

**Aus der
Abteilung für Innere Medizin III der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg
(Direktor: Prof. Dr. med. Cristoph Bode)
und aus dem
Institut für experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen
Universität München
(Direktor: Prof. Dr. med. Bernd Gänsbacher)**

angefertigt unter der Leitung von Dr. med. Ivo Buschmann

**eingereicht über
Prof. Dr. med. vet. Johannes Hirschberger Medizinische Kleintierklinik der Ludwig-
Maximilians-Universität München
(Vorstand: Prof. Dr. med. vet. Katrin Hartmann)**

**Zum Einsatz programmierbarer Medikamentenpumpen zur Förderung der
Arteriogenese durch *Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF)* im
Modell am Schwein**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**von
Susann Meryem Ulusans
Aalen**

München 2005

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent: Univ.-Prof. Dr. J. Hirschberger
Referent: Univ.-Prof. Dr. M. Stangassinger

Tag der Promotion: 15. Juli 2005

Gewidmet meinem Bruder Matthias

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
2	Schrifttum	7
2.1	Atherosklerose	7
2.2	Okklusive Gefäßkrankheiten	10
2.2.1	Die koronare Herzkrankheit (KHK)	10
2.2.2	Die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK)	11
2.2.3	Die zerebrovaskuläre Insuffizienz	13
2.3	Gefäßwachstum	15
2.3.1	Vaskulogenese	16
2.3.2	Angiogenese	16
2.3.3	Arteriogenese	17
2.4	Zirkulierende Zellen	18
2.4.1	Monozyten	18
2.4.2	Granulozyten.....	19
2.5	Pro-arteriogene Substanzen	20
2.5.1	Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1)	20
2.5.2	Granulocyte-Monocyte-Colony-Stimulating-Factor (GM-CSF).....	21
2.6	Limitationen der bisherigen Therapieansätze	23
2.6.1	MCP-1 stimuliert atherosklerotische Plaque-Progression.	23
2.6.2	Die Wirksamkeit von GM-CSF ist zeitlich begrenzt.....	24
3	Eigene Untersuchungen	26
3.1	Zielvorstellung	26
3.2	Material und Methoden.....	27
3.2.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen	27
3.2.2	Versuchsplan.....	28
3.2.3	Prämedikation und Operationsvorbereitung	28
3.2.4	Narkoseführung und Narkoseüberwachung	29
3.2.5	Ausleitung der Narkose	30
3.2.6	Postoperative Versorgung der Versuchstiere.....	31
3.2.7	Erste Operation	31
3.2.8	Zweite Operation	32
3.3	Messparameter	34
3.3.1	Bildgebende Parameter	34

3.3.2	Gemessene Parameter	34
3.3.3	Berechnete Parameter	35
3.4	Statistische Bewertung der Befunde	35
3.5	Ergebnisse	35
3.5.1	Post-mortem Angiographien	35
3.5.2	Knöchel-Arm-Index (ABI)	37
3.5.3	Blutfluss unter Hyperämie	38
3.5.4	Kollaterale Konduktanz	38
4	Diskussion	41
4.1	Untersuchungen im Schwein als Schritt zur klinischen Erprobung	41
4.2	Kollaterale Konduktanz: Verwendung von Ultraschall-Sonden zur Blutflussmessung	42
4.3	Verwendbarkeit der implantierbaren Infusionspumpen	44
4.4	Stimuliert GM-CSF das Kollateralarterienwachstum im Schweinehinterlauf?	45
4.4.1	Interpretation der Konduktanzmessungen	45
4.4.2	Interpretation der Ergebnisse der bildgebenden Verfahren	47
4.4.3	Interpretation der klinisch erhobenen Parameter	49
4.4.4	Interpretation des Blutflusses unter Hyperämie	49
4.4.5	Vergleich der intermittierenden mit der kontinuierlichen GM-CSF Applikation ..	50
4.5	Schlussfolgerung und Ausblick	50
5	Zusammenfassung	52
6	Literaturverzeichnis	55
7	Abkürzungsverzeichnis	62
8	Herstellernachweis	65
9	Tabellenverzeichnis:	67
10	Abbildungsverzeichnis:	67
11	Danksagung	68
12	Lebenslauf	69

1 Einleitung

Trotz Verbesserung in Prävention und Therapie bleiben Verschlüsse arterieller Blutgefäße und deren Folgen eine der Haupttodesursachen weltweit [PREVENTION 1994] [SCHANZENBÄCH und KOCHSIEK 1998]. Bei der sinkenden Mortalität in den westlichen Industrienationen ist ein starker Zuwachs vor allem in den Entwicklungsländern Afrikas und Asiens zu verzeichnen.

Neben der primären medikamentösen Therapie [SCHÜTZ 1996] werden invasive direkte Revaskularisationstechniken wie die perkutane transluminale Angioplastie (PTA) und die Bypasschirurgie zur funktionellen Beseitigung des arteriellen Gefäßverschlusses angewendet. Diese Verfahren sind jedoch in ihren Möglichkeiten eingeschränkt. Bei vielen Patienten können diese Techniken wie z. B. bei der Small Vessel Disease oder aber erfolgloser PTA bzw. Bypasschirurgie nicht durchgeführt werden. Für viele Patienten in Entwicklungsländern sind diese Therapieverfahren zudem unbezahlbar. Eine pharmakologische Stimulation des Kollateralarterienwachstums (Arteriogenese) und/ oder des kapillären Netzwerks (Angiogenese) könnte eine vielversprechende Therapieoption darstellen. Verschiedene Substanzen mit einem positiven Effekt auf die Arteriogenese befinden sich derzeit in der präklinischen Erprobung. Eine der am besten untersuchten Substanzen ist der rekombinante Granulozyten-Monozyten-Koloniestimulierende Faktor (GM-CSF), der bereits für die onkologische Indikation klinisch verfügbar ist. Besonders sein geringes Nebenwirkungsprofil macht dieses Pharmakon für die therapeutische Stimulation der Arteriogenese interessant.

In der vorliegenden Studie soll die Wirksamkeit von GM-CSF auf die Arteriogenese im Großtiermodell (Schwein) nach unilateraler Ligatur der A. femoralis untersucht werden. Darüber hinaus sollen verschiedene Therapieintervalle (kontinuierlich vs. intermittierende) betrachtet werden.

2 Schrifttum

2.1 Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine Erkrankung der größeren und mittleren muskulären und elastischen Arterien. Der Befall der Gefäßwand kann zur Erweiterung oder zur Gefäßeinengung führen. Die Erweiterung zu einem Aneurysma birgt die Gefahr der Perforation, die Verengung die von nachfolgenden Durchblutungsstörungen. Laut WHO-Definition ist die Atherosklerose eine variable Kombination von Veränderungen der Intima, bestehend aus einer herdförmigen Ansammlung von Fettsubstanzen, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia [DEFESCHE 2001, BÜLTMANN et al. 2001].

Degenerative Arterienveränderungen gewinnen besonders dann an Krankheitswert, wenn die Regulationsbreite der Gewebs- und Organdurchblutung in Ruhe oder unter funktioneller Belastung eingeschränkt ist. Eine wichtige Besonderheit der Atherosklerose ist einerseits ihr herdförmiges Auftreten, andererseits die progrediente Generalisation, die sie zur organübergreifenden Systemkrankheit macht. Oft sind gleichzeitig koronare, zerebrale, viszerale und periphere Arterien betroffen [HEROLD et al. 1999].

Eine Vielzahl endogener und exogener Risikofaktoren sind am Krankheitsgeschehen beteiligt. Neben den unbeeinflussbaren Risikofaktoren, wie z. B. familiäre Disposition, Lebensalter und männliches Geschlecht, wird die Entstehung der Atherosklerose von beeinflussbaren Risikofaktoren mitbestimmt. Die wichtigsten Risikofaktoren (1.Ordnung) sind Fettstoffwechselstörungen (z.B. Hypercholesterinämie), Hypertonie, Diabetes mellitus, metabolisches Syndrom (hierzu gehören u.a. Stammfettsucht, Insulinresistenz) und Nikotinabusus. Die gleichzeitige Einnahme von östrogenhaltigen Ovulationshemmern potenziert dieses Risiko. Zu den Risikofaktoren zweiter Ordnung gehören Hyperfibrinogenämie, erhöhtes Lipoprotein(a), Hyperhomocysteinämie, genetisch bedingte tPA-Defekte, Bewegungsmangel und negativer Stress [HEROLD et al. 1999].

Das Morbiditätsrisiko steigt beim Zusammenwirken mehrerer Risikofaktoren exponentiell an, da sie in einer engen Wechselbeziehung stehen. Sind zwei Risikofaktoren 1.Ordnung vorhanden, ist das Infarktisiko im Vergleich zu einer Normalperson vierfach erhöht, bei Vorliegen von drei Risikofaktoren 1.Ordnung liegt ein zehnfaches Risiko vor. Darüber hinaus gibt es eine gewisse Affinität der Risikofaktoren zu bestimmten Gefäßgebieten. So begünstigt

starkes Rauchen vor allem periphere Gefäßverschlüsse. Hypertonie manifestiert sich an den Zerebralarterien stärker als an Koronarien und peripheren Arterien und Diabetes mellitus verfünffacht das Risiko, an einem Extremitätenarterienverschluss zu erkranken [HEROLD et al. 1999].

Eine einheitliche pathogenetische Kaskade der Atherombildung gibt es wahrscheinlich nicht. Vielmehr wird sie durch eine Vielzahl von Mechanismen ausgelöst. Die pathogenetischen Prozesse sind komplex und greifen stark ineinander. Am besten fundiert für die Atheroskleroseentstehung ist die „response to injury hypothesis“ [ROSS 1986, 1993]. Zentraler Punkt dieser Hypothese ist das Auftreten von Endothelläsionen. Dadurch ist die Permeabilität des Endothels für Plasmabestandteile erhöht, Monozyten und Thrombozyten haften am Endothel an. Im Einzelnen lassen sich bei der „response to injury hypothesis“ folgende pathogenetische Mechanismen unterscheiden: Eine endotheliale Dysfunktion steht am Anfang des Prozesses. Sie kann durch Bluthochdruck, Nikotin, Immunmechanismen, hämodynamische Faktoren und eine Hyperlipidämie verursacht werden. Durch die Störung der Endothelfunktion kommt es zu einer Lipoproteinablagerung in die Intima, insbesondere von LDL, das beim Endotheldurchtritt oxidiert wird. Durch Endotheldefekte und/oder endotheliale Expression von Adhäsionsmolekülen wird auch die Einwanderung von Monozyten in die Arterienintima gefördert. Nach den grundlegenden Untersuchungen von BROWN und GOLDSTEIN [1983] und [BUJA et al. 1983] kommt den Makrophagen eine zentrale Rolle bei der Atherogenese zu: Makrophagen können LDL-gebundene Cholesterinester über den Scavenger – Rezeptor aufnehmen. Darüber hinaus haben sie auch einen Rezeptor für β -VLDL. Über diese Rezeptoren gelangen LDL und VLDL in das lysosomale Kompartiment der Makrophagen. Nach enzymatischer Spaltung gelangt das Cholesterin ins Zytoplasma und wird dort in Vakuolen gelagert. Es entstehen sogenannte Schaumzellen, die sich in der Intima in kleinen Gruppen ansammeln und durch Apoptose zugrunde gehen [BÖCKER et al. 2001].

Makrophagen haben darüber hinaus noch weitere Funktionen bei der Entstehung von atherosklerotischen Plaques. Sie sezernieren verschiedene Faktoren, wie z.B. Interleukine (u.a. IL-1, IL-8) und den Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), die einerseits eine vermehrte Adhäsion der Leukozyten an den Endothelzellen auslösen, andererseits glatte Muskelzellen und Fibroblasten aktivieren. Durch die Zunahme der Schaumzellen wächst die atherosklerotische Plaque, Endothel und Intima können dadurch zusätzlich mechanisch geschädigt werden. Hierdurch wird die Adhäsion von Thrombozyten weiter begünstigt, die den Wachstumsfaktor Platelet Derived Growth Factor (PDGF) sezernieren. Der PDGF und

Wachstumsfaktoren, die von Makrophagen gebildet werden, stimulieren die glatten Muskelzellen in der Arterienintima zu erhöhter Proliferation. Die Muskelzellen werden zu sekretorisch aktiven Zellen und synthetisieren unterschiedliche Kollagene und Proteoglykane. Da die pathogenen Faktoren weiterwirken, wandern in die wachsende fibröse Plaque aus der Blutbahn weiterhin Makrophagen, die sich durch Cholesterinaufnahme zu Schaumzellen umwandeln. Die in diesem Stadium zunehmenden extrazellulären Lipide stammen teilweise aus zerfallenen Schaumzellen, teils handelt es sich auch um Plasmaproteine. Zusätzlich kommt es zu Endotheldefekten mit Ablagerung von Fibrinplättchenthromben, welche wiederum die Einwanderung von Mediamyozyten fördern. So entsteht das Vollbild der Arteriosklerose.

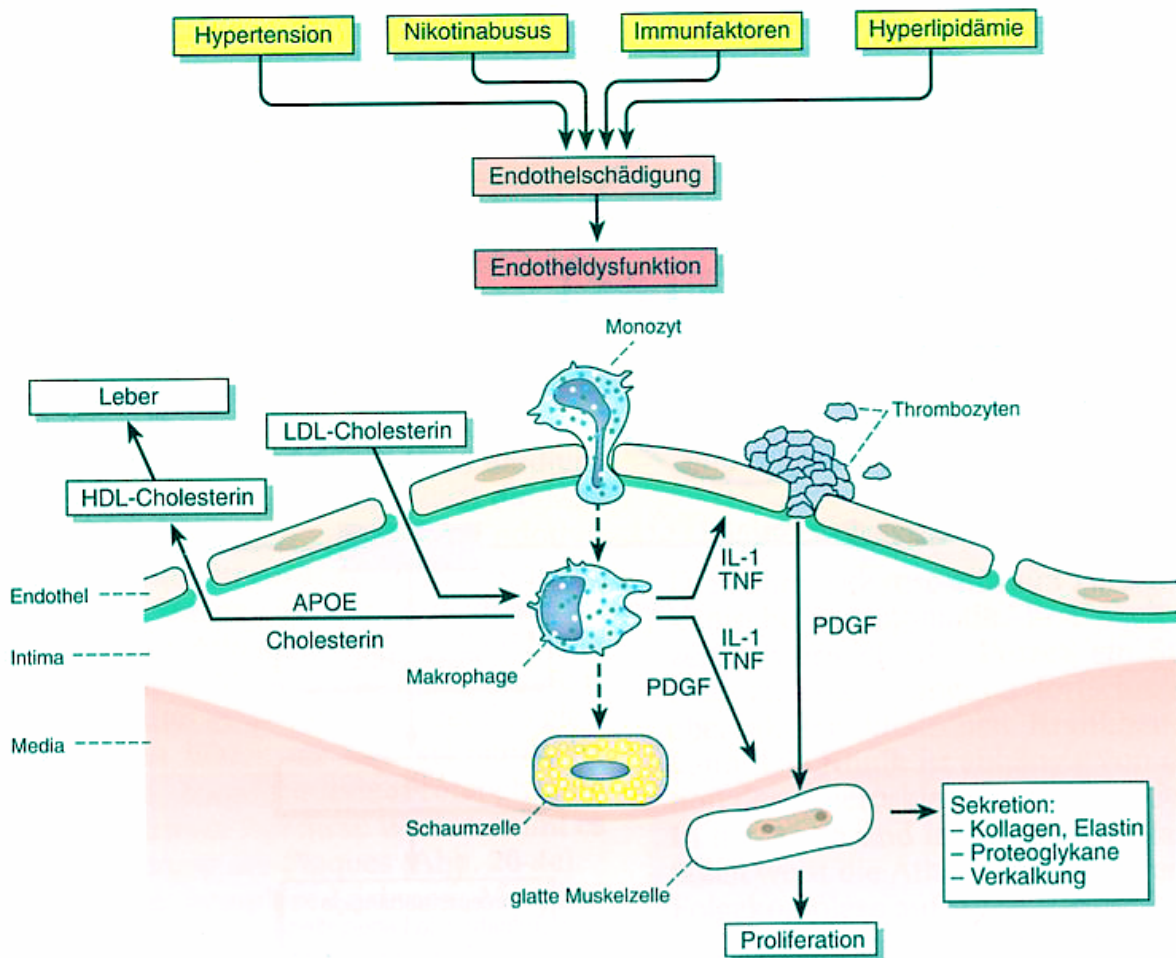


Abb. 1 Synoptische Darstellung der Atherogenese

Durch endotheliale Dysfunktion kommt es zur LDL-Cholesterin Einschwemmung und zur Immigration von Monozyten. Diese differenzieren sich zu Makrophagen und nehmen Cholesterin auf. Bei einem Überangebot an Cholesterin wandeln sich die Makrophagen in Schaumzellen um. Makrophagen sezernieren u.a. Interleukin 1 (IL-1), den Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), sowie den Platelet derived growth factor (PDGF). Dieser wird ebenfalls von am Endothel entstandenen Thrombozytenthromben sezerniert. PDGF regt die glatte Muskelzelle zur Proliferation an. Sie wandeln sich sekretorisch um und bilden u.a. Kollagen, Elastin und Proteoglykane. Die Matrix kann sekundär verkalken. [BÖCKER et al. 2001]

2.2 Okklusive Gefäßkrankheiten

Okklusive Gefäßkrankungen führen zu erheblichen Einschränkungen in der Lebensqualität und zu einer hohen Mortalität. So ist die koronare Herzkrankheit in der Bundesrepublik Deutschland, wie in den meisten Industrieländern Europas und Nordamerikas, die häufigste Todesursache. Im Jahr 2020 wird dies weltweit der Fall sein. Trotz rückläufiger Zahlen in den Industrienationen nimmt die Zahl der an KHK Erkrankten in den Entwicklungsländern rapide zu [KLEVER-DEICHERT et al. 1999].

Neben den Auswirkungen auf die Lebensqualität und die Mortalität, stellen die okklusiven Gefäßkrankungen einen bedeutenden sozioökonomischen Faktor dar [KLEVERT-DEICHERT et al. 1999].

2.2.1 Die koronare Herzkrankheit (KHK)

Die KHK, eine Verschlusskrankheit der Koronararterien, und ihre Folgen, ist eine Gefäßkrankung unterschiedlicher Ätiologie mit dem gemeinsamen pathologischen Mechanismus der Koronarinsuffizienz, welche das Missverhältnis von Sauerstoffbedarf und –angebot im Herzmuskel beschreibt. Nicht nur vasale Faktoren wie Makroangiopathie, Mikroangiopathie (small vessel disease) und Koronarspasmen, sondern auch Myokardhypertrophie und extrakardiale Faktoren (erniedrigtes O₂-Angebot, erhöhte Blutviskosität) spielen in der Ätiologie der KHK eine große Rolle [HEROLD et al. 1999].

Leitsymptom einer KHK ist der thorakale Schmerz im Sinne einer Angina pectoris. Dies muss jedoch nicht die Erstmanifestation für den Patienten darstellen. Myokardinfarkt, Myokardinsuffizienz, Rhythmusstörungen und der plötzliche Herztod können Folgen einer Koronarsklerose mit gleichzeitiger Koronarinsuffizienz sein. Durch die primäre medikamentöse Therapie wird versucht, den Sauerstoffbedarf des Herzens zu senken und gleichzeitig die Sauerstoffzufuhr zu erhöhen [SCHÜTZ 1996]. Perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) mit oder ohne Stent und der aortokoronare Bypass unter Verwendung der V. saphena magna oder parva oder unter Verwendung einer oder mehrerer Arterien (z.B. A. thoracica interna oder A. radialis) stellen zur Zeit die wichtigsten interventionellen bzw. invasiven Therapiemöglichkeiten dar. Der zunehmende Einsatz koronarer Stentimplantationen führt zu verbesserten Primär- und Langzeitergebnissen bei perkutanen koronaren Interventionen. Wesentliche Limitierung des Verfahrens bleibt die In-Stent-Restenose (ISR) mit einer Häufigkeit von 20 bis 40% [BAURIEDEL et al. 2002].

Der Einsatz von beschichteten Stents soll die ISR erheblich verringern. Es sind folgende therapeutische Eigenschaften einer Beschichtung erforderlich: Anti-inflammatorisch, anti-proliferativ, anti-migratorisch sowie pro-endothelial [TANABE et al. 2004] In den letzten Jahren wurden zahlreiche Substanzen getestet, Rapamycin (Sirolimus) erscheint als das erfolgversprechendste [WOODS et al. 2004]. In einem Großtiermodell konnte gezeigt werden, dass unter Rapamycintherapie die Neointimahyperplasie gehemmt wurde. Anti-proliferative, sowie anti-migratorische Eigenschaften des Rapamycins lassen sich auf eine gesteigerte Expression eines Proteinkinaseinhibitors (p27 (kip 1)), sowie der Hemmung der Proteintranslation und anderer Zellfunktionen zurückführen. In einer großen klinischen Studie konnte durch den Einsatz von Rapamycin-beschichteten Stents, die ISR von rund 30% auf 5% gesenkt werden [MARKS 2003].

