

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I

Ludwig-Maximilians-Universität München

ehem. Direktor: Prof. Dr. med. G. Steinbeck

Direktor: Prof. Dr. Steffen Massberg

Therapeutische Neovaskularisation:

**Regionale Überexpression der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase führt zu
einem funktionell relevanten Gefäßwachstum im hibernierenden Schweinemyokard.**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Stefan Mayer

aus Sterzing

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Kupatt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Nikolaus Plesnila
Prof. Dr. Reinhard Lorenz

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. vet. Rabea Hinkel

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2012

Meinen Eltern in Dankbarkeit

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Kupatt C., Hinkel R., von Bruhl M.L.; et al. Endothelial nitric oxide synthase overexpression provides a functionally relevant angiogenic switch in hibernating pig myocardium. J Am Coll Cardiol 49 2007 1575-1584.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	2
1.1	Koronare Herzerkrankung	2
1.1.1	Endotheliale Dysfunktion	3
1.1.2	Myokardiale Hibernation	5
1.2	Vaskuläres Wachstum und Remodeling	8
1.2.1	Angiogenese	9
1.2.2	Arteriogenese	11
1.2.3	Vaskulogenese	13
1.2.4	Die Bedeutung von Stickstoffmonoxid im postischämischen Revaskularisationsprozess	13
1.3	Therapeutische Neovaskularisation bei koronarer Herzerkrankung	15
1.3.1	Applikationsmodus	16
1.3.2	Das System der selektiven druckregulierten Retroinfusion	19
1.3.3	Liposomale Transfektion von komplementärer DNA (cDNA)	20
1.4	Fragestellung	21
2	Material und Methoden	22
2.1	Geräte, Verbrauchsmaterialien und Arzneimittel	22
2.2	Zellkultur	23
2.3	Der Reduktionsstent als Modell myokardialer Hibernation	24
2.3.1	Versuchstiere	24
2.3.2	Prämedikation und Narkoseeinleitung	24
2.3.3	Narkoseführung und Narkoseüberwachung	25
2.3.4	Peri- und postoperatives Management	26
2.3.4.1	Antikoagulation und Antibiotikatherapie	26
2.3.4.2	Arterielle und venöse Gefäßzugänge	26
2.3.5	Vorbereitung des Reduktionsstents	27
2.3.6	Einfluss des Reduktionsstents auf die myokardiale Funktion	27
2.4	Das System der druckregulierten Retroinfusion	28
2.5	Therapeutische Revaskularisation im hibernierenden Myokard	29
2.5.1	Tag 0: Implantation des Reduktionsstents	31

2.5.2	Tag 7: Kontrolle des Blutflusses mittels Koronarangiographie	31
2.5.3	Tag 28: Retroinfusion von eNOS S1177D und eGFP cDNA in die anteriore Koronarvene	32
2.5.3.1	Hämodynamische Parameter der globalen Herzfunktion und regionale Perfusion	32
2.5.3.2	Applikation von eNOS S1177D cDNA und eGFP cDNA	32
2.5.4	Tag 49: Erfassung der myokardialen Perfusion und Funktion	34
2.5.4.1	Regionaler myokardialer Blutfluss: Mikrosphären	34
2.5.4.2	Regionale Myokardfunktion: Sonomikrometrie	36
2.5.4.3	Bestimmung der Infarktgröße: TTC-Färbung	38
2.5.4.4	Analyse des Kollateralenwachstums	39
2.6	Immunologische Methoden	39
2.6.1	Immunoblotting (<i>Western-Blot</i>)	39
2.6.2	Immunhistochemie	40
2.6.3	Radioimmunoassay	41
2.7	Statistische Verfahren	41
3	Ergebnisse	43
3.1	Therapeutische Neovaskularisation durch retrograde Infusion von eNOS S1177D in die anteriore interventrikuläre Koronarvene	43
3.1.1	eNOS Expression	43
3.1.2	Endotheliale Proliferation in vitro und in vivo	46
3.1.3	Neovaskularisation im hibernierenden Myokard	50
3.1.3.1	Angiogenese	50
3.1.3.2	Arteriogenese	50
3.1.4	Myokardialer Blutfluss sowie globale und regionale Herzfunktion	52
3.1.4.1	Regionale Perfusion	52
3.1.4.2	Globale Herzfunktion	57
3.1.4.3	Regionale Herzfunktion	58
4	Diskussion	60
4.1	Das Modell der myokardialen Hibernation am Großtier	60
4.1.1	Auswahl der Versuchstierspezies	60
4.1.2	Experimentelle Modelle chronischer myokardialer Ischämie	61
4.1.2.1	Ameroid-Konstriktor	62
4.1.2.2	Fixierte Stenose	63
4.1.2.3	Hydraulischer Okkluder	63
4.1.2.4	Reduktionsstent	64
4.2	Interpretation der Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur	66
4.2.1	Expression von eNOS in vivo	66
4.2.2	Endotheliale Proliferation in vitro und in vivo	67

4.2.3	eNOS und Revaskularisation	68
4.2.3.1	Angiogenese	69
4.2.3.2	Arteriogenese	70
4.2.3.3	Perfusion	71
4.2.3.4	Funktion	73
4.3	Limitationen	75
4.3.1	Tierexperimentelles Modell	75
4.3.2	Klinische Anwendung	76
4.3.2.1	Retroinfusionsbehandlung am Patienten	76
4.3.2.2	Überexpression von eNOS beim Patienten	77
4.4	Klinische Relevanz und Perspektive	78
5	Zusammenfassung	81
	Literaturverzeichnis	XII
	Abbildungsverzeichnis	XXIX
	Tabellenverzeichnis	XXIX
	Abkürzungsverzeichnis	XXX

1 Einleitung

1.1 Koronare Herzerkrankung

Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist die häufigste Manifestation einer kardiovaskulären Erkrankung und stellt die führende Todesursache weltweit dar. Nach Daten der WHO starben im Jahr 2005 rund 7,6 Millionen Menschen an den Folgen einer KHK.¹¹⁰

In Deutschland verstarben im Jahr 2007 nach Angaben des Statistischen Bundesamtes 139 808 Menschen an einer chronisch ischämischen Herzkrankheit bzw. einem Myokardinfarkt.³³ Dies entspricht rund 17 % aller registrierten Todesfälle. Aufgrund der demographischen Entwicklung ist in Zukunft in Deutschland mit einem weiteren Anstieg der Prävalenz zu rechnen. Vor diesem Hintergrund besitzt die KHK eine erhebliche volkswirtschaftliche Relevanz.

Die KHK ist eine chronisch progrediente Erkrankung, welche die Manifestation der Atherosklerose in den Herzkranzgefäßen widerspiegelt. Morphologisch treten in den Koronararterien isolierte oder diffuse atherosklerotische Plaques auf, welche bei Ausbildung hämodynamisch relevanter Stenosen zu einer Minderperfusion des nachgeschalteten Myokardgewebes führen (Koronarinsuffizienz). Bedingt durch diese flusslimitierenden Koronarstenosen wird der Herzmuskel unzureichend mit Substraten und insbesondere Sauerstoff versorgt. Die hervorgerufene Myokardischämie bewirkt zunächst eine verminderte Kontraktilität des Herzmuskels (Kurzzeit-Hibernation),^{142,154} bei anhaltender Unterversorgung können jedoch strukturelle Veränderungen sowie dauerhafte Gewebeschädigungen bis hin zum Zelltod evoziert werden.¹⁰²

Je nach Größe, Lokalisation und Dauer der myokardialen Ischämie resultieren verschiedene Manifestationsformen der KHK:

- Angina pectoris (stabile/instabile)
- Myokardinfarkt

- Ischämische Herzmuskelschädigung mit Herzinsuffizienz
- Herzrhythmusstörungen
- Plötzlicher Herztod

Aus prospektiv-epidemiologischen Untersuchungen (Framingham-Herz-Studie, u.a.) sind bezüglich der vorzeitigen Entstehung einer koronaren Atherosklerose mittlerweile mehrere prädisponierende Faktoren bekannt. Diese können in konstitutionelle Zustände (Familienanamnese, Alter, Geschlecht) sowie in beeinflussbare Risikofaktoren (Nikotinabusus, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, u.a.) unterteilt werden.

1.1.1 Endotheliale Dysfunktion

Das Endothel nimmt hinsichtlich der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase eine bedeutende Position ein. Durch seine Fähigkeit, auf physische und chemische Reize mittels Regulation verschiedener Mediatoren (Prostaglandine, Endothelin, Stickstoffmonoxid, u.a.) zu reagieren, moduliert das Endothel den Gefäßtonus, die Hämostase bzw. Thrombogenität des Blutes, die Permeabilität der Gefäßwand, inflammatorische Prozesse sowie das vaskuläre Wachstum und Remodeling.¹⁸⁴ Die oben genannten kardiovaskulären Risikofaktoren können jedoch proinflammatorische sowie proatherogene Prozesse initiieren, die zu einer funktionalen Dysbalance des vaskulären Endothels führen. Störungen dieser Homöostase werden in der Literatur auch als *endotheliale Dysfunktion* bezeichnet und stellen eine Schnittstelle zwischen kardiovaskulären Risikofaktoren und atherothrombotischem Risiko dar.¹⁴⁴

In den letzten zwei Jahrzehnten zeigte sich, dass die endotheliale Dysfunktion wesentlich am Prozess der Atherogenese beteiligt ist und eine Vorstufe bzw. einen frühzeitigen Marker der KHK darstellt.¹⁰⁸ Als Surrogat für die gestörte Integrität des Endothels wird insbesondere eine verminderte Bioverfügbarkeit von endotheliale Stickstoffmonoxid (NO) angesehen. In der Literatur wird der Begriff der endothelialen Dysfunktion daher häufig synonym mit Störungen des endothelialen L-Arginin-NO-Stoffwechsels gebraucht.^{22,195}

In einem wegweisenden Experiment stellten Furchgott und Zawadzki 1980 fest, dass ein intaktes Endothel essentiell für die Relaxation vaskulärer glatter Muskelzellen durch Acetylcholin ist.⁵⁰ In späteren Untersuchungen wurde die vermittelnde Substanz, der *endothelium-derived relaxing factor*, als NO identifiziert.¹³² Das elektrisch neutrale Radikal Stickstoff-

monoxid wird im menschlichen Körper durch eine Familie von drei Isoenzymen, den NO-Synthasen (NOS), hergestellt: die konstitutiv exprimierte endotheliale (eNOS) und neuronale (nNOS) NO-Synthase sowie die induzierbare NO-Synthase (iNOS), vorwiegend in Monozyten und Makrophagen). Während iNOS durch proinflammatorische Zytokine hochreguliert wird und NO in der Folge zytotoxische Konzentrationen erreicht, bildet die Calcium-Calmodulin-abhängige eNOS aus der Aminosäure L-Arginin, molekularem Sauerstoff sowie mehreren Cofaktoren (u.a. Tetrahydrobiopterin) kontinuierlich physiologische Mengen von NO.¹³¹ Die Aktivität der eNOS wird dabei insbesondere durch Calcium-mobilisierende Agonisten (Bradykinin, Acetylcholin, VEGF, u.a.), aber auch mittels hämodynamischer Scherkräfte (Wandschubspannung, *shear stress*) streng reguliert.⁴² Die Freisetzung von NO führt über die Synthese von zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP) anschließend zu einer potenten Vasodilatation. Darüber hinaus wirkt NO einer Leukozytenadhäsion und -infiltration,⁸⁹ einer Proliferation und Migration vaskulärer glatter Muskelzellen³⁰ sowie einer Aggregation von Thrombozyten entgegen und konterkariert dadurch den Prozess der Atherogenese.³¹

Im Jahr 1986 beobachteten Ludmer et al. eine eingeschränkte NO-abhängige Vasodilatation bzw. segmentale Vasokonstriktion der Herzkranzgefäße, nachdem bei kardiovaskulären Risikopatienten mit milder sowie schwerer koronarer Atherosklerose Acetylcholin infundiert worden war. Sie zeigten damit zum ersten Mal in einer klinischen Situation, dass bereits die frühe Phase einer KHK, bei angiographisch noch unauffälligen Arterien, mit einer reduzierten Endothelfunktion einhergeht.¹⁰⁶ Diese lässt sich auf mindestens drei Defekte zurückführen:

- reduzierte Expression von eNOS
- verminderte Aktivität von eNOS
- Abfangen von NO durch freie Sauerstoffradikale

Die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) und der intrazelluläre Redoxzustand nehmen eine zentrale Rolle in der Entstehung der endothelialen Dysfunktion ein.²² Während ROS in physiologischen Konzentrationen an der Signaltransduktion beteiligt sind, enzymatische Reaktionen regulieren und für die Immunabwehr unentbehrlich sind,⁵⁹ schädigt ein oxidativer Stress nicht nur zelluläre Membranen, sondern verändert auch die Struktur sowie Funktion von Makromolekülen (Proteine, DNA) und führt zur Aktivierung von proinflammatorischen Mechanismen.⁷⁹

Die bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren sind mit einem erhöhten oxidativen Stress

an der Gefäßwand assoziiert.¹⁸⁵ In der Folge wird NO, gebildet von einer noch funktionellen eNOS, von freien Radikalen abgefangen und verbraucht. Aus dieser Reaktion gehen reaktive Stickstoffverbindungen hervor, insbesondere Distickstofftrioxid (N₂O₃) sowie Peroxynitrit (ONOO⁻), welche ihrerseits signifikante Schäden zellulärer Komponenten verursachen.⁹⁴ Im Zuge dessen wird der wichtige eNOS-Kofaktor Tetrahydrobiopterin zu biologisch inaktiven Produkten oxidiert und eine Entkopplung der eNOS Aktivität (*eNOS uncoupling*) ausgelöst.¹⁰⁰ Die entkoppelte, dysfunktionale eNOS selbst synthetisiert nun aus Sauerstoff reaktive Hyperoxidradikale.¹⁹³ Daraus resultiert ein Circulus vitiosus mit erhöhtem oxidativen Stress sowie verminderter Bioverfügbarkeit von vasoprotektivem NO und somit die Progression zur endothelialen Dysfunktion.

Neben dem hohen Stellenwert in der Aufrechterhaltung einer vaskulären Homöostase, gilt NO zudem als wesentlicher Mediator der Angiogenese und Arteriogenese. Aufgrund der zentralen Bedeutung des proangiogenetischen Effektes von NO für diese Arbeit, wird dieser Regulationsmechanismus im Abschnitt 1.2.4 separat behandelt.

1.1.2 Myokardiale Hibernation

Seit den Untersuchungen von Tennant und Wiggers im Jahr 1935, wurde bei KHK-Patienten eine abnormale regionale Kontraktion des Myokards infolge einer Ischämie mit einer irreversiblen myokardialen Nekrose gleichgesetzt.¹⁷⁰ In den letzten zwanzig Jahren zeigte sich jedoch, dass das myokardiale Gewebe einer koronaren Ischämie nicht schutzlos ausgeliefert ist, sondern über akute und chronische Adaptionsmechanismen verfügt, die das Myokard vor irreversiblen Schäden schützen. Besonders zwei Phänomene sind dabei in den Mittelpunkt des Interesses gerückt: die ischämische Präkonditionierung sowie die myokardiale Hibernation.

Das Phänomen der ischämischen Präkonditionierung gilt als einer der stärksten protektiven Mechanismen gegen eine ischämische Herzmuskelschädigung. Murry et al. demonstrierten im Jahr 1986, dass mehrere Episoden kurzdauernder Ischämien mit anschließender Reperfusion zu einer erhöhten Toleranz des Herzens gegenüber einer längerdauernden Ischämie führen, ohne dabei kumulativ irreversible Schäden am Myokard zu verursachen.¹²⁴

Nach einem präkonditionierenden Stimulus lassen sich zwei Phasen der schützenden Anpassung beobachten: die frühe Phase, welche einen stärkeren Einfluss auf die Infarktgröße zu

haben scheint und nach ein bis drei Stunden endet,¹²⁴ sowie die späte Phase, auch *second window of protection* genannt, welche nach 24 Stunden auftritt und bis zu drei Tage dauert.¹⁹⁶ Im Gegensatz zur frühen Phase besteht während des zweiten Fensters ein ausgeprägter, NO-vermittelter Schutz gegen eine prolongierte postischämische Dysfunktion (*stunning, s.u.*).¹⁷ Der protektive Effekt der ischämischen Präkonditionierung kann dabei auch in reizfernen Myokardarealen nachgewiesen werden,¹³⁷ bietet jedoch keinen effektiven Schutz vor den Folgen eines definitiven Koronarverschlusses, der länger als 90 Minuten anhält.¹²⁶ Dennoch zeigte sich beispielsweise bei Patienten mit Angina pectoris maximal 24 Stunden vor dem Infarktereignis eine geringere Infarktgröße sowie Komplikationsrate als bei Patienten, die keine vorangegangenen pectanginösen Beschwerden hatten.⁸⁵

Der Begriff der myokardialen Hibernation beschreibt den Zustand einer anhaltenden subakuten oder chronischen Myokardischämie, bei welcher sich die kontraktile Funktion und damit der Energiebedarf des Herzens an die reduzierte koronare Perfusion bzw. das reduzierte Energieangebot adaptiert. Das Herzmuskelgewebe wird dabei durch Reduktion des myokardialen Metabolismus sowie der Kontraktilität vor einer Infarzierung geschützt und kann bei Wiederherstellung eines adäquaten Blutflusses die kontraktile Funktion partiell oder vollständig wiedererlangen.¹⁴¹ Zur Beschreibung dieses Phänomens prägte Ross im Jahr 1991 den Ausdruck des Perfusions-Kontraktions-Gleichgewichts (*perfusion-contraction matching*).¹⁴²

Das Modell der myokardialen Hibernation widersprach jedoch der bis dahin verbreiteten Annahme, dass eine myokardiale Ischämie durch ein Ungleichgewicht zwischen koronarem Blutfluss und Kontraktilität gekennzeichnet ist. Vor diesem Hintergrund wurde von Hearse eine Unterscheidung zwischen biochemischer und physiologischer Ischämie vorgeschlagen.⁶⁶ Bei der biochemischen Ischämie versucht das Herz, trotz des mangelnden Energieangebots sowie auf Kosten des metabolischen Gleichgewichts und der zellulären Integrität, die kontraktile Funktion aufrecht zu erhalten. Demgegenüber wird im Rahmen der physiologischen Ischämie dieses Ungleichgewicht aufgehoben. Im Sinne des Perfusions-Kontraktions-Gleichgewichts kommt es zu einer proportionalen Adaption der Kontraktilität an die vorherrschende Perfusion und in Folge dessen - auf Kosten einer verminderten Variabilität der Herzleistung - zu einem protektiven Effekt auf das Myokard.^{66,74}

Darüber hinaus grenzte Ross, abhängig von der Dauer der Myokardischämie, die Kurzzeit-Hibernation (Stunden, Tage) von der Langzeit-Hibernation (Wochen, Monate) ab. Die Grundvoraussetzung für die Entwicklung einer myokardialen Hibernation ist indes eine gewisse

Restdurchblutung des Gewebes. Das Myokard toleriert eine subendokardiale Durchblutung von 0,17 ml/min/g bzw. eine transmurale Durchblutung von 0,25 ml/min/g (etwa 25 bis 30 % der Ruhedurchblutung).^{142,154} Eine weitere Reduktion der Perfusion bzw. eine konstante Steigerung des Energiebedarfs würde letztlich in einer Infarzierung des Gewebes münden.

Unmittelbar nach der Reduktion der koronaren Perfusion treten Störungen des metabolischen Gleichgewichts im Herzmuskelgewebe auf, infolge derer ein Anstieg der Laktatproduktion und des koronarvenösen pCO₂ sowie ein Abfall des koronarvenösen pH und des Kreatinphosphatgehalts beobachtet werden kann.¹⁵³ Insbesondere die Anreicherung von anorganischen Phosphaten aus dem Abbau von ATP sowie Kreatinphosphat wird in diesem Zusammenhang für die frühe myokardiale Funktionseinschränkung verantwortlich gemacht.¹¹¹ Im Rahmen der Kurzzeit-Hibernation erholen sich die genannten Parameter jedoch kontinuierlich wieder, wenngleich die regionale Minderperfusion und somit die myokardiale Dysfunktion bestehen bleibt. Bei unveränderter, aber anhaltender eingeschränkter Durchblutung kann nach 12 bis 24 Stunden eine weitere Reduktion der Kontraktilität gemessen werden, die wiederum mit einer Abnahme des myokardialen Sauerstoffverbrauchs einhergeht.³⁸ Kennzeichnend in der frühen Phase der Hibernation ist die mögliche Steigerung der Kontraktilität mit Dobutamin und Kalzium, während bei irreversibel geschädigtem Myokard dieser Versuch erfolglos bleibt. Die diagnostisch und therapeutisch nutzbare Stimulation der inotropen Reserve kann allerdings wiederum eine Dysbalance zwischen Energieangebot und Energiebedarf auslösen und gefährdet dadurch die Vitalität des hibernierenden Myokards.^{73,153,154}

Die der Kurzzeit-Hibernation zugrunde liegenden Mechanismen sind großteils noch ungeklärt. Sowohl eine Beteiligung der β -Rezeptoren als auch die oben genannten Effekte der ischämischen Präkonditionierung können weitestgehend ausgeschlossen werden, jedoch tritt eine Störung der elektromechanischen Kopplung auf.^{38,154} Dabei ist die Ansprechbarkeit des Myokards auf Kalzium reduziert, wobei insbesondere die maximal zu rekrutierende Kraft und nicht die Empfindlichkeit der Myofibrillen herabgesetzt ist.⁷³

Eine chronische Hibernation kann sich im Rahmen verschiedener Ausprägungen der KHK manifestieren: bei Patienten mit stabiler oder chronisch instabiler Angina pectoris, im nicht nekrotischen Gewebe nach einem Myokardinfarkt und bei Patienten mit Herzinsuffizienz. Dieser Zustand zur Zeit ausschließlich klinisch definiert und beschreibt eine chronisch andauernde, schmerzlose ischämische Dysfunktion, die sich nach Reperfusion bessert.^{38,141} Darüber hinaus geht die chronische Hibernation mit charakteristischen, progressiven morphologischen Verän-

derungen einher, die mit dem Grad der Hypoperfusion korrelieren:⁴⁰

- Verlust von Myofilamenten
- Desorganisation des Zytoskeletts bzw. der Sarkomere
- flächenhafte Einlagerung von Glykogen
- Funktionsverlust der Mitochondrien
- Reduktion des sarkoplasmatischen Retikulums
- Zunahme der interstitiellen Fibrose

Die Ausprägung der morphologischen Alterationen bestimmt die Dauer und den späteren Grad der Erholung der kontraktile Funktion nach Revaskularisation.⁴⁰

Des Weiteren spielt das sogenannte repetitive *stunning* eine wesentliche Rolle in der Entstehung von chronisch dysfunktionalem, vitalem Myokard. Der Begriff *stunning* beschreibt das Phänomen einer prolongierten postischämischen kontraktile Dysfunktion, obwohl eine normale Perfusion wieder gegeben ist und keine irreversiblen Schäden entstanden sind.¹⁶ In einer wegweisenden Arbeit zeigte Tillisch bei Patienten mit nicht kontraktile Myokardarealen, dass beide Phänomene gemeinsam auftreten können.¹⁷³

Letztendlich besteht die Therapie sowohl des hibernierenden, als auch des *stunned* Myokards in der umgehenden Revaskularisation, weshalb eine Differenzierung zwischen beiden Entitäten klinisch von untergeordneter Bedeutung zu sein scheint.¹⁴³ Die Besserung der kontraktile Funktion kann dabei bereits während oder frühzeitig nach der Reperfusion eintreten, kann aber auch mehrere Monate beanspruchen.^{38,51}

1.2 Vaskuläres Wachstum und Remodeling

Zur Aufrechterhaltung einer normalen Funktion müssen die Herzmuskelzellen über das koronare Gefäßsystem ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden. Bei einer chronischen Ischämie des Myokards reagiert der Körper, neben der zuvor beschriebenen protektiven myokardialen Hibernation, vornehmlich mit drei Adaptionsmechanismen, welche ein vaskuläres Wachstum und Remodeling induzieren und in der Folge zu einer verbesserten Perfusion des unterversorgten Herzmuskelgewebes beitragen. Die *Angiogenese* beschreibt die Neubildung von Blutgefäßen durch Aussprossung oder Intussuszeption von Kapillaren aus präexistierenden Gefäßen,

während die *Arteriogenese* das Remodeling bereits bestehender arteriöler Anastomosen zu funktionell relevanten Kollateralarterien darstellt. Der Begriff *Vaskulogenese* hingegen definiert die De-Novo-Bildung eines primitiven kapillären Gefäßplexus durch Differenzierung endothelialer Vorläuferzellen, sogenannter Angioblasten.^{26,160}

1.2.1 Angiogenese

Die Angiogenese ist ein elementarer biologischer Prozess, der pränatal bei der Embryonal- und Fetalentwicklung und postnatal im weiblichen Reproduktionssystem sowie beim Muskel- und Fettaufbau eine wichtige Rolle spielt. Im adulten Organismus tritt eine Neubildung von Blutgefäßen zudem bei Adaptions- und Reparaturvorgängen (Wundheilung, kardiovaskuläre Erkrankungen) auf. Diese physiologische oder pathophysiologische Angiogenese wird dabei durch pro- sowie antiangiogenetische Faktoren zeitlich und örtlich streng reguliert. Im Gegensatz dazu kann eine unkontrollierte, pathologische Angiogenese bei zahlreichen Erkrankungen gefunden werden, beispielsweise der proliferativen Retinopathie, der Psoriasis, der rheumatischen Arthritis sowie dem Tumorwachstum und der Tumormetastasierung.^{26,43} Der komplexe Prozess der Angiogenese ist noch nicht vollständig aufgeklärt, kann aber grundsätzlich in vier Schritte eingeteilt werden:

1. Aktivierung endothelialer Zellen durch angiogenetische Faktoren
2. Degradation der Basalmembran und der extrazellulären Matrix durch Proteinasen
3. Proliferation und Migration von Endothelzellen
4. Bildung von tubulären Strukturen und Stabilisierung durch akzessorische Zellen (Perizyten, glatte Muskelzellen)

Im ischämischen Myokard stellt eine Hypoxie des umliegenden Gewebes die treibende Kraft für die Induktion der Angiogenese dar,⁷⁸ wobei bedingt durch den reduzierten myokardialen Sauerstoffpartialdruck die lokale Bildung angiogenetischer und inflammatorischer Mediatoren (Transkriptionsfaktoren, Zytokine, Wachstumsfaktoren, Proteasen) induziert wird.⁶⁹ Im Mittelpunkt der Signalkaskade steht der *Hypoxie-induzierte Faktor* (HIF), ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, bestehend aus drei Isoformen einer α -Untereinheit sowie einer konstitutiv exprimierten β -Untereinheit.¹³⁸ Neben zahlreichen Wachstumsfaktoren und Zytokinen lösen insbesondere hypoxische Bedingungen eine Akkumulation von α -Untereinheiten aus und

führen zu einer erhöhten Bildung von HIF.¹⁵⁷ Infolge dessen stimulieren verschiedene HIF-induzierte Moleküle als auch HIF selbst die Transkription wichtiger angiogenetischer Gene und triggern damit das Gefäßwachstum. Daneben wird die Expression einiger Faktoren aber ebenso durch HIF-unabhängige Transkriptionsfaktoren in Gang gesetzt (siehe Tabelle 1.1).¹³⁸

Angiogenetischer Effekt	Stimulierende Faktoren	Einfluss von HIF
Vasodilatation	eNOS	✓
Erhöhung der Gefäßpermeabilität	VEGF	✓
	FLT-1	✓
	Kdr	⊘
Extravasation von Plasmaproteinen	VEGF	✓
Aussprossen von Endothelzellen	Angiopoietin-2	↔
	Tie-2	↔
Degradation der extrazellulären Matrix	MMP	⊘
	TIMP-1	✓
	C-P4H	✓
Endotheliale Zellproliferation und -migration	VEGF	✓
	FGF	↔
	Angiopoietine	↔
	MCP-1	↔
	PDGF	↔
Fusion der Endothelzellen und Lumenbildung	VEGF	✓
	Angiopoietin-1	⊘
	Tie-2	↔
Rekrutierung von Perizyten und glatten Muskelzellen	PDGF	↔
	TGF	?
Erhaltung, Differenzierung und Remodeling	Angiopoietin-1	⊘
	Tie-2	↔

Tab. 1.1: Einfluss von HIF auf den angiogenetischen Effekt verschiedener stimulierender Transkriptionsfaktoren

✓, direkte Transkriptionsziele von HIF; ↔, Hypoxie-sensible Gene, die durch HIF-vermittelte Signalwege induziert werden; ⊘, bislang kein direkter oder indirekter Einfluss von HIF bekannt

Zu Beginn der Angiogenese führt die Hypoxie zu einer eNOS vermittelten Vasodilatation sowie zu einer NO und HIF induzierten Synthese von VEGF, einer Familie von Proteinen,

die zu den wichtigsten angiogenetischen Mediatoren zählen. Durch Modifikation der zellulären Membranstruktur und Reorganisation von Endothel-spezifischen Adhäsionsmolekülen (PECAM-1, VE-Cadherin) erhöht VEGF zusammen mit Angiopoietin-1 die Permeabilität der Gefäße, worauf eine Extravasation von Plasmaproteinen erfolgt. Gleichzeitig locken diverse chemotaktische Mediatoren (u.a. der Tumor-Nekrose-Faktor α , das Monozytenchemotaktische-Protein, der Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierende Faktor) zahlreiche zirkulierende Monozyten in das ischämische Myokard. Dort wandern diese in das Gewebe ein, differenzieren zu Makrophagen und sezernieren mehrere angiogenetische Faktoren (u.a. Fibroblasten-Wachstumsfaktor) sowie Matrixmetalloproteinasen, welche an der Degradation der Basalmembran und der extrazellulären Bindegewebmatrix beteiligt sind. Im weiteren Verlauf wird mittels einer komplexen Interaktion von Wachstumsfaktoren, Differenzierungsfaktoren sowie den entsprechenden Rezeptoren, welche aufgrund der Hypoxie ebenfalls hochreguliert sind, die Migration und Proliferation von Endothelzellen eingeleitet. Dabei wachsen die endothelialen Zellen zunächst als solide Stränge in das aufgelöste Bindegewebe ein und formen erst nachträglich ein Gefäßlumen. Dies wird durch eine Verdünnung der Endothelzellen, eine Apoptose Matrix-ferner Zellen sowie durch eine Fusion existierender Gefäße ermöglicht. Zur Stabilisierung der Struktur neugebildeter Gefäße werden letztendlich mit Hilfe verschiedener Faktoren (u.a. *platelet derived growth factor*, *transforming growth factor*) Perizyten und glatte Muskelzellen rekrutiert, welche sich an das Gefäß anlagern und zudem selbst Wachstumsfaktoren, Zytokine und vasoaktive Proteine synthetisieren.^{25,69,138}

1.2.2 Arteriogenese

Im Gegensatz zur Angiogenese wird ein arteriogenetischer Prozess vor allem durch eine mechanische Stimulation ausgelöst. Der initiale Trigger der Arteriogenese ist eine hämodynamisch relevante Stenose einer Koronararterie, die zu einer Abnahme des poststenotischen Perfusionsdruckes und aufgrund des hohen Druckgradienten anschließend zu einer Umleitung des Blutflusses in präexistierende Arteriolen führt. Infolge der gesteigerten Durchblutung dieser arterio-arteriolären Anastomosen, welche im physiologischen Zustand nicht oder nur begrenzt an der Blutzirkulation beteiligt waren, werden die Gefäßwände einer gesteigerten Schubspannung (*shear stress*, SS) ausgesetzt.^{23,68} Die physiologische Reaktion auf die Wand-

schubspannung ist eine initiale Schwellung sowie die Aktivierung endothelialer Zellen über SS-spezifische Sensoren, wobei mittels sogenannter *shear stress response elements* (SSRE) die Expression zahlreicher SS-sensibler Gene initiiert wird.⁵⁵ Dadurch kommt es zur Induktion von eNOS sowie zu einer gesteigerten Synthese von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM) und diversen Zytokinen (v.a. MCP-1, GM-CSF, TNF- α und TGF- β), woraufhin angelockte Monozyten an die Gefäßwand adhäreren und in das Bindegewebe migrieren. Die Monozyten oder - nach ihrer Transformation - Makrophagen sind im weiteren Verlauf sowohl bei der Induktion der Proliferation vaskulärer Zellen, als auch im Rahmen des vaskulären Remodeling von entscheidender Bedeutung. Durch Produktion verschiedener Wachstumsfaktoren, darunter zahlreiche der FGF-Familie (u.a. FGF-2), wird die Proliferation von Endothelzellen sowie vaskulärer glatter Muskelzellen stimuliert. Darüber hinaus sind auch andere zirkulierende Zellen wie Lymphozyten oder spezielle Vorläuferzellen über parakrine Mediatoren an diesen Vorgängen beteiligt.^{23,68} Gleichzeitig wird mit Hilfe von Fibronektin, Proteoglykanen sowie Proteasen, insbesondere Matrixmetalloproteinasen, die Gefäßwand sowie die extrazelluläre Matrix der Arteriole moduliert und somit ein Raum für die Erweiterung der arteriellen Gefäße geschaffen. Dadurch können sich die Kollateralarterien bis auf das 20-fache erweitern und führen infolge dessen zu einer zügigen Abnahme der Wandschubspannung, welche ein Grund dafür sein könnte, dass die spontane Arteriogenese vorzeitig gestoppt wird und somit nur ungefähr 35-40 % des ursprünglichen Blutflusses wiederhergestellt werden. Die Kollateralarterien bilden initial eine typische korkenzieherähnliche Struktur, können jedoch im weiteren Verlauf häufig nicht mehr von normalen Arterien unterschieden werden.^{23,25,68,69,160}

Obwohl die Arteriogenese einige Mechanismen mit der Angiogenese gemein hat und beide Prozesse sich gegenseitig ergänzen, sind die spezifischen Signalwege und die resultierenden Effekte trotzdem unterschiedlich. Während die Angiogenese eine Anpassungsreaktion des ischämischen Myokards an die Hypoxie darstellt und dabei vorwiegend zur metabolischen Adaption beiträgt, ist insbesondere durch die Arteriogenese eine partielle Regeneration der Durchblutung möglich. Im Rahmen einer effizienten Neovaskularisation ist die Induktion der Angiogenese zum Schutz der zellulären Integrität aber dennoch unerlässlich.

