

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I - Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität

Direktor: Prof. Dr. med. G. Steinbeck

Therapeutische Angiogenese durch selektive venöse Retroinfusion von FGF-2
und VEGF₁₆₅ bei chronischer peripherer Ischämie im Hinterlauf des Kaninchens

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Alexander Karl
aus Augsburg

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. P. Boekstegers

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. M. Dellian
Prof. Dr. B. Walzog
Prof. Dr. U. Hoffmann

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Oktober 2005

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Gefäßwachstum	1
1.2 Angiogenetische Wachstumsfaktoren	4
1.2.1 Fibroblast Growth Factor (FGF).....	4
1.2.2 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	6
1.2.3 Therapeutische Angiogenese	7
1.3 Risiken der VEGF- und FGF-Applikation	8
1.3.1 Hypotonie	8
1.3.2 Hämangiombildung	8
1.3.3 Tumorwachstum	9
1.3.4 Sonstige unerwünschte Wirkungen	9
1.4 Applikationsverfahren	9
1.5 Venöse Retroinfusion	11
1.5.1 Applikation von FGF-2 und VEGF ₁₆₅ durch Retroinfusion in die Beinvene	11
2. Materialien und Methoden.....	12
2.1 Tierexperimentelles Modell am Kaninchen: chronische Ischämie im Hinterlauf.....	12
2.2 Anästhesie.....	13
2.3 Interventionen.....	13
2.3.1 Exzision der A. femoralis superficialis (Tag 0).....	13
2.3.2 Selektive Retroinfusion der Wachstumsfaktoren in die Vena tibialis anterior (Tag 7)	15
2.4 Angiographie	16
2.4.1 Arteriographie.....	16
2.4.2 Arteriographie der Becken- und Beinarterien.....	17
2.4.3 Retrograde Venographie	19
2.4.4 Technetium Szintigraphie	19
2.5 Messparameter.....	21
2.5.1 Bestimmung der Kollateralen	21
2.5.2 Cinedensitometrie und TIMI Frame Count	23
2.5.3 Doppler-Fluss-Messung.....	25

2.5.4	Bestimmung der Kapillardichte	26
2.5.5	Färbemethode mit alkalischer Phosphatase	26
2.6	Statistik	27
3.	Ergebnisse	28
3.1	Technetium Szintigraphie: Retention der ^{99m} Tc-Kolloide im ischämischen Hinterlauf	28
3.1.1	Selektive retrograde Applikation mit proximaler Stauung	28
3.1.2	Arterielle Applikation ohne proximale Stauung	29
3.2	Kollateralwerte	30
3.3	Kapillardichte	33
3.4	Blutfluss	37
3.5	Validierung der Cine-Densitometrischen Methode	38
4.	Diskussion	39
4.1	Höhere Konzentration und längere Verweildauer der Wachstums- faktoren im ischämischen Bein bei der Retroinfusion von ⁹⁹ Tc- Nanokolloiden im Vergleich zur antegraden arteriellen Infusion	40
4.2	Angiogenese, Kollateralwachstum und Erhöhung des Blutflusses durch retrograde Infusion angiogenetischer Wachstumsfaktoren	41
4.3	Kombinierte retrograde Infusion von FGF-2 und VEGF ₁₆₅	42
4.4	Arteriosklerose und periphere arterielle Verschlusskrankheit	44
4.5	Klinische Studien zur therapeutischen Angiogenese durch VEGF und FGF	45
4.6	Applikationswege für angiogenetische Wachstumsfaktoren	49
4.7	Angiogenese und Arteriogenese	51
4.8	Messung des Blutflusses mit Hilfe der Angiographie	53
4.9	Zusammenfassung	55
5.	Literaturverzeichnis	57
	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	68
	Danksagung	70
	Veröffentlichung	71
	Lebenslauf	72

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Formation eines vaskulären Netzwerkes	2
Abbildung 2:	Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls.....	12
Abbildung 3:	Schema zur Lokalisation der Exzision.....	14
Abbildung 4:	Angiographische Darstellung des Gefäßstatus 4 Wochen nach Exzision der A. femoralis superficialis rechts; Gefäßstumpf der A. femoralis superficialis im Bereich des Abgangs aus der A. iliaca externa im Bild links oben	14
Abbildung 5:	Angiographische Darstellung bei Retroinfusion	19
Abbildung 6:	Raster zur Kollateralbestimmung	22
Abbildung 7:	Schema zur Kollateralisierung.....	24
Abbildung 8:	Vergleich der venösen Retroinfusion einer ^{99m} TcNano-Kolloid-Lösung bei unterbrochenen Flussbedingungen über einen Zeitraum von 60 Minuten mit der antegraden arteriellen Gabe von ^{99m} TcNanoKolloid-Lösung ohne Unterbrechung des Blutflusses in Bezug auf die Gesamtaktivität in %.	29
Abbildung 9:	Antegrade Applikation von ^{99m} TcNano-Kolloid-Lösung.....	30
Abbildung 10:	Retrograde Applikation von ^{99m} TcNano-Kolloid-Lösung	30
Abbildung 11:	Kollateralwerte	31
Abbildung 12:	Angiographien vor und nach der Behandlung mit FGF-2 oder mit FGF-2 und VEGF ₁₆₅ nach Retroinfusion.	32
Abbildung 13:	Kapillardichte.....	33
Abbildung 14:	Kapillardichte des M. adductor.....	34
Abbildung 15:	Kapillardichte des M. gastrocnemius	34
Abbildung 16:	Kapillardichte des M. tibialis	35
Abbildung 17:	Kapillardichte des M. fibularis	35
Abbildung 18:	Histologische Schnitte des Muskelgewebes nach FGF-2-Applikation im Vergleich zur Kontrollgruppe	36
Abbildung 19:	Blutflussdiagramm	37
Abbildung 20:	Diagramm zur Validierung der Filmbildzählung.....	38

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Studien für therapeutisches Gefäßwachstum bei koronarer Herzkrankheit:	45
Tabelle 2:	Klinische Studien für therapeutisches Gefäßwachstum bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit.....	46

1. Einleitung

1.1 Gefäßwachstum

Kleinere Blutgefäße bestehen aus sogenannten Endothelzellen, wohingegen in mittleren und großen Gefäßen zusätzlich Perizyten und auch glatte Muskelzellen vorzufinden sind. Blutgefäße können hierbei grundsätzlich auf unterschiedliche Arten entstehen.

Unter **Vaskulogenese** versteht man die Bildung neuer Blutgefäße durch endotheliale Progenitors (Vorläufer-Zellen). Über viele Jahre wurde angenommen, dass embryonale Gefäße aus den endothelialen Progenitors hervorgehen, wohingegen im erwachsenen Organismus neues Gefäßwachstum durch die Teilung von differenzierten Endothelzellen erreicht wird. Neuere Erkenntnisse lassen jedoch darauf schließen, dass endotheliale Progenitors sowohl beim Gefäßwachstum in embryonalen Geweben wie auch in ischämischen, malignen oder entzündlichen Geweben beim Erwachsenen beteiligt sind. Dies kann zur Stimulation neuen Gefäßwachstums im ischämischen Gewebe beitragen (Carmeliet 2003).

Des Weiteren wird die Angiogenese von der sogenannten Arteriogenese abgegrenzt. Als **Angiogenese** wird hierbei die Aussprossung von Endothelzellen bezeichnet, welche schließlich zur Formierung eines kapillären Netzwerks führt (Risau 1997).

Die **Arteriogenese** wird als ein Prozess eingestuft, bei welchem das Wachstum von bereits existierenden Arteriolen in funktionell bedeutsame Kollateralen zu beobachten ist (Schaper et al. 1999; Carmeliet 2000; Kern 2000).

Alle genannten Prozesse gelten als Angriffspunkte für therapeutische Ziele. Wenn Gefäßwachstum jedoch unkontrolliert abläuft, kann dies einen erheblichen Einfluss auf den Organismus haben.

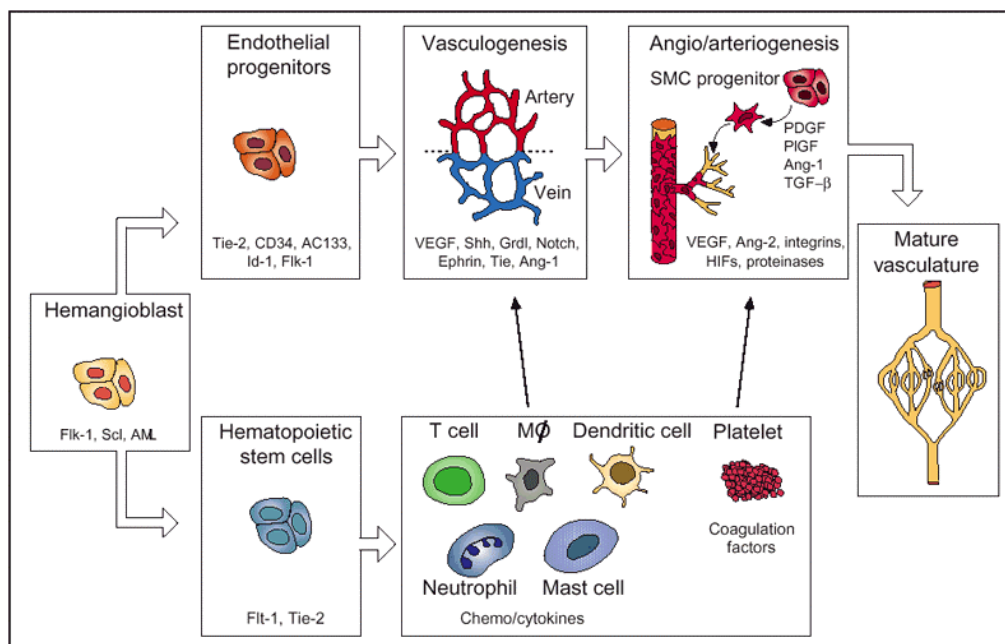


Abbildung 1: Formation eines vaskulären Netzwerkes (Carmeliet 2003)

In Abbildung 1 ist die Bildung eines neuen vaskulären Netzwerkes dargestellt (Carmeliet 2003). Die endothelialen Progenitors differenzieren unter Stimulation durch verschiedene Faktoren zu arteriellen und venösen Endothelzellen, welche sich dann zu einem primitiven kapillären Plexus formieren. Danach sprießen die Gefäße und werden im Verlauf durch glatte Muskelzellen (SMCs) stabilisiert, welche wiederum von ihren Progenitors abgeleitet sind. Hämatopoetische Stammzellen (HSCs) tragen in diesem Prozess direkt und indirekt zur Angiogenese bei, indem sie auch zu Leukozyten und Thrombozyten differenzieren.

Die pathophysiologische Relevanz des Gefäßwachstums für das Tumorwachstum wurde erstmals 1971 von J. Folkman beschrieben (Folkman et al. 1971 und 1992). Im adulten Organismus ist das Gefäßwachstum einem notwendigen und eng regulierten Mechanismus unterworfen, welcher für die Erhaltung der Homöostase von wachsenden Geweben, beispielsweise bei aktivitätsbedingter Skelettmuskelhypertrophie verantwortlich ist (Physiologie des Menschen, Schmidt-Thews 1995). Darüber hinaus können angiogenetische Prozesse jedoch zu verschiedenen Krankheitsbildern wie zum Beispiel der proliferativen Retinopathie führen, bei der es durch Überexpression von angiogenetischen Wachstumsfaktoren zur Kapillareinsprossung in die Netzhaut mit späterem Visusverlust kommt (Carmeliet et al. 1997). Von besonderer klinischer Bedeutung

sind angiogenetische Wachstumsprozesse bei der Entstehung oder dem Verlauf von „Volkskrankheiten“ wie sie bei Tumoren und ischämischen Erkrankungen vorzufinden sind. Letztere werden in der Regel durch arteriosklerotische Stenosierung oder vollständigen Verschluss einer Arterie verursacht, mit der Folge von Ischämie im abhängigen Gewebe. Je nach betroffener Arterie manifestiert sich die Erkrankung u.a. als *periphere arterielle Verschlusskrankheit* (A. iliaca, A. femoralis oder A. poplitea) oder als *koronare Herzerkrankung* (Herzkranzgefäße) (European Working Group on Clinical Leg Ischemia 1991; Sim et al. 2002).

Aufgrund der hohen klinischen Relevanz sind die molekularen und zellulären Mechanismen des Gefäßwachstums Gegenstand intensiver Forschung. Durch verschiedene endogene Prozesse wie auch durch äußere Einflüsse wird die Expression von angiogenetischen Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren induziert (z.B. VEGF und FGF, siehe Abschnitt 1.2). Das hierdurch induzierte Gefäßwachstum soll die Durchblutungssituation des arteriell unterversorgten Gewebes verbessern und somit bei verschiedenen Erkrankungen therapeutisch genutzt werden.

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, einen effektiven und schonenden Applikationsweg für Gefäßwachstum induzierende Substanzen zu etablieren.

1.2 Angiogenetische Wachstumsfaktoren

Es sind Wachstumsfaktoren isoliert und charakterisiert worden, die *in vitro* Proliferation und Migration von Endothelzellen sowie ihre Anordnung zu gefäßartigen tubulären Strukturen induzieren. Für mehrere Faktoren ist darüber hinaus die funktionell relevante Induktion von Kapillar- und Kollateralwachstum in tierexperimentellen chronischen Ischämie-Modellen gezeigt worden. Fibroblast growth factor (FGF) und vascular endothelial growth factor (VEGF) sind die beiden zuerst beschriebenen angiogenetischen Wachstumsfaktoren, die in einer Vielzahl von *in vivo* Modellen charakterisiert wurden.

1.2.1 Fibroblast Growth Factor (FGF)

Die *fibroblast growth factors* (FGFs) gehören einer Familie von heparinbindenden Polypeptiden mit starker Regulatorfunktion der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zellfunktion an (Burgess und Maciag 1989; Rifkin und Moscatelli 1989). Sie spielen eine große Rolle bei der Entwicklung und der Aufrechterhaltung von Geweben (Yamaguchi und Rossant 1995) sowie bei der Wundheilung und anderen Reparationsvorgängen im Körper (Cuevas et al. 1988). FGFs haben Bedeutung bei einer Vielzahl von pathologischen Prozessen wie bei Tumorwachstum und Metastasierung (Davies et al. 1996; Myoken et al. 1996). Die FGFs binden dabei nicht selektiv an Endothelzellen, sondern haben eine breite Wirkung auf Gewebe meso-, ekto- und endodermalen Ursprungs (Gospodarowicz et al. 1978 und 1985). Während die Erstbeschreibung dieser Faktoren als Mitogen für Fibroblasten zur Namensgebung führte (Gospodarowicz et al. 1978; Rudland et al. 1974), ist heute bekannt, dass sie einerseits eine weitschichtigere Funktion haben, und andererseits nicht alle Mitglieder der FGF-Familie auf Fibroblasten wirken.

Nach derzeitiger Kenntnis umfasst die FGF-Familie 23 Mitglieder. Die zuerst entdeckten Mitglieder der FGF-Familie sind die beiden Faktoren *acidic FGF* (aFGF bzw. FGF-1) und *basic FGF* (bFGF bzw. FGF-2), welche nach ihren verschiedenen isoelektrischen Punkten benannt wurden. Beide wurden in verschiedenen Studien intensiv untersucht und wiesen signifikante Einflüsse auf

den Prozess der Angiogenese auf. Alle Mitglieder der FGF-Familie sind von der Struktur her ähnlich, wobei die Spezifität ihrer Wachstum anstoßenden Wirkung differiert. Die Gene für FGF-1 und FGF-2 sind auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert. Ihre Aminosäuresequenzen stimmen jedoch zu ca. 55% überein, sie haben vergleichbare Molekulargewichte und ähnliche Spektren ihrer biologischen Aktivität. FGF-2 wird in so unterschiedlichen Geweben wie Nerven, Hypophyse, adrenalem Kortex, Korpus Luteum oder der Plazenta exprimiert (Esch et al. 1985; Gospadorowicz et al. 1974 und 1978).

Bei FGF-2 als Prototyp der FGFs handelt es sich um ein 16,5 kDa großes und 146 Aminosäuren umfassendes Peptid, welches mit hoher Affinität (10^{-9} M) an die zelluläre und die extrazelluläre Heparansulfat-Matrix bindet. Wobei FGFs mit noch höherer Affinität (10^{-10} M) an Thyosinkinaserzeptoren binden (Nugent et al. 1992), die hierdurch dimerisiert und phosphoryliert werden. Durch die zusätzliche Bindung an Heparansulfat-Proteoglykane wird der Ligand-Rezeptorkomplex stabilisiert (Friesel et al. 1995; Johnson et al. 1993) und die Affinität zum Rezeptor erhöht (Rosenberg et al. 1997).

Es sind insgesamt 6 FGF-Rezeptoren bekannt, die wesentliche Merkmale teilen. Sie bestehen aus einer extrazellulären, dreiteiligen immunglobulinähnlichen Domäne, einer Heparin-bindenden Domäne, einer hydrophobischen Transmembrandomäne und einer intrazellulären Tyrosin-kinase-Domäne (Johnson et al. 1989).

Die Relevanz der durch FGF-Rezeptor (FGF-R) vermittelten Signale wurde in Versuchen mit transgenen bzw. Knockout-Mäusen gezeigt. So sterben homozygote Mäuse für eine FGF-R1-0 Mutation zwischen E 7,5 und E 9,5 aufgrund von Gastrulationsdefekten und Wachstumsretardierung (Yamaguchi et al. 1994; Deng et al. 1994). Auch die gezielte Störung im FGF-R-2 Gen alleine führt zur embryonalen Sterblichkeit mit frühen Postimplantationsdefekten, die vermuten lassen, dass FGF-R-2 das Wachstum und die Differenzierung der inneren Zellmasse mitbestimmt (Arman et al. 1998). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die FGF-Rezeptoren verschiedene Rollen während der Entwicklung spielen.

FGFs waren die ersten Faktoren, für die eine proliferierende Wirkung auf Endothelzellen beschrieben wurde. Insbesondere für FGF-2 wurde eine wesentliche Rolle bei der endogenen Angiogenese in ischämischen Geweben

beschrieben. In verschiedenen Tierversuchsprotokollen wurde die Induktion von Kapillarwachstum und Kollateralwachstum durch FGF-2 gezeigt (Chleboun et al. 1992).

1.2.2 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) oder früher auch als vaskulärer Permeabilitätsfaktor (Vascular Permeability Factor, VPF) bezeichnet, wurde aus bovinem Hypophysengewebe und diversen anderen Ursprungsorten (Niere, Neuroblastome, Lunge etc.) isoliert (Shima et al. 1995). Beim nativen VEGF handelt es sich um ein basisches, Heparin-bindendes, homodimeres glykosiliertes Protein von 46-48 kDA (24 kDA Untereinheiten) (Ferrara et al. 1989). Die Untereinheiten sind durch Disulfidbindungen miteinander verbunden. Durch alternatives Exon-splicing eines einzelnen VEGF-Gens entstehen später mindestens vier verschiedene Isoformen mit 121, 165, 189, und 206 Aminosäuren (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆) mit unterschiedlich starker Heparinbindung. VEGF₁₆₅ ist der quantitativ dominierende Faktor, der von einer Vielzahl an Zellen gebildet wird. Die Bioverfügbarkeit von VEGF wird unter anderem auf Transkriptions- und Translationsebene reguliert. Das menschliche VEGF-Gen ist auf Chromosom 6p21.3 lokalisiert (Vincenti et al. 1996) und wird aus acht Exons, welche durch sieben Introns unterbrochen werden, aufgebaut. Das kodierende Segment erstreckt sich über annähernd 14 kb (Houck et al. 1991; Tischer et al. 1991). VEGF-Proteine werden möglicherweise durch zwei verschiedene Mechanismen für die endothelialen Zellen verfügbar gemacht. Als frei lösliche Proteine (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅) oder durch folgende Proteaseaktivierung und Spaltung der langen Isoformen. Es sind mindestens vier verschiedene hochaffine VEGF-spezifische Tyrosinkinaserzeptoren bekannt (VEGF-R-1 bis VEGF-R-4). Die beiden Rezeptoren VEGF-R-1 (Syn. Flt-1-Rezeptor, fms-like-tyrosin-kinase) (De Vries et al. 1992) und VEGF-R-2 (KDR-Rezeptor (kinase domain region) (Terman et al. 1992) werden auf Endothelzellen exprimiert.

Der Sauerstoffpartialdruck (pO₂) im Gewebe ist ein Schlüsselregulator der VEGF-Genexpression. Während die basale VEGF-Expression sehr gering ist, kommt es bei Hypoxie durch Stabilisierung von *Hypoxia-inducible factor 1α* (HIF-1α) zur Aktivierung des sogenannten *Hypoxia-responsive element* (HRE) des VEGF-

Promotors und somit zur vermehrten Transkription (Minchenko et al. 1994; Shima et al. 1995). Insbesondere bei experimenteller koronarer Ischämie im Tiermodell durch Verschluss der linken anterioren Herzkranzarterie (LAD) kommt es zu einem erheblichen Anstieg der VEGF-RNA-Expression (Ikeda et al. 1995). Die gewonnenen Erkenntnisse weisen darauf hin, dass VEGF ein Mediator der spontanen Revaskularisation bei Ischämie bzw. Hypoxie ist (Banai et al. 1994; Hashimoto et al. 1994). Eine Fülle experimenteller und klinischer Untersuchungen haben gezeigt, dass VEGF über Aktivierung der Rezeptoren VEGF-R1 und VEGF-R2 die Proliferation und Migration von Endothelzellen induziert. In vitro induziert VEGF die Anordnung in tubuläre Strukturen, und in vivo die Ausbildung neuer Mikrogefäße (Kopp et al. 2004).

