

**Universitätsklinikum Ulm  
Zentrum für Innere Medizin  
Klinik für Innere Medizin II**

**Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Vinzenz Hombach**

**Die Rolle von VEGF-A beim  
Kollateralenwachstum in einem  
Autoimmundiabetes-Modell der Maus**

**DISSERTATION**

**zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm**

**Thomas Niedhammer  
Temeschburg (Rumänien)**

**2009**

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Johannes Waltenberger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Frieder Keller

Tag der Promotion: 22.01.2010

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Diabetes mellitus und periphere arterielle Verschlusskrankheit.....	1
1.2 Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese .....	2
1.3 Die VEGF-Rezeptoren .....	4
1.4 Vascular Endothelial Growth Factor-A .....	6
1.5 Diabetes mellitus und Angiogenese.....	7
1.6 Das Maus Hindlimb Modell .....	7
1.7 Der Mausstamm RIP-B7.1 .....	9
1.8 Mikrosphären .....	10
1.9 Ziele der Studie.....	11
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>12</b>
2.1 Reagenzien und Geräte.....	12
2.1.1 Reagenzien und Geräte für die Operationen.....	12
2.1.2 Reagenz und Geräte für die nuklearmedizinische Untersuchung .....	14
2.1.3 Reagenzien für die Behandlung der Versuchstiergruppen .....	14
2.1.4 Herstellung der Versuchsreagenzien .....	14
2.1.5 Reagenzien und Materialien für die Mikrosphäreninjektion.....	15
2.1.6 Reagenzien und Geräte für die Mikrosphärenanalyse .....	15
2.2 Die Versuchstiergruppen und deren Behandlungsschemata .....	17
2.2.1 Tierversuchsantrag.....	17
2.2.2 Mausstämme und Haltung .....	17
2.2.3 Einteilung der Versuchstiergruppen .....	18
2.2.4 Injektionstechnik und Wachstumsfaktorapplikation .....	18
2.3 Der experimentelle Ablauf.....	19
2.3.1 Die Operationen .....	19
2.3.2 Nuklearmedizinische Analyse und statistische Auswertung.....	21
2.3.3 Die Quantifizierung der Perfusion.....	23
2.3.4 Mikrosphäreninjektion und Gewebeentnahme .....	23
2.3.5 Mikrosphärenanalyse und statistische Auswertung.....	24
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>25</b>

3.1 Die Beeinflussung der Perfusion im Hinterlauf durch Diabetes Mellitus und protrahierte systemische VEGF-A Applikation .....	25
3.1.1 Ergebnisse der Gruppe –ppIns/-VEGF .....	26
3.1.2 Ergebnisse der Gruppe +ppIns/-VEGF .....	27
3.1.3 Ergebnisse der Gruppe –ppIns/+VEGF .....	28
3.1.4 Ergebnisse der Gruppe +ppIns/+VEGF .....	29
3.2 Übersicht der Ergebnisse der Perfusionsversuchsreihen .....	30
3.3 VEGF verbessert die Perfusion unabhängig von der Stoffwechsellage signifikant.....	31
3.3.1 Kein signifikanter Einfluss von Diabetes auf die Relative Perfusion .....	32
3.3.2 Signifikanter Einfluss von VEGF-A auf die Relative Perfusion .....	34
3.4 Große Streuung bei den Ergebnissen der Mikrosphärenuntersuchungen ..	35
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>39</b>
4.1 VEGF-A stimuliert die Hinterlaufperfusion im Autoimmundiabetes-Modell der Maus.....	40
4.2 Diabetes Mellitus als chronische Erkrankung .....	42
4.3 Das Hindlimb-Modell zur Untersuchung der Arteriogenese im Autoimmundiabetes-Modell der Maus .....	42
4.4 Methoden der Perfusionsmessung im Vergleich.....	44
4.5 Das Potential von VEGF für die Therapie der pAVK und der KHK in der Klinik .....	47
4.6 Schlussfolgerungen aus der Arbeit .....	49
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>50</b>
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>52</b>
<b>7 Danksagung.....</b>	<b>66</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Analysis of Variance between groups (Statistischer Test)
B7.1	CD80 Expressionsgen in pankreatischen $\beta$ -Zellen
C57BL/6	Bezeichnung für den Mausstamm „Black 6“
CD	Cluster of Differentiation
CT	Computertomographie
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EAD	Experimental Autoimmune Diabetes
Flk-1	Fetal liver kinase-1 (muriner VEGFR-2)
Flt-1	<i>fms</i> -like receptor tyrosine kinase-1 (VEGFR-1)
KDR	Kinase insert-domain containing receptor (humaner VEGFR-2)
KHK	Koronare Herzkrankheit
MBq	Mega Bequerel
MSA	Maus Serum Albumin
NO	Nitric Oxide, Stickstoffmonoxid
pAVK	Periphere Arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate Buffered Saline, gepufferte Kochsalzlösung
PIGF	Placenta-like Growth Factor
ppIns	Präproinsulin
RIP	Rat Insuline Promoter
RPI	Relativer Perfusionsindex
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
Tc-99m-MIBI	Hexakis (2-methoxyisobutylisonitrile)-technetium-99m
TF	Tissue factor
TK	Tyrosine-kinase
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	VEGF Rezeptor (1, 2, 3)
ZNS	Zentrales Nervensystem

# **1 Einleitung**

## **1.1 Diabetes mellitus und periphere arterielle Verschlusskrankheit**

Diabetes Mellitus ist ein Risikofaktor für die Entstehung einer pAVK. Bereits 10 Prozent aller Deutschen sind an einem Diabetes mellitus erkrankt, also über 8 Millionen Menschen. 350.000 Neuerkrankungen kommen jährlich in Deutschland hinzu (18). Immer häufiger sind bereits junge Menschen von dieser Erkrankung betroffen. Umso wichtiger wird die frühe Behandlung, um Folgeerkrankungen wie unter anderem die pAVK so lange wie möglich hinauszuzögern.

Jedes Jahr werden in Deutschland etwa 22.000 diabetesassoziierte Gliedmaßenamputationen durchgeführt (19). Meist kommen für das Entstehen der pAVK zusätzliche Faktoren wie Nikotinabusus, arterielle Hypertonie oder Hyperlipidämie hinzu. Nichtsdestotrotz bleibt der Diabetes mellitus einer der Hauptrisikofaktoren für Gefäßerkrankungen.

Daraus ergibt sich der Bedarf an optimalen Vorsorgemaßnahmen, um die Folgeerkrankungen hinauszuzögern oder zu unterbinden, aber auch die Notwendigkeit, bereits vorhandene Schäden am kardiovaskulären System bestmöglich zu therapieren (66). Durch die Förderung des Wachstums von bereits physiologisch angelegten Kollateralgefäßen können Verengungen von Hauptgefäßen umgangen werden, wodurch die Perfusion eines ansonsten ischämischen Gewebes verbessert werden kann.

## 1.2 Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese

Es werden generell drei Arten des Wachstums von Gefäßen unterschieden:

Die **Vaskulogenese** beschreibt die Entstehung eines primären Gefäßplexus aus mesodermalen Vorläuferzellen während der Embryogenese. Aus pluripotenten Stammzellen entwickeln sich zunächst Hämangioblasten (68), aus diesen entstehen in einem weiteren Schritt Angioblasten. Diese wandern schließlich in das jeweilige Gewebe ein, wo sie weiter differenzieren und Gefäßgeflechte bilden. Mehrere Studien haben gezeigt, dass das Vorhandensein von VEGF (Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor) sowie seiner beiden Rezeptoren, VEGFR-1 und VEGFR-2, entscheidend ist für eine effektive Vaskulogenese und als einer der Stimuli bei der Differenzierung des Angioblasten zu verstehen ist (13), (25).

Schon die Inaktivierung eines einzigen Allels von VEGF führt bei Mäusen auf Grund einer fehlenden Vaskulogenese zu einer intrauterinen Letalität in einer frühen Periode der Embryogenese (13).

Die **Angiogenese** beschreibt, wie die Proliferation und Migration von Endothelzellen zum Aussprossen von Kapillaren aus einem bereits bestehenden kapillären Netzwerk führt (27). Es kommt zu einer Destabilisierung bereits vorhandener Gefäße und zum Abbau der perivaskulären Matrix. Hierauf wandern Endothelzellen in diesen Bereich ein und proliferieren. Zahlreiche Zytokine, unter anderem VEGF und Angiopoietin 2 sind daran beteiligt. Die Endothelzellen lagern sich schließlich zu Gefäßstrukturen zusammen (14). Die Ischämie im minderperfundiertem Gewebe ist ein wichtiger Aktivator, welcher über zahlreiche Signalwege die Angiogenese in Gang setzt (54), (92). Wund- und Frakturheilung sind Beispiele für physiologische Prozesse, in denen die Angiogenese eine wichtige Rolle spielt. Die Vaskularisierung solider Tumoren und die proliferative Retinopathie sind Beispiele für pathologische Angiogeneseprozesse.

Die **Arteriogenese** ist ein Begriff für das Wachstum und die Reorganisation bereits bestehender Kollateralgefäße von englumigen Arteriolen in hämodynamisch funktionsfähige Arterien (95).

Kommt es in einem Gefäß zu einer relevanten Stenose, sucht sich der Blutstrom einen neuen Weg über präformierte Kollateralgefäße. Im Anschluss an einen Verschluss kommt es in diesem parallelgeschalteten Gefäßsystem zu einer partiellen Flussumkehr, einer deutlichen Erhöhung der Blutflussgeschwindigkeit und somit zu erhöhten Scherkräften, die auf die Gefäßwand einwirken. Man geht davon aus, dass es nach einer Okklusion zu einem Anstieg dieser Scherkräfte in den Kollateralgefäßen um ca. den Faktor 200 kommt (33).

Diese Kräfte haben eine Proliferationsaktivierung der Endothelzellen zur Folge. Es kommt zum Einwandern von Monozyten und zu einer erhöhten Zellteilungsrate der Endothel- und glatten Muskelzellen. Nach weiteren Proliferations- und Differenzierungsschritten sind diese Kollateralen kaum noch von Arterien zu unterscheiden. Der Kollagenanteil in der Wand der Kollateralen ist jedoch leicht erhöht (100).

Die Arteriogenese ist ausschlaggebend für eine verbesserte regionale Perfusion nach Okklusion eines zuführenden arteriellen Gefäßes. Das Ausmaß der Perfusionszunahme durch eine Kollaterale lässt sich durch das Gesetz von Hagen-Poiseuille, wonach der Blutfluss mit der vierten Potenz des Gefäßradius zunimmt, berechnen.

Gesetz von Hagen-Poiseuille:

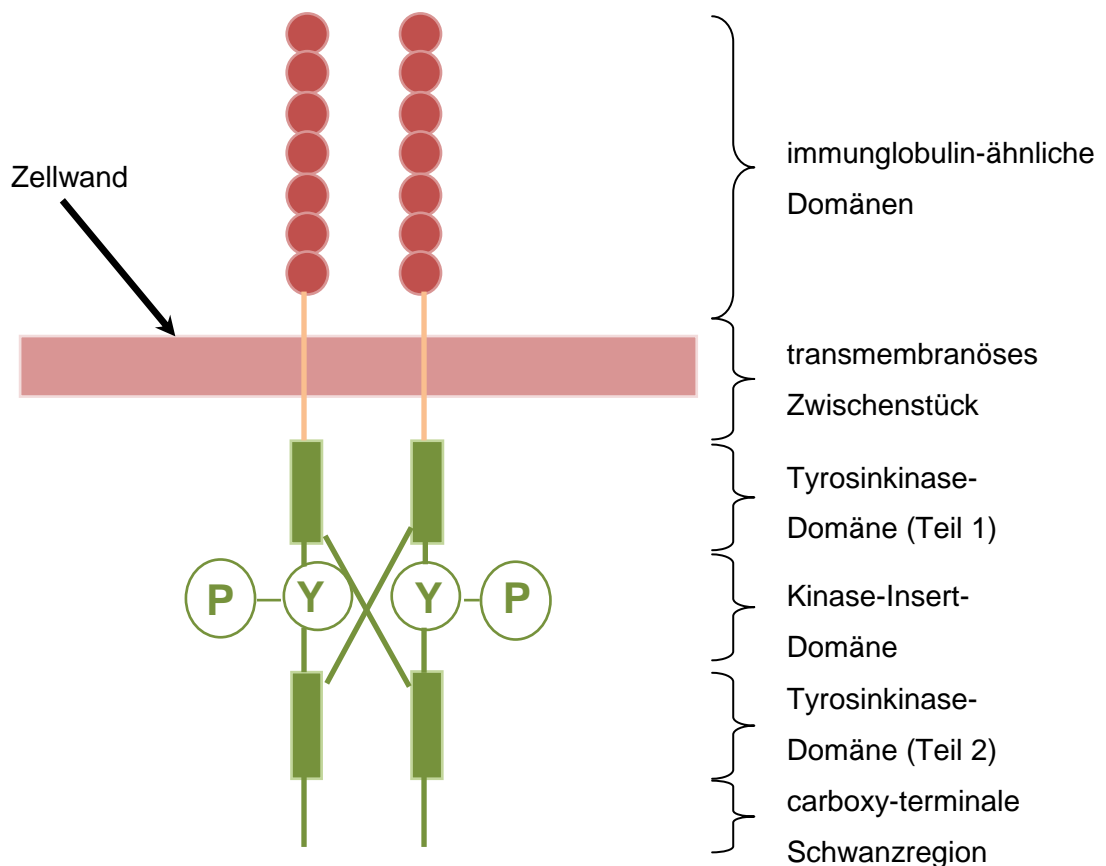
$$I = \frac{\Delta V}{\Delta t} = \frac{\pi R^4}{8\eta l} \Delta p$$

( $I$  = Stromstärke/Blutfluss,  $\Delta V$  = Durchflussvolumen,  $\Delta t$  = Durchflusszeit,  $R$  = Kapillarenradius,  $\Delta p$  = Druckdifferenz,  $\eta$  = Viskosität,  $l$  = Länge des Gefäßes)



### 1.3 Die VEGF-Rezeptoren

VEGF Rezeptoren sind im vaskulären System (Endothelzellen, Vorläuferzellen, Monozyten) und im Nervensystem exprimiert. Diese Familie von Rezeptoren vermittelt über Rezeptor-Tyrosinkinasen Signale für die Angiogenese an die Zelle. Die extrazelluläre Domäne des Rezeptors besteht dabei aus sieben dem Immunglobulin ähnlichen Domänen: einer einzelnen transmembranösen Region, einer juxtamembranösen Domäne, einer gespaltenen Tyrosinkinase Domäne und einer Carboxy-terminalen Schwanzregion (76), (86). Abbildung 1 zeigt den schematischen Aufbau eines VEGF-Rezeptors. Bindet VEGF-A an diesen Rezeptor führt dies zu einer Konformationsänderung im Rezeptor, im Anschluss zu seiner Dimerisierung und schließlich zur Autophosphorylierung an Tyrosinresten (89).



**Abb. 1: Darstellung eines schematischen Modells des Aufbaus eines Vascular endothelial growth factor (VEGF) - Rezeptors mit dessen extra- und intrazellulären Domänen. (P und Y = schematische Bestandteile der intrazellulären Kinase-Insert-Domäne)**

Im Falle des **VEGF-Rezeptors 1 (VEGFR-1)** wird die Migration von Monozyten und die Expression von Gewebsthromboplastin in Monozyten und Endothelzellen stimuliert (7). Der Rezeptor findet sich somit unter anderem auf Endothelzellen (77) sowie auf Monozyten (73).

Im Falle eines genetischen Defekts des VEGFR-1 versterben Mäuse im frühen Embryonalstadium auf Grund einer fehlerhaften Gefäßbildung (30), allerdings nicht bei funktionellen Deletionen. Bei diesen Tieren ist der Rezeptor auf der Zelloberfläche vorhanden, die Rezeptor Tyrosinkinase jedoch inaktiv.

