

Aus der
Chirurgischen Universitätsklinik,
Abteilung Herz- und Gefäßchirurgie
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau

**Einfluss von Wachstumsfaktoren und
Wachstumsfaktorkombinationen auf Angio- und Arteriogenese am
ischämischen Kaninchenmyokard.**

Eine histologische Studie

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung des Medizinischen Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg im Breisgau

Vorgelegt
Von Anna Laura Bredow
geboren in Göttingen

Dekan: Prof. Dr. Christoph Peters

1. Gutachter: Prof. Dr. Friedhelm Beyersdorf

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Bernd-Ulrich von Specht

Jahr der Promotion: 2006

Teile dieser Arbeit wurden bisher veröffentlicht:

Heilmann C, Tascher S, Bredow L, Renner T, Göbel H, Attmann T, Bort C, Beyersdorf F, Lutter G. Combined VEGF and FGF-2 Therapy Promotes Dose-Dependently Angiogenesis and Function in Chronic Myocardial Ischemia. Thorac Cardiovasc Surg 52 (2004) MP31-15

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	8
1.1 ISCHÄMISCHE HERZKRANKHEIT	8
1.2 THERAPEUTISCHE ANGIOGENESE UND ARTERIOGENESE	9
<i>1.2.1 Mechanismen der Blutgefäßentwicklung</i>	<i>9</i>
1.2.1.1 Vaskulogenese.....	10
1.2.1.2 Angiogenese	10
1.2.1.3 Arteriogenese	11
<i>1.2.2 Wachstumsfaktoren</i>	<i>13</i>
1.2.2.1 VEGF	13
1.2.2.2 FGF-2	16
1.2.2.3 GM-CSF	17
1.3 FRAGESTELLUNG	20
2 MATERIAL UND METHODEN	20
2.1 VERSUCHSABLAUF	21
<i>2.1.1 Prämedikation und Operationsvorbereitung</i>	<i>22</i>
<i>2.1.2 Narkose und Beatmung</i>	<i>22</i>
<i>2.1.3 Operationsablauf.....</i>	<i>23</i>
2.1.3.1 Erste Operation (Stenose).....	23
2.1.3.2 Zweite Operation (Therapie).....	25
2.1.3.3 Dritte Operation (Endoperation)	26
2.2 PARAMETER	27
2.3 EXPERIMENTELLE GRUPPEN	28
2.4 HISTOLOGIE.....	29
<i>2.4.1 Entnahme und Aufarbeitung der Gewebeproben.....</i>	<i>29</i>
<i>2.4.2 Färbemethoden.....</i>	<i>29</i>
2.4.2.1 Routinefärbungen	29
2.4.2.2. Immunhistochemie	30
2.4.2.2.1 Anti-CD31 (CD31).....	31

2.4.2.2.2 Anti-Smooth-Muscle-Actin (SMA)	33
2.4.3 <i>Lichtmikroskopische Auswertung und Auszählung</i>	34
2.5 STATISTISCHE AUSWERTUNG	35
3 ERGEBNISSE	36
3.1 GRUPPENSTATISTIK	36
3.2 ROUTINEHISTOLOGIE	37
3.3 IMMUNHISTOLOGIE	37
3.3.1 <i>Einzelfaktoren</i>	38
3.3.1.1 Kapillardichte	38
3.3.1.2 Arterioldichte	39
3.3.2 <i>Kombinationstherapie</i>	40
3.3.2.1 Kapillardichte	40
3.3.2.2 Arterioldichte	43
4 DISKUSSION	45
4.1 TIERMODELL	45
4.2 WACHSTUMSFAKTORAPPLIKATION	46
4.2.1 <i>Darreichungsform</i>	46
4.2.2 <i>Injektionsart</i>	48
4.2.3 <i>Dosis</i>	49
4.3 HISTOLOGIE	50
4.4 EINZELFAKTORERGEBNISSE	51
4.4.1 <i>FGF-2 oder VEGF</i>	51
4.4.2 <i>GM-CSF</i>	55
4.5 KOMBINATION VON VEGF UND FGF	56
4.6 KLINISCHE ANWENDUNG	60
4.6.1 <i>Angiogene Therapie ischämischer Krankheiten</i>	60
4.6.2 <i>Antiangiogene Tumorthherapie</i>	63
5 ZUSAMMENFASSUNG	65

6 ANHANG	66
6.1 TABELLEN ÜBER LETALITÄT UND VERSUCHSAUSSCHLUSS.....	66
6.2 TABELLEN DER MITTELWERTE PRO VERSUCHSTIER	68
6.3 ABBILDUNGEN.....	70
7 LITERATURVERZEICHNIS	73
8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	85
8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	85
9 HERSTELLERNACHWEIS.....	88
9.1 MATERIALIEN OP	88
9.2 MATERIALIEN LABOR.....	92
DANKSAGUNG	95
LEBENS LAUF	96

1 Einleitung

1.1 Ischämische Herzkrankheit

Die ischämische Herzkrankheit verursacht mehr Todesfälle, Behinderungen und ökonomische Kosten als jede andere Erkrankung in der entwickelten Welt. Sie stellt die häufigste chronische, lebensbedrohende Krankheit in den USA dar (102). In Deutschland hat die koronare Herzkrankheit (KHK) eine Lebenszeitprävalenz von circa 30% für Männer und circa 15% für Frauen. (48). Dabei werden in der Welt starke Zunahmen der ischämischen Herzkrankheit verzeichnet, und bis zum Jahr 2020 könnte die ischämische Herzkrankheit auch weltweit die häufigste Todesursache darstellen (102).

Krankheitsbilder, die auf einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf des Myokards beruhen, werden unter dem Begriff „ischämische Herzkrankheit“ zusammengefasst. Dabei wird die Sauerstoffversorgung der Herzmuskulatur vor allem durch Stenosen im koronaren Gefäßsystem gedrosselt, was als Koronarinsuffizienz bezeichnet wird.

Der klinische Begriff „koronare Herzkrankheit“ bezeichnet die durch Atherosklerose der Herzkranzgefäße entstandene ischämische Herzkrankheit. Bedingt durch flusslimitierende Koronarstenosen kommt es zur Koronarinsuffizienz. Die dadurch hervorgerufene Myokardischämie hat verschiedene Manifestationsformen: Angina pectoris und Herzinfarkt, ischämische Herzmuskelschädigung mit Linksherzinsuffizienz sowie Herzrhythmusstörungen und Sekundenherztod sind dieser Erkrankung zuzuschreiben.

Es gibt eine Reihe von Risikofaktoren, die das Auftreten der KHK fördern und sich dabei gegenseitig additiv verstärken, wie Alter und männliches Geschlecht sowie Hyperlipoproteinämien, Zigarettenrauch, Hypertonie, Diabetes mellitus, Adipositas und Hyperhomocysteinämie (85).

Die medikamentöse Therapie dieser weit verbreiteten Erkrankung beruht, abgesehen vom einem Risikofaktorenmanagement, einerseits auf dem Prinzip der Steigerung des Sauerstoffangebotes, andererseits auf der Senkung des Sauerstoffbedarfs (96). Des Weiteren kommen invasive Verfahren wie die perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) oder die Bypasschirurgie zum Einsatz, um funktionelle Stenosen zu beseitigen (25).

Dennoch sind die Möglichkeiten und Erfolge sowohl der medikamentösen als auch der invasiven oder chirurgischen Therapie eingeschränkt.

So sind diffus bis in die Peripherie verteilte Verengungen kleiner intramuraler Arterien, charakteristisch für „Small Vessel Disease“ (85), den Standardrevaskularisationsverfahren nicht zugänglich. Weitere limitierende Faktoren stellen Restenosen und Bypassverschlüsse dar, so dass für Patienten mit schwerer koronarer Herzkrankheit alternative Behandlungsstrategien von großer Bedeutung wären. Dies ist Gegenstand der aktuellen Forschung.

Neue Therapieoptionen könnte in diesem Zusammenhang die Behandlung mit angiogenen Wachstumsfaktoren bieten.

1.2 Therapeutische Angiogenese und Arteriogenese

Die Erforschung von Grundlagen der Blutgefäßentwicklung sowie von biologischen Eigenschaften diverser Wachstumsfaktoren führte zu einem neuen Therapieansatz zur Behandlung ischämischer Erkrankungen. Es entstand die Idee, mittels verschiedener Wachstumsfaktoren das Gefäß- und Kollateralwachstum im Zielgewebe zu stimulieren und damit die Sauerstoffversorgung zu verbessern. In diesem Zusammenhang spricht man auch von therapeutischer Angiogenese und Arteriogenese (37, 45, 63, 66, 106).

1.2.1 Mechanismen der Blutgefäßentwicklung

Blutgefäße bilden das erste Organ im Embryo und formen das größte Netzwerk in unserem Körper (16).

Man unterscheidet drei verschiedene Grundprinzipien der Blutgefäßentstehung: Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese.

1.2.1.1 Vaskulogenese

Bei der Vaskulogenese handelt es sich um die Bildung von Blutgefäßen durch endotheliale Progenitorzellen (16).

Die embryonale Blutgefäßentwicklung beginnt mit der Vaskulogenese. Im Dottersack formen Hämangioblasten Mesenchymzellaggregate, so genannte Blutinseln, in welchen sich die innen gelegenen Zellen zu hämatopoetischen Vorläuferzellen und die äusseren Zellen zu Endothelzellvorläufern entwickeln (21). Diese undifferenzierten endothelialen Precursorzellen (Angioblasten) differenzieren in situ zu Endothelzellen, welche sich zu einem primitiven Netzwerk anordnen.

Die Angioblastendifferenzierung wird unter anderem durch Wachstumsfaktoren wie VEGF (vascular endothelial growth factor) und FGF-2 (bFGF, basic fibroblast growth factor) sowie ihre Rezeptoren beeinflusst (17). So führt beispielsweise die Inaktivierung des VEGFR2 (Flk-1)-Gens bei Mäusen zu embryonaler Letalität aufgrund mangelnder Entwicklung von sowohl endothelialen als auch hämatopoetischen Zelllinien (103).

Früher dachte man, Blutgefäßentwicklung aus endothelialen Precursorzellen (Vaskulogenese) sei auf die Embryonalzeit beschränkt, aber mittlerweile weiß man, dass auch im adulten Organismus diese Endothelvorläuferzellen in Knochenmark und peripherem Blut zu finden sind. Auch hier können Wachstumsfaktoren wie VEGF oder GM-CSF (granulocyte-monocyte-colony-stimulating-factor) die Differenzierung und Mobilisation von Angioblasten stimulieren (21).

1.2.1.2 Angiogenese

Unter Angiogenese versteht man die Entstehung von reifen Kapillaren.

Das im Embryo durch Vaskulogenese entstandene primitive Netzwerk wird durch Wachstum und Remodellierungsprozesse zu einem komplexen Gefäßnetzwerk umgebaut (17). Hierbei unterscheidet man verschiedene zelluläre Mechanismen (siehe auch Abb.1):

Der Prozess der Aussprossung beginnt mit NO-vermittelter Vasodilatation bereits bestehender Gefäße. Die Gefäßpermeabilität nimmt in Antwort auf VEGF zu und erlaubt die Extravasation von Plasmaproteinen, die ein Gerüst für migrierende Endothelzellen darstellen. Daraufhin werden

die intraendothelialen Zellkontakte gelockert und die umgebende Interzellulärmatrix durch eine Anzahl von Proteasen degradiert. So können die Endothelzellen migrieren und neue Lumen formen.

Bereits bestehende Gefäße können sich auch durch Bildung endothelialer Zellbrücken oder durch Insertion interstitieller Gewebekolumnen in individuelle Tochtergefäße teilen (21).

Auch adulte Endothelzellen können neue Blutgefäße bilden (adulte Angiogenese). Dies findet zum Beispiel physiologischerweise im Ovarialzyklus, pathologischerweise in Tumoren, bei ophthalmologischen und rheumatischen Erkrankungen sowie, von Entzündung begleitet, in der Wundheilung statt.

Die Faktoren, welche die embryonale Angiogenese regulieren, sind auch für die adulte Angiogenese nötig (86). Sowohl FGF als auch VEGF und seine Rezeptoren beeinflussen embryonale, neonatale und pathologische Angiogenese (17).

Dennoch scheint sich die molekulare Basis von Angiogenese im Embryo von der pathologischen Angiogenese beim Erwachsenen zu unterscheiden. So scheinen adulte Gefäße weniger sensitiv für VEGF-Entzug zu sein als embryonale (21).

Abgesehen von Angiogenese-Stimulatoren wie VEGF und FGF gibt es auch Stoffe, welche die Angiogenese inhibieren, z.B. Angiostatin, Endostatin, Antithrombin III, Interferon β und Plättchenfaktor 4 (21). Derartige Stoffe sind interessant für Krankheiten, bei denen Gefäßwachstum unerwünscht ist. So werden Angiogeneseinhibitoren beispielsweise für die Krebstherapie erforscht und eingesetzt, denn durch Gefäße sind Tumoren in der Lage zu wachsen und zu metastasieren (33).

1.2.1.3 Arteriogenese

Unter Arteriogenese versteht man die Reifung der durch Angiogenese entstandenen Gefäßstrukturen durch Rekrutierung glatter Muskelzellen (17) (siehe auch Abb. 1).

Gefäße bilden sich leichter zurück, solange sie nicht von glatten Muskelzellen umgeben sind. Glatte Muskelzellen stabilisieren die Gefäße durch Inhibition von Endothelzellproliferation und

-migration. Des Weiteren sind periendotheliale Zellen metabolisch aktiv und exprimieren eine Vielzahl von vasoaktiven Peptiden und Wachstumsfaktoren (21).

Die glatten Muskelzellen der Gefäßwände haben je nach Lokalisation eine unterschiedliche Herkunft. Sie können aus Endothelzellen, mesenchymalen Zellen, Precursorzellen des Knochenmarks oder aus Makrophagen differenzieren; in den Koronararterien werden Muralzellen aus der epikardialen Schicht rekrutiert.

Sobald Muralzellen rekrutiert worden sind, muskularisieren sie das entstehende Gefäßsystem durch Migration entlang bestehender Gefäße; im Herzen geschieht dies von epikardal nach endokardial (17).

Kommt es zum Verschluss einer Versorgungsarterie, beispielsweise im Myokard, so führt dies zur adaptiven Arteriogenese, das heisst, vorbestehende Kollateralarteriolen wachsen und vergrößern sich (21, 95). Hierbei spielen Entzündungszellen eine Rolle: Rekrutierte Monozyten infiltrieren die Gefäßwand und remodellieren diese durch Freisetzung proteolytischer Enzyme. Aktivierte Endothelzellen exprimieren dann unter anderem verstärkt bFGF, welches das Wachstum von glatten Gefäßmuskelzellen stimuliert und zur Gefäßvergrößerung führt (21). Dies erklärt, wieso GM-CSF und andere Stoffe, die Monozyten stimulieren, das Kollateralwachstum fördern (16). Adaptive Arteriogenese resultiert schliesslich in funktionell und strukturell normalen Arterien (21).

Daher ist nicht nur die kapilläre Angiogenese als wichtiges Therapieziel in der Behandlung von Gewebhypoxien/-ischämien anzusehen, sondern auch das Arterienwachstum durch Arteriogenese: Während proximale Arterien den Zufluss zum Gewebe bereitstellen, verteilen die distalen Kapillaren das Blut im Gewebe (16).

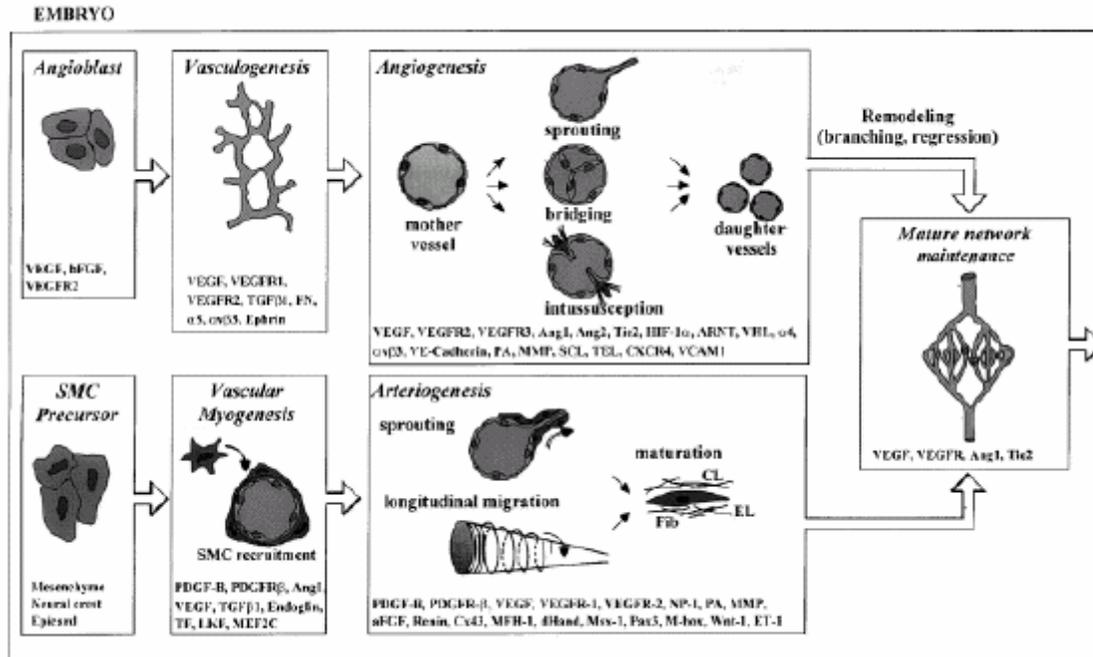


Abbildung 1: Mechanismen der Blutgefäßentwicklung: Endotheliale Precursor bilden im Embryo ein primitives Netzwerk (Vaskulogenese), welches expandiert und umgebaut wird (Angiogenese). Glatte Muskelzellen bedecken Endothelzellen während der vaskulären Myogenese, und stabilisieren Gefäße während der Arteriogenese. CL: Kollagen; EL: Elastin; Fib: Fibrillin.

Aus: Carmeliet P (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. Nat Med 6:389-395

1.2.2 Wachstumsfaktoren

1.2.2.1 VEGF

Unter VEGF versteht man in der Regel VEGFA. Es ist ein entfernter Verwandter von PDGF (platelet-derived growth factor), und gehört zu einer Familie von Wachstumsfaktoren, die VEGFB, VEGFC, VEGFD, VEGFE und placental growth factor (PIGF) einschließt (123).

VEGF formt aktive Homodimere, die über Disulfidbrücken verbunden sind (72).

Das humane VEGFA-Gen besteht aus acht Exons, getrennt durch sieben Introns. Alternatives Splicen der mRNA resultiert in der Entstehung von verschiedenen Isoformen, den vier häufigen Formen VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆, die dementsprechend 121, 165, 189 bzw. 206 Aminosäuren nach Signalsequenzspaltung besitzen, sowie einigen selteneren Formen, wie

VEGF₁₄₅ und VEGF₁₈₃ (72) (30). Maus- und Ratten-VEGF-Isoformen sind um eine Aminosäure kürzer (28).

Die Exons 1-5 sind für die Bindung von VEGF an die VEGF-Rezeptoren (VEGFR-1 und -2) essentiell. Exon 6 kodiert für eine Heparin-bindende Domäne, und das Transkript von Exon 7 bindet an Heparin und an Neuropilin-1 (NP-1), einen VEGF-Korezeptor (123).

Eine wichtige biologische Eigenschaft, welche die verschiedenen VEGF-Isoformen unterscheidet, ist ihre Heparin- und Heparansulfat-Bindungseigenschaft: VEGF₁₂₁ fehlen die Aminosäuren, die von Exon 6 und 7 kodiert werden, es bindet daher nicht an Heparin oder die Extrazellulärmatrix. VEGF₁₂₁ ist ein schwach saures Polypeptid und frei diffusionsfähig (30). Es ist die Isoform mit der höchsten Bioverfügbarkeit (28).

Die Addition eines 44 Aminosäuren langen Peptides, kodiert von Exon 7, unterscheidet VEGF₁₆₅ von VEGF₁₂₁ und verleiht dem schwach basischen VEGF₁₆₅ Heparin-bindende Eigenschaften: es ist in freier Form vorhanden, aber eine signifikante Fraktion bleibt an Zelloberfläche und Extrazellulärmatrix gebunden (30).

VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ besitzen sowohl die Peptide, die von Exon 6 als auch von Exon 7 kodiert werden, und zeigen eine noch höhere Affinität zu Heparin und Heparansulfat als VEGF₁₆₅ (72). VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆ sind stark basisch und fast vollständig an die Extrazellulärmatrix gebunden (30).

Rezeptoren:

VEGF-Bindungsstellen sind auf der Zelloberfläche von Gefäßendothelzellen *in vitro* und *in vivo* zu finden, ausserdem auf Zellen, die aus dem Knochenmark stammen (30).

Zwei verwandte Tyrosinkinase-Rezeptoren, VEGFR-1 (Flt-1 =fmx-like tyrosine kinase) und VEGFR-2 (KDR =kinase domain region /Flk-1) sind für VEGFA identifiziert und kloniert worden (72). VEGFR-3 (Flt-4) ist kein Rezeptor für VEGFA, sondern für VEGFC und VEGFD. Er findet sich hauptsächlich auf lymphatischen Endothelzellen (30).

VEGFR-1 und VEGFR-2 haben sieben immunglobulinähnliche Domänen im Extrazellulärraum, eine einzelne hydrophobe transmembranäre Domäne und eine Tyrosinkinase-Region (30). Die Bindung von VEGF an die Rezeptoren erfolgt über hydrophobe Interaktion der Pole des VEGF-Dimers mit der zweiten immunglobulinähnlichen Domäne von VEGFR-1 und -2 (28).

VEGFR-1 und -2 sind zu 44% Aminosäure-homolog, sie vermitteln aber unterschiedliche biologische Wirkungen (123):

VEGFR-1 (Flt-1):

VEGFR-1 vermittelt kein effektives mitogenes Signal in Endothelzellen. Vermutlich stellt VEGFR-1 eine Art ‚Köder-Rezeptor‘ dar und spielt, vor allem während der frühen embryonalen Entwicklung, eine inhibitorische Rolle durch Abfangen von VEGF, wodurch die Bindung von VEGF an VEGFR-2 verhindert wird. Entsprechend wirkt auch lösliches alternativ gesplizetes VEGFR-1.

Jedoch spielt VEGFR-1 eine Rolle bei der Vermittlung von Monozyten-Chemotaxis (30).

VEGFR-2 (KDR kinase domain region, oder Flk-1):

VEGFR-2 ist der Hauptmediator des mitogenen, angiogenen und permeabilitätsfördernden Effektes von VEGF.

Die Schlüsselrolle dieses Rezeptors in der Angiogenese und Hämatopoese ist durch die Beobachtung nachgewiesen, dass bei Flk-1-null-Mäusen Vaskulogenese und Entwicklung von Blutinseln und organisierten Blutgefäßen fehlt, was zwischen Tag 8,5 und 9,5 in utero zum Tode führt (30).

Funktion:

VEGF spielt sowohl eine Rolle bei physiologischer Angiogenese, beispielsweise in der embryonalen Entwicklung, im Skelettwachstum oder in der ovariellen Angiogenese, als auch in pathologischen Situationen, wie bei Tumoren, Entzündungen oder intraokularen Neovaskularisationssyndromen.

Für Gefäßwachstum sind der mitogene und permeabilitätsfördernde Effekt von VEGF wichtig (30). Aber VEGF mobilisiert auch endotheliale Progenitorzellen (54), worüber ebenfalls Gefäßneubildungen gefördert werden.

1.2.2.2 FGF-2

Fibroblast Growth Factor (FGF)-2, oder auch basisches FGF (b-FGF) genannt, gehört zu einer Familie von 23 strukturell verwandten Polypeptid-Wachstumsfaktoren (FGF-1 bis FGF-23). Dieser übergeordnet ist die Gruppe der Heparinbindenden Wachstumsfaktorfamilie, zu der auch VEGF gehört (24).

FGF-2 existiert in Formen mit unterschiedlichem Molekulargewicht aufgrund unterschiedlicher Translation der gleichen mRNA:

So entsteht bei Translation ab dem AUG-Kodon ein Protein mit 155 Aminosäuren und 18 kDa (=LMW, low molecular weight).

Kürzere FGF-2-Formen entstehen durch proteolytische Spaltung des 155 Aminosäuren großen Proteins. Durch Translation ab dem CUG-Kodon, welches 5'wärts des AUG-Kodons liegt, entstehen die längeren Formen mit 196/201/210 Aminosäuren (22/22,5/24 kDa) (=HMW, high molecular weight). Die HMW-Formen besitzen im Unterschied zur LMW-Form N-terminale Gly-Arg-repeats, die wichtig für den Kerntransport sind.

Die HMW-Form kommt vor allem im Nukleus vor, sie beeinflusst Zellwachstum und Zellmigration, während die LMW-Form vor allem im Zytoplasma zu finden ist. Sie beeinflusst das Zellwachstum, aber nicht die Zellmigration (9).

