Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Arteriogenese Innere Medizin CC13 Schwerpunkt Kardiologie Center for Cardiovascular Research (CCR) Richard Thoma Laboratorien der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Charakterisierung von Arteriogenese-Markern in einem arteriovenösen Shunt-Modell: das carotide Rete mirabile im Minischwein

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Eun-Ji Lee aus Seoul, Korea

Gutachter:

1. PD Dr. med. I. Buschmann

2. Prof. h.c. h.c. W. Schaper

3. PD Dr. med. P. Stawowy

Datum der Promotion: 24. 02. 2012

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1. Einleitung	6
1.1 Zusammenhang zwischen Erscheinungsform kardiovaskulärer Erkrankungen und	ł
Kollateralbversorgung	7
1.2 Histologischer Überblick zur Definition der Kollateralarterien	8
1.3 Morphologie von Kollateralarterien	9
1.4 Gefäßwachstum	9
1.4.1 Vaskulogenese	. 10
1.4.2 Angiogenese	. 10
1.4.3 Arteriogenese	. 12
1.4.3.1 Phasen der Arteriogenese	. 15
1.5 Hämodynamische Kräfte der Blutströmung	. 16
1.6 In <i>vivo</i> -Modelle zur Untersuchung der Arteriogenese	. 17
1.7 Tiermodell Minischwein	. 19
1.8 Rete mirabile	. 19
1.9 Arteriovenöses Shuntmodell im Rete mirabile des Minischweins	.21
2. Materialien und Methoden	.24
2.1 Materialien	.24
2.1.1 Versuchstiere	.24
2.1.2 Chirurgischer Eingriff	. 24
2.1.3 Immunhistochemische Charakterisierung des arteriovenösen Shunt-Modells	.24
2.1.3.1 Primärantikörper	. 24
2.1.3.2 Chemikalien	.25
2.1.3.3 Laborgeräte	.26
2.1.4 Nachweis von putativen Arteriogenesemarkern auf RNA-Ebene	.27
2.1.4.1 Primerliste	.27
2.1.4.2 Chemikalien	.28
2.1.4.3 Laborgeräte	.29
2.1.5 Lösungen	.30
2.2 Methoden	.31
2.2.1 Versuchstiere	.31
222 Chiruraischer Einariff	21
	.51

2.2.2.1 Präoperative Angiographie	31
2.2.2.2 Endovaskulärer Verschluss der Nackengefäße	32
2.2.2.3 Chirurgische Fistula-Bildung	32
2.2.2.4 Postoperative Angiographie	33
2.2.2.5 Gewebsentnahme	33
2.2.3 Fixierung und Lagerung	34
2.2.4 Immunhistochemische Charakterisierung des arteriovenösen Shunt-Modells	35
2.2.4.1 Einbettung	35
2.2.4.2 Schneiden am Kryostaten	35
2.2.4.3 Färbemethoden	36
2.2.4.3.1 Proliferationsfärbung mit Ki67-Antikörper	36
2.2.4.3.2 Makrophagenfärbung mit CD163-Antikörper	37
2.2.4.4 Quantifizierung der Immunhistochemie	38
2.2.5 RNA-Analyse	38
2.2.5.1 RNA-Isolierung	38
2.2.5.2 RNA-Bestimmung	40
2.2.5.3 RNA-Aufreinigung	41
2.2.5.4 Reverse Transkription	42
2.2.5.5 Quantitative real time PCR (qRT-PCR)	42
2.2.6 Statistische Auswertung	44
3. Zielsetzung	45
4. Ergebnisse	47
4.1 Immunhistochemische Charakterisierung des artiovenösen Shunt-Modells:	
Nachweis von Arteriogenesemarkern	47
4.2 RNA-Isolierung	51
4.3 RNA-Konzentrationsbestimmung und Qualitätserfassung mittels BioAnalyzer	51
4.4 Primertestung	53
4.5 ΔΔCT-Auswertung der untersuchten Zielgene	55
5. Diskussion	65
5.1 Immunhistochemische Analyse	66
5.1.1 Darstellung der Proliferation	66
5.1.2 Darstellung der Makrophagen	67
5.1.3 Zusammenhang zwischen Proliferation und Makrophageninflux	70
5.2 Nachweis von Arteriogenesemarkern und anderen Markern auf RNA-Ebene	70

5.2.1 TIMP-1 und MMP-2	71
5.2.2 MCP-1	74
5.2.3 CD44	76
5.2.4 VEGFA	77
5.2.5 SDF-1	79
5.2.6 Vimentin	80
5.2.7 Zusammenfassung der Signifikanztestung	81
6 Zusammenfassung	83
e. Edealinion accurg	
7. Literaturverzeichnis	
 7. Literaturverzeichnis 8. Abkürzungsverzeichnis 	
 7. Literaturverzeichnis 8. Abkürzungsverzeichnis 9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis 	
 7. Literaturverzeichnis 8. Abkürzungsverzeichnis 9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis 10. Publikationsliste 	
 7. Literaturverzeichnis 8. Abkürzungsverzeichnis 9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis 10. Publikationsliste 11. Lebenslauf 	
 7. Literaturverzeichnis	

1. Einleitung

Atherosklerotische Erkrankungen wie die koronare Herzerkrankung, Herzinfarkt, periphere arterielle Verschlusskrankheiten und zerebrovaskuläre Krankheiten gehören weltweit zu den häufigsten Todesursachen. Die früher auf die Industrieländer beschränkten Krankheiten finden in den Schwellenländern und Dritte Welt Ländern Einzug und die Zahl der Patienten steigt kontinuierlich an [World Health Organization, 2007. (http://who.int)]. In Deutschland erlag im Jahr 2008 fast jeder zweite der Gestorbenen (43,1%: 358.684 Sterbefälle) einer Erkrankung des kardiovaskulären Systems, welches den Überbegriff für diese Erkrankungen darstellt. Die wichtigste spezifische Todesursachengruppe darunter waren ischämische Herzkrankheiten (140 388 Sterbefälle), darunter insbesondere der akute sowie der rezidivierende Myokardinfarkt mit 62 067 Fällen. Eine weitere große Gruppe unter den Erkrankungen des kardiovaskulären Systems ist die der zerebrovaskulären Erkrankungen mit 62 085 Sterbefällen (Statistisches Bundesamt Deutschland. Todesursachen, 2007 (http://destatis.de)). Die okklusiven kardiovaskulären Erkrankungen führen beim ersten Auftreten selten zum Tode, aber die Progression der Atherosklerose der Gefäße führt zur Minderperfusion des versorgenden Gebietes mit den entsprechenden Folgen wie Angina pectoris oder Myokardinfarkt, welche zum Tod des Patienten führen können.

Aktuelle Therapieoptionen umfassen neben der medikamentös-konservativen Therapie revaskularisierende Maßnahmen wie kathetergestützte Angioplastieverfahren (PTA oder PTCA) oder Bypassoperationen. Methodische und technische Verbesserungen haben dazu geführt, dass diese Maßnahmen in Prozedur niedrige Morbiditäten und Mortalitäten aufweisen (Bondke and Buschmann 2008). Trotz der verbesserten therapeutischen Maßnahmen kommen die Revaskularisationsstrategien für ca. ein Fünftel der Patienten mit stenosierenden Gefäßerkrankungen wegen der Komorbitäten oder komplexen Gefäßbefunden wie höhergradige Stenosierungen, schmalen Gefäßen, Obstruktion der kardialen Endstrombahn nicht in Betracht (Seiler 2003). Außerdem neigen die atherosklerotischen Gefäßerkrankungen nach erfolgter PTCA oder Bypassoperation immer wieder zu repetitiven Restenosierungen bedingt durch die Pathophysiologie der chronisch progredienten atherosklerotischen Gefäßerkrankung (Bondke and Buschmann 2008).

6

1.1 Zusammenhang zwischen Erscheinungsform kardiovaskulärer Erkrankungen und Kollateralversorgung

Es werden Patienten beobachtet, die trotz hochgradigen Stenosen der Koronargefäße nur geringe Beschwerden aufweisen und diese ohne einen Infarkt überleben. Diese Patienten besitzen einen Umgehungskreislauf, der die verschlossenen Gefäße bei der Versorgung des Herzens ersetzt. Diese Gefäße werden als Kollateralgefäße bezeichnet, welche präexistente arterioläre Gefäße darstellen. Patienten mit Totalverschluss einer Koronararterie können mit gut ausgeprägten Kollateralen die entstehende Minderversorgung ersetzen und völlig beschwerdefrei leben (Schaper and Schaper 1993). Aufgrund der Parallelen zur chirurgischen Bypassoperation werden die Kollateralgefäße auch als "natürliche Bypässe" (Schaper and Schaper 2004) bezeichnet. Ziel aktueller Studien ist es daher, eine rechtzeitige und möglichst wenig invasive Induktion der Proliferation dieser Kollateralen bei Risikopatienten zu erreichen.

Bei der sogenannten Arteriogenese erfolgt eine Größenzunahme präexistenter kollateralarterieller Anastomosen durch Zellproliferation und Gefäßumbau (Remodeling) (Herzog et al. 2002). Die Stimulation der Arteriogenese stellt eine attraktive alternative Behandlungsmethode für Patienten mit stenosierenden Gefäßerkrankungen dar, um die Unterversorgung des stenosierten Gebietes zu kompensieren. So ist die Prognose abhängig von der Fähigkeit des menschlichen Körpers suffiziente Kollateralen zu bilden (Sabia et al. 1992). Daher ist die Stimulation der Arteriogenese für eine große Anzahl von Patienten ein Hoffnungsträger. Aber die Mechanismen der Arteriogenese im Menschen sind noch im unzureichenden Maße verschlüsselt. Basismechanismen der Arteriogenese wurden in ausgedehnten Untersuchungen der letzten zwei Jahrzehnte grundlegend untersucht. Zukünftige Studien müssen nun die molekularen Mechanismen beim Menschen weiter aufdecken, um die Stimulation des Kollateralwachstums in die Praxis umzusetzen (Schirmer et al. 2009).

1.2 Historischer Überblick zur Definition der Kollateralarterien

Die Existenz kollateralarterieller Verbindungen zwischen zwei unterschiedlichen Gefäßterritorien wurde erstmals im 17. Jahrhundert von Lower beschrieben. Schließlich

legten Longland in der Peripherie und Fulton im Bereich der Koronarzirkulation zweifelsfrei dar, dass arterielle Stromgebiete durch Kollateralen miteinander in Verbindung stehen (Longland 1953).

Die moderne Forschung zur Arteriogenese fing mit den Beobachtungen von Fulton an, welcher mit einer neuen Technik post mortem zeigte, dass sich unabhängig von einer bestehenden okklusiven Gefäßerkrankung zahlreiche Kollateralarterien im Herzen befinden und dass die Okklusionen der Koronararterien nicht immer zu einem Infarkt führen, da die Koronarien das Potential besitzen zu größeren Strukturen heranzuwachsen und das Myokardium so vor einer Nekrose bewahren (Fulton 1964).

Dass sich Kollateralarterien nach Verschluss eines Gefäßes nicht nur durch Vasodilatation im Durchmesser vergrößern, sondern aktiv proliferieren, konnte erstmals von Schaper Anfang der 70er Jahre demonstriert werden (Schaper et al. 1971). Er war es auch, der mit anderen wie Ramon Munoz-Chapuli den Begriff Arteriogenese für das aktive Größenwachstum von präexistenten kollateralen Arteriolen in Abgrenzung zum Begriff der Angiogenese in Veröffentlichungen vorstellte und einführte (Schaper et al. 1999).

Seit den ersten Beobachtungen vor fast 100 Jahren ergaben sich viele Fragestellungen zur Arteriogenese. Dazu gehören:

- Bedeutung der präexistenten Kollateralen
- Was ist der größte Stimulus zum Wachstum: chemisch (Ischämie) oder physikalisch?
- Wenn es ein physikalischer Stimulus ist, ist er Druck- oder Fluss-abhängig?
- Rolle der Monozyten

Aktuelle Debatten sind:

- Welche der bekannten oder noch nicht entdeckten Wachstumsfaktoren ist f
 ür die Arteriogenese notwendig? Spielen angiogenetische Wachstumsfaktoren eine Rolle in diesem Prozess? Wenn ja, welche sind es?
- Sind Stammzellen, Vorläuferzellen oder adulte Zellen von Wichtigkeit bei der Arteriogenese (Schaper and Schaper 2004)?

Mit diesen Fragen haben sich Forscher der Arteriogenese in den letzten Jahren beschäftigt und versuchen weiterhin weitere Zusammenhänge und Mechanismen aufzudecken.

1.3 Morphologie von Kollateralarterien

Die im Herzen eines normalen Schweins ca. 20 bis 60µm im Durchmesser betragenden Kollateralgefäße (Scholz et al. 2001) stellen ihrer Morphologie nach Arteriolen dar. Ihr Endothel ist von 1-2 Schichten glatter Muskelzellen umgeben. Diese präexistenten Kollateralarterien sind Teil eines arkardenartigen Gefäßnetzwerkes im Perfusionsgebiet (Scholz et al. 2002). Innerhalb der Arteriolen ist der Blutfluss nicht unidirektional sondern oszillierend. Da diese kleinen Gefäße unter physiologischen Bedingungen nicht essentiell sind, ist wahrscheinlich ein embryonaler Entwicklungsprozess für ihre Existenz verantwortlich.

Im Verlauf der Arteriogenese entwickeln sich aus den präformierten Arteriolen größere Arterien. Die erste Schicht der Arterie auf der Seite des Lumens ist die Endothelschicht, an die sich die Lamina elastica interna anschließt, die aus elastischen Fasern besteht. Die Endothelschicht und Lamina elastica interna werden zusammen als Intima bezeichnet. Die sich anschließende Media besteht aus mehreren Schichten glatter Muskelzellen und ist innen von der Lamina elastica interna und außen von der Lamina elastica externa begrenzt. Die Dicke der Media hängt von der Lage der Arterie im Organismus ab. Ist die Media großem Druck ausgesetzt, nimmt die Dicke und Anzahl der Schichten zu. Die äußerste Schicht einer Arterie, die Adventitia und ist von der externen elastischen Lamina auf der inneren Seite begrenzt. Die Adventitia besitzt große Mengen an Bindegewebe, Kapillaren, Venolen, Nervenfasern, aber auch glatte Muskelzellen, Fibroblasten, Makrophagen und Lymphozyten. Im Verlauf des Wachstums nehmen die Kollateralgefäße eine typische korkenzieherartige Struktur an, die wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass nicht nur eine Zunahme des Durchmessers, sondern auch eine Längenzunahme stattfindet (Helisch and Schaper 2003).

1.4 Gefäßwachstum

Die Versorgung von Gewebe und Organen erfolgt über das Blut, welches über Blutgefäße in verschiedenste Bereiche des menschlichen Körpers geleitet wird. Die Entwicklung des Gefäßwachstums wird in drei Formen unterteilt: Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese. Die Vaskulogenese und die Angiogenese treten in der embryonalen Phase auf, die sich in die postnatale Phase fortsetzt. Die Arteriogenese ist als das Gefäßwachstum im adulten Organismus bekannt.

1.4.1 Vaskulogenese

Die Vaskulogenese ist der früheste morphologische Prozess der Gefäßentwicklung und findet in der frühen Embryonalentwicklung statt. Dabei wird das kardiovaskuläre System als erstes ausgebildet (Buschmann and Schaper 1999). Die Vaskulogenese beschreibt die Entwicklung eines primären embryonalen Netzwerks, das sich aus Angioblasten differenziert (Risau 1997). Die zuerst undifferenzierten Angioblasten wandern aus, differenzieren sich zu Endothelzellen und fusionieren zum primitiven vaskulären Netzwerk, während glatte Muskelzellen diese umlagern und die Gefäße stabilisieren (Risau and Flamme 1995). Die Angioblastendifferenzierung wird unter anderem durch die Wachstumsfaktoren VEGF (vascular endothelial growth factor) und bFGF (basic fibroblast growth factor) sowie ihren Rezeptoren beeinflusst (Carmeliet 2000). Vaskulogenese wurde zuerst als Gefäßwachstum beschrieben, das nur im Embryonalstadium vorkommt. Durch spätere Studien wurde dennoch nachgewiesen, dass sie auch postnatal zum Beispiel beim Tumorwachstum, welches eine Kombination aus Vaskulogenese und Angiogense darstellt, vorzufinden ist (Ribatti et al. 2001). Hierbei tragen aus dem Knochenmark mobilisierte Endothelzellvorläufer zum Wachstum der Endothelmasse bei, indem sie sich an den Orten der Gefäßneubildung zu Endothelzellen ausdifferenzieren. Dies entspricht einer postnatalen Vaskulogenese (Asahara et al. 1999).

1.4.2 Angiogenese

Die Angiogenese ist als ein Aussprossen von neuen Kapillaren aus bereits existierenden Kapillaren (Risau 1997) oder als Unterteilung eines Gefäßes in zwei gleich starke neue Gefäße durch einwandernde periendotheliale Zellen definiert, welche neue kapilläre Netzwerke bilden. Der zweite Prozess trägt den Begriff Intusseption (Risau 1997; Djonov and Makanya 2005). Diese Kapillarnetzwerke bestehen aus Endothelzellröhren, denen zusätzliche Wandstrukturen wie glatte Muskelzellschicht oder Adventitia fehlen.



Abb.1: Angiogenese beschreibt das Aussprossen von neuen Kapillaren aus bereits existierenden Gefäßen oder auch die Intusseption, die Unterteilung eines Gefäßes in zwei gleich starke neue Gefäße. Der initiale Stimulus der Angiogenese ist die Hypoxie (modifiziert nach Heil et al. 2006).

Es gibt eine Antriebskraft für die Angiogenese: die Hypoxie des umliegenden Gewebes. Die Hypoxie verursacht die Induktion eines Transkriptionsfaktors, HIF-1 (hypoxia inducible factor-1), welches ein heterodimeres Protein mit zwei Untereinheiten, HIF-1 alpha und HIF-1 beta darstellt (Semenza 2002). Bei Hypoxie bindet HIF-1 an ein spezifisches Enhancer-Element in der Promotorregion des potenten Angiogenesefaktors VEGF-A (vascular endothelial growth factor A). Als Folge wird VEGF-A transkribiert. VEGF-A induziert die Proliferation von Endothelzellen wie auch die endotheliale Permeabilisation (Heil et al. 2006). Die Aussprossung von Kapillaren führt zu einer Zunahme der Kapillardichte, welche gleichzusetzen ist mit einer Abnahme der Zwischenräume zwischen den umliegenden Gefäßen. Die Angiogenese erhöht die Blutperfusion vom hypoxischen Gewebe und hält den lokalen Sauerstoff- und Nährstoffgehalt aufrecht (Heil et al. 2006).

Der Begriff Angiogenese ist auf Hertig zurückzuführen, welcher ihn 1935 definierte (Hertig 1935), um die Bildung neuer Blutgefäße in der Plazenta zu beschreiben. 1971 gebrauchte Folkman diesen Begriff für die Vaskularisierung solider Tumoren (Folkman

1971; Folkman 1976). Heute beinhaltet der Begriff die oben beschriebenen physiologischen und pathologischen Prozesse und ist die übliche Beschreibung für das Aussprosssen von neuen Kapillaren oder die Teilung von bereits existierenden Gefäßen sowohl im embryonalen als auch im adulten Organismus, z. B. während der Wundheilung (Jang et al. 1999) und des Wachstums von Tumoren (Folkman 1971; Folkman 1976).

1.4.3 Arteriogenese

Die Arteriogenese ist als Proliferation und Remodeling (Umstrukturierung) von präexistenten Kollateralanastomosen zu funktionstüchtigen größeren Arterien definiert.



Abb.2: Arteriogenese wird hinter einer Stenosse oder Okklusion einer größeren Arterie induziert (siehe grauen Fleck). Anders als in der Angiogenese ist die Schubspannung der Initialtrigger, die durch alternierenden Blutfluss durch die präexistenten Kollateralanastomosen fließt. Das Wachstum von Kollateralen erfolgt durch Umbauprozesse dieser präexistenten Anastomosen. (modifiziert nach Heil et al. 2006)

Dieser natürliche Bypass wird durch eine komplexe Kaskade von aufeinanderfolgenden Mechanismen kontrolliert. Der Initialtrigger ist anders als bei der Angiogenese nicht die Hypoxie, sondern eine physikalische Kraft, welche nach einem Blutflussanstieg auf die Kollateralen ausgeübt wird.

Nach einer Stenosierung eines Hauptgefäßes sind kleine präexistente Kollateralen die einzige Verbindung zwischen dem prästenotischen Hochdruckgebiet und dem poststenotischen Tiefdruckgebiet. Die Durchflussgeschwindigkeit in diesen Gefäßen erhöht sich, um die Blutversorgung aufrechtzuerhalten und damit auch die physikalische Kraft, die auf die Gefäßwand wirkt (Schaper and Ito 1996). Neben Blutdruck-basierten Kräften ist dies vor allem die Schubspannung, die als physikalische Kraft hier fungiert. Die Schubspannung (Shear stress) τ , ist erforderlich, um eine Fläche mit konstanter Geschwindigkeit über eine Flüssigkeit zu ziehen (τ= K/F). Die Schubspannung aktiviert die Endothelzellen der Gefäßwand und wurde als initialer Auslöser der Arteriogenese identifiziert (Pipp et al. 2004). Die Schubspannung führt zur Aktivierung der Endothelzellen der Kollateralgefäßwand, worauf die Endothelzellen ödematös anschwellen, welches vermutlich auf das Öffnen von Ionenkanälen zurückzuführen ist (Ziegelhoeffer et al. 2003). Das nun aktivierte Endothel bildet vermehrt MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), ein Polypeptid, welches zur Klasse der CC-Zytokinen gehört (Zimmermann et al. 1997) und einerseits zur systematischen Erhöhung eines Monozytenadhäsionsrezeptors und andererseits als direktes Mitogen zur Proliferation von glatten Muskelzellen führt (van Royen et al. 2003). Außerdem erfolgt eine Induktion von Adhäsionsmolekülen. Dies wirkt sich ebenfalls auf die Monozyten aus und es kommt zu einer Anlockung dieser aus dem Blut, die mit der Gefäßwand interagieren, an diese anlagern und transmigrieren (Schaper et al. 1976). Nach der Invasion in die Kollateralgefäßwand differenzieren sich die Monozyten zu Makrophagen und starten Zytokine wie TNF- α (tumor necrosis factor-alpha), bFGF (basic fibroblast growth factor), TGF-β (tumor growth factor-β) und MCP-1, welche für weitere Aktivierungskaskaden des Endothels, glatter Muskelzellen und Monozyten bedeutsam sind, zu synthetisieren. Außerdem verstärkt das Endothel die Produktion GM-CSF (granulocyte makrophage colony stimulating factor), was des die Überlebenszeit der Monozyten verlängert. Sie sind so in der Lage, große Mengen weiterer Wachstumsfaktoren (z.B. bFGF) zu bilden, welche die Umstrukturierung des Gefäßes beeinflussen (Buschmann and Schaper 1999). Im Anschluss an die Adhäsion und Invasion der Monozyten und Plättchen vollziehen sich bald die ersten Mitosen der Endothel- und glatten Muskelzellen. Dieser Vorgang beginnt in den präformierten Kollateralgefäßen etwa 24 Stunden nach akuter Okklusion der Arterien im Tiermodell (Scholz et al. 2000).



Adhäsion

Invasion

Monozyt in der Intima

Abb.3 Elektronenmikroskopische Aufnahme von Monozyten im Kollateralwachstum. Abbildungen zeigen die aufeinander folgenden Schritte der Monozyteninvasion (Heil and Schaper 2005).

Monozyten dringen anfangs vor allem in die Intima ein, sind später jedoch vermehrt in der Adventitia zu finden, wo sie eine entzündliche Umgebung schaffen. Diese Entzündungsreaktion hat die Auflösung der Basalmembran des Gefäßes zur Folge. Außerdem wird im umgebenden Gewebe Raum für das sich neu entwickelnde Gefäß geschaffen, das seinen Durchmesser bis zu 20-fach erhöhen kann. Beim Abbau der alten Gefäßstruktur in weiten Teilen und Ersatz dieser für ein größeres Kollateralgefäß werden zwei Phasen unterschieden: Proliferation und Remodeling. Makrophagen spielen in der Induktion der Proliferation von Gefäßwandzellen genauso wie beim Remodeling von Gefäßwänden durch Expression von gefäßabbauenden Proteasen wie Matrix-Metalloproteasen (MMP) und uronary plasminogen activator (uPA) eine zentrale Rolle (Kusch et al. 2002; Menshikov et al. 2002), welche den notwendigen Raum bei der Ausweitung der Kollateralarterien schaffen (Cai et al. 2003).