1.2.3 Vaskulogenese

Die Bildung des Blutgefäßsystems im Rahmen der Embryonalentwicklung wird neben der Angiogenese vor allem durch die Vaskulogenese gesteuert. Zu Beginn differenzieren mesenchymale Zellen in situ zu frühen Hämangioblasten, um sich anschließend zu zellulären Aggregaten, sogenannten Blutinseln, zu formieren. In der Folge entwickeln sich die inneren Zellen dieser Inseln zu hämatopoetischen Vorläuferzellen, während die äußere Zellpopulation zu primitiven endothelialen Zellen differenziert. Durch Fusion der Endothelzellen bildet sich zunächst ein einfaches kapilläres Netzwerk, aus dem sich im weiteren Verlauf durch eine Hypoxie-vermittelte Angiogenese ein komplexes Gefäßsystem entwickelt.^{25,160}

Lange Zeit wurde vermutet, dass eine Vaskulogenese ausschließlich in der Embryonalentwicklung stattfindet, während die Angiogenese sowohl pränatal als auch postnatal eine Rolle spielt. In den letzten Jahren konnten jedoch mehrere Untersuchungen zeigen, dass adulte Stammzellen sowie diverse Vorläuferzellen auch postnatal an Neovaskularisationsprozessen beteiligt sind.²⁴ Dabei wurde angenommen, dass sich diese Zellen ähnlich wie bei der embryonalen Vaskulogenese direkt in die Gefäßwand inkorporieren. Nach neueren Untersuchungen wird diesen Zellen allerdings eine vorwiegend parakrine Aktivität oder eine Rolle als monozytäre Vorläuferzellen zugesprochen.⁶⁸

1.2.4 Die Bedeutung von Stickstoffmonoxid im postischämischen Revaskularisationsprozess

In den letzten zehn Jahren mehrten sich die Hinweise darauf, dass im Rahmen des vaskulären Wachstums und Remodelings die Bioverfügbarkeit von NO eine Schlüsselrolle einnimmt. Anhand endothelialer Zellkulturen konnte zunächst gezeigt werden, dass diverse NO-Analoga oder -Donoren in der Lage sind angiogenetische Prozesse zu induzieren.⁶ Unbehandelte Endothelzellen beginnen frühestens 24 Stunden nach der Plattierung kapilläre Strukturen zu formen und schließen diese Entwicklung erst nach etwa 48 Stunden ab. Durch Stimulation der Zellen mit dem NO-Donor S-nitro-N-acetyl-penicillamine (SNAP) kann die Zeit bis zur Ausbildung kapillärer Strukturen signifikant verkürzt werden, wobei dosisabhängig bereits nach vier Stunden 93 % der Entwicklung abgeschlossen sind.⁸⁰ Weitere Untersuchungen belegten, dass die

exogene Supplementierung von NO auch in vivo angiogenetische Effekte auf Endothelzellen ausüben kann und dabei unter anderem die endotheliale Zellproliferation und -migration fördert.¹⁹⁸

Im lebenden Organismus kann die Produktion von NO durch endogene Mechanismen gesteigert werden. Im Zuge eines postischämischen Revaskularisationsprozesses kann die primäre Expression von eNOS entweder durch hämodynamische Veränderungen mit erhöhter Wand Schubspannung (siehe Abschnitt 1.2.2),¹⁶⁹ oder durch eine Hypoxie des Gewebes mit nachfolgender Synthese von HIF hochreguliert werden (siehe Abschnitt 1.2.1).¹⁹⁴

Tierexperimentelle Untersuchungen an Hinterläufen von Kaninchen zeigten, dass nach einer Ischämie eine vermehrte Synthese von eNOS mRNA respektive eNOS in hypoperfundierten Arealen auftritt und letztlich eine erhöhte Konzentration von cGMP, einem für NO sensiblen *second messenger*, gemessen werden kann.^{107,123} Daneben werden über einen mechanischen Reiz innerhalb weniger Sekunden die eNOS Aktivität (Lipidierung, Phosphorylierung, Glykosylierung, Nitrosylierung) sowie bei längerer Stimulation die Transkription und Stabilität der eNOS mRNA moduliert (Protein-Tyrosin-Kinase c-Src, Transkriptionsfaktor KLF2, microRNA).⁸ Dabei gilt vor allem die Phosphorylierung an Serin-1177 (S1177) mit nachfolgender Aktivierung des Phosphoinositid-3-Kinase sowie des Akt/PKB Signalweges als zentraler Mechanismus für eine Calcium-Calmodulin-unabhängige Stimulation der NO-Synthese.³⁴ Darüber hinaus kann eine sekundäre Expression von eNOS durch verschiedene angiogenetische Moleküle induziert werden. Insbesondere die Faktoren der VEGF-Familie, die zu den zentralen Regulatoren der Angiogenese gehören, können durch eine Erhöhung der Calcium-Konzentration, durch die Rekrutierung von Hsp-90 oder durch eine aktivierende Phosphorylierung die Synthese von eNOS auslösen. Zusätzliche Untersuchungen zeigten des Weiteren, dass auch andere Faktoren wie beispielsweise PDGF, Angiopoietin-1, Prostaglandin E₂ oder Bradykinin die Expression von eNOS steigern können.¹⁰⁷ Gleichzeitig ist NO jedoch selbst in der Lage zahlreiche angiogenetische Faktoren und Signalwege zu modulieren.³⁹

In der Literatur gilt NO infolge dessen als ein zentraler Mediator verschiedener angiogener Stimuli und ist in komplexer - und zum Teil ungeklärter - Weise an vielen Prozessen einer postischämischen Revaskularisation beteiligt. Dabei partizipiert NO nicht nur an der elementaren Regulation des Gefäßtonus sowie an der endothelialen Zellproliferation und -migration,⁸³ sondern ist auch an der Degradation der extrazellulären Matrix,¹⁶⁸ an der Modulation von Adhäsionsmolekülen sowie an der Inhibierung einer Apoptose beteiligt.³⁵ Außerdem

unterstützt NO die Mobilisierung von hämatopoetischen Stammzellen bzw. von endothelialen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark,² und nimmt somit maßgeblich an der Ausbildung neuer Gefäßstrukturen im Rahmen des vaskulären Wachstums und Remodelings teil.

Die Bedeutung von NO im postischämischen Revaskularisationsprozess kann letztendlich mit folgenden Beobachtungen zusammengefasst werden:

- im postischämischen Gewebe kommt es zu einer erhöhten Expression von eNOS und infolge dessen zu einer gesteigerten Synthese von NO
- pharmakologische Hemmung oder Genzerstörung von eNOS führen zu einer Abnahme der NO-Konzentration und folglich zur Drosselung der ischämie-induzierten Revaskularisation
- eine Supplementierung von NO mittels exogener NO Analoga bzw. Donatoren oder eine Konzentrationserhöhung des endogenen NO stellen eine ischämie-induzierte Revaskularisation wieder her

Die bei kardiovaskulären Risikofaktoren bzw. vaskulären Erkrankungen auftretende endotheliale Dysfunktion ist wie in Abschnitt 1.1.1 beschrieben mit einer reduzierten Bioverfügbarkeit von NO assoziiert. Dieser Zustand kann letztlich zu einer reduzierten Fähigkeit des Körpers führen, im Rahmen von Reparatur- oder Adaptionsvorgängen eine effektive Neovaskularisation zu induzieren.

1.3 Therapeutische Neovaskularisation bei koronarer Herzerkrankung

Auf Grund der Fortschritte bei konservativ-medikamentösen sowie invasiven Behandlungsverfahren (perkutane transluminale koronare Angioplastie (PTCA), koronare Bypass-Operation), steigt die Zahl der Patienten mit fortgeschrittener koronarer Herzerkrankung, die einer derartigen Therapie nicht mehr zugänglich sind.¹²² In der Regel können die Patienten wegen diffuser oder multipler koronarer Atherosklerose, vorangegangener Operationen, spezieller Komorbiditäten oder anderer Kontraindikationen nicht suffizient interventionell behandelt werden und bleiben trotz maximaler Therapie symptomatisch. Die therapeutische Revaskularisation mit

Induktion eines vaskulären Wachstums und Remodelings bietet daher eine optimale Möglichkeit die myokardiale Blutversorgung dieser sogenannten *no-option* Patienten zu verbessern.¹⁷⁶

In den letzten zwanzig Jahren wurden zahlreiche Wachstumsfaktoren in tierexperimentellen und klinischen Studien intensiv untersucht. Allerdings durchliefen nur wenige den Prozess von in vitro Studien zu präklinischen und klinischen Phase II Studien, darunter unter anderem FGF-2 sowie VEGF-A₁₆₅. Anhand verschiedener Untersuchungen an Schweinen und Hunden mit experimenteller chronischer Myokardischämie konnte initial gezeigt werden, dass durch die Verabreichung von VEGF oder FGF-2 ein vaskuläres Wachstum und Remodeling induziert wird.^{9,104,133,136,180} Zudem belegten Phase I Studien für VEGF und FGF-2 die Verträglichkeit und Sicherheit der Anwendung am Menschen.^{70,71,181} Während jedoch erste *open-label*-Studien mit VEGF-A, FGF-1 und FGF-2 noch eine signifikante Verbesserung der myokardialen Durchblutung und Funktion aufwiesen,^{70,95,155} konnten in zwei größeren randomisierten Doppelblind-Studien (VIVA-Studie¹ für VEGF-A₁₆₅, FIRST-Studie² für FGF-2) keine signifikanten Therapieerfolge im Vergleich zur Placebogruppe dokumentiert werden.^{72,161}

Infolge dieser enttäuschenden Ergebnisse wurden verschiedene mögliche Gründe diskutiert, weshalb die vielversprechenden präklinischen Resultate in den klinischen Studien nicht umgesetzt werden konnten. Neben des weiterhin mangelnden Verständnisses der genauen Mechanismen einer Revaskularisation bei chronisch myokardialer Ischämie sowie der Wahl und der Dosis der verabreichten Substanz, steht bis heute der Applikationsmodus im Mittelpunkt der Diskussion.

1.3.1 Applikationsmodus

Im Rahmen einer neovaskularisierenden Behandlung können proangiogenetische oder proarteriogenetische Substanzen entweder konventionell als rekombinante humane Proteine oder als ihr kodierendes Gen, d.h. mittels Gentransfer, eingesetzt werden. Im Vergleich zur Gentherapie ist durch die Infusion von Proteinen grundsätzlich eine präzisere Dosis-Wirkungs-Beziehung zu erzielen. Damit es allerdings zu einer stabilen Neubildung von Gefäßen kommt,

¹ *Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis*: intravenöse und intrakoronare Infusion von rekombinantem VEGF-A₁₆₅

² *FGF Initiating Revascularization Trial*: intrakoronare Infusion von rekombinantem FGF-2

ist eine ausreichend lange Verweildauer des gefäßbildenden Wachstumsfaktors im Myokard erforderlich.¹⁶² Auf Grund der kurzen Halbwertszeit bzw. Wirkungsdauer der Proteine sind daher nicht nur hohe Konzentrationen, sondern auch repetitive Behandlungen notwendig, um eine adäquate myokardiale Aufnahme unabhängig von der Applikationsroute zu erreichen.⁷⁶ Infolge dessen steigt zum einen die Gefahr potentieller systemischer Nebenwirkungen (Hypotonie und Ödeme bei VEGF sowie Anämie, Thrombozytopenie und Nephrotoxizität bei FGF),^{29,62,114} zum anderen gehen repetitive Behandlungen mit einer größeren Belastung für den Patienten sowie mit zusätzlichen Kosten einher.¹⁰¹

Im Gegensatz dazu ist die Gentherapie mit geeigneten lang exprimierenden Vektoren in der Lage, bereits nach einer einmaligen Behandlung eine anhaltende Synthese von Wachstumsfaktoren zu induzieren.¹⁵⁹ Zudem kann die Synthese und Sekretion von gefäßbildenden Substanzen auf einen bestimmten Zelltyp (beispielsweise Endothelzellen) beschränkt werden. Da für eine hohe Transfektionsrate des kodierenden Gens eine ausreichend hohe Konzentration der Genvektoren am Zielgebiet erforderlich ist,^{101,159} kamen in den letzten Jahren - auch infolge verbesserter Vektoren sowie geringerer systemischer Nebenwirkungen - vermehrt gentherapeutische Ansätze mit lokalen Freisetzungsmethoden zur Anwendung.¹⁶²

Die intraperikardiale Injektion mittels PTCA bietet auf Grund der Reservoirfunktion des Perikards den theoretischen Vorteil einer länger dauernden Kontaktzeit zwischen Wirkstoff und Gewebe. In tierexperimentellen Studien konnte eine effiziente Transfektionsrate mit Hilfe von adenoviralen Vektoren gezeigt werden, jedoch erbrachten Untersuchungen zur kardialen Perfusion und Funktion zwiespältige Ergebnisse. Darüber hinaus ist die praktische Durchführbarkeit am Patienten mit schwerer KHK oft eingeschränkt, da viele am Herzen voroperiert sind und daher keinen ausreichenden perikardialen Raum zur Verfügung haben.^{87,159}

Die intrakoronare (arterielle) Gabe ist in einem Herzkatheterlabor relativ einfach durchführbar und kann bei den meisten Patienten mit KHK angewandt werden.¹⁵⁹ Trotz der gezielten Freisetzung der Substanz in das koronare Gefäßsystem weist die intrakoronare Applikation eine relativ ineffektive myokardiale Retention auf. Laham et al. konnten zeigen, dass eine Stunde nach Injektion eines einzelnen Bolus lediglich 0,88 % der gesamten Menge im Myokard verbleiben und nach 24 Stunden die Retention auf 0,05 % absinkt.⁹⁶ Bedingt durch den koronararteriellen Blutfluss wird die applizierte Substanz zügig ausgewaschen und gelangt in den systemischen Kreislauf, wo ein Großteil der Faktoren letztendlich in die Leber gelangt und dem *First-Pass*-Effekt unterliegt.^{87,162} In tierexperimentellen Studien konnte die intrakoronare

Gabe daher nur bei Verlängerung der Kontaktzeit (Minipumpe, Doppelballon-Katheter, u.a.) signifikante Ergebnisse erzielen,^{104,179} jedoch können diese Techniken nicht am Patienten angewandt werden. Klinische Phase I und II Studien bestätigen in der Folge die Verträglichkeit und Sicherheit der intrakoronaren Injektion,⁶⁷ allerdings zeigten nur vereinzelte Studien erfolgreiche Resultate bezüglich der myokardialen Durchblutung und Funktion.^{58,134}

Die intramyokardiale Applikation gefäßbildender Substanzen kann entweder transepikardial im Rahmen einer Thorakotomie bzw. Thorakoskopie oder transendokardial im Zuge einer Herzkatheteruntersuchung erfolgen.⁸⁷ Während der transepikardiale Zugang auf Grund des hohen interventionellen Risikos und der erheblichen Kosten in seiner praktischen Umsetzbarkeit am Patienten limitiert ist, hat sich die transendokardiale intramyokardiale Injektion in den letzten Jahren zur bevorzugten Behandlungsstrategie für eine therapeutische Revaskularisation entwickelt.¹⁴⁰ Im Vergleich zu intraperikardialen und intrakoronaren Verfahren ist die transendokardiale Applikation durch eine höhere Transfer- und Retentionsrate im Herzmuskelgewebe sowie durch eine geringere systemische Rezirkulation der injizierten Substanzen gekennzeichnet.^{63,87} Da ein Großteil der Faktoren über den Stichkanal sowie über das Blut- oder Lymphsystem wieder ausgewaschen wird und nur ungefähr 43 % im Myokard erhalten bleiben, ist auch diese Technik mit einer ungenügenden Retention der applizierten Moleküle assoziiert.⁶⁰ Zudem führt die Injektion durch eine Nadel zu einer limitierten räumlichen Verteilung des Arzneimittels. Nachdem in experimentellen Untersuchungen an Tieren teilweise gute therapeutische Ergebnisse erzielt worden waren,^{148,174} konnte in klinischen Phase I Studien die Verträglichkeit und Sicherheit der Anwendung am Patienten gezeigt werden.¹⁸² Allerdings fehlt bislang ein klarer Nachweis eines signifikanten therapeutischen Nutzens in randomisierten und doppelblinden klinischen Phase II Studien.^{44,48,105}

Der klinische Erfolg der therapeutischen Neovaskularisation mit Induktion eines vaskulären Wachstums und Remodelings ist somit unter anderem wegen des Fehlens eines effizienten und am Patienten anwendbaren Applikationsverfahrens eingeschränkt. Die entscheidenden Kriterien sind dabei zum einen die Verlängerung der Kontaktzeit zwischen Wirkstoff und Gewebe - und damit eine höhere Transfektionsrate - sowie zum anderen eine gleichmäßigere Verteilung der applizierten Substanz. Das System der selektiven druckregulierten Retroinfusion stellt in diesem Zusammenhang einen vielversprechenden Ansatz für eine selektive, homogene und effektive Applikation von gefäßbildenden Faktoren dar.

1.3.2 Das System der selektiven druckregulierten Retroinfusion

Bereits seit mehr als hundert Jahren ist der Koronarsinus als alternativer Zugangsweg für kardiale Eingriffe bekannt und war in der Herzchirurgie, bis zur Einführung perkutaner Koronarinterventionen Ende der 70er Jahre, ein populäres Konzept zur Behandlung einer myokardialen Ischämie.^{117,118} Im Zuge der Entwicklung neuer Techniken und Materialien für die Herzkatheteruntersuchung sowie der Entdeckung potenter angiogenetischer und arteriogenetischer Faktoren, hat vor allem die selektive venöse Retroinfusion neues Interesse erlangt. Dabei stehen insbesondere drei Therapieverfahren zur Behandlung von Patienten mit schwerer KHK im Mittelpunkt aktueller Forschung: Erstens, die chronische Arterialisierung von Koronarvenen zur retrograden Perfusion ischämischen Myokards; zweitens, die regionale Applikation von kardioprotektiven Arzneimitteln, Genen oder Zellen im Rahmen eines akuten Myokardinfarkts; und drittens, die für diese Arbeit relevante retrograde Infusion von Proteinen, Genen oder Zellen zur Induktion eines vaskulären Wachstums und Remodelings im chronisch ischämischen bzw. hibernierenden Myokard.¹⁵

Die venösen Gefäße des Herzens bleiben selbst bei fortgeschrittener KHK von atherosklerotischen Veränderungen überwiegend unbeeinflusst. Darüber hinaus verfügen die Koronarvenen auf Grund ihrer dichten netzwerkartigen Struktur im normalen Zustand über eine ungenutzte Volumenkapazität und stellen somit eine attraktive Applikationsroute zur homogenen Verteilung gefäßbildender Substanzen dar.¹¹⁷ Das System der selektiven druckregulierten Retroinfusion (SSR) ist ein von Boekstegers et al. entwickeltes, klinisch anwendbares Verfahren, welches die Koronarvenen zur retrograden Infusion von arteriellem Blut und kardioprotektiven Substanzen nutzt.^{11,13,187} Die Durchführbarkeit, Sicherheit und Wirksamkeit dieser Methode zur Myokardprotektion bei akuter Ischämie wurde in klinischen Studien mehrfach nachgewiesen.^{12,54}

Daneben wird dieses Verfahren in tierexperimentellen Studien als neue Applikationsroute für Proteine, Gene oder Zellen bei chronischer Myokardischämie eingesetzt. Angiographische Studien an Schweinen und Menschen konnten zeigen, dass im Vergleich zur antegraden (arteriellen) Infusion die Passagezeit von Kontrastmittel dank des SSR zehnfach verlängert werden kann.¹⁴ Ähnliche Untersuchungen bestätigten eine längere Kontaktzeit zwischen Wirkstoff und Gewebe und konnten infolge dessen eine deutlich vermehrte Gewebebindung der Substanz im Myokard beobachten (u.a. β -Blocker, Kalziumantagonisten).^{64,116,149} Weitere Experimente be-

legten, dass durch die druckregulierte Retroinfusion eine selektive Applikation am Zielort ermöglicht wird und daraus keine unerwünschten systemischen Nebenwirkungen oder negative lokale Effekte am nicht-ischämischen Myokard resultieren.^{12,14,188} Mit dem Ziel einer verbesserten Transfektion wurde daher ein neues Verfahren zur perkutanen transluminalen retrograden Genfreisetzung entwickelt, welches die genannten Vorteile des SSR ausschöpft.¹⁴ In einer tierexperimentellen Untersuchung zeigte sich in der Folge, dass der Gentransfer mittels SSR im Vergleich zu intramyokardialen Injektionstechniken zu einer verstärkten und homogeneren transmuralen Genexpression im Zielareal führt.¹⁴⁰

1.3.3 Liposomale Transfektion von komplementärer DNA (cDNA)

Im Rahmen einer neovaskularisierenden Therapie stehen verschiedene Vektoren für einen Gentransfer gefäßbildender Faktoren zur Verfügung, darunter Plasmide, Adeno-assoziierte Viren und Liposomen. In der vorliegenden Arbeit wurde den Versuchstieren liposomale eNOS S1177D komplementäre DNA retrograd in die Koronarvene infundiert. Liposomale Vektoren zeichnen sich durch eine einfache Herstellung, eine fehlende Pathogenität und eine geringe Immunogenität aus, weisen aber eine niedrigere Transfektionsrate als virale Genvektoren auf. Die Transfektion mit liposomalen Vektoren führt dabei lediglich zu einer transienten Genexpression über wenige Tage. Im Rahmen einer therapeutischen Neovaskularisation hat eine limitierte Bildung des gefäßbildenden Faktors den Vorteil, dass unerwünschte Nebenwirkungen, wie beispielsweise eine kontinuierliche, pathologische Angiogenese, vermieden werden.⁹⁷ Die Phosphorylierung von eNOS an Serin-1177 (S1177) mit nachfolgender Aktivierung des Phosphoinositid-3-Kinase- sowie des Akt/PKB-Signalweges gilt als zentraler Mechanismus für die Stimulation der NO-Synthese.³⁴ Bei der mutanten Form von eNOS, welche statt Serin-1177 das phosphomimetische Aspartat enthält (eNOS S1177D), wird dieser Phosphorylierungsschritt umgangen, wodurch eNOS konstitutiv aktiv ist und es zu einem signifikanten Anstieg der NO-Synthese kommt.^{34,49}

1.4 Fragestellung

Die therapeutische Neovaskularisation im chronisch ischämischen, hibernierenden Myokard setzt sich das Ziel, die zelluläre Integrität sowie die myokardiale Funktion nach ischämischer Schädigung wiederherzustellen. Das vaskuläre Wachstum und Remodeling bedarf dabei einer streng regulierten und koordinierten Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Proteasen sowie verschiedener an der Gefäßbildung beteiligter Zellen. Stickstoffmonoxid ist ein zentraler Mediator zahlreicher angiogenetischer und arteriogenetischer Prozesse. Die Induktion der Signalwege, die zu einer erhöhten Bioverfügbarkeit von NO führen, gelten daher als vielversprechender Ansatz neuer revaskularisierender Behandlungsstrategien.

Neben der Wahl des geeigneten Agens stellt insbesondere der gewählte Applikationsmodus einen limitierenden Faktor für die Wirksamkeit und nicht zuletzt der Anwendbarkeit in der klinischen Praxis dar. Vielversprechende Ergebnisse zeigte diesbezüglich das System der selektiven druckregulierten Retroinfusion. Gegenstand der vorliegenden Arbeit war daher die therapeutische Neovaskularisation im chronisch ischämischen Myokard mittels retrograder Infusion liposomaler eNOS S1177D cDNA. Folgende Fragestellungen sollten dabei erstmals am porcinen Großtiermodell beantwortet werden:

1. Ist durch die retrograde Infusion von eNOS S1177D cDNA in die Koronarvene eine effektive Transfektion mit signifikanter Steigerung der Synthese von Stickstoffmonoxid zu erzielen?
2. Welchen Einfluss hat eine erhöhte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid auf Proliferation vaskulärer Zellen, die Bildung neuer kapillärer Strukturen sowie auf die Bildung kollateralisierender Anastomosen?
3. Inwieweit wirkt sich eine nachweisbar induzierte Angiogenese und Arteriogenese auf den regionalen myokardialen Blutfluss aus?
4. Welchen Effekt hat eine erhöhte, teilweise regenerierte Perfusion im hibernierenden Myokard auf die globale und regionale myokardiale Funktion?

2 Material und Methoden

Die vorliegende Studie wurde in der Abteilung für Kardiologie der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des Universitätsklinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU) unter der Leitung von Prof. Dr. med. Gerhard Steinbeck ausgearbeitet.

2.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Arzneimittel

Geräte

Beatmungsgerät	Ventilog®, Dräger (Lübeck)
Blutgasanalyse-Gerät	ABL 300 Radiometer (Kopenhagen, Dänemark)
Druckabnehmer	Statham Transducer, Hellige (Freiburg)
	Leycom Sigma-5DF, Cardiodynamics, (Zoetermeer, Niederlande)
Durchleuchtungsgerät	Siemens (München)
Schrittmacher	Siemens-Elma AG (Solna, Schweden)
Federwaage	Mettler Waagen GmbH (Giessen, Schweiz)
Sonomikrometer	Triton Technology Inc. (San Diego, USA)
Sonomikrometrie-Kristalle	Sonometrics (Ontario, Kanada)
Sonomikrometrie-Software	SonoSoft, SonoMetrics (Ontario, Kanada)

Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

Katheter: Amplatz, Cournand, Judkins, Pigtail	Cordis (Miami, USA)
Katheterschleuse	Cordis (Miami, USA)
Katheterspitzenmanometer	SPG-572, Millar (Houston, USA)
Mikrosphären	Molecular Probes (Eugene, USA)
Naht-Material	Ethicon - Johnson & Johnson (Norderstedt)
Führungsdraht	Cordis (Miami, USA)
PTCA-Katheter	Cordis (Miami, USA)
PTFE-Stent	Jomed (Schaffhausen)

Retroinfusionskatheter	PTC Pro-Med Technology Consult GmbH (Mödling, Österreich)
eNOS-Antikörper	BD Transduction Lab. (Lexington, USA)
iNOS-Antikörper	BD Transduction Lab. (Lexington, USA)
Ki67-Antikörper	Novocastra (Newcastle upon Tyne, UK)
PECAM-1-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA)
PVDF-Membran	Bio-Rad Lab. (Hercules, USA)
SDS-Polyacrylamid-Gel	Mini-Protean® II, Bio-Rad Lab. (Hercules, USA)
Sekundär-Antikörper	Jackson ImmunoResearch Lab. (WestGrove, USA)
Transfektionsreagenz	Effectene™, Qiagen (Hilden)
Triphenyltetrazolium	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Arzneimittel

Acetylsalicylsäure	Aspirin®, Bayer Vital (Leverkusen) Aspisol®, Bayer Vital (Leverkusen)
Azaperone	Stresnil®, Janssen-Cilag (Neuss)
Cefuroxim	Cefuroxim, Fresenius Kabi (Bad Homburg)
Clopidogrel	Iscover®, Bristol-Myers Squibb (München)
Enflurane	Ethane®, Abbott (Hannover)
Enrofloxacin	Baytril®, Bayer Vital (Leverkusen)
Fentanyl	Fentanyl®-Janssen, Janssen-Cilag (Neuss)
Nadroparin	Fraxiparin®, GlaxoSmithKline (München)
Heparin	Heparin-Natrium, BIBRAUN (Melsungen)
Ketamin	Ketamin, Inresa (Freiburg)
Kontrastmittel	Solustrast®, Bracco Imaging (Konstanz)
Midazolam	Dormicum®, Roche (Grenzach-Wyhlen)
Piritramid	Dipidolor®, Janssen-Cilag (Neuss)
Propofol	Disoprivan®, AstraZeneca (Wedel)
eGFP cDNA	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
eNOS S1177D cDNA	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
L-NAME	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

2.2 Zellkultur

Stickstoffmonoxid gilt wie bereits beschrieben als bedeutender Induktor der endothelialen Zellproliferation. Die Wirkung einer Transfektion von eNOS S1177D (mit Effectene™ als Transfektionsreagenz) wurde - neben der späteren Untersuchung am porcinen Herzen - auch

in vitro analysiert. Zur Verwendung kamen dabei neonatale, kardiale Endothelzellen der Ratte. Der erhöhte Metabolismus von acetylierten *low density* Lipoproteinen (LDL) diente dabei zur Identifikation und Isolation dieser Zellen.¹²⁸ Die Evaluation der Zellproliferation mit oder ohne Transfektion erfolgte durch Färbung des Ki67-Antigens mit Hilfe von Antikörpern. Zur in-vitro Simulation einer Reperfusionssituation (Ischämie gefolgt von Reperfusion) wurde daneben das Verfahren der Hypoxie und Reoxygenierung angewandt.

2.3 Perkutane Implantation des Reduktionsstents als Modell myokardialer Hibernation

Die Tierexperimente erfolgten mit Genehmigung der Tierschutzkommission der Regierung von Oberbayern und wurden gemäß den Vorgaben (insbesondere § 8) des deutschen Tierschutzgesetzes (in der Fassung vom 01. Juni 1998) durchgeführt.

2.3.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten vierzig Hausschweine deutscher Landrasse, welche vom Lehr- und Versuchsgut der LMU in Oberschleißheim bezogen wurden. Die Schweine wurden im Tierstall des Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin (Direktor: Prof. Dr. U. Pohl) in Gruppen von bis zu fünf Tieren gehalten und von Tierpflegern und zwei Tierärzten betreut.

2.3.2 Prämedikation und Narkoseeinleitung

Für das Modell der myokardialen Hibernation (siehe Abschn. 2.3.6) sollte eine vorzeitige Stentokklusion innerhalb der ersten sieben Tage vermieden werden. Die Implantation des sehr thrombogenen Reduktionsstents sowie die dadurch hervorgerufene Endothelläsion und die Veränderung des Blutflusses an der induzierten Stenose erforderten daher eine ausreichende Hemmung der Thrombozytenaggregation. Am Tag vor dem ersten Eingriff wurde den Tieren prophylaktisch eine Sättigungsdosis von 300 mg Clopidogrel und 100 mg Acetylsalicylsäure oral verabreicht.

Zur Einleitung der Narkose wurden die nüchternen Schweine in einen separaten Raum gelockt und durch eine intramuskuläre Bolusinjektion von Ketamin 20 mg/kg KG, Azaperone 10 mg/kg KG und 0,5 mg Atropinsulfat in die Nackenmuskulatur sediert. Nach Erreichen einer ausreichenden Analgosedierung wurde den Tieren ein peripherer venöser Zugang mittels einer 20 G Venenverweilkanüle in eine subkutane Ohrvene gelegt und zur Narkoseeinleitung 0,5 mg/kg KG Midazolam und 0,5 mg/kg Piritramid intravenös appliziert. Im Anschluss wurden die Tiere unter kontinuierlicher Beobachtung der Spontanatmung in den OP-Bereich transportiert, auf dem Operationstisch in Rückenlage fixiert und orotracheal mit einem Magill-Tubus (Innendurchmesser (ID) 6,0 – 8,0 mm) unter laryngoskopischer Sicht intubiert.

2.3.3 Narkoseführung und Narkoseüberwachung

Die Erhaltung der Narkose erfolgte im Rahmen einer balancierten Anästhesie, um unerwünschte Wirkungen der Anästhetika, insbesondere auf das Herz-Kreislauf-System, zu reduzieren. Die Tiere wurden volumenkontrolliert mit Sauerstoff und Stickstoff unter Zumischung von 0,5 bis 2 % Enflurane maschinell beatmet und erhielten 5-7 mg/kg KG/h Propofol als Dauerinfusion. Die Beatmungsparameter wurden mittels eines Pulsoxymeters sowie durch regelmäßige arterielle Blutgasanalysen kontrolliert und individuell angepasst. Zur Beurteilung der Narkosetiefe wurden der Reflexstatus, die Herzfrequenz und der arterielle Blutdruck herangezogen. Die Überwachung der Herzaktivität erfolgte dabei anhand eines 3-Kanal-Oberflächen-EKG, während die arterielle Druckkurve nach Einführen einer 9-French-Schleuse in die rechte bzw. linke A. carotis communis über einen Druckabnehmer invasiv gemessen wurde.

Begleitend zur Allgemeinanästhesie bekamen die Tiere kontinuierlich 10 ml/kg KG/h Vollelektrolytlösung und zur Kreislaufstabilisierung nach Bedarf zusätzlich eine kolloidale Lösung infundiert. Zudem wurde zum Schutz vor Hypothermie die physiologische Körpertemperatur durch Heizmatten konstant gehalten.

2.3.4 Peri- und postoperatives Management

2.3.4.1 Antikoagulation und Antibiotikatherapie

Zur weiteren Reduktion thrombotischer Komplikationen wurden die Schweine bei jedem Kathetereingriff intravenös antikoaguliert. Während am Tag 0 und Tag 28, aufgrund des erhöhten interventionellen Risikos, 20.000 IE Heparin und zusätzlich 500 mg Acetylsalicylsäure i. v. appliziert wurden, erhielten die Tiere am Tag 7 und Tag 49 intraoperativ 10.000 IE Heparin. Die Thrombozytenaggregationshemmung wurde über die gesamte Dauer des Versuchs täglich mit 150 mg Clopidogrel p. o. und 250 mg Acetylsalicylsäure p. o. aufrechterhalten. Außerdem erfolgte in der ersten Woche nach der Stentimplantation eine Antikoagulation mit 2850 I.E. Fraxiparin i. m pro Tag.

An den ersten drei Versuchstagen wurde den Tieren zum Schutz vor Infektionen intravenös 750 g Cefuroxim verabreicht. Bei Zeichen einer Infektion der Operationswunde wurde zwischen den Operationen zudem eine intramuskuläre Antibiotikatherapie mit 2,5 mg/kg KG Enrofloxacin im Tierstall durchgeführt.

