig auf dem Mammographietisch platziert.

Versuchsdurchführung bei dem Versuchsaufbau 1:

Die beiden Acrylglasplatten, zwischen denen das Herz ausgebreitet lag, wurden mit Hilfe der Schrauben angezogen. Eine Seite der Presse wurde angehoben und darunter der Styroporblock gelegt, so dass unter der angehobenen Presse ein Winkel von 15° entstand. Nach der Aufnahme wurde der Styroporblock unter die gegenüberliegende Seite der Presse gelegt und eine zweite Aufnahme angefertigt.

Versuchsdurchführung bei den Versuchsaufbauten 2 und 3:

Die beiden Acrylglasplatten, zwischen denen das Herz ausgebreitet lag, wurden mit Hilfe der Schrauben angezogen. Die Wippe wurde zu einer Seite gekippt und eine Aufnahme gemacht. Dies wiederholte sich anschließend auf der anderen Seite.

Versuchsdurchführung bei dem Versuchsaufbau 4:

Der Rahmen des Tisches wurde mit zwei Schraubzwingen auf dem Mammographietisch fixiert. Nach der ersten Aufnahme wurde die Presse durch Drehen an der Spindel um 46 mm horizontal verschoben und eine zweite Aufnahme angefertigt.

2.5.3. Bearbeitung der stereoskopischen Bilder

Die stereoskopischen Bilder wurden in Kooperation mit der Firma „Stereoskopie + Visualisierung“ (Duisburg, Deutschland) bearbeitet. Die beiden horizontal verschobenen Bilder eines Herzens, sogenannte Halb- oder Teilbilder, wurden mit dem Programm StereoPhoto Maker (Version 3.22 © Masuji SUTO & David Sykes & Werner Blos) übereinander gelegt (sogenanntes stereoskopisches Bildpaar). Da es zur Betrachtung eines stereoskopischen Bildpaares notwendig

ist, die beiden Teilbilder getrennt den Augen darzubieten, so dass jedes Auge für sich nur das perspektivisch ihm zugeordnete Teilbild sehen kann⁵, wurde die Anaglyphentechnik verwendet. Die Teilbilder jedes Bildpaares wurden eingefärbt, eines rot, das andere cyan. Die Betrachtung und Auswertung der stereoskopischen Bilder erfolgte mit einer sogenannten „3D-Brille“. Dies ist eine Brille, die über komplementäre Farbfilter-Folien als Gläser verfügte, d.h. eine rot- und eine cyanfarbene Folie. Indem der Rotfilter das rote und der Cyanfilter das cyane Bild absorbiert, erhält jedes Auge nur das ihm zugehörige Teilbild.

2.5.4. Auswertung

Die analogen Röntgenbilder wurden an einem Röntgenschirm ausgewertet. Die digitalen Röntgenbilder und stereoskopischen Bilder wurden an einem Computer-Bildschirm (Cinema Display, Apple (Auflösung 1680 x 1050 Pixel, 32 bit Farben)) beurteilt.

2.6. Korrosionsmethode

Insgesamt wurden sechs Korrosionspräparate mit dem Acrylharz Acrifix ® 190 (Röhm GmbH) hergestellt.

2.6.1. Zusammensetzung des Injektionsmittels

Acrifix ® 190 ist ein 2-Komponenten-Polymerisationsklebstoff, der bei Zugabe von 4% Katalysator 20 (Röhm GmbH) aushärtet. Acrifix ® 190 wurde mit Verdünner 32 (Röhm GmbH), Katalysator 20 und 2-3 Tropfen blauem oder rotem Mixol ® Abtönkonzentrat (Diebold GmbH) zusammengegeben und anschließend in drei 10 ml Spritzen (B. Braun Melsungen AG) gefüllt.

2.6.2. Versuchsdurchführung bei den Korrosionspräparaten Nr. 1-6

Zuerst wurden die Abgänge von LCA, RCX und RCA nach ihrem Abgang aus der Aorta ascendens freipräpariert und je eine Heidelberger Verlängerung über die Ostien in den proximalen Gefäßabschnitt von LCA, RCX und RCA eingebunden. Dann wurden trockene

Papiertücher in die Aortenklappen gelegt, um zu verhindern, dass das Acrylharz in den linken Ventrikel fließt. Anschließend wurde das Herz in ein Wasserbad gehängt, damit die Ventrikel nicht komprimieren und die Koronararterien in normaler anatomischer Lage perfundiert werden konnten.

Das Perfusionssystem, das für die postmortale Angiographie etabliert wurde, wurde an die eingebundenen Heidelberger Verlängerungen angeschlossen und eine Vorperfusion der Koronararterien mit einer 0.9%-igen NaCl-Lösung durchgeführt. Schließlich erfolgte die Perfusion mit Acrifix ® 190. Dafür wurden die mit Acrifix ® 190 gefüllten Spritzen auf die Heidelberger Verlängerungen aufgesetzt und der Inhalt sehr langsam unter leichtem Druck aus der Hand perfundiert. Abschließend wurde der Aortenkonus ebenfalls mit dem Injektionsmittel aufgefüllt.

Nach Aushärten des Acrylharzes wurde das Herz in verschieden konzentrierte Kalilauge (Merck KGaA) gehängt. Der Korrosionsprozess dauerte unterschiedlich lange. Die Korrosion erfolgte bei Raumtemperatur. Nach der Korrosion wurde das Herz vorsichtig aus der Kalilauge gehoben und in entmineralisiertes Wasser gehängt, um das Präparat von Geweberesten zu befreien. Nachdem die Präparate getrocknet waren, wurden sie unter einem Stereomikroskop (Leica MZ6, Leica Microsystems GmbH) untersucht und fotografiert.

Korrosionspräparat Nr. 1 und 2:

Die verwendeten Herzen waren frisch, der Rigor mortis hatte sich gelöst. Die Vorperfusion erfolgte mit 200 ml 0.9%-iger NaCl-Lösung je Heidelberger Verlängerung bei einem Perfusionsdruck von 170 mmHg.

Die Zusammensetzung des 2-Komponenten-Polymerisationsklebstoffs war folgende: für das 1. Herz: 20g Acrifix ® 190, 2.8g Verdünner 32 und 0.2 g Bleimennige (Kremer Pigmente GmbH) als Röntgenkontrastmittel (zusammen 15% des Acrifix ® 190), 0.4g Katalysator 20 (2% des Acrifix ® 190) und Mixol ® Abtönkonzentrat, für das 2. Herz: 40g Acrifix ® 190, 3.6g Verdünner 32 und 0.5 g Bleimennige als Röntgenkontrastmittel (zusammen 10.25% des Acrifix ® 190), 1.76g Katalysator 20 (4.4% des Acrifix ® 190) und Mixol ®-Abtönkonzentrat.

Beim ersten Herzen wurden 8 ml in die LCA und jeweils 7 ml in die RCX und RCA perfundiert. Die LCA wurde rot injiziert, die RCA blau. Beim zweiten Herzen wurden 10 ml Injektionsmasse in jede Koronararterie perfundiert, die RCA rot, die LCA und der RCX blau. Nach vierstündigem Aushärten des Acrylharzes erfolgte die Korrosion in 10%-iger Kalilauge. Der Korrosionsprozess dauerte eine Woche. Die Herzen wurden abschließend radiologisch mit der Mammographietechnik (s.o.) untersucht.

Korrosionspräparat Nr. 3:

Das verwendete Herz war eingefroren und wurde für den Versuch aufgetaut. Der Rigor mortis war gelöst. Die Vorperfusion erfolgte mit 320 ml Leitungswasser je Koronararterie bei einem Perfusionsdruck von 200 mmHg.

Die Zusammensetzung des 2-Komponenten-Polymerisationsklebstoffs war folgende: 45g Acrifix ® 190, 4.5g Verdünner 32 (10% des Acrifix ® 190), 1.8g Katalysator 20 (4% des Acrifix ® 190) und Mixol ®-Abtönkonzentrat. Es wurden jeweils 8 ml in jede Koronararterie perfundiert. Die LCA und der RCX wurden rot, die RCA blau injiziert.

Nach der Perfusion lag das Präparat neun Stunden in einem 30-60° C warmen Wasserbad. Anschließend erfolgte die Korrosion in 10%-iger Kalilauge. Nach fünf Tagen wurde das Präparat aus der Kalilauge gehoben und sechs Mal in entmineralisiertem Wasser gebadet.

Korrosionspräparat Nr. 4:

Das verwendete Herz war frisch, der Rigor mortis schon gelöst. Die Vorperfusion erfolgte mit 600 ml Leitungswasser je Koronararterie bei einem Perfusionsdruck von 200 mmHg.

Die Zusammensetzung des 2-Komponenten-Polymerisationsklebstoff war folgende: 45g Acrifix ® 190, 7.0g Verdünner 32 (15.56% des Acrifix ® 190), 1.8g Katalysator 20 (4% des Acrifix ® 190) und Mixol ®-Abtönkonzentrat. Die LCA wurde mit 8 ml perfundiert, die RCX und RCA jeweils mit 11 ml. Die LCA und der RCX wurden rot, die RCA blau injiziert.

Das Herz wurde in 10%-iger Kalilauge korrodiert. Fünf Tage später wurde das Präparat aus der

Kalilauge gehoben und über sieben Tage in entmineralisiertes Wasser gehängt. Das Wasser wurde in regelmäßigen Abständen erneuert.

Korrosionspräparat Nr. 5:

Das verwendete Herz war eingefroren und wurde für den Versuch aufgetaut. Der Rigor mortis war gelöst. Die Vorperfusion erfolgte mit 600 ml Leitungswasser je Heidelberger Verlängerung mit einem Perfusionsdruck von 150 mmHg.

Die Zusammensetzung des 2-Komponenten-Polymerisationsklebstoffs war folgende: 45g Acrifix ® 190, 2.25g Verdünner 32 (5% des Acrifix ® 190), 1.8g Katalysator 20 (4% des Acrifix ® 190) und Mixol ®-Abtönkonzentrat. Die Koronararterien wurden mit jeweils 8 ml perfundiert, die LCA blau, die RCA rot und die RCX violett als eine Mischung von blauem und rotem Abtönkonzentrat injiziert.

Das Herz wurde für vier Tage in 20%-iger Kalilauge korrodiert. Nach dem Korrosionsprozess wurde das Präparat für sechs Tage in entmineralisiertem Wasser gereinigt. Das Wasser wurde insgesamt vier Mal in dieser Zeit gewechselt.

Korrosionspräparat Nr. 6:

Das verwendete Herz war eingefroren und wurde für den Versuch aufgetaut. Der Rigor mortis war gelöst. Das Herz hatte einen Schnitt im linken Ventrikel, der von der Organentnahme herrührte. Die Vorperfusion wurde wie bei dem Korrosionspräparat Nr. 5 mit 600 ml Leitungswasser je Heidelberger Verlängerung bei einem Perfusionsdruck von 150 mmHg durchgeführt.

Die Zusammensetzung des 2-Komponenten-Polymerisationsklebstoffs war folgende: 55g Acrifix ® 190, 5.5g Verdünner 32 (10% des Acrifix ® 190), 2.2g Katalysator 20 (4% des Acrifix ® 190) und Mixol ®-Abtönkonzentrat. Die LCA wurde rot, die RCX violett und die RCA blau mit jeweils 10 ml injiziert.

Anschließend wurde das Herz vier Stunden lang in ein 60° C heißes Wasserbad gehängt. Die

Korrosion erfolgte über 10 Tage in 20%-iger Kalilauge und setzte sich anschließend für sechs Tage in 10%-iger Kalilauge fort. Anschließend wurde das Präparat in entmineralisiertes Wasser gelegt.

II. Teil: Nachweis präexistenter Kollateralen sowie Induktion und Analyse von Kollateralisierung im Schweineherzen

2.7. Tierexperimente

Die Tierhaltung und -experimente wurden mit Genehmigung des Landesamts für Gesundheit und Soziales Berlin nach Abschnitt 8 des Tierschutzgesetzes durchgeführt. Dieses befindet sich in Übereinstimmung mit dem Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, publiziert vom US National Institute of Health (NIH Publications No. 85-23, 1996). Der Tierversuchsantrag G0165/06 wurde am 13.07.2006 in Berlin genehmigt. Die Tierexperimente wurden an Schweinen durchgeführt (Deutsche Landrasse x Deutsches Edelschwein), die aus Zuchtbetrieben des Landes Brandenburg bezogen wurden und ein Anfangsgewicht von 45-50 kg aufwiesen.

Im II. Teil der Arbeit wurden 15 Tiere untersucht, die nach 56 Tagen finalisiert wurden. Alle Tierversuche wurden von einer Veterinärmedizinerin durchgeführt.

2.7.1. Stent

Es wurde ein handgearbeiteter, 3.0 x 8 mm großer Kupferstent (A. Chade, Mayo Clinic, Minnesota, USA) verwendet, der aus 0.125 mm starkem Kupferdraht sigmoidal geformt war. Der Kupferstent war zusätzlich zu 70% mit Gold und Palladium beschichtet.

2.7.2. Narkose

Nach einer mindestens einwöchigen Eingewöhnungsphase im Tierstall erhielten die Tiere 48 Stunden vor dem Eingriff 300 mg Clopidogrel (Plavix ® 75mg Filmtabletten, Sanofi-Aventis Deutschland GmbH) sowie 24 Stunden vorher erneut 225 mg Clopidogrel und 7.5 mg

Lercanidipin (Carmen®, Berlin Chemie AG), zur Vorbeugung von Gefäßspasmen, mit Futter verabreicht. Die Erhaltungsdosis des Clopidogrels betrug 150 mg/Tag über die gesamte Studiendauer.

Die Einleitung der Narkose erfolgte mit Azaperon (2.4 mg/kg, Stresnil®, Janssen-Cilag GmbH), Ketamin (20 mg/kg, Ursotamin®, Serumwerke Bernburg AG), Xylacin (2.5 mg/kg, Rompun®, Bayer HealthCare) und Atropin (0.05 mg/kg, Atropinsulfat, B. Braun Melsungen AG) intramuskulär. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde Propofol (2 mg/kg, Propofol 1% MCT Fresenius, Fresenius Kabi Deutschland GmbH) im Wechsel mit Ketamin (4 mg/kg, Ketamin 500 mg DeltaSelect, DeltaSelect GmbH) und Xylacin (3 mg/kg) im Abstand von 10 bis 15 Minuten intravenös über die V. auricularis verabreicht. Während der gesamten Versuchsdurchführung in Narkose atmeten die Tiere spontan. Die anästhesiologische Überwachung beinhaltete die Kontrolle von Herzfrequenz, Sauerstoffsättigung, Körpertemperatur, Stellung des Augapfels, sowie Lid- und Cornea-Reflex.

2.7.3. Stentimplantation

Für die Stentimplantation befanden sich die Tiere in Rückenlage. Es wurde unter sterilen Bedingungen in Seldinger-Technik eine Einführungsschleuse (Radifocus® Introducer II, 6 French, 100 mm, Terumo Corporation) in die A. femoralis verlegt und diese mit 10000 IE Heparin (Heparin-Rotexmedica, Rotexmedica GmbH) gespült. Anschließend wurde entlang eines Standard-Führungsdrahtes (Fixed Core Wire Guide Safe-T-J® Curved, Cook Medical) ein AR 2.0 Führungskatheter (6 French, Medtronic) bis zur linken Koronararterie vorgeführt.

Im nächsten Schritt erfolgte eine Koronarangiographie. Dafür wurde zunächst 0.04 mg Nitroglycerin i.a. (Trinitrosan®, Merck Serono GmbH) zur maximalen Dilatation des Gefäßes appliziert und anschließend ein Kontrastmittelbolus (Ultravist® 300, Bayer Schering Pharma AG) injiziert. Dargestellt wurde das Gefäß in den Ebenen posterior-anterior (PA), left-anterior-oblique (LAO) 30° und 90° sowie right-anterior-oblique (RAO) 30°. Für die rechte Koronararterie wurde ein Katheter der Größe JR 3 verwendet.

Die Implantation des Kupferstents erfolgte nach der initialen Koronarangiographie. Ein Führungsdraht (BMW Universal™ Guide Wire, Guidant Corporation) wurde in den Ramus

interventrikularis anterior (Left Anterior Descendens ((LAD)) der linken Koronararterie vorgelegt. Anschließend wurde der zuvor manuell auf einen Ballonkatheter (SeQuent® PTCA-Katheter, 2.0 x 20 mm, B. Braun Melsungen AG) aufgezoogene Stent durch Entfaltung des Ballons für vier Sekunden bei einem Druck von fünf Bar im distalen Drittel der LAD implantiert. Das Gefäß wurde dabei leicht überdehnt. Kontrollaufnahmen der LCA und die Darstellung der RCA in den vier genannten Ebenen schlossen die Untersuchung ab. Der arterielle Zugang wurde mit einem intravasalem Verschlusssystem (Angio-Seal™ STS Plus, 6 French, St. Jude Medical) verschlossen.

2.7.4. Finalisierung

Nach Ablauf des Untersuchungszeitraumes wurden die Tiere in tiefe Narkose versetzt, dann 5000 IE Heparin und Pancuronium (0.05mg/kg, DeltaSelect GmbH) injiziert und anschließend durch Infusion mit Kalium (0.8 g/kg, 7.45% Kaliumchlorid, B. Braun Melsungen AG) getötet. Innerhalb von 5 Minuten nach Herzstillstand wurde das Herz mittels medianer Thorakotomie entnommen. Dafür wurde das Herz 1-2 cm über der Klappenebene abgesetzt, die Vorhöfe nicht eröffnet. Dann wurden die Vorhöfe und Herzkammern von Blutresten gereinigt, die Koronararterien mit 300 ml physiologischer Kochsalzlösung unter Zusatz von 5000 IE Heparin und 0.8 mg Nitroglycerin (Trinitrosan®, Merck Serono GmbH) gespült und das Organ für 24 Stunden kühl gelagert.

2.8. Postmortale-Angiographie

Die postmortale Perfusion erfolgte nach der im ersten Teil der Arbeit etablierten Methode mit Bariumsulfat-KM 3 und dem Versuchsaufbau 3 (s.o.). Dann wurden die Herzen auf die Röntgenuntersuchung mittels Mammographie vorbereitet (s.o.) und stereographische Aufnahmen angefertigt (s.o.).

2.9. Vorbereitung der Herzen auf die Micro-CT-Untersuchung

Nach der radiologischen Untersuchung wurden die aufgeschnittenen Versuchstierherzen in ihre ursprüngliche Form gerollt. Die ausgebreiteten Ventrikel wurden dem Septum wieder

angenähert. Anschließend wurden die Herzen mit Faden umwickelt, so dass die Schnittränder adaptiert waren. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Schnittränder und durchtrennte Gefäße möglichst exakt einander anlagen. Bis zur Micro-CT Untersuchung wurden die Herzen in 4%-igem Formalin (Carl Roth GmbH) kühl gelagert.

Für die Micro-CT Untersuchung wurden die Herzen in eine Kunststofftüte zusammen mit 4%-igem Formalin (Carl Roth GmbH) unter Luftabschluss eingeschweißt (Fermant 40, Joisten&Kettenbaum).

2.10. Micro-CT Untersuchung

Die Micro-CT Untersuchungen wurden in Kooperation mit dem Zentrum für Muskel- und Knochenforschung (ZMK) der Charité Campus Benjamin Franklin durchgeführt. Es wurde ein hochauflösender, peripherer quantitativer Computertomograph (HR-3DpQCT, XtremeCT, Scanco Medical) verwendet, der eine maximale Auflösung von 41 µm ermöglichte. Die Herzen wurden als Ganzes mit 250 ms Integrationszeit, 60 kVp (1A) gemessen.

Die Daten wurden anschließend mit Hilfe des Programms Amira® (Visage Imaging) 3D-rekonstruiert und analysiert. Das Zählen und die Klassifizierung der Kollateralen erfolgte durch zwei Untersucher an stereoskopischen 3D-Rekonstruktionen (rot/cyan). Die Diameter der Kollateralen wurden in mehreren Bereichen an ihrem Ursprung, der Mittelzone und am Wiederanschluss an ein Gefäß gemessen. Die Messungen erfolgten stets im rechten Winkel zum Gefäß.

III. Teil: Ursprung, zeitlicher Entwicklungsverlauf und Histomorphologie von Brückenkollateralen

2.11. Tierexperiment

In diesem Teil der Arbeit erfolgten an 11 weiteren Tiere Untersuchungen, die zu fünf unterschiedlichen Zeitpunkten finalisiert wurden, um die zeitliche Entwicklung von

Brückenkollateralen über 12 Tage darzustellen: Finalisierung 0.5 Tage (D0.5) nach Stentimplantation (n=2) Tiere, D3 (n=2), D5 (n=1), D7 (n=3) und D12 (n=3).

Die Tierversuche und die anschließende postmortale Angiographie und Micro-CT Untersuchung wurden, wie im II. Teil der Arbeit beschrieben, durchgeführt. Im III. Teil der Arbeit erfolgten zusätzlich histologische und immunhistologische Untersuchungen, um an den Kollateralen typische Merkmale der Arteriogenese, wie perivaskuläre Monocyteninvasion und Proliferation sowie Umbau der Gefäßwand, zu untersuchen.

2.12. Histologie und Immunhistologie

2.12.1. Gewebeentnahme

Ein 2.5 x 2.5 x 1 cm großer Gewebeblock, in dem sich der Stent befand, wurde aus dem Herzen entnommen. Anschließend wurde der Gewebeblock rechtwinklig zum Stent aufgeschnitten und der Stent unter einem Stereomikroskop vorsichtig aus beiden Gewebeproben entfernt. Die Proben wurden bis zur immunhistologischen Aufarbeitung, die in Kooperation mit dem „Labor Habedank“ (Berlin, Deutschland) erfolgte, in 4%-igem Formalin aufbewahrt.

Die beiden Gewebeblöcke eines jeden Schweineherzens wurden in 4 mm dicke Segmente geschnitten und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden aus jedem Segment 5 µm dicke Schnitte angefertigt.

2.12.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbungen und Immunhistochemie

Zur allgemeinen Darstellung der Gewebestruktur (rechtwinklig angeschnittene linke Koronararterie, umgeben von Vasa Vasorum, eingebettet in Herzmuskelgewebe) wurden für jedes geschnittene Segment Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE) angefertigt. Dafür wurden die Schnitte deparaffiniert (drei mal mit Xylol (Carl Roth GmbH), 100% Ethanol (Carl Roth GmbH) und 95% Ethanol/Wasser) und nach HE gefärbt.

Für die Immunhistochemie wurden die Schnitte zunächst für 5 min in 120° C heißem Citrat unter

Druck gepuffert (pH 6.0). Nach dem Blocken wurden die Schnitte 45 min lang bei Raumtemperatur mit folgenden Antikörpern inkubiert: Anti-Alpha-Smooth-Muscel-Actin (Dako) 1:400 verdünnt, Anti-CD 163 (AbD-serotec) 1:100 verdünnt, Anti-Ki-67 (Neomarkers, Thermo Fisher Scientific) 1:1000 verdünnt. Zur Detektion der Antigene wurde ein Streptavidin-Biotin-HRP-Kit (GenScript) verwendet. Die Peroxidase wurde mit einem 3-Komponenten-AEC (Zymed Laboratories) bei Raumtemperatur entwickelt. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin I (Richard Allen Scientific, USA). Abschließend wurden die Schnitte wässrig mit Aquatex (Merck KgaA) eingedeckelt.

2.12.3. Auswertung der histologischen Schnitte

Die Färbungen der Schnitte wurden an einem Mikroskop (Leica DMR, Leica Microsystems GmbH) betrachtet und mit Hilfe von Qfluoro Software (Version V1.2.0, Leica) drei immunhistologische Schnitte von jeder verwendeten Färbung pro Stentregion ausgewertet. Es wurde dabei nur die Fläche um die LCA betrachtet, die vom Epikard bis zum Beginn der Herzmuskulatur reichte. Nur Gefäße, die in dieser Region lagen und in der HE-Färbung deutlich Kontrastmittel enthielten, wurden gezählt. Das Gewebe, das sich im doppelten Radius des Gefäßlumens eines Gefäßes befand, wurde als Gewebe definiert, das zum Gefäß gehört. So wurde dieser Bereich auf die Größe eines Gefäßes genormt.

Die Quantifizierung (Anzahl) und Qualifizierung (Gefäßquerschnittsfläche, Umfang und Diameter) eines Gefäßes, die Anzahl der Schichten glatter Muskelzellen in der Gefäßwand der fünf größten Gefäße und die Anzahl der positiv angefärbten Zellen (CD163 und Ki-67) wurde mit ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) vorgenommen.

Die Gefäße wurden nach ihrer Gefäßquerschnittsfläche (A), Perimeter (P) und Diameter (D) in kleine ($A < 1 \mu\text{m}^2$, $P \leq 130 \mu\text{m}$, $D: \leq 36 \mu\text{m}$), mittlere ($A \geq 1 \leq 5 \mu\text{m}^2$, $P > 130 \mu\text{m} \leq 300 \mu\text{m}$, $D: > 36 \leq 80 \mu\text{m}$) und große ($A > 5 \mu\text{m}^2$, $P > 300 \mu\text{m}$, $D > 80 \mu\text{m}$) Gefäße eingeteilt.

Für die Berechnung des Diameters bei schräg angeschnittenen Gefäßen wurde die geometrische Mitte des Gefäßes berechnet: $r = \sqrt{\frac{D(a)}{2} \times \frac{D(b)}{2}}$. Die geometrische Mitte des größten und kleinsten Diameters eines Gefäßes bestimmt den Radius eines hypothetischen Gefäßes, welches

dieselbe Gefäßquerschnittsfläche aufweist wie das schräg angeschnittene Gefäß.

Als Kontrollen wurden drei Proben gewählt: eine aus der RCA eines Schweines, das D0.5 finalisiert wurde, die beiden anderen aus der LCA und RCA von Schweinen ohne Stent.

2.13. Statistik

Die Versuchsergebnisse wurden als arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit SigmaStat® (Version 18.0, SPSS Inc., Chicago, USA). Korrelationen zwischen den kontinuierlichen Variablen wurden mit Hilfe des Regressionsmodells nach Pearson (R^2) sowie nach Spearman (ρ^2) bestimmt. Ein zweiseitiger unpaariger t-Test wurde benutzt, um Unterschiede zwischen kontinuierlichen Variablen zu untersuchen. Ein p-Wert von < 0.05 wurde als signifikant angesehen (Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0.05$).

3. ERGEBNISSE

I. Teil: Methodenetablierung zur Herstellung von Korrosionspräparaten und Anfertigung postmortaler Angiographien in Verbindung mit der Stereoskopie

3.1. Postmortale Kontrastmittelperfusion

3.1.1. Etablierung der Versuchsaufbauten 1-3

Versuchsaufbau 1:

Beide Versuche wurden nach 40-50 Sekunden abgebrochen, da in dem geschlossenen System der Druck schnell anstieg und die zuführenden Leitungen dekonnectierte. In den mammographischen Aufnahmen zeigten sich eine ungenügende Füllung der Koronararterien und viele Luftblasen.

Versuchsaufbau 2:

Der Druck stieg durch das offene System nicht mehr so stark an, die Druckeinstellung war aber zu schwankend und damit ungenau. Die Entlüftung war ungenügend, in den Röntgenaufnahmen zeigten sich viele Luftblasen.

Versuchsaufbau 3:

Der Perfusionsdruck konnte durch das halb offene System gut eingestellt werden. Durch den Hahn am Ende des offenen Schenkels konnte der Druck sehr genau justiert werden. In mehreren Versuchen wurde die Entlüftung der zuführenden Leitungen über die Drei-Wege-Hähne, die sich direkt vor den drei Knopfkanülen befanden, weiter verbessert, so dass sich bei den letzten Perfusionen zur Etablierung des Versuchsaufbaus und des Kontrastmittels keine Luftblasen mehr in den Koronararterien befanden.

3.1.2. Etablierung der Kontrastmittel

Bariumsulphat-KM 1:

Es konnte weder ein Unterschied zwischen einem Perfusionsdruck von 150 mmHg vs. 200 mmHg noch zwischen einer Perfusion vor vs. nach dem Lösen des Rigor mortis festgestellt werden. Die mammographischen Aufnahmen zeigten bei allen vier untersuchten Herzen Gefäßabbrüche schon bei großen Gefäßen, wie den Hauptästen der Koronararterien. So konnten nur Gefäße bis zur 2. und 3. Ordnung dargestellt werden. Darüber hinaus zeigten sich viele Luftblasen in Koronararterien.