1.4.3.1 Phasen der Arteriogenese

Die Entwicklung von präexistenten Kollateralen in eine reife Konduktanzarterie in der Arteriogenese lässt sich in verschiedenen Phasen beschreiben. Die Entwicklung wird dabei in eine initiale Phase, Proliferationsphase, Wachstumsphase, in der das Remodeling des Gefäßes stattfindet und in eine Reifungsphase unterteilt (Scholz et al. 2000). Eine aktuelle Studie von Wolfgang Schaper dagegen beziffert die Phasen von eins bis vier und definiert die einzelnen Phasen auf eine unterschiedliche Weise (Schaper 2009) als es Scholz et al. tun. Die initiale Phase beginnt nach Scholz et al. bereits einige Minuten nach der Okklusion der A. femoralis mit Aktivierung der Endothelzellen, die durch Schubspannung induziert wird. Anschließend kommt es zu Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen und die Adhäsion einer von Blutmakrophagen an diese Adhäsionsmoleküle (Scholz et al. 2000). Nach Schaper lagern sich die Makrophagen, die zu den bone marrow derived cells gehören, an die Endothelzellen und sammeln sich auch in der Adventitia an. Das Kennzeichen der ersten Phase ist der phänotypische Wechsel der Endothelzellen und SMCs (smooth muscle cells) von einer kontraktilen in eine synthetische und proliferative Form mit einem Anstieg der Gefäßpermeabilität. Die zweite Phase ist charakterisiert durch eine kontrollierte Destruktion der Kollateralen durch den Verdau der Lamina elastica interna und der extrazellulären Matrix. Diese tritt bei Scholz erst in der dritten Phase ein.

Simultan zeigt sich eine maximale mitotische Aktivität der SMCs und der Endothelzellen, wobei die Mitose der Endothelzellen der der SMCs ca. um einen Tag vorausgeht. Wenn verdaut und fragmentiert die Lamina elastica interna wird. hat die Monozytenrekrutierung nachgelassen und die Adhäsionsmoleküle sind nicht mehr exprimiert (Scholz et al. 2000). Die dritte Phase ist gekennzeichnet durch Anordnung der SMCs in kreisförmige Lagen, Etablierung von Zellkontakten und die Synthese von Elastin und Kollagen, die das Gerüst für das nun zu synthetisierende größere Gefäß schaffen (Schaper 2009). In der vierten Phase werden die Gefäße, die anfangs am Remodeling teilgenommen haben, aber dann nicht mehr von Bedeutung für den Blutfluss sind, von der Blutversorgung abgekappt. Die anfangs einen größeren Diameter aufwiesen, wachsen weiterhin aus, und viele andere verschließen sich durch überschießende Intimaproliferation wie ein Stumpf einer okkludierten Arterie (Scholz et al. 2000). Nach Scholz et al. tritt die Initialphase bereits einige Minuten nach Verschluss

der A. femoralis ein, die proliferative Phase ein bis drei Tage und die daran anschließende synthetische Phase (Wachstumsphase) drei bis 14 Tage nach Okklusion.

1.5 Hämodynamische Kräfte der Blutströmung

Bei der Arteriogenese spielt das Hagen-Poiseuille-Gesetz für laminare Strömungen eine entscheidende Rolle.

In einem zylindrischen Gefäß sind bei laminarer Strömung, d.h. einer Strömung, bei der sich alle Flüssigkeitsteilchen parallel zur Gefäßachse bewegen, die Schichten gleicher Geschwindigkeiten konzentrisch angeordnet. Mithilfe des Newton-Reibungsgesetzes lässt sich für eine laminäre und stationäre, d.h. zeitlich konstante Strömung in einem starren zylindrischen Gefäß eine Beziehung zwischen der Stromstärke und den sie bestimmenden Parametern herleiten, welches im Hagen-Poiseuille-Gesetz zum Ausdruck kommt.

Formel:
$$I = \frac{r_i^4 \pi \Delta P}{8\eta l} \left[\frac{m^3}{s} \right]$$

Hierbei sind ΔP die Druckdifferenz, η die Viskosität der Flüssigkeit, ri der Innenradius und I die Länge des Gefäßes.

Unter Heranziehung des Ohmschen-Gesetzes (I= $\Delta P/R$) lässt sich aus dem Hagen-Poiseuille-Gesetz der Strömungswiderstand bestimmen.

Formel:
$$R = \frac{8\eta l}{r_i^4 \pi} \left[\frac{Ns}{m^5} \right]$$

Der Strömungswiderstand ändert sich demnach umgekehrt proportional zur vierten Potenz des Gefäßradius. Die Arteriogenese, bei der Kollateralen auswachsen, ist nach dem Hagen-Poiseuilleschen Gesetz wesentlich effizienter bei der Kompensation einer okkludierten Arterie als die Angiogenese bei der weitere Kapillaren ausgebildet werden

würden. Denn für den Ersatz des ursprünglichen Gefäßes ist ein ähnlich großer Gesamtdurchmesser der neuen Gefäße notwendig. Ein solcher Durchmesser kann aber durch Kapillarsprossung nicht erreicht werden, da die Anzahl der hierzu benötigten Kapillaren das zur Verfügung stehende Volumen weitaus sprengen würde (Buschmann and Schaper 1999). Aber die Kollateralen sind ihrer Morphologie nach mit Arteriolen gleichzusetzen, die einen größeren Durchmesser besitzen als Kapillaren. Die vierte Potenz führt zu enormen Widerstands- und Blutflussänderungen bei Veränderungen des Radius. Bereits geringe Vergrößerungen im Gefäßdurchmesser führen zu einem wesentlichen Anstieg des Blutflusses bei gleichzeitiger Erniedrigung des Widerstandes in den Kollateralen.

Die Endothelzellen registrieren die Schubspannung als initiales Signal und leiten es über Transduktionskaskaden in ihren Nukleus weiter. Über spezifische Promotor-Elemente (SSRE= shear stress response element) kommt es zur Transkriptionsregulation von zahlreichen an der Arteriogenese beteiligten Genen (Heilmann et al. 2002).

1.6 In vivo-Modelle zur Untersuchung der Arteriogenese

Es wurden verschiedene Stenosemodelle als Tiermodelle für die Erforschung der Arteriogenese-relevanten Faktoren und Mechanismen etabliert. Hierbei kann man Modelle zur Untersuchung der kardialen, zerebralen und peripheren Arteriogenese voneinander unterscheiden. Allen gemeinsam ist das Ziel, die menschlichen Bedingungen mit der entsprechenden Erkrankungssituation möglichst realitätsnah widerzuspiegeln und dabei so minimalinvasiv wie möglich zu arbeiten. Für ein Arteriogenesemodell ist es jedoch sehr entscheidend, dass es in keinem Fall zur absoluten Ischämie und damit zu Nekrosen oder Infarkten kommt, denn für Arteriogenese ist nicht Hypoxie, sondern Schubspannung der auslösende Faktor.

Zur Erforschung der kardialen Arteriogenese haben sich chronische Stenose-Modelle durchgesetzt, die ein realitätsnahes Krankheitsbild von koronaren Herzkrankheiten liefern. Hierbei werden Ameroide, aber auch beschichtete Stents verwendet. Ameroide werden an die Außenseite von Gefäßen angebracht und sie führen zur Flüssigkeitsabsorption und das Gefäßlumen wird graduell eingeengt (Elzinga 1969).

Stents dienen der Beseitigung von Akutverschlüssen nach PTCA-Eingriffen (perkutane transluminare coronare Angioplastie). Die Stents sind dabei mit antiproliferativen Medikamenten beschichtet, die eine überschießende Intimahyperplasie mit der Tendenz zur Restenosierung verhindern und somit die Rate an erneuten Reinterventionen vermindern sollen (Herold 2009).

Für die Untersuchung der adaptiven und therapeutischen zerebralen Arteriogenese in der Schlaganfallforschung wurde das 3-VO (three vessel occlusion)-Modell etabliert. In Anlehnung an Kawata et al. (Kawata et al. 1996) entwickelten Busch et al. eine modifizierte Form des 3-VO-Modells (Busch et al. 2003). Dabei werden erst beide Aa. vertebrales mit einer Elektrokoagulation verschlossen und anschließend die A. carotis communis sinistra ligiert. So sind drei der vier Hauptgefäße, die das Gehirn versorgen, verschlossen und ein progressives Verschlussmodell mit steigender zerebraler Hypoperfusion ist erzeugt.

Die Ligation der A. femoralis am Hinterlauf von Kaninchen oder Mäusen findet als Modell für die periphere Verschlusskrankheit Anwendung, welches gleichzeitig den Prototyp des peripheren Arteriogenese-Modells darstellt. In diesem Modell wird die A. femoralis im Bereich des mittleren Oberschenkels zweimal im Abstand von ca. einem Zentimeter ligiert, um den Einfluss sogenannter Brückenkollateralen zu verhindern, welche die Verschlussstelle auf kürzestem Wege umgehen könnten. In einem Schweine-Hinterlaufmodell mit einer künstlich geschaffenen seitlichen Anastomose zwischen der verschlossenen A. femoralis und der dazugehörigen Vene (arteriovenöser Shunt) wurden Beweise für die morphogenetische Kraft von Schubspannung durch das Umgestalten der peripheren kollateralen Zirkulation geliefert (Pipp et al. 2004). Durch den arteriovenösen Shunt (AV-Shunt) wurde die Schubspannung während des Kollateralwachstums aufrechterhalten. Die wichtigste neue Erkenntnis aus der Studie von Pipp et al. ist, dass die durch einen Shunt stark erhöhte Schubspannung die anatomischen Restriktionen von Kollateralgefäßen überwindet und letztendlich zu einer kompletten Normalisierung und sogar Überkompensation der maximalen Konduktanz führen kann. Chronisch erhöhte Schubspannung, die durch einen chirurgisch hergestellten Shunt zwischen dem distalen Ende der verschlossenen A. femoralis und der benachbarten Vene hergestellt worden ist, führt zu einem erheblich verlängerten Wachstumsprozess der Kollateralarterien. Mit diesem Tiermodell war es erstmals möglich die volle maximale Konduktanz einer verschlossenen Hauptarterie wiederherzustellen und sogar zu überwinden. Viele der molekularen Mechanismen werden seit längerem erforscht und sind weiterhin noch aufzuklären.

1.7 Tiermodell Minischwein

Die in vorliegender Studie verwendeten Minischweine sind gezüchtete Zwergschweine, die entweder vom europäischen oder asiatischen Wildschwein abstammen. Durch Kreuzung des Hausschweins mit dem Hängebauchschwein entstand ihr Kleinwuchs. Es gibt verschiedene Rassen unter ihnen, unter anderem das Yucatan Minischwein (Charles River Wiga, GmbH).

Minischweine haben trotz der hohen Anschaffungskosten den Vorteil, dass sie mit ihrem Gewicht unter 100kg näher am Menschen liegen als die Hausschweine zwischen 250 und 400kg. Das Schwein ähnelt anatomisch dem Menschen sehr: Das Schwein besitzt eine Ähnlichkeit zur Anatomie der Koronararterien des Menschen. Es ist wie der Mensch nur wenig mit Kollateralen ausgestattet, es hat ein vergleichbares Kollateralwachstum, zeigt eine ähnliche proliferative Antwort nach Arterienläsionen und hat insgesamt eine ähnliche genetische Information wie der Mensch (Buschmann and Schaper 2000). Das Gerinnungssystem ähnelt dem des Menschen, ein wichtiger Punkt bei der Nachahmung eines menschlichen Gefäßsystems. Neben diesen Gründen bietet das Schwein mehrere Vorteile bei der Konstruktion eines experimentellen AV-Shunt-Modells, das in dieser Studie durchgeführt worden ist: Das Schwein hat lange Halsgefäße, welche leicht für die Konstruktion der Carotis-Jugular-Fistula zugänglich sind. Der wichtigste Punkt ist, es besitzt ein carotides Rete mirabile, ein Gefäßnetz aus feinsten Arterien (Massoud et al. 1994).

1.8 Rete mirabile

Das carotide Rete mirabile des Schweins befindet sich am Ende beider Aa. pharyngeales ascendentes nach Durchtritt durch die Schädelbasis (Massoud et al. 1994). Die A. pharyngealis ascendens teilt sich in ein Geflecht feinster Arterien auf und vereint sich in der Mittellinie mit feinsten Arterien der A. pharyngealis ascendens der gegenüberliegenden Seite statt mit einer Vene wie es normalerweise wäre. Beide Retia mirabilia werden vom Sinus cavernosus umgeben.



Abb.4 Plastikguss der beiden carotiden Rete mirabile des Schweins zeigt die komplexen Abzweigungen. Nichtvaskulären Strukturen in der Umgebung wurden entfernt. Kleine Pfeile zeigen auf die rechte und linke A. pharyngealis ascendens, aus der das Rete mirabile entspringt. Das Rete mirabile einer Seite vereinigt sich statt mit einer Vene mit dem Rete der anderen Seite (große Pfeile). (Modifiziert nach Dondelinger et al. 1998)

Die A. carotis communis im Schwein teilt sich anders als beim Menschen in die A. carotis externa und in die A. pharyngealis ascendens auf. Die letztere beträgt in ihrer Größe 2 bis 2,5mm und versorgt hauptsächlich das Gehirn mit arteriellem Blut. Die A. occipitalis und der muskuläre Ast der A. pharyngealis asc. anastomisieren über der Mittellinie mit den kontralateralen analogen Arterien. Zwei kleinere Äste aus der A. carotis externa versorgen ebenfalls je ein Rete mirabile. Der eine ist Ramus anastomoticus, ein Ast der A. meningealis, der andere A. anastomotica, ein Ast der A. ophthalmica externa. Damit leisten sie einen kleinen Beitrag zur Versorgung des Rete mirabile.

Das Rete beträgt in seiner Größe ungefähr 2 x 1,5 x 0,2cm (Brothers et al. 1989). Ein Gefäß des Rete mirabile kann in seinem Durchmesser zwischen 70µm bis 275µm mit einem Mittelwert von 154µm betragen (Lee et al. 1989). Die Funktion des carotiden Rete mirabile ist unklar. Es gibt zahlreiche Theorien über die Funktion des Rete mirabile. Die Vermutungen reichen vom Thermoregulator über Sauerstoffaustauscher bis hin zum zerebralen Blutflussregulator-Organ.

1.9 Arteriovenöses Shuntmodell im Rete mirabile des Minischweins

Arteriovenöse Fehlbildungen (auch arteriovenöse Malformationen genannt) zählen zu den häufigsten symptomatischen, erblich bedingten Gefäßmissbildungen des zentralen Nervensystems (Martin and Vinters 1990). Es handelt sich um eine tumorartige Fehlbildung mit einem arteriovenösen Shunt von variabler Größe zwischen zuführenden Arterien und abführenden Venen (Padget 1948). Das carotide Rete mirabile hat eine morphologische Ähnlichkeit mit dem AVM-Nidus mit dem Unterschied, dass dem Rete mirabile der angeborene AV-Shunt fehlt.

Massoud et al. führte 1994 die chirurgische Umsetzung eines AV-Fehlbildungsmodells (AVM-Modell = arteriovenous malformation model) im Schwein durch Umleitung und Erhöhung des Blutflusses durch das bilaterale Rete mirabile durch. Dieser sog. AV-Shunt wurde zwischen der rechten A. carotis communis und der rechten V. jugularis externa als seitliche "side-to-side" Anastomose künstlich geschaffen (Massoud et al. 1994). Das Hochdrucksystem ist nun mit dem Niedrigdrucksystem verbunden und gleichzeitig ist ein permanenter Blutdruckgradient geschaffen. Dies resultiert in einem drastischen Anstieg der Geschwindigkeit der Kollateraldurchblutung, welche eine Erhöhung der Schubspannung zur Folge hat (Eitenmuller et al. 2006). Durch den AV-Shunt wird der Blutfluss durch die beiden Retia mirabilia verstärkt, sodass der durchschnittliche arteriovenöse Blutdruckgradient über dem Nidus bei 28mmHG liegt (Massoud et al. 2000). Die Arteriogenese wird in diesem arteriovenösen Shunt-Modell maximal induziert (Eitenmuller et al. 2006).

Inzwischen ist unumstritten, dass die Schubspannung, auch "fluid shear stress" (FSS) genannt, die durch den Shunt erzeugt wird, einen Hauptstimulus der Arteriogenese darstellt. Damit ist klar, dass ein künstlich geschaffener Schubspannungsanstieg die anatomische Verengung der Kollateralarterien überwindet und zu einer Normalisierung und sogar zur Überkompensation der maximalen Konduktanz, d.h. der Leitfähigkeit des Blutes, führt.



Abb.5: Schematische Darstellung des AV-Shunt-Modells nach Herstellung einer Carotid-Jugular-Fistula. Der Ballon befindet sich in der rechten A. carotis externa. Die Pfeile zeigen die Flussrichtung des Blutes: von der A. carotis communis sinistra und den drei zuführenden Arterien (A. pharyngealis ascendens sinistra, Ramus anastomoticus sinistra und A. anastomoticus sinstra) durch die beiden Retia mirabilia retrograd zur A. pharyngealis ascendens dextra (modifiziert nach Massoud et al. 2000).

Das AV-Shunt-Modell weist zwei positive Eigenschaften bezüglich des fluid shear stress auf. 1. In der Frühphase der Arteriogenese steigt der Blutdruck nicht abrupt an, da das System an das venöse System verknüpft ist und gewährleistet einen gleichmäßigen Druckzustand. 2. Der Blutfluss-Widerstand ist durch den Shunt minimiert und verhindert gleichzeitig einen Abfall des fluid shear stress (FSS) während der späten Phase der Arteriogenese. Der FSS würde ohne einen Shunt normalerweise bei der Zunahme des Diameters von wachsenden Kollateralen abnehmen (Heil et al. 2006). Somit sind arteriovenöse Shunt-Modelle für die Untersuchung der Arteriogenese besonders geeignet, da sie dessen auslösende Mechanismen über einen langen Zeitraum aufrechterhalten. Der AV-Shunt ist ein sehr guter Stimulator der Arteriogenese, der effektiver ist als die Gabe des stärksten pro-arteriogenen Zytokins oder die Kombination mehrerer Zytokine (Schierling, Troidl et al. 2009).



Abb.6 Postmortem Angiographien von unterschiedlich behandelten Kaninchen-Hinterläufen; eine Woche nach Ligatur der A. femoralis. Pfeile zeigen Kollateralarterien.

A) Kontrolle mit okkludierter A. femoralis, einige Kollateralarterien sichtbar.

B) MCP-1-Infusion erhöht die Anzahl von Kollateralarterien.

C) Vervielfachung und Diameterzuwachs der Kollateralarterien nach AV-Shunt-Behandlung (modifiziert nach (Schierling et al. 2009).

Es wurden das Großtiermodell Minischwein mit dem arteriellen Geflecht, Rete mirabile und die Auswirkung des AV-Shunts auf die Arteriogenese, die einen stärkeren Stimulus auf das Kollateralwachstum in der Arteriogenese ausübt als die Gabe des stärksten proarteriogenen Zytokins, beschrieben. Die positiven Aspekte dabei ließen die Überlegung aufstellen, dieses auf die Eignung als Arteriogenese-Modell zu überprüfen. Vorrangig sollte untersucht werden, ob der Mechanismus der Arteriogenese wirklich eintritt. Hierfür wurde im vorliegenden Modell die Expression von verschiedenen Markern analysiert, die eine Rolle in der Arteriogenese spielen. Da die Proliferation, Inflammation und das Remodeling eine Schlüsselrolle in der Arteriogenese einnehmen, werden Marker, die diese Situationen widerspiegeln, auf ihre Expression und Regulation untersucht. Es wurde anschließend eine Aussage getroffen, ob das beschriebene Modell für die Erforschung der Arteriogenese eingesetzt werden kann.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Versuchstiere

Es werden zehn Yucatan Minischweine Sus scrofa der Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld für die Untersuchung verwendet. Sie sind bei ausgewachsener Größe klein und leicht handhabbar. Diese Minischweine wogen zwischen 10 und 14kg.

2.1.2 Chirurgischer Eingriff

Die verwendeten Materialien finden im Zusammenhang mit den Methoden Erwähnung, da der chirurgische Eingriff für alle Versuchstiere von Prof. Dr. Joachim Klisch in Freiburg durchgeführt wurde.

2.1.3 Immunhistochemische Charakterisierung des arteriovenösen Shunt-Modells 2.1.3.1 Primärantikörper

	CD 163	Ki67
Hersteller	AbD Serotec, Düsseldorf	Thermo scientific, Dreieich
Signal	Makrophagen	Proliferation
Klon	2A100/11	SP6
Katalog-Nr.	MCA2311	RM-9106-S0
Host	Maus	Kaninchen
Spezifität	Schwein	Mensch
Тур	monoklonal	Monoklonal
Markierung	unmarkiert	Unmarkiert

Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper

2.1.3.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	
Aceton	J.T.Baker, Deventer Holland	
AEC Substrat Kit	Zytomed systems, Berlin	
Aqua dest.	Hauseigene Quelle	
Aquatex	Merck, Darmstadt	
Biotinylierter Sekundärantikörper Anti mouse host donkey	Dianova, Hamburg	
Citratpuffer pH 6.0	Quartett, Berlin	
Dinatriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt	
Entellan	Merck, Darmstadt	
Eosin	Sigma, Steinheim	
Fettstift	DakoCytomation, Dänemark	
Fluoromount G	Southern Biotech, Birmingham USA	
Hämatoxylin	Thermo Scientific, Dreieich	
Kaninchenserum	DakoCytomation, Denmark	
Methanol	Merck, Darmstadt	
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe	
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt	
Natronlauge	Merck, Darmstadt	
Rinderalbumin	Sigma, Steinheim	
Salzsäure	Merck, Darmstadt	
Stickstoff	Merck, Darmstadt	
Stickstoffperoxid	Merck, Darmstadt	
Streptavidin-HRP-Konjugat Zytomed systems, Berl		
Tissue Freezing Medium	Jung, Nussloch	
Triton-X-100	Roth, Karlsruhe	
Trockeneis	Trockeneis Charité, Berlin	
Tween20	Roth, Karlsruhe	
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt	
Weigerts Hämatoxylin A	Merck, Darmstadt	
Weigerts Hämatoxylin B	Merck, Darmstadt	

Tabelle 2: Auflistung der für die immunhistochemische Analyse benötigten Chemikalien

2.1.3.3 Laborgeräte

Gerät	Hersteller	Gerätebezeichnung/Typ
+4°C Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen	Comfort
-20°C Freezer	Liebherr, Ochsenhausen	Comfort
-80°C Freezer	Sanyo, München	-
Crymold-Standard- Schälchen	Sakura, Staufen	-
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe	24x60mm#1
Eppiständer	Eppendorf, Berlin	-
Falcontube (15ml; 50ml)	BD, Heidelberg	-
Feuchtkammer	Instituteigene Werkstatt	-
Fotoapparat	Leica, Solms	DC 300F
Kryostat	Leica, Nussloch	CM1900
Laborwaage	Ohaus, Gießen	Scout
Metallstempel	-	-
Mikroskop	Leica, Wetzlar	DM IRE2
Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen	SuperFrost®Plus
pH-Meter	Radiometer, Copenhagen Dänemark	PHM92
Pipetten	Gilson, Limburg- Offheim	_
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht	-
Reaktionsgefäße (0,5ml; 1,5ml; 2ml)	eppendorf, Berlin	_
Software	Leica, Solms	-
Stoppuhr	neoLab, Heidelberg	-

Tabelle 3: Auflistung der für die immunhistochemische Analyse benötigten Geräte

2.1.4 Nachweis von putativen Arteriogensemarkern auf RNA-Ebene

2.1.4.1 Primerliste

Primername	Sequenz
RPLP0 (forward)	5'-AGA CAA AGT GGG AGC CAG TG-3'
RPLP0 (reverse)	5'-GGG TTG TAG ATG CTG CCA TT-3'
TIMP-1 (forward)	5'-CTG CGG ATA CTT CCA CAG GT-3'
TIMP-1 (reverse)	5'-CAA AAC TGC AGG TGG TGA TG-3'
MMP-2 (forward)	5'-GTG GTG CGT GTG AAG TAT GG-3'
MMP-2 (reverse)	5'-TGT GTC GGT GCA GCT GTT AT-3'
MCP-1 (forward)	5'-AGC AAG TGT CCC AAA GAA GC-3'
MCP-1 (reverse)	5'-TGG AAT CCT GAA CCC ACT TC-3'
CD44 (forward)	5'-TCC TGG TTT GGA GAC ATT CC-3'
CD44 (reverse)	5'-TGG TGG GGA TAA TTT CTG GA-3'
VEGFA (forward)	5'-GAG GCA AGA AAA TCC CTG TG-3'
VEGFA (reverse)	5'-GCG AGT CTG TGT TTT TGC AG-3'
SDF-1(forward)	5'-GCC AAC ATC AAG CAT CTC AA-3'
SDF-1 (reverse)	5'-CAA TTT TGG GTC AAT GCA CA-3'
Vimentin (forward)	5'-ATG CTT CTT TGG CAC GTC TT-3'
Vimentin (reverse)	5'-GGA TTT CCT CAT CGT GCA GT-3'

 Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Primersequenzen

2.1.4.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	
10µl forward primer	Invitrogen, Darmstadt	
10µl reverse primer	Invitrogen, Darmstadt	
10x RT Buffer	Invitrogen, Darmstadt	
10x RT Random primers	Invitrogen, Darmstadt	
2xPower SYBR Green Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt	
96-100% Ethanol	Herbeta Arznei, Berlin	
Agilent 6000 Nano Reagents Part I	Agilent Technologies, Waldbronn	
Chloroform	Merck, Darmstadt	
DEPC-Wasser	Roth, Karlsruhe	
dNTC Mix 100mM	Invitrogen, Darmstadt	
Ethanol	Merck, Darmstadt	
Flüssiger Stickstoff	Linde, Höllriegelskreuz	
Isopropanol	Merck, Darmstadt	
Multi Scribe Rtase (50U/µI)	Invitrogen, Darmstadt	
RLT Buffer	Qiagen, Hilden	
RNA 6000 Nano Dye Concentrate	Agilent Technologies, Waldbronn	
RNA 6000 Nano Gel Matrix	Agilent Technologies, Waldbronn	
RNA 6000 Nano Marker	Agilent Technologies, Waldbronn	
RNA Ladder 6000	Agilent Technologies, Waldbronn	
Rnase Inhibitor (Rnasin)	Promega, Mannheim	
Rnase Inhibitor (Rnasin) 40U/µl	Promega, Mannheim	
Rnase- und Dnase freies Wasser	Invitrogen, Darmstadt	
RNAseZAP®	Sigma-Aldrich, Steinheim	
RPE Buffer	Qiagen, Hilden	
Trizol Reagent	Invitrogen, Darmstadt	
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt	
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe	

Tabelle 5: Auflistung der für die RNA-Analyse benötigten Chemikalien

2.1.4.3 Laborgeräte

Gerät	Hersteller	Gerätebezeichnung/ Typ
96 well-Reaktionsplatte	Applied Biosystem, Darmstadt	optical 96well reaCtion plate with barcode
Adhäsionsfolie	Applied Biosystem, Darmstadt	L00605082
-20°C Freezer	Liebherr, Ochsenhausen	Comfort
-80°C Freezer	Sanyo, München	-
BioAnalyzer 2100	Agilent Technologies, Waldbronn	-
BioAnalyzer 2100 Software	Agilent Technologies, Waldbronn	-
Chip Priming Station	Agilent Technologies, Waldbronn	-
Feinwaage	Sartorius, Göttingen	TE64
Gradient Cycler	Biozym, Hessisch Oldendorf	-
Homogenisator	Polytron, Littau Schweiz	PT1200
Kombitipps	eppendorf, Berlin	-
Laptop	Dell, Frankfurt a.M.	-
Mörser	Instituteigene Werkstatt	-
Multipette® plus	eppendorf, Berlin	-
Nano Drop Spectrophotometer	Peqlab, Erlangen	ND-1000
Pipetten	Gilson, Limburg-Offheim	-
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht	-
Reaktionsgefäße (0,5ml; 1,5ml;2ml)	eppendorf, Berlin; Qiagen, Hilden	-
RNA-Chip	Agilent Technologies, Waldbronn	-
RNeasy MinElute Spin Column	Qiagen, Hilden	-
Spatel	-	-
Thermocycler	MJ Research, Waltham USA	PTC-200
Vortex Mixer	IKA, Staufen	
Zentrifuge	eppendorf, Berlin	5810R

Tabelle 6: Alphabetische Auflistung der für die RNA-Analyse benötigten Geräte

2.1.5 Lösungen

10xPBS (phosphate buffered saline) (0,1M PBS, pH 7,2)

12,13g Dinatriumhydrogenphosphat (Na2HPO4 (2xH2O))

3,68g Natriumdihydrogenphosphat (NaH2PO4 (H2O))

90g Natriumchlorid (NaCl)

Das Gemisch wird in aqua dest. gelöst und der pH-Wert mit 5M NaOH oder 5M HCL auf pH 7,2 eingestellt. Die Lösung wird 1:10 mit aqua dest. verdünnt.