1.2.3 Therapeutische Angiogenese

Die Isolierung der beschriebenen angiogenetischen Wachstumsfaktoren führte zur Hypothese, dass durch exogene Applikation dieser Faktoren während Ischämie die Angiogenese zusätzlich stimuliert, hierdurch der Blutfluss normalisiert und das Ausmaß der Gewebeschädigung vermindert werden könnten („therapeutische Angiogenese“) (Höckel et al. 1989 und 1993; Folkman et al. 1998; Takeshita et al. 1994). Im tierexperimentellen Modell am Kaninchen konnte durch Applikation von FGF oder VEGF bei chronischer Ischämie der hinteren Gliedmaße Kapillar- und Kollateralwachstum induziert werden (Bauters et al. 1995; Takeshita et al. 1994). Diese angiographisch und histologisch erfassbaren morphologischen Veränderungen gingen mit funktionellen Verbesserungen einher wie Verhinderung von Gewebnekrosen, Erhöhung des peripheren arteriellen (poststenotischen) Blutdruckes und des Blutflusses, sowie Verbesserung der maximalen und endothelabhängigen Flussreserve (Bauters et al. 1994 und 1995; Takeshita et al. 1994 und 1995, Baffour 1992).

Die tierexperimentellen Ergebnisse führten zur Initiierung mehrerer klinischer Studien, bei denen Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit oder koronarer Herzkrankheit angiogenetische Faktoren entweder als Proteine oder als Gene appliziert wurden. Auch hier wurden zuerst die „klassischen“ Faktoren FGF und VEGF eingesetzt. Die vorliegenden Ergebnisse aus randomisierten und doppelblinden klinischen Studien erbrachten bislang noch keinen sicheren Nachweis einer deutlichen therapeutischen Wirksamkeit.

1.3 Risiken der VEGF- und FGF-Applikation

1.3.1 Hypotonie

VEGF führt über mehrere intrazelluläre Signaltransduktionewege zur Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) in den Gefäßen, wodurch es zur Relaxation der vaskulären glatten Muskelzellen und zur ausgeprägten Vasodilatation kommt (Kroll et al. 1998 und 1999; Hood et al 1998). Die resultierende Hypotonie, obgleich prinzipiell reversibel, limitiert die maximal applizierbare VEGF-Dosis. Untersuchungen am Schwein haben gezeigt, dass die einmalige Gabe von 500 µg/kg VEGF zur schweren Hypotonie führt, sodass 50% der Tiere im Schock starben (Lopez et al. 1998). Die wissenschaftliche Diskussion darüber, ob auch FGF mittelbar oder unmittelbar zur NO-Freisetzung führt ist derzeit noch nicht abgeschlossen (Ziche 1998). Auch die Gabe von FGF führt zur Hypotonie, die jedoch möglicherweise bei therapeutischer Dosis weniger ausgeprägt ist als bei VEGF. Auch für FGF wurde eine Phase-I-Studie zur Ermittlung der maximal tolerierbaren Menge durchgeführt, die einen Wert von 100 µg/kg Körpergewicht (KG) ergab (Laham R. et al. 1999). In der Zusammenschau der verschiedenen tierexperimentellen und klinischen Befunde erscheint die Wirkung von VEGF auf die NO-Freisetzung und Hypotonie stärker ausgeprägt als die von FGF.

1.3.2 Hämangiombildung

In experimentellen Gentransferstudien von VEGF bildeten sich hämangiomartige Gefäßwucherungen aus. Dies konnte bei verschiedenen Genvektoren (Adenoviren, Plasmiden, Myoblasten und auch transgenen Modellen) und in verschiedenen Geweben (Herz und Skelettmuskel) beobachtet werden (Springer et al. 2000, Schwarz et al. 2000, Petterson et al. 2000, Dor et al. 2002). Dieser unerwünschte Effekt wurde für FGF nicht beschrieben. Auch scheint das Applikationsverfahren eine Rolle zu spielen, denn Hämangiombildungen wurden nur bei direkter Injektion der Genvektoren in das Gewebe beschrieben. Die hierbei auftretenden hohen lokalen Konzentrationen könnten möglicherweise durch intravaskuläre Applikation mit homogener Verteilung über das gesamte Zielareal vermeidbar sein. Tatsächlich wurde das Auftreten von Hämangiomen

weder bei tierexperimentellen noch bei klinischen Studien beschrieben, in denen die angiogenetischen Faktoren intravaskulär appliziert wurden.

1.3.3 Tumorwachstum

Tumorwachstum geht ab einer kritischen Tumorgröße zwingend mit Angiogenese einher („angiogenic switch“) (Folkman et al. 1971 und 1972). Tumoren exprimieren angiogenetische Wachstumsfaktoren und rekrutieren hierdurch die benötigten Gefäße. Durch Blockade einzelner angiogenetischer Faktoren (z.B. durch lösliche Rezeptoren) kann Tumorwachstum im Tierexperiment dramatisch verlangsamt oder gestoppt werden (Folkman et al. 1971 und 1975; Yang et al. 2003). Die Befürchtung, die therapeutische Gabe von angiogenetischen Wachstumsfaktoren bei ischämischen Erkrankungen könnte das Wachstum eines „schlafenden“ Tumors stimulieren, bestätigte sich jedoch bislang nicht. Inzwischen sind mehrere hundert Patienten in therapeutischen Angiogeneseprotokollen behandelt worden, ohne dass eine erhöhte Manifestation von Tumoren beobachtet wurde (VIVA, FIRST, TRAFFIC).

1.3.4 Sonstige unerwünschte Wirkungen

Es gibt relativ wenige Langzeit-Followup-Studien der zahlreichen Phase I und Phase II Untersuchungen in Bezug auf die spätere Sicherheit der Wachstumsfaktorapplikation. Präklinische Untersuchungen weisen jedoch auf weitere unerwünschte Wirkungen der Wachstumsfaktoren hin. So kann die Neovaskularisation im Bereich arteriosklerotischer Plaques induziert und somit ihr Wachstum und ihre Instabilität stimuliert werden (Caletti et al. 2001, Nabel et al. 1993). Auch eine proliferative Wirkung könnte möglicherweise durch exogene Applikation von angiogenetischen Wachstumsfaktoren induziert werden (Carmeliet et al. 1997).

1.4 Applikationsverfahren

Vor dem Hintergrund der klinischen Studienergebnisse und der erwiesenen oder zu befürchtenden Risiken ist die Optimierung des Ansatzes der therapeutischen Angiogenese notwendig. Neben der Frage nach dem „optimalen“

Wachstumsfaktor ist insbesondere die Diskussion um die optimale Applikationsmethode für angiogenetische Wachstumsfaktoren noch nicht abgeschlossen (Kornowski et al. 2000; Rosengart et al. 1999; Azrin 2001).

Bei direkter intramuskulärer Injektion wird vermutlich die höchstmögliche lokale Wirksamkeit erzielt, hierbei kann es jedoch in VEGF-Genstransferprotokollen zur bereits erwähnten Hämangiombildung kommen (Lee et al. 2000; Schwarz et al. 2000). Um die gewünschte homogene Verteilung der Substanz über das Zielareal zu erreichen, sind außerdem multiple Injektionen notwendig. Die intraarterielle Applikation wurde bei koronarer Ischämie in die Koronararterien untersucht, ergab in klinischen Studien jedoch keine sichere therapeutische Wirksamkeit.

Daher sollte ein Applikationsverfahren für angiogenetische Wachstumsfaktoren folgende Anforderungen erfüllen:

1. die Wachstumsfaktoren sollten mit möglichst hoher Effektivität in das ischämische Zielareal eingebracht werden, um einen maximalen lokalen pharmakologischen Effekt zu erzielen;
2. die Wachstumsfaktoren sollten möglichst selektiv in das Zielareal eingebracht werden;
3. die Wachstumsfaktoren sollten sich homogen über das gesamte Zielareal verteilen.

1.5 Venöse Retroinfusion

Die retrograde Infusion von arteriellem Blut in die Koronarvene ist ein klinisch anwendbares Verfahren zur Myokardprotektion bei akuter Ischämie (Boekstegers et al. 1994, 1998). Tierexperimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass dieser Zugang auch zur Applikation viraler und nicht-viraler Genvektoren genutzt werden kann (Boekstegers et al. 2000). Die Reporterexpression ist hierbei deutlich höher als bei antegrader Applikation adenoviraler Vektoren in die Koronararterien.

Ein ähnliches Verfahren wurde für die Gliedmaßen entwickelt („Biersche Sperre“, Wiener Wochenschrift 1993). Sie ist eine klinisch anwendbare Methode zur lokoregionalen Applikation mit hoher Effizienz. Hierbei wird der venöse Abstrom aus der Extremität durch Anlage einer Druckmanschette unterbrochen, und ein Medikament retrograd in eine distal von der Manschette gelegene Vene injiziert. Eine retrograd in die Vene injizierte Substanz verbleibt somit über längere Zeit im Gefäßsystem des Beines bis zur Entfernung der Druckmanschette (bis zu 30 Minuten). Der erhöhte intravenöse Druck führt zu einer begrenzten Extravasation der applizierten Flüssigkeit, wodurch ein zusätzlicher Depoteffekt erzielt wird (Wiener Wochenschrift 1993). Bei dieser Methode konnte bereits eine hohe und effektive Gewebekonzentration für Antibiotika und Anästhetika festgestellt werden, was im Verhältnis zur arteriellen Applikation zu einer 6 bis 7-fach höheren Retention der Medikamente im behandelten Bein führte.

1.5.1 Applikation von FGF-2 und VEGF₁₆₅ durch Retroinfusion in die Beinvene

In der vorliegenden Untersuchung im tierexperimentellen Modell für chronische periphere Ischämie wurden erstmals angiogenetische Wachstumsfaktoren durch Retroinfusion in die Beinvenen appliziert. Die Dosis von FGF-2 und VEGF₁₆₅ wurde entsprechend der von anderen Untersuchern als wirksam und tolerierbar ermittelten Menge gewählt.

2. Materialien und Methoden

2.1 Tierexperimentelles Modell am Kaninchen: chronische Ischämie im Hinterlauf

Das Tierversuchsprotokoll wurde entsprechend den Richtlinien der „Guide for the Care and Use of Laboratory animals“ (US National Institutes of Health: NIH Publication No. 85-23, revised 1985) erstellt und vom bayerischen Tierschutz und -gebrauchs Komitee genehmigt (AZ 211-2531-5899). Die Versuche wurden an 24 männlichen Kaninchen der Rasse „Deutscher Riese“ durchgeführt ($6,5 \pm 0,4$ kg KG). Die Versuche wurden an 24 Tieren durchgeführt, die in 4 Gruppen unterteilt wurden ($n/\text{Gruppe} = 6$). (Kontrollgruppe \triangleq NaCl-Lösung, bFGF-Gruppe \triangleq 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG retr. venös, Kombinationsgruppe \triangleq bFGF 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG plus 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG VEGF retr. venös und bFGF-Gruppe i.m. \triangleq 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG).

Das zugrundeliegende tierexperimentelle Modell zur Induktion einer chronischen Ischämie im Hinterlauf durch Exzision der Arteria femoralis wurde von anderen Untersuchern entwickelt und charakterisiert (Takeshita et al. 1994, Pu et al. 1994). Das Verfahren wurde für die vorliegende Untersuchung modifiziert und im Hause neu etabliert.

Das Versuchsprotokoll ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

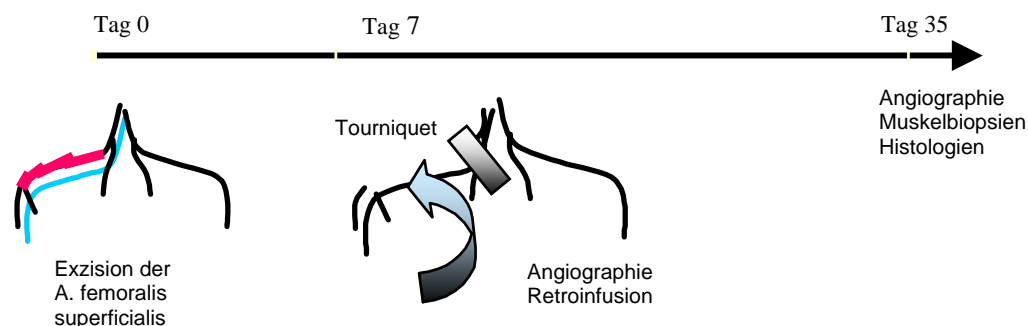


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls

- Tag 0: am ersten Versuchstag erfolgte die Induktion der chronischen Ischämie durch Exzision der distalen A. iliaca externa und der proximalen A. femoralis superficialis.
- Tag 7: sieben Tage später wurde der Baseline-Gefäßstatus erhoben (Cine-Angiographie) und die selektive Retroinfusion der angiogenetischen Wachstumsfaktoren bzw. Kontrollsubstanzen in die V. tibialis vorgenommen.
- Tag 35: nach weiteren 28 Tagen erfolgte die erneute Cine-Angiographie zur Bestimmung der Kollateralen und des Blutflusses sowie die Entnahme von Muskelgewebe zur Messung der Kapillardichte.

2.2 Anästhesie

Die Einleitung der Narkose erfolgte bei allen Eingriffen durch intramuskuläre Injektion von Xylazin 2ml/kg KG (Rompun 2%, Bayer, Leverkusen, Deutschland) und Ketamin 50mg/kg KG (Ketavet 10% Ratiopharm, Ulm, Deutschland). Nach Anlage einer Verweilkanüle in die Ohrvene wurde die Narkose durch kontinuierliche Infusion von Ketavet 10 % und Rompun 2 % aufrechterhalten (4 ml Xylazin [20 mg/ml] und 8 ml Ketamin [50 mg/ml] ad 50 ml NaCl 0,9 % \Rightarrow 20 ml/h \cong 160 mg/h Ketamin + 32 mg/h Xylazin). Die Vitalparameter Herz- und Atemfrequenz wurden während des gesamten Eingriffes engmaschig überwacht.

2.3 Interventionen

2.3.1 Exzision der A. femoralis superficialis (Tag 0)

Nach sorgfältiger Rasur, Reinigung und großflächiger Desinfektion des rechten Beines wurde ein Zugang zur A. femoralis superficialis geschaffen. Hierzu wurde eine Hautinzision im Bereich der Adduktorenloge geführt, beginnend unmittelbar distal des Leistenbandes bis oberhalb des Kniegelenkes. Mittels stumpfer Präparation und unter Blutstillung wurde die A. femoralis superficialis in ihrer gesamten Länge einschließlich aller Aufzweigungen (insbesondere A. epigastrica inferior, A. femoralis profunda, A. circumflexa lateralis sowie A. epigastrica

superficialis) dargestellt. Hierbei wurde speziell auf die Schonung der parallel verlaufenden und stellenweise kreuzenden Strukturen des N. femoralis und der leicht verletzbaren V. femoralis geachtet. Nach Ligatur des proximalen Abganges der A. femoralis superficialis und aller Seitenäste bis zum Übergang in die A. poplitea (Ethicon, Perma-Hand® Seide, 4/0, England) wurde die A. femoralis superficialis vollständig exzidiert (Abbildung 3 und 4). Nach sorgfältiger Blutstillung wurde die Wunde schichtweise verschlossen und die Narkose unter weiterer Beobachtung der Vitalparameter ausgeleitet.

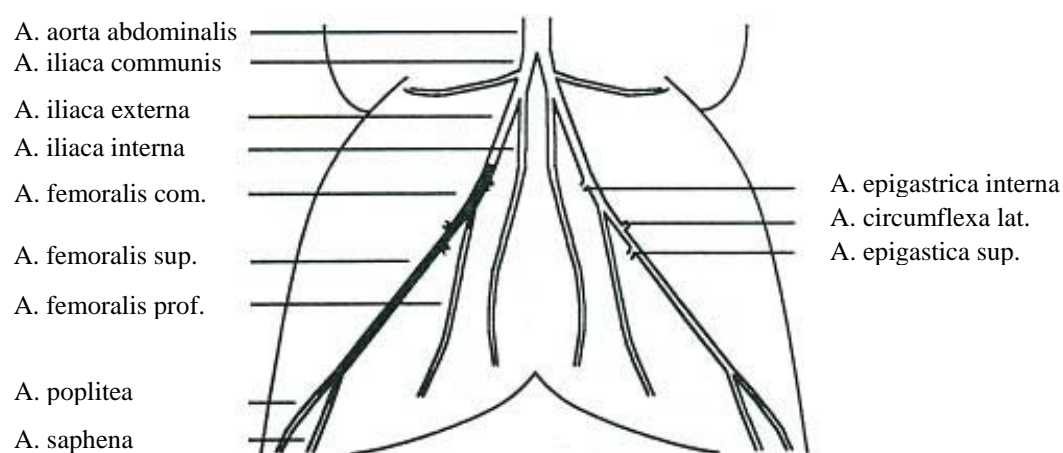


Abbildung 3: Schema zur Lokalisation der Exzision
Schwarz dargestellt der Bereich der entnommenen A. femoralis superficialis

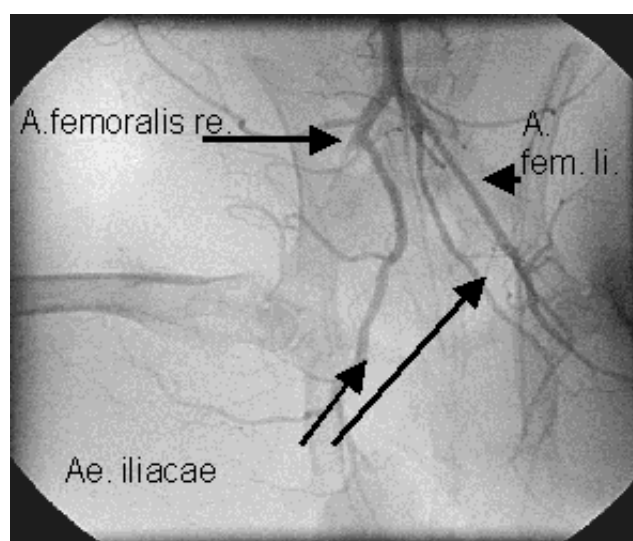


Abbildung 4: Angiographische Darstellung des Gefäßstatus 4 Wochen nach Exzision der A. femoralis superficialis rechts; Gefäßstumpf der A. femoralis superficialis im Bereich des Abgangs aus der A. iliaca externa im Bild links oben

2.3.2 Selektive Retroinfusion der Wachstumsfaktoren in die Vena tibialis anterior (Tag 7)

Narkose und Desinfektion erfolgten wie oben beschrieben. Zur Freilegung der Vena tibialis anterior wurde auf Höhe des Kniegelenks an der Extremitäteninnenseite eine Hautinzision durchgeführt. Es wurde ein zur Platzierung des Retroinfusionskatheters geeigneter Gefäßabschnitt gewählt, wobei insbesondere auf einen geraden Gefäßverlauf ohne Bifurkationen sowie auf die Abwesenheit von Venenklappen geachtet wurde. Die Vene wurde mittels einer speziellen Gefäßschere inzidiert, und ein Katheter (Polythene Tubing, 0,58 mm Innendurchmesser, 0,96 mm Außendurchmesser, SIMS Portex Ltd, New Hemshire, USA) ca. 1 Zentimeter tief in die Vene eingelegt. Zur Vermeidung einer Dislokation während der folgenden Manipulationen wurde der Katheter anschließend mit Fäden doppelt fixiert (Ethicon, Perma-Hand® Seide, 4/0 England). Um das spätere Aufsetzen einer Spritze zu ermöglichen, wurde an der proximalen Seite des Katheters ein standardisierter „Luer“-Anschluss angebracht. Um einen Abstrom der retrograd verabreichten Substanzen in den systemischen Kreislauf zu verhindern, wurde vor Behandlungsbeginn ein Tourniquet auf Höhe des Leistenbandes angebracht. Die vollständige Unterbrechung des arteriellen Zuflusses wurde angiographisch überprüft (aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit wird die Durchführung der Angiographie in 2.4.1 beschrieben). Um intravasal Raum für die retrograd zu infundierenden Lösungen zu schaffen, wurde das nun vom restlichen Kreislauf isolierte Venensystem der Extremität durch manuellen Sog über den liegenden Retroinfusionskatheter entleert. Die korrekte Lage des Retroinfusionskatheters und die erfolgreiche Retroinfusion bis in die Peripherie wurde durch die beiden folgenden Methoden kontrolliert:

- 1) Durch retrograde Kontrastmittelapplikation (Venographie) vor Applikation der Wachstumsfaktoren wurde die vollständige Füllung des venösen Systems überprüft (siehe Abschnitt 2.4.3)
- 2) Zur visuellen Überprüfung der vollständigen Retroinfusion der Beinvenen nach distal (insbesondere der retrograden Überwindung der Venenklappen) wurde eine kleine Hautinzision über einer dorsalen Fußvene durchgeführt. Anschließend wurde physiologische NaCl-Lösung infundiert und ggf. erneut abgesaugt, bis sich diese Vene blutleer und mit kristalloider Flüssigkeit gefüllt darstellte.

Die Retroinfusionsbehandlung wurde über einen Zeitraum von 30 Minuten vorgenommen. Als Trägerlösung wurde heparinisierte physiologische NaCl-Lösung verwendet. Die angiogenetischen Wachstumsfaktoren wurden zuerst in sechs Milliliter Trägerlösung gelöst (Stammlösung). Mit einem manuellen Druck, der ausreichte, um die sich entgegenstellenden Venenklappen zu überwinden, wurde zunächst ein Milliliter der Wachstumsfaktoren verabreicht. Anschließend erfolgte die Spülung mit Trägerlösung zur Verteilung der Wachstumsfaktoren. Durch alternierenden Druck und Sog wurde eine ständige Pendelbewegung der sich in den Gefäßen befindlichen Flüssigkeit induziert. In fünfminütigen Abständen wurde diesem System erneut 1 Milliliter Wachstumsfaktoren zugefügt. Abschließend wurde der Tourniquet gelöst und abgenommen, der Retroinfusionskatheter entfernt und die punktierte Vene ligiert. Die Wunde wurde schichtgerecht verschlossen und verbunden.

2.4 Angiographie

Die Angiographie wurde durchgeführt, um das Kollateralwachstum und die Kontrastmittelflussgeschwindigkeit zu quantifizieren.