Wie FGF-2 nach extrazellulär sezerniert wird, war allerdings lange Zeit unklar, da FGF-2 kein klassisches hydrophobes Exportsignal-Peptid besitzt. Es gibt allerdings Hinweise, dass eine indirekt die Na^+/K^+ -ATPase involvierende Exozytoseform hierbei von Bedeutung ist (32).

Rezeptoren:

Bei den FGF-Rezeptoren handelt es sich um spezifische Zelloberflächenrezeptoren der Tyrosinkinase-Familie mit extrazellulärer Ligandenbindungsstelle (24). Es existieren vier Hauptgruppen, FGFR-1 bis FGFR-4, sowie weitere Formen (9).

Im Herzen gibt es vor allem FGFR-1. Der Rezeptor ist essentiell für die normale Herzentwicklung. Im adulten Herzen ist das Expressionslevel geringer (24).

Funktion:

FGF-2 spielt eine Rolle bei Zellproliferation, -differenzierung, -adhäsion, -migration, -motilität und Apoptose. Es beeinflusst Vaskulogenese, Angiogenese und Blutgefäßremodelling sowie Wundheilung und Tumorgenese (24).

Auch Entwicklung und Differenzierung in verschiedenen Organsystemen (Lunge, Hämatopoese, Nervensystem, Haut, Auge, Reproduktionsorgane, Verdauungsapparat, Muskel- und Skelettsystem) hängen von diesem Wachstumsfaktor ab (9).

Am Herzen wirkt FGF-2 kardioprotektiv, was in Zellkulturen in Kardiomyozyten neonataler Ratten (55) sowie in Tierversuchen (52) beziehungsweise isolierten Herzmodellen (76, 77, 104) gezeigt wurde. Als Mechanismus werden ein direkter Effekt über die Proteinkinase C (PKC) Subtyp ϵ sowie ein indirekter Effekt über NO-Vasodilatation diskutiert.

An Gefäßen kann FGF-2 die Proliferation aller drei Gefäßzellarten (Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Fibroblasten) stimulieren.

Weiterhin induziert FGF-2 eine VEGF-Expression in Gefäßendothelzellen, was zumindest zum Teil den Synergismus von FGF-2 und VEGF erklären könnte (24).

1.2.2.3 GM-CSF

Endogenes GM-CSF (granulocyte-monocyte-colony-stimulating-factor) ist ein stark glykosyliertes Polypeptid, welches Überleben, Proliferation und Differenzierungsrate von unterschiedlichen hämopoetischen Zellpopulationen (13) steigert. Daher wird GM-CSF seit den frühen neunziger Jahren als Medikament für die Behandlung von Patienten mit hämatologischen und onkologischen Erkrankungen eingesetzt; man konzentrierte sich zunächst auf den myeloproliferativen Effekt in myelosupprimierten Patienten (11, 53). Es hat sich allerdings gezeigt, dass GM-CSF diverse biologische Effekte hat und unter anderem auch bei Entzündung, Infektion und Hämatopoese eine Rolle spielt (2).

Die molekulare Sequenz ist 1985 identifiziert worden, innerhalb weniger Jahre wurden dann drei verschiedene synthetische humane GM-CSF-Arten mittels rekombinanter DNA-Technologie in bakteriellen, Säuger- bzw. Hefe-Expressionssystemen produziert:

Mit Hilfe von *E. coli*-Bakterien hergestelltes GM-CSF wird auch Molgramostin genannt (in Europa erhältlich und gebräuchlich).

Aus der Hefe gewonnenes rekombinantes humanes GM-CSF heisst Sargramostin (In USA erhältlich).

Regramostin nennt man das aus Chinese hamster ovary cells (CHO) stammende rekombinante humane GM-CSF.

Die einzelnen Formen unterscheiden sich bezüglich ihrer spezifischen Aminosäuresequenz und dem Grad der Glykosylierung. Der Grad der Glykosylierung von rekombinantem humanen GM-CSF könnte ein wichtiges Charakteristikum darstellen, da er Pharmakokinetik, biologische Aktivität, Antigenität und Toxizität beeinflusst (2).

Rezeptor:

Der Rezeptor von GM-CSF wird GMR genannt. Dieser wird auf der Oberfläche von zahlreichen Zielzellen exprimiert: auf Granulozyten, Erythrozyten, Megakaryozyten, Makrophagenprogenitorzellen und maturaen Neutrophilen, Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, Plasmazellen, bestimmten T-Lymphozyten, Gefäßendothelzellen, Uteruszellen und myeloiden Leukämiezellen.

Der Rezeptor besteht aus zwei verschiedenen Untereinheiten, α und common β (β_c), die ein Heterodimer formen, welches hohe Affinität zu GM-CSF zeigt. Während die α -Untereinheit einzig beim GM-CSF-Rezeptor vorkommt, existiert die β -Form auch bei den Rezeptoren für Interleukin(IL)-3 und IL-5.

Bindung von GM-CSF an den GMR führt zur Formierung des Signalkomplexes und Aktivierung einer Janus-Kinase (JAK2). Die durch die JAK2 regulierte Genexpression aktiviert Transkriptionsfaktoren wie STAT-1, -3 und -5.

Ein zweiter Signalweg beinhaltet die Aktivierung von ras und mitogen-aktivierten Proteinkinasen mit daraus folgender Induktion von c-fos und c-jun, welches Gene sind, die in die Regulation von hämatopoetischer Differenzierung involviert sind (2).

Funktion:

GM-CSF spielt nicht nur bei Entzündung, Infektion und Hämatopoese eine Rolle (2), sondern wirkt sich auch auf das Gefäßwachstum aus.

Wie in Abschnitt 1.2.1.3 beschrieben, spielen Monozyten eine obligatorische Rolle in der Arteriogenese; GM-CSF verhindert Apoptose von Monozyten und wirkt so über eine Verlängerung der Lebensspanne von Monozyten/Makrophagen stark arteriogen (13).

Des Weiteren wurde beobachtet, dass GM-CSF direkt die Migration und Proliferation von Endothelzellen induziert (14).

Auch über eine Mobilisation von vaskulären Progenitorzellen aus dem Knochenmark kann GM-CSF zur Neovaskularisation beitragen (112).

1.3 Fragestellung

Der Einsatz von Wachstumsfaktoren zur Induktion von Gefäßwachstum stellt heute einen neuen, vielversprechenden Ansatz zur Behandlung ischämischer Erkrankungen dar. Trotz zahlreicher Tierversuche sowie erster klinischer Studien zur therapeutischen Angiogenese am ischämischen Myokard blieben dennoch viele wichtige Fragen unerforscht.

So wäre von Interesse, ob die Kombination mehrerer Wachstumsfaktoren - insbesondere eine Kombination, bei welcher der eine Faktor vor allem die Angiogenese, der andere Faktor die Arteriogenese stimuliert – besonders gute Resultate erzielt. Denn für eine sinnvolle Therapie von Gewebeischämien ist sowohl das Wachstum arterieller Gefäße durch Arteriogenese wichtig, um den Blutzufuß zum Gewebe bereitzustellen, als auch die Ausbildung von Kapillaren (Angiogenese), um das Blut im Gewebe zu verteilen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von direkt intramyokardial injizierter Plasmid-DNA der Wachstumsfaktoren VEGF, FGF-2 und GM-CSF auf das Gefäßwachstum im ischämischen Kaninchenmyokard untersucht sowie die Kombinationstherapie mit VEGF- und FGF-2-DNA in unterschiedlichen Dosierungen analysiert.

Im Rahmen der histologischen Untersuchung standen dabei vor allem die folgenden Fragen im Mittelpunkt:

1. Welcher der verabreichten Wachstumsfaktoren stimuliert das Gefäßwachstum im Grenzbereich eines Myokardinfarktes besonders effizient?
2. Findet die Gefäßinduktion hauptsächlich auf der Ebene von Kapillaren oder von Arteriolen statt?
3. Vermag die simultane Gabe von VEGF- und FGF-2-Plasmid-DNA das Gefäßwachstum in besonderem Maße zu steigern? Gibt es Hinweise für additive oder gar synergistische Effekte?

2 Material und Methoden

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Herz- und Gefäßchirurgie der Chirurgischen Klinik des Klinikums der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br. unter der Leitung von Prof. Dr. med. Friedhelm Beyersdorf erstellt.

Das tierexperimentelle Vorgehen entsprach den Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes und war von dem Tierschutzbeauftragten der Universität Freiburg, Herrn Dr. Roth, und dem Regierungspräsidium Baden-Württemberg (Registrier-Nummer: G-01/14) genehmigt.

Die Herstellernachweise zu den aufgeführten Geräten und Materialien sind dem Anhang zu entnehmen.

2.1 Versuchsablauf

Zur Untersuchung der myokardialen Ischämie wurde mit einem Kaninchenmodell gearbeitet.

Es wurden jeweils drei Operationen durchgeführt:

Bei der ersten Operation wurde ein Ast der A. coronaria sinistra, der Ramus interventricularis paraconalis, in seinem mittleren Drittel ligiert und dadurch die myokardiale Ischämie der Vorderseitenwand des linken Ventrikels erzeugt.

Eine Woche später folgte die zweite Operation zur Therapie mittels Wachstumsfaktoren.

Die dritte Operation wurde wiederum eine Woche später durchgeführt. Hierbei wurden erneut, wie auch bei den ersten beiden Operationen geschehen, Daten für die Bestimmung der segmentalen myokardialen Verkürzung (SMV), der myokardialen Perfusion mittels fluoreszierender Mikrosphären sowie der Herzsonographie erhoben. Am Ende der Operation wurde das Herz zur weiteren histologischen und mikrobiologischen Untersuchung entnommen.

Als Versuchstiere dienten Kaninchen weiblichen Geschlechts der Rasse New Zealand White Rabbit (Charles River, Sulzfeld). Bis zum Erreichen des Ausgangsgewichtes waren die Kaninchen in Freilaufställen untergebracht, ab Versuchsbeginn wurden die Tiere dann in Einzelkäfigen (60 x 70 cm) bei 21°C und 50% Luftfeuchtigkeit gehalten. Der Lichtrhythmus betrug 12 zu 12 Stunden. Kraftfutter, Heu sowie Wasser standen ad libitum zur Verfügung.

Das Ausgangsgewicht der Tiere lag bei 3,0 – 4,9 kg, das Endgewicht zwischen 2,6 und 3,7 kg.

2.1.1 Prämedikation und Operationsvorbereitung

Zur Prämedikation bekamen die Tiere 0,15 mg/kg Körpergewicht (KG) Medetomidin sowie 15 mg/kg KG Ketamin intramuskulär (i.m.) in den M. quadrizeps femoris injiziert. Sauerstoff, 10 l/min, wurde daraufhin bis zur Intubation über einen Trichter insuffliert. Subcutan (s.c.) wurden 0,15 ml/kg KG Penicillin-Streptomycin (Tardomycel) sowie 2,5 mg/kg KG Carprofen (Rimadyl) gegeben.

Es wurde ein venöser Zugang in die Ohrtrandvene gelegt und die Operationsgebiete sowie die Elektrodenkontaktstellen wurden rasiert. Zum Schutz vor Austrocknung wurde Augensalbe (Bepanthen) in beide Augen appliziert.

Es folgte die blinde Intubation mit einem Mallinckrodt-Tubus der Größe 2,5 – 3,5 I.D., ab Größe 3,0 I.D. mit Niederdruckcuff; bei Bedarf wurde hierzu 10-20 mg Disoprivan 1 % (Propofol) zur weiteren Sedierung intravenös (i.v.) verabreicht.

Zur Operation wurden die Tiere in Rechtsseitenlage auf einem Tisch mit Wärmematte gelagert. Ein Dreikanal-EKG (Extremitätenableitung) wurde kontinuierlich abgeleitet und überwacht. Der Tubus wurde mit dem Beatmungsgerät konnektiert, und die weiteren zur Narkose notwendigen Perfusoren und Infusomaten wurden angeschlossen. Die rasierten Operationsgebiete wurden mit Betaisodona-Lösung desinfiziert und steril abgedeckt.

2.1.2 Narkose und Beatmung

Die maschinelle Beatmung erfolgte mit einem Ventilationsvolumen von 15 ml/kg KG bei einer Atemfrequenz von 40 /min. Die inspiratorische Sauerstoffkonzentration lag bei 50 %. Anhand von Kapnometrie und Pulsoxymetrie wurde die Beatmung kontinuierlich überprüft und gegebenenfalls individuell optimiert.

Die Narkose wurde als Inhalationsnarkose mittels 2,0 % Isofluran sowie als Injektionsnarkose mittels 10 mg/kg KG/h Disoprivan (Propofol) und 0,01 mg/kg KG/h Fentanyl, verabreicht über

Perfusoren, durchgeführt. Zur Volumensubstitution wurde Ringer-Lösung (10 ml/kg KG/h) verwendet.

Bei Auftreten von Kammerflimmern wurde eine intrathorakale Herzdruckmassage durchgeführt. Zusätzlich wurden Xylocain, i.v. und lokal sowie Suprarenin i.v. nach Bedarf verwendet.

Die Ausleitung und Extubation erfolgte im Operationssaal. Hier wurden die Tiere intensiv überwacht, auch mit Hilfe von arteriellen Blutgasanalysen, und erst im stabilen Zustand in die Tierställe verlegt. Auch dort wurden die Kaninchen weiterhin tiermedizinisch betreut.

Alle Tiere bekamen Lactobacillen (Bird-Bene Bac). Für ausreichende Analgesierung mittels Carprofen s.c. und Temgesic i.v. wurde gesorgt.

2.1.3 Operationsablauf

2.1.3.1 Erste Operation (Stenose)

Die erste Operation diente der Induzierung einer myokardialen Ischämie:

Der Zugang zum Herzen erfolgte über eine laterale Thorakotomie. Der Hautschnitt wurde im achten Interkostalraum links gesetzt, es folgte die Durchtrennung der darunter liegenden Muskelschichten (M. cutaneus trunci, M. latissimus dorsi und M. serratus ventralis). Bei Bedarf wurde zur Blutstillung elektrokoaguliert. Mittels eines Roux-Hakens wurde der fünfte Interkostalraum dargestellt, anschliessend wurde der Thorax durch Durchtrennung der Mm. intercostales externi et interni mit einer Metzenbaumschere im fünften Interkostalraum lateral eröffnet. Ein Rippenspreizer wurde eingesetzt, und die anterioren Lungenabschnitte mit Hilfe einer feuchten Kompresse zur Seite gedrängt, um ungehinderten Zugang zum Herzen zu erhalten. Um Atelektasenbildung weitgehend zu vermeiden, wurde die Lunge während der Operation mehrfach durch vorsichtiges manuelles Blähen wieder entfaltet. Das Perikard wurde mit einer feinen Metzenbaumschere unter Schonung des N. phrenicus mit einem T-förmigen Schnitt eröffnet.

Zur Bestimmung der segmentalen myokardialen Verkürzung (SMV) wurden zwei 1 mm dicke Ultraschallkristalle parallel zur Herzachse je 0,5 cm oberhalb und unterhalb der zu setzenden Stenose im Myokard platziert. Hierzu wurden vorher mit einer Kanüle (16 G) die entsprechenden Stellen im Myokard markiert und zur besseren Platzierung vorgestochen.

Nach erfolgter Messung der SMV wurde der zu unterbindende Koronarast mit einem nicht resorbierbaren monofilen Prolene 6/0 Faden (BV-1) unterstochen und anschließend ligiert (siehe auch Abb. 3). Die Infarktkontrolle erfolgte durch Beobachtung der makroskopischen Verfärbung des ischämischen Areals sowie durch kontinuierliche EKG-Aufzeichnung mit den charakteristischen Infarktzeichen (siehe Abb. 2).



Abbildung 2: Infarkt-EKG

Repräsentative EKG-Aufzeichnung eines Versuchstieres vor sowie nach Ligation des Koronararterienastes

Im Anschluss wurde noch einmal die SMV gemessen, dann wurden die Ultraschallkristalle entfernt. Nach vollständiger Blutstillung wurde der Thorax wieder verschlossen. Hierzu wurde zunächst eine Thoraxdrainage (Venenkatheter 14 G) am Oberrand der siebten Rippe in den Thorax eingeführt und die Lunge durch vorsichtiges manuelles Blähen wieder vollständig entfaltet. Durch Adaption der Rippen mit Einzelknopfnähten (Vicryl 1-0 CP-1) wurde der Thorax verschlossen. Hierauf wurden durch erneutes vorsichtiges Blähen der Lunge die verbliebenen Luftreste aus dem Pleuraspalt über die Kanüle entfernt, die anschließend gezogen wurde.

Die Muskelschichten wurden mit fortlaufenden Nähten (Vicryl 3-0 SH plus), die Haut mit Einzelknopfnähten (Vicryl 3-0 FSL) schichtweise verschlossen.

Zum Schutz der Wunde wurde ein Sprühverband aufgebracht.

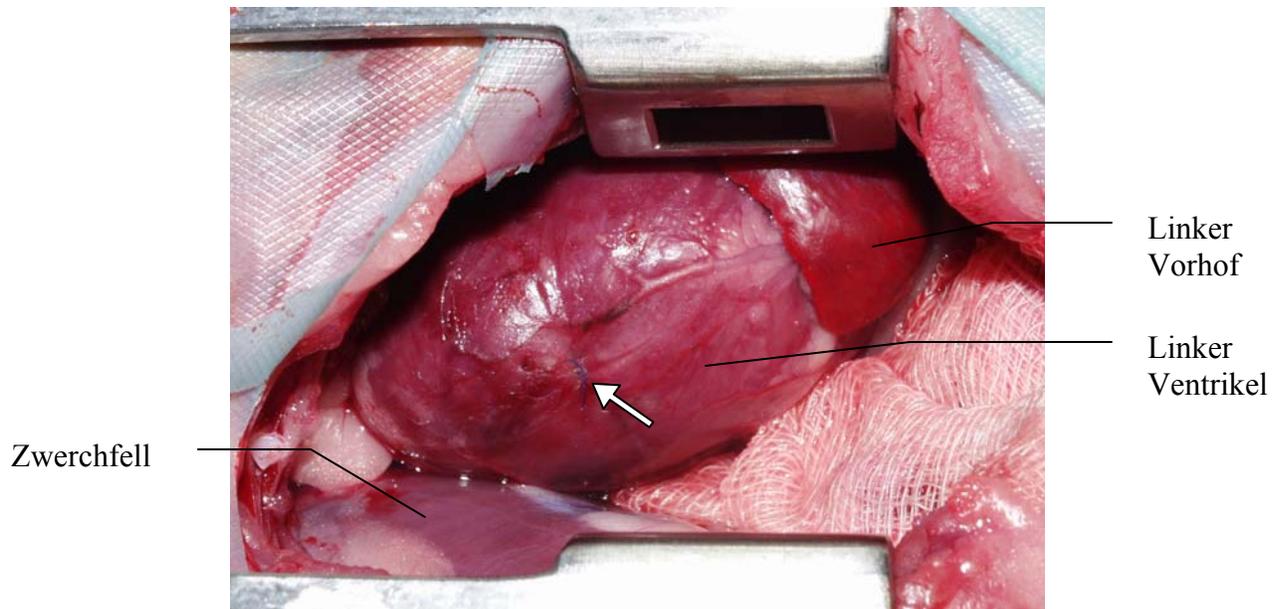


Abbildung 3: Operationssitus

Blick auf den linken Ventrikel mit blauer Ligatur des Koronararterienastes (Pfeil).

2.1.3.2 Zweite Operation (Therapie)

Die zweite Operation diente der Applizierung von Wachstumsfaktoren:

Zur Messung der regionalen Durchblutung des Myokards mittels fluoreszierender Mikrosphären wurde zunächst die A. carotis communis sinistra freipräpariert. Hierzu wurden ein ca. 3 cm langer Hautschnitt zwischen linken Kieferwinkel und oberer Thoraxapertur gelegt, die Muskelschichten unter Schonung der V. jugularis und der Halsnerven mit einer Metzenbaumschere stumpf präpariert und die A. carotis communis sinistra freigelegt. Das Gefäß wurde auf einer Strecke von ca. 1,5 cm von Bindegewebe freipräpariert und mit einem Vicryl-Faden (3-0) im kranialen Abschnitt ligiert. Kaudal hiervon wurde das Gefäß mit einem zweiten Vicryl-Faden angeschlungen. Durch Zugspannung dieses kaudalen Fadens konnte der Blutzufluss der A. carotis unterbrochen werden. Mit einem Skalpell (Gr. 11) wurde daraufhin die Arterie längs gespalten und ein Venenkatheter (20 G) in kaudaler Richtung in das Gefäß eingeführt. Der Zugang wurde fixiert und mit einer Havard-Saugpumpe konnektiert, die Durchgängigkeit durch Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung überprüft.

Nun wurde der Thorax analog zur ersten Operation eröffnet, um das Herz darstellen zu können. Es wurde mit der Messung der regionalen Durchblutung begonnen. Hierzu wurden in den linken Vorhof 10 ml Mikrosphärenlösung (2,5 ml Mikrosphären mit 7,5 ml physiologischer Kochsalzlösung) gleichmäßig über einen Zeitraum von einer Minute injiziert. Hierzu wurde eine Spritze mit einer feinen Kanüle (Größe 20; 0,4x20 mm) verwendet. Parallel erfolgte die Entnahme einer Referenzblutprobe mit Hilfe einer Havard-Pumpe über den Zugang der A. carotis communis für drei Minuten (9,72 ml Blut). Anschließend wurde das Herz sonographisch untersucht. Es wurden Kurzschnittschnitte des Herzens im basalen sowie apikalen Abschnitt mittels eines steril direkt epikardial platzierten 7 MHz Schallkopfes aufgezeichnet.

Nach erfolgter Bestimmung dieser Parameter wurde die Wachstumsfaktortherapie durchgeführt.

Hierzu wurden die Kaninchen in die acht Versuchsgruppen eingeteilt (siehe auch 2.3).

Die Verabreichung der Wachstumsfaktor-Plasmid-DNA, kloniert in einen Expressionsvektor (pCI-neo) unter der Kontrolle eines CMV-Promotors, erfolgte durch standardisierte intramyokardiale Injektion. Die in 200 µl Natriumbicarbonatpuffer mit physiologischer Osmolarität gelöste Plasmid-DNA wurde mittels einer feinen Kanüle (0,45x12 mm) im schrägen Winkel in das Myokard injiziert, unterteilt in fünf Teilinjektionen, drei entlang der basalen Infarktgrenze, sowie zwei apikal hiervon im ischämischen Areal.

Es folgte der schichtweise Thoraxverschluss analog zur ersten Operation. Aus der A. carotis communis sinistra wurde der Zugang entfernt, die Arterie ligiert, und die Haut ebenfalls mit Einzelknopfnähten (Vicryl 3-0 FSL) verschlossen. Es wurde erneut ein Sprühverband verwendet.

2.1.3.3 Dritte Operation (Endoperation)

Diese Operation diente der Messung aller bereits beschriebenen Parameter sowie der Entnahme des Herzens zur histologischen, immunhistochemischen und molekularbiologischen Untersuchung.

Zunächst wurde zur Messung der regionalen Herzdurchblutung der Hautschnitt an der linken Halsseite wiedereröffnet. Vergleichbar dem Vorgehen bei der vorangegangenen Operation wurde

nun die A. carotis communis dextra freipräpariert, der Zugang verlief hierbei anterior zur Trachea. Das Einlegen des Zugangs in das Gefäß erfolgte ebenfalls analog zur zweiten Operation. Der Thorax wurde erneut in beschriebener Weise eröffnet, um das Herz darzustellen.

Es wurde mit der Bestimmung der SMV begonnen. Hierzu wurden die Ultraschallkristalle erneut an alter Stelle in das Myokard implantiert. Nach erfolgter Messung und Explantation der Kristalle wurde mit dem Durchblutungsparameter fortgefahren. Es wurden Mikrosphären einer anderen Farbe nach gleichem Schema in den linken Vorhof injiziert und eine Referenzblutprobe wurde aus der A. carotis communis dextra gewonnen. Es folgte die erneute sonographische Untersuchung des Herzens.

Nach Abschluss der Erhebung sämtlicher Parameter wurde in tiefster Narkose das Herz entnommen, von Blut befreit und zur weiteren Laboruntersuchung aufbereitet:

Je zwei Proben der Infarkttrandzone des linken Ventrikels sowie des gesunden rechten Ventrikels wurden zur weiteren molekularbiologischen Untersuchung (RNA-Extraktion) in flüssigem Stickstoff gefroren.

Eine zirka 4 mm dicke, ringförmige Gewebeprobe, welche Teile des rechten sowie linken Ventrikels umfasst, wurde aus dem Herzen entnommen, in 4%igem Formalin fixiert und später in Paraffin eingebettet.

Der Rest des Herzens wurde in 10%igem Formalin fixiert und aus definierten Proben die verabreichten Mikrosphären zur Bestimmung der regionalen Durchblutung extrahiert.