Auch Bypässe sind durch eine Re-Stenose trotz begleitender konservativer Therapie gefährdet, wobei der Mammariabypass dem Venenbypass überlegen ist. Ein erneuter Verschluss ist möglich, dies zeigt deutlich, dass auch der Erfolg invasiver Techniken bei progredienter Koronarsklerose zeitlich begrenzt ist [HANSMANN et al. 1999].

2.2.2 Die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK)

Ätiologisch steht hinter der pAVK meist eine Atherosklerose (>95%), andere Ursachen für eine arterielle Verschlusskrankheit der Extremitäten können unter anderem rezidivierende Thrombembolien, selten Thrombangiitis obliterans sein. Die Größe der Restdurchblutung bei der pAVK hängt vom Stenosegrad, vom Kollateralkreislauf (dieser ist im Allgemeinen besser, je langsamer die Stenose auftritt) und von der Blutviskosität ab. Bei Gesunden kann die Durchblutung der Extremitäten durch Dilatation der präkapillaren Widerstandsgefäße bis zum 20-fachen gesteigert werden [HEROLD et al. 1999].

Die pAVK lässt sich in Einetagen- und Mehretagenerkrankungen einteilen. Bei der Einetagenerkrankung können verschiedene Gefäßabschnitte betroffen sein. So ist beim Beckentyp (35% Häufigkeit) die Aorta bzw. die A. iliaca betroffen, beim Oberschenkeltyp, der 50% aller Erkrankungen ausmacht sind A. femoralis/ A. poplitea und beim peripheren Typ, der v.a. beim Diabetiker auftritt die Unterschenkel- bzw. die Fußarterien betroffen. Leitsymptom der pAVK ist der belastungsabhängige ischämische Schmerz, der sich distal der Stenose projiziert und den Patienten zwingt, nach einer bestimmten Gehstrecke stehen zu bleiben („Schaufensterkrankheit“ = Claudicatio intermittens). Diese Schmerzen sind ischämische Muskelschmerzen; sie sind unter Belastung reproduzierbar und verschwinden in Ruhe. In den späten Stadien der Erkrankung kann es jedoch zu Ruheschmerz, besonders in

der Nacht, kommen. Im Endstadium kommt es zu Nekrose und/ oder Gangrän [HEROLD et al. 1999].

Zur Therapie einer pAVK stehen, wie bei der KHK, im Wesentlichen drei Möglichkeiten zur Verfügung: Die konservative medikamentöse Therapie, die interventionelle perkutane transluminale Angioplastie (PTA) mit dem optionellen Einbringen eines endoluminalen Stents, sowie als chirurgische Verfahren die Embolektomie oder die Bypass – Operation [HEROLD et al. 1999].

Besonders in der konservativen Therapie mit Medikamenten werden die therapeutischen Grenzen deutlich: Die Progression der Erkrankung lässt sich nur selten verhindern [BÖCKER et al. 2001].

Neben der Kontrolle der allgemeinen kardiovaskulären Risikofaktoren und der Anregung eines regelmäßigen Trainingsprogramms umfasst die Basistherapie die Gabe eines Thrombozytenaggregationshemmers, meist Acetylsalicylsäure (ASS).

In der CAPRIE Studie konnte gezeigt werden, dass die Langzeittherapie mit Clopidogrel bei Patienten mit AVK das Risiko eines Myokardinfarktes oder Schlaganfalls besser reduziert als mit ASS. Der Einsatz von Clopidogrel ist jedoch aufgrund seiner hohen Kosten bisher limitiert [CAPRIE-STEERING-COMMITTEE 1996].

In aktuellen Studien unserer Forschergruppe konnte gezeigt werden, dass die Anwendung von ASS sich negativ auf die Kollateralisierung auswirkt, der Einsatz von Clopidogrel hingegen zeigte keine negativen Auswirkungen auf die Arteriogenese [HOEFER et al. 2003].

Neben der medikamentösen Therapie können auch Lumen-eröffnende Maßnahmen zum Einsatz kommen. Häufig angewandt werden Katheterv Verfahren, Operationen (Bypässe) sowie lokale Fibrinolyse bzw. eine Kombination von Angioplastie und Fibrinolyse [HEROLD et al. 1999].

Etwa 3,3 Mio. Deutsche sind an peripherer arterieller Verschlusskrankheit erkrankt. Jedes Jahr kommen in der Bundesrepublik ca. 100.000 Neuerkrankungen hinzu [Statistisches Bundesamt].

Eine exakte Einschätzung der Häufigkeit der pAVK wird durch eine erhöhte Dunkelziffer asymptomatischer Patienten erschwert. Auf einen Patienten mit Claudicatio intermittens kommen ca. 2 asymptomatisch Erkrankte. Männer erkranken im Alter von 55 bis 64 Jahren etwa fünfmal häufiger als Frauen. Die Geschlechtsunterschiede verwischen sich allerdings mit zunehmendem Lebensalter. Frauen erkranken im Mittel 10 Jahre später als Männer. Aufgrund einer starken Zunahme an Raucherinnen, wird die Zahl der an pAVK erkrankten Frauen insgesamt jedoch in den nächsten Jahren ansteigen [Statistisches Bundesamt].

Unter den Todesursachen spielt die pAVK mit 17800 Todesfällen 1995 nur eine untergeordnete Rolle, da sie im allgemeinen nicht unmittelbar zum Tode führt. Die meisten Patienten sterben an einer begleitenden Erkrankung der Koronargefäße. In ihrer Auswirkung auf die Lebensqualität der Betroffenen ist sie jedoch dramatisch. Schätzungsweise 22 000 Gliedmaßen werden jährlich in Deutschland aufgrund arterieller Verschlusskrankheit amputiert. 1995 wurden in der Statistik 43 000 Schwerbehinderte wegen krankheitsbedingtem Teilverlust von Extremitäten geführt. Besonders Patienten mit einem Diabetes mellitus leiden an einer pAVK als Spätfolge ihrer Erkrankung [KLEVER-DEICHERT et al. 1999].

2.2.3 Die zerebrovaskuläre Insuffizienz

Der Schlaganfall gehört zum Krankheitsbild der Herz-Kreislaufkrankungen, mit den bösartigen Tumoren zählt er zu den drei häufigsten Todesursachen in Deutschland und ist der häufigste Grund einer Behinderung. Mit einer durchschnittlichen Inzidenz von 200 bis 350 pro 100.000 Einwohner pro Jahr erleiden ca. 500 bis 600 Menschen in Deutschland jeden Tag einen Schlaganfall [Statistisches Bundesamt].

Anders als beim Myokardinfarkt ist die Letalität innerhalb des ersten Tages relativ gering. Im ersten Monat sterben allerdings je nach Schwere der Erkrankung zwischen 5 und 25% der Betroffenen. Der überwiegende Anteil aller Schlaganfälle ist ischämisch bedingt, nur bei ca. 15% handelt es sich um intrakranielle Blutungen. Schlaganfälle ischämischer Genese treten in Folge einer mangelnden Blutversorgung auf. Dies kann eine orthostatische Hypotension infolge antihypertensiver medikamentöser Behandlung oder Diabetes mellitus, eine orthostatische zerebrale Ischämie ohne Hypotension, eine perioperative Komplikation, eine myokardiale Ischämie, eine kardiale Arrhythmie oder eine Stenose bzw. Okklusion der A. carotis interna als Ursache haben [SCHIELE et al. 2000a, HABERL 2001].

Häufig liegen Kombinationen dieser Ursachen vor. Neben den ischämisch bedingten Schlaganfällen treten hämorrhagisch bedingte Schlaganfälle mit ca. 30 % auf. Infolge des Gefäßverschlusses bzw. des gestörten Blutflusses kommt es zu einer lokalen Unterversorgung an Sauerstoff, anaerober Glykolyse, lokaler Azidose und schließlich zum Zusammenbruch des Zellstoffwechsels [BUSCH et al. 2003].

Die zerebralen Durchblutungsstörungen werden in verschiedene Stadien eingeteilt: Stadium 1 stellt eine asymptotische Stenose der hirnversorgenden Gefäße dar. Die transitorische ischämische Attacke (TIA) stellt mit ihren kurzfristigen reversiblen neurologischen Ausfällen, die sich nach Minuten bis maximal 24 Stunden zurückbilden (z.B. Seh- und/ oder

Sprachstörungen) das zweite Stadium dar. Während sich die vollständige Rückbildung der Symptome in Stadium drei erst nach 24 Stunden einstellt (prolongiertes reversibles ischämisches neurologisches Defizit (PRIND)), gibt es in Stadium vier nur eine partielle oder fehlende Rückbildung der neurologischen Ausfälle (kompletter Hirninfarkt). Unter einem leichten Schlaganfall (minor stroke) versteht man persistierende neurologische Symptome, die aber das Verhalten im Alltag nicht behindern [HEROLD et al. 1999].

Für den Schlaganfall gelten die gleichen Risikofaktoren wie bei der Entstehung der Arteriosklerose beschrieben [HEROLD et al. 1999].

Da die Zellen im Bereich des Infarkts schnell und nachhaltig geschädigt werden, und zudem im Gehirn keine Neuronenneubildung stattfindet, ist eine schnell einsetzende Therapie zur Prävention weiterer Schäden unumgänglich. Wenn innerhalb von drei bis sechs Stunden eine Reperfusion erzielt werden kann, so sind im ischämischen Kern die Neurone nekrotisch. In der Penumbra dagegen können sie ihre volle Funktionsfähigkeit wiedererlangen. Dieser Zeitraum wird auch als therapeutisches Fenster bezeichnet [PULSINELLI 1992].

Die Therapie von Schlaganfallpatienten zielt vor allem auf die Stabilisierung der Hirnperfusion. Dazu gehören die Beseitigung einer manifesten Herzinsuffizienz, die Behandlung von Herzrhythmusstörungen und die Therapie einer arteriellen Hypertonie [HEROLD et al. 1999].

Zur Sekundärprävention, insbesondere zur lokalen Embolieprophylaxe, sind Thrombozytenaggregationshemmer indiziert. Ebenso kommt bei Patienten mit Schlaganfall die Physiotherapie zur Milderung der Symptome zum Einsatz, da trotz intensiver Forschung keine Medikamente zur Verfügung stehen, die die Ursache des Schlaganfalls, den Gefäßverschluss, schnell und effektiv beseitigen [FISHER und SHAEBITZ 2000; HACKE et al. 1999; MARLER et al. 2000; SCHIELE et al. 2000b]. Als einziges wird zurzeit beim akuten embolischen Gefäßverschluss die thrombolytische Therapie mit Streptokinase oder rekombinanter Gewebs-Plasminogenaktivator (rt-PA) durchgeführt [HACKE et al. 1995; HEISS et al. 1997], die durch die Nebenwirkungen (Blutungen infolge gestörter Blutgerinnung) einige Risiken in sich birgt. Operative Möglichkeiten zur Rekanalisation sind die Endarterieektomie der A. carotis oder eine Bypassoperation.

Das Risiko, einen Schlaganfall zu erleiden, beträgt nach einer TIA 5%/Jahr. Das Risiko nach einem Schlaganfall einen erneuten Schlaganfall zu erleiden beträgt 10%/Jahr.

2.3 Gefäßwachstum

Der Organismus ist von der Versorgung mit Sauerstoff abhängig. Dieser wird überwiegend über das Transportsystem der Blutgefäße, die in jeden Bereich des Organismus gelangen, transportiert. Die Bildung von neuen Blutgefäßen erfolgt überwiegend während der Embryonalentwicklung. Auch im adulten Organismus kann es zur Weiterentwicklung von Gefäßen kommen, physiologischerweise findet eine Neoangiogenese in den Organen des weiblichen Reproduktionstraktes und während der Wundheilung statt. Unter pathologischen Bedingungen wie Tumorwachstum, Entzündung und Gewebischämie kommt es ebenfalls zu einem funktionell bedeutsamen Gefäßwachstum. Dieses überschießende oder auch fehlende Gefäßwachstum derartiger pathologischer Zustände führt oft zu Erkrankungen mit hoher Morbidität oder Mortalität [FOLKMAN 1995].

Im Zusammenhang mit Gefäßwachstum muss zwischen drei Termini unterschieden werden: der Vaskulogenese, der Angiogenese und der Arteriogenese.

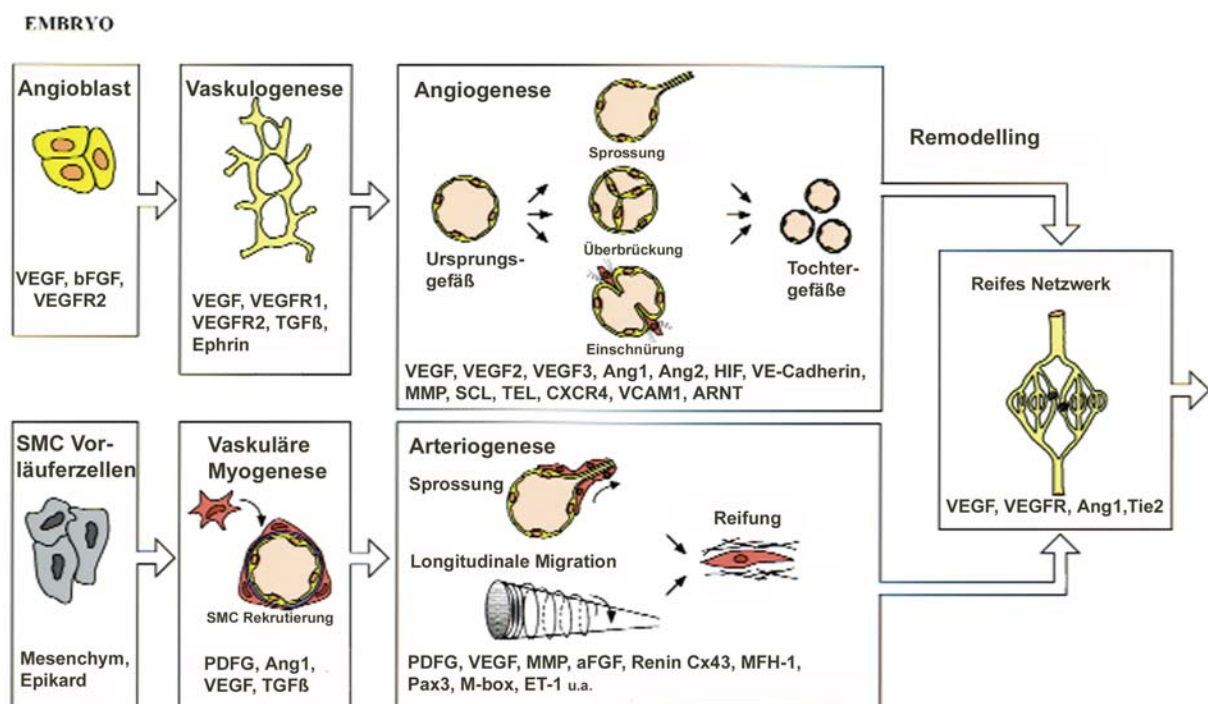


Abb.2 Endotheliale Vorläuferzellen formieren sich während der Embryonalentwicklung zu einem primitiven Netzwerk (Vaskulogenese), welches expandiert und sich umgestaltet (Angiogenese). Während der vaskulären Myogenese bedecken glatte Muskelzellen die Endothelzellen und stabilisieren die gebildeten Gefäße durch Arteriogenese. [CARMELIET 2000].

2.3.1 Vaskulogenese

Während der Embryonalentwicklung beginnt die Bildung des Blutgefäßsystems mit der Differenzierung von Hämangioblasten aus dem Mesoderm des Dottersacks [CARMELIET 2000, RISAU 1997].

Die Hämangioblasten formieren sich zu zellulären Aggregaten (Blutinseln) deren innere Zellen zu hämatopoetischen Vorläuferzellen differenzieren, während sich die äußeren zu primitiven Endothelzellen entwickeln [CARMELIET 2000, RISAU 1997]. Die Differenzierung der Hämangioblasten wird im Wesentlichen von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und seinen Rezeptoren (Flk-1 und Flt-1), sowie von basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) beeinflusst.

Im Verlauf fusionieren die Endothelzellen und bilden ein primitives vaskuläres Netzwerk, welches sich letztlich zu einem komplexen System fortentwickelt. Die Umwandlung in ein reifes Gefäßsystem erfolgt durch die Prozesse der Angiogenese und Arteriogenese.

Ob dieser Vorgang auch im adulten Organismus stattfindet, ist umstritten. CARMELIET [2000] hält die Vaskulogenese auch postembryonal für möglich, während andere Autoren diesen Begriff für die Ontogenese reservieren [SCHAPER und BUSCHMANN 1999].

2.3.2 Angiogenese

Angiogenese ist ein integraler Bestandteil wichtiger physiologischer Prozesse wie Schwangerschaft und Wundheilung. Aber auch unter pathologischen Bedingungen wie z. B. bei Neoplasien, diabetischer Retinopathie, Entzündungsprozessen und Ischämie kann Angiogenese induziert werden [BÖCKER et al. 2001].

Neben Gewebsverletzungen ist der Hauptstimulus der Angiogenese eine andauernde Hypoxie. Sauerstoffmangel wird von vielen Zelltypen mit der gesteigerten Expression von angiogen wirksamen Signalmolekülen wie VEGF und Angiopoetin-1 beantwortet. Die Hypoxie-abhängige frühe Signaltransduktion ist noch zu großen Teilen ungeklärt [CARMELIET 2000].

Unter Hypoxie kommt es zu einer vermehrten Expression des Transkriptionsfaktors Hypoxia-inducible-factor-1 (HIF-1). Die erhöhte Konzentration an HIF-1 führt zu einer gesteigerten Transkription verschiedener Faktoren unter anderem für VEGF [SEMENZA 1999]. Vasodilatation ist eines der frühesten Stadien der Angiogenese und führt Stickstoffmonoxid (NO)-abhängig zu einer Hochregulation von Wachstumsfaktoren. Durch VEGF, welcher zuerst als Vascular Permeability Factor beschrieben wurde, kommt es zu einer Steigerung der

Gefäßpermeabilität. Plasmaproteine treten in das umgebende Gewebe aus und bilden eine Leitstruktur für später migrierende Endothelzellen. Degradationsenzyme der Matrix-Metalloproteinasenfamilie, sowie Plasminogen-Aktivatoren und andere führen einerseits zu einer Lockerung der engen Zellkontakte und einer Auflösung der Basalmembran, andererseits werden auf diesem Wege weitere Signalmoleküle wie bFGF und VEGF, die in der extrazellulären Matrix gespeichert sind, proteolytisch freigesetzt und aktiviert. Die Teilung, Migration und Reorganisation von Endothelzellen *in vivo* wird im Wesentlichen durch das aus der extrazellulären Matrix stammende VEGF initiiert und reguliert. Endothelzellen formieren sich zunächst zu soliden Strängen und bilden dann ein Lumen aus. Durch Fusion mit anderen Gefäßen wird eine Vergrößerung des Durchmessers und eine Längenzunahme der Gefäße ermöglicht [RISAU 1997, CARMELIET 2000].

Grundlegende Arbeiten zur Angiogenese-Forschung wurden im Rahmen der Onkologie aus der Gruppe von FOLKMAN [1971] durchgeführt. Durch die Entdeckung, dass physiologische Inhibitoren des kapillären Gefäßwachstum wie Angiostatin das Wachstum von malignen Tumoren unterdrücken kann [O'REILLY et al. 1994], eröffnete sich das weite Feld der Anti-Angiogenese.

2.3.3 Arteriogenese

Der Begriff der Arteriogenese beschreibt das Auswachsen präexistenter arteriolärer und arterieller Kollateralen zu funktionellen bedeutsamen Kollateralarterien. Der Prozess der Arteriogenese wird durch erhöhten Scherstress vermittelt. Kollateralarterien werden nach Eintreten einer hämodynamisch relevanten Stenose größerer Arterien rekrutiert. Während der Druck post-stenotisch absinkt, verteilt sich der Blutfluss über die präexistierenden Arteriolen, welche nun das Hochdruckgebiet (prä-stenotisch) mit dem Niederdruckgebiet (post-stenotisch) verbinden. Dies führt zu einer erhöhten Durchflussgeschwindigkeit und somit zu erhöhten Scherkräften in den Kollateralarterien [SCHAPER und ITO 1996]. Das durch Scherstress aktivierte Endothel exprimiert verstärkt Zytokine (z.B. MCP-1) und Zelladhäsionsmoleküle, an denen Monozyten anhaften und durch die Gefäßwand wandern. Hier differenzieren Monozyten zu Makrophagen und sezernieren ebenfalls Zytokine und Wachstumsfaktoren, welche weitere Monozyten anlocken [SCHAPER et al. 1976]. Es entsteht eine lokale Entzündungsreaktion. Durch Andauung der Lamina elastica interna und der extrazellulären Matrix wird Raum für nachfolgende Umbauprozesse des Gefäßes geschaffen, an denen maßgeblich die Proliferation glatter Muskel- und Endothelzellen beteiligt sind [CAI et al. 2003].