2.4.1 Arteriographie

Da sich Arterien von dem sie umgebenden Weichteilgewebe hinsichtlich der Absorption von Röntgenstrahlen nicht nennenswert unterscheiden, ist die intravasale Injektion von positivem (röntgendichtem) oder negativem Kontrastmittel erforderlich (Abrams 1983). Bei der *direkten Angiographie* wird über einen geeigneten Katheter das Kontrastmittel gezielt in das interessierende Gefäß injiziert. In der vorliegenden Untersuchung wurde neben der *antegraden Arteriographie* zur Darstellung der Beinarterien und Kollateralen auch eine *retrograde Venographie* zur Kontrolle der Lage des Retroinfusionskatheters durchgeführt. Bei der Arteriographie sollte eine definierte Kontrastmittelmenge möglichst rasch als Bolus injiziert werden, um eine gleichmäßige maximale Kontrastierung der Arterie zu gewährleisten (Abrams 1983; Wenz 1972). Im Vergleich zur manuellen Injektion wird durch Verwendung elektromotorischer Injektoren ein konstanter Kontrastmittelfluss unabhängig vom Widerstand des verwendeten Katheters und

der Kontrastmittelviskosität erreicht. In der vorliegenden Untersuchung wurde eine maschinelle Injektion auch mit dem Ziel einer maximalen Standardisierung vorgenommen; durch geringst mögliche Variabilität sollte eine bessere Vergleichbarkeit der Kollateralenanzahl und der Kontrastmittel-Fließzeit erreicht werden.

2.4.2 Arteriographie der Becken- und Beinarterien

Eine antegrade Darstellung der Becken- und Beinarterien wurde bei allen Tieren jeweils 7 und 35 Tage nach Induktion der chronischen Ischämie durchgeführt. Durch die Erhebung eines „Baseline“-Status (Tag 7) konnten die zum späteren Zeitpunkt (Tag 35) dargestellten Kollateralen auf diesen Ausgangsbefund „normalisiert“ und die Differenz als Kollateralwachstum gewertet werden.

Unter Narkose wurde nach Rasur und Desinfektion der Hautstelle ein Schnitt lateral des zu tastenden Larynx geführt. Die A. carotis communis wurde über eine Strecke von ca. zwei Zentimetern dargestellt, und von der V. jugularis und dem N. vagus getrennt. Nach Inzision der A. carotis communis wurde der Angiographiekatheter (4F, „Pigtail“ Katheter) zunächst ca. 1 Zentimeter tief im Gefäß platziert und mit einer Fadenschlinge fixiert. Um der Bildung von Blutgerinnseln bei der Katheterisierung der Arterien und Venen vorzubeugen, wurde das Tier nun antikoaguliert (Heparin-Natrium, 900 I.E./kg KG i.v., B. Braun, Melsungen, Deutschland). Unter Röntgenkontrolle wurde anschließend ein Führungsdraht (Rodrunner extra support RSTF-14-180) von der A. carotis communis über den Truncus brachiocephalicus und die Aorta descendens in die Aorta abdominalis bis unmittelbar proximal der Bifurkation in die Ae. iliacae communes vorgeschoben. Über diesen Führungsdraht konnte nun der Katheter in der Aorta abdominalis positioniert werden. Der Führungsdraht wurde entfernt, die korrekte Lage des Katheters angiographisch überprüft und ggf. korrigiert.

Die regionale Durchblutung der Skelettmuskulatur wird über einen weiten Bereich reguliert. Der Skelettmuskel ist in Ruhe mit $2 - 4 \text{ ml} \times \text{min}^{-1} \times 100\text{g}^{-1}$ sehr schwach durchblutet. Bei Leistung kann die spezifische Durchblutung um den Faktor 30 ansteigen auf $50 \text{ ml} \times \text{min}^{-1} \times 100\text{g}^{-1}$ (Golenhofen, Physiologie heute, Urban & Fischer, 1997).

Beim schlafenden bzw. narkotisierten Tier ist demgegenüber die Durchblutung im Vergleich zum ruhenden, jedoch wachen Tier nochmals deutlich reduziert (Physiologie des Menschen, Schmid-Thews, 1995, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg).

Bei der Bestimmung des Blutflusses eines Beines besteht daher eine besondere Schwierigkeit darin, dass die am narkotisierten Tier durchgeführten Messungen repräsentativ für die physiologisch relevante Durchblutung beim wachen und aktiven Tier sein müssen.

Im Falle der chronischen Ischämie kann es bedeuten, dass die im narkotisierten Zustand gemessene Durchblutung des operierten Hinterlaufs noch „normal“ erscheinen kann (d.h. im Vergleich zur anderen „gesunden“ Extremität ähnlich ist), jedoch im wachen Zustand diese Durchblutung viel zu gering ist. Ein realistischerer Einblick in die Situation beim wachen oder belasteten Tier kann durch Vasodilatation ermöglicht werden, welche eine kritisch eingeschränkte Flussreserve demaskieren kann. Daher wurden in der vorliegenden Untersuchung alle Angiographien im Zustand der maximalen Vasodilatation durchgeführt. Hierzu wurde zwei Minuten vor Injektion des Kontrastmittels Nitroprussidnatrium (Nipruss, Schwarz-Pharma, Monheim, Deutschland) (40 µg/kg Körpergewicht) im Bolus über den Angiographiekatheter verabreicht (Takeshita et al. 1994, Baffour 1992). Die hierdurch induzierte Vasodilatation ermöglichte es, das jeweilige Maximallumen des zu analysierenden Gefäßes zu bestimmen und den größtmöglichen Fluss zu ermitteln.

Nach Füllung des Katheters mit Kontrastmittel wurde mittels Injektor eine Kontrastmittelmenge von acht Millilitern mit einer Geschwindigkeit von vier ml/s appliziert. Der Angiographiefilm wurde mit einer Geschwindigkeit von 25 Frames/s erstellt (Katheteranlage: Siemens, Minga, Deutschland). Es wurden jeweils zwei Bildsequenzen von jedem Bein angefertigt. Es musste auf die Abbildung des gesamten Bereiches zwischen der Aortenbifurkation und der A. poplitea geachtet werden, da diese beiden Aufzweigungen als proximale und distale Referenzpunkte für die spätere Auswertung benötigt wurden (angiographische Kontrolle vor Anfertigung der eigentlichen Cine-Sequenz).

Abschließend wurde der Katheter entfernt und die A. carotis communis ligiert. Die Wunde wurde verschlossen und verbunden. Bei der zweiten Angiographie am terminalen Versuchstag (Tag 35) wurde der Zugang über die kontralaterale A. carotis communis gewählt.

2.4.3 Retrograde Venographie

Wie in Abschnitt 2.4.1 erwähnt, wurde die korrekte Lage des Retroinfusionskatheters und die erfolgreiche Verteilung des Retroinfusates bis in die distalen Gefäßabschnitte durch eine Venographie überprüft. Hierzu wurde nach Platzierung des Retroinfusionskatheters sowie nach Anlage des Tourniquets und Entleerung der Venen Kontrastmittel manuell mit ca. 120 mmHg Druck injiziert. Eine angiographische Darstellung der Retroinfusion von Kontrastmittel ist in Abbildung 5 dargestellt: eine vollständige Füllung des venösen Systems auch entgegen der Venenklappen konnte dokumentiert werden.

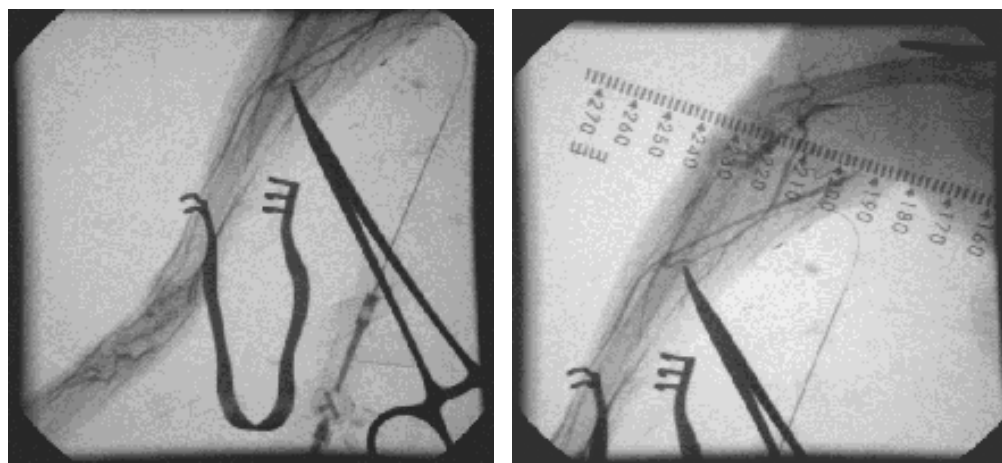


Abbildung 5: Angiographische Darstellung bei Retroinfusion

2.4.4 Technetium Szintigraphie

Um die Verteilung der infundierten Substanzen im ischämischen Areal zu überprüfen, wurde ein Vergleich zwischen der arteriellen Applikation ohne arteriell-venöse Stauung und der retrograd venösen Verabreichung mit arteriell-venöser Stauung durchgeführt.

Bei zwei Kaninchen wurden sieben Tage nach erfolgter Exzision der A. femoralis superficialis die szintigraphische Retention und die räumliche Verteilung einer definierten Menge eines radioaktiv markierten Isotops, ^{99m}Tc Nano-Kolloids aufgezeigt. Das Nanokolloid verhält sich hierbei wie Albumin: physiologischerweise intravasal kann es bei Ischämie und Angiogenese auch extravasieren. Die Tracersubstanz wurde wie die Wachstumsfaktoren über einen

speziell angelegten Katheter verabreicht. Die Versuchsbedingungen entsprachen dabei denen der retrograden Applikation (2.3.2).

1. Kaninchen:

Szintigraphische Untersuchung zur arteriellen Applikation ohne arteriell-venöse Stauung

Nach Positionierung eines Angiographiekatheters in der A. iliaca communis nach oben beschriebener Technik und Exzision der A. femoralis superficialis im Sinne der Retroinfusion wurden an einem nuklearmedizinischen Arbeitsplatz zwei Milliliter einer ^{99m}Tc Nano-Kolloid-Lösung (7,5 MBq) kontinuierlich (4ml/h) antegrad arteriell über einen sieben F Katheter infundiert. Dabei wurde die Infusion über einen Zeitraum von 30 Minuten angelegt. Mit Hilfe einer Gammakamera¹ wurden Aufnahmen in 10 Minuten-Abständen angefertigt.

2. Kaninchen:

Szintigraphische Untersuchung zur retrograd venösen Applikation mit arteriell-venöser Stauung

Dieselbe Menge der ^{99m}Tc Nano-Kolloid-Lösung wurde einem anderen Kaninchen, welches ebenfalls im Sinne der Exzision der A. femoralis superficialis vorbehandelt wurde, als venöser Bolus retrograd verabreicht. Davor wurde der Hinterlauf auf Höhe des Leistenbandes mit Hilfe eines Tourniquets für einen Zeitraum von 30 Minuten arteriell gestaut und somit weitestgehend vom Restblutkreislauf abgetrennt (1.5).

Beide Kaninchen wurden dabei in Bauchlage mit einer Gammakamera gefilmt und die erhaltenen Bilder in Intervallen von 10 Minuten gespeichert. Die Verteilung und die Dynamik der Radioaktivität wurden am ischämischen Bein und normalisiert auf den gesamten Körper gemessen.

¹ Die Gammakamera ist eine bildgebende Apparatur, die im Gegensatz zum Scanner keine punktweise zeitliche aufeinanderfolgende, sondern mit stationären Detektoren eine simultane Messung des gesamten Untersuchungsfeldes und eine ebenso simultane Bilddarstellung der Aktivitätsverteilung ermöglicht. Mit bis zu 100 Bildern pro Sekunde können die Funktionsvorgänge dargestellt werden. Auf diese Weise ist es möglich die Raumverteilung und zeitliche Abfolge des Verweilmusters der applizierten Substanzen mit Hilfe der Gammakamera zu verfolgen.

2.5 Messparameter

2.5.1 Bestimmung der Kollateralen

Beim Kollateralwachstum handelt es sich um einen essentiellen Adaptationsvorgang zur Wiederherstellung der Durchblutung einer ischämischen Extremität (Schaper 1999). Kollateralen sind als kleine Gefäße angelegt, die im Falle einer Stenose der Hauptarterie vermehrtem „Shear-Stress“ (Scheerkraft) ausgesetzt sind. Hierdurch kommt es zur Vergrößerung des Gefäßdurchmessers durch positives Remodeling (Arteriogenese).

Mit Hilfe der Angiographie ist es möglich, Gefäße oberhalb eines Durchmessers von ca. 100 μm darzustellen.

Die größeren Gefäße haben nach dem Hagen-Poiseuille-Gesetz² einen um ein Vielfaches reduzierten Widerstand. Bei der Angiographie kann also gemessen werden, wie viele Kollateralen durch Kaliberwachstum den angiographisch kritisch darzustellenden Durchmesser überschreiten.

Um ein objektivierbares Maß für die Anzahl der angiographisch sichtbaren Kollateralen zu erhalten, wurde aus der Cine-Angiographiesequenz das Standbild ausgewählt, in dem die Kollateralen von proximal nach distal am stärksten kontrastiert waren. Über den mittleren Oberschenkelabschnitt in diesem Bild wurde ein standardisiertes Gitterraster gelegt (Murohara et al. 1998). Die „area of interest“ im Oberschenkelbereich wurde folgendermaßen definiert: kaudal des Femurs zwischen (medial) der A. iliaca interna und (lateral) der Patella. Es wurden alle Schnittstellen zwischen einem Gefäß und einer Gitternetzlinie ausgezählt, und der Kollateralscore aus der Anzahl der Schnittstellen geteilt durch die Gesamtzahl der Kästchen ermittelt (Abbildung 6) (Takeshita et al. 1994, Baffour 1992). Der 35 Tage nach dem Eingriff erhobene Kollateralscore wurde auf den Baseline-Wert

² Hagen-Poiseuille-Gesetz:

Mit Hilfe des Newton-Reibungsgesetzes läßt sich für eine laminäre und stationäre Strömung in einem starren zylindrischen Rohr eine Beziehung zwischen Stromstärke und den sie bestimmenden Parametern herleiten.

(Hagen-Poiseuille-Gesetz): $I = r_i^4 \pi \Delta P / 8 \eta l$, hierbei sind ΔP die Druckdifferenz, η die Viskosität der Flüssigkeit, r_i der Innenradius und l die Länge des Rohres. Unter Heranziehung des Ohm-Gesetzes läßt sich hieraus die Stromstärke bestimmen. $R = 8 \eta l / r_i^4 \pi$: die Stromstärke und der Strömungswiderstand ändern sich demnach direkt bzw. umgekehrt proportional zur vierten Potenz des Gefäßradius (Physiologie des Menschen, Schmidt-Thews, 1995, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg).

am Tag 7 normalisiert, und als Kollateralwachstum angegeben [% der Baseline] (Asahara et al. 1995). Die vollständige Auswertung erfolgte doppelblind durch zwei unabhängige Untersucher.

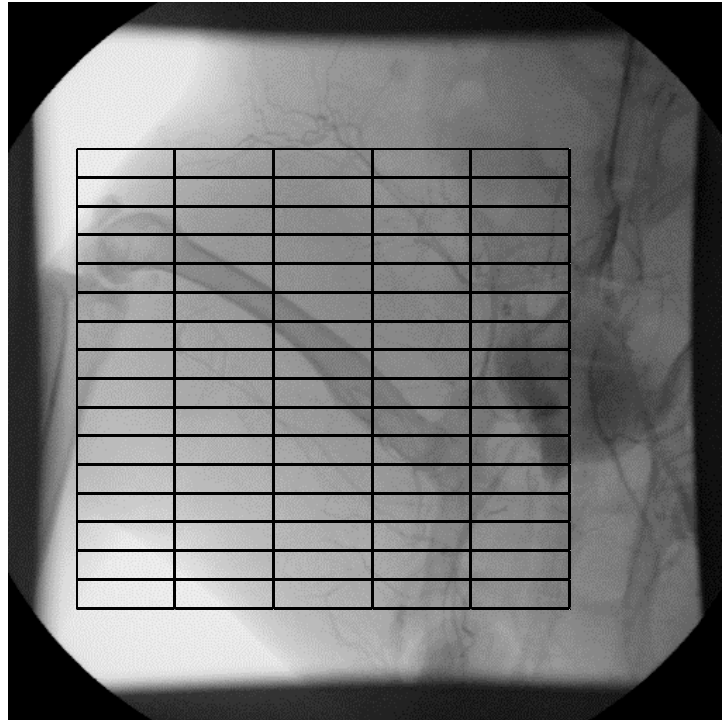


Abbildung 6: Raster zur Kollateralbestimmung

2.5.2 Cinedensitometrie und TIMI Frame Count

Die radiologisch gestützte Methode basiert auf dem Prinzip, dass die Durchgangszeit eines Kontrastmittels zwischen einem proximalen und einem distalen Referenzpunkt umgekehrt mit der Flussgeschwindigkeit des Blutes korreliert (Rutishauser et al. 1967).

Eine genaue Messung dieser konnte sowohl peripher als auch koronar nachgewiesen werden. Rutishauser stellte bereits 1967 mit der Röntgen Cinedensitometrie ein Verfahren vor, mit dem der Blutfluss *in vitro* und an Koronararterien von Hunden gemessen wurde. Er stellte diese Methode auch der volumetrischen Messung gegenüber. Die Cineangiographischen Filme wurden auf einen matten Bildschirm projiziert und die Lichtintensität an den Kreuzungsstellen von zwei benachbarten Gefäßen gemessen. Die Kontrastmittelpassage des Gefäßes erbrachte zwei Indikatorcurven, anhand welcher die Differenz der mittleren Durchgangszeit bestimmt wurde. Die Entfernung zwischen den Kreuzungsstellen und der Durchmesser der Gefäße wurden mit Hilfe von Röntgen-Dichte-Skalen gemessen. Der Fluss durch das Gefäß wurde als Produkt der Strecke mit der Durchschnittsgeschwindigkeit berechnet.

Die TIMI (Thrombolysis in Myocardial Infarction) frame Zählung wurde als eine quantitative Methode zur Bestimmung des koronaren arteriellen Blutflusses validiert (Gibson et al. 1996).

Bei der TIMI frame count Methode wird die Anzahl der Bilder, die für ein verabreichtes Kontrastmittel zum Erreichen eines vorher definierten Orientierungspunktes notwendig ist, bestimmt. Die Zählung der Bilder nach Berücksichtigung der Länge der einzelnen Gefäße wird als CTFC (corrected TIMI frame count) bezeichnet. Es wurde die Anzahl der Bilder vom ersten bis zum letzten Bild gezählt, bei welchem das Kontrastmittel einen definierten Punkt erreicht hat.

In der vorliegenden Arbeit wurde die filmische Angiographie wie beschrieben angewandt. Die Referenzpunkte wurden proximal als Abgang der A. iliaca interna und distal als Ursprung der A. poplitea definiert (Abbildung 7). Dieses Gebiet wird nach Ischämieinduktion durch operative Entfernung der A. femoralis durch

Kollateralen überbrückt, die vornehmlich aus der A. iliaca interna entspringen (Morishita et al. 1999).

Die Anzahl der Bilder, die das Kontrastmittel benötigte, um die beiden Orientierungspunkte zu passieren, wurde von 2 geblindeten Untersuchern bestimmt (Dicom Viewer, Rubo Medical Imaging BV, Ravelingsteeg 10, 2011 EL Haarlem, Niederlande). Zusätzlich wurde dieser Wert in 4 Versuchen mit Grauwertbestimmung am Computer bestimmt (Photoshop 6.0, Adobe). Hierzu wurden an den Orientierungspunkten drei Messpunkte angelegt, an welchen die Graustufen abgelesen werden konnten. Als erstes zu wertendes Bild wurde hier die Intensitätszunahme des Grauwertes herangezogen. Ebenso wurde am Endpunkt verfahren. Die visuell ermittelten Daten wurden anschließend mit den durch den Computer errechneten Werten verglichen.

Der Blutfluss (Q_D) wurde als $Q_D = (\pi d^2 / 4) (x / \text{Durchgangszeit})$ berechnet, wobei x der Distanz zwischen den Referenzpunkten entsprach.

Diese Methode wurde mit den bereits bekannten Messmethoden der Dopplerflussmessung verglichen und in Relation gebracht.

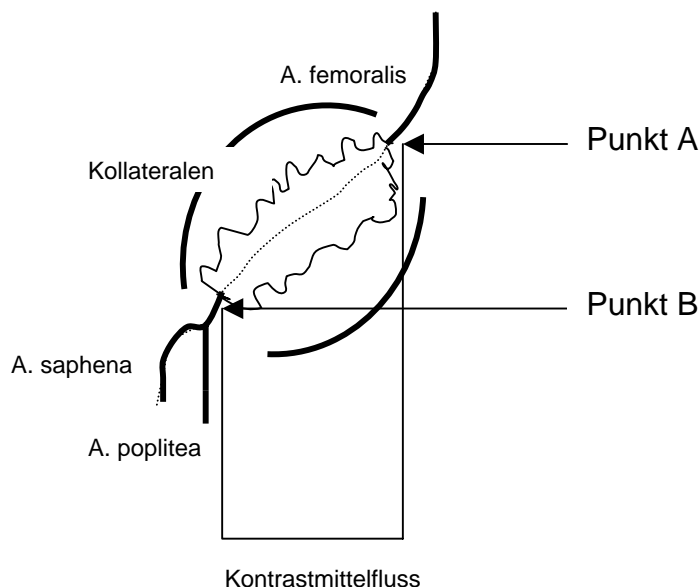


Abbildung 7: Schema zur Kollateralisierung

Zur Beurteilung des Kontrastmittelflusses wird die Geschwindigkeit des Kontrastmittels zwischen den beiden Bezugspunkten A und B anhand der Anzahl der benötigten Filmbilder ermittelt.