Bariumsulphat-KM 2:

Im Vergleich des Perfusionsdrucks von 150 mmHg vs. 200 mmHg zeigte sich, dass die Herzen, die mit 200 mmHg perfundiert wurden, eine bessere Gefäßfüllung aufwiesen. Dieser Unterschied war nicht deutlich, bei allen Herzen konnten Gefäße bis in die 3. und 4. Ordnung dargestellt werden, aber bei den Herzen, die mit dem höheren Druck perfundiert worden waren, konnten in der Anzahl mehr Gefäße der 4. Ordnung dargestellt werden. Gefäßabbrüche und Füllungsdefekte zeigten sich bei allen Herzen schon in der 2. und 3. Gefäßordnung.

Ein Unterschied zwischen den KM-Perfusionen vor vs. nach dem Lösen des Rigor mortis bestand nicht. Alle KM-Perfusionen zeigten eingeschlossene Luftblasen in den Koronararterien.

Mit dem Herz, das mit einer doppelt so langen KM-Perfusionszeit perfundiert wurde, konnten viele Gefäße bis zur 4. Ordnung vor allem im Ventrikelseptum dargestellt werden. Vorwiegend im Versorgungsgebiet des RCX gab es aber viele Gefäßabbrüche in der 3. Gefäßordnung. Die LCA zeigte viele eingeschlossene Luftblasen.

Bariumsulphat-KM 3:

Beim ersten der vier Herzen, das zur Untersuchung des Einflusses einer sequenziellen vs. gleichzeitigen Perfusion der Koronararterien eingesetzt wurde, musste der Versuch wegen Kontrastmittelaustritts aus einem Gefäß abgebrochen werden. So konnten nur nacheinander die

LCA 4 min, der RCX 3 min und die RCA 3 min lang perfundiert werden. Es konnte daher der RCX kaum dargestellt werden. In der LCA und RCA konnten Gefäße bis zur 4. Ordnung dargestellt werden. Luftblasen waren nur wenige im KM vorhanden.

Bei den drei anderen Herzen dieser ersten Versuchsreihe wurde das Perfusionsergebnis sukzessive besser. Es konnten Gefäße bis zur 5. Ordnung im letzten Herz der Reihe dargestellt werden. Zu Gefäßabbrüchen kam es anfangs bis in die 3. Gefäßordnung, beim letzten Herz der Reihe gab es keine Füllungsdefekte mehr. Eingeschlossene Luftblasen konnten beim letzten Herz nicht mehr nachgewiesen werden.

Die vier Herzen, die zur Untersuchung des Einflusses eines höheren Perfusionsdrucks von 240 mmHg eingesetzt wurden, zeigten alle eine Gefäßfüllung mit KM bis in die 5. und 6. Ordnung und keine Gefäßabbrüche oder Lufteinschlüsse. Obwohl die Unterschiede nur gering waren, zeigte die Perfusion des letzten Herzens dieser Versuchsreihe mit einer sequenziellen Perfusion über 5 min jeder einzelnen Koronararterie und anschließend einer Perfusion über 1 min aller Koronararterien gleichzeitig mehr Gefäße 6. Ordnung als bei einer kürzeren Perfusion (Abb. 4).

In einer weiteren Versuchsreihe mit drei Herzen und denselben Parametern wurde dieses Ergebnis bestätigt.

Am Ende der Etablierung dieses Kontrastmittels wurden die Schritte der postmortalen KM-Perfusion weiter eingeübt. Dabei kam es bei beiden Herzen zu Kontrastmittelaustritt an der Absetzungsebene des Herzens, so dass die Versuche abgebrochen wurden. Die LCA und der RCX des ersten Herzens wurde 5 min nacheinander perfundiert, die RCA 4 min. Die Koronararterien des zweiten Herzens wurden jeweils 4 min nacheinander perfundiert.

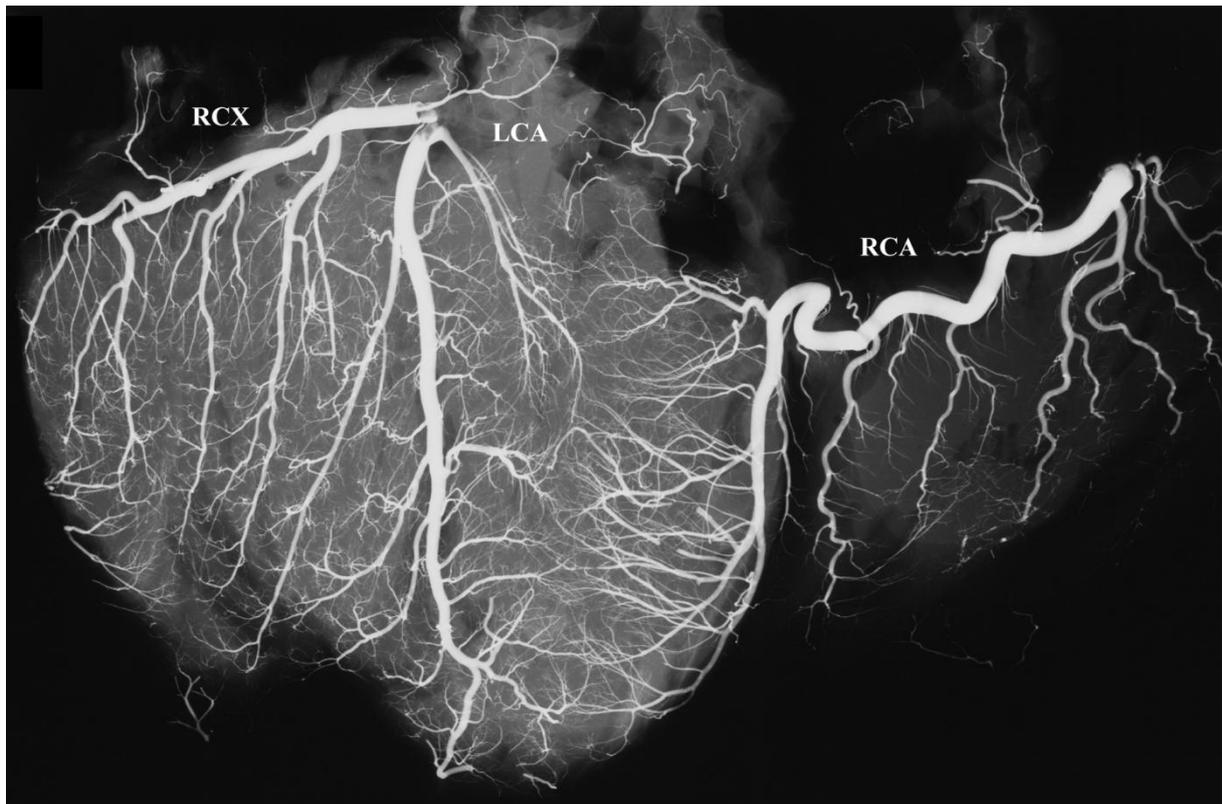


Abb. 4 – Herz aus der Versuchsreihe zur Etablierung des Bariumsulfat-Kontrastmittels Nr. 3
RCX: Ramus circumflexus, LCA: Linke Koronararterie, RCA: Rechte Koronararterie

Bismuth-KM:

Die erste Versuchsreihe zur Untersuchung des Einflusses von 150 mmHg vs. 200 mmHg Perfusionsdruck musste vorzeitig abgebrochen werden, da es bei beiden Herzen zu einem starken Kontrastmittelaustritt an der Absetzungsebene der Gefäße kam. So konnten beim ersten Herzen der RCX und die RCA nur jeweils 2 bzw. 1 min lang perfundiert werden. Beim zweiten Herzen konnte die LCA nur 2 min, der RCX 1 min und die RCA 1.5 min lang perfundiert werden.

Mit Hilfe der postmortalen Angiographie konnten beim ersten Herzen in der linken Vorderwand Gefäße bis zur 4. Ordnung dargestellt werden, Septum und rechter Ventrikel waren kaum dargestellt. Beim zweiten Herz waren feinste Gefäße, teilweise auch Kapillaren und Venen dargestellt. Dennoch kam es in beiden Herzen zum Abbruch von Gefäßen 3. Ordnung; ebenso waren Luftblasen nachweisbar.

Als Folge dieses Ergebnisses wurden Perfusionszeit und -druck verändert. Der erste Versuch mit 150 mmHg Perfusionsdruck musste wegen starken Kontrastmittelaustritts abgebrochen werden.

Die LCA wurde 4 min, der RCX 3 min und die RCA 2 min perfundiert. Beim zweiten Herzen wurden mit einem höheren Druck von 170 mmHg alle Koronararterien 2 min lang perfundiert. Bei beiden Herzen konnten zwar teilweise Gefäße bis zur 4. Ordnung abgebildet werden, doch waren viele Bereiche des Herzens nur schlecht perfundiert, so dass es vor allem zum Abbruch von Gefäßen 2. und 3. Ordnung kam. Darüber hinaus gab es bei beiden Herzen auch viele Lufteinschlüsse.

Da das zweite Herz mehr Gefäße 4. Ordnung aufwies, wurden die beiden folgenden Herzen der nächsten Versuchsreihe mit demselben Druck, aber länger perfundiert. Beide Herzen sollten 4 min lang perfundiert werden, die Versuche mussten aber wegen starken Kontrastmittelaustritts vorzeitig abgebrochen werden. Beim ersten Herzen konnten der RCX und die RCA nur jeweils 2 min lang perfundiert werden, beim zweiten Herzen die RCA nur 0.5 min lang. Bei beiden zeigte sich dasselbe Bild wie bei vorherigen Versuchen: feinste Gefäße bis in die 4. Ordnung konnten dargestellt werden, aber dennoch kam es zum Abbruch von großen Gefäßen 2. und 3. Ordnung. Beide Herzen zeigten viele Lufteinschlüsse.

Nach Evaluation der Ergebnisse, bei der die Herzen der ersten Versuchsreihe trotz vorzeitigen Abbruchs der KM-Perfusion die besten Füllungsergebnisse aufwiesen, wurde ein letzter Versuch mit zwei weiteren Herzen durchgeführt. Beide zeigten eine gute Füllung mit Kontrastmittel bis zu Gefäßen 4. Ordnung, aber auch viele Gefäßabbrüche bei Gefäßen 3. und 4. Ordnung. Lufteinschlüsse konnten nicht mehr nachgewiesen werden.

3.2. Stereoskopie

Etablierung des Versuchsaufbaus 1:

Es war nicht möglich mit diesen Aufnahmen ein stereoskopisches Bildpaar anzufertigen.

Etablierung der Versuchsaufbauten 2 und 3:

Die Platte, die unter dem Versuchsaufbau 2 festgeklebt war und die beide Füße miteinander verband, zeigte sich als Verschattung in der radiologischen Aufnahme und beeinträchtigte so die Auswertung der Aufnahmen. Mit beiden Wippen war es nicht möglich, Aufnahmen anzufertigen, die als stereoskopisches Bildpaar genutzt werden konnten.

Etablierung des Versuchsaufbaus 4:

Dieser Aufbau ermöglichte es, zwei Aufnahmen, die um 46 mm horizontal verschoben waren, zu einem stereoskopischen Bildpaar zusammenzusetzen (Abb. 5). So konnten 2-dimensionale Röntgenaufnahmen 3-dimensional betrachtet und ausgewertet werden.

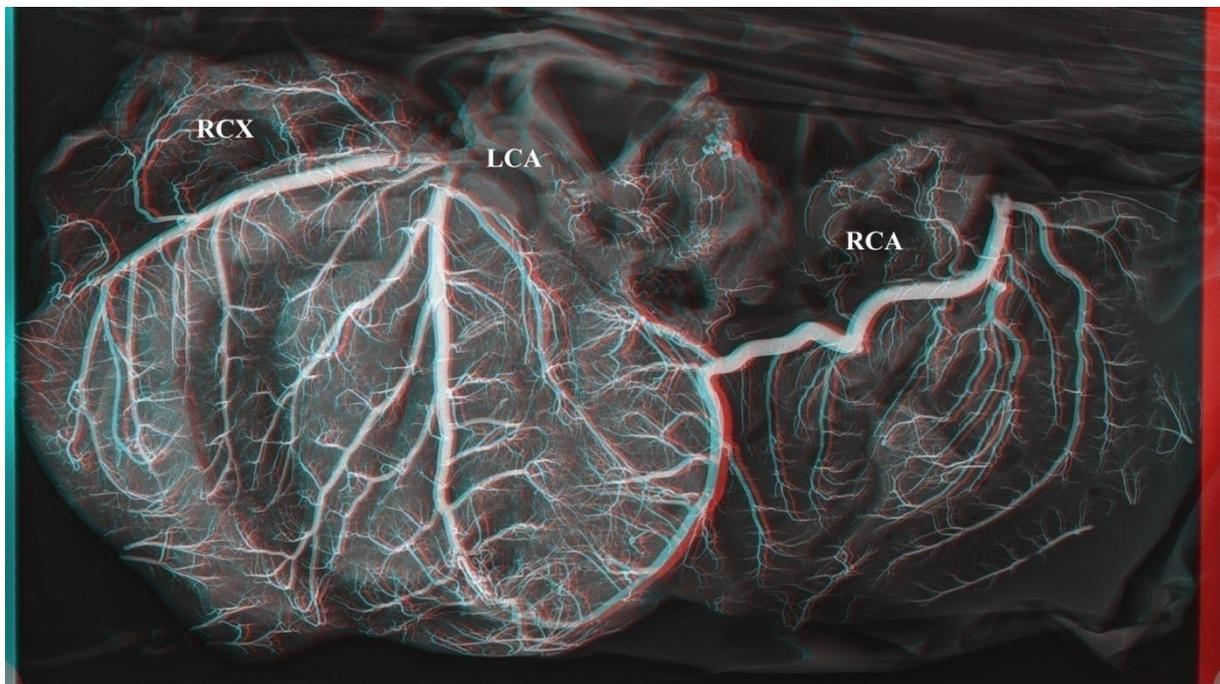


Abb. 5 – Stereoskopisches Bild, aufgenommen mit Hilfe des Versuchsaufbaus 4

RCX: Ramus circumflexus, LCA: Linke Koronararterie, RCA: Rechte Koronararterie

3.3. Korrosionsmethode

In diesem Teil wird nur die Herstellung der Korrosionspräparate evaluiert. Auf die Darstellung von bestimmten Gefäßen in den Korrosionspräparaten, wie z.B. solchen, die die Wasserscheidenregionen zwischen zwei Gefäßversorgungsgebieten überbrücken (II. Teil), oder Vasa Vasorum (III. Teil) wird später eingegangen.

Beim Herausheben des 1. Korrosionspräparates aus der 10%-igen Kalilauge brach die LCA mit dem RCX ab. Das 2. Korrosionspräparat stellte das gesamte Gefäßnetz der Koronararterien bis in die kleinsten Gefäße dar. Trotz Abbruchs einer Koronararterie im 1. Korrosionspräparat zeigte

sich während der Untersuchung mit Hilfe des Stereomikroskops, dass die Präparate durch die zugesetzte Bleimennige hochelastisch, aber nicht spröde waren. Die Röntgenaufnahmen beider Herzen mit der Mammographietechnik zeigten zwar den koronaren Gefäßbaum, die Bleimennige war aber ungleichmäßig verteilt und führte zu fleckigen Verschattungen.

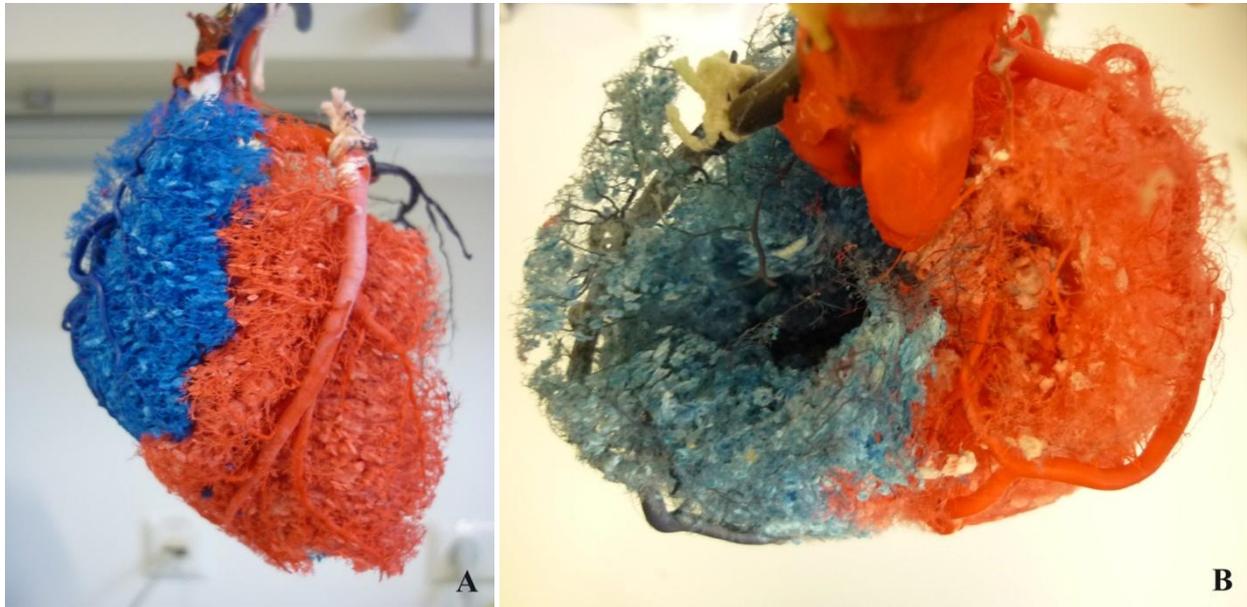


Abb. 6 – Korrosionspräparat

A: Blau: Perfusionsgebiet der rechten Koronararterie, rot: Perfusionsgebiet der linken Koronararterie. B: Blick auf die Herzbasis, blau: Perfusionsgebiet der linken Koronararterie, rot: Perfusionsgebiet der rechten Koronararterie.

Die Präparate Nr. 3-6 stellten alle Koronararterien bis in die kleinsten Äste dar (Abb. 6). Beim 6. Korrosionspräparat war der RCX durch den Gewebeschaden des Herzens bei der Organentnahme nur wenig mit Acrifix ® 190 gefüllt und daher schlecht dargestellt.

Es konnte kein Unterschied zwischen dem Zusatz von Verdünner 32 in Höhe von 5-15% des Gewichtes des Acrylharzes festgestellt werden. Die Injektion von 8-10 ml des Kunststoffes in jede Koronararterie bewährte sich. Weniger als 8 ml führte zu einer Unterfüllung und die Gefäße brachen leicht ab (Korrosionspräparat Nr. 1), mehr als 10 ml hatten eine Überfüllung der Koronararterien zur Folge, so dass der Gefäßbaum des Präparates zu dicht war und eine Analyse erschwerte (Korrosionspräparat Nr. 4). Die Korrosion in 10%-iger oder 20%-iger Kalilauge dauerte zwar etwas länger, stellte für das Ergebnis jedoch keinen Unterschied dar.

In allen Präparaten hafteten viele weißlich-kristalline Strukturen an dem Gefäßausguss, die auch durch häufiges Spülen mit entmineralisiertem Wasser nicht zu entfernen waren.

II. Teil: Nachweis präexistenter Kollateralen sowie Induktion und Analyse von Kollateralisierung im Schweineherzen

3.4. Korrosionsmethode

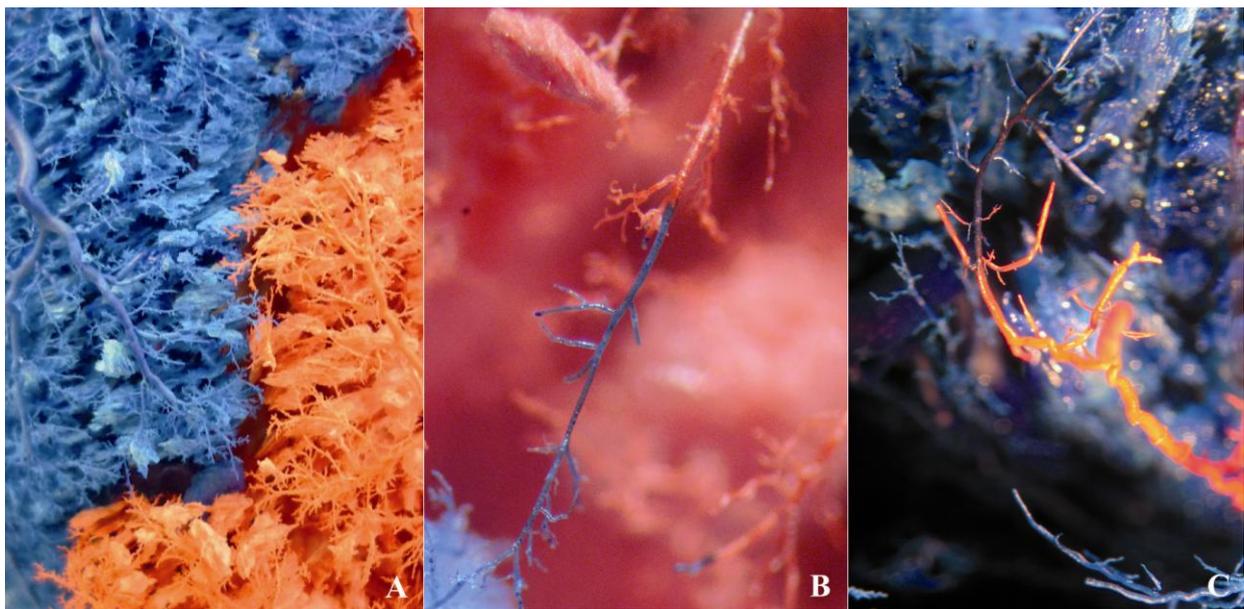


Abb. 7 – Wasserscheidenregion im Korrosionspräparat

*A: Wasserscheidenregion zwischen den Perfusionsgebieten der beiden Koronararterien.
B, C: Gefäße, die die Wasserscheidenregion überbrücken und die Koronararterien miteinander verbinden, erkennbar an dem Farbumschlag.*

In allen Korrosionspräparaten fand sich, abhängig vom Zustand des Präparates (s.o.), eine Wasserscheidenregion (Abb. 7 A) zwischen dem Versorgungsgebiet der LCA und RCA. Diese stellte sich als ca. 1 mm breiter Streifen dar, der die beiden Gefäßversorgungsgebiete voneinander trennte. Es konnte aber in vier von sechs Korrosionspräparaten (66.67%) Gefäße nachgewiesen werden, die diese Wasserscheidenregion überbrückten (Abb. 7 B, C). Der Farbwechsel eines Gefäßes zeigte an, dass die beiden Gefäßgebiete, die jeweils mit einer anderen

Farbe injiziert worden waren, über dieses Gefäß miteinander in Verbindung standen. Im Korrosionspräparat Nr. 2 fanden sich sechs solcher Gefäße in der Wasserscheide zwischen LCA und RCA und in der zwischen RCA und RCX acht. Im Korrosionspräparat Nr. 3 gab es nur in der Wasserscheide zwischen RCA und RCX vier Gefäße, die die beiden Gefäßversorgungsgebiete miteinander verbanden. Im Präparat Nr. 4 ließen sich ein Gefäß in der Wasserscheide zwischen LCA und RCA und zwischen RCX und RCA sieben Gefäße nachweisen. Im Korrosionspräparat Nr. 6 stellte sich nur ein Gefäß zwischen dem Versorgungsgebieten der LCA und RCA dar.

3.5. Tierexperimente

In 26 Tieren wurde die minimal invasive Stentimplantation erfolgreich durchgeführt. Während der Stentimplantation war die Sauerstoffsättigung konstant zwischen 94-100% und die Herzfrequenz zwischen 70-90/ min. Klinischen Zeichen eines akuten Infarktes wurden während der Intervention nicht beobachtet. Drei der 15 Tiere aus der ersten Versuchstiergruppe starben vorzeitig (11.54% aller Tiere). Zwei Tiere verstarben an D14. Eines der beiden Tiere verstarb vermutlich an einem Herzinfarkt, nachdem es sich sehr erregt hatte. Das andere Tier wurde tot aufgefunden, vermutlich ist es an Herzrhythmusstörungen gestorben. Das dritte Tier verstarb D2 an einem Herzinfarkt.

Die durch den Kupferstent induzierte Gefäßokklusion der LCA wurde an D3 in beiden Schweinen, die an dem Tag finalisiert wurden, in der postmortalen Angiographie und in Micro-CT Untersuchungen nachgewiesen. Da in den beiden Tieren, die an D0.5 finalisiert wurden, die LAD angiographisch zu ca. 20% okkludiert war, erfolgte die Stenosierung der LAD wahrscheinlich kontinuierlich bis D3 und führte zu einem ansteigenden arteriogenem Stimulus.

3.6. Superfizielle Kollateralen

Mit Hilfe der postmortalen Angiographie und dem Micro-CT konnten in 23 von 26 Schweinen (88.46%) koronare Kollateralen nachgewiesen werden (Abb. 8)

Drei Tiere der 2. Versuchstiergruppe hatten keine Kollateralen: jeweils ein Tier in den Gruppen

D0.5, D3 und D7. Es fanden sich insgesamt 60 Kollateralen, eine in den Gruppen D0.5, D3 und D5, zwei in dem Tier, das an D2 verstarb, drei an D7, sieben an D12 und acht wurden an D14 gefunden. Insgesamt wurden 23 Kollateralen bis D14 gezählt (38.33% aller Kollateralen) und 37 an D56 Tage (61.67%). Dies stellt einen signifikanten Zuwachs der Anzahl der Kollateralen dar ($p=0.011$).

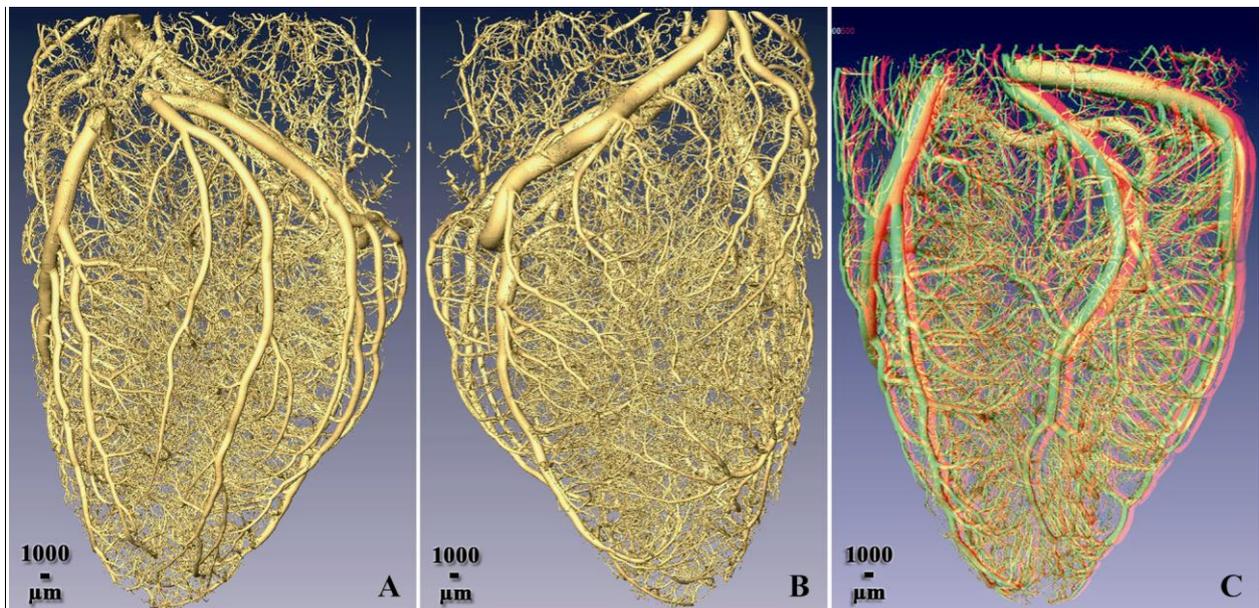


Abb. 8 – Radiologische Aufnahmen des Schweinherzens mit Hilfe des Micro-CTs

A: Blick auf den linken Ventrikel. **B:** Blick auf den rechten Ventrikel. **C:** Stereoskopisches Bild, Blick auf den linken Ventrikel.