2.2 Parameter

Es wurden folgende Untersuchungen während der Operationen durchgeführt:

- Messung der regionalen myokardialen Verkürzung (SMV) mittels implantierter Ultraschallkristalle
- Bestimmung des regionalen myokardialen Blutflusses (RMBF) mittels fluoreszierender Mikrosphären
- Ermittlung der myokardialen Kontraktilität durch sonographische Untersuchung

Im Anschluss an die Operationen wurden die folgenden Parameter erhoben:

- molekularbiologische Untersuchung des Myokards mit RNA-Extraktion und RT-PCR zum Nachweis der für die verabreichten Wachstumsfaktorplasmide spezifischen mRNA
- Histologische sowie immunhistochemische Untersuchung des Myokards zur Bestimmung von Angio- und Arteriogenese

Diese Arbeit entstand im Rahmen eines Gemeinschaftsprojektes. Im Folgenden wird auf die histologische und immunhistochemische Auswertung eingegangen. Die Ergebnisse der übrigen Parameter können den entsprechenden Dissertationsschriften (RMBF und Sonographie: cand. med. Tobias Renner; SMV: Tierärztin Stephanie Tascher) entnommen werden.

2.3 Experimentelle Gruppen

Die Kaninchen wurden in acht Versuchsgruppen eingeteilt:

- Kontrollgruppe (Ko) (keine Therapie)
- Placebogruppe (Pl) (100 µg Vektor-Plasmid-DNA ohne Insert)
- VEGF-Gruppe (VEGF) (100 µg Plasmid-DNA für humanes VEGF-A₁₂₁)
- FGF-Gruppe (FGF) (100 µg Plasmid-DNA für humanes FGF-2)
- GM-CSF-Gruppe (GMCSF) (100 µg Plasmid-DNA für humanes GM-CSF)
- Kombinationsgruppe 1 (V+F100) (je 100 µg Plasmid-DNA für humanes VEGF-A₁₂₁ und humanes FGF-2)
- Kombinationsgruppe 2 (V+F50) (je 50 µg Plasmid-DNA für humanes VEGF-A₁₂₁ und humanes FGF-2)
- Kombinationsgruppe 3 (V+F25) (je 25 µg Plasmid-DNA für humanes VEGF-A₁₂₁ und humanes FGF-2)

2.4 Histologie

2.4.1 Entnahme und Aufarbeitung der Gewebeproben

Aus dem explantierten Herzen wurde apikal der Ligationstelle ein zirka 4 mm breiter horizontal geschnittener Herzring als Gewebeprobe für die Histologie entnommen. Diese Probe wurde zunächst für 24 Stunden in 4%igem PBS-gepufferten Formalin fixiert, bevor sie eine aufsteigende Alkoholreihe zur Entwässerung und die Überführung in Paraffin im Gewebeeinfiltrationsautomaten durchlief. Die Gewebeproben wurden in einen Paraffinblock eingebettet, von dem anschließend 3 µm dünne Serienschritte an einem Mikrotom erstellt und auf selbsthaftende Objektträger aufgezogen wurden. Diese Objektträger wurden mindestens 24 Stunden in einem Wärmeschrank bei 37 °C getrocknet.

2.4.2 Färbemethoden

Es wurden routinemäßig sowohl Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE) als auch Elastica-von-Giesson-Färbungen (EvG) nach Standardprotokoll angefertigt.

Weiterhin wurden immunhistochemische Verfahren angewandt, um das Gefäßwachstum in den Ischämierandzonen spezifisch und isoliert darstellen zu können.

2.4.2.1 Routinefärbungen

Die Gewebsschnitte wurden in Rotihistol deparaffiniert (mindestens zwei Stunden) und durchliefen zur Rehydrierung eine absteigende Alkoholreihe (100 %, 90 %, 80 % und 70 % Ethanol, je fünf Minuten), anschließend wurden die Schnitte in destilliertem Wasser gewaschen. Es folgten HE- und EvG-Färbungen nach Standardvorschrift. Nach erneuter Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Präparate mit einem lösungsmittelhaltigem Eindeckmedium und Deckgläsern versiegelt.

Die Färbeprotokolle können dem Anhang entnommen werden.

2.4.2.2. Immunhistochemie

Bei der verwendeten Färbemethode handelte es sich um die Avidin-Biotin-Enzymkomplex-Methode (ABC-Methode) (siehe Abb. 4). Dieses Verfahren beruht auf der Fähigkeit des Eiweissglykoproteins Avidin, vier Moleküle des Vitamins Biotin physikalisch zu binden:

Es wird ein Primärantikörper, der spezifisch gegen die gesuchte Struktur gerichtet ist, auf das vorbehandelte Präparat aufgetragen. Ein Sekundärantikörper, der gegen den Fc-Teils des Primärantikörpers gerichtet ist und an diesen bindet, fungiert als Brückenantikörper. Dieser Antikörper ist mit Biotin-Molekülen konjugiert. Als nächstes wird ein Enzymkomplex aufgetragen, wobei das Enzym ebenfalls biotinyliert ist. Zusätzlich zu diesem Enzym enthält diese Lösung noch Avidin-Moleküle, welches sich nun über seine Affinität zu Biotin sowohl mit dem Brückenantikörper als auch mit dem Enzym verbinden kann.

Zum Abschluss wird ein Enzymsubstrat zugefügt, welches nach enzymatischer Umsetzung eine Farbreaktion bewirkt.

Mit dieser Methode können Zielstrukturen in paraffinfixierten Geweben mit hoher Spezifität und Empfindlichkeit nachgewiesen werden (10, 70).

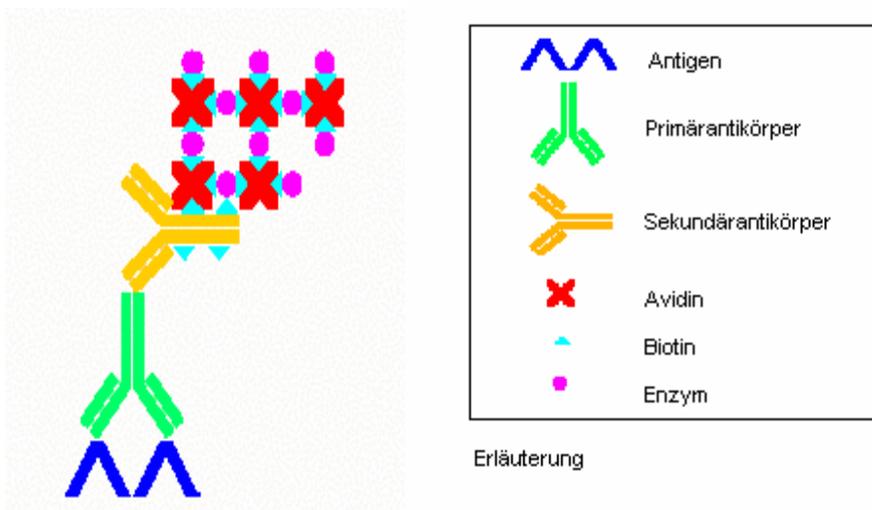


Abbildung 4: Immunhistologisches Färbeverfahren nach der ABC-Methode. Aus: Handbuch Immunchemische Färbemethoden (10)

Es wurden zwei verschiedene immunhistochemische Färbungen durchgeführt; zum Einen wurde ein Antikörper gegen CD31 genutzt, um Endothelzellen und damit auch Kapillaren darzustellen

(CD31), zum Anderen ein Antikörper gegen smooth muscle actin (SMA) zur Markierung von Arterien und Arteriolen.

Für jede der beiden verwendeten immunhistochemischen Färbungen wurden je zwei Schnitte pro Versuchstier ausgewertet.

Die Färbungen wurden nach einem standardisierten Protokoll durchgeführt; zusätzlich wurden bei jeder Färbung eine Positivkontrolle (bei CD31 humanes Herzseptum sowie humanes Lungenkarzinom, bei SMA Dünndarm vom Schwein), sowie von jedem Versuchspräparat eine Negativkontrolle, bei der kein Primärantikörper aufgebracht wurde, angefertigt. Die Positivkontrolle diente dazu, aufzuzeigen, dass die Färbemethode erfolgreich war; die Negativkontrolle diente als Nachweis, dass es sich um eine spezifische Anfärbung der gewünschten Strukturen handelte.

2.4.2.2.1 Anti-CD31 (CD31)

Der verwendete Primärantikörper (Monoclonal Mouse Anti-Human CD31, Endothelial Cell Clone JC/70A) ist gegen CD31 gerichtet, ein Adhäsionsmolekül, welches von allen Endothelzellen stark exprimiert wird (79) und geeignet ist, Angiogenese zu beurteilen (19, 39, 50, 79).

Die mindestens zwei Stunden in Rotihistol entparaffinierten Schnitte durchliefen zur Rehydrierung eine absteigende Alkoholreihe (100 %, 90 %, 80 % und 70 % Ethanol, je fünf Minuten) und wurden anschließend in destilliertem Wasser (Aqua dest.) und TRIS-Puffer (pH 7,5; Trizma base® 25 mM, NaCl 140 mM) gespült.

Zur Antigendemaskierung wurden die Präparate sechs Minuten mit einer Pepsinlösung (500 mg Pepsin und 1 ml 2 M HCl in 200 ml warmem Aqua dest.) inkubiert. Es folgten erneute Spülgänge mit Aqua dest. und TRIS-Puffer. Zur Blockierung unspezifischer Hintergrundfärbung wurde Kaninchenserum (Normal Rabbit Serum) in einer 1:10-Verdünnung mit TRIS-BSA-Puffer (0,1 % Rinderserumalbumin, BSA, in TRIS-Puffer) verwendet, pro Schnitt wurden 100 µl Serumlösung auf den Objektträger pipettiert. Nach zehn Minuten bei 37 °C wurde sowohl von den Versuchspräparaten als auch von den Positivkontrollen das Serum abgeklopft, 100 µl Primärantikörperlösung (Monoclonal Mouse Anti-Human CD31) in einer Verdünnung von 1:20

in TRIS-BSA-Puffer aufgetragen und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Bei den Negativkontrollen entfiel dieser Schritt, das Serum wurde statt des Primärantikörpers auf den Schnitten belassen. Alle Objektträger wurden erneut in TRIS-Puffer gespült. Dann wurden 100 µl der Sekundärantikörperlösung (1:300-Verdünnung des Sekundärantikörpers mit TRIS-BSA-Puffer) für 30 Minuten bei 37 °C aufgetragen. Bei diesem Antikörper handelte es sich um einen biotinylierten Kaninchen-anti-Maus-Brückenantikörper, welcher an den Primärantikörper bindet. Erneut wurden die Objektträger in frischem TRIS-Puffer gespült, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Danach konnte der Avidin-Biotin-Enzymkomplex (AB Complex /AP) (Verdünnung 1:100 ebenfalls mit TRIS-BSA-Puffer, je 100 µl pro Präparat) für 30 Minuten bei 37 °C auf die Objektträger aufgebracht werden. Avidin zeigt Affinität zu Biotin und bindet daher an den biotinylierten Sekundärantikörper. Bei dem Enzym des verwendeten Komplexes handelte es sich um alkalische Phosphatase (AP), welche für die Umsetzung des Farbstoffes verantwortlich ist. Wiederum wurde in TRIS-Puffer gewaschen. Anschliessend wurden je 100 µl der Fast Blue-Farbstofflösung (Fast Blue BB Salt) auf die Objektträger aufgetragen. Nach 30 Minuten konnte die Färbereaktion mit Aqua dest. gestoppt werden, ein wässriges Eindeckmedium (Aquatex) sowie ein Deckglas ermöglichen längeres Aufbewahren der Schnitte. Unter dem Lichtmikroskop stellten sich nun Endothelzellen blau dar, die gelbliche Hintergrundfärbung entspricht der Herzmuskulatur (siehe Abb. 5).

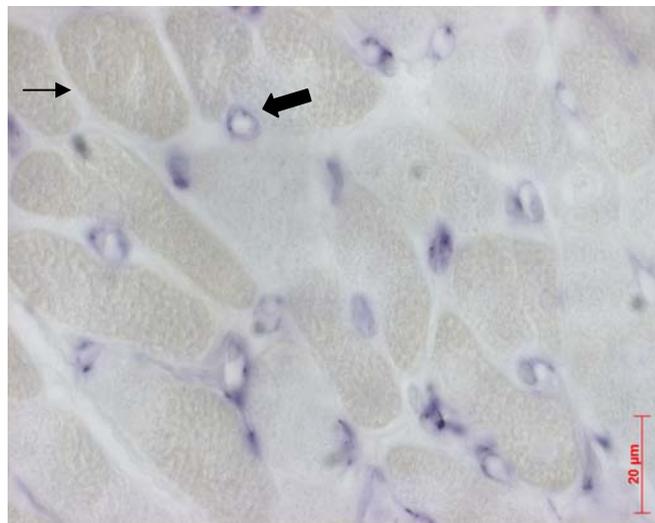


Abbildung 5: CD31-Färbung

Dargestellt ist querangeschnittene Herzmuskulatur (dünner Pfeil) mit dazwischenliegenden blau angefarbten Kapillaren (dicker Pfeil). 1000-fache Vergrößerung

2.4.2.2.2 Anti-Smooth-Muscle-Actin (SMA)

Um die Muskelzellschicht der arteriellen Gefäße darzustellen, wurde ein Antikörper verwendet, der gegen die α -Smooth-Muscle-Isoform von Aktin (SMA) gerichtet ist (Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin, Clone 1A4). Dieser Antikörper reagiert dabei nicht mit Herzmuskulatur (107).

Die Serienschnitte wurden auch hier zunächst mindestens zwei Stunden in Rotihistol entparaffiniert, in der absteigenden Alkoholreihe (100 %, 90 %, 80 % und 70 % Ethanol, je fünf Minuten) rehydriert, und in Aqua dest. und TRIS-Puffer (pH 7,5) gespült. Anschließend wurde die endogene Peroxidase 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 200 ml Methanol und 6 ml H₂O₂ blockiert. Nach Spülgängen in Aqua dest. und TRIS-Puffer folgte die Antigendemaskierung durch Behandlung mit Pepsinlösung (500 mg Pepsin und 1 ml 2 M HCl in 200 ml warmem Aqua dest.) für eine Minute. Wiederum wurde in Aqua dest. und TRIS-Puffer gespült. Zur Blockierung unspezifischer Hintergrundfärbung wurde je 100 μ l Kaninchenserumlösung (Normal Rabbit Serum), 1:10 mit TRIS-BSA-Puffer verdünnt, für 10 Minuten bei 37 °C auf die Objektträger aufgetragen. Bei den Versuchspräparaten sowie bei den Positivkontrollen wurde nach Abklopfen des Serums 100 μ l des 1:200 mit TRIS-BSA-Puffer verdünnten Primärantikörpers für 30 Minuten bei 37 °C aufgebracht. Bei den Negativkontrollen entfiel dieser Schritt, das Serum verblieb anstelle des Primärantikörpers auf den Schnitten. Nach Abspülen des überschüssigen Primärantikörpers in TRIS-Puffer wurden je 100 μ l der Lösung mit dem biotinylierten Kaninchen-Anti-Maus-Brückenantikörper, in einer Verdünnung von 1:300 mit TRIS-BSA-Puffer, bei 37 °C für 30 Minuten aufgetragen. Erneut wurden die Objektträger in TRIS-Puffer gespült. Bei dem verwendeten Avidin-Biotin-Enzymkomplex (StreptABComplex/HRP) wurde Horse Radish Peroxidase (HRP) eingesetzt. Je 100 μ l des 1:100 mit TRIS-BSA-Puffer verdünnten Komplexes wurden für 30 Minuten bei 37°C auf die Objektträger aufgebracht, anschließend wurden die Präparate noch einmal in TRIS-Puffer gespült, dann folgte die Farbentwicklung mit dem Farbstoff DAB (3,3-Diaminobenzidintetrahydrochloride Dihydrat p.a.) für 20 Sekunden. Gestoppt wurde die Reaktion mit Aqua dest.

Um die Präparate vor dem Austrocknen zu schützen, wurden ein wässriges Eindeckmedium (Aquatex) und ein Deckglas verwendet.

Arteriolen sind so an ihrer braun gefärbten glatten Muskelzellschicht zu erkennen (siehe Abb. 6).



Abbildung 6: SMA-Färbung

Dargestellt sind braun gefärbte arterielle Gefäße im Myokard. 630-fache Vergrößerung

2.4.3 Lichtmikroskopische Auswertung und Auszählung

Die Anzahl der CD31-positiven Gefäße (für die Kapillarzahlen) bzw. der SMA-positiven Gefäße (für die Zahlen arterieller Gefäße) in der Herzmuskulatur des Infarktgrenzgebietes wurde unter dem Lichtmikroskop in 600-facher Vergrößerung mit Hilfe eines Handzählgerätes ermittelt. Pro Schnitt wurden vier Gesichtsfelder im Myokard ausgezählt, je zwei an beiden Infarktgrenzen – zum einen endomyokardial, zum anderen im zentralen Bereich der Grenze. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Herzmuskulatur horizontal angeschnitten war, um die Vergleichbarkeit zwischen den Proben zu gewährleisten.

Da für jedes Tier pro immunhistochemischer Färbung zwei Herzschnitte ausgewertet wurden, ergab dies acht gewertete Gesichtsfelder pro Färbung und Tier.

Bei den SMA-positiven Gefäßen handelt es sich weitgehend um Arteriolen sowie um vereinzelte kleine Arterien. Im Folgenden wird vereinfachend von Arteriolenzahlen gesprochen.

Bei den CD31-positiven Gefäßen handelt es sich fast ausschliesslich um Kapillaren, doch vereinzelte größere Gefäße färben sich ebenfalls an. Im Folgenden wird vereinfachend von Kapillarzahlen gesprochen.

Als Einschlusskriterium galt, dass der Infarkt mindestens einem Drittel der freien Vorderwand des linken Ventrikels entsprechen sowie transmural ausgebildet sein musste.

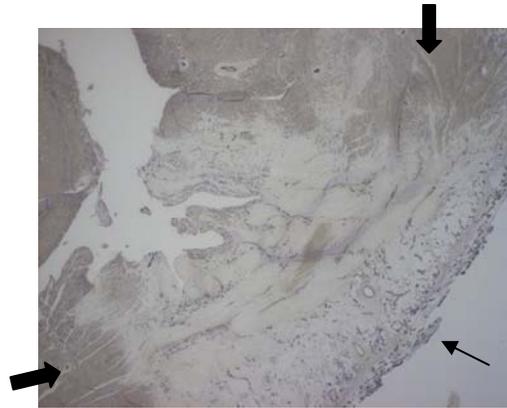


Abbildung 7: Infarkt im Überblick

Dargestellt ist ein Ausschnitt des linken Ventrikels nach CD31-Färbung. Das helle Areal entspricht dem Infarktgebiet (dünner Pfeil), die dunkleren Areale im Bild oben sowie links zeigen Herzmuskulatur (dicke Pfeile). 25-fache Vergrößerung.

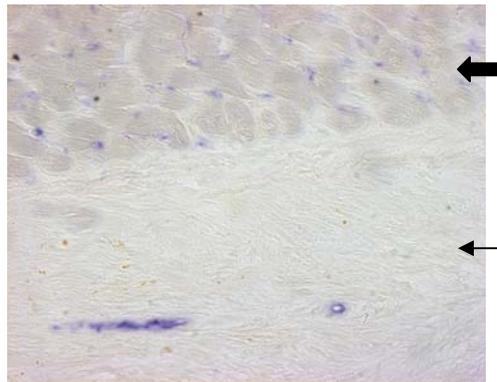


Abbildung 8: Infarktgrenze vergrößert

Dargestellt ist der Infarktgrenzbereich nach CD31-Färbung. Im Bild oben ist Herzmuskulatur (dicker Pfeil) zu sehen, darunter das Infarktgebiet (dünner Pfeil). 400-fache Vergrößerung.

2.5 Statistische Auswertung

Die Tabellenkalkulation wurde mit Microsoft Excel für Windows durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS Version 11.5 für Windows unter Verwendung des Mann-Whitney-U-Tests. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ angenommen. Alle angegebenen Werte verstehen sich als Mittelwerte und Standardabweichung (SD). Die statistische Auswertung wurde mit freundlicher Unterstützung durch Herrn Dipl. Stat. Manfred Olschewski, Institut für Medizinische Biometrie und Medizinische Informatik der Universität Freiburg i.Br., Abteilung Medizinische Biometrie und Statistik, durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Gruppenstatistik

105 Kaninchen der Rasse New Zealand White Rabbit wurden in den Versuch eingeschlossen, 68 Tiere konnten hiervon schließlich histologisch ausgewertet werden (siehe Abbildung 9).

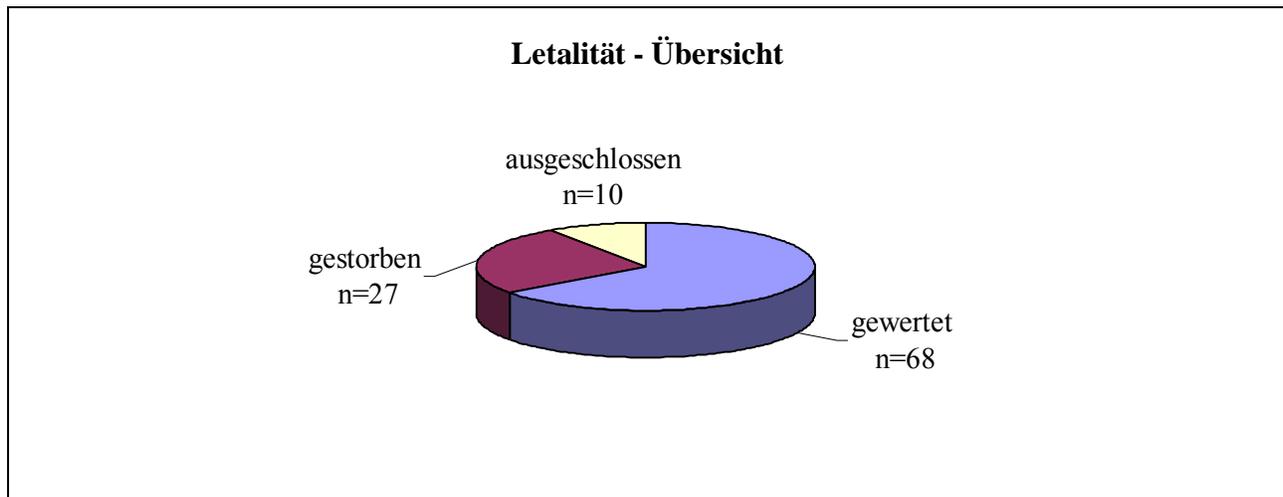


Abbildung 9: Letalität – Übersicht

68 von 105 Versuchstieren wurden histologisch ausgewertet, 27 verstarben und 10 Tiere wurden vom Versuch ausgeschlossen

Insgesamt verstarben 27 Tiere. Davon starben 18 Tiere vor der Einteilung in die einzelnen Versuchsgruppen:

Zwei Tiere starben bei der Einleitung zur ersten Operation durch Herzstillstand, elf an Kammerflimmern während oder unmittelbar nach der ersten Operation, vier weitere Tiere verstarben innerhalb der Woche zwischen Stenose- und Therapie-Operation im Stall (eines hiervon wurde wegen respiratorischer Insuffizienz euthanasiert), und ein Tier starb bei der Einleitung zur Therapie-Operation.

Die verbliebenen 87 Kaninchen wurden in die acht Versuchsgruppen eingeteilt und mit den verschiedenen Wachstumsfaktoren bzw. Wachstumsfaktorkombinationen therapiert.

Nach erfolgter Therapie verstarben weitere neun Kaninchen (Gruppenzugehörigkeit siehe Tabelle 1 im Anhang 6.1):

Acht verstarben innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Therapieoperation, davon wurden zwei Tiere euthanasiert. Zwei Tiere entwickelten nach der Mikrosphäreninjektion derselben Charge eine Bradykardie, die nach Beendigung der Operation zum Tode führte. Diese Charge wurde hierauf nicht weiter verwendet; alle anderen Chargen konnten komplikationsfrei benutzt werden. Ein weiteres Tier verstarb zu Beginn der Endoperation.

Es überlebten also 78 Tiere bis zum Ende der dritten Operation. Die Herzen dieser Tiere wurden histologisch wie beschrieben untersucht. Allerdings wurden hiervon noch einmal acht Tiere aus der Studie ausgeschlossen, weil sich histologisch kein den Einschlusskriterien entsprechender Infarkt darstellen ließ. Zwei weitere Präparate ließen sich nicht immunhistochemisch anfärben und mussten so ebenfalls ausgeschlossen werden (siehe Tabelle 2 im Anhang 6.1).

Demnach wurden schließlich 68 Herzen histologisch bezüglich Angio- und Arteriogenese ausgewertet.

3.2 Routinehistologie

Es wurden routinemäßig sowohl Hämatoxylin-Eosin-Färbungen sowie Elastica-vanGiesson-Färbungen durchgeführt.