2.5.3 Doppler-Fluss-Messung

Zur Validierung der Cinemethode wurde die Dopplerflussmessung verwendet. Hierbei handelt es sich um eine invasive Methode, die zur Bestimmung des Kollateralflusses validiert wurde (Müller M et al. 1995).

Bei der Dopplermethode macht man sich die Frequenzverschiebung, die durch Reflexion von Schallwellen an sich bewegenden Zellen und Blutbestandteilen entsteht zu Nutze. Hierdurch kann die Blutflussgeschwindigkeit ermittelt werden (Kauffmann, Röntgenfibel, Springer 2001). Als Messpunkt wurde in diesem Fall die A. iliaca interna gewählt, da hier wie beschrieben die Hauptversorgung der hinteren Extremität über Kollateralen bei Ischämie ausgeht.

Es wurde ein für die klinische Anwendung entwickeltes Doppler-System verwendet (FloWire/FloMap-System, Cardiometrics, Inc. 645 Clyde Avenue Mountain View, California USA). Die wie ein herkömmlicher Führungsdraht dimensionierte Sonde (0,46 mm = 0,0014") enthält an der röntgendichten Spitze ein pw-System (pulse and wave-System) mit einer Arbeitsfrequenz von 12 MHz.

Der Transducer bildet ein antegrades Schallbündel mit einer Aufweitung von 30 Grad, wobei die Messvolumen-Position fünf Millimeter vor der Sondenspitze liegt. Es wird ein Messvolumen in der Umgebung von einem Millimeter erfasst.

Die Strömungsverhältnisse werden von diesen intravaskulären Miniatursonden aufgrund ihrer Größe und Geometrie nicht signifikant verändert, solange die Gefäßweite nicht auf die Größenordnung des Sondendurchmessers reduziert ist.

Bei drei Tieren jeder Gruppe wurde sieben Tage nach Exzision der A. femoralis superficialis ein 3F Führungskatheter in die A. iliaca communis platziert. Über diesen wurde der Dopplerdraht in das proximale Segment der A. iliaca interna positioniert. Die Lage der Drahtspitze wurde angiographisch dokumentiert, um dieselbe Stelle bei der erneuten Messung 35 Tage nach der initialen Operation wiederfinden zu können. Hierdurch konnte die Zunahme der Flussgeschwindigkeit zwischen der Baseline-Untersuchung (Tag 7) und der letzten Untersuchung (Tag 35) ermittelt werden.

Es wurde die sogenannte Durchschnittsspitzen geschwindigkeit (APV: average peak velocity) für die Auswertung herangezogen. Nach der Bestimmung der basalen APV wurde durch intraarterielle Verabreichung von Nitroprussidnatrium

1,5 microgramm/min/kg KG (Nipruss, Schwarz-Pharma, Monheim, Deutschland) über zwei Minuten die maximale APV ermittelt.

Der Gefäßdurchmesser der *A. iliaca interna* wurde unter Verwendung eines automatischen Randerkennungssystems bestimmt (Ku et al. 1993).

Der Fluss wurde als $Q_D = (\pi d^2 / 4) (0,5 \times APV)$ berechnet, hierbei entspricht Q_D dem vom Doppler abgeleiteten gemittelten Fluss und d dem Gefäßdurchmesser (Tsurumi et al. 1997).

2.5.4 Bestimmung der Kapillardichte

Der angiogenetische Effekt der Retroinfusion von Wachstumsfaktoren wurde durch histologische Bestimmung der Kapillardichte im Skelettmuskel des Ober- und Unterschenkels ermittelt. Nach Tötung des Tieres (Tag 35) wurden beiderseits Gewebeproben von Muskeln des Oberschenkels (*M. vastus intermedius*, *M. adductor magnus*) und des Unterschenkels (*M. fibularis*, *M. gastrocnemius* und *M. tibialis anterior*) entnommen, sofort in flüchtigem Methylbutan gefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80° Celsius gelagert. Von jeder Probe wurden transversal zur Muskelfaserrichtung sechs Schnitte mit einer Dicke von $5 \mu\text{m}$ mit Hilfe eines Microtoms angefertigt (Leica CM 3050, Solms, Deutschland) und auf einen Objektträger aufgebracht (Superfrost, Firma Menzel, Braunschweig, Deutschland).

Zur Färbung der Kapillaren wurde die Methode mittels alkalischer Phosphatase verwendet (Ziada et al. 1984). Das Enzym alkalische Phosphatase ist vorwiegend an der Zellmembran von Endothelzellen, Arteriolen und arteriellen Kapillarabschnitten lokalisiert. Es katalysiert die hydrolytische Spaltung von Estern der Orthophosphorsäure mit Alkoholen oder Phenolen bei stark alkalischem pH-Optimum (pH 9,2 bis 9,8).

2.5.5 Färbemethode mit alkalischer Phosphatase

Es erfolgt zunächst die Inkubation der Schnitte über 60 Minuten bei 37° Celsius mit 30 mg Nitroblue-Tetrazolium (SIGMA) und 6 mg 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat p-Toluidine Salz (SIGMA) aufgelöst in 30 ml Puffer (pH 9,2 bis 9,4) enthaltend:

6,9 mmol/l MgSO_4 (MERCK), FW 120,4 --- 0,083g MgSO_4 auf 100 ml Bidest, 27,5 mmol/l NaBo_2 (MERCK) FW 381,4 --- 1,05 g auf 100 ml Bidest.

Daraufhin ist eine Spülung mit H_2O erforderlich. Es erfolgt die Fixierung über fünf Minuten in Formalin (4% Formaldehyd, pH 7,3) (Ziada et al. 1984). Die Muskelfasern werden dann mit 0,5 % Eosin über 30 Sekunden gegengefärbt. Nun folgt eine Spülung mit einer aufsteigenden Alkohohlreihe 50%, 70% und 100% Alkohol. Zum Abschluss schließt sich die Einbettung mit dem Klebstoff Entellan an.

Durch die Färbung stellen sich die Kapillaren blau und die Muskelfasern hellrot dar. Es wurden nach standardisiertem Protokoll jeweils 10 verschiedene Areale pro Objekt zufällig ausgewählt und analysiert (12-fache Vergrößerung, Zeiss, Deutschland). Die Kapillardichte wurde dann durch zwei geblindete Untersucher beurteilt und als ein Verhältnis von Kapillare zu Muskelfaser angegeben.

2.6 Statistik

Unterschiede zwischen den behandelten Gruppen im Hinblick auf die Kapillardichte, die Kollateralanzahl und den Blutfluss wurden durch Varianzanalyse (ANOVA) und Student Newman Keuls Test verglichen (SPSS Inc. Headquarters, 233 S. Wacker Drive, Chicago, Illinois). Als signifikant wurde $p < 0,05$ gewertet. Soweit nicht anders vermerkt, werden die Daten als Durchschnitt \pm SEM angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Technetium Szintigraphie: Retention der ^{99m}Tc -Kolloide im ischämischen Hinterlauf

Die szintigraphischen Untersuchungen ergaben eine erhöhte Anreicherung des radioaktiven Tracers im Zielareal nach Retroinfusion im Vergleich zur antegraden Infusion. Die Applikation des Tracers wurde bei beiden Versuchstieren sieben Tage nach chirurgischer Exzision der A. femoralis superficialis vorgenommen.

3.1.1 Selektive retrograde Applikation mit proximaler Stauung

Die retrograde Bolusgabe von zwei Milliliter einer ^{99m}Tc Nano-Kolloid-Lösung bei 30 minütigem proximalem Verschluss der behandelten Extremität nach vorbeschriebener Behandlung führte zu einer lokalen Konzentration von 70 % der registrierten Aktivität im Areal des ischämischen Hinterlaufs bezogen auf die am gesamten Kaninchen registrierte Aktivität. Die Aktivität war hier homogen über das gesamte Gebiet distal des Tourniquets verteilt. Der Anteil der Radioaktivität verblieb während der gesamten Beobachtung von zunächst 30 Minuten bis zur Entfernung der Blutsperre äußerst konstant. Die Aktivität nahm dann nach Entfernung des Tourniquets im Zeitraum von weiteren 30 Minuten linear ab (Abbildung 8).

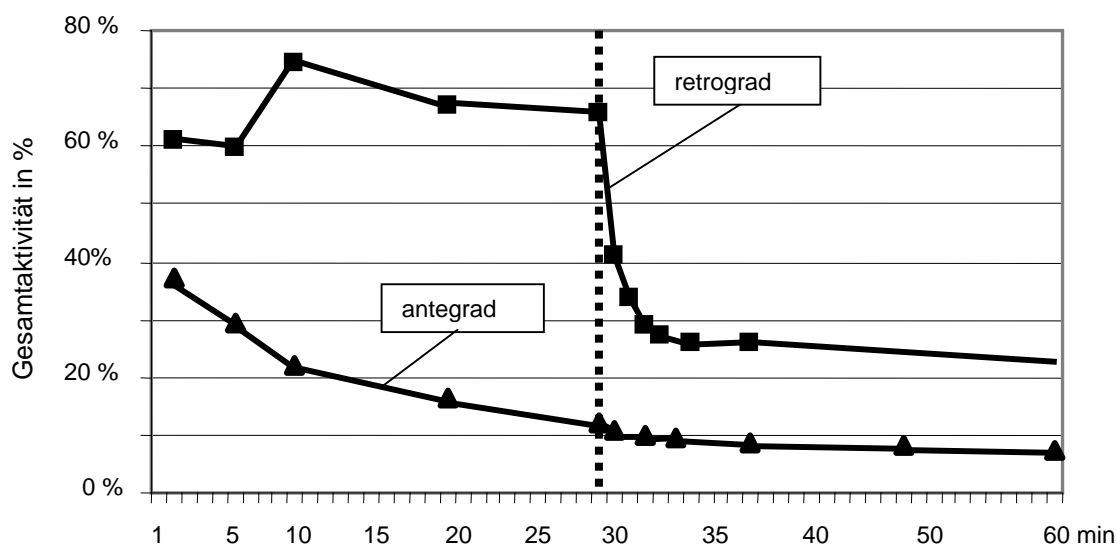


Abbildung 8: Vergleich der venösen Retroinfusion einer ^{99m}Tc Nano-Kolloid-Lösung bei unterbrochenen Flussbedingungen über einen Zeitraum von 60 Minuten mit der antegraden arteriellen Gabe von ^{99m}Tc NanoKolloid-Lösung ohne Unterbrechung des Blutflusses in Bezug auf die Gesamtaktivität in %. ■ entspricht der gemessenen Aktivität bei der retrograd venösen Applikation. ▶ entspricht der gemessenen Aktivität bei der intraarteriellen Verabreichung.

3.1.2 Arterielle Applikation ohne proximale Stauung

Im Gegensatz zur retrograd venösen Applikation der ^{99m}Tc Nano-Kolloid-Lösung zeigte sich bei der kontinuierlichen 30 minütigen arteriellen Infusion derselben Menge des radioaktiv markierten Tracers eine wesentlich niedrigere Retention der Nanokolloide im ischämischen Hinterlauf.

Die Retention entsprach dabei anfänglich einer Konzentration von 30 % der Gesamtaktivität. Am Ende der 30 minütigen Infusionszeit fiel die Retention dann bis auf einen Wert von 12 %, bezogen auf die registrierte Gesamtaktivität, ab.

Die Radioaktivität zeigte sich zudem weitgehend auf den proximalen Teil des Oberschenkels konzentriert. Die Aktivität im chirurgisch induzierten ischämischen Areal war nicht größer als auf der nicht im therapeutischen Zielgebiet liegenden gegenüberliegenden Extremitätenseite (Abbildung 9 und 10).

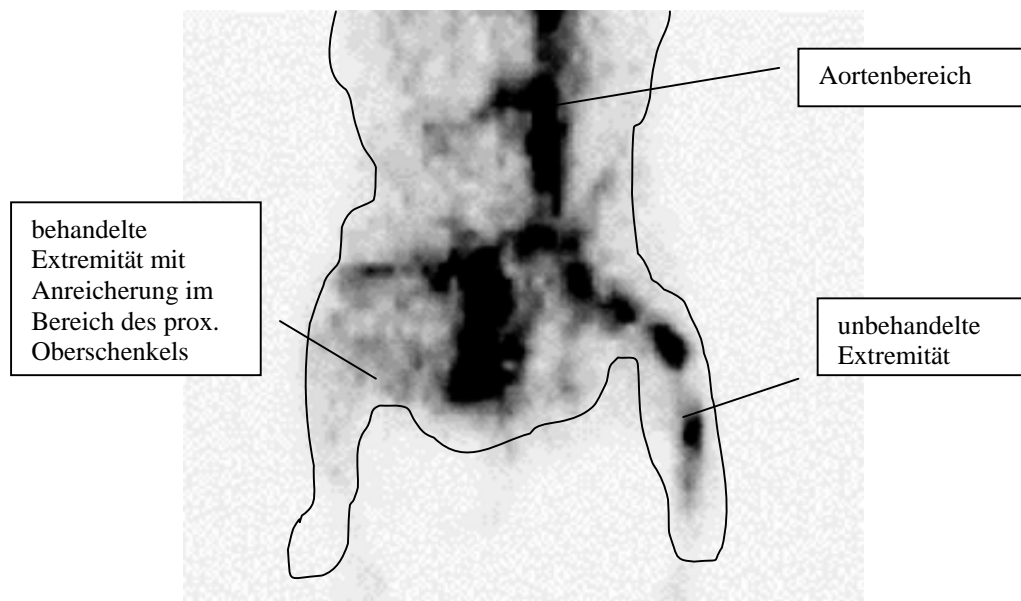


Abbildung 9: Antegrade Applikation von ^{99m}Tc Nano-Kolloid-Lösung. Zur Darstellung kommt ein schematisches Bild der Aktivitätsanreicherung in der unteren Körperhälfte bei intraarterieller Applikation.

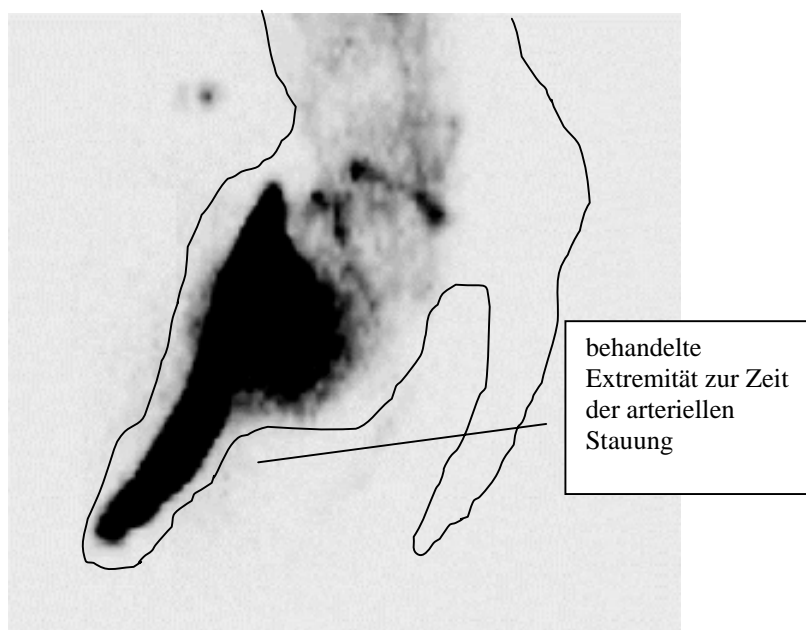


Abbildung 10: Retrograde Applikation von ^{99m}Tc Nano-Kolloid-Lösung. Dargestellt wird hier ein schematisches Bild zur Aktivitätsanreicherung in der unteren Körperhälfte bei retrograd venöser Applikation.

3.2 Kollateralwerte

Die Gesamtanzahl der angiographisch sichtbaren Kollateralen, die das überprojizierte Bezugsgitter kreuzten, wurde als Bezugsgröße definiert.

Der Vergleich der Kollateralwerte 35 Tage nach der Exzision der A. femoralis superficialis mit den Ausgangswerten am Tag 7 (34 ± 5 verglichen zu 30 ± 3 , 107 ± 7 %) ließ bei der Kontrollgruppe keinen signifikanten Anstieg der Kollateralenanzahl verzeichnen.

Im Gegensatz dazu zeigten sich am Tag 35 nach Retroinfusion von FGF-2 signifikant mehr Kollateralen im Vergleich zur Kontrollgruppe (161 ± 29 % zur Baseline, $p < 0,05$). Die Kollateralen wiesen dabei das typische korkenzieherartige Erscheinungsbild auf (Abbildung 12).

Die retrograd applizierte Kombination von FGF-2 und VEGF₁₆₅ induzierte keine signifikante Erhöhung der Kollateralzahlen im Vergleich zur alleinigen Gabe von FGF-2 (172 ± 26 %, $p < 0,05$). Der Anstieg des Kollateralwachstums nach intramuskulärer Verabreichung war mit dem der alleinigen retrograden FGF-2 Applikation vergleichbar (142 ± 14 %, $p < 0,05$). (Abbildung 11)

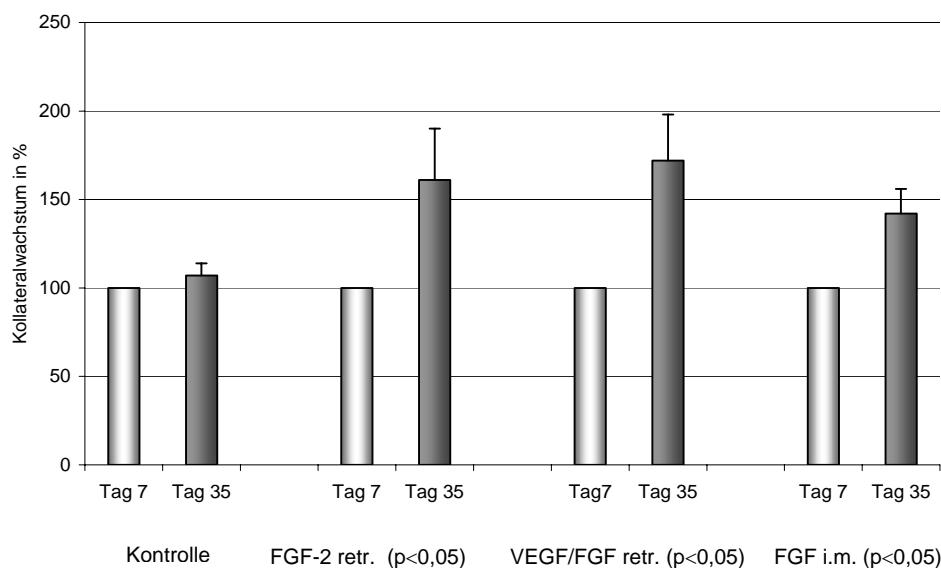


Abbildung 11: Kollateralwerte (Zunahme in %)

Dargestellt wird das Kollateralwachstum in der Kontrollgruppe, der retr. FGF-2 Gruppe, der retr. FGF-2/VEGF₁₆₅ Gruppe und der i.m. FGF-2 Gruppe.

Bereits bestehende Kollateralen am Tag 7 werden als 100 % definiert und daraus der prozentuale Anstieg für das Kollateralwachstum in jeder Gruppe bestimmt. Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg im Kollateralwachstum nach der Retroinfusion von FGF-2 (161 ± 29 %) sowie für die gemeinsame Retroinfusion von FGF-2/VEGF₁₆₅ (172 ± 26 %) und die FGF-2 i.m. Gruppe (142 ± 14 %), wohingegen nur ein geringer Anstieg in der Kontrollgruppe (107 ± 7 %) zu verzeichnen war.

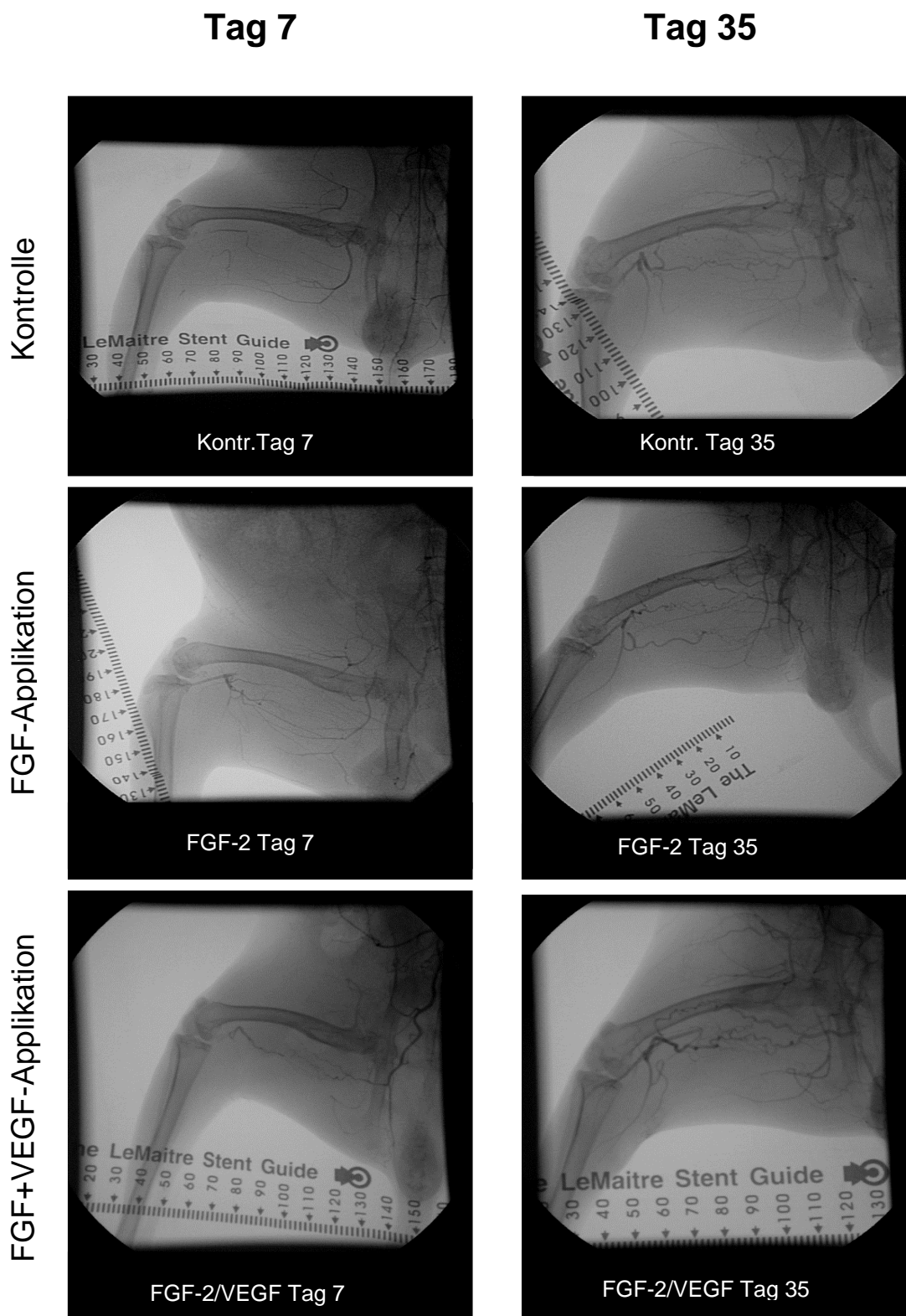


Abbildung 12: Angiographien am Tag 7 und 35 für die Kontrollgruppe, die retr. FGF-2 Gruppe und die retr. FGF-2 plus VEGF Gruppe mit deutlich sichtbaren Unterschieden in der Darstellung wie auch der Anzahl der Kollateralen.