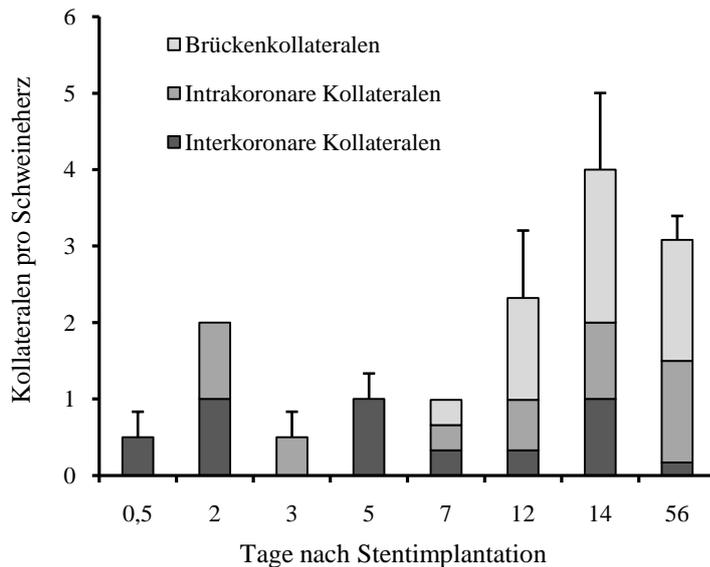


Abb. 9 – Häufigkeit der Kollateralen pro Schweineherz

An D0.5 wurden 0.5 ± 0.33 Kollateralen pro Tier gefunden, an D2 zwei, an D3 0.5 ± 0.33 , an D5 1 ± 0.33 , an D7 eine und an D12 2.33 ± 0.88 . D14 wurden 4 ± 1 Kollateralen pro Tier gezählt, D56 3.08 ± 0.31 (Abb. 9).

Auf die Häufigkeit der unterschiedlichen Kollateralen wird bei der Untersuchung der einzelnen Kollateralen-Typen vertieft eingegangen.

3.6.1. Interkoronare Kollateralen

In neun Tieren (34.62%) konnten interkoronare Kollateralen nachgewiesen werden. In der ersten Versuchstiergruppe fand sich jeweils eine interkoronare Kollaterale in je einem der drei Tiere, die vorzeitig gestorben waren. Interkoronare Kollateralen zeigten sich bei den 12 Tieren, die D56 finalisiert wurden, nur in zwei Tieren (16.67%). In der zweiten Versuchstiergruppe wurde jeweils eine interkoronare Kollaterale in Tieren gefunden, die unterschiedlichen Gruppen angehörten. Jeweils ein Tier zählte zu den Gruppe D0.5, D5, D7 und D12. Insgesamt hatten sieben der 14 Tiere, die bis D14 finalisiert wurden, interkoronare Kollateralen (50%).

Neun der untersuchten 60 Kollateralen (15%) waren interkoronare. Jeweils eine Kollaterale wurde in den Gruppen D0.5, D2, D5, D7 und D12 gefunden und zwei bei den Tieren, die D14 verstarben. Dies entsprach 30.43% aller Kollateralen bis zu diesem Zeitpunkt und

0.5±0.71 intrakoronare Kollateralen pro Tier D0.5, eine Kollaterale D2 und D5, 0.33±0.58 D7 und D12 und eine D14 (Abb. 9). D56 Tage wurden zwei interkoronare Kollateralen nachgewiesen, was 5.41% aller Kollateralen der Gruppe entsprach, 0.17±0.39 interkoronaren Kollateralen pro Tier (Abb. 9). Der Unterschied der Anzahl der interkoronaren Kollateralen zwischen den Tieren bis D14 und den Tieren an D56 war nicht signifikant ($p=0.074$)

Sechs der neun interkoronaren Kollateralen (66.67%) verliefen über das Moderatorband (Abb. 10 A), davon zwei der fünf interkoronaren Kollateralen aus der ersten Versuchstiergruppe (40%) und alle vier aus der zweiten Versuchstiergruppe. Drei der neun Kollateralen (33.33%) verliefen über die freie Wand des rechten Ventrikels (Abb. 10 B).

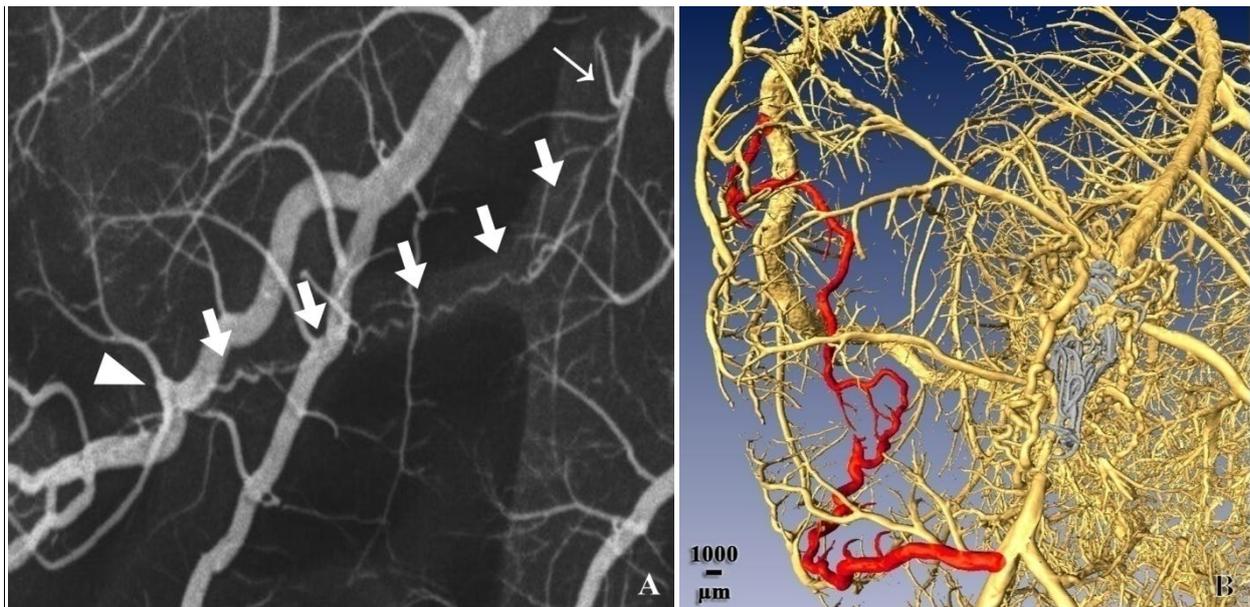


Abb. 10 – Interkoronare Kollateralen

A: Kollaterale, die über das Moderatorband verläuft. Dünner Pfeil: abgeschnittenes Moderatorband, dicke Pfeile: korkenzieherartiger Verlauf auf dem Moderatorband durch den rechten Ventrikel, Pfeilspitze: Anschluss an einen Ast der rechten Koronararterie. **B:** Kollaterale, die über die Wand des rechten Ventrikels verläuft. Rot: Interkoronare Kollaterale, grau: Kupferstent.

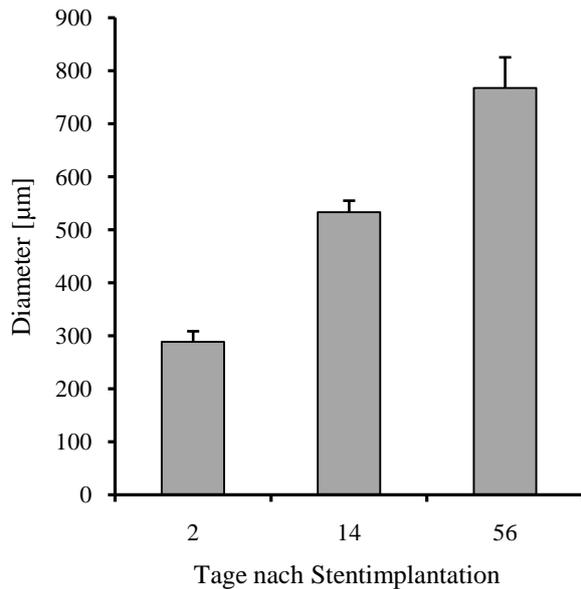


Abb. 11 – Diameter der interkoronaren Kollateralen, die über den rechten Ventrikel verlaufen

Der Durchmesser der interkoronaren Kollaterale, die über die freie Wand des rechten Ventrikels verlief, betrug D2 $288.77 \pm 19.56 \mu\text{m}$ und nahm über D14 ($533.33 \pm 21.44 \mu\text{m}$) auf $767.18 \pm 58.13 \mu\text{m}$ an D56 zu. Diese Kollateralen nahmen also in diesem Zeitraum um das 2.66-fache ihrer Größe zu (Abb. 11). Auf den Durchmesser der interkoronaren Kollateralen, die über das Moderatorband verliefen, wird später eingegangen.

3.6.2. Intrakoronare Kollateralen

Intrakoronare Kollateralen konnten in 15 Herzen (57.69%) nachgewiesen werden, davon jeweils eine an D2, D3, D7, D12 und D14 und in zehn Tieren, die D56 finalisiert wurden (83.33% der Tiere der Gruppe).

23 der 60 untersuchten Kollateralen (38.33%) zählten zu den intrakoronaren, eine an D2, D3 und D7, zwei an D12 und D14 und 16 an D56 (1.33 ± 0.31 Kollateralen pro Tier (Abb. 9)). Bis D12 konnten also nur drei intrakoronare Kollateralen nachgewiesen werden (13.04% der intrakoronaren Kollateralen), so dass sich die Anzahl der intrakoronaren Kollateralen bis einschließlich D7 signifikant von der ab D12 unterscheidet ($p=0.037$).

19 der 23 gefundenen Kollateralen waren direkt an der Überbrückung der Stenose beteiligt (82.61%), da sie in direkter Nähe zum Gefäßverschluss lokalisiert waren und entweder

das prästenotische Gefäß mit einem Seitenast anastomosierten oder einen Seitenast mit dem poststenotischen Gefäß verbunden (Abb. 12A). Keine dieser Kollateralen wurde vor D12 nachgewiesen. Von den übrigen intrakoronaren Kollateralen verliefen zwei (8.7%) endomural im Ventrikelseptum (D3 und D56) und zwei (8.7%) über das Moderatorband (D2 und D7) (Abb. 12 B, C).

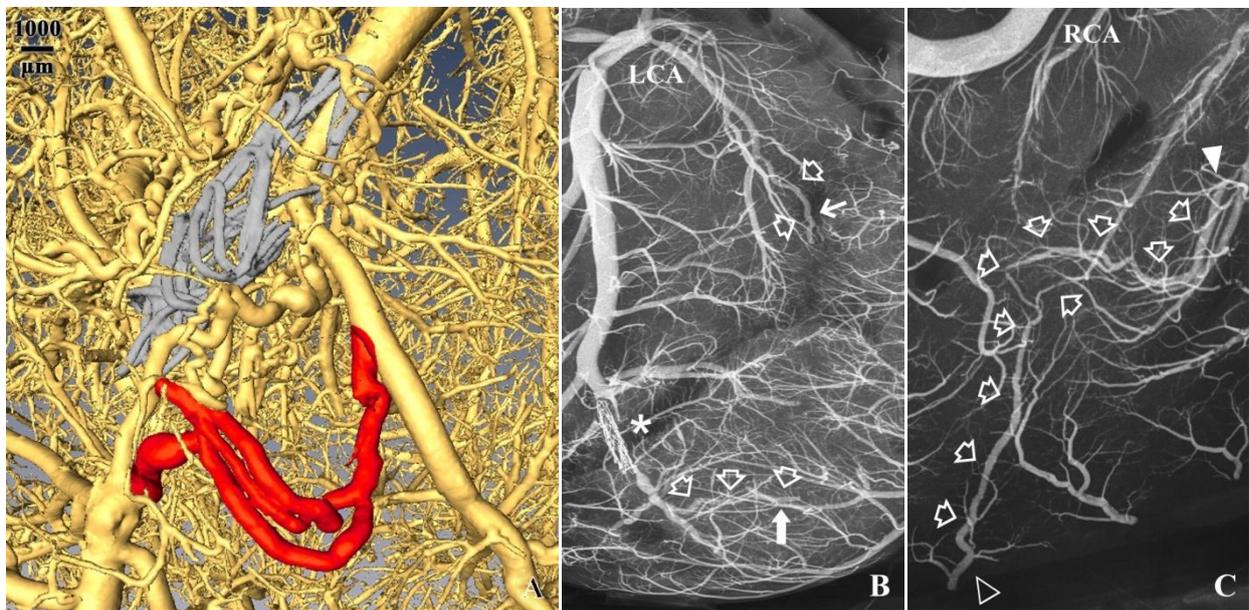


Abb. 12 – Intrakoronare Kollateralen

A: Kollaterale, die direkt an der Überbrückung des Gefäßverschlusses beteiligt ist. Rot: intrakoronare Kollaterale, grau: Kupferstent. **B, C:** Kollaterale, die über das Moderatorband verläuft. Die Kollaterale zweigt von der linken Koronararterie (LCA) ab und wird beim Verlauf durch den rechten Ventrikel durchgeschnitten (**B**, dünner Pfeil). Das andere Ende des Gefäßes (**C**, Pfeilspitze) verläuft über den *M. papillaris major* im rechten Ventrikel (offene Pfeile) und anastomosiert dort mit einem Gefäß, das über den rechten Ventrikel verläuft und am Rand des Ventrikels abgeschnitten wird (**C**, offene Pfeilspitze). Das andere Ende des Gefäßes (**B**, dicker Pfeil) findet dann distal des Kupferstents (*) wieder Anschluss an die LCA.

Vergleicht man nur die 19 intrakoronaren Kollateralen, die direkt an der Überbrückung der Stenose beteiligt waren, kann man eine Größenzunahme um das 1.77-fache von $282.38 \pm 35.85 \mu\text{m}$ (D12 und D14) nach $500.54 \pm 23.02 \mu\text{m}$ D56 feststellen. Der Durchmesser der beiden endomuralen Kollateralen im Ventrikelseptum betrug D3 $311.04 \pm 27.88 \mu\text{m}$ und D56 $334.82 \pm 47.15 \mu\text{m}$, ein Zuwachs um das 1.07-fache. Auf den Durchmesser der Kollateralen, die

über das Moderatorband verliefen, wird später eingegangen.

3.6.3. Brückenkollateralen

Brückenkollateralen ließen sich in 18 Herzen (69.23%) darstellen: bei einem Tier D7 (33.33% der Gruppe) (Abb. 14 A) und bei allen Tieren D12 (Abb. 13 A, B, Abb. 14 B), D14 (Abb. 13 C) und D56 (Abb. 13 D-F).

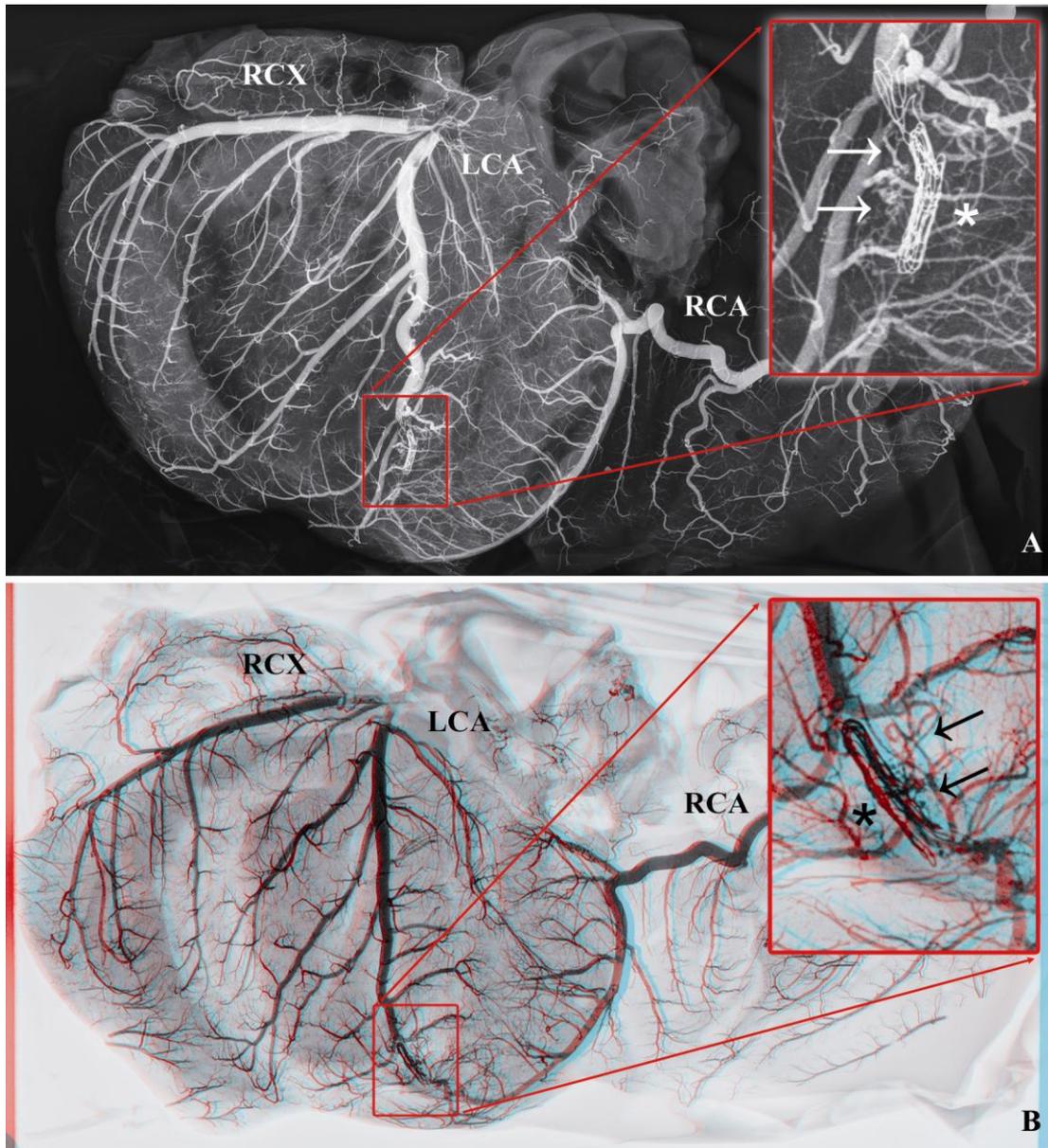


Abb. 13 – Brückenkollateralen in der postmortalen Angiographie und Stereoskopie
A: Postmortale Angiographie. **B:** Stereoskopie. Kollateralen an Tag 12 nach Stentimplantation (D12) (Pfeile), die die Gefäßokklusion, induziert durch einen Stent (*), überbrücken.

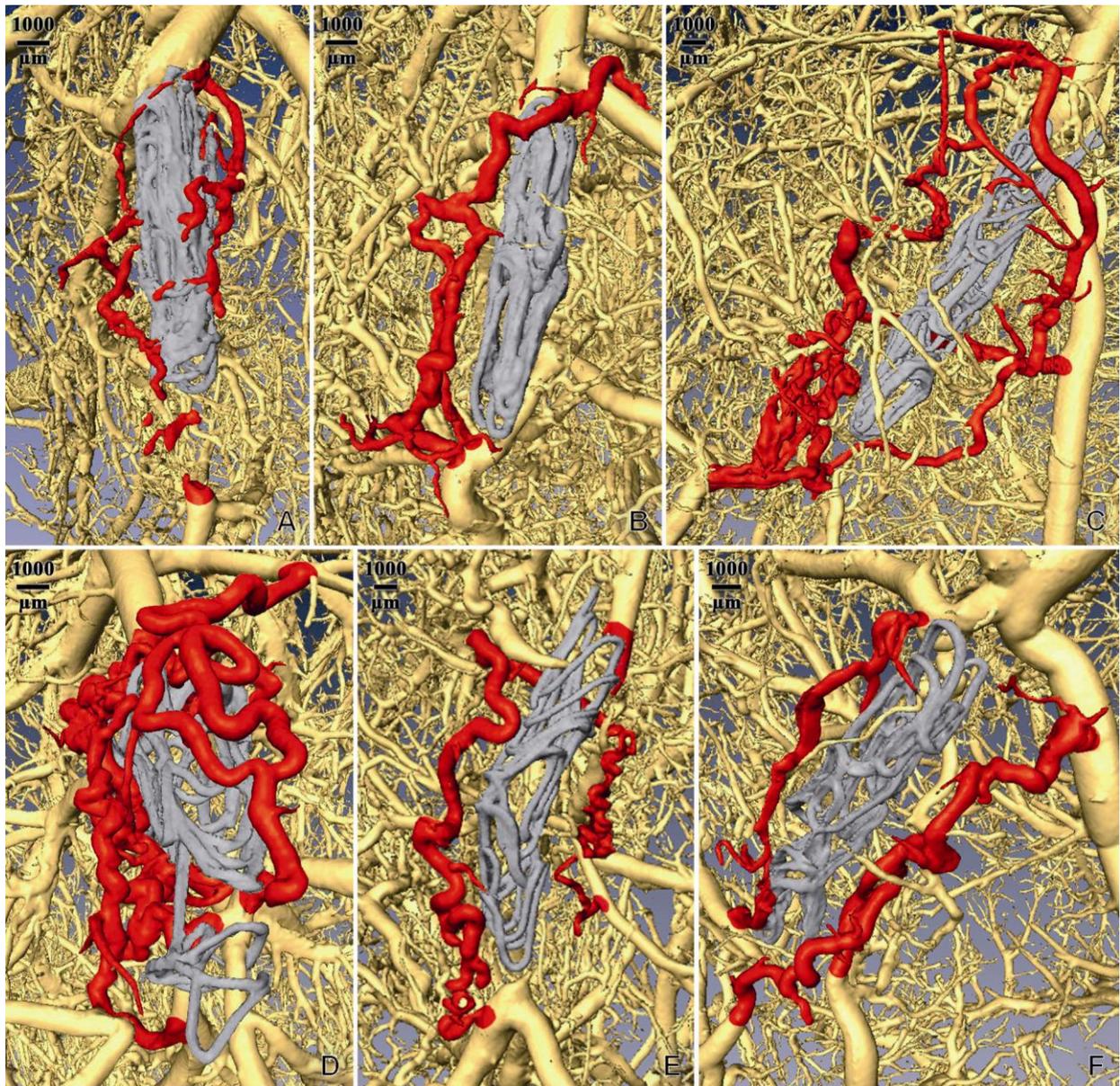


Abb. 14 – Brückenkollateralen im Micro-CT

Rot: Brückenkollateralen, grau: Kupferstent. A: 7 Tage nach Stentimplantation (D7), B: D12, C: D14, D-F: D56.

28 der 60 untersuchten Kollateralen (46.67%) waren Brückenkollateralen. Im Schnitt hatten die Tiere D7 0.33 ± 0.33 Brückenkollateralen, D12 1.33 ± 0.33 , D14 zwei und D56 1.58 ± 0.15 (Abb. 9). Die Anzahl der Brückenkollateralen bis einschließlich D7 unterscheidet sich dabei signifikant von der ab D12 ($p < 0.0005$).

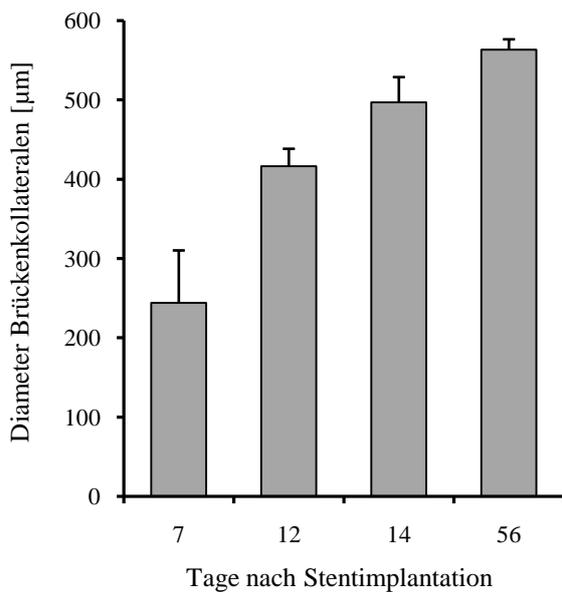


Abb. 15 – Diameter der Brückenkollateralen

Es konnte eine stetige Größenzunahme der Brückenkollateralen beobachtet werden: Der Durchmesser der Brückenkollateralen nahm von D7 ($243.98 \pm 66.14 \mu\text{m}$) nach D12 ($416.15 \pm 22.15 \mu\text{m}$) um das 1.71-fache zu. D14 wiesen sie einen Durchmesser von $496.96 \pm 31.73 \mu\text{m}$ auf, D56 einen von $563.36 \pm 13 \mu\text{m}$. Dies entspricht einer Größenzunahme der Gefäße um das 2.31-fache zwischen D7 und D56 (Abb. 15). Vergleicht man den Diameter der Brückenkollateralen bis D14 (428.76 ± 19.58) mit dem der Brückenkollateralen an D56 zeigt sich ein signifikantes Wachstum ($p=0.012$).

3.7. Tiefe Kollateralen

3.7.1. Subendokardiale Kollateralen auf dem Papillarmuskel

In 24 von 26 Herzen (92.31%) ließen sich subendokardiale, makroskopisch sichtbare Gefäße nachweisen. Im linken Ventrikel fanden sich diese in 19 der 26 untersuchten Herzen (73.08%) an der Spitze des anterioren Papillarmuskels (Abb. 16 A) und in 21 Herzen (80.78%) am posterioren Papillarmuskel. Diese bildeten am anterioren Papillarmuskel zu 73.08% und am posterioren Papillarmuskel zu 69.23% ein endokardiales Netzwerk aus kommunizierenden Gefäßen. Im rechten Ventrikel waren in 24 von 26 Herzen (92.31%) Gefäße auf dem Musculus

papillaris major sichtbar, die zu 65.38% ein Netzwerk bildeten (Abb. 16 B). Die endokardialen Gefäße ließen sich nicht mit Hilfe der postmortalen Angiographie und dem Micro-CT darstellen.

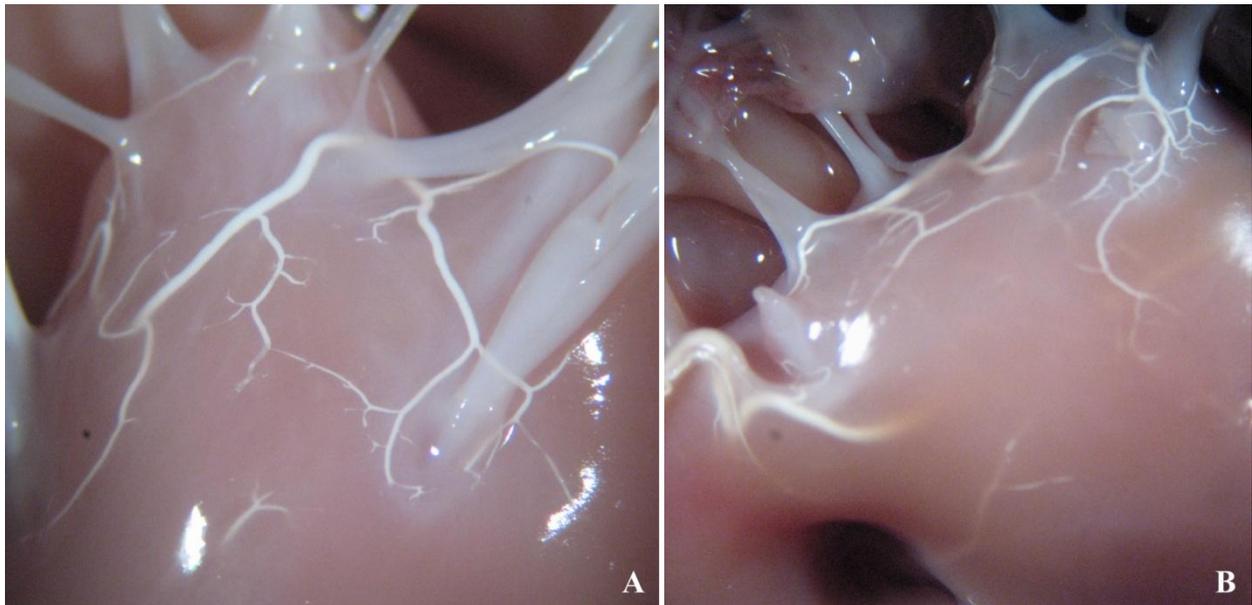


Abb. 16 – Subendokardiale Kollateralen

A: Kollateralen auf dem *M. papillaris anterior* im linken Ventrikel. **B:** Kollateralen auf dem *M. papillaris major* im rechten Ventrikel.