Dem **VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR-2)** wird eine wichtige Funktion in der Angiogenese zugesprochen. Bereits die isolierte Aktivierung des VEGFR-2 (zum Beispiel durch VEGF-E) ist ausreichend, um die Gefäßneubildung zu induzieren (56). Während bei Mäusen mit einem Gendefekt des VEGFR-1 eine gestörte Gefäßbildung stattfindet, kommt es bei Knock-out-Tieren mit Defekt des VEGFR-2 nicht einmal zur Bildung von Endothelzellen. Diese Mäuse sterben intrauterin bereits am Tag 7,5 (75). Über den VEGFR-2 werden unter anderem Funktionen wie die Proliferation und Migration (93) von Endothelzellen, die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (48), die vaskuläre Permeabilität und die Genexpression induziert (47), (106). VEGFR-2 wird im Gegensatz zu VEGFR-1 nur auf Endothelzellen und deren Vorläuferzellen exprimiert, nicht auf Monozyten.

Der VEGFR-2 spielt also zweifellos eine wichtige Rolle in der Angiogenese, (55) vor allem auch bei der Tumorangio-genese (28), weshalb heute in der Tumorthherapie häufig VEGF-Inhibitoren zum Einsatz kommen. Durch die Bindung an VEGF wird verhindert dass dieses an seine Rezeptoren binden kann. Beispiele hierfür wären die Chemotherapie des Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms (72) und des kolorektalen Karzinoms (3). Ansatzpunkt ist hier jeweils die Inhibition der Tumorangio-genese (57).

Zuletzt sei noch **VEGF-Rezeptor 3 (VEGFR-3)** erwähnt, welcher sowohl in lymphatischen Gefäßen als auch in Tumorgefäßen exprimiert wird und an deren Entstehung beteiligt ist (41).

## 1.4 Vascular Endothelial Growth Factor-A

Die Familie der VEGF Moleküle umfasst mittlerweile folgende Vertreter: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F sowie PlGF-1 und -2 (83), (87), (59). VEGF-F ist hierbei das zuletzt entdeckte Molekül (Erstbeschreibung unter dieser Bezeichnung 2005) und fand sich als exogener Vertreter vor allem in Schlangengift. Hier fehlt die C-terminale Heparin-bindende Domäne der intrinsischen VEGF-Vertreter. Es bindet fast ausschließlich an VEGFR-2 und ist ein noch potenterer Induktor der Proliferation vaskuloendothelialer Zellen in vitro als VEGF-A (103), (104), (102).

Wir beschränken uns in unseren Studien auf VEGF-A. Dieses ist ein homodimeres Glykoprotein. Durch posttranskriptionelle Modifikationen (splicing) der mRNA kann das VEGF-A Gen mehrere Isoformen kodieren. Je nach Anzahl der Aminosäuren bezeichnet man die verschiedenen VEGF-A Isoformen VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF 183, VEGF189 und VEGF206 (27). Das Isomer VEGF-A165 hat hierbei hinsichtlich der Bioverfügbarkeit und Affinität die besten Eigenschaften und bindet sowohl an VEGFR-1 als auch an VEGFR-2 (34), weshalb es in unseren Untersuchungen Verwendung findet. Außerdem ist es der potenteste Stimulator der Angiogenese im Maus-Modell (4)

## 1.5 Diabetes mellitus und Angiogenese

Nun soll auf die Beeinflussung der Angiogenese durch eine diabetische Stoffwechsellaage eingegangen werden. Es konnte gezeigt werden, dass hohe Blutglukosewerte über die Induktion einer Hypoxie in der Retina die vermehrte Produktion von VEGF-A bewirken. Dies führt zu überschießender Angiogenese mit nachfolgender Visuseinschränkung, einer typischen Veränderung bei der diabetischen Retinopathie (17). In weiteren Untersuchungen an Ratten konnte gezeigt werden, dass eine diabetische Stoffwechsellaage eine signifikante Reduktion der VEGF-A Konzentration in deren Embryonen zur Folge hatte. Dies führte zu einer erhöhten Missbildungsrate. Ursächlich hierfür scheint eine eingeschränkte Angiogenese zu sein (71).

Diese Beispiele suggerieren einen engen Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus und der Angiogenese. Bleibt die Frage, ob eine diabetische Stoffwechsellaage Einfluss auf die Effektivität von VEGF-A hat oder anders gefragt: hat VEGF-A einen Einfluss auf die Angiogenese unter einer diabetischen Stoffwechsellaage?

## 1.6 Das Maus Hindlimb Modell

Es gibt in der Primärliteratur vielfältige Tiermodelle zur Erforschung der Angiogenese *in vivo* in jeweils unterschiedlichen Organen. Als aktuelle Beispiele seien Untersuchungen an Ratten (36), Schweinen (15), Hunden (51) und Kaninchen (96) genannt. Die kleineren Säuger gewinnen aus logistischen und finanziellen Gründen zunehmend an Popularität.

Bei der Erforschung von Gefäßumbauprozessen gab es aus anatomischen Gründen bei den Kleintier-Modellen Diskussionen in Fragen der Ligaturlokalisation, Operationsweise sowie in der qualitativen und quantitativen Auswertung der Durchblutung. Von Vorteil hingegen war das Vorhandensein von

genetisch veränderten Tieren, wodurch ein großes Spektrum an wissenschaftlichen Fragestellungen erforscht werden konnte.

Für die Klärung der Rolle des Diabetes mellitus in der Arteriogenese wurde in dieser Arbeit das Maus-Hindlimb-Modell verwendet (4), (5). In jenem Modell kamen entweder transgene oder genetisch veränderte knock-out-Mäuse zur Anwendung. Es wurde während der ersten Operation die rechte Arteria femoralis in der Leistenbeuge an immer derselben Lokalisation mittels zwei Nähten ligiert. Es wurde dabei sehr gewebeschonend vorgegangen, um eine Verletzung des umliegenden Gewebes oder Gefäß-Nerven-Bündels zu vermeiden.

Im weiteren Verlauf wurden die Tiere während der nächsten vier beziehungsweise sieben Tage in ihren Käfigen auf eventuell auftretende Lähmungserscheinungen oder Nekrosen im Hinterlaufbereich hin beobachtet. Weiterhin wurde das Einzelverhalten, wie z.B. sozialer Rückzug oder Adynamie, aber auch die Dynamik innerhalb der Gruppe, wie z.B. Verstoßung oder Biss Einzelner beobachtet, um bei Veränderungen adäquat darauf reagieren zu können. Eventuell auftretende Schmerzreaktionen und Infektionen wurden ebenso beobachtet, da postoperativ eine möglichst schmerzfreie, artgerechte und physiologische Situation erreicht werden sollte.

Schließlich wurde am vierten bzw. siebten postoperativen Tag eine Perfusionsszintigraphie des Hinterlaufs bei den Mäusen durchgeführt. Anschließend wurden sie auf Grund der Reststrahlung eine Nacht in Räumen der Nuklearmedizin verbracht, um am nächsten Tag der finalen Operation unterzogen zu werden. Hierbei wurden Gewebelöcke von der Wade und dem Operationsgebiet entnommen und schockgefroren, um spätere histologische Untersuchungen durchführen zu können. Ebenso wurden Fotografien des Operationsgebietes und des gegenüberliegenden korrespondierenden Areales angefertigt, um makroskopische Veränderungen zu dokumentieren.

## 1.7 Der Mausstamm RIP-B7.1

Für unsere Untersuchungen wurde ein Mausstamm benötigt, der im Rahmen der Adoleszenz durch genetische Veränderungen eine diabetische Stoffwechsellage erreicht. Diese Eigenschaft fand sich in einem Autimmundiabetes(EAD)-Modell basierend auf einer Mauszüchtung namens RIP-B7.1. Diese ist eine transgene Mauslinie mit C57BL/6-Hintergrund. B7.1 bezeichnet ein in diesem Stamm enthaltenes Gen, das gesteuert durch den Ratten-Insulinpromoter (rat insulin promoter, RIP), an die pankreatischen Betazellen gekoppelt wurde. Es kodiert für ein T-Zell stimulierendes Molekül in der Wand der pankreatischen Betazellen. Allein durch das Vorhandensein dieses Gens entwickeln die Tiere auch nach längerer Zeit keinen spontanen Diabetes. Werden diese Tiere jedoch im Alter von 4 bis 6 Wochen mit vektorvermittelter Präproinsulin-DNS geimpft entwickeln sie im Mittel nach 39 Tagen einen Diabetes mellitus (44). Durch die Impfung werden autoreaktive präproinsulinspezifische CD8 T-Zellen induziert, die dann mit dem B7.1 exprimierenden pankreatischen Zielgewebe wechselwirken und so zu einer Zerstörung der Betazellen führen (45).

Um den Zeitpunkt der Entwicklung einer Hyperglykämie zu erfassen, wurden bei diesen Tieren wöchentliche Kontrollen des Uringlukosegehalts durchgeführt. Wurde eine Glukosurie festgestellt, folgte zur Verifikation noch eine Blutzuckermessung. Bei einem Glukosewert von  $\geq 250$  mg/dl ( $\geq 13.8$  mmol/l) galten sie als diabeteskrank und wurden unverzüglich den Operationen unterzogen. Diese Diabetesentwicklung ist charakterisiert durch eine diffuse Infiltration der pankreatischen Inselzellen durch CD4 und CD8-T-Zellen und einen schweren Insulinmangel (44). Der RIP-B7.1 Mausstamm ist etabliert und fand bereits in vielen Studien die ein EAD erforschten Anwendung (64), (101), (63), (20). Einige der Tiere entwickelten eine Polyurie und Polydipsie.

Als Kontrollgruppe dienten die Tiere vom Wildtyp, also die nicht-geimpften C57BL/6 Mäuse. Diese wurden im selben Alter (im Mittel 12 Wochen) wie die Verumgruppen operiert.

## 1.8 Mikrosphären

Frühe Beschreibungen einer wissenschaftlichen Verwendung von Mikrosphären oder Mikrohohlkugeln zur Untersuchung der Perfusion und Blutzirkulation gehen auf das Jahr 1969 zurück (43), (91). Das zu Grunde liegende Prinzip findet bis heute Verwendung. Es werden unterschiedlich aufgebaute Molekülaggregate eines bestimmten Durchmessers (zwischen 1 µm und 100 µm) in die Blutzirkulation eingebracht. Die Materialien variieren je nach Verwendungszweck und Hersteller. Es finden sich anorganische (Metalle, Glas, Keramik), organische (Polystyrole, Melamin, Polylaktide), magnetische oder radioaktiv markierte Stoffe. Meist werden Sphären der Größe 15 µm angewandt. Auf Grund ihrer Ausmaße verfangen sie sich in den präkapillären Arteriolen. Zur Auswertung muss das Zielgewebe entnommen, aufgearbeitet und mit entsprechenden Maßnahmen ausgewertet werden. Dies erfordert vor allem bei Kleintieren meist den Tod des Tieres. Man erhält also lediglich eine Momentaufnahme der Perfusion. Gemessen wird die Anzahl der Partikel pro Gewichtseinheit des Gewebes. Längsschnittstudien können zum Beispiel durchgeführt werden, indem unterschiedlich markierte Mikrosphären zu unterschiedlichen Zeiten injiziert werden.

Diese Methode der Perfusionsmessung ist etabliert und weit verbreitet. Wir verwendeten für unsere Studien fluoreszierende Mikrosphären, deren Fluoreszenzintensität über die Fluoreszenzspektrometrie bestimmt wurde.

## 1.9 Ziele der Studie

Aufbauend auf bisherige Daten sollte in der vorliegenden Arbeit die funktionelle Relevanz des Vascular Endothelial Growth Factor-A in Bezug auf die Arteriogenese *in vivo* an einem Autoimmundiabetes-Modell der Maus untersucht werden. Hierzu wurden genetisch veränderte Mäuse, die im Verlauf ihrer Adoleszenz durch Impfung mit Präproinsulin einen Autoimmundiabetes entwickelten, verwendet. Mit Hilfe eines etablierten Maus-Hindlimb-Modells (5) sollte die Perfusion nach einer Ligaturoperation im Hinterlauf gemessen und ausgewertet werden. In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob in diesem Modell eine Perfusionsmessung auch durch fluorospektrometrische Konzentrationsmessung zuvor injizierter Mikrosphären gelingt.

Folgende **Hypothesen** wurden vor Arbeitsbeginn formuliert:

1. Das Kollateralenwachstum und damit die Durchblutung der rechten Extremität nach Ligatur der A. Femoralis ist bei den Tieren mit Autoimmundiabetes gegenüber den Tieren vom Wildtyp eingeschränkt.
2. Durch die systemische Applikation von VEGF-A über eine Woche kann das Kollateralenwachstum und damit die Durchblutung nach Ligatur signifikant gesteigert werden, egal ob ein Autoimmundiabetes vorliegt oder nicht.
3. Eine quantitative Perfusionsmessung durch Mikrosphärenkonzentrationsbestimmung im Hinterlauf von Mäusen liefert valide reproduzierbare Ergebnisse.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Reagenzien und Geräte

#### 2.1.1 Reagenzien und Geräte für die Operationen

##### Narkose

NaCl (Isotonische Kochsalzlösung)	Fresenius, Bad Homburg
Ketanest S <sup>®</sup> (Ketamin)	Parke-Davis/Pfizer, Karlsruhe
Rompun <sup>®</sup> 2% (Xylazin)	Bayer, Leverkusen

##### Operationsgeräte

Operationsmikroskop OP-MI.1	Zeiss, Jena
Elektrorasierer	Contura <sup>®</sup> Wella, Darmstadt

##### Operationsbesteck und Zubehör

Mikro-Pinzette	Best.Nr.: BD 331 R, Aeskulap, Tuttlingen
Müller-Mikro-Pinzette	Best.Nr.: FM 001 R, Aeskulap, Tuttlingen
Mikro-Knüpppinzette	Best.Nr.: FD 280 R, Aeskulap, Tuttlingen
Mikro-Knüpppinzette	Best.Nr.: FD 285 R, Aeskulap, Tuttlingen
Mikro-Nadelhalter	Best.Nr.: FD 242 R, Aeskulap, Tuttlingen
Mikro-Federschere mit Flachgriff	Best.Nr.: OC 498 R, Aeskulap, Tuttlingen
Mikro-Federschere mit Flachgriff	Best.Nr.: FD 022 R, Aeskulap, Tuttlingen
Ligaturschere	Best.Nr.: BC 295 W, Aeskulap, Tuttlingen
Chirurgische Schere	Best.Nr.: BC 320 R, Aeskulap, Tuttlingen

Kanülen	Microlance 3, 27 GA $\frac{3}{4}$ 0,4x19, Nr.20
	Microlance 3, 30 GA $\frac{1}{2}$ 0,3x13, Nr.1
	Microlance 3, 25 GA 1 0,5x25 Nr.18
	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Steriles Nahtmaterial	Prolene <sup>®</sup> 7-0, Ethicon GmbH, Norderstedt
1 ml Spritzen	Plastipak <sup>®</sup> , Becton Dickinson Labware, Heidelberg
2 ml Spritzen	Plastipak <sup>®</sup> , Becton Dickinson Labware, Heidelberg
24 G Katheter	Insyte <sup>®</sup> 24 G x 0.75, Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Sterile Operationshandschuhe	Peha-taft <sup>®</sup> Powderfree, Hartmann, Heidenheim

## 2.1.2 Reagenz und Geräte für die nuklearmedizinische Untersuchung

### Reagenz

Hexakis(2-methoxyisobutylisonitrile) -technetium-99m (TC-99m-MIBI)	Cardiolite <sup>®</sup> , DuPont Pharma, Bad Homburg
---	---

### Gerät und Software

Gamma-Kamera	Basicam <sup>®</sup> Siemens, München
ICON Software Packet (Bildauswertung)	Siemens, München

## 2.1.3 Reagenzien für die Behandlung der Versuchstiergruppen

PBS Dulbecco`s	GIBCO™, Invitrogen Corporation, Paisley, UK
Maus Serum Albumin	Sigma , Albumin Mouse LOT 49F93112
VEGF-A	ReliaTech, Receptor Liagand Technologies GmbH Braunschweig, Deutschland

## 2.1.4 Herstellung der Versuchsreagenzien

### Injektionslösung der Kontrollgruppe

Allen Tieren wurde als Trägersubstanz PBS mit 0,1% Maus Serum Albumin (MSA) verabreicht. Zunächst wurde eine 0,5 % Lösung aus PBS und MSA angesetzt. Diese wurde bei 4°C gelagert. Vor der Injektion wurde die Lösung mit PBS auf 0,1% verdünnt und 0,9 ml davon blasenfrei in einer Spritze aufgezogen. Das Volumen einer Injektion betrug 200 µl. Die Injektionslösung wurde unter sterilen Bedingungen abgefüllt.

