

Der Einfluss des Zytokins Monozyten-Chemoattraktives Protein-1 (MCP-1) auf  
Gefäßneubildung im chronischen Myokardinfarktmodell der Ratte

Von der Medizinischen Fakultät  
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen  
zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Medizin  
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Dennis Alexander Meven

aus

Düsseldorf

Berichter: Herr Privatdozent  
Dr. med. Ernst Rüdiger Schwarz

Herr Universitätsprofessor  
Dr. med. Christian Weber

Tag der mündlichen Prüfung: 3. März 2004

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

# Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Einleitung .....	4
1.1 Vorbemerkungen .....	4
1.2 Grundlagen.....	5
1.3 Wachstumsfaktoren und Zytokine in der tierexperimentellen Forschung.....	7
1.4 Klinische Anwendung von Wachstumsfaktoren.....	15
2. Fragestellung .....	19
3. Methodik .....	20
3.1 Tierauswahl.....	20
3.2 Studiendesign .....	21
3.3 Messparameter .....	23
3.4 Versuchsdurchführung .....	23
3.5 Auswertung.....	42
4. Ergebnisse .....	45
4.1 Körpergewicht im Versuchsverlauf.....	46
4.2 Herzgewicht.....	47
4.3 Herzfrequenzen im Versuchsverlauf.....	48
4.4 Echokardiographische Daten.....	50
4.5 Anzahl der von Willebrand-Faktor-positiven Zellen.....	59
4.6 Anzahl der Gefäße mit Membrana elastica interna .....	63
4.7 CD 31-Immunhistologie zur Darstellung der Monozyteninfiltration.....	67
5. Zusammenfassung der Ergebnisse .....	69
6. Diskussion.....	70
6.1 Wahl des Ischämie-modells: akut versus chronisch.....	71
6.2 Wahl des Wachstumsfaktors / Zytokins .....	71
6.3 Applikationsformen von Wachstumsfaktoren: Plasmid versus Protein .....	72
6.4 Applikationsmodi für Wachstumsfaktoren und Zytokine.....	74
6.5 Therapeutische Angiogenese: Chancen und Risiken .....	76
6.6 Methodenkritik .....	78

7.	Schlussfolgerungen .....	80
8.	Literaturverzeichnis.....	81
9.	Abbildungsverzeichnis.....	89
10.	Tabellenverzeichnis.....	93
11.	Danksagung.....	95
12.	Lebenslauf.....	96

# 1. Einleitung

## 1.1 Vorbemerkungen

Die Haupttodesursachen von Patienten mit koronarer Herzkrankheit sind der akute Myokardinfarkt sowie die daraus resultierenden Folgen wie Herzrhythmusstörungen und Linksherzinsuffizienz. Der Myokardinfarkt wird durch die Ruptur eines arteriosklerotischen Plaques initiiert, auf die eine Freisetzung thrombogenen Materials folgt. Durch Einschwemmen dieses Materials in das Gefäß kommt es zu einem akuten Koronararterienverschluß. Ohne sofortige Therapie in Form einer perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (PTCA) oder einer medikamentösen Lyse kann es zu einer Ischämie und nachfolgend zur Nekrose des Myokardareals kommen. Auch in der Therapie der Angina pectoris als Leitsymptom der koronaren Herzkrankheit spielt die Revaskularisation von stenosierten Herzkranzgefäßen eine entscheidende Rolle, entweder in Form von Katheterinterventionen wie PTCA und Stent-Implantation oder operativ in Form eines aortokoronaren Bypasses. Hierbei werden oft mehrere venöse Gefäßabschnitte, welche in der Regel aus den Venae saphenae des Patienten entnommen werden, auf die Koronarien aufgenäht und stellen einen Shunt zwischen Aorta und den stenosierten Kranzgefäßen her. Alternativ oder zusätzlich zu den Veneninterponaten lässt sich auch die Arteria thoracica interna (= Arteria mammaria interna) für einen aortokoronaren Bypass nutzen. Dieser operative Eingriff ist für den Patienten jedoch nicht ohne Risiko: bei einer durchschnittlichen Letalität von 1 Prozent, welche bei Patienten höheren Lebensalters mit schlechter Auswurffraktion und weiteren kardiopulmonalen Begleiterkrankungen noch ansteigt, und einer 1-Jahres-Verschlußrate der Venentransplantate von 10-20 Prozent<sup>69</sup> zeigt sich, dass der Bedarf zur Suche nach alternativen oder supportiven Maßnahmen zweifelsohne heute immer mehr besteht. Auch gibt es Patienten, bei denen aufgrund von Kontraindikationen wie zu schlechter Auswurffraktion, generalisierter Koronarsklerose, Neoplasmen oder Systemerkrankungen eine aortokoronare Bypassoperation nicht in Frage kommt.



## **1.2 Grundlagen**

### **1.2.1 Auslöser und Folgen eines Myokardinfarktes**

Der Myokardinfarkt, definiert als ischämische Myokardnekrose, entsteht meist auf dem Boden einer arteriosklerotisch bedingten koronaren Herzkrankheit mit Stenose einer Koronararterie.<sup>64</sup> Durch Ruptur eines arteriosklerotischen Plaques kommt es durch nachfolgende Plättchenaggregation zum partiellen oder kompletten thrombotischen Verschluss eines Herzkranzgefäßes mit entsprechender Ischämie des abhängigen Myokards. Dies führt zum klassischen klinischen Ischämiesymptom, der Angina pectoris (= Brustenge), mit Ausstrahlung in den Oberbauch, die linke Schulter, den linken Arm sowie den Kiefer. Weiterhin können vegetative Begleitsymptome wie Schwitzen, Übelkeit und Erbrechen bestehen. Beim transmuralen Myokardinfarkt zeigt sich im EKG eine T-Überhöhung mit Übergang in eine ST-Strecken-Elevation, später dann ein pathologisches Q sowie ein terminal negatives T. In der Enzymdiagnostik zeigen sich ein erhöhtes Troponin sowie eine erhöhte CK-MB innerhalb der ersten 4-6 Stunden. Zu den häufigsten Komplikationen bei einem Myokardinfarkt zählen die bei über 90 Prozent der Patienten auftretenden ventrikulären Herzrhythmusstörungen, die akute Linksherzinsuffizienz mit den potentiellen Folgen Lungenödem und kardiogener Schock und der Re-Infarkt. Eine effiziente Gefäßneubildung im Sinne einer Perfusionsverbesserung innerhalb der ischämischen Randzone könnte das Risiko des Re-Infarkts verringern.

### **1.2.2 Artificielle Auslösung eines Myokardinfarktes im Tierexperiment**

Zur Auslösung eines Myokardinfarkts im Tierexperiment bedient man sich unterschiedlicher Techniken. Diese hängen von der verwendeten Spezies und vom Studiendesign ab. Zur Auslösung eines akuten Myokardinfarkts bei Hunden und Schweinen eignen sich atraumatische Gefäßklemmen,<sup>1,2</sup> welche nach einer festgelegten Okklusionszeit wieder gelöst werden können. Für den dauerhaften Verschluss einer Koronararterie stellt die Ligatur mit einer nicht resorbierbaren Naht eine erprobte Methode dar.<sup>3,4</sup>

### 1.2.3 Angiogenese – Arteriogenese – Vaskulogenese

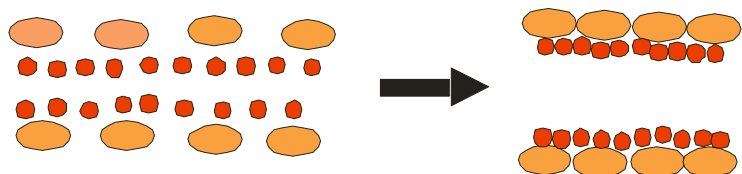
Nach W. Schaper unterscheidet man drei verschiedene Formen der Gefäßneubildung (Abbildung 1): 1. Angiogenese, 2. Vaskulogenese und 3. Arteriogenese. Unter Angiogenese versteht man die Ausbildung eines kapillaren Netzwerks mittels Endothel-Sprossung. Vaskulogenese bezeichnet die embryonale Gefäßneubildung. Hierbei entstehen Gefäße durch Differenzierung von Angioblasten.<sup>5</sup> Als Arteriogenese bezeichnet man die Rekrutierung und Reorganisation vorbestehender Arteriolen, wodurch es zur Zunahme des Gefäßquerschnitts kommt. Hauptstimuli für diese Prozesse sind Ischämie und shear stress,<sup>62</sup> (= Schubspannung; bezogen auf das Gefäßsystem bezeichnet shear stress die durch den Blutfluss auf das Endothel wirkende Kraft pro Fläche) wobei die Arteriogenese möglicherweise einer Entzündungsreaktion mit Einwanderung mononukleärer Zellen bedarf.<sup>63</sup>

Angiogenese



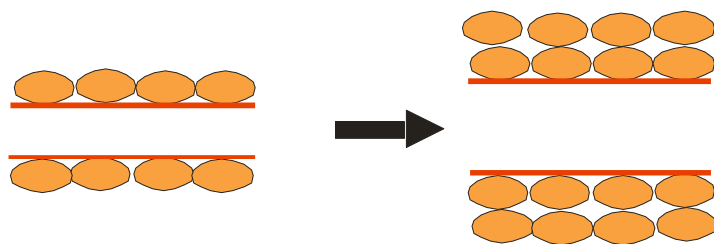
Sprossung eines Endothelschlauchs aus einer Kapillare

Vaskulogenese



Organisation von glatter Gefäßmuskulatur und Angioblasten

Arteriogenese



Reorganisation von Endothel und glatter Gefäßmuskulatur

Abbildung 1: schematische Darstellung der drei möglichen Gefäßneubildungen (modifiziert nach Schaper W, Hauptvortrag H 433 auf dem Deutschen Kongress für Kardiologie in Mannheim 2000).

Die Arteriogenese kann in zwei Phasen unterteilt werden: Proliferations-Phase und Remodeling-Phase.<sup>5</sup> In der Proliferations-Phase nach Okklusion eines Gefäßes werden das Endothel und die glatten Gefäßmuskelzellen zur Mitosebildung angeregt. Letztere produzieren Extrazellulärmatrix, Kollagen und Elastin und bilden schließlich die neue Membrana elastica interna. In der komplexen Remodeling-Phase wird der initiale Gefäßdurchmesser auf das Zwanzigfache gesteigert, die Gewebsmasse in diesem Bereich nimmt um das Fünfzigfache zu. Diese enorme Größen- und Massenzunahme wird eingeleitet durch das Lösen der Zell-zu-Zell-Adhäsion der glatten Muskelzellen, wodurch es zu einer strukturellen Dilatation der kleinen Arteriolen kommt. Im Rahmen dieser Dehnung kommt es zu Lecks in der Gefäßwand, durch die Proteine (Fibrinogen und andere) in den Extravasalraum gelangen. Gleichzeitig kommt es als Folge der lokalen Entzündungsreaktion zu vermehrter Invasion von Monozyten in das perivaskuläre Gewebe. Durch die Ausschüttung von vaskulären Wachstumsfaktoren (unter anderem vascular endothelial growth factor, VEGF) sind Monozyten maßgeblich am Prozess der Angiogenese beteiligt. Außerdem stimulieren Monozyten das Endothel zur Produktion von Wachstumsfaktoren wie basic fibroblast growth factor (bFGF) und platelet-derived growth factor (PDGF). Diese stimulieren zusammen mit den von den Monozyten ausgeschütteten Wachstumsfaktoren die Mitose von Endothelzellen und glatten Muskelzellen. Um das deutlich vergrößerte Gefäß im Gewebe einzubetten, ist eine kontrollierte Zerstörung der alten Gefäßstruktur erforderlich.<sup>54</sup> Dies geschieht durch Restrukturierung der Adventitia mittels gezieltem Absterben von Kardiomyozyten in der Umgebung des neuen Gefäßes. Hierzu sezernieren die Monozyten Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  und induzieren Apoptose im Bereich der alten Gefäßwand.