Peroxidase Blockinglösung (0,3% Wasserstoffperoxid in 70% Methanol/PBS)

- 0,2ml 30% Wasserstoffperoxid (H2O2)+
- 12,6ml Methanol (CH₃OH)+
- 5,4ml aqua dest.

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

Die Tierhaltung erfolgte artgerecht unter Beachtung der Richtlinien für die Versuchstierhaltung in der tierexperimentellen Einrichtung der Universität Freiburg. Die Tierhaltung und -experimente wurden mit Genehmigung des Regierungspräsidiums Freiburg, Referat Veterinärwesen, 79083 Freiburg, gemäß § 8, Absatz 1 des Tierschutzgesetzes unter der Genehmigungsnummer AZ 35-9185.81/G-03/36 und dem Titel "Arteriogenese im AVM-Modell am Schwein" durchgeführt. Dieses befand sich in Übereinstimmung mit dem "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals", publiziert vom US National Institute of Health (NIH Publications No. 85-2, 1996). Es wurden zehn Minischweine verwendet.

2.2.2 Chirurgischer Eingriff

Am Abend vor dem operativen Eingriff fasteten die Schweine. Vor der Operation erhielten sie eine intramuskuläre Injektion von 20mg/kg Ketamin und 2mg/kg Xylazin. Nach der endotrachealen Intubation konnten die Tiere an die Inhalationsnarkose mit 1% bis 2% Halothan angeschlossen und künstlich beatmet werden.

2.2.2.1 Präoperative Angiographie

Der operative Eingriff wurde von Prof. Dr. Joachim Klisch nach dem Protokoll von Massoud (Massoud et al. 1994) durchgeführt.

Unter Anästhesie wurde eine 7F (French) Schleuse anhand der Standard-Seldinger-Punktion in die A. femoralis plaziert. Unter Verwendung dieser transfemoralen Route wurden ein linkes und ein rechtes Carotid-Arteriogramm mit spitz zulaufendem 5F Vinuela Katheter durchgeführt. Jodhaltiges Kontrastmittel (Iohexol (350mg/I/mI)) wurde für die Darstellung der Arterien und Venen des Hals- und Nackenbereichs verabreicht.

2.2.2.2 Endovaskulärer Verschluss der Nackengefäße

Der Vinuela Katheter wurde über einen Führungsdraht gegen einen 7F Royal Flush Führungskatheter ausgetauscht. Dieser wurde mit einem Y-Konnektor verbunden, welche die koaxiale Einführung einer Kombination aus Tracker 18 Mikrokatheter und Seeker 14 Mikroführungsdraht erlaubt. Eine intraarterielle Heparindosis (3000 U) wurde verabreicht. Die rechte A. occipitalis und die muskuläre Verzweigung der rechten A. pharyngealis ascendens wurden fluoroskopisch im latero-lateralen Strahlengang visualisiert. Beide Arterien wurden ein Stück über ihrem Ursprung endovaskulär entweder mit einem einfachen Coil oder durch eine monopolare Elektrokoagulation mit einem Mikroführungsdraht verschlossen. Im Anschluss wurden der Mikrokatheter und der Mikroführungsdraht entfernt. Ein aufblasbarer Ballon wurde über einen Tracker 18 Katheter eingeführt und zum Ursprung der rechten A. carotis externa geführt. An dieser Stelle wurde der Ballon aufgeblasen und bewirkte einen permanenten Gefäßverschluss (siehe Abb. 5).

2.2.2.3 Chirurgische Fistula-Bildung

Die Fistel-Bildung zwischen der A. carotis und der V. jugularis ist eine chirurgisch gut beschriebene Standardprozedur (Stehbens 1968). Unter sterilen Bedingungen wurde langer Schnitt in der seitlichen Halsgegend ein 10cm parallel zum Μ. sternocleidomastoideus gesetzt. Die Verwendung eines Retraktors erleichterte die Freilegung des Muskels. Ein 3cm langes Segment der V. jugularis externa, das frei von Abzweigungen war, wurde präpariert, isoliert und von der Adventitia befreit. Das gleiche erfolgte für ein 3cm langes angrenzendes Segment der A. carotis communis. Durch die Gabe von Papaverin-Hydrochlorid wurde ein Vasospasmus der Arterie und Vene verhindert. Kleine Gefäßklemmen wurden an jedes isolierte Arterien- und Venensegmentende platziert, um einen temporären Verschluss während der Fistula-Bildung zu erreichen. Mit einem Mikroskalpell wurde eine 2cm lange ellipsoide Arterienund Venenöffnung gesetzt, dessen posteriorer Rand mit 7-0 Prolennaht miteinander verbunden wurde. Nachdem das Gefäßlumen mit heparinisierter physiologischer Kochsalzlösung gespült wurde, wurden beide Ränder miteinander verbunden. Die Gefäßklemmen wurden nacheinander entfernt, um den korrekten Sitz der Gefäße zu überprüfen. Die Operationswunde wurde in Schichten zusammen genäht. Die Schweine erhielten intramuskulär 0,9 bis 1,2 x106 Einheiten Penicillin G.

2.2.2.4 Postoperative Angiographie

Direkt nach dem operativen Eingriff wurde eine weitere Angiographie durchgeführt, um die Blutflussumleitung durch die beiden Retia mirabilia zu überprüfen.



Abb.7: Postoperative Angiographien des Rete mirabile

A) Ausgangsbefund vor Anlage der endovaskulären Ballonokklusion der rechten A. carotis externa. Keine Füllung des kontralateralen Rete mirabile B) Unmittelbar nach der OP und Anlage des AV-Shuntes. Abbildung des Katheters in der A. pharyngealis ascendens dextra. Katheter mit Außendurchmesser von 1,7mm. C) Drei Tage nach Anlage des AV-Shuntes. Persistierende Ballonokklusion der distalen A. communis externa dextra. Deutliche Zunahme des Gefäßdurchmessers der A. pharyngealis ascendens beidseits.

2.2.2.5 Gewebeentnahme

Zehn Minischweine wurden in eine der folgenden Gruppen zugeordnet: Gruppe mit AV-Shunt für null Tage (n=vier), für drei Tage (n=drei) und für 14 Tage (n=drei). Die Schweine wurden somit entweder direkt nach dem chirurgischen Eingriff oder nach 3 bzw. 14 Tagen mit einer Überdosierung von Pentobarbital geopfert und das Rete mirabile mit rechter und linker A. pharyngealis ascendens entnommen. Anschließend wurde das arterielle Netzwerk in acht Abschnitte (von A bis H) unterteilt (Abb. 8). Daneben wurde die A. carotis externa beidseits ebenfalls in verschiedene Bereiche unterteilt (von I bis P), die nicht in die Abbildung eingezeichnet wurden. Die einzelnen Abschnitte sowohl des Rete mirabile als auch der A. carotis externa wurden für unterschiedliche Untersuchungen herangezogen:

Region A und F für die RNA-Analyse, Region B, H, J, N für die Immunhistochemie und andere Regionen für die Etablierung von Methoden.



Abb. 8: Angiographie des Rete mirabile mit der Unterteilung in acht Segmente A bis H.

2.2.3 Fixierung und Lagerung

Nach der Aufteilung des Rete mirabile in acht und der beiden Carotiden in weitere Abschnitte wurden sie in flüssigen Stickstoff getaucht, damit sie möglichst schnell gefrieren. Die Gewebeproben wurden anschließend für folgende Versuche bei -80°C im Freezer aufbewahrt.

2.2.4 Immunhistochemische Charakterisierung des arteriovenösen Shunt-Modells

2.2.4.1 Einbettung

Für die immunhistochemische Untersuchung wurden die Abschnitte B, H, J, N auf Trockeneis in Tissue Freezing Medium eingebettet. Dazu wurde ein Cryomold-Standard-Schälchen mit einer 10ml-Spritze mit Tissue Freezing Medium befüllt. Anschließend wurden die Abschnitte ins Tissue Freezing Medium überführt und für 30 Minuten auf Trockeneis gestellt. Nachdem das Tissue Freezing Medium mit dem eingebetteten Gewebestück gefroren war, konnte das Ganze vorsichtig aus der Schale gedrückt werden. Im Anschluss wurde ein Metallstempel auf Trockeneis gestellt. Tissue Freezing Medium wurde auf den Metallstempel geträufelt und für einen kurzen Moment im Trockeneis stehen gelassen. Sobald das Tissue Freezing Medium am Rand des Stempels weiß wurde, wurde vorsichtig das eingebettete Gewebestück auf den Metallstempel platziert. Zum Aushärten wurde das so platzierte Gewebestück für weitere zehn Minuten direkt auf Trockeneis belassen. Die langfristige Lagerung der so eingebetteten Gewebestücke erfolgte bei -80°C im Freezer.

2.2.4.2 Schneiden am Kryostaten

Ziel war es, die Gewebe-Kryoblöcke mit dem Kryostaten in 5µm dicke Schnitte zu schneiden. Die erfahrungsgemäß optimale Schneidetemperatur lag sowohl für die Kammer als auch für den Schneide-Streckblock des Kryostaten bei -23°C. Der Anschnitt zum entsprechenden Gewebe erfolgte über die Grobeinstellung. Hierfür wurde eine Schnittdicke von ca. 20µm gewählt und der Block bis zum Geweberand angeschnitten. Dann wurde die Schnittdicke auf 5µm reduziert. Sobald das Objekt erreicht war, wurden Folgeschnitte geschnitten. Jeder einzelne Schnitt wurde mit dem Pinsel vorsichtig vom Kryoblock auf den Schneideblock gezogen und gegebenenfalls gestreckt. Anschließend konnte der Schnitt mit einem Objektträger (OT), welcher auf Raumtemperatur (RT) belassen wurde, aufgenommen werden. Wegen des Temperaturunterschieds zwischen Objekt und OT wurde das Objekt vom OT angezogen. Bis zu drei Schnitten wurden auf einen OT aneinander gereiht. Im Anschluss wurden die Schnitte über Nacht luftgetrocknet. Dabei war zu achten, dass

keine Feuchtigkeit an die Objektträger gelangt. Die Schnitte konnten dann zum Färben herangezogen werden.

2.2.4.3 Färbemethoden

2.2.4.3.1 Proliferationsfärbung mit Ki67-Antikörper

Das Ki67-Antigen ist ein Nuklearprotein, welches durch proliferierende Zellen in allen Phasen des aktiven Zellzyklus (G₁-, S-, G₂- und M-Phase) exprimiert wird. Ruhende Zellen in der G₀-Phase dagegen exprimieren das Antigen Ki67 nicht. Der Ki67-Antikörper wird routinemäßig als Proliferationsmarker verwendet.

Die immunhistochemische Färbung wurde von Labor Habedank mitunterstützt. Die Schnitte wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) luftgetrocknet und für 10 Minuten in -20°C kaltes Aceton überführt. Sie wurden dann kurz bei RT getrocknet und für 5 Minuten in PBS gewaschen. Die Schnitte kamen in eine mit Wasser gefüllte Feuchtkammer und wurden mit einem Fettstift, der die Lösung auf dem Schnitt hält, umrandet. Dabei war zu beachten, dass die Markierung mit dem Stift einen gewissen Abstand zum Schnitt hatte, sodass die Bestandteile aus dem Stift nicht in die Schnitte hineinliefen. Es folgte eine Vorbehandlung (Pretreatment) für die AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol)-Behandlung mit 0,3% H2O2 in 70%igen Methanol, welches in PBS verdünnt wurde. Durch das Pretreatment sollte die endogene Peroxidaseaktivität blockiert werden, damit die Zellen nicht falsch positiv angefärbt werden. Diese Lösung wurde nach 30 Minuten bei RT von den Schnitten abgeklopft und die Schnitte wurden 2x2 Minuten in Aqua dest. und einmal für 2 Minuten in PBS gespült. Dann wurden unspezifische Bindungen mit 1%PBSA, 0,1% Triton-X-100, 0,05% Tween20, 5% Kaninchenserum (normal) geblockt. Nach zehnminütiger Inkubation in der Feuchtkammer wurde die Lösung von den Schnitten abgeklopft und mit einem primären monoklonalen Antikörper gegen Ki67 rabbit anti human (Klon SP6, Thermo Scientific), 1:1000 für 60 Minuten inkubiert. Danach wurden die Schnitte für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem polyvalenten sekundären Antikörper aus dem Zytochem-Kit in einer 1:200-Verdünnung für 10 Minuten. Die Schnitte wurden wieder abgeklopft und anschließend 5x2 Minuten in PBS gewaschen. Dann wurden die
Schnitte mit Streptavidin mit HRP aus dem Zytochem-Kit für 10 Minuten inkubiert und erneut 5x2 Minuten lang mit PBS gewaschen. Für jeden Schnitt wurden 70µl Lösung verwendet. Beim nächsten Schritt wurden die Schnitte mit einem bis zwei Tropfen AEC-Komplex für 15 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Sie wurden anschließend dreimal mit Aqua dest. und mit fließendem Wasser 5 Minuten gespült. Es folgte für 25 Sekunden eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin, wonach die Schnitte mit Aqua dest. dreimal kurz ausgespült und für 5 Minuten unter fließendem Wasser gebläut wurden. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Aqua tex. zur Aufbewahrung als Langzeitpräparate eingedeckelt.

2.2.4.3.2 Makrophagenfärbung mit CD163-Antikörper

Das CD163-Antigen ist ein hoch exprimiertes Makrophagen-Membranprotein, das zur sogenannten Scavenger receptor cysteine rich (SRCR) domain family gehört (Graversen et al. 2002). Es wurde beobachtet, dass Makrophagen während der späten Phase der inflammatorischen Reaktion oder während der Auflösungsphase hoch exprimert sind. (Hogger et al. 1998; Schaer et al. 2001).

Die Schnitte wurden eine Stunde lang bei Raumtemperatur (RT) luftgetrocknet, dann 10 Minuten lang in -20°C Aceton getaucht, kurz bei RT getrocknet und anschließend in PBS für 5 Minuten getaucht. Die Schnitte wurden für die weiteren Behandlungen in einer mit Wasser gefüllten Feuchtkammer überführt und mit einem Fettstift umrandet. Es folgte das Pretreatment für die AEC-Behandlung mit 0,3% H₂O₂ in 70% Methanol, welches in PBS verdünnt wurde. Dies diente dazu, die endogene Peroxidaseaktivität, die zu falsch positiven Reaktionen führen kann, zu eliminieren. Diese Lösung wurde nach 30 Minuten bei RT von den Schnitten abgeklopft und die Schnitte wurden 2x2 Minuten in Aqua dest. und einmal für 2 Minuten in PBS gespült. Dann wurden unspezifische Bindungen mit 1%PBSA, 0,1% Triton-X-100, 0,05% Tween20, 5% rabbit serum (normal) geblockt. Nach zehnminütiger Inkubation in der Feuchtkammer wurde die Lösung von den Schnitten abgeklopft und mit 1:50-verdünntem primärem Antikörper CD163, mouse anti pig (2A100/11, AbD Serotec) ausgetauscht. Nach 60-minütiger Inkubation wurden die Schnitte abgeklopft und für 5 Minuten in PBS gewaschen. Für weitere 30 Minuten folgte die Inkubation mit biotinyliertem sekundärem Antikörper, anti mouse (host donkey) in 1:2000-Verdünnung. Die Schnitte wurden anschließend wieder von der Lösung befreit und 5x2 Minuten in PBS gespült. Dann wurden die Schnitte mit dem Streptavidin mit HRP aus dem Zytochem-Kit für 10 Minuten inkubiert und erneut 5x2 Minuten lang mit PBS gewaschen. Für jeden Schnitt wurden 70µl Lösung verwendet. Beim nächsten Schritt wurden die Schnitte mit einem bis zwei Tropfen AEC-Komplex für 15 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Sie wurden anschließend dreimal mit Aqua dest. und mit fließendem Wasser 5 Minuten gespült. Es folgte für 25 Sekunden eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin, wonach die Schnitte mit Aqua dest. Als letzten Schritt erfolgte das Eindeckeln mit Aqua tex. Die Präparate konnten nun als Langzeitpräparate bei RT aufbewahrt werden.

2.2.4.4 Quantifizierung der Immunhistochemie

Die gefärbten Schnitte wurden mikroskopisch mit dem Leica Mikroskop (DM IRE2), Wetzlar mit einem 20-fachen Objektiv betrachtet und fotografiert. Die Färbung wurde analysiert, indem die Intensität der Färbung mit dem Bildverarbeitungsprogramm Image J Software (<u>http://rsb.info.nih.gov/ij/</u>) bestimmt wurde. Dabei wurden die gefärbten Zellen ins Verhältnis zur Gesamtfläche des Gewebes gesetzt.

2.2.5 RNA-Analyse

2.2.5.1 RNA-Isolierung

Die Rete-Regionen A und F wurden zur RNA-Analyse verwendet. Alle Geräte, die zur RNA-Isolierung gebraucht wurden, mussten vorher gründlich gesäubert werden. Sie wurden zuerst mit Wasser und Seife gereinigt und anschließend mit Isopropanol getrocknet. Die Geräte und die Arbeitsflächen mussten von RNAsen befreit werden. Dazu wurde RNaseZAP benutzt. Da die RNA in den Gewebestücken sehr empfindlich war, wurden die Gewebestücke auf Trockeneis gelagert und die Geräte in Stickstoff gekühlt, um die RNA bei der Bearbeitung vor einer Denaturierung durch RT zu bewahren. Das Gewebe wurde in einen Mörser, der vorher ebenfalls mit Stickstoff

gekühlt wurde, gegeben. Stickstoff wurde nachgegossen, um das Gewebe noch weiter herunter zu kühlen. Mit einem Stempel wurde das erkaltete Gewebestück zu Pulver zerkleinert. Dieses Pulver wurde möglichst schnell mit einem kalten Spatel vorsichtig in ein Kryoröhrchen, in dem sich 1ml Trizol befand, überführt. Das Gewebestück in Trizol wurde vorsichtig mit dem Polytron-Gerät homogenisiert und anschließend für 5 Minuten bei RT inkubiert. Die optimale Homogenisationszeit und -stärke war wichtig für die Isolierung von RNA aus dem Gewebe. Wenn hierbei zu lange und zu stark homogenisiert wurde, wurde die Probe zu stark erhitzt und die RNA wurde ebenfalls geschädigt. Das Polytron-Gerät wurde für die Homogenisation der nächsten Proben gereinigt und ebenfalls von RNase befreit. Die homogenisierte Lösung wurde in ein 1,5ml-Eppendorfgefäß überführt. 200µl Chloroform wurden dazugegeben und die Lösung wurde für einige Sekunden hin und her geschwenkt und bei RT für 2 bis 3 Minuten inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation von 20 Minuten bei 12000rcf und 4°C. Die hierbei entstehende obere wässrige RNA-enthaltende Phase wurde vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die untere Phase verworfen. Dabei war zu beachten, dass man mit der Pipettenspitze nicht an die untere Phase kam und diese mitpipettierte. Für die RNA-Fällung wurden 500µl Isopropanol dazugegeben und mit der Pipette durchmischt. Diese Lösung wurde für 10 Minuten bei RT inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 12000rcf und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. 1ml 75% Ethanol wurde dazugegeben, gevortext und 5 Minuten lang bei 7500rcf, 4°C zentrifugiert. Ein Pellet wurde in der Lösung sichtbar. Ethanol wurde vorsichtig abpipettiert und solange gewartet, bis der Rest des Ethanols fast vollständig abdampfte und der Pelletrand transparent wurde. Das Pellet wurde in 20µl RNA-freiem Wasser gelöst und dann bei 55°C im Thermocycler für 5 bis 10 Minuten inkubiert. Um die Proben rasch erkalten zu lassen, wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt und anschließend bei -80°C gelagert.

2.2.5.2 RNA-Bestimmung

Für die Mengen- und Qualitätsbestimmung wurden BioAnalyzer 2100 und Nano Drop verwendet. Die BioAnalyzer-Software zeigt eine elektrophoretische Darstellung der RNA aus den jeweiligen Proben. Die Software überprüft, welche Qualität die RNA besitzt und zeigt eventuelle Verunreinigungen und Degradationen an. Der Nano Drop ist ein schnelles Messverfahren der Spektrophotometrie, das auch in der Lage ist, aus hochkonzentrierten Lösungen die Quantität und Qualität der RNA zu messen.

Für die Messung mit dem BioAnalyzer wurden die notwendigen Materialien dem Agilent RNA 6000 Nano Kit entnommen. Das Kit wurde für 30 Minuten auf RT temperiert. Der RNA Ladder 6000 wurde für 2 Minuten bei 70°C mit dem PCR-Cycler denaturiert und zügig auf Eis überführt. Die Elektroden des BioAnalyzers wurden für je 1 Minute mit 400µl RNaseZAP® und DEPC-Wasser gereinigt. 500µl der RNA 6000 Nano Gel Matrix wurden in ein Spin Filter gegeben und bei 1500g für zehn Minuten zentrifugiert. Davon wurden 65µl mit 1µl des Nano Dye Concentrate versetzt und gevortext. Der RNA-Chip wurde in die Chip Priming Station gelegt und 9µl der Gel Dye Matrix in das mit G markierte Well gefüllt. Die Chip Priming Station wurde verschlossen und der Spritzeneinsatz bis zum Einrasten heruntergedrückt. Nach 30 Sekunden wurde der Druck gelöst und die Chip Priming Station geöffnet. Anschließend wurden je 9µl der Gel Dye Matrix in zwei weitere mit G markierte Wells gefüllt. Alle anderen noch verbleibenden Wells wurden mit je 5µl RNA 6000 Nano Marker befüllt. 1µl des denaturierten RNA-Ladders 6000 wurde in das mit "Ladder" markierte Well gefüllt. Anschließend wurden je 1µl der zu vermessenden Proben in die Wells eins bis zwölf pipettiert und der RNA-Chip für eine Minute am Setpoint (2400rpm) gevortext. Der RNA-Chip wurde in den BioAnalyzer 2100 gelegt und die Messung gestartet.

Mit der BioAnalyzer 2100 Software wird die RNA-Konzentration und Qualität der Proben ermittelt. Für die Beurteilung der Reinheit der RNA bezieht man die rRNA Ratio, die aus dem Quotienten der 28S RNA -und 18S RNA-Konzentration berechnet wird und die RNA Integrity Number (RIN), die ebenfalls ein Qualitätskriterium für die RNA darstellt. Für die rRNA Ratio sind Werte über 1,8 optimal. Der RIN-Wert kann eine Zahl zwischen null (völlig degradiert) und zehn (vollständig intakt) annehmen, sodass die RNA umso besserer Qualität ist, je höher der RIN-Wert ist. Bei der Vermessung der RNA mit Nano Drop wird 1µl der Probe auf das Ende der Lichtwellenleiter pipettiert. Eine zweite Lichtwellenleiter wird dann mit der flüssigen Probe in Kontakt gebracht. Eine Xenon-Blitzlampe stellt die Lichtquelle bereit und das Spektrometer analysiert das Licht, nachdem es die Probe passiert hat.