### Injektionslösung für die Verum-Gruppe

VEGF-A wurde in einer Lösung bei einer Konzentration von 522 ng/ µl bei –80°C aufbewahrt. Um die Lösung weiterverarbeiten zu können wurde sie aufgetaut. Die Aufbereitung erfolgte unter sterilen Bedingungen. Als Grundlage für die Injektionslösung diente die zuvor beschriebene 0,1% MSA/ PBS Lösung. Die Dosis für die Einzelinjektion betrug 500 µg VEGF-A. Dies resultiert in einem VEGF-A Serumspiegel von etwa 250 µg/ ml bei einem durchschnittlichen Gesamtblutvolumen von 2ml pro Maus. Für jede 1ml Spritze wurden 0,9 ml 0,1%MSA/ PBS Lösung mit einem VEGF-A Gehalt von 2250 µg hergestellt. Dies reichte für vier Injektionen zu je 200 µl, wobei 20% Verlust eingerechnet waren. Die Spritzen wurden bis zur Applikation bei 4°C auf bewahrt.

### **2.1.5 Reagenzien und Materialien für die Mikrosphäreninjektion**

Pink Fluorescent Microspheres 15 µm	Triton, F-8834, UK
1 ml Spritzen	Plastipak <sup>®</sup> , Becton Dickinson Labware, Heidelberg
24 G Katheter	Insyte <sup>®</sup> 24 G x 0.75, Becton Dickinson Labware, Heidelberg

### **2.1.6 Reagenzien und Geräte für die Mikrosphärenanalyse**

#### Reagenzien :

Kaliumhydroxid Pellets	BDH, UN1813
Ethanol 96%	Fresenius, Bad Homburg
Triton X-100	Triton, T-8532, UK
Diethylen-Glycol-Monoethyl-Ether-Acetat	Fluka, 32240
Tween-20 bzw. 80	Sigma, P-1379, UK
Destilliertes Wasser	Fresenius, Bad Homburg

Geräte:

Vortexer = Röhrchenschüttler

Schütt-Biotech, Göttingen

Mikropipetten

Brand, Wertheim

Fluorospektrometer

Perkin Elmer LS50B

Lösungen:

*Kaliumhydroxid/Ethanol:*

Es wurden 129 g Kaliumhydroxid in 200ml Wasser gelöst und 800 ml Ethanol 96% sowie 10 ml Tween 20 bzw 80 hinzugegeben.

*1% Triton X-100:*

Es wurden 10 ml Triton X-100 in 1 Liter Wasser gelöst.

## **2.2 Die Versuchstiergruppen und deren Behandlungsschemata**

### **2.2.1 Tierversuchsantrag**

Sämtliche Versuche fanden mit Genehmigung des Regierungspräsidiums Baden-Württemberg gemäß des seit 1998 geltenden Tierschutzgesetzes statt. Die Genehmigung des Tierversuchsantrags mit der Nummer 666 erfolgte entsprechend der Richtlinien im Jahre 1999.

### **2.2.2 Mausstämme und Haltung**

Bei den verwendeten Tieren handelte es sich um Mäuse aus dem Stamm RIP-B7.1 beziehungsweise dem Wildtyp C57BL/6. Diese waren zum Zeitpunkt der Operation zwischen 10 und 13 Wochen alt und wogen zwischen 26 g und 30 g.

Sie entstammten der Zucht des Tierforschungszentrums der Universität Ulm. Die Tiere wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen unter Aufsicht des Tierforschungszentrums Ulm gehalten. Die Mäuse lebten für die Dauer der Experimente in Fünfergruppen in Typ II (350 cm<sup>2</sup>) Käfigen in einem strengen 12 Stunden Hell/ Dunkel Rhythmus.

### 2.2.3 Einteilung der Versuchstiergruppen

Die Tiere wurden in 4 Gruppen eingeteilt: zwei Gruppen mit Autoimmundiabetes und zwei Gruppen mit Mäusen vom Wildtyp.

**Tabelle 1: Aufstellung der Versuchstiergruppen (VEGF = vascular endothelial growth factor)**

Gruppe 1	Kein Diabetes, Kontroll-Injektionen	n=11
Gruppe 2	Diabetes, Kontroll-Injektionen	n=11
Gruppe 3	Kein Diabetes, VEGF-A Injektionen	n=11
Gruppe 4	Diabetes, VEGF-A Injektionen	n=13

### 2.2.4 Injektionstechnik und Wachstumsfaktorapplikation

Die VEGF-A- bzw. die PBS/ MSA Lösung wurden jeweils in eine der vier Schwanzvenen der Mäuse injiziert. Hierfür wurde die Maus in die Injektionsvorrichtung des Tierforschungszentrums eingebracht. Anschließend wurde der Schwanz der Maus etwa 60 s lang in lauwarmem Wasser aufgewärmt. Die Injektionsstelle wurde mit Alkohollösung desinfiziert und ein Bolus von 0,2 ml in eine der Schwanzvenen verabreicht. Die VEGF-A-Lösung bzw. Kontroll-Lösung wurde täglich um 8 Uhr und um 18.00 Uhr appliziert. Die erste Injektion erfolgte direkt im Anschluss an die Ligatur der Arterie, die nächste am Abend desselben Tages um 18.00 Uhr. In den folgenden Tagen wurde nach dem oben beschriebenen Injektionsschema verfahren. Der Versuchszeitraum erstreckte sich über insgesamt sieben Tage, wobei der Operationstag als Tag 0 bezeichnet wurde und alle darauf folgenden Tage als postoperative Tage veranschlagt wurden.

## 2.3 Der experimentelle Ablauf

### 2.3.1 Die Operationen

Jegliche an den Mäusen durchgeführten Operationen fanden vormittags im Eingriffsraum des Tierforschungszentrums sowie in den Laborräumen der Abteilung Innere Medizin 2 statt. Alle hierfür benutzten Instrumente wurden in der Zentralsterilisation des Universitätsklinikums nach dem für Operationsbesteck üblichen Schema dampfsterilisiert. Hierfür wurde alternierend eine Über- und Unterdruckinkubation mit einer Mindestzeit von sieben Minuten bei 134°C Dampftemperatur durchgeführt. Bis zum Gebrauch wurden die Instrumente und Operationstücher steril in Folie verschweißt.

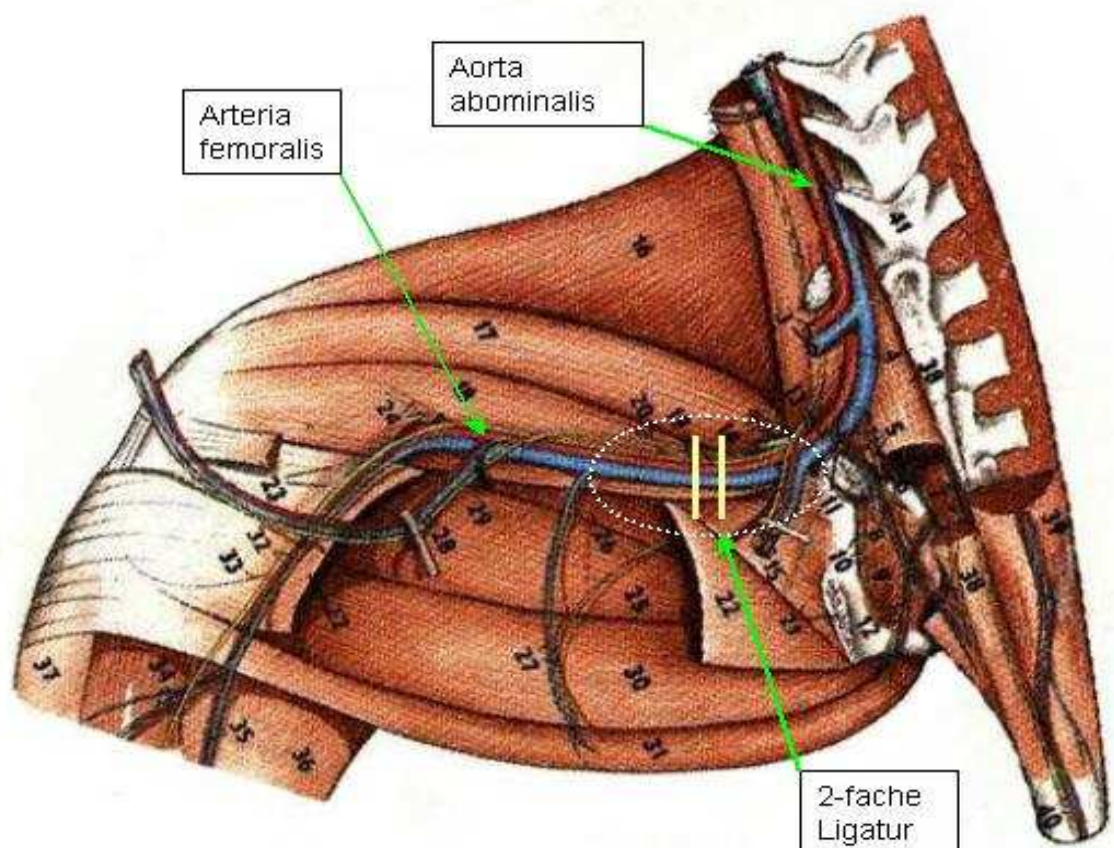
Bei allen Operationen sowie bei der nuklearmedizinischen Untersuchung wurden die Versuchstiere narkotisiert. Als Narkosemittel diente eine Kombination aus Ketamin (Ketanest S<sup>®</sup>) und Xylazin (Rompun<sup>®</sup> 2%), welche mit 0,9%iger NaCl-Lösung verdünnt wurde. Die Dosis betrug für Ketamin 96 mg/ kg Körpergewicht und für Xylazin 15 mg/ kg Körpergewicht. Dieses Gemisch wurde mit NaCl-Lösung auf 300 µl zur leichteren Applikation hochverdünnt und dann den Mäusen als Bolus intraperitoneal verabreicht.

Die Narkosetiefe wurde durch Zwischenzehen- und Schwanzreflexauslösung überprüft. Nachdem die Maus vollständig narkotisiert war (etwa 3-5 min nach Applikation), wurde sie auf dem Rücken liegend fixiert. Mit einem Elektrorasierer (Contura<sup>®</sup>, Wella) wurde ein etwa 2 cm<sup>2</sup> messendes Areal beidseitig inguinal freirasiert. Danach wurde die rechte Leiste mit 95%igem Ethanol gründlich desinfiziert. Alle nun folgenden Schritte erfolgten unter dem Operationsmikroskop. Beidseitig ließ sich unter dem Mikroskop der Gefäßverlauf der *Vena femoralis* durch die Haut verfolgen. Es wurde rechts inguinal eine kleine Hautfalte mit einer Pinzette angehoben und die Haut mit einer Schere in etwa 5 mm Länge eröffnet. Die nun sichtbare Muskelfaszie der Adduktorengruppe wurde stumpf durchtrennt, wodurch *Arteria* und *Vena femoralis* mit ihren Abgängen sowie der begleitende *Nervus ischiadicus* frei lagen. Im nächsten Schritt wurden die Abgänge der *Arteria femoralis* dargestellt. Zwischen dem Abgang der *Arteria caudalis femoris* und der



*Arteria saphena* wurde mit einer stumpfen Pinzette die *Arteria femoralis* aus den umgebenden Strukturen (*Nervus ischiadicus* und *Vena femoralis*) herausgelöst und von perivasalem Fettgewebe atraumatisch befreit. Die Ligatur erfolgte nun zwischen der Aufspaltung der *Arteria femoralis* in die *Arteria saphena* und *Arteria poplitea* und dem Abgang der *Arteria caudalis femoris* mit einem sterilen Faden (Prolene® 7-0, Ethicon). Distal der ersten Ligatur wurde in 1-2 mm Abstand eine zweite Ligatur gesetzt um so einen vollständigen Verschluss des Gefäßes garantieren zu können (siehe Abb. 2). Die übrigen umliegenden Strukturen wurden in ihrem Ausgangszustand belassen. Nach der zweiten Ligatur wurde die Wunde mit 0,9%iger Kochsalzlösung sorgfältig ausgespült und im Anschluss daran mit drei bis vier Einzelknopfnähten verschlossen. Als Nahtmaterial wurde hierzu wieder Prolene® 7-0 von Ethicon verwendet.

Bis zum vollständigen Abklingen der Narkose wurde die Maus beobachtet und mit Hilfe einer Wärmematte vor Unterkühlung geschützt.



**Abb. 2 Darstellung der rechten hinteren Extremität der Maus. Die Arteria femoralis wurde an der markierten Stelle ligiert. Nerv und Vene wurden belassen (97).**

### 2.3.2 Nuklearmedizinische Analyse und statistische Auswertung

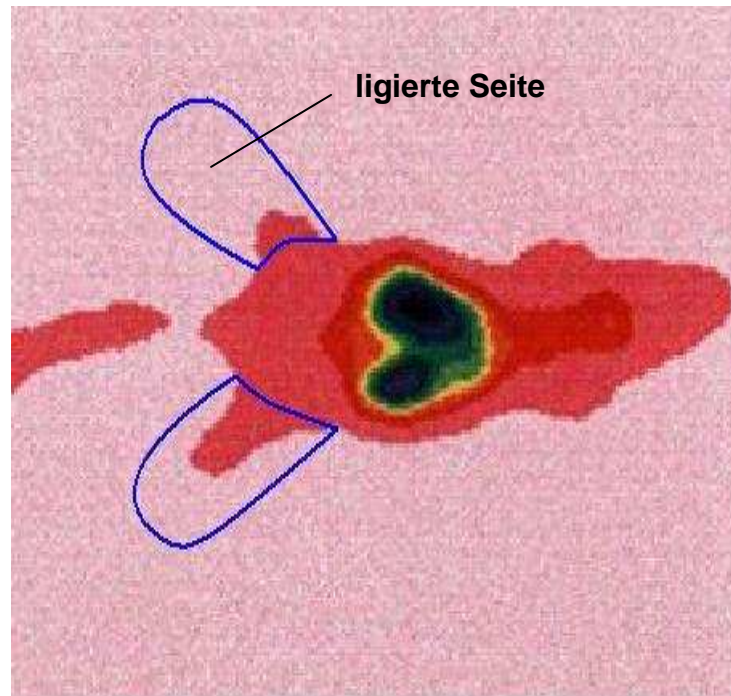
Die Untersuchung fand für alle Tiere am siebten postoperativen Tag in der Nuklearmedizinischen Abteilung statt. Nach erneuter Narkotisierung der Maus nach dem bei den Operationen verwendeten Narkoseschema (Ketamin (Ketanest S®) und Xylazin (Rompun® 2%)) wurden die Schwänze der Tiere, mit dem Ziel der Vasodilatation in diesem Bereich, in warmes Wasser gehalten. Nach Desinfektion der Einstichstelle wurde Hexakis(2-methoxyisobutylisonitrile)-technetium-99m (Technetium-99m-MIBI) mit einer Aktivität von 50 MBq als Bolus von 200 µl intravenös in eine der dilatierten Schwanzvenen injiziert. Technetium-99m-MIBI reichert sich je nach Durchblutungssituation unterschiedlich stark in den Geweben an.

Nach einer Minute wurde die Maus auf dem Bauch liegend auf der Gammakamera mit Klebestreifen fixiert. Der Abstand von einem Hinterlaufende zum anderen betrug dabei jeweils genau 8 cm.