### **1.3 Wachstumsfaktoren und Zytokine in der tierexperimentellen Forschung**

Die proangiogenetische Wirkung vieler Substanzen ist inzwischen bekannt (Tabelle 1), das Hauptaugenmerk der experimentellen Kardiologie gilt aber vor allem den vaskulären Wachstumsfaktoren und Zytokinen, da diese auch an den physiologischen Entwicklungs- und Wachstumsvorgängen von Blutgefäßen beteiligt sind. Diese Faktoren werden vorwiegend in Endothelzellen und Monozyten produziert und nach Stimulation durch Hypoxie oder shear stress

sezerniert. In den folgenden Abschnitten soll auf die bedeutendsten Substanzen, deren Wirkmechanismen und ihre Anwendungen im Tierexperiment eingegangen werden.

## Endogene Stimulatoren der Angiogenese

- |   |  |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• VEGF (vascular endothelial growth factor) -A, -B, -C, -D</li> <li>• PlGF (placenta growth factor)</li> <li>• aFGF (acidic fibroblast growth factor)</li> <li>• bFGF (basic fibroblast growth factor)</li> <li>• PDGF (platelet-derived growth factor)</li> <li>• TGF-<math>\alpha</math> (transforming growth factor <math>\alpha</math>)</li> <li>• TGF-<math>\beta</math> (transforming growth factor <math>\beta</math>)</li> <li>• HGF (hepatocyte growth factor)</li> <li>• IGF-1 (insulin-like growth factor)</li> <li>• B61/LERK-1</li> <li>• TNF-<math>\alpha</math> (tumor necrosis factor <math>\alpha</math>)</li> <li>• MCP-1(monocyte chemoattractant protein 1)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• IL-8 (Interleukin 8)</li> <li>• PD-ECGF (platelet-derived endothelial cell growth factor)</li> <li>• Angiogenin</li> <li>• Östrogene</li> <li>• Prostaglandin E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub></li> <li>• Follistatin</li> <li>• Proliferin</li> <li>• Hyaluronan-Oligosaccharide</li> <li>• Ganglioside</li> <li>• Erythropoietin</li> <li>• G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor)</li> <li>• GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)</li> </ul> |
|---|--|

Tabelle 1, modifiziert nach Augustin HG: Antiangiogenic tumor therapy: will it work? Trends Pharmacol Sci 1998; 19: 216-222

### 1.3.1 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

In der Gruppe der vaskulären Wachstumsfaktoren zählt VEGF, vascular endothelial growth factor, zu den am besten erforschten Substanzen. Es wird in malignen Tumorzellen, glatten Muskelzellen, Monozyten und Endothelzellen produziert. Die Genexpression für VEGF wird nicht nur durch Hypoxie, sondern auch durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen wie TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ), Angiotensin II, bFGF (basic fibroblast growth factor) und Interleukin-1 gesteigert.<sup>6</sup> Heute unterscheidet man fünf Subtypen, die mit Großbuchstaben von A bis E gekennzeichnet sind. Unter in vitro-Bedingungen fanden Levy und Mitarbeiter<sup>7</sup> heraus, dass sich die Expression der vier zuerst bekannten Isoformen von VEGF in Kardiomyozyten durch Stimulatoren der Protein Kinase C wie Phorbol ester steigern lässt. Für VEGF-A sind zwei Rezeptortypen auf Endothelzellen bekannt: Flt-1 und KDR. Der Flt-1-Rezeptor reguliert die Expression des Gewebsthromboplastins, der KDR-Rezeptor scheint für die Angiogenese zuständig zu sein. VEGF-E ist ein virales Protein, welches selektiv am KDR-Rezeptor bindet.

Im Rahmen myokardialer Ischämie kommt es in den Herzmuskelzellen zu einer gesteigerten Genexpression für VEGF.<sup>2</sup> Die proangiogenetische Wirkung von VEGF läuft über eine

Reaktionskaskade, an der unter anderem die Serin/Threonin-Kinase Akt, welche die Apoptose von Endothelzellen hemmt, beteiligt ist. Gleichzeitig blockiert Akt mittels Phosphorylierung den Zellzyklusinhibitor p21. Dies ermöglicht die Proliferation von Endothelzellen im ischämischen Myokardareal.<sup>65</sup>

Hashimoto und Mitarbeiter<sup>3</sup> untersuchten den Einfluss von Ischämie und Hypoxie auf die VEGF-Expression im Rattenmyokard. Hierzu führten sie bei Ratten 30-minütige bis sechsstündige Okklusionen durch Ligatur im Bereich des Abgangs der linken Koronararterie in vivo durch und fanden im Bereich des linken Ventrikels eine deutliche Steigerung der Expression der VEGF mRNA. Unter in vitro-Bedingungen mit kultivierten Kardiomyozyten konnten sie nach Begasung der Zellen mit 95%N<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub> eine Steigerung der VEGF mRNA-Expression unter Hypoxie nachweisen. Um diese Ergebnisse zu bestätigen führten die Forscher Langendorff-Perfusionsversuche mit Rattenherzen durch. Hypoxie wurde mittels Begasung des Rezirkulationsmediums mit 95% Stickstoff-5% Kohlendioxid-Gemisch erzeugt, Ischämie durch intermittierende Ligatur der linken Kranzarterie. Auch diese Experimente zeigten eine deutliche Zunahme der VEGF mRNA-Expression im ischämischen und hypoxischen Myokard.

Banai und Mitarbeiter<sup>2</sup> zeigten beim Schwein, dass Myokardischämie zu einer Steigerung der VEGF-Expression in den Herzmuskellzellen führt. Die Forscher induzierten die Ischämie in vivo durch intermittierende Okklusion des Ramus interventricularis anterior über einen Zeitraum von sechs Stunden, entnahmen die Herzen und wiesen mittels RNA-Blot-Hybridisierung eine gesteigerte Transkription der für VEGF kodierenden Genabschnitte nach. Auch in einem in vitro-Modell, bei dem kultivierte Myokardzellen von Ratten mehrstündiger Hypoxie ausgesetzt wurden, konnte eine deutliche Steigerung der VEGF mRNA gezeigt werden.

Schwarz und Mitarbeiter<sup>4</sup> untersuchten den Effekt von VEGF auf die regionale Myokarddurchblutung. Hierzu wurden Plasmide mit für VEGF codierender DNA-Sequenz (phVEGF<sub>165</sub>) in die Randzone von Myokardinfarkten bei Ratten injiziert. Die Flußratenmessung mittels radioaktiver Mikrosphären ergab im Vergleich zur Kontrollgruppe (Injektion von Kochsalzlösung) keinen signifikanten Unterschied, obwohl sowohl mikroskopisch als auch makroskopisch Angiogenese zu erkennen war. Die Autoren erklären diesen Umstand dadurch, dass die beobachteten neuen Gefäße in Form von Angiom-ähnlichen Strukturen vorlagen, die nicht wesentlich zur Perfusion des Myokards beitragen. Die Entstehung dieser Strukturen könnte

nach Ansicht dieser Gruppe mit der Rolle von VEGF bei der Tumor-Neovaskularisation in Zusammenhang stehen.

Neben den angiogenetischen Eigenschaften liegen Untersuchungen zum Beitrag des VEGF zur Progression der Atherosklerose vor. So fanden Inoue und Mitarbeiter<sup>6</sup> heraus, dass bei Vorliegen von Atherosklerose VEGF in glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Monozyten vermehrt exprimiert wird, wohingegen keine nennenswerte VEGF-Expression in normalem Herzmuskelgewebe ohne Atherosklerose nachweisbar war.

### **1.3.2 Fibroblast Growth Factor-2**

Fibroblast growth factor-2 (FGF-2), auch basic fibroblast growth factor (bFGF) genannt, ist ein Heparin-bindendes, monomeres Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 17 kD (Kilodalton), welches die Proliferation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen fördert und Angiogenese induziert. Unger und Mitarbeiter<sup>8</sup> untersuchten den Effekt von intrakoronar appliziertem FGF-2 bei Hunden nach Okklusion des Ramus circumflexus der linken Kranzarterie. Mit Hilfe radioaktiver Mikrosphären fanden die Forscher über den Behandlungszeitraum von vier Wochen einen signifikant gegenüber den Kontrollen (Injektion von Kochsalzlösung) gesteigerten kollateralen Blutfluß. Histologisch zeigten Verum- und Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied in der Kapillardichte, jedoch wiesen die untersuchten Myokardareale der Verumgruppe eine signifikant erhöhte Zahl von Gefäßen mit Durchmessern größer 20 µm auf.

Lazarous und Mitarbeiter<sup>9</sup> verglichen den Effekt von FGF-2 und VEGF auf den Kollateralfluss bei Hunden nach Koronarokklusion. Die Okklusion des linken Ramus circumflexus wurde mit Hilfe eines „ameroïd constrictor“ durchgeführt, der das Gefäß über einen Zeitraum von zehn bis zwanzig Tagen konstringiert und schließlich okkludiert. Vom zehnten bis sechzehnten postoperativen Tag wurde über einen Katheter FGF-2, VEGF oder als Kontrolle Kochsalzlösung in Form eines täglichen Bolus in das linke Atrium infundiert. Lazarous und Mitarbeiter<sup>9</sup> stellten fest, dass die maximale Kollateralkonduktanz bei den mit FGF-2 behandelten Tieren nach 24 und 38 Versuchstagen gegenüber der VEGF- und der Kontrollgruppe signifikant erhöht war. Ein Effekt von VEGF war nicht nachzuweisen: es fand sich keine signifikante Verbesserung des

Kollateralfusses im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies erklären die Autoren damit, dass die Applikationsform, die Konzentration und die Dauer der VEGF-Administration nicht optimal gewählt worden seien.