Mit dem Nano Drop wird ebenfalls die RNA-Konzentration gemessen. Die Reinheit wird anhand der Ratio aus 260/280 berechnet, die die Absorption bei 260nm durch die der 280nm darstellt. Eine Ratio bei ca. 2 wird bei der RNA als rein betrachtet.

2.2.5.3 RNA-Aufreinigung

Für die Aufreinigung der RNA wurden die notwendigen Materialien dem RNA-Cleanup-Kit von Qiagen entnommen. Das Volumen der Probe wurde zuerst mit Rnase-freiem Wasser auf 100µl aufgefüllt, 350µl Buffer RLT dazugegeben und sorgfältig gemischt. Dann wurde zur RNA 250µl 96-100%iges Ethanol dazupipettiert und durchmischt. Zügig wurde 700µl der Probe in ein 2ml Sammelgefäß, das vorher mit einer RNeasy MinElute Spin Column versehen worden war, gegeben und bei 10000rpm für 15 Sekunden zentrifugiert. Das Durchflossene wurde erneut verworfen. Der Spin Column wurde mit einem neuen 2ml Eppendorfgefäß versehen. 500µl RPE Buffer wurde in das Spin Column gegeben und bei 10000rpm für 15 Sekunden zum Waschen dieser Säule zentrifugiert. Das Durchflossene wurde verworfen. 500µl 80%Ethanol wurde in die Säule pipettiert und bei 10000rpm 2 Minuten lang zentrifugiert, um die Silicon-Gel-Membran der Säule trocknen zu lassen. Die durchflossene Flüssigkeit und das Sammelgefäß wurden verworfen. Die Säule wurde in ein neues 2ml-Sammelgefäß überführt. Bei offenem Deckel wurde die Säule in der Zentrifuge bei einer Maximalgeschwindigkeit für 5 Minuten zentrifugiert. Und das Durchflossene anschließend verworfen. Die Säule wurde in ein neues 1,5ml großes Sammelgefäß überführt, 14µl RNase-freies Wasser wurde direkt in das Zentrum der Silicon-Gel-Membran gegeben und für 1 Minute bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert, um die Probe aus der Membran zu eluieren. Die Probe wurde anschließend mit BioAnalyzer und Nano Drop erneut gemessen und auf Qualität und Quantität überprüft (Kap. 2.2.5.2).

2.2.5.4 Reverse Transkription

Nach der Bestimmung des RNA-Gehaltes und der -Qualität der Proben wurde die RNA für die Real-Time-RT-PCR durch eine Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde ein 20µl-Ansatz erstellt, der 2µl Random Primer, 2µl RT Buffer, 0,8µl dNTP Mix 100mM, 1µl Multi Scribe RTase (50U/µl) 0,25µl RNase Inhibitor (RNasin) 40U/µl, Total-RNA von 740ng/µl (F-Region) bzw. 1000ng/µl (A-Region) für jede Probe und RNase/DNase freies Wasser enthielt.

Dieser 20µl-Ansatz wurde im PCR-Cycler für 10 Minuten bei 25°C, dann für 120 Minuten bei 37°C und als letzten Schritt für 15 Minuten bei 70°C inkubiert und dabei in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wird gleich im Anschluss bei 4°C gekühlt. Für die nachfolgende Real-time-RT-PCR wurde die so erhaltene cDNA-Stammlösung mit RNase/DNase-freiem Wasser so verdünnt, dass als Endkonzentration in 1µl 0,37ng cDNA enthalten waren.

2.2.5.5 Quantitative real time PCR (qRT-PCR)

Für die RT-PCR wurden Primer (Housekeeping-Gene und die zu untersuchenden Zielgene) benötigt, deren mRNA-Sequenz für die Spezies Schwein über das NCBI, Unterbereich Core Nucleotide (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/), ermittelt wurden. Mit den so erhaltenen Seguenzen erfolgte das Designen der Primer anhand des Primer3-Programms, welches vom Whitehead Institute for Biomedical Research (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3 www.cgi) zur Verfügung gestellt wird. Die Gensequenz wurde in das Programm eingegeben und einige "primer picking"-Bedingungen als Optimum festgelegt: die Schmelztemperatur von 60 °C, eine Basenlänge des Amplifikats von 100 bis 130bp, Max-Poly-X von 3 und die Primergröße von 20. Die Gensequenz wurde an die Firma Invitrogen geschickt und dort erfolgte die Primerherstellung. Es waren die Sequenzen für TIMP-1 (tissue inhibitors of metalloproteinase-1), metalloproteinase-2), MCP-1 MMP-2 (matrix (monocyte chemoattractant protein-1). (cluster of differentiation-44), CD44 VEGFA (vasoendothelial growth factor A), SDF-1 (stromal cell-derived factor-1), Vimentin und das Housekeeping Gen RPLP0 (ribosomales Protein large P0) (Primerseguenzen Kap. 2.1.4.1).

Die qRT-PCR erfolgte mit dem Mx-3000P-Programm. Hierbei wurde in eine 96er Well-Platte ein 30µl-Ansatz pipettiert, wobei der Ansatz aus folgenden Komponenten bestand: 3,3µl 10µM-Primer forward, 3,3µl 10µM-Primer reverse, 15µl Power Sybergreen Mastermix, 3,4µl RNase/DNase freies Wasser und 5µl cDNA. Für jedes untersuchte Zielgen wurde eine NTC-Kontrolle mitgeführt, in der keine Probe enthalten war und so die Kontaminationsfreiheit des restlichen Ansatzes demonstrieren sollte. In nicht gefüllten Wells wurde 30µl RNase/DNase freies Wasser pipettiert. Die 96er Well-Platte wurde mit einer Adhäsionsfolie dicht verschlossen und bei 2000rpm und 4°C für 1 Minute zentrifugiert. Die Platte wurde in den Real Time Cycler gestellt und das Programm gestartet, welches folgende Schritte beinhaltet: Ein Zyklus bei 95°C für 10 Minuten, 40 Zyklen aus je 15 Sekunden bei 95°C, bei der die DNA-Doppelstränge aufgetrennt werden (Denaturierung), 15 Sekunden bei 60°C für die Anlagerung der Primer an die DNA-Einzelstränge (Annealing) und 30 Sekunden bei 72°C für die Verlängerung des neu zu synthetisierenden Stranges (Elongation) und ein Zyklus aus 1 Minute 50 °C und 20 Sekunden 60 °C.

Die Amplifikation einer RT-PCR teilt sich in vier Phasen auf: In der ersten Phase, der lag-Phase, verschwindet das Fluoreszenzsignal hinter das Hintergrundsignal. In der zweiten Phase, der log-Phase, ist ein exponentieller, quantifizierbarer Anstieg zu verzeichnen. Jeder Zyklus ist durch eine exakte Produktverdopplung gekennzeichnet. In der dritten Phase, der Übergangsphase, wird das Substrat langsam verbraucht und schließlich in der vierten Phase, der stationären Phase, ist keine Amplifikation mehr erkennbar. Die Messung erfolgt am Anfang der exponentiellen Phase und der Wert der jeweiligen Messung wird in Ct (cycle threshold= Zyklusschwellenwert) angegeben, der den Zyklus bezeichnet, an dem erstmalig die Fluoreszenz signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt.

Der Schwellenwert (threshold) wird so von der Software festgelegt, dass er in der exponentiellen Amplifikationsphase liegt und eine bestimmte Fluoreszenz-Signalintensität überschritten hat. Das Programm ermittelt die Anzahl der Zyklen, nach der die Probe den Schwellenwert überschritten hat. Zur Beurteilung, ob ein Gen dereguliert ist, muss der Schwellenwert weiter berechnet werden. Als erstes wird der Schwellenwert des jeweiligen Zielgens vom Schwellenwert des Housekeeping-Gens (Referenzgens) subtrahiert:

Danach wird der negative Exponent zur Basis 2 berechnet:

Der Quotient aus behandelter Gruppe (3Tage- oder 14 Tage-Gruppe) und der Kontrollgruppe gibt abschließend die relative Menge des exprimierten Zielgens im Verhältnis zur Kontrolle wieder:

$$2^{-\Delta\Delta CT=} \frac{2^{-\Delta CT(behand \ elt)}}{2^{-\Delta CT(Kontro \ lle)}}$$

2.2.6 Statistische Auswertung

Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SEM (Standard Error of the Mean) angegeben. Die quantitative RT-PCR sowie die immunhistochemischen Bilder wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen, welcher anhand des SPSS-Programms (SPSS GmbH Software, München) durchgeführt wurde. Es wurde die zweiseitige exakte Signifikanz betrachtet. Ein Ergebnis mit der Irrtumswahrscheinlichkeit p<0,05 galt als signifikant.

Zielsetzung

3. Zielsetzung

Ziel der Doktorarbeit war es, das carotide Rete mirabile des Minischweins mit dem AV-Shunt unter dem Aspekt einer möglichen Verwendung in der Arteriogeneseforschung zu untersuchen. Bei einer Eignung könnte das Modell zur Testung von pro-arteriogenen pharmakologischen Substanzen eingesetzt werden.

Das (Mini-)Schwein besitzt eine Ähnlichkeit zur Anatomie von Koronararterien und zum Kollateralwachstum des Menschen. Ebenfalls ist die Spärlichkeit an Kollateralen in beiden Organismen und auch das Gerinnungssystem, welches einen wichtigen Punkt bei der Nachahmung eines menschlichen Gefäßsystems darstellt, ähnlich. Insgesamt besitzt das Schwein eine vergleichbare genetische Information wie der Mensch (Buschmann and Schaper 2000).

Das Rete mirabile im Minischwein, welches das Versuchsobjekt war, ist ein Geflecht feinster Arterien, das aus der A. pharyngealis ascendens abzweigt und sich meist in der Mittellinie mit dem der anderen Seite vereinigt. Da die Arteriogenese eine Proliferation und ein Remodeling von präexistenten Kollateralen darstellt, ist das Rete mirabile ein sehr gut geeignetes Analyseobjekt für die Erforschung der Arteriogenese.

Das arteriovenöse Shunt-Modell im carotiden Rete mirabile wurde bisher nur für die Erforschung der arteriovenösen Fehlbildung (AVM) verwendet. Neuere Studien aber konnten zeigen, dass Shuntmodelle eine gleichbleibende Schubspannung erzeugen, die unumstritten ein essentieller Induktor des Kollateralwachtums (Arteriogenese) darstellt. Das Rete mirabile im Tiermodell Minischwein und der AV-Shunt könnten daher eine sehr gute Kombination darstellen, die Arteriogenese zu stimulieren, im Anschluss zu untersuchen und möglicherweise für pharmakologische Wirkstofftestung zu verwenden.

Die Charakterisierung des carotiden Rete mirabile des Minischweins sollte dabei auf zwei verschiedenen Ebenen untersucht werden. Auf der Proteinebene wurden mit immunhistochemischer Untersuchung die charakteristischen Schritte des Kollateralwachstums wie Proliferation und Makrophageninvasion analysiert. Auf der RNA-Ebene wurde mit quantitativer Real-Time-RT-PCR Arteriogenesemarker auf ihre Regulation hin überprüft. Wenn es sich bei diesem Modell um ein Arteriogenese-Modell handelt, würden bestimmte Marker, die in anderen Arteriogenese-Modellen dereguliert waren, ebenfalls dereguliert vorliegen.

Für diese Aufgabenstellungen standen Gewebeproben des Rete mirabile aus Gruppen unterschiedlicher Behandlungszeiten zur Verfügung, die für die Analysen aufbereitet wurden. Die Tiere waren mit ihren unterschiedlichen Behandlungszeiträumen unterschiedlich lange durch den AV-Shunt einer erhöhten Schubspannung ausgesetzt. Es sollten einerseits die Folgen des AV-Shunts im Rete mirabile untersucht und andererseits die Behandlung unterschiedlicher Zeiten (0d, 3d und 14d) untereinander verglichen werden.

Im Anschluss sollte der Versuch unternommen werden, anhand der ermittelten Daten die molekularen Mechanismen der Arteriogenese weiter aufzuklären und die Fragestellung zu beantworten, ob das AV-Shunt-Modell im Rete mirabile des Minischweins als Arteriogenese-Modell für die Erforschung der Arteriogenese geeignet ist.

Ergebnisse

4. Ergebnisse

4.1 Immunhistochemische Charakterisierung des arteriovenösen Shunt-Modells: Nachweis von Arteriogenesemarkern

Die Proliferationsrate im Gewebe wurde nach Shunt-Behandlung mit dem Proliferationsmarker Ki67-Antikörper untersucht, welches üblicherweise zur Darstellung der proliferierenden Kollateralen zur Anwendung kommt. Anschließend wurden die Makrophagen, die bei der Arteriogenese eine entscheidende Rolle spielen, ebenfalls histologisch mit CD163 dargestellt. Um sicher aussagen zu können, dass der Makrophagen-Influx nicht aus dem Eingriff der Operation selbst resultiert, wurden neben der B-Region, die für die Verwendung in der Immunhistologie vorgesehen war, noch eine weitere Region H, die auch im Rete mirabile liegt, Region J, die direkt im AV-Shunt-Bereich liegt, und Region N, die sich auf der gegenüberliegenden Seite vom AV-Shunt befindet, auf Makrophagen untersucht.

Region H lag weiter lateral als Region B im Rete mirabile, sodass bei der Färbung auf einen Unterschied zwischen Region B und H in der Makrophagenfärbung geachtet wurde. Würde die Färbung der Makrophagen in der Region des AV-Shunts, Region J stärker ausfallen als auf der gegenüberliegenden Seite ohne Shunt, Region N, würde nicht ausgeschlossen werden können, dass der Makrophageninflux aus einer Inflammation, welche auf die OP zurückzuführen wäre, resultiert ist. Würde die Makrophagenfärbung auf der AV-Shunt-Seite schwächer ausfallen als auf der gegenüberliegenden Seite, ist eine Inflammation durch den Eingriff selbst unwahrscheinlich.

Zu jeder Färbung wurde eine Positiv- und Negativkontrolle mitgezogen. Es wurden Bilder unterschiedlicher Gefäßregionen verschiedener Gefäße (von jedem histologischen Schnitt) angefertigt und ausgewertet. Insgesamt wurden zwanzig Bilder zu jedem Tier mit dem Bildverarbeitungsprogramm Image J Software ausgewertet. Die Hintergrundflächen, die keine Gefäßstrukturen enthielten, wurden bei der Auswertung mit dem Programm außer Acht gelassen, damit keine zusätzlichen Flächen mitberechnet werden, die keine Gefäßstrukturen darstellen. Die gefärbten Zellen in den Gefäßen wurden ins Verhältnis zur Gesamtfläche der Gefäße gesetzt und jeweils eine Ratio gebildet. Zu jedem Bild ergab sich eine Ratio, aus denen ein Mittelwert und aus allen Mittelwerten einer Behandlungsgruppe ebenfalls ein Gesamtmittelwert gebildet wurde. Aus diesem wurden die Standardabweichung und der Standardfehler berechnet und als Grafik dargestellt (Abb.10 und Abb.12).



Ki67: Sham: 15MP18B20.7

3d: 09MP22B20.2



Abb.9: Immunhistochemische Darstellungen der proliferierenden Zellen der Region B verschiedener Behandlungszeiten mit dem Ki67-Antikörper. Aufnahme mit 20er Objektiv.

Die Proliferationsfärbung mit dem Ki67-Antikörper ergab für die 0-Tage-Gruppe eine Ratio von $2,0 \pm 0,3 \times 10^{-3}$ zwischen gefärbter Fläche und Gesamtfläche, bei der 3-Tage-Gruppe war die gefärbte Fläche ca. auf das 1,5-fache, $3,3 \pm 0,4 \times 10^{-3}$ angestiegen (p=0,143). Bei der 14-Tage-Gruppe ging die Färbung fast auf den Ausgangszustand zurück und lag bei $2,3 \pm 0,3 \times 10^{-3}$ (p=0,629) (Abb. 10).



Abb.10: Graphische Darstellung der Immunhistochemie von den proliferierenden Zellen der Region B gefärbt mit dem Ki67-Antikörper. Kontrolle (n=4), 3d (n=3) und 14d (n=3).

Die Behandlung mit dem Shunt bewirkte eine verstärkte Einwanderung der Makrophagen ins Gewebe. Dies ließ sich anhand der Makrophagenfärbung ermitteln.



Abb. 11: Immunhistochemische Darstellungen von Makrophagen der Region B verschiedener Behandlungszeiten mit dem Antikörper CD163. Aufnahme mit 20er Objektiv.

So konnte bei der 0-Tage-Gruppe eine Ratio von $1,9 \pm 0,2 \times 10^{-4}$ berechnet werden, welcher sich nach drei Tagen Shuntbehandlung ca. auf das 6-fache $(11,9 \pm 1,9 \times 10^{-4})$ (p= 0,057) erhöhte, um dann nach 14 Tagen exakt auf die Ausgangslage zurückzukehren $(1,9 \pm 0,6 \times 10^{-4})$ (p= 0,714) (Abb.12).



Abb. 11:Graphische Darstellung der Immunhistochemie von Makrophagen der Region B gefärbt mit dem CD163-Antikörper. Kontrolle (n=4), 3d (n=3) und 14d (n=3).

Bei der Untersuchung verschiedener Regionen auf Makrophagen resultierte folgendes Bild. Die B-Region ergab einen Wert von $11,9\pm3,4\times10^{-4}$, für die H-Region, die sich ebenfalls im Rete mirabile befand, $12,8\pm3\times10^{-4}$, für die J-Region, die auf der Seite des Shunts lag $4,9\pm3,8\times10^{-4}$ und für die gegenüberliegende Seite vom Shunt, Region- N, einen Wert von $9,0\pm1,6\times10^{-4}$ (Abb.14). Der p-Wert zwischen Region B und H beträgt 1, zwischen Region J und N 0,4, zwischen B und J 0,7 und zwischen B und N 0,2.



CD163: Region H: 14MP23H20.5

Region J: 03MP22J20.4

Region N: 04MP23N20.4

Abb.13: Immunhistochemische Darstellung von Makrophagen der 3d-Gruppe verschiedener Regionen. Aufnahme mit 20er Objektiv.



Abb.14: Graphische Darstellung der Immunhistochemie von Makrophagen in Shunt-und Reteregionen der 3d-Gruppe (n=3) gefärbt mit CD163- Antikörper.

Ergebnisse

4.2 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung aus Gewebe wurde zuerst etabliert und optimiert. Es wurde darauf geachtet, wie die nächsten Schritte bei der Isolierung der endgültigen Proben vorbereitet sein sollten, damit die Zeiten zwischen den einzelnen Schritten möglichst kurz gehalten werden konnten. Die Proben einer Behandlungszeit mussten für eine bessere Vergleichbarkeit untereinander gleichzeitig isoliert werden. Zwei Methoden der RNA-Isolierung, Isolierung mit RNeasy Mini Kit von Qiagen und Trizol-Methode, wurden bei Übungsproben angewandt und miteinander verglichen. Die Trizol-Methode zeigte nach der Isolierung eine höhere RNA-Quantität mit viel besserer Qualität. Daher wurde die Trizol-Methode für die Isolierung der zu analysierenden Proben gewählt. Die isolierte RNA aus den Proben wurde anschließend mit BioAnalyzer und Nano Drop gemessen.

4.3 RNA-Bestimmung und Qualitätserfassung mit BioAnalyzer

Die isolierte F-Region wurde gemessen (Kap. 2.2.5.2). Zwei Kontrolltiere, MP16F und MP18F, enthielten kaum RNA, sodass die Proben aus der Betrachtung herausgenommen werden mussten. Die rRNA Ratio [28s/18s] lag bei fast allen anderen Proben über 1,8. MP23 hatte als rRNA Ratio 0,0, wurde aber zur weiteren Analyse herangezogen, da die RIN fast bei einem maximalen Wert von 9,8 lag und deutlich zwei Peaks für 18S und 28S aufwies, die nur vom Programm nicht als 18s und 28s detektiert und ausgewertet wurden. MP 12 zeigte eine rRNA Ratio von 1,2, wurde ebenfalls weiter bearbeitet, da der RIN-Wert einen akzeptablen Bereich von 8,4 vorwies.

Da MP16F und MP18F durch geringe Quantität an RNA aus der Analyse heraus fielen, wurde für die RNA-Analyse die F-Region durch eine andere Region, A-Region ersetzt. Hierfür wurde die RNA nicht nur von MP16A und MP18A, sondern die RNA aller Proben der A-Region für eine bessere Vergleichbarkeit mit der F-Region mit der Trizol-Methode isoliert und anschließend mit BioAnalyzer und Nano Drop gemessen. Für die Beurteilung der Qualität ist der BioAnalyzer und der Quantität der Nano Drop besser geeignet.

Die Probe 12A zeigte eine Verunreinigung in der BioAnalyzer-Messung. Die folgende Überlegung war, ob eine Aufreinigung wie mit RNA-Clean-up-Kit (Qiagen) sinnvoll wäre.

Ergebnisse

Durch die Aufreinigung wird die Probe zwar von den verunreinigenden Materialien befreit, aber gleichzeitig geht auch ein großer Teil der RNA verloren, der vorher nicht abschätzbar ist. Es wurde dennoch entschieden, die Probe aufzureinigen, um eine Fälschung der Ergebnisse durch eine Verunreinigung zu vermeiden. Nach der Aufreinigung von 12A wurden noch einmal alle Proben im BioAnalyzer und Nano Drop gemessen, da nur Proben einer gemeinsamen Messung miteinander verglichen werden können. Die Probe MP12A zeigte ein gutes Aufreinigungsergebnis mit einer rRNA Ratio von 1,8 und einem RIN von 8,1. Die verbliebene RNA-Konzentration nach Nano Drop mit 196,85 ng/µl war ebenfalls ein erfreuliches Ergebnis. Es folgte eine First-Strand cDNA-Synthese aller Proben der F- und A-Region mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit für einen 20µl Ansatz.

Um entscheiden zu können, ob und wie die A-Region die fehlenden Kontrolltiere der F-Region ersetzen können, wurden die synthetisierte cDNA beider Regionen mit dem Housekeeping Gen RPLP0 untersucht. RPLP0 war zu diesem Zeitpunkt bereits als Housekeeping-Gen etabliert. Alle Proben der neuen Region und der ursprünglichen Region wurden mit dem Housekeeping-Gen getestet und miteinander verglichen. Dann wurden alle gewählten Zielgene mit allen Kontrollproben (14F, 17F, 14A, 16A, 17A und 18A) untersucht. Die Ct-Werte aller sechs Kontrollproben lagen in einem ähnlichen Bereich, sodass die fehlenden Tiere der F-Region mit den analogen der A-Region ersetzt wurden, sodass die endgültige Auswahl für die Kontrollgruppe lautete: 14F, 17F, 16A und 18A. Die Proben der 3d- und 14d-Gruppen der F-Region zeigten in Qualität und Quantität keine Mängel, sodass sie alle in die Analyse einbezogen wurden. Die Auswahl für diese Gruppen war: 20F, 22F, 23F, 10F, 11F und 12F (Tab. 6). Tabelle 7zeigt den ermittelten RNA-Gehalt des F-Abschnittes aller Reteproben und zweierKontrollproben der A-Region. In dieser Tabelle ist außerdem die jeweilige RNA-Qualität durch die Ratiovon 28s RNA zu 18s RNA und die RIN angegeben.

Shuntbehandlung	Probe	c [ng/µl]	rRNA Ratio [28s/18s]	RNA Integrity Number (RIN)
0 Tage	MP 14F	148	1,9	8,9
	MP16A	400	1,1	7,4
	MP 17F	74	2,7	8,1
	MP18A	587	1,1	6,9
3 Tage	MP 20F	756	2,4	9,1
	MP 22F	345	2,0	9,1
	MP 23F	78	0	9,8
14 Tage	MP 10F	477	2,1	8,1
	MP 11F	376	1,8	8
	MP 12F	110	1,2	8,4

4.4 Primer-Testung

Nachdem die Zielgene ausgesucht worden waren, wurden für diese mehrere Primersequenzen hergestellt und ausgetestet, um die am besten passende Primersequenz zu identifizieren. Hierfür wurde zuerst ein Genpool aus allen zu untersuchenden Proben hergestellt und dann eine Verdünnungsreihe dieses Genpools mit den Primern untersucht. Das Genpool wurde 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 verdünnt. Ein optimal synthetisierter Primer zeigt bei jedem Verdünnungsschritt aus der Ausgangslage einen Ct-Anstieg um 1 bei der qRT-PCR und in der Dissoziationskurve ein PCR-Produkt. Ein Primer mit den genannten Voraussetzungen wurde für die Analyse ausgewählt.

Mit der Verdünnungsreihe sollte außerdem die beste Verdünnung der Probe bestimmt werden. Der Anstieg um einen Ct-Wert war bei einer Verdünnung zwischen 1:100 und 1:200 am genauesten. Es wurde entschieden, eine Verdünnung von 1:100 für die Analyse zu nehmen.