Es folgte eine zehnmünütige Szintigraphie. Anschließend wurde die Maus bis zum Erwachen überwacht und wieder in den Käfig gesetzt. Die Daten wurden auf dem System ICON® gesammelt und mit der Anwendung „Region-Ratio“ dargestellt und ausgewertet. Mit diesem Programm wurden die zwei hinteren Extremitäten eingekreist und die in den so entstandenen Messbereichen (=Region Of Interest) gemessene Anzahl der radioaktiven Zerfälle des Technetiums verglichen. Dabei wurde streng darauf geachtet, dass die markierten Bereiche nur die Extremitäten selbst und nicht Teile des Rumpfes umfassen (s. Abb. 3). Das Festlegen der Messbereiche wurde von drei Personen überprüft. Erst nach Konsens über die richtige Position des Messbereiches wurde die Berechnung der Daten gestartet. Gemessen wurde die Anzahl der Zerfälle in einem Zeitraum von zehn Minuten. Es fand sich als Messergebnis der relative Perfusionsindex (RPI):

$$\text{Relativer Perfusionsindex} = \frac{\text{Anzahl der Zerfälle auf der ligierten Seite}}{\text{Anzahl der Zerfälle auf der nicht-ligierten Seite}}$$

Die erhaltenen Werte wurden einer statistischen Auswertung mittels ANOVA-Testung, unterzogen. So wurden die Unterschiede bzw. Signifikanzniveaus, der jeweiligen zu untersuchenden Gruppen errechnet. Diese Auswertung erfolgte mit freundlicher Unterstützung des Instituts für Biometrie der Universität Ulm.



**Abb. 3: Durch eine Gamma-Kamera erzeugtes Bild einer Maus nach Injektion von Tc-99m-MIBI (Hexakis 2-methoxyisobutylisonitrile-technetium-99m). Die jeweils zu messenden Areale sind blau umrandet. Die Leber und Nieren zeigen auf Grund der hohen Durchblutung eine deutliche verstärkte Signalanreicherung. Blau umrandet sind die beiden Messareale. Die operierte rechte Extremität (ligierte Seite, im Bild oben) zeigt eine geringere Anreicherung als die nicht-operierte Gegenseite.**

### **2.3.3 Die Quantifizierung der Perfusion**

Die so ermittelten Perfusionsindizes sind mitsamt der Rohdaten (Zerfälle pro Messareal) im Kapitel 3 aufgelistet. Es findet sich zusätzlich der errechnete Median, der Mittelwert und die jeweilige Standardabweichung. Ligiert steht hierbei für die Zerfälle auf der rechten operierten Extremität. Nicht-Ligiert für die Zerfälle der linken nicht operierten Extremität.

### **2.3.4 Mikrosphäreninjektion und Gewebeentnahme**

Die Mikrosphärenapplikation und die darauf folgende Gewebeentnahme erfolgte am achten postoperativen Tag. Die gesamte abschließende Operation erfolgte unter dem Operationsmikroskop. Die Mäuse wurden erneut mit einer Kombinationlösung aus Ketamin (Ketanest S®) und Xylazin (Rompun® 2%) gewichtsabhängig narkotisiert. Nach der Narkotisierung der Maus wurde sie erneut auf dem Rücken liegend fixiert und das Bauch- und Thoraxfell großzügig längs eröffnet. Anschließend wurde durch einen Oberbauchquerschnitt entlang des Rippenbogens das Peritoneum eröffnet. Der jetzt gut zugängliche Thorax wurde durch eine mediane Sternotomie eröffnet und gespreizt. Das nun freiliegende Herz wurde mit einem Katheter (Insyte® 24 G, Becton Dickinson) linksventrikulär punktiert. Daraufhin wurde die Führungsnadel zurückgezogen und durch das pulssynchrone Aufsteigen des Blutes die korrekte Lage des Katheters überprüft. Die vorbereitete Mikrosphärenlösung (250 µl entsprechend ca. 250 000 Mikrosphären) wurde nun über den Katheter in den linken Ventrikel injiziert.

Abschließend wurden beide Hinterläufe der Maus vom Fell befreit und der gesamte Unterschenkel auf Höhe des Kniegelenks amputiert. Des Weiteren wurden beide Lungenflügel entfernt, um in der Auswertung eine eventuelle Fehlinjektion in den rechten Ventrikel mit konsekutiver Mehranreicherung in der Lunge feststellen zu können. Beide Unterschenkel und die Lunge wurden in separaten Probenröhrchen verstaut und tiefgefroren.

### 2.3.5 Mikrosphärenanalyse und statistische Auswertung

#### *Tag 1:*

Die Gewebeproben wurden in ein Filtrerröhrchen eingebracht, welches zuvor im Leerzustand gewogen worden war. Dann wurde mittels einer Feinwaage das genaue Gewicht der Proben bestimmt. Im Anschluss wurde das Gewebe in 10ml der Kaliumhydroxid/ Ethanollösung zersetzt. Die Proben wurden dann über Nacht in einem Ofen bei 60 °C inkubiert.

#### *Tag 2:*

Am Folgetag waren die Proben vollständig zersetzt. Nun wurde der flüssige Überstand mit einer Pipette entfernt und dann das Röhrchen mit Triton-X 100 gespült. Dieses wird verwendet um Membranproteine aus Membranproteinkomplexen zu lösen. Anschließend wurde wieder die Flüssigkeit entfernt und nochmals gespült, diesmal mit Wasser. Nun wurde das Teströhrchen möglichst vollständig leergesaugt, sodass nur noch feste Bestandteile übrig blieben. In die nun trockenen Teströhrchen wurden 3 ml der Diethylen-Glycol-Monoethyl-Ether-Acetat Lösung pipettiert und für 30 Sekunden im Vortexer gemischt. Nun wurden die Teströhrchen für 4 Stunden an einen dunklen Ort gestellt und anschließend die komplette Lösung in ein frisches Teströhrchen umgefüllt. Schließlich wurde die Lösung mit einem Fluorospektrometer untersucht und so die Mikrosphärenkonzentration bestimmt.

Es folgte die statistische Auswertung der Ergebnisse mittels Bestimmung der Mediane sowie der Mittelwerte mit Standardabweichung.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Die Beeinflussung der Perfusion im Hinterlauf durch Diabetes Mellitus und protrahierte systemische VEGF-A Applikation

Zwei Gruppen wurden nicht mit VEGF-A, sondern über sieben Tage mit Kontrollösung (PBS/ MSA) behandelt. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen lag im Vorhandensein einer Diabetischen Stoffwechsellage beziehungsweise einer Normoglykämie. Die „diabetischen“ Tiere waren zuvor wie oben beschrieben mit Präproinsulin beimpft worden und werden deshalb im Folgenden mit *+ppIns* bezeichnet. Die „nicht-diabetischen“ Tiere nennen wir fortan *-ppIns*. Der Einfachheit halber nennen wir die Applikation von Kontrollösung an Stelle von VEGF-A „-VEGF“.

Die beiden anderen Gruppen wurden über sieben Tage mit VEGF-A behandelt. Der Unterschied zwischen den Gruppen lag erneut im Vorhandensein einer Diabetischen Stoffwechsellage beziehungsweise einer Normoglykämie. Analog zu den vorherigen Gruppen werden die Tiere mit diabetischer Stoffwechsellage mit *+ppIns* bezeichnet. Die normoglykämischen Tiere wieder *-ppIns*. Die Gabe von VEGF-A wird als „+VEGF“ bezeichnet.

### 3.1.1 Ergebnisse der Gruppe *-ppIns/-VEGF*

Für die über sieben Tage mit Kontrolllösung behandelten normoglykämischen Tiere (n=11) ergab sich ein Mittelwert der Perfusionsindizes von 0,803 mit einer Standardabweichung von +/- 0,067. Der Median betrug 0,818. Die einzelnen Werte sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

**Tabelle 2: Einzelwerte der ligierten beziehungsweise nicht-ligierten Extremitäten und die daraus resultierenden relativen Perfusionsindizes der Gruppe *-ppIns/-VEGF* am Tag sieben nach der Operation. (VEGF = vascular endothelial growth factor, ppIns = Präproinsulin)**

<b>-ppIns/-VEGF</b>					
<b>Mausnummer</b>	<b>Nicht-ligiert</b>	<b>Ligiert</b>	<b>Relativer Perfusionsindex</b>	<b>Median</b>	<b>Mittelwert mit Standardabweichung</b>
1	2985	2597	0,870	0,818	0,803 +/- 0,067
2	6996	5091	0,728		
3	3254	2662	0,818		
4	7611	5554	0,730		
5	7032	5193	0,738		
6	17052	14042	0,823		
7	48592	39814	0,819		
8	15433	14277	0,925		
9	4381	3792	0,866		
10	34098	25081	0,736		
11	4690	3665	0,781		

### 3.1.2 Ergebnisse der Gruppe **+ppIns/-VEGF**

Für die über sieben Tage ebenfalls mit Kontrolllösung behandelten Tiere mit diabetischer Stoffwechsellage (n=11) ergab sich ein Mittelwert der Perfusionsindizes von 0,785 mit einer Standardabweichung von +/- 0,104. Der Median betrug 0,778. Dieser Wert lag nicht signifikant (p=0,653) niedriger als in der Gruppe *-ppIns/-VEGF*. Die Einzelwerte sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

**Tabelle 3: Einzelwerte der ligierten beziehungsweise nicht-ligierten Extremitäten und die daraus resultierenden relativen Perfusionsindizes der Gruppe +ppIns/-VEGF am Tag sieben nach der Operation. (VEGF = vascular endothelial growth factor, ppIns = Präproinsulin)**

<b>+ppIns/-VEGF</b>					
<b>Mausnummer</b>	<b>Nicht-ligiert</b>	<b>Ligiert</b>	<b>Relativer Perfusionsindex</b>	<b>Median</b>	<b>Mittelwert mit Standardabweichung</b>
1	22438	17620	0,785	0,778	0,7850 +/- 0,104
2	18139	13355	0,736		
3	10837	10751	0,992		
4	15059	13157	0,874		
5	12324	10335	0,839		
6	17088	13242	0,775		
7	31368	17760	0,566		
8	11426	8623	0,755		
9	8013	6235	0,778		
10	3197	2365	0,740		
11	12293	9780	0,796		



### 3.1.3 Ergebnisse der Gruppe *-ppIns/+VEGF*

Für die über sieben Tage mit VEGF-A behandelten Tiere mit Normoglykämie (n=11) ergab sich ein Mittelwert der Perfusionsindizes von 1,024 mit einer Standardabweichung von +/- 0,064. Der Median betrug 1,036. Dieser Wert lag somit signifikant höher ( $p < 0,0001$ ) als in beiden Kontrollgruppen ohne VEGF Applikation. Die einzelnen Werte sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

**Tabelle 4: Einzelwerte der ligierten beziehungsweise nicht-ligierten Extremitäten und die resultierenden relativen Perfusionsindizes der Gruppe -ppIns/+VEGF am Tag sieben nach der Operation.**

(VEGF = vascular endothelial growth factor, ppIns = Präproinsulin)

<b>-ppIns/+VEGF</b>					
<b>Mausnummer</b>	<b>Nicht-ligiert</b>	<b>Ligiert</b>	<b>Relativer Perfusionsindex</b>	<b>Median</b>	<b>Mittelwert mit Standardabweichung</b>
1	8566	9487	1,108	1,036	1,024 +/- 0,064
2	6775	6742	0,995		
3	20830	21584	1,036		
4	19234	16803	0,874		
5	1979	1923	0,972		
6	3119	3302	1,059		
7	4666	4844	1,038		
8	6478	6758	1,043		
9	9540	9653	1,012		
10	9077	9356	1,031		
11	5264	5789	1,100		

### 3.1.4 Ergebnisse der Gruppe **+ppIns/+VEGF**

Schließlich ergab sich für die über sieben Tage mit VEGF-A behandelten Tiere mit Diabetes (n=13) ein Mittelwert der Perfusionsindizes von 0,990 mit einer Standardabweichung von +/- 0,047. Der Median betrug 0,974. Dieser Wert lag ebenfalls signifikant höher ( $p < 0,0001$ ) als in beiden Kontrollgruppen ohne VEGF, jedoch nicht signifikant ( $p = 0,136$ ) unter dem der Gruppe **-ppIns/+VEGF**. Die einzelnen Werte sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

**Tabelle 5: Einzelwerte der ligierten beziehungsweise nicht-ligierten Extremitäten und die daraus resultierenden relativen Perfusionsindizes der Gruppe **+ppIns/+VEGF** am Tag sieben nach der Operation. (VEGF = vascular endothelial growth factor, ppIns = Präproinsulin)**

<b>+ppIns/+VEGF</b>					
<b>Mausnummer</b>	<b>Nicht-ligiert</b>	<b>Ligiert</b>	<b>Relativer Perfusionsindex</b>	<b>Median</b>	<b>Mittelwert mit Standardabweichung</b>
1	7370	7168	0,973	0,974	0,990 +/- 0,047
2	9248	9367	1,013		
3	12307	11986	0,974		
4	27204	26018	0,956		
5	6834	7482	1,095		
6	19361	17672	0,913		
7	11610	11436	0,985		
8	5635	5768	1,024		
9	19565	18709	0,956		
10	9007	9419	1,046		
11	9283	9408	1,013		
12	13384	12894	0,963		
13	8704	8318	0,956		

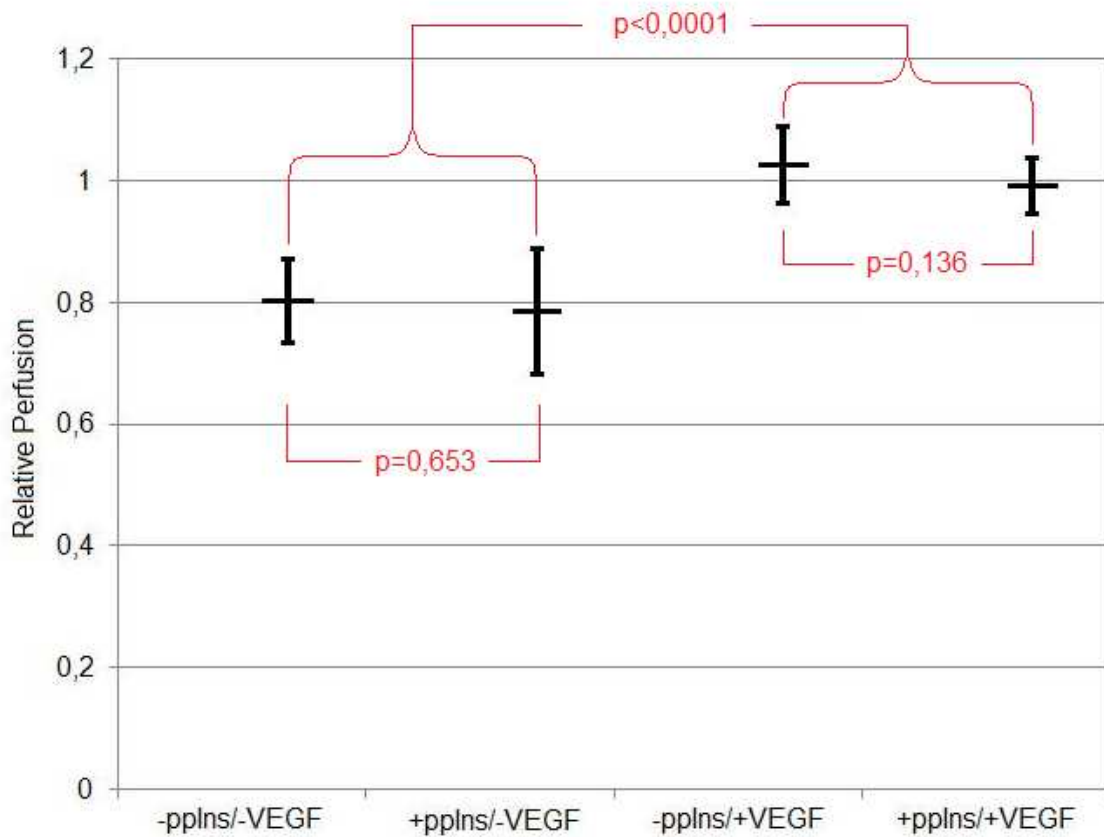
### 3.2 Übersicht der Ergebnisse der Perfusionsversuchsreihen

Tabelle 6 Ergebnisse der einzelnen Versuchstiergruppen -ppIns/-VEGF, +ppIns/-VEGF, -ppIns/+VEGF und +ppIns/+VEGF im Vergleich mit deren Medianen, Mittelwerten und Standardabweichungen.