Um eine Aussage über die Wirkungs-dosis von FGF-2 treffen zu können, applizierten Laham und Mitarbeiter<sup>10,11</sup> bei chronisch infarzierten Schweinen verschiedene Mengen FGF-2 zwischen 30µg und 2mg drei Wochen nach Anlage eines Ameroid in Form einer intraperikardialen Infusion. Anhand magnetresonanztomographischer Untersuchungen wurde eine signifikante Verringerung des myokardialen Ischämiegebiets bei den mit FGF-2 behandelten Tieren festgestellt, die bei der höchsten applizierten Dosis (2mg) erwartungsgemäß am deutlichsten ausfiel. Weiterhin fand man eine gesteigerte Vaskularisation in Epikard und Myokard der Verum-Gruppen, bei einigen wenigen mit FGF-2 behandelten Tieren auch im Perikard.

Kürzlich veröffentlichten Scheinowitz und Mitarbeiter<sup>71</sup> eine Arbeit zur Applikation von FGF-2 über eine Woche mit einer osmotischen Minipumpe in einem Ischämie- /Reperusionsmodell der Ratte. Im Gegensatz zu einigen anderen Gruppen konnten sie keine gesteigerte Endothelzellproliferation nachweisen.

### **1.3.3 Insulin-like Growth Factor-I**

Auch Insulin-like growth factor I (IGF-I) wird im Rahmen myokardialer Ischämie vermehrt ausgeschüttet und hat Einfluss auf die Angiogenese. Kluge und Mitarbeiter<sup>12</sup> zeigten nach Mikroembolisation am Schweineherzen, dass IGF-I an der für angiogenetische Prozesse charakteristischen Entzündungsreaktion beteiligt ist. Für IGF-I kennt man sechs verschiedene Bindungsproteine, IGFBP-1 bis IGFBP-6 genannt, deren Funktion vermutlich in der Modulation der biologischen Aktivität des IGF-I liegt. Um die mRNA-Expression dieser Bindungsproteine im zeitlichen Verlauf nach Auftreten einer regionalen myokardialen Ischämie darzustellen, wurde mit Hilfe von Polystyren-Mikrosphären mit einem Durchmesser von 25µm eine Mikroembolisation in einem Teil des Myokards ausgelöst.<sup>13</sup> Hierzu wurden die Mikrosphären in den Ramus circumflexus der linken Herzkranzarterie injiziert. Die mRNA-Expression von IGFBP-3 war im Zeitraum von 3 bis 24 Stunden nach Mikroembolisation signifikant erhöht, die mRNA-Expression von IGFBP-6 war über die gesamte Versuchsdauer von 3 Stunden nach

Mikroembolisation bis zur Messung nach 168 Stunden signifikant gegenüber nichtinfarzierten Kontrollregionen erhöht. Dieser Zusammenhang zwischen Ischämie und verstärkter Expression von IGF-I und seiner Bindungsproteine weist auf eine Beteiligung dieser Substanzen an Reparaturprozessen oder Angiogenese hin.

#### **1.3.4 Hepatocyte Growth Factor**

Hepatocyte growth factor (HGF) ist ein multifunktionaler Wachstumsfaktor und als solcher an Gewebsregeneration, Wundheilung und Angiogenese<sup>70</sup> beteiligt. In der Frühphase nach Myokardinfarkt ist eine erhöhte Plasmakonzentration von HGF nachweisbar. Ono und Mitarbeiter<sup>14</sup> führten ein Ischämie-Reperfusionmodell der Ratte durch, um Aussagen über die Plasmakonzentration von HGF und die Genexpression von HGF und c-Met, dem Rezeptor für HGF, in verschiedenen Geweben zu erhalten. Das Versuchsprotokoll sah nach einstündiger Okklusion des Ramus interventricularis anterior eine 24-stündige Reperfusion vor, während derer die Plasmakonzentration von HGF zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt wurde. Außerdem wurde die Genexpression von HGF und c-Met zu verschiedenen Zeitpunkten bis 120 Stunden nach Reperfusion gemessen. Die Plasmakonzentration von HGF zeigte 3 Stunden nach Reperfusion einen deutlichen Gipfel, fiel dann ab und stieg 12 Stunden nach Reperfusion wieder an. Die Genexpressionen von HGF und c-Met im ischämischen Myokard waren 12 bis 120 Stunden nach Reperfusion signifikant erhöht.

#### **1.3.5 Granulocyte/Monocyte-Colony-Stimulating Factor**

Granulozyten-Monozyten-koloniestimulierender Faktor, kurz GM-CSF, ist ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor, welcher im Knochenmark die Produktion, Reifung und Ausschüttung von Granulozyten und Monozyten anregt. Seine proangiogenetische Wirkung besteht in einer Inhibition der Apoptose von Monozyten. Durch das verlängerte Überleben der Monozyten wird deren Akkumulation verstärkt und dadurch ihr Einfluss auf die Angiogenese gesteigert.<sup>66</sup>



### 1.3.6 Monocyte Chemoattractive Protein-1

Humanes Monozyten chemoattraktives Protein-1 (MCP-1), auch human macrophage/monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) genannt, ist ein Protein aus 76 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 8.5 kD (Kilodalton).<sup>41</sup> Es gehört zur Chemokin-Familie proinflammatorischer Zytokine<sup>40</sup> und spielt eine wichtige Rolle bei der Entzündungsreaktion von Monozyten und Makrophagen. Die Induktion von Angiogenese und Arteriogenese geschieht durch Aktivierung von Monozyten, Stimulation der Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen in ischämischen Gefäßabschnitten und Anregung der Monozyten zur Migration durch die Gefäßwand.

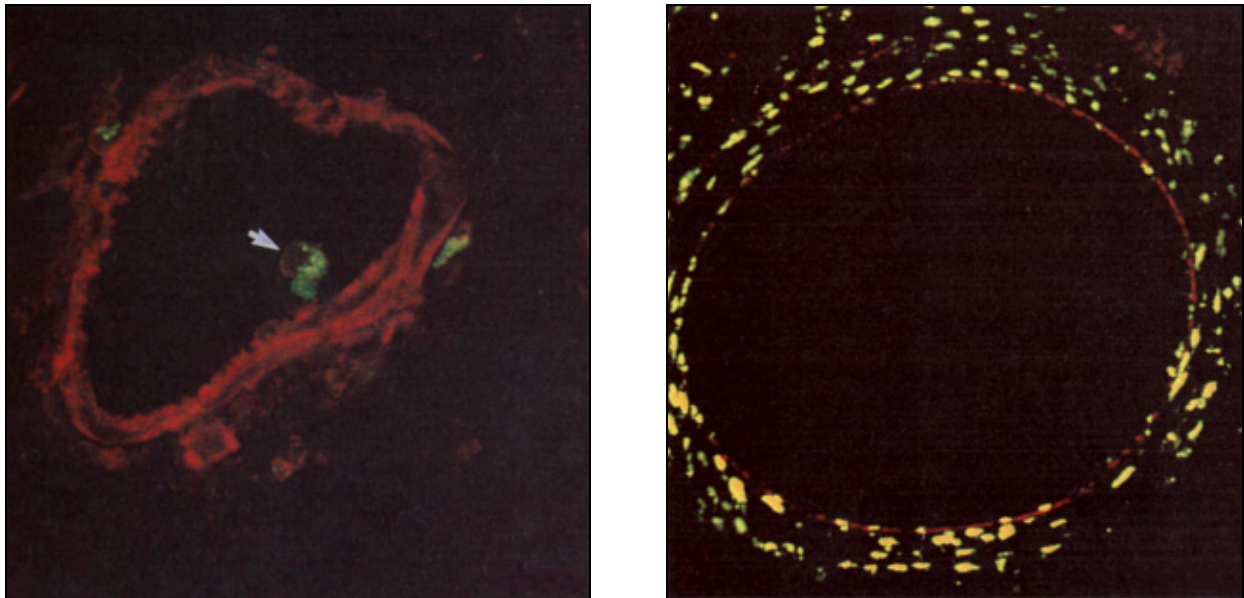


Abbildung 2: Immunhistologische Darstellung der Monozyten-Adhäsion (links) und – Akkumulation (rechts) in der Gefäßwand (aus Ito WD et. al: Monocyte Chemotactic Protein-1 Increases Collateral and Peripheral Conductance After Femoral Artery Occlusion. *Circ Res* 1997;80:829-837; mit freundlicher Genehmigung von Prof. W. Schaper).

Ito und Mitarbeiter<sup>15</sup> aus der Arbeitsgruppe um W. Schaper vom Max-Planck-Institut für experimentelle Kardiologie in Bad Nauheim untersuchten den Einfluss von MCP-1 auf den kollateralen Blutfluß bei Kaninchen. Hierzu okkludierten die Forscher bei den Tieren die Arteria

femorales und applizierte MCP-1 proximal des Verschlusses mittels einer osmotischen Minipumpe über einen Zeitraum von 7 Tagen. Anschließend wurden Messungen zur Bestimmung der Hinterlauf-Durchblutung durchgeführt, dann wurden die Tiere getötet und post mortem-Angiogramme zur Darstellung der Femoralgefäße angefertigt. Im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigten die mit MCP-1 behandelten Tiere eine signifikante Steigerung der Durchblutung des Hinterlaufs, und auch angiographisch war eine gesteigerte Kollateralisierung zu erkennen (siehe Abbildung 3).

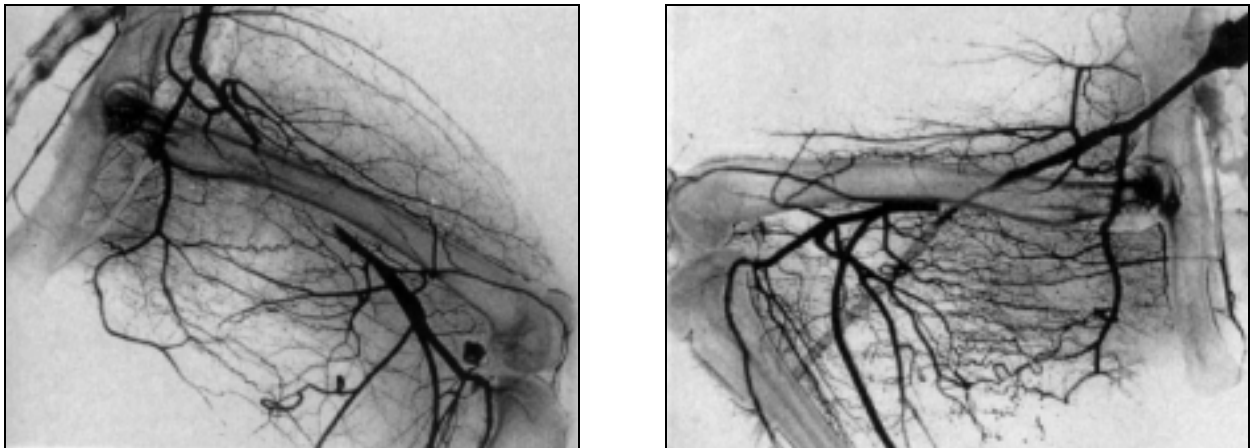


Abbildung 3: post mortem-Angiogramme bei Kaninchen nach 7-tägiger Okklusion der Arteria femoralis, links: ohne MCP-1 (Kontrolle), rechts: nach 7-tägiger kontinuierlicher Administration von MCP-1 über eine osmotische Minipumpe (aus Ito WD et. al: Monocyte Chemotactic Protein-1 Increases Collateral and Peripheral Conductance After Femoral Artery Occlusion. *Circ Res* 1997;80:829-837; mit freundlicher Genehmigung von Prof. W. Schaper).