2.3.4.2 Arterielle und venöse Gefäßzugänge

Für die Interventionen mussten bei den Tieren Katheterschleusen platziert werden, wofür die vordere Halsregion zunächst gründlich rasiert und desinfiziert wurde. Anschließend erfolgte unter sterilen Bedingungen über einen ungefähr sechs Zentimeter langen Hautschnitt die saubere chirurgische Darstellung der A. carotis communis sowie der V. jugularis externa. Nachdem das jeweilige Gefäß mit einem Faden distal ligiert worden war, konnte nach einer kleinen Inzision der Gefäßwand mit Hilfe eines Führungsdrahtes die Katheterschleuse in das Gefäß eingeführt und fixiert werden. An allen vier Versuchstagen wurde arteriell eine 9-F-Schleuse und venös eine 11-F-Schleuse in das Gefäß eingebracht. Für die ersten beiden Eingriffe erfolgte die Präparation an der rechten Halsseite, während bei der zweiten und dritten Operation die linke A. carotis communis und die linke V. jugularis externa verwendet wurden. Insbesondere am letzten Versuchstag misslang fallweise das Einführen der Katheterschleuse auf Grund von Vernarbungen oder Thrombosierung des Gefäßes. Gegebenenfalls wurde daher die A. femoralis freipräpariert und wie oben beschrieben eine 7-F-Schleuse im Gefäß platziert.

Am Ende der Intervention wurden die Schleusen wieder entfernt und die Gefäße proximal der Inzision ligiert. Dank guter Kollateralkreisläufe über die A. vertebralis, die A. basilaris sowie den Circulus arteriosus Willisii stellt das Abbinden beider Karotiden beim Schwein keine Gefahr für die Durchblutung des Gehirns dar.

2.3.5 Vorbereitung des Reduktionsstents

Die chronische myokardiale Ischämie respektive myokardiale Hibernation wurde bei den Tieren durch perkutane Implantation des Reduktionsstents in die LAD der linken Koronararterie erreicht. Zur Vorbereitung wurde ein mit PTFE beschichteter koronarer Stent (Länge: 13 mm) mit einer Kanüle (17 G) aufgefädelt und nachfolgend in der Mitte mit einem Faden (Stärke USP 5-0) so ligiert, dass der Restdurchmesser dem Ausgangsdurchmesser der 17 G Kanüle entsprach. Anschließend wurde der präparierte Stent auf einen PTCA-Ballon (Durchmesser 3,0 mm, Länge 20 mm) gekrempt, mittels Inflation des Ballons auf 1 atm fixiert und im weiteren Verlauf in die proximale LAD platziert (siehe Abb. 2.1(a) und 2.1(b)).¹⁸⁸

2.3.6 Einfluss des Reduktionsstents auf den myokardialen Blutfluss und die Myokardfunktion

Der Reduktionstent als Modell einer myokardialen Hibernation wurde im Jahr 2003 von unserer Arbeitsgruppe etabliert. Von Degenfeld et al. untersuchten in diesem Zusammenhang den Einfluss des Reduktionsstents auf den myokardialen Blutfluss und die Myokardfunktion.¹⁸⁸ (Wegen des sachlichen Zusammenhangs wird in folgendem Abschnitt auf später dargestellte Methoden vorgegriffen; siehe im Einzelnen die entsprechenden Verweise).

Die Implantation des Reduktionsstents induzierte bei den Schweinen eine ca. 70 %ige koronararterielle Stenose im proximalen LAD-Segment mit konsekutiver Progression zu einer vollständigen Okklusion bis zum Tag 28 der Untersuchung. Mittels Mikrosphären (siehe Abschn. 2.5.4.1) konnte am Tag 7 und insbesondere am Tag 28 nach Platzierung des Stents im Vergleich zum nicht-ischämischen Kontrollareal des RCx eine signifikante Abnahme des transmuralen Ruheblutflusses sowie eine deutliche Verminderung des Adenosin-induzierten Maximalflusses im Stromgebiet der LAD gesehen werden. Zudem bestätigte eine Positronenemissions-

tomographie eine deutlich vermehrte Aufnahme von Fluordesoxyglucose (FDG) distal des Reduktionsstents, ein Indiz für minderperfundiertes aber noch vitales Gewebe (siehe Abschn. 1.1.2).¹⁸⁸

Am Tag 28 konnte anhand von sonomikrometrischen Daten (siehe Abschn. 2.5.4.2) eine signifikante Abnahme der myokardialen Kontraktilität (Hypokinesie) im proximalen und distalen Perfusionsareal der LAD nachgewiesen werden. Bei Erhöhung des Sauerstoffbedarfes des Herzmuskels mittels rechtsatrialem Pacing verstärkte sich die Hypokinesie im Vergleich zum nicht-ischämischen Kontrollareal bis hin zu einer deutlichen Dyskinesie im Bereich der distalen LAD.¹⁸⁸

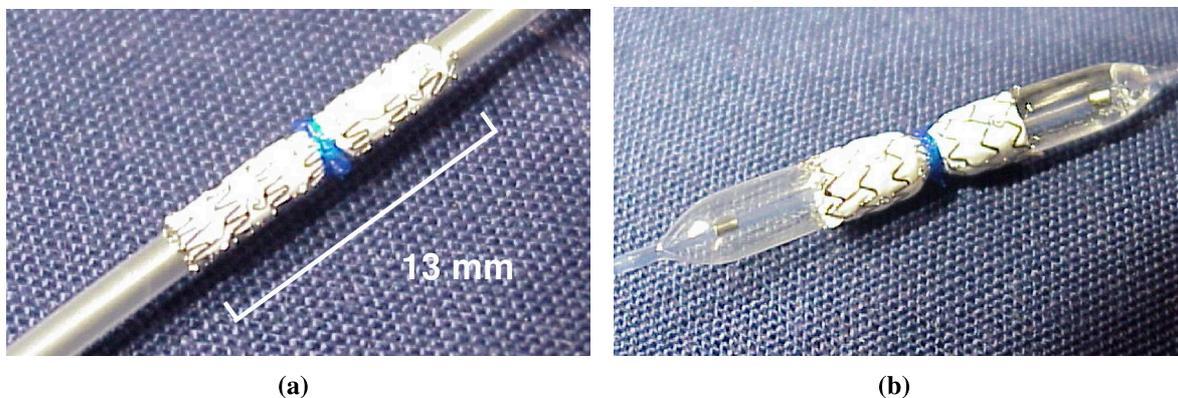


Abb. 2.1: Vorbereitung des Reduktionsstents zur Erzeugung einer sanduhrförmigen Stenose
(a) Nicht entfalteter PTFE-Stent auf einer 1,5 mm dicken Kanüle; in der Mitte des Stents ist der eng gebundene, blaue Faden zu erkennen. (b) Ballonkatheter mit zuvor präpariertem PTFE-Stent im entfalteten Zustand; die Ligation mit dem chirurgischen Faden verhindert die Aufdehnung des Stents in der Mitte und führt zu einer sanduhrförmigen Stenose.¹⁸⁸

2.4 Das System der selektiven druckregulierten Retroinfusion

Das System der selektiven druckregulierten Retroinfusion (SSR) umfasst eine Rollerpumpe, einen kleinen extrakorporalen Kreislauf mit einem Hochdruckreservoir sowie ein Exzenter-Ventil, einen vierlumigen Katheter und eine Absaugereinheit.^{11,13} Des Weiteren sind ein Druckabnehmer und eine Ballonpumpe in das Gerät integriert.^{11,13}

Die vier Lumen des Reperfusionskatheters werden an die Absaugereinheit, an das Hochdruckreservoir, an die Ballonpumpe sowie an den Drucksensor angeschlossen. Anschließend wird das System vollständig entlüftet. Das Hochdruckreservoir wird nun mittels druckkontrollierter Steuerung der Rollerpumpe bis zu einem frei wählbaren Druckniveau mit arteriellem Blut aus der 9-F-Schleuse in der A. carotis communis gefüllt. Dieser Vordruck ermöglicht die Infusion des arteriellen Blutes vom Reservoir in die anteriore interventrikuläre Vene (AIV) und somit die retrograde Infusion von Blut beziehungsweise gefäßbildenden Faktoren. Zur Vermeidung von druckbedingten Schäden durch zu hohe Spitzendrücke in der Koronarvene, und demnach zur Sicherung der Wirksamkeit, wird der retrograde Blutfluss im zuführenden Schenkel des Systems gemessen (Transonic© Flowprobe, Transonic Systems Inc.) und mittels einer Druckregulation des nachgeschalteten Exzenter-Ventils gesteuert.^{12,187} Die retrograde Infusion erfolgt dabei zyklisch und kann mit Hilfe eines Oberflächen-EKG R-Zacken getriggert kontrolliert werden. Sowohl der Modus (Kopplung von Infusionszyklus und Herzaktion, zum Beispiel 1:2) als auch die Latenz zwischen R-Zacke und Infusionsbeginn sind regulierbar und ermöglichen auf diese Weise eine rein diastolische Retroinfusion.^{11,13}

2.5 Therapeutische Neovaskularisation im hibernierenden Myokard mittels retrograder Infusion von eNOS S1177D cDNA in die anteriore Koronarvene

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die retrograde Infusion von liposomaler eNOS S1177D komplementärer DNA einen Einfluss auf das vaskuläre Remodeling und die Funktion im ischämischen Myokard hat. Als Versuchstiere dienten insgesamt vierzig Hauschweine, denen am Tag 0 der Untersuchung zur Induktion eines hibernierenden Myokards ein Reduktionsstent implantiert wurde. Während sechzehn Schweine das Ende der Versuchsserie nicht erreichten und daher deren Ausschluss aus der Studie erfolgte, wurden von den verbleibenden 24 Tieren 18 in drei gleich große Gruppen A bis C (n = 6) eingeteilt. Als zweiter Schritt erfolgte am Tag 7 eine Koronarangiographie, um die Durchgängigkeit des Stents sicherzustellen. Nach weiteren drei Wochen wurden die Versuchstiere ihrer Aufteilung entsprechend mittels retrograder Infusion in die Koronarvene behandelt:

Gruppe A: eNOS S1177D cDNA

Gruppe B: eNOS S1177D cDNA und nachfolgende Behandlung mit L-NAME

Gruppe C: eGFP cDNA (*enhanced green fluorescent protein*; Kontrollgruppe, Schein)

Sowohl am Tag 28 als auch am Tag 49 der Studie erfolgten in Gruppe A bis C hämodynamische Messungen zur Bestimmung der globalen Herzfunktion: Herzfrequenz (HF), linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP), linksventrikulärer systolischer Druck (LVSP), Kontraktions- sowie Relaxationsgeschwindigkeit (dP/dt_{max} , dP/dt_{min}). Zur späteren Analyse des regionalen myokardialen Blutflusses wurden an beiden Versuchstagen fluoreszierende Mikrosphären eingesetzt und mit Hilfe der Sonomikrometrie konnte am Tag 49 zudem die regionale Myokardfunktion als subendokardiale Segmentverkürzung ermittelt werden. Alle Messungen erfolgten dabei unter Ruhebedingungen und während rechtsatrialem Pacing (erhöhter O_2 -Bedarf, funktionelle Flussreserve) bei 120 oder 140 Herzschlägen pro Minute. Da eine Infarzierung über 8 % der linksventrikulären Masse als Ausschlusskriterium galt, wurde nach Tötung der Tiere und Explantation des Herzens mittels Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung (TTC) die Infarktgröße bestimmt. Außerdem wurde für die spätere Analyse des Kollateralenwachstums eine postmortale Angiographie durchgeführt. Zur Ermittlung des regionalen Blutflusses, der Expression von eNOS und der Kapillardichte im hibernierenden Myokard sowie zur Untersuchung des vaskulären Remodelings erfolgte die Entnahme von Gewebeproben aus dem linken Ventrikel.

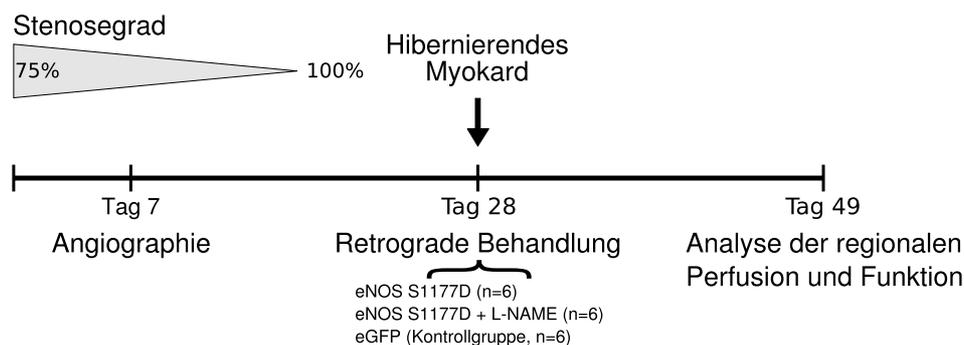


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls in Gruppe A bis C.

Die restlichen sechs Hausschweine wurden in zwei Gruppen mit jeweils drei Versuchstieren aufgeteilt. Nach einer Woche wurden die Tiere entweder mit eNOS S1177D (**Gruppe D**) oder

mit eGFP (**Gruppe E**) behandelt und drei Tage später zur Analyse der eNOS S1177D cDNA Transfektion das Herz explantiert.

2.5.1 Versuchstag 0: Implantation des Reduktionsstents in die LAD

Nach erfolgreicher Narkoseeinleitung wurden am Versuchstier eine arterielle und eine venöse Katheterschleuse platziert. Anschließend wurde unter Röntgen-Durchleuchtung ein rechtskoronarer Judkins-Katheter (8 F) über die Schleuse in der A. carotis communis vorgeschoben, das linke Koronarostium aufgesucht und der Verlauf der A. coronaris sinistra durch eine Kontrastmittel-Angiographie dargestellt. Mit Hilfe des Führungskatheters konnte nun ein Führungsdraht (14 inch) bis in das distale Segment der LAD eingeführt werden. Der Ballonkatheter mit dem bereits vorbereiteten Reduktionsstent wurde daraufhin über den Führungsdraht avanciert und distal des ersten Diagonalastes der LAD positioniert. Im nächsten Schritt wurde der PTCA-Ballon mit 16 atm inflatiert und der Druck für ungefähr zwanzig Sekunden konstant gehalten. Während die Mitte des Implantats auf Grund der Fadenligatur dabei den ursprünglichen Durchmesser beibehielt, entfaltete sich der Reduktionsstent an seinen beiden Enden vollständig, wodurch eine sanduhrförmige Stenose entstand. Im Anschluss konnten der Katheter sowie der Führungsdraht nach Deflation des Ballons wieder vollständig entfernt werden. Zur Verifikation der korrekten Lage des Stents und Abschätzung des erzielten Stenosegrades, welcher durchschnittlich ungefähr 75 % betrug, erfolgte eine erneute Koronarangiographie. Abschließend wurden alle Instrumente aus dem Körper des Tieres entfernt und die Halswunde unter sterilen Bedingungen sorgfältig zugenäht. Nach Ausleitung der Narkose und Extubation wurde das Schwein unter Kontrolle der Vitalparameter zurück in den Tierstall gebracht.

2.5.2 Versuchstag 7: Kontrolle des Blutflusses in der LAD mittels Koronarangiographie

Das Studiendesign implizierte, dass Versuchstiere mit einer frühzeitigen Stentokklusion innerhalb der ersten Woche ausgeschlossen werden. Damit sollte die Induktion einer graduellen Ischämie und folglich einer myokardialen Hibernation sichergestellt werden. Sieben Tage nach Stentimplantation wurde aus diesem Grund eine Kontrollangiographie der LAD, bei

welcher eine erhaltene Blutpassage durch die Stenose überprüft wurde, durchgeführt. Vorbereitung und Umsetzung der Angiographie erfolgte hierbei wie in Abschn. 2.5.1 beschrieben. Fünf von vierzig Tieren wurden dem Protokoll entsprechend nach Tag 7 von der Studie ausgeschlossen.

2.5.3 Versuchstag 28: Selektive venöse, druckregulierte Retroinfusion von eNOS S1177D und eGFP cDNA in die anteriore Koronarvene

2.5.3.1 Hämodynamische Parameter der globalen Herzfunktion und regionale Perfusion

Die Versuchstiere wurden wie an den beiden vorangegangenen Interventionen narkotisiert und mit zwei Katheterschleusen versehen. Im Anschluss erfolgte die Messung hämodynamischer Parameter der globalen Herzfunktion, welche später als Referenzwerte nach der Behandlung mit eNOS S1177D dienen sollten. Hierfür wurde ein Katheterspitzenmanometer über die arterielle Schleuse im Apexbereich des linken Ventrikels platziert und daraufhin HF, LVEDP, LVSP sowie dp/dt_{max} und dp/dt_{min} aufgezeichnet. Zur Analyse des regionalen myokardialen Blutflusses wurden nun über einen Pigtail-Katheter 10^7 fluoreszierende Mikrosphären, suspendiert in 20 ml Natriumchloridlösung, innerhalb einer Minute gleichmäßig in den linken Vorhof appliziert.^{1,5} Zeitgleich mit dem Beginn der Injektion wurde mit der Entnahme von Referenzblut aus der arteriellen Katheterschleuse begonnen und bei einer Rate von 4,1 ml/min für drei Minuten fortgesetzt (siehe Abschn. 2.5.4.1). Die Messungen der Herzfunktionsparameter sowie die Gabe der Mikrosphären erfolgte dabei sowohl unter Ruhebedingungen als auch während rechtsatrialem Pacing mit 140 Schlägen pro Minute.

2.5.3.2 Applikation von eNOS S1177D cDNA und eGFP cDNA

Im nächsten Schritt konnte der Retroinfusionskatheter in die AIV, welche parallel zur LAD liegt und dessen Perfusionsgebiet drainiert, vorgeschoben werden. Dazu wurde zunächst ein 7 F Katheter (Cournand oder Amplatz links) über die Jugularvene eingeführt und unter Durchleuchtung der Sinus coronarius aufgesucht. An dieser Stelle musste mittels Kontrastmittelgabe der Abgang der V. coronaria sinistra von der Mündung der V. azygos unterschieden werden, da

Letztere beim Schwein, im Gegensatz zum Menschen, in den Sinus coronarius mündet. Anschließend avancierte der Katheteriseur einen Führungsdraht (18 inch) durch den liegenden Katheter in die V. coronaria sinistra und weiter in die AIV. Nach Entfernen des Führungskatheters wurde der Retroinfusionskatheter mit Hilfe des Drahtes in der AIV platziert, wobei der Ballon an der Spitze des Katheters auf Höhe des implantierten Reduktionsstents zum Liegen kam. Daraufhin konnten die vier Lumina des Katheters mit dem vorbereiteten SSR-Gerät (siehe Abschn. 2.4) konnektiert werden. Für die regionale Applikation von eNOS S1177D cDNA und eGFP cDNA wurde dabei eine modifizierte Technik angewandt, bei welcher dem Versuchstier kein Blut entnommen und reinfundiert wurde, sondern das Hochdruckreservoir (2,5 atm) stattdessen mit 37°C warmer Natriumchloridlösung (0,9 %) gefüllt wurde. Im weiteren Verlauf wurde der Ballon des Retroinfusionskatheters in der AIV für dreißig Sekunden inflatiert und bei erhaltener arterieller Perfusion das individuelle systolische Plateau des Venenverschlussdruckes (VVD) bestimmt. Dieses ermöglicht die Anpassung des Retroinfusionsdruckes an das individuelle Koronarvenensystem, womit Hyper- oder Hypoperfusion der AIV vermieden werden, und dadurch eine Optimierung der Myokardprotektion.⁵³ Der ideale Infusionsdruck, welcher am SSR-Gerät eingestellt wurde, liegt nach früheren Ergebnissen etwa 20 mm Hg über dem VVD und wird von dem Exzenter-Ventil durch Änderung der Flussrate innerhalb von Millisekunden reguliert.⁵³ Nachdem die korrekte Lage des Retroinfusionskatheters mittels Kontrastmittelgabe nochmals überprüft und der Ballon mit 150 mm Hg inflatiert worden war, konnte die Retroinfusion mit einer Flussrate von 20 ml/min gestartet werden. Der Katheterballon verzögerte unterdessen das Abfluten des Retroinfusats und verlängerte die Kontaktzeit der Substanzen mit dem ischämischen Myokardareal auf durchschnittlich sieben Sekunden.¹⁴ Die in 0,9 %iger Natriumchloridlösung suspendierte cDNA von eNOS S1177D und eGFP wurde unterdessen mit einem Perfusor über ein Rücklaufventil in den zuführenden Schenkel, unmittelbar nach dem Reservoir, eingespeist.

Die Versuchstiere aus Gruppe A und Gruppe B wurden folglich zwei Mal für zehn Minuten mit eNOS S1177D cDNA enthaltenden Liposomen behandelt (1,5 mg cDNA pro Tier). Die Schweine der Gruppe B erhielten darüber hinaus über drei Wochen Trinkwasser, das mit 500 µmol/l L-Nitroargininmethylester (L-NAME) versetzt war. Dieser unspezifische Inhibitor der NO-Synthase sollte den erwarteten positiven Effekt der eNOS S1177D cDNA Transfektion auf die Neovaskularisation verhindern. Um ferner einen akuten Effekt der NOS-Hemmung auszuschließen, wurde die Gabe von L-NAME 24 Stunden vor den Messungen des Versuchs-

tages 49 abgesetzt.

Bei der Kontrollgruppe C erfolgte mit zwei Zyklen über zehn Minuten gleichermaßen die retrograde Applikation von liposomaler, eGFP komplementärer DNA in die anteriore Koronarvene (1,5 mg cDNA pro Tier). Die Codon-optimierte Variante des GFP weist eine fünf- bis zehnfach stärkere Expression als der Wildtyp auf und ermöglichte im weiteren Verlauf eine Identifikation mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops.

Nach Abschluss der Retroinfusion wurden der Ballon des Retroinfusionskatheters wieder deflatiert und sämtliche Instrumente entfernt. Die A. communis interna sowie die V. jugularis externa wurden ligiert, die Wunden am Hals daraufhin steril versorgt und nach Ausleitung der Narkose wurde das Tier unter Beobachtung der Vitalparameter zurück in den Tierstall gebracht.

2.5.4 Versuchstag 49: Analyse der regionalen Myokardperfusion und der Myokardfunktion nach Retroinfusion

Die Versuchstiere wurden wiederum narkotisiert und mit einer arteriellen Katheterschleuse in der A. communis interna sowie einer venösen Katheterschleuse in der V. jugularis externa versehen. Bei manchen Schweinen war wegen Thrombosierung oder Bildung von Granulationsgewebe am Halsbereich nicht möglich die Katheterschleuse zu platzieren, weshalb fallweise auf die rechte A. femoralis ausgewichen wurde. Anschließend erfolgte über einen Judkins-Katheter eine Koronarangiographie der LAD und mit Hilfe eines Katheterspitzenmanometers die Ermittlung der genannten Parameter der globalen Herzfunktion.

2.5.4.1 Regionaler myokardialer Blutfluss: Mikrosphären

In dieser Studie wurde der regionale myokardiale Blutfluss mittels multipler, fluoreszierender Mikrosphären bestimmt.^{1,5} Bereits 1967 wurde diese Technik anhand von radioaktiv markierten Mikrosphären beschrieben und in den darauf folgenden Jahren von mehreren Autoren auf Funktionalität sowie Anwendbarkeit in verschiedenen Organsystemen überprüft.¹⁴⁷ Mehr als zwanzig Jahre später erfolgte die Einführung von kolorierten Mikrosphären⁶¹ und im Jahre

1993 wurden erstmalig fluoreszierende Mikrosphären eingesetzt,⁵⁶ welche sich gegenüber ihren beiden Vorgängern als überlegen zeigten.^{56,171}

Die Mikrosphärenmethode beruht auf der Injektion von 15 µm großen, sphärischen Polymerpartikeln in den linken Vorhof. Durch die dort herrschende turbulente Strömung werden die Mikrosphären gleichmäßig im Blut verteilt und gelangen anschließend mit dem arteriellen Blutstrom in die Peripherie. In den Gefäßen der Endstrombahn bleiben die Partikel auf Grund ihres Durchmessers hängen, wobei sich die Anzahl der im Gewebe haftenden Mikrosphären direkt proportional zum konkomitierenden Blutfluss verhält. Zum Zeitpunkt der Injektion wird zudem eine arterielle Referenzblutprobe entnommen, welche als Bezugsorgan mit bekanntem Blutfluss (Entnahmerate) und Sphärengelalt (Fluoreszenzaktivität) dient.^{36,127} Die dabei ermittelten Daten ermöglichen nun die Berechnung des absoluten, regionalen Blutflusses des untersuchten Myokardareals nach folgender Formel:

$$\frac{\textit{Regionaler Blutfluss}^{(Probe)}}{\textit{Fluoreszenzaktivität}^{(Probe)}} = \frac{\textit{Entnahmerate}^{(Referenz)}}{\textit{Fluoreszenzaktivität}^{(Referenz)}} \quad (2.1)$$

Um einen Ausgangswert für die spätere Analyse der regionalen Myokardperfusion zu erhalten, wurde den Tieren in dieser Studie bereits am Tag der Retroinfusion (Versuchstag 28) 10^7 fluoreszierende Mikrosphären appliziert. Drei Wochen nach der Behandlung mit eNOS S1177D cDNA und eGFP cDNA erfolgte erneut die Gabe von 10^7 Mikrosphären, welche über einen Pigtail-Katheter innerhalb einer Minute konstant in das linke Atrium injiziert wurden. Gleichzeitig wurde über die arterielle Katheterschleuse mit Hilfe einer Präzisionspumpe mit der Entnahme von Referenzblut (4,1 ml/min) begonnen und für drei Minuten fortgesetzt. Die Applikation der Mikrosphären fand an dieser Stelle wiederum für beide Herzfrequenzen statt. Hierfür kamen zwei unterschiedlich fluoreszierende Mikrosphären zur Anwendung, welche durch ihr charakteristisches Exzitations- und Emissionsmaximum exakt einem Farbstoff zugeordnet werden können.

Nach der Explantation (siehe Abschn. 2.5.4.2) wurde das Herz nach einem vorab festgelegten Schnittmuster präpariert. Am Apex beginnend wurden parallel zur Herzbasis ungefähr ein Zentimeter breite Scheiben des ischämischen Myokards abgetrennt und anschließend von jeder Ebene subendokardiale sowie subepikardiale Proben des ischämischen und des nicht-ischämischen, RCx-perfundierten Muskels, entnommen. Nachdem die Gewebeproben eine Woche in Formalin fixiert und mit einer Federwaage gewogen worden waren, konnte die

Fluoreszenzaktivität dieser Muskelschnitte und der Referenzblutproben der Versuchstage 28 und 49 gemessen werden. Mit Hilfe eines speziellen Filtersystems,¹³⁹ welches den Verlust fluoreszierender Partikel verhindert, wurden die Mikrosphären aus dem Myokard sowie aus dem Blut standardisiert rückgewonnen und im nächsten Schritt nach dem Prinzip der Fluoreszenzspektrometrie vollständig automatisiert detektiert.¹⁷² Zur besseren Vergleichbarkeit bei der Auswertung wurde mittels des Gewichts der Gewebeproben die relative regionale Myokardperfusion (ml/min/g Gewebe) berechnet.

2.5.4.2 Regionale Myokardfunktion: Sonomikrometrie

Für die Bestimmung der regionalen Myokardfunktion mittels Sonomikrometrie musste bei den Versuchstieren eine mediane Längssternotomie durchgeführt werden, weshalb die Analgesie bei den Versuchstieren vorab mit 5 µm/kg KG Fentanyl verstärkt wurde. Zunächst erfolgte ein longitudinaler Hautschnitt, welcher sich von der Incisura jugularis sterni bis zum gut tastbaren Processus xiphoideus erstreckte. Unter Verwendung eines Elektrokauters wurde daraufhin das Sternum sowie der Processus xiphoideus vom subkutanen Fettgewebe und von der Muskulatur freipräpariert. Nach elektrischer Blutstillung konnte nun mit einer kräftigen scharfen Schere das Brustbein von kaudal beginnend vorsichtig durchtrennt werden, wobei Knochenwachs zur lokalen Blutstillung am Markraum eingesetzt wurde. Sobald der Brustkorb mit einem Thoraxspreizer behutsam aufgespannt worden war, konnte das Perikard y-förmig eröffnet werden.

Das Prinzip der Sonomikrometrie beruht auf der Messung der Laufzeit, welches ein Ultraschallsignal für den Weg von einem Transmitter zu einem Empfänger benötigt.²¹ In dieser Untersuchung wurden sphärische Ultraschallkristalle mit einem Durchmesser von zwei Millimetern verwendet, welche dank des piezoelektrischen Effektes und unter Verwendung eines digitalen Sonomikrometers simultan als Sender und Empfänger agieren können. Beim inversen Piezoeffekt wird durch Anlegen einer Wechselspannung eine periodische Verformung der Kristalle ausgelöst, sodass mechanische Schwingungen, also Schallwellen, entstehen. Analog können Schallwellen eine piezoelektrische Substanz verformen und dadurch eine messbare elektrische Spannung erzeugen (direkter piezoelektrischer Effekt). Sofern nun die Ausbreitungsgeschwindigkeit des Ultraschalls im fortleitenden Medium bekannt und konstant ist, kann anhand der Formel 2.2 der Abstand zwischen den beiden im Gewebe fixierten Kristallen kontinuierlich bestimmt werden und daraus auf das Bewegungsausmaß des untersuchten

Gewebes geschlossen werden.²¹

$$[\text{Abstand der beiden Kristalle}] = [\text{Ausbreitungsgeschwindigkeit}] \times [\text{Laufzeit}] \quad (2.2)$$

Das Auflösungsvermögen dieser Methode hängt von der exakten Detektierung des empfangenen Ultraschallsignales sowie von der Bestimmung der Laufzeit durch den Transceiver ab. In weichem Gewebe respektive im Myokard kann eine durchschnittliche Ausbreitungsgeschwindigkeit von 1540 m/s angenommen werden, womit sich bei einer Abtastrate von ungefähr 65 MHz ein räumliches Auflösungsvermögen von 24 μm errechnet. Dadurch ermöglicht die Sonomikrometrie eine sehr sensible Erfassung der regionalen Kontraktionsstrecke des Myokards (Segmentverkürzung), welche eng mit den lokalen Perfusionsverhältnissen des Gewebes korreliert.^{164,175,191} Diesbezüglich ist anzumerken, dass aus technischen Gründen nur eine subendokardiale Platzierung der Kristalle möglich ist und somit in dieser Arbeit keine Vergleichsdaten zwischen der Kontraktion endokardialer und epikardialer Myokardschichten vorliegen.

Nachdem bei den Versuchstieren der Gruppen A bis C der Thorax sowie der Herzbeutel eröffnet worden waren, konnten die Ultraschallkristalle zur Messung der regionalen kontraktiven Myokardfunktion eingesetzt werden. Zunächst wurde der Herzmuskel mit einem spitzen Skalpell im proximalen und distalen ischämischen Areal der LAD sowie im nicht-ischämischen RCx-Gebiet jeweils zweimal inzidiert, ohne aber dabei das Endokard zu durchstoßen. Im nächsten Schritt wurden die Kristallpaare im Abstand von ungefähr 1,5 bis 2 Zentimetern an den Inzisionsstellen eingeführt, bis der elastische Widerstand des Endokards zu spüren war. Um bestmögliche Kontraktionswerte zu erhalten und anwendungsbedingte Messfehler zu minimieren, wurden die Kristalle parallel zum Verlauf der epikardialen Herzmuskelfasern und senkrecht zur langen Herzachse platziert.^{45,189} Anschließend konnte mit der Aufzeichnung der Messdaten begonnen werden, welche durch eine spezielle Software des Herstellers zusammen mit einer Ableitung des Elektrokardiogramms sowie der linksventrikulären Druckkurve registriert und auf einem Desktop-Rechner gespeichert wurden.

Zur Normierung der erhaltenen Daten wurden bei der Auswertung jeweils fünf Herzzyklen analysiert und daraufhin mit den Mittelwerten die subendokardiale Segmentverkürzung (SES),

ausgedrückt in Prozent der enddiastolischen Strecke, nach folgender Formel berechnet:

$$SES [\%] = \frac{(\text{enddiastolische Distanz} - \text{endsystolische Distanz}) \times 100}{\text{enddiastolische Distanz}} \quad (2.3)$$

Die Bestimmung der Messzeitpunkte für die Segmentstrecke erfolgte mit Hilfe der ersten Ableitung des linksventrikulären Druckes. Das Ende der Diastole wurde mit dem Moment kurz vor Beginn einer positiven Druckänderung ($dLVP/dt$ [mm Hg/s]) gleichgesetzt, das Ende der Systole wurde durch den maximalen Abfall des Druckes definiert ($dLVP/dt$ min [mm Hg/s]).