Besonders eindrücklich kann das Ausmaß der Arteriogenese am Beispiel der Aortenisthmusstenose gezeigt werden. Bei diesem Krankheitsbild wird das größte Gefäß des menschlichen Körpers, die Aorta, durch Kollateralarterien ersetzt. Als Verbindungsgefäß dienen hauptsächlich die Arterien der Thoraxwand, insbesondere die Interkostalararterien.

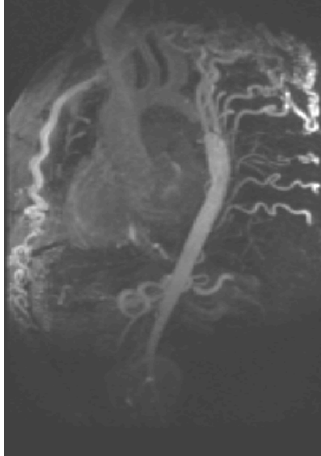


Abb.3 Diese NMR- Aufnahme in koronarer Schichtung stammt von einem 30jährigen Mann, der als gesunder Proband der Kontrollgruppe an einer NMR-Studie teilnahm. Trotz eines vollständigen Verschlusses der Aortenisthmus war dieser Patient beschwerdefrei und spielte aktiv Fußball. Die deutlich sichtbaren geschlängelten Interkostalararterien hatten die Versorgung der unteren Körperhälfte übernommen. (Abbildung überlassen von Dr. N. van Royen, AMC Amsterdam, Niederlande)

In der Entstehung von Atherosklerose und Arteriogenese gibt es einige Gemeinsamkeiten, so zum Beispiel die inflammatorische Komponente, die Beteiligung von Monozyten, die Hochregulation von MCP-1, Adhäsionsmolekülen (z.B. ICAM, VCAM) und Matrix-Metalloproteasen, sowie die Umwandlung des Phänotyps glatter Muskelzellen und ihrer Migration [BÖCKER et al. 2001]

2.4 Zirkulierende Zellen

2.4.1 Monozyten

Monozyten und Makrophagen sind, neben ihrer Funktion in der immunologischen Abwehr gegen pathogene Keime und zahlreiche andere Funktionen in der Homöostase des Organismus, für das Wachstum von Kollateralgefäßen nach hämodynamisch relevanten Stenosen von entscheidender Bedeutung. Die Arbeitsgruppe um SCHAPER [et al.1976] konnte zeigen, dass Monozyten als Gewebsmakrophagen um proliferierende Kollateralarterien der peripheren Zirkulation akkumulieren. An der Adhäsion von Monozyten am Endothel sind im Wesentlichen das leukozytäre Mac-1 und das endotheliale ICAM-1 beteiligt. Zirkulierende Monozyten haften am scherstressaktivierten Endothel des noch kleinlumigen Kollateralgefäßes an und transmigrieren in die Adventitia. SCHOLZ et al. konnten zeigen, dass eine Zerstörung der Monozyten einen negativen Effekt auf die Arteriogenese hat.

Über ihre Zell-vermittelten Wirkungen hinaus verfügen Makrophagen über ein beträchtliches sekretorisches Potential. So werden weit über 100 Moleküle von Makrophagen, neben Enzymen, wie der Matrix-Metalloprotease werden Zytokine (GM-CSF, MCP-1, TNF α , bFGF), Adhäsionsmoleküle (z.B. Laminin), Lipidmediatoren und vieles mehr exprimiert und sezerniert [SCHOLZ et al. 1996].

Makrophagen stellen die wichtigste Quelle von Wachstumsfaktoren in der Arteriogenese dar. In verschiedenen Studien konnte eine positive Beeinflussung der Arteriogenese durch künstliche Applikation von MCP-1 zur Chemoattraktion von Monozyten im Tiermodell gezeigt werden [ITO et al. 1997b, HOEFER et al. 2001]. Für verschiedene Zytokine konnte in unterschiedlichen Tiermodellen bereits ihre arteriogene Wirksamkeit bewiesen werden. Neben MCP-1 zeigen vor allem GM-CSF und TGF- β eine starke arteriogene Potenz.

2.4.2 Granulozyten

Neutrophile Granulozyten sind wichtige Effektoren der akuten Entzündung, tragen durch Sekretion von Zytokinen aber auch zum afferenten Schenkel der Immunantwort bei. Bei der akuten Entzündung können die Neutrophilen, die annähernd 90% der zirkulierenden Granulozyten ausmachen, infolge Adhäsion (via CD11b/CD18 auf Neutrophilen und ICAM.1, ICAM-2 bzw. E-Selektin auf Endothelzellen) und transendotheliale Migration entlang einem chemotaktischen Gradienten rasch und in großer Zahl ins entzündliche Gewebe gelangen. Hier können sie verschiedene Zytokine exprimieren und sezernieren, die beim Gefäßwachstum eine Rolle spielen. Dieser Zusammenhang wurde bisher primär im Kontext der Angiogenese diskutiert. Bei Entzündungsprozessen sezernieren neutrophile Granulozyten VEGF in ihre Umgebung [TAICHMAN et al. 1997], das aus intrazellulären Vesikeln stammt. Die Sekretion erfolgt u.a. durch physiologische Agonisten (z.B. TNF α). MCCOURT et al. [1999] konnten eine stimulierte Proliferation von humanen Endothelzellen in vitro nach Inkubation mit aktivierten polymorphkernigen Neutrophilen zeigen.

Neben VEGF werden zahlreiche Proteine exprimiert, die eine bedeutende Rolle in der Arteriogenese einnehmen. Sie sezernieren aktivationsabhängig TNF α und TGF β und sind in physiologischen und pathologischen Prozessen entscheidend für Matrixdegradation und Gewebeumbauprozesse. Durch die Sekretion von proteolytischen Enzymen wird die extrazelluläre Matrix gelockert, somit wird Platz für Zellmigration und Zellproliferation geschaffen [HAZIOT et al. 1993, QUAYLE et al. 1994].

2.5 Pro-arteriogene Substanzen

Während der Arteriogenese wachsen bereits vorhandene arterioläre Verbindungen zu funktionellen Kollateralarterien heran. Im Vergleich zu dem durch Angiogenese entstehenden kapillären Netzwerk sind die Kollateralarterien in Bezug auf eine verbesserte Perfusion nach arteriellem Verschluss den englumigen Kapillaren deutlich überlegen [HELISCH und SCHAPER 2000].

Durch den therapeutische Einsatz von pro-arteriogenen Substanzen kann die Arteriogenese gezielt gesteigert werden [BUSCHMANN et al. 2003b, SCHAPER 2001].

Die Ergebnisse vor allem der Arbeitsgruppe um SCHAPER [1971] wiesen infiltrierende Monozyten als essentielle Mediatorstrukturen der Arteriogenese nach.

In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche Substanzen mit aktivierenden, chemoattraktiven oder anti-apoptischen Effekten auf Leukozyten hinsichtlich ihrer Wirkung auf Arteriogenese untersucht. Da es sich bei allen bisher nachgewiesenen Substanzen mit pro-arteriogener Wirkung um Proteine handelt, ist der Applikationsmodus von entscheidender Bedeutung [RAJANAYAGAM et al. 2000]. Unter den bisher erprobten Applikationsmodi stellt sich die intraarterielle Injektion als wirksamste Form der Substanzapplikation dar.

Zwei in ihrer präklinischen Erforschung weit fortgeschrittene Substanzen sind das Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) als chemo-attraktive Substanz [ITO et al. 1997a, HOEFER et al. 2001] und der Granulocyte-Monocyte-Colony-Stimulating-Factor (GM-CSF) als Wachstumsfaktor der myeloischen Hämatopoese [BUSCHMANN et al. 1998, SEILER et al. 2001].

2.5.1 Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1)

Das MCP-1 ist ein 76-AS-Protein. Aufgrund eines Motivs aus zwei Cysteinaminosäuren in direkter Bindung ist es als Zytokin der CC-Familie klassifiziert.

Nach der empirischen Beobachtung der Akkumulation von Monozyten um proliferierende Kollateralarterien durch SCHAPER et al. [1976] wurde von mehreren Arbeitsgruppen versucht, die Arteriogenese durch Chemoattraktion und Aktivierung von Monozyten zu beeinflussen. ITO et al.[1997] beschrieben erstmals eine signifikante Stimulation der Arteriogenese durch intraarterielle Infusion von humanem MCP-1 im Kaninchenhinterlauf eine Beobachtung die später von HÖFER et al. [2001] mit weiterentwickelter Technik auch mit verschiedenen langen Beobachtungszeiträumen bestätigt werden konnte.

MCP-1 wird von einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert und sezerniert, darunter aktivierte Leukozytenpopulationen, Fibroblasten und Endothelzellen. Verschiedene Stimuli vermögen eine endotheliale MCP-1-Expression zu induzieren. Als physikalische Kraft ist tangentialer Scherstress *in vitro* in Plattenkegelexperimenten mit zirkulärem Fluss über eine kultivierte Endothelzellschicht ein starker Auslöser der MCP-1-Expression [SHYY et al. 1994]. Neben Zytokinen wie TNF- α und IL-1 vermag auch der leukozytäre Wachstumsfaktor GM-CSF eine erhöhte MCP-1 Sekretion zu induzieren.

Als CC-Chemokin wirkt MCP-1 nicht nur auf Monozyten, sondern auch auf Lymphozyten im peripheren Blut stark chemotaktisch [ROTH et al. 1995]. Im Rahmen von chronischen Entzündungen vermögen auch Granulozyten die MCP-1 Rezeptoren CCR1 und CCR2 zu exprimieren.

Während die pro-arteriogene Wirkung von MCP-1 wohl vor allem durch seine stark chemotaktischen Qualitäten bestimmt zu sein scheint, ist auch durch die zytokininduzierte Aktivierung von Monozyten durch TGF- β 1 die Arteriogenese positiv zu beeinflussen [VAN ROYEN et al. 2002].

Neben einem nachgewiesenen stimulierenden Effekt von MCP-1 im Kaninchen und der Maus [VAN ROYEN et al. 2003a] wurde die Wirksamkeit dieses Zytokins auch in einem pAVK-Modell im Schwein untersucht, wobei eine mit der vorliegenden Studie vergleichbare Messanordnung zum Einsatz kam [VOSKUIL et al. 2003]. Auch im Großtierorganismus bleibt also die pro-arteriogene Wirkung von MCP-1 erhalten. In derselben Studie konnte demonstriert werden, dass die Zytokininfusion in einem kurzen Zeitfenster von zwei Tagen nach Femoralarterienligatur denselben Effekt auf die kollaterale Konduktanz erzielte wie eine zweiwöchige Dauerinfusion. MCP-1 konnte somit über die Speziesgrenzen hinaus als stark wirksame arteriogene Substanz beschrieben werden. Ein möglicher therapeutischer Einsatz im menschlichen Patienten ist jedoch durch sein ausgeprägtes Nebenwirkungsprofil eingeschränkt (siehe folgende Kapitel).

2.5.2 Granulocyte-Monocyte-Colony-Stimulating-Factor (GM-CSF)

Der GM-CSF ist ein 22kDa glykosiliertes Protein, welches im hämatopoetischen Knochenmark Wachstum und Differenzierung der myeloischen Zellreihe reguliert [CLARK und KAMEN 1987]. Weiterhin fördert es die Freisetzung von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut und verlängert als anti-apoptotischer Faktor die Lebensdauer von Granulozyten und Monozyten [DENECKER et al. 1997].

Ohne anti-apoptotische Einflüsse geht ein Großteil der peripheren Leukozyten durch den physiologischen Zelltod zugrunde. So wird eine überschießende und unerwünschte Entzündungsreaktion in gesundem Gewebe verhindert. Zahlreiche lösliche und zellgebundene Mediatoren vermögen Apoptose zu induzieren. WALSH und SATA [1999] postulieren, dass schon bei transendothelialen Migration durch die Gefäßwand eine monozytäre Apoptose induziert werden kann. GM-CSF Expression in Endothelzellen wird durch erhöhten Scherstress induziert und vermag die Überlebenszeit von Monozyten/ Makrophagen zu verlängern [KOSAKI et al. 1998].

Bei der bekannten Bedeutung von Monozyten als Stimulatoren der Arteriogenese untersuchten BUSCHMANN et al. [2001] erstmalig den Effekt von GM-CSF auf das Kollateralarterienwachstum im Kaninchenhinterlauf. Sie konnten eine signifikante Zunahme der kollateralen Konduktanz sieben Tage nach Femoralarterienligatur nachweisen.

In Kombination mit dem chemoattraktiven Zytokin MCP-1 vermochte GM-CSF die Konduktanz auch längerfristig auf 72% des Ausgangswertes wiederherzustellen. Dieses Ergebnis übertrifft alle anderen bisherigen Therapieversuche im Tierexperiment [BUSCHMANN et al. 2001].

Neben der peripheren Zirkulation des Kaninchens lässt sich die pro-arteriogene Wirksamkeit von GM-CSF auch im zerebrovaskulären System der Ratte demonstrieren. Diese kürzlich publizierten Ergebnisse von BUSCHMANN [2003a] et al. legen eine mögliche zukünftige Anwendung zur Schlaganfallprophylaxe nahe.

GM-CSF ist als rekombinantes Protein als Pharmakon der Hämatologie/Onkologie verbreitet und für die klinische Praxis zugelassen. Dies ermöglichte SEILER et al.[2001] die Erprobung von GM-CSF in einer kleinen randomisierten, doppelblinden und Placebo-kontrollierten Studie in Patienten mit koronarer Herzerkrankung. Als Endparameter diente ein aus distalem koronaren Verschlussdruck und Aortendruck abgeleiteter kollateraler Flussindex (CFI), der in katheterbasierten Messungen auch die Detektion kleiner Flussunterschiede ermöglicht. Nach zwei Wochen ließ sich eine signifikante Zunahme des CFI in der Verum-Therapiegruppe feststellen. Aufgrund der sehr heterogenen Ergebnisse und der geringen Gruppengröße sind jedoch vor der Einleitung umfangreicherer Patientenstudien besonders zur pAVK noch weitere Grundlagenarbeiten in Großtiermodellen erforderlich, um bessere Kenntnisse über Dosierungsintervalle und zu erwartenden Effekt zu gewinnen [SEILER et al. 2001].

2.6 Limitationen der bisherigen Therapieansätze

2.6.1 MCP-1 stimuliert atherosklerotische Plaque-Progression.

Nachdem die Wirksamkeit mehrerer Zytokine als Stimulatoren der Arteriogenese bewiesen werden konnte, muss vor einer klinischen Anwendung vor allem das mögliche Nebenwirkungsspektrum der zu evaluierenden Substanz untersucht werden [EPSTEIN et al. 2001]. Dies trifft besonders für das stark arteriogene MCP-1 zu [VAN ROYEN et al. 2003a]. MCP-1 als inflammatorisches Zytokin stimuliert nicht selektiv die Monozyteninfiltration in der Arteriogenese, sondern auch in jedem anderen entzündlichen Prozess.

Zum Formenkreis der Entzündungen kann unter anderem auch die Atherosklerose gezählt werden [ROSS 1999]. Wie in der Arteriogenese kommt es zur Expression leukotaktischer Zytokine und der Infiltration von Monozyten in die Gefäßwand. MCP-1 ist auch in der Atherosklerose ein Stimulus dieser von Monozyten abhängigen Reaktion und als pro-arteriosklerotischer Faktor gut beschrieben [NAMIKI et al. 2002].

Während die Beteiligung von intrinsischem MCP-1 in der Atherosklerose als gesichert gilt, war lange unklar, inwiefern die artifizielle Zufuhr dieses Zytokins, z.B. im Rahmen einer Arteriogenese-fördernden Therapie, zu einem Fortschreiten von Gefäßläsionen führt. Eine Studie in hyperlipidämischen Watanabe-Kaninchen führte nicht zu einer signifikant vergrößerten intraluminalen Plaquefläche [VAN ROYEN et al. 2003b]. Die Autoren betonten jedoch aufgrund der hohen Standardabweichung der Ergebnisse die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen. Dieselbe Forschergruppe konnte später nachweisen, dass in Apo-E-Knock-out-Mäusen unter hyperlipidämischen Bedingungen die arteriogene Potenz von MCP-1 zwar erhalten blieb, in diesem Modell jedoch eine deutliche Wirkung auf die systemische Atherosklerose zu detektieren war. Die lokale intraarterielle Infusion von MCP-1 führte systemisch zu einer erhöhten Expression des monozytären Adhäsionsmoleküls Mac-1, dem Liganden des endothelialen ICAM-1 und einem essentiellen Vermittler der Leukozyteninfiltration in der Atherosklerose und Arteriogenese. Es kam zu einer signifikanten Zunahme der atherosklerotischen Plaquefläche, und der aortalen Neointimabildung. Besonders Besorgnis-erregend erschien die Destabilisierung atherosklerotischer Plaques durch einen geringeren Anteil glatter Muskelzellen in der Gefäßläsion [VAN ROYEN et al. 2003a].

Diese Ergebnisse machen eine klinische Erprobung von MCP-1 in Patientenstudien in näherer Zukunft unwahrscheinlich. Beinahe jeder Patient, welcher für eine pro-arteriogene Therapie in Frage käme, leidet an Atherosklerose. Substanzen, welche die Progression dieser

Krankheitsentität fördern, sind deshalb in der relevanten Patientengruppe kontraindiziert. Substanzen ohne eine solche schädliche Nebenwirkung sind dadurch in den Mittelpunkt des Interesses gerückt [SCHAPER und BUSCHMANN 1999].

2.6.2 Die Wirksamkeit von GM-CSF ist zeitlich begrenzt.

Der Wachstumsfaktor GM-CSF erscheint hinsichtlich seines Nebenwirkungsprofils besonders vielversprechend. Im Gegensatz zu MCP-1 ist GM-CSF als anti-atherogenes Zytokin beschrieben. Es reduziert LDL-Plasmalevel [ISHIBASHI et al. 1996] und verringert die atherosklerotische Plauefläche in hyperlipidämischen Watanabe-Kaninchen [SHINDO et al. 1999]. An sonstigen Nebenwirkungen sind vor allem Knochenschmerzen während der Therapie und sehr selten anaphylaktische Reaktionen relevant. Vom Nebenwirkungsprofil ist GM-CSF also ein geeigneter Kandidat für die klinische Erprobung.

GM-CSF zeigte jedoch in tierexperimentellen Studien im Kaninchen eine entscheidende Einschränkung, die es auch mit MCP-1 gemein hat: Die anscheinend fehlende Wirksamkeit bei chronischem Gefäßverschluss. Wartet man nach Ligatur der A. femoralis für 3 Wochen bis zum Beginn der Therapie, so zeigt die anschließende intraarterielle Infusion von GM-CSF keinen signifikanten Unterschied zum Spontanverlauf [BUSCHMANN et al. 2001]. Diese Ergebnisse und die Arbeit von HÖFER et al. [2001] zeigen, dass für die wirksame pharmakologische Therapie nach Gefäßverschluss anscheinend nur ein begrenztes Zeitfenster existiert.

Eine mögliche Ursache für diese Beobachtung ist die potentielle Herabregulierung der relevanten Zytokin-Rezeptoren mit der Abnahme des induzierenden Scherstresses oder gar durch die andauernde Substanzwirkung selbst. Für zahlreiche Pharmaka ist ein solcher rapider Wirkungsverlust bei kontinuierlicher Applikation (Tachyphylaxie) bekannt, darunter sind auch gefäßwirksame Substanzen wie Nitrate. Für sympathomimetische β -Rezeptor-Agonisten wie Fenoterol ist die intermittierende intravenöse Gabe in kurzen Intervallen zur Tokolyse tägliche Praxis auf jeder obstetrischen Klinikstation. Spezielle programmierbare Infusionssysteme stehen hierfür zur Verfügung.

Auch für den GM-CSF-Rezeptor ist eine Liganden-abhängige Verminderung der Anzahl Membran-ständiger Rezeptoren beschrieben. Auf menschlichen Monozyten, neutrophilen Granulozyten und auch myeloischen Vorläuferzellen induziert GM-CSF die durch Endozytose vermittelte Internalisierung seines Rezeptors [CANNISTRA et al. 1990]. Neben GM-CSF vermochten in biologisch relevanten Konzentrationen auch Formyl-Met-Leu-Phe und TNF- α diesen Effekt zu erzielen, wobei für letztere Substanz auch eine essentielle

Beteiligung an der Arteriogenese beschrieben ist [HOEFER et al. 2002]. Die Signaltransduktionskaskaden dieser negativen Regulation der Rezeptorpräsentation durch GM-CSF ist noch nicht vollständig geklärt. Da sich der Prozess durch Pertussistoxin teilweise inhibieren lässt, wird eine G-Protein-vermittelte Signaltransduktion angenommen [FAN et al. 1993]. BRIZZI et al. [1991] postulieren sowohl einen PKC-vermittelten, als auch einen von Phosphorylierung unabhängigen Regulationsmechanismus.