Ergebnisse

Es gibt einige bekannte Housekeeping-Gene, die häufig gebraucht werden. Da alle Werte auf dieses Gen bezogen und berechnet werden, ist die Auswahl eines geeigneten Housekeeping-Gens umso wichtiger.

Standard-Housekeeping-Gene Einiae wie 18s, β-actin, HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase), GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehyrogenase) und RPLP0 (ribosomales Protein large P0) wurden wie oben beschrieben vorab mit den Proben getestet, um den besten Kandidaten als Referenzgen zu identifizieren. Bei der Auswahl wurden bestimmte Kriterien herangezogen. Der Ct-Wert musste in einem Bereich liegen, in dem auch die Ct-Werte der Zielgene lagen. Weiterhin sollte das Housekeeping-Gen möglichst keiner Regulation durch die Proben unterworfen sein. Hierfür wurde jedes Housekeeping-Gen mit der RNA aller Proben einzeln als Triplikat getestet und der Mittelwert der drei gebildet. Die Mittelwerte aller Proben mit jedem Housekeeping-Gen wurden herangezogen, um den Kandidaten mit der kleinsten Varianz unter den Proben der unterschiedlichen Behandlungsgruppen herauszufinden. Die Analyse zeigte, dass 18s von den untersuchten Referenzgenen die kleinste Varianz von 0,98 Ct aufwies. Aber die Ct-Werte von 18s lagen in einem Bereich zwischen 9,57 und 10,55, wovon man wusste, dass diese weit von den Ct-Werten der Zielgene lagen, sodass 18s aus der Auswahl heraus fiel. Denn die Primer der Zielgene wurden vorab auf ihre Funktion getestet und alle zeigten Ct-Werte zwischen 20 und 33,4.

β-actin zeigte eine Varianz von 2,02 zwischen den Proben, HPRT eine Varianz von 4,2, GAPDH 1,51 und RPLP0 1,39. RPLP0 zeigte die kleinste Varianz. Es ist bekannt, dass RPLP0 ein stabiles Housekeeping-Gen ist. Vor der Auswahl von RPLP0 als Housekeeping-Gen stellte sich die Frage, ob RPLP0 häufig als Housekeeping-Gen zum Einsatz kommt. GAPDH ist als ein weit verbreitetes Referenzgen bekannt, sodass in vielen Studien dieses Gen ohne zu testen verwendet wird. Es wird aber vermutet, dass GAPDH reguliert ist und daher nicht als Referenzgen geeignet ist. Deshalb wurde entschieden, RPLP0, das zwar weniger Verwendung findet als GAPDH, aber eine kleinere Varianz aufweist und in Studien als stabiles Referenzgen beschrieben ist (Stern-Straeter et al. 2009), als endogene Kontrolle für die RNA-Analysen zu nehmen.

54

Ergebnisse

4.5 ΔΔCτ-Auswertung der untersuchten Zielgene

Mithilfe der Formeln (1), (2) und (3) aus dem Methodenteil (Kap. 2.2.5) ließen sich die $\Delta\Delta$ CT-Werte ermitteln. Die Kontrollgruppe wurde gleich 1 gesetzt und als Bezugspunkt genommen. Die Gene der Kontrolltiere befanden sich in einem nicht regulierten Zustand, bevor eine erhöhte Scherkraft auf die Gefäße Veränderungen in der Genexpression hervorrief. Ein durch diese Formeln berechneter Wert zwischen 0,5 und 2 bedeutet, dass ein Gen keiner Regulation unterworfen ist. Liegt der $\Delta\Delta$ CT-Wert über 2, entspricht es einer Hochregulierung, liegt der Wert unter 0,5, ist das Gen runterreguliert. Mit der qRT-PCR-Methode wurden TIMP-1, MMP-2, MCP-1, CD44, VEGFA, SDF-1, Vimentin und das Housekeeping-Gen RPLP0 untersucht und die Genregulation mittels der $\Delta\Delta$ CT-Methode berechnet.

TIMP-1 war in beiden Behandlungszeiten hochreguliert, wobei die Hochregulation nach drei Tagen höher war als nach 14 Tagen. Nach drei Tagen zeigte TIMP-1 eine 7-fache (p=0,057) und nach 14 Tagen 4-fache (p=0,057) Erhöhung (Abb. 16). MMP-2 zeigte eine Herunterregulierung um das 0,4-fache (p=0,514) nach drei Tagen Behandlungszeit, nach 14 Tagen nahm die Deregulation ab und war nicht mehr reguliert (p=0,629) (Abb. 18). MCP-1 war nach drei Tagen stark um 6,4-fach (p=0,057) heraufreguliert und nach 14 Tagen war keine Deregulation mehr zu beobachten (p=0,629) (Abb.20). CD44 war in beiden Behandlungszeiten heraufreguliert, wobei die Regulation nach 14 Tagen stärker, 5,2-fach (p=0,086), ausfiel als nach drei Tagen (Abb.22). Ein Wert von CD44 der Drei-Tage-Gruppe fiel aus der Reihe. Dieses Ergebnis wurde durch einen Wiederholungstest bestätigt. Wurde dieser Wert dennoch in die Wertung miteinbezogen, war das Gen nach drei Tagen nicht reguliert. Wurde es nicht miteinbezogen, war es nach drei Tagen hochreguliert. In diesem Fall war die Bildung des Mittelwertes nicht sinnvoll. VEGFA zeigte keine signifikante Deregulation in allen Behandlungszeiten (p=0,429 (3d); p=0,057 (14d)) (Abb. 24). SDF-1 war nur in der Drei-Tage-Gruppe um 0,4-fach (p=0,143) herunterreguliert (Abb.25). Vimentin wies in beiden Behandlungsmodi eine Herunterregulierung, und zwar nach drei Tagen um das 0,2- (p=0,057) und nach 14 Tagen um 0,3-fache (p=0,057) (Abb. 27).

Auf Abbildungen 15 bis 27 ist die Regulation der einzelnen Gene abgebildet. Es werden die Mittelwerte jedes einzelnen Tieres gesondert dargestellt und auch Mittelwerte der zu einer Behandlungsgruppe gehörenden Werte als Gruppenmittelwerte gebildet. In einigen Fällen fiel ein Wert eines Tieres aus der zu ersichtlichen Tendenz heraus und die Bildung von Mittelwerten veränderten die tatsächlichen Werte stark, sodass die separate Darstellung der einzelnen Proben noch einmal die einzelnen Daten besser veranschaulicht.



Abb. 15: Expression von TIMP-1 bezogen auf das Housekeeping Gen RPLP0. Werte aller Proben wurden einzeln dargestellt: Kontrollen (MP14F, MP16A, MP17F, MP18A), 3d (MP20F, MP22F, MP23F), 14d (MP10F, MP11F, MP12F). Werte unter 0,5 bzw. über 2 bedeuten eine Runterregulierung bzw. Hochregulierung.



Abb. 16: Expression von TIMP-1 bezogen auf das Housekeeping Gen RPLP0. Die zu einer Gruppe gehörenden Werte wurden als Gruppenmittelwerte dargestellt: Kontrolle (n=4), 3d (n=3) und 14d (n=3). Werte unter 0,5 bzw. über 2 bedeuten eine Runterregulierung bzw. Hochregulierung. Bei der statistischen Auswertung ist der Standardfehler angegeben.



Abb. 17: Expression von MMP-2 bezogen auf das Housekeeping Gen RPLP0. Werte aller Proben wurden einzeln dargestellt: Kontrollen (MP14F, MP16A, MP17F, MP18A), 3d (MP20F, MP22F, MP23F), 14d (MP10F, MP11F, MP12F). Werte unter 0,5 bzw. über 2 bedeuten eine Runterregulierung bzw. Hochregulierung.



Abb. 18: Expression von MMP-2 bezogen auf das Housekeeping Gen RPLP0. Die zu einer Gruppe gehörenden Werte wurden als Gruppenmittelwerte dargestellt: Kontrolle (n=4), 3d (n=3) und 14d (n=3). Werte unter 0,5 bzw. über 2 bedeuten eine Runterregulierung bzw. Hochregulierung. Bei der statistischen Auswertung ist der Standardfehler angegeben.



Abb. 19: Expression von MCP-1 bezogen auf das Housekeeping Gen RPLP0. Werte aller Proben wurden einzeln dargestellt: Kontrollen (MP14F, MP16A, MP17F, MP18A), 3d (MP20F, MP22F, MP23F), 14d (MP10F, MP11F, MP12F). Werte unter 0,5 bzw. über 2 bedeuten eine Runterregulierung bzw. Hochregulierung.



Abb.20: Expression von MCP-1 bezogen auf das Housekeeping Gen RPLP0. Die zu einer Gruppe gehörenden Werte wurden als Gruppenmittelwerte dargestellt: Kontrolle (n=4), 3d (n=3) und 14d (n=3). Werte unter 0,5 bzw. über 2 bedeuten eine Runterregulierung bzw. Hochregulierung. Bei der statistischen Auswertung ist der Standardfehler angegeben.



Abb.21: Expression von CD44 bezogen auf das Housekeeping Gen RPLP0. Werte aller Proben wurden einzeln dargestellt: Kontrollen (MP14F, MP16A, MP17F, MP18A), 3d (MP20F, MP22F, MP23F), 14d (MP10F, MP11F, MP12F). Werte unter 0,5 bzw. über 2 bedeuten eine Runterregulierung bzw. Hochregulierung.



Abb.22: Expression von CD44 bezogen auf das Housekeeping Gen RPLP0. Die zu einer Gruppe gehörenden Werte wurden als Gruppenmittelwerte dargestellt: Kontrolle (n=4), 3d (n=3) und 14d (n=3). Werte unter 0,5 bzw. über 2 bedeuten eine Runterregulierung bzw. Hochregulierung. Bei der statistischen Auswertung ist der Standardfehler angegeben.



Abb.23: Expression von VEGFA bezogen auf das Housekeeping Gen RPLP0. Werte aller Proben wurden einzeln dargestellt: Kontrollen (MP14F, MP16A, MP17F, MP18A), 3d (MP20F, MP22F, MP23F), 14d (MP10F, MP11F, MP12F). Werte unter 0,5 bzw. über 2 bedeuten eine Runterregulierung bzw. Hochregulierung.



Abb.24: Expression von VEGFA bezogen auf das Housekeeping Gen RPLP0. Die zu einer Gruppe gehörenden Werte wurden als Gruppenmittelwerte dargestellt: Kontrolle (n=4), 3d (n=3) und 14d (n=3). Werte unter 0,5 bzw. über 2 bedeuten eine Runterregulierung bzw. Hochregulierung. Bei der statistischen Auswertung ist der Standardfehler angegeben.



Abb.24: Expression von SDF-1 bezogen auf das Housekeeping Gen RPLP0. Werte aller Proben wurden einzeln dargestellt: Kontrollen (MP14F, MP16A, MP17F, MP18A), 3d (MP20F, MP22F, MP23F), 14d (MP10F, MP11F, MP12F). Werte unter 0,5 bzw. über 2 bedeuten eine Runterregulierung bzw. Hochregulierung.



Abb.25: Expression von SDF-1 bezogen auf das Housekeeping Gen RPLP0. Die zu einer Gruppe gehörenden Werte wurden als Gruppenmittelwerte dagestellt: Kontrolle (n=4), 3d (n=3) und 14d (n=3). Werte unter 0,5 bzw. über 2 bedeuten eine Runterregulierung bzw. Hochregulierung. Bei der statistischen Auswertung ist der Standardfehler angegeben.



Abb. 26: Expression von Vimentin bezogen auf das Housekeeping Gen RPLP0. Werte aller Proben wurden einzeln dargestellt: Kontrollen (MP14F, MP16A, MP17F, MP18A), 3d (MP20F, MP22F, MP23F), 14d (MP10F, MP11F, MP12F). Werte unter 0,5 bzw. über 2 bedeuten eine Runterregulierung bzw. Hochregulierung.



Abb. 27: Expression von Vimentin bezogen auf das Housekeeping Gen RPLP0. Die zu einer Gruppe gehörenden Werte wurden als Gruppenmittelwerte dargestellt: Kontrolle (n=4), 3d (n=3) und 14d (n=3). Werte unter 0,5 bzw. über 2 bedeuten eine Runterregulierung bzw. Hochregulierung. Bei der statistischen Auswertung ist der Standardfehler angegeben.

Auch die A-Region wurde für die RNA-Analyse miteinbezogen. Die A-Region lag weiter lateral im Rete mirabile als die F-Region. Die Überlegung war, dass die Regulation in einer lateralen Gegend des Rete mirabile geringer ausgeprägt sein könnte als in medialer Gegend, da die Schubspannung dort geringer war. Hier war TIMP-1 ebenfalls hochreguliert, wobei die Regulation weniger ausgeprägt war als in der F-Region. Nach drei Tagen war TIMP-1 4,4-fach und nach 14 Tagen 2,6-fach erhöht. MMP-2 zeigte nach drei Tagen keine Deregulation, anders als in der F-Region. Nach 14 Tagen war das Gen je nachdem, ob der Ausreißer miteinbezogen wurde oder nicht, nicht reguliert oder hochreguliert (3-fach). MCP-1 war nach drei Tagen weniger stark hochreguliert (3,6-fach) und nach 14 Tagen war das Gen, je nachdem, ob der Ausreißer miteinbezogen wurde oder nicht wie in der F-Region nicht reguliert oder runterreguliert (0,4-fach). CD44 war in beiden Behandlungen hochreguliert (3d: 4,7-fach; 14d: 4-fach), wobei diese weniger stark war als in der F-Region. VEGFA war anders als in der F-Region nach drei Tagen herunterreguliert (0,4-fach) und wies nach 14 Tagen keine Deregulation mehr auf. Die Regulationsrichtung für SDF-1 und Vimentin blieben gleich, nur waren die Gene in beiden Behandlungszeiten weniger dereguliert als in der F-Region: SDF-1 war nach drei Tagen 0,42-fach und nach 14 Tagen 1,01-fach und Vimentin nach drei Tagen 0,4-fach und nach 14 Tagen 0,4-fach reguliert. Insgesamt lässt sich aussagen, dass die Gene in der A-Region weniger starken Regulationen unterworfen waren als es in der F-Region der Fall war (Tab. 7).

Zielgen	Regulation (F-Region)		Regulation (A-Region)	
	3d	14d	3d	14d
TIMP-1	6,99	4,17	4,38	2,66
MMP-2	0,42	1,27	0,51	1,41
MCP-1	6,41	0,85	3,58	0,86
CD44	1,85	5,2	2,97	4
VEGFA	0,68	0,55	0,43	0,89
SDF-1	0,38	0,86	0,42	1,01
Vimentin	0,24	0,31	0,42	0,39

Tabelle 8: Zusammenfassung der $\Delta\Delta$ CT-Auswertung auf F- und A-Regionen. Darstellung des relativen Regulationsfaktors bezogen auf die Kontrolle als das x-fache zur Kontrolle

5. Diskussion

Ziel der Doktorarbeit war es, das carotide Rete mirabile des Minischweins mit dem AV-Shunt unter dem Aspekt einer möglichen Verwendung in der Arteriogeneseforschung zu untersuchen.

Der Großteil an experimentellen Daten über die Arteriogenese basiert auf Modellen in Kleintieren wie Mäusen, Ratten und Kaninchen. Kleintiermodelle sind wegen ihrer Verfügbarkeit an knock-out-Tieren, fortgeschrittener genetischer Information, geringeren Anschaffungs- und Erhaltungskosten und geringerem Verbrauch an der zu verabreichenden Substanz für die Forschung unverzichtbar. Wenn jedoch die durch Kleintierversuche ermittelten Daten auf den menschlichen Organismus übertragen werden sollen, entstehen große Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen der Kleintiere und menschlichen Organismen und die Nutzbarkeit der Ergebnisse bei der Übertragung auf den Menschen ist sehr begrenzt. Ein Beispiel ist die Zellteilung: Kleintiere benötigen aufgrund ihrer Größe viel weniger Zellteilungen, um z.B. ein funktionsfähiges Gefäß auszubilden (Hughes et al. 2003).

Trotz der positiven Aspekte der Kleintiermodelle erfüllt das Schwein als ein Großtiermodell viel besser die gewünschten Voraussetzungen bei der Übertragung der Studienergebnisse auf den Menschen, insbesondere durch die Ähnlichkeit des Kollateralwachstums, der Gefäßanatomie und Genetik als ein Kleintiermodell. Das Minischwein ist dabei noch mehr geeignet, da es mit seinem geringeren Gewicht näher am Menschen liegt als ein Zuchtschwein. Für die Testung von Substanzen für klinische Studien ist es zwingend notwendig, ihre Wirksamkeit in einem Lebewesen zu testen, deren Größe, Gewicht und Metabolismus vergleichbar dem des Menschen ist (Hoefer et al. 2006). Positive Ergebnisse durch die Gabe von arteriogenen Substanzen in Kleintieren ergeben nicht automatisch auch einen positiven Effekt im Menschen. Es können nämlich positive Ergebnisse in Kleintierstudien durch die Gabe von arteriogenen Substanzen erzielt werden, die bei Gabe in den Menschen keinen positiven Effekt hervorrufen. Das Minischwein als Tiermodell repräsentiert die Situation im menschlichen Patienten am besten und erlaubt als Tiermodell am ehesten

Prognosen auf die Wirksamkeit im Menschen zu stellen (Buschmann and Schaper 2000).

Zweitens ist das AV-Shunt-Modell durch die Aufrechterhaltung der Schubspannung, die notwendig für das Kollateralwachstum ist und durch das stärkere Hervorrufen des Kollateralwachstums als jede bis hierhin getestete arteriogene Substanz, insgesamt ein sehr geeignetes Großtiermodell, um für die Erforschung der Arteriogenese einzusetzen.

Um diese Behauptung zu überprüfen, wurden drei Behandlungsgruppen, die unterschiedlich lang der chronischen Schubspannung ausgesetzt waren, miteinander verglichen. Es ist die Kontrollgruppe mit 0 Tage, Drei-Tage-Gruppe mit drei Tagen und 14-Tage-Gruppe mit 14 Tagen Shunt-Behandlung. Hierfür wurde in diesem Modell nach arteriogenenen Markern und nach anderen, bei denen noch über die Rolle in der Arteriogense diskutiert werden, analysiert. TIMP-1, MMP-2, MCP-1, CD44 und Vimentin wurden im Prozess der Arteriogenese gefunden. Bei SDF-1 und VEGF ist es noch umstritten, ob sie einen Einfluss auf die Arteriogenese ausüben. Daher wurde mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit die vorherrschende Datenlage weiter diskutiert. Die Charakterisierung des AV-Shunt-Modells erfolgte anhand Immunhistochemie und RNA-Analyse.

5.1 Immunhistochemische Analyse

5.1.1 Darstellung der Proliferation

Ki67 ist ein spezieller Marker für proliferierende Zellen. Proliferation ist ein wichtiger Teilschritt der Arteriogenese und in dieser Phase findet eine maximale mitotische Aktivität statt (Scholz et al. 2000). Nur wachsende Kollateralen werden mit Ki67-Antikörper gefärbt, während ruhende Anastomosen der nicht okkludierten Seite nicht damit angefärbt werden (Grundmann et al. 2007). Daher wurde auch in dieser Studie die Ki67-Antikörper-Färbung durchgeführt, um die Rate der Proliferation zu bestimmen.

Die Fläche der mit Ki67 positiv gefärbten Zellen wurde ins Verhältnis zur Gesamtfläche der Gefäßstrukturen gesetzt und damit der Proliferationsindex bestimmt (Kap. 2.2.4.5). Es resultierte eine Veränderung während der Beobachtungszeiträume. Die höchste proliferative Aktivität lag am Tag drei (Abb. 10). Die Proliferationsphase, die nach einer

Okklusion einsetzt, ist geprägt von einer mitotischen Aktivität in den Endothelzellen (ECs), glatten Muskelzellen (SMCs) und Fibroblasten (Scholz et al. 2000). Die Mitose in der Proliferationsphase, die in der vorliegenden Studie am dritten Tag ein Maximum aufwies, bereitet das Gefäß auf die Remodelingsphase und das Wachstum vor. Die mitotische Aktivität ist notwendig, da das Lumen der Kollateralgefäße während des Remodelings um das fünf- bis achtfache ansteigt und ein Viertel des Durchmessers der versorgenden Hauptarterie erlangt (Scholz et al. 2000).

Beim Vergleich der Proliferationsfärbung der vorliegenden Arbeit mit anderen Studien wurden Parallelen beobachtet. Durch Okklusion der A. femoralis in einem Kaninchen-Hinterlaufmodell konnte nach 24 Stunden die erste positive Ki67-Reaktion beobachtet werden. Einen Höhepunkt erreichte diese Reaktion ebenfalls nach drei Tagen und verzeichnete einen Rückgang am siebenten Tag (Scholz et al. 2000). In einer weiteren Studie, in der mit einem Shunt zwischen der A. und V. femoralis im Schwein experimentiert wurde, ergab sich eine zweifache Erhöhung der Ki67-positiven Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Pipp et al. 2004).

5.1.2 Darstellung der Makrophagen

ED2 ist ein weit verbreiterter Antikörper für Gewebsmakrophagen in Ratten. Die Gruppe von Fabriek et al. fand heraus, dass ED2 in Ratten ortholog zu CD163 ist (Fabriek et al. 2009). CD163 wurde als ein endozytischer Rezeptor für Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex identifiziert (Kristiansen et al. 2001). CD163 der Ratten ist auf ausgereiften Gewebsmakrophagen exprimiert und fehlt auf Monozyten und Alveolarmakrophagen (Polfliet et al. 2006). In der Expression aber gibt es beträchtliche Unterschiede zwischen Ratten und Menschen. Während bei der Ratte CD163 auf Monozyten und Alveolarmakrophagen fehlt, ist im Menschen CD163 auf diesen Zellen vorzufinden (Zwadlo et al. 1987; Buechler et al. 2000). Insgesamt ist nur wenig über die Expression und Funktion von CD163 in den verschiedenen Spezies bekannt (Polfliet et al. 2006). Es lässt sich vermuten, dass mehr Analogien zwischen Mensch und Schwein bestehen, das in der vorliegenden Arbeit als Modell zur Analyse herangezogen wurde als zwischen Ratte und Schwein. So wird der CD163/ED2 Antikörper zur Darstellung der Makrophagen verwendet.

Nach dem Verschluss einer Arterie und der Aktivierung der Endothelzellen wird die Expression der Adhäsionsmoleküle hochreguliert, welches das erste Zeichen für positives Remodeling in präexistenten Arteriolen nach der Okklusion darstellt. Zirkulierende Monozyten im Blut adhärieren daraufhin an das aktivierte Endothel, transmigrieren durch die Gefäßwand, akkumulieren und reifen zu Makrophagen heran. Diese produzieren eine Mehrzahl von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Proteasen wie MCP-1, bFGF, TNF-alpha und MMPs (Arras et al. 1998; Hoefer et al. 2002).

Zytokine wie bFGF und TNF-α stellen eine inflammatorische Umgebung der Anastomosen her, welche neben dem FSS einen wichtigen Antrieb der Arteriogenese darstellt (Burger et al. 1982; Bergmann et al. 2006). An diesem Punkt haben die Monozyten die Rolle der Protagonisten in der Arteriogenese eingenommen (van Oostrom et al. 2008). Der Prozess des Remodelings der arteriellen Wand wird durch Proteasen, die von Makrophagen freigesetzt werden, initiiert und bald darauf folgt die Mitose der Endothelzellen und glatten Muskelzellen (Schaper and Schaper 1993). Diese Enzyme verdauen das umgebende Gewebe wie die Lamina elastica interna und die extrazelluläre Matrix und verschaffen so den Monozyten die Möglichkeit in die Gefäßwand einzudringen. Es wird so der parakrine Signalweg zwischen Endothelium und perivaskulären Zellen ermöglicht und Raum für das wachsende Gefäß geschaffen (Polverini et al. 1977).

Eine verstärkte Attraktion der Monozyten durch die Gabe von z.B. MCP-1 (Ito et al. 1997) oder die Verlängerung der Überlebenszeit von Monozyten durch GM-CSF (Grundmann et al. 2006) steht einerseits im direkten Zusammenhang mit einer verstärkten Bildung von Kollateralen nach Verschluss einer Arterie, welche die essentielle Rolle der Monozyten zeigt. Eine Verringerung der Monozytenzahl korreliert andererseits mit einer verringerten arteriogenen Antwort (Hoefer et al. 2004). Die Ergebnisse vieler Studien lassen vermuten, dass eine direkte und funktionelle Korrelation zwischen Kollateralwachstum nach Okklusion einer Hauptarterie und der Konzentration der zirkulierenden Monozyten besteht (Heil et al. 2002). Daher wird angestrebt, diese Makrophagen zu detektieren (Scholz et al. 2000), welches auch Ziel der durchgeführten Arbeit war.

In der Makrophagenfärbung konnte eine Änderung im Verlauf der verschiedenen Behandlungsgruppen beobachtet werden (Kap. 4.1, Abb. 12). Die mit CD163 positiv gefärbten Zellen wurden ins Verhältnis zur Gesamtfläche gesetzt und so der

68

Makrophagenindex berechnet (Kap. 2.2.4.5). Am Tag drei war die Konzentration von Makrophagen ca. sechsmal höher als am Tag null und ließ somit die Schlussfolgerung zu, dass das Kollateralwachstum unter dieser Behandlungszeit am stärksten ablief.