(VEGF = vascular endothelial growth factor, ppIns = Präproinsulin)

Gruppe	Median	Mittelwert	Standardabweichung
-ppIns/-VEGF	0,818	0,803	+/- 0,067
+ppIns/-VEGF	0,778	0,785	+/- 0,103
-ppIns/+VEGF	1,036	1,024	+/- 0,064
+ppIns/+VEGF	0,974	0,990	+/- 0,047

### 3.3 VEGF verbessert die Perfusion unabhängig von der Stoffwechsellage signifikant



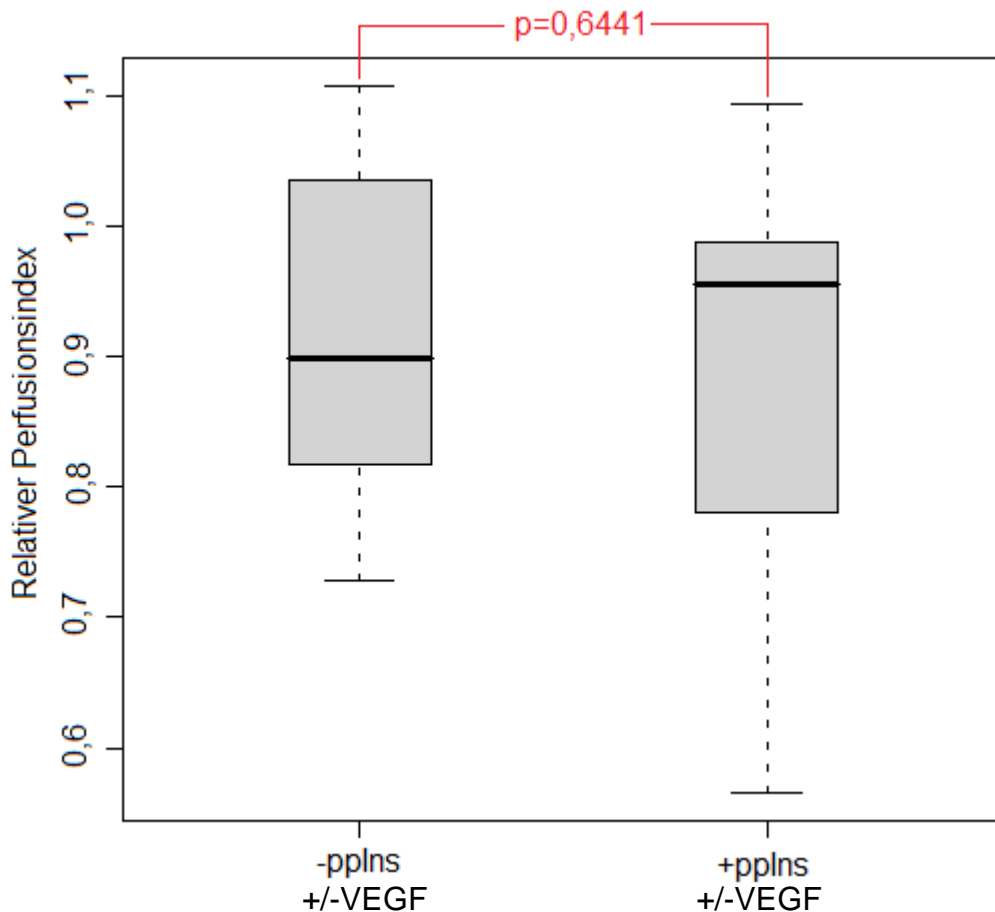
**Abb. 4:** Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der szintigraphischen Perfusionsmessung. Dargestellt ist der relative Perfusionsindex auf der Ordinate. Die Abszisse zeigt die verschiedenen Gruppen -pplns/-VEGF, +pplns/-VEGF, -pplns/+VEGF und +pplns/+VEGF am siebten postoperativen Tag. Der waagerechte Balken beschreibt den Mittelwert, die senkrechte Linie die Standardabweichung jeder Gruppe. In Rot sind die jeweiligen Signifikanzniveaus (p) zwischen den Gruppen dargestellt. Die Unterschiede zwischen Kontroll- und VEGF-Gruppen sind unabhängig von der diabetischen Stoffwechsellage hochsignifikant, deshalb wurden diese Angaben zur besseren Übersicht zusammengefasst (p jeweils <0,0001). Die Stoffwechsellage (-pplns bzw. +pplns) hat keinen signifikanten Einfluss auf die Perfusion (p=0,653 bzw. 0,136).

(VEGF = vascular endothelial growth factor, pplns = Präproinsulin)

### 3.3.1 Kein signifikanter Einfluss von Diabetes auf die Relative Perfusion

Um den Einfluss der diabetischen Stoffwechsellage zu ergründen mussten neue Gruppenkonstellationen gebildet werden. Verglichen wurden hierzu die Gruppen -pplns und +pplns unabhängig von der VEGF Applikation, also folgende zwei Konstellationen: -pplns/ $\pm$ VEGF (n=22) und +pplns/ $\pm$ VEGF (n=24).

Nach Durchführung einer ANOVA Testung kamen wir bezüglich des Diabetes zu folgendem Ergebnis: entgegen der Hypothese ist die Durchblutung nach Ligatur der *A. femoralis* bei den Tieren mit Autoimmundiabetes gegenüber denen ohne Diabetes nicht signifikant eingeschränkt (p=0,6441). Siehe Abbildung 5.

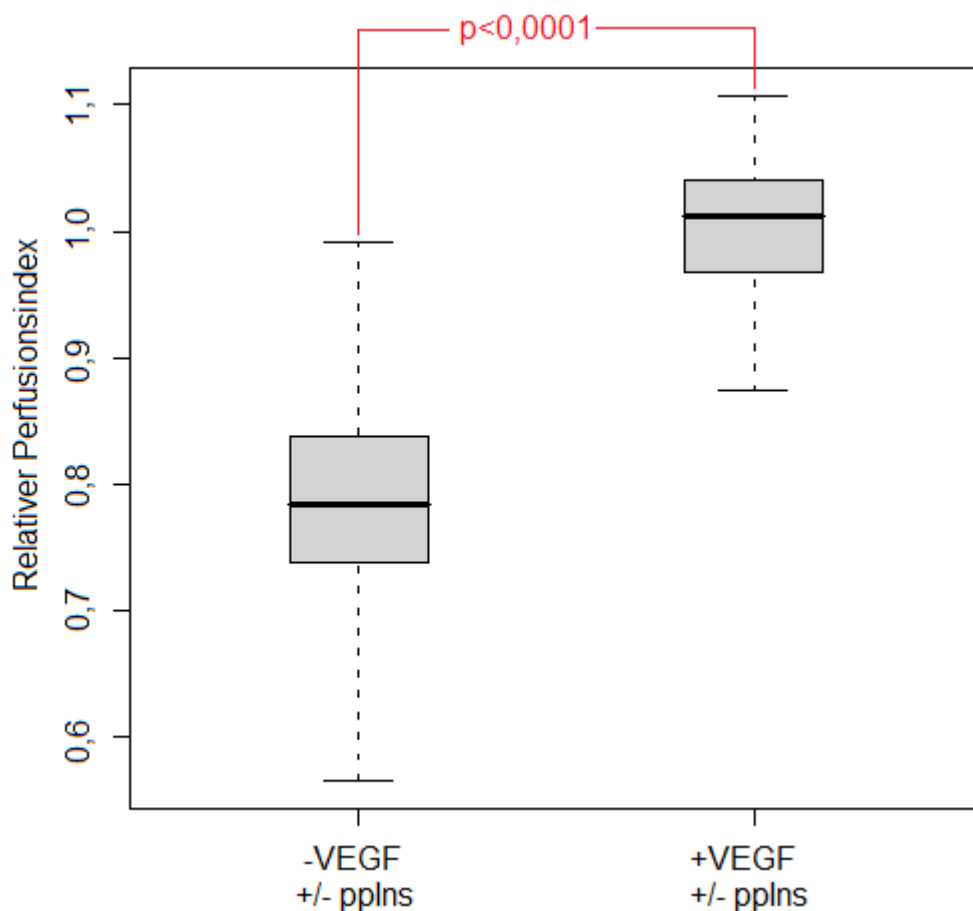


**Abb. 5: Einfluss des Autoimmundiabetes auf den Relativen Perfusionsindex. Kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen -pplns/±VEGF und +pplns/±VEGF. Boxplot-Darstellung, die Ordinate zeigt den Relativen Perfusionsindex, die Abszisse die zwei zu vergleichenden Gruppen. Der fettgedruckte schwarze Balken entspricht dem Median, die grauen Boxen ober- und unterhalb dem oberen und unteren Quartil. Die gestrichelten Linien entsprechen dem „Whisker“. Das Signifikanzniveau liegt bei  $p=0,6441$ .**

**(VEGF = vascular endothelial growth factor, pplns = Präproinsulin)**

### 3.3.2 Signifikanter Einfluss von VEGF-A auf die Relative Perfusion

Weiterhin wurde nun untersucht ob die Applikation von VEGF-A in diesem Modell einen Einfluss auf die Perfusion hat. Hierzu wurden folgende Gruppen verglichen: -VEGF/ $\pm$ pplns (n=22) und +VEGF/ $\pm$ pplns (n=24). Durch die ANOVA Testung kamen wir hier zu folgendem Ergebnis: Entsprechend der aufgestellten Hypothese kann durch die systemische Applikation von VEGF-A über eine Woche das Kollateralenwachstum und damit die Durchblutung nach Ligatur signifikant gesteigert werden, unabhängig davon ob ein Autoimmundiabetes vorliegt oder nicht. Das Signifikanzniveau lag bei  $p < 0,0001$ . Siehe Abbildung 6.



**Abb. 6: Einfluss der VEGF-A Applikation auf den Relativen Perfusionsindex. Hochsignifikanter Unterschied zwischen den Gruppen -VEGF/ $\pm$ pplns und +VEGF/ $\pm$ pplns ( $p < 0,0001$ ). Analog zu Abbildung 5 kommt wieder eine Boxplot-Darstellung zur Anwendung. Zur Erklärung siehe dort. (VEGF = vascular endothelial growth factor, pplns = Präproinsulin)**

### **3.4 Große Streuung bei den Ergebnissen der Mikrosphärenuntersuchungen**

Nach Abschluss der nuklearmedizinischen Untersuchungen folgte am achten postoperativen Tag die finale Operation mit der Mikrosphäreninjektion in den linken Ventrikel bei eröffnetem Thorax. Pro Injektion wurden 250 µl Lösung injiziert was einer Zahl von etwa 250 000 Mikrosphären entspricht. Nach der Gewebeaufbereitung folgte die Analyse. Im Rahmen der Fluorospektrometrie wurde wie bereits erwähnt die Zahl der Mikrosphären pro Gewichtseinheit gemessen und der Absolutwert dokumentiert. Als Kontrolle einer eventuellen Fehlinjektion in den rechten Ventrikel und somit in die pulmonale Strombahn diente die Konzentrationsmessung in den Lungen der Tiere.



**Tabelle 7 mittels Mikrosphäreninjektion untersuchte Mäuse. Durch Fluorospektrometrie wurde die Zahl der Mikrosphären pro Gewichtseinheit bestimmt. Als Kontrolle einer Fehlinjektion in den rechten Ventrikel diente die Konzentrationsmessung in den Lungen der Tiere. Die Tabelle enthält alle Messungen der ligierten und nicht ligierten Hinterläufe sowie beider Lungenflügel der Mäuse. Alle Individuen stammen aus der Gruppe -ppIns/-VEGF. Die Werte der jeweiligen Extremitätenseite beziehungsweise der Lunge entsprechen der Zahl der dort gemessenen Mikrosphären. (VEGF = vascular endothelial growth factor, ppIns = Präproinsulin, RPI = Relativer Perfusionsindex)**

<b>-ppIns/-VEGF</b>						
<b>Maus-nummer</b>	<b>Nicht ligiert</b>	<b>Ligiert</b>	<b>Lunge</b>	<b>RPI</b>	<b>Median</b>	<b>Mittelwert und Standardabweichung</b>
1	4,805	4,107	56,947	0,855	1,136	1,001 +/- 0,444
2	101,395	138,916	34,251	1,370		
3	154,164	50,331	1,464	0,326		
4	70,959	13,742	1,312	0,194		
5	5,048	5,77	100,406	1,143		
6	3,787	4,616	28,357	1,219		
7	75,356	85,046	11,806	1,129		
8	70,523	64,99	27,507	0,922		
9	2,797	4,46	5347,78	1,595		
10	107,326	134,891	46,421	1,257		

Somit ergibt sich ein Mittelwert für den RPI von 1,001 allerdings mit einer sehr hohen Standardabweichung von  $\pm 0,444$ . Somit waren diese Ergebnisse statistisch nicht zu verwerten. Wir entschlossen uns eine neue Berechnung durchzuführen in der diejenigen Proben ausgeschlossen wurden bei denen ein Großteil der Mikrosphären in der Lunge gemessen wurde. Dies betrifft die Tiere mit den Nummern 1, 5, 6 und 9.

**Tabelle 8 Mikrosphärenanalyse nach Ausschluss der Mäuse aus der Gruppe -pplns/-VEGF mit mutmaßlicher Fehlinjektion der Mikrosphären in die Lungenstrombahn mit Median, Mittelwert und Standardabweichung. Alle Mäuse mit einer höheren Mikrosphärenkonzentration im Lungengewebe als in den Extremitäten sind nicht in die Berechnung aufgenommen worden. (VEGF = vascular endothelial growth factor, pplns = Präproinsulin, RPI = Relativer Perfusionsindex)**

<b>-pplns/-VEGF ohne Lungenfehlinjektion</b>						
<b>Maus-nummer</b>	<b>Nicht ligiert</b>	<b>Ligiert</b>	<b>Lunge</b>	<b>RPI</b>	<b>Median</b>	<b>Mittelwert und Standardabweichung</b>
2	101,395	138,916	34,251	1,370	1,025	0,866 +/- 0,494
3	154,164	50,331	1,464	0,326		
4	70,959	13,742	1,312	0,194		
7	75,356	85,046	11,806	1,129		
8	70,523	64,99	27,507	0,921		
10	107,326	134,891	46,421	1,257		

Nach Ausschluss der Tiere mit mutmaßlicher Fehlinjektion der Mikrosphären in die Lungenstrombahn liegt der neu berechnete Mittelwert bei 0,866 und die Standardabweichung sogar noch höher bei  $\pm 0,494$ . Der Median ist 1,025. Dieses Verhältnis zwischen Median und Mittelwert spricht für eine Rechtssteilheit der Verteilung.

Betrachtet man die Rohwerte, fällt die deutliche Schwankungsbreite der Werte auf, der Minimalwert für den relativen Perfusionsindex liegt bei 0,194 der Maximalwert bei 1,370. Auf Grund der großen Streuung würde für eine signifikante Testung eine große Anzahl Tiere benötigt werden. Dies war aus finanziellen und logistischen Gründen nicht sinnvoll durchführbar. Somit stellten wir die Untersuchungen mittels Mikrosphären frühzeitig ein.

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Rolle des Vascular Endothelial Growth Factor A im Hinblick auf die Arteriogenese in einem Autimmundiabetes-Modell der Maus untersucht. Die funktionelle Relevanz von VEGF-A konnte durch ein bereits etabliertes Maus-Hindlimb-Modell (5) in vivo untersucht werden. Dieses Modell fand Anwendung an der transgenen Mauslinie RIP-B7.1, welche die Eigenschaft besitzt nach Impfung mit Präproinsulin eine diabetische Stoffwechsellage zu entwickeln. Nach einem definierten Zeitraum von 7 Tagen postoperativ wurde der Blutfluss in den Hinterläufen szintigraphisch gemessen und hieraus ein relativer Perfusionsindex (RPI) bestimmt, der dann statistisch ausgewertet wurde. Der mittlere RPI betrug in den nicht mit VEGF-A behandelten Gruppen 0,80 für die normoglykämischen und 0,78 für die diabetischen Tiere. In den Behandlungsgruppen mit VEGF-A Behandlung ergab sich ein mittlerer RPI von 1,02 für die Tiere in Normoglykämie und 0,98 für die Tiere mit Diabetes.