### 1.3.7 Wachstumsfaktoren-„Cocktails“

Um die Wirkung von exogen im Experiment zugeführten Wachstumsfaktoren auf die Angiogenese zu verstärken, erscheinen bestimmte Kombinationen von Wachstumsfaktoren sinnvoll. So testete die Gruppe um W. Schaper aus Bad Nauheim die Administration eines „Cocktails“ aus MCP-1 und GM-CSF im Kaninchen-Modell. Nach Okklusion der rechten Arteria femoralis wurde der „Cocktail“ aus MCP-1 und GM-CSF mit einer osmotischen Minipumpe über eine Woche direkt proximal der Verschluss-Stelle infundiert. Die

Flußratenmessung zeigte eine deutliche Konduktanzzunahme, welche angiographisch bestätigt ist, und im Vergleich zur alleinigen Anwendung von MCP-1 einen additiven Effekt auf die Angiogenese.<sup>68</sup> Dies lässt sich dadurch erklären, dass MCP-1 und GM-CSF zwei unterschiedliche Mechanismen fördern, die an den Prozessen der Angiogenese und Arteriogenese beteiligt sind: MCP-1 wirkt chemoattraktiv auf Monozyten und aktiviert diese, und GM-CSF hemmt die Apoptose der Monozyten.<sup>66</sup>

Einen anderen Weg beschritten Witzsch und Mitarbeiter:<sup>67</sup> sie kombinierten VEGF mit Angiopoietin-1, einer Substanz, die für sich alleine keine Angiogenese auszulösen vermag. Angiopoietin-1 wirkt jedoch an den Endothelzellen neu gebildeter Gefäße antiapoptotisch. Dadurch kommt es nach gemeinsamer Gabe von VEGF und Angiopoietin zu einer potenzierten Angiogenese in einem Kaninchenmodell chronischer peripherer Ischämie.

## **1.4 Klinische Anwendung von Wachstumsfaktoren**

### **1.4.1 Intramyokardiale Injektion von FGF-2 bei koronarer Herzkrankheit**

In den letzten Jahren haben mehrere Forschungsgruppen verschiedene Anwendungsgebiete und Applikationsformen für Wachstumsfaktoren erprobt. Schumacher und Mitarbeiter<sup>16</sup> injizierten FGF-2 in das Myokard von Patienten mit koronarer Herzkrankheit während Bypassoperationen im Bereich der Anastomose zwischen dem Ramus interventricularis anterior (RIVA oder LAD = left anterior descending coronary artery) und der Arteria thoracica interna (=A. mammaria interna, IMA). In der Kontrollgruppe wurde hitzeinaktiviertes FGF-2 injiziert. Zwölf Wochen nach Injektion von FGF-2 sahen die Autoren in der angiographischen Darstellung der Koronararterien neovaskuläre Strukturen im Bereich der stenosierten Herzkranzgefäße. Trotz dieser vielversprechenden Daten wurden die Methodik (Dichtemessung) sowie die fraglichen Langzeiteffekte und funktionelle Bedeutung einer möglichen Perfusionsverbesserung dieser Arbeit von vielen Arbeitsgruppen kritisiert.

Laham und Mitarbeiter<sup>17</sup> untersuchten den Effekt von intramyokardial-perivaskulär injiziertem bFGF in einer Studie an Patienten während einer koronararteriellen Bypass-Operation. Als

Trägermaterial für den Wachstumsfaktor wurden Kugeln aus Heparin-Alginat verwendet, die ein Depot für die langsame Freisetzung von bFGF darstellen. Neben acht Placebo-Patienten wurden bei ebenfalls jeweils acht Patienten entweder 10µg oder 100µg bFGF appliziert. Erwartungsgemäß zeigten die mit 100µg bFGF behandelten Patienten bei den Kontrolluntersuchungen neun Monate nach der Applikation des Wachstumsfaktors deutliche Perfusionsverbesserungen in der Magnetresonanz-Perfusionsdarstellung. Auch war das Ausmaß der regionalen Wandbewegung in dieser Gruppe signifikant verbessert, wohingegen dieser Effekt in den beiden anderen Gruppen nicht nachweisbar war.

#### **1.4.2 Intramyokardiale Injektion von phVEGF<sub>165</sub> bei koronarer Herzkrankheit**

Die intramyokardiale Injektion von einem für VEGF codierenden Plasmid, phVEGF<sub>165</sub>, wurde von Losordo und Mitarbeitern<sup>18, 19</sup> als alleinige Therapie bei myokardialer Ischämie untersucht. Fünf Patienten, bei denen konventionelle Therapieformen versagten, wurden in diese Studie eingeschlossen. Zu diesen konventionellen Therapieformen zählt die medikamentöse Therapie mit ACE-Hemmern, Aspirin, Beta-Blockern, Calciumantagonisten, Diuretika und Nitraten. Außerdem unterzogen sich die Patienten in der Vergangenheit bereits Revaskularisationsmaßnahmen wie koronararterieller Bypass-Chirurgie und/oder einer perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (PTCA), zum Teil mit Einlage von Stents. Nach einer linksthorakalen Mini-Thorakotomie wurde die Plasmid-DNA in die anterolaterale Wand des linken Ventrikels injiziert. Kontrollangiographien 60 Tage nach der Injektion zeigten bei allen 5 Patienten einen gesteigerten kollateralen Blutfluß im ischämischen Areal. Auch in der SPECT-Darstellung (Single-Photon-Emissions-Computertomographie) des linken Ventrikels war bei allen Patienten eine verbesserte myokardiale Perfusion nachzuweisen. Alle Patienten gaben zudem eine ab dem 10. Tag spürbare Verringerung der Frequenz und Schwere der pectanginösen Anfälle an, und der dauerhafte durchschnittliche tägliche Verbrauch von Nitraten sank bis zum 60. Tag nach Gentransfer auf weniger als ein Fünftel im Vergleich zur Zeit vor dem Eingriff.

### **1.4.3 Intrakoronare Injektion von rhVEGF bei koronarer Herzkrankheit**

Eine weitere Applikationsmöglichkeit für Wachstumsfaktoren ist die intrakoronare Injektion.<sup>20-22</sup> Hendel und Mitarbeiter<sup>22</sup> rekrutierten 14 Patienten mit schwerer koronarer Herzkrankheit und injizierten verschiedene Dosen rekombinantes humanes VEGF (rhVEGF) in den Koronarkreislauf dieser Patienten. Vor allem bei den Patienten, die mit höheren Dosen rhVEGF behandelt wurden, zeigte sich im SPECT 60 Tage nach Administration des Wachstumsfaktors eine Verbesserung der Myokardperfusion.

### **1.4.4 Intrakoronare Injektion von rFGF-2 bei koronarer Herzkrankheit**

Rekombinantes FGF-2 (rFGF-2) wurde an einem Kollektiv von 52 Patienten klinisch erprobt. Laham und Mitarbeiter<sup>23</sup> untersuchten die Wirkung von intrakoronar injiziertem rFGF-2 in verschiedenen Dosierungen. Die Forscher konnten bei den behandelten Patienten Verringerungen der Angina pectoris - Anfälle, gesteigerte Belastbarkeit sowie magnetresonanztomographisch gesicherte Verbesserungen der Myokardperfusion und der linksventrikulären Funktion 30 und 60 Tage nach der Applikation von FGF-2 nachweisen.

### **1.4.5 Intraarterielle Administration von phVEGF<sub>165</sub> bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit**

Auch bei der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) sind Wachstumsfaktoren in der klinischen Erprobung. So applizierten Isner und Mitarbeiter<sup>24</sup> bei einer 71-jährigen Patientin mit einer Gangrän der rechten Großzehe aufgrund verschlossener Unterschenkelarterien 2000 µg phVEGF<sub>165</sub>, also Plasmid-DNA, die für die aus 165 Aminosäuren bestehende Isoform von VEGF codiert, in die Arteria poplitea. Dies geschah mittels eines Angioplastie-Katheters, an dessen Spitze eine Schicht aus Hydrogel-Polymer aufgetragen worden war, die das Plasmid für VEGF enthielt. Durch Aufblasen des an der Katheterspitze befindlichen Ballons wurde das Plasmid auf die Gefäßwand übertragen. Vier und 12 Wochen nach der Gentherapie zeigte die digitale Subtraktionsangiographie (DSA) vermehrte Kollateralgefäße im Unterschenkel. Trotz dieser angiographisch nachgewiesenen Kollateralisation musste der Unterschenkel der Patientin

aufgrund der nicht abheilenden Gangrän 5 Monate nach der Gentherapie amputiert werden. Bereits eine Woche nach Gentherapie fiel eine andere unerwünschte Wirkung des VEGF auf: es kam zur Entwicklung dreier Angiome vom Spider Nävi - Typ als Zeichen einer unkontrollierten Angiogenese am distalen Unterschenkel.

#### **1.4.6 Intramuskuläre Injektion von phVEGF<sub>165</sub> bei peripherer arterieller Verschußkrankheit**

Baumgartner und Mitarbeiter<sup>25</sup> injizierten 9 Patienten mit nichtheilenden Ulcera crura phVEGF<sub>165</sub> direkt in die Unterschenkelmuskulatur des betroffenen Beins. Bei 7 Unterschenkeln zeigte die digitale Subtraktionsangiographie 8 Wochen nach Gentransfer neue Kollateralgefäße. Eine Perfusionsverbesserung stellte sich bei 8 Unterschenkeln der betroffenen Patienten im Magnetresonanzangiogramm (MRA) dar.

#### **1.4.7 Klinische Wertigkeit der Wachstumsfaktorenanwendung**

Die Ergebnisse der bisher veröffentlichten Studien zeigen nicht nur Erfolge, sondern auch Risiken der Anwendung von Wachstumsfaktoren oder den für Wachstumsfaktoren kodierenden Plasmiden auf. Solange keine Langzeitergebnisse zu den beschriebenen Studien vorliegen, die den nachhaltigen Nutzen der Wachstumsfaktorenanwendung am Menschen zeigen, werden Wachstumsfaktoren sicherlich keinen routinemäßigen Einzug in die klinische kardiologische und kardiochirurgische Therapie erhalten, stellen jedoch eine interessante und ausbaufähige zukünftige Therapiealternative dar.

## **2. Fragestellung**

Im Rahmen eines Angiogenese-Projektes in experimentellen Myokardischämie-Modellen wurden diverse Wachstumsfaktoren auf die Entwicklung einer Angiogenese getestet. In einer ersten Arbeit wurde der Einfluss von VEGF auf die Angiogenese im Myokardinfarkt der Ratte getestet.

In der vorliegenden Folgearbeit wurde der Einfluss des Zytokins MCP-1 auf Angiogenese und Arteriogenese im chronischen Myokardinfarktmodell der Ratte untersucht. Die zugrunde liegende Arbeitshypothese lautete: Eine einmalige Anwendung von MCP-1 bewirkt eine Angiogenese und eine Arteriogenese im chronischen Myokardinfarktmodell der Ratte.