Andere Studien zur Analyse der Arteriogenese zeigen ähnliche Ergebnisse wie die der vorliegenden Arbeit. Eine maximale Akkumulation der Makrophagen wurde ebenfalls drei Tage nach Okklusion der A. femoralis in einem Kaninchen-Tiermodell beobachtet, die im Vergleich zur Kontrolle drei- bis sechsfach erhöht war. Zwischen dem dritten und siebenten Tag ging die Zahl der Makrophagen um ein Drittel zurück (Khmelewski et al. 2004). Auch Hillmeister et al. verzeichneten in den Beobachtungszeiträumen 24 Stunden und drei Tage nach 3-VO (three vessel occlusion) in einem Rattenmodell eine erhöhte Anzahl von Makrophagen, die mit CD68 (ED1) sichtbar gemacht wurden. Die positiven Zellen befanden sich sowohl in der Adventitia als auch im perivaskulären Gewebe. Ebenso wurden in der Endothelschicht positive Zellen detektiert, die die Adhäsion der Makrophagen an das Endothel zeigen (Hillmeister et al. 2008). Die Färbung der Monozyten/Makrophagen in den Gefäßstrukturen zeigte die Anfangsphase der Arteriogenese, in der die Makrophagen an den Platz des Geschehens hinwandern und viele Schritte wie die Sekretion von MMPs initiieren, die das Remodeling des Gefäßes erst ermöglichen.

Die Untersuchung der Makrophagen unterschiedlicher Regionen B, H, J und N wurde durchgeführt, um erstens zu überprüfen, ob die Einwanderung der Makrophagen ins Gefäß im Prozess der Arteriogenese abläuft oder Folgen des Eingriffs selbst ist. Zweitens wurden zwei Regionen direkt im Rete mirabile miteinander verglichen, um zu analysieren, ob es innerhalb des Rete mirabile einen Unterschied in der Makrophagenaktivität gibt. Es resultierte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl gefärbter Zellen zwischen der Seite mit und ohne AV-Shunt, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Makrophageneinwanderung nicht Folge des Eingriffs selbst ist (Kap. 4.1, Abb. 14). Zum zweiten Punkt ließ sich aussagen, dass auf immunhistochemischer Ebene kein Unterschied in der Anzahl von positiv anfärbbaren Makrophagen zwischen verschiedenen Regionen im Rete mirabile zu verzeichnen war, sodass innerhalb des Rete mirabile mit einem ähnlichen Maß an Makrophagenaktivität gerechnet werden kann.

5.1.3 Zusammenhang zwischen Proliferation und Makrophageninflux

Die maximale proliferative Aktivität im Rete mirabile nach AV-Shunt-Einbau überschneidet sich zeitlich mit der höchsten Aktivität der Makrophagen. Dies erklärt sich damit, dass Monozyten/Makrophagen eine Quelle für Wachstumsfaktoren wie TNF-a und bFGF, welche die Proliferation der Endothelzellen (ECs), SMCs und Fibroblasten in der Kollateralgefäßwand initiieren können, darstellen (Arras et al. 1998). In vivo Daten anderer Studien zeigen ebenfalls, dass die maximale proliferative Aktivität mit dem Peak in der Akkumulation der Monozyten zwischen Tag 2 und 3 nach Okklusion der A. femoralis in einem Kaninchen-Hinterlaufmodell übereinstimmen (Scholz et al. 2000). Dies verdeutlicht, dass Makrophagen für die Proliferation der Gefäßstrukturen essentiell sind. Die in vitro Daten derselben Gruppe weisen daraufhin, dass die Stimulation der ECs mit Wachstumsfaktoren und dem Beginn der Proliferation mit einer kleinen Verzögerung von 8 bis 12 Stunden erfolgt. Diese Beobachtung korreliert gut mit in vivo Daten, in denen Monozyten/Makrophagen um die Kollateralen 12 Stunden vor Beginn der Proliferation detektiert wurden, welche die enge Korrelation zwischen der Proliferation und der Aktivität der Makrophagen verdeutlicht. Der Grund für diese zeitliche Abweichung könnte darin liegen, dass für den Übergang der Zellen von der Go zur G1-Phase im Zellzyklus eine gewisse Zeit benötigt wird (Scholz et al. 2000).

5.2 Nachweis von Arteriogenese- und anderen Markern auf RNA-Ebene

Mit quantitativer Real-time-RT-PCR wurden Arteriogenesemarker und andere noch nicht als Arteriogenesemarker definierte Gene auf ihrer Regulationsebene untersucht. Die untersuchten Zielgene waren TIMP-1, MMP-2, MCP-1, CD44, VEGFA, SDF-1 und Vimentin und wurden auf das Housekeeping-Gen RPLP0 (Ribisomales Protein large P0) bezogen. RPLP0 ist eins von den Proteinen, die sich hochkonserviert und phosphoryliert in der großen Ribosomeneinheit von Eukaryonten befinden. RPLP0 hat sich in der Drosophila als ein multifunktionelles Protein erwiesen, das mit dem Elongationfaktor eEF-2 assoziiert und an der Elongation beteiligt ist. Daneben spielt es eine Rolle bei der DNA-Reparatur (Chang et al. 2008).

Der Begriff Housekeeping-Gen wurde zuerst für Gene benutzt, die notwendig für Zellfunktionen sind und sich in jedem Zelltyp befinden (Rhinn et al. 2008). Wegen ihrer tatsächlichen Funktion ist es präziser, stattdessen den Begriff Refenzgen zu verwenden (Stern-Straeter et al. 2009), weil darauf die Zielgene bezogen werden. Idealerweise sollte ein Housekeeping-Gen keine Variation in der Expression zwischen den verschiedenen Proben zeigen (Deindl et al. 2002). Praktisch kann man nicht von einer 100%-Nichtregulation ausgehen. Viele Studien, die zu Angio- oder Arteriogenese durchgeführt worden sind, haben GAPDH oder β-actin als Housekeeping-Gen verwendet (Sharma et al. 1992; Seki et al. 2000). Eine Studie zeigte jedoch, dass diese häufig verwendeten GAPDH und β-actin dereguliert und während der ersten 24 Stunden des Kollateralwachstums in einem Kaninchenmodell der Arteriogenese sogar signifikant hochreguliert sind (Deindl et al. 2002). Die in derselben Studie als einen besser geeigneten Kandidaten für die interne Kontrolle identifizierte 18S rRNA fiel als Referenzgen für die vorliegende Untersuchung heraus, da die Ct-Werte von 18S weit von den Ct-Werten der zu untersuchenden Zielgene lagen. Die Ct-Werte vom Referenzgen und der zu untersuchenden Gene sollten in einem ähnlichen Bereich liegen. RPLP0 dagegen wurde in mehreren Untersuchungen, die verschiedene Referenzgene miteinander verglichen haben, als das stabilste Referenzgen identifiziert und in der Literatur als invariant beschrieben (Shi et al. 2010; Stern-Straeter et al. 2009). RPLP0 stellte sich in der vorliegenden Arbeit ebenfalls als das Gen unter mehreren getesteten mit einer kleinen Varianz zwischen den einzelnen Behandlungen dar und wurde daher als Referenzgen verwendet.

5.2.1 TIMP-1 und MMP-2

TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases-1) wird von vaskulären glatten Muskelzellen produziert. Es kontrolliert die Aktivität der **MMPs** (Matrix-Metalloproteinasen) und vermittelt somit die Degradation der extrazellulären Matrix der Gefäße durch Proteolyse, welche einen wichtigen Schritt während der adaptiven Arteriogenese darstellt (Cai et al. 2000). Neben dieser Funktion sind TIMPs an der Regulation der Zellproliferation, Angiogenese und Apoptose beteiligt (Mannello and Gazzanelli 2001). Aus zwei früheren Studien wurde berichtet, dass TIMP-1 in einem Modell für koronare Arteriogenese in einem Hundeherz hochreguliert ist (Cai et al. 2000; Cai, Kocsis et al. 2004). So wurde TIMP-1 als Zielgen für die vorliegende Arbeit gewählt, um zu überprüfen, ob und wie es im AV-Shunt-Modell im Rete mirabile des Minischweins exprimiert ist.

MMPs sind an der Degradation der extrazellulären Matrix (ECM) beteiligt (Herron, Banda et al. 1986). MMPs dürften ein wichtiger Regulator des SMC-Phänotyps, der Proliferation, Migration und Erhaltung der Integrität der Gefäßwand bei der Proteolyse während der Arteriogenese sein. Ein Anstieg in der Produktion und Aktivität von MMP mündet in der Fragmentierung der Lamina elastica interna. Dieser Prozess ermöglicht die Auswanderung der Gefäßwandstrukturen nach außen (Cai et al. 2004).

TIMP-1 ist in der Lage, MMPs (Herron et al. 1986), mitunter das MMP-2 (Yiqin et al. 2009), zu inhibieren. Aus diesem Grund wurden TIMP-1 und MMP-2 als eine Einheit betrachtet und es wurde das Wechselspiel zwischen TIMP-1 und MMP-2 analysiert.

In vorliegender Studie zeigten TIMP-1 und MMP-2 in beiden Behandlungszeiten gegensätzliche Expressionen (Abb. 16 und 18). Die Expressionsermittlung von TIMP-1 mit der qRT-PCR wies eine 7-fache Hochregulation in der Drei-Tage-Gruppe bezogen auf die Kontrollgruppe auf. In der 14-Tage-Gruppe war ein Rückgang der Expressionshöhe auf das 4-fache auf die Kontrolle bezogen zu beobachten. MMP-2 zeigte eine zum TIMP-1 entgegengesetzte Regulation und war in der Drei-Tage-Gruppe um das 0,4-fache herunterreguliert. In der 14-Tage-Gruppe wies MMP-2 keine Regulation mehr auf.

Die Studie von Cai et al. (Cai et al. 2000) behauptet, dass im Prozess des Gefäßremodelings die Herunterregulation von MMP-2 und auch die von MMP-9 und die Hochregulation von TIMP-1 parallel zur Phase des aktiven Gefäßwachstums mit der Rekonstruktion der Neointima steht. Dieser Fakt ist bei Cai et al. in der Neointima von ausgereiften Kollateralen, die sich zum größten Teil nach acht Wochen gebildet haben, vorzufinden. Es ist ein empfindlicher Mechanismus, bei dem die SMCs zu ihrer richtigen Position zurückfinden und die entwickelten Kollateralen ihre Funktion aufnehmen (Cai et al. 2000). Es konnte eine signifikante Erniedrigung der Expression von MMP-2 in der Neointima von reifen Kollateralen und eine signifikante Erhöhung von TIMP-1 in der Intima nachgewiesen werden, während die SMCs die Proliferation beendet haben. In vorliegender Studie war eine verminderte Expression von MMP-2 bereits nach drei
Tagen vorzufinden, die zur 14-Tage-Behandlung hin abnahm. Die Erklärung kann in der Auswahl des Tiermodells gefunden werden. Cai et al. verwendeten in ihrer Studie ein Ameroid-Konstriktor, der auf der Außenseite der linken Koronararterie angebracht wurde. Ein Ameroid-Konstriktor absorbiert die Flüssigkeit vom Gewebe um das Gefäß herum, das Gefäß schwillt durch die Flüssigkeit an und verschließt dadurch das Gefäß langsam nach neun bis zwölf Tagen. Dagegen verbindet ein AV-Shunt eine Arterie mit einer Vene und ein großes Druckgefälle wird geschaffen. Dies ermöglicht, dass die Mechanismen der Arteriogenese bald darauf beginnen können. Im AV-Shunt liegt ein Zustand vor, in dem chronisch erhöhte Schubspannung auf die Gefäße ausgeübt wird. Als eine alternative Erklärung könnte das Ergebnis von Milkiewicz et al. dienen, dass die kapillären Endothelzellen die MMP-Produktion als Antwort zur erhöhten Schubspannung erniedrigen (Milkiewicz et al. 2006). Denn wenn erhöhte Schubspannung vorherrscht, muss die Gefäßstruktur diesem Druck entgegen wirken können und eine stabile Struktur aufweisen. Eine erhöhte MMP-Konzentration mit Degradation der extrazellulären Matrix wäre somit kontraproduktiv.

Der Beginn der Proliferationsphase wird anhand der erzielten Ergebnisse in der Drei-Tage-Gruppe vermutet. Die Ergebnisse wurden mit der Proliferationsfärbung ergänzt. Die Wachstumsphase mit Gefäßumbau lässt sich zwischen Tag 3 und Tag 14 mit der Änderung der MMP-2-Expression in der 14 Tage-Gruppe, die in Richtung Hochregulation tendiert und für die proteolytische Aktivität der glatten Muskelzellen im Zuge des Gefäßumbaus und der Neointimabildung benötigt werden, vermuten. Es könnte ebenfalls möglich sein, dass eine erhöhte Expression bereits zwischen Tag 3 und 14 stattgefunden hat und die Tendenz zur Hochregulation am Tag 14 unabhängig hiervon ist.

Diese Ergebnisse deuten draufhin, dass MMP-2 einen wichtigen Beitrag bei der Kontrolle der SMC-Migration leistet. Andere Faktoren wie α-SM-actin sind ebenfalls an diesem Mechanismus beteiligt. Eine erhöhte Expression von MMP-2 zeigt sich dagegen in der Tunica media während der Frühphase von wachsenden Gefäßen (Cai, Kocsis et al. 2004). Erst die Degradation der Basalmembran ermöglicht die Migration von SMCs und dann auch die Expansion der Gefäßwand. Dieser Prozess muss kontrolliert und limitiert werden, sonst würde die intakte Wand zerstört werden. Die MMPs treiben den Prozess der Migration der SMCs und TIMPs inhibieren diesen Vorgang (Cai, Kocsis et

al. 2004). Die passiven Bewegungen der SMCs und der SMC-Proliferation sind für das Remodeling der Tunica media von Bedeutung (Cai et al. 2004). SMCs produzieren sowohl TIMPs als auch MMPs (Galis et al. 1994). Von den MMPs können MMP-2 und MMP-9 das Kollagen IV degradieren, welches ein wichtiger Bestandteil der Basalmembran ist (Dollery et al. 1995).

Eine positive Färbung von TIMP-1 in der Intima, Media und Adventitia der A. cerebralis posterior wurde während der Arteriogenese bereits 24 Stunden nach einem 3-VO (three vessel occlusion) gezeigt. Es wird vermutet, dass TIMP-1 ein Marker der Frühphase der Arteriogenese ist und eine erhöhte Expression von TIMP-1 in dieser Frühphase eine Rolle bei der Kontrolle der Degradation der extrazellulären Matrix und das angetriebene Gefäßremodeling durch die Aktivierung der Zellproliferation veranschaulicht (Hillmeister et al. 2008).

Zusammenfassend lässt sich aussagen, dass die Herunterregulierung von MMPs und die Heraufregulierung von TIMP-1 den Zustand widerspiegeln, in dem ein aktives Gefäßwachstum mit der Rekonstruktion der Neointima abläuft. Nun muss die Frage noch geklärt werden, ob eine erhöhte Expression von MMP-2 bereits vor der Beobachtungszeit von Tag 3 stattgefunden oder zu einem ganz anderem Zeitpunkt stattfindet. Um diese Frage beantworten zu können, müssten noch weitere Behandlungsgruppen die Analyse ergänzen.

5.2.2 MCP-1

MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) gehört zur Familie der CC-Chemokinen und treibt die Rekrutierung und Aktivierung von Monozyten/Makrophagen voran (Matsushima et al. 1989; Rollins 1997; Ikeda et al. 2002). Die Monozyten sind die Hauptmediatoren der Arteriogenese (Hoefer et al. 2004). Aufgrund der übergeordneten Bedeutung der Monozyten wird das stärkste pro-arteriogene Zytokin, MCP-1, das unter den Zytokinen am stärksten Monozyten anlockt eine große Bedeutung zugemessen (Schirmer et al. 2009), sodass MCP-1 zur Analyse herangezogen wurde.

MCP-1 war nach 3 Tagen Shuntbehandlung in der Expression verglichen mit der Kontrollgruppe um 6,4-fach erhöht. Die Expression ging in der 14-Tage-Gruppe zurück

und war nicht mehr dereguliert. Die erhöhte MCP-1-Produktion in der Drei-Tage-Gruppe wies daraufhin, dass die Makrophagen angelockt wurden. Es konnte in einer anderen Studie ebenfalls nach Okklusion der A. femoralis während der ersten Tage eine Akkumulation von Makrophagen aktiviert durch MCP-1 beobachtet werden, welche in einen Zusammenhang zur Gefäßproliferation gesetzt wurde (Khmelewski, Becker et al. 2004).

In vielen Studien wurde den Versuchsobjekten sogar exogen MCP-1 appliziert, um die Auswirkung dieser Substanz auf das Kollateralwachstum zu analysieren. So wurde MCP-1 in den proximalen Stumpf der okkludierten A. femoralis infundiert. Dies beschleunigte das Kollateralwachstum über eine verstärkte Monozytenanlockung (Ito et al. 1997). Bei diesem Prozess lagern sich die Monozyten über ihren Mac-1-Rezeptor an die Endothelzellen über das Adhäsionsmolekül ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) an (Hoefer et al. 2004). Die Monozyten transmigrieren in das perivaskuläre Gewebe, wo weitere Chemokine und Wachstumsfaktoren wie GM-CSF, bFGF, TGF- β und VEGF sezerniert werden (Schirmer et al. 2009). Weitere Untersuchungen wurden unternommen, um das Kollateralwachstum nach Zufuhr verschiedener Zytokine miteinander zu vergleichen. Dabei zeigte sich bei der MCP-1-Applikation das stärkste Kollateralwachstum von den untersuchten Substanzen (Schierling et al. 2009). Diese Untersuchungen veranschaulichen zusammenfassend deutlich den pro-arteriogenen Effekt von MCP-1.

Es wurde die Vermutung aufgestellt, dass MCP-1 an der Entstehung von Atherosklerose beteiligt ist. Denn Akkumulation von Makrophagen in der Gefäßwand gehört mit der Umwandlung dieser in Schaumzellen zum Basismechanismus bei der Entstehung von Atherosklerose (Ross 1999). Daher könnte die MCP-1 assoziierte Chemotaxis paradoxerweise Arteriogenese als auch Atherosklerose auslösen (Cannon et al. 2009). Nakimi et al. transfizierten cDNA für MCP-1 in die Gefäßwände von Kaninchen, welches nicht zur Atherosklerose führte. Aber die Kaninchen im Versuch entwickelten Atherosklerose, wenn sie eine Cholesterol-Diät erhielten. Mit dieser Studie wurde gezeigt, dass eine erhöhte Konzentration von MCP-1 selbst nicht zur Atherosklerose führt. sondern andere Faktoren wie solche. die durch Hypercholesterinämie hervorgerufen werden, als Cofaktoren vorhanden sein müssen (Namiki et al. 2002).

Die große Bedeutung von MCP-1, die andere Studien diesen wegen seiner Fähigkeit Monozyten anzulocken, zusprechen, wurde durch die vorliegenden Ergebnisse der quantitativen RT-PCR untermauert. MCP-1 zeigte neben TIMP-1 eine starke Hochregulation, die weit über dem Wert von VEGF lag, das bei Schirmer et al. ebenfalls unter den Arteriogenese beeinflussenden Genen aufgeführt und untersucht wurde. Die positive Färbung des Rete mirabile mit CD163-Antikörper veranschaulicht noch einmal die Anwesenheit der Makrophagen bei diesem Prozess und unterstützt den Befund des hochregulierten MCP-1.

5.2.3 CD44

CD44 ist ein transmembranäres Glykoprotein und gehört zur Familie der Zelloberflächenrezeptoren, die auf verschiedenen Zelltypen einschließlich auf Leukozyten, Endothelzellen und SMCs exprimiert werden. CD44 vermittelt in Lymphozyten die T-Zell- und Monozytenadhäsion auf Endothelzellen, die Freisetzung proinflammatorischen Zytokinen aus Makrophagen und nimmt an von der Dedifferenzierung der SMCs von der kontraktilen zur synthetischen Form teil (Protasiewicz and Adamiec 2005). Weiterhin reguliert CD44 die biologische Aktivität von mehreren Wachstumsfaktoren wie bFGF (basic fibroblast growth factor), PDGF-B (platelet-derived growth factor) und HGF (hepatocyte growth factor). Von CD44 ist bekannt, die Arteriogenese zu regulieren. Aufgrund der wichtigen Rolle der Monozyten in der Arteriogenese wurde CD44 als Zielgen zusätzlich neben MCP-1 analysiert.

Bei der RNA-Analyse bei den mit AV-Shunt behandelten Minischweinen konnte eine auf das 2,3-fach erhöhte Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen werden, die sich in der 14-Tage-Gruppe auf das 5,2-fache steigerte. Eine stark erhöhte Expression von CD44 in Kollateralarterien war in der Studie von van Royen vorzufinden, die auf den Endothelzellen lokalisiert war, nachdem sie die A. femoralis okkludiert hatten. Sie konnten ebenfalls beobachten, wie sich zwischen Tag eins und drei der Blutfluss langsam steigerte und sahen nach Tag drei eine merkliche Steigerung des Blutflusses zum siebten Tag. Die Expression von CD44 auf der nicht verschlossenen Seite war dagegen sehr niedrig und auf die Adventitia beschränkt. Weiterhin konnten sie beobachten, dass die Wiederherstellung des Blutflusses in CD44-knock out Mäusen schwer beeinträchtigt war. Damit fanden sie den Zusammenhang zwischen dem

Ausmaß der Entwicklung von Kollateralen und der Expression von CD44 durch Monozyten heraus (van Royen et al. 2003). Ein Unterschied der Expressionen zwischen MCP-1 und CD44 in vorliegender Studie bestand darin, dass die höchste Expression von MCP-1 am Tag drei und die von CD44 am Tag 14 lag. Eine Erklärung für die zeitlich unterschiedliche Regulation könnte mit den unterschiedlichen Zelltypen, mit denen die Moleküle interagieren, zusammenhängen. So rekrutiert und aktiviert MCP-1 Makrophagen, die in der Anfangsphase der Arteriogenese eine entscheidende Rolle einnehmen und CD44 ist an der Freisetzung von Zytokinen aus Makrophagen und an der Dedifferentierung von SMCs von kontraktilem in synthetischen Typ beteiligt, welche der Rekrutierung und Aktivierung von Makrophagen folgen.

Durch die vorliegende Studie wurde gezeigt, dass CD44, welches die Arteriogenese reguliert, auch im AV-Shunt des Minischweins hochreguliert war.

5.2.4 VEGFA

VEGF (vasoendothelial growth factor) ist als ein angiogenes Zytokin bekannt und wurde im Zuge der Untersuchungen zu Substanzen gefunden, die die Gefäßpermeabilität in fast allen malignen soliden und Aszites-Tumoren erhöhen (Vlodavsky et al. 1987). VEGF ist als einer der potentesten Faktoren für die Gefäßpermeabilität zuständig und ist 50.000 Mal effektiver als Histamin (Buschmann et al. 2003). Die Gefäße werden innerhalb von Minuten nach Injektion dieser Substanz permeabel, sodass ihr zuerst der Name Vascular permeability factor (VPF) gegeben wurde (Senger et al. 1983).

VEGF gehört zu den angiogenen Faktoren, die intensiv auf ihre Eigenschaft untersucht wurden (Buschmann et al. 2003). VEGF besitzt auch die Fähigkeit, die Migration der SMCs zu induzieren (Ishida et al. 2001). Diese Eigenschaft veranlasste viele Forscher VEGF auf arteriogene Eigenschaften zu untersuchen (Buschmann et al. 2003). In letzter Zeit vermuten viele Forschergruppen, dass VEGF-A und sein Rezeptor eine entscheidende Rolle in der Arteriogenese einnehmen (Babiak et al. 2004). Sie vermuten zwei bestimmte Zelltypen, auf denen sich die Mechanismen abspielen. Es sind die Endothelzellen und Monozyten (Ferrara et al. 2003; Babiak et al. 2004). VEGF-A bindet auf Gefäßendothelzellen an zwei verschiedenen Tyrosinkinase-Rezeptoren, den VEGFR-1 (Flt-1) und VEGFR-2 (KDR/Flk-1), wovon VEGFR-2 der Hauptmediator bei

der Aktivierung des Endothels als Antwort auf VEGF zu sein scheint und ein großes Spektrum von Endothelfunktionen vermittelt (Waltenberger et al. 1994; Olsson et al. 2006). VEGFR-1 wurde als Modulator der Aktivitäten, die von VEGFR-2 induziert wurden, beschrieben (Neufeld et al. 2002).

Monozyten können durch einen Vertreter der VEGF-Familie aktiviert werden. Auf der Oberfläche von Monozyten ist der Rezeptortyp VEGFR-1 präsent und vermittelt eine chemotaktische Antwort auf VEGF-A (Clauss et al. 1996). VEGFR-1-Tyrosinkinase-Domäne ist für eine physiologische Monozytenfunktion erforderlich und zwar für die Induktion der Migration von Monozyten/Makrophagen (Tchaikovski et al. 2008).