2.5.4.3 Bestimmung der Infarktgröße: TTC-Färbung

Um eine konstante Infarktgröße in allen Versuchsgruppen sicherzustellen, wurde das Ausmaß der linksventrikulären Gewebsnekrose durch Färbung mit Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) quantifiziert. Das wasserlösliche und farblose TTC fungiert dabei als Redoxindikator, indem es die Elektronen der Atmungskette abfängt und zu rotem Triphenylformazan reduziert wird.¹⁸⁶ Das Versuchstier wurde vorab durch Injektion von 20 ml Kaliumchlorid in den linken Ventrikel euthanasiert und nach Explantation des Herzens eine postmortale Angiographie durchgeführt (siehe Abschn. 2.5.4.4). Für die Färbung wurde danach eine Kanüle über das linke Koronarostium in der LAD platziert und 15 ml einer 10 %igen TTC-Lösung mit einem Druck von 80 bis 100 mm Hg eingespritzt.^{11,88} Bei erhaltenem Stoffwechsel in den Zellen des Myokards wird das TTC nun zum wasserunlöslichen Formazan reduziert und färbt noch vitales Gewebe rot, während infarzierte Areale ohne mitochondriale Aktivität ungefärbt bleiben.¹⁸⁶ Dadurch kann das avitale Myokard deutlich vom noch lebenden, stoffwechselaktiven Herzmuskel abgegrenzt werden. Im weiteren Verlauf wurde das Herz in ein Zentimeter dicke, axiale Schichten geschnitten und vor der Probenentnahme einzeln digital fotografiert. Anhand der Bilder erfolgte später die planimetrische, computerassistierte Vermessung des infarzierten Areals, welches bezogen auf das gesamte linksventrikuläre Volumen angegeben wurde. Tiere mit einer Infarzierung über 8 % wurden von der Studie ausgeschlossen.^{11,88}

2.5.4.4 Analyse des Kollateralenwachstums

Um eine therapeutische Stimulation der Arteriogenese durch die Transfektion von eNOS S1177D cDNA zu evaluieren, wurde nach Explantation des Herzens eine Angiographie durchgeführt.⁵² Das Herz wurde zunächst mit einer Natriumchloridlösung gespült und für eine rechts-anteriore oblique Projektion auf einem sauberen Tisch gelagert. Nachdem der linke Hauptstamm anschließend mit einem 8 F Katheter aufgesucht worden war, konnten 10 ml Kontrastmittel unter einem konstantem Druck von 100 mm Hg in die A. coronaria sinistra injiziert werden. Für die spätere Auswertung zeichnete das Durchleuchtungsgerät währenddessen eine Bildsequenz auf, aus der daraufhin das Bild ausgewählt wurde, bei welchem sich die distale LAD und der umliegende Gefäßbaum maximal darstellt. Die Auszählung der Kollateralen erfolgte am Ende doppelblind durch zwei unabhängige Untersucher. Dabei wurde als Kollaterale ein Blutgefäß definiert, welches den RCx, die proximale LAD oder den ersten Diagonalast mit der distalen LAD verbindet und zu dessen Perfusion beiträgt.¹⁰⁹

2.6 Immunologische Methoden

Für eine weitergehende Analyse der eNOS S1177D Transfektion und der therapeutischen Neovaskularisation sollten verschiedene immunologische Methoden zur Anwendung kommen. Aus diesem Grund wurden direkt postmortal mehrere Proben des ischämischen und nicht-ischämischen linksventrikulären Myokards, sowie Kontrollbiopsien des durch die RCx perfundierten Gewebes, entnommen.

2.6.1 Immunoblotting (*Western-Blot*)

Beim Immunoblotting werden homogenisierte Gewebeproben beziehungsweise Zell-Lysate auf eine Trägermatrix aufgebracht und durch Anlegen eines elektrischen Feldes entsprechend ihres isoelektrischen Punktes, ihres Molekulargewichts oder ihrer elektrischen Ladung aufgetrennt. Beim eigentlichen *blotting* werden die Proteine mittels Elektrophorese oder einem angelegten Flüssigkeitsstrom (Elektro-, Kapillar-, Vakuum-Blot) auf eine Nitrozellulose- oder Polyvinylidendifluorid-(PVDF)-Membran übertragen und immobilisiert. Anschließend müssen die

unspezifischen Bindungstellen der Membran durch ein Bad in einer Lösung von Milchpulver oder Rinderserumalbumin geblockt werden. Die Detektion der spezifischen Proteinbanden gelingt am Ende mit Hilfe zweier Antikörper: zunächst bindet ein Primär-Antikörper direkt an das zu bestimmende Protein und nachfolgend wird ein zweiter Antikörper hinzugegeben, welcher hochspezifisch für den Primär-Antikörper ist und letztendlich durch seine radioaktive Markierung oder durch ein gekoppeltes Enzym nachgewiesen werden kann.

In dieser Studie wurde das Immunoblotting zum Nachweis einer eNOS-Expression im ischämischen Myokard eingesetzt. Die hierzu verwendeten Proben stammten aus den Experimenten der Gruppen E und F, deren Versuchstiere am Tag 7 nach Implantation des Reduktionsstents mit eNOS S1177D cDNA oder eGFP cDNA behandelt und drei Tage später zur Explantation des Herzens euthanasiert wurden. Die Gewebeproben wurden mittels Aceton und Trockeneis auf 12 %igen sodium dodecyl sulfate (SDS)-Polyacrylamid-Gelen eingefroren. Nach dem Übertragen und Immobilisieren auf einer PVDF-Membran wurden anschließend murine eNOS Antikörper sowie anti-Maus-IgG Ziegen-Antikörper zur Detektion eingesetzt.

2.6.2 Immunhistochemie

In der Immunhistochemie wird das Prinzip der spezifischen Antikörperbindung zur Detektion und Lokalisation von Proteinen in histologischen Schnitten genutzt. Während bei der direkten Methode bereits der Primärantikörper mit einem Detektionssystem gekoppelt ist, wird bei der sensitiveren indirekten Methode ein zweiter Antikörper eingesetzt, welcher sich spezifisch gegen den ersten Antikörper richtet. Dieser Sekundärantikörper ist seinerseits mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder einem Enzym konjugiert und ermöglicht dadurch den Nachweis des gesuchten Proteins.

Die Proben der immunhistochemischen Untersuchungen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zur weiteren Verarbeitung in einem minus 80°C kalten Gefrierschrank gelagert. Für die Immunhistochemie wurden später drei verschiedene Antikörper eingesetzt: eNOS- und iNOS-Antikörper zur Ermittlung des Transfektionserfolges, Antikörper gegen Ki67 zur Evaluation der Zellproliferation sowie Antikörper gegen den Endothelmarker PECAM-1 (CD31-Färbung) zur Bestimmung der Kapillardichte. Zur Quantifizierung wurden

nachfolgend fünf mikroskopische *high power* Felder (jeweils 0,0875 mm²) pro Region und Herz ausgezählt.

2.6.3 Radioimmunoassay

Der Radioimmunoassay ist eine sehr sensitive und spezifische Methode um kleinste Substanzmengen eines Antigens (zum Beispiel Hormone oder Enzyme) quantitativ zu bestimmen. Hierbei wird zunächst eine definierte Menge eines radioaktiv markierten Antigens mit Antikörpern gegen dieses Antigen zur Reaktion gebracht. Anschließend wird das zu bestimmende Substrat zu dieser Lösung hinzugefügt, welches nun mit dem markierten Antigen um die Bindungsstellen der Antikörper kompetitiv konkurriert. Nach genügend langer Inkubation stellt sich entsprechend dem Konzentrationsverhältnis und der Reaktionskonstanten ein Gleichgewicht ein. Je höher die Konzentration des hinzugefügten Substrats dabei ist, desto mehr markiertes Antigen wird dementsprechend von den Antikörpern verdrängt. Am Ende werden die gebundenen von den nicht-gebundenen Antigenen getrennt (zum Beispiel durch Immunpräzipitation) und die Strahlungsaktivität im Präzipitat gemessen. Anhand dieses Wertes kann schließlich durch Vergleich mit Standardkurven die Menge des zu bestimmenden Substrats ermittelt werden.

In dieser Studie wurde der Radioimmunoassay zur Bestimmung des Gehalts an zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) in myokardialen Gewebeproben angewandt. cGMP stellt einen für NO sensiblen *second messenger* dar. Drei Tage nach der Applikation von eNOS S1177D konnte somit die funktionelle Wirksamkeit der gesteigerten eNOS-Expression überprüft werden.

2.7 Statistische Verfahren

Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SEM) dargestellt. Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen wurden mit dem ANOVA-Test untersucht. Im Falle eines statistisch signifikanten Unterschiedes nach dem ANOVA-Verfahren, wurde ein Gruppenvergleich nach der Bonferroni-Methode durchgeführt. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch

signifikant angesehen. Die Daten wurden mit SPSS (SPSS 13.0, SPSS Inc., Chicago, USA) analysiert.

Zur Planung und Durchführung eines Tierversuches ist es erforderlich, die optimale Gruppengröße zu ermitteln. Das Ziel dabei ist, die Anzahl der benötigten Tiere zu reduzieren, ohne dabei die statistische Aussagekraft soweit zu beeinflussen, dass die primäre wissenschaftliche Frage nicht beantwortet werden kann. Die Gruppengröße in dieser Arbeit wurde - in Rücksprache mit unseren statistischen Mitarbeitern - anhand eigener Erfahrungswerte, der Literatur sowie unter Annahme einer zu erwartenden Differenz von 20% und einem Signifikanzniveau von 5% bestimmt. Für die Anwendung des ANOVA-Verfahrens ergab sich eine erforderliche Anzahl von fünf Schweinen pro Gruppe.

3 Ergebnisse

Mit dem Ziel der Induktion einer myokardialen Hibernation wurde in der vorliegenden Untersuchung bei vierzig Hausschweinen deutscher Landrasse ein Reduktionsstent implantiert. In den ersten vier Wochen starben dabei elf Versuchstiere: fünf in den ersten sieben Tagen sowie ein Tier zwischen Tag 28 und 49 der Versuchsreihe. Fünf weitere Schweine wurden auf Grund eines Herzinfarkts größer als 8 % der linksventrikulären Muskelmasse von der Studie ausgeschlossen. Ursächlich dafür war eine frühzeitige Stentokklusion innerhalb der ersten sieben Tage, welche durch die Koronarangiographie am Tag 7 nachgewiesen werden konnte. Die verbleibenden 24 Versuchstiere wurden in die Gruppen A bis E eingeteilt und nachfolgend ihrer Aufteilung entsprechend behandelt. Abschließend wurde die Expression von eNOS, die endotheliale Proliferation, die Neovaskularisation und die myokardiale Perfusion im Gewebe untersucht sowie die globale und regionale Herzfunktion ermittelt.

3.1 Therapeutische Neovaskularisation durch retrograde Infusion von eNOS S1177D in die anteriore interventrikuläre Koronarvene

3.1.1 eNOS Expression nach Retroinfusion von eNOS S1177D cDNA

Angesichts des Versuchmodells musste initial verifiziert werden, dass die retrograde Infusion von liposomaler cDNA zu einer erfolgreichen Transfektion von eNOS S1177D führt. Hierfür wurde bei den Tieren der Gruppen D und E die Expression von eNOS im myokardialen Gewebe analysiert.

Im Vergleich zu den Kontrolltieren konnte unter dem Fluoreszenzmikroskop 72 Stunden nach retrograder Behandlung eine gesteigerte endotheliale eNOS-Expression im ischämischen Areal transfizierter Herzen beobachtet werden (Abb. 3.1(a) sowie 3.1(b)). Durch eine Antikörpermarkierung gelang gleichermaßen die optische Detektion der induzierbaren Isoform (iNOS). Die Abbildungen 3.1(c) und 3.1(d) veranschaulichen, dass die Expression von iNOS überwiegend auf runde Zellen, zum Beispiel Makrophagen, beschränkt blieb und bei diesen keine Expression von eNOS stattfand.

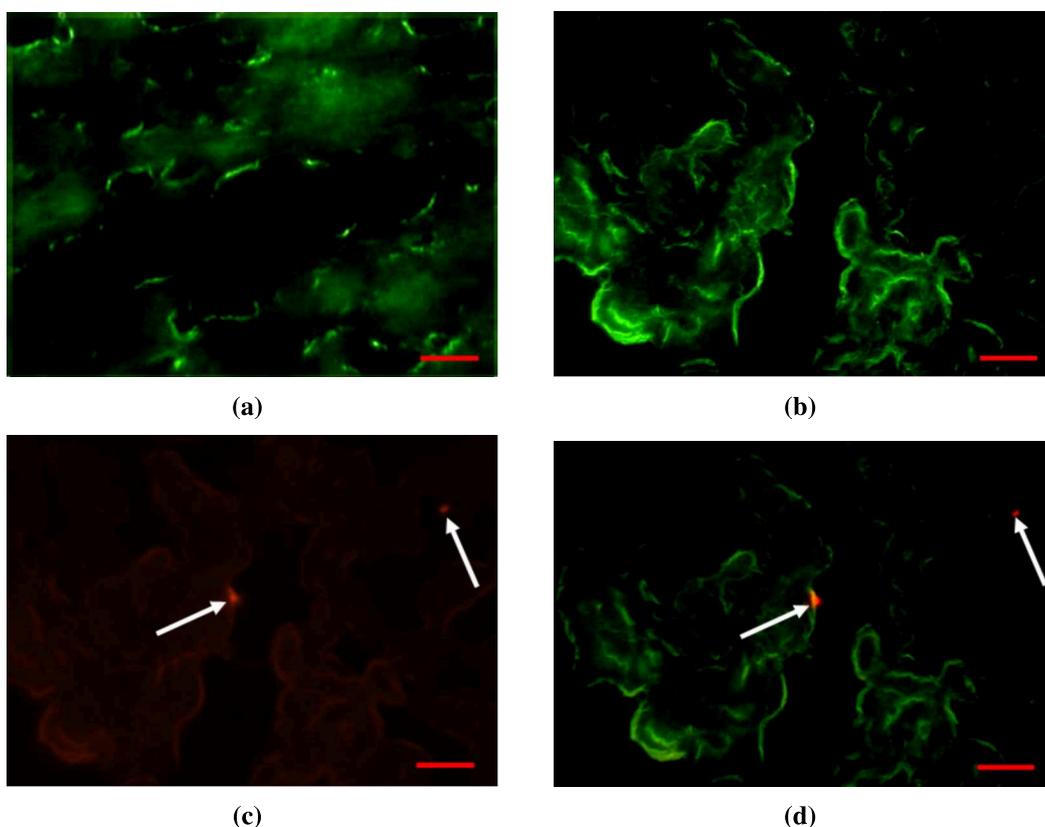


Abb. 3.1: Gesteigerte eNOS-Expression 72 h nach retrograder Infusion von eNOS S1177D cDNA in die anteriore interventrikuläre Koronarvene (Fluoreszenzmikroskop)

Im Vergleich zu einem Kontrollherzen (a) führte die Transfektion von eNOS S1177D zu einer gesteigerten eNOS Expression im ischämischen Gewebe (b); die Markierung von iNOS (Pfeile) zeigte eine Beschränkung auf runde Zellen (c), welche eNOS nicht exprimierten (d) (Fluoreszenzüberlappung). Roter Balken = 50 μ m.

Die quantitative Evaluation der eNOS-Expression erfolgte mittels Immunoblotting von eNOS im ischämischen und nicht-ischämischen Myokard. Dieses war entweder mit eGFP cDNA oder mit eNOS S1177D cDNA behandelt worden. Nach retrograder Infusion zeigte sich eine 2,3-fache Steigerung der eNOS-Expression im ischämischen LAD-Stromgebiet (Abb. 3.2).

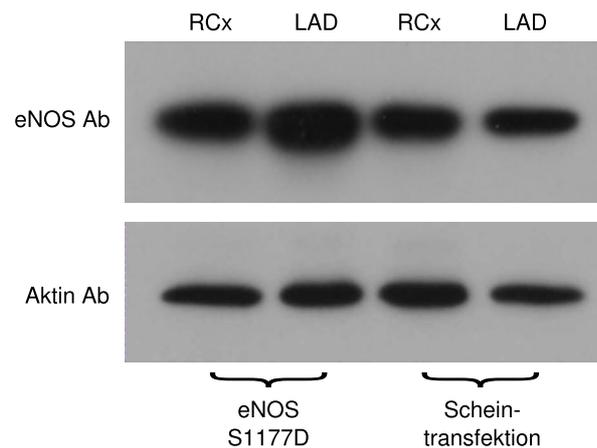


Abb. 3.2: Quantitative Bestimmung von eNOS im myokardialen Gewebe

Immunoblotting von eNOS offenbarte eine 2,3-fache Steigerung der eNOS Expression im ischämischen Myokard der mit eNOS S1177D behandelten Tiere (repräsentativer Western-Blot aus drei Experimenten).

In Abbildung 3.3 ist ergänzend der Gehalt von cGMP im ischämischen Gewebe prozentual zur Menge im nicht-ischämischen Areal angegeben. Die Versuchstiere, welche ausschließlich mit eGFP cDNA behandelt worden waren, wiesen im Radioimmunoassay eine cGMP-Konzentration von 68,4 % auf, während nach der Transfektion von eNOS S1177D ein Anstieg des cGMP-Gehaltes auf 117,1 % verzeichnet wurde. Die gesteigerte Expression von eNOS induzierte demnach im minderperfundierter Myokard eine vermehrte Bildung von cGMP, einem für NO sensiblen *second messenger*, und übertraf sogar den cGMP-Gehalt in der normaldurchbluteten RCx-Region. Dieser Effekt konnte durch Koapplikation von L-NAME wiederum verhindert werden, wobei die cGMP-Spiegel annähernd die Werte der mit eGFP cDNA behandelten Kontrollgruppe erreichten.

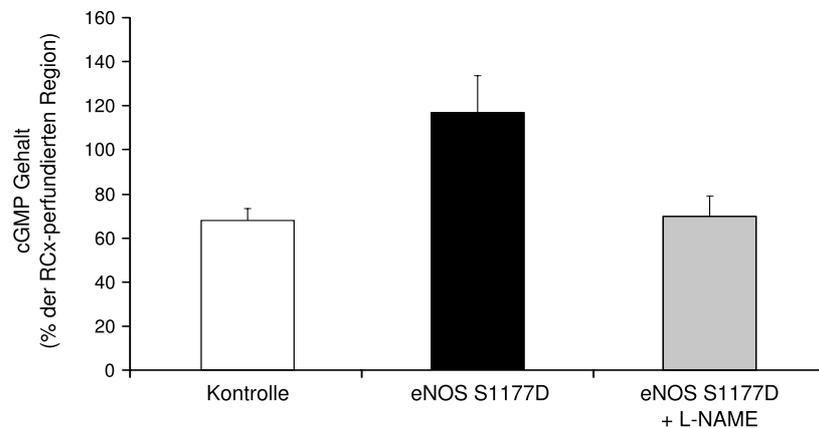


Abb. 3.3: Vermehrte myokardiale Bildung von cGMP nach Behandlung mit eNOS S1177D cDNA
Detektion der cGMP-Spiegel mittels Radioimmunoassay zeigte eine signifikante Erhöhung der cGMP-Bildung im ischämischen Myokard, welches mit eNOS S1177D cDNA behandelt worden war. Bei Koapplikation von L-NAME konnte kein vermehrter cGMP-Gehalt beobachtet werden (3 Tiere/Gruppe, jeweils drei Gewebeprouen).

3.1.2 Endotheliale Proliferation in vitro und in vivo nach Transfektion von eNOS S1177D cDNA

In der Literatur wird endotheliales NO als bedeutender Mediator der Angiogenese beschrieben und übt hierbei entscheidenden Einfluss auf die Zellproliferation aus. In vier unabhängigen Experimenten wurde daher die endotheliale Zellproliferation nach Transfektion von eNOS S1177D in vitro untersucht.

Aus Abbildung 3.4 ist ersichtlich, dass die gesteigerte Produktion von NO in der Lage ist, die Proliferation von hypoxischen koronaren Endothelzellen deutlich zu steigern. In diesem Zusammenhang ist hervorzuheben, dass die Anzahl der mit Ki67 markierten proliferierenden Zellen nach Transfektion von eNOS S1177D nicht nur gegenüber der Kontrolle, sondern auch gegenüber den Zellen nach alleiniger Hypoxie und Reoxygenation erhöht ist. Durch Koapplikation von L-NAME konnte der positive Effekt auf die endotheliale Zellproliferation wiederum deutlich abgeschwächt werden.

Zur Bestätigung der Beobachtungen in vitro erfolgten entsprechende Untersuchungen am Tiermodell. Die Abbildungen 3.5(a) und 3.5(b) zeigen exemplarisch zwei histologische Schnitte aus ischämischem myokardialen Gewebe, welches mit eGFP (Kontrollgruppe) oder eNOS

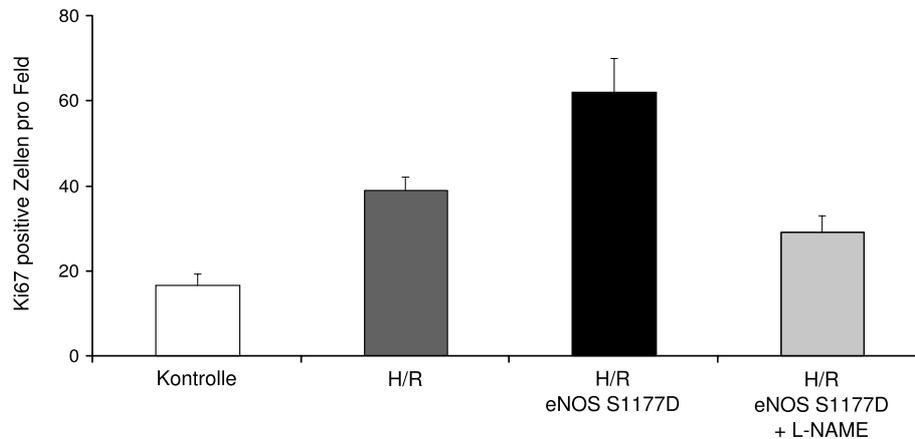


Abb. 3.4: Endotheliale Zellen proliferieren nach Transfektion von eNOS S1177D in vitro

Proliferation von hypoxischen koronaren Endothelzellen ist nach Transfektion von eNOS S1177D (mit Effectene) erhöht und übertrifft die Anzahl proliferierender Zellen nach Hypoxie / Reoxygenation-Stress (vier Experimente). H/R = Hypoxie/Reoxygenation.

S1177D transfiziert worden war. Nach Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki67 ist eine Zunahme Ki67-positiver Zellen im eNOS S1177D cDNA behandelten Myokard zu erkennen (Abb. 3.5(b); braun gefärbte Zellkerne). Die quantitative Analyse anhand der histologischen Schnitte ergab einen Zuwachs von 5,5 auf 14,9 Zellen pro Feld. Dabei konnte die Gabe von L-NAME den Effekt auf die Zellproliferation im ischämischen LAD-Areal auch in vivo deutlich mindern. Die Anzahl proliferierender Zellen in der nicht-ischämischen RCx-perfundierten Region blieb weitestgehend unverändert (Abb. 3.5(c)).

Aus der Literatur ist bekannt, dass für eine therapeutische Neovaskularisation mittels eNOS-Aktivierung die Stimulation von endothelialen Zellen maßgeblich ist, während eine ungehemmte Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen ein negatives Remodeling bewirkt.¹⁴⁶ Die histochemische Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki67 erlaubte jedoch keine eindeutige Kategorisierung der markierten Zellpopulation. Aus diesem Grund erfolgte eine Inkubation mit Ki67-Antikörpern, mit dem Endothelmarker PECAM-1 sowie mit Antikörpern gegen α -Actin glatter Muskelzellen (Abb. 3.6). Dank dieser zusätzlichen Färbungen konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop $42 \pm 5 \%$ der proliferierenden Zellen als Endothelzellen identifiziert werden. Lediglich $21 \pm 2 \%$ der Ki67-positiven Zellen wiesen hingegen das α -Actin Antigen auf.

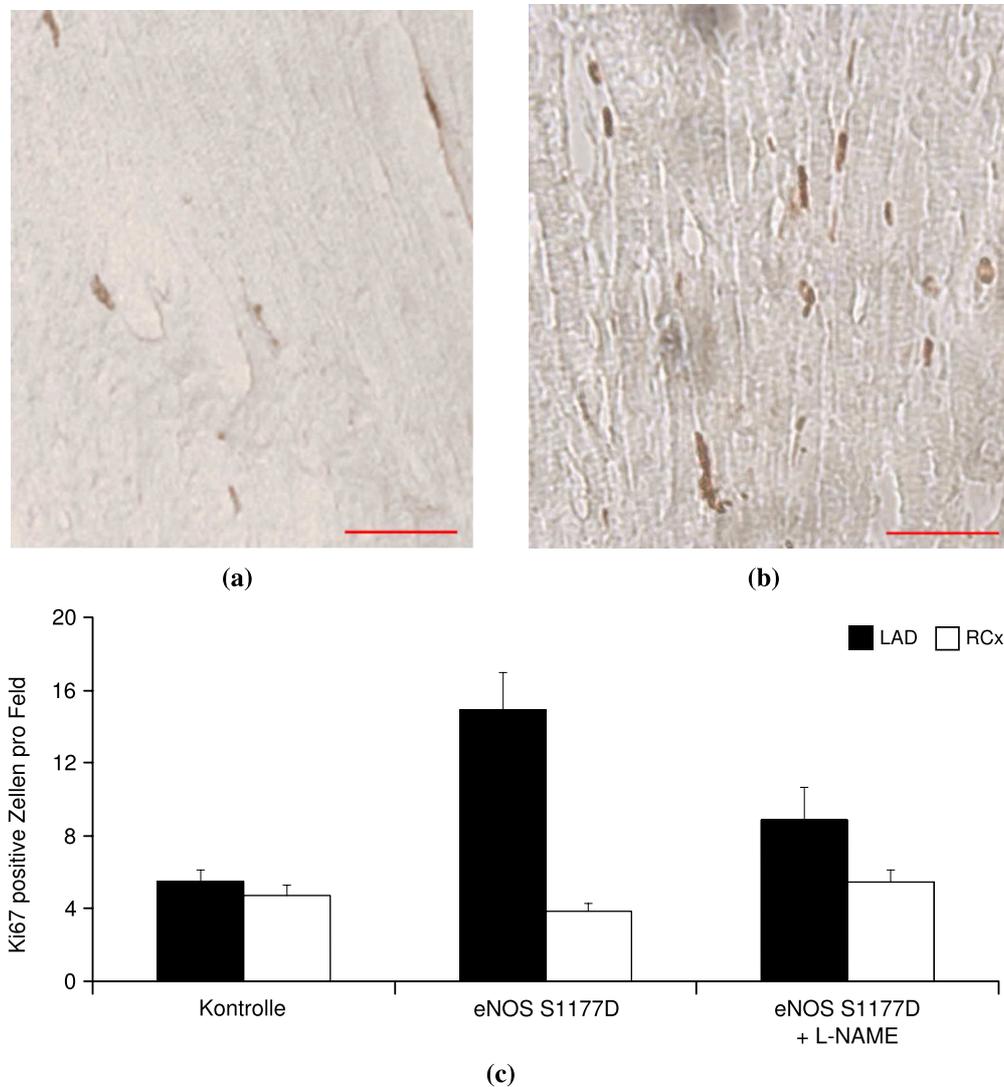


Abb. 3.5: Vermehrte Zellproliferation im myokardialen Gewebe nach Transfektion von eNOS S1177D in vivo

Histochemische Analyse der Proliferation (Ki67-Färbung) nach Transfektion von eGFP (a) sowie von eNOS S1177D (b). **Roter Balken** = 50 μm . (c) Quantitative Bestimmung ergab eine Steigerung der Proliferation im eNOS S1177D transfizierten LAD-Areal. Koapplikation von L-NAME konnte den Zuwachs an proliferierenden Zellen unterbinden (3 Experimente/Gruppe mit jeweils fünf Gewebeprobe(n)).

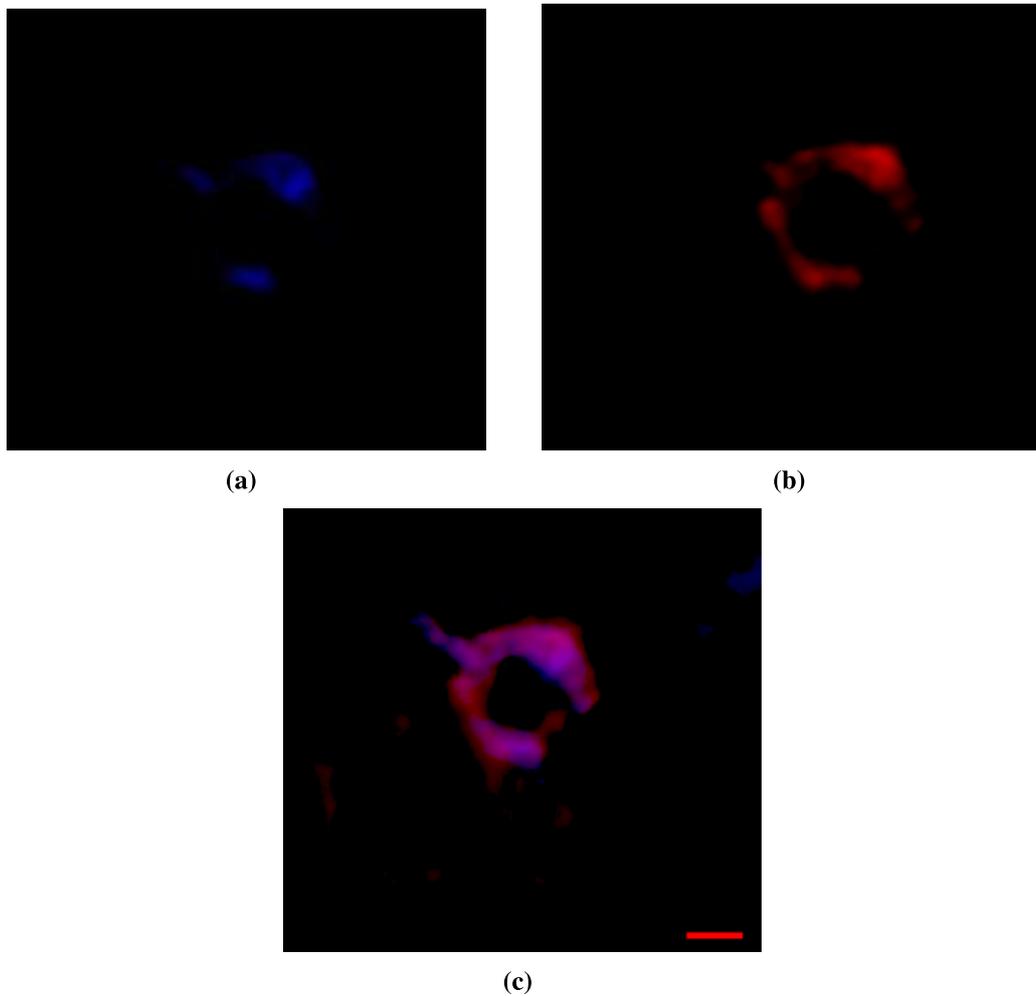


Abb. 3.6: Qualitative Charakterisierung proliferierender Zellen (Fluoreszenzmikroskop)
Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder der Gewebeschnitte nach Färbung mit Ki67 sowie PECAM-1 werden überlagert und der prozentuale Anteil der proliferierenden Subpopulation ermittelt. **Roter Balken** = 10 μm .

3.1.3 Neovaskularisation im hibernierenden Myokard

3.1.3.1 Angiogenese

Endotheliale Zellen sind neben muralen Zellen unentbehrliche Protagonisten der Angiogenese. Inwieweit die erhöhte Anzahl proliferierender vaskulärer Zellen nun zur Ausbildung neuer kapillärer Gefäßstrukturen führte, wurde durch histologische Analyse myokardialer Gewebeproben, die mit PECAM-1 gefärbt worden waren (Abb. 3.7(a)), ermittelt.

Die Untersuchungen zeigten, dass nach der Transfektion von eNOS S1177D ein signifikanter Anstieg der Kapillardichte im hibernierenden Myokard beobachtet werden kann. Drei Tage nach der retrograden Behandlung in Gruppe E betrug die Zahl der Kapillaren in der ischämischen Region 219,8 pro Feld, während bei den Tieren, die zusätzlich mit L-NAME behandelt worden waren, 156,7 Kapillaren pro Feld gezählt wurden (Abb. 3.7(b)). Drei Wochen nach der Transfektion von eNOS S1177D war der proangiogenetische Effekt abgeschwächt, jedoch zeichnete sich mit 172 ± 13 Kapillaren pro Feld weiterhin eine Tendenz zu erhöhter Gefäßdichte ab. Dem gegenüber betrug die Zahl der Kapillaren nach Koapplikation von L-NAME 155 ± 8 pro Feld und war im Vergleich zur Kontrollgruppe weitestgehend unverändert (145 ± 7 Kapillaren pro Feld; Abb. 3.7(c)).

3.1.3.2 Arteriogenese

Der Prozess der Neovaskularisation beruht, neben der Ausbildung neuer kleiner Arteriolen und Kapillaren (Angiogenese), auf der Entstehung von Kollateralarterien aus präexistierenden arteriolären Anastomosen (Arteriogenese). Aus diesem Grund wurde bei den Versuchstieren anhand der Angiogramme der Versuchstage 28 und 49 die Anzahl der Kollateralen bestimmt.