Neben der histologischen Untersuchung auf neu gebildete Gefäße im ischämischen Myokard wurden Herzfrequenz und linksventrikuläre Fraktionsverkürzung als funktionelle Parameter erfasst.

### 3. Methodik

Sämtliche Versuche wurden nach Genehmigung durch die Bezirksregierung Köln (Aktenzeichen: 23.203.2 AC 37, 22/98) und gemäß des Tierschutzgesetzes, des *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Research Council 1996, Washington DC, USA) sowie den intra-institutionellen Richtlinien zum Umgang mit Versuchstieren im Institut für Versuchstierkunde der Medizinischen Einrichtungen der RWTH Aachen durchgeführt.

#### 3.1 Tierausswahl

Bei den verwendeten Versuchstieren handelte es sich um weibliche Sprague-Dawley Ratten (SPRD) aus eigener Zucht des Instituts für Versuchstierkunde der Medizinischen Einrichtungen der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen (Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Küpper, Tierzucht und Tierhaltung: Dr. sc. agr. Kluge). Die Vorzüge der Spezies Ratte sind die einfache Haltung und die Handlichkeit im Rahmen des operativen Eingriffs, der in der Regel von einer Person durchgeführt werden kann. Mit Ratten vom Stamm Sprague-Dawley liegen in der experimentell-kardiologischen Literatur zahlreiche Erfahrungen vor.<sup>3, 4, 26-28</sup>



Abbildung 4: Sprague-Dawley Ratte.



Damit sich die Tiere an die veränderten Umgebungsbedingungen gewöhnen konnten, wurden sie etwa 1 Woche vor Versuchsbeginn zu jeweils 2 Ratten pro Käfig (Makrolon Typ III) geliefert. Das Einstreu der Käfige bestand aus entstaubter Weichholzfaser, Futter und Wasser stand den Tieren über den gesamten Aufenthaltszeitraum ad libitum zur Verfügung. Hierbei handelte es sich um das Alleinfutter für die Haltung von Ratten und Mäusen ssniff R/M-H (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest). Das Tränkwasser wurde vor Bereitstellung entkalkt und durch zweifache Ozonierung und UV-Bestrahlung entkeimt. Die Umgebungstemperatur in den Tierräumen betrug  $20 \pm 2$  Grad Celsius bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von  $50 \pm 10$  %, der Hell/Dunkel Rhythmus lag bei 12:12 Stunden.

### **3.2 Studiendesign**

Um den Einfluss von MCP-1 auf ischämisches Myokard zu untersuchen, wurde nach einer echokardiographischen Untersuchung ein Myokardinfarkt durch operative Okklusion des Hauptastes der linken Herzkranzarterie (Ramus interventricularis anterior) induziert. Nach einer Erholungsphase von sechs Wochen wurde erneut eine Echokardiographie durchgeführt und in einer zweiten Operation entweder die zu untersuchende Substanz MCP-1 (in isotoner Kochsalzlösung) oder ausschließlich Kochsalzlösung als Kontrolle in den ischämischen Randbereich des Infarkts injiziert. Vier Wochen nach der zweiten Operation wurden die Tiere nochmals echokardiographisch untersucht und anschließend getötet. Die Herzen wurden entnommen, in Scheiben geschnitten, photographiert und bis zur Aufbereitung für die histologische Analyse in Formalin gelagert.

## STUDIENDESIGN

### 1. Gruppe: NaCl, 5 Tiere



### 2. Gruppe: MCP-1, 5 Tiere



Abbildung 5: Studiendesign.

### **3.3 Messparameter**

Folgende Parameter wurden erfasst:

1. Körpergewicht der Tiere vor jeder Operation
2. Herzfrequenz und 1-Kanal-EKG während jedes Eingriffs
3. echokardiographisch ermittelte Fraktionsverkürzung des linken Ventrikels vor der ersten und zweiten Operation und vier Wochen nach der zweiten Operation
4. Herzgewicht

Außerdem wurde von den Herzen eine histologische Beurteilung in verschiedenen Färbungen vorgenommen, um das Vorhandensein einer potentiellen Angiogenese aufzuzeigen. Dies wird im Detail in Kapitel 3.4.7 dargestellt.

### **3.4 Versuchsdurchführung**

#### **3.4.1 Echokardiographische Voruntersuchung**

Nach einer Eingewöhnungszeit von etwa 1 Woche im Tierstall der Abteilung für Versuchstierkunde wurden die Ratten echokardiographisch unter einer kurzen Inhalationsnarkose mit Isofluran (Forene<sup>®</sup>, Abbott GmbH, Wiesbaden) untersucht (Hewlett Packard Sonos 5500 mit Philips s12 Schallkopf (12 MHz), Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen und Philips Medizin Systeme, Hamburg), um die Fraktionsverkürzung des linken Ventrikels als funktionellen Parameter zu ermitteln. Hierzu wurden die Tiere in einen Glasbehälter überführt, in den zuvor 2 ml Isofluran zur Verdunstung eingebracht worden waren. Nach erfolgreicher Narkose wurde der Thorax rasiert (Aesculap GT 104/GH 204, Aesculap AG und Co KG, Tuttlingen) und kurz mit Hautdesinfektionsmittel (Sterillium<sup>®</sup>, Bode Chemie, Hamburg) abgerieben. Unter fortwährender Narkose mit einem mit Isofluran getränkten Tupfer wurde eine echokardiographische Darstellung des linken Ventrikels im Querschnitt angefertigt

und anschließend im so genannten M-Mode (time motion) die Kammerkontraktion in der Querschnittsebene über den Zeitverlauf dargestellt. Diese M-Mode-Darstellungen dienten zur Ermittlung der endsystolischen und enddiastolischen Längen, aus denen später die Fraktionsverkürzung ermittelt wurde. Alle echokardiographischen Daten wurden auf Videokassetten aufgezeichnet (BASF E 240, BASF, Ludwigshafen).

### **3.4.2 Operation zur Induktion eines Myokardinfarktes**

#### **3.4.2.1 Narkose**

Zur Ermittlung des Körpergewichts wurden die Ratten vor Applikation der Narkose gewogen (Waage BP2100, Sartorius AG, Göttingen). Anschließend wurde eine Injektionsnarkose bestehend aus einer Kombination aus 60 bis 100 mg/kg Körpergewicht Ketamin (Ketamin 10%, Sanofi-CEVA GmbH, Düsseldorf) und 5 bis 10 mg/kg Körpergewicht Xylazin (Rompun<sup>®</sup> 2%, Bayer Vital, Leverkusen) mit einem Gesamtvolumen von 0,4 bis 0,5 ml mittels einer Feindosierungsspritze mit aufgesetzter Nadel (Omnican<sup>®</sup> 1 ml, B.Braun, Melsungen) intraperitoneal injiziert. Diese Narkosedosis ist mit Angaben aus der Literatur vergleichbar.<sup>28, 29</sup> Falls die Narkose bei einem Tier im Operationsverlauf nachließ, wurde  $\frac{1}{4}$  der einleitenden Narkosedosis nachinjiziert. Zeichen für das Nachlassen der Narkose sind zum Beispiel das Einsetzen der selbständigen Atmung trotz maschineller Beatmung, die Bewegung der Sinneshaare an der Nase und die Reaktion auf Schmerzreize wie etwa einen Kniff in den Schwanz der Ratten.

#### **3.4.2.2 Vorbereitungen zur Intubation**

Nach Einleitung der Narkose wurde die Brust der Ratten rasiert (Aesculap GT 104/GH 204, Aesculap AG und Co KG, Tuttlingen) und kurz mit einer Desinfektionslösung (Sterillium<sup>®</sup>, Bode Chemie, Hamburg) desinfiziert. Um die Augen der Tiere vor dem Austrocknen zu schützen, wurde Bepanthen Roche<sup>®</sup> Augen- und Nasensalbe (Hoffmann-La-Roche AG, Grenzach-Wyhlen) in die Bindehautsäcke eingebracht, anschließend wurden die Tiere in Rückenlage vorsichtig auf der Operationsunterlage mit medizinischem Pflaster (Durapore<sup>®</sup>, 3M,

Borken) an den Extremitäten fixiert. Zur Überwachung der Körpertemperatur wurde ein digitales Fieberthermometer (Hartmann Digital, Paul Hartmann AG, Heidenheim) rektal eingeführt. Mit Hilfe eines Heizkissens und einer roten Wärmelampe wurde die Körpertemperatur der Tiere auf einem Niveau von etwa 36 Grad Celsius gehalten. Um bei der Intubation den Blick in den Rachen der Tiere zu erleichtern, wurde der Kopf mit Hilfe eines an der Operationsunterlage und an den vorderen Schneidezähnen des Oberkiefers befestigten Gummibandes rekliniert.

### **3.4.2.3 Intubation und Beatmung**

Als Tubus wurde eine an der Spitze schräg angeschnittene flexible Venenverweilkanüle vom Typ Abbocath-T<sup>®</sup> 16 G (Abbott LTD, Sligo, Irland) verwendet. Um den Blick auf den Larynx zu ermöglichen und die Zunge aus dem Blickfeld zu halten, wurde ein kleiner, an der Spitze leicht nach oben gebogener Spatel verwendet, mit dem die Zunge aufgeladen und hochgehalten wurde. Unter Sicht wurde dann der Tubus in die Trachea eingeführt. Die korrekte Lage des Tubus wurde durch Einschalten der Beatmung und Beobachtung der Thoraxexkursionen beurteilt. War der Tubus richtig in der Trachea platziert, sah man eine seitengleiche und beatmungssynchrone Thoraxbewegung. Zur Beatmung der Tiere wurde ein Beatmungsgerät für Tiere der Firma Engler (A.D.S 1000, Engler Engineering Corp., Hialeah, USA) verwendet. Die Tiere wurden mit einem Sauerstoff/Raumluft-Gemisch bei einer Frequenz von 80 Atemzügen pro Minute beatmet. Das Atemzugvolumen betrug 8 ml/kg, der maximale Beatmungsdruck wurde auf 5 cm H<sub>2</sub>O eingestellt.