Stenosierende Gefäßerkrankungen sind in den allermeisten Fällen chronische Prozesse, bei denen ein signifikantes (wenn auch insuffizientes) Kollateralarterienwachstum zu Therapiebeginn schon stattgefunden hat. Das Vorhandensein der spezifischen Rezeptoren zum Zeitpunkt der pharmakologischen Therapie ist von entscheidender Bedeutung. Ebenso wichtig ist, dass die Rezeptordichte nicht durch überdosierte Stimulation weiter verringert wird [VALETTE et al. 1967].

In aktuellen Übersichtsarbeiten zur Arteriogeneseforschung werden mehrere Möglichkeiten genannt, diesem Problem zu begegnen [BUSCHMANN et al. 2003b]. Eines ist die Kombination verschiedener Substanzen mit synergistischem Wirkeffekt, wie dies für MCP-1 und GM-CSF schon demonstriert werden konnte.

Ebenso wichtig ist der Therapiemodus, bezogen auf Applikationsweg (i.a., i.v., s.c., p.o.), Dosierung und Intervall [VAN ROYEN et al. 2001]. Besonders durch intermittierende lokale Infusion in kurzen Zeitabständen könnte die Therapieeffizienz durch verringerte Tachyphylaxie gesteigert werden. Als sekundärer Endpunkt soll diese Frage auch in der vorliegenden Studie untersucht werden.

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Zielvorstellung

Durch Applikation pharmakologischer Substanzen lässt sich in verschiedenen präklinischen Tiermodellen das Wachstum von Kollateralarterien zu Blutversorgung von minder-perfundiertem Gewebe signifikant stimulieren. Dieser Ansatz stellt eine vielversprechende zukünftige Therapieoption für Patienten mit arterieller Verschlusskrankheit dar, die für ein interventionelles oder chirurgisches Vorgehen nicht in Frage kommen. Der Granulocyte-Monocyte-Colony-Stimulating-Factor (GM-CSF) ist eine der bestuntersuchten Substanzen mit pro-arteriogener Wirkung. In verschiedenen Kleintiermodellen vermochte er den Spontanverlauf der Arteriogenese zu beschleunigen. Zur Anwendung in der klinischen Praxis fehlen jedoch Erkenntnisse über die Wirkung in Großtieren, die dem Mensch an Körpermasse vergleichbar sind. Während präexistente Arteriolen in großen und kleinen Säugetieren eine vergleichbare Größe besitzen, ist zum Erreichen eines suffizienten Enddurchmessers im Großtier und im Menschen eine erheblich größere Proliferationsaktivität vonnöten.

Neben der Substanz selbst ist auch die Applikationsroute von entscheidender Bedeutung. Bisherige Arbeiten im Kaninchen und der Maus konnten zeigen, dass durch die kontinuierliche intraarterielle Applikation der pro-arteriogene Effekt verschiedener Substanzen (MCP-1, TGF- β) am deutlichsten wirksam wird. Hierbei besteht jedoch wiederum die Gefahr eines Wirkungsverlustes durch tachyphylaktische Herunterregulierung der Rezeptormoleküle. Dieser Effekt lässt sich möglicherweise durch die intermittierende Applikation vermeiden und so eine starke arterielle Wachstumsförderung erzielen.

Diese Studie hat sich deshalb folgende Ziele gesetzt:

- I Die bekannte pro-arteriogene Effektivität von GM-CSF im Kleintiermodell war erstmalig auch im Großtiermodell des Schweinehinterlaufs zu verifizieren.

- II Vor einer möglichen klinischen Anwendung zur Therapie der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit im Menschen sollte das Ausmaß der Stimulation des Kollateralarterienwachstums im Schwein mit Goldstandardmethoden valide quantifiziert werden.

- III Neben invasiven tierexperimentellen Messmethoden sollten klinisch übliche diagnostische Verfahren erprobt werden. Diese Parameter sollten hinsichtlich ihrer Korrelation mit den invasiven Konduktanzmessungen untersucht werden.
- IV Implantierbare Infusionspumpen zur kontinuierlichen intraarteriellen Applikation sollten hinsichtlich ihrer potentiellen Verwendbarkeit für zukünftige Studien bewertet werden.
- V Die pulsatile intraarterielle Infusion über programmierbare Infusionspumpen sollte bezüglich einer potentiellen Steigerung des pro-arteriogenen Effekts mit der kontinuierlichen Applikation verglichen werden.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Die Untersuchungen werden an 24 klinisch gesunden Schweinen beiderlei Geschlechts (Deutsche Landrasse, Fa. Rein) durchgeführt. Die Schweine stammen aus einem staatlich anerkannten Zuchtbetrieb mit Gruppenhaltung auf Vollspaltenböden.

Die Tiere wiegen 75 ± 3 kg und werden zur Eingewöhnung jeweils ca. eine Woche vor der Operation eingestallt. Der Keimstatus der Tiere ist nicht spezifiziert. Die hygienischen Schutzvorkehrungen entsprechen denen einer offenen Haltung.

Die Haltung erfolgt in Einzelboxen auf einstreulosen, planbefestigten Kunststoffspaltboden mit einer Größe von ca. 6m^2 . Die Boxen sind so konzipiert, dass die Tiere Sicht- und Geruchskontakt zu Artgenossen haben. Das Stallklima wird durch Zwangsbelüftung geregelt. Die Raumtemperatur beträgt $18\text{-}20^\circ\text{C}$, die relative Luftfeuchtigkeit liegt bei ca. $60\% \pm 5$.

Beleuchtet werden die Boxen mit maximal 300 Lux im geregelten Tag-Nacht-Rhythmus (zwölfstündiger Hell-Dunkelrhythmus).

Bei Einnistung wird eine Allgemeinuntersuchung durchgeführt, um die Gesundheit und Eignung der Tiere für den Versuch zu überprüfen.

Die Fütterung erfolgt einmal täglich (TREFF- Haltungsfutter eiweißarm, Firma Hausladen, Heimstetten).

Die Aufstallung der Tiere erfolgt in der Zentralen Klinischen Forschung in Freiburg, Operationen und Angiographien werden in den Operationsräumen des Neurozentrums Freiburg durchgeführt.

Das tierexperimentelle Vorgehen entspricht den Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes und ist von der zuständigen Ethikkommission, dem Regierungspräsidium Freiburg dem Tierschutzbeauftragten der Universität Freiburg, genehmigt und entsprach den Vorschriften des Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (veröffentlicht von US National Institutes of Health, Publication No. 85-23, 1996).

3.2.2 Versuchsplan

Für die vorliegende Untersuchung werden die Schweine auf drei Gruppen randomisiert verteilt, alle Tiere werden den gleichen operativen Eingriffen unterzogen.

Gruppe k-NaCl: kontinuierliche Applikation von 0,9% Natriumchlorid über eine Medikamentenpumpe über einem Zeitraum von 1 Woche (n=8)

Gruppe k-GM-CSF: kontinuierliche Applikation von GM-CSF (5µg/kg/d) über eine Medikamentenpumpe über einem Zeitraum von 1 Woche (n=8)

Gruppe i-GM-CSF: intermittierende Applikation von GM-CSF (5µg/kg/d; 1h Infusion, 7h Pause, 3Zyklen/d) über eine Medikamentenpumpe über einem Zeitraum von 1 Woche (n=8)

3.2.3 Prämedikation und Operationsvorbereitung

Nach 24-stündiger Nahrungskarenz und Wasser ad libitum erfolgt die Narkoseeinleitung durch gluteale, intramuskuläre Injektion von 0,2 mg/kg Flunitrazepam und 10 bis 20mg/kg Ketamin. Diese Analgosedierung ermöglicht die Anlage eines venösen Zuganges in die Vena auricularis lateralis; über welche nach Präoxigenierung mit Sauerstoff über 5 Liter pro Minute eine Bolusapplikation von 0,05mg Fentanyl und 2 bis 4 mg/kg KG Propofol erfolgt.

Unter laryngoskopischer Kontrolle wird ein Endotrachealtubus (Magill-Tubus: 8,0-8,5 ID) mit Niederdruckcuff eingeführt. Nach erfolgreicher intratrachealer Platzierung erhalten die Tiere 0,05 mg/kg KG Vecuroniumbromid i. v., sowie bei Bedarf 2 bis 3 mg/kg Propofol. Im Anschluss an die Intubation wird das Operationsgebiet und die zur Ableitung eines Dreikanal-Elektrokardiogramms benötigten Körperregionen rasiert und bei erfolgter suffizienter Relaxation eine Magensonde gelegt.

Während des Transportes zwischen den Tierställen der Abteilung für Chirurgische Forschung und dem Tier OP werden die Tiere manuell beatmet und pulsoxymetrisch überwacht.

Im experimentellen Tier OP werden die Tiere auf den mit einer Wärmematte bedeckten OP Tisch gelegt und in Rückenlage fixiert, der Endotrachealtubus wird an das Beatmungsgerät (Servo 900 C®) angeschlossen und die zur Aufrechterhaltung der Narkose notwendigen Spritzenpumpen (Perfusoren®) sowie ein Infusionspumpe (Infosomat®) für die Trägerlösung mit dem venösen Zugang in der Ohrvene konnektiert. Vor dem Abdecken der Tiere mit sterilen Tüchern werden die EKG-Elektroden (nach Goldberger) an den adäquaten Stellen aufgeklebt und das OP Feld mit Desinfektionsmittel (Betaisadonna®) abgewaschen. Als Hornhautschutz wird Bepanthenaugensalbe auf das Auge aufgebracht. Als Infektionsprophylaxe erhalten die Tiere vor der Operation 3ml/50 kg KG Penicillin-Streptomycin (Tardomyocel®) i.m..

3.2.4 Narkoseführung und Narkoseüberwachung

Die Tiere werden mit einem halb-offenen Beatmungssystem, einem Atemzugvolumen von 10 bis 15ml/kg KG und einer Frequenz von 12 bis 15 Atemzüge pro Minute kontrolliert beatmet. Um dies zu ermöglichen, erfolgt die Einstellung einer ausreichenden Narkosetiefe durch eine Total Intravenöse Anästhesie (TIVA). Es wird bewusst auf eine Inhalationsnarkose verzichtet, um das Risiko einer malignen Hyperthermie auszuschalten. Die Medikamente der TIVA werden über Spritzenpumpen (Perfusoren®) kontinuierlich verabreicht. Die Menge richtet sich nach Standarddosierungen (Tab.1), wobei diese individuell der Narkosetiefe angepasst werden. Für die klinische Beurteilung der Narkosetiefe wird Herzfrequenz, Beatmungsdruck und Reflexstatus herangezogen.

<i>Medikament</i>	<i>Dosierung</i>
Fentanyl	0,015mg/kg KG/h
Propofol	4-6mg/kg KG/h
Vecuroniumbromid	0,04mg/kg KG/h
Sterofundin als Trägerlösung	5-10ml/kg KG/h
Lachgas zur Supplementierung der Analgesie und Einsparung von Opioiden	FiN ₂ O=0,6 FiO ₂ =0,4

Tab.1: Richtdosierungen der Medikamente der TIVA

Die apparative Narkoseüberwachung wird über folgende Untersuchungsmethoden sichergestellt und die Anästhesie individuell angepasst.

- 3 Kanal EKG
- Kapnometrie
- Pulsoxymetrie
- Beatmungsdruck und Beatmungsvolumina
- Kontinuierliche invasive Blutdruckmessung (Arteria mediana)
- Arterielle Blutgasanalyse (BGA)

Alle Werte werden in den normal physiologischen Grenzen durch individuelle Anpassung der Anästhesie gehalten.

3.2.5 Ausleitung der Narkose

Die Ausleitung der Narkose erfolgt im OP-Saal. Da eine Maskenbeatmung der Schweine nicht durchführbar ist, ist es für eine sichere Ausleitung der Narkose essentiell, die Tiere in respiratorisch und reflektorisch stabilem Zustand zu extubieren. Dadurch können sicher postanästhesiologische Komplikationen wie Atemdepression durch Opioid- oder Relaxantienüberhang vermieden werden. Das Entwöhnen (weaning) des Schweines von der kontrollierten Beatmung erfolgt in Bauchlage mit dem SIMV-Modus (spontaneous intermediate mandatory ventilation) bzw. zu einem späteren Zeitpunkt bei regelmäßigen und suffizienten Atemzügen mit dem CPAP-Modus (continuous positiv airway pressure). Vervollständig wird das „weaning“ bei Spontanatmung und noch intubiertem Tier mit sukzessiver Reduzierung von Sauerstoff unter Benützung des „Querflöten-Prinzips“.

Die pharyngealen Schutzreflexe, ein durch Provokation (intratracheales Absaugen) auslösbarer Hustenreflex und ein deutlicher Tonus der Kiefermuskulatur sind Zeichen für die sichere Extubation, die unter Absaugung durchgeführt wird. Das Schwein wird weiterhin mit EKG und Pulsoxymetrie überwacht und gegebenenfalls Sauerstoff insuffliert, bis ein klinisch stabiler Zustand den Transport in den Tierstall ermöglicht.

3.2.6 Postoperative Versorgung der Versuchstiere

Zur postoperativen Analgesie erhalten die Tiere eine Kombination aus einem Gramm Metamizol (Novalgin®) über eine Kurzinfusion i. v., sowie aus der Gabe von 0,005 bis 0,01 mg/kg KG Buprenorphin (Temgesic®) i. m. Bei Bedarf erhalten die Tiere an den ersten postoperativen Tagen Buprenorphin verabreicht.

Die Tiere werden post operationem auf Allgemeinbefinden, Futteraufnahme, Kot- und Harnabsatz, sowie auf Wundschwellung untersucht, ggf. erfolgt Wundbehandlung.

3.2.7 Erste Operation

Nach Desinfektion und sterilem Abdecken des Operationsfeldes erfolgt ein ca. 8 cm langer Hautschnitt im rechten Schenkelspalt. Nach Aufsuchen des M. pectineus, des M. vastus medialis, sowie des M. rectus femoris erfolgt die vorsichtige Präparation der A. femoralis und der A. circumflexa femoris lateralis.

Die A. circumflexa femoris lateralis wird an ihrer Abzweigung aus der A. femoralis ligiert. Die A. femoralis wird distal der A. circumflexa femoris lateralis ligiert. Proximal der Ligatur der A. femoralis wird das Gefäß angeschlungen und nach einer kleinen Inzision ein Katheter (Vascular Catheter, Medtronic®) in den proximalen Stumpf des Gefäßes implantiert.

Zeitgleich wird für die subkutane Implantation der programmierbaren Medikamentenpumpe am rechten Unterbauch ein ca. 5cm langer Hautschnitt senkrecht zur Medianen vorgenommen. Durch stumpfes, vorsichtiges Ablösen wird der M. cutaneus trunci vom darunter liegenden M. obliquus externus getrennt und eine ca. 7 auf 7cm große Hauttasche präpariert. Vor Implantation des Katheters in die A. femoralis wird der Katheter mit Hilfe einer Klemme subkutan in Richtung des Gefäßes getunnelt.

Nach Säuberung der Wundhöhle erfolgt der Wundverschluss mit resorbierbarem Nahtmaterial (Muskulatur Vicryl CP-1®, Subkutan und Intrakutan Vicryl FSL 3/0®). Anschließend wird die Wunde mit einer antiseptischen Salbe (Braunovidonsalbe®), sowie mit einem sterilen Wundverband versehen.

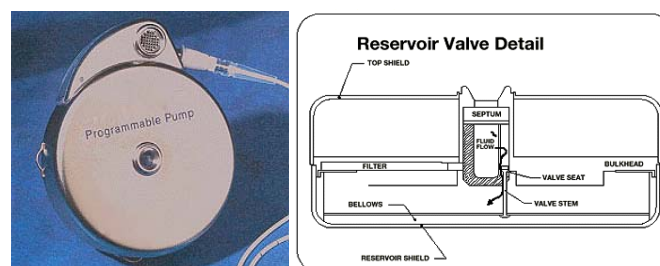


Abb. 4: SynchroMed EL programmierbare Medikamentenpumpen



Abb. 5: Das Programmiergerät stellt eine Zweiwege-Hochfrequenzverbindung mit der implantierten Pumpe her, sendet Abfrage- und Programmiersignale an die Pumpe und erhält von dieser Statusinformationen zurück.(Telemetrie).

3.2.8 Zweite Operation

Nach einem Beobachtungszeitraum von einer Woche erfolgt die zweite Operation der Tiere . Nach Fixation der Tiere in Rückenlage auf dem Operationstisch, Desinfektion und steriler Abdeckung des Operationsfeldes wird zum Eröffnen des Abdomens in der Medianen zwischen Xyphoid und dem letzten Zitzenpaar, ein Hautschnitt angelegt. In gleicher Länge werden die Fascia trunci superficialis, lockeres Bindegewebe und das Fett durchtrennt, mobilisiert und mit der Haut gespreizt. Nach Darstellung der Linea alba wird die Fascia trunci profunda zusammen mit dem äußeren Blatt der Rektusscheide gefasst, etwas angehoben und die Bauchhöhle in der Linea alba geöffnet. Zur besseren Übersicht und zur Schonung des Darmes kann dieser in ein steriles Tuch eingeschlagen, anschließend vorsichtig nach kranial verlagert werden

Nach Katheterisierung der Blase erfolgt die vorsichtige Präparation und Mobilisation der Aorta abdominalis auf einer Länge von ca. 15cm. In Höhe der A. renalis wird die Aorta abdominalis mit drei Ligaturen umschlungen, ca. sechs Zentimeter cranial des Abganges der A. mesenterica caudalis wird die Aorta abdominalis ebenfalls mit drei Ligaturen umschlungen. Im Anschluss daran wird die A. mesenterica caudalis präpariert, angeschlossen und ein Katheter zur Druckmessung implantiert (perf).

Nach Einbringen des Katheters erhält das Tier 10.000 I.E. Heparin (Liquemin 5000®) i. v..

Im Anschluss daran werden die Aa. iliacae externae präpariert und Ultraschallflussonden (4RR/ 4RR; Transonic®) um die Gefäße gelegt.

Für die Messung der distalen Drücke werden sowohl an der rechten wie auch an der linken Hintergliedmaße die Rami caudales der Aa. saphenae präpariert und mit einem Katheter kanüliert.

Vor Implantation der externen Pumpe erfolgt die Durchführung von Hyperämiemessungen. Hierfür wird die Aorta abdominalis auf Höhe des Abganges der A. renalis für eine Minute mit Hilfe einer atraumatischen Klemme abgeklemmt. Nach Öffnen der Klemme werden sowohl die Flüsse (Aa. iliacae externae), wie auch die Drücke (distaler Druck in den Rr. caudales der Aa. saphenae, der p perf in der A. mesenterica caudalis, sowie der systemische Blutdruck (p sys) Präokklusion, in der A. radialis) unter reaktiver Hyperämie gemessen.

Diese Hyperämiemessungen werden insgesamt dreimal durchgeführt. Zwischen den einzelnen Messungen befindet sich eine Erholungsphase von fünf Minuten, um die weiteren Messungen unter Ausgangsbedingungen durchführen zu können.

Nach Abschluss der Hyperämiemessungen wird die externe Roller – Pumpe (konstanter Fluss unter max. Vasodilatation) in die Aorta abdominalis unter Schonung der Vena cava caudalis implantiert. Vor Implantation erhält das Tier nochmals 25.000 I.E. Heparin i. v., sowie 1mg/kg KG /min Adenosin über das pumpenbetriebene Shuntsystem.

Für die anschließenden Messungen wird die externe Pumpe um jeweils 25 Umdrehungen/min Durchfluss gesteigert, beginnend bei einem Ausgangswert von 50 steigend auf einen Höchstwert von 250, dann wieder absinkend auf den Ausgangswert von 50.

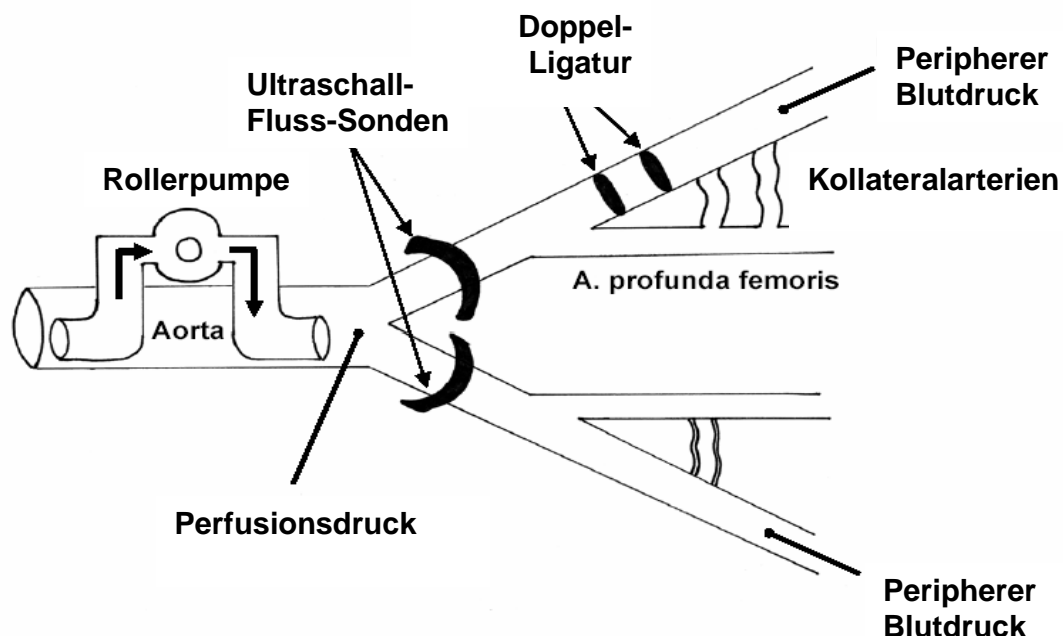


Abb.6: Schematischer Versuchsaufbau

Nach Abschluss der Messungen wird das Tier mit einer intravenösen Kaliumgabe euthanasiert.