3.7.2. Intramurale Kollateralen auf dem Moderatorband

Ein Moderatorband, das sich zwischen Septum und anteriorem Papillarmuskel im rechten Ventrikel aufspannte, zeigte sich in 23 der 26 Herzen (88.46%). In 16 Herzen (69.57%) war auf dem Moderatorband ein makroskopisch sichtbares Gefäß zu erkennen.

Insgesamt wurde das Moderatorband als Struktur, über die eine Kollateralisierung erfolgte, in acht Schweineherzen (34.78%) genutzt: jeweils in einem Schweineherz D0.5, D2, D5, D12, D14 und D56 und in zwei Herzen an D7 (Abb. 17 A).

Insgesamt acht Kollateralen verliefen über das Moderatorband (13.33% der Kollateralen): sechs interkoronare (75%) und zwei intrakoronare Kollateralen (25%) (Abb. 17 B, C).

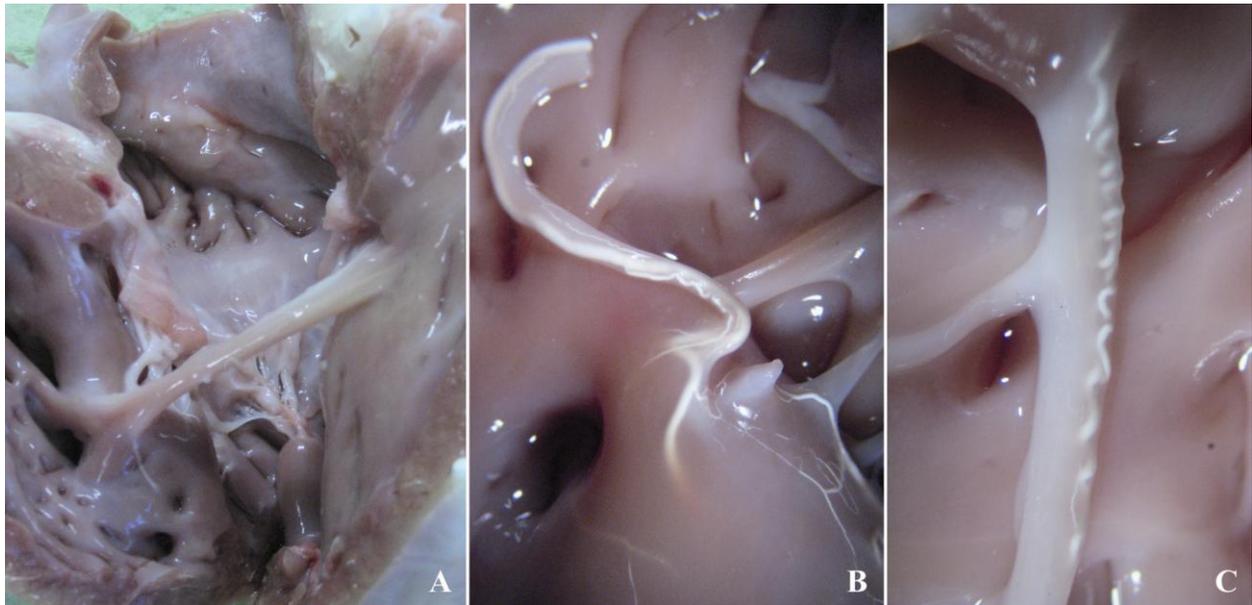


Abb. 17 – Intramurale Kollateralen, die über das Moderatorband verlaufen

A: Moderatorband, das sich zwischen dem Ventrikelseptum und der Basis des *M. papillaris major* im rechten Ventrikel aufspannt. **B:** Kontrastmittel gefülltes Gefäß, das im Moderatorband verläuft. **C:** Korkenzieherartig geformtes Gefäß, das auf dem Moderatorband verläuft.

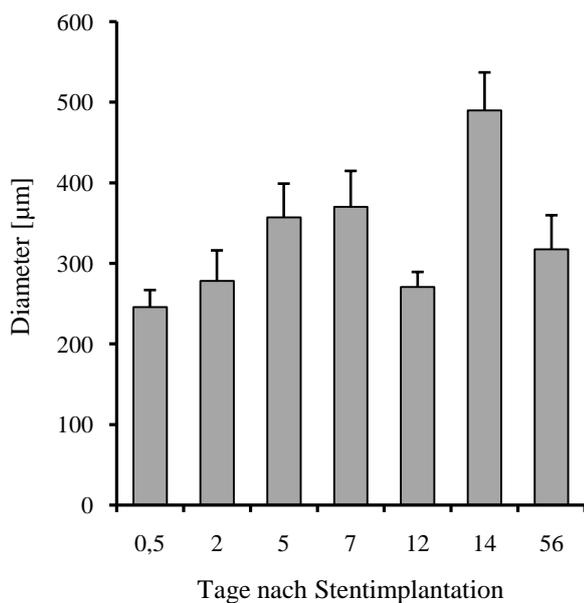


Abb. 18 – Diameter der inter- und intrakoronaren Kollateralen, die über das Moderatorband verlaufen

Der Durchmesser der Gefäße, die über das Moderatorband verliefen, nahmen um das 1.51-fache

von D0.5 ($245.51 \pm 21.51 \mu\text{m}$) über D2 ($278.28 \pm 37.97 \mu\text{m}$) und D5 ($357.11 \pm 42.05 \mu\text{m}$) bis D7 ($370 \pm 44.91 \mu\text{m}$) zu, um dann wieder D12 ($270.68 \pm 18.82 \mu\text{m}$) und D56 ($317.57 \pm 42.37 \mu\text{m}$) abzunehmen. Die intrakoronare Kollaterale an D14 mit $489.88 \pm 47.36 \mu\text{m}$ Durchmesser stellte eine Ausnahme bei diesem Wachstumsverlauf dar (Abb. 18).

III. Teil: Ursprung, zeitlicher Entwicklungsverlauf und Histomorphologie von Brückenkollateralen

3.8. Ursprung der Brückenkollateralen

Mit Korrosionspräparaten gelang es, den physiologischen Aufbau von Vasa Vasorum und ihre Vernetzung untereinander darzustellen.

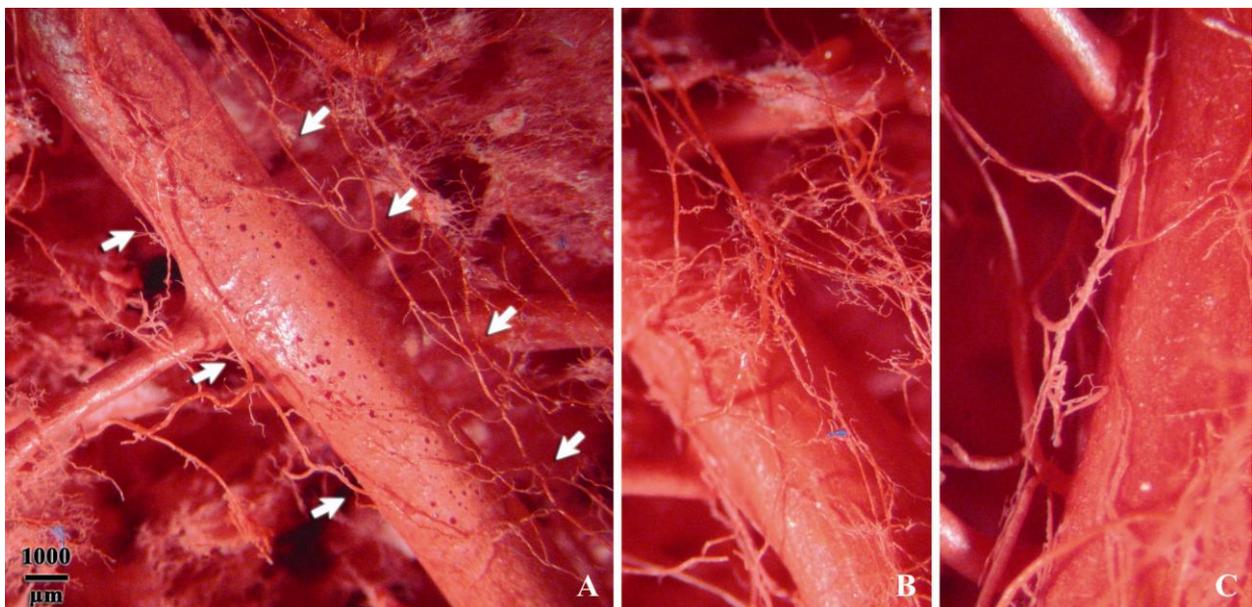


Abb. 19 – Vasa Vasorum im Korrosionspräparat

A, B: Vasa Vasorum sind netzartig um die großen Koronararterien herum angelegt. C: Aufnahme eines Vas Vasorum in der Wand der linken Koronararterie mit hoher Vergrößerung

Es zeigte sich, dass VV longitudinal entlang und circumferentiell um die LCA herum angelegt sind und ein Netzwerk von kleinen Gefäßen bilden (Abb. 19 A-C). 19 der 27 im Micro-CT

gezählten Brückenkollateralen (70.37%) entsprangen vom Gefäßlumen des okkludierten Gefäßes, überbrückten die Okklusion und fanden postokklusiv wieder Anschluss an dasselbe Gefäß. Die übrigen acht Brückenkollateralen (29.63%) entsprangen vom Gefäßast proximal der Okklusion und anastomosierten postokklusiv mit dem Hauptgefäß.

3.9. Wachstumsprozess der Brückenkollateralen

Als typische Merkmale von Arteriogenese konnte eine Invasion von Monocyten, Proliferation und Gefäßwachstum beobachtet werden.

3.9.1. Monocyteninvasion

Die Induktion der Arteriogenese durch den semi-akut okkludierenden Kupferstent führte zu einer Invasion von CD163+ Zellen (Monocyten) in den perivaskulären Raum. Die Anzahl der CD163+ Zellen korrelierte dabei positiv mit dem Zeitverlauf ($R^2=0.87$; $p<0.0005$) (Abb. 20 A).

Da die Anzahl der CD163+ Monocyten pro Gefäß abhängig von der Größe des Gefäßes ist, wurden die Gefäße auf $1 \mu\text{m}^2$ Gefäßquerschnittsfläche normiert. Die Anzahl der positiven Zellen zeigte dann ein deutliches Maximum an D3 (4.4 ± 0.77) (Abb. 20 B), die vor allem durch die Anzahl der Monocyten um kleine Gefäße herum hervorgerufen wurde (7.57 ± 0.58), weniger von mittleren (3.04 ± 0.16) und großen Gefäßen, die eine Monocyteninvasion erst ab D5 zeigten (Abb. 20 C). Die Korrelation der Anzahl der CD163+ Monocyten pro $1 \mu\text{m}^2$ Gefäßquerschnittsfläche mit dem Zeitverlauf waren aber nicht signifikant ($R^2=0.12$; $p=0.219$).

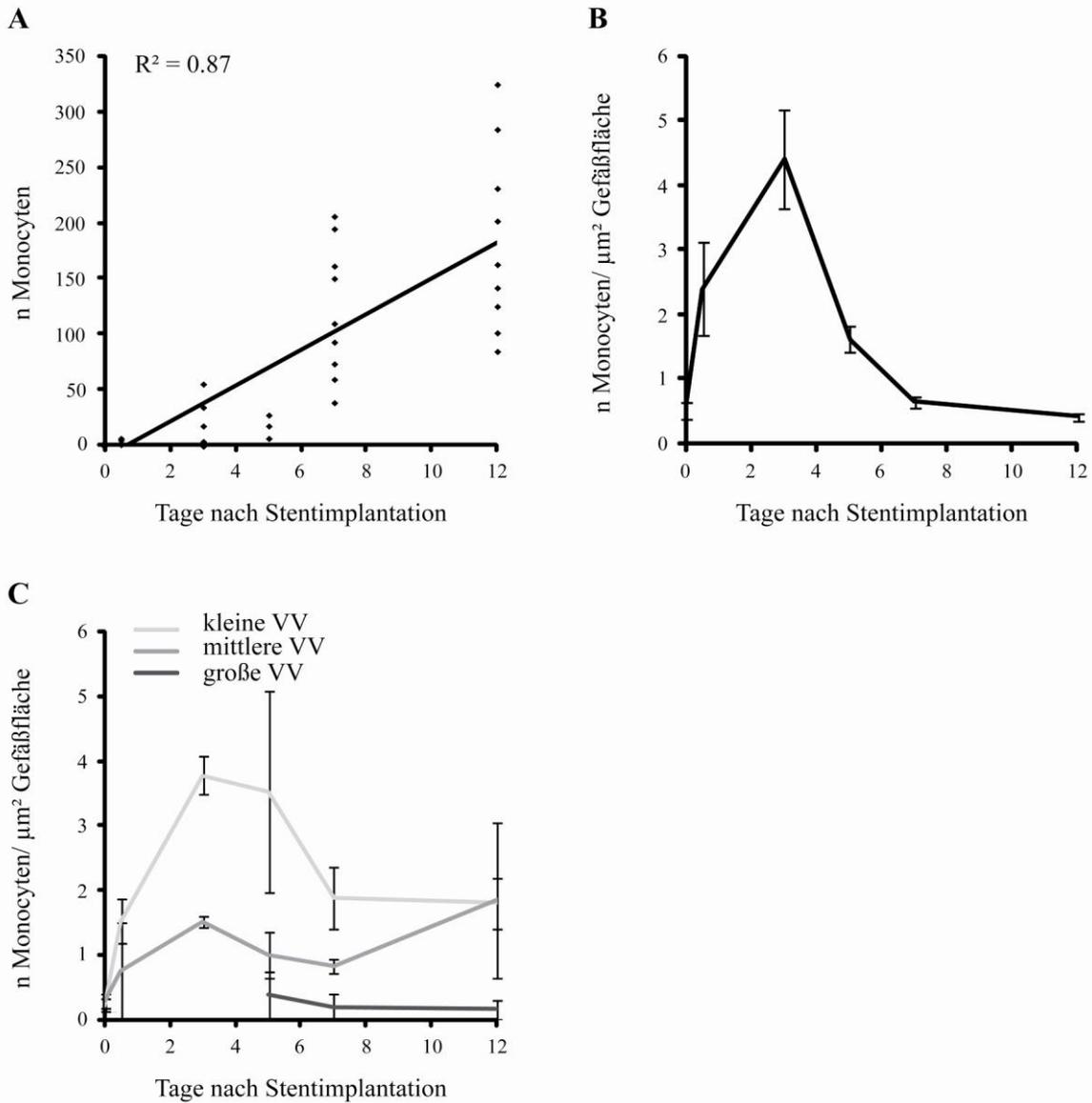


Abb. 20 – Monocyteninvasion.

Die Monocyteninvasion perivaskulär um Vasa Vasorum (VV) herum steigt linear nach der Stentimplantation an (A). Zum Vergleich der Monocyteninvasion um unterschiedlich große Gefäße herum wurde die Zahl der Monocyten zur Gefäßfläche normalisiert. Die Monocyteninvasion erreichte an Tag 3 nach Stentimplantation ihr Maximum (B), vor allem hervorgerufen durch die Infiltration von kleinen VV, weniger von mittleren und großen VV (C).

3.9.2. Gefäßproliferation

Durch die Monocyteninvasion wird wahrscheinlich eine Zellproliferation induziert, da die Anzahl der CD163+ Monocyten positiv mit der Anzahl der Ki-67+ Zellen ($R^2=0.74$; $p<0.0005$) korrelierte (Abb. 21 A). Außerdem war die Korrelation der Anzahl der proliferierenden Zellen mit dem Zeitverlauf signifikant positiv ($R^2=0.69$; $p<0.0005$).

Da auch die Anzahl der Ki-67+ Zellen abhängig von der Größe des Gefäßes ist, wurden die Gefäße ebenfalls auf eine Größe von $1 \mu\text{m}^2$ Gefäßquerschnittsfläche normiert. Die Anzahl der proliferierenden Zellen zeigte dann ein deutliches Maximum an D3 (0.92 ± 0.28) (Abb. 21 B), diese war aber nicht signifikant ($\rho^2=0.16$; $p=0.576$). Untersucht man dies entsprechend der Größenaufteilung der Gefäße, zeigte sich interessanterweise, dass diese Spitze an D3 vor allem von kleinen Gefäßen hervorgerufen wurde (1.31 ± 0.61), weniger von mittleren (0.47 ± 0.15) und großen Gefäßen (keine Gefäße an D3) (Abb. 21 C). Die Korrelation mit dem Untersuchungszeitraum zeigt, dass die kleinen Gefäße stark positiv mit der Zeit korrelierten ($\rho^2=0.79$; $p=0.001$), mittlere weniger stark, aber dennoch positiv ($\rho^2=0.59$, $p=0.043$), und die Proliferation großer Gefäße sogar negativ korreliert war ($\rho^2= - 0.926$; $p=0.003$).

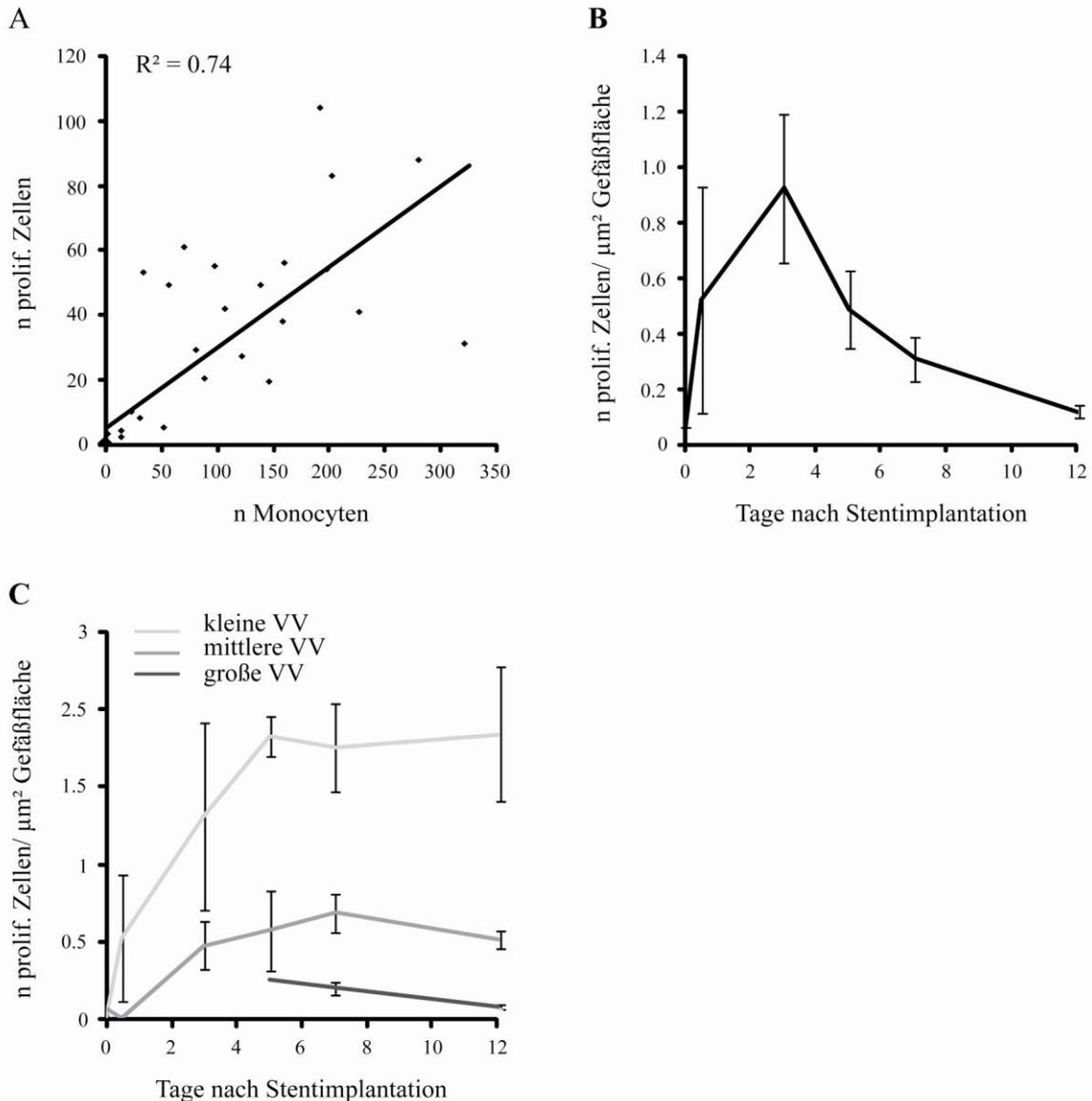


Abb. 21 – Gefäßproliferation.

Die Zahl der Ki-67+ Zellen (proliferierende (prolif.) Zellen) perivaskulär um Vasa Vasorum (VV) herum korreliert linear mit der Monocyteninvasion (A). Die Proliferationsrate von allen VV normalisiert zur Gefäßfläche zeigt ein Maximum an Tag 3 nach Stentimplantation (B), das vor allem von der Proliferation kleiner VV, weniger von mittel großen VV hervorgerufen wird. In großen VV sinkt die Proliferationsrate (C).

3.9.3. Gefäßwachstum

Der Gefäßverschluss an D3 verursachte einen starken arteriogenen Stimulus. Monocyten strömten in den perivaskulären Raum und induzierten Zellproliferation: Die VV nahmen in Größe und Anzahl zu.

Die Größe der Gefäßquerschnittsfläche eines Vas Vasorum nahm von $1.18 \pm 0.38 \mu\text{m}^2$ (Kontrollgruppe) auf $22.76 \pm 3.97 \mu\text{m}^2$ (D12) zu ($R^2=0.69$; $p<0.0005$), was einem Zuwachs um das 19.29-fache entspricht. Analog nahm der Umfang von $123.05 \pm 16.95 \mu\text{m}$ auf $491.63 \pm 50.64 \mu\text{m}$ D12 zu ($R^2=0.80$; $p=0.000$), ein Zuwachs um das 4.0-fache. Der Diameter nahm von $32.34 \pm 3.83 \mu\text{m}$ auf $125.12 \pm 12.96 \mu\text{m}$ D12 zu ($R^2=0.82$; $p<0.0005$), ein Zuwachs um das 3.87-fache (Abb. 22 A). Der Größenzuwachs korreliert ebenfalls positiv signifikant mit der Anzahl der proliferierenden Ki-67+ Zellen (Gefäßquerschnittsfläche $R^2=0.44$; $p=0.010$, Gefäßperimeter $R^2=0.65$; $p=0.001$ und Diameter $R^2=0.604$; $p=0.001$ (Abb. 22 B)).

Die im Micro-CT beobachtete Zunahme der Anzahl und Größe der Brückenkolateralen wurde bereits im II. Teil der Arbeit dargestellt. Zusätzlich wiesen die Brückenkolateralen in der postmortalen Angiographie und im Micro-CT ein für Arteriogenese typisches korkenzieherartiges Wachstum auf (vergl. Abb. 14).

Die Anzahl der VV nahm von 2.4 ± 0.38 (Kontrollgruppe) auf 24.44 ± 3.06 (D12) zu. Diese Zunahme war sowohl zum Beobachtungszeitraum ($R^2=0.76$; $p=0.000$) als auch zur Anzahl der Ki-67+ Zellen ($R^2=0.95$; $p=0.000$) (Abb. 22 C) positiv signifikant korreliert. Bis D3 dominierten vor allem kleine VV (nach allen drei untersuchten Parametern Gefäßquerschnittsfläche, Umfang und Diameter), zwischen D3 und D7 mittelgroße VV und ab D12 große VV (Abb. 22 D).

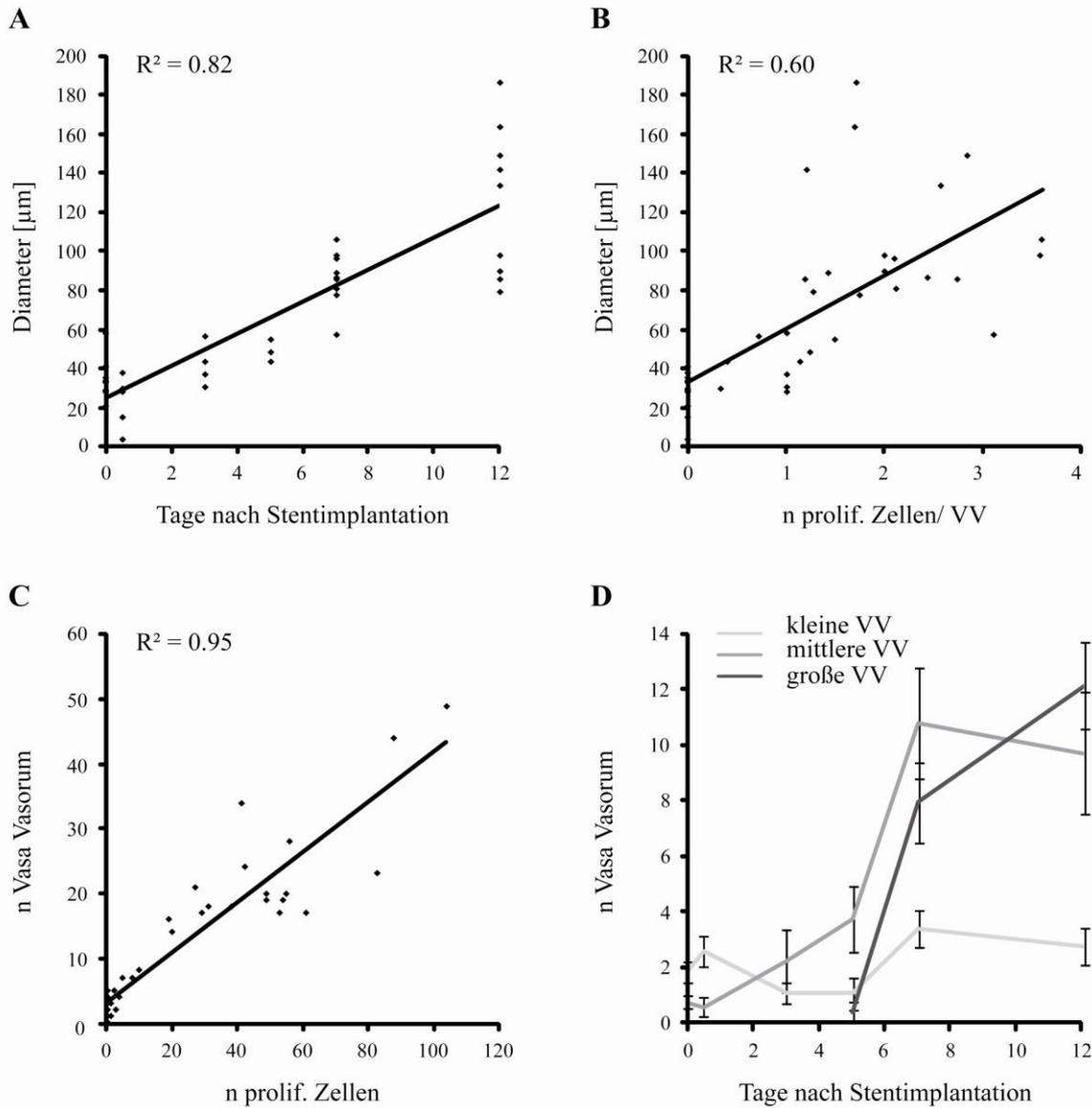


Abb. 22 – Wachstum der Vasa Vasorum (VV).