Nach retrograder Infusion von eGFP cDNA wurde in der Kontrollgruppe C keine wesentliche Verbesserung des Kollateralenwachstums festgestellt (Tag 28: $2,4 \pm 0,4$ Kollateralen; Tag 49: $1,9 \pm 7$ Kollateralen). Bei der Auszählung der Kollateralen im postmortalen Angiogramm (Versuchstag 49) zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und

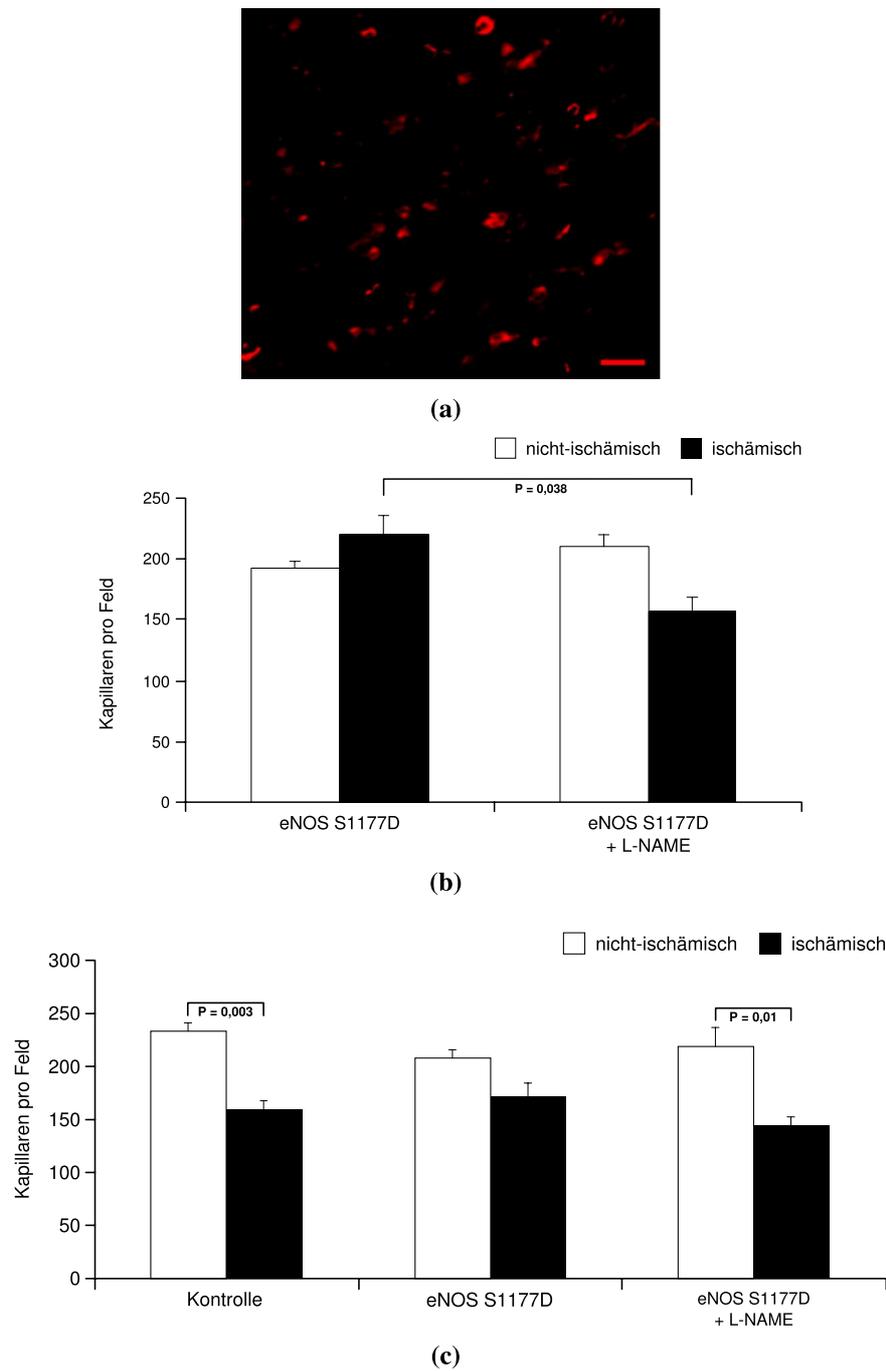


Abb. 3.7: Angiogenese nach Transfektion von eNOS S1177D komplementärer DNA in vivo

(a) Beispiel eines fluoreszenzmikroskopischen Bildes nach Inkubation des myokardialen Gewebes mit dem Endothelmarker PECAM-1 (**Roter Balken** = 100 μm). (b) Drei Tage nach retrograder Behandlung zeigte sich eine signifikante Zunahme der Kapillaren im ischämischen Areal eNOS S1177D behandelte Versuchstiere. (c) Drei Wochen nach der Applikation von eNOS S1177D cDNA wurde ebenso eine proangiogenetische Wirkung beobachtet, diese erreichte jedoch keine statistische Signifikanz.

denjenigen Tieren, die mit eNOS S1177D cDNA behandelt worden waren. Die Gabe von L-NAME und damit die Hemmung der NO-Synthase führte wiederum zu einer Abschwächung des proarteriogenetischen Effekts (Abb. 3.8).

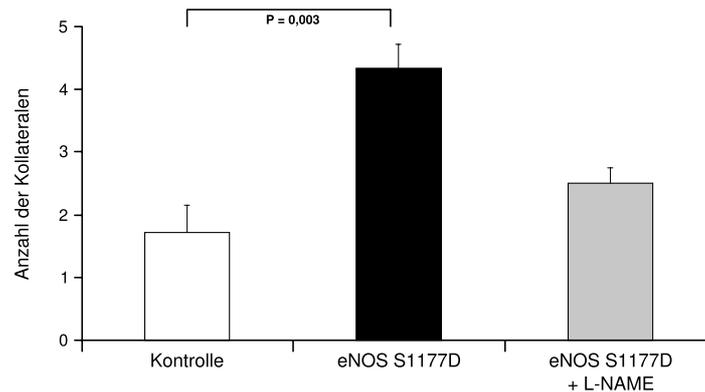


Abb. 3.8: Arteriogenese nach Transfektion von eNOS S1177D komplementärer DNA in vivo
Drei Wochen nach Retroinfusion von liposomaler eNOS S1177D cDNA war im Angiogramm eine deutliche Zunahme des Kollateralenwachstums zu verzeichnen (n = 6 / Gruppe)

3.1.4 Myokardialer Blutfluss und Herzfunktion nach Behandlung mit eNOS S1177D cDNA

3.1.4.1 Regionale Perfusion

Die Transfektion von eNOS S1177D regte das Wachstum neuer mikrovaskulärer Gefäße an und leitete gleichzeitig den Prozess der Arteriogenese ein. Damit waren zwei grundlegende strukturelle Voraussetzungen einer effektiven Neovaskularisation respektive einer verbesserten Perfusion gegeben. Am Versuchstag 28 sowie drei Wochen nach der retrograden Behandlung wurde folglich mit Hilfe fluoreszierender Mikrosphären das Niveau der regionalen Durchblutung im hibernierenden Myokard bestimmt.

Versuchsgruppe Perfusion [ml/min/g]	Kontrollgruppe		eNOS S1177D		eNOS S1177D + L-NAME	
	epikardial	endokardial	epikardial	endokardial	epikardial	endokardial
Tag 28						
LAD	1,08 ± 0,15	1,08 ± 0,08	0,99 ± 0,07	1,01 ± 0,07	0,97 ± 0,11	0,99 ± 0,10
RCx	1,60 ± 0,04	1,62 ± 0,15	1,60 ± 0,12	1,57 ± 0,06	1,49 ± 0,14	1,55 ± 0,04
Tag 49 Ruhe						
LAD	0,85 ± 0,06	0,73 ± 0,05	1,09 ± 0,06*	1,06 ± 0,06*	0,94 ± 0,07	0,82 ± 0,06
RCx	1,38 ± 0,05	1,23 ± 0,06	1,39 ± 0,07	1,45 ± 0,05	1,37 ± 0,09	1,29 ± 0,06
Tag 49 Pacing						
LAD	1,19 ± 0,07	1,08 ± 0,06	1,62 ± 0,12*	1,41 ± 0,09*	1,45 ± 0,06	1,34 ± 0,09
RCx	1,77 ± 0,07	1,72 ± 0,04	1,97 ± 0,08	1,80 ± 0,07	2,02 ± 0,15	1,93 ± 0,11

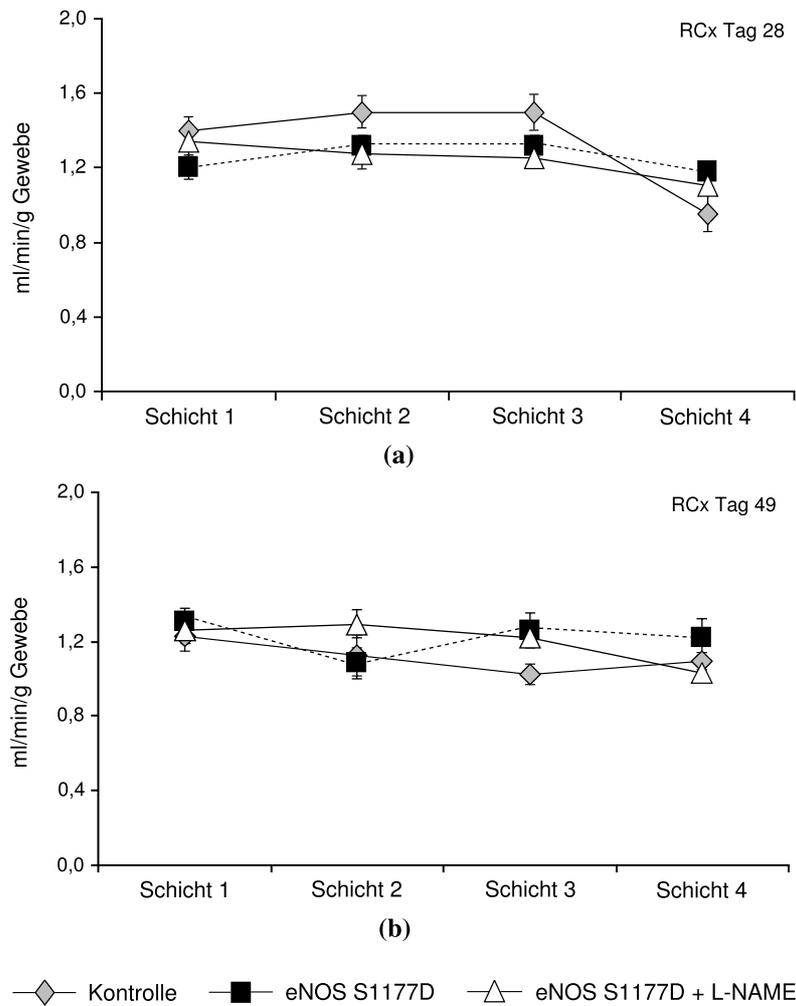
Tab. 3.1: Regionaler myokardialer Blutfluss in epikardialen und endokardialen Gewebeproben

Retrograde Infusion von eNOS S1177D cDNA führte sowohl in Ruhe als auch unter Pacing zu einer verbesserten Perfusion im ischämischen LAD-Areal. Additive Zugabe von L-NAME unterband die positive Wirkung der Transfektion auf den Blutfluss.

* $p < 0,05$ verglichen mit entsprechendem Gewebe der Kontrollgruppe

Am Tag der retrograden Behandlung (Versuchstag 28) sowie am Versuchstag 49 konnte zwischen den Gruppen A, B und C keine relevante Perfusionsdifferenz im normoxischen RCx-Areal festgestellt werden (Abb. 3.9(a) und 3.9(b)). Im Gegensatz zum RCx-Stromgebiet war vier Wochen nach Implantation des Reduktionsstents der Blutfluss im LAD-versorgten Myokard jedoch erwartungsgemäß vermindert, wobei ein abnehmender Perfusionsgradient von der Herzbasis zum Apex beobachtet wurde (Abb. 3.10(a) und 3.10(b)). Am Versuchstag 49 erreichte der Blutfluss in der Kontrollgruppe C lediglich $62 \pm 4\%$ (Ruhebedingungen) beziehungsweise $65 \pm 3\%$ (Pacing mit 140/min) des RCx-Niveaus. Die Durchblutung im normoxischen Myokard steigerte sich bei erhöhtem Sauerstoffbedarf unterdessen um 36% des Ruhewertes.

Die Abbildungen 3.10(a) bis 3.11(b) zeigen, dass die Transfektion eNOS S1177D zu einer Verbesserung der regionalen Perfusion im ischämischen LAD-Stromgebiet führte. Am Versuchstag 49 betrug die Durchblutung unter Ruhebedingungen $77 \pm 3\%$ des RCx-Niveaus, während bei einer Stimulationsfrequenz von 140 Herzschlägen pro Minute (funktionelle Reserve) $80 \pm 5\%$ des RCx-Niveaus erreicht wurden. Die deutlichste Steigerung des Blutflusses konnte dabei im Bereich der Herzspitze beobachtet werden (Abb. 3.10(b)). Die Analyse der

**Abb. 3.9: Unveränderte Perfusion des Gewebes im Kontrollareal am Versuchstag 28 und 49**

In allen drei Versuchsgruppen war sowohl am Versuchstag 28 (a) als auch am Versuchstag 49 (b) unter Ruhebedingungen eine ähnliche Perfusion in der nicht-ischämischen RCx-Region zu verzeichnen (Schicht 1 = basisnächste ischämische Ebene, Schicht 4 = Apex).

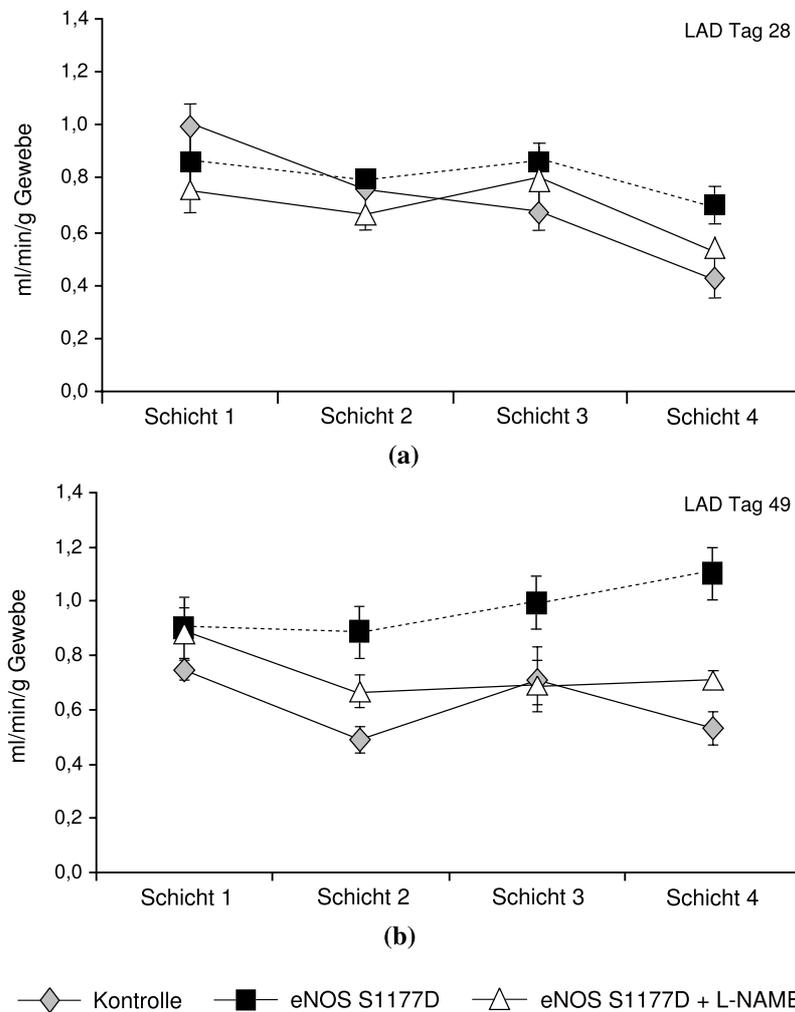


Abb. 3.10: Verbesserte Perfusion in der apikalen Herzregion nach forcierter Expression von eNOS S1177D

(a) Die Durchblutung des LAD-Areals war am Versuchstag 28 in allen drei Versuchsgruppen in gleichem Maße reduziert. (b) Im Vergleich zu der Kontrollgruppe und den zusätzlich mit L-NAME behandelten Tieren führte die gesteigerte Expression von eNOS zu einer signifikant verbesserten myokardialen Perfusion im apikalen LAD-Stromgebiet.

(n = 6 für Kontrolle, eNOS S1177D; n = 5 für eNOS S1177D + L-NAME)

Gewebeproben der Gruppe B demonstrierte wiederum, dass die Koapplikation von L-NAME den positiven Effekt der eNOS S1177D Transfektion abschwächt und folglich kein signifikanter Anstieg der Perfusion im hypoxischen Areal mehr gemessen werden kann (Ruhebedingungen: $69 \pm 3 \%$, Pacing: $70 \pm 5 \%$ des RCx-Niveaus).

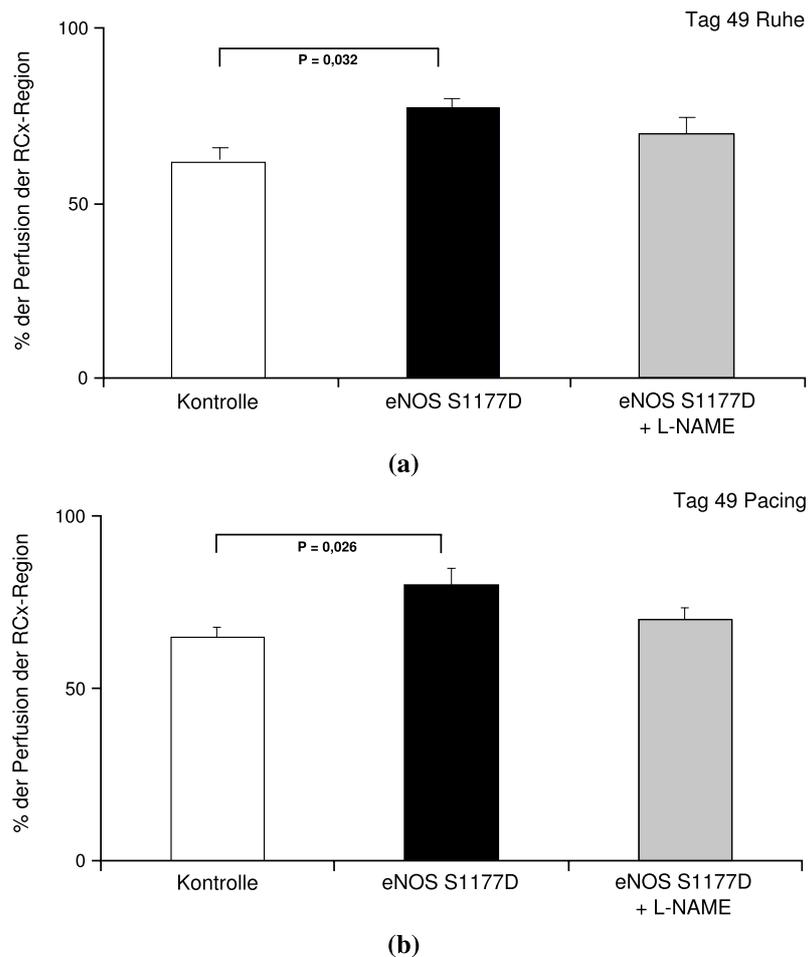


Abb. 3.11: Signifikant gesteigerte Durchblutung sowohl in Ruhe als auch unter Pacing

Im Vergleich zu den Kontrolltieren war die Ratio der LAD/RCx-Perfusion in eNOS S1177D behandelten Tieren sowohl in Ruhe als auch bei atrialer Stimulation signifikant verbessert. (n = 6 für Kontrolle, eNOS S1177D; n = 5 für eNOS S1177D + L-NAME)

3.1.4.2 Globale Herzfunktion

Die vorangegangenen Ergebnisse zeigten, dass die Überexpression von eNOS mit resultierender erhöhter Synthese von NO die Neovaskularisation im hibernierenden Myokard mittels endothelialer Zellproliferation sowie Kollateralenwachstum fördert, und dadurch eine gesteigerte Perfusion im hypoxischen Gewebe ermöglicht wird. Zwei weitere Untersuchungen sollten abschließend darlegen, inwieweit sich die verbesserte Sauerstoffversorgung der ischämischen Areale positiv auf die globale sowie regionale Herzfunktion des Myokards auswirkt. Zur Bestimmung der funktionellen Reserve des Herzens erfolgten die Messungen der regionalen Herzfunktion dabei sowohl unter Ruhebedingungen, als auch während erhöhtem Sauerstoffbedarfs bei rechtsatrialem Pacing mit 120 und 140 Herzschlägen pro Minute.

Versuchsgruppe	Kontrollgruppe	eNOS S1177D	eNOS S1177D + L-NAME
HF [min^{-1}]			
Tag 28	88 ± 6	77 ± 4	84 ± 7
Tag 49	85 ± 4	81 ± 5	85 ± 6
LVEDP [mm Hg]			
Tag 28	18,7 ± 1,2	19,5 ± 0,6	18,4 ± 1,1
Tag 49	20,5 ± 1,1	17,1 ± 0,8	20,6 ± 1,8
LVSP [mm Hg]			
Tag 28	103 ± 4	100 ± 4	102 ± 3
Tag 49	94 ± 4	96 ± 4	106 ± 5
dP/dt _{max} [mm Hg/s]	1,358 ± 111	1,334 ± 75	1,385 ± 24
dP/dt _{min} [mm Hg/s]	-1,195 ± 175	-1,122 ± 46	-1,316 ± 122

Tab. 3.2: Hämodynamische Parameter der globalen Herzfunktion

dP/dt_{max} = Druckanstiegs- bzw. Kontraktilitätsgeschwindigkeit; dP/dt_{min} = Druckabfall- bzw. Relaxationsgeschwindigkeit; LVEDP = linksventrikulärer enddiastolischer Druck; LVSP = linksventrikulärer systolischer Druck.

In der Tabelle 3.2 sind die Messergebnisse verschiedener Parameter der globalen Herzfunktion aufgelistet. Die Auswertung offenbarte keine deutlichen Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen A, B und C. Bei den mit eNOS S1177D cDNA behandelten Tieren zeichnete sich jedoch drei Wochen nach retrograder Behandlung ein tendenziell niedriger linksventriku-

lärer enddiastolischer Druck ab, während in der Kontrollgruppe sowie in der Versuchsgruppe B der LVEDP im Vergleich zum Versuchstag 28 anstieg.

3.1.4.3 Regionale Herzfunktion

Am Versuchstag 49 wurde mit Hilfe der Sonomikrometrie die subendokardiale Segmentverkürzung (SES) des ischämischen Gewebes ermittelt und mit der SES des normalperfundierten Gewebes verglichen. Die Abbildung 3.12(a) veranschaulicht, dass im Bereich der proximalen LAD beim Vergleich aller drei Versuchsgruppen unter Ruhebedingungen kein maßgeblicher Unterschied der SES zu beobachten war (Kontrollgruppe: 63 ± 12 % des RCx-Areals). Darüber hinaus konnte durch rechtsatriales Pacing mit 120 sowie 140 Herzschlägen keine wesentliche Einschränkung der myokardialen Funktion in den unbehandelten Gruppen induziert werden. Jedoch ist zu erkennen, dass während erhöhtem Sauerstoffbedarfs die myokardiale Funktion in der behandelten Gruppe A erhalten bleibt, während in der unbehandelten Gruppe C sowie in der Gruppe B die SES abnimmt.

Aus Abbildung 3.12(b) ist hingegen ersichtlich, dass im distalen Versorgungsbereich der LAD eine deutliche Diskrepanz zwischen der Kontrollgruppe und den mit eNOS S1177D transfizierten Tieren festgestellt werden konnte. In allen drei Versuchsgruppen führte das rechtsatriale Pacing, insbesondere bei 140 Herzaktionen pro Minute, zu einem Abfall der regionalen Segmentverkürzung. Bei einer Herzfrequenz von 140/min sank die myokardiale Funktion bei der mit eGFP behandelten Gruppe C auf 7 ± 4 % des RCx-Areals ab, während in der Gruppe A im Gegensatz dazu eine signifikant bessere SES respektive funktionelle Reserve sowohl bei 120 (41 ± 8 % des RCx-Areals) als auch bei 140 Herzschlägen pro Minute (33 ± 7 % des RCx-Areals) erhalten blieb. Die regionale Kontraktion des ischämischen Areals der Tiere in der Gruppe B, welche mit eNOS cDNA sowie L-NAME behandelt worden waren, zeigte erneut keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe und nahm bei der Erhöhung der Herzfrequenz durch rechtsatriales Pacing erheblich ab.

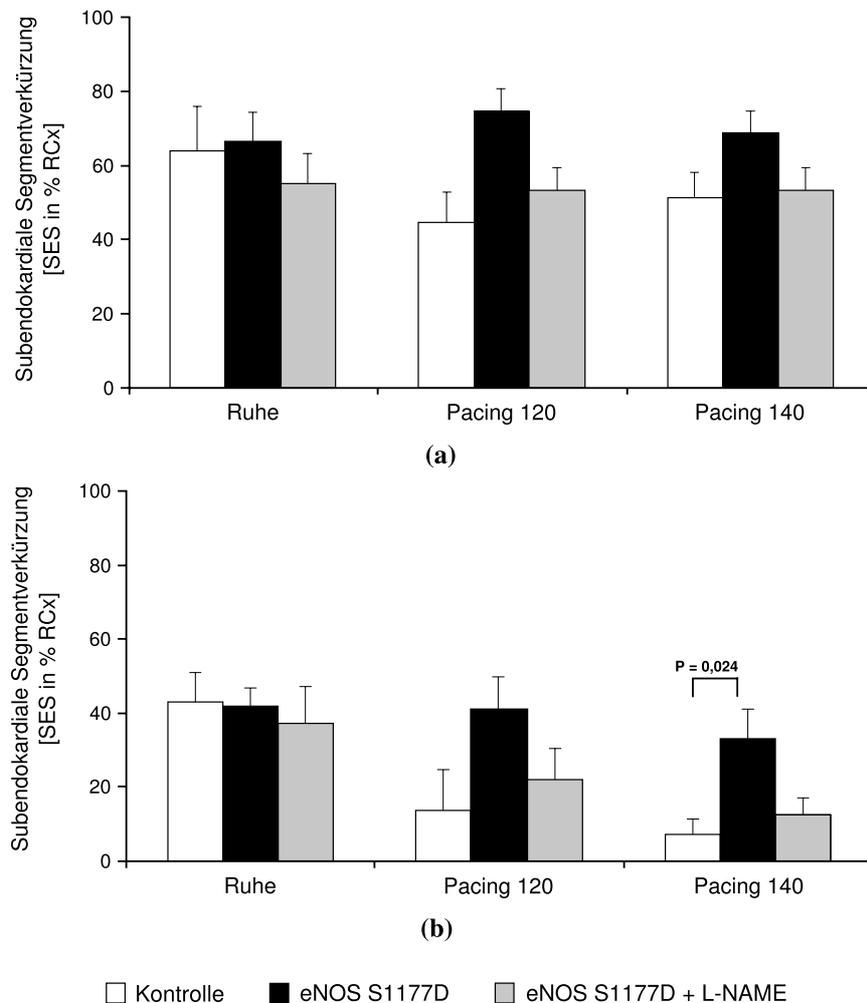


Abb. 3.12: Verbesserte regionale Herzfunktion im distalen LAD-perfundierten Areal

(a) Während im proximalen LAD-Stromgebiet zwischen alle drei Gruppen kein deutlicher Unterschied der subendokardialen Segmentverkürzung zu beobachten war, (b) zeigten die mit eNOS S1177D behandelten Tiere insbesondere bei erhöhtem Sauerstoffbedarf eine deutlich bessere Herzfunktion im apikalen Bereich. (n = 6/Gruppe)

4 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde die retrograde Infusion von eNOS S1177D cDNA in die anteriore Koronarvene zur Induktion eines therapeutischen vaskulären Wachstums und Remodelings im chronisch ischämischen (hibernierenden) Myokard untersucht. Diese Arbeit stellt dabei die erste präklinische Untersuchung an einem porcinen Großtiermodell dar, bei welcher mit Hilfe einer regionalen Überexpression von Stickstoffmonoxid das Ziel einer signifikanten Revaskularisation mit funktionell relevanter Kontraktilitätssteigerung des Myokards verfolgt wurde.

4.1 Das Modell der myokardialen Hibernation am Großtier

4.1.1 Auswahl der Versuchstierspezies

Das kardinale Kriterium bei der Auswahl der Versuchstierspezies in präklinischen Untersuchungen ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen. In kardiovaskulären Studien mit myokardialer Ischämie war dabei für viele Jahrzehnte der Hund die bevorzugte Tierart. Seit den Untersuchungen von Maxwell et al. (1987) hinsichtlich des breiten Spektrums des Kollateralblutflusses in verschiedenen Säugetierspezies, hat jedoch das porcine Modell deutlich an Bedeutung dazu gewonnen und sich dabei auch als Modell der myokardialen Hibernation etabliert.^{76, 113}

Schweine und Menschen teilen wichtige anatomische und physiologische Charakteristiken des Herzens: Das Herzgewicht eines typischen, dreißig Kilogramm schweren Schweines beträgt etwa 0,5 % des Körpergewichts und ist mit dem Verhältnis beim Menschen vergleichbar. Ebenso ist die Ruheherzfrequenz, das Erregungsleitungssystem, der relative koronare Blutfluss, der

Metabolismus sowie die Entwicklung einer Atherosklerose bei beiden Spezies ähnlich. Im Gegensatz zum Hund verfügt das Schwein zudem über ein koronares Dreigefäß-System, welches dem des Menschen insbesondere in der Entwicklung und im Verlauf der linken Koronararterie mit LAD und RCx verwandt ist.^{77,190}

Sowohl das Schwein als auch der Mensch besitzen ein relativ schlecht entwickeltes kollaterales Gefäßnetzwerk. Während das Koronarsystem des Hundes ein ausgeprägtes epikardiales Kollateralsystem formt, weisen die Herzen der anderen beiden Spezies vornehmlich ein dichtes subendokardiales Netzwerk auf, welches dem des Hundes allerdings nicht gleichwertig ist.¹⁵² Aus diesem Grund kann das porcine sowie das menschliche Herz den akuten Verschluss einer epikardialen Koronararterie nicht im selben Umfang kompensieren. Während beim Hund nach der Okklusion ein koronarer Restblutfluss von 15,9 % im entsprechenden Versorgungsgebiet verbleibt, können beim Schwein lediglich 0,6 % der ursprünglichen Durchblutung gemessen werden.^{76,113} Daneben führt die ungleiche Kollateralisierung zu einer unterschiedlichen Verteilung des residuellen Blutflusses an den ischämischen Randzonen, wobei beim Schwein - ähnlich wie beim Menschen - eine deutlich homogenere Grenze zum nicht-ischämischen Areal beobachtet werden kann.¹⁶³ Aufgrund der genannten Analogien mit dem Menschen bezüglich der kardiovaskulären Physiologie, der Anatomie sowie spezieller Perfusionseigenschaften und Kompensationsmechanismen bei myokardialer Ischämie, ist das porcine Herz in der derzeitigen Forschung weit verbreitet. Darüber hinaus sind tierexperimentelle Studien mit Schweinen, verglichen mit Untersuchungen an Hunden oder Primaten, meist mit geringeren Kosten sowie mit geringeren ethischen Bedenken assoziiert.⁷⁶

Zur Untersuchung der therapeutischen Revaskularisation wurde in dieser Studie daher das Hausschwein deutscher Landrasse als Versuchstierspezies eingesetzt. Angesichts der Überlebenszeit von sieben Wochen ab Ankunft erleichterte der Einsatz junger Schweine das Management der Tiere. Gleichzeitig würde die Herzgröße bei adulten Schweinen mit bis zu 320 kg Körpergewicht die Verwendung humanmedizinischer PTCA-Instrumente wesentlich einschränken.