3.3 Messparameter

3.3.1 Bildgebende Parameter

Zur Durchführung der angiographischen Darstellung wird in die rechte A. iliaca externa ein Katheter implantiert. Über diesen erfolgt die druckkontrollierte Applikation des Bariumkontrastmittels (100ml Aqua dest., 60g Bariumsulfat, 12g Gelatine). Direkt im Anschluss daran wird eine Angiographie durchgeführt (Philips Optimus®; 55kV; 6,3mAS (20,8ms)).

3.3.2 Gemessene Parameter

Druckmessungen wurden an folgenden Gefäßen durchgeführt:

- A. radialis: im Folgenden wird dieser Druck als p systemisch (p sys) bezeichnet, er gibt den systemischen Blutdruck des Tieres wider
- In der A. mesenterica caudalis erfolgt die Druckmessung des im Folgenden genannten p perfusion (p perf). Dieser Wert ergibt sich aus dem Druck der durch die extern implantierte Rollerpumpe erzeugt wird.
- Rr. caudales der Aa. saphenae die Drücke dieser Gefäße werden im Weiteren als p peripher (p per) bezeichnet.

Flussmessungen der Aa. iliacae externae erfolgen mit Hilfe von Ultraschall-Flusssonden (Transonic ®)

Die Aufzeichnung aller Messungen (Druck- und Flussmessungen) erfolgt durch ein Computerprogramm (Chart for Windows®).

Einbau einer externen Rollerpumpe zur konstanten Messung der Flüsse unter maximaler Vasodilatation. Die Pumpe kann mit unterschiedlichen Pumpraten gesteuert werden. In diesem Versuch steigt die Umdrehungszahl der Pumpe von einem Ausgangswert von 50 Umdrehungen pro Minute (U/min) auf 250 U/min, dann wieder absinkend auf 50 U/min. Die jeweiligen Umdrehungssteigerungen/ -senkungen werden für 90 Sekunden aufrechterhalten, alle Werte (Fluss- und Druckwerte) werden von einem Computerprogramm aufgezeichnet (Chart for Windows®; ADInstruments).

3.3.3 Berechnete Parameter

- Der Knöchel-Arm-Index (ankle brachial index, ABI) wird folgendermaßen berechnet:

$$\text{ABI} = \frac{p \text{ systemisch (A. radialis)}}{p \text{ peripher (A. saphena, R. caudalis)}}$$

- Die Konduktanz kann nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Konduktanz} = \frac{\Delta \text{ Fluss [ml/min]}}{\Delta \text{ Druckgradient (p perfusion - p peripher [mmHg])}}$$

Δ Fluss = Flussanstieg während der Messung

Δ Druckgradient = Anstieg des Druckgradienten während der Messung

Zur größeren Genauigkeit wird die Konduktanz nicht nur aus 2 Punkten bestimmt, wie die Formel impliziert, sondern aus der Steigung der Geraden, die aus den einzelnen Messpunkten resultiert.

3.4 Statistische Bewertung der Befunde

Alle Ergebnisse sind als Mittelwert plus/minus Standardabweichung angegeben. Vergleiche zwischen Mittelwerten werden mit ANOVA-Testung und Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgt mit einem computerisierten Statistikprogramm (SigmaStat Software®). P-Werte kleiner 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

3.5 Ergebnisse

3.5.1 Post-mortem Angiographien

Sieben Tage nach Ligatur der rechten Femoralarterie zeigt sich eine retrograde Kontrastmittelfüllung des verschlossenen Gefäßes distal der Ligatur über zahlreiche Kollateralarterien, die hauptsächlich aus der A. profunda femoris entspringen. Diese Umgehungsgefäße sind morphologisch typischerweise kornenzieherförmig.

Es zeigt sich unter der kontinuierlichen Behandlung mit GM-CSF eine Steigerung der Gefäßdicke und der Gefäßgröße entlang des Femurs und insbesondere dem Verlauf der A.

profunda femoris folgend mit der Mündung in die A. saphena. Ein ähnliches Resultat lässt sich ebenfalls unter der intermittierenden Behandlung beobachten.

Aufgrund der bereits erwähnten geringen Aussagekraft und der Tatsache, dass kleinste Änderungen im Gefäßdurchmesser auf Grundlage des Hagen-Poiseuillschen Gesetzes eine signifikante Steigerung des Blutflusses bewirken, wird die kollaterale Konduktanz unter maximaler Vasodilatation als funktioneller Parameter zusammen mit anderen auch klinisch verfügbaren Parametern erhoben.

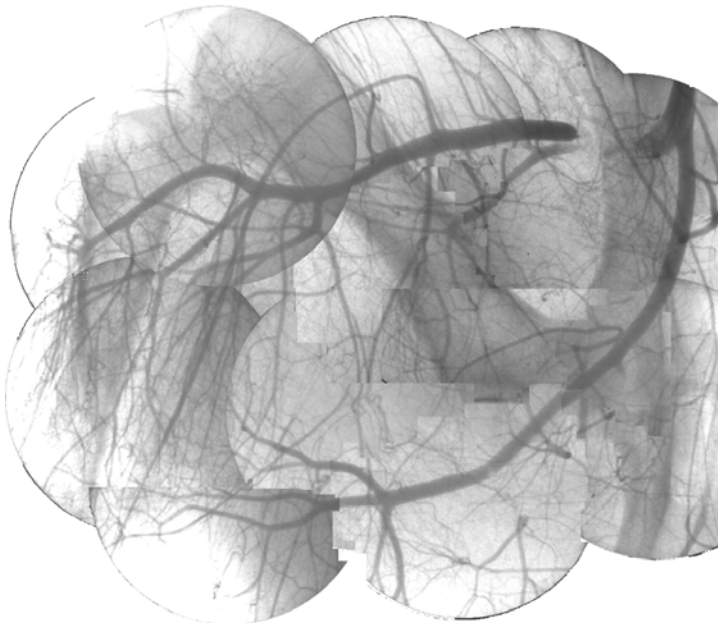


Abb. 7: Post-mortem Bariumangiographie des rechten Hinterlaufs 7d nach Femoralarterienligatur. A PBS behandeltes Kontrolltier

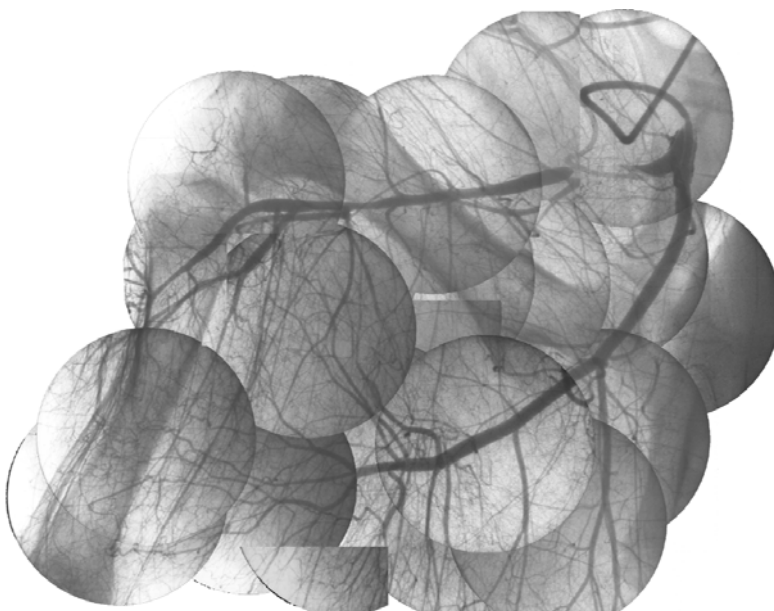


Abb. 8: Kontinuierliche GM-CSF Infusion, Zahl und Größe der Kollateralgefäße ist deutlich größer als in der Kontrollgruppe, im Vergleich zur intermittierenden GM-CSF Applikation ist kein Unterschied erkennbar.

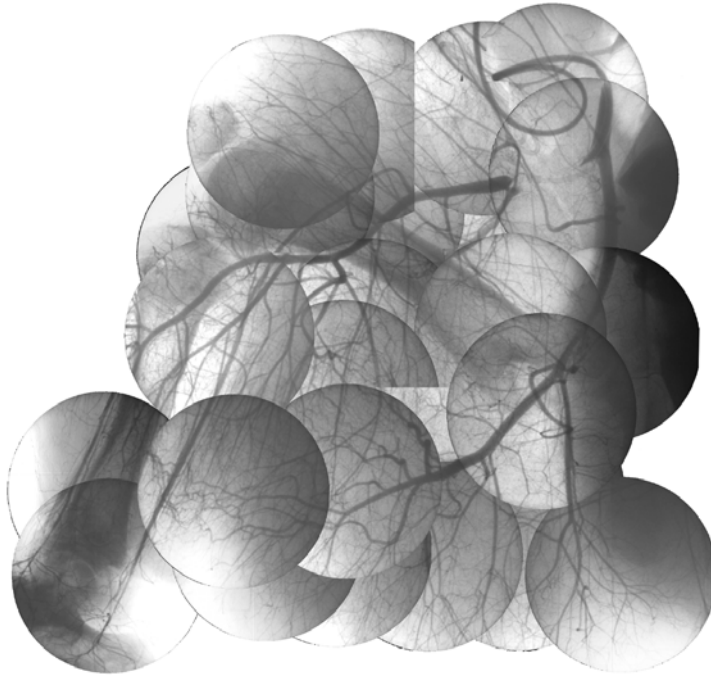


Abb. 9: intermittierende GM-CSF Infusion.

3.5.2 Knöchel-Arm-Index (ABI)

In vorliegenden Versuchen wird der Index aus dem Verhältnis des Druckes im R. caudalis der A. saphena (p per) und dem Druck in der A. radialis (p sys) berechnet. Es zeigt sich jedoch unter der Therapie mit GM-CSF kein statistisch signifikanter Anstieg im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kontrolle: $0,79 \pm 0,07$; GM-CSF kontinuierlich: $0,81 \pm 0,06$; GM-CSF intermittierend: $0,77 \pm 0,04$; p = nicht signifikant für alle Gruppen). Daten sind aus Tabelle 2 bis 5 zu entnehmen. Die graphische Darstellung dieser Daten ist in der Abbildung 10 ersichtlich.

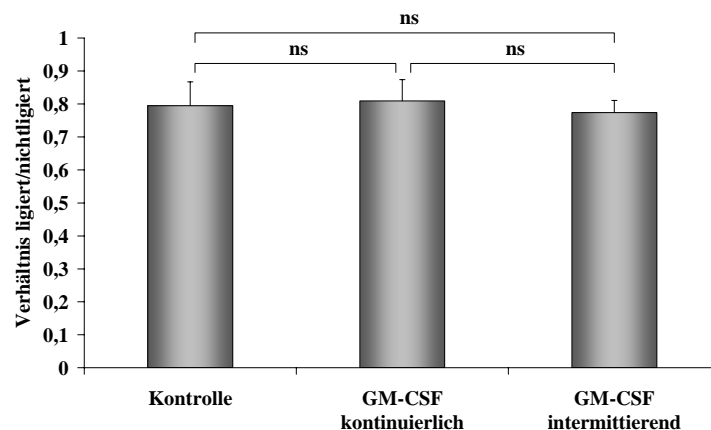


Abb. 10: Knöchel-Arm-Index: keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (ns = nicht signifikant)

3.5.3 Blutfluss unter Hyperämie

Für die Messungen unter Hyperämie wird der jeweils maximale Blutfluss während der Hyperämiephase herangezogen. Die Werte der Wiederholungsmessungen werden für jedes Tier gemittelt. Unter der Behandlung mit GM-CSF kommt es hier zu einem ca. 20%igen Anstieg des Flussverhältnisses im Vergleich zur Kontrolle, es lässt sich jedoch kein Unterschied zwischen kontinuierlicher und intermittierender Applikation des Faktors nachweisen (Kontrolle: $0,40 \pm 0,09$; GM-CSF kontinuierlich: $0,49 \pm 0,04$; GM-CSF intermittierend $0,49 \pm 0,04$ [Flussverhältnis A. iliaca externa rechts/links]; $p < 0,05$ GM-CSF vs. Kontrolle; $p =$ nicht signifikant für GM-CSF kontinuierlich vs. intermittierend). Die Ergebnisse dieser Messungen werden in den Tabellen 2 bis 5 wiedergegeben. Die Graphik 11 liefert eine vergleichende Darstellung.

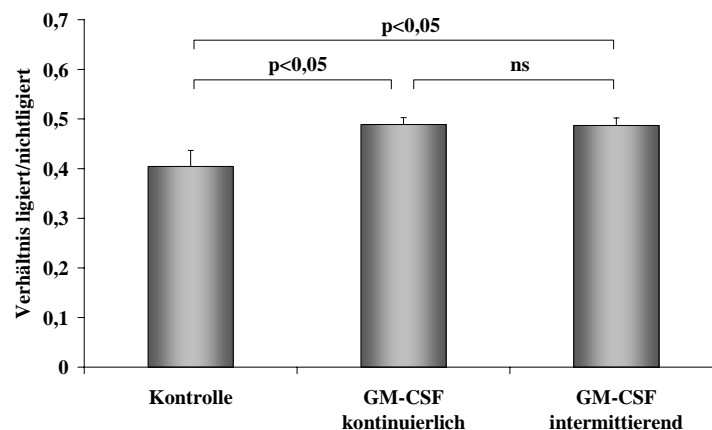


Abb. 11: Blutflussmessung unter Hyperämie: signifikante Steigerung des Blutflusses unter GM-CSF erkennbar, keine Signifikanz zwischen kontinuierlicher und intermittierender GM-CSF Applikation. (ns = nicht signifikant, $p < 0,05$ = signifikant)

3.5.4 Kollaterale Konduktanz

Die Ligatur der Femoralarterie im Hinterlauf des Schweines führt akut zu einer signifikanten Reduktion der Konduktanz, steigert sich jedoch in den folgenden Tagen auf ca. 11,2% der unverschlossenen Extremität bzw. Femoralarterie (Kontrolle: $37,72 \pm 5,42$ ml/min/100 mmHg). Die kontinuierliche Infusion von GM-CSF in den proximalen Stumpf der Femoralarterie führt zu einer signifikanten Erhöhung der Konduktanz und damit des Gefäßbettes im Vergleich zur reinen Ligatur und erreicht Werte von 20,5% des Kontrollbeines (GM-CSF kontinuierlich: $69,16 \pm 12,46$ ml/min/100mmHg; $p < 0,05$ vs. Kontrolle). Eine intermittierende Gabe des Faktors in gleicher Gesamtdosierung führt zu keinem weiteren signifikanten Anstieg

der Konduktanz im Vergleich zur kontinuierlichen Applikation (GM-CSF intermittierend: $71,50 \pm 11,08$ ml/min/100mmHg; $p < 0,05$ vs. Kontrolle). Die Tabellen 2 bis 5 beinhalten die Ergebnisse der Konduktanz, die Abbildung 12 die graphische Darstellung.

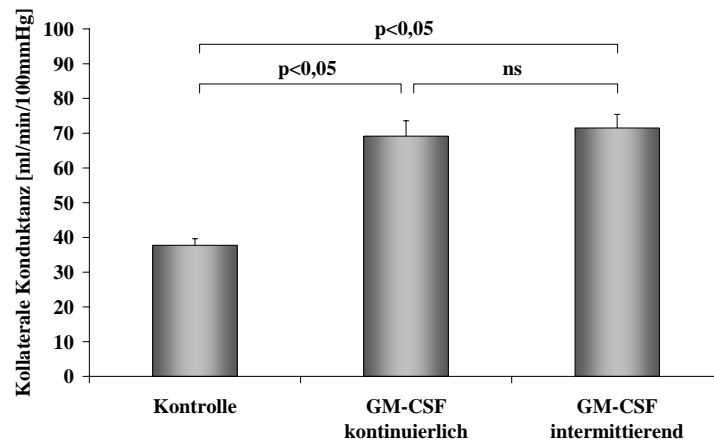


Abb. 12: Kollaterale Konduktanz: signifikante Steigerung der Konduktanz unter GM-CSF Einfluss, kein Unterschied zwischen kontinuierlich und intermittierend erkennbar. (ns = nicht signifikant, $p < 0,05$ = signifikant)

ABI (ance-brachial index)			Fluss in Hyperämie	Konduktanz
ligiert	nicht-ligiert	ligiert/nicht-ligiert	ligiert/nicht-ligiert	ligiert
0,68	0,74	0,92	0,4	47,09
0,66	0,81	0,81	0,24	38,72
0,77	0,91	0,85	0,5	29,15
0,72	0,92	0,78	0,33	35,37
0,69	0,88	0,78	0,46	40,8
0,61	0,86	0,71	0,52	41,03
0,71	0,83	0,86	0,39	34,42
0,74	0,97	0,76	0,39	35,19

Tab.2: Ergebnisse der Kontrollgruppe [ml/min/100mmHg]

ABI			Fluß in Hyperämie	Konduktanz
ligiert	nicht-ligiert	ligiert/nicht-ligiert	ligiert/nicht-ligiert	ligiert
0,72	0,93	0,77	0,45	65,59
0,71	0,87	0,82	0,45	76,27
0,7	0,89	0,79	0,51	47,68
0,73	0,9	0,81	0,47	67,69
0,64	0,9	0,71	0,52	79,22
0,74	0,96	0,77	0,45	59,75
0,69	0,87	0,79	0,52	88,39
0,69	0,94	0,73	0,54	68,72

Tab.3 : Ergebnisse der Gruppe mit kontinuierlicher Infusion von GM-CSF [ml/min/100mmHg]

ABI			Fluß in Hyperämie	Konduktanz
ligiert	nicht-ligiert	ligiert/nicht-ligiert	ligiert/nicht-ligiert	ligiert
0,67	0,92	0,73	0,47	69,43
0,7	0,93	0,75	0,49	64,07
0,65	0,84	0,77	0,43	87,5
0,77	0,89	0,87	0,51	84,12
0,62	0,73	0,85	0,54	63,61
0,78	0,86	0,91	0,54	76,13
0,7	0,89	0,79	0,47	54,21
0,6	0,86	0,7	0,44	72,95

Tab.4: Ergebnisse der Gruppe mit intermittierendem Pumpmodus [ml/min/100mmHg]

Gruppe	ABI			Fluß in Hyperämie	Konduktanz
	ligiert	nicht-ligiert	ligiert/nicht-ligiert	ligiert/nicht-ligiert	ligiert [ml/min/mmHg]
Kontrolle	0,70 ± 0,05	0,87 ± 0,07	0,81 ± 0,07	0,40 ± 0,09	37,7 ± 5,4
GM-CSF kontinuierlich	0,70 ± 0,03	0,91 ± 0,03	0,77 ± 0,04	0,49 ± 0,04	69,2 ± 12,5
GM-CSF intermittierend	0,69 ± 0,07	0,87 ± 0,06	0,80 ± 0,07	0,49 ± 0,04	71,5 ± 11,1

Tab.5: Zusammenfassung aller Ergebnisse [ml/min/100mmHg]

4 Diskussion

4.1 Untersuchungen im Schwein als Schritt zur klinischen Erprobung

Die meisten Erkenntnisse der Arteriogeneseforschung wurden in Studien an Mäusen und Kaninchen gewonnen. Während diese Spezies für die Grundlagenforschung u.a. durch die Verfügbarkeit von Knock-out-Tieren unverzichtbar sind [HOEFER 2003], reflektieren sie die Situation im Menschen jedoch nur ungenügend [VOSKUIL et al. 2003]. Während die präexistenten Anastomosen, aus denen sich die funktionellen Kollateralarterien entwickeln, sowohl in der Maus wie auch im Mensch dasselbe kleine Kaliber aufweisen, nimmt mit der Größe des Tieres die benötigte Endgröße des Kollateralgefäßes dramatisch zu. Schon nach wenigen Zellteilungen ist in kleinen Spezies ein funktioneller Durchmesser erreicht. Das Schwein hingegen repräsentiert mit seinen großlumigen maturierten Kollateralgefäßen am Besten die Situation im menschlichen Patienten und erlaubt als Tiermodell übertragbare Prognosen auf die Wirksamkeit im Menschen [BUSCHMANN et al. 2003c].