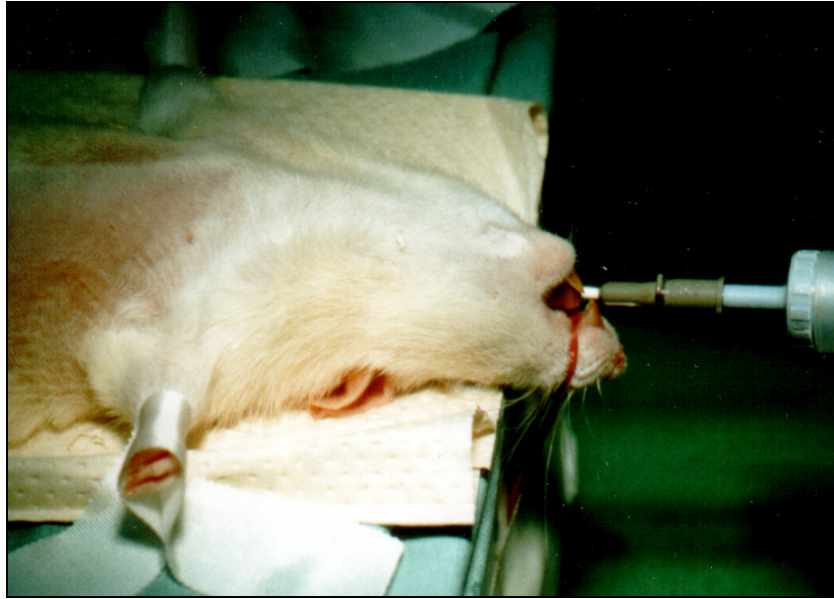


Abbildung 6: Ratte nach Intubation. Man erkennt das über die vorderen Schneidezähne gelegte Gummiband, welches den Kopf in der leichten Reklination fixiert (rot), außerdem das äußere Ende der als Tubus verwendeten Venenverweilkanüle (grau) sowie das Ansatzstück, welches den Tubus mit dem Schlauch des Beatmungsgeräts konnektiert.

#### **3.4.2.4 Thorakotomie**

Nach erfolgreicher Intubation und Beginn der maschinellen Beatmung wurde zur Überwachung der Herzaktion ein 1-Kanal EKG über ein MacLab<sup>®</sup>-Interface (AppleStore Europe, Hollyhill Industrial Estate, Hollyhill, Cork, Irland) an einen Apple/Macintosh Power PC Performa 5200 (AppleStore Europe, Hollyhill Industrial Estate, Hollyhill, Cork, Irland) übertragen, um zu verschiedenen Zeitpunkten der Operation ein EKG-Signal aufzuzeichnen. Es wurde ein eigens zu diesem Zweck präpariertes EKG-Kabel verwendet, an dessen Elektroden Sicherheitsnadeln gelötet worden waren (Dipl.-Ing. W. Krebs, OBERINGENIEUR Medizinische Klinik I, Universitätsklinikum der RWTH Aachen), die perkutan an den Extremitäten der Tiere angebracht werden konnten. Die erste EKG-Aufzeichnung wurde unmittelbar vor dem ersten Skalpellschnitt durchgeführt.

Mittels linksseitiger Thorakotomie im vierten Interkostalraum wurde das Herz zur Darstellung gebracht. Hierbei wurde mit einem Einmalskalpell (Feather Disposable Scalpel Fig 11, pfm Produkte für die Medizin AG, Köln) zunächst durch einen parallel zu den Rippen verlaufenden Hautschnitt von einem Zentimeter Länge der Blick auf die Thoraxmuskulatur ermöglicht. Diese wurde in der gleichen Schnittrichtung vorsichtig mit dem Einmalskalpell (Feather Disposable Scalpel Fig 11, pfm Produkte für die Medizin AG, Köln) unter Zuhilfenahme einer anatomischen Pinzette (Aesculap AG & Co KG, Tuttlingen) durchtrennt. Dabei galt besondere Vorsicht, um keine größeren Gefäße, die in der Thoraxmuskulatur der Ratte verlaufen, zu verletzen. Die Interkostalmuskulatur wurde schließlich mit einer gebogenen Klemme (Ulrich GmbH & Co KG, Ulm) stumpf präpariert, um die darunterliegenden Strukturen, den linken Lungenflügel und das Herz, nicht zu verletzen. Nach stumpfer Durchtrennung der Pleura parietalis wurde ein Thoraxspanner für Kleinnager (Eickemeyer Medizintechnik für Tierärzte, Tuttlingen) zwischen den Rippen platziert, um das Sichtfenster auf das Herz zu vergrößern. Mit einer anatomischen Pinzette (Aesculap AG & Co KG, Tuttlingen) und einer kleinen spitzen Schere (Ulrich GmbH & Co KG, Ulm) wurde dann das Perikard eröffnet. Nach erfolgter Thorakotomie wurde die EKG-Aufzeichnung erneut für etwa 20 bis 30 Sekunden gestartet.

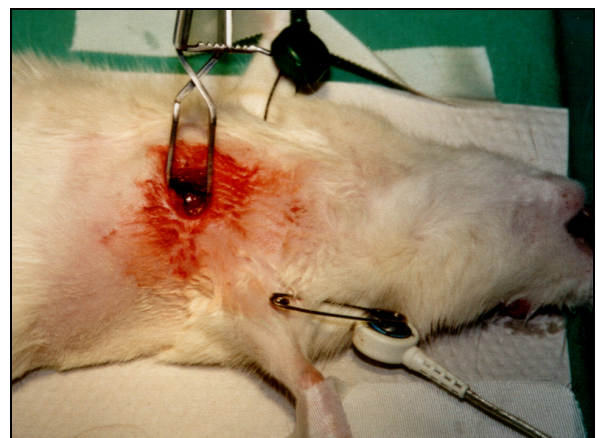


Abbildung 7: Thorakotomie. Links: Hautschnitt, Blick auf die Thoraxmuskulatur. Rechts: nach Eröffnung des Thorax und Perikardinzision; ein Thoraxspanner spreizt die Rippen, um ein größeres Sichtfenster für den Blick auf das Herz zu schaffen.

### **3.4.2.5 Koronarokklusion**

Da die Koronarien bei Ratten vorwiegend intramyokardial verlaufen und nicht epikardial wie beim Menschen, sind diese in einem kleinen Operationsfeld schlecht mit bloßem Auge zu erkennen. Durch Legen einer quer zur Herzachse unterhalb des linken Herzhohrs verlaufenden Naht ist ein Verschluss des Ramus interventricularis anterior, der am Rattenherzen in diesem Gebiet verläuft, jedoch sehr wahrscheinlich und wird durch tiefe S-Zacken, Verlust der R-Zacken und Auftreten von Arrhythmien im EKG bestätigt. Für die Koronarokklusion wurde eine nicht resorbierbare monofile 6-0 Surgilene<sup>®</sup> Naht (mit HR10 Nadel, B.Braun-Dexon GmbH, Spangenberg) verwendet, die mit einem kleinen Nadelhalter (Aesculap AG & Co KG, Tuttlingen) unterhalb des linken Herzhohrs über eine Strecke von zwei bis drei Millimetern in einer Tiefe von ein bis zwei Millimetern durch das Myokard geführt wurde. Anschließend wurde der Faden zugezogen und geknotet und die EKG-Aufzeichnung gestartet. Das Auftreten von tiefen S-Zacken sowie einsetzende Arrhythmien wurden als frühe Indikatoren der korrekten Ligatur des Ramus interventricularis anterior gedeutet. Leichte Blutungen aus der Einstich- sowie Austrittsstelle der Nadel wurden, sofern sie nicht durch das Zuziehen der Naht tamponiert wurden, durch leichtes Andrücken eines sterilen Watteträgers gestillt.

### **3.4.2.6 Thoraxverschluss**

Nach Entfernung des Thoraxspanners wurden die Wundränder mit einer in isotoner Natriumchloridlösung (Delta-Pharma GmbH, Pfullingen) getränkten Mullkompressen (X-Ray 5x5cm, 12-fach, NOBA Verbandmittel Danz GmbH, Erfstadt) gesäubert. Mit einer nicht resorbierbaren Naht (Ethibond<sup>®</sup> 2-0 RB-1, Ethicon GmbH & Co KG, Norderstedt) wurden zunächst mit zwei oder drei Einzelknopfnähten die Rippen adaptiert, anschließend mit einem resorbierbaren Faden (Vicryl<sup>®</sup> 2-0 SH-1, Ethicon GmbH & Co KG, Norderstedt) ebenfalls in zwei oder drei Einzelknopfnähten die Thoraxmuskulatur genäht. Damit die Hautnaht dem Reinigungsverhalten der Ratten standhalten konnte, musste auch hier auf Einzelknopfnähte zurückgegriffen werden. So konnte gewährleistet werden, dass die Wundränder auch bei Beschädigung einer Naht zumindest während des Heilungsprozesses der Haut, der innerhalb etwa einer Woche abgeschlossen ist, ausreichend adaptiert blieb. Für diese Hautnaht aus zehn bis zwölf Einzelknopfnähten wurde ein nicht resorbierbarer Faden vom Typ Ethibond<sup>®</sup> (3-0 FS-2,



Ethicon GmbH & Co KG, Norderstedt) verwendet. Nach der letzten Naht wurde erneut die EKG-Aufzeichnung gestartet. Anschließend wurden dem Tier zur lokalen Analgesie 0,3 ml Xylocain 2% (AstraZeneca AG, Zug, Schweiz) subkutan in den Wundbereich injiziert und die Wunde mit Mullkompressen (X-Ray 5x5cm, 12-fach, NOBA Verbandmittel Danz GmbH, Erfstadt) zuerst mit Sterillium® (Bode Chemie, Hamburg) desinfiziert und dann mit isotoner Natriumchloridlösung (Delta-Pharma GmbH, Pfullingen) gesäubert.

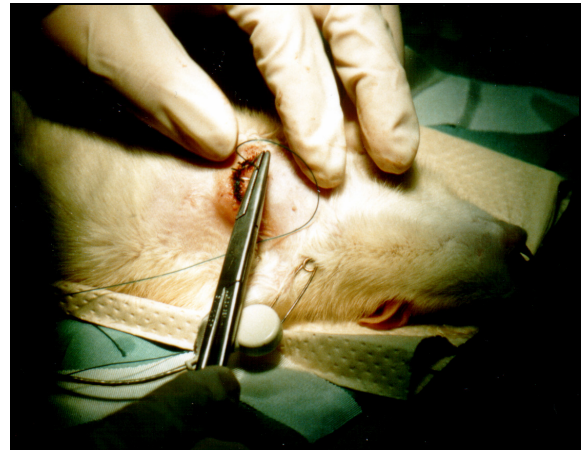
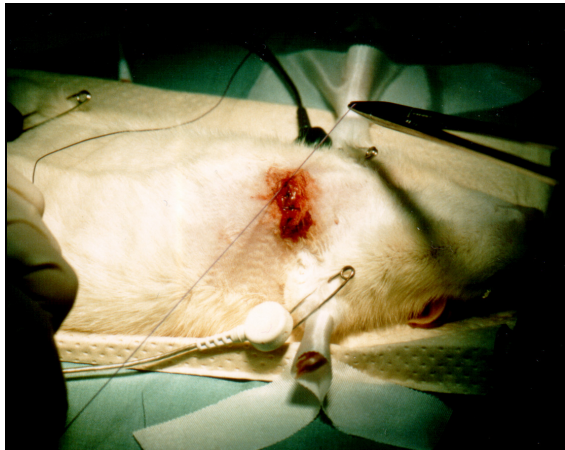


Abbildung 8: Verschluss der Thoraxmuskulatur in Einzelknopfnähten mit resorbierbarem Faden (links) und Hautnaht in Einzelknopfnähten mit nicht resorbierbarem Faden (rechts).