In allen gewerteten Versuchstieren fanden sich transmural ausgebildete Myokardinfarkte. Dies diente als Einschlusskriterium für die Versuche (siehe auch 3.1).

3.3 Immunhistologie

Die in allen Präparaten ausgezählten Kapillar- und Arteriolenzahlen pro Gesichtsfeld werden nicht einzeln aufgeführt, sondern die Mittelwerte aller Auszählungen pro Versuchstier (siehe Material und Methoden) in Tabellen dargestellt, die dem Anhang (siehe 6.2) zu entnehmen sind.

Im Folgenden werden jeweils der Mittelwert sowie die Standardabweichung für jede Versuchsgruppe in Balkendiagrammen dargestellt.

3.3.1 Einzelfaktoren

3.3.1.1 Kapillardichte

Es zeigte sich bei allen Einzelfaktorgruppen, das heisst der VEGF-, FGF- und GMCSF-Gruppe, eine signifikante Steigerung der Kapillardichte, sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe (unbehandelte Ischämie, Ko) als auch im Vergleich zur Placebogruppe (Behandlung nur mit Vektor ohne Wachstumsfaktor, Pl). Unterschiede zwischen den Wachstumsfaktorgruppen bestanden nicht.

Die Gefäßdichte der Placebogruppe lag signifikant über der Kontrollgruppe ($p=0,001$).

Im Vergleich zu sowohl Kontroll- als auch Placebogruppe wurden in der VEGF-Gruppe signifikant höhere Kapillarzahlen gezählt ($p=0,000$ vs. Ko, $p=0,004$ vs. Pl), ebenso wie in der FGF-Gruppe ($p=0,000$ vs. Ko, $p=0,012$ vs. Pl), und in der GMCSF-Gruppe ($p=0,000$ vs. Ko, $p=0,043$ vs. Pl).

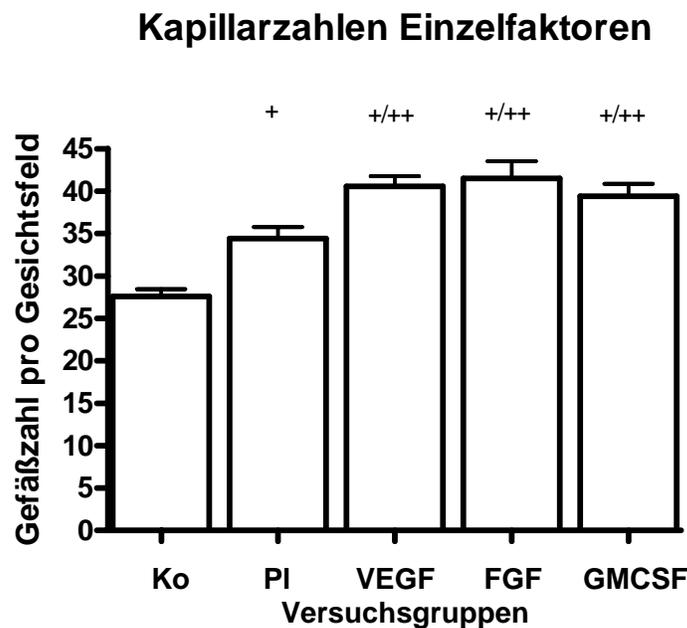


Abbildung 10: Kapillarzahlen Einzelfaktoren

CD31-Färbung. Signifikante Steigerung der Gefäßzahlen für die Einzelfaktorgruppen VEGF, FGF und GMCSF im Vergleich zur Kontrollgruppe sowie zur Placebogruppe.

+ = $p < 0,05$ vs. Ko; ++ = $p < 0,05$ vs. Pl

3.3.1.2 Arterioldichte

Auch bezüglich der Arterioldichte bewirkte die Therapie mit den Wachstumsfaktoren VEGF, FGF-2 und GM-CSF jeweils eine signifikante Steigerung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Unterschiede zwischen den Therapiegruppen zeigten sich nicht.

Die Placebogruppe zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe ($p=0,053$). Die Behandlung mit VEGF erhöhte die Arterioldichte hingegen signifikant ($p=0,004$ vs. Ko), ebenso wie die Therapie mit FGF-2 ($p=0,021$ vs. Ko). Auch die GM-CSF-Therapie bewirkte einen signifikanten Anstieg der Arterioldichte ($p=0,027$ vs. Ko).

Der Unterschied dieser drei Einzelfaktorgruppen im Vergleich zur Placebogruppe war nicht signifikant.

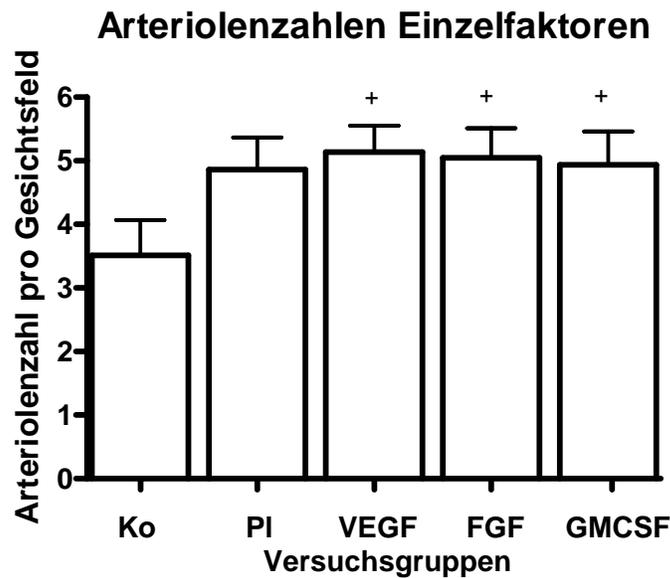


Abbildung 11: Arteriolenzahlen Einzelfaktoren

SMA-Färbung. Signifikante Steigerung der Arteriolenzahlen der Einzelfaktorgruppen VEGF, FGF und GMCSF im Vergleich zur Kontrollgruppe.

+ = $p < 0,05$ vs. Ko

3.3.2 Kombinationstherapie

3.3.2.1 Kapillardichte

Alle drei Kombinationstherapien, V+F25, V+F50 sowie V+F100, bei denen FGF-2 und VEGF zusammen in den entsprechenden Konzentrationen appliziert wurde, steigerten die Kapillardichte hochsignifikant im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen (V+F25: $p=0,000$ vs. Ko, $p=0,000$ vs. Pl; V+F50: $p=0,000$ vs. Ko, $p=0,000$ vs. Pl; V+F100: $p=0,000$ vs. Ko, $p=0,001$ vs. Pl).

Bei der Gruppe V+F25 wurden sowohl 25 μg VEGF-DNA als auch 25 μg FGF-2-DNA gemeinsam intramyokardial injiziert, bei der V+F50-Gruppe waren es jeweils 50 μg DNA der beiden Wachstumsfaktoren, und bei der Versuchsgruppe V+F100 je 100 μg VEGF- und FGF-2-DNA.

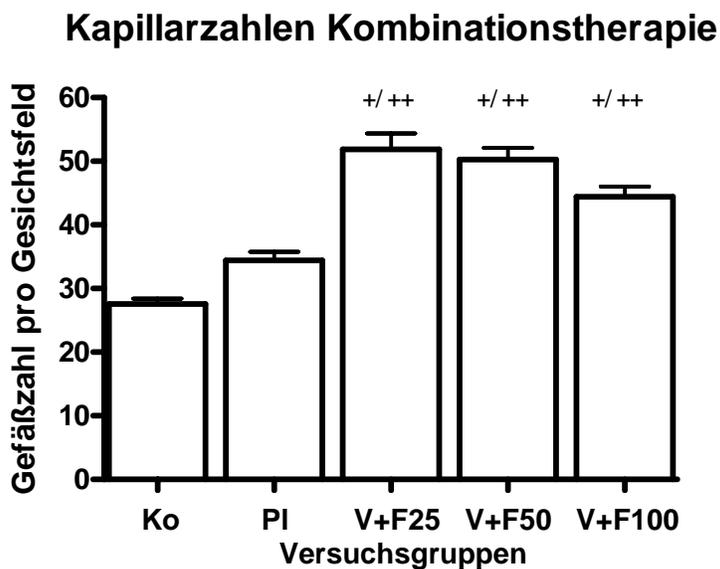
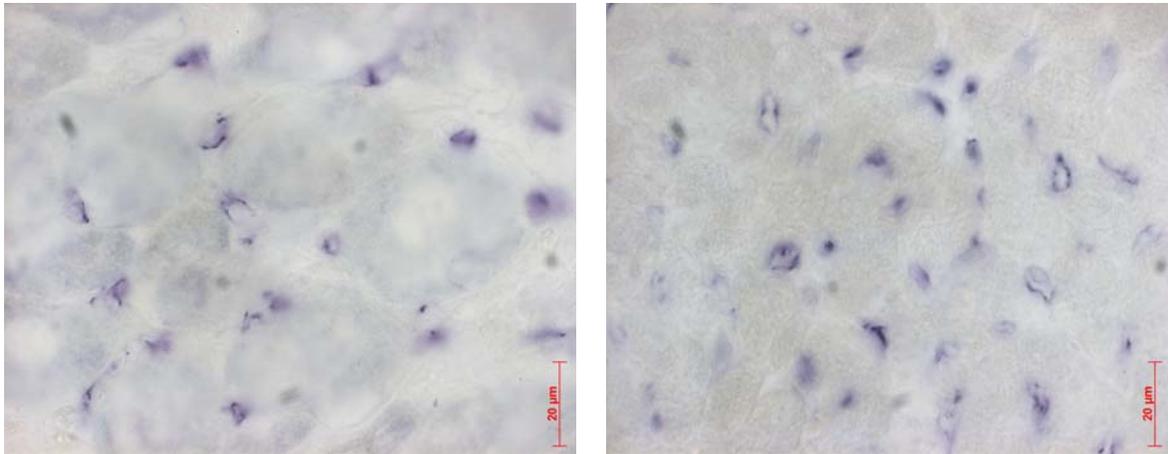


Abbildung 12: Kapillarzahlen Kombinationstherapie

CD31-Färbung. Signifikante Steigerung der Gefäßzahlen der Kombinationsgruppen V+F25, V+F50 und V+F100 im Vergleich zu Kontroll- und Placebogruppe.

+ = $p < 0,05$ vs. Ko; ++ = $p < 0,05$ vs. Pl



Pl

V+F25

Abbildung 13: Vergleich der Gefäßanzahl zwischen Placebogruppe links und Kombinationsgruppe V+F25 rechts

CD31-Färbung (blau = Endothel), 1000-fache Vergrößerung

Abgesehen davon, dass die Kombinationsgruppen eine signifikante Kapillanzahlerhöhung im Vergleich zu Kontroll- und Placebogruppe aufweisen, übertreffen die Kombinationsgruppen V+F25 und V+F50 auch signifikant die Einzelfaktorgruppen VEGF und FGF:

Die Gruppe V+F25, bei der jeweils 25 µg VEGF-DNA und 25 µg FGF-2-DNA verabreicht wurden, hatte signifikant mehr Kapillaren als die VEGF-Einzelfaktor-Gruppe (100 µg DNA) ($p=0,002$), sowie auch signifikant mehr Kapillaren als die FGF-Einzelfaktor-Gruppe (ebenfalls 100 µg DNA) ($p=0,006$).

Auch die V+F50-Gruppe, bei der je 50 µg VEGF-DNA und 50 µg FGF-2-DNA injiziert wurden, also insgesamt die gleiche Wachstumsfaktor-DNA-Menge wie bei den Einzelfaktoren, übertraf die Einzelfaktorgruppen bezüglich der Kapillardichte signifikant ($p=0,001$ vs. VEGF, $p=0,015$ vs. FGF).

Die Kombinationsgruppe V+F100 mit der höchsten Wachstumsfaktor-DNA-Menge, je 100 µg VEGF- und FGF-2-DNA, verfehlte die Signifikanz zu VEGF und FGF.

Der direkte Vergleich zwischen den verschiedenen Kombinationsgruppen zeigte ebenfalls signifikante Unterschiede. So hatten sowohl die V+F25-Gruppe ($p=0,04$ vs. V+F100) als auch

die V+F50-Gruppe ($p=0,046$ vs. V+F100) signifikant mehr Kapillaren aufzuweisen als die V+F100-Kombinationsgruppe.

Im Vergleich zu der GMCSF-Gruppe zeigten sich wiederum die V+F25-Gruppe ($p=0,001$) und die V+F50-Gruppe ($p=0,000$) überlegen in Bezug auf die Gefäßdichte.

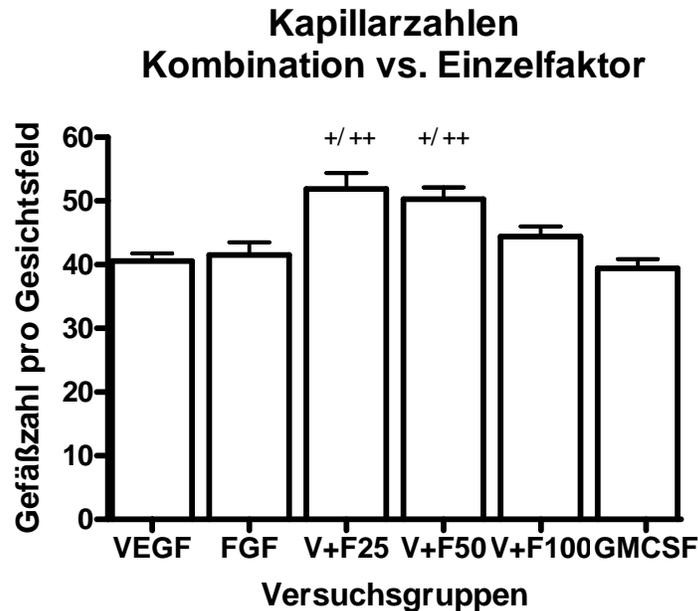


Abbildung 14: Kapillarzahlen Kombination vs. Einzelfaktor

CD31-Färbung. Signifikante Steigerung der Gefäßzahlen der Kombinationsgruppen V+F25 sowie V+F50 im Vergleich zu den Einzelfaktorgruppen VEGF und FGF sowie GMCSF.

+ = $p < 0,05$ vs. VEGF, FGF und GMCSF; ++ = $p < 0,05$ vs. V+F100

Der prozentuale Anstieg der Kapillardichte (Gruppenmittelwerte) über Leerplasmidniveau lag bei 18 % in der VEGF-Versuchsgruppe und bei 23 % in der FGF-2-Gruppe. Die Kombinationsgruppe V+F25-Gruppe erreichte 51 %; in dieser Gruppe wurde zusammengenommen nur 50 μ g DNA verabreicht, also nur die Hälfte der DNA-Menge der Einzelversuche. Bei der V+F50-Gruppe lag der prozentuale Kapillanzuwachs bei 46 %, hier wurde mit jeweils 50 μ g VEGF- und FGF-2-DNA therapiert, also mit 100 μ g Wachstumsfaktor-DNA insgesamt, dieselbe Menge, die bei den Einzelfaktorversuchen verwendet wurde. Die V+F100-Gruppe zeigte einen prozentualen Zuwachs der Kapillarzahlen von 29 %.

Prozentualer Gefäßzuwachs über Leerplasmidgruppe

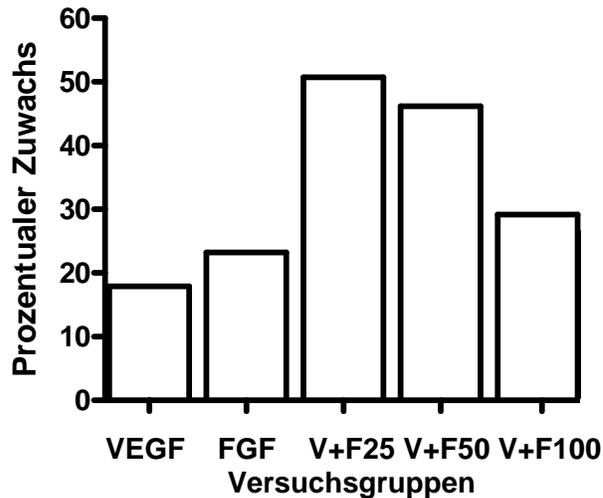


Abbildung 15: Prozentualer Gefäßzuwachs über Placebogruppe

Dargestellt ist der Anstieg der Kapillarzahlen (CD31-Färbung) in den einzelnen Versuchsgruppen über das Leerplasmidniveau in Prozent.

3.3.2.2 Arterioldichte

Die Kombinationstherapiegruppe V+F100 verfehlte einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe bezüglich der Arterioldichte. Bei der V+F50-Gruppe fand sich hingegen ein signifikanter Anstieg der Arteriolenzahl ($p=0,019$ vs. Ko). Die Kombinationsgruppe V+F25 erreichte die höchste mittlere Arteriolenzahl aller Gruppen, verfehlte allerdings aufgrund der hohen Standardabweichung knapp die Signifikanz ($p=0,059$ vs. Ko).

Gegenüber der Placebogruppe konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, wie auch nicht zwischen den einzelnen Therapiegruppen.

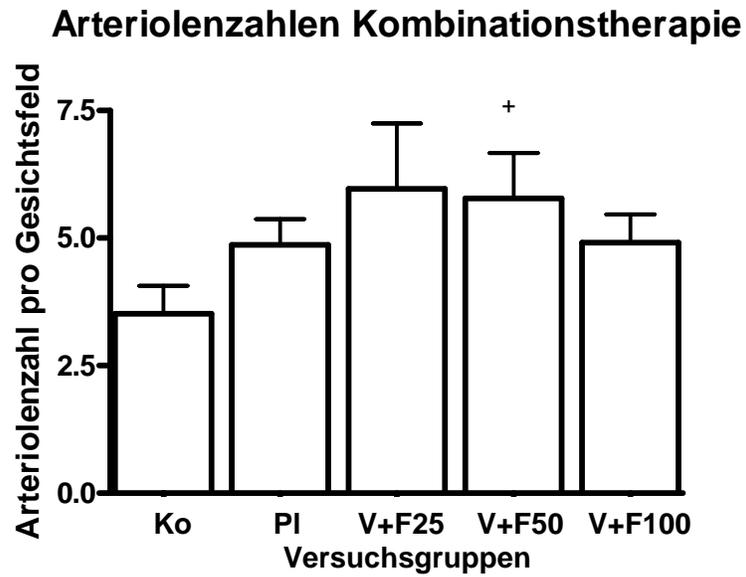
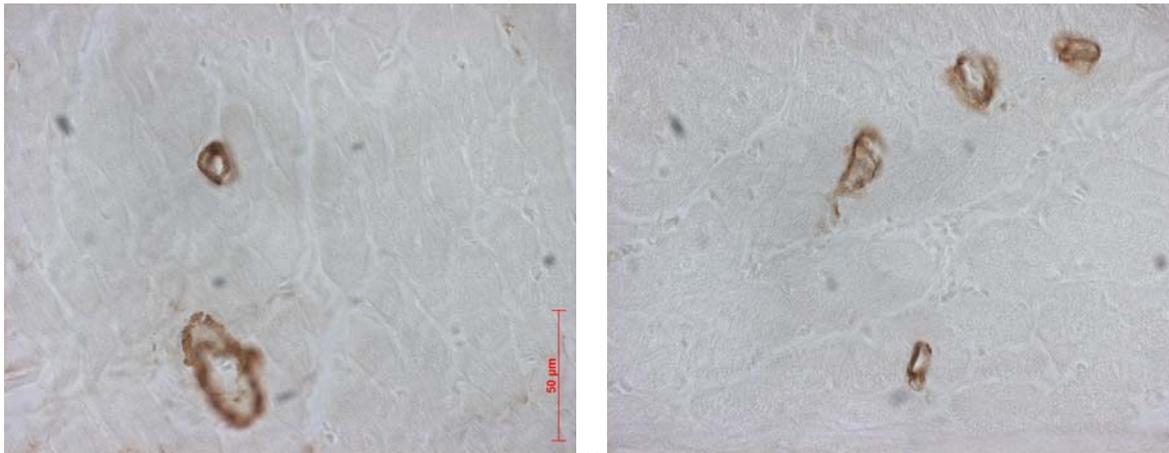


Abbildung 16: Arteriolenzahlen Kombiantinstherapie

SMA-Färbung. Signifikante Steigerung der Arteriolenzahl in der V+F50-Kombinationsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

+ = $p < 0,05$ vs. Ko



Ko

V+F50

Abbildung 17: Vergleich der Arteriolenzahl zwischen Kontrollgruppe links und Kombinationsgruppe V+F50 rechts

SMA-Färbung (braun = glatte Muskulatur der Arteriolen), 630-fache Vergrößerung

4 Diskussion

4.1 Tiermodell

Wir verwendeten für unsere Versuche ein Kaninchenmodell mit Induktion eines akuten Myokardinfarktes, welches auch schon von anderen Arbeitsgruppen erfolgreich zur Untersuchung therapeutischer Angiogenese genutzt wurde (41, 124). Auch wenn beispielsweise das kardiovaskuläre System des Schweins dem des Menschen ähnlicher ist, so haben doch Kaninchen die Vorteile der einfacheren Haltung und geringeren Kosten. Es würde sich im Anschluss anbieten, die erfolgreichsten Wachstumsfaktorkombinationen oder Wachstumsfaktoren aus unserem Kaninchenmodell auf andere aufwändigere Tiermodelle zu übertragen, die die chronische Ischämie bei Patienten mit KHK nachbilden. Hierfür eignet sich etwa das Ameroidkonstriktor-Modell in großen Spezies wie dem Schwein (74, 88, 120), mit welchem sich die Effekte von angiogenen Wachstumsfaktoren im chronisch ischämischen Myokard, ähnlich der KHK, gut untersuchen lassen (62).

Obwohl Kaninchen kleine Versuchstiere darstellen, ähnelt die Koronarzirkulation dem humanen Gefäßsystem, wo die natürliche Kollateralzirkulation in der Regel nicht ausreicht, ischämisches Myokard zu versorgen. Vergleichbar sind Kaninchenherzen schwach kollateralisiert (31), ebenso wie auch Schweineherzen, wohingegen beispielsweise Hunde oder Meerschweinchen stark kollateralisiertes Myokard besitzen und daher als Versuchstiere weniger geeignet scheinen (69, 75).

Bei der ersten Operation induzierten wir einen akuten Myokardinfarkt durch Ligation eines Koronararterienastes. Die Therapie erfolgte 7 Tage nach Induktion der Ischämie, zu einem recht späten Zeitpunkt, an dem die myokardiale Narbenbildung bereits eingetreten ist. Doch unsere Untersuchungen richteten sich auf die Grenzzone des Infarktes, da es Hinweise gibt, dass Myokard einer Infarktgrenzzone durch Vaskularisierung gerettet werden kann (1, 41, 121).

4.2 Wachstumsfaktorapplikation

In der Vergangenheit wurden viele verschiedene Ansätze zur therapeutischen Wachstumsfaktorapplikation untersucht. Sowohl die Darreichungsform der Wachstumsfaktoren (DNA oder Protein) als auch die Injektionsart (intravenös, intrakoronar, intramyokardial oder intraperikardial) wurden hierbei variiert.

4.2.1 Darreichungsform

Prinzipiell ist es möglich, Wachstumsfaktoren direkt als Protein zu verabreichen oder die für den Wachstumsfaktor kodierende DNA zu verwenden.

Die Proteintherapie hat den Vorteil, dass Pharmakokinetik und Gewebewirkspiegel besser vorhersagbar sind als bei Gen-Therapie. Einen Nachteil allerdings stellt die kurze Halbwertszeit der Proteine dar (58). Die schnelle Elimination exogen verabreichter Proteine macht meist repetitive Applikationen nötig (57), was je nach Applikationsart einen erneuten invasiven Eingriff für den Patienten bedeuten würde.

Einen Ausweg stellt - neben vereinzelt verwendeten slow-release devices, bisher allerdings nur für FGF-2 (101) - die Therapie mit Wachstumsfaktor-Genen dar. DNA-Transfer besitzt das Potential für längerfristige Expression eines angiogenen Gens und damit für die einmalige therapeutische Verabreichung (58). So wurde die Genexpression von nackter Plasmid-DNA unter Kontrolle eines CMV-Promotors in Kardiomyozyten für acht Tage mit einem Peak am ersten Tag nach intramyokardialer Injektion beobachtet (90), während von intramyokardial injiziertem FGF-2-Protein nur 5 % bis drei Tage erhalten bleibt (42, 84).

Ein weiterer Vorteil liegt in der Möglichkeit der zell- oder gewebespezifischen angiogenen Therapie (101).

Im direkten Vergleich von Protein- und DNA-Transfer zeigten Heilmann et al., dass im Schweinmodell mit chronischer Ischämie (Endoperation nach drei Monaten) in Bezug auf regionalen myokardialen Blutfluss in Ruhe, regionale Kontraktilität und teilweise systemische Hämodynamik FGF-2-Therapie als Plasmid effektiver ist als Proteintherapie (42).