Der durchschnittliche Diameter eines Vas Vasorum nimmt linear bis Tag 12 nach Stentimplantation (D12) zu (A). Dieses Wachstum ist wahrscheinlich induziert durch die Zahl der proliferierenden (prolif.) Zellen pro Vas Vasorum (B). Außerdem induziert die Gefäßproliferation auch eine Zunahme der Gefäßanzahl (C). Dabei überwiegt die Zahl der kleinen VV bis D3, von D3-D7 dominieren mittlere VV und ab D12 große VV (D).

3.10. Histomorphologie der Brückenkollateralen

Die HE-Färbung der “Region of Interest” (ROI) zeigte die linke Koronararterie quer angeschnitten, umgeben von VV, die mit braunem Kontrastmittel gefüllt waren (Abb. 23). Der LAD fehlte durch das Entfernen des Stents das Endothel. Im Lumen der LAD befand sich ein Thrombus, der aus quer verbundenen Fibrinfäden und inflammatorischen Zellen, wie Granulocyten und Makrophagen, bestand und an der Gefäßwand in ein Granulationsgewebe überging und sich organisierte. Reste der originären Gefäßwandstruktur konnten zwar nachgewiesen werden, die Media mit ihrer Schicht aus glatten Muskelzellen war aber stark fragmentiert. Zum Gefäßlumen hin veränderte sich die Gefäßwand in ungeordnetes Granulationsgewebe und reichlich Fibroblasten. In der Gefäßwand waren außerdem regressive Kalzifizierungen zu beobachten, die als Reaktion auf den Stent zu werten waren. Im Myokard fanden sich Zeichen eines subakuten Infarktes: Übergänge von gesundem Myokard über Granulationsgewebe bis hin zu Nekrosen. Die VV wiesen eine unterschiedliche Anzahl ungleichmäßig geformter Schichten glatter Muskelzellen auf.

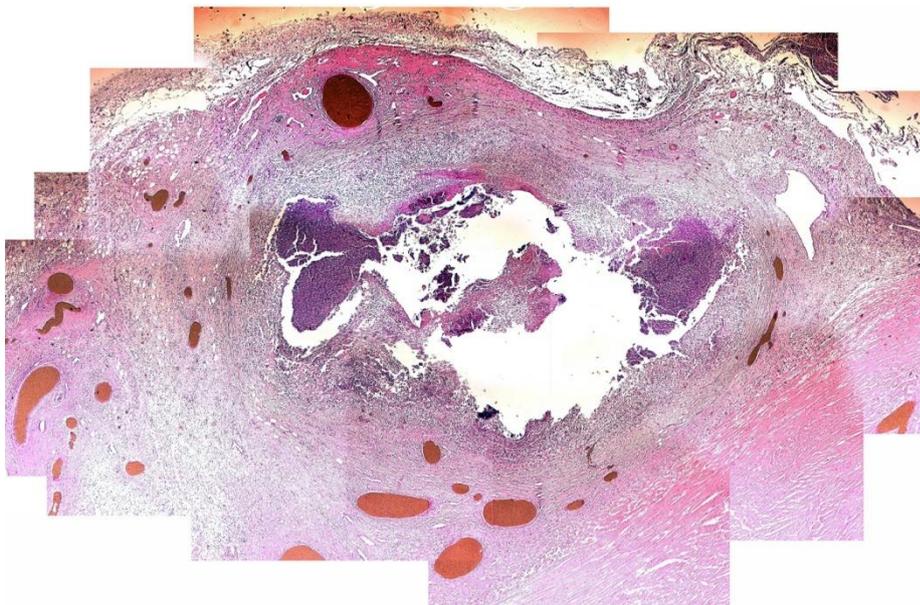


Abb. 23 – HE-Färbung eines histologischen Schnittes aus der Gefäßregion der linken Koronararterie, in der sich der Kupferstent befand.

Quer angeschnittene linke Koronararterie, umgeben von VV, die mit braunem Kontrastmittel gefüllt sind. Das Bild ist aus mehreren Einzelaufnahmen zusammengesetzt.

An D12 hatten die größten Gefäße 1.96 ± 0.15 Schichten glatter Muskelzellen (SMC) pro Vas Vasorum im Gegensatz zu 0.97 ± 0.03 Schichten pro Gefäß in der Kontrollgruppe. Dies entspricht einem Zuwachs um 102.06%. Die Schichten glatter Muskelzellen pro Vas Vasorum korrelierte dabei linear mit dem Untersuchungszeitraum ($R^2=0.81$; $p=0.000$) (Abb. 24).

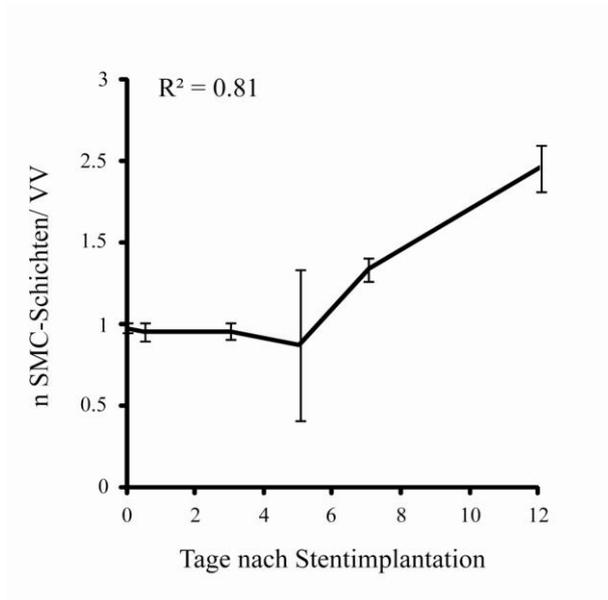


Abb. 24 – Histomorphologie der Gefäßwand der Vasa Vasorum.

Die Zahl der Schichten glatter Muskelzellen (SMC) steigt linear im Untersuchungszeitraum um 102.06% an.

4. DISKUSSION

I. Teil: Methodenetablierung zur Herstellung von Korrosionspräparaten und Anfertigung postmortaler Angiographien in Verbindung mit der Stereoskopie

Der Wunsch, Gefäße in ihrer räumlichen Anordnung darzustellen, ist so alt wie die Injektionsmethode selbst. Die Geschichte der Gefäßinjektion reicht zurück bis auf Leonardo da Vinci um das Jahr 1500 ⁸⁹. Für die Raumdarstellung der Gefäße stehen drei Methoden zu Verfügung: die Aufhellung, die postmortale Angiographie und die Korrosion.

Die Aufhellungsmethode ist seit dem Ende des 18. Jahrhunderts bekannt und beruht auf der Angleichung des Brechungsindex von Präparat und umgebendem Medium ⁹⁵. Diese Methode bringt Präparate mit einer hohen Detailgenauigkeit hervor, ist aber sehr aufwendig und soll hier nur cursorisch erwähnt bleiben.

Die Etablierungsarbeit der beiden anderen Methoden, der Korrosion und der postmortalen Angiographie, zur Darstellung von Gefäßen im Schweineherzen erbrachte drei wichtige Ergebnisse:

1. Mit der postmortalen Angiographie können unter Verwendung des Versuchsaufbaus 3, der beschriebenen Versuchsdurchführung und des Bariumsulfat-KM 3 arterielle Gefäße bis zur 6. Ordnung dargestellt werden.
2. Mit Hilfe eines Tisches, mit dem das Herz horizontal auf dem Mammographietisch verschoben wird, ist es möglich, stereoskopische Bilder anzufertigen.
3. Mit dem Acrylharz können in der Zusammensetzung, wie sie in der Methodik beschrieben wurde, detailreiche Korrosionspräparate angefertigt werden.

Im ersten Teil dieser Diskussion werden diese Ergebnisse gewertet.

4.1. Postmortale Angiographie

Als letzte der drei oben genannten Verfahren zur Darstellung von Gefäßen entwickelte sich die postmortale Angiographie, kurz nachdem Röntgenstrahlen praktisch angewandt werden konnten. Auch bei dieser Methode kamen vor allem während der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts viele Injektionsmethoden und Kontrastmittel zum Einsatz, aber nur wenige werden heute noch angewandt. Bariumsulfat-Gelatine als KM gehört dazu, das vor allem nach Schlesingers Arbeit⁸⁵ oft für Angiographien eingesetzt wurde. Die moderne Arteriogeneseforschung begann mit Fulton^{33, 34}, der mit seinen Bismuth-Oxychlorid-Angiogrammen wichtige Erkenntnisse zur Kollateralentwicklung machte⁷⁹.

Die postmortale Angiographie ist eine komplexe Methode mit vielen Einflussfaktoren, die beachtet werden müssen, um aussagekräftige Angiogramme zu erzielen. Eine Herausforderung bei der Untersuchung von Kollateralen besteht vor allem darin, ausschließlich den präkapillären arteriellen Schenkel der Koronargefäße zu perfundieren. In den meisten Studien wurde zur KM-Perfusion, wie in der vorliegenden Studie, die Perfusionstechnik nach Schlesinger angewandt, umstritten war aber der Perfusionszeitpunkt vor bzw. nach dem Lösen des Rigor mortis, die Notwendigkeit einer Vorperfusion, die Perfusionsmethode, die Höhe des Perfusionsdrucks und die Dauer sowie die Reihenfolge der Koronarperfusion. Diese Einflussfaktoren sollen nun im Einzelnen diskutiert werden.

4.1.1. Rigor mortis

Während in vielen Studien das Lösen des Rigor mortis abgewartet wurde^{7, 40, 78}, stellten andere Autoren fest, dass bei einer Perfusion nach mehr als 24 Stunden post mortem vermehrt Extravasate auftraten³⁸. In der vorliegenden Studie konnten wir keinen Qualitätsunterschied zwischen den Angiogrammen feststellen, die vor bzw. nach dem Lösen des Rigor mortis angefertigt wurden. Aus praktischen Gründen lagen aber oft 12-24 Stunden zwischen Herzentnahme und KM-Perfusion. Außerdem lassen sich die Herzen, wenn sie nach der Methode von Reiner und Rodriguez⁷⁰ aufgeschnitten werden, nur schlecht ausbreiten, wenn noch eine Todesstarre besteht⁸⁹.

4.1.2. Vorperfusion

Durch eine Perfusion mit 0.9%-iger NaCl-Lösung vor der eigentlichen KM-Perfusion werden Blutgerinnsel und Luftblasen aus den Gefäßen entfernt. Man beugt so einer inkompletten Füllung vor³⁸. Andere Autoren berichten jedoch auch über gute Ergebnisse ohne diese Vorperfusion⁸⁹. In der vorliegenden Arbeit hat sich die Vorperfusion vor allem deshalb bewährt, weil dadurch Blutreste aus den Gefäßen gespült wurden und Artefakte durch eingeschlossene Luftblasen vermieden werden konnten.

4.1.3. Perfusionstechnik

Im Laufe der Zeit wurden viele Methoden und Techniken angewandt, um einen gleichmäßigen Druck aufzubauen: Perfusionen nur mit einer Handspritze⁸⁹, mit Hilfe von Schwerkraft, mit Injektionsautomaten oder Rollerpumpen³⁸. Der Versuchsaufbau in dieser Studie war an dem von Schlesinger⁸⁵ orientiert. Das geschlossene System des Versuchsaufbaus 1 zeigte, dass der Druck im System schnell anstieg, nachdem wenig KM in die Koronararterien perfundiert wurde, sich das Kontrastmittel in den Gefäßen aufstaute und dadurch der Perfusionswiderstand anstieg. Es verdeutlichte die Notwendigkeit eines Ventils, durch das Druck aus dem System entweichen konnte, wenn dieser zu stark stieg. Der Versuchsaufbau 2 löste dieses Problem, war aber zu ungenau in der Druckeinstellung. Beim Versuchsaufbau 3 ließ sich der Druck ohne Schwankungen gut einstellen. Ein weiterer Vorteil des Versuchsaufbaus 3 waren die Drei-Wege-Hähne, die direkt vor den Knopfkanülen angebracht waren. Damit konnten einerseits die zuführenden Schläuche vor der Vor- und KM-Perfusion entlüftet werden, andererseits konnte nach der KM-Perfusion ein Zurückfließen des KM vor dem Erstarren des KMs verhindert werden. Sukzessive konnte so die Perfusionstechnik verbessert werden, so dass die letzten Herzen der Etablierungsphase des Bariumsulfat-KMs 3 und die Versuchstierherzen des II. und III. Teils der Studie ohne Artefakte durch Luftblasen waren.

4.1.4. Reihenfolge der Koronarperfusion

Die Reihenfolge der KM-Perfusion der Koronararterien (d.h. eine Perfusion der Koronararterien gleichzeitig vs. sequenziell) ist vor allem bei der Darstellung von Kollateralen wichtig. Da z.B.

interkoronare Kollateralen zwei unterschiedliche Stromgebiete miteinander verbinden, werden diese vor allem dann perfundiert, wenn wie bei einer sequenziellen Perfusion ein Druckgradient zwischen den Stromgebieten besteht^{7, 101}. Diese Technik wurde als erstes von Fulton etabliert³³. In der vorliegenden Studie konnte bestätigt werden, dass eine sequenzielle, gefolgt von einer gleichzeitigen Perfusion der Koronararterien, ein gutes Ergebnis liefert.

4.1.5. Perfusionsdruck, Perfusionslänge und Kontrastmittel

Die Höhe des Perfusionsdrucks und die Dauer der Perfusion ist grundsätzlich abhängig vom KM selbst, von der Viskosität des KMs und vom Gewebe. Direkte Vergleiche sind daher zwischen den Studien nur bedingt aussagekräftig.

Das 1. Bariumsulfat-KM nach Barmeyer zeigte in unserer Studie eine schlechte Füllung des Gefäßsystems und blieb hinter den Ergebnissen von Barmeyer⁷ zurück. Der Unterschied in den Ergebnissen lässt sich bei sonst gleichen Voraussetzungen am ehesten auf die längere Perfusionszeit von 4 min (gleichzeitige und anschließend sequenzielle Perfusion der Koronararterien bei 200 mmHg) bei Barmeyer zurückführen.

Mit dem 2. Bariumsulfat-KM wurden insgesamt bessere Angiogramme als mit dem 1. KM angefertigt. Es zeigte sich auch, dass sich sowohl ein höherer Druck von 200 mmHg als auch eine längere Perfusionszeit positiv auf das Ergebnis auswirken.

Trotz der guten Ergebnisse mit dem 2. Bariumsulfat-KM wurde das 3. Bariumsulfat KM weiter untersucht, da schon die ersten Versuche zur Etablierung des Versuchsaufbaus 1 eine gute Füllung aufwiesen. Auf die Ergebnisse der ersten beiden KM aufbauend zeigte sich, dass sowohl der Druck wie auch die Perfusionszeit noch weiter erhöht werden können, um ein noch besseres Füllungsergebnis zu erzielen. Durch eine sequenzielle KM-Perfusion mit 240 mmHg über 5 min und eine anschließende 1-minütige Perfusion aller Koronararterien gleichzeitig konnten wir ein optimales Füllungsergebnis erzielen.

Obwohl der verwendete Perfusionsdruck höher als bei allen anderen bisherigen vergleichbaren Studien war^{7, 33, 78}, wurden keine Extravasate oder Gefäßzerstörungen nachgewiesen. Eine Perfusion mit einem Druck, wie er auch physiologisch im Gefäßsystem herrscht, hat keinen

Vorteil, da sich post mortem alle Einflussfaktoren auf den Blutdruck im Gefäßsystem verändern: Venendruck, Gewebsturgor und Muskelspannung fehlen. Eine Perfusion post mortem folgt also nur physikalischen, nicht hämodynamischen Gesetzen. Dies führt zu einer Gefäßweitung, so dass post mortem gemessene Parameter nicht mit intravitalen Werten übereinstimmen, eine Vergleichbarkeit dadurch nur zwischen Tieren besteht, die mit derselben Methode perfundiert wurden⁸⁹.

Das Bismuth-KM entsprach dem KM, das auch Fulton benutzt hatte³³, es konnten aber unter gleichen Voraussetzungen keine ähnlichen Ergebnisse erzielt werden^{33, 84}. Versuche mit demselben Perfusionsdruck von 150 bis 200 mmHg mussten abgebrochen werden, da das KM die Koronarvenen mit perfundierte. Dabei konnte eine paradoxe Gefäßfüllung beobachtet werden: kleinste Gefäße wurden perfundiert, aber da das KM auch venöse Gefäße anfüllte und sich nicht präkapillar aufstaute, wurden vor allem größere Gefäße 2. und 3. Ordnung nicht perfundiert.

Ein weiterer Nachteil des Bismuths ist, dass es zwar eine höhere Röntgendichte als Bariumsulfat-KM aufweist, aber auch eine nachfolgende Histologie negativ beeinflusst⁷⁸. Es wurde daher darauf verzichtet, weitere Versuche mit diesem KM zu unternehmen.

4.2. Ausrollen des Herzens

Es werden verschiedene Methoden beschrieben, wie man ein Herz aufschneiden kann, um Summationsprojektionen in der Röntgenuntersuchung durch flaches Ausbreiten des Herzens zu vermeiden⁸⁹. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode nach Reiner und Rodriguez⁷⁰ gewählt, da mit dieser Methode am besten das Septum dargestellt wird. Kollateralen, die zwischen dem RCX und der RCA verlaufen sowie zwischen LCA und RCA, werden jedoch durchgeschnitten.

4.3. Stereoskopie

Die Stereoskopie ist der Versuch, 3-dimensionale Bilder anzufertigen, indem es das menschliche Sehen nachempfunden. Das 3-dimensionale Sehen des Menschen basiert darauf, dass jedem Auge ein Bild aus einem gering unterschiedlichen Blickwinkel angeboten wird. Das linke Auge sieht

mehr von der linken Seite eines Objekts, das rechte mehr von der rechten. Diese beiden inhaltsgleichen, aber nicht geometrisch gleichen Bilder werden gedanklich zu einem zusammengesetzt und ergeben in der Summe einen 3-dimensionalen Gesamteindruck⁵. Ein 3-dimensionales Sehen ist daher abhängig vom Abstand der beiden Augen zueinander, mit nur einem Auge ist dies nicht mehr möglich.

Grundsätzlich gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten, um diese Verschiebung, die sog. stereoskopische Deviation, zu erzielen. Entweder wird der Bildempfänger verschoben (wie bei den Augen, nur dass es hier gleich zwei Bildempfänger gibt, die nebeneinander angeordnet sind) oder der Bildsender. Da bei dem verwendeten Röntgengerät die Röntgenquelle und der Mammographietisch starr zueinander ausgerichtet waren und nicht gegeneinander bewegt werden konnten, musste der Bildsender, d.h. das Herz, das von Röntgenstrahlen durchleuchtet wurde, verschoben werden. In den ersten drei Versuchsaufbauten wurde dies über eine Wippenkonstruktion versucht, wie sie auch Schaper angewandt hat⁷⁸. Stereoskopische Bildpaare konnten damit aber nicht angefertigt werden, da es nicht zu einer horizontalen, sondern vor allem zu einer vertikalen Verschiebung kam (neben anderen Bewegungsartefakten, die durch das Kippen des Versuchsaufbaus entstanden). Ein stereoskopisches Bildpaar ist so nur an der Linie entstanden, über die die Wippe gekippt wurde, weil es hier zu keiner vertikalen Verschiebung kam. Daraufhin wurde der Versuchsaufbau umgebaut und ein Tisch angefertigt, der lediglich zu einer Verschiebung des Herzens in der horizontalen Ebene führte. Bewegungsartefakte wurden durch die Fixierung des Versuchsaufbaus auf dem Mammographietisch mit Hilfe der Zwingen ausgeschlossen. Dabei ist eine Verschiebung von 46 mm zwischen den Bildpaaren zwar relativ gering, reichte aber aus, um stereoskopische Bilder zu erzeugen. Schoenemackers empfahl eine noch größere Verschiebung von 7 cm⁸⁹, ein Abstand der auch etwa dem Abstand zwischen den Augen entspricht.

Während die Stereoskopie eine Methode ist, die in der Geschichte immer wieder eingesetzt wurde, um in Angiographien Kollateralen zu identifizieren^{32, 78}, unterschied sich die Methode, mit der die beiden Halbbilder dem Untersucher dargeboten wurden. Meistens wurden die Halbbilder mit einem speziellen Stereoskop betrachtet, das die beiden Halbbilder jedem Auge getrennt zeigte. In der vorliegenden Studie wurden die Halbbilder mit Hilfe der Anglyoglyphentechnik den Augen präsentiert und mit einer 3D-Brille angesehen. Diese Technik ermöglicht durch die Unabhängigkeit spezieller Betrachtungsvorrichtungen eine bessere

Objektivierbarkeit der Ergebnisse. Ändert man die Zuweisung eines stereoskopischen Bildpaares zum Augenpaar, so dass das linke Auge das Bild für das rechte Auge sieht und umgekehrt, dann dreht sich die räumliche Ausdehnung des Bildes um (Pseudoskopie) ⁵. Dies kann durch das Umdrehen der Brille, d.h. durch einen Wechsel der beiden farbigen Folien vor dem Auge erzielt werden. Je nach dem, wie man die Brille trägt, sieht man dann entweder auf die endokardiale oder epikardiale Seite des linken Ventrikels. Jeweils genau andersherum stellt sich wegen des Aufschneidens des Herzens nach der Methode von Reiner und Rodriguez ⁷⁰ der rechte Ventrikel dar. Die Pseudoskopie kann bei der Untersuchung des Verlaufs von Kollateralen sehr hilfreich sein.

4.4. Korrosionsmethode

Unter der Korrosionsmethode versteht man die Injektion eines Mittels in das Gefäßsystem und nach Aushärten desselben die Korrosion des umliegenden organischen Gewebes. Man erhält so einen Negativabdruck der Gefäße. Die Korrosionsmethode hat eine lange Geschichte, schon da Vinci soll die Korrosionsmethode zur Darstellung von Herzhöhlen und Hirnventrikeln genutzt haben ⁸⁹. Im Laufe der Jahrhunderte kamen viele verschiedene Injektionsmittel zum Einsatz. Auch der Zusatz von Bleimennige wurde erprobt, um Korrosionspräparate einer radiologischen Untersuchung zuzuführen ⁸⁸. Als erster wiesen Baroldi et al. mit Hilfe der Korrosionsmethode koronare Kollateralen beim Menschen nach ⁸. Die Vorteile von Korrosionspräparaten ist, dass Artefakte selten sind ³⁸ und die topographischen Verhältnisse in allen drei Dimensionen erfasst werden können ⁸⁷. Die Nachteile umfassen unter anderem das Schrumpfen der Präparate nach dem Aushärten ³⁸ und die Zerbrechlichkeit der Präparate.

Die Korrosionspräparate, die in dieser Studie mit dem Acrylharz Acrifix ® 190 angefertigt wurden, zeigten feinste Gefäße, deren Füllung nicht durch unterschiedliche Mengen an Verdünner 20 beeinflusst wurde. Die Zugabe von Bleimennige beeinflusste die Härte der Korrosionspräparate positiv und kann daher für die Verwendung in Korrosionspräparaten empfohlen werden. Für eine röntgenologische Darstellung der Koronararterien ist Bleimennige wegen der ungleichmäßigen Verteilung der Bleimennige und des Summationseffekts in der Röntgenaufnahme nicht geeignet. Da die Menge der Injektionsmasse den Füllungsgrad der Korrosionspräparate beeinflusst, hat sich hier eine Menge zwischen 8-10 ml pro Koronararterie als geeignet erwiesen, um kleinste Gefäße darzustellen.

Die Korrosion in 10%-iger Kalilauge dauert zwar länger als bei einer höher prozentigen Lauge⁴⁰, hat aber keinen Nachteil bezogen auf das Ergebnis der Korrosionspräparate.

Die weißlich-kristallinen Strukturen sind am ehesten auf Rückstände von Kalkseifen aus Organfetten und Kalilauge zurückzuführen^{40, 86}. Diese ließen sich auch durch mehrmaliges Waschen der Präparate nicht auflösen. Ein Abspülen der Präparate, wie es andere Autoren vorgeschlagen haben⁸⁶, war nicht möglich, da die Gefäße zu zerbrechlich waren.

II. Teil: Nachweis präexistenter Kollateralen sowie Induktion und Analyse von Kollateralisierung im Schweineherzen

Die Diskussion des zweiten Teils der Studie richtet sich nach zwei Einteilungsprinzipien von Kollateralen am Schwein. Kollateralen werden nach Rockstroh et al. in vier Typen klassifiziert: interatriale, intraseptale, interkoronare und Brückenkollateralen⁷⁴. Die interatrialen Kollateralen sollen hier nur cursorisch erwähnt bleiben, da in der Studie nur koronare Gefäße untersucht wurden, die die Ventrikel versorgen.

Des weiteren stellten Fulton und van Royen fest, dass man grundsätzlich oberflächliche (epikardiale) und tiefe (subendokardiale und intramurale) Kollateralen unterscheiden kann³². Auf zwei für die tiefe Kollateralisierung im Schwein wichtige anatomische Strukturen, die Schaper beschrieb, soll außerdem vertieft eingegangen werden: dies sind zum einen die Papillarmuskeln, an denen man im Schwein oft ein subendokardiales Netzwerk von Kollateralen findet⁷⁷, zum anderen das Moderatorband (Trabecula septomarginalis), ein muskulärer Strang, der sich zwischen Septum und anteriorem Papillarmuskel im rechten Ventrikel aufspannt, und in dem sich häufig intramurale Kollateralen befinden^{69, 75, 77}.

Die wichtigsten Ergebnisse des zweiten Teils der Arbeit waren folgende:

1. Präexistente Kollateralen sind im nativen Schweineherzen mit Hilfe von Korrosionspräparaten nachweisbar.
2. Arteriogenese ist im Schwein induzierbar. Für die Kollateralisierung sind vor allem

superfizielle Kollateralen, weniger tiefe, subendokardiale Kollateralen verantwortlich.

3. Langstreckige interkoronare und intrakoronare Kollateralen entwickeln sich früh und werden von kurzstreckigen Brückenkollateralen ab D7 und von intrakoronaren Kollateralen ab D12 abgelöst.
4. Das Moderatorband hat auf Grund seiner Lage im rechten Ventrikel als anatomische Struktur eine besondere Bedeutung für die frühe Kollateralisierung des Schweineherzens.

Diese Ergebnisse sollen nun nach dem oben genannten Einteilungsprinzip diskutiert werden, um abschließend in der Zusammenschau der Ergebnisse eine Aussage über die Kollateralisierung des Schweineherzens in diesem Tiermodell zu treffen.

4.5. Superfizielle Kollateralen

Die Ergebnisse der Korrosionspräparate zeigen, dass in nativen Schweineherzen superfizielle, präexistent angelegte Kollateralen vorhanden sind, die interkoronar die Wasserscheidenregion zwischen zwei Gefäßgebieten überbrücken und die beiden Koronararterien miteinander verbinden. Damit können Aussagen, die die Existenz von präexistenten Kollateralen im Schwein verneinen^{32, 41, 73}, widerlegt werden. Die Ergebnisse bestätigen Rodrigues et al., die feststellten, dass in 75% der Schweineherzen mindestens zwei Anastomosen zu finden sind⁷⁵.

Die Tierexperimente zeigen, dass durch eine minimal invasiv induzierte Gefäßokklusion mit Hilfe eines Kupferstents Kollateralwachstum in 88.46% der untersuchten Schweineherzen stimuliert werden kann. Lediglich bei ca. 12% der Tieren, die zu frühen Zeitpunkten nach Stentimplantation finalisiert wurden, konnten keine Kollateralen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu der Beobachtung von Rodrigues et al., die nur in 30% der von ihnen untersuchten nativen Schweineherzen oberflächliche Kollateralen nachweisen konnten⁷⁵. Dieser Unterschied lässt sich am ehesten darauf zurückführen, dass in der vorliegenden Studie Kollateralen durch die induzierte Gefäßokklusion zum Wachstum stimuliert wurden, die im nativen Schweineherzen nicht nachweisbar waren. Schon Fulton stellte fest, dass der Nachweis von präexistenten Kollateralen im Schwein schwierig und abhängig von der Methode ist, die eingesetzt wird³².