Die dem Menschen ähnliche Anatomie des porcinen Gefäßnetzes erlaubt die Erhebung valider Parameter des Kollateralarterienwachstums durch invasive Methoden. Gleichzeitig ist auch die Anwendung der klinisch üblichen diagnostischen Verfahren, besonders der angiographischen Bildgebung, gut durchführbar.

Die Nachteile des porcinen Großtiermodells sind wiederum teilweise ebenso durch die Größe bedingt: Die Verwendung von fluoreszierenden oder radioaktiven Mikrosphären als Goldstandardmethode der Blutflussmessung ist durch die erheblichen Kosten dieser Tracersubstanzen und einer Mindestanzahl von einzusetzenden Mikrosphären pro Gewebemasse nicht finanzierbar. Mit Ultraschall-Blutfluss-Sonden steht jedoch eine erprobte Alternative zur Verfügung [BUSCHMANN et al. 2003c].

Eine weitere Einschränkung besteht in der geringen Anzahl verfügbarer Antikörper und molekularbiologischer Methodik zur Anwendung im Schwein. Für die mechanistische Grundlagenforschung sind weiterhin Kleintiere wie Maus und Ratte besser geeignet. Das Schwein jedoch erlaubt die beste Extrapolation von hämodynamischen Messergebnissen auf die Situation im menschlichen Patienten.

4.2 Kollaterale Konduktanz: Verwendung von Ultraschall-Sonden zur Blutflussmessung

Die Perfusion und damit der arterielle Blutfluss wird im Wesentlichen von folgenden Faktoren bestimmt: Aufgrund des Hagen-Poiseuillschen Gesetzes ist der Einfluss-reichste Faktor der Gefäßradius, da er in die Berechnung des Blutflusses in der vierten Potenz eingeht. Weiterhin bestimmend für die Gewebsperfusion sind der Druckgradient bzw. der Blutdruck und der Gefäßtonus. Blutfluss in die Extremität und Druckgradient lassen sich messen und aufzeichnen, der Gefäßtonus lässt sich jedoch nur schwer bestimmen. Um unberechenbare Einflüsse dieses Faktors auf die Bestimmung der kollateralen Konduktanz auszuschließen, werden die hämodynamischen Messungen zur Berechnung der Konduktanz sämtlich unter maximaler Vasodilatation durchgeführt. Diese wird durch kontinuierliche Infusion von Adenosin (1mg/kg KG/min) erreicht und aufrechterhalten.

Als verlässlichster Parameter zur Beurteilung von Kollateralwachstumsprozessen dient die kollaterale Konduktanz. Sie berechnet sich aus dem Kehrwert des nach dem Ohmschen Gesetz bestimmten Widerstandes des kollateralen Gefäßsystems. Aus den gemessenen Parametern p_{sys} und p_{per} wird der Druckgradient über die Stenose bei den angelegten verschiedenen Pumpenumdrehungen berechnet und zu den entsprechenden Blutflusswerten in der A. iliaca externa in Relation gesetzt. Durch die verschiedenen Perfusionsstufen lassen sich somit mehrere Punkte gewinnen und aus der Steigung der daraus entstehenden Regressionsgeraden die kollaterale Konduktanz des untersuchten Hinterlaufs ablesen. Letztendlich lässt sich aus der kollateralen Konduktanz vorhersagen, um welchen Betrag der Blutfluss im kollateralen Gefäßbett ansteigt, wenn der Druckgradient über die Stenose um einen bestimmten Betrag erhöht wird. Daraus lassen sich somit verlässliche Aussagen über die Gesamt-Größe des kollateralen Netzwerkes treffen.

Die genaue Quantifizierung der kollateralen Versorgungskapazität verlangt den Einsatz aufwändiger Messmethoden. Die Verwertbarkeit von angiographischen Darstellungen zur quantitativen Beurteilung des Kollateralarterienwachstums wird in der Literatur oft zu Recht angezweifelt [FUCHS et al. 2001]. Klinische Parameter wie der ABI sind meist nicht sensitiv genug, um kleine Unterschiede im kollateralen Blutfluss zu detektieren. Die Berechnung der kollateralen Konduktanz aus invasiven Flussmessungen und der systemisch-peripheren Druckdifferenz stellt deshalb den besten verfügbaren Parameter zur Beurteilung eines Substanzeffektes dar und rechtfertigt den großen materiellen Aufwand [HOEFER et al. 2001].

Konduktanz als der Kehrwert des arteriellen Gefäßwiderstandes leitet sich direkt aus dem Ohmschen Gesetz und berechnet sich als Quotient aus Blutfluss und Druckdifferenz über den untersuchten Gefäßabschnitt.

$$\text{Konduktanz} = \frac{\Delta \text{Fluss} [\text{ml} / \text{min}]}{\Delta \text{Druckgradient} (p_{\text{prox}} - p_{\text{dist}}) [\text{mmHg}]}$$

In hämodynamischen Messungen bei mehreren Perfusionsdrücken lässt sich die Konduktanz als Steigung der Widerstandskurve der Druck-Fluss-Verhältnisse darstellen. Je steiler die Kurve verläuft, desto höher ist die Konduktanz des kollateralen Gefäßsystems.

Während sich die anliegende Druckdifferenz relativ einfach durch invasive Blutdruckmessung prä- und poststenotisch in der A. mesenterica caudalis und im R. caudalis der A. saphena ableiten lässt, stellt die genaue Blutflussmessung in jeder tierexperimentellen Anordnung eine schwierige Aufgabe dar. Ultraschall-Fluss-Sonden werden bei den extrem hohen Kosten von mikrosphärenbasierten Messungen in Großtieren als momentan beste Methodik akzeptiert.

Die verwendeten perivaskulären Ultraschallsonden bestehen aus zwei Transducern und einem fixierten Reflektor, die das Blutgefäß von zwei Seiten umfassen. Ein Transducer emittiert eine plane Ultraschallwelle, die den Blutstrom durchquert, vom Reflektor abprallt und durch das Blutgefäß den zweiten Transducer erreicht, der den Schall in ein elektrisches Signal umwandelt.

Wie die Geschwindigkeit eines Schwimmers durch einen Fluss unter anderem von der Wasserströmung abhängt, so wird auch die Zeit der Schallwelle durch das Blutgefäß von der Geschwindigkeit des Blutstroms bestimmt. Im Gegensatz zum Doppler-Prinzip ist das Signal dabei nicht vom Hämatokrit oder den Eigenschaften der Flüssigkeiten abhängig. Die Geschwindigkeit der Ultraschallwelle wird bei zweimaligem schrägem Durchtritt von dem Blutstrom erst beschleunigt, dann abgebremst. Die Differenz aus Durchtrittsgeschwindigkeiten stromaufwärts und stromabwärts repräsentiert echten Volumenfluss.

Damit ist die Berechnung der kollateralen Konduktanz als validestem Parameter der Arteriogenese aus Blutfluss und Druckdifferenz möglich und ein direkter Rückschluss auf einen eventuellen Therapieeffekt erlaubt.

4.3 Verwendbarkeit der implantierbaren Infusionspumpen

Die verwendeten implantierbaren Infusionspumpen sind in der Humanmedizin etablierte Applikationssysteme der Tumor- und Schmerztherapie. Je nach verwendetem Kathetersystem ist entweder die intrathekale oder epidurale Infusion von Opioiden möglich oder die chronische intravaskuläre Applikation von Zytostatika wie Doxorubicin, Cisplatin oder Methotrexat. In der vorliegenden Studie wurde die Verwendbarkeit zur intermittierenden Infusion gegenüber der kontinuierlichen Infusion des pro-arteriogenen Faktors GM-CSF evaluiert.

Die technische Durchführung der Implantation gestaltete sich wie beschrieben problemlos. Durch die komplett subkutane Lage des Infusionsystems wurde jede transkutane Ausleitung von Kathetersystemen vermieden. Dies stellt einen entscheidenden Vorteil gegenüber dem sonst üblichen Vorgehen in vergleichbaren tierexperimentellen Versuchsanordnungen dar, da sich das Tier frei und ungehindert bewegen kann. Gleichzeitig wird das Infektionsrisiko signifikant verringert. Bei den in dieser Studie eingesetzten 24 Pumpensystemen konnte keine Infektion der Wundtasche beobachtet werden. Lediglich bei drei der implantierten Pumpen war eine geringgradige Serombildung zu beobachten, welche problemlos abpunktiert werden konnte.

Die Funktion der Pumpen konnte durch telemetrische Ablesung von Förderrate und Restvolumen jederzeit am wachen Tier überprüft werden.

Nach Erschöpfung des Pumpenreservoirs von 18ml kann das System durch Punktion einer Portmembran aufgefüllt werden. Dieses war einmal pro Versuchszeitraum nötig und ließ sich in Kurznarkose (Dormicum und Ketamin) durchführen.

Alle Pumpsysteme hatten am Versuchsende das eingestellte Infusionsvolumen gefördert und die Katheter waren frei von Thromben. Auch intravasal löste der Katheter keine zum Zeitpunkt der Endoperation erkennbare Thrombenbildung aus.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das verwendete implantierbare Infusionssystem zur kontinuierlichen intraarteriellen Applikation von Wachstumsfaktoren in die Femoralarterie des Schweines geeignet ist. Es stellt damit eine zuverlässige und einfach durchführbare Methode für die zukünftige Evaluation weiterer Substanzen (TGF- β 1, MCP-1) dar.

Vor einem möglichen Einsatz dieses Systems im Indikationsbereich der pAVK-Therapie im menschlichen Patienten sind jedoch noch zahlreiche Fragen zu klären. Obwohl das System in der humanmedizinischen Therapie weit verbreitet eingesetzt wird, stellt die Implantation doch einen recht invasiven Eingriff dar. Besonders die mögliche thrombogene Wirkung ist bei Patienten mit chronischen Gefäßverengungen natürlich sehr kritisch zu betrachten. Bedingung

für einen möglichen Einsatz in der Humanmedizin ist auch, dass sichere Substanzen zu Verfügung stehen, deren therapeutischer Effekt bei intraarterieller Applikation deutlich stärker wirksam wird als bei weniger invasiver Zufuhr (wie z. B. intravenös oder subkutan). Letzteres trifft vor allem für das stark arteriogene MCP-1 zu, dessen klinischer Einsatz aber durch das mögliche Nebenwirkungsprofil sehr eingeschränkt erscheint.

4.4 Stimuliert GM-CSF das Kollateralarterienwachstum im Schweinehinterlauf?

GM-CSF wurde 2001 erstmals von BUSCHMANN et al. als pro-arteriogene Substanz beschrieben. Seine fördernde Wirkung auf das Kollateralarterienwachstum wurde bisher im Kaninchenhinterlauf und der zerebralen Zirkulation der Ratte nachgewiesen. Ergebnisse in Großtieren sind in der Literatur bisher noch nicht veröffentlicht. Da rekombinantes GM-CSF als Pharmakon in der hämato-onkologischen Therapie bereits zugelassen und verfügbar ist, wurde in einer kleinen Pilotstudie bereits ein positiver Effekt auf das Kollateralarterienwachstum im Koronarsystem von menschlichen Patienten gemeldet [SEILER et al. 2001].

Ob GM-CSF jedoch auch die Arteriogenese im peripheren Gefäßsystem von Großtieren zu beeinflussen vermag, blieb bisher offen.

Diese Frage wurde in der vorliegenden Studie sowohl mit hämodynamischen Messmethoden, radiologischer Bildgebung und klinisch ableitbaren Parametern wie dem ABI untersucht, wobei die aus Fluss- und Druckmessungen berechnete Konduktanz die primäre Endgröße darstellte.

Aufgrund der beschriebenen Validität dieser Methode im Schwein wurde die Aussagekraft der sekundären Parameter an den Ergebnissen der hämodynamischen Erhebungen gemessen.

4.4.1 Interpretation der Konduktanzmessungen

Sowohl die kontinuierliche als auch die intermittierende intraarterielle Infusion von GM-CSF vermochten eine signifikante Zunahme der kollateralen Konduktanz im Vergleich zur PBS-behandelten Kontrollgruppe zu induzieren. Wie bereits dargelegt, repräsentiert die hämodynamische Konduktanz direkt die Leitfähigkeit des Gefäßsystems, welche von dem mit Ultraschall bestimmten Blutstrom durchflossen wird. Da die Zunahme der Konduktanz eine Woche nach Femoralarterienligatur im Wesentlichen durch das adaptive arterielle Gefäßwachstum zustande kommt, lässt sich der Therapieeffekt der GM-CSF Applikation

glaubhaft beurteilen. Die vorliegenden Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen in der peripheren Zirkulation des Kaninchens und dem zerebrovaskulären System der Ratte überein. Sie zeigen als primärer Endpunkt, dass GM-CSF auch im großen Säugetierorganismus die Arteriogenese signifikant zu stimulieren vermag.

Im Gegensatz zu mikrosphärenbasierten Messungen in Kleintieren unterliegt die Blutflussmessung mit Ultraschallsonden einer gewissen Einschränkung: Durch die proximale Anlage des Messkopfes vor Abgang der kollateralen Gefäßstämme wird auch der Blutfluss zum Oberschenkel über reguläre Versorgungsgefäße erfasst, der nicht von der Kollateralisierung abhängig ist. Dadurch repräsentiert der Messwert nicht nur kollateralen Fluss, sondern auch die basale Blutversorgung des Oberschenkels. Der absolute Messwert liegt also in allen Versuchstieren systematisch zu hoch. Da jedoch relative Änderungen des Flusses im Wesentlichen durch das Ausmaß der Arteriogenese bestimmt werden und die Versorgung zum Oberschenkel in allen Versuchstieren vergleichbar ist, führt dies nur zu einem systemischen Fehler in allen Gruppen, der den Vergleich relativer Werte weiterhin erlaubt. Da das nicht ligierte, bzw. vor dem zweiten Messdurchgang akut ligierte Hinterbein als intrinsische Kontrolle dient, schränkt dieser systemische Fehler die Aussagekraft der Ergebnisse nicht ein.

Alle Perfusionsmessungen wurden sowohl unter reaktiver Hyperämie als auch bei pharmakologisch induzierter Vasodilatation durch Adenosininfusion ins Shuntsystem durchgeführt. Wie besonders die Arbeitsgruppe um SCHAPER [1999] zeigen konnte, erlauben nur Flussmessungen bei maximaler Vasodilatation einen Rückschluss auf adaptive Wachstumsprozesse. Messungen unter Ruhebedingungen hingegen sind vor allem durch neuromuskulären Gefäßtonus und endothelialer Tonusregulation bestimmt und geben zwar den aktuellen Blutfluss korrekt wieder, jedoch nicht die maximale Kapazität des kollateralen Gefäßsystems unter Stressbedingungen [SCHIRMER et al. 2004]. Bei der reaktiven Hyperämie kommt es aufgrund eines Durchblutungsstopps mit anschließender Reperfusion zu einer Mehrdurchblutung des Gewebes. Als metabolische Faktoren, die hierbei für die Vasodilatation sorgen, kommen z. B. in Betracht: Protonen, als Folge der vermehrten CO₂ Bildung, Laktatanreicherung durch Umschalten auf anaeroben Stoffwechsel, Adenosin das bei vermehrter ATP-Spaltung freigesetzt wird und Phosphat, das ebenfalls bei der vermehrten ATP-Spaltung anfällt. Die Freisetzung dieser metabolischen Faktoren führt außerdem zu einem Anstieg der Osmolalität im Gewebe, was zusätzlich vasodilatierend wirkt. Die reaktive Hyperämie kann durch verschiedene Faktoren, z. B. Medikamente beeinflusst werden, eine maximale Vasodilatation wird hingegen nicht erreicht.

In der vorliegenden Studie hat sich dabei die Verwendung von Adenosin den Messungen unter reaktiver Hyperämie als überlegen erwiesen. Wiederholte Messungen am selben Tier zeigten eine höhere Reliabilität der pharmakologischen Vasodilatation. Adenosin wird im Blut schnell von Erythrozyten aufgenommen und induzierte bei der intraarteriellen Applikation ins Shuntsystem keine kardialen atrioventrikulären Verzögerungen.

Zusammenfassend vermochte die intraarterielle Applikation von GM-CSF die Arteriogenese im Schweinehinterlauf, um signifikante Ausmaße zu stimulieren. Damit wurde erstmalig gezeigt, dass nicht nur das Wachstum kleinkalibriger Gefäße mit wenigen Schichten an glatter Gefäßmuskulatur in kleinen Säugetieren stimuliert werden kann, sondern auch die Proliferation von großlumigen Arterien zu beeinflussen ist. Ein möglicher therapeutischer Einsatz im Menschen erscheint unter diesen Gesichtspunkten möglich.

4.4.2 Interpretation der Ergebnisse der bildgebenden Verfahren

Die Morphologie des kollateralen Gefäßsystems war angiographisch gut darstellbar. Arterielle Gefäße in der typischen Korkenzieherformation entsprangen vor allem von der A. profunda femoris und der A. poplitea und gewannen poststenotisch im Bereich der A. genualis wieder Anschluss an das distale Gefäßnetz. Die typische Korkenzieherformation wird durch die starke Proliferation der Gefäße verursacht, die nicht nur zu einer Vergrößerung der Arterien im Durchmesser, sondern auch in der Länge zur Folge hat. Aufgrund des begrenzten Platzangebotes im Muskelgewebe kommt es dadurch zu einer Stauchung, die zu der Korkenzieher-artigen Form führt. Gefäße ab einem Durchmesser von 200µm konnten visualisiert werden. Obwohl Angiographien hinsichtlich ihrer funktionellen Relevanz nur begrenzt aussagekräftig sind, lassen sie jedoch einen ersten Schluss hinsichtlich der Gefäßwachstums-fördernden Potenz einzelner Substanzen zu.

Neben der klassischen Angiographie besteht die Möglichkeit, Gefäße mit Hilfe der Kernspinangiographie darzustellen. Die Nachteile der herkömmlichen Angiographie liegen zum einen in der hohen Strahlenbelastung, sowie in der Applikation eines jodhaltigen Kontrastmittels, welches neben Nierenfunktionseinschränkungen zu allergischen Reaktionen führen kann. Der Vorteil der Kernspinangiographie liegt darin, dass keinerlei Strahlenbelastung auftritt; außerdem kann ein Teil der Gefäßdarstellungen ohne Kontrastmittel durchgeführt werden; selbst wenn die Untersuchung eine Kontrastmittelgabe erforderlich macht, so enthält das Kontrastmittel kein Jod, sondern Gadolinium, das in der Regel sehr gut vertragen wird. Allergische Reaktionen sind sehr selten. Auch kommt es zu keinerlei

Beeinflussung der Nierenfunktion. Nachteil dieser Methode im Tierversuch sind neben hohen Kosten, die Durchführbarkeit im Klinikalltag.

Die durchgeführten bildgebenden Verfahren dienen vor allem zur morphologischen Darstellung des kollateralen Gefäßnetzes. In der Vergangenheit wurde oft versucht, ein angiographisches Bewertungssystem, bei dem sichtbaren Gefäßen nach Anzahl und Durchmesser ein Zahlenwert zugeordnet wurde, mit funktionellen Perfusionmessungen zu korrelieren. Dabei führten jedoch zwei Bedingungen zu großen Fehlschätzungen. Erstens ändert sich der Blutfluss durch ein rundes Kaliber mit der vierten Potenz des Radius, jede Fehlmessung des Gefäßdurchmessers geht also in der vierten Potenz in die Berechnung des Flusses ein. Zweitens entspricht eine hohe Anzahl von Kollateralgefäßen nicht notwendigerweise einer besseren Blutversorgung. Bei Darstellungen im zeitlichen Verlauf zeigt sich, dass anfangs ein dichtes Netz kleinlumiger Anastomosen rekrutiert wird, es jedoch mit der Zeit zu einer Regression kommt und nur wenige Gefäße zu funktionellen Kollateralarterien maturieren, während die größte Anzahl nicht mehr nachweisbar wird. Dieser Effekt wird nach dem Zurechtschneiden von wilden Trieben an Bäumen und Rebstöcken im Englischen „pruning“ genannt.

FUCHS et al. [2001] konnten anhand systematischer Untersuchungen am Koronarsystem des Schweines zeigen, dass angiographische Punktwertungen nicht mit mikrosphärenbasierten Perfusionmessungen korrelieren.

Während die Angiographie zur klinischen Darstellung des Gefäßverlaufs und von Stenosen und Gefäßverschlüssen unverzichtbar ist, ist sie zur Bewertung eines pro-arteriogenen Therapieeffekts überholt. Die durchgeführten bildgebenden Verfahren dienen in dieser Studie vor allem der Betrachtung des Aufbaus des kollateralen Gefäßsystems (Ursprünge bis Wiedereintritt) und garantierten, dass die Ergebnisse nicht durch unbeabsichtigte thrombotische Gefäßverschlüsse verfälscht werden. Zur Beurteilung der GM-CSF Wirkung auf die Arteriogenese wurden sie nur additiv zu funktionellen Messungen der kollateralen Konduktanz herangezogen.