3.3 Kapillardichte

Die Kapillardichte wurde lichtmikroskopisch ermittelt. Ein signifikanter Unterschied der Kapillardichte (Verhältnis: Kapillare/Muskel) im Bereich des Oberschenkels zwischen der Kontrollgruppe ($0,63 \pm 0,09$) und den behandelten Gruppen in der FGF-2-Gruppe ($0,78 \pm 0,07$) und bei der FGF-2+ VEGF₁₆₅-Gruppe ($0,69 \pm 0,07$), ließ sich nicht finden (Abbildung 13).

Im Gegensatz dazu war die Kapillardichte bei den Untersuchungen im Bereich der Unterschenkel höher.

	Kontrolle	FGF-2	VEGF₁₆₅+FGF-2	
<i>M. adductor</i> (Abb. 14)	0,63 ± 0,09	0,78 ± 0,07	0,69 ± 0,07	p = nicht sign. geg. Kontrolle
<i>M. gastrocnemius</i> (Abb. 15)	0,87 ± 0,40	1,62 ± 0,21	1,70 ± 0,40	p < 0,5 geg. Kontrolle
<i>M. tibialis anterior</i> (Abb. 16)	1,14 ± 0,22	1,85 ± 0,29	2,15 ± 0,29	p < 0,5 geg. Kontrolle
<i>M. fibularis</i> (Abb. 17)	1,23 ± 0,02	2,32 ± 0,48	2,50 ± 0,29	p < 0,5 geg. Kontrolle

Abbildung 13: Kapillardichte

Kapillarsprossung am ischämischen Hinterlauf nach Behandlung mit FGF-2 oder FGF-2 mit VEGF₁₆₅. *M. adductor* als Repräsentant der Oberschenkelmuskulatur.

Es zeichnete sich ein Trend in Richtung höherer Kapillardichte im Unterschenkel bei den Tieren ab, die mit FGF-2 und VEGF₁₆₅ gemeinsam behandelt wurden im Vergleich zu denen, die nur FGF-2 erhielten. Dieser Unterschied erreichte aber keine statistische Signifikanz.

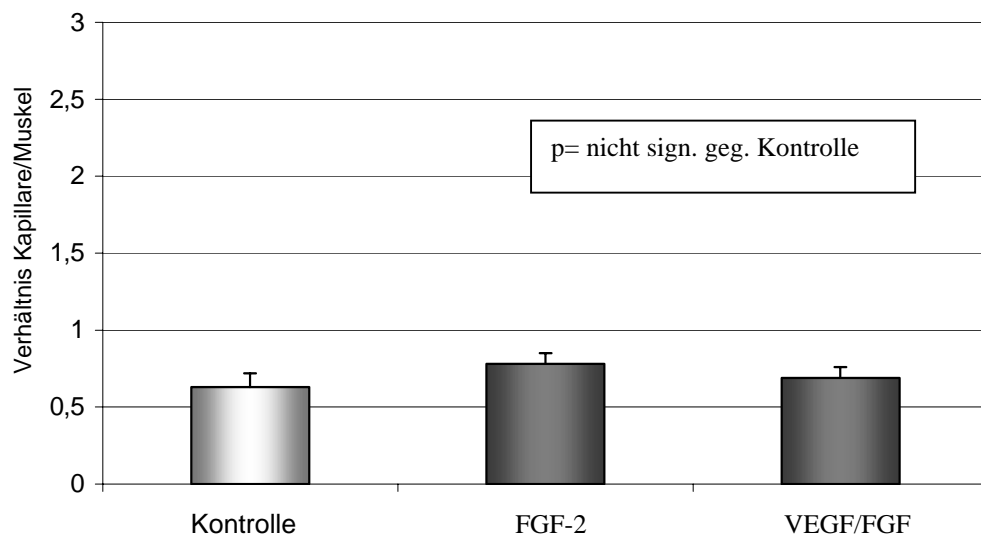


Abbildung 14: Kapillardichte des M. adductor als Vertreter für die Oberschenkelmuskulatur. Verhältnis Kapillare zu Muskel. Kontrolle ($0,63 \pm 0,09$), FGF-2 ($0,78 \pm 0,07$) und VEGF₁₆₅+FGF-2 ($0,69 \pm 0,07$). p ist hierbei nicht signifikant gegen Kontrolle.

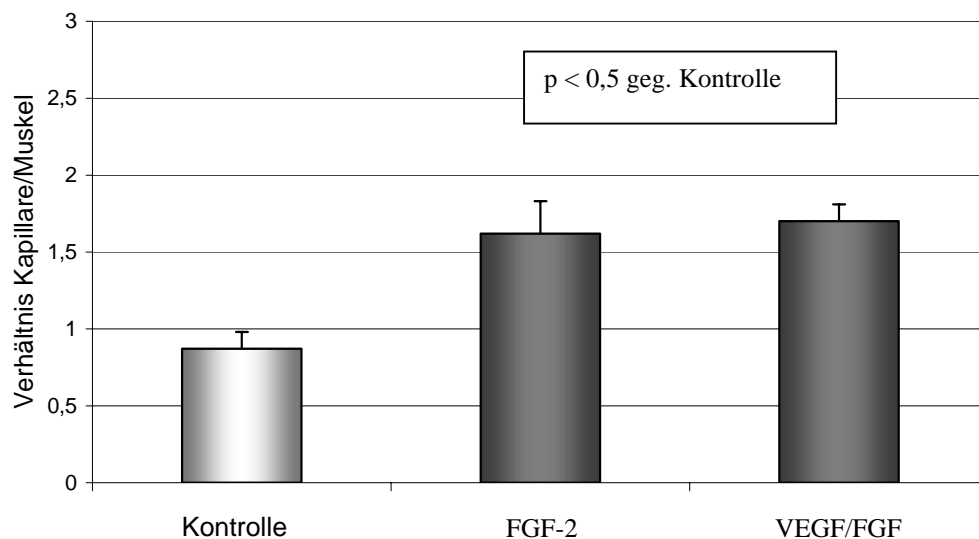


Abbildung 15: Kapillardichte des M. gastrocnemius als Vertreter der Unterschenkelmuskulatur. Verhältnis Kapillare zu Muskel. Kontrolle ($0,87 \pm 0,40$), FGF-2 ($1,62 \pm 0,21$) und VEGF₁₆₅+FGF-2 ($1,70 \pm 0,40$). $p < 0,5$ gegen Kontrolle.

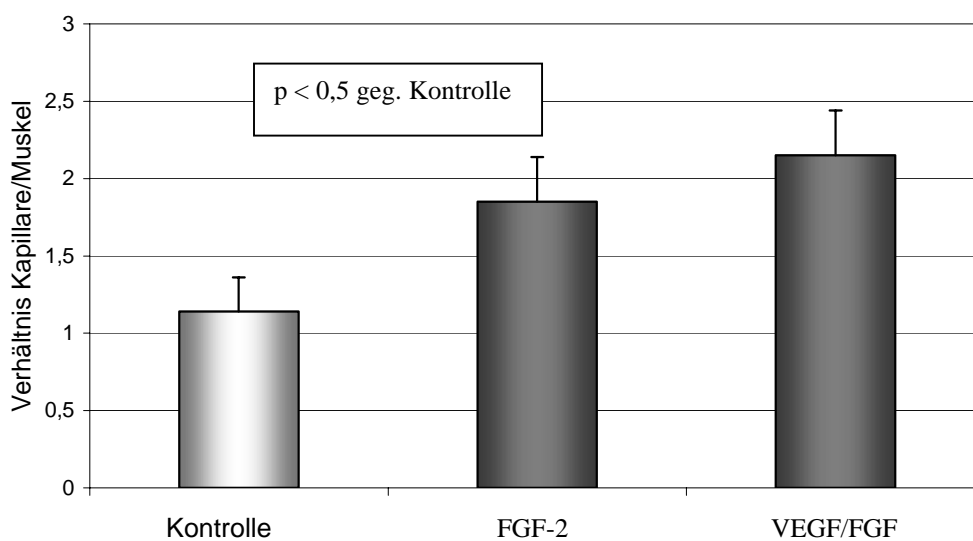


Abbildung 16: Kapillardichte des M. tibialis als Vertreter der Unterschenkelmuskulatur. Verhältnis Kapillare zu Muskel. Kontrolle ($1,14 \pm 0,22$), FGF-2 ($1,85 \pm 0,29$) und VEGF₁₆₅+FGF-2 ($2,15 \pm 0,29$). $p < 0,5$ gegen Kontrolle.

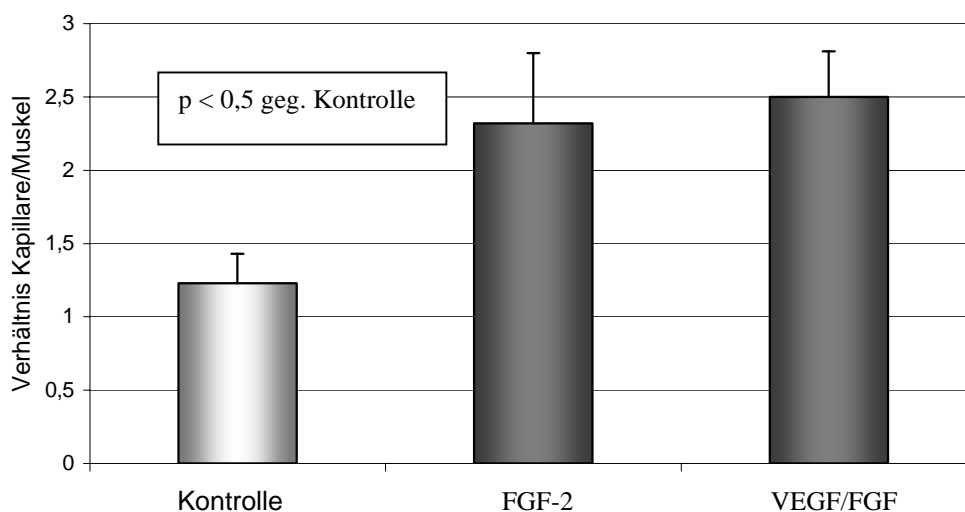


Abbildung 17: Kapillardichte des M. fibularis als Vertreter der Unterschenkelmuskulatur. Verhältnis Kapillare zu Muskel. Kontrolle ($1,23 \pm 0,02$), FGF-2 ($2,32 \pm 0,48$) und VEGF₁₆₅+FGF-2 ($2,50 \pm 0,29$). $p < 0,5$ gegen Kontrolle.

Histologische Bearbeitung:

Die histologische Ermittlung der Kapillardichte erfolgte mit Hilfe der alkalischen Phosphatase. In Abbildung 18 werden exemplarisch histologische Schnitte des M. gastrocnemius des ischämischen Hinterlaufs eines Kontrolltieres und eines mit FGF-2 behandelten Kaninchens dargestellt. Man kann ein signifikant höheres Verhältnis Kapillare zu Muskelfaser beim mit FGF-2 behandelten Tier im Vergleich zur Kontrolle beobachten.

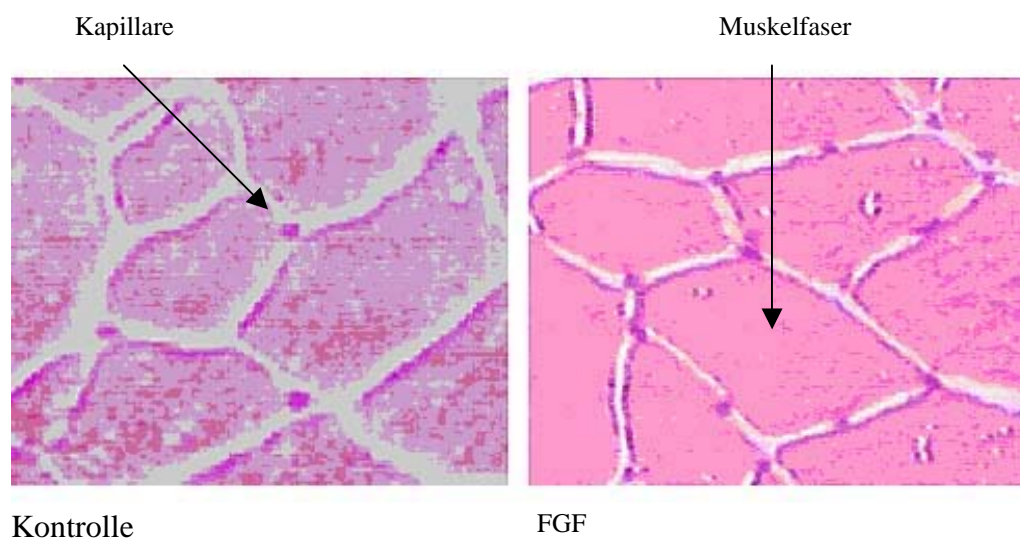


Abbildung 18: Histologische Schnitte des Muskelgewebes nach FGF-2-Applikation im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dargestellt sind exemplarisch Schnitte zur Identifikation von Muskelfasern mit umliegenden Kapillaren, welche sich mit Hilfe der alkalischen Phosphatase von ihrer Umgebung besser unterscheiden lassen.

3.4 Blutfluss

Die Messung des Blutflusses im ischämischen Hinterlauf mit Hilfe der Cinedensitometrie zeigte, verglichen mit der Kontrollgruppe ($110 \pm 12\%$), einen statistisch signifikant vergrößerten Blutfluss bei Kaninchen, die mit FGF-2 als Retroinfusion ($142 \pm 15\%$ zur Baseline, $p < 0,05$) und bei solchen, die mit FGF-2+ VEGF₁₆₅ ($144 \pm 16\%$, $p < 0,05$) behandelt wurden.

Die Zunahme an Kollateralen nach intramuskulärer FGF-2 Applikation entsprach dem der Retroinfusionsgruppe ($143 \pm 13\%$, $p < 0,05$). (Abbildung 19)

Die Dopplerflussmessung wurde bei neun Kaninchen aller Gruppen angewandt und zeigte eine signifikante Korrelation zur Cinedensitometrie.

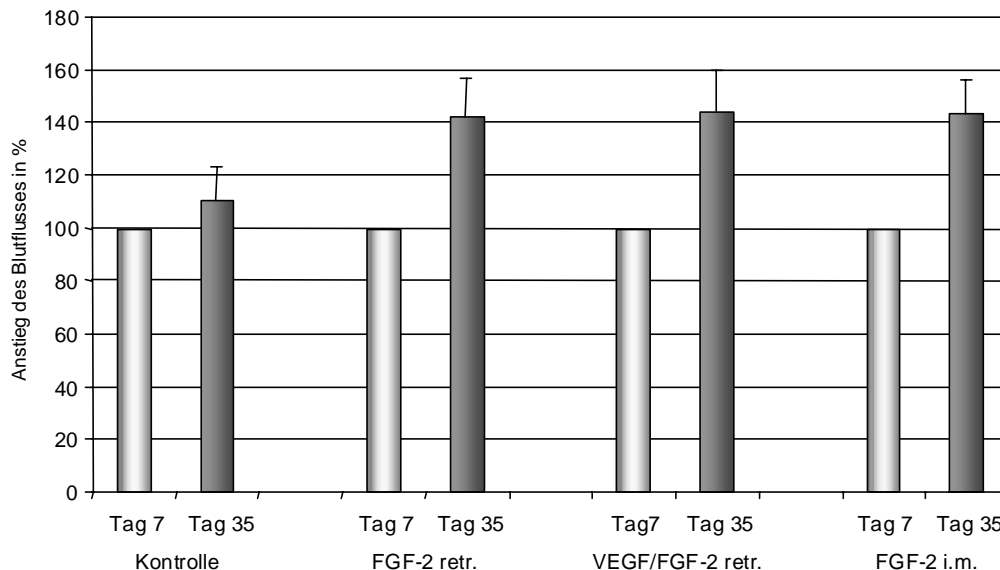


Abbildung 19: Blutflussdiagramm. Dargestellt wird die prozentuale Zunahme des Blutflusses in den verschiedenen Gruppen. Für die Kontrollgruppe zeigt sich ein Zuwachs von $110 \pm 12\%$ ($p =$ nicht signifikant), für die retr. FGF-2 Gruppe ein Zuwachs von $142 \pm 15\%$ ($p < 0,05$), für die retr. FGF-2 plus VEGF Gruppe ein Zuwachs von $144 \pm 16\%$ ($p < 0,05$) und für die i.m. FGF-2 Gruppe ein Zuwachs von $143 \pm 13\%$ ($p < 0,05$).

3.5 Validierung der Cine-Densitometrischen Methode

Der Vergleich der verwendeten Bildzählung mit der zur Kollateralf Flussbestimmung etablierten Dopplerflussmessung ergab eine signifikante Korrelation (-0,967) über einen 5-fachen Messbereich. Die Ergebnisse basieren auf der Messung an einem Tier im ischämischen wie auch im nicht ischämischen Hinterlauf, unter Ruhebedingungen und auch bei maximaler Dilatation, erreicht durch die Applikation von Adenosin, um ein weites Feld an Werten beurteilen zu können. Es zeigte sich eine hohe Übereinstimmung der Werte beider Methoden.

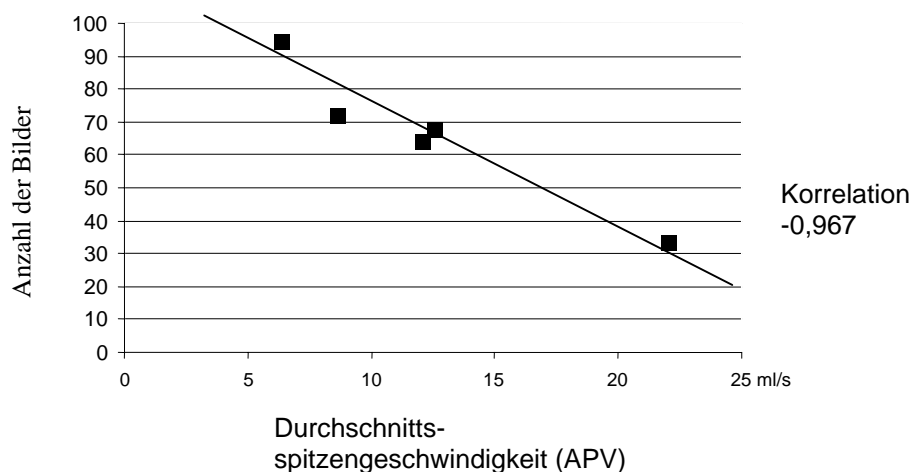


Abbildung 20: Diagramm zur Validierung der Filmbildzählung. Vergleich der etablierten Dopplerflussmessung mit der Cine-Densitometrischen Methode. Es zeigt sich eine hohe Übereinstimmung beider Methoden (Korrelation = 0,967)

4. Diskussion

In der vorliegenden Untersuchung wurden erstmalig angiogenetische Wachstumsfaktoren retrograd in die Beinvenen infundiert. Die wichtigste Erkenntnis im tierexperimentellen Modell für chronische periphere Ischämie war, dass die einmalige retrograde Gabe von rekombinantem FGF-2 sieben Tage nach Induktion der Ischämie zu einer höheren Kapillardichte in der ischämischen Unterschenkelmuskulatur und zu Kollateralwachstum im Oberschenkelbereich nach 35 Tagen führte. Somit konnte mit diesem neuen Applikationsverfahren für angiogenetische Wachstumsfaktoren sowohl Angiogenese als auch Arteriogenese induziert werden. Diese morphologischen Veränderungen gingen mit einem erhöhten Frame count score einher, was auf eine erhöhte Blutflussgeschwindigkeit schließen lässt. Die Ergebnisse der retrograden Infusion von FGF-2 entsprachen dabei denen der intramuskulären Verabreichung. Interessanterweise ergab die zusätzliche Gabe von VEGF₁₆₅ in einer bisher als nebenwirkungsfrei beschriebenen Dosis keine weitere Verbesserung der Kapillardichte und des Blutflusses im Vergleich zur alleinigen Gabe von FGF-2. Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, ein Applikationsverfahren zu entwickeln, mit dem potentielle Risiken und bekannte Limitationen von angiogenetischen Wachstumsfaktoren minimiert werden können.