Für die Gentherapie stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Häufig verwendet wurden Plasmid-DNA und virale Vektoren. Einige Versuche nutzten allerdings auch alternative DNA-Transfers mittels Liposomen (für VEGF) oder zell-basiertem Gentransfer mit autologen Zellen als Vektoren (57).

Virale Vektoren können von RNA- oder DNA-Viren abgeleitet sein.

Von RNA-Viren (Retroviren) –abgeleitete Vektoren integrieren in das Wirtsgenom, was in einer permanenten Expression des therapeutischen Gens resultiert. Ein Risiko stellt die mögliche insertionelle Mutagenese bei der Integration in das Wirtsgenom dar. Ausserdem sind Retroviren in nicht-teilenden Zellen nicht infektiös, was eine entscheidende Limitation für ihre Applikation darstellt. Desweiteren sind sie klein, weshalb die Größe der Gene, die in den Vektor inkorporiert werden können, limitiert ist.

DNA-virale Vektoren können auf der Grundlage von Adenoviren oder adeno-assoziierten Viren konstruiert sein. Das Gen für den angiogenen Wachstumsfaktor wird mit einem Promotor eingebaut (z.B. CMV-Promotor), welcher dann für konstitutive Expression des Proteins sorgen kann. Die viralen Konstrukte können eine Immunantwort hervorrufen. Eine frühe nicht-spezifische Entzündung kann auftreten, gefolgt von einer spezifischen Wirtsimmunantwort, die in einer verkürzten Dauer der transgenen Immunantwort resultiert (6).

Die klinische Anwendung dieser Vektoren ist vor allem auch dann schwierig, wenn bei Patienten eine vorbestehende Immunität gegen Adenovirus-Serotypen oder adeno-assoziierten Viren besteht, die mit dem für den Gentransfer genutzten Typus identisch sind oder mit diesem kreuzreagieren (67).

Zwar integrieren DNA-Viren nicht in das Wirtsgenom, und kritische virale Gene, die für die virale Vermehrung nötig sind, werden entfernt (6); dennoch verwendeten wir Plasmid-DNA, um Virusrisiken wie Immunantwort, insertionelle Mutagenese und virale Transmission zu vermeiden.

Plasmid-DNA-Expressionsvektoren enthalten DNA-Sequenzen zusätzlich zum Zielgen. Diese beinhalten unter anderem einen Transkriptionspromotor sowie Sequenzen, die der Stabilität und Funktionalität der mRNA dienen (6).

Als Nachteile eines Plasmid-DNA-Gentransfers werden eine Entzündungsreaktion und die geringe Transmissionseffektivität betrachtet (57). Während Viren effektive Transfermechanismen entwickelt haben, um ihre Nukleinsäuren in Säugerzellen zu transferieren, ist Plasmid-DNA-

Gentransfer weniger effizient. Trotzdem haben Tierversuche und klinische Studien die Funktionalität dieser Gentransfermethode nachgewiesen. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Transfektionsrate in ischämischen Muskel erhöht ist (113). Ausserdem könnte ein sekretiertes Protein trotz niedriger Transfektionseffektivität parakrine Effekte haben (6).

Weiterhin liegen Vorteile in der Expression von Plasmid-DNA in nicht-proliferierenden Zellen sowie in der leichten Produktion von Plasmid-DNA-Vektoren (57).

4.2.2 Injektionsart

Bisher wurde eine Wachstumsfaktortherapie bei kardialer Ischämie sowohl intravenös, intrakoronar, intraperikardial als auch direkt intramyokardial durchgeführt. Am einfachsten durchzuführen ist zweifelsohne die intravenöse Applikation des Wirkstoffes. Diese Methode ist billig und bei den meisten Patienten durchführbar - vermutlich aber auch ineffektiv (58). Einige Versuche zeigten, dass es nach intraarterieller Verabreichung von Wachstumsfaktorprotein zu Verbesserung der myokardialen Perfusion kam, bei intravenöser Gabe hingegen nicht (92, 93). Intrakoronare Gabe scheint zwar immerhin besser als intravenöse Injektion zu sein, aber auch hier existiert das gravierende Problem der geringen Wirkkonzentration im Zielgewebe. So wurde gezeigt, dass nach intravenöser Verabreichung von I125-markiertem FGF-2 der größte Teil der FGF-2-Aktivität in der Leber gefunden wurde. Nach einer Stunde lag die totale herzspezifische Aktivität bei 0,88 % für intrakoronare und 0,26 % für intravenöse Verabreichung, diese Werte sanken dann weiter auf 0,05 % und 0,04 % nach 24 Stunden (101).

Edelman et al. stellten fest, dass die Serumhalbwertszeit von intravenös injiziertem FGF-2 bei nur 2,9 Minuten lag. Auch war der FGF-2-Gehalt in den Organen Niere, Leber und Milz 5-30 mal höher als nach perivaskulärer Freisetzung aus Alginat-Mikrosphären (27).

Ein weiterer Nachteil von intravenöser, aber auch intrakoronarer Injektion von Wachstumsfaktoren ist die systemische Exposition. Dadurch können je nach Wachstumsfaktor Nebenwirkungen wie beispielsweise Hypotension entstehen (58).

Einen anderen Ansatz stellt die intraperikardiale Gabe von Wachstumsfaktoren dar. Dies ist, ebenso wie die intrakoronare Gabe, mittels Katheter möglich und bietet den Vorteil einer verlängerten Exposition mit erhöhter myokardialer Aufnahme des Wachstumsfaktors. Dieser Ansatz klingt zwar interessant und zeigte sich auch in präklinischen Studien erfolgreich, ist aber

in der Klinik häufig unpraktikabel: Für dieses Verfahren wird ein intaktes Perikard benötigt, die meisten Patienten mit kardialer Ischämie sind hingegen am Herzen voroperiert (z.B. Bypass-Chirurgie), und besitzen daher kein intaktes Perikard.

Daher bietet sich die direkte intramyokardiale Injektion der Wachstumsfaktoren an. Diese Methode ist effektiv, die verabreichten Wirkstoffe werden nicht von der Zirkulation entfernt, die systemische Exposition ist geringer, das Zielgebiet hingegen ist länger exponiert.

Für die Injektion wird ein operativer Zugang gewählt. Um die Risiken einer Operation zu vermeiden, beziehungsweise um auch nicht-operable Patienten behandeln zu können, sind mittlerweile auch vielversprechende perkutane Katheter-basierte Methoden entwickelt worden. Mit deren Hilfe ist es möglich, die Vorteile der direkten intramyokardialen Injektion von Wachstumsfaktoren zu nutzen, ohne die Nachteile einer Operation in Kauf nehmen zu müssen (58).

4.2.3 Dosis

Bei den Einzelfaktorversuchen wurden jeweils 100 µg der entsprechenden Wachstumsfaktor-DNA verwendet. Es wurden für jeden Einzelfaktor, also für VEGF, FGF-2 und GM-CSF, jeweils die gleiche DNA-Menge verwendet, um die Gruppen besser miteinander vergleichen zu können.

Bei den Kombinationsversuchen wurden verschiedene DNA-Konzentrationen getestet. Bei der V+F100-Gruppe wurden die Einzelfaktormengen addiert, das heißt, es wurden sowohl 100 µg VEGF-DNA als auch 100 µg FGF-2-DNA verabreicht. Demnach war die Gesamt-DNA-Menge doppelt so hoch wie in den Einzelfaktorversuchen.

Um auszuschließen, dass eventuelle Verbesserungen in dieser Kombinationsgruppe allein auf die erhöhte Konzentration an Wachstumsfaktor-DNA zurückzuführen sein könnten, führten wir den Versuch mit der V+F50-Gruppe durch. Hier wurden 50 µg VEGF-DNA und 50 µg FGF-2-DNA benutzt, die Gesamt-DNA-Menge entsprach also genau derjenigen der Einzelfaktorgruppen.

Da für viele Wachstumsfaktoren eine Dosisabhängigkeit bekannt ist (38, 90, 109, 122), und derartiges auch bei der Kombination von VEGF und FGF-2 in vitro beobachtet wurde (80), reduzierten wir die DNA-Dosis erneut mit der V+F25-Gruppe. Hier wurden nur je 25 µg VEGF-DNA und 25 µg FGF-2-DNA injiziert.

4.3 Histologie

In der Vergangenheit wurden verschiedene histologische Methoden verwendet, um Gefäße darzustellen. Dazu gehören auch Routinehistologien wie Hämatoxylin-Eosin- und Elastica-van Giesson-Färbungen. Allerdings sind diese Standardverfahren nicht für die Beurteilung von Angio- und Arteriogenese zu empfehlen, da sie Gefäße nicht gezielt anfärben und so die objektive Auszählung sehr schwer zu gewährleisten ist. Außerdem kann es bei der Fixation des Gewebes zum Kollabieren von Gefäßen kommen, die mit unspezifischen Färbemethoden dann oft nicht mehr eindeutig als Gefäße zu identifizieren sind.

Im Vergleich hierzu bieten immunhistologische Verfahren wichtige Vorteile. Durch die Verwendung eines spezifischen Antikörpers können bestimmte Gefäßstrukturen isoliert dargestellt werden. Wir verwendeten einen anti-CD31-Antikörper, um Endothel anfärben zu können, sowie einen anti-SMA-Antikörper, um die glatte Muskelschicht von arteriellen Gefäßen darzustellen.

Bei CD31 (PECAM-1, platelet endothelial cell adhesion molecule 1) handelt es sich um ein Adhäsionsmolekül, welches vor allem in den interzellulären Verbindungen von Endothelzellen in hoher Konzentration vorkommt. PECAM-1 wird schwächer exprimiert von Thrombozyten, Monozyten, Neutrophilen und einigen speziellen T-Zell-Populationen und kommt nicht auf Fibroblasten, Epithelien, Muskelzellen oder anderen Nicht-Gefäßzellen vor (73).

Die Färbung von Gefäßen mit Antikörpern gegen CD31 ist gut geeignet, um Angiogenese in unterschiedlichen Geweben und Tumoren zu beurteilen (19, 39, 50, 79).

Im direkten Vergleich verschiedener immunhistologischer Färbemethoden im normalen und ischämischen Herzen war die Verwendung von anti-CD31 für die Lokalisation von Endothelzellen am besten geeignet (51).

Bei α -smooth muscle actin (SMA) handelt es sich um eine Aktin-Isoform, die von glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert wird, nicht aber von Myokard, Fibroblasten oder quergestreifter Muskulatur (107). Daher ist ein Antikörper gegen SMA auch bestens geeignet, um Arteriolen und Arterien in der Herzmuskulatur anzufärben (22, 26).

Die im Infarktgebiet entstehenden Myofibroblasten verhalten sich zwar ebenfalls α -smooth-muscle-actin-positiv (36), sind aber aufgrund ihrer Morphologie von Gefäßen leicht zu

unterscheiden. Desweiteren wurden die Gefäßzahlen im Myokard bestimmt, und nicht im Infarktbereich.

4.4 Einzelfaktorergebnisse

4.4.1 FGF-2 oder VEGF

In der FGF-2-Gruppe konnten wir, wie auch in allen übrigen Therapiegruppen, eine signifikante Steigerung der Kapillardichte im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachten. Auch im Vergleich zur Placebogruppe, in der nur Vektor injiziert wurde, war ein signifikanter Anstieg der Kapillarzahlen zu verzeichnen. FGF-2, VEGF und auch GM-CSF, je 100 µg DNA, stimulierten Angiogenese hierbei in vergleichbarem Ausmaß.

Ebenso berichteten auch andere Arbeitsgruppen über eine Induktion von Angiogenese durch FGF-2 *in vivo* (8, 56, 61, 121). Auch *in vitro* ist seit längerem bekannt, dass FGF-2 Endothelzellproliferation, -migration und Angiogenese induziert (9)

Allerdings gibt es auch Arbeiten, die nach Gabe von FGF-2 keine Angiogenese feststellen konnten, hingegen aber Arteriogenese beobachteten (119). Einen Anstieg der Arteriolenzahl konnten auch wir in unseren Versuchen feststellen, die FGF-2-Gruppe zeigte sich diesbezüglich signifikant besser als die Kontrollgruppe. Ebenfalls einen arteriogenen Effekt von FGF-2 beschreiben auch weitere Tierversuche (115, 121).

Auch VEGF verursachte in unserer Studie einen signifikanten Anstieg der Kapillarzahlen im Vergleich zu Kontroll- sowie Leerplasmid-Gruppe.

Andere Tierstudien konnten ebenso erhöhte Kapillarzahlen nach Verabreichung von VEGF in ischämischen Myokardmodellen feststellen (97, 105).

Auch von positiven Effekten von VEGF auf die Arteriolenzahl wurden berichtet (7), so wie auch wir in unseren Versuchen eine signifikante Vermehrung der Arteriolen im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellten.

Obwohl es am ischämischen Hinterlaufmodell am Kaninchen auch negative Ergebnisse gab (23), wurde bereits vielfach gezeigt, dass VEGF wohl tatsächlich einen Einfluss auf das Arteriolenwachstum hat (7, 26, 82, 105).

Mitverantwortlich für diese Wirkung ist vermutlich, dass Monozyten, die eine Rolle in der Arteriogenese spielen (siehe auch 1.2.1.3), den VEGF-Rezeptor VEGFR-1 exprimieren (123). Dieser scheint in die Vermittlung von Monozyten-Chemotaxis involviert zu sein (30). Hierfür sprechen auch die Beobachtungen, dass Placenta Growth Factor (PlGF), ein selektiver VEGFR-1-Agonist, arteriogen wirkte, und zwar signifikant stärker als VEGF-E, ein Stoff, der selektiv VEGFR-2 bindet. PlGF war ebenso potent wie VEGF in Bezug auf die Monozytenaktivierung. Die These, dass Monozyten diese arteriogenen Effekte vermitteln, stützte auch die Feststellung, dass in Monozyten-depletären Kaninchen der arteriogene Effekt von PlGF ausblieb (82).

Bezüglich des Kapillarwachstums im Myokard spielt sicherlich der seit längerem bekannte direkte Effekt von VEGF auf Endothelzellen und damit Angiogenese eine Rolle. VEGF initiiert die Anlagerung von Endothelzellen, fördert die Bildung des Gefäßlumens und vergrößert die Gefäßlänge (17). Ein wichtiger Aspekt könnte aber auch die Wirkung von VEGF auf endotheliale Vorläuferzellen (endothelial progenitor cells, EPC) sein.

Progenitorzellen sind primitive Zellen aus dem Knochenmark, die in der Lage sind, zu proliferieren, zu migrieren, und sich zu verschiedenen reifen Zelltypen zu differenzieren. Endotheliale Progenitorzellen können hierbei zu Endothelzellen reifen und das Gefäßlumen auskleiden. Dieser Prozess findet vor allem während der Embryonalentwicklung statt und wird auch Vaskulogenese genannt. Mittlerweile weiss man aber, dass auch beim Erwachsenen EPC-abhängige Gefäßneubildung möglich ist und durch Wachstumsfaktoren wie VEGF, FGF und GM-CSF gefördert werden kann (111). So kommt es auch bei ischämisch bedingter VEGF-Freisetzung über die Mobilisierung von EPCs aus dem Knochenmark zur Angiogenese.

Asahara et al. zeigten, dass EPCs in verschiedene Neovaskularisationsorte erwachsener Mäuse inkorporiert werden. Hierzu gehören Gefäße in Wunden, Gefäßneubildungen im Ovarialzyklus und bei Hinterlaufischämie sowie Gefäßneubildungen an der Infarktgrenzzone bei induzierten Myokardinfarkten (4).

Es wurde festgestellt, dass die intraperitoneale Verabreichung von rekombinantem humanen VEGF₁₆₅ in vivo bei Mäusen zu einem Anstieg der Zahl der zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen führte. Dieser Effekt blieb aus, wenn gleichzeitig ein VEGF-neutralisierender

Antikörper verabreicht wurde. Bei im Anschluss durchgeführten Neovaskularisationsversuchen der Hornhaut konnte gezeigt werden, dass mit VEGF vorbehandelte Mäuse stärkere korneale Gefäßneubildungen aufwiesen als die Kontrollgruppe. Histologische Untersuchungen zeigten, dass aus dem Knochenmark stammende EPCs in die Kapillaren inkorporiert worden waren (5).

Auch bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit konnte gezeigt werden, dass intramyokardial injiziertes humanes VEGF₁₆₅ zu einem signifikanten Anstieg von endothelialen Progenitorzellen im Blut führte (54).

Welche essentielle Rolle VEGF in embryonaler Vaskulogenese und Angiogenese spielt, zeigte die Inaktivierung eines einzelnen VEGF-Allels in Mäusen. Dies resultierte in embryonaler Letalität zwischen Tag 11 und 12. Die VEGF^{+/-}-Embryos zeigten eine Anzahl von Entwicklungsanomalien und eine defekte Vaskularisation in verschiedenen Organen (18, 29).

Um die Wirkung von VEGF am adulten Herzen besser untersuchen zu können, wurde ein transgenes Mausmodell entwickelt, in welchem die VEGF-Expression im Herzen steuerbar ist. Mit Hilfe dieses Modells wurde gezeigt, dass VEGF am Herzen das Wachstum von neuen Blutgefäßen fördert, und zwar sowohl von Kapillaren als auch Arteriolen (26).

Wir verwendeten DNA für die VEGF₁₂₁-Isoform, welche gemeinsam mit VEGF₁₆₅ zu den am häufigsten für die Induktion von Gefäßwachstum verwendeten Isoformen gehört. Der Unterschied dieser beiden Isoformen liegt darin, dass VEGF₁₂₁ die Aminosäuren der Exons 6 und 7 nicht besitzt, während VEGF₁₆₅ nur die Aminosäuren des Exons 7 fehlen.

Daher bindet VEGF₁₂₁ nicht an Heparin oder die Extrazellulärmatrix, VEGF₁₆₅ hingegen besitzt Heparin-bindende Eigenschaften (72) (siehe auch 1.2.3.1).

In diesem Versuch wurde VEGF₁₂₁ verwendet, da es frei diffusionsfähig ist (30) und die höchste Bioverfügbarkeit besitzt (28).

Bezüglich der Kapillarzahlen zeigte sich in unseren Versuchen, dass schon alleine die intramyokardiale Injektion des Leerplasmids, also eines Placebos, zu einer signifikanten Steigerung der Kapillardichte führte. Dieser zunächst überraschende Effekt wurde allerdings auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet. So untersuchten Chu et al. die Auswirkung von mehrfachen Nadelpunktionen im Herzgewebe. Sie stellten fest, dass dieser mechanische Reiz zu einer gesteigerten Wachstumsfaktorkonzentration im Gewebe sowie Erhöhung der Gefäßdichte

im Herzmuskel führte. Dies ließe sich als unspezifische Reaktion auf die Gewebsverletzung deuten (20).

Wir führten sowohl eine Kontrollgruppe ohne Therapie als auch eine Placebogruppe durch. So konnten wir diese unspezifische Induktion von Angiogenese beobachten, aber in den Versuchen mit VEGF-, FGF-2- und GM-CSF-DNA auch feststellen, dass die durch die Wachstumsfaktoren hervorgerufene Angiogenese stärker ausfiel als der Reaktion auf Placebo entsprach. Alle Einzelfaktorgruppen zeigten signifikant bessere Ergebnisse als die Kontrollgruppe sowie auch signifikant bessere Ergebnisse als die Placebogruppe.

Die Ergebnisse der Arteriolenzahlen waren weniger deutlich. So waren zwar die Arteriolenzahlen der Einzelfaktorgruppen signifikant höher als die der Kontrolle ohne Therapie, während hingegen die Placebogruppe keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe aufwies. Doch schafften es die Einzelfaktortherapiegruppen nicht, signifikant bessere Ergebnisse als die Placebogruppe zu erzielen. Dies könnte einerseits an den für die recht kleinen Arteriolenzahlen und damit verbundenen hohen Standardabweichungen zu kleinen Gruppen liegen, es ist aber auch nicht auszuschließen, dass es sich bei der beobachteten arteriogenen Verbesserung in den Therapiegruppen nur um einen unspezifischen Effekt handelt, der ansatzweise vielleicht auch in der Placebogruppe zu erkennen ist.

Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass wir die Gefäßzahlen nur zu einem einzigen einheitlichen Zeitpunkt, sieben Tage nach Therapie, untersuchen konnten. Es gibt aber Hinweise dafür, dass Angio- und Arteriogenese ihren Höhepunkt zu unterschiedlichen Zeitpunkten erreichen, und es daher denkbar scheint, zu einem anderen, eventuell etwas späteren Zeitpunkt, noch eindrucksvollere Ergebnisse bezüglich der Arteriogenese aufzeigen zu können. So wurde in einem ischämischen Kaninchenhinterlaufmodell der maximale angiogene Effekt nach fünf Tagen beobachtet, während Arteriogenese zehn Tage benötigte (49).

4.4.2 GM-CSF

Ursprünglich wurde GM-CSF klinisch zur Behandlung von Patienten mit hämatologischen und onkologischen Erkrankungen genutzt.

Mittlerweile wurde GM-CSF aber auch als ein stark arteriogenes Peptid identifiziert, welches über die Verlängerung der Lebensspanne von Monozyten/Makrophagen wirkt. Adhäsion, Aktivierung und Migration von Monozyten spielen eine obligatorische Rolle bei der Arteriogenese (13). Monozyten produzieren verschiedene Wachstumsfaktoren, welche bei Anheftung an transformierende Gefäße freigesetzt werden (94).

In unseren Versuchen konnten wir zeigen, dass die GM-CSF-Versuchsgruppe, in der wir 100 µg der Wachstumsfaktor-DNA injizierten, die Zahl der Arteriolen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant steigerte ($p=0,027$). Dies spricht für eine Stimulation der Arteriogenese in dieser Versuchsgruppe.

Andere Arbeitsgruppen berichteten von ähnlichen Ergebnissen.

Experimentell wurde dokumentiert, dass aktivierte Makrophagen in Meerschweinchenkornea Gefäßwachstum induzieren (83), und das rekombinantes humanes GM-CSF (Molgramostin) Arteriogenese stimuliert (99).

Im Kaninchenmodell führte die kontinuierliche Infusion von GM-CSF für sieben Tage in den proximalen Stumpf der akut verschlossenen A. femoralis zu einer arteriogenen Antwort. Die Kollateralarterien nahmen in Zahl und Größe im Angiogramm um das Doppelte zu. Noch bessere Ergebnisse wurden mit der Kombination von GM-CSF und MCP-1 erreicht (13), allerdings scheint dieses Zytokin für den Einsatz im ischämischen Myokard nicht geeignet zu sein (43).

Auch im hypoperfundiertem Rattenhirnmodell führte die subkutane Applikation von GM-CSF zu funktioneller Verbesserung von hämodynamischen Parametern im Hirn durch Stimulation von Arteriogenese (12).

Bisher wurde meist der Einfluss von GM-CSF auf die Arteriogenese beurteilt.

Überraschend war daher unser Ergebnis, dass GM-CSF auch das Kapillarwachstum stark stimulierte. Die Behandlung mit 100 µg GM-CSF-DNA führte zu einem signifikanten Anstieg der Gefäßzahlen im Vergleich zur Kontrollgruppe wie auch zur Placebogruppe ($p=0,000$ vs. Ko,

$p=0,043$ vs. PL). Tatsächlich zeigte sich die Verabreichung von GM-CSF-DNA in Bezug auf die Angiogenese ebenso potent wie VEGF- oder FGF-2-DNA. Zwischen diesen Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Wichtig könnte in diesem Zusammenhang die Beobachtung sein, dass GM-CSF die Migration und Proliferation von Endothelzellen induziert (14). Abgesehen von diesem direkten Effekt auf Endothelzellen könnten indirekte Einflüsse eine Rolle in der Induktion von Kapillarwachstum durch GM-CSF spielen. Monozyten reifen zu Makrophagen, welche große Mengen an Wachstumsfaktoren, unter anderem FGF-2, produzieren (13). Diese Wachstumsfaktoren könnten daraufhin ihrerseits Angiogenese stimulieren.

Außerdem mobilisiert auch GM-CSF vaskuläre Progenitorzellen aus dem Knochenmark, welche zur Neovaskularisation beitragen (112).

4.5 Kombination von VEGF und FGF

Es gibt viele Zytokine, die angiogen wirksam sind.

Man geht heute davon aus, dass die angiogene Aktivität von einem Zytokin wie VEGF oder FGF-2 vom Kontext abhängt, das heißt, von Interaktionen mit anderen Faktoren, die in der perizellulären Endothelumgebung vorhanden sind (68, 81).