4.4.3 Interpretation der klinisch erhobenen Parameter

Der Knöchel-Arm-Index (ankle-brachial-index; ABI) dient in der klinischen Medizin zur Verlaufsbeobachtung und Beurteilung des Behandlungserfolges bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit. Er berechnet sich aus dem Verhältnis vom Blutdruck im Bereich des Knöchels (z. B. A. dorsalis pedis) zum Blutdruck des Armes. Je höher der Wert umso besser die Durchblutung der unteren Extremität. Allerdings ist auch dieser Wert von geringerer Aussagekraft und zeigt nur bei massiven Veränderungen der Durchblutung (z. B. nach Rekanalisation) einen signifikanten Anstieg. Der normale ABI beträgt 1 bis 1,1. Dies bedeutet das der Blutdruck am Knöchel der gleiche oder höher ist als der Blutdruck am Arm und somit keine signifikanten Einengungen oder Okklusionen der Blutgefäße vorhanden sind. Werte unter 0,95 deutet auf eine signifikante Verengung eines oder mehrerer Blutgefäße hin, ab einem Wert unter 0,8 spricht man bereits von einer Claudicatio intermittens (mit deutlichen Symptomen nach Bewegung, wie Schmerzen im Fuß oder Bein). Bei einem Wert unter 0,4 beherrschen diese Symptome auch das Ruhebild. Werte unter 0,25 sind eindeutig auf eine pAVK zurück zu führen. Aufgrund der leichten Erhebbarkeit dieses Parameters findet er in der Klinik häufig Anwendung. In einer Studie von Voskoil et al. [2003] konnte nach Ligatur der A. femoralis gezeigt werden, dass der ABI auf 0,5 absinkt. Bereits nach einer Woche stieg der ABI auf 0,75. Da der ABI unter Ruhebedingungen gemessen wurde, können nur gravierende Unterschiede deutlich gemacht werden. Der Ruhefluss zwischen den Gruppen mit Therapie und ohne Therapie zeigt keine signifikanten Unterschiede, da der Ruhefluss maßgeblich vom Vasotonus beeinflusst wird. Durch den Vasotonus und den gleichen Ruhefluss erklärt sich der nicht signifikant veränderte ABI. Erst durch Ausschaltung des Vasotonus durch maximale Vasodilatation bekommt man objektive Werte für die Ausprägung des Gefäßwachstums. Die vergleichsweise geringen Änderungen nach Behandlung schlagen sich daher nicht in einer Änderung des unter Ruhe bestimmten ABI nieder. Der ABI eignet sich daher nicht zur Verifizierung des Kollateral-arterienwachstums.

4.4.4 Interpretation des Blutflusses unter Hyperämie

Die Messung des Blutflusses als Parameter zur Bestimmung des Behandlungserfolges einer pAVK unterliegt mehreren Einschränkungen und ist daher kein verlässlicher Wert. So ist der Gefäßtonus einer der entscheidenden Faktoren für den Ruheblutfluss und unterliegt selbst vielen weiteren Einflüssen. Generell ist die momentane Kreislaufsituation zu berücksichtigen, die unter Narkose selbstverständlich nicht mit der physiologischen Situation gleichzusetzen ist. Weiterhin führt eine Reihe von lokalen Faktoren zu einer Veränderung des Vasotonus und

beeinflusst somit den Ruhefluss. Frühere Experimente konnten zeigen, dass sich der Ruheblutfluss relativ schnell nach Femoralarterienokklusion wieder normalisiert, während Messungen unter Vasodilatation zum Ausschluss des Faktors Vasotonus eine weitaus langsamere Regeneration zeigen. Im Rahmen dieser Versuche wird der kollaterale Blutfluss anhand perivaskulärer Flusssonden unter reaktiver Hyperämie bestimmt. Dieses Vorgehen führt während der reaktiven Hyperämie zu einer Dilatation der Gefäße und somit zu einem verlässlichen Wert. Um zusätzlich den generellen Kreislaufstatus zu kompensieren werden die Werte als Verhältnis der verschlossenen Beinarterie gegen die der unverschlossenen Gegenseite berechnet, welches somit als interner Standard dient.

4.4.5 Vergleich der intermittierenden mit der kontinuierlichen GM-CSF Applikation.

Bei der Tachyphylaxie kommt es aufgrund eines negativen Feedbacks zu einer Abnahme von Rezeptoren für eine bestimmte Substanz. Dieser Vorgang ist für verschiedene Substanzen und Medikamente bekannt, wie z. B. Nitrate oder Ephedrin. Es kommt trotz Dosissteigerung zu einem Wirkverlust. Auch für endogene Wachstumsfaktoren ist bei exogener Applikation eine Tachyphylaxie beschrieben. In der vorliegenden Studie konnte jedoch keine verbesserte Wirksamkeit von intermittierender GM-CSF-Applikation nachgewiesen werden. Dies zeigt einerseits, dass eine signifikante Tachyphylaxie für die pro-arteriogene Wirkung des Zytokins nicht vorzuliegen scheint. Andererseits legen die Ergebnisse nahe, dass für die klinische Erprobung die evtl. einfacher durchzuführende intermittierende Anwendung ausreichend sein könnte.

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Studie konnte demonstriert werden, dass die Gabe von GM-CSF im Großtiermodell zu einer signifikanten Steigerung der kollateralen Konduktanz führt. Ein Unterschied zwischen kontinuierlicher und intermittierender Applikation konnte nicht nachgewiesen werden. SCHAPER et al. [1976] zeigten erstmals, dass die Situation der Kollateralgefäßversorgung beim Schwein der des Menschen sehr nahe kommt. Dies lässt eine Übertragung der gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen zu. So kann der Einsatz von GM-CSF bei der pAVK eine mögliche neue Therapieoption darstellen. Durch die Implantation

einer Medikamentenpumpe kann eine sichere intraarterielle Applikation gesichert werden, die bei der Arteriogenese von bedeutender Rolle ist.

In ersten klinischen Studien am Patienten konnte bereits eine positive Wirkung von GM-CSF auf das Kollateralarterienwachstum nachgewiesen werden. Ein möglicher nächster Schritt könnte der Einsatz der programmierbaren Medikamentenpumpen im Koronarsystem darstellen.

5 Zusammenfassung

Die Zahl der Patienten mit arteriellen Gefäßverschlüssen nimmt stetig zu. Eine Alternative zu invasiven Techniken stellt die Förderung des körpereigenen Kollateralwachstums (Arteriogenese) dar. Arteriogenese beschreibt die Entwicklung von großlumigen Kollateralarterien aus präexistenten arteriellen oder arteriolären Anastomosen, während Angiogenese die Neuentwicklung von kapillären Netzwerken beschreibt. Aufgrund des Hagen-Poiseuillschen Gesetzes bedarf es für den Ersatz von Arterien größerer Gefäße, die nicht durch Angiogenese entstehen können. Experimentell lässt sich das Wachstum von Kollateralarterien durch Granulozyten-Makrophagen-Kolonie Stimulierender Faktor (GM-CSF) fördern. Die Wirkung von GM-CSF auf die Arteriogenese in größeren Organismen ist jedoch noch unbekannt und soll in einem Schweinehinterlaufmodell überprüft werden.

Material und Methoden: Die rechte Femoralarterie von 24 Schweinen Deutscher Landrasse (n=8/Gruppe) wurde ligiert, kanüliert und an eine implantierte Pumpe angeschlossen. Die erste Gruppe erhielt 0,9%Natriumchloridlösung, in der zweiten Gruppe wurden die Tiere kontinuierlich mit GM-CSF 5 µg/kg/d behandelt, die Tiere der dritten Gruppe erhielten die selbe Tagesdosis in einem intermittierenden Applikationsmodus (1h Infusion, 7h Pause, 3Zyklen/d). Nach einwöchigem Behandlungszeitraum wurde die kollaterale Konduktanz bestimmt unter maximaler Vasodilatation sowie weitere klinische Parameter (ABI, Fluss unter Hyperämie, Angiographien) bestimmt.

Ergebnisse: Angiographisch und durch Bestimmung des ABI ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen. Funktionelle Untersuchungen zeigten jedoch, dass sowohl die kontinuierliche als auch die intermittierende Applikation von GM-CSF zu einer signifikanten Steigerung der reaktiven Hyperämie und der kollateralen Konduktanz im Vergleich zur Kontrollgruppe führte ([ml/min/mmHg] NaCl:37,73±5,42; GM-CSF kont.:69,16±12,46; GM-CSF interm.:71,50±11,08).

Schlussfolgerung: Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Wirksamkeit von GM-CSF als pro-arteriogene Substanz im Großtierorganismus. Die intermittierende Anwendung von GM-CSF führte zu keiner signifikanten Wirkungssteigerung im Vergleich zur kontinuierlichen Infusion. Eine tachyphylaktische Rezeptorregulation unter GM-CSF-Therapie in der Arteriogenese erscheint somit unwahrscheinlich. Der Einsatz von programmierbaren Infusionspumpen stellt eine mögliche Lösung für die intravasale Anwendung bei Menschen mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit dar

6. Summary

Programmable drug infusion pumps as delivery platform for stimulation of arteriogenesis with Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating-Factor (GM-CSF) in the porcine hind limb model

Objective: The group of patients suffering from arterial occlusive disease is still growing. Stimulation of collateral artery growth (arteriogenesis) serves as a potential alternative to invasive techniques. Arteriogenesis refers to the recruitment of pre-existing anastomoses and their growth towards functional collateral arteries. In contrast angiogenesis describes the development of new capillary networks. According to the law of Hagen-Poiseuille however, a main artery can only be replaced by larger vessels, which cannot be provided by angiogenic processes. In experimental settings, arteriogenesis can be stimulated by infusion of Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF). Whether this effect is preserved in larger species is not known yet and is objective of this study.

Methods and Results: Twenty-four German Landrace pigs underwent occlusion of the right femoral artery and were randomly assigned to three groups (n=8 per group). Eight animals received GM-CSF via the implantable pump device continuously over the whole observation period of seven days, another group of eight animals received GM-CSF in an intermittent fashion (one hour infusion, seven hours break, three cycles/ day). Both groups received a total of 5µg/kg GM-CSF/ day intra arterially. A third group received saline solution only. After the one week treatment period, flow under reactive hyperemia and collateral conductance was determined under maximal vasodilation. Conductance showed a significant stimulatory effect of GM-CSF on arteriogenesis (Collateral conductance (ml/min/mmHG): Saline: 37.73±5.42; GM-CSF cont.: 69.16±12.46; GM-CSF interm.: 71.50±11.08). Perfusion measurements under reactive hyperemia were consistent with these results (flow occluded/ non-occluded hind limb: Saline: 40.46±9.05%; GM-CSF cont.:48.89±3.94%; GM-CSF interm.:48.67±4.35%). Post-mortem angiography showed a well developed collateral arterial network. At this timepoint, seven days after femoral artery occlusion, there was no angiographically detectable difference between controls, continuous GM-CSF or intermittent GM-CSF application. Measurements of the ankle-brachial-index were not sufficient to detect the differences in collateral growth between the three treatment groups and showed no statistically significant differences (Saline: 80.93±6.44; GM-CSF cont.: 77.39±3.70; GM-CSF interm.:79.49±7.22).

Conclusion: GM-CSF significantly promotes arteriogenesis in large animal models. Intermittent infusion is of comparable efficacy as continuous application. Furthermore, we provide evidence that implantable pumps offer a reliable and safe mean of application for

intra-arterial delivery of growth factors and might therefore be used administration for potential future therapy strategies aiming at stimulating arteriogenesis upon vascular occlusion.

6 Literaturverzeichnis

BAURIEDEL G, SKOWASCH D, VAERST J, JABS A, ANDRIE R, LUDERITZ B. Association between progression of untreated coronary lesions and in-stent restenosis. *Dtsch Med Wochenschr.* 2002;2114-9.

BÖCKER W, DENK H, HEITZ P. Atherosklerose. In: Böcker WD, H Heitz,P, ed. *Pathologie*: Urban & Fischer Verlag; 2001.

BRIZZI MF, ARDUINO C, AVANZI GC, BUSSOLINO F, PEGORARO L. GM-CSF and phorbol esters modulate GM-CSF receptor expression by independent mechanisms. *J Cell Physiol.* 1991 Jul; 148:24-34.

BROWN MS, GOLDSTEIN JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem.* 1983;223-61.

BUJA LM, KITA T, GOLDSTEIN JL, WATANABE Y, BROWN MS. Cellular pathology of progressive atherosclerosis in the WHHL rabbit. An animal model of familial hypercholesterolemia Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Arteriosclerosis.* 1983;87-101.

BÜLTMANN BD, J. KC, ROESSNER A, SCHNEIDER J. *Kardiovaskuläres System.* München, Wien, Baltimore: Urban und Schwarzenberg; 2001.

BUSCH HJ, BODE C, SCHNEELOCH E, HOSSMANN KA, MIES G, BUSCHMANN I. Arteriogenesis in hypoperfused rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003;621-28.

BUSCHMANN I, ITO W, HOEFER I, SCHOLZ D, SCHAPER W. Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulation-Factor (GM-CSF) fördert das Kollateralarterienwachstum durch prolongierte Makrophagenaktivität. In: *Z Kardiol*; 1998;218 (abstr).

BUSCHMANN I, HOEFER IE, VAN ROYEN N, KATZER E, BRAUN-DULLEAUS R, HEIL M, KOSTIN S, BODE C, SCHAPER W. GM-CSF: a strong arteriogenic factor acting by amplification of monocyte function. *Atherosclerosis.* 2001;343-56.

BUSCHMANN I, BUSCH HJ, MIES G, HOSSMANN KA. Therapeutic induction of arteriogenesis in hypoperfused rat brain via granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Circulation.* 2003a;610-5.

BUSCHMANN I, HEIL M, JOST M, SCHAPER W. Influence of inflammatory cytokines on arteriogenesis. *Microcirculation.* 2003b;371-9.

BUSCHMANN I, VOSKUIL M, VAN ROYEN N, HOEFER IE, SCHEFFLER K, GRUNDMANN S, HENNING J, SCHAPER W, BODE C, PIEK JJ. Invasive and non-invasive evaluation of spontaneous arteriogenesis in a novel porcine model for peripheral arterial obstructive disease. *Atherosclerosis.* 2003c;33-43.

- CAI WJ, KOLTAI S, KOCSIS E, SCHOLZ D, KOSTIN S, LUO X, SCHAPER W, SCHAPER J. Remodeling of the adventitia during coronary arteriogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003:H31-40.
- CANNISTRA SA, GROSHEK P, GARLICK R, MILLER J, GRIFFIN JD. Regulation of surface expression of the granulocyte/macrophage colony-stimulating factor receptor in normal human myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990:93-7.
- CAPRIE-STEERING-COMMITTEE. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet*. 1996:1329-39.
- CARMELIET P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 2000:389-95.
- CLARK SC, KAMEN R. The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science*. 1987:1229-37.
- DEFESCHE J. World health organisation report on familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2001:242.
- DENECKER G, VANDENABEELE P, GROOTEN J, PENNING LC, DECLERCQ W, BEYAERT R, BUURMAN WA, FIERS W. Differential role of calcium in tumour necrosis factor-mediated apoptosis and secretion of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in a T cell hybridoma. *Cytokine*. 1997:631-8.
- EPSTEIN SE, KORNOWSKI R, FUCHS S, DVORAK HF. Angiogenesis therapy: amidst the hype, the neglected potential for serious side effects. *Circulation*. 2001:115-9.
- FAN K, BARENSEN N, SENSENBRENNER L, CHEN BD. Deregulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) receptor in murine macrophage cell line J774A.1. *J Cell Physiol*. 1993:535-42.
- FISHER M, SCHAEBITZ W. An overview of acute stroke therapy: past, present, and future. *Arch Intern Med*. 2000:3196-206.
- FOLKMAN J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*. 1995:27-31.
- FUCHS S, SHOU M, BAFFOUR R, EPSTEIN SE, KORNOWSKI R. Lack of correlation between angiographic grading of collateral and myocardial perfusion and function: implications for the assessment of angiogenic response. *Coron Artery Dis*. 2001:173-8.
- HABERL R. Möglichkeiten und Grenzen der Primär- und Sekundärprävention. *Neurotransmitter*. 2001.
- HACKE W, KASTE M, FIESCHI C, TONI D, LESAFFRE E, VON KUMMER R, BOYSEN G, BLUHMKI E, HOXTER G, MAHAGNE MH. Intravenous

- thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA*. 1995:1017-25.
- HACKE W, RINGLEB P, STINGELE R. Thrombolysis in acute cerebrovascular disease: indications and limitations. *Thromb Haemost*. 1999:983-6.
- HANSMANN D, MÜGGE A, WG D. Koronare Herzkrankheit. In: Thieme G, ed. *Innere Medizin*. Stuttgart, New York: Thieme Verlag; 1999:1120.
- HAZIOT A, TSUBERI BZ, GOYERT SM. Neutrophil CD14: biochemical properties and role in the secretion of tumor necrosis factor-alpha in response to lipopolysaccharide. *J Immunol*. 1993:5556-65.
- HEISS WD, GROND M, THIEL A, VON STOCKHAUSEN HM, RUDOLF J. Ischaemic brain tissue salvaged from infarction with alteplase. *Lancet*. 1997:1599-600.
- HELISCH A, SCHAPER W. Angiogenesis and arteriogenesis--not yet for prescription. *Z Kardiol*. 2000:239-44.
- HEROLD G, MITARBEITER U. Innere Medizin - Eine vorlesungsorientierte Darstellung. In: Herold G, ed. *Innere Medizin*: Herold Verlag; 1999.
- HOEFER I, VAN ROYEN N, BUSCHMANN I, PIEK J, SCHAPER W. Time course of arteriogenesis following femoral artery occlusion in the rabbit. *Cardiovascular Research*. 2001:609-617.
- HOEFER I, VAN ROYEN N, RECTENWALD J, BRAY E, ABOUHAMZE Z, MOLDAWER L, VOSKUIL M, PIEK J, BUSCHMANN I, OZAKI C. Direct Evidence for Tumor Necrosis Factor- α Signaling in Arteriogenesis. *Circulation*. 2002:1639-1641.
- HOEFER I. Arteriogenesis in Mice. In: Ince C, ed. *The Physiological Genomics of the Critically Ill Mouse*. Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers; 2003.
- HOEFER I, GRUNDMANN S, VAN ROYEN N, SCHIRMER S, BUSCHMANN I. Einfluss von Thrombozytenaggregationshemmern auf das Kollateralarterienwachstum. In: *32. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Angiologie (DGA), Gesellschaft für Gefäßmedizin e.V.* Baden-Baden; 2003.
- ISHIBASHI T, NAKAZATO K, SHINDO J, YOKOYAMA K, MARUYAMA Y. Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the levels of VLDL and LDL receptor mRNAs in vivo. *J Atheroscler Thromb*. 1996:76-80.
- ITO W, ARRAS M, WINKLER B, SCHOLZ D, SCHAPER J, SCHAPER W. Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ Res*. 1997a:829-837.

ITO W, ARRAS M, WINKLER B, SCHOLZ D, SCHAPER J, SCHAPER W. "Monocyte Chemotactic Protein-1" fördert Kollateralwachstum und Angiogenese. In: *Z Kardiol*; 1997b:1185 (abstr).

Klever-Deichert G, Hinzpeter B, Hunsche E, Lauterbach KW. [Costs of coronary heart diseases over the remaining life time in coronary heart disease cases--an analysis of the current status of coronary heart disease cases in Germany from the social perspective]. *Z Kardiol*. 1999:991-1000.

KLEVERT-DEICHERT G, HINZPETER B, HUNSCHE E, LAUTERBACH KW. [Costs of coronary heart diseases over the remaining life time in coronary heart disease cases--an analysis of the current status of coronary heart disease cases in Germany from the social perspective]. *Z Kardiol*. 1999:991-1000.

KOSAKI K, ANDO J, KORENAGA R, KUROKAWA T, KAMIYA A. Fluid shear stress increases the production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by endothelial cells via mRNA stabilization. *Circ Res*. 1998:794-802.

MARKS AR. Sirolimus for the prevention of in-stent restenosis in a coronary artery. *N Engl J Med*. 2003:1307-9.

MARLER JR, TILLEY BC, LU M, BROTT TG, LYDEN PC, GROTTA JC, BRODERICK JP, LEVINE SR, FRANKEL MP, HOROWITZ SH, HALEY EC, Jr., LEWNDOWSKI CA, KWIATKOWSKI TP. Early stroke treatment associated with better outcome: the NINDS rt-PA stroke study. *Neurology*. 2000:1649-55.

MCCOURT M, JH. W, SOOKHAI S, REDMOND P. Proinflammatory Mediators Stimulate Neutrophil-Directed Angiogenesis. *Arch Surg*. 1999:1325-1332.

NAMIKI M, KAWASHIMA S, YAMASHITA T, OZAKI M, HIRASE T, ISHIDA T, INOUE N, HIRATA K, MATSUKAWA A, MORISHITA R, KANEDA Y, YOKOYAMA M. Local overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 at vessel wall induces infiltration of macrophages and formation of atherosclerotic lesion: synergism with hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002:115-20.