Unzureichende Effektivität:

Versuche mit radioaktiv markiertem FGF-2 bei Koronarischämie haben ergeben, dass die Retention im Zielareal bei intravenöser Gabe und intraarterieller Gabe gering ist (0,5 % bzw. 1-5 % der applizierten Gesamtmenge). Dementsprechend wurden bei mehreren bisher abgeschlossenen größeren, placebokontrollierten klinischen Studien die primären Ziele entweder verfehlt (VIVA, FIRST) oder nur bedingt erreicht (TRAFFIC). Als möglicher Grund für die enttäuschenden klinischen Befunde wird insbesondere eine unzureichende regionale Wirksamkeit diskutiert (VIVA, FIRST, TRAFFIC).

Die beschriebenen Probleme wurden in der vorliegenden Untersuchung durch drei verschiedene Ansätze angegangen:

1. durch Retroinfusion der Faktoren in die Beinvenen, wodurch eine effiziente Anreicherung im ischämischen Zielareal erreicht wurde
2. durch Anpassung der Dosis an die in klinischen Studien als maximal tolerierbar ermittelte Dosis
3. durch Fokussierung auf die Applikation von FGF-2, für das die beschriebenen Komplikationen entweder gar nicht oder nur abgeschwächt beschrieben wurden.

4.1 Höhere Konzentration und längere Verweildauer der Wachstumsfaktoren im ischämischen Bein bei der Retroinfusion von ^{99}Tc -Nanokolloiden im Vergleich zur antegraden arteriellen Infusion

Die szintigraphischen Untersuchungen wurden durchgeführt, um die maximale Konzentration und Verweildauer der Radionuklide bei Retroinfusion in die Beinvene im Vergleich zur antegraden Infusion in die Arterie zu vergleichen. Die verwendeten ^{99}Tc -Nanokolloide haben eine Teilchengröße von 15-30 nm im Durchmesser und verhalten sich nach Injektion ähnlich dem Serum-Albumin (Becit et al. 2001).

Hierbei zeigte sich, dass die *antegrade* Infusion in die A. iliaca interna über 30 Minuten zu keiner signifikanten Anreicherung der Nanokolloide im Unterschenkel im Vergleich zur kontralateralen Seite führte (Abbildung 8). Vielmehr war eine Anreicherung lediglich im Bereich des nichtischämischen proximalen Oberschenkels sowie eine rasche systemische Ausschwemmung mit Beginn der Infusion zu beobachten. Aufgrund der fehlenden Anreicherung bei der szintigraphischen Untersuchung könnte im Falle der antegraden Infusion von angiogenetischen Wachstumsfaktoren eine Stimulierung von Kapillarwachstum im ischämischen Unterschenkel durch arteriell infundierte angiogenetische Wachstumsfaktoren lediglich durch einen systemischen Effekt der rezirkulierenden Faktoren erwartet werden. Die Ursache hierfür liegt am ehesten darin, dass durch die Exzision der Femoralarterie mit verminderter Blutzufuhr

auch die mit dem arteriellen Blut zugeführten Substanzen das Zielareal nicht in ausreichendem Maße erreichen.

Die *retrograde* Infusion führte demgegenüber zu einer gemittelt ca. 15-fach höheren Konzentration des Radionuklids im ischämischen Bein. Die Nanokolloide waren homogen über das gesamte Bein distal des Tourniquets im mittleren Oberschenkels verteilt. Es zeigte sich eine deutlich geringere systemische Ausschwemmung im Vergleich zur antegraden Gabe. Schließlich zeigte sich auch eine deutliche Depotwirkung, so dass auch 30 Minuten nach Ende der Infusion und Lösen der arteriellen Blutsperre die Tracerkonzentration deutlich erhöht war. Diese Ergebnisse bestätigen im Wesentlichen die Befunde einer früheren Studie am nichtischämischen Bein, in der nach retrograder Applikation mit einem anderen Verfahren die Radionuklidkonzentration im Zielgewebe ca. 6,7-fach höher war als im Vergleich zur arteriellen Verabreichung und 13,6-fach höher im Vergleich zur intravenösen, systemischen Gabe (Schoop und Acevedo 1993). Zusammengefasst ergaben die szintigraphischen Untersuchungen eine günstige Verteilungskinetik im ischämischen Zielareal nach retrograder Infusion in die Beinvene.

4.2 Angiogenese, Kollateralwachstum und Erhöhung des Blutflusses durch retrograde Infusion angiogenetischer Wachstumsfaktoren

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob durch die neuartige Applikationsmethode der Retroinfusion in die Beinvene die regionale Wirkung erhöht werden kann. Bei der Wahl der applizierten Dosis von FGF-2 und VEGF₁₆₅ wurde sich an den experimentell und klinisch ermittelten Maximaldosen orientiert (Lopez et al. 1997; TRAFFIC; VIVA; FIRST). Diese Dosen lagen im Falle von FGF-2 bei max. 30 µg/kg KG und VEGF₁₆₅ bei 36 µg/kg KG. Im Gegensatz hierzu hatten die zuvor in tierexperimentellen Studien eingesetzten Dosen teilweise erheblich über diesen Werten gelegen.

Die retrograde Infusion von FGF-2 führte zu einer deutlichen Zunahme der Kapillardichte in der ischämischen Unterschenkelmuskulatur im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieser angiogenetische Effekt konnte gleichermaßen in allen drei

getrennt analysierten Muskeln *M. gastrocnemius*, *M. tibialis anterior* und *M. fibularis* beobachtet werden. Die Befunde zeigen, dass die retrograde Infusion von FGF-2 zu einer regionalen Konzentration und Verweildauer im Unterschenkel führte, die zur Induktion von Kapillarwachstum ausreichte. Dies ist um so bemerkenswerter, als die Faktoren lediglich als einmalige Gabe verabreicht wurden. Die ähnlich potente relative Angiogeneseinduktion in allen drei untersuchten Unterschenkelmuskeln zeigte, dass die Wachstumsfaktoren homogen über den gesamten Zielbereich verteilt wurden.

Im Gegensatz zum Unterschenkel führte die retrograde Applikation der Wachstumsfaktoren zu keinem signifikanten Anstieg der Kapillardichte im Oberschenkel. Dies scheint nicht auf eine geringere Konzentration der Wachstumsfaktoren zurückzuführen zu sein, da sowohl die szintigraphischen als auch die venographischen Untersuchungen ergaben, dass durch die Retroinfusion die Ober- und Unterschenkelbereiche in vergleichbarem Maße erreicht wurden. Andere Untersucher haben jedoch gezeigt, dass im Kaninchenmodell für chronische Hinterlaufischämie der Oberschenkelbereich weniger oder gar nicht ischämisch ist (Deindl et al. 2001, Ito et al. 1997). Da Wachstumsfaktoren typischerweise auf ein ischämisches Umfeld zur Induktion von Kapillarwachstum *in vivo* angewiesen sind, erscheint diese Erklärung am Wahrscheinlichsten.

Das Größenwachstum der Kollateralgefäße (Arteriogenese) ist notwendig zur Wiederherstellung der Gewebepfusion bei Ischämie. Die retrograde Infusion von FGF-2 führte zu einer signifikanten Erhöhung des angiographischen Kollateralscores. Die morphologischen Veränderungen (Kapillarwachstum und Kollateralwachstum) durch retrograde Infusion von FGF-2 gingen dabei mit einer Erhöhung des Blutflusses einher. Diese entsprechen in etwa dem der intramuskulären Applikation.

4.3 Kombinierte retrograde Infusion von FGF-2 und VEGF₁₆₅

Bei FGF-2 und VEGF₁₆₅ handelt es sich um die beiden in chronischen Ischämie modellen am genauesten untersuchten angiogenetischen Wachstumsfaktoren. Beide Faktoren haben eine starke Wirkung auf Proliferation

und Migration von Endothelzellen. Interessanterweise erbrachten Zellkultur- und tierexperimentelle Untersuchungen Hinweise auf synergistische angiogenetische Effekte (Pepper et al. 1992).

Höhere Dosen von VEGF₁₆₅ verhalten sich synergistisch mit FGF-2 im Hinblick auf die Proteinsynthese (Couper et al. 1997) und auf die Induktion von Angiogenese (Asahara et al. 1995). Vorangegangene Beobachtungen zeigten einen überadditiven Effekt bei der kombinierten Gabe von VEGF₁₆₅ und FGF-2. Pepper et al. konnten an einem in vitro Modell demonstrieren, dass FGF-2 im Vergleich zu VEGF₁₆₅ in äquimolarer Lösung etwa doppelt so potent bei der Stimulation zu „tube-like structures“ durch Endothelzellen ist (Pepper et al. 1992). Bei der gleichzeitigen Gabe beider Faktoren zeigte sich in vitro eine angiogenetische Antwort, die weit über einen additiven Effekt hinaus ging und die schneller eintrat als bei einem der Zytokine allein. Takeshita et al. konnten diese Beobachtungen in vivo bestätigen. Sie sahen ein signifikant größeres und auch schnelleres Kollateralwachstum im Modell des ischämischen Hinterlaufs nach einer einzigen intraarteriellen Bolusgabe von VEGF₁₆₅ und FGF-2, welches zu einer hämodynamischen Verbesserung im Vergleich zu den Gruppen führte, die mit VEGF₁₆₅ oder FGF-2 allein behandelt wurden (Takeshita et al. 1994). Hierbei wurden jedoch hohe Dosen VEGF₁₆₅ verabreicht (500-1000 Mikrogramm VEGF₁₆₅).

Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Untersuchung eine Gruppe eingeschlossen, bei der diese beiden Wachstumsfaktoren kombiniert appliziert wurden. Die VEGF₁₆₅ Dosis (10 µg/kg/KG) wurde jedoch in einem Bereich gewählt in dem bei Ischämieversuchen an Hunden keine Nebenwirkungen wie systemische Hypotonie oder Hämangiomentstehung beobachtet wurden (Rakue et al. 1998).

Hierbei zeigte sich zwar ein gegenüber der einzelnen Gabe von FGF-2 nochmals gesteigertes Kollateralwachstum. Das Kapillarwachstum war jedoch nur geringgradig erhöht, ohne das statistisch signifikante Niveau zu erreichen. Ebenso konnte eine lediglich leichte, statistisch ebenfalls nicht signifikante Verbesserung des Blutflusses beobachtet werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Perfusion im ischämischen Hinterlauf in vivo nicht vom Synergismus von FGF-2 und VEGF₁₆₅ profitiert, wenn subtoxische VEGF₁₆₅-Dosen verabreicht werden.

4.4 Arteriosklerose und periphere arterielle Verschlusskrankheit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und tierexperimentelle Untersuchung eines neuartigen vaskulären Applikationsverfahrens für angiogenetische Wachstumsfaktoren durch retrograde Infusion in die Beinvenen. Klinischer Hintergrund ist das Fehlen einer effektiven medikamentösen Therapieoption für die periphere arterielle Verschlusskrankheit im fortgeschrittenen Stadium. Bei dieser Erkrankung kommt es infolge arteriosklerotischer Veränderungen der Gefäßwände zu Stenosierungen der Bein- oder Beckenarterien, die zum Perfusionsdefizit der unteren Extremität führen (Anand S. und Craeger M. 2003). Klinisch manifestiert sich die Erkrankung in der Regel zunächst in Form von funktionellen Beschwerden, die zuerst bei stärkerer Belastung (Claudicatio intermittens), später auch bei geringer Belastung und in Ruhe auftreten können. Im weiteren Verlauf kann es zu trophischen Störungen, Wundheilungsstörungen, Infektionen und schließlich zur Gangrän kommen. In Deutschland leiden derzeit ca. 3,3 Millionen Patienten an dieser Erkrankung (Schulenberg et al. 1995).

Zur Therapie stehen neben der Einstellung von Risikofaktoren interventionelle (z.B. PTA oder Stent-Implantation) und chirurgische (z.B. Bypass-Operation oder Endatherektomie) Revaskularisierungsverfahren zur Verfügung. Da diese Therapieverfahren jedoch nicht bei allen Patienten durchführbar oder ausreichend erfolgreich sind, kommt es in den meisten Fällen zum weiteren Fortschreiten der Erkrankung. Im Endstadium verbleibt die Amputation der unteren Gliedmaße als letzte therapeutische Option, deren Häufigkeit in den USA bei ca. 150.000/Jahr liegt (Dormandy et al. 1988). Bei einer perioperativen Sterblichkeit von 5 bis 20 % (je nach Amputationshöhe) versterben im weiteren Verlauf etwa 40 % der Patienten innerhalb der ersten beiden Jahre nach dem Eingriff. Psychologische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Lebensqualität der an der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit leidenden Patienten massiv reduziert ist (European Working Group on Critical Leg Ischemia 1991).

4.5 Klinische Studien zur therapeutischen Angiogenese durch VEGF und FGF

Nach verschiedenen Tierversuchen für die Wachstumsfaktoren FGF und VEGF sind nun auch mehrere Phase I und Phase II Studien zur therapeutischen Angiogenese bei Patienten mit peripherer oder koronarer Ischämie initiiert und teilweise abgeschlossen worden. Hierbei wurden die Wachstumsfaktoren entweder als rekombinantes Protein oder mittels Gentransfer appliziert. Ziel dieser Studien war es, die Wirksamkeit und das Risikoprofil verschiedener angiogenetischer Wachstumsfaktoren am Menschen zu überprüfen.

Inzwischen liegen die Ergebnisse aus mehr als 20 klinischen Studien vor, in denen entweder Wachstumsfaktoren als Proteine oder als Genmaterial appliziert wurden. Zwar ergaben die initial durchgeführten, nicht kontrollierten Studien zunächst vielversprechende Ergebnisse (Grossmann D. und Grossmann W. 2002), die inzwischen vorliegenden Ergebnisse von mehreren kontrollierten, randomisierten Doppelblindstudien ergaben jedoch ein gemischtes Bild. So wurde in einigen Studien ein prädefinierter primärer Endpunkt erreicht, weitere primäre Endpunkte jedoch verfehlt. Zudem erscheint das Ausmaß der erreichten Verbesserungen insgesamt bescheiden.

Tabelle 1: Studien für therapeutisches Gefäßwachstum bei koronarer Herzkrankheit:

Studiename	Wachstumsfaktor	Anzahl der Pat.	Ergebnis*
VIVA	VEGF-A Protein	178	-
FIRST	FGF-2 Protein	337	-
GM-CSF trial	GM-CSF Protein	21	+
AGENT	Adenovirus FGF-4	79	+
KAT	Adenovirus-VEGF-A 165 Plasmid/liposome VEGF-A-165	103	+
REVASC	Adenovirus-VEGF-A-121	67	+
EuroInject One	Plasmid-VEGF-A 165	74	-

*=Erreichen von prädefinierten primären Endpunkten

Tabelle 2: Klinische Studien für therapeutisches Gefäßwachstum bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit.

Studiename	Wachstumsfaktor	Anzahl der Pat.	Ergebnis*
TRAFFIC	FGF-2-Protein	190	+
VEGF-PAOD	Adenovirus-VEGF-A-165 Plasmid/liposome VEGF-A-165	54	+
RAVE	Adenovirus-VEGF-A-121	105	-

*=Erreichen von prädefinierten primären Endpunkten

Um die Limitationen der klinischen Studienergebnisse zu illustrieren, werden einige Beispiele besprochen.

In die **TRAFFIC-Studie** (Therapeutic Angiogenesis with Recombinant Fibroblast Growth Faktor-2 for Intermittent Claudication) wurden 190 Patienten eingebracht. Die Patienten wurden in drei Gruppen randomisiert: die Placebogruppe erhielt an zwei Tagen im Abstand von 30 Tagen jeweils eine Infusion von Trägerlösung in die Iliakalarterien; die „single dose“ Gruppe erhielt am ersten Tag eine Infusion von rekombinantem FGF-2 (30 µg/kg KG) in die Iliakalarterien, 30 Tage später ebenfalls eine Placeboinfusion; Gruppe 3 erhielt an beiden Tagen eine Infusion von FGF-2. Als primärer Endpunkt wurde das Ergebnis eines Belastungstests prädefiniert, die „Peak walking time“ (maximal tolerierbare Belastungszeit). Hierbei zeigte sich eine statistisch signifikante Erhöhung der Belastbarkeit nach 90 Tagen in beiden behandelten Gruppen gegenüber der Placebogruppe: $0,60 \pm 2,34$ Minuten (Placebo) vs. $1,77 \pm 2,84$ Minuten (single dose) vs. $1,54 \pm 3,39$ Minuten (double dose). Interessanterweise zeigte sich kein Unterschied zwischen den Patienten, die FGF-2 ein- oder zweimal erhielten. Nach 180 Tagen zeigte sich jedoch auch bei den mit Placebo behandelten Patienten eine Verbesserung der Belastbarkeit, so dass kein Unterschied zur Verumgruppe mehr bestand: $1,44 \pm 2,73$ Minuten (Placebo) vs. $1,81 \pm 3,78$ Minuten (single dose) vs. $1,50$ Minuten (double dose).

In der **FIRST-Studie** (The FGF-2 Initiating Revascularization Support Trial) wurde die Angiogeneseinduktion durch FGF-2 als ein Alternativverfahren für KHK-Patienten untersucht, die für ein klassisches Revaskularisationsverfahren nicht in Frage kamen. Es handelt sich hierbei um eine randomisierte, Placebo kontrollierte Doppelblind-Phase II-Studie. Als Endpunkte wurden primär die Änderung der Belastungszeit im ETT-Test (exercise tolerance test) vom Ausgangswert im Vergleich zum Wert nach 90 Tagen definiert; sekundär wurden die Veränderungen im ETT-Test (180 Tage im Vergleich zum Ausgangswert), eine Veränderung im Seattle Angina Questionnaire (SAQ) und Short Form 36 (SF-36) (erhoben als Ausgangswert, 90 Tage und 180 Tage nach Therapiebeginn) sowie eine Veränderung im Myokardbelastungsszintigramm (Thallium/Sestamibi) (ebenfalls erhoben als Ausgangswert sowie 90 und 180 Tage nach Therapiebeginn) definiert. FGF-2 wurde als intrakoronare Infusion in den Dosierungen 0,3 µg/kg, 3,0 µg/kg und 30,0 µg/kg KG verabreicht.

Als Ergebnis ließ sich ein nicht statistisch signifikanter Trend zu Gunsten der FGF-2 behandelten Patienten im ETT-Test finden ($p=0,64$). In einer post-hoc Analyse bezogen auf die Wertigkeit des Alters der Patienten konnte gezeigt werden, dass bei älteren Patienten (über 63 Jahre Durchschnittsalter) mit potentiell schwerer Erkrankung eine deutliche, statistisch signifikante, Verbesserung ($p=0,025$) im ETT-Test beobachtet werden konnte. Die deutlichste Verbesserung ergab sich bei einer Dosierung von 3,0 µg/kg. Eine Reduktion der Angina-Frequenz konnte bei allen Patienten beobachtet werden, wobei sich im Trend eine Verbesserung der mit FGF-2 behandelten Gruppe im Vergleich zur Placebogruppe zeigte ($p=0,057$).

Die Myokardszintigraphie zeigte im Ganzen keine signifikanten Unterschiede in den verschiedenen Messungen, wobei jedoch Patienten mit einer schweren Ausgangsangina, welche mit FGF-2 therapiert wurden, einen größeren Benefit im Vergleich zur Placebogruppe ($p=0,05$) aufwiesen.

In der **VIVA-Studie** (Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis) konnte die Sicherheit einer intrakoronaren und intravenösen Infusion von VEGF im Rahmen einer Placebo kontrollierten Doppelblindstudie gezeigt werden. In die Studie wurden 178 Patienten mit stabiler Angina pectoris, die jedoch für eine klassische Revaskularisation nicht in Frage kamen, eingeschlossen. Die Patienten wurden auf eine Placebogruppe, eine low-dose

VEGF ($17 \text{ ng} \times \text{kg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ oder eine high-dose Gruppe ($50 \text{ ng} \times \text{kg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) randomisiert, welche eine intrakoronare Infusion am Tag 0 gefolgt von intravenösen Infusionen am Tag 3, 6 und 9 erhielten.

Belastungstests, Angina Klassifikationen und Lebensqualitätseinschätzungen wurden an den Tagen 0, 60 und 120 angefertigt. Die Myokardperfusion wurde an den Tagen 0 und 60 bestimmt. Am Tag 60 konnte im ETT-Test kein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden. Die Anginaklassifikation sowie die Quality of life Daten zeigten eine signifikante Verbesserung in allen Gruppen, jedoch ohne Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Am Tag 120 zeigte die Placebogruppe einen verminderten Vorteil in allen drei Messungen ohne signifikanten Unterschied zur low-dose Gruppe.

Im Gegensatz dazu wies die high-dose Gruppe eine signifikante Verbesserung in der Anginaklassifikation ($p=0,05$) sowie einen nicht signifikanten Trend im ETT-Test ($p=0,15$) und in der Angina-Frequenz ($p=0,09$) im Vergleich zur Placebogruppe auf. Zusammenfassend wurde VEGF als gut verträglich und sicher eingestuft.

In der **AGENT-Studie** (angiogenic gene therapy trial) wurden 5 ansteigende Dosierungen von Ad5-FGF4 (Ad, Adenovirus) an Patienten mit Angina pectoris untersucht.

79 Patienten mit chronischer stabiler Angina pectoris Klasse 2 oder 3 wurden doppelt geblindet (1:3) auf eine Placebogruppe ($n=19$) oder auf die Ad5-FGF4 ($n=60$) randomisiert. Sicherheitstest sowie der ETT-Test wurden am Tag 0, nach 4 und nach 12 Wochen durchgeführt.

Die einfache intrakoronare Verabreichung von Ad5-FGF4 erscheint sicher und gut tolerierbar. Schwere Nebeneffekte unterschieden sich, während des Follow-up (im Mittel 311 Tage), in beiden Gruppen nicht. Alles in Allem war der Trend zur Verbesserung im ETT-Test in der therapierten Gruppe nach 4 Wochen (1,3 gegen 0,7 Minuten, $n=79$) größer. Eine Subgruppenanalyse zeigte die höchsten Verbesserungen bei Patienten mit einem ETT-Test unterhalb von 10 Minuten (1,6 Minuten gegen 0,6 Minuten, $p=0,01$, $n=50$).