4.1.2 Experimentelle Modelle chronischer myokardialer Ischämie

In den letzten Jahrzehnten kamen in tierexperimentellen Studien verschiedene Verfahren zur Induktion einer myokardialen Ischämie zum Einsatz, darunter der Ameroid-Konstriktor, der

hydraulische Okkluder, die sogenannte fixierte Stenose sowie die in dieser Untersuchung angewandte Implantation eines präparierten Reduktionsstents.^{76,188}

4.1.2.1 Ameroid-Konstriktor

Das Ameroid-Konstriktor-Modell stellt die bislang am häufigsten verwendete Methode für eine chronische Ischämie beim Schwein dar und wurde in zahlreichen Studien zur therapeutischen Revaskularisation umgesetzt.^{76,129,145} Der ursprünglich von Litvak et al. entwickelte Konstriktor besteht aus einem metallischen Außenring, welcher einen scheibenförmigen Kern aus hygrokopischem Kasein umhüllt.¹⁰³ Nach Implantation des Rings um eine epikardiale Koronararterie, in der Regel der RCx, schwillt der Konstriktor durch Absorption von Wasser an und verursacht im Zeitraum von vierzehn bis dreißig Tagen eine vollständige Okklusion des Gefäßes.¹⁰³ Allerdings verursacht der Konstriktor ein mechanisches Trauma des Endothels mit nachfolgender Plättchenaggregation und Thrombusbildung.¹⁷⁸ Infolgedessen kann sowohl der Zeitpunkt als auch das Ausmaß des koronaren Verschlusses mit diesem Verfahren kaum kontrolliert werden, weshalb eine erhebliche Variation in der Größe des infarzierten Gewebes prozentual zur *area at risk* beobachtet wird.^{129,145,166,192} In diversen Studien mit Schweinen wurde nach Okklusion der RCx als Konsequenz dessen eine Mortalitätsrate von annähernd 30 % berichtet.^{46,151}

Zahlreiche Untersuchungen konnten zwar zeigen, dass bei Belastung oder forcierter Vasodilatation (Adenosin) die regionale Perfusion reduziert ist, unter Ruhebedingungen wird durch den Konstriktor jedoch keine Einschränkung der myokardialen Durchblutung hervorgerufen. Dementsprechend konnte drei bis sechzehn Wochen nach Implantation des Ameroid-Rings unter Ruhebedingungen kein signifikanter Unterschied der regionalen myokardialen Funktion im Vergleich zur Kontrollregion beobachtet werden.^{145,158,166,192} Darüber hinaus kann der Ameroid-Ring eine Kompression der benachbarten Koronarvene auslösen und folglich den venösen Blutfluss beziehungsweise eine effektive Retroinfusion negativ beeinflussen.^{129,192} Nicht zuletzt erschwert die koronarvenöse Anatomie des Schweines eine vergleichbare und reproduzierbare Retroinfusion des RCx-Areals. Im Gegensatz dazu ist die anteriore Koronarvene bei vielen Spezies in hohem Maße konsistent, weshalb frühere Studien mit dem SSR an der AIV durchgeführt wurden.¹⁵

Die restriktiven Eigenschaften sowie der normale regionale Blutfluss mit unveränderter myo-

kardialer Funktion unter Ruhebedingungen limitieren daher den Einsatz des Ameroid-Konstriktor-Modells in Studien zur therapeutischen Revaskularisation.⁷⁶

4.1.2.2 Fixierte Stenose

Das Modell der fixierten Stenose wurde bisher vor allem zur Erforschung der Pathophysiologie des hibernierenden Myokards eingesetzt.^{28,41} Zur Induktion der Stenose kommen dabei entweder Seidenbänder oder Okkluder mit einer konstanten inneren Öffnung zur Anwendung, welche in der Regel um die proximalen LAD implantiert werden.^{28,41} Im Vergleich zum Ameroid-Ring besteht der wesentliche Vorteil dieses Verfahrens darin, dass eine relativ gleichmäßige Stenose bzw. myokardiale Ischämie bei den Versuchstieren induziert werden kann. Zudem ist die regionale Perfusion sowie die myokardiale Funktion auch unter Ruhebedingungen reduziert und bietet somit einen zusätzlichen Parameter bei der Beurteilung einer revaskularisierenden Therapie.^{41,76,98} erklärt.^{41,76}

Das Modell der fixierten Stenose ist allerdings aufgrund technischer Anforderungen zur Zeit nicht weit verbreitet und wurde bis dato in Untersuchungen zur Induktion eines therapeutischen vaskulären Wachstums und Remodelings kaum eingesetzt.⁷⁶

4.1.2.3 Hydraulischer Okkluder

Die Technik des hydraulischen Okkluders ist ein gängiges Verfahren und findet in der Erforschung des hibernierenden Myokards sowie diverser revaskularisierender Behandlungsstrategien Verwendung.^{37,75,76} Analog zum Modell der fixierten Stenose kann auch mit dieser Methode ein konstanter Stenosegrad einer Koronararterie herbeigeführt werden, jedoch wird die Inflation des Okkluders mit Hilfe eines externen Katheters gesteuert. Während erste Implementationen an dem LAD von Schweinen noch mit einer sehr hohen Mortalitätsrate von 44 % einhergingen,¹⁸ konnte an einem modifizierten Modell, bei welchem der hydraulische Okkluder um die RCx gelegt wurde und die Versuchstiere sich bis zur Inflation des Okkluders postoperativ mehrere Tage erholen konnten, die Inzidenz fataler Herzrhythmusstörungen auf unter 1 % gesenkt werden.¹⁶⁵ Dieses Verfahren ermöglicht dabei wie die fixierte Stenose die Induktion einer verminderten Perfusion und Funktion im betroffenen Myokardareal, bietet darüber hinaus jedoch die Möglichkeit den Grad der Stenose mit Hilfe der zusätzlich angebrachten

Blutflussmessung beliebig zu manipulieren.⁷⁶ Die wesentlichen Nachteile dieses Modells sind zum einen die chirurgisch schwierige Präparation der Koronararterie sowie die Implantation des Okkluders und der Blutflussmessung, zum anderen die aufwendigere Betreuung der Tiere mit aus dem Körper ausgeleiteten, externen Geräten beziehungsweise Materialien.⁷⁶

4.1.2.4 Reduktionsstent

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Modellen erfordert die Implantation des Reduktionsstents keine Thorakotomie, sondern kann mit Hilfe eines Herzkatheterversfahrens über einen arteriellen Zugang durchgeführt werden. Dieser relativ junge Ansatz zur Induktion einer chronischen myokardialen Ischämie wurde im Jahr 2003 von unserer Arbeitsgruppe entwickelt und zeichnet sich unter anderem durch einen in hohem Maße reproduzierbaren Stenosegrad aus. Unmittelbar nach der Platzierung des präparierten koronaren Stents kann demzufolge angiographisch eine 72 ± 3 %ige Verengung des LAD beobachtet werden, welche sich nach vier Wochen - ähnlich wie beim Ameroid-Konstriktor-Modell - zu einer vollständigen Okklusion der epikardialen Arterie ausdehnt. Allerdings lässt sich der Zeitpunkt des Verschlusses weder präzise prognostizieren noch dokumentieren, weshalb in der vorliegenden Studie ausschließlich Tiere aufgenommen wurden, bei denen am Versuchstag 7 angiographisch ein Restfluss durch den implantierten Stent ersichtlich war. Dies gewährleistete eine langsame, aber stetige Abnahme der myokardialen Durchblutung über vier Wochen und ermöglichte dem Myokard ohne schwerwiegende Infarzierung des betroffenen Gewebes in den Zustand der Hibernation einzutreten. In diesem Zusammenhang konnte in der Untersuchung von v. Degenfeld et al. 28 Tage nach Implantation des Reduktionsstents sowohl unter Adenosin-Stress, als auch unter Ruhebedingungen eine signifikante Verminderung des Blutflusses in dem LAD-versorgten Myokardareal festgestellt werden, wobei durchschnittlich lediglich 2 % der linksventrikulären Masse nekrotisch wurden. Im Zuge der myokardialen Ischämie wurde zudem eine deutlich reduzierte globale Funktion und eine Abnahme der regionalen subendokardialen Segmentverkürzung um 30 % unter Ruhe sowie um 38 % bei intrakoronarer Adenosinabgabe gemessen. Mit Hilfe der Positronenemissionstomographie ermittelte diese Arbeitsgruppe darüber hinaus eine erhöhte Aufnahme von Fluordesoxyglucose im ischämischen LAD-Areal, welche zusammen mit der verminderten Perfusion und Funktion - bei erhaltener Vitalität - den pathophysiologischen Zustand der myokardialen Hibernation bestätigt.^{19,74,188}

Zusammenfassend ergeben sich durch die kathetergestützte perkutane Implantation des Reduktionsstents folgende Vorteile, aufgrund derer dieses Modell in der vorliegenden Untersuchung favorisiert wurde:

- geringerer technischer und zeitlicher Aufwand als bei einer Thorakotomie
- kaum Gewebetrauma, weniger Komplikationen sowie geringere Mortalität
- einfachere postinterventionelle Betreuung der Versuchstiere
- Reduktion der myokardialen Durchblutung und kontraktile Funktion auch unter Ruhebedingungen
- keine funktionell relevante Infarzierung des ischämischen Gewebes
- geringerer interventioneller Einfluss auf revaskularisierende Prozesse
- erwiesene Induktion einer myokardialen Hibernation

An dieser Stelle sei angemerkt, dass durch den Beginn der Retroinfusion vier Wochen nach der Implantation des Reduktionsstents nicht nur das Vorliegen von hibernierendem Myokard garantiert werden sollte, sondern auch unmittelbare physiologische Reaktionen bzw. deren Auswirkungen in Folge der akuten Ischämie ausgeschlossen werden sollten. Die in Abschnitt 1.1.2 sowie insbesondere in Abschnitt 1.2 diskutierten Effekte im Zuge eines akuten Ischämieereizes hätten zwangsläufig mit dem therapeutisch induzierten vaskulären Wachstum und Remodeling interferiert und wären in der Analyse der Ergebnisse kaum von den direkten Auswirkungen der eNOS-Überexpression zu unterscheiden gewesen.

Gleichzeitig muss jedoch berücksichtigt werden, dass eine zu lange Ischämiedauer vor dem Beginn der therapeutischen Angio- und Arteriogenese eine signifikante Funktionssteigerung des Myokards trotz verbesserter Perfusion verhindern könnte.⁷⁶ Wie bereits beschrieben, weist chronisch ischämisches, aber vitales Muskelgewebe im Rahmen einer myokardialen Hibernation progressive morphologische Veränderungen auf, welche mit einer kontraktile Dysfunktion des Myokards einhergehen. Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass eine Revaskularisation bei Patienten mit bereits fortgeschrittener Schädigung der Myozyten zu einer verminderten Erholung der myokardialen Funktion führt als bei Patienten mit geringeren zellulären Veränderungen.^{40,76,156} Beanlands et al. untersuchten beispielsweise die Auswirkungen einer chirurgischen Revaskularisation auf die linksventrikuläre Funktion und die Mortalität bei Patienten mit hibernierendem Myokard. Dabei beobachteten sie, dass eine späte Operation im Vergleich zur frühen chirurgischen Intervention mit einer erhöhten präoperativen Mortalität sowie mit einer reduzierten Funktionsverbesserung des linken Ventrikels assoziiert ist.¹⁰ Die

Ausprägung der morphologischen Alterationen übt demzufolge einen entscheidenden Einfluss auf den Grad der Erholung der kontraktile Funktion nach Revaskularisation aus. Da die meisten klinischen Studien zur therapeutischen Revaskularisation mittels Wachstumsfaktoren vor allem sogenannte *no option* Patienten mit schwerer KHK einschlossen, sollten diese Beobachtungen bei der Analyse der überwiegend enttäuschenden Resultate in Bezug auf einen signifikanten klinisch-funktionellen Benefit mit in Betracht gezogen werden.⁷⁶

4.2 Interpretation der Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur

4.2.1 Expression von eNOS in vivo

In Bezug auf das Studiendesign stellte die effektive Transfektion der eNOS cDNA mit darauf folgender erhöhter Expression von eNOS eine essentielle Voraussetzung sowie Ausgangspunkt für diese Untersuchung dar. Kupatt et al. konnten unter Anwendung eines liposomalen Vektors bereits eine effiziente Transfektion von eNOS S1177D cDNA mittels retrograder Infusion in die anteriore Koronarvene erzielen.⁹² Angesichts ihrer grundlegenden Bedeutung wurde eine suffiziente Genexpression auch in der vorliegenden Untersuchung verifiziert. In diesem Zusammenhang führte die zweimalige Retroinfusion von insgesamt 1,5 mg cDNA zu einer 2,3-fachen Überexpression von eNOS im ischämischen LAD-Stromgebiet. Dieser Wert bestätigt die Resultate von Kupatt et al., die unter Verwendung derselben Menge cDNA eine 2- bis 2,5-fache Steigerung der eNOS Expression festgestellt hatten und stimmt mit den Beobachtungen anderer Studien, welche ebenfalls einen myokardialen Gentransfer mittels koronarvenöser Retroinfusion untersuchten, überein.^{14,92,140} Die hohe Transfektionsrate mit gesteigerter Genexpression ist dabei insbesondere dem SSR zuzuschreiben, das eine verlängerte Kontaktzeit zwischen liposomalem Vektor und myokardialem Gewebe ermöglicht. Nach den Erfahrungen unserer Arbeitsgruppe führt diese Methode der Retroinfusion dabei überwiegend zu einer Transfektion von mikrovaskulären Endothelzellen und koronaren Mikrogefäßen und nicht von Myozyten.⁹¹

Bekanntermaßen induziert freigesetztes Stickstoffmonoxid die Synthese des intrazellulären *second messenger* cGMP. Die erhöhte Produktion von zyklischem GMP im Vergleich zu den

mit L-NAME behandelten Versuchstieren sowie zum Kontrollareal bestätigte daher rückwirkend eine gesteigerte Bildung von NO und lässt cGMP-vermittelte Effekte in Folge der Überexpression von eNOS annehmen.⁴ Diesbezüglich ist anzumerken, dass NO an der Modulation der Kontraktilität sowie der Frequenz des Herzens beteiligt ist, womit eine nicht selektive Hemmung nativer oder induzierter NO-Synthasen durch L-NAME die kardiale Funktion der Schweine beeinträchtigen könnte. Kupatt et al. konnten allerdings bei derselben verwendeten Menge von L-NAME keine eingeschränkte Myokardfunktion beobachten.⁹² Um ferner einen akuten Effekt der NOS-Hemmung in dieser Untersuchung sicher auszuschließen, wurde die Gabe von L-NAME 24 Stunden vor den Messungen des Versuchstages 49 abgesetzt. Zur Diskussion potentieller negativer Auswirkungen einer vermehrten Expression von eNOS beziehungsweise Synthese von NO siehe Abschnitt 4.3.

4.2.2 Endotheliale Proliferation in vitro und in vivo

Die Proliferation vaskulärer Zellen stellt einen grundlegenden Prozess der Angiogenese sowie der Arteriogenese dar.⁶⁸ Für die Induktion einer Proliferation endothelialer sowie muraler Zellen genügt dabei wie bereits beschrieben eine Ischämie des myokardialen Gewebes.^{78,194} Aus diesem Grund musste in dieser Untersuchung die native Reaktion des Körpers auf die Hypoxie von einem zusätzlich herbeigeführten proliferativen Effekt durch die Transfektion von eNOS S1177D unterschieden werden. Erwartungsgemäß war die Proliferation von hypoxischen koronaren Endothelzellen in vitro im Vergleich zur nicht-hypoxischen Kontrolle erhöht. Die proliferationssteigernde Wirkung wurde allerdings durch die Transfektion von eNOS S1177D nicht nur in vitro, sondern auch in vivo nochmals deutlich übertroffen (Abb. 3.4). Angesichts der verminderten Zahl Ki67-positiver Zellen nach Koapplikation von L-NAME ist letztendlich eine direkte Wirkung der eNOS-Überexpression auf die vaskuläre Zellproliferation, als Kennzeichen der revaskularisierenden Wirkung, anzunehmen. Da sich das Problem einer verlängerten Kontaktzeit dabei in vitro nicht stellt, können die positiven Ergebnisse in vivo - zumindest zum Teil - wiederum dem SSR zugeschrieben werden.

Darüber hinaus konnte mit Hilfe der PECAM-1-Färbung der Großteil der Ki67-positiven Zellen in vivo als endotheliale Zellen identifiziert werden. Diese Ergebnisse entsprechen den Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls eine deutliche Zunahme der endothelialen Proliferation und Migration infolge einer vermehrten eNOS-Expression feststellen konnten.^{4,81}

In diesem Zusammenhang muss ein vaskuläres Wachstum und Remodeling während eines revascularisierenden Prozesses ausdrücklich von einem sogenannten negativen Remodeling unterschieden werden. In der Literatur gilt NO als bedeutender Antagonist der Proliferation glatter Muskelzellen.^{146,150,197} So konnte beispielsweise in eNOS-*knock-out*-Mäusen im Sinne eines negativen Remodelings eine deutlich verstärkte, beziehungsweise unkontrollierte Proliferation glatter Muskelzellen nach Ligation der A. carotis externa beobachtet werden,¹⁴⁶ während eine artifizielle eNOS-Expression die Proliferation und somit den Lumenverlust des Gefäßes deutlich hemmen konnte.¹⁵⁰ Im Rahmen einer Gefäßerkrankung, welche mit einer Störung der vaskulären Homöostase respektive reduzierten Bioverfügbarkeit von NO einhergeht, trägt eine unkontrollierte Proliferation glatter Muskelzellen daher wesentlich zur Entwicklung einer Atherosklerose oder Restenose bei.^{31,146}

Zusammenfassend unterstützen unsere Ergebnisse den Zusammenhang, dass eNOS über die Aktivierung der endothelialen Zellproliferation sowie über die Hemmung einer überschießenden Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen die Revaskularisation im ischämischen Myokard kontrolliert.^{30,57,146,197} Inwieweit die Wiederherstellung einer ausreichenden Synthese von NO darüber hinaus die Progression einer Atherosklerose aufhalten könnte, bleibt abzuwarten.

4.2.3 eNOS und Revaskularisation

Unger sowie von Post et al. stellten Überlegungen über die verschiedenen möglichen experimentellen Endpunkte in Studien zur therapeutischen Revaskularisation an.^{136,178} Sie kamen zu dem Schluss, dass diese Untersuchungen als Minimum eine Beurteilung der regionalen myokardialen Funktion und Perfusion vor und nach Behandlung sowie eine histologische Evaluation der Angiogenese und Arteriogenese beinhalten sollten. Die histologische Analyse sollte des Weiteren immunhistochemische Färbungen für zellspezifische Marker einschließen, um die Existenz von endothelialen Zellen in den vermuteten Blutgefäßen zu bestätigen.^{136,178}

Daneben konnten mehrere tierexperimentelle und klinische Studien zeigen, dass im Rahmen sequentieller Perfusionsmessungen mit Bestimmung der absoluten Werte des myokardialen Blutflusses sowohl eine räumliche Heterogenität zwischen verschiedenen linksventrikulären Arealen, als auch eine Variabilität innerhalb einer bestimmten Region des Myokards zu beobachten ist. Aus diesem Grund wird für eine akkurate Einschätzung potentieller Veränderungen

der myokardialen Perfusion eine Normalisierung der Messergebnisse verlangt, bei welcher die regionale Durchblutung des ischämischen Areals prozentual zu der im nicht-ischämischen Gebiet angegeben wird. Ähnlich verhält es sich bei der Evaluation der myokardialen Funktion durch Bestimmung der subendokardialen Segmentverkürzung mit Hilfe der Sonomikrometrie. Auch hier sollten die Ergebnisse zur besseren Vergleichbarkeit und Transparenz normiert werden und beispielsweise prozentual zu den Werten im nicht-ischämischen Kontrollareal ausgedrückt werden.^{76, 136, 178}

Die angewandten Methoden und Analysen in der vorliegenden Untersuchung erfüllen die oben genannten Anforderungen für eine normgerechte Interpretation der Ergebnisse im Rahmen einer Studie zur therapeutischen Revaskularisation.

4.2.3.1 Angiogenese

Die Neubildung von Kapillaren aus präexistierenden Blutgefäßen ist wesentlich an der metabolischen Adaption des ischämischen Myokards an die Hypoxie beteiligt (siehe Abschnitt 1.2.1) und gilt als wichtiger Parameter zur Beurteilung der Effektivität einer therapeutischen Revaskularisation.^{136, 162, 178} Nach der Applikation von 1,5 mg eNOS cDNA in die anteriore Koronarvene kam es zu einer Zunahme der Kapillardichte im hibernierenden Myokardareal, welche im Vergleich zu den mit L-NAME behandelten Tieren drei Tage nach der Transfektion statistisch signifikant war. Allerdings war der proangiogenetische Effekt drei Wochen nach der retrograden Behandlung abgeschwächt, auch wenn die Differenz der Kapillardichte zwischen gehemmter und induzierter eNOS-Expression dennoch auf eine gefäßbildende Wirkung von NO hinweist. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, welche die Wirkung einer Transfektion oder Aktivierung von eNOS in einem ischämischen Hinterlauf-Modell erforscht haben und eine erhöhte relative Kapillardichte beobachten konnten.^{4, 20, 135} Die Induktion der Proliferation vaskulärer Zellen führte somit zur Ausbildung neuer kapillärer Gefäßstrukturen, welche jedoch im Vergleich zur beobachteten Proliferationssteigerung eine schwächere Ausprägung zeigten.

4.2.3.2 Arteriogenese

Im Gegensatz zur Angiogenese ist durch die Bildung von Kollateralarterien aus präexistierenden arteriolären Anastomosen (sogenannte *natürliche Bypässe*) eine partielle Regeneration der Durchblutung des ischämischen Myokards möglich (siehe Abschnitt 1.2.2). Einige Autoren postulieren daher, dass das primäre Therapieziel im Zuge einer revaskularisierenden Behandlung vor allem die Stimulation der Arteriogenese sein sollte.^{7,32,119,162}

In unserer Untersuchung war drei Wochen nach der Transfektion von eNOS S1177D die Anzahl der Kollateralen im ischämischen Myokardareal im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Zudem war durch die Gabe des NOS-Inhibitors L-NAME der arteriogenetische Effekt bedingt durch die eNOS-Überexpression deutlich abgeschwächt. Diese Beobachtungen bestätigen die These, dass NO im Rahmen einer Ischämie am Prozess der Arteriogenese beteiligt ist, erlauben indes nicht die Annahme, dass allein die Transfektion von eNOS beziehungsweise das daraus gebildete NO zu der vermehrten Anzahl an Kollateralen geführt hat. Wie in Abschnitt 1.2.2 beschrieben führt auch eine gesteigerte Wandschubspannung infolge einer hämodynamisch relevanten Stenose über die Aktivierung endothelialer Zellen zur Induktion von eNOS. Die therapeutisch induzierte Arteriogenese lässt sich somit mit hoher Wahrscheinlichkeit durch einen bzw. eine Kombination dieser Mechanismen erklären, kann aber nicht mit Sicherheit auf einen direkten Effekt der eNOS Überexpression zurückgeführt werden. Dennoch bleibt anzumerken, dass in einem ischämischen Hinterlauf-Modell am Kaninchen, welches analog zum Schwein kaum Kollateralgefäße besitzt, sowie in einem Ameroid-Konstriktor-Modell hypercholesterinämischer Schweine nach Gabe des NO-Donors L-Arginin, ein ähnliches mikro- und makrovaskuläres Wachstum wie in dieser Untersuchung beobachtet werden konnte.^{123,125}

In Anbetracht eines neuen ischämischen Hinterlauf-Modells, das die Evaluation der Arteriogenese ohne angiogenetische Einflüsse ermöglicht, bezweifeln Cai und Schaper hingegen eine direkte Wirkung der endothelialen NO-Synthase auf die Arteriogenese.²³ Zwar kann in Mäusen mit ausgeschaltetem eNOS-Gen nach der Okklusion der Femoralarterie eine verzögerte Erholung des Blutflusses beobachtet werden, jedoch wurde mit Hilfe von morphometrischen Analysen ein gewöhnliches Kaliber sowie eine normale Anzahl der Kollateralarterien festgestellt.¹¹⁵ Zudem konnte die Applikation eines NO-Donors die Perfusion wieder auf das Niveau der Wild-Typ Mäuse anheben.¹¹⁵ Sie folgerten aus diesen Ergebnissen, dass die Aktivität von

eNOS für eine NO vermittelte Vasodilatation der Kollateralgefäße während der Regeneration der Durchblutung von entscheidender Bedeutung ist, allerdings keine Rolle in der Induktion arteriogenetischer Prozesse spielt. Aufgrund der in der Literatur häufig beobachteten Reduktion arteriogenetischer Prozesse bei der Gabe von L-NAME stellten sie die Hypothese auf, dass dieser relativ unspezifische NOS-Hemmer auch die induzierbare NO-Synthase von Monozyten beziehungsweise Makrophagen inhibiert und dadurch deren starke Wirkung auf das Kollateralwachstum abschwächt.^{23,115} Allerdings erklärt dieses Modell die im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtete erhöhte Anzahl an Kollateralarterien in den mit eNOS S1177D behandelten Schweinen nicht hinreichend. Neben der Speziesdifferenz könnte dafür insbesondere ein sogenanntes *vascular backward signaling* verantwortlich sein. Dabei führt ein induziertes Kapillarwachstum über einen gesteigerten Fluss zu einer erhöhten Wandschubspannung in den vorgeschalteten Gefäßsegmenten und folglich zu einer gesteigerten Bildung von Kollateralen.⁹⁰ Daneben konnte in dieser Untersuchung keine vermehrte Stimulation der Monozyten-Rekrutierung, bedingt durch die Überexpression von eNOS, beobachtet werden. Ferner scheint iNOS im Rahmen einer Revaskularisation im chronisch ischämischen Gewebe, verglichen zur Tumorangiogenese, eine untergeordnete Rolle zuzukommen.⁹¹

Zur Detektion der Kollateralarterien mit Hilfe der Koronarangiographie muss der Durchmesser der Gefäße mindestens 130 µm betragen. Dabei beeinflussen verschiedene schwierig zu kontrollierende Faktoren die angiographische Darstellung der Kollateralen, darunter der Gefäßtonus, die Menge des injizierten Kontrastmittels, der Injektionsdruck sowie die Medikation, und erschweren somit die korrekte Analyse einer arteriogenetischen Stimulation durch gefäßbildende Substanzen.¹⁶⁰ Da die angiographische Einstufung des Kollateralwachstums zudem nicht mit der myokardialen Perfusion und Funktion korreliert, sind zur Evaluation einer funktionell relevanten Revaskularisation ergänzende Untersuchungen erforderlich.⁴⁷

4.2.3.3 Perfusion

Die Wiederherstellung eines adäquaten Blutflusses im ischämischen Gewebe bildet die Grundlage für eine partielle bis vollständige Regeneration der kontraktilen Funktion des hibernierenden Myokards. Infolge der Transfektion von eNOS S1177D und der daraus resultierenden Induktion einer Angio- sowie Arteriogenese waren die strukturellen Voraussetzungen für eine effektive Revaskularisation gegeben. Um schließlich eine relevante Steigerung der Perfusion

zu verifizieren, wurde in dieser Untersuchung der regionale myokardiale Blutfluss mit dem etablierten Mikrosphären-Verfahren ermittelt.

Im Vergleich zum normoperfundierte RCx-Areal war die regionale myokardiale Durchblutung des LAD-Areals unter Ruhebedingungen, vier Wochen nach der Implantation des Reduktionsstents, in allen drei Gruppen deutlich reduziert. Dabei konnte zwischen den Versuchstieren kein relevanter Unterschied der Perfusion im LAD-Stromgebiet festgestellt werden. Allerdings war die Ischämie in den apikalen Regionen des Myokards bei allen Tieren am deutlichsten ausgeprägt. Das gezielte und schonende Einsetzen des Reduktionsstents führte somit zu der erwünschten Hypoperfusion im LAD-Areal ohne den Blutfluss in anderen Myokardarealen wesentlich zu beeinträchtigen. In der abgetrennten Myokardschicht am Apex betrug der durchschnittliche relative Blutfluss 0,55 ml/min/g Gewebe, dies entspricht bei einem relativen transmyokardialen Blutfluss von $1,57 \pm 0,04$ ml/min/g im nicht-ischämischen RCx-Areal (Versuchstag 28), trotz regionaler Durchblutungsfluktuationen, annähernd 35 % der normalen Ruheperfusion. Wie in Abschnitt 1.1.2 beschrieben, ist für die Induktion einer chronischen myokardialen Ischämie ohne Infarzierung des Gewebes eine Restdurchblutung von über 25 bis 30 % der Ruheperfusion erforderlich. Die Implantation des Reduktionsstents mit nachfolgender Reduktion des Blutflusses auf maximal 35 % erfüllte somit auch in dieser Untersuchung die Grundvoraussetzung für die Entwicklung einer myokardialen Hibernation.^{142, 154}

Drei Wochen nach der retrograden Behandlung mit eNOS S1177D war die myokardiale Durchblutung verglichen zu derjenigen der Kontrollgruppe und zu derjenigen der mit L-NAME behandelten Tieren insbesondere in den apikalen Arealen signifikant verbessert. Dies lässt sich zum einen durch die geringere basale Perfusion vor der therapeutischen Behandlung in den Apex-nahen Regionen erklären, zum anderen ist in der Literatur auch eine höhere Effizienz des Gentransfers im ischämischen Gewebe bekannt.^{167, 177} Inwieweit durch die ausgeprägtere Ischämie in den apikalen Arealen eine vermehrte Expression von eNOS S1177D im Myokard erfolgte, kann in der vorliegenden Untersuchung jedoch nicht beantwortet werden. Gleichmaßen war infolge der gesteigerten Durchblutung das Verhältnis der LAD-/RCx-Perfusion im Vergleich zur Kontrollgruppe sowohl unter Ruhebedingungen als auch unter Bedingungen mit erhöhtem Sauerstoffbedarf - als Hinweis auf eine erhaltene beziehungsweise wiederhergestellte funktionelle Reserve - signifikant erhöht. Allerdings konnte der Blutfluss distal des Reduktionsstents nicht vollständig wiederhergestellt werden und erreichte daher auch nicht den Wert nicht-ischämischer Regionen. Entsprechend dem beobachteten Wachstum von Kapillaren sowie Kollateralen nach der Transfektion von eNOS S1177D führte die retrograde In-

fusion aber zu einer effektiven Revaskularisation mit verbesserter Durchblutung des ischämischen Myokardareals. Betrachtet man darüber hinaus den zum Versuchstag 28 unveränderten Blutfluss in der RCx-Region am Versuchstag 49 kann angenommen werden, dass durch die selektive Freisetzung des liposomalen Vektors am Zielort keine gefäßbildenden Effekte im nicht-ischämischen Myokard ausgelöst werden. Diese Ergebnisse stimmen mit den Erfahrungen vorheriger Untersuchungen zur retrograden Infusion überein.^{12,14,188}

Eine weitere interessante Beobachtung ist die prozentual stärkere Regeneration der Durchblutung in den epikardialen Myokardschichten. Von Degenfeld et al. konnten diesbezüglich in einer Untersuchung, bei welcher den Versuchstieren FGF-2 retrograd in die anteriore Koronarvene appliziert wurde, ähnliche Resultate aufzeigen.¹⁸⁸ Ursächlich dafür ist mit hoher Wahrscheinlichkeit die transmyokardiale Verteilung pharmakologischer Substanzen und Genektoren im Gewebe, welche ein deutliches Konzentrationsgefälle zwischen subepikardialen und subendokardialen Myokardschichten aufweist.^{14,64,149} Aus diesem Grund kann auch für die retrograde Infusion von eNOS S1177D von einer vermehrten subepikardialen Transfektion ausgegangen werden, die letztendlich zu einem verstärkten therapeutischen Effekt in diesen Arealen führte.

4.2.3.4 Funktion

Die Wiederherstellung bzw. Optimierung der kontraktile Funktion des hibernierenden Myokards stellt hinsichtlich der klinischen Anwendung einer therapeutischen Revaskularisation am Patienten zweifellos das bedeutendste Behandlungsziel dar. Allerdings erzielten bisherige klinische Studien zur Anwendung von gefäßbildenden Faktoren überwiegend keine signifikanten Ergebnisse oder konnten auf Grund mangelnder Verblindung der Studienteilnehmer einen Placeboeffekt (Bsp. Laufbandergometer) nicht ausschließen (siehe Abschn. 1.3).

Bei Betrachtung der isovolumetrischen Druckwerte LVEDP und LVSP sowie insbesondere dP/dt_{\max} , als Parameter der systolischen kontraktile Funktion, und dP/dt_{\min} , als Kenngröße der diastolischen Relaxation, zeigte sich keine deutliche Differenz zwischen den drei Versuchsgruppen. Die Überexpression von eNOS S1177D scheint demnach zu keiner messbaren Verbesserung der globalen Herzfunktion geführt zu haben. Jedoch muss in diesem Zusammenhang auch die Aussagekraft der erhobenen Daten diskutiert werden. Bekanntermaßen beeinflussen zahlreiche endogene und exogene Faktoren die kardiale und vaskuläre Häm-

dynamik. Insbesondere die für die Durchführung der Versuche notwendige Vollnarkose stellt dabei einen wichtigen potentiellen Störfaktor für die Messung hämodynamischer Parameter dar. Zwar erhielten alle Versuchstiere dieselben Anästhetika, jedoch war zum Erhalt einer ausreichenden Narkosetiefe eine individuelle Anpassung der Narkotika- und Analgetikadosis erforderlich. Zudem war auf Grund technischer Schwierigkeiten, zum Beispiel bei der Platzierung der Katheter, die Dauer der Versuche und somit gleichermaßen die Dauer der Narkose von Tier zu Tier unterschiedlich. Letztendlich können daher modulierende Auswirkungen der Vollnarkose auf die Bestimmung der globalen Herzfunktion nicht ausgeschlossen werden.

Im Gegensatz dazu wurde die regionale myokardiale Herzfunktion durch die sensitive Sonomikrometrie ermittelt. Diese erfasst bereits kleine Veränderungen der Kontraktilität und ermöglicht dank ihrer lokalen Anwendung einen Vergleich von ischämischen, behandeltem Myokard und nicht-ischämischem Gewebe. In unserer Untersuchung konnte im Bereich der proximalen LAD kein signifikanter Unterschied der kontraktilen Funktion zwischen den Gruppen festgestellt werden, dennoch zeichnete sich verglichen zu den unbehandelten Tieren unter Bedingungen mit erhöhtem Sauerstoffbedarf eine Verbesserung der Kontraktilität ab. Im Versorgungsareal des distalen LAD hingegen war während rechtsatrialem Pacing mit 120 sowie insbesondere mit 140 Schlägen pro Minute eine deutliche Optimierung der SES erkennbar. Im Sinne des Perfusions-Kontraktions-Gleichgewichts stimmt diese Beobachtung mit der in Abschnitt 4.2.3.3 beschriebenen signifikant verbesserten Perfusion in den apikalen Regionen der Herzen eNOS S1177D transfizierter Tiere überein. Trotz dieser sehr spezifischen Methode können allerdings auch hier störende Einflüsse auf die Messresultate, insbesondere durch die hinzukommende Thorakotomie, nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend induzierte die regionale Überexpression von eNOS nach retrograder Behandlung mit dem SSR ein vaskuläres Wachstum und Remodeling im chronisch ischämischen, hibernierenden Myokard, welches vor allem in den apikalen Myokardarealen zu einer signifikant vermehrten Durchblutung des Gewebes führte. Die Wiederherstellung eines adäquaten Blutflusses mit gesteigerter Substratzufuhr verbesserte letztendlich insbesondere die kontraktile Reserve (rechtsatriales Pacing), weshalb von einer funktionell relevanten Revaskularisation gesprochen werden kann.

4.3 Limitationen

4.3.1 Tierexperimentelles Modell

In Abschnitt 4.1.2 wurden verschiedene Möglichkeiten zur Induktion einer chronischen myokardialen Ischämie vorgestellt. In experimentellen Studien zur therapeutischen Revaskularisation werden dabei üblicherweise junge, gesunde Versuchstiere eingesetzt, bei denen durch die Implantation eines Konstriktors, Okkluders oder Reduktionsstents eine koronare Eingefäßerkrankung künstlich erzeugt wird. In der derzeitigen klinischen Praxis würde eine derartige singuläre Verengung allerdings primär mittels PTCA oder einer Bypass-Operation behandelt werden. Zudem bleiben die restlichen Gefäße des Herzens von der artifiziellen Stenose unbeeinflusst und sind auf Grund des jungen Alters der Schweine nicht im selben Maße atherosklerotisch vorgeschädigt wie bei der klinischen Zielgruppe, d.h. den *no-option* Patienten mit therapieresistenter Angina pectoris beziehungsweise fortgeschrittener KHK. Die Gefäße der Versuchstiere weisen deshalb keine vergleichbare endotheliale Dysfunktion mit reduzierter Bioverfügbarkeit von NO auf und sind infolge dessen potentiell in der Lage, in höherem Maße auf einen revaskularisierenden Reiz zu antworten und dabei angio- sowie arteriogenetische Prozesse zur Regeneration des Blutflusses zu induzieren. Neben der möglichen abgeschwächten direkten stimulatorischen Wirkung von NO auf die Gefäßbildung bei Atherosklerose kommt in diesem Zusammenhang ebenso eine erhöhte Bildung von Angiostatin, einem bekannten Inhibitor der Angiogenese, zum tragen, welche bei verminderter Synthese von NO beobachtet werden kann.¹¹² Die gängigen Ischämie Modelle stellen somit lediglich im erwünschten Endpunkt, der Induktion einer myokardialen Hibernation, ein geeignetes KHK-Modell zur Erforschung revaskularisierender Behandlungsstrategien dar. Die Limitationen des tierexperimentellen Modells könnten daher eine weitere Ursache für die unterschiedlichen therapeutischen Ergebnisse zwischen präklinischen und klinischen Studien darstellen. Die Entwicklung neuer porciner Tiermodelle mit diffuser oder multipler Atherosklerose würde folglich eine bessere Simulation des pathologischen Zustandes der Koronargefäße am chronisch kranken Menschen ermöglichen und letztendlich eine strengere und präzisere Beurteilung therapeutischer Effekte in einem präklinischen Modell mit koronarer Eingefäßerkrankung erlauben.