In einer weiteren Versuchsreihe sollte oben genannte szintigraphische Perfusionsmessmethode mit einer ebenfalls bereits etablierten Methode, der Perfusionsmessung mittels Mikrosphären verglichen werden. Diese Untersuchung wurde auf Grund statistisch nicht verwertbarer Ergebnisse abgebrochen.

#### **4.1 VEGF-A stimuliert die Hinterlaufperfusion im Autoimmundiabetes-Modell der Maus**

Es ist mittlerweile allgemein anerkannt, dass Vascular Endothelial Growth Factor und dessen Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 in der Angio- und Arteriogenese eine wichtige Rolle spielen, vor allem in der Beeinflussung und Regulierung der Endothelzellen und der Blutgefäßformierung (28), (83), (26), (74), wenn auch weiterhin wenig bekannt ist über die genaue Funktion und Rolle des VEGFR-1 (12). Neueste Untersuchungen am Schwein unterstützen die These, dass dieser Rezeptor vor allem in der embryologischen Angiogenese und während der Schwangerschaft eine wichtige Rolle spielt (42). Dies untermauern frühere Experimente bei Mäusen, die gezeigt haben, dass es bei Tieren mit gestörter VEGFR-1 Funktion zu einer defekten Gefäßbildung kommt (30).

Verschiedene Diabetesmodelle am Tier erbrachten das Ergebnis, dass hier das Kollateralenwachstum und die Perfusion herabgesetzt sind. Ein weiterer Befund sind die eingeschränkte Fähigkeit zur Vasodilatation sowie eine Inhibition der Monozytenchemotaxis, ein weiterer essentieller Faktor in der Arteriogenese (88), (94). Es konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit der Monozyten zur Migration hin zu einer erhöhten VEGF-A Konzentration wie sie in ischämischen Organen vorkommt bei diabetischen Individuen stark eingeschränkt ist. Der Grund hierfür ist ein Defekt in der Signalkaskade innerhalb des Monozyten (94). Die genannte Vasodilatation der Kollateralen wird durch erhöhte Scherkräfte des Blutflusses, wie sie in ischämischen Arealen wirken, ausgelöst. Auch diese Fähigkeit scheint durch Diabetes eingeschränkt zu sein (94), (61). So kommt es dass in einigen Organsystemen niedrige VEGF-Aktivitäten beim Diabetiker zu Pathologien führen wie zum Beispiel im Herz, bei der Wundheilung und der peripheren Neuropathie. Zu hohe Konzentrationen von VEGF führen jedoch bei dem selben Krankheitsbild zum Beispiel im Auge zu einer diabetischen Retinopathie durch pathologisch erhöhte Gefäßneubildung (99). Auf Grund dessen gibt es bereits viele Untersuchungen zur Verwendung von Anti-VEGF Präparaten zur Therapie der Diabetischen Retinopathie, einige befinden sich bereits im klinischen Einsatz wie zum Beispiel Ranibizumab, ein monoklonales Antikörperfragment gegen VEGF-A

(70), (11), (46). Über die Wirksamkeit einer Therapie mit VEGF-A selbst in diabetischen Individuen ist wenig zu finden (105). In unseren Experimenten schien VEGF-A unabhängig von der Stoffwechsellage zu wirken. VEGF-A verbesserte signifikant die Arteriogenese, unabhängig ob in diabetischen oder nicht-diabetischen Mäusen. Diabetes mellitus hat in unserem Modell somit keinen Einfluss auf die Wirksamkeit von VEGF-A bezüglich der Arteriogenese.

Mögliche Gründe für die fehlende Beeinflussung der Perfusion durch Diabetes mellitus unter VEGF-A-Gabe sind eine dosisabhängige Wirksamkeit von VEGF-A. Eine Studie untersuchte die nephroprotektive Wirksamkeit von Erythropoetin, welches die VEGF-Bildung stimuliert. Hier war die Beziehung dosisabhängig (81). So würden eventuell niedrigere Dosisschemata von VEGF möglicherweise eine signifikante Reduktion der Perfusion im diabetischen Tier bewirken. Evidente Studien hierzu fehlen jedoch.

Auffällig ist bei unserer Arbeit auch die hohe Signifikanz der Perfusionsverbesserung bei den mit VEGF behandelten Tieren. Möglicherweise hängt die Wirksamkeit somit auch vom genetischen Hintergrund der Tiere ab. In den Versuchsreihen unserer Abteilung waren immer wieder Schwankungen in den Ergebnissen bezüglich des Relativen Perfusionsindex trotz immer gleicher VEGF-Applikationsschemata aufgefallen. Eventuell liegt hier eine unterschiedliche Genexpression mit dem Resultat einer erhöhten Rezeptordichte und somit besserem Ansprechen auf VEGF vor. Die Unterschiede zwischen den Mausstämmen wurden allein schon durch die Narkosewirkung evident, die RIP-B7.1 Tiere benötigten zum Teil eine höhere Dosis und wachten später auf als die Tiere anderer Mausstämmen, dies ist möglicherweise Folge einer unterschiedlichen Kinetik der Anästhetika im ZNS, da Perizyten und glatte Gefäßmuskelzellen die Gefäßdichtigkeit auch im ZNS mitbeeinflussen (23).

## **4.2 Diabetes Mellitus als chronische Erkrankung**

Diabetes mellitus ist eine chronische Erkrankung. Viele Begleiterkrankungen werden erst nach längerer Hyperglykämie manifest (38). Möglicherweise überwiegen zu Beginn noch die Kompensationsmechanismen des Körpers. Zwar sind beim Menschen oftmals bereits erste Folgeerkrankungen des Diabetes Mellitus bei Diagnosestellung manifest, dies beruht jedoch auf einer schon längere Zeit, oft viele Jahre vorbestehende Hyperglykämie. Die Entwicklung der Komplikationen wird auch als pathologisches Kontinuum beschrieben, erste mikroskopische Veränderungen liegen bereits früh in jenen Zellen vor die den erhöhten Blutglukosespiegeln als erstes ausgesetzt sind, nämlich in den Endothelzellen im Gefäßsystem, den Perizyten bei der Retinopathie und in den Podozyten bei der diabetischen Nephropathie (58). Bis zur klinischen Manifestation im Sinne einer symptomatischen pAVK, einer Retinopathie oder einer Nephropathie vergehen jedoch oft Jahre.

Unsere Tiere wurden möglichst zeitnah nach Erreichen einer hyperglykämischen Stoffwechsellage operiert und Operationen durchgeführt. Unter Umständen hat dieser frühe Beginn der Experimente auch zu den Ergebnissen beigetragen. Auch war der Beobachtungszeitraum von 7 Tagen für den Diabetes mellitus als chronische Erkrankung eventuell zu kurz.

## **4.3 Das Hindlimb-Modell zur Untersuchung der Arteriogenese im Autoimmundiabetes-Modell der Maus**

Zur Untersuchung der Angio- beziehungsweise Arteriogenese gibt es schon lange unterschiedliche Ansätze, die Idee durch eine Ligatur eines Gefäßes eine peripher davon gelegene Ischämie zu erzeugen und die Folgen hiervon zu untersuchen gibt es schon seit den vierziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts. Die dabei verwandten Tierspezies variieren. Es gibt Untersuchungen an Schweinen (37), Hunden (53), Kaninchen (8), (82), Ratten (52), (84) und Mäusen (16), (9), (2).

Viele der Versuche erfolgten an verschiedenen Mausmodellen auf Grund des geringeren logistischen Aufwands beim Kleintier. Unsere Methode unterscheidet sich von anderen Mausmodellen.

Häufig wurde zur Unterbrechung der Durchblutung in der zu untersuchenden Extremität die *Arteria femoralis* teilweise exzidiert (16), bei uns hingegen erfolgte eine weitaus weniger traumatische Ligatur des Gefäßes mit einer feinen Naht. So wurde das umgebende Gewebe, insbesondere Nerv und Vene geschont. Lokale Entzündungen und die Narbenbildung waren ebenfalls reduziert.

In anderen Hindlimb-Modellen der Maus wurde eine andere Höhe für den Arteriellen Verschluss gewählt. Diese fand zumeist distal des Abgangs der *Arteria saphena* statt was zu einer geringeren Reduktion des Blutflusses in der Extremität führte. Die von uns weiter proximal gesetzte Ligatur vor dem Abgang gewährleistete eine Minimierung der methodisch bedingten Ungenauigkeit bezüglich der Perfusion. Trotzdem kam es hierdurch zu keiner Zunahme der Nekrosenbildung oder sonstigen trophischen Störungen im Hinterlauf der Tiere. Außerdem war durch diese Standardisierung die Durchführung der Operation unabhängiger von der ausführenden Person. Viele Studien beschäftigten sich an diesem Modell mit der Angiogenese unsere Zielgröße war die Arteriogenese.

Natürlich ist auch die von uns verwendete Methode nicht perfekt, so stellt etwa unser Modell methodenbedingt nur eine Momentaufnahme der Perfusion der Extremität am siebten postoperativen Tag dar, da nur zu diesem Zeitpunkt die Perfusionsszintigraphie zur Anwendung kam. Eine longitudinale Untersuchung wäre nur durch mehrere Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten an derselben Maus möglich gewesen. Aus tierschutzrechtlichen und ethischen Gründen war dies jedoch nicht möglich. Außerdem waren die äußeren Bedingungen wie Verfügbarkeit des Technetiums und ein freier Untersuchungsplatz an der Gamma-Kamera nicht jederzeit gegeben.



#### 4.4 Methoden der Perfusionsmessung im Vergleich

Es stehen unterschiedliche Ansätze zur Perfusionsmessung zur Verfügung. Einer der Hauptvertreter hierbei ist die Laser-Doppler Perfusionsmessung. Diese findet als nicht invasive Methode breite Anwendung unter anderem auch in Kleintierexperimenten zum Beispiel an Mäusen (16), Ratten (98) und Kaninchen (69). Für die Untersuchung der Arteriogenese bietet diese Methode jedoch entscheidende Nachteile: Der Laserstrahl der hier zur Anwendung kommt besitzt während der Messung lediglich eine Eindringtiefe von 200 µm. So kann lediglich die Perfusion von direkt unter der Haut verlaufenden Gefäßen erfasst werden. Die Kollateralbildung erfolgt aber aus tiefer gelegenen präformierten Gefäßen im Bereich der Muskulatur. Ein direkter Zusammenhang zwischen Hautdurchblutung und Gesamtdurchblutung der Extremität besteht jedoch nicht. Somit ist diese Methode für unsere Fragestellungen ungeeignet (40).

Als ebenfalls weit verbreitete Alternativmethode kamen somit noch die Mikrosphären in Betracht. In einigen Arbeiten werden diese sogar als der Goldstandard der Perfusionsmessung bezeichnet, hier etwa an Kaninchen (90) und Schweinen (60). Bei Mäusen kommt diese Methode ebenfalls zum Einsatz (80), (1). Die Injektion erfolgte teilweise in die *Aorta abdominalis*, teilweise in den linken Ventrikel (40), (79). Die Problematik die sich hieraus ergibt (Nur einmalige Untersuchung auf Grund der Invasivität, Probleme in der späteren histologischen Aufarbeitung) wurden bereits diskutiert.

Nun stellt sich die Frage, warum in unserem speziellen Modell die Mikrosphärendetektion Ergebnisse mit solch hoher Streuung lieferte. Ein Hauptunterschied zwischen unserem Protokoll und der Arbeit von Hoefler et al. (40) zum Beispiel bestand in der Injektion direkt in eine in der *Aorta abdominalis* liegende Kanüle. So war eine Applikation in das arterielle Stromgebiet unter Sicht gewährleistet. Wir punktierten das Herz zwar auch unter Sicht nach Eröffnen des Thorax, die Aufsteigende Blutsäule in der Kanüle war jedoch nicht beweisend für die korrekte Lage im linken Ventrikel. So kam es dass bei einigen Versuchstieren eine Injektion in die Lungenstrombahn erfolgte, was für eine Fehlinjektion in den

rechten Ventrikel sprach. Eine direkte Kontrolle über die perfundierten Organe in Situ war auf Grund fehlender Gewebeverfärbungen durch die Mikrosphären nicht möglich. Erst nach Gewebeaufarbeitung und Analyse konnte die Fehlinjektion post mortem gesichert werden.

Weiterhin wurde den Mäusen in der Arbeit von Hoefler vor Injektion der Mikrosphären Adenosin gespritzt. So wurde eine maximale Vasodilatation herbeigeführt. In unseren Experimenten erfolgte diese medikamentöse Vorbereitung nicht. Es ist davon auszugehen, dass durch den operativen Stress und durch die Eröffnung des Thorax mit konsekutiver akuter Hypoxie eine Vasokonstriktion in den Extremitäten erzeugt wird und damit die Perfusion zugunsten der lebenswichtigen Organe umverteilt wird. Dies wäre eine Erklärung für die niedrigen Messwerte der Mikrosphären in den Extremitäten und die weite Streuung.

Möglicherweise spielt auch die Zahl der applizierten Mikrosphären eine Rolle für die Validität der Messung. Wir injizierten 250 µl der Lösung entsprechend etwa einer Zahl von 250 000 Mikrosphären. Eine Studie hat belegt, dass bei der Ratte ab einer bestimmten Zahl injizierter Mikrosphären (hier 60 000) eine signifikante Erhöhung des kardialen Gefäßwiderstandes zu einer Zunahme der Ischämie führte (107). Somit scheint die von uns intrakardial applizierte Menge an Mikrosphären für ein Mäuseherz deutlich zu hoch gegriffen. Eventuell war hierdurch die kardiale Pumpleistung akut eingeschränkt und es kam so zu einer mangelhaften Verteilung im peripheren Gewebe.

Es ist ersichtlich dass eine Reihe von Störfaktoren für die mangelhaften Resultate in Frage kommt. Nicht zuletzt sei auch die mangelnde Erfahrung in der Anwendung dieser Methode genannt die sicherlich mit hierzu beigetragen hat.

Die Methode der Perfusionsszintigraphie fand bisher nur in unserem Modell Anwendung an der Maus (4). Vorbeschrieben ist sie außerdem an Ratten (52). Die Anwendung dieses Verfahrens an der Maus wurde erst durch unsere Arbeitsgruppe etabliert. Als radioaktives Nuklid wurde Technetium-99 mit MIBI als Tracer gekoppelt und injiziert. Die Detektion des Technetiums erfolgte mittels einer

Gamma-Kamera. Hieraus ist ersichtlich dass für diese Methode eine Nuklearmedizinische Abteilung mit den technischen Vorrichtungen für eine Nuklidproduktion und Scannern für die eigentliche Messung vonnöten ist.

Die Durchführung der Untersuchung erfordert kein Töten der Tiere sodass auch noch anschließend Studien erfolgen können (5). Außerdem ist diese Methode weit weniger invasiv und somit mit geringerem Stress für die Tiere behaftet als die von uns durchgeführte Mikrosphärenuntersuchung, was zur höheren Validität der Ergebnisse beigetragen haben dürfte. Die Szintigraphie spiegelt im Gegensatz zur Laser Doppler Untersuchung die Durchblutung der gesamten Extremität und nicht nur der Haut wider.

Aktuelle Studien verwenden weitere nuklearmedizinische Untersuchungsmethoden auf Basis der Szintigraphie. Erwähnt sei hier beispielsweise die hoch auflösende Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) mit der sich der Stoffwechsel verschiedener Organe grafisch darstellen lässt. Die Methode wird mittlerweile als „Small-Animal SPECT“ auch in Kleintieruntersuchungen angewendet. Die Messergebnisse werden zu einem dreidimensionalen Bild zusammengesetzt. Die Ergebnisse können dann mittels einer Kombination mit der Computertomographie (SPECT/CT) mit morphologischen Daten kombiniert werden (31). Voraussetzung für die Anwendung an Kleintieren ist ein sehr hohes Auflösungsvermögen. Diese Methode verlangt natürlich nach noch größerem logistischem und gerätetechnischem Aufwand, liefert aber interessante Ergebnisse.