Je länger die Schweine nach der Induktion des Arteriogeneseprozess durch die Stentimplantation lebten, desto mehr Kollateralen wurden ausgebildet. Deutlich bildet dies die Zunahme von 0.5 Kollateralen pro Tier D0.5 zu 3.08 Kollateralen pro Tier D56 ab. Ausreißer aus diesem Trend sind in der kleinen Fallzahl der Gruppen begründet.

4.5.1. Interkoronare Kollateralen

Die Daten der vorliegenden Studie zeigen, dass interkoronare Kollateralen zwar bei 34.62% der untersuchten Schweine gefunden werden konnten, diese aber nur 15% der beobachteten Kollateralen darstellen. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den von Robbins und Rodriguez, in deren Studien 53.85% der Kollateralen interkoronar waren ⁷³. Dieser Unterschied lässt sich neben der Möglichkeit, dass Robbins und Rodriguez eine andere Schweinerasse verwendeten, damit erklären, dass Robbins und Rodriguez nicht nach der Einteilung von Longland ⁶¹ Stamm, Mittelzone und Wiederanschluss der Kollaterale an ein Gefäß identifizierten. So ergeben sich Fehlermöglichkeiten, da zum Beispiel über das Moderatorband oft Gefäße verlaufen (s.u.), diese aber nicht in allen Fällen Anastomosen darstellen.

Die Daten der Studie decken sich auch nicht mit Robbins und Rodriguez' Beobachtung, dass 77% der interkoronaren Kollateralen die LCA mit der RCA anastomosierten, von denen 54% über das Moderatorband, 9% über die freie Wand des rechten Ventrikels und 14% über das Septum verliefen ⁷³. Die Tatsache, dass in der vorliegenden Studie nur Kollateralen zwischen LCA und RCA nachgewiesen wurden, hat zwei Gründe: zum einen standen die Kollateralen zwischen LCA und RCA im Fokus der Untersuchung, da eine Stenose in der LAD induziert wurde, zum anderen konnten Kollateralen zwischen dem RCX und der RCA nicht nachgewiesen werden, da diese durch das Aufschneiden und Ausrollen der Herzen nach der Methode von Reiner und Rodriguez ⁷⁰ nicht mehr zu identifizieren waren. Der Unterschied des Verlaufs der interkoronaren Kollateralen zu vorliegenden Daten liegt in der individuellen Schwankungsbreite der Gefäßverteilung.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass die Kollateralisierung über interkoronare Kollateralen vor allem ein frühes Ereignis darstellt, da bis D14 die Hälfte der Tiere interkoronare Kollateralen aufweisen, während dies später nur bei 16.67% der Tiere der Fall ist. Während der ersten 14 Tage nach Stentimplantation sind 30.43% der Kollateralen interkoronare, während es bis D56 nur

noch 5.41% sind. Diese Beobachtung lässt sich, auch wenn die Daten wegen der kleinen Gruppengröße nicht signifikant sind, folgendermaßen erklären: interkoronare Kollateralen sind präexistent angelegt und werden zu einem sehr frühen Zeitpunkt nach Induktion der Stenose rekrutiert. Dem Moderatorband kommt dabei eine besondere Bedeutung zu, da über diese Struktur 2/3 der interkoronaren Kollateralen zwischen LCA und RCA zogen. Die Bedeutung des Moderatorbands wird später weiter vertieft. Die Messergebnisse zeigen, dass interkoronare Kollateralen, die über die freie Wand des rechten Ventrikels ziehen, zwar selten sind, wenn sie aber auftreten, über eine große Wachstumsdynamik verfügen.

4.5.2. Intrakoronare Kollateralen

Die Daten der Studie zeigen, dass intrakoronare Kollateralen im Schwein nach den Brückenkollateralen zu den zweit häufigsten superfizialen Kollateralen gehören. Die Ergebnisse weichen leicht von denen von Robbins und Rodriguez ab, die feststellten, dass 46.15% der von ihnen untersuchten Kollateralen intrakoronar waren⁷³. Der Unterschied zu den vorliegenden Ergebnissen ist nicht groß, kann aber zum einen dadurch erklärt werden, dass Robbins und Rodriguez in ihrer Studie native Schweineherzen untersuchte, zum anderen, dass sie Brückenkollateralen nicht von intrakoronaren Kollateralen unterschieden.

Die Ergebnisse zeigen, dass je länger der Untersuchungszeitraum nach Induktion der Stenose ist, desto mehr Schweine intrakoronare Kollateralen entwickeln. D56 haben 83.33% der Tiere intrakoronare Kollateralen. Die Entwicklung von intrakoronaren Kollateralen scheint relativ parallel zu der von Brückenkollateralen zu verlaufen, wenn auch nicht so ausgeprägt. Ab D12 sind intrakoronare Kollateralen, die in unmittelbare Nähe zur Okklusion lokalisiert sind, nachweisbar. Zu einem früheren Zeitpunkt sind intrakoronare Kollateralen nur bei drei Tieren nachweisbar, bei denen die Kollateralen langstreckig entweder über das Moderatorband oder über einen Seitenast im Septum verlaufen. Ein Tier an D56 Tage hat eine intrakoronare Kollaterale, die durch das Septum zieht, und bildet damit eine Ausnahme.

Die Diametermessungen zeigen, dass nicht nur die Anzahl der intrakoronaren Kollateralen ab D12 zunimmt, sondern auch ihr Durchmesser. Die intrakoronaren Kollateralen, die direkt an der Überbrückung der Okklusion beteiligt sind, nehmen um das 1.77-fache im Durchmesser zu. Der Durchmesser der beiden intrakoronaren Kollateralen, die endomural durch das Ventrikelseptum

verlaufen, verändert sich kaum. Dies deutet darauf hin, dass sie keinen Arteriogeneseprozess durchlaufen. Die Aussagekraft dieses Ergebnisses ist aber limitiert durch die Tatsache, dass nur in zwei Tieren endomurale Kollateralen nachgewiesen werden konnten.

4.5.3. Brückenkollateralen

Brückenkollateralen wurden in anderen Studien oft nach Implantation eines Ameroidkonstriktors beobachtet, der zur experimentellen Induktion einer Stenose von außen ein Gefäß komprimiert⁷⁷. Auch in dieser Studie stellen sie die häufigste superfizielle, koronare Kollaterale dar. Sie kann bei den meisten Tieren nachgewiesen werden, wobei ab D12 jedes Tier Brückenkollateralen ausgebildet hat. In einem Tier ist eine Brückenkollaterale sogar ab D7 nachweisbar. Ab diesem Zeitpunkt nehmen die Anzahl und der Durchmesser der Brückenkollateralen zu. Die Anzahl steigt von anfangs 0.33 Brückenkollateralen pro Tier D7 auf 1.58 an D56. Die beiden Tiere, die D14 verstarben, fallen aus dem Trend heraus, da die Gruppengröße so klein ist. Der Diameter der Brückenkollateralen, die im Micro-CT gemessen wurden, nimmt um mehr als das Doppelte innerhalb von 49 Tagen von D7 nach D56 zu. Dies stellt eine eindrucksvolle Wachstumsdynamik dar, die im III. Teil der Arbeit vertieft untersucht werden soll.

4.6. Tiefe Kollateralen

4.6.1. Subendokardiale Kollateralen auf dem Papillarmuskel

Die große Bedeutung der subendokardialen Kollateralen für die Kollateralisierung beim Schwein wurde bereits in früheren Studien erkannt^{75, 77, 104}. Rodrigues et al stellten fest, dass Kollateralen im Schwein in bis zu 70% subendokardial liegen⁷⁵. Die vorliegenden Daten bestätigen, dass im Schweineherzen ein ausgedehntes, kollaterales Netzwerk an den Spitzen der Papillarmuskeln vorhanden ist, das lokal intrakoronar miteinander anastomosiert. Meistens haben sie darüber hinaus eine Funktion als interkoronare Kollateralen: an der Spitze des posterioren Papillarmuskels im linken Ventrikel anastomosieren häufig RCA und RCX. Der anteriore Papillarmuskel im linken Ventrikel wird von LCA und RCX versorgt, die auch anastomosieren können. Über den M. papillaris major im rechten Ventrikel anastomosieren häufig LCA und RCA

unter Nutzung des Moderatorbands ⁷⁵. Durch ihre subendokardiale Position und ihren meist kapillären Aufbau werden die Gefäße durch den intraventrikulären enddiastolischen Druck komprimiert und sind daher muskulären Kollateralen unterlegen ³².

Die vorliegenden Daten bestätigen, dass das subendokardiale Netzwerk zwar ausgedehnt ist, zeigen aber, dass das Netzwerk bis auf wenige Ausnahmen nur schwach ausgebildet bleibt. Daher konnte das kollaterale Netzwerk auf dem Papillarmuskel nicht mit Hilfe von postmortaler Angiographie und Micro-CT dargestellt werden. Es wurde darauf verzichtet, Messungen des Diameters durchzuführen, da sich diese Messungen am Stereomikroskop an einem Vergleichsmaßstab orientieren und damit meist sehr ungenau sind.

4.6.2. Intramurale Kollateralen auf dem Moderatorband

Die Ergebnisse bestätigen vorherige Studien, dass das Moderatorband eine wichtige anatomische Struktur für die Kollateralisierung des Schweineherzens darstellt ^{75, 77}. In 69.57% der Fälle sieht man makroskopisch Gefäße, die über das Moderatorband ziehen, die aber nur in ca. 1/3 der Fälle intramurale Anastomosen darstellen. Diese Daten decken sich mit Rodrigues et al., die in 65% der von ihnen untersuchten Herzen Gefäße beobachtete, die über das Moderatorband zogen. 20% der von ihnen nachgewiesenen interkoronaren Kollateralen verliefen zwischen dem trabekulären Ast der LCA und dem rechten ventrikulären Ast der RCA ⁷⁵. In der vorliegenden Studie konnten interkoronare Kollateralen weniger häufig beobachtet werden, dafür konnten in zwei Fällen intrakoronare Kollateralen dargestellt werden, die über das Moderatorband verliefen.

Die Daten zeigen, dass die Gefäße, die das Moderatorband als Leitstruktur benutzen, früh und häufig nach der Induktion der Gefäßokklusion zur Kollateralisierung rekrutiert werden. Durch ihren z.B. zu Brückenkollateralen vergleichsweise großen Gefäßdurchmesser von 50-300 µm im nativen Schweineherzen ⁶² sind sie bereits früh nach der Gefäßokklusion geeignet, nach dem Hagen-Poiseuille'schen Gesetz ein relativ großes Blutvolumen zu drainieren. Obwohl die Daten nur auf jeweils einem Tier pro Zeitpunkt basieren (an D7 auf zwei Tieren), zeichnet sich doch eine Zunahme des Gefäßdurchmessers bis D7 ab, der dann bis D56 wieder abnimmt. Die Häufigkeit, mit der auf dem Moderatorband Kollateralen identifiziert werden, kann mit der besonderen Topographie der Struktur erklärt werden. Durch die Lage des Moderatorbands im rechten Ventrikel sind die Gefäße, die in ihm verlaufen, wechselnden intraventrikulären

Druckbelastungen ausgesetzt: in der Systole werden die Gefäße komprimiert, in der Diastole gedehnt. Um einen stabilen Blutfluss bei dieser Doppelbelastung zu gewährleisten, verfügen die Gefäße über eine verbreiterte Tunica intima mit längs gerichteten Myozyten und eine breite Schicht zirkulär angeordneter glatter Muskelzellen in der Tunica media ⁶².

4.7. Kollateralisierung des Schweineherzens

Nach der Analyse der unterschiedlichen Kollateralen, die in der Studie gefunden wurden, erfolgt die Kollateralisierung des Schweineherzens nach Induktion einer Gefäßokklusion mit Hilfe eines Kupferstents folgendermaßen: Langstreckige, interkoronare und intrakoronare Kollateralen haben frühzeitig nach der Induktion der Gefäßokklusion eine Schutzfunktion gegen eine ausgeprägte myokardiale Nekrose. Dabei werden vor allem die Gefäße rekrutiert, die intramural über das Moderatorband verlaufen, da diese auf Grund ihrer Anatomie und Topographie hämodynamisch besonders günstig sind.

Ab D7 werden Brückenkollateralen ausgebildet, die kurzstreckig die Okklusion überbrücken. Diese verfügen zwar anfangs über einen relativ kleinen Durchmesser, sind aber nach dem Hagen-Poiseuille'schen Gesetz hämodynamisch günstig, weil sie deutlich kürzer sind als die langstreckigen inter- und intrakoronaren Kollateralen. Innerhalb kurzer Zeit nehmen die Brückenkollateralen zudem stark im Durchmesser zu und zeigen so eine beeindruckende Wachstumsdynamik. Brückenkollateralen stellen die wichtigsten und häufigsten Kollateralen in diesem Tiermodell dar.

Kurzstreckige intrakoronare Kollateralen unterstützen ab D12 die Umgehung der Okklusion durch Brückenkollateralen, indem sie das prästenotische Gefäß mit Seitenästen anastomosieren und Seitenäste mit dem poststenotischen Gefäß verbinden.

Die langstreckigen inter- und intrakoronaren Kollateralen der ersten Abwehr werden so im Vergleich zu den kurzstreckigen Brückenkollateralen und intrakoronaren Kollateralen hämodynamisch ungünstig, da ihr Gefäßwiderstand hoch ist. Die kollaterale Konduktanz nimmt ab. In Kollateralen, in denen der Blutfluss abnimmt, setzt eine subintimale Proliferation ein, die bis zur Okklusion des Gefäßes gehen kann. Dieser Prozess, der auch in der Embryonalentwicklung auftritt, wird als „Beschneidung“, Pruning, bezeichnet ^{12, 101}. Dieses

Phänomen kann mit dem Hagen-Poiseuille'schen Gesetz erklärt werden: Je kleiner die Querschnittsfläche der Gefäße und je länger das Gefäß ist, desto größer ist der Widerstand und der Energieverlust⁸³. In der Folge regredieren diese kollateralen Verbindungen und können später, wenn sie nicht über einen großen Durchmesser verfügen, wie die interkoronaren Kollateralen, die über die freie Wand des rechten Ventrikels ziehen, oder intrakoronare Kollateralen, die über das Moderatorband ziehen, nur noch selten nachgewiesen werden.

Es konnte gezeigt werden, dass das Schwein über eine ausgeprägte superfizielle Kollateralisierung verfügt. Das endokardiale, kollaterale Netzwerk im Schwein konnte zwar dargestellt werden, es hatte aber für die Umgehung des induzierten Gefäßverschlusses keine Bedeutung.

III. Teil: Ursprung, zeitlicher Entwicklungsverlauf und Histomorphologie von Brückenkollateralen

Seit Barger's Studie 1984⁶ hat die Forschung begonnen, sich auf die Rolle von VV in Gefäßerkrankungen zu fokussieren^{58, 64}. Brückenkollateralen, die ein Gefäß nach nicht-akutem Gefäßverschluss ersetzen, wurde bereits in anderen Studien beschrieben^{22, 98}, es ist aber wenig bekannt über den Ursprung, die Entwicklungsdynamik und die Histomorphologie von Brückenkollateralen. Weitere Daten dazu könnten wichtig für die Entwicklung neuer Therapien der Angina pectoris und des Gefäß bedingten Schwindels und der Claudicatio sein, zum Beispiel durch die therapeutische Stimulation von Brückenkollateralen.

Die drei wesentlichen Ergebnisse des dritten Teils der Studie sind daher:

1. Brückenkollateralen stammen vom longitudinal verlaufenden Typ 1 VV⁵⁹ ab.
2. Die Entwicklung von VV zu Brückenkollateralen ist ein schneller Prozess, der innerhalb von 7 Tagen nach Stentimplantation abläuft.
3. Brückenkollateralen weisen glatte Muskelzellen auf und sind daher wahrscheinlich funktionell relevant.

Im Weiteren sollen diese drei wichtigen Ergebnisse im Detail diskutiert werden.

4.8. Ursprung der Brückenkolateralen

Die Ergebnisse der Korrosionspräparate, der postmortalen Angiographie, des Micro-CTs und der Immunhistologie liefern zwei wesentliche Erkenntnisse zum Ursprung von Brückenkolateralen:

1. Die Ergebnisse der Korrosionspräparate zeigten, dass VV Typ 1⁵⁹ ein Netzwerk von präexistenten Arteriolen entlang der Koronararterien formen. Sie können als Substrat für Brückenkolateralen angesehen werden.
2. Die Micro-CT Untersuchungen ergeben, dass vor allem VVI³⁷, Typ 1⁵⁹ rekrutiert werden, um Brückenkolateralen auszubilden. In 70.37% der Brückenkolateralen anastomosieren zwei VVI. Seltener werden VVE³⁷ rekrutiert, die sich mit einer VVI verbinden und die Okklusion umgehen. Diese Definition einer Brückenkolaterale entspricht zwar nicht der von Rockstroh⁷⁴, dass Stamm und Wiedereintritt der Brückenkolaterale am selben Gefäß sind, berücksichtigt aber die unterschiedliche Genese von Brückenkolateralen aus VVI und auch aus VVE.

Die Ergebnisse können mit der Bernoulli Gleichung erklärt werden.

$$\frac{v^2}{2} + \frac{p}{\rho} = \textit{konst. Bernoulli Gleichung}$$

v: Strömungsgeschwindigkeit, p: statischer Druck, ρ: Dichte

Nach dieser stehen Strömungsgeschwindigkeit *v* und statischer Druck *p* eines inkompressiblen Fluids in einer festen Beziehung. Bei einem sich verengendem Querschnitt eines Gefäßes steigt die Strömungsgeschwindigkeit *v* in der Stenose an (Kontinuitätssatz) und der statische intravasale Druck *p* auf die Gefäßwand nimmt ab. Der intravasale Druck der Koronararterie, der den intravasalen Druck der VV übersteigt und so zu ihrer Kompression führt, nimmt mit folglich mit zunehmender Gefäßstenosierung ab und komprimierte VV werden geöffnet.

Der statische Druck p in der Stenose nimmt dabei nach dem Lamé Gesetz ²⁵ radial mit der Entfernung vom Mittelpunkt der Koronararterie ab.

$$\sigma_r = \frac{P \alpha^2}{b^2 - \alpha^2} \left(1 - \frac{b^2}{r^2} \right) \text{ Lamé Gesetz}$$

σ_r : radialer Druck, a : Gefässinnenradius, b : Gefässausseradius, r : radiale Position der VV

Es werden also zuerst Lumen ferne VV in der Gefäßwand der Koronararterie geöffnet und mit der weiteren Abnahme des statischen Drucks p auch Lumen nahe VV.

Die chronische Stenosierung der Koronararterie führt zu einem Strömungswiderstand R im Gefäß, durch den der Blutdruck prästenotisch ansteigt und poststenotisch absinkt. Diese Druckdifferenz Δp über R führt nach dem Hagen-Poiseuille'schen Gesetz zu einer proportionalen Steigerung des Volumenstroms \dot{V} über die geöffneten VV. Da die Gefäßwand der VV aber elastisch ist, ist der Gefäßradius r der VV in den Grenzen der Elastizität auch von der Druckdifferenz Δp abhängig und \dot{V} steigt folglich überproportional an. Der stark gesteigerte Volumenstrom \dot{V} , der über die VV verläuft, führt zu einer linearen Steigerung der Schubspannung τ und induziert Arteriogenese, die VV zu Brückenkollateralen umbaut (Abb. 25).

Zusammenfassend sind VV die Basis für Brückenkollateralen. Andere Erklärungen für die Entstehung von Brückenkollateralen, wie eine Hyperplasie der Media ²² oder arteriosklerotisch induzierte, neu gebildete Gefäße, die präexistente VV mit dem Lumen verbinden ⁶⁵ können somit für das hier entwickelte Tiermodell ausgeschlossen werden.

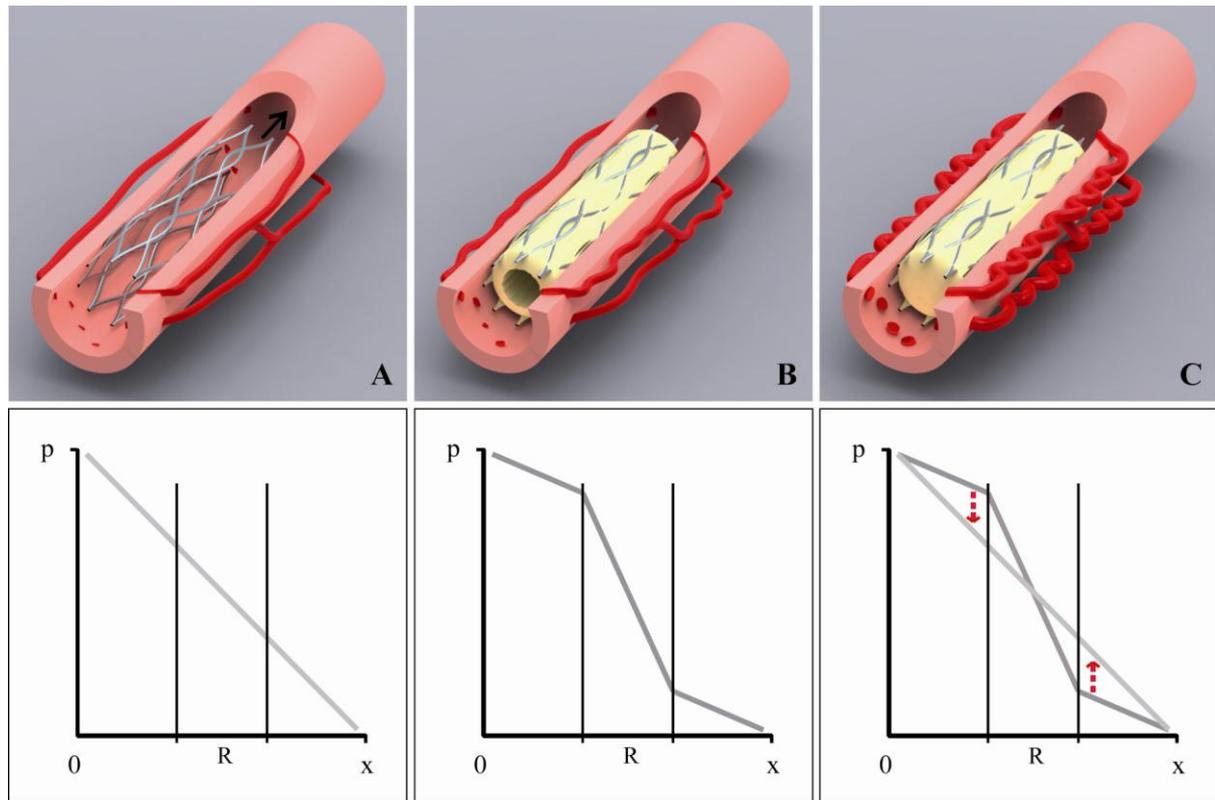


Abb. 25 – Schema der Entwicklung von Brückenkollateralen aus Vasa Vasorum (VV) durch Arteriogenese, induziert mit Hilfe eines semi-akut okkludierenden Kupferstents.

A: Normalerweise sind intramurale VV durch den intravasalen Druck der Koronararterie komprimiert und das hämodynamische Druckpotential (p) nimmt entlang des Verlaufs der Koronararterie (x) kontinuierlich ab. **B:** Durch die Induktion einer Stenose R nimmt die Strömungsgeschwindigkeit in der Stenose zu und der statische Druck auf die Gefäßwand nimmt ab (Bernoulli Gleichung); die VV werden geöffnet. Über R entsteht ein starkes Druckgefälle (Δp): prästenotisch steigt der Druck an, nimmt über R steil ab und erreicht poststenotisch ein niedriges Niveau. Der Blutstrom \dot{V} steigt proportional zu Δp an (Hagen-Poiseuille'sches Gesetz) und führt zu einer starken Schubspannung τ in den VV, die Arteriogenese induziert. **C:** Je ausgeprägter die Kollateralisierung ist, d.h. die Zunahme des Gefäßradius r der VV, desto mehr steigt der Blutstrom \dot{V} über R (nach dem Hagen-Poiseuille'sches Gesetz mit der 4. Potenz von r) und desto mehr nähert sich p seinem physiologischen kontinuierlichem Abfall an (rote Pfeile). Die Gefäßkonduktanz G der VV steigt und hämodynamisch relevante Brückenkollateralen entstehen.

4.9. Entwicklungsprozess der Brückenkollateralen

Der Wachstumsprozess der Brückenkollateralen zeigt drei typische Eigenschaften von Arteriogenese: Monocyteninvasion, Proliferation und Gefäßwachstum. Monocyten, auf denen CD163 exprimiert wird²⁹, strömen in den perivaskulären Raum, induzieren Ki-67+ Zellen, die mit Zellproliferation assoziiert sind⁹¹, und führen zu einem Umbau der Gefäßwand. Brückenkollateralen entstehen folglich durch aktiven Umbau und nicht durch passive Dilatation¹³.

Monocyten haben eine wichtige parakrine Funktion in der Arteriogenese, da sie den Umbauprozess der Kollateralen veranlassen⁵³. Die vorliegenden Ergebnisse bestärken die These, dass Monocyten zur Gefäßproliferation führen und so zur Zunahme der Gefäßgröße und -anzahl¹. Außerdem bestätigen die Ergebnisse frühere Studien. Einerseits kann Arteriogenese durch proinflammatorische Zytokine, wie GM-CSF, das Stammzellen anregt, Granulozyten und Monocyten zu produzieren und deren Lebensspanne verlängert⁵³, oder MCP-1⁵¹ stimuliert werden. So ist das Wachstum von Kollateralen und die Anzahl an zirkulierenden Zellen direkt positiv miteinander korreliert⁴⁴. Andererseits kann der Prozess der Arteriogenese durch die Inhibition der transendothelialen Migration von Monocyten mit Hilfe von ICAM-1 Antikörpern stark verlangsamt werden². (op/op⁻) Mäuse, die einen Mangel an zirkulierenden Monocyten haben, zeigen nach arterieller Ligatur ein schlechteres Regenerationspotential als Wildtypen¹⁰.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie verdeutlichen, dass Brückenkollateralen nach folgendem Muster entstehen: Innerhalb der ersten 24 Stunden nach Stentimplantation beginnen Monocyten in den perivaskulären Raum kleiner VV einzudringen. Dadurch kommt es zur Proliferation und kleine VV nehmen an Größe und Anzahl zu. Die Monocyteninvasion ist vor allem wichtig in der frühen Phase nach einem arteriellen Verschluss². Von D3 bis D5 gibt es am meisten Monocyten und proliferierende Zellen um mittlere Gefäße herum. Dies führt zur Entwicklung von großen Gefäßen ab D5. Diese nehmen wiederum bis D12 zu, während gleichzeitig weniger mittelgroße VV ab D7 nachgewiesen werden können. Es kann daraus geschlossen werden, dass die großen VV aus mittleren VV entstehen. Insgesamt nehmen Diameter und Perimeter in den ersten 12 Tagen nach Stentimplantation um das ca. 4-fache zu, die Gefäßquerschnittsfläche sogar um das ca. 19-fache, da der Radius der Fläche quadriert wird. Es ist aber auch schon

Kollateralwachstum um das 20-fache beobachtet worden ^{81, 105}.

Vor diesem Hintergrund sind folgende drei Beobachtungen entscheidend:

1. Die Zahl der Monocyten und der proliferierenden Zellen hat einen Verteilungsgipfel an D3.
2. Das Wachstum kleiner und mittlerer VV nimmt ab D7 ab.
3. Die Größe und Zahl der VV nimmt im Verlauf zu.

Die erste Beobachtung, dass Monocyten und proliferierende Zellen einen Verteilungsgipfel an D3 aufweisen, ist interessant, da dieses Maximum genau an dem Tag auftritt, an dem der Stent vollkommen okkludiert. Die Schubspannung in den präexistenten VV ist nach der Definition der Schubspannung (s.o.) zu diesem Zeitpunkt am größten.