Um eine eventuelle arteriogene Funktion von VEGF zu überprüfen, wurde VEGF in Kaninchen verabreicht und darauf das Kollateralwachstum beobachtet. VEGF steigerte merklich die Anzahl der Kollateralen, aber gehörte verglichen mit anderen arteriogenen Wachstumsfaktoren nicht zu den potentesten (Schierling et al. 2009). Der Effekt von VEGF wurde auch an Patienten getestet. Es liefen zuerst nicht randomisierte, nicht Placebo-kontrollierte Untersuchungen, welche einen positiven Effekt auf die Arteriogenese zeigten (Isner et al. 1996). Die darauf folgenden randomisierten Untersuchungen (VIVA und RAVE-Studien) konnten dieses Ergebnis nicht bestätigen (Henry et al. 2003; Rajagopalan et al. 2003). Daher bleiben die Beweise noch aus, dass VEGF im Menschen einen positiven Effekt im Kollateralwachstum ausübt. Um dieser Frage nachzugehen, wurde in der Studie VEGF als Kandidat mituntersucht.

In der durchgeführten Studie zeigte VEGF-A in beiden Behandlungszeiten keine Deregulation. Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass eine moderate Stimulation vom Kollateralwachstum durch VEGF (Buschmann et al. 2003) in einer dünnen Schicht wie die Endothelschicht nicht messbar ist. Denn die Aktivität von VEGF ist auf Endothelzellen konzentriert (Bauters et al. 1999). Eine andere Erklärung ist, dass die erhöhte Expression von VEGF, welche die Expression von MCP-1 in SMCs induziert (Schaper 2009), schon stattgefunden hat und nicht mehr detektierbar ist. Denn MCP-1 zeigte in der Drei-Tage-Gruppe die höchste Expression, was bedeutet, dass die Mechanismen, die zur MCP-1-Aktivierung führen, bereits stattgefunden haben müssen. Ist es der Fall, spielt VEGFA in Hinsicht auf die Aktivierung von VEGFR-abhängigen Signaltranduktionsweg eine Rolle und die damit verbundene Chemotaxis der Monozyten (Tchaikovski et al. 2008). Spielt VEGFA in diesem Prozess keine Rolle, ist

es ein Hinweis auf einen anderen Aspekt und zwar dass die Hypoxie, welche ein Stimulus der Angiogenese ist, bei der Arteriogenese keine Bedeutung hat.

5.2.5 SDF-1

SDF-1 (Stromal-cell-derived factor 1), welches zu den CXC-Chemokinen gehört, ist auch unter dem Namen CXCL12 bekannt. Es wurde ursprünglich bei der Aufreinigung vom Überstand der Basalmembran von Bindegewebszellen entdeckt (Nagasawa et al. 1994).

SDF-1 und sein Rezeptor CXCR4 sind entscheidend beim Gefäßremodeling durch die Rekrutierung von Progenitorzellen der glatten Muskelzellen (Zernecke et al. 2005). Diese Progenitorzellen nehmen an der Akkumulation der glatten Muskelzellen teil. Bei einer Blockade von SDF-1 würde es zu einer signifikanten Reduzierung des Gehaltes an glatten Muskelzellen kommen (Schober et al. 2006). Weiterhin induziert SDF-1 die Proliferation der Endothelzellen, Chemotaxis und Tubenformation. SDF-1 erhöht die VEGF-Produktion, welche seinerseits den Gehalt von CXCR4 auf Endothelzellen hochreguliert. Das synergistische Wechselspiel zwischen SDF-1 und VEGF ist im Rahmen der Angiogenese bekannt (Rosenkilde and Schwartz 2004). Der CXCR4 Rezeptor ist auf Endothelzellen exprimiert. Eine systemische Gabe, so behaupten Park et al., könnte die Arteriogenese verstärken, zumindest durch seinen Effekt auf den Endothelien von präexistierenden Arteriolen (Carr et al. 2006).

In dieser Arbeit sollte eine Regulation von SDF-1 während der Arteriogenese untersucht werden. Weitere Lokalisationsorte von SDF-1 sind glatte Muskelzellen und Makrophagen (Gear and Camerini 2003). In der Kollateralentwicklung spielen die Monozyten schon in der initialen Phase eine Rolle, in der sie durch Adhäsionsmoleküle zum Endothel gelockt werden. Die Invasion der Monozyten hört dann in der Wachstumsphase auf, in der auch keine weiteren Adhäsionsmoleküle exprimiert werden (Scholz et al. 2000). Die Monozyten induzieren darauf die Zellproliferation von Gefäßwandzellen und das Gefäßwandremodeling. Die Monozyten, die auf SDF-1 andocken, könnten eine Rolle in diesem Mechanismus spielen.

Gegen Erwartung war die Expression von SDF-1 nach drei Tagen runterreguliert und nach 14 Tagen war keine Deregulation mehr vorfindbar. Die Gruppe von Park et al. fand bei der Untersuchung zwischen der Plasmakonzentration von SDF-1 und der

sichtbaren Entwicklung von Kollateralen während der Frühphase von akutem Myokardinfarkt ebenfalls keinen Zusammenhang heraus (Park et al. 2008). Demnach könnte es sein, dass SDF-1 in der vorliegenden Studie keine Rolle gespielt hat.

Eine andere Erklärung könnte sein, dass die Monozyten unabhängig von SDF-1 aktiviert worden sind. Denn aus den Ergebnissen der anderen untersuchten Zielgene war bekannt, dass Monozyten/Makrophagen aktiv am Geschehen beteiligt waren. Eine weitere Überlegung ist, dass die Hochregulierung von SDF-1 bereits stattfand und zum Zeitpunkt der Analyse (3d oder 14d) die Expression von SDF-1 nicht mehr detektierbar war. Um dieser Frage nachzugehen, wäre eine Kinetikanalyse von SDF-1 nach einem Tag Shuntbehandlung hilfreich.

Die Expression von SDF-1 hängt mit der Expression von MMP-2 zusammen, indem SDF-1 eine konzentrations- und zeitabhängige Erhöhung von proMMP-2-Protein in SMCs induziert, die im vorliegenden Versuch nicht vorzufinden war, da SDF nicht hochreguliert war (Kodali et al. 2006).

5.2.6 Vimentin

Intermediärfilamente (IFs), zu denen Vimentin gehört, bilden neben den Mikrofilamenten und Mikrotubuli einen der Hauptbestandteile des Zytoskeletts (Amos and Amos 1991). Das Zytosklett kontrolliert und reguliert viele Zellfunktionen wie die Kontraktion, Migration, Proliferation, Proteinsynthese, Genexpression, Apoptose und Mechanotransduktion (Chicurel et al. 1998; Beningo et al. 2001). Die Reichhaltigkeit der Intermediärfilamente und die Tatsache, dass IFs vom Nucleus bis zur Zellmembran spannen (Djabali 1999) lassen die Vermutung aufstellen, dass IFs eine wichtige mechanische Rolle bei der Gewährleistung von struktureller Stabilität der Zellen spielen und mechanische Signale in biologische Antworten umwandeln (Djabali 1999).

Vimentin ist auf Endothelzellen, Fibroblasten (Wang and Stamenovic 2002) und glatten Muskelzellen (Fuchs and Weber 1994) exprimiert. Vimentin wird für viele Zellfunktionen benötigt. Es wird berichtet, dass Vimentin mit der Motilität von verschiedenen Zellen zusammenhängt (Lane et al. 1983; Cochard and Paulin 1984).

Vimentin wurde als ein Mediator, der für die Stimulation des Kollateralwachstums verantwortlich ist, gefunden, welcher 5-fach sieben Tage nach AV-Shuntbildung

zwischen der A. und der V. femoralis in einem Kaninchenmodell hochreguliert war (Eitenmuller et al. 2006) und wurde auch in Proteomansätzen in der Arbeitsgruppe Buschmann ebenfalls als dereguliert gefunden.

In vorliegender Studie war Vimentin sowohl nach drei als auch nach 14 Tagen Shuntbehandlung runterreguliert. Dies korreliert mit der Behauptung von Schiffers et al, dass die Abwesenheit von Vimentin zum strukturellen Remodeling des Gefäßes führt. Weiterhin wurde beobachtet, dass die physiologische Zell-Zell-Interaktion in Zellen ohne Vimentin dramatisch reduziert war, was darauf schließen ließ, dass Vimentin zur Erhaltung der mechanischen Interaktion zwischen Zellen wichtig ist, welches wiederum für die mechanische Kraft des Zytoskletts und für den Schutz der Intaktheit der Zellstruktur von Bedeutung ist (Wang and Stamenovic 2002).

Wenn der Blutfluss chronisch gesteigert ist, löst das Endothel das flussinduzierte Remodeling der arteriellen Wand aus, das Gefäß nimmt an Diameter zu und hypertrophiert. Dieser Prozess wird erst durch die genetische Abwesenheit von Vimentin ermöglicht (Schiffers et al. 2000; Loufrani et al. 2002). Besteht der chronisch gesteigerte Blutfluss weiterhin, dürfte die Synthese von Vimentin einsetzen, um die zelluläre Architektur vor dem längerfristig erhöhten Druck zu schützen (Schnittler et al. 1998).

Wenn Vimentin wie in vorliegender Arbeit fehlt, ist der Zusammenhalt zwischen den Zellen aufgehoben, sodass ein Umbau der Gefäßstrukturen möglich ist. Es wird ein Abund Umbau der endothelialen Struktur vermutet, die Bestandteile der Entwicklung von Kollateralen darstellen. So kann von einem Einfluss von Vimentin im Prozess der Arteriogenese ausgegangen werden.

5.2.7 Zusammenfassung der Signifikanztestung

Ein statistischer Test beantwortet lediglich die Frage, ob die Ergebnisse der untersuchten Stichprobe trotz der zufallsbedingten Streuung auf die Grundgesamtheit übertragen, d.h. verallgemeinert werden dürfen.

Nach der Durchführung des Mann-Whitney U-Test mit dem SPSS-Programm wurde ersichtlich, ob die Versuchsergebnisse statistisch signifikant sind. Es wurde die exakte Signifikanz (zweiseitig) betrachtet. Für einige Gene lagen die Werte an der Grenze der statistischen Signifikanz bei p=0,057, welche noch akzeptabel war, da die Funktion

Exact timer eingestellt war. Bei der Berechnung der einseitigen Signifikanz resultierten für mehrere Gene ein p-Value von <0,05. Da aber damit die Richtung der Genexpression vorweggenommen wird, ist für eine eindeutig objektive Betrachtung die zweiseitige Signifikanz gewählt worden, auch wenn für einige Gene aus frühen Untersuchungen die Richtung der Genexpression bekannt ist. Gene mit p=0,057 waren: TIMP-1 (drei und 14 Tage), MCP-1 (drei Tage), VEGFA (14 Tage) und Vimentin (drei und 14 Tage). Für die nicht aufgeführten Gene und Behandlungszeiten lag laut der Mann-Whitney U-Test kein signifikantes Ergebnis vor. Bei den nicht signifikanten Ergebnissen von MMP-2 (drei Tage) und CD44 (drei und 14 Tage) wurde dennoch ein Einfluss des AV-Shunts auf die Genregulation vermutet, denn je zwei der drei Tiere zeigten ähnliche Werte und der dritte wich davon ab, sodass die Vermutung aufgestellt werden konnte, dass der Ausreißer einen negativen Einfluss auf die Signifikanz ausübte, sodass insgesamt von einem Einfluss des AV-Shunts auf diese Gene auszugehen ist. Diese zufällige Streuung der Messwerte zwischen den einzelnen Tieren ließe sich bei einer größeren Fallzahl verringern, sodass die Wahrscheinlichkeit eines β-Fehlers damit verringert wird.

Zusammenfassung

6. Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen gehören zu den häufigsten Todesursachen in den Industrieländern und inzwischen auch in den Schwellenländern. Zu den kardiovaskulären Krankheiten gehören u.a. ischämische Krankheiten, bei denen die Gefäße stenosieren und das Perfusionsgebiet nicht ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt wird.

Es werden Patienten beobachtet, die trotz hochgradiger Stenosen der Koronargefäße nur geringe Beschwerden aufweisen und einen Infarkt überleben. Es sind Menschen mit ausgeprägten Kollateralgefäßen, die weitlumige Arterien durch Proliferation ersetzen und die Perfusion an ihrer Stelle übernehmen. Ziel aktueller Studien ist es daher, eine rechtzeitige und wenig invsasive Induktion der Proliferation dieser Kollateralgefäße zu erreichen. Um das Kollateralwachstum genau zu erforschen, sind geeignete Modelle notwendig, die möglichst die Situation des Menschen widerspiegeln. Das Schwein, besonders das Minischwein, das mit seinem Gewicht näher am Menschen liegt als das Zuchtschwein, ist aufgrund der anatomischen Gegebenheiten, die dem Menschen ähneln, als Modell sehr gut geeignet. Das Minischwein besitzt ein Arteriengeflecht, das sogenannte Rete mirabile, das sich aus der A. pharyngealis ascendens in viele feine Arterienäste abzweigt und mit dem Geflecht der anderen Seite vereinigt. Dieses Arteriengeflecht wurde zur Untersuchung der Arteriogenese herangezogen.

Von essentieller Bedeutung für die Stimulierung der Arteriogenese ist die Schubspannung τ, die sich aus dem Quotienten aus Kraft und Fläche zusammensetzt und als Initiator der Arteriogenese fungiert. Um die Schubspannung auf die Arterienwände im Rete mirabile zu erhöhen, wurde in zehn Minischweinen ein sogenannter arteriovenöser Shunt (AV-Shunt) eingebaut, welcher zwischen der A. carotis communis dextra und V. jugularis externa dextra zu liegen kommt.

Ziel dieser Dissertation war es, das arterielle Rete mirabile des Minischweins mit dem künstlich geschaffenen AV-Shunt unter dem Aspekt einer möglichen Verwendung in der Arteriogeneseforschung zu untersuchen, sodass es im Anschluss auf die Eignung zur Testung proarteriogener Compounds überprüft und in der therapeutischen Arteriogenese eingesetzt werden kann.

Die Tiere wurden direkt nach dem chirurgischen Eingriff (Kontrollgruppe) oder nach drei bzw. 14 Tagen Shuntbehandlung (Drei-Tage bzw. 14-Tage-Gruppe) geopfert und jedem das carotide Rete mirabile mit rechter und linker A. pharyngealis ascendens entnommen. Anschließend wurde das Arteriengeflecht in mehrere Segmente unterteilt und für RNA-Analyse und Immunhistochemie herangezogen.

Bei der Analyse wurden auf RNA-Ebene Arteriogenesemarker untersucht, die in anderen Arteriogenesemodellen bereits gefunden wurden und als Arteriogenesemarker bekannt sind oder noch auf eine arteriogene Eigenschaft untersucht werden. Es sind die Zielgene TIMP-1, MMP-2, MCP-1, CD44, VEGFA, SDF-1 und Vimentin. Auf Proteinebene wurde das Modell mit Immunhistochemie nach wichtigen Eigenschaften der Arteriogenese, nämlich der Makrophageninvasion und Proliferation untersucht.

Die RNA-Analyse brachte folgendes Ergebnis: TIMP-1, MCP-1 und CD44 waren in beiden Behandlungszeiten heraufreguliert, MMP-2 und SDF-1 waren nach drei Tagen herunterreguliert, Vimentin war in beiden Behandlungszeiten herunterreguliert und VEGFA zeigte insgesamt keine Deregulation.

In der immunhistochemischen Untersuchung konnte bei der Ki67-Färbung ein Anstieg der Proliferation in der Drei-Tage Gruppe bezogen auf die Kontrollgruppe ermittelt werden, die in der 14-Tage-Gruppe auf die Ausgangslage zurückging. Die Makrophagenfärbung zeigte wie die Proliferationsfärbung nach drei Tagen einen deutlichen Anstieg an markierten Makrophagen, deren Zahl in der 14-Tage-Gruppe beinahe wieder die Ausgangslage annahm.

Insgesamt lässt sich weiter zusammenfassen, dass die Mechanismen der Arteriogenese nach dem Einbau des AV-Shunts im Rete mirabile des Minischweins früh einsetzen und in diesem Modell die meisten der Gene, die in anderen Modellen als Arteriogenesemarker identifiziert wurden, die gleiche Expressionsrichtung zeigen.

Um im Modell noch weitere Details aufzuklären, bedarf es einer Untersuchung dieses nach einem Tag AV-Shunt, um die unmittelbaren Folgen zu analysieren und für die mittelfristigen Folgen eine Untersuchung zwischen Tag 3 und 21 AV-Shunt-Behandlung. Für statistisch signifikantere Ergebnisse müsste die Tierzahl in den einzelnen Behandlungsgruppen erhöht werden. Danach könnten bekannte pharmakologische Substanzen wie GM-CSF oder MCP-1 als Positivkontrolle getestet werden, um eine therapeutische Arteriogenese zu bestätigen. Eine Eignung als Arteriogenesemodell ist zu erkennen, die Kombination der Faktoren, die das Modell innehat, scheint günstig im Hinblick auf die Aktivierung und Aufrechterhaltung der Arteriogenese zu sein.

Literaturverzeichnis

7. Literaturverzeichnis

- Abi-Younes, S., M. Si-Tahar, et al. (2001). "The CC chemokines MDC and TARC induce platelet activation via CCR4." Thromb Res **101**(4): 279-89.
- Amos, L. A. and W. B. Amos (1991). "The bending of sliding microtubules imaged by confocal light microscopy and negative stain electron microscopy." <u>J Cell Sci</u> <u>Suppl</u> **14**: 95-101.
- Arras, M., W. D. Ito, et al. (1998). "Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb." J Clin Invest **101**(1): 40-50.
- Asahara, T., T. Takahashi, et al. (1999). "VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells." <u>Embo J</u> **18**(14): 3964-72.
- Babiak, A., A. M. Schumm, et al. (2004). "Coordinated activation of VEGFR-1 and VEGFR-2 is a potent arteriogenic stimulus leading to enhancement of regional perfusion." <u>Cardiovasc Res</u> 61(4): 789-95.
- Bauters, C., I. Six, et al. (1999). "Growth factors and endothelial dysfunction." <u>Drugs</u> **58 Spec No 1**: 11-5.
- Beningo, K. A., M. Dembo, et al. (2001). "Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts." <u>J Cell Biol</u> 153(4): 881-8.
- Bergmann, C. E., I. E. Hoefer, et al. (2006). "Arteriogenesis depends on circulating monocytes and macrophage accumulation and is severely depressed in op/op mice." <u>J Leukoc Biol</u> 80(1): 59-65.
- Bondke, A. and I. Buschmann (2008). "Duales Therapieprinzip beim biologischen Bypass (Arteriogenese)".
- Singuläre Pharmakotherapie vs. Kombinationstherapie mit Training?" <u>Der Kardiologe</u> 2: 33-38.
- Brothers, M. F., J. C. Kaufmann, et al. (1989). "n-Butyl 2-cyanoacrylate--substitute for IBCA in interventional neuroradiology: histopathologic and polymerization time studies." <u>AJNR Am J Neuroradiol</u> **10**(4): 777-86.
- Buechler, C., M. Ritter, et al. (2000). "Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli." <u>J Leukoc Biol</u> **67**(1): 97-103.

- Burger, E. H., J. W. Van der Meer, et al. (1982). "In vitro formation of osteoclasts from long-term cultures of bone marrow mononuclear phagocytes." <u>J Exp Med</u> **156**(6): 1604-14.
- Busch, H. J., I. R. Buschmann, et al. (2003). "Arteriogenesis in hypoperfused rat brain." <u>J Cereb Blood Flow Metab</u> **23**(5): 621-8.
- Buschmann, I., M. Heil, et al. (2003). "Influence of inflammatory cytokines on arteriogenesis." <u>Microcirculation</u> **10**(3-4): 371-9.
- Buschmann, I. and W. Schaper (1999). "Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth." <u>News Physiol Sci</u> **14**: 121-125.
- Buschmann, I. and W. Schaper (2000). "The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis)." J Pathol **190**(3): 338-42.
- Cai, W., R. Vosschulte, et al. (2000). "Altered balance between extracellular proteolysis and antiproteolysis is associated with adaptive coronary arteriogenesis." <u>J Mol</u> <u>Cell Cardiol</u> **32**(6): 997-1011.
- Cai, W. J., E. Kocsis, et al. (2004). "Remodeling of the vascular tunica media is essential for development of collateral vessels in the canine heart." <u>Mol Cell</u> <u>Biochem</u> **264**(1-2): 201-10.
- Cai, W. J., S. Koltai, et al. (2003). "Remodeling of the adventitia during coronary arteriogenesis." <u>Am J Physiol Heart Circ Physiol</u> **284**(1): H31-40.
- Cannon, J. G., M. J. Sabatier, et al. (2009). "Femoral artery diameter and arteriogenic cytokines in healthy women." <u>Vascul Pharmacol</u> **50**(3-4): 104-9.
- Carmeliet, P. (2000). "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis." <u>Nat Med</u> **6**(4): 389-95.
- Carr, A. N., B. W. Howard, et al. (2006). "Efficacy of systemic administration of SDF-1 in a model of vascular insufficiency: support for an endothelium-dependent mechanism." <u>Cardiovasc Res</u> 69(4): 925-35.
- Chang, T. W., C. C. Chen, et al. (2008). "Ribosomal phosphoprotein P0 interacts with GCIP and overexpression of P0 is associated with cellular proliferation in breast and liver carcinoma cells." <u>Oncogene</u> **27**(3): 332-8.
- Chicurel, M. E., C. S. Chen, et al. (1998). "Cellular control lies in the balance of forces." <u>Curr Opin Cell Biol</u> **10**(2): 232-9.
- Clauss, M., H. Weich, et al. (1996). "The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta

growth factor in monocyte activation and chemotaxis." <u>J Biol Chem</u> **271**(30): 17629-34.

- Cochard, P. and D. Paulin (1984). "Initial expression of neurofilaments and vimentin in the central and peripheral nervous system of the mouse embryo in vivo." J <u>Neurosci</u> **4**(8): 2080-94.
- Coulombe, P. A., O. Bousquet, et al. (2000). "The 'ins' and 'outs' of intermediate filament organization." <u>Trends Cell Biol</u> **10**(10): 420-8.
- Deindl, E., K. Boengler, et al. (2002). "Differential expression of GAPDH and beta3-actin in growing collateral arteries." <u>Mol Cell Biochem</u> **236**(1-2): 139-46.
- Djabali, K. (1999). "Cytoskeletal proteins connecting intermediate filaments to cytoplasmic and nuclear periphery." <u>Histol Histopathol</u> **14**(2): 501-9.
- Djonov, V. and A. N. Makanya (2005). "New insights into intussusceptive angiogenesis." <u>Exs(94)</u>: 17-33.
- Dollery, C. M., J. R. McEwan, et al. (1995). "Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease." <u>Circ Res</u> **77**(5): 863-8.
- Dondelinger, R. F., M. P. Ghysels, et al. (1998). "Relevant radiological anatomy of the pig as a training model in interventional radiology." <u>Eur Radiol</u> **8**(7): 1254-73.
- Eitenmuller, I., O. Volger, et al. (2006). "The range of adaptation by collateral vessels after femoral artery occlusion." <u>Circ Res</u> **99**(6): 656-62.
- Elzinga, W. E. (1969). "Ameroid constrictor: uniform closure rates and a calibration procedure." <u>J Appl Physiol</u> **27**(3): 419-21.

Fabriek, B. O., R. van Bruggen, et al. (2009). "The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria." <u>Blood</u> **113**(4): 887-92.

- Ferrara, N., H. P. Gerber, et al. (2003). "The biology of VEGF and its receptors." <u>Nat</u> <u>Med</u> **9**(6): 669-76.
- Folkman, J. (1971). "Tumor angiogenesis: therapeutic implications." <u>N Engl J Med</u> **285**(21): 1182-6.
- Folkman, J. (1976). "The vascularization of tumors." <u>Sci Am</u> 234(5): 58-64, 70-3.
- Fuchs, E. and K. Weber (1994). "Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease." <u>Annu Rev Biochem</u> **63**: 345-82.
- Fulton, W. F. (1964). "The Time Factor in the Enlargement of Anastomoses in Coronary Artery Disease." <u>Scott Med J</u> **9**: 18-23.

- Galis, Z. S., M. Muszynski, et al. (1994). "Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion." <u>Circ Res</u> **75**(1): 181-9.
- Gear, A. R. and D. Camerini (2003). "Platelet chemokines and chemokine receptors: linking hemostasis, inflammation, and host defense." <u>Microcirculation</u> **10**(3-4): 335-50.
- Graversen, J. H., M. Madsen, et al. (2002). "CD163: a signal receptor scavenging haptoglobin-hemoglobin complexes from plasma." <u>Int J Biochem Cell Biol</u> **34**(4): 309-14.
- Grundmann, S., I. Hoefer, et al. (2006). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates arteriogenesis in a pig model of peripheral artery disease using clinically applicable infusion pumps." <u>J Vasc Surg</u> **43**(6): 1263-9.
- Grundmann, S., N. van Royen, et al. (2007). "A new intra-arterial delivery platform for pro-arteriogenic compounds to stimulate collateral artery growth via transforming growth factor-beta1 release." J Am Coll Cardiol **50**(4): 351-8.
- Heil, M., I. Eitenmuller, et al. (2006). "Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences." <u>J Cell Mol Med</u> **10**(1): 45-55.
- Heil, M. and W. Schaper (2005). "Cellular mechanisms of arteriogenesis." <u>Exs</u>(94): 181-91.
- Heil, M., T. Ziegelhoeffer, et al. (2002). "Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth." <u>Am J Physiol Heart Circ Physiol</u> 283(6): H2411-9.
- Heilmann, C., F. Beyersdorf, et al. (2002). "Collateral growth: cells arrive at the construction site." <u>Cardiovasc Surg</u> **10**(6): 570-8.
- Helisch, A. and W. Schaper (2003). "Arteriogenesis: the development and growth of collateral arteries." <u>Microcirculation</u> **10**(1): 83-97.
- Henry, T. D., B. H. Annex, et al. (2003). "The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis." <u>Circulation</u> **107**(10): 1359-65.