Da VEGF und FGF-2 oft gemeinsam vorkommen, bestand der Verdacht, dass sich diese Wachstumsfaktoren gegenseitig beeinflussen könnten. So beschrieben Goto et al., dass humane Glioblastome, mit die am höchsten vaskularisierten Tumore, sowohl VEGF als auch FGF-2 produzieren. Sie untersuchten den Effekt von diesen Wachstumsfaktoren auf BCE-Zellen (bovine capillary endothelial cells), welche in einem Typ-I-Kollagengel verteilt waren, hinsichtlich Morphologie und Proliferation der Zellen. Es wurde gezeigt, dass die Kapillarendothelzellzahl bei Gabe von VEGF (als biologische Hauptaktivität des verwendeten SNB-19-Mediums) höher blieb als in der Kontrollgruppe. FGF-2 zeigte die gleiche Wirkung, allerdings dreimal schwächer als VEGF. Wurden aber VEGF und FGF-2 gleichzeitig verabreicht, resultierte dies in einer signifikant größeren Zellzahl als der Summe der Zellzahlen aus den Einzelfaktorversuchen entsprochen hätte. FGF-2 und VEGF hatten also einen synergistischen Effekt auf die Proliferation von BCE-Zellen in einem Kollagengel. Der synergistische Effekt wurde über eine weite Spanne von FGF-2-Konzentrationen beobachtet (40).

Auch Pepper et al. konnten einen synergistischen Effekt von VEGF und FGF-2 in vitro zeigen. Sie behandelten BME-Zellen (bovine microvascular endothelial cells) in einem dreidimensionalen Kollagengel mit humanem VEGF₁₆₅ und humanem FGF-2. Bei gleichzeitiger Anwendung beider Wachstumsfaktoren wurde eine angiogene Antwort induziert, die weit größer als additiv war, und welche mit größerer Geschwindigkeit auftrat verglichen mit der Einzelfaktorgabe (80).

Aber nicht nur in vitro konnte bisher diese synergistische Wirkung von VEGF und FGF-2 auf das Gefäßwachstum nachgewiesen werden, auch in-vivo-Versuche zeigten vergleichbare Ergebnisse.

In einem Kaninchenmodell mit unilateraler Hinterlaufischämie untersuchten Asahara et al. die Kombination dieser zwei Wachstumsfaktoren. Zehn Tage nach Induktion der Ischämie wurden 500 µg VEGF beziehungsweise 10 µg FGF-2, oder 500 µg VEGF unmittelbar gefolgt von 10 µg FGF-2 per Katheter in die A. iliaca interna injiziert. Als Kontrolle diente eine Vektorgruppe. Nach 10 beziehungsweise 30 Tagen stellte man fest, dass die Kombinationstherapie einen signifikant größeren und schnelleren Aufbau einer Kollateralzirkulation stimulierte als VEGF oder FGF-2 alleine, welches in einer stärkeren hämodynamischen Verbesserung resultierte. Die kombinierte Gabe von VEGF und FGF-2 wirkte synergistisch (3).

Auch in einem weiteren in-vivo-Versuch gab es Hinweise auf eine Wirkungssteigerung bei kombinierter Gabe von VEGF und FGF-2. Mäusen wurde entweder 80 ng FGF-2, 160 ng VEGF oder 40 ng FGF-2 gemeinsam mit 160 ng VEGF in Korneamikropockets eingebracht. Die beobachtete Angiogenese fiel bei kombinierter Gabe stärker aus als bei getrennter Verabreichung der Wachstumsfaktoren. Desweiteren wurde gezeigt, dass der entstandene Gefäßplexus bei Kombination von 40 ng FGF-2 und 80 ng VEGF, im Gegensatz zu den Einzelfaktorversuchen mit 40 ng FGF-2 oder 160 ng VEGF, extensivem Remodelling zu einem gut definierten vaskulären Netzwerk unterlief, welches ebenfalls entscheidend länger bestehen blieb als die durch Einzelfakten entstandenen Gefäße (15).

Auch unsere Versuchsergebnisse am ischämischen Kaninchemyokard könnten auf einen angiogenen Synergismus von VEGF und FGF-2 hindeuten. Der prozentuale Anstieg der Kapillardichte (Gruppenmittelwerte) über Leerplasmidniveau lag bei 18 % in der VEGF-Versuchsgruppe und bei 23 % in der FGF-2-Gruppe. Die Kombinationsgruppe V+F50 lag bei 46 %, was für einen Effekt spricht, der größer als additiv, d.h. synergistisch ist. In der V+F50-Gruppe wurde mit jeweils 50 µg VEGF- und FGF-2-DNA therapiert, also mit insgesamt 100 µg

DNA, derselben DNA-Menge, die bei den Einzelfaktorversuchen verwendet wurde. In der V+F25-Gruppe lag der prozentuale Kapillarzyuwachs sogar bei 51 %; in dieser Gruppe wurde zusammengenommen nur 50 µg DNA verabreicht, also nur die Hälfte der DNA-Menge der Einzelversuche.

In unseren Versuchen stellte sich heraus, dass der Erfolg der Kombinationstherapie dosisabhängig ist.

Während die Therapie mit 100 µg VEGF-DNA plus 100 µg FGF-2-DNA (V+F100-Gruppe) nur tendenziell die Einzelfaktortherapie mit 100 µg VEGF-DNA oder 100 µg FGF-2-DNA übertraf, war der Effekt der Kombinationsgruppen mit geringeren DNA-Mengen, V+F50 sowie V+F25, signifikant besser als die beiden Einzelfaktorgruppen VEGF und FGF-2. Die V+F25-Versuchsgruppe, diejenige mit der geringsten Menge von Wachstumsfaktor-DNA, schien hierbei die beste zu sein, auch wenn der Unterschied von V+F25 zu V+F50 nicht das Signifikanzniveau erreichte.

Interessanterweise haben auch andere Arbeitsgruppen das Phänomen beobachten können, dass bei der Kombination von VEGF- und FGF-2-Protein die ideale Wachstumsfaktormenge geringer ist als bei der getrennten Gabe.

In dem *in vitro* Versuch von Pepper et al., die den Effekt der VEGF-FGF-2-Kombinationstherapie anhand von Endothelzellen in einem Kollagengel untersuchten, lag die beste Dosis für VEGF bei 100 ng/ml und für FGF-2 bei 10-30 ng/ml. Bei der kombinierten Gabe allerdings lag die optimale Dosis nur bei 30 ng/ml VEGF und 10 ng/ml FGF-2 (80).

Diese Ergebnisse unterstützen demnach unsere Versuchsergebnisse, auch wenn wir für die Einzelfaktorversuche die Wachstumsfaktor-DNA-Mengen nicht variierten, und es möglich wäre, nicht die beste DNA-Menge im Einzelfaktorversuch verwendet zu haben.

Als Ursache für die Dosisabhängigkeit bei unserer DNA-Therapie könnte eine Sättigung der DNA-Aufnahme oder -Expression in Frage kommen. Auch wäre es denkbar, dass es zu einer Überladung von DNA oder synthetisiertem Protein auf Zell- oder Gewebsebene kommen könnte, welche möglicherweise die angiogene Antwort beeinträchtigt.

Die molekularen Ursachen für den beobachteten Synergismus von VEGF und FGF-2 sind bisher noch nicht eindeutig geklärt. Es gibt allerdings zahlreiche Indizien dafür, dass VEGF und FGF-2 sich gegenseitig beeinflussen und voneinander abhängig sind.

Es wurde gezeigt, dass FGF-2 eine VEGF-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen (108) und in Gefäßendothelzellen (98) induziert. Endogenes 18-kD FGF-2 reguliert die VEGF-Expression hierbei durch extrazelluläre Interaktion mit Zellmembranrezeptoren, hochmolekulares FGF-2 agiert via intrazellulären Mechanismen.

Die systemische Gabe von neutralisierenden VEGF-Antikörpern reduzierte die FGF-2-induzierte Angiogenese dramatisch (98). Dass umgekehrt auch FGF-2-neutralisierende Antikörper die VEGF-induzierte Angiogenese in vitro blockieren, lässt die komplexen Interaktionen zwischen FGF-2 und VEGF erkennen. Diese Blockierung der in vitro Angiogenese war dabei dosisabhängig bis zu 100%ig (68).

4.6 Klinische Anwendung

4.6.1 Angiogene Therapie ischämischer Krankheiten

Es hat bisher bereits eine Anzahl von klinischen Studien zur angiogenen Therapie mittels Wachstumsfaktoren gegeben. Verwendet wurden hierbei meist VEGF oder FGF-2, aber auch GM-CSF.

Therapiert wurden verschiedene Krankheiten, denen ursächlich ischämische Verhältnisse zugrunde liegen. Hierzu gehören außer der KHK (koronare Herzkrankheit) vor allem auch die PAVK (periphere arterielle Verschlusskrankheit) (57, 71). Zu diesen zwei weit verbreiteten und mit herkömmlichen Methoden oft nur unzureichend zu therapierenden Krankheiten wurden bisher die meisten Studien durchgeführt.

Nachdem die Therapie myokardialer Ischämie mit angiogenen Wachstumsfaktoren in Tierversuchen vielversprechende Ergebnisse zeigte (siehe auch 4.4), wurde begonnen, diese neue Therapieoption auf den Menschen zu übertragen.

In mehreren Phase-I-Versuchen wurde die technische Durchführbarkeit und Sicherheit bestätigt. Obwohl die starke Überexpression von VEGF in Mäusen mit der Entwicklung von Angiomen und vaskulären Tumoren assoziiert wurde, konnten diese Komplikationen glücklicherweise in keinen Wachstumsfaktorstudien beobachtet werden, die große Versuchstiere oder Menschen involvierten (101). Die therapeutische Angiogenese scheint gut vertragen zu werden und sicher zu sein, wenn allerdings natürlich Langzeitergebnisse erst in begrenztem Umfang zugänglich sind.

Auch in diesen ersten Phase-I-Versuchen fand man positive Resultate bei der Behandlung mit Wachstumsfaktoren, wenn auch diese Studien nicht darauf ausgelegt sind, die Wirksamkeit der Therapie eindeutig zu belegen.

Die meisten klinischen Studien wurden mit VEGF und FGF-2 durchgeführt, aber auch GM-CSF wurde bereits in der Klinik eingesetzt.

In einer doppelblinden, placebokontrollierten Studie wurden 21 Patienten mit koronarer Herzkrankheit, die der herkömmlichen Bypasschirurgie nicht zugänglich waren, mit einer intrakoronaren Injektion von 40 µg GM-CSF sowie über zwei Wochen subkutan mit GM-CSF

(10 µg/kg) beziehungsweise Placebo behandelt. Nach zwei Wochen wurden signifikante Verbesserungen im gemessenen Kollateralflußindex im Vergleich zur Placebogruppe beobachtet (99).

Weitere Studien mit GM-CSF zur Therapie der koronaren Herzkrankheit könnten interessant sein, um diese positiven Ergebnisse zu unterstützen sowie weitere funktionelle Parameter zu untersuchen.

Bereits weit besser klinisch untersucht in Bezug auf die Behandlung der koronaren Herzkrankheit ist heute aber VEGF.

Es wurden sowohl klinische Studien mit VEGF-DNA (35, 64, 65, 87, 91, 110, 117, 118) als auch –Protein (44, 46, 47) durchgeführt.

Über Minithorakotomien wurde Plasmid-DNA (phVEGF₁₆₅) direkt intramyokardial injiziert. Die Patientenzahlen waren gering (n=5-7) und das operative Verfahren ermöglichte keine Placebokontrollen, doch die Ergebnisse bestätigten die Durchführbarkeit und Sicherheit dieses Verfahrens und deuteten auch auf vielversprechende symptomatische Verbesserungen der Patienten hin (65, 91, 110). Auch ein intramyokardialer Adenovirustransfer von VEGF₁₂₁ wurde problemlos durchgeführt (35).

Der Gentransfer von VEGF, über eine Minithorakotomie intramyokardial injiziert, zeigte zwar gute Ergebnisse, war allerdings nicht placebokontrolliert. Die Durchführung einer Placebokontrolle wurde erst durch die Verwendung einer perkutanen katheterbasierten Injektionsmethode möglich. Nach einer ersten Studie mit sechs Patienten (118) wurde eine größere doppelblinde, placebokontrollierte Phase I/II Studie durchgeführt. 19 Patienten wurden doppelt verblindet in drei Versuchsgruppen eingeteilt und erhielten entweder Placebo oder phVEGF₂ in einer Dosis von 200 µg, 800 µg oder 2000 µg über einen Katheter intramyokardial injiziert. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Verbesserung der Angina-Klasse der VEGF-behandelten Patienten im Vergleich zur nahezu unveränderten Placebogruppe. Auch die Steigerung der Belastungstest-Zeiten und die Daten der Seattle Angina Fragebögen im Vergleich zur Placebogruppe sowie die SPECT-Bilder zur Bestimmung der myokardialen Perfusion sprachen stark für die Effektivität der VEGF-Behandlung von Patienten mit koronarer Herzkrankheit (64).

Die bisher größte klinische Studie mit VEGF nutzte aber nicht die intramyokardiale Injektion von Wachstumsfaktor-DNA, sondern die intrakoronare und intravenöse Applikation von rekombinantem VEGF-Protein. Nach der Durchführung von Phase-I-Studien mit VEGF-Protein (44, 47), in denen die maximal tolerable Dosis von systemisch und intrakoronar verabreichtem VEGF-Protein bestimmt worden war, wurde eine große Multicenterstudie mit dem Namen VIVA (VEGF in Ischemia for Vascular Angiogenesis) ins Leben gerufen. An dieser doppelblinden, placebokontrollierten Studie nahmen 178 Patienten mit Angina Pectoris, die nicht mit Standardrevaskularisierungsmaßnahmen behandelt werden konnten, teil. Die Patienten bekamen Placebo, niedrig dosiertes rhVEGF (17 ng/kg/min) oder höher dosiertes rhVEGF (50 ng/kg/min) über 20 Minuten intrakoronar infundiert, gefolgt von vierstündigen intravenösen Infusionen an Tag 3, 6 und 9. Als primäres Endziel wurden die Belastungstestergebnisse nach 60 Tagen festgelegt, weiterhin untersucht wurden Veränderungen in der Angina-Klasse und Lebensqualität sowie myokardiale Perfusionsbilder. Die mit Spannung erwarteten Ergebnisse waren allerdings eher enttäuschend. Zwar fand sich nach 60 Tagen eine signifikante Verbesserung in der Angina-Klasse, es gab allerdings zwischen den Gruppen keine Unterschiede. In keinem der Parameter ließ sich nach 60 Tagen eine signifikante Verbesserung erkennen, die das Maß der Placebogruppe überschritt. Erst nach 120 Tagen zeichnete sich ab, dass die höher dosierte rhVEGF-Gruppe in Angina-Klasse und tendentiell in den Belastungstests besser abschnitt als die Placebogruppe (46).

Es gibt mehrere denkbare Gründe für die etwas ernüchternden Ergebnisse der VIVA-Studie im Vergleich zu anderen Versuchen.

So stellt die höhere VEGF-Dosis mit 50 ng/kg/min bereits die höchste Dosis dar, die systemisch (iv) beziehungsweise intrakoronar verabreicht toleriert wird, bei höheren Dosen fällt der systolische Blutdruck zu stark ab (44, 47). Nachdem die höhere VEGF-Konzentration aber die effektivere zu sein schien und für die VEGF-Wirkung auch eine Dosisabhängigkeit seit langem bekannt ist (38, 90, 109, 122), ist möglicherweise 50 ng/kg/min zwar die höchste tolerable, aber keineswegs die wirkungsvollste Dosis. Möglicherweise läge beim Menschen die potenteste Dosis für systemisch verabreichtes VEGF-Protein über der klinisch verträglichen Dosis, zumal auch in Tierversuchen gezeigt werden konnte, dass intrakoronar und intravenös verabreichte Wachstumsfaktoren nur zu äußerst geringer herzspezifischer Aktivität führen (27).

Auch mit dem Wachstumsfaktor FGF-2 wurden bereits mehrere Phase-I-Studien durchgeführt (59, 60, 89, 100, 114, 116).

Bei all diesen Studien wurde FGF-2-Protein verwendet, Studien mit FGF-2-Gentransfer wurden bisher noch nicht durchgeführt (63).

Die bisher größte Studie mit FGF-2 war die sogenannte FIRST-Studie (FGF Initiating Revascularization Trial), eine doppelblinde placebokontrollierte Multicenterstudie mit 337 KHK-Patienten. Ähnlich der VIVA-Studie wurde bei diesem Versuch Wachstumsfaktorprotein mittels einer einmaligen 20-minütigen intrakoronaren Infusion von 0,3, 3 oder 30 µg/kg FGF-2 beziehungsweise Placebo verabreicht. In Phase-I-Studien war Hypotension als dosisabhängig und dosislimitierend festgestellt worden, 36 µg/kg war die höchste Dosis, die intrakoronar verabreicht toleriert wurde (59).

Im Belastungstest zeigten alle Gruppen, einschliesslich der Placebogruppe, nach 90 Tagen bessere Ergebnisse, zwischen den Gruppen waren allerdings keine eindeutigen Unterschiede festzustellen.

Besser als Placebo schnitt die FGF-2-Therapie aber hinsichtlich Angina-Klasse und Lebensqualität nach 90 Tagen ab, nach 180 Tagen war dieser Unterschied allerdings nicht mehr signifikant, da die Placebogruppe in dieser Zeit zunehmend besser wurde.

Es bleibt interessant, neue Studien zum myokardialen Gentransfer bei koronarer Herzkrankheit, eventuell auch zur kombinierten Gabe von verschiedenen Wachstumsfaktorgenen, weiter zu verfolgen.

4.6.2 Antiangiogene Tumorthherapie

Die Beobachtung, dass VEGF und FGF-2 in vivo synergistisch auf das Gefäßwachstum wirken können, ist nicht nur für die Therapie der koronaren Herzkrankheit oder anderer ischämischer Erkrankungen eine wichtige Entdeckung.

Auch andere klinische Bereiche, in denen Wachstumsfaktoren eine Rolle spielen, sind hiervon betroffen. Ein bedeutendes Feld stellt hier die antiangiogene Tumorthherapie dar.

Grundlage bildete die Entdeckung, dass das Wachstum von soliden Neoplasien stets von Neovaskularisation begleitet ist (34). Gefäße ermöglichen es Tumoren zu wachsen sowie zu metastasieren (33). Diese Assoziation zwischen soliden malignen Tumoren und Gefäßneubildung führte zur Entwicklung einer neuen Therapiestrategie: Inhibition von Tumorangiogenese, beispielsweise durch Antikörper gegen VEGF oder eine lösliche Form des FGF-2-Rezeptors (78).

Ein Synergismus zwischen VEGF und FGF-2 wäre nun auch in diesem Zusammenhang relevant, da dieser antiangiogene Strategien rechtfertigen könnte, die sich auf die Neutralisation eines Einzelfaktors stützen, trotz der Probleme der Redundanz. Denn wenn eine angiogene Antwort von VEGF sowie FGF-2 unterstützt wird, so würde die Neutralisation nur einer dieser Faktoren diese Antwort stärker als erwartet reduzieren - durch Unterdrückung des synergistischen Effektes (40, 80).

5 Zusammenfassung

Einleitung: Die Induktion von Gefäßwachstum zur Therapie ischämischer Krankheiten wie der koronaren Herzkrankheit ist Gegenstand der aktuellen Forschung und zeigt vielversprechende Ansätze. Das Ziel dieser Studie war, den Einfluss von VEGF-, FGF-2- sowie GM-CSF-Plasmid-DNA auf Angiogenese und Arteriogenese im ischämischen Kaninchenmyokard zu untersuchen. Desweiteren war von besonderem Interesse, ob und bei welcher DNA-Konzentration VEGF und FGF-2 synergistisch wirken könnten.

Methoden: Eine Woche nach Induktion eines Myokardinfarktes im Kaninchenmodell durch Ligation eines Koronararterienastes wurde die Therapie mittels verschiedener Wachstumsfaktorgene durchgeführt. Hierzu wurde Plasmid-DNA direkt intramyokardial injiziert: VEGF 100 µg DNA (n=9), FGF-2 100 µg DNA (n=8), GM-CSF 100 µg DNA (n=8), VEGF+FGF-2 je 25 µg DNA (V+F25) (n=7), VEGF+FGF-2 je 50 µg DNA (V+F50) (n=9), sowie VEGF+FGF-2 je 100 µg DNA (n=8). Als Kontrolle dienten eine Placebogruppe, bei der das Plasmid ohne Insert gegeben wurde (n=10), sowie eine Ischämiegruppe (n=9). Eine Woche nach Therapie wurde das Herz mikroskopisch untersucht. Mit Hilfe von immunhistologischen CD31- und Smooth-Muscle-Actin-Färbungen wurden Kapillar- und Arteriolenzahlen im Infarkttrandgebiet bestimmt.

Ergebnisse: Es zeigte sich bei allen Einzelfaktorgruppen, VEGF, FGF sowie GMCSF, eine signifikante Steigerung der Kapillardichte, sowohl im Vergleich zur Ischämiegruppe als auch im Vergleich zur Placebogruppe. Die Arteriolenzahl stieg ebenfalls signifikant in allen Einzelfaktorgruppen im Vergleich zur Ischämiegruppe. Die kombinierte Gabe von VEGF- und FGF-2-DNA in drei verschiedenen Konzentrationen resultierte nicht nur in einem hochsignifikanten Kapillanzahlanstieg im Vergleich zu den Kontrollgruppen, sondern die Gruppen V+F50 und V+F25 zeigten sich auch signifikant den Einzelfaktorgruppen VEGF und FGF überlegen. Die Arteriolenzahlen waren bei V+F50 signifikant gegenüber der Ischämiegruppe erhöht, V+F25 wies zwar den höchsten Mittelwert aller Gruppen insgesamt auf, verfehlte aber dennoch das Signifikanzniveau. V+F100 zeigte sich nur tendentiell der Kontrolle überlegen.

Zusammenfassung: Im Infarktgrenzgebiet eines Kaninchenmodelles führt die intramyokardiale Injektion von VEGF-, FGF-2- oder GM-CSF-Plasmid-DNA zur Induktion von Angiogenese und Arteriogenese. Hierbei zeigte besonders die Kombinationstherapie mit den zwei Wachstumsfaktorgen für VEGF und FGF vielversprechende Ergebnisse.