### 3.4.2.7 Extubation

Die Aufwachphase der Ratten ist gekennzeichnet durch erhöhte Sensibilität gegenüber Schmerzreizen (zum Beispiel Kniff in den Schwanz), Wiedereinsetzen des Schluckreflexes, Bewegung der Sinneshaare an der Nase und Wiedereinsetzen der Atmung. Durch die Beatmung mit leichtem Sauerstoffüberangebot war der Atemreflex bei den Tieren stark gehemmt. Um den Atemantrieb zu fördern, wurde nach Prüfung der Reflexe auf Schmerzreize durch Abschalten der Beatmung für 30 Sekunden eine milde Hyperkapnie induziert, anschließend wurden die Tiere meist noch für einige Minuten maschinell beatmet, da der Atemantrieb nicht sofort für eine suffiziente Sauerstoffversorgung ausreichte. Dies kann zum einen an einem Narkosemittel-Überhang, zum anderen auch an der Beatmung selbst gelegen haben, die - wie beim Menschen - je nach Dauer eventuell einer Entwöhnung bedarf. Atmeten die Tiere regelmäßig und tief genug, wurde der Tubus vom Beatmungsgerät getrennt und aus prophylaktischen Gründen in der

Trachea der Tiere belassen, falls es postoperativ zu einem erneuten Aussetzen der Atmung kommen sollte. Aus dem etwa fünf Zentimeter vom Kopf der Ratten entfernt platzierten Tubusansatzstück des Beatmungsgeräts wurde weiterhin Sauerstoff ausgeströmt, um die Atemluft der Tiere mit Sauerstoff anzureichern. Nach 30 Minuten suffizienter Atmung wurde der Tubus entfernt, eine letzte EKG-Aufzeichnung durchgeführt und die Ratten bis zum Aufwachen überwacht. Anschließend kamen die Tiere einzeln für sechs Wochen zurück in einen Käfig bei Wasser und Futter ad libitum.

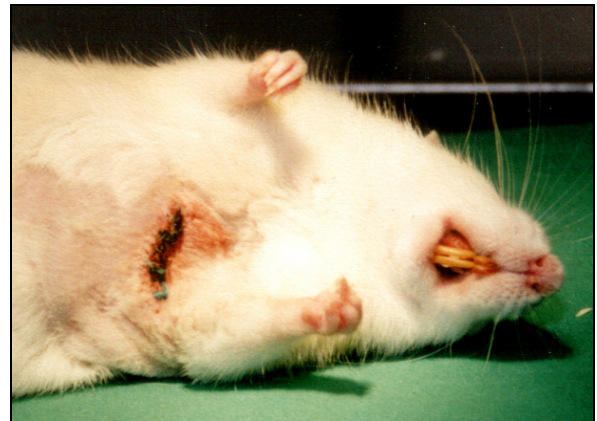
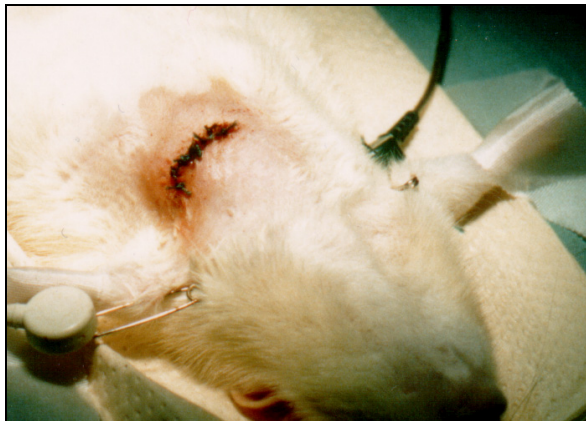


Abbildung 9: Noch narkotisierte aber bereits extubierte und spontan atmende Ratte nach Thoraxnaht. Im linken Bild sieht man die EKG-Elektroden, die mit Sicherheitsnadeln perkutan an den Extremitäten der Ratte befestigt sind.

Die Naht wurde mindestens eine Woche lang einmal täglich auf Entzündung oder Insuffizienz während einer routinemäßigen postoperativen Stallvisite begutachtet. Zeigte ein Tier Schmerzen, indem es wenig oder gar nicht fraß und mit gekrausstem Fell scheu in der Ecke des Käfigs saß, wurde Feuchtfutter (Haferflocken mit Wasser) und 5%ige Glucoselösung verabreicht, außerdem erhielt das Tier zur Analgesie entweder 12-stündlich 10mg/kg Körpergewicht Tramadol subkutan oder 12-stündlich 5mg/kg Körpergewicht Tramadol in 0,1ml Glucose 5% bis zur Besserung des Allgemeinzustandes.

### **3.4.3 Echokardiographie nach Myokardinfarkt**

Um Effekte der Myokardinfarzierung auf die linksventrikuläre Funktion aufzuzeigen, wurden echokardiographische Untersuchungen sechs Wochen nach Induktion des Infarkts durchgeführt.

### **3.4.4 Operation zur Applikation des MCP-1**

Einige Tage nach der zweiten Echokardiographie erfolgte der zweite Eingriff, bei dem den Tieren entweder isotone Kochsalzlösung (Delta-Pharma GmbH, Pfullingen) oder isotone Kochsalzlösung mit MCP-1 (Pepro Tech Inc., Rocky Hill, USA; deutscher Vertrieb: TEBU GmbH, Frankfurt am Main) intramyokardial injiziert wurden. Die Zugehörigkeit zu einer der Gruppen wurde randomisiert, indem mit den Tiernummern beschriftete Zettel wahllos gezogen und abwechselnd den ersten beiden Versuchsgruppen zugeordnet wurden. Die Narkose, die Intubation und die Beatmung wurden entsprechend der Beschreibung in den Kapiteln 3.4.2.1 bis 3.4.2.3 durchgeführt.

#### **3.4.4.1 Thorakotomie**

Bei der Thorakotomie wurden die Fäden der Rippennaht, die man durch die Haut der Tiere fühlen konnte, als Leitstruktur verwendet, um den Thorax im fünften Interkostalraum zu eröffnen, also einen Zwischenrippenraum tiefer als bei der ersten Operation. Mögliche Verwachsungen im Thorax wie Anheftung von Perikardresten, Lunge oder dem okkludierenden Faden der ersten Operation an der Thoraxwand, wurden vorsichtig stumpf mit sterilen Watteträgern oder scharf mit einer Schere gelöst.

#### **3.4.4.2 Intramyokardiale Injektion**

Nach Darstellung des Herzens wurde eine im Randbereich des Infarkts liegende Stelle ausgewählt, an der die intramyokardiale Injektion erfolgen sollte. Eine nicht resorbierbare Naht

(Prolene® 6-0 V-18, Ethicon GmbH & Co KG, Norderstedt) wurde hierzu oberflächlich an den Rand der Infarkt Narbe in das Myokard gelegt, so dass der Faden durch das Gewebe schimmerte. Dann wurde bei Tieren der Kontrollgruppe (Gruppe 1) 0,15ml isotone Kochsalzlösung, bei Tieren der Verum-Gruppe (Gruppe 2) 0,15ml isotone Kochsalzlösung mit 3µl MCP-1 intramyokardial injiziert. Um eine korrekte intramyokardiale Injektion zu ermöglichen, wurde eine Feindosierungsspritze mit aufgesetzter Nadel (Omnican® 1 ml, B.Braun, Melsungen) verwendet, deren Nadelspitze zuvor um 90 Grad mit dem Schliff zur Spritze hin umgebogen worden war. Die Nadel wurde flach oberhalb der Naht in das Gewebe eingeführt, die Spritze langsam entleert und dabei die Entstehung einer subepikardial gelegenen weißen Blase („Bubble“) als Zeichen der korrekten intramyokardialen Injektion beobachtet. Nach Entleerung der Spritze wurde die Nadel aus dem Gewebe entfernt und die Naht umgehend zugezogen, um die Einstichstelle zu verschließen, damit zum einen die injizierte Substanz am vorgesehenen Ort verblieb und zum anderen eine Blutung aus der Injektionsstelle vermieden oder zumindest verringert werden konnte. Gelegentlich auftretende Blutungen aus den Einstichstellen der Nadeln von Faden und Spritze wurden mit sterilen Watteträgern durch Kompression gestillt.



Abbildung 10: Rattenherz nach Myokardinfarkt und intramyokardialer Injektion. Die Naht apexwärts des linken Herzhohrs wurde in der ersten Operation zum Verschluss der linken Koronararterie angelegt, die apexnahe Naht markiert die Stelle der intramyokardialen Injektion. Deutlich zu erkennen ist die helle, fibröse Narbe nach linksventrikulärem Myokardinfarkt.

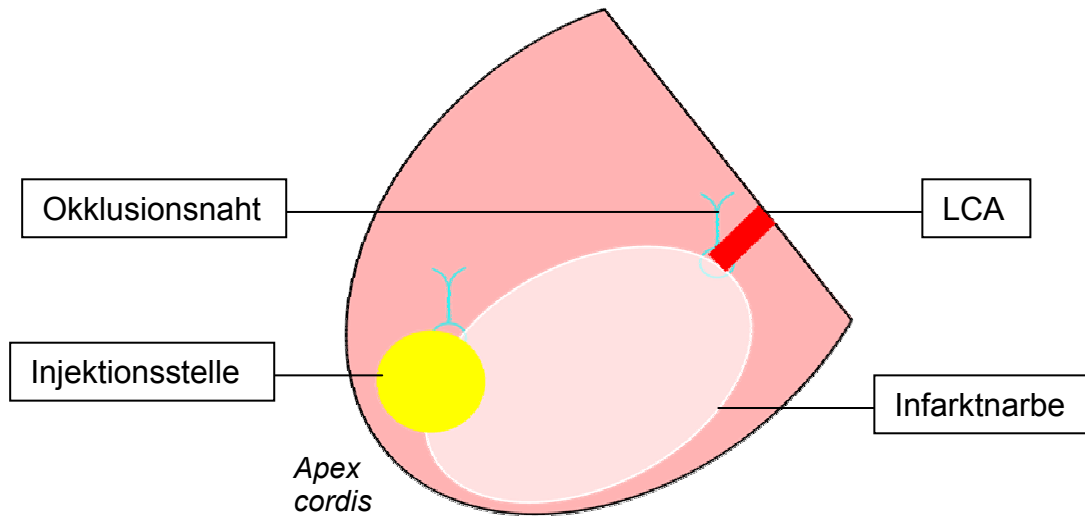


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Rattenherzens mit dem Ort der intramyokardialen Injektion. LCA = linke Koronararterie.

### 3.4.4.3 Thoraxverschluss und Extubation

Die operativen Schritte beim Thoraxverschluss und die Nachsorge entsprachen dem in den Kapiteln 3.4.2.6 und 3.4.2.7 dargestellten Procedere.

### 3.4.5 Echokardiographie nach intramyokardialer Injektion

Vier Wochen nach dem zweiten operativen Eingriff wurde erneut eine echokardiographische Untersuchung durchgeführt. Das Vorgehen bei dieser Diagnostik ist in Kapitel 3.4.1 geschildert.