O'REILLY MS, HOLMGREN L, SHING Y, CHEN C, ROSENTHAL RA, MOSES M, LANE WS, CAO Y, SAGE EH, FOLKMAN J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*. 1994:315-28.

PREVENTION TCFDCA. Trends of ischemic heart disease deaths-United States. *J Am Med Assoc*. 1990-1994:1109.

PULSINELLI W. Pathophysiology of acute ischaemic stroke. *Lancet*. 1992:533-6.

QUAYLE JA, ADAMS S, BUCKNALL RC, EDWARDS SW. Cytokine expression by inflammatory neutrophils. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1994:233-9.

RAJANAYAGAM MA, SHOU M, THIRUMURTI V, LAZAROUS DF, QUYYUMI AA, GONCALVES L, STIBER J, EPSTEIN SE, UNGER EF. Intracoronary basic

- fibroblast growth factor enhances myocardial collateral perfusion in dogs. *J Am Coll Cardiol.* 2000:519-26.
- RISAU W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997:671-4.
- ROSS R. The pathogenesis of atherosclerosis--an update. *N Engl J Med.* 1986:488-500.
- ROSS R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Atherosclerosis: current understanding of mechanisms and future strategies in therapy. *Nature.* 1993:801-9.
- ROSS R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999:115-126.
- ROTH SJ, CARR MW, SPRINGER TA. C-C chemokines, but not the C-X-C chemokines interleukin-8 and interferon-gamma inducible protein-10, stimulate transendothelial chemotaxis of T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1995:3482-8.
- SCHANZENBÄCHER P, KOCHSIEK K. Koronare Herzerkrankung. In: Classen M, Diehl V, K K, eds. *Innere Medizin.* München, Wien Baltimore: Urban & Schwarzenberg; 1998:S. 1114.
- SCHAPER J, KÖNIG R, FRANZ D, SCHAPER W. The endothelial surface of growing coronary collateral arteries. Intimal margination and diapedesis of monocytes. A combined SEM and TEM study. *Virchows Arch A (Pathol Anat).* 1976:193-205.
- SCHAPER W, DEBRABANDER M, LEWI P. DNA-synthesis and mitoses in coronary collateral vessels of the dog. *Circ Res.* 1971:671-679.
- SCHAPER W, ITO WD. Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circ Res.* 1996:911-9.
- SCHAPER W, BUSCHMANN I. Arteriogenesis, the good and bad of it. *Cardiovasc Res.* 1999:835-837.
- SCHAPER W. Therapeutic arteriogenesis has arrived. *Circulation.* 2001:1994-5.
- SCHIELE T, NIEHUS R, KNOBLOCH W, METZGER G, JACKSCH R. Interventions in carotid stenoses: carotid surgery, percutaneous transluminal balloon angioplasty and stent implantation. Indications, results of clinical studies. An overview. *Z Kardiol.* 2000a:2-8.
- SCHIRMER SH, BUSCHMANN IR, JOST MM, HOEFER IE, GRUNDMANN S, ANDERT JP, ULUSANS S, BODE C, PIEK JJ, VAN ROYEN N. Differential effects of MCP-1 and leptin on collateral flow and arteriogenesis. *Cardiovasc Res.* 2004:356-64.
- SCHOLZ D, DEVAUX B, HIRCHE A, POTZSCH B, KROPP B, SCHAPER W, SCHAPER J. Expression of adhesion molecules is specific and time-dependent in cytokine-stimulated endothelial cells in culture. *Cell Tissue Res.* 1996:415-23.

- SCHOLZ D, ITO W, ARRAS M, HOEFER I, SCHAPER J, SCHAPER W. Early events in adaptive arteriogenesis. *J Mol Cell Cardiol*; 1998:496 (abstr).
- SCHÜTZ W. Pharmakologie des kardiovaskulären Systems: Das Herz. In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K, eds. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum; 1996:394-406.
- SEILER C, POHL T, WUSTMANN K, HUTTER D, NICOLET PA, WINDECKER S, EBERLI FR, MEIER B. Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Circulation*. 2001:2012-7.
- SEMENZA GL. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Ann Rev Cell Develop Bio*. 1999:551-78.
- SHINDO J, ISHIBASHI T, YOKOYAMA K, NAKAZATO K, OHWADA T, SHIOMI M, MARUYAMA Y. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor prevents the progression of atherosclerosis via changes in the cellular and extracellular composition of atherosclerotic lesions in watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Circulation*. 1999:2150-6.
- SHYY Y-J, HSIEH H-J, USAMI S, CHIEN S. Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemoattractant protein 1 gene expression in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994:4678-4682.
- STATISTISCHES BUNDESAMT, Gesundheitsbericht für Deutschland. 1998, Stuttgart: Metzler Poeschel.
- TAICHMAN NS, YOUNG S, CRUCHLEY A, TAYLOR O, PALEOLOG E. Human neutrophils secrete vascular endothelial growth factor. *J Leukoc Biol*. 1997:397-400.
- TANABE K, REGAR E, LEE CH, HOYE A, VAN DER GIESSEN WJ, SERRUYS PW. Local drug delivery using coated stents: new developments and future perspectives. *Curr Pharm Des*. 2004:357-67.
- VALETTE G, PEYROUX C, JACQUOT C. Influence of the duration of low temperature conservation of isolated rabbit aorta on the appearance of tachyphylaxia toward tyramine. *J Physiol Paris*. 1967:520.
- VAN ROYEN N, PIEK JJ, SCHAPER W, BODE C, BUSCHMANN I. Arteriogenesis: mechanisms and modulation of collateral artery development. *J Nucl Cardiol*. 2001:687-93.
- VAN ROYEN N, HOEFER I, BUSCHMANN I, HEIL M, KOSTIN S, DEINDL E, VOGEL S, KORFF T, AUGUSTIN H, BODE C, PIEK JJ, SCHAPER W. Exogenous application of transforming growth factor beta 1 stimulates arteriogenesis in the peripheral circulation. *Faseb J*. 2002:432-4.
- VAN ROYEN N, HOEFER I, BOTTINGER M, HUA J, GRUNDMANN S, VOSKUIL M, BODE C, SCHAPER W, BUSCHMANN I, PIEK JJ. Local monocyte chemoattractant protein-1 therapy increases collateral artery formation in

apolipoprotein E-deficient mice but induces systemic monocytic CD11b expression, neointimal formation, and plaque progression. *Circ Res.* 2003a:218-25.

VAN ROYEN N, HOEFER I, BUSCHMANN I, KOSTIN S, VOSKUIL M, BODE C, SCHAPER W, PIEK JJ. Effects of local MCP-1 protein therapy on the development of the collateral circulation and atherosclerosis in Watanabe hyperlipidemic rabbits. *Cardiovasc Res.* 2003b:178-85.

VOSKUIL M, VAN ROYEN N, HOEFER IE, SEIDLER R, GUTH BD, BODE C, SCHAPER W, PIEK JJ, BUSCHMANN IR. Modulation of collateral artery growth in a porcine hindlimb ligation model using MCP-1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003:H1422-8.

WALSH K, SATA M, Negative regulation of inflammation by Fas ligand expression on the vascular endothelium. *Trens Cardiovasc Med*, 1999. 170: 1745-50.

WOODS TC, MARKS AR. Drug-eluting stents. *Annu Rev Med.* 2004:169-78.

7 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
A.	Arteria
Aa.	Arteriae
Abb.	Abbildung
ApoE	Apolipoprotein E
AS	Aminosäuren
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BGA	Blutgasanalyse
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Cluster of differentiation (Zelloberflächenantigen)
CFI	Kollateraler Flußindex
Co2	Kohlendioxid
CPAP	contineous positive airway pressure
d.h.	das heißt
EKG	Elektrokardiographie
et al.	und andere
Fa.	Firma
Fi O2	inspiratorische Sauerstoffkonzentration
Flk	Fetal Liver Kinase
Flt	fms-Like Tyrosine Kinase
g	Gramm
GM-CSF	Granulozyten Monozyten Koloniestimulierender Faktor
h	Stunde
HDL	High density Lipoprotein
HIF	Hypoxia inducible Factor
i.a.	Intraarteriell
I.D.	Innendurchmesser
I.E.	Internationale Einheiten

i.m.	Intramuskulär
i.v.	Intravenös
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IL	Interleukin
ISR	In-Stent-Restenose
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KHK	Koronara Herzkrankheit
kV	Kilovolt
LDL	Low-Density Lipoprotein
m	Quadratmeter
M.	Musculus
MAC	
mAS	Milliamperesekunde
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
mg	Milligramm
min	Minute
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
Mm.	Musculi
mmHG	Millimeter Quecksilbersäule
Mrd.	Milliarden
ms	Millisekunde
NaCL	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
ns.	nicht signifikant
OP	Operation/ Operationsaal
p.o	per os
PAP	Peripherer Arterieller Blutdruck

pAVK	periphere Arterielle Verschußkrankheit
PDGF	Platelet Derived GrowthFactor
PRIND	prologiertes reversibles ischämisches neurologisches Defizit
PTA	Transluminale Angioplastie
PTCA	Perkutane transluminale Koronarangioplastie
R	Ramus
rt-PA	rekombinanter Gewebsplasminogenaktivator
s.c.	subkutan
SAP	Systemic Arteriel Pressure
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SIMV	spontaneously intermediate mandatory ventilation
Tab.	Tabelle
TGF	Transforming Growth Factor
TIA	transitorische Ischämische Attacke
TIVA	Total intravenöse Anästhesie
TNF	Tumor Nekrose Faktor
u.a.	unter anderem
V.	Vena
VCAM	Vascular celladhesion Molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLDL	Very Lov-Density Lipoprotein
vs.	versus
Vv.	Venae
WHO	World Health Organisationo
z. B.	zum Beispiel
®	eingetragenes Warenzeichen

8 Herstellernachweis

Absaugung	Receptal; Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois, USA
Adenosin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ambubeutel	Life Support Products Inc. Fa. Dräger, Irvine, Calif. USA
Angiographie	Philips Optimus, Medizinsysteme GmbH, Hamburg
Autoklav	Selectomat S 3000
Bariumsulfat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Beatmungsgerät	Servo Ventilator 900c, Siemens Elma, Schweden
Blasenkatheter	Sekretbeutel 1,5l; Sarstedt Nümbrecht
Blutdruckmessung	Medex Inc., Carlsbad, CA, USA
Blutgasanalysator	Radiometer Copenhagen, Kopenhagen, Dänemark
Buprenorphin	Temgesic , Essex Pharma GmbH, München
Clopidogrel	Plavix, Sanofi Synthelabo GmbH, Berlin
Dexpanthenol	Bepanthen Augen- und Nasensalbe, La Roche AG, Grenzach-Wyhlen
Einwegspritzen	Luer, B. Braun Melsungen AG, Melsungen
EKG Elektroden	P.J. Dahlhausen &Co. GmbH, Köln
EKG Gerät	Hellige, Freiburg
Elektrokoagulation	Fa. Martin, Umkirch
Endotrachealtubus	Hi-Contour , Mallinckrodt Medical, Athlone, Ireland
Exel	Microsoft Corporation, Redmont, Wa, USA
Fentanyl	Janssen-Cilag, Neuss
Flunitrazepam	Rohypnol, Hoffmann La Roche AG, Grenzach-Wyhlen
Gelatine	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Heparin	Liquemin, Hoffmann La Roche AG, Grenzach-Wyhlen
Infusomat fm	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kaliumchlorid	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kanülen	Sterican, B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kapnometer	Capnomac ultima, Datex, Helsinki, Finnland

Ketamin	Essex Tierarznei, München
Magensonde	Medicoplast, Illingen
Mersilene	nicht resorbierbares Nahtmaterial, Ethicon, Johnson & Johnson, Brüssel, Belgien
Metamizol	Novalgin, Hoechst, Frankfurt a. M.
Metoclopramid	Paspertin, Sovay Arzneimittel GmbH, Hannover
Midazolam	Dormicum, La Roche AG Grenzach-Wyhlen
NaCL	Delta Select GmbH, Pfullingen
Ohrmarken	Fa. Hauptner Herberholz, Sollingen
Penicillin-Streptomycin	Tardomyocel, Fa. Bayer, Leverkusen
Perfusor	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Povidon Iod	Betaisadonna, Mundipharma GmbH, Limburg
Povidon Iod	Braunovidonsalbe, B.Braun, Melsungen AG, Melsungen
Powerlab/8SP	ADInstruments, Spechbach, Germany
Propofol	Disoprivan, Zeneca GmbH, Planckstadt
Pulsoxymeter	Radiometer Copenhagen, Kopenhagen, Dänemark
Quad Bridge	ADInstruments, Spechbach, Germany
Ringer-Lösung	Delta-Pharma, Pfullingen
Rollerpumpe	flowmaster FMT 300, Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Monfeld
Skalpell	Feather Saftey Razor Co Ltd.,Japan
Sterofundin BG 5	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
SynchroMed EL	Medtronic, Minneapolis MN, USA
Ultraschall-Doppler-Flußsonde	Transonic Systems Inc., Ithaca, NY,
Vascular Catheter 8700A	Medtronic, Minneapolis MN, USA
Vecuroniumbromid	Norcuron, Organon Teknika, Eppelheim
Vicryl	resorbierbares Nahtmaterial, Johnson & Johnson, Brüssel, Belgien
Wärmematte	Hico-Aquaterm 640, Hirtz &Co., Köln
Word	Microsoft Corporation, Redmont, Wa, USA

9 Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Richtdosierungen der Medikamente der TIVA.....	30
Tabelle 2: Ergebnisse der Kontrollgruppe.....	39
Tabelle 3: Ergebnisse der Gruppe mit kontinuierlicher Infusion von GM-CSF.....	40
Tabelle 4: Ergebnisse der Gruppe mit intermittierendem Pumpmodus.....	40
Tabelle 5: Zusammenfassung aller Ergebnisse.....	40

10 Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Synoptische Darstellung der Atherogenese.....	9
Abbildung 2: Übersicht Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese.....	16
Abbildung 3: NMR Aufnahme in koronarer Schichtung stammt von einem 30jährigen Mann, der als gesunder Proband der Kontrollgruppe an einer NMR-Studie teilnahm. Trotz eines vollständigen Verschlusses der Aortenisthmus war dieser Patient beschwerdefrei und spielte aktiv Fußball. Die deutlich sichtbaren geschlängelten Interkostalarterien hatten die Versorgung der untheren Körperhälfte übernommen (Abbildung überlassen von Dr. N. van Royen, AMC Amsterdam, Niederlande).....	18
Abbildung 4: SynchroMed EL programmierbare Medikamentenpumpe.....	32
Abbildung 5: Telemetrie Programmiercomputer.....	32
Abbildung 6: Schematischer Versuchsaufbau.....	32
Abbildung 7: Post-mortem Wismutangiographie PBS Kontrolle.....	36
Abbildung 8: Post-mortem Wismutangiographie GM-CSF kontinuierlich.....	36
Abbildung 9: Post-mortem Wismutangiographie GM-CSF intermittierend.....	37
Abbildung 10: Knöchel-Arm-Index (Ankle Brachial Index).....	38
Abbildung 11: Blutflussmessung unter Hyperämie.....	39
Abbildung 12: Kollaterale Konduktanz.....	40

11 Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. vet. Johannes Hirschberger für die Übernahme der Arbeit an die Tierärztliche Fakultät der Ludwig – Maximilians – Universität München.

Bei Herrn Prof. Dr. med. vet. Wolf Erhard bedanke ich mich ganz herzlich für die Durchsicht meines Manuskripts

Bei Herrn Dr. Ivo Buschmann bedanke ich mich herzlich für die Überlassung des Themas und für seine stets freundliche und hilfreiche Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Ganz besonderer Dank gebührt Herrn Dr. Imo Höfer und Herrn Dr. Sebastian Grundmann für die vielen schönen Stunden und die tolle Zusammenarbeit im Tier OP, sowie für die Betreuung meiner Doktorarbeit. Ihr seid die Größten.

Dank gebührt auch all meinen Kollegen der Forschergruppe Arteriogenese: Imke Bergmann, Stephanie Fischer, Caroline Bergmann und Stephan Schirmer.

Bei den Mitarbeitern der Zentralen Klinischen Forschung bedanke ich mich für die kompetente Betreuung meiner Tiere.

Bedanken möchte ich mich auch ganz herzlich bei meinen ehemaligen Mitdoktoranden Johannes Brodauf, Stefan Blaser, Werner Armbruster und Daniel Haug.

All meinen Freunden im Besonderen Andrea Bahle, Alexandra Giesen, Dr. Kerstin Schlegel, Valborg Eide, Joao Carlos Dänzer und Barbara Matthes danke ich für die Unterstützung im letzten Jahr, meinem Bruder Thomas danke ich für Rat und Tat.

Darüber hinaus bedanke ich mich ganz herzlich bei meiner Mutter.

12 Lebenslauf

Name: Susann Meryem Ulusans

Geburtsdatum /-ort: 01.Februar 1975, Aalen

Familienstand: ledig

Eltern: Ismet Ulusans, Maschinenschlosser
Maria Ulusans, Hausfrau

Geschwister: Matthias Ulusans
Thomas Ulusans

Ausbildung: 1994 Abitur an der Justus-von-Liebig-Schule in Aalen,

1995 Freiwilliges Soziales Jahr in einer Einrichtung (Schule und Werkstatt) für geistig und körperlich mehrfachbehinderte Menschen in Schwäbisch Hall (Sonnenhof)

1995 Beginn des Studiums der Veterinärmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München

2000 3. Staatsexamen

Famulaturen: März – April 1999 Kleintierpraxis Dr. med. vet. Jürgen Maier in Aalen

März – April 2000 Chirurgische Tierklinik der Ludwig – Maximilians – Universität München

April – Juni 2000 Kildare Chilling Company Ireland

Juni – Juli 2000 Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten der Ludwig – Maximilians – Universität München

Beruflicher
Werdegang:

Mai 2001 – April 2002 Abteilung der Herz – und Gefäßchirurgie der Albert – Ludwigs – Universität Freiburg

Mai 2002 Forschergruppe für klinische und experimentelle Arteriogenese der Abteilung für Kardiologie, Medizinische Klinik III der Albert – Ludwigs – Universität Freiburg

Dezember 2003 Abteilung für Neuroradiologie der Albert – Ludwigs – Universität Freiburg

Assistentenstelle in der Tierarztpraxis Breisach Drs. Bröckelmann und Vogt

Publikationen:

Schirmer S, Buschmann I, Jost M, Hofer I, Grundmann S, Andert JP, **Ulusans S**, Bode C, Piek JJ, van Royen N: Differential effects of MCP-1 and leptin on collateral flow and arteriogenesis. Cardiovascular Research 2004 Nov 1; 64(2): 356-64.

Pothmann D, **Ulusans S**, Pröls F, Klisch J: Liquid 2-P-HEMA for endovascular tumor therapy: in vivo feasibility study. Medical Science Monitor 2004 Aug; 10(8); BR 286-93. Epub 2004 Jul 23.

Grundmann S, Höfer I, **Ulusans S**, van Royen N, Schirmer SH, Ozaki CK, Bode C, Piek JJ, Buschmann IR: Anti-Tumor Necrosis Factor – (alpha) Therapies attenuate adaptive arteriogenesis in the rabbit. Am J of Physiol Heart Circ Physiol 2005 May 27;

Heilmann C, von Samson P, **Ulusans S**, Haffner E, Schlegel K, Beyersdorf F, Lutter G: Gene therapy in cardiac surgery: intramyocardial injection of naked plasmid DANN for chronic myocardial ischemia. Abstract Book of the 16th Annual Meeting of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery 2002; 16: 412

Grundmann S, Hofer I, **Ulusans S**, Schirmer S, van Royen N, Buschmann I: The Tumor Necrosis Factor- α Antagonist Infliximab and Etanercept Inhibit Arteriogenesis
Submitted to Circulation

Ulusans S, Bergmann I, van Royen N, Hartmann S, Piek JJ, Bode C: Stimulation of Arteriogenesis in the Coronary Circulation of the Pig Heart. Als Manuskript in Vorbereitung

Grundmann S, Höfer I, van Royen N, Schirmer S, **Ulusans S**, Hartmann S, Piek J, Buschmann I: Leukozyten und granulozyten-attraktive Zytokine (NAP-2, IL-8): Ihr Einfluss auf die Arteriogenese. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie 2003 Mannheim.

Grundmann S, Höfer I, van Royen N, Schirmer S, **Ulusans S**, Hartmann S, Piek J, Buschmann I: Direct evidence for specific contributions of leucocyte subpopulations to arteriogenesis. European Society of Cardiology 2003, Wien, Österreich.

Grundmann S, Höfer I, van Royen N, Schirmer S, **Ulusans S**, Buschmann I: Monocytes, but not Lymphocytes or Neutrophils are essential mediators of arteriogenesis. Jahrestagung des American College of Cardiology 2004, New Orleans, USA.