Der Verteilungsgipfel von Monocyten und proliferierenden Zellen an D3 stimmt gut mit vorherigen Studien überein. Nach der semi-akuten Okklusion gibt es eine Phase, in der man keine Veränderung beobachten kann ⁷⁹. Innerhalb von drei Tagen nach Stentimplantation kommt es dann zur Makrophageninvasion ^{45, 92}, die eine lokale Entzündung verursacht ⁴⁵. Eine aktive Proliferation kann nach 24 Stunden zum ersten mal nachgewiesen werden ¹⁹, die zwischen D2 und D5 nach Gefäßligatur ihr Maximum erreicht ¹⁸. Zum ersten Mal konnten wir damit zeigen, dass Arteriogenese auch in VV von Schweinen stattfindet und zu einer signifikanten Kollateralisierung führt.

Der Verteilungsgipfel wird vor allem von Monocyten und proliferierenden Zellen um kleine Gefäße an D3 verursacht. Mittlere und große Gefäße sind zu diesem Zeitpunkt beinahe unbeeinflusst. Obwohl diese Ergebnisse nicht signifikant für die Monocyten sind, sind sie es für die proliferierenden Zellen. Dies verdeutlicht erneut, dass je kleiner die Gefäße sind, desto größer ist die Schubspannung und desto stärker der arteriogene Stimulus. Dieses Ergebnis wird durch die starke negative Korrelation von proliferierenden Zellen mit dem Zeitverlauf in großen Gefäßen bestärkt. Je größer die Gefäße werden, desto weniger proliferieren sie. Andere Tiermodellen zeigten, dass die Konduktanz der Kollateralisierung, d.h. der reziproke Wert des

Widerstandes des Gefäßes, nur ungefähr 30-40% der originalen Arterie erreicht^{28, 83}. Dieses Defizit bleibt während der gesamten Lebenszeit der Tiere bestehen und führt z.B. nach der Okklusion der Femoralarterie zu einer signifikanten Reduktion der Fähigkeit, auf einem Laufband zu laufen⁴⁷. Die Ursache für die Reduktion der Konduktanz ist die Schubspannung, die sich vorzeitig mit der 3. Potenz des Radius der wachsenden Kollaterale normalisiert²⁸. Die Potenz der Arteriogenese limitiert sich also durch ihre Abhängigkeit von der Schubspannung selbst. Durch die chronische Steigerung der Schubspannung mit Hilfe eines AV-Shunts, der den kollateralen Fluss direkt in das venöse Niederdrucksystem drainiert, konnten aber auch Konduktanzwerte in Kollateralen erzielt werden, die einem nicht-okkludiertem Gefäß entsprachen. Nach 4-wöchigem Shunt wurden sogar Konduktanzwerte erzielt, die doppelt so hoch waren wie die in einem nicht-okkludierten Gefäß²⁸. Die Differenz zwischen der Konduktanz der Kollateralgefäße, die physiologisch erreicht wird, und der, die durch eine chronische Steigerung der Schubspannung erreicht wird, stellt das therapeutische Potenzial der Arteriogenese dar, das durch Stimulation der Arteriogenese genutzt werden kann.

Die zweite wichtige Beobachtung, die Abnahme der Anzahl kleiner und mittlerer VV von D7 an, stellt den Beginn der 2. Phase der Arteriogenese dar: Nach der akuten Phase der Arteriogenese, dominiert von Inflammation, Rekrutierung vieler kleiner, präexistenter Anastomosen und Proliferation, beginnt eine Phase des positiven Umbaus⁹⁰. Während anfangs die große Anzahl initial proliferierender, kollateraler Arteriolen schnell und effektiv die Perfusion wiederherstellt, bilden sich nun die meisten durch Pruning zu Gunsten weniger Hauptgefäße und des Gesamtwiderstandes zurück^{12, 90, 101}. Am Ende bleiben nur ca. 10% der anfangs proliferierenden Gefäße als große Konduktanzgefäße bestehen⁹⁰: In dieser Studie sind es 1 bis 2 Brückenkollateralen pro Tier, die in der postmortalen Angiographie und im Micro-CT an D56 sichtbar sind.

Die dritte Beobachtung, die Zunahme der Größe und Anzahl der VV ab D3 wird durch das Maximum der Monocyten und proliferierenden Zellen an D3 hervorgerufen. Dies führt zu einer starken Zunahme der Größe und Anzahl der VV von D3 bis D7. Da Brückenkollateralen ab D7 in der postmortalen Angiographie und im Micro-CT sichtbar werden, kann D7 als Studienendpunkt bei weiteren Studien zur Arteriogenese mit diesem minimal invasiven Modell genutzt werden.

Im Micro-CT nahmen die Brückenkollateralen innerhalb kurzer Zeit zwischen D7 bis D12 um das 1.71-fache im Diameter zu. Dies stellt eine beeindruckende Wachstumsdynamik dar, die in der Folge bis D56 schwächer wird und ein weiterer Hinweis dafür ist, dass die 2. Phase der Arteriogenese abläuft.

Da die Kollateralen nicht nur in der Breite, sondern auch in der Länge wachsen⁸³, zeigen die Brückenkollateralen eine für Arteriogenese typische korkenzieherartige Morphologie. Es gibt dafür zwei Erklärungen: Entweder der gesteigerte Fluss in den präexistenten Kollateralen vergrößert vor allem präexistente Krümmungen des Gefäßes durch größere Schubspannung in der äußeren Krümmung eines Gefäßes⁸³ oder das Längenwachstum ist genetisch determiniert und rekapituliert die embryonale Entwicklung, bei der Gefäße immer in der Länge und Breite wachsen⁸⁰. Die Tortuosität wäre so Folge des Platzmangels im umliegenden Gewebe⁸³. Die Tortuosität limitiert ebenfalls die Arteriogenese, da sie einerseits das Gefäß verlängert und andererseits eine nicht-laminare Strömung verursacht, die zur Wirbelbildung führt. Der Flusswiderstand wird dadurch gesteigert und die Konduktanz nimmt ab^{46, 83, 90}.

Für die Zunahme der Anzahl der VV gibt es drei mögliche Erklärungen:

1. Die perkutane Angioplastie verursacht eine Gefäßverletzung, die eine Formierung von neuen Kapillaren initiiert^{24, 58, 76}. Die Entzündungsreaktion, die der Kupferstent auslöst, unterstützt noch den Wachstumsprozess, der durch die vorangegangene Gefäßverletzung initiiert wurde.
2. Es handelt sich um einen Messfehler, da die großen Gefäße durch ihren korkenzieherartigen Aufbau im histologischen Schnitt mehrfach angeschnitten werden.
3. Es handelt sich um eine Neubildung von Kollateralen. Obwohl das Prinzip der Arteriogenese darauf basiert, dass Kollateralen aus präexistenten Gefäßen gebildet werden, wird auch die Theorie der „Neoarteriogenese“ diskutiert. Diese geht davon aus, dass muskuläre Kollateralen auch aus Kapillaren de novo durch die Rekrutierung von glatten Muskelzellen gebildet werden können⁹³. Dieser Prozess, der als „Myogenese“ bezeichnet wird²¹, stellt die Verbindung zwischen Angiogenese und Arteriogenese dar und entspricht einer „postnatalen Vaskulogenese“⁴⁶. So konnte in einem

Schweinemodell, in dem eine Gefäßokklusion mit Hilfe eines Ameroidkonstriktors induziert wurde, im Ischämiegebiet ein Anstieg der Kapillardichte beobachtet werden, gefolgt von einem Anstieg der Anzahl der Arteriolen¹⁰⁴. Dasselbe Bild zeigte sich im M. adductorius nach der Ligatur der Femoralarterie in einem Kaninchenhinterlauf⁴⁹. Diese Ergebnisse werden durch eine andere Studie gestützt, die zum Schluss kommt, dass Arteriolen im Skelettmuskel aus Kapillaren entstehen können, die glatte Muskelzellen rekrutieren³⁹. Auch die Entstehung von Brückenkollateralen im Schwein wurde mit Neoarteriogenese in Verbindung gebracht⁴⁶. Es lassen sich also einige Hinweise für die Existenz von Neoarteriogenese im Schwein finden. Es bleibt aber fraglich, selbst wenn sie existiert, welches Gewicht sie bei der Revaskularisierung im Verhältnis zur Arteriogenese hat, die nur auf der Rekrutierung vorhandener Gefäße basiert.

Abschließend ist es wichtig festzustellen, dass der Progress des Arteriogeneseprozesses abhängig von der angewandten Methode zur Induktion einer Gefäßokklusion ist: Kollateralen können innerhalb von 2 Tagen nach akuter Gefäßligatur⁶⁸, nach Induktion einer hochgradigen Gefäßstenose innerhalb von 12 Tagen¹¹ oder 21 Tage nach Implantation eines Ameroidkonstriktors nachgewiesen werden¹⁰⁵.

4.10. Histomorphologie der Brückenkollateralen

Die Ergebnisse der Histomorphologie weisen darauf hin, dass die Kollateralisierung durch Arteriogenese im Schwein zwar - wie oben dargestellt – ein schneller Entwicklungsprozess ist, es aber trotzdem zum Infarkt kommt. Dies bestätigt, dass Schweine fast immer einen Infarkt bei einem Gefäßverschluss ausbilden^{46,77}.

Die Histomorphologie der Brückenkollateralen zeigt, dass Kollateralen im Schwein wahrscheinlich funktionell relevant sind. Wie andere Arbeiten beschrieben haben, rekrutieren wachsende Kollateralen glatte Muskelzellen^{19,21}. In der vorliegenden Studie verdoppelt sich die Schicht der glatten Muskelzellen der Brückenkollateralen innerhalb von 12 Tagen. Diese Ergebnisse bestätigen, dass das Schwein in seiner Kollateralisierung dem Menschen sehr ähnlich ist¹⁰⁶ und dieses Modell gut geeignet ist, um den Arteriogeneseprozess unter Bedingungen, die dem Menschen vergleichbar sind, zu erforschen.

Diese Studie steht im Gegensatz zu früheren Beobachtungen, die Kollateralen im Schwein als vergrößerte, dünnwandige Kapillaren ohne arterielle Hülle beschrieben^{32, 83, 90}. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen hingegen, dass sich Kollateralen im Schwein nicht nur aus endokardialen Kapillaren entwickeln, sondern darüber hinaus auch aus präexistenten Arteriolen, die durch Arteriogenese aktiv zu Kollateralen umgebaut werden, die eine muskuläre Wand aufweisen.

IV. Teil: Bewertung des Tiermodells und der Methode für die Eignung in der Arteriogeneseforschung

4.11. Bewertung des Tiermodells

In der vorliegenden Arbeit haben wir ein prä-klinisches Tiermodell zur Induktion von koronaren Kollateralen durch Arteriogenese entwickelt. Mit Hilfe eines interventionell implantierten Kupferstents in die linke Koronararterie eines Schweineherzens wurde eine subakute Gefäßokklusion herbeigeführt und dadurch die Entwicklung von Kollateralen induziert wird. Das Modell hat Vor- und Nachteile, die im Weiteren gegeneinander abgewogen werden. Außerdem sollen die Limitationen der Studie diskutiert werden.

Vorteile des Modells sind folgende:

1. Für die Induktion der Gefäßokklusion ist keine Thorakotomie notwendig, um, wie bei anderen Modellen, z.B. einen Ameroidkonstriktor zu implantieren oder eine Koronararterie zu ligieren.
2. Der semi-akut okkludierende Stent leitet den Blutfluss in präexistente Anastomosen um und führt so zu einer gesteigerten Schubspannung in ihnen, was einer der wichtigsten Stimuli für Arteriogenese darstellt^{14, 15, 45}. In der Folge werden Monocyten angezogen, die einen aktiven Umbau der Gefäßwand und Gefäßwachstum induzieren.
3. Das Kupfer des verwendeten Stents provoziert eine inflammatorische Reaktion in der Koronararterie⁹⁷, die die Monocyteninvasion in den perivaskulären Raum steigert, was ein wichtiger Schritt der Arteriogenese darstellt². Interessanterweise führen im

Gegensatz zu unseren Ergebnissen Chelatbildner in Tumoren zu einer Abnahme der Angiogenese ³⁵. Daher sollten sowohl der Einfluss von Kupfer als auch von Chelatbildnern auf den Arteriogeneseprozess untersucht werden.

4. Die Anatomie und Kollateralisierung des Schweineherzens ist der des Menschen sehr ähnlich. Das Schwein ist daher ein gutes Modell zur Arteriogeneseforschung ¹⁰⁶. An Hand dieses Modell kann der Einfluss von proarteriogenen Substanzen, wie GM-CSF ¹⁷ und MCP-1 ⁵¹, oder antiarteriogenen Medikamenten, wie Aspirin ⁵⁰, auf das koronare Kollateralwachstum unter Bedingungen, die denen im Menschen vergleichbar sind, untersucht werden.

Nachteile des Modells bestehen in folgenden Punkten:

1. Die präexistente Kollateralisierung des Schweineherzens ist nur schwach ausgebildet, so dass das Schweineherz fast immer nach einem Gefäßverschluss einen Infarkt ausbildet ^{45, 77}. Abhängig von der Ausdehnung des Infarkts und begleitenden klinischen Symptomen kann dies zum Tode des Tieres führen. Dies geschah bei 11.54% der untersuchten Schweine.
2. Es konnte zwar die Entwicklung von Brückenkollateralen im Zeitverlauf über 12 Tage dargestellt werden, die Ergebnisse der Studie beruhen aber auf einem interindividuellen Vergleich zwischen den Versuchstieren und bilden nicht den intraindividuellen Arteriogeneseprozess in einem Tier ab. Die Ergebnisse sind also interindividuellen Schwankungen unterworfen. Dies limitiert die Aussagekraft der Ergebnisse. Bisher ist es jedoch nicht möglich, die Entwicklung von Kollateralen in vivo am Großtiermodell mit der nötigen hohen Auflösung bis ca. 10 µm (Größe einer kleinen Arteriole) darzustellen.
3. Es wurden zwar histologische Untersuchungen zum Aufbau der Brückenkollateralen im Schwein vorgenommen, die die hämodynamische Relevanz der Kollateralen sehr wahrscheinlich erscheinen lassen, weitere Untersuchungen mit Hilfe von Druck gesteuerten Flussindex-Messungen (Pressure-derived Collateral Flow Index (CFIp)) der Kollateralen, die als Goldstandard zur Bestimmung der funktionellen Relevanz von Kollateralen gelten ¹⁰¹, sind aber notwendig, um diese Ergebnisse zu bestätigen.

Die Limitationen der Studie bestehen in folgenden Punkten:

1. Die Zahl der Versuchstiere im dritten Teil der Studie war klein. Dadurch bestand eine Gruppe (D5) nur aus einem Tier. Neben den interindividuellen Unterschieden unter den Tieren limitiert das ebenfalls die Aussagekraft der Ergebnisse. Es scheint jedoch ethisch bedenklich, eine große Anzahl Großtiere innerhalb eines kurzen Zeitraums zu töten, nur um die interindividuellen Schwankungen auszugleichen.
2. Dadurch, dass die Herzen erst mit Hilfe der postmortalen Angiographie untersucht wurden und später erst mit dem Micro-CT, waren die Ventrikel aller Herzen bei letzterer Untersuchung schon aufgeschnitten. Es kann vermutet werden, dass dadurch Kollateralen durchgeschnitten wurden, die so nicht erkannt wurden. Dieses Vorgehen war aber notwendig, da die Herzen frühestmöglich nach der Finalisierung des Tieres in Formalin fixiert werden sollten, damit das Herzgewebe eine gute Qualität für die Immunhistologie behielt. Das Herzgewebe wurde jedoch nach Fixierung mit Formalin sehr fest, so dass die Herzen nach der Fixierung nicht mehr hätten ausgerollt werden können. Eine postmortale Angiographie nach der Micro-CT Untersuchung ohne eine Summationsprojektion der Gefäße wäre dann nicht mehr möglich gewesen.

4.12. Bewertung der Methoden

In der vorliegenden Arbeit kamen verschiedene Methoden zur Darstellung des Entwicklungsprozesses von präexistenten, arteriolären Anastomosen zu voll ausgebildeten Kollateralen zum Einsatz: die Korrosionsmethode, postmortale Angiographie und Stereoskopie, Micro-CT und Immunhistologie. Zusammenfassend kann keine Methode zur Darstellung der Arteriogenese uneingeschränkt präferiert werden, da jede Methode nur einen Teil des Arteriogeneseprozesses unterschiedlich gut abbildet. Erst in der Summe dieser Methoden kann der gesamte Entwicklungsprozess untersucht werden. Die Methoden sollen nun in ihren Vor- und Nachteilen beleuchtet werden, um abschließend einen kurzen Ausblick darauf zu geben, wohin sich die Methodik in der Arteriogeneseforschung in Zukunft entwickeln wird.

4.12.1. Korrosionsmethode

Die Korrosionsmethode eignet sich vor allem dafür, präexistente und superfizielle Kollateralen darzustellen. Durch die unterschiedliche Färbung der Koronararterien gelingt es gut, kleinste interkoronare Anastomosen, die die Wasserscheidenregion zwischen den Koronararterien überbrücken, darzustellen. Die Methode ist hingegen schlecht geeignet, um endokardiale Anastomosen, z.B. solche, die auf den Papillarmuskeln verlaufen, darzustellen, da zur Untersuchung dieser Kollateralen das Korrosionspräparat weitestgehend zerstört werden muss. Rodrigues et al.⁷⁵ zeigten zwar, dass mit Hilfe eines anderen Injektionsmittels auch endokardiale Anastomosen dargestellt werden können, es gelang ihnen aber weder die interkoronaren Anastomosen in der Wasserscheidenregion noch die VV der Koronararterien darzustellen. Die Ergebnisse der Korrosionsmethode sind also abhängig vom verwendeten Injektionsmaterial, der angewandten Methode und auch der Erfahrung des Untersuchers. Die Korrosionsmethode ist ungeeignet, um Kollateralen nach der Induktion eines Gefäßverschlusses darzustellen, da das postokklusive Gefäß nur von Kollateralgefäßen gestützt wäre und leicht abbrechen würde. Die Methode eignet sich auch nicht, um weitere Untersuchungen, z.B. histologische, durchzuführen. Die Ergebnisse und ihre Aussagekraft sind dadurch immer auf eine Methode limitiert, was Tierversuche vor allem am Großtiermodell, die nur mit Hilfe der Korrosionsmethode untersucht werden, obsolet erscheinen lässt.

4.12.2. Postmortale Angiographie

Die postmortale Angiographie ist vor allem in Verbindung mit der Stereoskopie gut geeignet, um Kollateralen darzustellen. Während bei der reinen postmortalen Angiographie Kollateralen wegen des Summationseffekts nur durch die typische kornenzieherartige Morphologie identifiziert werden können, schafft die Stereoskopie eine optische, 3-dimensionale Plastizität, die das Aufsuchen von Kollateralen stark vereinfacht. Nach der postmortalen Angiographie können sich weitere Untersuchungen, wie Micro-CT oder histologische Untersuchungen, anschließen.

Grenzen sind der Methode vor allem durch die Auflösung und den Grad der Gefäßfüllung gesetzt. Obwohl die postmortale Angiographie gerade durch die angewandte Mammographietechnik eine sehr hohe räumliche Auflösung und damit Detailerkennbarkeit hat,

verringert sich der Kontrast mit der Abnahme des Gefäßdurchmessers. Wenn gleichzeitig viele kleine Gefäße angefüllt sind, kann eine Unterscheidung, ob kleine Gefäße anastomosieren oder nicht, auch in Verbindung mit der Stereoskopie schwierig sein. Vor allem präexistente oder kleine endokardiale Gefäße, die z.B. auf den Papillarmuskeln lokalisiert sind, können so nur schlecht oder gar nicht abgebildet werden. Der Nachteil der Methode kann aber teilweise durch die makroskopische Untersuchung der Papillarmuskeln aufgehoben werden, auf denen sich die Gefäße nach der KM-Perfusion weiß darstellen. Genauere Untersuchungen gelingen anschließend mit Hilfe eines Stereomikroskops. Ein weiterer Nachteil der postmortalen Angiographie ist, dass Größenmessungen am Röntgenbild nur sehr ungenau sind. Daher wurde in dieser Studie darauf verzichtet.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass die postmortale Angiographie in Verbindung mit der Stereoskopie auch noch fast 50 Jahre nach ihrer Einführung³³ unentbehrlich für die Arteriogeneseforschung ist. Ihre Stärke liegt aber vor allem in detailreichen Übersichtsaufnahmen, anhand derer man bestimmte ROIs identifizieren und anschließend höher auflösenden Untersuchungsverfahren zuführen kann.

4.12.3. Micro-CT

Das Micro-CT ist eine Technik, die mittlerweile Einzug in die Erforschung der Gefäßentwicklung gehalten hat⁹³. Mit Hilfe des Micro-CTs, auch hier in Verbindung mit der Stereoskopie, lassen sich die Koronararterien des Schweineherzens hoch auflösend 3-dimensional rekonstruieren. Das räumliche Auflösungsvermögen eines Micro-CTs ist von mehreren Faktoren abhängig, die sich natürlich in den Grenzen der technischen Ausstattung, v.a. des Detektors eines Gerätes bewegen. Im Allgemeinen gilt: je höher die Auflösung ist (die gemessene Schichtdicke, d.h. Kantenlänge eines gemessenen Voxels), desto länger ist die Mess- und Volumenrekonstruktionszeit, desto größer die Datenmenge und höher die Strahlenbelastung. Da in der vorliegenden Studie das Schweineherz als Ganzes mit einer Auflösung von 41 µm gemessen wurde, betrug die Messzeit oft mehr als 4 Stunden pro Herz. Je höher die räumliche Auflösung und länger die Messzeiten, desto größer ist auch die Anfälligkeit für Bewegungsartefakte, z.B. durch Vibration des Raumes, in dem das Micro-CT steht. Während der Messung wurden pro Herz ca. 80 Gb Daten generiert, die gespeichert und mit einem entsprechend leistungsfähigen Computerprozessor 3D-rekonstruiert werden mussten. Die

Strahlenbelastung spielt post mortem keine Rolle, ist aber wichtig beim Einsatz von Micro-CTs in vivo.

Man kann aus diesen Variablen schließen, dass je kleiner das zu untersuchende Objekt ist, desto höher die Auflösung gewählt werden kann. Da in der vorliegenden Arbeit Kollateralen im gesamten Schweineherzen untersucht wurden, war das Auflösungsvermögen (auch durch die technischen Voraussetzungen des Micro-CTs) auf 41 µm begrenzt. Mit anderen Geräten hätte man eine höhere Auflösung erzielen können, aber dafür das Schweineherz in kleinere Stücke teilen müssen, wodurch man viele Kollateralen zerstört hätte. Das Micro-CT ist aufgrund der gewählten Auflösung nicht geeignet, um kleine, präexistente und endokardiale Gefäße darzustellen, kann aber am detailreichsten von allen eingesetzten Methoden bereits entwickelte Kollateralen darstellen. Die Suche nach Kollateralen kann Computer gestützt erfolgen, indem der Computer alle Gefäße anzeigt, die miteinander kommunizieren. Messungen können mit einer hohen Genauigkeit an den Schnittbildern oder 3D-Rekonstruktionen vorgenommen werden. Ein weiterer Vorteil des Micro-CTs ist die Möglichkeit, virtuelle Angiographien durchzuführen. Der Untersucher kann sich mit diesem Instrument in das Lumen einer Kollaterale hineinversetzen und die Gefäßstrecke der Kollaterale von ihrer Abzweigung über den Stamm bis zum Wiederanschluss an ein anderes Gefäß endovaskulär untersuchen.

4.12.4. Immunhistologie

Die Histologie ermöglicht es nicht nur, deskriptive Parameter, wie Gefäßgröße und -morphologie zu bestimmen, sondern auch in Verbindung mit der Immunhistologie funktionelle, wie Gefäßproliferation und Makrophageninvasion, die wichtige Merkmale der Arteriogenese darstellen. Die Immunhistologie ist somit eine wichtige Methode, die die anderen bildgebenden Instrumente ergänzt, um in kleinen Proben den Arteriogeneseprozess auf mikroskopischer Ebene darzustellen.

4.13. Ausblick

Bei künftigen Studien in der Arteriogeneseforschung könnte es ausreichen, mit Hilfe der postmortalen Angiographie gezielt ROIs zu identifizieren, herauszuschneiden und anschließend hoch auflösende Micro-CT Untersuchungen durchzuführen. Die radiologischen Schnittbilder könnten dann mit einer sich anschließenden (immun-)histologischen Untersuchung korreliert werden.

Eine weitere künftige Anwendungsmöglichkeit ist der Einsatz von Micro-CTs in vivo als Elektrokardiographie synchronisierte CT-Koronarangiographie. Dadurch könnte neben der intraindividuellen Entwicklung der Kollateralenmorphologie im Herzen auch der Blutfluss über die Kollateralen und der zeitliche Verlauf der postokklusiven Gefäßanfüllung untersucht werden. Zurzeit gibt es aber keine CTs, die die nötige zeitliche und räumliche Auflösung besitzen, um den Entwicklungsprozess von Kollateralen im Herzen darzustellen. Die räumliche Auflösung eines modernen Dual-Source CTs (Somatom Definition, Siemens) ist auf 240 µm begrenzt. Der Einsatz von Micro-CTs in vivo ist an menschlichen Extremitäten zur Knochendichtemessung (periphere quantitative Computertomographie) und an Kleintieren etabliert ⁵⁴. Dabei sind aber die Probengrößen sehr klein und die Messzeiten kurz, um die Strahlenbelastung gering zu halten. Es gibt bisher keine Micro-CTs, mit denen man das gesamte Herz eines Großtiers in vivo mit einer hohen räumlichen und zeitlichen Auflösung, aber einer geringen Strahlenbelastung untersuchen könnte.

Künftig wird es in der Arteriogeneseforschung von Bedeutung sein, nicht nur die reine Gefäßmorphologie darzustellen, sondern auch noch mehr funktionelle Parameter zu messen. In der vorliegenden Studie wurden daher mit Hilfe der Immunhistologie die Gefäßproliferation, die Monocyteninvasion und der Gefäßumbau nachgewiesen. Andere Möglichkeiten, wie in vivo Micro-CT und CFIP-Untersuchungen, wurden oben bereits genannt. Ein weiteres Instrument stellt das MRT dar. Mit Hilfe des Kardio-MRTs ist es möglich, das Perfusionsdefizit nach erfolgtem Gefäßverschluss und die Verbesserung der Perfusion durch Kollateralisierung nachzuweisen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund und Ziele der Arbeit: Stenosierende kardiovaskuläre Erkrankungen gehören zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland und anderen Industrienationen. Neben der medikamentösen und invasiven Therapie stellt die Induktion eines „natürlichen Bypasses“ durch Arteriogenese eine potentielle Therapiealternative dar. Da das Schwein eine im Vergleich zum Menschen ähnlich schwache koronare Kollateralisierung aufweist, bietet es ein interessantes Modell zur Untersuchung von koronarer Arteriogenese. Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist daher folgende:

1. Methodenetablierung der postmortalen Koronarangiographie und der Korrosionsmethode.
2. Untersuchung der Frage, ob präexistente Kollateralen im nativen Schweineherzen nachweisbar sind und ihr Wachstum durch die Induktion von Arteriogenese mit Hilfe eines semi-akut okkludierenden Kupferstents angeregt werden kann. Anschließend wird die Kollateralisierung im Schweineherzen analysiert.
3. Untersuchung des Ursprungs, des zeitlichen Entwicklungsverlaufs und der Histomorphologie von Brückenkollateralen im Schweineherzen.
4. Bewertung, ob das Tiermodell und die etablierte Methodik geeignet sind, den Prozess der Arteriogenese darzustellen.

Methoden: Im I. Teil wurden 34 Herzen von Schlachthofschweinen angiographisch untersucht. Nach der Etablierung dreier verschiedener Versuchsaufbauten erfolgte eine Vorperfusion der Koronararterien mit einer Kochsalzlösung und die Kontrastmittel (KM)-Perfusion mit vier verschiedenen Kontrastmitteln, drei auf Basis von Bariumsulfat, eines auf der von Bismuth-Oxychlorid. Anschließend wurden die Herzen mit Hilfe der Mammographietechnik radiologisch untersucht und stereoskopische Bildpaare mit Hilfe von vier unterschiedlichen Versuchsaufbauten angefertigt. Für die Etablierung der Korrosionsmethode wurden die Koronararterien von sechs Schweineherzen mit einem Acrylharz injiziert und in Kalilauge korrodiert.