## **4.5 Das Potential von VEGF für die Therapie der pAVK und der KHK in der Klinik**

Das vorliegende angiogenetische und arteriogenetische Potential von VEGF-A suggeriert geradezu eine klinische Anwendung zur Behandlung von Patienten, die von einer vermehrten Kollateralenbildung und somit Perfusionsverbesserung profitieren würden. Schon frühe Versuche am Hundeherz konnten die Wirksamkeit einer solchen Behandlung aufzeigen (6). Auch am Hinterlauf des Kaninchens konnte eine Zunahme der Kollateralisierung beobachtet werden (82), (83). Aktuellere Methoden untersuchen die Wirksamkeit der Gentherapie zur Kollateralenbildung nach Myokardinfarkt. Hierbei werden mononukleäre Zellen die das VEGF-Gen exprimieren in Koronarien von Schweinen nach Myokardinfarkt geimpft. Die Ergebnisse sind vielversprechend (35). Bleibt die Frage der Anwendbarkeit beim Menschen. Mögliche therapierbare Krankheiten wären die periphere Arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) und die Koronare Herzkrankheit (KHK). Es gibt klinische Anwendungen bei Patienten mit fortgeschrittener KHK, hier wurde ein direkter intramyokardialer Gentransfer von VEGF durch intraoperative Injektion in nicht durch Bypasschirurgie reperfundierbare Gebiete durchgeführt (67). Dies führte zu einer Abnahme von pektanginösen Beschwerden. Ein positiver Effekt auf die Mortalität konnte jedoch auch in einer aktuellen Studie nicht nachgewiesen werden (39).

Neue Anwendungen zeigen sich auch in der Therapie der pAVK, hier auch vor Allem in Verbindung mit Diabetes Mellitus. Hier gibt es erste Erfolge mittels VEGF-Gentherapie. Auffällig scheint eine Überlegenheit der Therapie mittels Gentransfer gegenüber der Gabe der Proteinprodukte zu sein (10), (50), (76). Verblindete, plazebokontrollierte Studien hierzu sind geplant oder bereits durchgeführt (63), (47). In weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, dass die topische Applikation von VEGF die Heilung diabetischer Wunden durch vermehrte Angiogenese beschleunigen kann (32). Ein klinischer Einsatz steht jedoch noch aus.

Kritisch zu betrachten sind mögliche Nebenwirkungen in der Therapie mit VEGF. Nachgewiesen ist etwa ein deutlicher dosisabhängiger Blutdruckabfall nach VEGF

Applikation auf Grund der NO-Freisetzung (24). Außerdem sind mangels Langzeitstudien noch keine Aussagen zu Nebenwirkungen einer dauerhaften Anwendung möglich. Es könnte zu einer vermehrten Angiogenese in Plaques kommen, dies ist aber bisher nicht nachgewiesen worden.

Die breite Anwendung von VEGF-Antagonisten in der Tumorthherapie basiert jedoch nicht zuletzt auf der Tatsache, dass VEGF die Angiogenese in soliden Tumoren und somit deren Wachstum fördert (62). Dies ist insbesondere in der mittel- bis langfristigen Therapie mit VEGF zu beachten.

## 4.6 Schlussfolgerungen aus der Arbeit

Zur Rolle von VEGF-A in einem Autoimmundiabetes-Modell der Maus kann folgendes festgestellt werden: eine diabetische Stoffwechsellage, induziert im speziellen Mausstamm RIP-B7.1, hat keinen Einfluss auf die Wirksamkeit von VEGF-A. Die wiederholte Injektion von VEGF-A verbessert die Perfusion sowohl in diabetischen als auch in normoglykämischen Tieren signifikant. Es sollten weitere Experimente mit anderen Diabetesmodellen und Mausstämmen folgen um diese Aussage zu überprüfen. Eventuell sollte hierbei die Dauer der Hyperglykämie verstärkt in den Vordergrund gerückt werden.

Eine valide Perfusionsmessung durch Mikrosphären konnte mit unseren Methoden nicht erreicht werden. In weiteren Versuchsreihen sollte die Anwendung von Mikrosphären verfeinert werden. Durch Anpassung und Optimierung der Methode sollten auch bei der Maus valide Ergebnisse zu erreichen sein.

Die bereits validierte Methode der Perfusionsszintigraphie könnte durch verbesserte und hochauflösendere Methoden wie SPECT und SPECT/CT erweitert werden.

Die breite klinische Anwendung von VEGF im Bereich der koronaren Herzkrankheit und der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit bleibt abzuwarten.

## 5 Zusammenfassung

Diabetes Mellitus ist eine der Hauptursachen für die periphere arterielle Verschlusskrankheit. Jedoch kann durch das Wachstum von arteriellen Kollateralen der chronische Verschluss auch großlumiger Arterien kompensiert werden. Dieser Prozess wird durch die Arteriogenese vermittelt. Hierbei werden aus präformierten Arteriolen durch multiple Vorgänge wie dem Einwandern von Monozyten in die Gefäßwand und der Proliferation sowohl glatter Muskelzellen als auch von Endothelzellen größerlumige, korkenzieherartig geschlängelte Kollateralen gebildet. Die genauen molekularen Mechanismen hierbei sind noch nicht vollständig geklärt. Ein großer Einfluss auf dieses Geschehen wird jedoch dem Gefäßwachstumsfaktor Vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) zugeschrieben.

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Rolle von VEGF-A in der Arteriogenese am Beispiel eines Autoimmundiabetes-Modelles *in vivo*. Die Experimente erfolgten mit dem transgenen Mausstamm RIP-B7.1, welcher die Eigenschaft besitzt, im Laufe der Adoleszenz eine diabetische Stoffwechsellage zu erreichen. Hierzu wurde bei Mauslinien mit C57BL/6-Hintergrund (Bezeichnung für den Mausstamm „Black 6“) durch Ratten-Insulinpromoter (RIP) das Gen B7.1, welches für ein T-Zell stimulierendes Molekül kodiert, an die pankreatischen Betazellen gekoppelt. Durch Impfung von vektorvermittelter Präproinsulin-DNS konnte so ein Autoimmundiabetes induziert werden. Als Hypothese wurde vorab formuliert, dass das Kollateralenwachstum bei den Tieren mit Diabetes eingeschränkt ist. Als Kontrolle dienten Tiere vom Wildtyp. Weiterhin wurde postuliert, dass die Durchblutung durch VEGF-A unabhängig von der diabetischen Stoffwechsellage verbessert wird.

Nach operativer Ligatur der rechten *Arteria femoralis* wurden die Tiere über 7 Tage zweimal täglich entweder mit VEGF-A oder mit Kontrolllösung behandelt. Dann wurde die Perfusionsdifferenz zwischen ligierter und nicht-ligierter Extremität szintigraphisch mittels Technetium 99m-MIBI quantifiziert.

Bei den nicht-diabetischen Tieren ohne VEGF-A Behandlung ergab sich ein relativer Perfusionsindex von  $80,3 \pm 6,7\%$ . Die Untersuchung der Gruppe der diabetischen Tiere ohne VEGF Behandlung ergab einem mittleren Index von  $78,5 \pm 10,3\%$  und lag somit auf demselben Niveau wie derjenige der nicht-diabetischen Tiere. Die Behandlung mit VEGF-A verbesserte die Perfusion sowohl in der Gruppe der nicht-diabetischen Tiere, als auch bei den diabetischen Tieren ( $102,4 \pm 6,4\%$  beziehungsweise  $99,0 \pm 4,7\%$ ). Daraus ergab sich, dass unabhängig von der Stoffwechsellage eine Therapie mit VEGF-A die Perfusion signifikant verbessert ( $p < 0,0001$ ). Außerdem konnte für dieses Modell gezeigt werden, dass eine diabetische Stoffwechsellage keinen signifikanten Einfluss auf die Perfusion hat ( $p = 0,6441$ ).

In einer weiteren Versuchsreihe sollte oben genannte szintigraphische Perfusionsmessmethode mit der ebenfalls bereits etablierten Perfusionsmessung mittels Mikrosphären verglichen werden. Auf Grund statistisch nicht sicher verwertbarer Ergebnisse wurde diese Versuchsreihe abgebrochen. Mögliche Gründe hierfür sind Mängel im Versuchsablauf und die fehlende vorherige Vasodilatation des peripheren Stromgebietes.

Entgegen anderer Studien scheint in unserem Modell der Diabetes mellitus keinen Einfluss auf die Perfusion zu haben. Auch die Effektivität von VEGF-A bleibt unbeeinflusst. Gründe für diese divergierenden Ergebnisse könnten die kurze Hyperglykämiezeit von etwa 7 Tagen sowie eine Dosisabhängigkeit der VEGF-Wirkung sein.

Die Entwicklung einer Protein- oder Gentherapie unter Verwendung von VEGF-A zur Behandlung der chronischen Koronaren Herzkrankheit und der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit stellt eine interessante Perspektive dar.



## 6 Literaturverzeichnis

1. Arai Y, Fujita M, Marui A, Hirose K, Sakaguchi H, Ikeda T, Tabata Y, Komeda M: Combined treatment with sustained-release basic fibroblast growth factor and heparin enhances neovascularization in hypercholesterolemic mouse hindlimb ischemia. *Circ J* 71: 412-417 (2007)
2. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G and Isner JM: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275: 964-967 (1997)
3. AU Giantonio BJ; Levy DE; O'dwyer PJ; Meropol NJ; Catalano PJ; Benson AB 3rd: A phase II study of high-dose bevacizumab in combination with irinotecan, 5-fluorouracil, leucovorin, as initial therapy for advanced colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group study E2200. *Ann Oncol* 17: 1399-1403 (2006)
4. Babiak A, Schumm AM, Wangler C, Loukas M, Wu J, Dombrowski S, Matuschek C, Kotzerke J, Dehio C, Waltenberger J: Coordinated activation of VEGFR-1 and VEGFR-2 is a potent arteriogenic stimulus leading to enhancement of regional perfusion. *Cardiovasc Res* 61: 789-795 (2004)
5. Babiak A: Die Etablierung eines in vivo Modells zur Untersuchung der Arteriogenese. *Med Dissertation, Universität Ulm* (2004)
6. Banai S, Jaklitsch MT, Shou M, Lazarous DF, Scheinowitz M, Biro S, Epstein SE and Unger EF: Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation* 89: 2183-2189 (1994)

7. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A and Marme D: Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 87: 3336-3343 (1996)
8. Becit N, Ceviz M, Kocak H, Yekeler I, Unlu Y, Celenk C and Akin Y: The effect of vascular endothelial growth factor on angiogenesis: an experimental study. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 22: 310-316 (2001)
9. Besnard S, Silvestre JS, Duriez M, Bakouche J, Lemaigre-Dubreuil Y, Mariani J, Levy BI and Tedgui A: Increased ischemia-induced angiogenesis in the staggerer mouse, a mutant of the nuclear receptor Roralpha. *Circ Res* 89: 1209-1215 (2001)
10. Bobek V, Taltynov O, Pinterova D, Kolostova K: Gene therapy of the ischemic lower limb--Therapeutic angiogenesis. *Vascul Pharmacol* 44: 395-405 (2006)
11. Campochiaro PA: Targeted pharmacotherapy of retinal diseases with ranibizumab. *Drugs Today* 43: 529-537 (2007)
12. Cao Y: Positive and Negative Modulation of Angiogenesis by VEGFR1 Ligands. *Sci Signal* 2: re1 (2009)
13. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W and Nagy A: Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380: 435-439 (1996)
14. Carmeliet, P: Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6: 389-395 (2000)

15. Chen SL, Zhu CC, Liu YQ, Tang LJ, Yi L, Yu BJ, Wang DJ: Mesenchymal stem cells genetically modified with the angiopoietin-1 gene enhanced arteriogenesis in a porcine model of chronic myocardial ischaemia. *J Int Med Res* 37: 68-78 (2009)
16. Couffinhal T, Silver M, Zheng LP, Kearney M, Witztenbichler B and Isner JM: Mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol* 152: 1667-1679 (1998)
17. Crawford TN, Alfaro DV 3rd, Kerrison JB, Jablon EP: Diabetic retinopathy and angiogenesis. *Curr Diabetes Rev* 5: 8-13 (2009)
18. Deutsche Diabetes Stiftung 2006, Internetseite: <http://www.deutsche-diabetesstiftung.de/medienpreis.0.html>, Download Datum 14.11.2006
19. Deutsches Diabetes Forschungsinstitut Düsseldorf 2000, Internetseite: <http://www.uni-duesseldorf.de/ddfi/main/04aktuelles/aktionsplan.shtml>, Download Datum 16.11.2006
20. Devendra D, Paronen J, Moriyama H, Miao D, Eisenbarth GS, Liu E: Differential immune response to B:9-23 insulin 1 and insulin 2 peptides in animal models of type 1 diabetes. *J Autoimmun* 23: 17-26 (2004)
21. Djonov V, Andres AC and Ziemiecki A: Vascular remodelling during the normal and malignant life cycle of the mammary gland. *Microsc Res Tech* 52: 182-189 (2001)
22. Emanuelli C, Caporali A, Krankel N, Cristofaro B, Van Linthout S, Madeddu P: Type-2 diabetic Lepr(db/db) mice show a defective microvascular phenotype under basal conditions and an impaired response to angiogenesis gene therapy in the setting of limb ischemia. *Front Biosci* 12: 2003-2012 (2007)
23. Enge M., Bjarnegard M., Gerhardt H., Gustafsson E., Kalen M., Asker N., Hammes H. P., Shani M., Fassler R. and Betsholtz C: Endothelium-specific

- platelet-derived growth factor-B ablation mimics diabetic retinopathy. *EMBO J* 21: 4307-4316 (2002)
24. Eppler SM, Combs DL, Henry TD, Lopez JJ, Ellis SG, Yi JH, Annex BH, McCluskey ER and Zioncheck TF: A target-mediated model to describe the pharmacokinetics and hemodynamic effects of recombinant human vascular endothelial growth factor in humans. *Clin Pharmacol Ther* 72: 20-32 (2002)
  25. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ and Moore MW: Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380: 439-442 (1996)
  26. Ferrara N. and Davis-Smyth T: The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18: 4-25 (1997)
  27. Ferrara N: Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: 1358-1366 (2001)
  28. Ferrara N; Gerber HP: The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9: 669-676 (2003)
  29. Folkman, J. and Shing, Y: Angiogenesis. *J Biol Chem* 267: 10931-10934 (1992)
  30. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M and Breitman ML: Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376: 66-70 (1995)
  31. Franc BL, Acton PD, Mari C, Hasegawa BH: Small-animal SPECT and SPECT/CT: important tools for preclinical investigation. *J Nucl Med* 49: 1651-1663 (2008)

32. Galiano RD, Tepper OM, Pelo CR, Bhatt KA, Callaghan M, Bastidas N, Bunting S, Steinmetz HG, Gurtner GC: Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *Am J Pathol* 164: 1935-1947 (2004)
33. Gao E, Young WL, Pile-Spellman J, Joshi S, Duong H, Stieg PE and Ma Q: Cerebral arteriovenous malformation feeding artery aneurysms: a theoretical model of intravascular pressure changes after treatment. *Neurosurgery* 41: 1345-1358 (1997)
34. Grunstein J, Masbad JJ, Hickey R, Giordano F and Johnson RS: Isoforms of vascular endothelial growth factor act in a coordinate fashion To recruit and expand tumor vasculature. *Mol Cell Biol* 20: 7282-7291 (2000)
35. Hagikura K, Fukuda N, Yokoyama SI, Yuxin L, Kusumi Y, Matsumoto T, Ikeda Y, Kunimoto S, Takayama T, Jumabay M, Mitsumata M, Saito S, Hirayama A, Mugishima H: Low invasive angiogenic therapy for myocardial infarction by retrograde transplantation of mononuclear cells expressing the VEGF gene. *Int J Cardiol* Jan 22 (2009)
36. Halin S, Rudolfsson SH, Van Rooijen N, Bergh A: Extratumoral macrophages promote tumor and vascular growth in an orthotopic rat prostate tumor model. *Neoplasia* 11: 177-186 (2009)
37. Hariawala MD, Horowitz JR, Esakof D, Sheriff DD, Walter DH, Keyt B, Isner JM and Symes JF: VEGF improves myocardial blood flow but produces EDRF-mediated hypotension in porcine hearts. *J Surg Res* 63: 77-82 (1996)
38. Haupt E, Benecke A, Haupt A, Herrmann R, Vogel H, Walter C. The KID Study VI: diabetic complications and associated diseases in younger type 2 diabetics still performing a profession. Prevalence and correlation with