4.3.2 Klinische Anwendung

4.3.2.1 Retroinfusionsbehandlung am Patienten

Der Koronarsinus erlangte in den letzten Jahren als neuer Zugangsweg für verschiedene kardiale Interventionen neues Interesse. Im Zuge dieser Entwicklung untersuchten Langenberg et al. in einer klinischen Studie mit 62 Patienten, bei welchen eine koronare Bypass-Operation durchgeführt wurde, potentielle Komplikationen beim Einsatz eines Koronarsinuskatheters. Über einen jugulären Zugang gelang ihnen dabei in 92 % der Fälle die Platzierung des Katheters im Koronarsinus.⁹⁹ Vergleichbare Resultate - allerdings über einen femoralen Zugang - erzielten Boekstegers et al. in einer klinischen Studie zur Retroinfusion, bei welcher unter Anwendung eines Retroinfusionskatheters bei 57 von 60 Patienten (95 %) die Katheterisierung des Sinus coronarius erfolgreich war. Das Vorschieben des Katheters in die anteriore Koronarvene war in allen Fällen ohne große Schwierigkeiten möglich.¹²

Des Weiteren berichten Langenberg et al. bei 15 % ihrer Patienten interventionell bedingte kardiale Komplikationen. Bei vier Patienten (6 %) wurde ein Hämoperikard beobachtet, in drei dieser Fälle konnte ein kleines Hämatom im rechten Ventrikel nachgewiesen werden, bei zwei anderen Patienten wurde während der Katheterisierung Kontrastmittel im Myokard des rechten Ventrikels festgestellt und bei drei weiteren Patienten zeigte sich während der Intervention ein irregulärer Herzrhythmus. Die Untersucher merkten diesbezüglich an, dass keine dieser Komplikationen sich in klinisch detektierbaren hämodynamischen Veränderungen äußerte und die Schäden am Herzen ohne die Thorakotomie für die Bypass-Operation unbemerkt geblieben wären. Sie schlossen daraus, dass die Platzierung des Koronarsinuskatheters zwar geringe Schäden am Herzen verursachen kann, jedoch in den meisten Fällen klinisch inapparent bleiben.⁹⁹ Gleichmaßen beobachteten Boekstegers et al. in einer Studie mit 42 Patienten keine schwerwiegenden Komplikationen (Hämolyse, Perikardtamponade, schwere Herzrhythmusstörungen) im Zuge der Retroinfusionsbehandlung.¹²

Technische Schwierigkeiten im Rahmen einer Retroinfusion können insbesondere bei revascularisierenden Behandlungen auftreten, bei welchen der Retroinfusionskatheter in die rechte Koronarvene eingeführt werden muss. Anatomische Untersuchungen ergaben, dass in 25 % der Fälle eine eindeutige Zuordnung einer Vene zu einer Arterie, vergleichbar mit der AIV und dem LAD, nicht gegeben ist. Zudem drainiert die rechte Koronarvene gewöhnlich nicht in den Sinus coronarius, sondern besitzt neben dessen Mündung einen eigenen, gesonderten

Zufluss zum rechten Atrium. Trotz dieser anatomischen Variation ist die Katheterisierung der rechten Koronarvene beim Patienten häufig durchführbar.¹⁵

4.3.2.2 Überexpression von eNOS beim Patienten

Bei der Betrachtung möglicher schädigender Nebenwirkungen infolge der Überexpression von eNOS sollten prinzipiell direkte Einflüsse der eNOS-Überexpression bzw. der NO-Produktion von indirekten Nebenwirkungen durch die Induktion eines vaskulären Wachstums und Remodelings unterschieden werden.

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass eine pharmakologische oder gentechnische Hemmung von eNOS in Apolipoprotein E defizienten Mäusen (ApoE^{-/-}) die Entwicklung einer Atherosklerose begünstigt.^{82,86} In Tiermodellen kann die endotheliale Funktion durch einen Gentransfer von eNOS jedoch wieder verbessert werden und somit die Bildung atherosklerotischer Läsionen inhibiert oder sogar teilweise rückgängig gemacht werden.^{65,121} Untersuchungen an transgenen ApoE^{-/-} Mäusen, welche eine Überexpression von eNOS zeigten, ergaben allerdings kontroverse Ergebnisse. So beobachteten Ozaki et al. eine beschleunigte Bildung atherosklerotischer Läsionen,¹³⁰ während van Haperen et al. in einem vergleichbaren Mausmodell eine Reduktion der atherosklerotischen Formationen feststellten.¹⁸³ Die Gründe für diese abweichenden Resultate sind weitestgehend ungeklärt, es bleibt jedoch festzuhalten, dass eNOS oder die Überexpression von eNOS unter bestimmten Umständen atherosklerotische Prozesse fördern kann. In der Literatur wird in diesem Zusammenhang insbesondere die anfangs beschriebene Entkopplung der eNOS Aktivität, bedingt durch erhöhten oxidativen Stress, als mögliche Ursache diskutiert. Analog dazu wurde in diversen präklinischen Studien über einen proatherogenen Effekt nach Gabe von VEGF berichtet.^{27,120} Klinische Studien der letzten Jahre konnten allerdings eine beschleunigte Atherosklerose durch die Induktion eines vaskulären Wachstums und Remodelings nicht bestätigen.^{67,93}

In der klinischen Anwendung einer Retroinfusion von eNOS S1177D wäre eine verstärkte Bildung atherosklerotischer Plaques in jedem Fall zu vermeiden. Kupatt et al. konnten in einem porcinen Modell keine zellschädigenden Effekte nach Transfektion von eNOS S1177D beobachten.⁹² Sie schlossen daraus, dass die retrograde Behandlung zu einer moderaten Überexpression von eNOS S1177D führt und das daraus synthetisierte NO bzw. andere reaktive Stickstoffverbindungen die Toxizitätsschwelle der Zellen nicht überschreitet. Inwieweit diese

präklinischen Beobachtungen an Schweinen mit überwiegend gesunden Koronargefäßen auf *no-option* Patienten mit vermutlich ausgeprägter endothelialer Dysfunktion übertragbar sind, kann in dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Allerdings könnte eine Erhöhung des eNOS-Proteinspiegels unter pathologischen Bedingungen nicht zu einem vermehrten NO-Gehalt, sondern zu einer gesteigerten Synthese von Hydroxylradikalen führen, die nun zusätzliche schädigende Effekte auf das vaskuläre Endothel ausüben. In diesem Zusammenhang nimmt der Kofaktor Tetrahydrobiopterin für eine physiologische Funktion von eNOS eine zentrale Rolle ein (siehe Abschnitt 4.4). In zukünftigen Studien an Patienten sollte daher eine potentielle Progression der koronaren Atherosklerose aufmerksam untersucht werden.

Des Weiteren ist als mögliche direkte Nebenwirkung der eNOS-Überexpression eine NO vermittelte Vasodilatation mit signifikanter Hypotonie denkbar, die auch den Blutdruckabfall bei Applikation von rekombinantem VEGF erklärt.^{93,160} Die Verwendung des SSR gewährleistet zwar eine vorwiegende Transfektion am Zielort, allerdings ist eine systemische Freisetzung auf Grund venovenöser oder venoarterieller Shunts nicht gänzlich auszuschließen.¹⁴ Ungeachtet dessen wurde diese Nebenwirkung in präklinischen und klinischen Studien, die VEGF oder FGF-2 mittels Gentransfer einsetzten, unabhängig vom Genvektor, bislang noch nicht beobachtet. Der mutmaßliche Grund dafür ist die im Vergleich zum rekombinanten Protein geringere Menge an zirkulierendem Genprodukt.⁹³ Darüber hinaus werden in der Literatur, insbesondere mit Bezug auf VEGF, vaskuläre Malformationen, Retinopathien sowie Neoplasien als mögliche Nebenwirkungen genannt. Keine dieser pathologischen Veränderungen wurde jedoch in klinischen Studien zur therapeutischen Revaskularisation bestätigt, weshalb sie vermutlich ebenso bei der Transfektion von eNOS S1177D am Patienten eine untergeordnete Rolle spielen werden.^{93,160}

4.4 Klinische Relevanz und Perspektive

Der Großteil aktueller Techniken und Methoden zur Induktion eines therapeutischen Wachstums und Remodelings hat sich als sicher und durchführbar erwiesen. Allerdings fehlt in den bislang durchgeführten klinischen Studien der definitive Beweis einer signifikanten und funktionell relevanten Wirksamkeit der eingesetzten gefäßbildenden Substanzen. Dank des Systems der druckregulierten Retroinfusion steht mittlerweile ein komplikations- und neben-

wirkungsarmes Verfahren zur Verfügung, das eine selektive, homogene und effektive Applikation von gefäßbildenden Faktoren im Myokard ermöglicht. Zukünftige Fortschritte in der klinischen Anwendung einer therapeutischen Revaskularisation sind aus diesem Grund insbesondere in der Identifikation neuer beziehungsweise unerforschter Substanzen zu erwarten, welche die komplexen Prozesse der Angiogenese und Arteriogenese besser simulieren und nachhaltiger stimulieren.

Stickstoffmonoxid ist in der Regulation des Blutflusses, in der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase sowie als *second messenger* für die Induktion einer stabilen Arteriogenese und Angiogenese von entscheidender Bedeutung. Dabei ist bemerkenswert, dass NO in der Vermittlung proangiogenetischer sowie proarteriogenetischer Effekte von zahlreichen bekannten Faktoren, wie beispielsweise VEGF und FGF, beteiligt zu sein scheint. In Anbetracht der hohen Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen, deren Grundlage eine endotheliale Dysfunktion mit einer reduzierten Bioverfügbarkeit von NO bildet, stellt die Regeneration des NO-Gehalts im Organismus eine interessante therapeutische Strategie für *no-option* Patienten dar.

In der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die retrograde Infusion von eNOS S1177D in die anteriore Koronarvene über die Überexpression von eNOS ein NO vermitteltes Gefäßwachstum induzierte, welches mit einer gesteigerten myokardialen Perfusion einherging und schließlich zu einer verbesserten kontraktile Funktion im Zielgebiet führte. Jedoch bleibt fraglich, ob die Transfektion von eNOS S1177D in der Lage ist das Ausmaß der endothelialen Dysfunktion bei Patienten mit fortgeschrittener KHK zu reduzieren und somit eine erhöhte Bioverfügbarkeit von NO zu ermöglichen. Nicht zuletzt könnten die oft enttäuschenden Resultate zahlreicher Studien zur therapeutischen Revaskularisation auf eine verminderte Responsivität endothelialer Zellen auf angiogenetische und arteriogenetische Stimuli zurückzuführen sein, deren Ursache möglicherweise in der endothelialen Dysfunktion mit vermindertem NO-Gehalt liegt.

An dieser Stelle gewinnt Tetrahydrobiopterin als Kofaktor von eNOS zunehmend an Bedeutung. Ein Mangel an BH₄ gilt in der Literatur als Hauptmechanismus für die Entkopplung der eNOS-Funktion, die wiederum eine wesentliche Ursache der endothelialen Dysfunktion darstellt. Vermutlich ist ein erhöhter oxidativer Stress, u.a. bedingt durch die bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren, für die Reduktion der BH₄-Konzentration verantwortlich.^{84,195} Die Bioverfügbarkeit von NO ist somit eng mit der Bioverfügbarkeit von BH₄ assoziiert. Ge-

stützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass eine Supplementierung oder eine gesteigerte Synthese von BH₄, mittels Überexpression der GTP-Zyklohydrolase I in transgenen ApoE^{-/-}/eNOS Mäusen, zu einer verminderten Bildung von atherosklerotischen Läsionen bei gleichzeitig erhöhter Synthese von NO und reduzierter Produktion von Hydroxylradikalen führt.³ Die Regulation beziehungsweise die Aufrechterhaltung einer normalen enzymatischen Aktivität von eNOS stellt folglich einen interessanten Ansatzpunkt für zukünftige Studien zur therapeutischen Revaskularisation dar.

Darüber hinaus versprechen verbesserte Bildgebungsverfahren, dabei vor allem die Magnetresonanztomographie, eine sensiblere Detektion myokardialer Perfusions- und Funktionsänderungen im ischämischen Myokard und erlauben somit eine bessere Beurteilung einer revaskularisierenden Therapie im klinischen Rahmen.

5 Zusammenfassung

Neben der koronaren Bypass-Operation und der perkutanen transluminalen koronaren Angioplastie stellt die Induktion eines vaskulären Wachstums und Remodelings einen vielversprechenden neuen Therapieansatz für Patienten mit koronarer Herzerkrankung dar. Für eine effektive therapeutische Revaskularisation ist dabei die Wahl des gefäßbildenden Substrats sowie der Applikationsmodus von essentieller Bedeutung. Stickstoffmonoxid (NO) nimmt in der Regulation des Blutflusses, in der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase sowie als *second messenger* für die Induktion einer stabilen Arteriogenese und Angiogenese eine zentrale Rolle ein. Eine Überexpression und damit Regeneration der reduzierten Bioverfügbarkeit von NO bei Patienten mit endothelialer Dysfunktion und KHK stellt somit einen interessanten therapeutischen Ansatz dar. Dank des Systems der druckregulierten Retroinfusion steht daneben ein komplikations- und nebenwirkungsarmes Verfahren zur Verfügung, das eine selektive, homogene und effektive Applikation von gefäßbildenden Faktoren im Myokard ermöglicht.

In der vorliegenden Arbeit wurde die retrograde Infusion von eNOS S1177D komplementärer DNA (als konstitutiv aktive Mutante) in die anteriore Koronarvene zur Induktion einer therapeutischen Revaskularisation im chronisch ischämischen, hibernierenden Myokard untersucht. Durch eine regionale Überexpression von NO wurde dabei anhand eines etablierten porcinen Großtiermodells erstmals im präklinischen Rahmen das Ziel einer funktionell relevanten Kontraktilitätssteigerung des Myokards verfolgt. Mittels perkutaner Implantation eines präparierten Koronarstents wurde zunächst eine hochgradige Stenose im proximalen LAD-Segment der linken Koronararterie herbeigeführt. Nach sieben Tagen wurde angiographisch ein Restfluss dokumentiert, um eine langsame aber stetige Abnahme der myokardialen Durchblutung bis zur vollständigen Okklusion zu gewährleisten und die Induktion einer myokardialen Hibernation mit reduzierter kontraktile Funktion ohne schwerwiegende Infarzierung des Gewebes sicherzustellen. Drei Wochen später wurde den Tieren eNOS S1177D cDNA, eNOS

S1177D und L-NAME (unspezifischer NO-Inhibitor) oder eGFP cDNA als Scheintransfektion retrograd in die anteriore Koronarvene infundiert (n = 6 pro Gruppe). Sowohl am Behandlungstag als auch am Tag 49 der Untersuchung (Versuchsende) wurden Parameter der globalen Herzfunktion bestimmt. Zur Analyse der regionalen myokardialen Perfusion dienten fluoreszierende Mikrosphären; die Bestimmung der regionalen Myokardfunktion als subsegmentale Segmentverkürzung gelang mit Hilfe der Sonomikrometrie. Für das Kollateralenwachstum wurden postmortale Angiographien ausgewertet. Darüber hinaus war zur Ermittlung der Expression von eNOS, des regionalen Blutflusses und der Kapillardichte die Entnahme von Gewebeproben aus dem linken Ventrikel erforderlich.

In dieser Untersuchung demonstrieren wir, dass die retrograde Applikation von eNOS S1177D cDNA über die Überexpression von eNOS ein NO vermitteltes Gefäßwachstum induziert, welches mit einer gesteigerten myokardialen Perfusion einhergeht und schließlich zu einer verbesserten kontraktile Funktion im Zielgebiet führt. Die zum Kontrollareal 2,3-fach gesteigerte Expression von eNOS geht dabei über eine gesteigerte Bildung von NO respektive cGMP (117,1 % der RCx-perfundierten Region) neben einer Proliferation von Kapillaren (Angiogenese) insbesondere mit der Bildung von kollateralisierenden Anastomosen (Arteriogenese) einher. Aus diesem vaskulären Wachstum und Remodeling resultiert im Vergleich zur Kontrollgruppe arealabhängig eine bis zu 2,2-fach gesteigerte myokardiale Perfusion, wodurch sich die regionale Herzfunktion (subsegmentale Segmentverkürzung) bei erhöhtem Sauerstoffbedarf von 7% auf 41 % (Herzfrequenz von 120 Schlägen pro Minute) respektive 33 % (Herzfrequenz von 140 Schlägen pro Minute) des normoxischen Myokards regeneriert.

Zukünftige Arbeiten werden die komplexen Prozesse des vaskulären Wachstums und Remodelings weiter identifizieren und präzisieren müssen, um durch die Applikation von gefäßbildenden Faktoren gezielter und effektiver therapeutisch intervenieren zu können. Die Entwicklung eines präklinischen Großtiermodells, welches neben einer myokardialen Hibernation auch die funktionelle Dysbalance einer endothelialen Dysfunktion berücksichtigt, wird die Anwendbarkeit und Umsetzung im klinischen Alltag verbessern können. Im Rahmen der therapeutischen Revaskularisation mittels NO stellt die bei endothelialer Dysfunktion reduzierte Bioverfügbarkeit des eNOS-Kofaktors Tetrahydrobiopterin, als Hauptmechanismus einer entkoppelten eNOS-Funktion, einen interessanten Ansatzpunkt zukünftiger Studien dar.

Literaturverzeichnis

- [1] F L Abel, R H Cooper, and R R Beck. Use of fluorescent latex microspheres to measure coronary blood flow distribution. *Circ Shock*, 41:156–161, November 1993.
- [2] Alexandra Aicher, Christopher Heeschen, Christiane Mildner-Rihm, Carmen Urbich, Christian Ihling, Katja Technau-Ihling, Andreas M Zeiher, and Stefanie Dimmeler. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med*, 9:1370–1376, November 2003.
- [3] Nicholas J Alp, Martina A McAteer, Jeffrey Khoo, Robin P Choudhury, and Keith M Channon. Increased endothelial tetrahydrobiopterin synthesis by targeted transgenic GTP-cyclohydrolase I overexpression reduces endothelial dysfunction and atherosclerosis in ApoE-knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24:445–450, 2004.
- [4] Katsuya Amano, Hiroaki Matsubara, Osamu Iba, Mitsuhiro Okigaki, Soichiro Fujiyama, Takahiro Imada, Hiroyuki Kojima, Yoshihisa Nozawa, Seinosuke Kawashima, Mitsuhiro Yokoyama, and Toshiji Iwasaka. Enhancement of ischemia-induced angiogenesis by eNOS overexpression. *Hypertension*, 41:156–162, January 2003.
- [5] G E Austin, M B Tuvlin, D Martino-Salzman, R L Hunter, A G Justicz, N K Thompson, and A C Brooks. Determination of regional myocardial blood flow using fluorescent microspheres. *Am J Cardiovasc Pathol*, 4:352–357, 1993.
- [6] Saeid Babaei and Duncan J Stewart. Overexpression of endothelial NO synthase induces angiogenesis in a co-culture model. *Cardiovasc Res*, 55:190–200, July 2002.
- [7] Dmitri Baklanov and Michael Simons. Arteriogenesis: lessons learned from clinical trials. *Endothelium*, 10:217–223, 2003.
- [8] J-L Balligand, O Feron, and C Dessy. eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *Physiological reviews*, 89(2):481–534, April 2009.
- [9] S Banai, M T Jaklitsch, M Shou, D F Lazarous, M Scheinowitz, S Biro, S E Epstein, and E F Unger. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation*, 89:2183–2189, 1994.

- [10] R S Beanlands, P J Hendry, R G Masters, R A DeKemp, K Woodend, and T D Ruddy. Delay in revascularization is associated with increased mortality rate in patients with severe left ventricular dysfunction and viable myocardium on fluorine 18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging. *Circulation*, 98:II51—II56, November 1998.
- [11] P Boekstegers, J Diebold, and C Weiss. Selective ECG synchronised suction and retroinfusion of coronary veins: first results of studies in acute myocardial ischaemia in dogs. *Cardiovasc Res*, 24:456–464, June 1990.
- [12] P Boekstegers, W Giehl, G von Degenfeld, and G Steinbeck. Selective suction and pressure-regulated retroinfusion: an effective and safe approach to retrograde protection against myocardial ischemia in patients undergoing normal and high risk percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol*, 31:1525–1533, June 1998.
- [13] P Boekstegers, W Peter, G von Degenfeld, C A Nienaber, M Abend, T C Rehders, H Habazettl, T Kapsner, M von Lüdinghausen, and K Werdan. Preservation of regional myocardial function and myocardial oxygen tension during acute ischemia in pigs: comparison of selective synchronized suction and retroinfusion of coronary veins to synchronized coronary venous retroperfusion. *J Am Coll Cardiol*, 23:459–469, February 1994.
- [14] P Boekstegers, G von Degenfeld, W Giehl, D Heinrich, R Hullin, C Kupatt, G Steinbeck, G Barretton, G Middeler, H Katus, and W M Franz. Myocardial gene transfer by selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins. *Gene Ther*, 7:232–240, February 2000.
- [15] Peter Boekstegers and Christian Kupatt. Current concepts and applications of coronary venous retroinfusion. *Basic Res Cardiol*, 99:373–381, November 2004.
- [16] R Bolli. Mechanism of myocardial “stunning”. *Circulation*, 82:723–738, September 1990.
- [17] R Bolli, B Dawn, X L Tang, Y Qiu, P Ping, Y T Xuan, W K Jones, H Takano, Y Guo, and J Zhang. The nitric oxide hypothesis of late preconditioning. *Basic Res Cardiol*, 93:325–338, 1998.
- [18] H Bolukoglu, A J Liedtke, S H Nellis, A M Eggleston, R Subramanian, and B Renstrom. An animal model of chronic coronary stenosis resulting in hibernating myocardium. *Am J Physiol*, 263:H20—H29, July 1992.
- [19] R O Bonow. Identification of viable myocardium. *Circulation*, 94:2674–2680, 1996.
- [20] Lucy S Brevetti, David S Chang, Gale L Tang, Rajabrata Sarkar, and Louis M Messina. Over-expression of endothelial nitric oxide synthase increases skeletal muscle blood flow and oxygenation in severe rat hind limb ischemia. *J Vasc Surg*, 38:820–826, 2003.
- [21] B Bugge-Asperheim, S Leraand, and F Kiil. Local dimensional changes of the myocardium measured by ultrasonic technique. *Scand J Clin Lab Invest*, 24:361–371, 1969.
- [22] H Cai and D G Harrison. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*, 87:840–844, November 2000.

- [23] Weijun Cai and Wolfgang Schaper. Mechanisms of arteriogenesis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 40:681–692, August 2008.
- [24] Noel M Caplice and Brendan Doyle. Vascular progenitor cells: origin and mechanisms of mobilization, differentiation, integration, and vasculogenesis. *Stem Cells Dev*, 14:122–139, April 2005.
- [25] P Carmeliet. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, 6:389–395, April 2000.
- [26] Peter Carmeliet. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 438:932–936, 2005.
- [27] F L Celletti, J M Waugh, P G Amabile, A Brendolan, P R Hilfiker, and M D Dake. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med*, 7:425–429, April 2001.
- [28] C Chen, L Chen, J T Fallon, L Ma, L Li, L Bow, D Knibbs, R McKay, L D Gillam, and D D Waters. Functional and structural alterations with 24-hour myocardial hibernation and recovery after reperfusion. A pig model of myocardial hibernation. *Circulation*, 94:507–516, August 1996.
- [29] L T Cooper, W R Hiatt, M A Creager, J G Regensteiner, W Casscells, J M Isner, J P Cooke, and A T Hirsch. Proteinuria in a placebo-controlled study of basic fibroblast growth factor for intermittent claudication. *Vasc Med*, 6:235–239, November 2001.
- [30] T L Cornwell, E Arnold, N J Boerth, and T M Lincoln. Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am J Physiol*, 267:C1405—C1413, November 1994.
- [31] J C de Graaf, J D Banga, S Moncada, R M Palmer, P G de Groot, and J J Sixma. Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation*, 85:2284–2290, June 1992.
- [32] E D de Muinck and M Simons. Re-evaluating therapeutic neovascularization. *J Mol Cell Cardiol*, 36:25–32, January 2004.
- [33] Statistisches Bundesamt Deutschland. Todesursachen in Deutschland. *Fachserie 12 Reihe 4*, 2008.
- [34] S Dimmeler, I Fleming, B Fisslthaler, C Hermann, R Busse, and A M Zeiher. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, 399:601–605, June 1999.
- [35] S Dimmeler and A M Zeiher. Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression. *Circ Res*, 87:434–439, September 2000.
- [36] R J Domenech, J I Hoffman, M I Noble, K B Saunders, J R Henson, and S Subijanto. Total and regional coronary blood flow measured by radioactive microspheres in conscious and anesthetized dogs. *Circ Res*, 25:581–596, November 1969.

- [37] P W Domkowski, G C Hughes, and J E Lowe. Ameroid constrictor versus hydraulic occluder: creation of hibernating myocardium. *Ann Thorac Surg*, 69:1984, June 2000.
- [38] H Dörge, R Schulz, and G Heusch. Pathophysiology of hibernation, stunning, and ischemic preconditioning. *Thorac Cardiovasc Surg*, 46 Suppl 2:255—62; discussion 263, September 1998.
- [39] J Dulak, A Józkwicz, A Dembinska-Kiec, I Guevara, A Zdzienicka, D Zmudzinska-Grochot, I Florek, A Wójtowicz, A Szuba, and J P Cooke. Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20:659–666, 2000.
- [40] A Elsässer, M Schlepfer, W P Klövekorn, W J Cai, R Zimmermann, K D Müller, R Strasser, S Kostin, C Gagel, B Munkel, W Schaper, and J Schaper. Hibernating myocardium: an incomplete adaptation to ischemia. *Circulation*, 96:2920–2931, November 1997.
- [41] J A Fallavollita, B J Perry, and J M Canty. 18F-2-deoxyglucose deposition and regional flow in pigs with chronically dysfunctional myocardium. Evidence for transmural variations in chronic hibernating myocardium. *Circulation*, 95:1900–1909, April 1997.
- [42] O Feron and R A Kelly. The caveolar paradox: suppressing, inducing, and terminating eNOS signaling. *Circ Res*, 88:129–131, February 2001.
- [43] J Folkman. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, 1:27–31, January 1995.
- [44] Saul Benedict Freedman and Jeffrey M Isner. Therapeutic angiogenesis for coronary artery disease. *Ann Intern Med*, 136:54–71, January 2002.
- [45] G L Freeman, M M LeWinter, R L Engler, and J W Covell. Relationship between myocardial fiber direction and segment shortening in the midwall of the canine left ventricle. *Circ Res*, 56:31–39, January 1985.
- [46] S Fuchs, R Baffour, Y F Zhou, M Shou, A Pierre, F O Tio, N J Weissman, M B Leon, S E Epstein, and R Kornowski. Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol*, 37:1726–1732, 2001.
- [47] S Fuchs, M Shou, R Baffour, S E Epstein, and R Kornowski. Lack of correlation between angiographic grading of collateral and myocardial perfusion and function: implications for the assessment of angiogenic response. *Coron Artery Dis*, 12:173–178, 2001.
- [48] Shmuel Fuchs, Nabil Dib, Barry M Cohen, Petros Okubagzi, Edward B Diethrich, Ann Campbell, Jennifer Macko, Paul D Kessler, Henrik S Rasmussen, Stephen E Epstein, and Ran Kornowski. A randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter, pilot study of the safety and feasibility of catheter-based intramyocardial injection of AdVEGF121 in patients with refractory advanced coronary artery disease. *Catheter Cardiovasc Interv*, 68:372–378, September 2006.

- [49] D Fulton, J P Gratton, T J McCabe, J Fontana, Y Fujio, K Walsh, T F Franke, A Papapetropoulos, and W C Sessa. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*, 399:597–601, June 1999.
- [50] R F Furchgott and J V Zawadzki. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288:373–376, November 1980.
- [51] M Galli, C Marcassa, R Bolli, P Giannuzzi, P L Temporelli, A Imparato, P L Silva Orrego, R Giubbini, A Giordano, and L Tavazzi. Spontaneous delayed recovery of perfusion and contraction after the first 5 weeks after anterior infarction. Evidence for the presence of hibernating myocardium in the infarcted area. *Circulation*, 90:1386–1397, September 1994.
- [52] C M Gibson, K Ryan, A Sparano, J L Moynihan, M Rizzo, M Kelley, S J Marble, R Laham, M Simons, T R McClusky, and J T Dodge. Angiographic methods to assess human coronary angiogenesis. *Am Heart J*, 137:169–179, January 1999.
- [53] W Giehrl, G von Degenfeld, and P Boekstegers. Die druckgesteuerte selektive Retroinfusion von Koronarvenen (SSR) erlaubt die Anpassung des Retroinfusionsdruckes an das individuelle Koronarvenensystem zur Optimierung der Myokardprotektion während koronarer Ischämie. *Z Kardiol*, 85:169–170, 1996.
- [54] W Giehrl, G von Degenfeld, A Molnar, C Lebherz, and P Boekstegers. The coronary veins as an alternative access to ischemic myocardium: experiences in 260 patients undergoing high risk PTCA. *Europ Heart J*, 21:162 (abstract), 2000.
- [55] M A Gimbrone, N Resnick, T Nagel, L M Khachigian, T Collins, and J N Topper. Hemodynamics, endothelial gene expression, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, 811:1, April 1997.
- [56] R W Glenny, S Bernard, and M Brinkley. Validation of fluorescent-labeled microspheres for measurement of regional organ perfusion. *J Appl Physiol*, 74:2585–2597, 1993.
- [57] P Gorog and I B Kovacs. Inhibition of vascular smooth muscle cell migration by intact endothelium is nitric oxide-mediated: interference by oxidised low density lipoproteins. *J Vasc Res*, 35:165–169, 1998.
- [58] Cindy L Grines, Matthew W Watkins, Greg Helmer, William Penny, Jeffrey Brinker, Jonathan D Marmur, Andrew West, Jeffery J Rade, Pran Marrott, H Kirk Hammond, and Robert L Engler. Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. *Circulation*, 105:1291–1297, 2002.
- [59] Matthew B Grisham. Reactive oxygen species in immune responses. *Free Radic Biol Med*, 36:1479–1480, June 2004.
- [60] P Michael Grossman, Zhenguo Han, Maria Palasis, James J Barry, and Robert J Lederman. Incomplete retention after direct myocardial injection. *Catheter Cardiovasc Interv*, 55:392–397, 2002.

- [61] S L Hale, K J Alker, and R A Kloner. Evaluation of nonradioactive, colored microspheres for measurement of regional myocardial blood flow in dogs. *Circulation*, 78:428–434, August 1988.
- [62] M D Hariawala, J R Horowitz, D Esakof, D D Sheriff, D H Walter, B Keyt, J M Isner, and J F Symes. VEGF improves myocardial blood flow but produces EDRF-mediated hypotension in porcine hearts. *J Surg Res*, 63:77–82, June 1996.
- [63] Kishore J Harjai, Pertha Chowdhury, and Cindy L Grines. Therapeutic angiogenesis: a fantastic new adventure. *J Interv Cardiol*, 15:223–229, June 2002.
- [64] N Hatori, P O Sjöquist, C Regardh, and L Rydén. Pharmacokinetic analysis of coronary sinus retroinfusion in pigs. Ischemic myocardial concentrations in the left circumflex coronary arterial area using metoprolol as a tracer. *Cardiovasc Drugs Ther*, 5:1005–1010, 1991.
- [65] Toshio Hayashi, Daigo Sumi, Packiasamy A R Juliet, Hisako Matsui-Hirai, Yukako Asai-Tanaka, Hatsuyo Kano, Akiko Fukatsu, Taku Tsunekawa, Asaka Miyazaki, Akihisa Iguchi, and Louis J Ignarro. Gene transfer of endothelial NO synthase, but not eNOS plus inducible NOS, regressed atherosclerosis in rabbits. *Cardiovasc Res*, 61:339–351, February 2004.
- [66] D J Hearse. Myocardial ischaemia: can we agree on a definition for the 21st century? *Cardiovasc Res*, 28:1736–1737, 1994.
- [67] Marja Hedman, Juha Hartikainen, Mikko Syväne, Joachim Stjernvall, Antti Hedman, Antti Kivelä, Esko Vanninen, Hanna Mussalo, Esa Kauppila, Sakari Simula, Outi Närvänen, Arto Rantala, Keijo Peuhkurinen, Markku S Nieminen, Markku Laakso, and Seppo Ylä-Herttuala. Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia: phase II results of the Kuopio. *Circulation*, 107:2677–2683, June 2003.
- [68] M Heil, Inka Eitenmüller, T Schmitz-Rixen, and W Schaper. Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. *J Cell Mol Med*, 10:45–55, 2006.
- [69] A Helisch and W Schaper. Angiogenesis and arteriogenesis—not yet for prescription. *Z Kardiol*, 89:239–244, 2000.
- [70] R C Hendel, T D Henry, K Rocha-Singh, J M Isner, D J Kereiakes, F J Giordano, M Simons, and R O Bonow. Effect of intracoronary recombinant human vascular endothelial growth factor on myocardial perfusion: evidence for a dose-dependent effect. *Circulation*, 101:118–121, January 2000.
- [71] T D Henry, K Rocha-Singh, J M Isner, D J Kereiakes, F J Giordano, M Simons, D W Losordo, R C Hendel, R O Bonow, S M Eppler, T F Zioncheck, E B Holmgren, and E R McCluskey. Intracoronary administration of recombinant human vascular endothelial growth factor to patients with coronary artery disease. *Am Heart J*, 142:872–880, November 2001.