6 Anhang

6.1 Tabellen über Letalität und Versuchsausschluss

Gruppe	Anzahl der Todesfälle	Todeszeitpunkt/ Todesursache
Kontrolle	n=2	Tod am Tag der Therapie-OP (Verdacht auf Mikrosphärenkomplikation) Tod nach Einleitung bei End-OP
Leerplasmid	n=1	Tod in der ersten postoperativen Nacht der Therapie-OP
VEGF	n=0	
FGF	n=2	Tod am Tag der Therapie-OP (Krampfanfall) Tod am Tag der Therapie-OP
GMCSF	n=0	
V+F100	n=2	Tod am Tag der Therapie-OP (Euthanasie in Agonie) Tod am Tag der Therapie-OP (Verdacht auf Mikrosphärenkomplikation)
V+F50	n=1	Tod am Tag der Therapie-OP (Euthanasie bei Krampfanfall)
V+F25	n=1	Tod am Tag der Therapie-OP
gesamt	n=9	

Tabelle 1: Letalität und Todesursachen innerhalb der Versuchsgruppen

Gruppe	Anzahl der nicht gewerteten Präparate	Ursache des Versuchsausschlusses
Kontrolle	n=3	Infarkt nicht ausreichend Infarkt nicht ausreichend Infarkt komplett (keine Randzone)
Leerplasmid	n=1	Infarkt nicht ausreichend
VEGF	n=2	Infarkt nicht ausreichend Infarkt nicht ausreichend
FGF	n=3	Infarkt nicht ausreichend nicht anfärbbar nicht anfärbbar
GMCSF	n=0	
V+F100	n=0	
V+F50	n=0	
V+F25	n=1	Infarkt nicht ausreichend
gesamt	n=10	

Tabelle 2: Histologische Ausschlussursachen innerhalb der Versuchsgruppen

6.2 Tabellen der Mittelwerte pro Versuchstier

Gruppe	Ko n=9	PI n=10	VEGF n=9	FGF n=8	GMCSF n=8
	26,5	33,75	41,25	46,625	40,375
	30,375	41,25	45	35,25	36,375
	31,375	41,125	43	47,625	45
	26	32,375	42,75	48,875	44,375
	25,5	33	40,625	42	32,625
	30,75	33	39,5	36,25	40
	25,5	35,375	42,75	40,125	39,625
	27,5	29,875	36,875	35,25	36,875
	24,75	36,25	33,375		
		28			
MW	27,5833333	34,4	40,5694444	42,3928571	39,7678571
SD	2,56402394	4,2998708	3,57186877	5,49783507	4,3123059

Tabelle 3: Mittelwerte der Kapillarzahlen pro Gesichtsfeld für jedes Versuchstier

Gruppe	V+F25 n=7	V+F50 n=9	V+F100 n=8
	50,625	54,5	38,875
	50,25	45,375	46,875
	42,125	55,375	43,375
	47,125	45,25	47,875
	61,75	40,625	50,75
	58,75	55,375	43,75
	52,375	54,5	37,625
		48,5	46,375
		53,125	
MW	51,8571429	50,2916667	44,4375
SD	6,66904719	5,49289314	4,4771244

Tabelle 4: Mittelwerte der Kapillarzahlen pro Gesichtsfeld für jedes Versuchstier

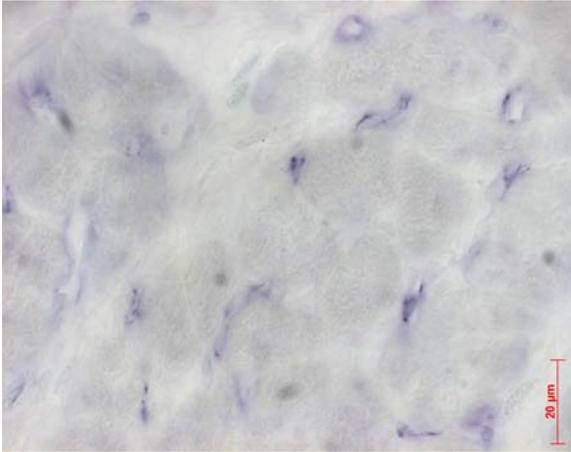
Gruppe	Ko n=9	Pl n=10	VEGF n=9	FGF n=8	GMCSF n=8
	3,5	4,5	3,875	4,875	3
	3	2,75	4,375	7,5	4,875
	2,25	7	5,5	4,625	3,625
	3,25	5,75	7,875	3,375	7,875
	2	6,625	4,125	3,75	4,875
	3,75	6,625	4,25	5,5	5,875
	7,5	4,5	5,25	6,125	4,375
	2,25	2,5	6	4,625	5
	4,125	3,75	5		
		4,625			
MW	3,51388889	4,8625	5,13888889	5,10714286	4,92857143
SD	1,66353873	1,60451836	1,24443204	1,41684173	1,59729123

Tabelle 5: Mittelwerte der Arteriolenzahlen pro Gesichtsfeld für jedes Versuchstier

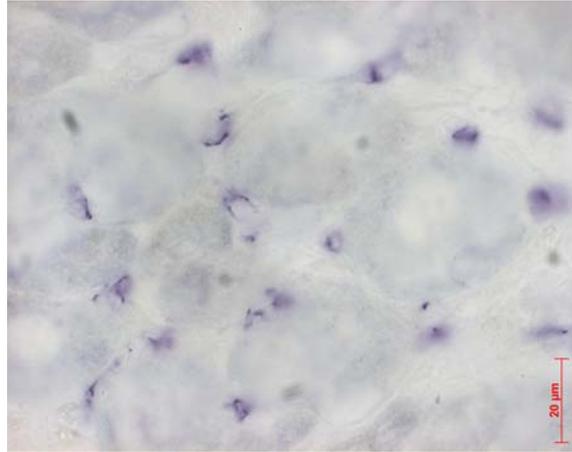
Gruppe	V+F25 n=7	V+F50 n=9	V+F100 n=8
	4,875	5,5	6,75
	10,625	3,75	4,875
	4,625	4,5	4,125
	2,875	5,5	4,375
	9,625	6	2,5
	1,625	2,625	3,5
	7,5	5,75	6,625
		6,25	6,5
		12,125	
MW	5,96428571	5,77777778	4,90625
SD	3,38710352	2,65516726	1,58360743

Tabelle 6: Mittelwerte der Arteriolenzahlen pro Gesichtsfeld für jedes Versuchstier

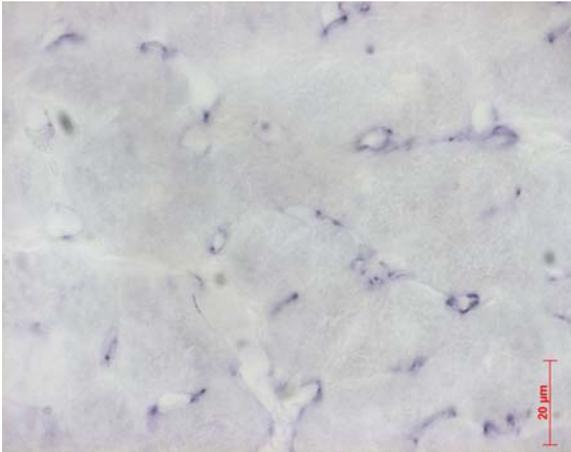
6.3 Abbildungen



Ko



PI



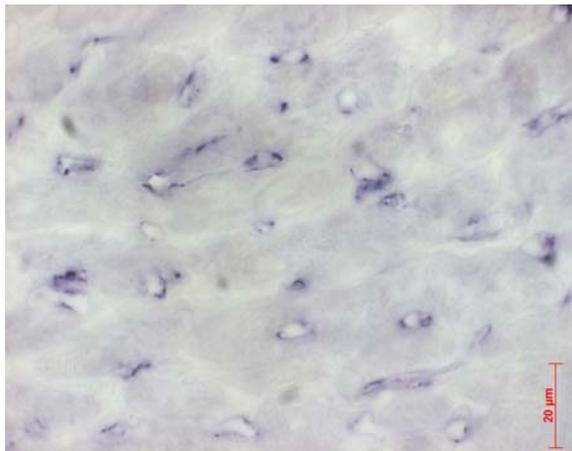
VEGF



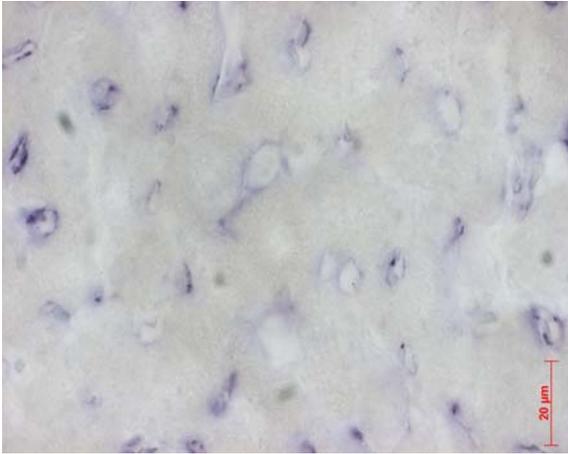
FGF



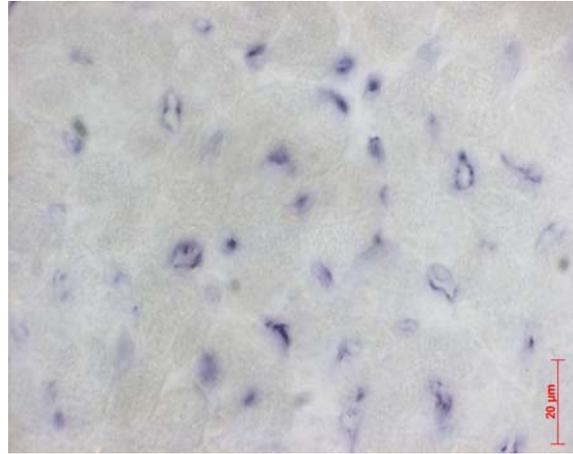
GMCSF



V+F100



V+F50



V+F25

Abbildung 18: GefäÙe in der Muskulatur der Infarkttrandzone, CD31-Färbung
1000-fache Vergrößerung



Ko



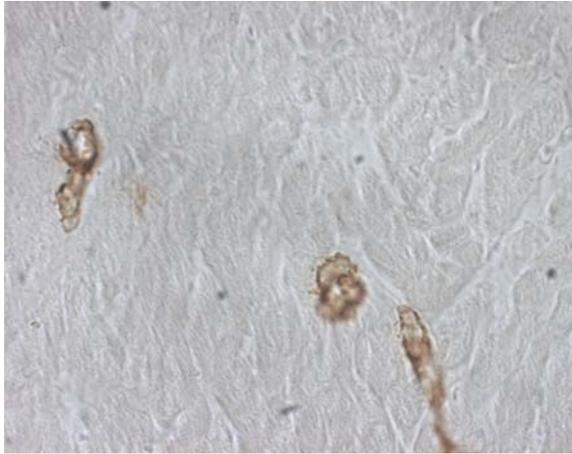
Pl



VEGF



FGF



GMCSF



V+F100



V+F50



V+F25

Abbildung 19: Arterielle Gefäße in der Muskulatur der Infarkttrandzone, SMA-Färbung
630-fache Vergrößerung

7 Literaturverzeichnis

1. **Ando, H., J. Tanaka, M. Hisahara, M. Umesue, and T. Shirota.** 1998. Effect of coronary bypass grafting onto the site of old myocardial infarction and the recovery of cardiac function. *Cardiovasc Surg* **6**:511-9.
2. **Armitage, J. O.** 1998. Emerging applications of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* **92**:4491-508.
3. **Asahara, T., C. Bauters, L. P. Zheng, S. Takeshita, S. Bunting, N. Ferrara, J. F. Symes, and J. M. Isner.** 1995. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation* **92**:II365-71.
4. **Asahara, T., H. Masuda, T. Takahashi, C. Kalka, C. Pastore, M. Silver, M. Kearne, M. Magner, and J. M. Isner.** 1999. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* **85**:221-8.
5. **Asahara, T., T. Takahashi, H. Masuda, C. Kalka, D. Chen, H. Iwaguro, Y. Inai, M. Silver, and J. M. Isner.** 1999. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Embo J* **18**:3964-72.
6. **Azrin, M.** 2001. Angiogenesis, protein and gene delivery. *Br Med Bull* **59**:211-25.
7. **Banai, S., M. T. Jaklitsch, M. Shou, D. F. Lazarous, M. Scheinowitz, S. Biro, S. E. Epstein, and E. F. Unger.** 1994. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation* **89**:2183-9.
8. **Battler, A., M. Scheinowitz, A. Bor, D. Hasdai, Z. Vered, E. Di Segni, N. Varda-Bloom, D. Nass, S. Engelberg, M. Eldar, and et al.** 1993. Intracoronary injection of basic fibroblast growth factor enhances angiogenesis in infarcted swine myocardium. *J Am Coll Cardiol* **22**:2001-6.
9. **Bikfalvi, A., S. Klein, G. Pintucci, and D. B. Rifkin.** 1997. Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev* **18**:26-45.
10. **Boenisch, T.** 2003. *Handbuch Immunchemische Färbemethoden*, vol. 3. Auflage. Boenisch, T; DakoCytomation Corp., Carpinteria, CA, USA.

11. **Bohlius, J., M. Reiser, G. Schwarzer, and A. Engert.** 2004. Granulopoiesis-stimulating factors to prevent adverse effects in the treatment of malignant lymphoma. *Cochrane Database Syst Rev*:CD003189.
12. **Buschmann, I. R., H. J. Busch, G. Mies, and K. A. Hossmann.** 2003. Therapeutic induction of arteriogenesis in hypoperfused rat brain via granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Circulation* **108**:610-5.
13. **Buschmann, I. R., I. E. Hoefler, N. van Royen, E. Katzer, R. Braun-Dulleaus, M. Heil, S. Kostin, C. Bode, and W. Schaper.** 2001. GM-CSF: a strong arteriogenic factor acting by amplification of monocyte function. *Atherosclerosis* **159**:343-56.
14. **Bussolino, F., J. M. Wang, P. Defilippi, F. Turrini, F. Sanavio, C. J. Edgell, M. Aglietta, P. Arese, and A. Mantovani.** 1989. Granulocyte- and granulocyte-macrophage-colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate. *Nature* **337**:471-3.
15. **Cao, R., E. Brakenhielm, R. Pawliuk, D. Wariaro, M. J. Post, E. Wahlberg, P. Leboulch, and Y. Cao.** 2003. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. *Nat Med* **9**:604-13.
16. **Carmeliet, P.** 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* **9**:653-60.
17. **Carmeliet, P.** 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* **6**:389-95.
18. **Carmeliet, P., V. Ferreira, G. Breier, S. Pollefeyt, L. Kieckens, M. Gertsenstein, M. Fahrig, A. Vandenhoeck, K. Harpal, C. Eberhardt, C. Declercq, J. Pawling, L. Moons, D. Collen, W. Risau, and A. Nagy.** 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380**:435-9.
19. **Charpin, C., B. Devictor, D. Bergeret, L. Andrac, J. Boulat, N. Horschowski, M. N. Lavaut, and L. Piana.** 1995. CD31 quantitative immunocytochemical assays in breast carcinomas. Correlation with current prognostic factors. *Am J Clin Pathol* **103**:443-8.
20. **Chu, V., J. Kuang, A. McGinn, A. Giaid, S. Korkola, and R. C. Chiu.** 1999. Angiogenic response induced by mechanical transmymocardial revascularization. *J Thorac Cardiovasc Surg* **118**:849-56.
21. **Conway, E. M., D. Collen, and P. Carmeliet.** 2001. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* **49**:507-21.

22. **Cotton, J. M., M. R. Thomas, B. J. Dunmore, J. Salisbury, A. M. Shah, and N. P. Brindle.** 2002. Angiogenesis in chronically ischaemic human heart following percutaneous myocardial revascularisation. *Heart* **87**:281-3.
23. **Deindl, E., I. Buschmann, I. E. Hoefler, T. Podzuweit, K. Boengler, S. Vogel, N. van Royen, B. Fernandez, and W. Schaper.** 2001. Role of ischemia and of hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit. *Circ Res* **89**:779-86.
24. **Detillieux, K. A., F. Sheikh, E. Kardami, and P. A. Cattini.** 2003. Biological activities of fibroblast growth factor-2 in the adult myocardium. *Cardiovasc Res* **57**:8-19.
25. **Dietz, R.** 2001. *Harrisons Innere Medizin*, 15. Auflage ed. ABW Wissenschaftsverlag, Leiben.
26. **Dor, Y., V. Djonov, R. Abramovitch, A. Itin, G. I. Fishman, P. Carmeliet, G. Goelman, and E. Keshet.** 2002. Conditional switching of VEGF provides new insights into adult neovascularization and pro-angiogenic therapy. *Embo J* **21**:1939-47.
27. **Edelman, E. R., M. A. Nugent, and M. J. Karnovsky.** 1993. Perivascular and intravenous administration of basic fibroblast growth factor: vascular and solid organ deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:1513-7.
28. **Ferrara, N.** 2001. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**:C1358-66.
29. **Ferrara, N., K. Carver-Moore, H. Chen, M. Dowd, L. Lu, K. S. O'Shea, L. Powell-Braxton, K. J. Hillan, and M. W. Moore.** 1996. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* **380**:439-42.
30. **Ferrara, N., H. P. Gerber, and J. LeCouter.** 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* **9**:669-76.
31. **Flores, N. A., R. L. Davies, W. J. Penny, and D. J. Sheridan.** 1984. Coronary microangiography in the guinea pig, rabbit and ferret. *Int J Cardiol* **6**:459-71.
32. **Florkiewicz, R. Z., J. Anchin, and A. Baird.** 1998. The inhibition of fibroblast growth factor-2 export by cardenolides implies a novel function for the catalytic subunit of Na⁺,K⁺-ATPase. *J Biol Chem* **273**:544-51.
33. **Folkman, J.** 1995. *Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston.* Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* **333**:1757-63.

34. **Folkman, J.** 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* **285**:1182-6.
35. **Fortuin, F. D., P. Vale, D. W. Losordo, J. Symes, G. A. DeLaria, J. J. Tyner, G. L. Schaer, R. March, R. J. Snell, T. D. Henry, J. Van Camp, J. J. Lopez, W. Richenbacher, J. M. Isner, and R. A. Schatz.** 2003. One-year follow-up of direct myocardial gene transfer of vascular endothelial growth factor-2 using naked plasmid deoxyribonucleic acid by way of thoracotomy in no-option patients. *Am J Cardiol* **92**:436-9.
36. **Frangogiannis, N. G., C. W. Smith, and M. L. Entman.** 2002. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* **53**:31-47.
37. **Freedman, S. B., and J. M. Isner.** 2002. Therapeutic angiogenesis for coronary artery disease. *Ann Intern Med* **136**:54-71.
38. **Gal, D., L. Weir, G. Leclerc, J. G. Pickering, J. Hogan, and J. M. Isner.** 1993. Direct myocardial transfection in two animal models. Evaluation of parameters affecting gene expression and percutaneous gene delivery. *Lab Invest* **68**:18-25.
39. **Giatromanolaki, A., M. Koukourakis, K. O'Byrne, S. Fox, R. Whitehouse, D. C. Talbot, A. L. Harris, and K. C. Gatter.** 1996. Prognostic value of angiogenesis in operable non-small cell lung cancer. *J Pathol* **179**:80-8.
40. **Goto, F., K. Goto, K. Weindel, and J. Folkman.** 1993. Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Lab Invest* **69**:508-17.
41. **Hasegawa, T., A. Kimura, M. Miyataka, M. Inagaki, and K. Ishikawa.** 1999. Basic fibroblast growth factor increases regional myocardial blood flow and salvages myocardium in the infarct border zone in a rabbit model of acute myocardial infarction. *Angiology* **50**:487-95.
42. **Heilmann, C., P. von Samson, K. Schlegel, T. Attmann, B. U. von Specht, F. Beyersdorf, and G. Lutter.** 2002. Comparison of protein with DNA therapy for chronic myocardial ischemia using fibroblast growth factor-2. *Eur J Cardiothorac Surg* **22**:957-64.
43. **Heilmann, C. A., T. Attmann, A. Thiem, E. Haffner, F. Beyersdorf, and G. Lutter.** 2003. Gene therapy in cardiac surgery: intramyocardial injection of naked plasmid DNA for chronic myocardial ischemia. *Eur J Cardiothorac Surg* **24**:785-93.

44. **Hendel, R. C., T. D. Henry, K. Rocha-Singh, J. M. Isner, D. J. Kereiakes, F. J. Giordano, M. Simons, and R. O. Bonow.** 2000. Effect of intracoronary recombinant human vascular endothelial growth factor on myocardial perfusion: evidence for a dose-dependent effect. *Circulation* **101**:118-21.
45. **Henry, T. D.** 1999. Therapeutic angiogenesis. *Bmj* **318**:1536-9.
46. **Henry, T. D., B. H. Annex, G. R. McKendall, M. A. Azrin, J. J. Lopez, F. J. Giordano, P. K. Shah, J. T. Willerson, R. L. Benza, D. S. Berman, C. M. Gibson, A. Bajamonde, A. C. Rundle, J. Fine, and E. R. McCluskey.** 2003. The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation* **107**:1359-65.
47. **Henry, T. D., K. Rocha-Singh, J. M. Isner, D. J. Kereiakes, F. J. Giordano, M. Simons, D. W. Losordo, R. C. Hendel, R. O. Bonow, S. M. Eppler, T. F. Zioncheck, E. B. Holmgren, and E. R. McCluskey.** 2001. Intracoronary administration of recombinant human vascular endothelial growth factor to patients with coronary artery disease. *Am Heart J* **142**:872-80.
48. **Herold, G. u. M.** 2003. *Innere Medizin - Eine vorlesungsorientierte Darstellung*, vol. Aufl. 2003. Herold-Verlag.
49. **Hershey, J. C., E. P. Baskin, J. D. Glass, H. A. Hartman, D. B. Gilberto, I. T. Rogers, and J. J. Cook.** 2001. Revascularization in the rabbit hindlimb: dissociation between capillary sprouting and arteriogenesis. *Cardiovasc Res* **49**:618-25.
50. **Horak, E. R., R. Leek, N. Klenk, S. LeJeune, K. Smith, N. Stuart, M. Greenall, K. Stepniewska, and A. L. Harris.** 1992. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* **340**:1120-4.
51. **Ismail, J. A., V. Poppa, L. E. Kemper, M. Scatena, C. M. Giachelli, J. D. Coffin, and C. E. Murry.** 2003. Immunohistologic labeling of murine endothelium. *Cardiovasc Pathol* **12**:82-90.
52. **Jiang, Z. S., R. R. Padua, H. Ju, B. W. Doble, Y. Jin, J. Hao, P. A. Cattini, I. M. Dixon, and E. Kardami.** 2002. Acute protection of ischemic heart by FGF-2: involvement of FGF-2 receptors and protein kinase C. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**:H1071-80.

53. **Jones, T. C.** 1991. Recombinant human GM-CSF: present clinical results and potential use in oncologic and hematologic disorders. *Bull Cancer* **78**:1155-9.
54. **Kalka, C., H. Tehrani, B. Laudenberg, P. R. Vale, J. M. Isner, T. Asahara, and J. F. Symes.** 2000. VEGF gene transfer mobilizes endothelial progenitor cells in patients with inoperable coronary disease. *Ann Thorac Surg* **70**:829-34.
55. **Kardami, E., R. Padua, K. Pasumarthi, and e. al.** 1993. Basic fibroblast growth factor in cardiac myocytes: expression and effects. Cummings P, editor, *Growth factors and the cardiovascular system*, Norwell, MA: Kluwer, pp. 55-57.
56. **Kawasuji, M., H. Nagamine, M. Ikeda, N. Sakakibara, H. Takemura, S. Fujii, and Y. Watanabe.** 2000. Therapeutic angiogenesis with intramyocardial administration of basic fibroblast growth factor. *Ann Thorac Surg* **69**:1155-61.
57. **Khan, T. A., F. W. Sellke, and R. J. Laham.** 2003. Gene therapy progress and prospects: therapeutic angiogenesis for limb and myocardial ischemia. *Gene Ther* **10**:285-91.
58. **Khan, T. A., F. W. Sellke, and R. J. Laham.** 2003. Therapeutic angiogenesis: protein-based therapy for coronary artery disease. *Expert Opin Pharmacother* **4**:219-26.
59. **Laham, R. J., N. A. Chronos, M. Pike, M. E. Leimbach, J. E. Udelson, J. D. Pearlman, R. I. Pettigrew, M. J. Whitehouse, C. Yoshizawa, and M. Simons.** 2000. Intracoronary basic fibroblast growth factor (FGF-2) in patients with severe ischemic heart disease: results of a phase I open-label dose escalation study. *J Am Coll Cardiol* **36**:2132-9.
60. **Laham, R. J., F. W. Sellke, E. R. Edelman, J. D. Pearlman, J. A. Ware, D. L. Brown, J. P. Gold, and M. Simons.** 1999. Local perivascular delivery of basic fibroblast growth factor in patients undergoing coronary bypass surgery: results of a phase I randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Circulation* **100**:1865-71.
61. **Lazarous, D. F., M. Scheinowitz, M. Shou, E. Hodge, S. Rajanayagam, S. Hunsberger, W. G. Robison, Jr., J. A. Stiber, R. Correa, S. E. Epstein, and et al.** 1995. Effects of chronic systemic administration of basic fibroblast growth factor on collateral development in the canine heart. *Circulation* **91**:145-53.
62. **Lopez, J. J., R. J. Laham, A. Stamler, J. D. Pearlman, S. Bunting, A. Kaplan, J. P. Carrozza, F. W. Sellke, and M. Simons.** 1998. VEGF administration in chronic myocardial ischemia in pigs. *Cardiovasc Res* **40**:272-81.

63. **Losordo, D. W., and S. Dimmeler.** 2004. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part I: angiogenic cytokines. *Circulation* **109**:2487-91.
64. **Losordo, D. W., P. R. Vale, R. C. Hendel, C. E. Milliken, F. D. Fortuin, N. Cummings, R. A. Schatz, T. Asahara, J. M. Isner, and R. E. Kuntz.** 2002. Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation* **105**:2012-8.
65. **Losordo, D. W., P. R. Vale, J. F. Symes, C. H. Dunnington, D. D. Esakof, M. Maysky, A. B. Ashare, K. Lathi, and J. M. Isner.** 1998. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* **98**:2800-4.
66. **Luttun, A., and P. Carmeliet.** 2003. De novo vasculogenesis in the heart. *Cardiovasc Res* **58**:378-89.
67. **Maione, D., C. Della Rocca, P. Giannetti, R. D'Arrigo, L. Liberatoscioli, L. L. Franlin, V. Sandig, G. Ciliberto, N. La Monica, and R. Savino.** 2001. An improved helper-dependent adenoviral vector allows persistent gene expression after intramuscular delivery and overcomes preexisting immunity to adenovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:5986-91.
68. **Mandriota, S. J., and M. S. Pepper.** 1997. Vascular endothelial growth factor-induced in vitro angiogenesis and plasminogen activator expression are dependent on endogenous basic fibroblast growth factor. *J Cell Sci* **110 (Pt 18)**:2293-302.
69. **Maxwell, M. P., D. J. Hearse, and D. M. Yellon.** 1987. Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischaemia: a critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction. *Cardiovasc Res* **21**:737-46.
70. **Miller, K.**
71. **Morishita, R.** 2002. Recent progress in gene therapy for cardiovascular disease. *Circ J* **66**:1077-86.
72. **Neufeld, G., T. Cohen, S. Gengrinovitch, and Z. Poltorak.** 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J* **13**:9-22.
73. **Newman, P. J.** 1997. The biology of PECAM-1. *J Clin Invest* **99**:3-8.