- duration of diabetic state, BMI and C-peptide. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 107: 435-441 (1999)
39. Hedman M, Muona K, Hedman A, Kivelä A, Syväne M, Eränen J, Rantala A, Stjernvall J, Nieminen MS, Hartikainen J, Ylä-Herttua S: Eight-year safety follow-up of coronary artery disease patients after local intracoronary VEGF gene transfer. *Gene Ther* Feb 12 (2009)
  40. Hofer IE, van Royen N, Rectenwald JE, Bray EJ, Abouhamze Z, Moldawer LL, Voskuil M, Piek JJ, Buschmann IR and Ozaki CK: Direct evidence for tumor necrosis factor- $\alpha$  signaling in arteriogenesis. *Circulation* 105: 1639-1641 (2002)
  41. Jiang S, Bailey AS, Goldman DC, Swain JR, Wong MH, Streeter PR, Fleming WH: Hematopoietic stem cells contribute to lymphatic endothelium. *PLoS ONE* 3:e3812. (2008)
  42. Kaczmarek MM, Kiewisz J, Schams D, Ziecik AJ: Expression of VEGF-receptor system in conceptus during peri-implantation period and endometrial and luteal expression of soluble VEGFR-1 in the pig. *Theriogenology* 71: 1298-1306 (2009)
  43. Kaihara S, Sugishita Y, Migita T, Iio M: Regional circulation by labelled microspheres. *Saishin Igaku* 24: 2277-2282 (1969)
  44. Karges W, Pechhold K, Al Dahouk S, Riegger I, Rief M, Wissmann A, Schirmbeck R, Barth C, Boehm BO: Induction of autoimmune diabetes through insulin (but not GAD65) DNA vaccination in nonobese diabetic and in RIP-B7.1 mice. *Diabetes* 51: 3237-3244 (2002)
  45. Karges W, Rajasalu T, Spyrtanis A, Wieland A, Boehm B, Schirmbeck R: The diabetogenic, insulin-specific CD8 T cell response primed in the experimental autoimmune diabetes model in RIP-B7.1 mice. *Eur J Immunol* 37: 2097-2103 (2007)

46. Kourlas H, Abrams P: Ranibizumab for the treatment of neovascular age-related macular degeneration: a review. *Clin Ther* 29: 1850-1861 (2007)
47. Kroll J and Waltenberger J: VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochem Biophys Res Commun* 252: 743-746 (1998)
48. Kroll J and 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* 265: 636-639 (1999)
49. Kusumanto YH, van Weel V, Mulder NH, Smit AJ, van den Dungen JJ, Hooymans JM, Sluiter WJ, Tio RA, Quax PH, Gans RO, Dullaart RP, Hospers GA: Treatment with intramuscular vascular endothelial growth factor gene compared with placebo for patients with diabetes mellitus and critical limb ischemia: a double-blind randomized trial. *Hum Gene Ther* 17: 683-691 (2006)
50. Lara-Hernández R, Lozano-Vilardell P, Cordobés-Gual J: Novel therapies of non-revascularizing peripheral arterial occlusive disease: therapeutic angiogenesis. *Med Clin* 131: 665-669 (2008)
51. Li W, Tanaka K, Morioka K, Takamori A, Handa M, Yamada N, Ihaya A.: Long-term effect of gene therapy for chronic ischemic myocardium using platelet-derived endothelial cell growth factor in dogs. *J Gene Med* 10: 412-420 (2008)
52. Mack CA, Magovern CJ, Budenbender KT, Patel SR, Schwarz EA, Zanzonico P, Ferris B, Sanborn T, Isom P, Isom OW, Crystal RG and Rosengart TK: Salvage angiogenesis induced by adenovirus-mediated gene transfer of vascular endothelial growth factor protects against ischemic vascular occlusion. *J Vasc Surg* 27: 699-709 (1998)

53. Marasco SF, Rosenfeldt FL, Lim HK, Mennen M, Cairo S, Bain C: Correction of posteromedial papillary muscle displacement in repair of ischemic mitral regurgitation. *J Heart Valve* 17: 620-627 (2008)
54. Maxwell, PH, Dachs, GU, Gleadle JM, Nicholls LG, Harris AL, Stratford IJ, Hankinson O, Pugh CW and Ratcliffe PJ: Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 8104-8109 (1997)
55. Mellberg S, Dimberg A, Bahram F, Hayashi M, Rennel E, Ameer A, Westholm JO, Larsson E, Lindahl P, Cross MJ, Claesson-Welsh L: Transcriptional profiling reveals a critical role for tyrosine phosphatase VE-PTP in regulation of VEGFR2 activity and endothelial cell morphogenesis. *FASEB J* 23: 1490-1502 (2009)
56. Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A, Waltenberger J, Augustin HG, Ziche M, Lanz C, Buttner M, Rziha HJ and Dehio C: A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF- E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *Embo J* 18: 363-374 (1999)
57. Moreira IS, Fernandes PA, Ramos MJ: Vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibition--a critical review. *Anticancer Agents Med Chem* 7: 223-245 (2007)
58. Orasanu G, Plutzky J: The pathologic continuum of diabetic vascular disease. *J Am Coll Cardiol* 53: 35-42 (2009)
59. Otrrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI: Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood Cells Mol Dis* 38: 258-268 (2007)



60. Peukert D, Kaufels N, Laule M, Schnorr J, Carme S, Farr T, Schönenberger E, Taupitz M, Hamm B, Dewey M: Improved evaluation of myocardial perfusion and viability with the magnetic resonance blood pool contrast agent p792 in a nonreperfused porcine infarction model. *Invest Radiol* 42: 248-255 (2007)
61. Pipp F, Boehm S, Cai WJ, Adili F, Ziegler B, Karanovic G, Ritter R, Balzer J, Scheler C, Schaper W, Schmitz-Rixen T: Elevated fluid shear stress enhances postocclusive collateral artery growth and gene expression in the pig hind limb. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1664-1668 (2004)
62. Poon RT, Fan ST, Wong J: Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol* 19: 1207-1225 (2001)
63. Rajagopalan S, Mohler ER 3rd, Lederman RJ, Mendelsohn FO, Saucedo JF, Goldman CK, Blebea J, Macko J, Kessler PD, Rasmussen HS, Annex BH: Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication. *Circulation* 108: 1933-1938 (2003)
64. Rajagopalan G, Mangalam AK, Sen MM, Kudva YC, David CS: Distinct local immunogenic stimuli dictate differential requirements for CD4+ and CD8+ T cell subsets in the pathogenesis of spontaneous autoimmune diabetes. *Autoimmunity* 40: 489-496 (2007)
65. Rajasalu T, Barth C, Spyranis A, Durinovic-Belló I, Uibo R, Schirmbeck R, Boehm BO, Karges W: Experimental autoimmune diabetes: a new tool to study mechanisms and consequences of insulin-specific autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci* 1037: 208-215 (2004)
66. Ratner RE: Type 2 diabetes mellitus: the grand overview. *Diabet Med* 15: 4-7 (1998)

67. Reilly JP, Grise MA, Fortuin FD, Vale PR, Schaer GL, Lopez J, VAN Camp JR, Henry T, Richenbacher WE, Losordo DW, Schatz RA, Isner JM: Long-term (2-year) clinical events following transthoracic intramyocardial gene transfer of VEGF-2 in no-option patients. *J Interv Cardiol* 18: 27-31 (2005)
68. Risau W: Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386: 671-674 (1997)
69. Rivard A, Fabre JE, Silver M, Chen D, Murohara T, Kearney M, Magner M, Asahara T and Isner J M: Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation* 99: 111-120 (1999)
70. Rodriguez-Fontal M, Alfaro V, Kerrison JB, Jablon EP: Ranibizumab for diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev* 5: 47-51 (2009)
71. Salim MD, Al-Matubsi HY, El-Sharaky AS, Kamel MA, Oriquat GA, Helmy MH, El-Bassiouni EA: The levels of vascular endothelial growth factor-A and placental growth factor-2 in embryopathy associated with experimental diabetic gestation. *Growth Factors* 27: 32-39 (2009)
72. Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, Lilienbaum R, Johnson DH: Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 355: 2542-2550 (2006)
73. Sawano A, Iwai S, Sakurai Y, Ito M, Shitara K, Nakahata T and Shibuya M: Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood* 97: 785-791 (2001)
74. Schaper W: Collateral circulation: past and present. *Basic Res Cardiol* 104: 5-21 (2009)
75. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML and Schuh AC: Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376: 62-66 (1995)

76. Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H and Sato M: Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* 5: 519-524 (1990)
77. Shibuya M: Role of VEGF-flt receptor system in normal and tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 67: 281-316 (1995)
78. Simons M, Bonow RO, Chronos NA, Cohen DJ, Giordano FJ, Hammond HK, Laham RJ, Li W, Pike M, Sellke FW, Stegmann TJ, Udelson JE, Rosengart TK: Clinical trials in coronary angiogenesis: issues, problems, consensus: An expert panel summary. *Circulation* 102: 73-86 (2000)
79. Springer ML, Ip TK, Blau HM: Angiogenesis monitored by perfusion with a space-filling microbead suspension. *Mol Ther* 1: 82-87 (2000)
80. Steele EC Jr, Guo Q, Namura S: Filamentous middle cerebral artery occlusion causes ischemic damage to the retina in mice. *Stroke* 39: 2099-2104 (2008)
81. Sturiale A, Campo S, Crascì E, Aloisi C, Buemi M: Experimental models of acute renal failure and erythropoietin: what evidence of a direct effect? *Ren Fail* 29: 379-386 (2007)
82. Takeshita S, Pu LQ, Stein LA, Sniderman AD, Bunting S, Ferrara N, Isner JM and Symes JF: Intramuscular administration of vascular endothelial growth factor induces dose-dependent collateral artery augmentation in a rabbit model of chronic limb ischemia. *Circulation* 90: 11228-11234 (1994)
83. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, Ferrara N, Symes JF and Isner JM: Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest* 93: 662-670 (1994)

84. Takeshita S, Isshiki T, Mori H, Tanaka E, Tanaka A, Umetani K, Eto K, Miyazawa Y, Ochiai M and Sato T: Microangiographic assessment of collateral vessel formation following direct gene transfer of vascular endothelial growth factor in rats. *Cardiovasc Res* 35: 547-552 (1997)
85. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K: The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 65: 550-563 (2005)
86. Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy RL Shows TB: Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 6: 1677-1683 (1991)
87. Testa U, Pannitteri G, Condorelli GL: Vascular endothelial growth factors in cardiovascular medicine. *J Cardiovasc Med* 9: 1190-1221 (2008)
88. van Golde JM, Ruiter MS, Schaper NC, Vöö S, Waltenberger J, Backes WH, Post MJ, Huijberts MS: Impaired collateral recruitment and outward remodeling in experimental diabetes. *Diabetes* 57: 2818-2823 (2008)
89. Veikkola T; Alitalo K: VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 9: 211-220 (1999)
90. Virmani S, Wang D, Harris KR, Ryu RK, Sato KT, Lewandowski RJ, Nemcek AA Jr, Szolc-Kowalska B, Woloschak G, Salem R, Larson AC, Omary RA: Comparison of transcatheter intraarterial perfusion MR imaging and fluorescent microsphere perfusion measurements during transcatheter arterial embolization of rabbit liver tumors. *J Vasc Interv Radiol* 18: 1280-1286 (2007)
91. Wagner HN Jr, Rhodes BA, Sasaki Y, Ryan JP: Studies of the circulation with radioactive microspheres. *Invest Radiol* 4: 374-386 (1969)
92. Walgenbach KJ, Gratas C, Shestak KC, Becker D: Ischaemia-induced expression of bFGF in normal skeletal muscle: a potential paracrine

- mechanism for mediating angiogenesis in ischaemic skeletal muscle. *Nat Med* 1: 453-459 (1995)
93. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M and Heldin CH: Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 269: 26988-26995 (1994)
  94. Waltenberger J, Lange J, Kranz A: Vascular endothelial growth factor-A-induced chemotaxis of monocytes is attenuated in patients with diabetes mellitus: A potential predictor for the individual capacity to develop collaterals. *Circulation* 102: 185-190 (2000)
  95. Waltenberger J: Impaired collateral vessel development in diabetes: potential cellular mechanisms and therapeutic implications. *Cardiovasc Res* 49: 554-560 (2001)
  96. Wang W, Wu SM, Zhang ZM, Zhang YQ: In vivo transfection of hepatocyte growth factor gene induces pulmonary angiogenesis in rabbits with hyperkinetic pulmonary hypertension. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 36:1110-1114 (2008)
  97. Wangler C: Die Rolle verschiedener Vertreter der VEGF-Familie und von MCP-1 auf die Arteriogenese im Maus-Hindlimb-Modell. *Med Dissertation, Universität Ulm: S. 29* (2002)
  98. Westermaier T, Jauss A, Eriskat J, Kunze E, Roosen K. Acute vasoconstriction: decrease and recovery of cerebral blood flow after various intensities of experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *J Neurosurg* 110: 996-1002 (2008)
  99. Wirostko B, Wong TY, Simó R: Vascular endothelial growth factor and diabetic complications. *Prog Retin Eye Res* 27: 608-621 (2008)

100. Wolf C, Cai WJ, Vosschulte R, Koltai S, Mousavipour D, Scholz D, Afsah-Hedjri A, Schaper W and Schaper J: Vascular remodeling and altered protein expression during growth of coronary collateral arteries. *J Mol Cell Cardiol* 30: 2291-2305 (1998)
101. Wong FS, Du W, Thomas IJ, Wen L: The influence of the major histocompatibility complex on development of autoimmune diabetes in RIP-B7.1 mice. *Diabetes* 54: 2032-2040 (2005)
102. Yamazaki Y, Takani K, Atoda H, Morita T: Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGFs) exhibit potent activity through their specific recognition of KDR (VEGF receptor 2). *J Biol Chem* 278: 51985-51988 (2003)
103. Yamazaki Y, Tokunaga Y, Takani K, Morita T: Identification of the heparin-binding region of snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF-F) and its blocking of VEGF-A165. *Biochemistry* 44: 8858-8864 (2005 a)
104. Yamazaki Y, Tokunaga Y, Takani K, Morita T: C-terminal heparin-binding peptide of snake venom VEGF specifically blocks VEGF-stimulated endothelial cell proliferation. *Pathophysiol Haemost Thromb* 34: 197-199 (2005 b)
105. Yoon CS, Jung HS, Kwon MJ, Lee SH, Kim CW, Kim MK, Lee M, Park JH: Sonoporation of the Minicircle-VEGF(165) for Wound Healing of Diabetic Mice. *Pharm Res* 26: 794-801 (2008)
106. Zachary I and Gliki G: Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res* 49: 568-581 (2001)
107. Zuurbier CJ, Kruyver B, Eerbeek O, Mik EG, Ince C: Commonly used numbers of microspheres affect cardiac vascular resistance. *J Cardiovasc Pharmacol* 41: 223-232 (2003)

## 7 Danksagung

Diese Arbeit war ein Bestandteil des DFG-Schwerpunktprojektes (SPP 1069). Im Verlauf dieser Förderperiode wurde außer dieser Arbeit der Grundstein für weitere Projekte zur Untersuchung des Wachstums arterieller Kollateralen gelegt. Freundliche Unterstützung fand unsere Gruppe hierbei vom Tierforschungszentrum Ulm, von der Abteilung Biometrie und Medizinische Dokumentation, der Abteilung Nuklearmedizin sowie von Herrn Prof. Dr. Wolfram Karges, Herrn Prof. Böhm und den Mitarbeitern der Medizinischen Klinik I. Allen Mitarbeitern dieser Abteilungen gebührt mein Dank.

Ich möchte mich auch besonders bei meinem Vater und Susanne Weigold für die unerbittliche Unterstützung bedanken.

Mein ganz besonderer Dank geht an Prof. Dr. med. Johannes Waltenberger für die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung meiner Forschungen. Weiterhin dem gesamten Team der „Collateral Development“-Gruppe, speziell meinen Mitdoktoranden Jan Endregat, Alexander Babiak und Patrick Müller, der Abteilung Molekulare Kardiologie sowie der Abteilung Innere Medizin II der Universität Ulm.