Inzwischen liegen für einige der erwähnten Studien Follow-up Untersuchungen vor, die zumindest den Nachweis der Verträglichkeit und Sicherheit der Applikation von angiogenetischen Wachstumsfaktoren erbracht haben.

Angesichts der nicht überragend positiven Ergebnisse stellt sich somit die Frage nach einer effektiveren Applikation der zur Verfügung stehenden Wachstumsfaktoren.

4.6 Applikationswege für angiogenetische Wachstumsfaktoren

Zur Applikation von angiogenetischen Proteinen zur therapeutischen Angiogenese stehen diverse Methoden zur Verfügung. Es zeigten sich sowohl für den intraarteriellen als auch für den intramuskulären Zugangsweg ein therapeutischer Erfolg bei Tierversuchen und klinischen Anwendungen (Isner et al. 1991 und 1996; Baumgartner et al. 1998; Lazarous et al. 2000).

Bei der intraarteriellen Verabreichung der angiogenetischen Wachstumsfaktoren erweist sich die Tatsache, dass zum Einen dem ischämischen Gebiet eine arterielle Stenose vorgeschaltet ist und zum Anderen eine nur kurze lokale Verweildauer im ischämischen Zielgebiet zu verzeichnen ist, als theoretisch nachteilig. Diese Situation erfordert somit eine wiederholte hohe systemische Applikation der Wachstumsfaktoren, um dann auch eine therapeutisch ausreichende lokale Konzentration zu erzielen (Lazarous et al. 2000; Baffour et al. 1992).

Die selektive intraarterielle Applikation in die Hauptzufluss-Arterie des ischämischen Bereichs konnte zwar erfolgreich bei verschiedenen Tierversuchen gezeigt werden, hierfür waren jedoch wie erwähnt hohe Faktorkonzentrationen erforderlich (z.B. 500 Mikrogramm/kg/KG VEGF₁₆₅, Takeshita 1995). Besonders hohe Faktorkonzentrationen führen aber ihrerseits zu einer erhöhten Gefahr möglicher systemischer und lokaler Nebenwirkungen, wie zum Beispiel dem möglicherweise beschleunigten Tumorwachstum oder der retinalen Proliferation. Es ist nach Laham und Lazarous deshalb beim Menschen nicht möglich die Dosis der Faktoren beliebig zu erhöhen. Die maximal tolerierte Dosis für FGF-2 lag bei ca. 30 µg/kg KG.

Die vaskuläre Applikation von rekombinanten Wachstumsfaktoren ist daher derzeit auf Kurzzeitinfusionen mit einer maximal tolerierbaren Dosis beschränkt (Simons et al. 1999). Abgesehen von diesen Beschränkungen konnten einige

positive Auswirkungen Placebo-kontrollierter intraarterieller Infusionen von FGF-2 in klinischen Studien verzeichnet werden.

Als eine Alternative stellt sich die intramuskuläre Verabreichung dar. Der Wirkstoff kann mit geringem technischem Aufwand an den Wirkort gebracht werden. Ein Nachteil der intramuskulären Injektion liegt im Mangel einer homogenen Verteilung des applizierten Stoffes, da nur ein begrenzter lokaler Bereich mittels Injektionen erreicht werden kann. Diese Injektionen von VEGF können daher ohne die erwünschte dazwischenliegende Kapillarsprossung zu einer Entstehung von hämodynamisch ineffektiven Kapillarschwämmen an der Injektionsstelle führen (Springer et al. 2000, Schwarz et al. 2000, Pettersson et al. 2000, Dor et al. 2002). Dieser unerwünschte Effekt wurde bislang nicht für intravaskuläre, arterielle Applikation von VEGF beschrieben.

Bei einem Modell für myokardiale Ischämie konnte nach Lazarous für die direkte Injektion von FGF eine hohe und auch persistierende Geweberetention festgestellt werden. Nachdem die Verteilung der Faktoren aber sehr inhomogen ist, bleibt der funktionelle Nutzen der lokalen Applikation umstritten. Darüber hinaus konnte für die intramuskuläre Applikation von Plasmid-DNA, die für VEGF kodierte, eine Auslösung von Hämangiomstrukturen nachgewiesen werden (Schwarz et al. 2000).

Als neue Methode und erstmalig im Tierversuch durchgeführtes Applikationsverfahren stellt sich die retrograde venöse Verabreichung unter Blutfluss-Stillstands-Bedingungen dar.

Die Applikation der Wachstumsfaktoren über den venösen retrograden Weg erscheint als eine praktikable und effiziente Methode zur Verabreichung der Wachstumsfaktoren.

Sie ermöglicht im Gegensatz zur intramuskulären Applikation nicht nur eine homogene, sondern ebenso selektive Verteilung der Wachstumsfaktoren im ischämischen Zielgebiet. Sie verbindet diese Eigenschaften mit einer Verlängerung der lokalen Retention im ischämischen Bereich unter Blutfluss-Stillstands-Bedingungen.

4.7 Angiogenese und Arteriogenese

Experimentelle Studien haben gezeigt, dass die Adaptation des Gefäßsystems des adulten Organismus an chronische Ischämie durch 2 unterschiedliche Mechanismen erfolgt: durch Arteriogenese und Angiogenese (Gorge et al. 1989).

Die Anfänge in der Arbeit mit **Angiogenese** wurden besonders in Bezug auf die Vaskularisierung von Tumoren von J. Folkman begründet (Folkman et al. 1971, 1972, 1975).

Die Angiogenese bezieht sich hierbei auf die Aussprossung von Endothelzellen, welche schließlich zur Formierung eines kapillären Netzwerks führt (Risau 1997). Eine unzureichende Oxygenierung der Zellen, wie sie bei pathologischen Ereignissen wie zum Beispiel beim Karzinom, Apoplex und ischämischer Gefäßkrankheit gefunden wird, führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors, Hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α).

HIF-1 α fungiert hierbei als Hauptregulator der Sauerstoffhomöostase. Seine Expression führt zu einem Anstieg der Transkription einiger Gene wie unter anderem auch der NOS 1-3 und VEGF (Iyer et al. 1998; Semenza et al. 1999; Palmer et al. 1998; Carmeliet et al. 1998). Hierdurch kommt es zur Vasodilatation, die insbesondere auf die Produktion von NO zurückzuführen ist. Als Zweites tritt eine Erhöhung der Gefäßdurchlässigkeit durch VEGF auf, das ursprünglich als Gefäßpermeabilitätsfaktor entdeckt wurde (Ferrara et al. 1989). Das Auftreten von Ödemen ist somit ein früher Indikator der angiogenetischen Antwort (Ziche 1998; BenEzra et al. 1998). Auch kann VEGF die Endothelproliferation induzieren. Diese Vorgänge führen schließlich zur Bildung eines neuen kapillären Netzwerks. Zusammengefasst handelt es sich bei der Angiogenese um die Neubildung von Kapillaren, die lokal im ischämischen Areal stattfindet.

Die zweite Form des Gefäßwachstums ist die **Arteriogenese**. Sie wurde als eigenständiger Prozess erkannt und wird inzwischen auch als eigenständiges therapeutisches Ziel angesehen (Schaper et al. 1999; Carmeliet 2000; Kern 2000).

Arteriogenese bezeichnet das Wachstum von bereits existierenden Arteriolen in funktionell bedeutende Kollateralen. Die bereits bestehenden Arteriolen lassen sich sowohl bei den Koronarien als auch in der Peripherie finden. Zum ersten Mal sind diese Gefäße 1932 von Richard Lower (Oxford University) beschrieben

worden (Lower 1932). In einer Arbeit von Fulton konnte gezeigt werden, dass diese Kollateralen unabhängig von der Präsenz einer koronaren Herzerkrankung vorhanden waren (Fulton et al. 1965).

1971 wurde gezeigt, dass das Kollateralwachstum mit einem strukturellen Umbau des Gefäßes durch Proliferation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen einhergeht und somit über die einfache Vasodilatation hinausgeht (Schaper et al. 1971).

Die funktionelle Relevanz der Arteriogenese im Sinne der Verbesserung der regionalen Durchblutung und Vermeidung von Ischämiefolgen ist inzwischen gut belegt (Nohara et al. 1983; Blanke et al. 1985; Schwartz et al. 1985; Habib et al. 1991).

Im Gegensatz zur Angiogenese findet Kollateralwachstum nicht im ischämischen Gewebe selbst, sondern proximal hierzu statt (Schaper 1996). Der entscheidende Stimulus ist daher auch nicht die Ischämie selbst, sondern mechanische Kräfte durch Umverteilung des Blutflusses (Shear Stress). Es wurde von verschiedenen Autoren berichtet, dass der arterielle Durchmesser durch einen erhöhten Shear Stress zunimmt, was schließlich zu einer Normalisierung der Scherkräfte führt (Kamiya et al. 1980; Zarins et al. 1987; Glagov et al. 1988; Singh et al. 1998; Furchgott 1983).

Diese Kollateralarterien werden nach dem Auftreten einer hämodynamisch relevanten Stenose aus einer bestehenden hauptzuführenden Arterie rekrutiert. Wegen des Abfalls des arteriellen Blutdrucks im nachgeschalteten, ischämischen Bereich wird der Blutfluss über die bestehenden Kollateralwege abgeleitet und so ein gut durchblutetes mit einem schlecht perfundierten Gebiet verbunden (Schaper et al. 1976).

Dies führt zu einer erhöhten Flussgeschwindigkeit und folglich zu einem erhöhten Shear Stress in den bestehenden Kollateralarterien. Daraufhin kommt es zur Aktivierung des Endothels mit erhöhter Expression von MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein) und von endothelialen Oberflächenrezeptoren, die zur Bindung und Migration von Monozyten führen (Gimbrone et al. 1997; Resnick et al. 1995; Shyy et al. 1994, 1995, Scholz et al. 2000). Die darauf folgende erhöhte Adhärenz von Monozyten (Schaper et al. 1976) und ihre Transformation in Makrophagen lässt eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren produzieren, die einen stimulierenden Einfluss auf das Kollateralwachstum haben. Unter diesen Faktoren sind MCP-1 (Chemoattraktion und Aktivierung von

Monozyten/Makrophagen), TNF-alpha (Tumornekrosefaktor-alpha), bFGF (Mitogen für Endothelzellen und glatte Muskelzellen) und Matrix-Metalloproteinasen, die den proteolytischen Umbau der vaskulären Basalmembran und extrazellulären Matrix vermitteln (Arras et al. 1998).

Die Induktion einer chronischen Ischämie im Hinterlauf beim Kaninchen ist ein etabliertes Verfahren zur Induktion der Sprossung von Kapillaren (Angiogenese) und des Kollateralwachstums (Arteriogenese) (Takeshita et al. 1994).

In der Kontrollgruppe (mit Heparinlösung per retrograd venöser Infusion behandelt) konnte kein signifikanter Anstieg des Kollateralwachstums oder des Blutflusses zwischen den Tagen 7 und 35 festgestellt werden.

Diese Ergebnisse der niedrigen spontanen Arteriogenese bei unbehandelten Tieren bestätigte die Daten anderer Forschungsgruppen bei ähnlichen Modellen.

In unserer Arbeit konnte gezeigt werden, dass die retrograd venöse Infusion von FGF-2-Protein zu einer signifikant gesteigerten Angiogenese, im Vergleich zu den Kontrolltieren führte, nachgewiesen durch die größere Anzahl an Kapillaren im ischämischen Bereich. Es ist bekannt, dass FGF-2 eine Rolle in der Arteriogenese spielt (Deindl et al. 2003). Dennoch ist vaskuläre Adaptation bei Ischämie als Ganzes ein komplexer Prozess, bei dem viele verschiedene Faktoren eine Rolle spielen. FGF-2 fördert die Angiogenese vielleicht zusätzlich, indem es VEGF und die Expression seines Rezeptors steigert (Stavri et al. 1995; Hata et al. 1999).

4.8 Messung des Blutflusses mit Hilfe der Angiographie

Zur Beurteilung der Relevanz morphologischer Veränderungen wie dem Kapillar- und Kollateralwachstum wurde der Blutfluss angiographisch ermittelt. Dazu wurde die Zeitdauer bestimmt, die das Kontrastmittel im Gefäßsystem zur Überwindung eines definiertes Teilstücks benötigt.

Quantitative Methoden bei angiographischen Versuchen zur Beurteilung des arteriellen Flusses sind experimentell etabliert und gut charakterisiert worden (Rurishauser et al. 1967). Solche Methoden konnten auch für die klinische Anwendung etabliert werden (TIMI Flussklassifikation, Thrombolyis in Myokardial Infarction, Gibson et al. 1996). In der vorliegenden Untersuchung wurde der Blutfluss durch Zählen der Filmbilder bestimmt, die das Kontrastmittel

brauchte, um die Länge der exziierten A. femoralis superficialis von einem Bezugspunkt proximal der Ligation bis zum Zielpunkt distal davon zu überbrücken.

Das am besten etablierte und validierte Verfahren zur Messung des globalen Blutflusses in das ischämische Bein im intakten Organismus ist jedoch die intravasale Dopplerflussmessung. Zur Bestätigung der einfachen, objektiven und reproduzierbaren Möglichkeit der Quantifizierung des Blutflusses mit der Filmbildzählung wurde ein Vergleich zwischen der Dopplerflussmessung und den gleichzeitig erstellten Angiographiedaten erstellt, um die neue Methode zu etablieren.

4.9 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit ist es, eine effektive, selektive und homogene Applikation von bekannten Angiogenesefaktoren in eine ischämische Extremität zu etablieren. Die Induktion therapeutischer Angiogenese im ischämischen Hinterlauf ist bereits über den arteriellen Weg wie auch über eine intramuskuläre Applikation gelungen. Als Alternative, das ischämische Gewebe über eine stark stenosierte oder sogar verschlossene Arterie oder aber inhomogen über eine intramuskuläre Injektion zu erreichen, wird in dieser Arbeit das intakte venöse Gefäßsystem unter Verwendung der Retroinfusion genutzt. Hierfür kommt basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) als etablierter Angiogenesefaktor zur Anwendung. Die Retroinfusion wird hierbei mit der intramuskulären Applikation verglichen. Darüber hinaus wird überprüft, ob eine zusätzliche low-dose Ko-Applikation von Vascular Endothelial Derived Growth Factor (VEGF) einen additiven Effekt erzielen kann.

Die chronische Ischämie im Hinterlauf des Kaninchens wird am Tag 0 mittels Exzision der Arteria femoralis und Ligatur ihrer Aufzweigungen erreicht. Am Tag 7 wird die Baseline für die Kollateralenanzahl mittels Angiographie und ein Korrelat für die Blutflussgeschwindigkeit in den Kollateralen (Frame Count Score) ermittelt. Anschließend erfolgt die retrograde Applikation von NaCl-Lösung (Kontrollgruppe) oder bFGF (20 µg/kg KG) mit oder ohne VEGF₁₆₅ (10 µg/kg) über eine Unterschenkelvene. Alternativ wird bFGF (20 µg/kg KG) in die Ober- und Unterschenkelmuskulatur injiziert. Am Tag 35 werden erneut die Kollateralenanzahl wie auch der Frame Count Score ermittelt. Darüber hinaus werden Muskelproben zur Bestimmung des Kapillarwachstums entnommen.

Die Ergebnisse zeigen, dass in der *Kontrollgruppe* das Kapillarwachstum wie auch die Kollateralenanzahl am Tag 35 im Vergleich zum Tag 7 nicht signifikant zunehmen.

Die retrograde Applikation von bFGF induziert hingegen eine signifikante Zunahme des Kapillarwachstums und der Kollateralenanzahl, woraus sich eine höhere Blutflussgeschwindigkeit (Frame Count Score) ableiten lässt. Die Ergebnisse entsprechen denjenigen der intramuskulären bFGF Applikation.

Die low-dose Ko-Applikation von VEGF₁₆₅ als Retroinfusion kann keine weitere Verbesserung im Vergleich zur alleinigen bFGF Gabe induzieren.

Zusätzlich wurde mit Hilfe szintigraphischer Methoden die venöse retrograde Infusion mit der antegraden arteriellen Applikation verglichen. Hierbei zeigte sich eine effektive, selektive und homogene Verteilung der infundierten Lösung im Zielgebiet mit einer deutlich verlängerten Verweildauer zu Gunsten der Retroinfusion.

Es kann postuliert werden, dass durch eine einmalige venöse Retroinfusion von bFGF Angiogenese und damit ein gesteigerter Blutfluss im Modell des chronischen ischämischen Hinterlaufs des Kaninchens wirkungsvoll induziert werden kann.

Zusammenfassend erscheint die venöse retrograde Verabreichung von Wachstumsfaktoren in ein ischämisches Gebiet als eine effektive Methode, Kollateralwachstum und Kapillarsprossung mit folgender Verbesserung des Blutflusses zu induzieren. Da es sich hierbei um ein klinisch anwendbares Applikationsverfahren handelt, könnte dieser Ansatz zu einer Verbesserung der klinischen Effektivität der therapeutischen Angiogenese führen.

5. Literaturverzeichnis

Abrams HL. The collateral circulation: response to ischemia. *Am J Roentgenol.* 1983; **140(6)**:1051-63.

Arman E, Haffner-Krausz R, Chen Y, Heath J und Lonai P. Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**:5082-5087.

Anand S, Creager M. Peripheral arterial occlusive disease (PAVK). *Vasa* 2003; **32(3)**:179-80.

Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J und Schaper W. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest* 1998; **101**:40-50.

Asahara T, Bauters C, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation* 1995;**92**(9 Supl):II365-71.

Azrin M. Angiogenesis, protein and gene delivery. *Br Med Bull* 2001; **59**:211-25

Baffour R, Berman J, Garb JL, Rhee SW, Kaufman J, Friedmann P. Enhanced angiogenesis and growth of collaterals by in vivo administration of recombinant basic fibroblast growth factor in a rabbit model of acute lower limb ischemia: dose-response effect of basic fibroblast growth factor. *J Vasc Surg* 1992; **16**:181-191.

Banai S, Jaklitsch MT, Lazarous DF, Scheinowitz M, Biro S, Epstein SE, Unger EF. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation* 1994; **89**:2183-2189.

Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K, Isner JM: Constitutive expression of ph VEGF after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in Patients with critical limb ischemia. *Circulation* 1998; **97**:1114-1123.

Bauters C, Asahara T, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Physiological assessment of augmented vascularity induced by VEGF in ischemic rabbit hindlimb. *Am J Physiol* 1994; **267**(4 Pt 2):H1263-71.

Bauters C, Asahara T, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Site-specific therapeutic angiogenesis after systemic administration of vascular endothelial growth factor. *J Vasc Surg* 1995; **21(2)**:314-24; discussion 324-5.

Becit N, Ceviz M, Kocak H, Yekeler I, Unlu Y, Celenk C, Akin Y. The effect of vascular endothelial growth factor on angiogenesis: an experimental study. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2001; **22**(4):310-6.

BenEzra D. Critical assessment of in vitro and in vivo assays of angiogenesis. In: Maragoudakis M. editor, *Angiogenesis: models, models and clinical applications*. New York: Plenum Press 1998; pp. 85-89.

Blanke H, Cohen M, Karsch KR, Fagerstrom R, Rentrop KP. Prevalence and significance of residual flow to the infarct zone during the acute phase of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1985; **5**:827-831.

Boekstegers P, Wolfgang Peter W, von Degenfeld G, Nienaber C, Abend M, Rehders T, Habazettl H, Kapsner T, Lüdinghausen M. v, Werdan K.. Perseveration of regional myocardial function and myocardial oxygen tension during acute ischemia in pigs: comparison of selective synchronizes suction and retroinfusion of coronary veins to synchronized coronary venous retroperfusion. *J Am Coll Cardiol* 1994; **23**:459-69.

Boekstegers P, Giehrl W, von Degenfeld G, Steinbeck G. 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 College* 1998; **31**:1525-33.

Boekstegers P, von Degenfeld G, Giehrl W, Heinrich D, Hullin R, Kupatt C, Steinbeck G, Baretton G, Middeler G, Katus H, Franz WM. Myocardial gene transfer by selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins. *Gene Ther*. 2000; **7**(3):232-40.

Burgess WH, Maciag T. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem* 1989; **58**:575-606.

Caletti F, Waugh JM, Amabile PG.. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med* 2001, **7**:425-429.

Carmeliet P, Collen D. Molcular analysis of blood vessel formation and disease. *Amer J Physiol* 1997; **42**:H2091-H2104

Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dwerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovich R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E, Keshet E. Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 1998; **394**:485-490.

Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Med* 2000; **6**:389-395.

Carmeliet P. Angiogenesis in health an disease. *Nature Med* 2003; **9**:653-660.

Chleboun JO, Martins RN, Mitchell CA, Chirila TV. bFGF enhances the development of the collateral circulation after acute arterial occlusion. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **185**:510-516.

Couper L L, Bryant S R, Eldrup-Jorgensen J, Bredenberg C E, Lindner V. Vascular endothelial growth factor increases the mitogenic response to fibroblast growth factor-2 in vascular smooth muscle cells in vivo via expression of fms-like tyrosine kinase-1. *Circulation Research* 1997; **89**:779-786.

Cuevas P, Burgos J, Baird A. Basic fibroblast growth factor (FGF) promotes cartilage repair in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; **156(2)**:611-8.

Deindl E, Buschmann I, Hoefler IE, Podzuweit T, Boengler K, Vogel S, van Royen N, Fernandez B, Schaper W. Role of ischemia and of hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit. *Circ Res.* 2001; **89(9)**:779-86

Deindl E, Hoefler IE, Fernandez B, Barancik M, Heil M, Strniskova M, Schaper W. Involvement of the fibroblast growth factor system in adaptive and chemokine-induced arteriogenesis. *Circ Res.* 2003; **92(5)**:561-8.

De Vries C, Escubedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT: The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992; **255**:989-991.

Deng CX, Wynsahw-Boris A, Shen MM, Daugherty C, Ornitz DM, Leder P. Murine FGFR-1 is required for early post-implantation growth and axial organisation. *Genes Dev* 1994; **8**:3045-3057.