- [72] Timothy D Henry, Brian H Annex, George R McKendall, Michael A Azrin, John J Lopez, Frank J Giordano, P K Shah, James T Willerson, Raymond L Benza, Daniel S Berman, C Michael Gibson, Alex Bajamonde, Amy Chen Rundle, Jennifer Fine, and Edward R McCluskey. The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation*, 107:1359–1365, 2003.
- [73] G Heusch, J Rose, A Skyschally, H Post, and R Schulz. Calcium responsiveness in regional myocardial short-term hibernation and stunning in the in situ porcine heart. Inotropic responses to postextrasystolic potentiation and intracoronary calcium. *Circulation*, 93:1556–1566, April 1996.
- [74] Gerd Heusch, Rainer Schulz, and Shahbudin H Rahimtoola. Myocardial hibernation: a delicate balance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288:H984—H999, 2005.
- [75] G Chad Hughes, Shankha S Biswas, Bangliang Yin, Dmitri V Baklanov, Brian H Annex, R Edward Coleman, Timothy R DeGrado, Carolyn K Landolfo, Kevin P Landolfo, and James E Lowe. A comparison of mechanical and laser transmyocardial revascularization for induction of angiogenesis and arteriogenesis in chronically ischemic myocardium. *J Am Coll Cardiol*, 39:1220–1228, April 2002.
- [76] G Chad Hughes, Mark J Post, Michael Simons, and Brian H Annex. Translational physiology: porcine models of human coronary artery disease: implications for preclinical trials of therapeutic angiogenesis. *J Appl Physiol*, 94:1689–1701, 2003.
- [77] H C Hughes. Swine in cardiovascular research. *Lab Anim Sci*, 36:348–350, August 1986.
- [78] W D Ito, M Arras, D Scholz, B Winkler, P Htun, and W Schaper. Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion. *Am J Physiol*, 273:H1255—H1265, September 1997.
- [79] H Jaeschke. Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury. *Proc Soc Exp Biol Med*, 209:104–111, June 1995.
- [80] Michael K Jones, Kouji Tsugawa, Andrzej S Tarnawski, and Dolgor Baatar. Dual actions of nitric oxide on angiogenesis: possible roles of PKC, ERK, and AP-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 318:520–528, 2004.
- [81] Satoshi Kashiwagi, Yotaro Izumi, Takeshi Gohongi, Zoe N Demou, Lei Xu, Paul L Huang, Donald G Buerk, Lance L Munn, Rakesh K Jain, and Dai Fukumura. NO mediates mural cell recruitment and vessel morphogenesis in murine melanomas and tissue-engineered blood vessels. *J Clin Invest*, 115:1816–1827, July 2005.
- [82] K Kauser, V da Cunha, R Fitch, C Mallari, and G M Rubanyi. Role of endogenous nitric oxide in progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 278:H1679—H1685, 2000.

- [83] Koh Kawasaki, Robert S Smith, Chung-Ming Hsieh, Jianxin Sun, Julie Chao, and James K Liao. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt pathway mediates nitric oxide-induced endothelial cell migration and angiogenesis. *Mol Cell Biol*, 23:5726–5737, August 2003.
- [84] Seinosuke Kawashima and Mitsuhiro Yokoyama. Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24:998–1005, June 2004.
- [85] R A Kloner, T Shook, K Przyklenk, V G Davis, L Junio, R V Matthews, S Burstein, M Gibson, W K Poole, and C P Cannon. Previous angina alters in-hospital outcome in TIMI 4. A clinical correlate to preconditioning? *Circulation*, 91:37–45, January 1995.
- [86] J W Knowles, R L Reddick, J C Jennette, E G Shesely, O Smithies, and N Maeda. Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS(-/-)Apoe(-/-) mice are ameliorated by enalapril treatment. *J Clin Invest*, 105:451–458, February 2000.
- [87] R Kornowski, S Fuchs, M B Leon, and S E Epstein. Delivery strategies to achieve therapeutic myocardial angiogenesis. *Circulation*, 101:454–458, February 2000.
- [88] C Kupatt, R Wichels, M Deiss, A Molnar, C Lebherz, P Raake, G von Degenfeld, D Hahnel, and P Boekstegers. Retroinfusion of NFkappaB decoy oligonucleotide extends cardioprotection achieved by CD18 inhibition in a preclinical study of myocardial ischemia and retroinfusion in pigs. *Gene Ther*, 9:518–526, April 2002.
- [89] C Kupatt, S Zahler, C Seligmann, P Massoudy, B F Becker, and E Gerlach. Nitric oxide mitigates leukocyte adhesion and vascular leak after myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol*, 28:643–654, 1996.
- [90] Christian Kupatt. The vascular compartments of neovascularization: spotlight on the microcirculation. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 8(1):27–33, 2007.
- [91] Christian Kupatt, Chantal Dessy, Rabea Hinkel, Philip Raake, Géraldine Daneau, Caroline Bouzin, Peter Boekstegers, and Olivier Feron. Heat shock protein 90 transfection reduces ischemia-reperfusion-induced myocardial dysfunction via reciprocal endothelial NO synthase serine 1177 phosphorylation and threonine 495 dephosphorylation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24:1435–1441, August 2004.
- [92] Christian Kupatt, Rabea Hinkel, Robert Vachenauer, Jan Horstkotte, Philip Raake, Torleif Sandner, Robert Kreuzpointner, Fabian Müller, Stefanie Dimmeler, Olivier Feron, and Peter Boekstegers. VEGF165 transfection decreases postischemic NF-kappa B-dependent myocardial reperfusion injury in vivo: role of eNOS phosphorylation. *FASEB J*, 17:705–707, April 2003.
- [93] Michael J B Kutryk and Duncan J Stewart. Angiogenesis of the heart. *Microsc Res Tech*, 60:138–158, February 2003.
- [94] Nermin Kuzkaya, Norbert Weissmann, David G Harrison, and Sergey Dikalov. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, 278:22546–22554, June 2003.

- [95] R J Laham, N A Chronos, M Pike, M E Leimbach, J E Udelson, J D Pearlman, R I Pettigrew, M J Whitehouse, C Yoshizawa, and M Simons. Intracoronary basic fibroblast growth factor (FGF-2) in patients with severe ischemic heart disease: results of a phase I open-label dose escalation study. *J Am Coll Cardiol*, 36:2132–2139, 2000.
- [96] R J Laham, M Rezaee, M Post, F W Sellke, R A Braeckman, D Hung, and M Simons. Intracoronary and intravenous administration of basic fibroblast growth factor: myocardial and tissue distribution. *Drug Metab Dispos*, 27:821–826, July 1999.
- [97] R J Laham, M Simons, and F Sellke. Gene transfer for angiogenesis in coronary artery disease. *Annu Rev Med*, 52:485–502, 2001.
- [98] T Lai, J T Fallon, J Liu, J Mangion, L Gillam, D Waters, and C Chen. Reversibility and pathohistological basis of left ventricular remodeling in hibernating myocardium. *Cardiovasc Pathol*, 9:323–335, 2000.
- [99] Chris J M Langenberg, Henk G Pietersen, Gijs Geskes, Anton J M Wagenmakers, Peter B Soeters, and Marcel Durieux. Coronary sinus catheter placement: assessment of placement criteria and cardiac complications. *Chest*, 124:1259–1265, 2003.
- [100] J B Laursen, M Somers, S Kurz, L McCann, A Warnholtz, B A Freeman, M Tarpey, T Fukai, and D G Harrison. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation*, 103:1282–1288, 2001.
- [101] J S Lee and A M Feldman. Gene therapy for therapeutic myocardial angiogenesis: a promising synthesis of two emerging technologies. *Nat Med*, 4:739–742, June 1998.
- [102] Peter Libby and Pierre Theroux. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*, 111:3481–3488, June 2005.
- [103] J Litvak, L E Siderides, and A M Vineberg. The experimental production of coronary artery insufficiency and occlusion. *Am Heart J*, 53:505–518, April 1957.
- [104] J J Lopez, R J Laham, A Stamler, J D Pearlman, S Bunting, A Kaplan, J P Carrozza, F W Sellke, and M Simons. VEGF administration in chronic myocardial ischemia in pigs. *Cardiovasc Res*, 40:272–281, November 1998.
- [105] Douglas W Losordo, Peter R Vale, Robert C Hendel, Charles E Milliken, F David Fortuin, Nancie Cummings, Richard A Schatz, Takayuki Asahara, Jeffrey M Isner, and Richard E Kuntz. Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation*, 105:2012–2018, April 2002.
- [106] P L Ludmer, A P Selwyn, T L Shook, R R Wayne, G H Mudge, R W Alexander, and P Ganz. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*, 315:1046–1051, 1986.

- [107] Diana Luque Contreras, Hilda Vargas Robles, Eunice Romo, Amelia Rios, and Bruno Escalante. The role of nitric oxide in the post-ischemic revascularization process. *Pharmacol Ther*, 112:553–563, November 2006.
- [108] T F Lüscher and G Noll. The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator. *Atherosclerosis*, 118 Suppl:S81—S90, 1995.
- [109] C A Mack, S R Patel, E A Schwarz, P Zanzonico, R T Hahn, A Ilercil, R B Devereux, S J Goldsmith, T F Christian, T A Sanborn, I Kovesdi, N Hackett, O W Isom, R G Crystal, and T K Rosengart. Biologic bypass with the use of adenovirus-mediated gene transfer of the complementary deoxyribonucleic acid for vascular endothelial growth factor 121 improves myocardial perfusion and function in the ischemic porcine heart. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 115:167–168, January 1998.
- [110] J Mackay and G Mensah. Atlas of Heart Disease and Stroke. *World Health Organization*, Geneva, 2004.
- [111] C Martin, R Schulz, J Rose, and G Heusch. Inorganic phosphate content and free energy change of ATP hydrolysis in regional short-term hibernating myocardium. *Cardiovasc Res*, 39:318–326, August 1998.
- [112] Toshiro Matsunaga, Dorothee W Weihrauch, Melinda C Moniz, John Tessmer, David C Warltier, and William M Chilian. Angiostatin inhibits coronary angiogenesis during impaired production of nitric oxide. *Circulation*, 105:2185–2191, 2002.
- [113] M P Maxwell, D J Hearse, and D M Yellon. Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischaemia: a critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, 21:737–746, 1987.
- [114] G Mazué, F Bertolero, C Jacob, P Sarmientos, and R Roncucci. Preclinical and clinical studies with recombinant human basic fibroblast growth factor. *Ann N Y Acad Sci*, 638:329–340, 1991.
- [115] Barend Mees, Shawn Wagner, Elena Ninci, Silvia Tribulova, Sandra Martin, Rien van Haperen, Sawa Kostin, Matthias Heil, Rini de Crom, and Wolfgang Schaper. Endothelial nitric oxide synthase activity is essential for vasodilation during blood flow recovery but not for arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27:1926–1933, September 2007.
- [116] A Miyazaki, H Tadokoro, J K Drury, L Rydén, R V Haendchen, and E Corday. Retrograde coronary venous administration of recombinant tissue-type plasminogen activator: a unique and effective approach to coronary artery thrombolysis. *J Am Coll Cardiol*, 18:613–620, August 1991.
- [117] W Mohl. The relevance of coronary sinus interventions in cardiac surgery. *Thorac Cardiovasc Surg*, 39:245–250, 1991.
- [118] Werner Mohl, Kazuo Komamura, Hirofumi Kasahara, Georg Heinze, Dietmar Glogar, Atsushi Hirayama, and Kazuhisa Kodama. Myocardial protection via the coronary sinus. *Circ J*, 72:526–533, April 2008.

- [119] Daniel Molin and Mark J Post. Therapeutic angiogenesis in the heart: protect and serve. *Curr Opin Pharmacol*, 7:158–163, April 2007.
- [120] K S Moulton, E Heller, M A Konerding, E Flynn, W Palinski, and J Folkman. Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 99:1726–1732, April 1999.
- [121] Kathi Mujynya-Ludunge, Hema Viswambharan, Robert Driscoll, Xiu-Fen Ming, Ludwig K von Segesser, Lukas Kappenberger, Zhihong Yang, and Giuseppe Vassalli. Endothelial nitric oxide synthase gene transfer restores endothelium-dependent relaxations and attenuates lesion formation in carotid arteries in apolipoprotein E-deficient mice. *Basic Res Cardiol*, 100:102–111, 2005.
- [122] D Mukherjee, K Comella, D L Bhatt, M T Roe, V Patel, and S G Ellis. Clinical outcome of a cohort of patients eligible for therapeutic angiogenesis or transmyocardial revascularization. *American Heart Journal*, 142(1):72–74, 2001.
- [123] T Murohara, T Asahara, M Silver, C Bauters, H Masuda, C Kalka, M Kearney, D Chen, J F Symes, M C Fishman, P L Huang, and J M Isner. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest*, 101:2567–2578, June 1998.
- [124] C E Murry, R B Jennings, and K A Reimer. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74:1124–1136, November 1986.
- [125] Yasunari Nakai, Pierre Voisine, Cesario Bianchi, Shu-Hua Xu, Jun Feng, Tamer Malik, Audrey Rosinberg, and Frank W Sellke. Effects of L-arginine on the endogenous angiogenic response in a model of hypercholesterolemia. *Surgery*, 138:291–298, August 2005.
- [126] B S Nao, T B McClanahan, M A Groh, R J Schott, and K P Gallagher. The time limit of effective ischemic preconditioning in dogs (abstract). *Circulation*, 82(suppl I):271, 1990.
- [127] J M Neutze, F Wyler, and A M Rudolph. Use of radioactive microspheres to assess distribution of cardiac output in rabbits. *Am J Physiol*, 215:486–495, August 1968.
- [128] M Nishida, W W Carley, M E Gerritsen, O Ellingsen, R A Kelly, and T W Smith. Isolation and characterization of human and rat cardiac microvascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 264:H639–652, 1993.
- [129] M S O’Konski, F C White, J Longhurst, D Roth, and C M Bloor. Ameroid constriction of the proximal left circumflex coronary artery in swine. A model of limited coronary collateral circulation. *Am J Cardiovasc Pathol*, 1:69–77, January 1987.
- [130] Masanori Ozaki, Seinosuke Kawashima, Tomoya Yamashita, Tetsuaki Hirase, Masayuki Nami-ki, Nobutaka Inoue, Ken-ichi Hirata, Hiroyuki Yasui, Hiromu Sakurai, Yuichi Yoshida, Masahiro Masada, and Mitsuhiro Yokoyama. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase accelerates atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice. *J Clin Invest*, 110:331–340, August 2002.

- [131] R M Palmer, D S Ashton, and S Moncada. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 333:664–666, June 1988.
- [132] R M Palmer, A G Ferrige, and S Moncada. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327:524–526, June 1987.
- [133] J D Pearlman, M G Hibberd, M L Chuang, K Harada, J J Lopez, S R Gladstone, M Friedman, F W Sellke, and M Simons. Magnetic resonance mapping demonstrates benefits of VEGF-induced myocardial angiogenesis. *Nat Med*, 1:1085–1089, 1995.
- [134] W F Penny and H Kirk Hammond. Clinical use of intracoronary gene transfer of fibroblast growth factor for coronary artery disease. *Curr Gene Ther*, 4:225–230, June 2004.
- [135] Achim Pfosser, Mark Thalgott, Kerstin Büttner, Agnès Brouet, Olivier Feron, Peter Boekstegers, and Christian Kupatt. Liposomal Hsp90 cDNA induces neovascularization via nitric oxide in chronic ischemia. *Cardiovasc Res*, 65:728–736, February 2005.
- [136] M J Post, R Laham, F W Sellke, and M Simons. Therapeutic angiogenesis in cardiology using protein formulations. *Cardiovasc Res*, 49:522–531, February 2001.
- [137] K Przyklenk, B Bauer, M Ovize, R A Kloner, and P Whittaker. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*, 87(3):893–9, March 1993.
- [138] Christopher W Pugh and Peter J Ratcliffe. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med*, 9:677–684, June 2003.
- [139] S Raab, E Thein, A G Harris, and K Messmer. A new sample-processing unit for the fluorescent microsphere method. *Am J Physiol*, 276:H1801—H1806, 1999.
- [140] Philip Raake, Georges von Degenfeld, Rabea Hinkel, Robert Vachenaer, Torleif Sandner, Sabrina Beller, Martin Andrees, Christian Kupatt, Gerhard Schuler, and Peter Boekstegers. Myocardial gene transfer by selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins: comparison with surgical and percutaneous intramyocardial gene delivery. *J Am Coll Cardiol*, 44:1124–1129, September 2004.
- [141] S H Rahimtoola. A perspective on the three large multicenter randomized clinical trials of coronary bypass surgery for chronic stable angina. *Circulation*, 72:V123—V135, 1985.
- [142] J Ross. Myocardial perfusion-contraction matching. Implications for coronary heart disease and hibernation. *Circulation*, 83:1076–1083, 1991.
- [143] J Ross. Myocardial hibernation, stunning, or both? *Basic Res Cardiol*, 90:41–43, 1995.
- [144] R Ross. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 340:115–126, January 1999.
- [145] D M Roth, Y Maruoka, J Rogers, F C White, J C Longhurst, and C M Bloor. Development of coronary collateral circulation in left circumflex Ameroid-occluded swine myocardium. *Am J Physiol*, 253:H1279—H1288, November 1987.

- [146] R D Rudic, E G Shesely, N Maeda, O Smithies, S S Segal, and W C Sessa. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest*, 101:731–736, February 1998.
- [147] A M Rudolph and M A Heymann. The circulation of the fetus in utero. Methods for studying distribution of blood flow, cardiac output and organ blood flow. *Circ Res*, 21:163–184, August 1967.
- [148] Yin Ruixing, Yang Dezhai, Wu Hai, Huang Kai, Wu Xianghong, and Chen Yuming. Intramyocardial injection of vascular endothelial growth factor gene improves cardiac performance and inhibits cardiomyocyte apoptosis. *Eur J Heart Fail*, 9:343–351, April 2007.
- [149] L Rydén, H Tadokoro, P O Sjöquist, C Regardh, S Kobayashi, E Corday, and J K Drury. Pharmacokinetic analysis of coronary venous retroinfusion: a comparison with anterograde coronary artery drug administration using metoprolol as a tracer. *J Am Coll Cardiol*, 18:603–612, August 1991.
- [150] J Sato, K Nair, J Hiddinga, N L Eberhardt, L A Fitzpatrick, Z S Katusic, and T O'Brien. eNOS gene transfer to vascular smooth muscle cells inhibits cell proliferation via upregulation of p27 and p21 and not apoptosis. *Cardiovasc Res*, 47:697–706, September 2000.
- [151] K Sato, T Wu, R J Laham, R B Johnson, P Douglas, J Li, F W Sellke, S Bunting, M Simons, and M J Post. Efficacy of intracoronary or intravenous VEGF165 in a pig model of chronic myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol*, 37:616–623, February 2001.
- [152] W Schaper, A Jageneau, and R Xhonneux. The development of collateral circulation in the pig and dog heart. *Cardiologia*, 51:321–335, 1967.
- [153] R Schulz, B D Guth, K Pieper, C Martin, and G Heusch. Recruitment of an inotropic reserve in moderately ischemic myocardium at the expense of metabolic recovery. A model of short-term hibernation. *Circ Res*, 70:1282–1295, June 1992.
- [154] R Schulz, J Rose, C Martin, O E Brodde, and G Heusch. Development of short-term myocardial hibernation. Its limitation by the severity of ischemia and inotropic stimulation. *Circulation*, 88:684–695, August 1993.
- [155] B Schumacher, P Pecher, B U von Specht, and T Stegmann. Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors: first clinical results of a new treatment of coronary heart disease. *Circulation*, 97:645–650, February 1998.
- [156] E R Schwarz, F A Schoendube, S Kostin, N Schmiedtke, G Schulz, U Buell, B J Messmer, J Morrison, P Hanrath, and J vom Dahl. Prolonged myocardial hibernation exacerbates cardiomyocyte degeneration and impairs recovery of function after revascularization. *J Am Coll Cardiol*, 31:1018–1026, April 1998.
- [157] Gregg Semenza. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol*, 64:993–998, September 2002.

- [158] Y T Shen and S F Vatner. Mechanism of impaired myocardial function during progressive coronary stenosis in conscious pigs. Hibernation versus stunning? *Circ Res*, 76:479–488, 1995.
- [159] M Simons, R O Bonow, N A Chronos, D J Cohen, F J Giordano, H K Hammond, R J Laham, W Li, M Pike, F W Sellke, T J Stegmann, J E Udelson, and T K Rosengart. Clinical trials in coronary angiogenesis: issues, problems, consensus: An expert panel summary. *Circulation*, 102:E73—E86, September 2000.
- [160] Michael Simons. Angiogenesis: where do we stand now? *Circulation*, 111:1556–1566, 2005.
- [161] Michael Simons, Brian H Annex, Roger J Laham, Neal Kleiman, Timothy Henry, Harold Dauerman, James E Udelson, Ernesto V Gervino, Marilyn Pike, M J Whitehouse, Thomas Moon, and Nicolas A Chronos. Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2: double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Circulation*, 105:788–793, February 2002.
- [162] Michael Simons and J Anthony Ware. Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov*, 2:863–871, November 2003.
- [163] P O Sjöquist, G Duker, and O Almgren. Distribution of the collateral blood flow at the lateral border of the ischemic myocardium after acute coronary occlusion in the pig and the dog. *Basic Res Cardiol*, 79:164–175, 1984.
- [164] M G St John Sutton, R L Frye, H C Smith, J H Chesebro, and E L Ritman. Relation between left coronary artery stenosis and regional left ventricular function. *Circulation*, 58:491–497, September 1978.
- [165] J D St Louis, G C Hughes, A P Kypson, T R DeGrado, C L Donovan, R E Coleman, B Yin, C Steenbergen, K P Landolfo, and J E Lowe. An experimental model of chronic myocardial hibernation. *Ann Thorac Surg*, 69:1351–1357, 2000.
- [166] J D Symons, K F Pitsillides, and J C Longhurst. Chronic reduction of myocardial ischemia does not attenuate coronary collateral development in miniswine. *Circulation*, 86:660–671, August 1992.
- [167] S Takeshita, T Isshiki, and T Sato. Increased expression of direct gene transfer into skeletal muscles observed after acute ischemic injury in rats. *Lab Invest*, 74:1061–1065, June 1996.
- [168] T Tamura, T Nakanishi, Y Kimura, T Hattori, K Sasaki, H Norimatsu, K Takahashi, and M Takigawa. Nitric oxide mediates interleukin-1-induced matrix degradation and basic fibroblast growth factor release in cultured rabbit articular chondrocytes: a possible mechanism of pathological neovascularization in arthritis. *Endocrinology*, 137:3729–3737, September 1996.
- [169] Jun Tao, Zhen Yang, Jie-Mei Wang, Chang Tu, and Shi-Rong Pan. Effects of fluid shear stress on eNOS mRNA expression and NO production in human endothelial progenitor cells. *Cardiology*, 106:82–88, April 2006.

- [170] R Tennant and C J Wiggers. The effect of coronary occlusion on myocardial contraction. *Am J Physiol*, 112:351–361, 1935.
- [171] E Thein, S Raab, A G Harris, M Kleen, O Habler, F Meisner, and K Messmer. Comparison of regional blood flow values measured by radioactive and fluorescent microspheres. *Eur Surg Res*, 34:215–223, 2002.
- [172] E Thein, S Raab, A G Harris, and K Messmer. Automation of the use of fluorescent microspheres for the determination of blood flow. *Comput Methods Programs Biomed*, 61:11–21, January 2000.
- [173] J Tillisch, R Brunken, R Marshall, M Schwaiger, M Mandelkern, M Phelps, and H Schelbert. Reversibility of cardiac wall-motion abnormalities predicted by positron tomography. *N Engl J Med*, 314:884–888, April 1986.
- [174] R A Tio, T Tkebuchava, T H Scheuermann, C Lebherz, M Magner, M Kearny, D D Esakof, J M Isner, and J F Symes. Intramyocardial gene therapy with naked DNA encoding vascular endothelial growth factor improves collateral flow to ischemic myocardium. *Hum Gene Ther*, 10:2953–2960, 1999.
- [175] H Tomoike, D Franklin, and J Ross. Detection of myocardial ischemia by regional dysfunction during and after rapid pacing in conscious dogs. *Circulation*, 58:48–56, July 1978.
- [176] Eiji Toyota, Toshiro Matsunaga, and William M Chilian. Myocardial angiogenesis. *Mol Cell Biochem*, 264:35–44, September 2004.
- [177] Y Tsurumi, S Takeshita, D Chen, M Kearney, S T Rossow, J Passeri, J R Horowitz, J F Symes, and J M Isner. Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion. *Circulation*, 94:3281–3290, 1996.
- [178] E F Unger. Experimental evaluation of coronary collateral development. *Cardiovasc Res*, 49:497–506, February 2001.
- [179] E F Unger, S Banai, M Shou, M Jaklitsch, E Hodge, R Correa, M Jaye, and S E Epstein. A model to assess interventions to improve collateral blood flow: continuous administration of agents into the left coronary artery in dogs. *Cardiovasc Res*, 27:785–791, 1993.
- [180] E F Unger, S Banai, M Shou, D F Lazarous, M T Jaklitsch, M Scheinowitz, R Correa, C Klingbeil, and S E Epstein. Basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral flow in a canine model. *Am J Physiol*, 266:H1588—H1595, April 1994.
- [181] E F Unger, L Goncalves, S E Epstein, E Y Chew, C B Trapnell, R O Cannon, and A A Quyyumi. Effects of a single intracoronary injection of basic fibroblast growth factor in stable angina pectoris. *Am J Cardiol*, 85:1414–1419, June 2000.

- [182] P R Vale, D W Losordo, C E Milliken, M C McDonald, L M Gravelin, C M Curry, D D Esakof, M Maysky, J F Symes, and J M Isner. Randomized, single-blind, placebo-controlled pilot study of catheter-based myocardial gene transfer for therapeutic angiogenesis using left ventricular electromechanical mapping in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation*, 103:2138–2143, 2001.
- [183] Rien van Haperen, Monique de Waard, Elza van Deel, Barend Mees, Michael Kutryk, Thijs van Aken, Jaap Hamming, Frank Grosveld, Dirk J Duncker, and Rini de Crom. Reduction of blood pressure, plasma cholesterol, and atherosclerosis by elevated endothelial nitric oxide. *J Biol Chem*, 277:48803–48807, 2002.
- [184] J R Vane, E E Anggaard, and R M Botting. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med*, 323:27–36, July 1990.
- [185] C Vassalle, L Petrozzi, N Botto, M G Andreassi, and G C Zucchelli. Oxidative stress and its association with coronary artery disease and different atherogenic risk factors. *J Intern Med*, 256:308–315, 2004.
- [186] M T Vivaldi, R A Kloner, and F J Schoen. Triphenyltetrazolium staining of irreversible ischemic injury following coronary artery occlusion in rats. *Am J Pathol*, 121:522–530, 1985.
- [187] G von Degenfeld, W Giehl, and P Boekstegers. Targeting of dobutamine to ischemic myocardium without systemic effects by selective suction and pressure-regulated retroinfusion. *Cardiovasc Res*, 35:233–240, August 1997.
- [188] G von Degenfeld, P Raake, C Kupatt, C Lebherz, R Hinkel, F J Gildehaus, W Münzing, An. Kranz, J Waltenberger, M Simoes, M Schwaiger, E Thein, and P Boekstegers. Selective pressure-regulated retroinfusion of fibroblast growth factor-2 into the coronary vein enhances regional myocardial blood flow and function in pigs with chronic myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol*, 42:1120–1128, September 2003.
- [189] L K Waldman, D Nosan, F Villarreal, and J W Covell. Relation between transmural deformation and local myofiber direction in canine left ventricle. *Circ Res*, 63:550–562, September 1988.
- [190] M E Weaver, G A Pantely, J D Bristow, and H D Ladley. A quantitative study of the anatomy and distribution of coronary arteries in swine in comparison with other animals and man. *Cardiovasc Res*, 20:907–917, 1986.
- [191] W S Weintraub, S Hattori, J B Agarwal, M M Bodenheimer, V S Banka, and R H Helfant. The relationship between myocardial blood flow and contraction by myocardial layer in the canine left ventricle during ischemia. *Circ Res*, 48:430–438, 1981.
- [192] F C White, S M Carroll, A Magnet, and C M Bloor. Coronary collateral development in swine after coronary artery occlusion. *Circ Res*, 71:1490–1500, 1992.
- [193] Y Xia, A L Tsai, V Berka, and J L Zweier. Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca²⁺/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J Biol Chem*, 273:25804–25808, 1998.

- [194] X P Xu, J S Pollock, M A Tanner, and P R Myers. Hypoxia activates nitric oxide synthase and stimulates nitric oxide production in porcine coronary resistance arteriolar endothelial cells. *Cardiovasc Res*, 30:841–847, 1995.
- [195] Zhihong Yang and Xiu-Fen Ming. Recent advances in understanding endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Clin Med Res*, 4:53–65, 2006.
- [196] D M Yellon and G F Baxter. A “second window of protection” or delayed preconditioning phenomenon: future horizons for myocardial protection? *J Mol Cell Cardiol*, 27:1023–1034, April 1995.
- [197] Jun Yu, Ebo D DeMuinck, Zhenwu Zhuang, Mary Drinane, Katalin Kauser, Gabor M Rubanyi, Hu Sheng Qian, Takahisa Murata, Bruno Escalante, and William C Sessa. Endothelial nitric oxide synthase is critical for ischemic remodeling, mural cell recruitment, and blood flow reserve. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102:10999–11004, August 2005.
- [198] Ruilan Zhang, Lei Wang, Li Zhang, Jieli Chen, Zhenping Zhu, Zhenggang Zhang, and Michael Chopp. Nitric oxide enhances angiogenesis via the synthesis of vascular endothelial growth factor and cGMP after stroke in the rat. *Circ Res*, 92:308–313, February 2003.

Abbildungsverzeichnis

2.1	Vorbereitung des Reduktionsstents	28
2.2	Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls in Gruppe A bis C	30
3.1	eNOS Expression 72 h nach Infusion von eNOS S1177D cDNA	44
3.2	Quantitative Bestimmung von eNOS im myokardialen Gewebe	45
3.3	Vermehrte myokardiale Bildung von cGMP nach Behandlung mit eNOS S1177D cDNA	46
3.4	Endotheliale Zellen proliferieren nach Transfektion von eNOS S1177D in vitro	47
3.5	Vermehrte Zellproliferation nach Transfektion von eNOS S1177D in vivo	48
3.6	Qualitative Charakterisierung proliferierender Zellen	49
3.7	Angiogenese nach Transfektion von eNOS S1177D cDNA in vivo	51
3.8	Arteriogenese nach Transfektion von eNOS S1177D cDNA in vivo	52
3.9	Unveränderte Perfusion des Gewebes im Kontrollareal	54
3.10	Verbesserte Perfusion in der apikalen Herzregion nach forcierter Expression von eNOS S1177D	55
3.11	Signifikant gesteigerte Durchblutung sowohl in Ruhe als auch unter Pacing	56
3.12	Verbesserte regionale Herzfunktion im distalen LAD-perfundierten Areal	59

Tabellenverzeichnis

1.1	Einfluss von HIF auf den angiogenetischen Effekt verschiedener stimulierender Transkriptionsfaktoren	10
3.1	Regionaler Blutfluss in epikardialen und endokardialen Gewebeproben	53
3.2	Hämodynamische Parameter der globalen Herzfunktion	57

Abkürzungsverzeichnis

AIV	Anteriore interventrikuläre Vene
ATP	Adenosintriphosphat
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CD	Cluster Of Differentiation
cDNA	Complementary DNA
DNA	Deoxyribonucleic Acid
eGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EKG	Elektrokardiogramm
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
F	French
FDG	Fluorodesoxyglucose
FGF	Fibroblast Growth Factor
FLT	FMS-like Tyrosine Kinase
G	Gauge
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor
HF	Herzfrequenz
HIF	Hypoxie-induzierte Faktor
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IE	Internationale Einheiten
Kdr	Knock Down Resistance
KHK	Koronare Herzkrankheit
LAD	Left Anterior Descending
L-NAME	L-Nitro-Arginine Methyl Ester
LVEDP	Leftventricular Enddiastolic Pressure
LVSP	Leftventricular Systolic Pressure
MCP	Monocyte Chemotactic Protein
MMP	Matrix Metalloproteinasen
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
NO	Stickstoffmonoxid
pCO ₂	Kohlendioxid-Partialdruck
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PTCA	Perkutane transluminale coronare Angioplastie

PTFE	Polytetrafluorethylen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RCx	Ramus circumflexus
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SES	Subendokardiale Segmentverkürzung
SS	Shear Stress
SSR	System der selektiven druckregulierten Retroin- fusion
TGF	Transforming Growth Factor
TIMP	Tissue Inhibitor Of Metalloproteinases
TNF	Tumornekrosefaktor
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
USP	United States Pharmacopeia
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VVD	Venenverschlussdruck
WHO	World Health Organisation

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med Christian Kupatt für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die Möglichkeit, in seiner engagierten Arbeitsgruppe an meiner Promotion zu arbeiten.

Für die geduldige kontinuierliche Betreuung sowie die kompetente methodische Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten möchte ich Frau Dr. med. vet. Rabea Hinkel ausdrücklich danken.

Ferner bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Pohl für die Bereitstellung der Räumlichkeiten zur Durchführung der Experimente im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin.

Nicht zuletzt danke ich meinem Mitdoktoranden Sebastian Müller und allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die herzliche Zusammenarbeit und tatkräftige Unterstützung.