Herold, G.: Innere Medizin, Köln 2009.

Herron, G. S., M. J. Banda, et al. (1986). "Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. II. Expression of collagenase and stromelysin activities is regulated by endogenous inhibitors." <u>J Biol Chem</u> 261(6): 2814-8.

- Hertig, A. T. (1935). <u>Angiogenesis in the early human chorion and in the primary</u> <u>placenta of the macaque monkey</u>, Carnegie Institute of Washington Publication 459, Contributions to embryology.
- Herzog, S., H. Sager, et al. (2002). "Collateral arteries grow from preexisting anastomoses in the rat hindlimb." <u>Am J Physiol Heart Circ Physiol</u> 283(5): H2012-20.
- Hillmeister, P., K. E. Lehmann, et al. (2008). "Induction of cerebral arteriogenesis leads to early-phase expression of protease inhibitors in growing collaterals of the brain." <u>J Cereb Blood Flow Metab</u> 28(11): 1811-23.
- Hoefer, I. E., N. van Royen, et al. (2001). "Time course of arteriogenesis following femoral artery occlusion in the rabbit." <u>Cardiovasc Res</u> **49**(3): 609-17.
- Hoefer, I. E., N. van Royen, et al. (2006). "Experimental models of arteriogenesis: differences and implications." Lab Anim (NY) **35**(2): 36-44.
- Hoefer, I. E., N. van Royen, et al. (2002). "Direct evidence for tumor necrosis factoralpha signaling in arteriogenesis." <u>Circulation</u> **105**(14): 1639-41.
- Hoefer, I. E., N. van Royen, et al. (2004). "Arteriogenesis proceeds via ICAM-1/Mac-1mediated mechanisms." <u>Circ Res</u> **94**(9): 1179-85.
- Hogger, P., J. Dreier, et al. (1998). "Identification of the integral membrane protein RM3/1 on human monocytes as a glucocorticoid-inducible member of the scavenger receptor cysteine-rich family (CD163)." <u>J Immunol</u> **161**(4): 1883-90.
- Hughes, G. C., M. J. Post, et al. (2003). "Translational physiology: porcine models of human coronary artery disease: implications for preclinical trials of therapeutic angiogenesis." <u>J Appl Physiol</u> **94**(5): 1689-701.
- Ikeda, Y., Y. Yonemitsu, et al. (2002). "Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates pulmonary hypertension in rats." <u>Am J Physiol Heart Circ</u> <u>Physiol</u> 283(5): H2021-8.
- Ishida, A., J. Murray, et al. (2001). "Expression of vascular endothelial growth factor receptors in smooth muscle cells." <u>J Cell Physiol</u> **188**(3): 359-68.
- Isner, J. M., A. Pieczek, et al. (1996). "Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb." Lancet **348**(9024): 370-4.
- Ito, W. D., M. Arras, et al. (1997). "Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion." <u>Circ Res</u> 80(6): 829-37.

- Jang, Y. C., S. Arumugam, et al. (1999). "Role of alpha(v) integrins and angiogenesis during wound repair." Wound Repair Regen **7**(5): 375-80.
- Johnson, G. J., T. R. Griggs, et al. (1999). "The utility of animal models in the preclinical study of interventions to prevent human coronary artery restenosis: analysis and recommendations. On behalf of the Subcommittee on Animal, Cellular and Molecular Models of Thrombosis and Haemostasis of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis." <u>Thromb Haemost</u> **81**(5): 835-43.
- Kawata, Y., K. Sako, et al. (1996). "Sequential changes in cerebrovascular reserve capacity in three-vessel occlusion rats." <u>Brain Res</u> **739**(1-2): 330-4.
- Khmelewski, E., A. Becker, et al. (2004). "Tissue resident cells play a dominant role in arteriogenesis and concomitant macrophage accumulation." <u>Circ Res</u> 95(6): E56-64.
- Kodali, R., M. Hajjou, et al. (2006). "Chemokines induce matrix metalloproteinase-2 through activation of epidermal growth factor receptor in arterial smooth muscle cells." <u>Cardiovasc Res</u> 69(3): 706-15.
- Kristiansen, M., J. H. Graversen, et al. (2001). "Identification of the haemoglobin scavenger receptor." <u>Nature</u> **409**(6817): 198-201.
- Kusch, A., S. Tkachuk, et al. (2002). "Monocyte-expressed urokinase regulates human vascular smooth muscle cell migration in a coculture model." <u>Biol Chem</u> 383(1): 217-21.
- Lane, E. B., B. L. Hogan, et al. (1983). "Co-expression of vimentin and cytokeratins in parietal endoderm cells of early mouse embryo." <u>Nature</u> **303**(5919): 701-4.
- Lee, D. H., C. H. Wriedt, et al. (1989). "Evaluation of three embolic agents in pig rete." <u>AJNR Am J Neuroradiol</u> **10**(4): 773-6.
- Longland, C. J. (1953). "Collateral circulation in the limb." Postgrad Med J **29**(335): 456-8.
- Loufrani, L., Z. Li, et al. (2002). "Excessive microvascular adaptation to changes in blood flow in mice lacking gene encoding for desmin." <u>Arterioscler Thromb Vasc</u> <u>Biol 22(10)</u>: 1579-84.
- Mannello, F. and G. Gazzanelli (2001). "Tissue inhibitors of metalloproteinases and programmed cell death: conundrums, controversies and potential implications." <u>Apoptosis</u> 6(6): 479-82.

- Martin, N. and H. Vinters (1990). "Pathology and grading of intracranial vascular malformations. In: Barrow DL, ed. Intracranial Vascular Malformations: Neurosurgical Topics.." American Association of Neurological Surgeons: 1-31.
- Massoud, T. F., C. Ji, et al. (1994). "An experimental arteriovenous malformation model in swine: anatomic basis and construction technique." <u>AJNR Am J Neuroradiol</u> **15**(8): 1537-45.
- Massoud, T. F., H. V. Vinters, et al. (2000). "Histopathologic characteristics of a chronic arteriovenous malformation in a swine model: preliminary study." <u>AJNR Am J</u> <u>Neuroradiol</u> **21**(7): 1268-76.
- Matsushima, K., C. G. Larsen, et al. (1989). "Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line." <u>J Exp Med</u> **169**(4): 1485-90.
- Menshikov, M., E. Elizarova, et al. (2002). "Urokinase upregulates matrix metalloproteinase-9 expression in THP-1 monocytes via gene transcription and protein synthesis." <u>Biochem J</u> 367(Pt 3): 833-9.
- Milkiewicz, M., C. Kelland, et al. (2006). "Nitric oxide and p38 MAP kinase mediate shear stress-dependent inhibition of MMP-2 production in microvascular endothelial cells." <u>J Cell Physiol</u> 208(1): 229-37.
- Nagasawa, T., H. Kikutani, et al. (1994). "Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **91**(6): 2305-9.
- Namiki, M., S. Kawashima, et al. (2002). "Local overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 at vessel wall induces infiltration of macrophages and formation of atherosclerotic lesion: synergism with hypercholesterolemia." <u>Arterioscler Thromb Vasc Biol</u> 22(1): 115-20.
- Neufeld, G., T. Cohen, et al. (2002). "The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis." <u>Trends</u> <u>Cardiovasc Med</u> **12**(1): 13-9.
- Olsson, A. K., A. Dimberg, et al. (2006). "VEGF receptor signalling in control of vascular function." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> **7**(5): 359-71.
- Padget, D. H. (1948). "The development of the cranial arteries in the human embryo." <u>Contrib Embryol</u> **32**: 205.
- Park, H. J., K. Chang, et al. (2008). "Coronary collaterals: the role of MCP-1 during the early phase of acute myocardial infarction." Int J Cardiol **130**(3): 409-13.

- Pipp, F., S. Boehm, et al. (2004). "Elevated fluid shear stress enhances postocclusive collateral artery growth and gene expression in the pig hind limb." <u>Arterioscler</u> Thromb Vasc Biol **24**(9): 1664-8.
- Polfliet, M. M., B. O. Fabriek, et al. (2006). "The rat macrophage scavenger receptor CD163: expression, regulation and role in inflammatory mediator production." Immunobiology **211**(6-8): 419-25.
- Polverini, P. J., P. S. Cotran, et al. (1977). "Activated macrophages induce vascular proliferation." <u>Nature</u> **269**(5631): 804-6.
- Protasiewicz, J. and R. Adamiec (2005). "[The role of CD44 in pathogenesis of atherosclerosis]." Pol Merkur Lekarski **19**(112): 559-62.
- Rajagopalan, S., E. R. Mohler et al. (2003). "Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication." <u>Circulation</u> **108**(16): 1933-8.
- Rhinn, H., C. Marchand-Leroux, et al. (2008). "Housekeeping while brain's storming Validation of normalizing factors for gene expression studies in a murine model of traumatic brain injury." <u>BMC Mol Biol</u> **9**: 62.
- Ribatti, D., A. Vacca, et al. (2001). "Postnatal vasculogenesis." <u>Mech Dev</u> **100**(2): 157-63.
- Risau, W. (1997). "Mechanisms of angiogenesis." Nature 386(6626): 671-4.
- Risau, W. and I. Flamme (1995). "Vasculogenesis." Annu Rev Cell Dev Biol 11: 73-91.
- Rollins, B. J. (1997). "Chemokines." <u>Blood</u> 90(3): 909-28.
- Rosenkilde, M. M. and T. W. Schwartz (2004). "The chemokine system -- a major regulator of angiogenesis in health and disease." <u>Apmis</u> **112**(7-8): 481-95.
- Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." <u>N Engl J Med</u> **340**(2): 115-26.
- Sabia, P. J., E. R. Powers, et al. (1992). "An association between collateral blood flow and myocardial viability in patients with recent myocardial infarction." <u>N Engl J</u> Med **327**(26): 1825-31.
- Schaer, D. J., F. S. Boretti, et al. (2001). "Molecular cloning and characterization of the mouse CD163 homologue, a highly glucocorticoid-inducible member of the scavenger receptor cysteine-rich family." <u>Immunogenetics</u> 53(2): 170-7.

- Schaper, J., R. Konig, et al. (1976). "The endothelial surface of growing coronary collateral arteries. Intimal margination and diapedesis of monocytes. A combined SEM and TEM study." Virchows Arch A Pathol Anat Histol **370**(3): 193-205.
- Schaper, W. (2009). "Collateral circulation: past and present." <u>Basic Res Cardiol</u> **104**(1): 5-21.
- Schaper, W., M. De Brabander, et al. (1971). "DNA synthesis and mitoses in coronary collateral vessels of the dog." <u>Circ Res</u> **28**(6): 671-9.
- Schaper, W. and W. D. Ito (1996). "Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth." <u>Circ Res</u> **79**(5): 911-9.
- Schaper, W., J. J. Piek, et al. (1999). <u>Collateral circulation of the heart, in Ware JA,</u> <u>Simons M (eds.): Angiogenesis and Cardiovascular Disease</u>. New York, NY, Oxford, Oxford University Press.
- Schaper, W. and J Schaper: <u>Collateral development and function in man. In Collateral</u> <u>Circulation-Heart, Brain, Kidney, Limbs</u>. Boston, Dordrecht, London, Kluwer Academic Publishers 1993.
- Schaper, W. and J. Schaper: <u>Arteriogenesis</u>. Boston, Dordrecht, London, Kluwer Academic Publishers 2004.
- Schierling, W., K. Troidl, et al. (2009). "The role of angiogenic growth factors in arteriogenesis." <u>J Vasc Res</u> **46**(4): 365-74.
- Schiffers, P. M., D. Henrion, et al. (2000). "Altered flow-induced arterial remodeling in vimentin-deficient mice." <u>Arterioscler Thromb Vasc Biol</u> **20**(3): 611-6.
- Schirmer, S. H., N. van Royen, et al. (2009). "[Mechanisms and potential of the therapeutic stimulation of arteriogenesis]." <u>Dtsch Med Wochenschr</u> **134**(7): 302-6.
- Schnittler, H. J., T. Schmandra, et al. (1998). "Correlation of endothelial vimentin content with hemodynamic parameters." <u>Histochem Cell Biol</u> **110**(2): 161-7.
- Schober, A., E. Karshovska, et al. (2006). "SDF-1alpha-mediated tissue repair by stem cells: a promising tool in cardiovascular medicine?" <u>Trends Cardiovasc Med</u> **16**(4): 103-8.
- Scholz, D., W. J. Cai, et al. (2001). "Arteriogenesis, a new concept of vascular adaptation in occlusive disease." <u>Angiogenesis</u> **4**(4): 247-57.
- Scholz, D., W. Ito, et al. (2000). "Ultrastructure and molecular histology of rabbit hindlimb collateral artery growth (arteriogenesis)." <u>Virchows Arch</u> **436**(3): 257-70.

- Scholz, D., T. Ziegelhoeffer, et al. (2002). "Contribution of arteriogenesis and angiogenesis to postocclusive hindlimb perfusion in mice." <u>J Mol Cell Cardiol</u> **34**(7): 775-87.
- Seiler, C. (2003). "The human coronary collateral circulation." Heart 89(11): 1352-7.
- Seki, N., J. Kodama, et al. (2000). "Vascular endothelial growth factor and plateletderived endothelial cell growth factor expression are implicated in the angiogenesis of endometrial cancer." <u>Eur J Cancer</u> **36**(1): 68-73.
- Semenza, G. (2002). "Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1." <u>Biochem</u> <u>Pharmacol</u> **64**(5-6): 993-8.
- Senger, D. R., S. J. Galli, et al. (1983). "Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid." <u>Science</u> **219**(4587): 983-5.
- Sharma, H. S., M. Wunsch, et al. (1992). "Molecular biology of the coronary vascular and myocardial responses to ischemia." <u>J Cardiovasc Pharmacol</u> **20 Suppl 1**: S23-31.
- Shi, G., Z. Zhang, et al. (2010). "Selection of reference genes for quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction in concanavalin A-induced hepatitis model." <u>Anal Biochem</u> **401**(1): 81-90.
- Stehbens, W. E. (1968). "Blood vessel changes in chronic experimental arteriovenous fistulas." <u>Surg Gynecol Obstet</u> **127**(2): 327-38.
- Stern-Straeter, J., G. A. Bonaterra, et al. (2009). "Identification of valid reference genes during the differentiation of human myoblasts." <u>BMC Mol Biol</u> **10**: 66.
- Tchaikovski, V., G. Fellbrich, et al. (2008). "The molecular basis of VEGFR-1 signal transduction pathways in primary human monocytes." <u>Arterioscler Thromb Vasc</u> <u>Biol</u> **28**(2): 322-8.
- van Oostrom, M. C., O. van Oostrom, et al. (2008). "Insights into mechanisms behind arteriogenesis: what does the future hold?" <u>J Leukoc Biol</u> **84**(6): 1379-91.
- van Royen, N., I. Hoefer, et al. (2003). "Effects of local MCP-1 protein therapy on the development of the collateral circulation and atherosclerosis in Watanabe hyperlipidemic rabbits." <u>Cardiovasc Res</u> **57**(1): 178-85.
- Vlodavsky, I., J. Folkman, et al. (1987). "Endothelial cell-derived basic fibroblast growth factor: synthesis and deposition into subendothelial extracellular matrix." <u>Proc</u> <u>Natl Acad Sci U S A</u> 84(8): 2292-6.

- Waltenberger, J., L. Claesson-Welsh, et al. (1994). "Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor." J Biol Chem **269**(43): 26988-95.
- Wang, N. and D. Stamenovic (2002). "Mechanics of vimentin intermediate filaments." J <u>Muscle Res Cell Motil</u> **23**(5-6): 535-40.
- Yiqin, Y., X. Meilin, et al. (2009). "Aspirin inhibits MMP-2 and MMP-9 expression and activity through PPARalpha/gamma and TIMP-1-mediated mechanisms in cultured mouse celiac macrophages." Inflammation **32**(4): 233-41.
- Zernecke, A., A. Schober, et al. (2005). "SDF-1alpha/CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells." <u>Circ</u> <u>Res</u> 96(7): 784-91.
- Ziegelhoeffer, T., D. Scholz, et al. (2003). "Inhibition of collateral artery growth by mibefradil: possible role of volume-regulated chloride channels." <u>Endothelium</u> **10**(4-5): 237-46.
- Zimmermann, R., M. Arras, et al. (1997). "Time course of mitosis and collateral growth following coronary microembolization in the porcine heart." <u>Cell Tissue Res</u> **287**(3): 583-90.
- Zwadlo, G., R. Voegeli, et al. (1987). "A monoclonal antibody to a novel differentiation antigen on human macrophages associated with the down-regulatory phase of the inflammatory process." <u>Exp Cell Biol</u> **55**(6): 295-304.

8. Abkürzungsverzeichnis

A.	Arterie
Aa.	Arterien
Abb.	Abbildung
ABC-Komplex	Avidin-Biotin-Komplex
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
av	arteriovenös
AVM	arteriovenous malformation
bFGF	basic fibroblast growth factor
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD44/163	cluster of differentiation 44/163
cDNA	copy Desoxyribonucleinsäure
cm	Zentimeter
Ct	cycle threshold
d	Тад
ΔΔCt	cycle thereshold-Methode
DEPD	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
ΔΡ	Druckdifferenz
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
3-VO	three vessel occlusion
EC	Endothelzellen
ECM	extrazelluläre Matrix
et al.	et alii
F	French
FSS	fluid shear stress
g	Gramm
GAPDH	glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase

GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor
°C	Grad Celsius
HCL	Chlorwasserstoff
H2O2	Wasserstoffperoxid
HGF	hepatocyte growth factor
HIF-1	hypoxia inducible factor-1
HPRT	hypoxanthin phosphoribosyl transferase
η	dynamische Viskosität
I	Stromstärke
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IF	Intermediärfilament
IL	Interleukin
kg	Kilogramm
I	Länge
Μ	Mol
M.	Musculus
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
mg	Milligramm
mm	Millimeter
ml	Milliliter
MMP-2	matrix metalloproteinase-2
MP	mini pig
n	Anzahl
NAOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NTC	non template control
OT	Objektträger
PBS	phosphate buffered saline
PBSA	phosphate buffered saline albumin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF-B	platelet-derived growth factor-b

PTA	perkutane transluminale Angioplastie
PTCA	perkutane transluminale Koronarangioplastie
qRT-PCR	quantitative reverse Transkriptase-PCR
R	Widerstand
r	Radius
rcf	relative centrifugal force
RIN	RNA integrity number
RNA	Ribonukleinsäure
RPLP0	ribosomales protein large P0
rpm	revolutions per minute
rRNA	ribosomales RNA
RT	Reverse Transkriptase
	Raumtemperatur
SDF-1	stromal cell-derived factor-1
SEM	standard error of the mean (Standardfehler)
SMC	smooth muscle cell
SRCR	scavenger receptor cysteine rich
SSRE	shear stress response element
т	Scherkraft
Tab.	Tabelle
TGF-β	transforming growth factor-β
TIMP-1	tissue inhibitor of metalloproteinase-1
TNF-α	tumor necrosis factor-α
U	unit
u. a.	unter anderem
uPA	urokinase plasminogen activator
V.	Vena
VEGFA	vascular endothelial growth factor A
VEGFR	VEGF receptor

9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

9.1 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1- Angiogenese
- Abbildung 2 Arteriogenese
- Abbildung 3 Elektronenmikroskopische Aufnahme von Makrophagen
- Abbildung 4 Plastikguss beider carotiden Rete mirabile des Schweins
- Abbildung 5 Schematische Darstellung des AV-Shunt-Modells
- Abbildung 6 Postmortem Angiographien von unterschiedlich
- behandelten Kaninchenhinterläufen
- Abbildung 7 Postoperative Angiographien des Rete mirabile
- Abbildung 8 Angiographie des Rete mirabile mit Unterteilung

in acht Segmente

- Abbildung 9 Immunhistochemische Färbung der B-Region
- mit Ki67-Antikörper
- Abbildung 10 Graphische Darstellung der Färbung
- mit Ki67-Antikörper
- Abbildung 11 Immunhistochemische Färbung der B-Region
- mit CD163-Antikörper
- Abbildung 12 Graphische Darstellung der Färbung
- mit CD163-Antikörper
- Abbildung 13 Immunhistochemische Färbung der Rete- und Shuntregionen
- mit CD163-Antikörper
- Abbildung 14 Graphische Darstellung der Rete- und Shuntregionen
- mit CD163- Antikörper
- Abbildung 15 Expression von TIMP-1 bezogen auf RPLP0.
- Darstellung aller Proben separat
- Abbildung 16 Expression von TIMP-1 bezogen auf RPLP0.
- Dastellung der Gruppenmittelwerte
- Abbildung 17 Expression von MMP-2 bezogen auf RPLP0.
- Darstellung aller Proben separat
- Abbildung 18 Expression von MMP-2 bezogen auf RPLP0.
- Darstellung der Gruppenmittelwerte

Abbildung 19 - Expression von MCP-1 bezogen auf RPLP0.

Darstellung aller Proben separat

Abbildung 20 - Expression von MCP-1 bezogen auf RPLP0.

Darstellung der Gruppen mittelwerte

Abbildung 21 - Expression von CD44 bezogen auf RPLP0.

Darstellung aller Proben separat

Abbildung 21 - Expression von CD44 bezogen auf RPLP0.

Darstellung der Gruppenmittelwerte

Abbildung 22 - Expression von VEGFA bezogen auf RPLP0.

Darstellung aller Proben separat

Abbildung 23 - Expression von VEGFA bezogen auf RPLP0.

Darstellung der Gruppenmittelwerte

Abbildung 24 - Expression von SDF-1 bezogen auf RPLP0.

Darstellung aller Proben separat

Abbildung 25 - Expression von SDF-1 bezogen auf RPLP0.

Darstellung der Gruppenmittelwerte

Abbildung 26 - Expression von Vimentin bezogen auf RPLP0.

Darstellung aller Proben separat

Abbildung 27 - Expression von Vimentin bezogen auf RPLP0.

Darstellung der Gruppenmittelwerte

9.2. Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1 Primärantikörper
- Tabelle 2 Chemikalien für die immunhistochemische Analyse
- Tabelle 3 Geräte für die immunhistochemische Analyse
- Tabelle 4 Primersequenzen
- Tabelle 5 Chemikalien für die RNA-Analyse
- Tabelle 6 Geräte für die RNA-Analyse

Tabelle 7 - Zuordnung der Proben zu Behandlungsgruppen

mit dem ermittelten RNA-Quantität und -Qualität

Tabelle 8 - Zusammenfassung der $\Delta\Delta$ CT-Auswertung der F- und A-Regionen

Publikationsliste

10. Publikationsliste

Lehmann, K., **Lee, E.-J**., Jacobi, D., John, A.-K., Ulusans, S., Schumacher, M., Klisch, J., Buschmann, I.R., 2011. Induction of cerebral arteriogenesis by an arterio-venous shunt/fistula in a pig model. (Manuskript in Vorbereitung)

Duelsner, André; Gatzke, Nora; Glaser, Johanna; Hillmeister, Philipp; Li, Meijing; **Lee**, **Eun-Ji**; Lehmann, Kerstin; Urban, Daniel; Meyborg, Heike; Stawowy, Philipp; Busjahn, Andreas; Bondke, Anja; Nagorka, Stephanie; Buschmann, Ivo. Acetylsalicylic Acid, but not Clopidogrel, Inhibits Therapeutically Induced Cerebral Arteriogenesis in the Hypoperfused Rat Brain, JCBFM. Published.

11. Curriculum Vitae

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

12. Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Ivo Buschmann sehr für die Ermöglichung der Doktorarbeit und die Projektbesprechungen während der Durchführung, die mir jedes Mal Motivation und neue Ideen geschenkt haben. Frau Dr. rer. nat. Kerstin Lehmann bin ich sehr dankbar, dass sie mit ihren Ratschlägen an meiner Seite gestanden und mir zugetraut hat, eine gelungene Arbeit zu vollenden. Ich danke allen Personen meiner Arbeitsgruppe, die sich immer wieder gern für Fragen zur Verfügung gestellt haben. Mein besonderer Dank geht dabei an Dorit Jacobi, Franziska Weber und André Duelsner.

Ein besonders herzlicher Dank geht an die Gutachter meiner Dissertation, Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. W. Schaper und Herrn PD Dr. med. P. Stawowy. Ich schätze sehr ihre mühevolle Arbeit der Erstellung der Begutachtung.

Weiterhin danke ich den Prüfern Herrn PD Dr. C. Große-Siestrup, Herrn Prof. Dr. A. Pries und Herrn PD Dr. H. Laube. Die Vorbereitungszeit mit der anschließenden Prüfung waren ein Erkenntnisgewinn für mich.

Ich danke meiner Familie und allen Freunden, die mir Kraft für die Durchführung geschenkt und mir zur Seite gestanden haben.

Gott gebührt die ganze Ehre. Denn von Ihm und durch Ihn und zu Ihm sind alle Dinge. Ich danke Gott, dass er mich bis zum Ende der Arbeit Schritt für Schritt begleitet und ermöglicht hat, diese zu vollenden.

13. Selbstständigkeitserklärung

Ich, Eun-Ji Lee, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Charakterisierung von Arteriogenese-Markern in einem AV-Shunt-Modell: das carotide Rete mirabile im Minischwein" 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.

Datum: 24. 02. 2012

Eun-Ji Lee