Dor Y, Djonov V, Abramovitch R, Itin A, Fishman GI, Carmeliet P, Goelman G, Keshet E. Conditional switching of VEGF provides new insights into adult neovascularization and pro-angiogenic therapy. *EMBO J* 2002; **21(8)**:1939-47.

Dormandy JA, Thomas PRS: What is natural history of a critically ischemic with and without leg? In: Limb Salvage and Amputation for vascular disease, edited by Greenhalgh, Jamieson and Nicolaides. *Philadelphia;WB Saunders Co.* 1988; p. 11-26.

Esch F, Baird A, Ling N, Ueno N, Hill F, Denoroy L, Klepper R, Gospodarowicz D, Bohlen P, Guillemin R. Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; **82(19)**:6507-11.

European Working Group on Clinical Leg Ischemia: Second european consensus document on chronic critical leg ischemia. *Circulation* 1991; **84**:IV-1-IV-26.

Ferrara N, Henzel WJ: Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; **161**:851-858.

Folkman J. Therapeutic angiogenesis in ischemic limbs. *Circulation* 1998; **97**: 1108-1110.

Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 1972; **175**:409-416.

Folkman J. Tumor angiogenesis: a possible control point in tumorgrowth. *Ann Inter Med* 1975; **82**:96-100.

Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New Engl J Med* 1971; **285**:1182-1186.

Friesel RE, Maciag T. 1995. Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction. *FASEB J* 1995; **9**:919-925.

Fulton WFM. The coronary arteries, Springfield. IL: Charles C. Thomas, 1965

Furchgott RF. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ Res* 1983; **53**:557-573.

Gibson CM, Cannon CP, Daley WL, Dodge JT, Alexander B, Marble SJ, McCabe CH, Raymond L, Fortin T, Poole K, Braunwald E. TM frame count; a quantitative method of assessing coronary flow. *Circulation* 1996; **93**: 879-888.

Gimbrone Jr. MA, Nagel T, Topper JN. Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology. *J Clin Invest* 1997; **99**:1809-1813.

Glagov S, Zarins C, Giddens DP, Ku DN. Hemodynamics and atherosclerosis. Insights and perspectives gained from studies of human arteries. *Arch Pathol Lab Med* 1988; **112**:1018-1031.

Golenhofen, Physiologie heute, Urban & Fischer, 1997

Gorge G, Schmidt T, Ito BR, Pantley GA, Schaper W. Microvascular and collateral adaptation in swine hearts following progressive coronary artery Stenosis. *Basic Res Cardiol* 1989; **84**:524-535.

Gospodarowicz D, Cheng J, Lui GM, Baird A, Esch F, Bohlen P. Corpus luteum angiogenic factor is related to fibroblast growth factor. *Endocrinology* 1985; **117(6)**:2383-2391.

Gospodarowicz D, Brown KD, Birdwell CR, Zetter BR. Control of proliferation of human vascular endothelial cells. Characterization of the response of human umbilical vein endothelial cells to fibroblast growth factor, epidermal growth factor, and thrombin. *J Cell Biol* 1978; **77(3)**:774-88.

Gospodarowicz D, Greenburg G, Bialecki H, Zetter BR. Factors involved in the modulation of cell proliferation in vivo and in vitro: the role of fibroblast and epidermal growth factors in the proliferative response of mammalian cells. *In Vitro* 1978; **14(1)**:85-118.

Grossman J, Grossman W. Angiogenesis. *Cardiovasc Med* 2002; **3(3)**:138-144

Habib GB, Heibig J, Forman SA . Influence of coronary collateral vessels on myocardial infarct size in humans. Results of phase I thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) trial. *Circulation* 1991; **83**:739-746.

Hashimoto E, Ogita T, Nakakao T, Matsuoka R, Takao A, Kira Y: Rapid induction of vascular endothelial growth factor expression by transient ischemia in rat heart. *Am J Physiol* 1994; **267**:H1948-H1954.

Hata Y, Rook SL, Aiello LP. Basic fibroblast growth factor induces expression of VEGF receptor KDR through a protein kinase C and p44/p42 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *Diabetes* 1999; **48**(5):1145-1155.

Henry TD, Annex BH, Azrin MA, McKendall GR, Willerson JT, Hendel RC, Giordano FJ, Klein R, Gibson CM, Berman DS, Luce CA, McCluskey ER. Double blind, placebo controlled trial of recombinant human vascular endothelial growth factor: the VIVA trial. *J Am Coll Cardiol.* 1999; **33**: 384A

Höckel M, Burke JF Angiotropin treatment prevents flap necrosis and enhance dermal regenerations in rabbits. *Arch Surg* 1989; **124**:693-698.

Höckel M, Schlenger K, Doctrow S, Kissel T, Vaupel P. Therapeutic Angiogenesis. *Arch Surg* 1993; **128**:423-429.

Hood JD, Meininger CJ, Ziche M, Granger HJ. VEGF upregulates ec-NOS message, protein, and NO production in human endothelial cells – Rapid Communication. *Amer J Physiol* 1998; **43**:H1054-H1058.

Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW: The vascular endothelial growth factor family: Identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991; **5**:1806-1814.

Ikeda E, Achen MG, Breier G, Risau W: Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J Biol Chem* 1995; **270**:19761-19766.

Isner JM, Walsh K, Symes J, Pieczek A, Takshita S. Arterial Gene Therapy for Therapeutic Angiogenesis in Patients with Peripheral Vascular Disease. *Circulation* 1991; **91**: 2687-2692.

Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischemic limb. *Lancet* 1996; **348**:370-374.

Ito WD, Arras M, Scholz D, Winkler B, Htun P, Schaper W: Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion. *Am J Physiol* 1997; **273**: H1255-H1265.

Iyer NV, Kotch LE, Agani F. Cellular and developmetal control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Devel* 1998; **12**:149-162.

Johnson DEE, Cousens LS, Fried VA, Williams LT. Purification and complementary DNA cloning of receptor for basic fibroblast growth factor. *Science* 1989; **245**:57-60.

Johnson DEE, Williams LT. Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv Cancer Res* 1993; **60**:1-40.

Kamiya A, Togawa T. Adaptive regulation of wall shear stress to flow change in the canine carotid artery. *Am J Physiol* 1980; **239**:H14-H21.

Kauffmann GW, Röntgenfibel, Springer, 2001

Kern MJ. Angiogenesis. arteriogenesis and physiological perfusion: review of natural history and concepts. *J Intervent Cardiol* 2000; **12**:313-318.

Kopp CW, Minar E, Steiner S. Therapeutische Angiogenese bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit. *Journal für Kardiologie* 2004; **11 (3)**:79-83.

Kornowski R, Fuchs S, Leon MB, Epstein SE. Delivery strategies to achieve therapeutic myocardial angiogenesis. *Circulation* 2000; **101(4)**:454-458.

Kroll J, Waltenberger J. VEGF-A induced expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **252**:743-746.

Kroll J, Waltenberger J. A novel function of VEGF receptor-2 (KDR): Rapid release of nitric oxide in response to VEGF-A stimulation in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **265**:636-639.

Ku DD, Zaleski JK, Liu S, Brock TA. Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am J Physiol*. 1993; **265**:H586-H592.

Laham RJ, Hung D, Simons M. Therapeutic myocardial angiogenesis using percutaneous intrapericardial drug delivery. *Clin Cardiol* 1999; **22**:16-19.

Laham RJ, Sellke FW, Edelman ER, Pearlman JD, Ware JA, Brown DL, Gold JP, Simons M. Local perivascular delivery of basic fibroblast growth factor in patients undergoing coronary bypass surgery: results of a phase I randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Circulation* 1999; **100**:1865-1871.

Lazarous DF, Unger EF, Epstein SE, Stine A, Arevalo JL, Chew EY, Quyyumi AA. Basic fibroblast growth factor in patients with intermittent claudication: results of a phase 1 clinical trial. *JACC* 2000; **36(4)**: 1239-1244.

Lee R.J, M.L. Springer, W. E. Blanco-Bose, R. Shaw, P.C. Ursell, and H.M. Blau. VEGF gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression. *Circ* 2000; **102**:898-901.

Lopez JJ, Laham RJ, Stamler A, Pearlman JD, Bunting S, Kaplan A, Carrozza JP, Sellke FW, Simons M. VEGF administration in chronic myocardial ischemia in pigs. *Cardiovasc Res*. 1998; **40(2)**:272-81

Lopez JJ, Laham RJ, Carrozza JP, Tofukuji M, Sellke FW, Bunting S, Simons M. Hemodynamic effects of intracoronary VEGF delivery: evidence of tachyphylaxis and NO dependence of response. *Am J Physiol*. 1997; **273**:H1317-23

Lower R. Early science in Oxford, Oxford: Oxford University Press. 1932

Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J: Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vivo and in vitro. *Lab Invest* 1994; **71**:374-379.

Morishita R, Nakamura S, Hayashi S, Taniyama Y, Moriguchi A, Nagano T, Taiji M, Noguchi H, Takeshita S, Matsumoto K, Nakamura T, Higaki J, Ogihara T. Therapeutic angiogenesis induced by human recombinant hepatocyte growth factor in rabbit hind limb ischemia model as cytokine supplement therapy. *Hypertension* 1999; **33(6)**:1379-84.

Müller M, Hermes M, Brückmann M und Schimrigk K. Transcranial doppler ultrasound in the evaluation of collateral blood flow in patients with internal carotid artery occlusion: correlation with cerebral angiography. *Am J Neuroradiol* 1995; **16**:195–202.

Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Chen D, Symes JF, Fishman MC, Huang PL, Isner JIM. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J. Clin Invest* 1998; **101(11)**:2567-2578

Myoken Y, Myoken Y, Okamoto T, Sato JD, Kan M, McKeehan WL, Nakahara M, Takada K. Immunohistochemical study of overexpression of fibroblast growth factor-1 (FGF-1), FGF-2, and FGF receptor-1 in human malignant salivary gland tumours. *J Pathol* 1996; **178(4)**:429-36.

Nabel EG, Yang ZY, Plautz G, Forough R, Zhan X, Haudenschild CC, Maciag T, Nabel GJ. Recombinant fibroblast growth factor.1 promotes intimal hyperplasia and angiogenesis in arteries in vivo. *Nature* 1993, **362**:844-846.

Nohara R, Kambara H, Murakami T, Kadota K, Tamaki S, Kawai C. Collateral function in early acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1983; **52**:955-959.

Nugent M, Edelman E. Kinetics of basic fibroblast growth factor binding to its receptor and heparan sulfate proteoglycan: a mechanism for cooperativity. *Biochemistry* 1992; **31**:8876-8883.

Palmer LA, Semenza GL, Stoler MH, Johns RA. Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. *Am J Physiol* 1998; **274**:L212-L219.

Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **189(2)**:824-31.

Pettersson A, Nagy JA, Brown LF, Sundberg C, Morgan E, Jungles S, Carter R, Krieger JE, Manseau EJ, Harvey VS, Eckelhofer IA, Feng D, Dvorak AM, Mulligan RC und Dvorak HF. Heterogeneity of the angiogenic response induced in different normal adult tissues by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Lab Invest* 2000; **80(1)**:99-115

Physiologie des Menschen, Schmid-Thews, 1995, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg

Pu LQ, Jackson S, Lachapelle KJ, Arekat Z, Graham AM, Lisbona R, Brassard R, Carpenter S, Symes JF. A persistent hindlimb ischemia model in the rabbit. *J Invest Surg* 1994; **7(1)**:49-60.

Rakue H, Nakajima H, Katoh T, Usui M, Amemiya T, Miyagi M, Hara T, Tamura K, Sasame A, Naito Y, Nagai Y, Ibukiyama C. Low-dose basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor for angiogenesis in canine acute hindlimb insufficiency. *Jpn Circ J*. 1998; **62(12)**:933-9.

Resnick N, Gimbrone Jr. MA. Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. *FASEB J* 1995; **9**:874-882.

Rifkin DB, Moscatelli D. Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol* 1989; **109(1)**:1-6.

Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; **386**:671-674.

Rosenberg R, Shworak N, Liu J, Schwartz JJ, Zhang L. Heparan sulfate proteoglycans of cardiovascular system. Specific structures emerge but how is synthesis regulated? *J Clin Invest* 1997; **99**:2062-2070.

Rosengart TK, Patel SR, Crystal RG. Therapeutic angiogenesis: protein and gene therapy delivery strategies. *J Cardiovasc Risk* 1999; **6(1)**:29-40.

Rudland PS, Gospodarowicz D, Seifert W. Activation of guanyl cyclase and intracellular cyclic GMP by fibroblast growth factor. *Nature* 1974; **250(5469)**:741-2, 773-4.

Rutishauser W, Simon H, Stucky JP, Schad N, Nosedá G, Wellauer J. Evaluation of Roentgen cineradiography for flow measurement in models and in the intact circulation. *Circulation* 1967; **36(6)**:951-63.

Schaper J, König R, Franz D, Schaper W. The endothelial surface of growing coronary collateral arteries. Intimal margination and diapedesis of monocytes. A combined SEM and TEM study. *Virchows Arch A, Pathol Anat Histol* 1976; **370**:193-205.

Schaper W and Ito WD: Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circulation Res* 1996; **79**:911-919.

Schaper W, Buschmann I. Collateral circulation and diabetes. *Circulation* 1999; **97**:1108-1110.

Schaper W, Buschmann I, Arteriogenesis, the good and bad of it. *Cardiovasc Res* 1999; **43**:835-837.

Schaper W, De Brabander M, Lewi P. DNA synthesis and mitoses in coronary collateral vessels of the dog. *Circ Res* 1971; **28**:671-679.

Schaper W, Pasyk S. Influence of collateral flow on the ischemic tolerance of the heart following acute and subacute coronary occlusion. *Circulation* 1976; **53**:I57-I62.

Scholz D, Ito W, Fleming I. Ultrastructure and molecular histology of rabbit hindlimb collateral artery growth (arteriogenesis). *Virchows Arch Intern J Pathol* 2000; **436**:257-270.

Schoop W. and Acevedo A, Antibiotikakonzentration nach intravenöser und retrograd intravenöser Injektion. *Wiener Medizinische Wochenschrift* 1993; **143**:199-200.

Schwartz H, Leiboff RL, Katz RJ, Wasserman AG, Bren GB, Varghese PJ, Ross AM. Arteriographic predictors of spontaneous improvement in left ventricular function after myocardial infarction. *Circulation* 1985; **71**:466-472.

Semenza GL. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Develop Biol* 1999; **15**:551-578.

Shima DT, Adamis AP, Ferrara N, Yeo KT, Yeo TK, Allende R, Folkman J, D'Amore PA: Hypoxic induction of endothelial cell growth factors in retinal cells: Identification and characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF) as the mitogen. *Mol Med* 1995; **1**:182-193.

Shima DT, D'Amore PA: Hypoxic induction of vascularendothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability. *FEBS* 1995; **370**:203-208.

Shyy Y-J, Hsieh H-J, Usami S. Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemotactic protein 1 gene expression in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**:4678-4682.

Sim EK, Zhang L, Shim WS, Lim YL, Ge R. Therapeutic angiogenesis for coronary artery disease. *J Card Surg* 2002; **17**(4):350-354.

Simons M, Laham RJ. Therapeutic angiogenesis in myocardial ischemia. In: Ware JA, Simons M. *Angiogenesis and Cardiovascular Disease*. New York: Oxford University Press, 1999

Singh TM, Abe KY, Sasaki T, Zhuang YJ, Masuda H, Zarins CK. Basic fibroblast growth factor expression precedes flow-induced arterial enlargement. *J Surg Res* 1998; **77**:165-173.

Springer, Dvorak, Keshet, Lee RJ, Springer ML, Blanco-Bose. VEGF gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression. *Circulation* 2000; **102**:898-901.

Stavri GT, Zachary IC, Baskerville PA, Martin JF, Erusalimsky JD- Basic fibroblast growth factor expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 1995; **92**:11-14.

Takeshita S, Rossow ST, Kearney M, Zheng LP, Bauters C, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Time course of increased cellular proliferation in collateral arteries after administration of vascular endothelial growth factor in a rabbit model of lower limb vascular insufficiency. *Am J Pathol* 1995; **147(6)**:1649-1660.

Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearny M, Pu LQ, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JIM. J Therapeutic angiogenesis: a single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hindlimb model. *Clin Invest* 1994; **93**:662-670.

Terman BI, Dougher Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bohlen P: Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **187**:1579-1586.

Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA: The human gene for vascular endothelial growth factor: Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991; **266**:11947-11954.

Tsurumi Yukoi, Marianne Kearney, Dongfen Chen, Marcy Silver, Satoshi Takeshita, Jihong Yang, James F. Symes, Jeffrey M. Isner: Treatment of acute limb ischemia by intramuscular injection of vascular endothelial growth factor gene. *Circulation* 1997; **96**:382-388.

Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G: Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 1996; **93**:1493-1495.

Wenz W. Progress in diagnostic radiology. *Langenbecks Arch Chir* 1972; **332**:171-177.

Wiener Wochenschrift, 143. Jahrgang Heft 7/8, 1993

Yamaguchi TP, Harpal K, Henkemeyer M, Rossant J. FGFR-1 is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation. *Genes Dev* 1994; **8**:3032-3044.

Yamaguchi TP, Rossant J. Fibroblast growth factors in mammalian development. *Curr Opin Genet Dev* 1995; **5(4)**:485-491.

Yang JC, Haworth L, Sherry RM, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Steinberg SM, Chen HX, Rosenberg SA. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med* 2003; **349(5)**:427-34.

Zarins CK, Zatina MA, Giddens DP, Ku DN, Glagov S. Shear stress regulation of artery lumen diameter in experimental atherogenesis. *J Vase Surg* 1987; **5**:413-420.

Ziada AM, Hudlicka O, Tyler KR, Wright AJ. The effect of long-term vasodilatation on capillary growth and performance in rabbit heart and skeletal muscle. *Cardiovasc Res* 1984; **18**:724-732.

Ziche M. The rat and rabbit cornea assay. In: Maragoudakis M. editor, *Angiogenesis: models and clinical applications*. New York: Plenum Press, 1998, pp. 39-46

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A.	Arteria
Ad	Adenovirus
aFGF	Acidic Fibroblast Growth Factor
APV	Average Peak Velocity
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
CTFC	Corrected TIMI frame count
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eNOS	Endotheliale NO-Synthetase
ETT	Exercise tolerance test
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGF-R	FGF-Rezeptor
Flk	Fetal-liver-kinase
Flt	Fms-like-tyrosin-kinase
GMZ	Glatte Muskelzellen
HIF-1 α	Hypoxia-inducible factor 1 α
HRE	Hypoxia-responsive element
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
I.E.	Internationale Einheiten
i.v.	Intravenös
kDA	Kilo Dalton
KDR	Kinase domain region
KG	Körpergewicht
LAD	Linke anteriore Herzkranzarterie
M.	Muskulus
MBq	Mega Becquerel
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein
MHz	Megahertz
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
N.	Nervus
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid

pH	$-\log [H^+]$
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
RNA	Ribonukleinsäure
SMC	Glatte Muskelzelle
TIMI	Thrombolysis in Myocardial Infarction
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor-alpha
V.	Vena
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VPF	Vascular Permeability Factor

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Peter Boekstegers möchte ich sehr für die Überlassung des Themas und die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe danken. Die Einführung in die wissenschaftliche Arbeit auf einem sehr interessanten experimentellen Forschungsgebiet ist Herrn Prof. Dr. Boekstegers zu verdanken.

Besonderer Dank gebührt Frau Dr. Corinna Leberherz für ihren Ehrgeiz bei der Etablierung der Methode sowie bei verschiedensten wissenschaftlichen Fragen.

Dank gilt auch meinem Betreuer Herrn Dr. Georges von Degenfeld, der ebenfalls zum Gelingen der Dissertation beigetragen hat.

Allen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe möchte ich für die vielfältige Hilfe und Mühe danken, ohne die die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Diese Arbeit möchte ich meinen Eltern Waltraud und Werner Karl widmen, die mir während des gesamten Studiums und auch im Rahmen der vorliegenden Dissertation stets mit Verständnis und Unterstützung zur Seite standen.

Veröffentlichung

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in Teilen in folgender Publikation veröffentlicht worden:

Leberz C, von Degenfeld G, Karl A, Pfosser A, Raake P, Pachmayr F, Scholz D, Kupatt C, Boekstegers P. Therapeutic angiogenesis/arteriogenesis in the chronic ischemic rabbit hindlimb: effect of venous basic fibroblast growth factor retroinfusion. *Endothelium*. 2003;**10(4-5)**:257-65.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE INFORMATION

Name, Vorname:	Karl, Alexander
Geburtsdatum:	21. Dezember 1975
Geburtsort:	Augsburg
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

AUSBILDUNG

1982 – 1986	Grundschule in Augsburg
1986 – 1995	Gymnasium Augsburg bei St. Anna
Juni 1995	Allgemeine Hochschulreife

ZIVILDIENST

Sep. 1995 – Sep. 1996	Pflegehelfer auf der chirurgischen Station des Krankenhauses Haunstetten, KZVA Augsburg, Lehrkrankenhaus der LMU
-----------------------	---

STUDIUM

Mai 1997	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians- Universität in München (LMU)
März 2000	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung: Note 2
April 2002	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung: Note 2
Mai 2003	Ärztliche Prüfung: Note 1
Okt. 2000 – Feb. 2001	Ko-Assistent zum Kurs der makroskopischen Anatomie am Institut für Anatomie. Betreuung und Unterricht von 24 Studentinnen und Studenten der Vorklinik. Dozent: Prof. Dr. med. Putz

BERUFLICHE TÄTIGKEIT

Juli 2003-Okt 2004	Arzt im Praktikum, Urologische Abteilung, Klinikum Großhadern, Direktor: Prof. Dr. med. Stief
seit Okt 2004	Assistenzarzt, Urologische Abteilung, Klinikum Großhadern, Direktor: Prof. Dr. med. Stief