74. **O'Konski, M. S., F. C. White, J. Longhurst, D. Roth, and C. M. Bloor.** 1987. Ameroid constriction of the proximal left circumflex coronary artery in swine. A model of limited coronary collateral circulation. *Am J Cardiovasc Pathol* **1**:69-77.
75. **Operschall, C., L. Falivene, J. P. Clozel, and S. Roux.** 2000. A new model of chronic cardiac ischemia in rabbits. *J Appl Physiol* **88**:1438-45.
76. **Padua, R. R., P. L. Merle, B. W. Doble, C. H. Yu, P. Zahradka, G. N. Pierce, V. Panagia, and E. Kardami.** 1998. FGF-2-induced negative inotropism and cardioprotection are inhibited by chelerythrine: involvement of sarcolemmal calcium-independent protein kinase C. *J Mol Cell Cardiol* **30**:2695-709.
77. **Padua, R. R., R. Sethi, N. S. Dhalla, and E. Kardami.** 1995. Basic fibroblast growth factor is cardioprotective in ischemia-reperfusion injury. *Mol Cell Biochem* **143**:129-35.
78. **Papetti, M., and I. M. Herman.** 2002. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**:C947-70.
79. **Parums, D. V., J. L. Cordell, K. Micklem, A. R. Heryet, K. C. Gatter, and D. Y. Mason.** 1990. JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol* **43**:752-7.
80. **Pepper, M. S., N. Ferrara, L. Orci, and R. Montesano.** 1992. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **189**:824-31.
81. **Pepper, M. S., S. J. Mandriota, J. D. Vassalli, L. Orci, and R. Montesano.** 1996. Angiogenesis-regulating cytokines: activities and interactions. *Curr Top Microbiol Immunol* **213 (Pt 2)**:31-67.
82. **Pipp, F., M. Heil, K. Issbrucker, T. Ziegelhoeffer, S. Martin, J. van den Heuvel, H. Weich, B. Fernandez, G. Golomb, P. Carmeliet, W. Schaper, and M. Clauss.** 2003. VEGFR-1-selective VEGF homologue PlGF is arteriogenic: evidence for a monocyte-mediated mechanism. *Circ Res* **92**:378-85.
83. **Polverini, P. J., P. S. Cotran, M. A. Gimbrone, Jr., and E. R. Unanue.** 1977. Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature* **269**:804-6.
84. **Post, M. J., R. Laham, F. W. Sellke, and M. Simons.** 2001. Therapeutic angiogenesis in cardiology using protein formulations. *Cardiovasc Res* **49**:522-31.
85. **Riede, U. D., H; Ihling, C; Kaiserling, E; Müntefering, H.** 2004. *Allgemeine und spezielle Pathologie*, vol. 5. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

86. **Risau, W.** 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**:671-4.
87. **Rosengart, T. K., L. Y. Lee, S. R. Patel, T. A. Sanborn, M. Parikh, G. W. Bergman, R. Hachamovitch, M. Szulc, P. D. Kligfield, P. M. Okin, R. T. Hahn, R. B. Devereux, M. R. Post, N. R. Hackett, T. Foster, T. M. Grasso, M. L. Lesser, O. W. Isom, and R. G. Crystal.** 1999. Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation* **100**:468-74.
88. **Roth, D. M., Y. Maruoka, J. Rogers, F. C. White, J. C. Longhurst, and C. M. Bloor.** 1987. Development of coronary collateral circulation in left circumflex Ameroid-occluded swine myocardium. *Am J Physiol* **253**:H1279-88.
89. **Ruel, M., R. J. Laham, J. A. Parker, M. J. Post, J. A. Ware, M. Simons, and F. W. Sellke.** 2002. Long-term effects of surgical angiogenic therapy with fibroblast growth factor 2 protein. *J Thorac Cardiovasc Surg* **124**:28-34.
90. **Sarkar, N., P. Blomberg, E. Wardell, M. Eskandarpour, C. Sylven, V. Drvota, and K. B. Islam.** 2002. Nonsurgical direct delivery of plasmid DNA into rat heart: time course, dose response, and the influence of different promoters on gene expression. *J Cardiovasc Pharmacol* **39**:215-24.
91. **Sarkar, N., A. Ruck, G. Kallner, Y. H. S, P. Blomberg, K. B. Islam, J. van der Linden, D. Lindblom, A. T. Nygren, B. Lind, L. A. Brodin, V. Drvota, and C. Sylven.** 2001. Effects of intramyocardial injection of phVEGF-A165 as sole therapy in patients with refractory coronary artery disease--12-month follow-up: angiogenic gene therapy. *J Intern Med* **250**:373-81.
92. **Sato, K., R. J. Laham, J. D. Pearlman, D. Novicki, F. W. Sellke, M. Simons, and M. J. Post.** 2000. Efficacy of intracoronary versus intravenous FGF-2 in a pig model of chronic myocardial ischemia. *Ann Thorac Surg* **70**:2113-8.
93. **Sato, K., T. Wu, R. J. Laham, R. B. Johnson, P. Douglas, J. Li, F. W. Sellke, S. Bunting, M. Simons, and M. J. Post.** 2001. Efficacy of intracoronary or intravenous VEGF165 in a pig model of chronic myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* **37**:616-23.
94. **Schaper, W.** 2001. Therapeutic arteriogenesis has arrived. *Circulation* **104**:1994-5.
95. **Schaper, W., and D. Scholz.** 2003. Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**:1143-51.

96. **Schütz, W.** 2001. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 8. Auflage ed. Urban&Fischer, München, Jena.
97. **Schwarz, E. R., M. T. Speakman, M. Patterson, S. S. Hale, J. M. Isner, L. H. Kedes, and R. A. Kloner.** 2000. Evaluation of the effects of intramyocardial injection of DNA expressing vascular endothelial growth factor (VEGF) in a myocardial infarction model in the rat--angiogenesis and angioma formation. *J Am Coll Cardiol* **35**:1323-30.
98. **Seghezzi, G., S. Patel, C. J. Ren, A. Gualandris, G. Pintucci, E. S. Robbins, R. L. Shapiro, A. C. Galloway, D. B. Rifkin, and P. Mignatti.** 1998. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J Cell Biol* **141**:1659-73.
99. **Seiler, C., T. Pohl, K. Wustmann, D. Hutter, P. A. Nicolet, S. Windecker, F. R. Eberli, and B. Meier.** 2001. Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Circulation* **104**:2012-7.
100. **Sellke, F. W., R. J. Laham, E. R. Edelman, J. D. Pearlman, and M. Simons.** 1998. Therapeutic angiogenesis with basic fibroblast growth factor: technique and early results. *Ann Thorac Surg* **65**:1540-4.
101. **Sellke, F. W., and M. Ruel.** 2003. Vascular growth factors and angiogenesis in cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* **75**:S685-90.
102. **Selwyn, A. P., and E. Braunwald.** 2005. Harrison's Principles of Internal Medicine, vol. 16th Edition. McGraw-Hill.
103. **Shalaby, F., J. Rossant, T. P. Yamaguchi, M. Gertsenstein, X. F. Wu, M. L. Breitman, and A. C. Schuh.** 1995. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* **376**:62-6.
104. **Sheikh, F., D. P. Sontag, R. R. Fandrich, E. Kardami, and P. A. Cattini.** 2001. Overexpression of FGF-2 increases cardiac myocyte viability after injury in isolated mouse hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**:H1039-50.
105. **Siddiqui, A. J., P. Blomberg, E. Wardell, I. Hellgren, M. Eskandarpour, K. B. Islam, and C. Sylven.** 2003. Combination of angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor gene therapy enhances arteriogenesis in the ischemic myocardium. *Biochem Biophys Res Commun* **310**:1002-9.

106. **Simons, M., R. O. Bonow, N. A. Chronos, D. J. Cohen, F. J. Giordano, H. K. Hammond, R. J. Laham, W. Li, M. Pike, F. W. Sellke, T. J. Stegmann, J. E. Udelson, and T. K. Rosengart.** 2000. Clinical trials in coronary angiogenesis: issues, problems, consensus: An expert panel summary. *Circulation* **102**:E73-86.
107. **Skalli, O., P. Ropraz, A. Trzeciak, G. Benzonana, D. Gillessen, and G. Gabbiani.** 1986. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* **103**:2787-96.
108. **Stavri, G. T., I. C. Zachary, P. A. Baskerville, J. F. Martin, and J. D. Erusalimsky.** 1995. Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. Synergistic interaction with hypoxia. *Circulation* **92**:11-4.
109. **Syven, C., N. Sarkar, E. Wardell, A. Jamsa, V. Drvota, P. Blomberg, and K. Bin Islam.** 2001. Protein and angiogenic dose-response expression of phVEGF-A(165) gene in rat myocardium. *J Thromb Thrombolysis* **12**:151-6.
110. **Symes, J. F., D. W. Losordo, P. R. Vale, K. G. Lathi, D. D. Esakof, M. Mayskiy, and J. M. Isner.** 1999. Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease. *Ann Thorac Surg* **68**:830-6; discussion 836-7.
111. **Szmitko, P. E., P. W. Fedak, R. D. Weisel, D. J. Stewart, M. J. Kutryk, and S. Verma.** 2003. Endothelial progenitor cells: new hope for a broken heart. *Circulation* **107**:3093-100.
112. **Takahashi, T., C. Kalka, H. Masuda, D. Chen, M. Silver, M. Kearney, M. Magner, J. M. Isner, and T. Asahara.** 1999. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* **5**:434-8.
113. **Takeshita, S., T. Isshiki, and T. Sato.** 1996. Increased expression of direct gene transfer into skeletal muscles observed after acute ischemic injury in rats. *Lab Invest* **74**:1061-5.
114. **Udelson, J. E., V. Dilsizian, R. J. Laham, N. Chronos, J. Vansant, M. Blais, J. R. Galt, M. Pike, C. Yoshizawa, and M. Simons.** 2000. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 improves stress and rest myocardial perfusion abnormalities in patients with severe symptomatic chronic coronary artery disease. *Circulation* **102**:1605-10.

115. **Unger, E. F., S. Banai, M. Shou, D. F. Lazarous, M. T. Jaklitsch, M. Scheinowitz, R. Correa, C. Klingbeil, and S. E. Epstein.** 1994. Basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral flow in a canine model. *Am J Physiol* **266**:H1588-95.
116. **Unger, E. F., L. Goncalves, S. E. Epstein, E. Y. Chew, C. B. Trapnell, R. O. Cannon, 3rd, and A. A. Quyyumi.** 2000. Effects of a single intracoronary injection of basic fibroblast growth factor in stable angina pectoris. *Am J Cardiol* **85**:1414-9.
117. **Vale, P. R., D. W. Losordo, C. E. Milliken, M. Maysky, D. D. Esakof, J. F. Symes, and J. M. Isner.** 2000. Left ventricular electromechanical mapping to assess efficacy of phVEGF(165) gene transfer for therapeutic angiogenesis in chronic myocardial ischemia. *Circulation* **102**:965-74.
118. **Vale, P. R., D. W. Losordo, C. E. Milliken, M. C. McDonald, L. M. Gravelin, C. M. Curry, D. D. Esakof, M. Maysky, J. F. Symes, and J. M. Isner.** 2001. Randomized, single-blind, placebo-controlled pilot study of catheter-based myocardial gene transfer for therapeutic angiogenesis using left ventricular electromechanical mapping in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation* **103**:2138-43.
119. **Watanabe, E., D. M. Smith, J. Sun, F. W. Smart, J. B. Delcarpio, T. B. Roberts, C. H. Van Meter, Jr., and W. C. Claycomb.** 1998. Effect of basic fibroblast growth factor on angiogenesis in the infarcted porcine heart. *Basic Res Cardiol* **93**:30-7.
120. **White, F. C., S. M. Carroll, A. Magnet, and C. M. Bloor.** 1992. Coronary collateral development in swine after coronary artery occlusion. *Circ Res* **71**:1490-500.
121. **Yanagisawa-Miwa, A., Y. Uchida, F. Nakamura, T. Tomaru, H. Kido, T. Kamijo, T. Sugimoto, K. Kaji, M. Utsuyama, C. Kurashima, and et al.** 1992. Salvage of infarcted myocardium by angiogenic action of basic fibroblast growth factor. *Science* **257**:1401-3.
122. **Yang, H. T., and Y. Feng.** 2000. bFGF increases collateral blood flow in aged rats with femoral artery ligation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**:H85-93.
123. **Zachary, I.** 2001. Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**:C1375-86.
124. **Zhang, C., J. Yang, J. Feng, and L. K. Jennings.** 2002. Short-term administration of basic fibroblast growth factor enhances coronary collateral development without exacerbating atherosclerosis and balloon injury-induced vasoproliferation in atherosclerotic rabbits with acute myocardial infarction. *J Lab Clin Med* **140**:119-25.

8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Celsius
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
A.	Arteria
Aqua dest.	Aqua destillata
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
CMV	Zytomegalie-Virus
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Hydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EKG	Elektrokardiographie
EPC	Endotheliale Progenitorzelle
et al.	und andere
EvG	Elastica-von-Giesson
F(ab)	antigenbindendes Fragment
FGF	fibroblast growth factor
Flk	fetal liver kinase
Flt	fms-like tyrosine kinase
g	Gramm
GM-CSF	granulocyte-monocyte-colony-stimulating-factor
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF	hypoxia inducible factor
i. Br.	im Breisgau
I.D.	Innendurchmesser

I.E.	internationale Einheiten
ia	intraarteriell
IL	Interleukin
iv	intravenös
kDA	Kilodalton
KDR	kinase insert domain-containing receptor
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
KHK	Koronare Herzkrankheit
Ko	Kontrollgruppe
Pl	Placebogruppe
M	Molare
M.	Musculus
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
Mm.	Musculi
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NO	Stickstoffmonoxid
OP	Operation
p.o.	per os
PBS	Phosphat- gepufferte Salzlösung
PDGF	platelet derived growth factor
PIGF	placenta growth factor
rhFGF-2	rekombinantes humanes FGF-2
RIVA	Ramus interventricularis anterior
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung

SMV	segmentale myokardiale Verkürzung
Strept ABComplex/AP	Strept-Avidin-Biotin-Komplex/Alkalische Phosphatase
Strept ABComplex/HRP	Strept-Avidin-Biotin-Komplex/Meerrettichperoxidase
V.	Vena
V+F	VEGF + bFGF
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
vs.	versus

9 Herstellernachweis

9.1 Materialien OP

Alkoholische Lösung	Softasept N, Braun
Alkoholische Lösung zur Händedesinfektion	Promanum N, Braun
Amylin	Merial
Atipamezolhydrochlorid	Antisedan, Pfizer
Atropinsulfat	Braun
Augensalbe	Bepanthen (Dexpanthenol), Roche
Beatmungsgerät	Servo Ventilator 900 C, Siemens-Elema, Schweden
Bird Bene-Bac	(Lactobacillus), Albrecht
Blutgasanalysespritze	Pico 50
Capnograph	Capnomax Ultima, Type ULT-SV..08.DE Datex-Ohmeda Division Instrumentarium Corp., Helsinki, Finland
Carprofen	Rimadyl, für Tiere, Pfizer
Cauter	Valleylab
EKG-Elektroden	Einmal-EKG-Elektroden, Dahlhausen
EKG-Gerät	Sirecust 404, Model No. 8192759E2250, Siemens, Deutschland
Elastomull haft	Beiersdorf
Epinephrinhydrochlorid	Suprarenin, Aventis

Faden	3-0 Vicryl FSL, V585H 3-0 Vicryl SH plus, V242H 1 Vicryl CP-1, V585H 3-0 Vicryl, Sutupack, V644 6-0 Prolene BV-1, EH7223 Johnson-Johnson
Fentanyl	Janssen
Havard-Pumpe	Havard '33' Syringe Pump, Cat# 55-3333, Havard Apparatus, Natick, MA, USA
Heizkissen	Heating pad, Type P5, Kema Eur
Infusionslösung, Glukose 5%	Delta-Pharma
Infusionslösung, Ringerlösung	Ringer-Lösung, Delta-Pharma
Infusionslösung, Sterofundin BG-5	Braun
Infusomat fm	Typ 871942/0, Braun
Infusomat-Leitung	Typ Standard, Braun
Isofluran	Forene, Abbott
Jod-Lösung	Betaisodonna-Lösung (Povidon-Iod), Mundipharma GmbH
Kautergerät	ME81, Martin Medizintechnik, Tuttlingen
Ketaminhydrochlorid	Ketamin 10%, Essex Tierarznei
Kochsalzlösung	isotonisch, Fresenius
Kraftfutter	ssniff K-H, V2333-000, Alleinfutter für Kaninchen, ssniff Spezialdiäten, Soest
Lidocainhydrochlorid	Xylocain 2%, Astra Zeneca
Medetomidinhydrochlorid	Domitor, für Tiere, Pfizer

Metoclopramid	Paspertin, Solvay Arzneimittel
Mikrosphären	Fluospheres, polystyrene microspheres, 15µm, orange fluorescent (540/560) und blue-green fluorescent (430/465), Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Penicillin-Streptomycin-Kombination	Tardomycel comp.III, für Tiere, Bayer
Perfusor	Secura FF, B. Braun Melsungen AG
Propofol	Disoprivan 1%, Astra Zeneca
Rasierer	Haarschneidemaschine Elektra II, Aesculap
Skalpelli	No. 21 und No. 11, Einmalgebrauch, Feather
SMS-Computer	Model No. 4066-04-1.60, Sonometrics Corporation, Kanada
SMS-Empfänger	Digital Ultrasonic Measurement System, Sonometrics Corporation, Kanada
Sprühverband	Flint
Tubus, blockbar	Hi-Contour-tracheal tube, 3,0mm ID, Mallinckrodt
Tubus, nicht blockbar	Portex tracheal tube, 2,5mm ID, Portex Limited
Ultraschallbad	Ultramatic 550, Münchener Medizin Mechanik GmbH
Ultraschallbilddrucker	Super Sonoprinter TP-8700, Toshiba
Ultraschallgerät	Diagnostik Ultrasound Equipment, Modell SSH-140A, Toshiba Corporation, Toshiba Medical Systems Europe, Neuss
Ultraschallkontaktgel	Aquasonic 100, Parker Laboratories, Inc.

Ultraschallkopf	7 MHz, Phases Array Probe, PSH-70LT Toshiba, Japan
Vakuum-Absauger	Weimann, Dänischenhagen, Deutschland
Verdampfer	Siemens Elema AB, Model No.E346E-EV952, Schweden
Verdampfer-Mixer	Mixer 962, Siemens
Vortexshaker	MS2 Minishaker, IKA
Waage	D96-09-037, Seca, Vogel & Halke, Hamburg
Wund- und Heilsalbe	Bepanthen (Dexpanthenol), Roche

9.2 Materialien Labor

Aceton	1.00014, Merck
Albumin	Albumin, Bovine, Sigma A-2153, Steinheim
Antikörper CD31	Anti-human CD31, monoklonal Maus, DAKO Code No. M0823
Antikörper SMA	Anti-Human Smooth Muscle Actin, Monoklonal Maus, Code No. M0851, Dako
Avidin-Biotin-Enzymkomplex AP	AB Complex / AP, Code No. K0376, Dako
Avidin-Biotin-Enzymkomplex HRP	StreptABComplex / HRP, Code No. K0377, Dako
Brückenantikörper (=sekundärer Antikörper)	biotinylierter Kaninchen-anti-Maus Brückenantikörper, Code No. E0413, Dako
Citronensäure-Monohydrat	244 Merck
DAB	(3,3Diaminobenzidintetrahydrochloride Dihydrat p.a., 32750, Fluka
Deckgläser	24x32mm, RL
Ethanol	Best. Nr. 8419.1, Roth
fast blue- Farbstofflösung	Fast Blue BB Salt, F-3378, Sigma
Formaldehydlösung mind. 36,5%	33220 Riedel-de Haen, RdH Laborchemikalien, Seelze
Gewebeinfiltrationsautomat	TP1020, Leica
H ₂ O ₂	1.07210.0250, Merck, Darmstadt
HCl	Riedel-de Haen AG, Seelze
Imidazol	56750, Fluka

Kaninchenserum	Normal Rabbit Serum, Code No. 011-000-120, Jackson Immuno Research Laboratories, Inc./ Dianova
Lichtmikroskop	Olympus BX40 F4, Olympus Optical Co., Japan
Lichtmikroskopische Aufnahmeeinheit	Axio Cam/ Axioplan2, Carl Zeiss Vision GmbH, Deutschland
Methanol	1.06009, Merck, Darmstadt
MgSO ₄	1.05886 Merck, Darmstadt
Mikrotom	Leica SM 2000 R, Leica Instruments GmbH, Nussloch
Mikrotomklingen	Leica, Model No. 819, Leica Instruments GmbH, Nussloch
Mikrotomwasserbad	HI 1210, Leica Microsystems, Nussloch
Mikrowelle	Mikromat, AEG
Minishaker	MS2 Minishaker, IKA Works, Wilmington NC
N,N-Dimethylformamid	2937, Merck
NaCl	Chemika 71381, Fluka
Naphthol AS MX Phosphat	N-4875, Sigma
Natrium-Dihydrat	6448, Merck
Objektträger	HistoBond Adhäsions-Objektträger, Kat. No. 90.1236, Marienfeld, Deutschland
Paraffin	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Paraffinausgießstation	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch

Parafilm	American National Can, USA
pCl-neo	Promega Inc., Palo Alto, CA, USA
Pepsin	P-7000, Sigma
phFGF-2	Labor Lutter/ Specht, ZKF, Uniklinik Freiburg
pH-Meter	pH-Meter 766, Calimatic, Knick
phVEGF-A ₁₂₁	Labor Lutter/ Specht, ZKF, Uniklinik Freiburg
Rotihistol	Art. 6640.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TRIZMA BASE	T-1503, Sigma
wässriges Eindeckmedium	Aquatex, 1.08562, Merck

Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Beyersdorf danke ich für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und für die Möglichkeit, in seiner Abteilung promovieren zu dürfen.

Herrn Professor Dr. Dr. von Specht danke ich vielmals für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. Claudia Heilmann für die persönliche Betreuung meiner Doktorarbeit.

Vielen Dank an alle Mitarbeiter der Chirurgischen Forschung, die uns mit den Tieren geholfen haben, ebenso an die Mitarbeiter des Labor Stark und Frau Dr. Göbel aus der Pathologie für die Hilfestellung bei der Histologie. Danke auch an Dr. Tim Attmann und Dr. Georg Lutter für die operative Einarbeitung.

Ich danke meiner Mitdotorandin und Tierärztin Stephanie Tascher für die Betreuung der Tiere, und natürlich besonders meinem Mitdotoranden Tobias Renner für die gute Zusammenarbeit und seine Gelassenheit.

Und zuletzt möchte ich mich selbstverständlich bei all meinen Freunden und meiner Familie für die seelische Unterstützung sowie auch Ablenkung von meiner Arbeit bedanken!

Lebenslauf

Name: Anna Laura Bredow
 Geburtsdatum: 20.06.1980
 Geburtsort: Göttingen
 Eltern: Dr. Marianne Bredow, geb. Keller, Fachärztin für Allgemeinmedizin
 Dr. Jürgen Bredow, Facharzt für Chirurgie/Unfallchirurgie und Orthopädie
 Geschwister: Eva, Maximilian und Friederike Bredow

Schulbildung:

1986-1990 Grundschole Murnau
 1990-1999 Besuch des Albert-Einstein-Gymnasium Ravensburg
 1994 Zweiwöchiger Schüleraustausch mit Barnstaple, Großbritannien
 1995 Dreimonatiger Schüleraustausch in Windsor, Ontario/ Kanada
 Besuch der Holy Names High School
 Juni 1999 Abitur (Note 1,2)

Fremdsprachen: Englisch, Latein, Französisch

Studium:

WS 1999 – SS 2006 Studium der Humanmedizin Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
 August 2001 Physikum (Note 2,0)
 August 2002 Erstes Staatsexamen (Note 2,0)
 März 2005 Zweites Staatsexamen (Note 2,0)
 Mai 2006 Drittes Staatsexamen (Note 1,0)

Famulaturen:

Februar 2002 Famulatur in der Praxisgemeinschaft Chirurgie Dres. Schwarz,
 Berenskötter
 Fachrichtung: Hand-/ Plastische Chirurgie, Kinderchirurgie
 Sept. 2003 Englisch-sprachige Auslandsfamulatur in Victoria, Mahé, Seychellen
 Fachrichtung: Gynäkologie
 April 2004 Famulatur in der Augenklinik der Universität Freiburg
 Juli 2004 Auslandsfamulatur an der Gachon Medical School, Incheon, Südkorea
 Fachrichtung: HNO
 Sept. 2004 Englisch-sprachige Auslandsfamulatur an der Universität von Toronto,
 Ontario/ Kanada.
 Fachrichtung: plastische Chirurgie

Praktisches Jahr:

April - Aug. 2005 University of South Florida, Tampa, USA
 Innere Medizin
 Aug. - Nov. 2005 Universitätsklinikum Freiburg
 Augenheilkunde
 Nov. 05 - Feb. 06 Kantonsspital Obwalden, Sarnen, Schweiz
 Chirurgie

Tätigkeiten:

Okt. 01 - März 04 Wissenschaftliche Hilfskraft am Physiologischen Institut,
 Tutor für das Physiologische Praktikum