Im II. Teil wurde bei 15 Schweinen (Deutsche Landrasse x Deutsches Edelschwein)

interventionell ein Kupferstent in die linke Koronararterie implantiert. Nach 56 Tagen wurden die Tiere finalisiert, die Herzen mit Hilfe der etablierten postmortalen Angiographie und Stereoskopietechnik untersucht und abschließend Micro-CT-Aufnahmen angefertigt.

Im III. Teil wurde bei elf weiteren Schweinen interventionell ein Kupferstent in die linke Koronararterie implantiert. Die Tiere wurden zu fünf unterschiedlichen Zeitpunkten nach Stentimplantation finalisiert: 0.5 Tage (D0.5) (n=2), D3 (n=2), D5 (n=1), D7 (n=3) und D12 (n=3). Anschließend wurden Untersuchungen mit Hilfe der postmortalen Angiographie, Stereoskopie und dem Micro-CT durchgeführt. Zusätzlich wurde die Stentregion histologisch (HE-Färbung) und immunhistologisch (KI-67-, CD163- und SMC-Marker) untersucht.

Ergebnisse: I. Teil: Mit der postmortalen Angiographie können unter Verwendung des Versuchsaufbaus Nr. 3 und des Bariumsulfat-KM 3 arterielle Gefäße bis zur 6. Ordnung dargestellt werden. Mit Hilfe eines Tisches, mit dem das Herz in einer Ebene verschoben wird, ist es möglich, stereoskopische Bilder anzufertigen. Mit dem Acrylharz können detailreiche Korrosionspräparate angefertigt werden.

II. Teil: Präexistente Kollateralen sind im nativen Schweinherzen mit Hilfe von Korrosionspräparaten nachweisbar. Diese sind induzierbar und bilden früh nach Stentimplantation langstreckige, inter- und intrakoronare Kollateralen aus, die vor allem über das Moderatorband verlaufen. Diese werden von hämodynamisch günstigeren, kurzstreckigen Brückenkollateralen ab D7 und von intrakoronaren Kollateralen ab D12 abgelöst.

III. Teil: Brückenkollateralen stammen vom longitudinal verlaufenden Typ 1 Vasa Vasorum (VV) ab. Die Entwicklung von VV zu Brückenkollateralen verläuft innerhalb von 7 Tagen nach Stentimplantation. Die Brückenkollateralen weisen glatte Muskelzellen auf und sind daher funktionell relevant.

IV. Teil: Das Tiermodell ist gut geeignet, um koronare Arteriogenese zu induzieren. Die angewandten Methoden bilden aber jeweils nur einen Teil des Arteriogeneseprozesses im Schwein ab. Erst im Zusammenspiel der Instrumente lässt sich der gesamte Umfang des Arteriogeneseprozesses nachvollziehen.

Schlussfolgerung: In der vorliegenden Arbeit konnte die hochauflösende postmortale Angiographie in Verbindung mit der Stereoskopie- und Micro-CT-Technik sowie die Korrosionsmethode etabliert werden. Durch einen nicht-invasiven, semi-akuten Gefäßverschluss mit Hilfe eines Kupferstents wurde Arteriogenese bei präexistenten Kollateralen induziert und die vor allem superfiziale Kollateralisierung im Schwein analysiert. Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass sich VV durch Arteriogenese mit einer bisher im Schwein nicht beschriebenen Wachstumsdynamik zu Brückenkollateralen entwickeln, die funktionell relevant sind. Dieses Tiermodell und die Summe der Methoden sind daher gut geeignet, um Arteriogenese unter Bedingungen, die dem Menschen ähnlich sind, zu untersuchen. Die vorliegenden Ergebnisse könnten daher wichtig sein für weitere Studien zur Behandlung der koronaren Herzkrankheit und peripheren arteriellen Verschlusskrankheit durch die therapeutische Stimulation der Arteriogenese zur Induktion von Kollateralwachstum.

6. QUELLENVERZEICHNIS

1. Aguirre-Sanceledonio M, Fossum TW, Miller MW, et al. Collateral Circulation in Experimental Coarctation of the Aorta in Minipigs: A Possible Association with Hypertrophied Vasa Vasorum. *J Comp Pathol* 2003;128:165-71.
2. Arras M, Ito WD, Scholz D, et al. Monocyte Activation in Angiogenesis and Collateral Growth in the Rabbit Hindlimb. *J Clin Invest* 1998;101:40-50.
3. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone Marrow Origin of Endothelial Progenitor Cells Responsible for Postnatal Vasculogenesis in Physiological and Pathological Neovascularization. *Circ Res* 1999;85:221-8.
4. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. *Science* 1997;275:964-7.
5. Bahr A. Stereoskopie. Räume - Bilder - Raumbilder. Essen, Deutschland: Thales Verlag, 1991.
6. Barger AC, Beeuwkes R, 3rd, Lainey LL, Silverman KJ. Hypothesis: Vasa Vasorum and Neovascularization of Human Coronary Arteries. A Possible Role in the Pathophysiology of Atherosclerosis. *N Engl J Med* 1984;310:175-7.
7. Barmeyer J. [Post Mortem Coronary Angiography and Perfusion of Normal and Diseased Hearts, Perfusibility of Intercoronary Anastomoses]. *Beitr Pathol Anat* 1968;137:373-90.
8. Baroldi G, Mantero O, Scomazzoni G. The Collaterals of the Coronary Arteries in Normal and Pathologic Hearts. *Circ Res* 1956;4:223-9.
9. Bellman S, Frank HA. Intercoronary Collaterals in Normal Hearts. *J Thorac Surg* 1958;36:584-603.
10. Bergmann CE, Hoefler IE, Meder B, et al. Arteriogenesis Depends on Circulating Monocytes

and Macrophage Accumulation and Is Severely Depressed in Op/Op Mice. *J Leukoc Biol* 2006;80:59-65.

11. Blumgart HL, Zoll PM, et al. The Experimental Production of Intercoronary Arterial Anastomoses and Their Functional Significance. *Circulation* 1950;1:10-27, pl.

12. Bondke A, Buschmann IR, Bode C, Buschmann EE. [Inducing Collaterals in Due Time. Arteriogenesis as a Preventive Principle]. *Hamostaseologie* 2007;27:363-72.

13. Buschmann I, Pries A, Styp-Rekowska B, et al. Pulsatile Shear and Gja5 Modulate Arterial Identity and Remodeling Events During Flow-Driven Arteriogenesis. *Development* 2010;137:2187-96.

14. Buschmann I, Schaper W. Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth. *News Physiol Sci* 1999;14:121-5.

15. Buschmann I, Schaper W. The Pathophysiology of the Collateral Circulation (Arteriogenesis). *J Pathol* 2000;190:338-42.

16. Buschmann IR, Hoefler IE. All Arteriogenesis Is Local? Home Boys Versus the Newcomers. *Circ Res* 2004;95:e72.

17. Buschmann IR, Hoefler IE, van Royen N, et al. Gm-Csf: A Strong Arteriogenic Factor Acting by Amplification of Monocyte Function. *Atherosclerosis* 2001;159:343-56.

18. Buschmann IR, Voskuil M, van Royen N, et al. Invasive and Non-Invasive Evaluation of Spontaneous Arteriogenesis in a Novel Porcine Model for Peripheral Arterial Obstructive Disease. *Atherosclerosis* 2003;167:33-43.

19. Cai W, Scholz D, Ziegelhoeffer T, Schaper J. Structural Remodeling During Growth of Collateral Vessels. In: Schaper, W, Schaper, J, eds. *Arteriogenesis*. Boston, USA: Kluwer Academic Publishers, 2004:21-49.

20. Cai WJ, Koltai S, Kocsis E, et al. Remodeling of the Adventitia During Coronary Arteriogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H31-40.
21. Carmeliet P. Mechanisms of Angiogenesis and Arteriogenesis. *Nat Med* 2000;6:389-95.
22. Colon GP, Deveikis JP, Dickinson LD. Revascularization of Occluded Internal Carotid Arteries by Hypertrophied Vasa Vasorum: Report of Four Cases. *Neurosurgery* 1999;45:634-7.
23. Cosby RS, Giddings JA, See JR. Coronary Collateral Circulation. *Chest* 1974;66:27-31.
24. Cragg AH, Einzig S, Rysavy JA, et al. The Vasa Vasorum and Angioplasty. *Radiology* 1983;148:75-80.
25. Den Hartog JP. *Strength of Materials*. New York, USA: Dover Publications, 1949.
26. Depre C, Havaux X, Wijns W. Neovascularization in Human Coronary Atherosclerotic Lesions. *Cathet Cardiovasc Diagn* 1996;39:215-20.
27. Djonov V, Makanya AN. New Insights into Intussusceptive Angiogenesis. *Exs* 2005:17-33.
28. Eitenmuller I, Volger O, Kluge A, et al. The Range of Adaptation by Collateral Vessels after Femoral Artery Occlusion. *Circ Res* 2006;99:656-62.
29. Fabrick BO, Dijkstra CD, van den Berg TK. The Macrophage Scavenger Receptor CD163. *Immunobiology* 2005;210:153-60.
30. Folkman J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *N Engl J Med* 1971;285:1182-6.
31. Folkman J. The Influence of Angiogenesis Research on Management of Patients with Breast Cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1995;36:109-18.
32. Fulton W, van Royen N. The Coronary Collateral Circulation in Man. In: Schaper W, Schaper J, eds. *Arteriogenesis*. Boston, USA: Kluwer Academic Publishers, 2004:287-331.

33. Fulton WF. Arterial Anastomoses in the Coronary Circulation. I. Anatomical Features in Normal and Diseased Hearts Demonstrated by Stereoarteriography. *Scott Med J* 1963;8:420-34.
34. Fulton WF. Arterial Anastomoses in the Coronary Circulation. II. Distribution, Enumeration and Measurement of Coronary Arterial Anastomoses in Health and Disease. *Scott Med J* 1963;8:466-74.
35. Goodman VL, Brewer GJ, Merajver SD. Copper Deficiency as an Anti-Cancer Strategy. *Endocr Relat Cancer* 2004;11:255-63.
36. Gossel M, Malyar NM, Rosol M, et al. Impact of Coronary Vasa Vasorum Functional Structure on Coronary Vessel Wall Perfusion Distribution. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H2019-26.
37. Gossel M, Rosol M, Malyar NM, et al. Functional Anatomy and Hemodynamic Characteristics of Vasa Vasorum in the Walls of Porcine Coronary Arteries. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2003;272:526-37.
38. Grabherr S, Djonov V, Yen K, et al. Postmortem Angiography: Review of Former and Current Methods. *AJR Am J Roentgenol* 2007;188:832-8.
39. Hansen-Smith F, Egginton S, Zhou AL, Hudlicka O. Growth of Arterioles Precedes That of Capillaries in Stretch-Induced Angiogenesis in Skeletal Muscle. *Microvasc Res* 2001;62:1-14.
40. Heger W, Kaden F, Mittmann U, Schmier J. Injection Methods for the Demonstration of the Coronary Arterial Vasculature. *Basic Res. Cardiol.* 1976;71:103-12.
41. Heil M, Eitenmüller I, Schmitz-Rixen T, Schaper W. Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Similarities and Differences. *J Cell Mol Med* 2006;10:45-55.
42. Heil M, Schaper W. Influence of Mechanical, Cellular, and Molecular Factors on Collateral Artery Growth (Arteriogenesis). *Circ Res* 2004;95:449-58.

43. Heil M, Schaper W. Pathophysiology of Collateral Development. *Coron Artery Dis* 2004;15:373-8.
44. Heil M, Ziegelhoeffer T, Pipp F, et al. Blood Monocyte Concentration Is Critical for Enhancement of Collateral Artery Growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H2411-9.
45. Helisch A, Schaper W. Angiogenesis and Arteriogenesis--Not yet for Prescription. *Z Kardiol* 2000;89:239-44.
46. Helisch A, Schaper W. Arteriogenesis: The Development and Growth of Collateral Arteries. *Microcirculation* 2003;10:83-97.
47. Helisch A, Wagner S, Khan N, et al. Impact of Mouse Strain Differences in Innate Hindlimb Collateral Vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:520-6.
48. Helisch A, Ware JA. Therapeutic Angiogenesis in Ischemic Heart Disease. *Thromb Haemost* 1999;82:772-80.
49. Hershey JC, Baskin EP, Glass JD, et al. Revascularization in the Rabbit Hindlimb: Dissociation between Capillary Sprouting and Arteriogenesis. *Cardiovasc Res* 2001;49:618-25.
50. Hofer IE, Grundmann S, Schirmer S, et al. Aspirin, but Not Clopidogrel, Reduces Collateral Conductance in a Rabbit Model of Femoral Artery Occlusion. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:994-1001.
51. Hofer IE, van Royen N, Buschmann IR, et al. Time Course of Arteriogenesis Following Femoral Artery Occlusion in the Rabbit. *Cardiovasc Res* 2001;49:609-17.
52. Hofer IE, van Royen N, Rectenwald JE, et al. Arteriogenesis Proceeds Via Icam-1/Mac-1-Mediated Mechanisms. *Circ Res* 2004;94:1179-85.
53. Hossmann KA, Buschmann IR. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor as an Arteriogenic Factor in the Treatment of Ischaemic Stroke. *Expert Opin Biol Ther* 2005;5:1547-

56.

54. Jorgensen SM, Demirkaya O, Ritman EL. Three-Dimensional Imaging of Vasculature and Parenchyma in Intact Rodent Organs with X-Ray Micro-Ct. *Am J Physiol* 1998;275:H1103-14.

55. Kemeny V, Droste DW, Nabavi DG, et al. Collateralization of an Occluded Internal Carotid Artery Via a Vas Vasorum. *Stroke* 1998;29:521-3.

56. Kinoshita I, Katoh O, Nariyama J, et al. Coronary Angioplasty of Chronic Total Occlusions with Bridging Collateral Vessels: Immediate and Follow-up Outcome from a Large Single-Center Experience. *J Am Coll Cardiol* 1995;26:409-15.

57. Kumamoto M, Nakashima Y, Sueishi K. Intimal Neovascularization in Human Coronary Atherosclerosis: Its Origin and Pathophysiological Significance. *Hum Pathol* 1995;26:450-6.

58. Kwon HM, Sangiorgi G, Ritman EL, et al. Adventitial Vasa Vasorum in Balloon-Injured Coronary Arteries: Visualization and Quantitation by a Microscopic Three-Dimensional Computed Tomography Technique. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:2072-9.

59. Kwon HM, Sangiorgi G, Ritman EL, et al. Enhanced Coronary Vasa Vasorum Neovascularization in Experimental Hypercholesterolemia. *J Clin Invest* 1998;101:1551-6.

60. Langheinrich AC, Kampschulte M, Buch T, Bohle RM. Vasa Vasorum and Atherosclerosis - Quid Novi? *Thromb Haemost* 2007;97:873-9.

61. Longland CJ. Collateral Circulation in the Limb. *Postgrad Med J* 1953;29:456-8.

62. Lorenz G. [Histotopographic Studies of the Intramural Coronary Arteries in the Trabecula Septomarginalis of the Right Cardiac Ventricle in Swine (*Sus Scrofa Domesticus*) and Dwarf Goats (*Capra Aegagrus F. Domestica*)]. *Z Mikrosk Anat Forsch* 1990;104:607-16.

63. Lumb G, Hardy LB. Collateral Circulation in the Heart. *N C Med J* 1963;24:456-60.

64. Marcus ML, Heistad DD, Armstrong ML, Abboud FM. Effects of Chronic Hypertension on Vasa Vasorum in the Thoracic Aorta. *Cardiovasc Res* 1985;19:777-81.
65. Martin MA, Marotta TR. Vasa Vasorum: Another Cause of the Carotid String Sign. *AJNR Am J Neuroradiol* 1999;20:259-62.
66. Moll W. Structure Adaptation and Blood Flow Control in the Uterine Arterial System after Hemochorial Placentation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;110 Suppl 1:S19-27.
67. Murray CD. The Physiological Principle of Minimum Work: Ii. Oxygen Exchange in Capillaries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1926;12:299-304.
68. Paul MH, Norman LR, Zoll PM, Blumgart HL. Stimulation of Inter-Arterial Coronary Anastomoses by Experimental Acute Coronary Occlusion. *Circulation* 1957;16:608-14.
69. Reig J, Alberti N, Petit M. Arterial Vascularization of the Human Moderator Band: An Analysis of This Structure's Role as a Collateral Circulation Route. *Clin Anat* 2000;13:244-50.
70. Reiner L, Rodriguez FL. A New Method of Dissection of the Heart. *AMA Arch Pathol* 1957;63:160-3.
71. Risau W. Mechanisms of Angiogenesis. *Nature* 1997;386:671-4.
72. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995;11:73-91.
73. Robbins SL, Rodriguez FL. Postmortem Angiographic Studies on the Coronary Arterial Circulation. Intercoronary Arterial Anastomoses in Normal Young Adult Pig Hearts. *Vasc Dis* 1964;1:226-32.
74. Rockstroh J, Brown BG. Coronary Collateral Size, Flow Capacity, and Growth: Estimates from the Angiogram in Patients with Obstructive Coronary Disease. *Circulation* 2002;105:168-73.

75. Rodrigues M, Silva A, Águas A, Grande N. The Coronary Circulation of the Pig Heart: Comparison with the Human Heart. *Eur J Anat* 2005;9:67-87.
76. Sanada JI, Matsui O, Yoshikawa J, Matsuoka T. An Experimental Study of Endovascular Stenting with Special Reference to the Effects on the Aortic Vasa Vasorum. *Cardiovasc Intervent Radiol* 1998;21:45-9.
77. Schaper W. Comparative Arteriography of the Collateral Circulation. In: Schaper W, ed. *The Collateral Circulation of the Heart*. Amsterdam, Netherlands: North-Holland Publishing Company, 1971:29-50.
78. Schaper W. The Morphology of Collaterals and Anastomoses in Human, Canine and Porcine Hearts. In: Schaper W, ed. *The Collateral Circulation of the Heart*. Amsterdam, Netherlands: North-Holland Publishing Company, 1971:5-18.
79. Schaper W. Collateral Circulation: Past and Present. *Basic Res Cardiol* 2009;104:5-21.
80. Schaper W, Buschmann I. Arteriogenesis, the Good and Bad of It. *Cardiovasc Res* 1999;43:835-7.
81. Schaper W, Ito WD. Molecular Mechanisms of Coronary Collateral Vessel Growth. *Circ Res* 1996;79:911-9.
82. Schaper W, Pipp F, Scholz D, et al. Physikal Forces and Their Translation into Molecular Mechanisms. In: Schaper, W, Schaper, J, eds. *Arteriogenesis*. Boston, USA: Kluwer Academic Publishers, 2004:74-113.
83. Schaper W, Scholz D. Factors Regulating Arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1143-51.
84. Schirmer SH. Effekte Von Leptin- und MCP-1-Applikation auf funktionelle Parameter der Arteriogenese: Eine experimentelle Studie mittels Ultraschallflussmessungen, Mikrosphärperfusion und Proliferationsanalyse. In: *Abteilung Innere Medizin III – Kardiologie*

& Angiologie, Albert-Ludwigs Universität Freiburg, Freiburg im Breisgau 2004. p. 112.

85. Schlesinger MJ. An Injection Plus Dissection Study of Coronary Artery Occlusions and Anastomosis. *Am Heart J* 1938;15:528-96.

86. Schlueter O. Organinjektionen Mit Acrylharz zur Korrosionspräparation. *Der Präparator* 1962;8:83-90.

87. Schmindt H, Schmier J. Eine Methode zur Herstellung anatomischer Korrosionspräparate. *Z. f. Kreislaufforschg.* 1966;55:297-305.

88. Schmitdt K. Kunststoff-Silikonkautschuk-Perfusorinjektion. Die Darstellung kleinster Blutgefäße durch verbesserte Injektionsmethoden. *Der Präparator* 1981;27:117-20.

89. Schoenmackers J. [Technic of Postmortem Angiography with Reference to Related Methods of Postmortem Blood Vessel Demonstration.]. *Ergeb Allg Pathol Pathol Anat* 1960;39:53-151.

90. Scholz D, Cai WJ, Schaper W. Arteriogenesis, a New Concept of Vascular Adaptation in Occlusive Disease. *Angiogenesis* 2001;4:247-57.

91. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. *J Cell Physiol* 2000;182:311-22.

92. Seiler C. The Human Coronary Collateral Circulation. *Heart* 2003;89:1352-7.

93. Simons M. Angiogenesis: Where Do We Stand Now? *Circulation* 2005;111:1556-66.

94. Song W, Lee J, Kim H, et al. A New Percutaneous Porcine Coronary Model of Chronic Total Occlusion. *J Invasive Cardiol* 2005;17:452-4.

95. Spalteholz W. Die Arterien der Herzwand. Leipzig, Deutschland: Hirzel, 1924.

96. Srivatsa SS, Edwards WD, Boos CM, et al. Histologic Correlates of Angiographic Chronic

Total Coronary Artery Occlusions: Influence of Occlusion Duration on Neovascular Channel Patterns and Intimal Plaque Composition. *J Am Coll Cardiol* 1997;29:955-63.

97. Staab ME, Srivatsa SS, Lerman A, et al. Arterial Remodeling after Experimental Percutaneous Injury Is Highly Dependent on Adventitial Injury and Histopathology. *Int J Cardiol* 1997;58:31-40.

98. Suzuki K, Saito N, Zhang G, et al. Development of a Novel Calcified Total Occlusion Model in Porcine Coronary Arteries. *J Invasive Cardiol* 2008;20:296-301.

99. Suzuki S, Yamada I, Himeno Y. Angiographic Findings in Buerger Disease. *Int J Cardiol* 1996;54:159-65.

100. Thoma R. Untersuchungen über die Histogenese und Histomechanik des Gefäßsystems. Stuttgart, Deutschland: Enke-Verlag, 1893.

101. van Royen N, Piek JJ, Schaper W. A Critical Review of Clinical Arteriogenesis Research. *J Am Coll Cardiol* 2010;55:17-25.

102. Van Royen N, Piek JJ, Schaper W, et al. Arteriogenesis: Mechanisms and Modulation of Collateral Artery Development. *J Nucl Cardiol* 2001;8:687-93.

103. Vastesaeger MM, Van Der Straeten PP, Friart J, et al. [Intercoronary Anastomoses Like Those Seen in Postmortem Coronarography.]. *Acta Cardiol* 1957;12:365-401.

104. White FC, Carroll SM, Magnet A, Bloor CM. Coronary Collateral Development in Swine after Coronary Artery Occlusion. *Circ Res* 1992;71:1490-500.

105. Wolf C, Cai WJ, Vosschulte R, et al. Vascular Remodeling and Altered Protein Expression During Growth of Coronary Collateral Arteries. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:2291-305.

106. Wolfram S. Effects of Physical Activity. In: Schaper, W, Schaper, J, eds. *Arteriogenesis*. Boston, USA: Kluwer Academic Publishers, 2004:259-81.

QUELLENVERZEICHNIS

107. Zadeh G, Guha A. Angiogenesis in Nervous System Disorders. *Neurosurgery* 2003;53:1362-74; discussion 1374-6.

108. Zoll PM, Wessler S, Schlesinger MJ, et al. Interarterial Coronary Anastomoses. *Mod Concepts Cardiovasc Dis* 1952;21:118-9.

7. APPENDIX

7.1. Abkürzungsverzeichnis

A	Gefäßquerschnittsfläche
bFGF-2	Basic Fibroblast Growth-Factor-2
CD	Cluster of Differentiation
CFIp	Pressure-derived Collateral Flow Index, Druck gesteuerte Flussindex-Messung
CT	Computertomograph
D	Diameter
D3	Tag 3 nach Stentimplantation
Dpi	Dots per Inch
FGF	Fibroblast Growth Factor
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF	Hypoxie induzierter Transkriptionsfaktor
ICAM-1/2	Intercellular Adhesion Molecule-1 und 2
IE	Internationale Einheiten
KHK	koronare Herzkrankheit
KM	Röntgenkontrastmittel
LAD	Left Anterior Descendens, Ramus interventricularis anterior
LAO	left-anterior-oblique
LCA	Left Coronary Artery, linke Koronararterie
µm	Mikrometer
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MMPs	Matrixmetalloproteinasen
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
NOS	Nitric Oxide Synthase
P	Perimeter
PA	posterior-anterior

PDGF	Platelet-derived Growth Factor
R^2	Bestimmtheitsmaß nach Pearson
ρ^2	Bestimmtheitsmaß nach Spearman
RAO	right-anterior-oblique
RCA	Right Coronary Artery, rechte Koronararterie
RCX	Ramus circumflexus
ROI	Region of Interest
SEM	Standard Error of Mean
SMC	Smooth Muscle Cells, glatten Muskelzellen
TGF- β	Transforming Growth Factor-Beta
TNF α	Tumornekrosefaktor-Alpha
u-PA	Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VV	Vasa Vasorum
VVE	Vasa Vasorum externa
VVI	Vasa Vasorum interna
VVV	Venöse Vasa Vasorum

7.2. Danksagung

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater PD Dr. Ivo Buschmann für die freundliche Überlassung des Themas danken. Er brachte mir während der Anfertigung dieser Arbeit großes Vertrauen entgegen und räumte mir viele Freiräume ein, wodurch ich gelernt habe, selbstständig, organisiert und wissenschaftlich zu arbeiten. Dafür bin ich ihm sehr dankbar.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Kollegin Susanne Granzow bedanken, die als Veterinärmedizinerin mit großem Einsatz und Engagement den tierexperimentellen Teil der Arbeit betreute. Vielen Dank für die lange und intensive Zusammenarbeit, die vielen Ideen und anregenden Diskussionen!

Bei Dr. Zully Ritter möchte ich mich besonders herzlich bedanken. Ohne ihren unermüdlichen Einsatz bei der Anfertigung und Auswertung der Micro-CT Aufnahmen wäre ein wichtiger Teil der Arbeit nicht möglich gewesen. Ich danke ihr für ihre Hilfsbereitschaft, ihren Ideenreichtum und ihre ansteckende Begeisterung!

Bei Herrn Prof. Dieter Felsenberg, Leiter des Zentrums für Muskel- und Knochenforschung (ZMK), Campus Benjamin Franklin, möchte ich mich für die gute Kooperation bedanken, die den Einsatz des Micro-CTs ermöglichte.

Herzlich danke ich Herrn Prof. Friedrich, der mir bei den radiologischen Aufnahmen mit der Mammographie-Technik geholfen hat und seine große Erfahrung in dieses Projekt mit eingebracht hat.

Ein großer Dank gilt auch Herrn Dr. Neudeck, der mich bei der Auswertung der Immunhistologie unterstützt und beraten hat.

Den Präparatoren Frau Heuckendorf, Frau Widulin, Herrn Weigner, Frau Maynicke und Frau Teletzky möchte ich danken, dass sie mich in die faszinierende Welt der Organpräparation einführten.

Herrn Bahr, Inhaber von „Stereoskopie + Visualisierung“, möchte ich für seinen Rat bei der

Anfertigung der stereoskopischen Bilder danken.

Bei Jan Kischkat möchte ich mich bedanken, der mir in allen Fragen der Physik, Mathematik, Bildbearbeitung und Statistik geholfen hat. Diese Arbeit hat unsere Freundschaft noch vertieft.

Herrn Dr. Neumann danke ich für die statistische Auswertung der Studienergebnisse.

Den Kollegen meiner Arbeitsgruppe danke ich für all die guten und ereignisreichen Jahre, die ich mit ihnen verbracht habe. Es war schön, Teil dieser Arbeitsgruppe gewesen zu sein. Darüber hinaus wird mir „mein“ kleines Labor fehlen.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie, meinen Eltern und Brüdern, bedanken, die mich stets begleitet, unterstützt und ermutigt haben. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank.

7.3. Curriculum Vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

7.4. Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Jonathan-Michael Harnoß, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Arteriogenese im Schweineherzen – eine Analyse und Methodenetablierung“ 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.“

Ort, Datum:

Unterschrift:

Jonathan-Michael Harnoß