### 3.4.6 Tötung der Tiere am Versuchsende

Im Anschluss an die dritte Echokardiographie vier Wochen nach Injektion der Testsubstanz MCP-1 (Gruppe 2) oder Kochsalzlösung in der Kontrollgruppe (Gruppe 1) wurden die Tiere durch eine Überdosis Narkotikum getötet. Hierzu wurde die zehnfache Narkosedosis, also etwa 1000 mg/kg Körpergewicht Ketamin und 100 mg/kg Körpergewicht Xylazin, intraperitoneal injiziert. Nach dem Aussetzen der Herzaktionen wurden die Tiere thorakotomiert und die Herzen von den zu- und abführenden Gefäßen getrennt, entnommen und nach Ausspülen von in den Herzhöhlen verbliebenen Blutresten mit sterilen Kompressen trockengetupft. Nach Ermittlung des Herzgewichts mit einer Waage (BP2100, Sartorius AG, Göttingen) wurden die Herzen mit einem Einmalskalpell (Feather Disposable Scalpel Fig 10, pfm Produkte für die Medizin AG, Köln) in drei Scheiben geschnitten, fotografiert (Frau Vera Mevissen, Study Nurse der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums der RWTH Aachen) und anschließend bis zur histologischen Aufbereitung in 3,5 % Formalinlösung gelagert. Die Tierkadaver wurden sachgerecht im Kadaverraum des Instituts für Versuchstierkunde der RWTH Aachen entsorgt.

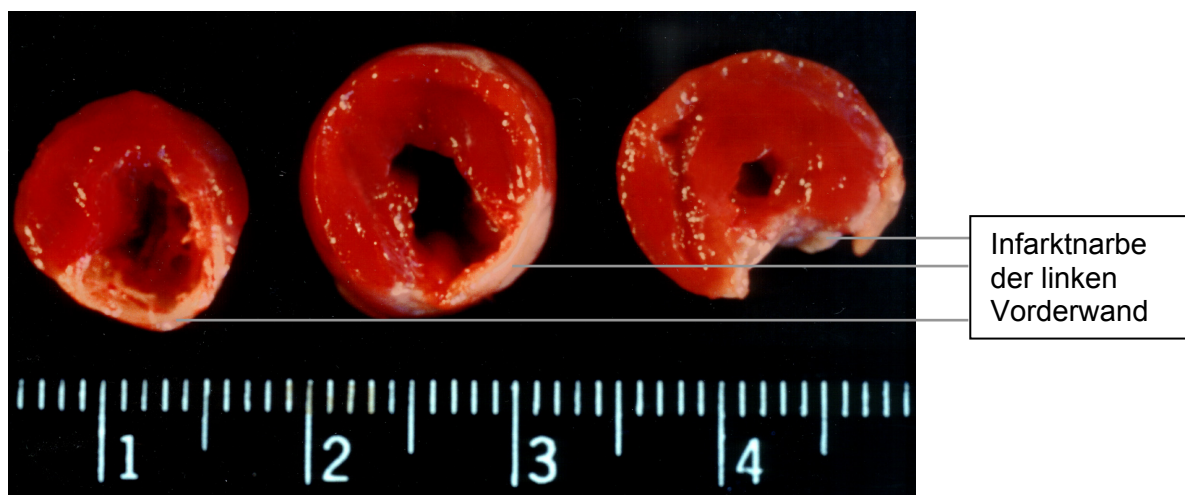


Abbildung 12: Rattenherz nach Myokardinfarkt, in drei Scheiben geschnitten. Man erkennt deutlich die ausgedünnte Infarkttnarbe im Bereich der Vorderwand des linken Ventrikels.

### **3.4.7 Herstellung der histologischen Präparate**

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der RWTH Aachen (Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. C. Mittermayer) wurde die histologische Auswertung der Herzen geplant. In einem ersten Schritt wurde jeweils die mittlere Herzscheibe, in wenigen Fällen auch die apikale Scheibe, mit einem Präparationsmesser auf eine für die Einbettung passende Dicke von etwa zwei bis drei Millimeter geschnitten. Dann wurden die Präparate über Nacht entwässert und in Paraffin eingebettet (Herr Leon Muys, MTA, Pathologie der RWTH Aachen). Die so entstandenen Blöcke wurden mit einem Mikrotom (Leica RM 2145, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim) auf 4 µm Dicke geschnitten und mittels eines auf 40 bis 47 Grad Celsius erhitzten Wasserbads (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim) auf Objektträger (Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde) überführt. Um ein Abrutschen der Präparate während der Färbungen zu verhindern, wurden die Objektträger zuvor mit 0,1% Poly-L-Lysin Lösung (Sigma Diagnostics, St. Louis, USA) beschichtet.

Als Färbungen wurden Hämatoxylin-Eosin, Elastica-van Gieson und immunhistologische Färbungen mittels monoklonaler Antikörper gegen von Willebrand-Faktor und CD 31 durchgeführt.

#### **3.4.7.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung, kurz HE-Färbung genannt, gilt als eine Routinefärbung in der Pathologie.<sup>30</sup> Hämatoxylin dient der Darstellung der Zellkerne in blauer Farbe, während Eosin das Zytoplasma rosa bis hellrot anfärbt. Hierbei werden Muskelfasern intensiver angefärbt als Bindegewebe.

In der vorliegenden Arbeit wurde die HE-Färbung ausschließlich zum gezielten Auffinden des Übergangsbereichs vom Myokard zum Narbengewebe angefertigt. Die gute Darstellbarkeit der Herzmuskelzellen war zur Ermittlung des nach Angiogenese zu untersuchenden Areals hilfreich. So konnte gewährleistet werden, dass alle Präparate in vergleichbaren Gewebsbereichen untersucht wurden.



In einem ersten Schritt wurden die auf die Objektträger gebrachten Präparate für 30 Minuten in einem Wärmeschrank (Heraeus GmbH, Hanau) bei 60 Grad Celsius erwärmt. Anschließend wurde das Paraffin aus dem Schnitt herausgelöst. Dazu wurden die Objektträger für zehn Minuten in Xylol getaucht und durchliefen im Anschluss daran eine absteigende Alkoholreihe (Bio-Optica, Milano, Italien) von 100% über 96% bis auf 70% Ethanolgehalt für jeweils zwei Minuten. Nach einer Minute Spülen in Aqua dest. wurden die Objektträger für eine Minute in Hämalaun-Lösung gestellt und dann drei Minuten mit Aqua dest. gespült. Anschließend wurden die Objektträger für zehn Sekunden in Eosin getaucht, für etwa fünf Sekunden mit Aqua dest. gespült und dann für jeweils drei Sekunden durch die aufsteigende Alkoholreihe geführt. In dieser wird durch die ansteigenden Alkoholkonzentrationen von 70% über 96% bis 100% das Wasser aus den Präparaten gelöst. Von dem Behälter mit 100% Alkohol wurden die Objektträger kurz in einen ersten Xylolbehälter, eine Minute später in einen zweiten Behälter mit Xylol überführt. Die Präparate wurden dort erst unmittelbar vor ihrer Eindeckelung entnommen. Mit Hilfe eines Klebers auf Xylol-Basis (Vitro-Clud, Einschlussmittel für mikroskopische Technik R. Langenbrinck, Emmendingen) wurden dann Deckgläser auf die Objekte aufgebracht. Die so fixierten Präparate wurden auf Vollständigkeit und Gelingen der Färbung kontrolliert und 24 Stunden bei Raumtemperatur flach zum Trocknen liegengelassen.

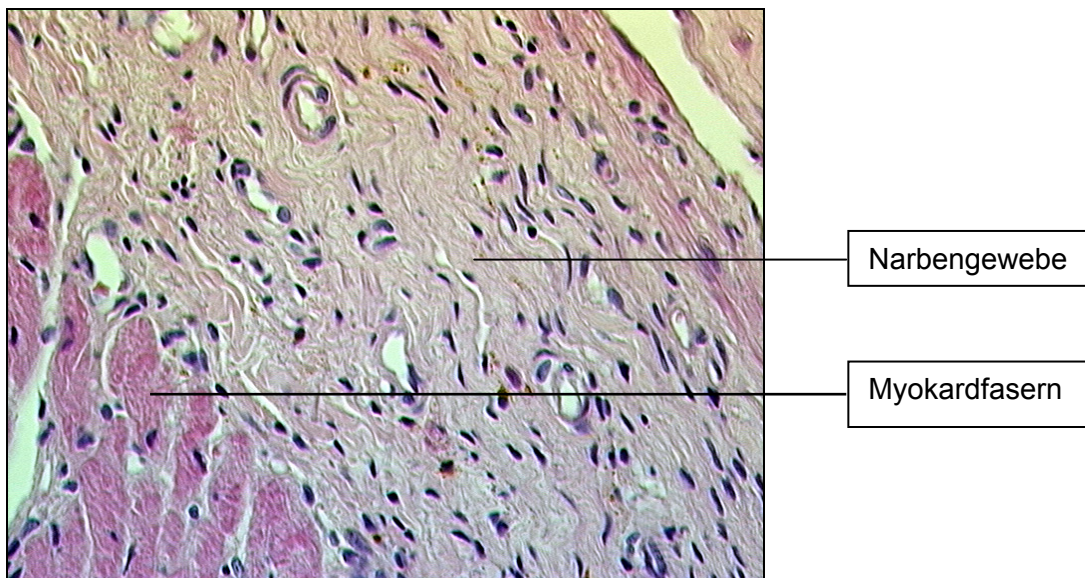


Abbildung 13: Hämatoxylin-Eosin Färbung von infarziertem Rattenmyokard (400-fache Vergrößerung). Links im Bild erkennt man noch Herzmuskelfasern, der überwiegende Bildausschnitt zeigt narbig umgebautes Herzgewebe.



### 3.4.7.2 Elastica-van Gieson-Färbung

Die Elastica-van Gieson-Färbung, kurz EvG-Färbung genannt, wird zur Gefäßdarstellung verwendet.<sup>31</sup> Da elastische Fasern durch Pikrofuchsin schwarz angefärbt werden, lässt sich bei Arterien die Membrana elastica interna, eine aus elastischem Bindegewebe bestehende Schicht zwischen Media und Intima, als schmale schwarzgefärbte Struktur darstellen.

Für die EvG-Färbung wurden die Präparate eine halbe Stunde im Wärmeschrank (Heraeus GmbH, Hanau) bei 60 Grad Celsius erwärmt und anschließend zum Auslösen des Paraffins für zehn Minuten in Xylol überführt. Es folgten jeweils zwei Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe (Bio-Optica, Milano, Italien) von 100% über 96% bis 70% Ethanolgehalt, dann wurden die Präparate für eine Minute in Aqua dest. gespült. Für den ersten Schritt der Färbung wurden die Präparate in eine mit Resorchin gefüllte Küvette überführt, die zuvor 30 Minuten im Wärmeschrank bei 60 Grad Celsius erwärmt worden war. Nach 30 Minuten in der Resorchin-Lösung wurden die Präparate in eine neue Küvette überführt, zuerst für zwei bis drei Sekunden mit 80 prozentiger Ethanollösung, und dann für ein bis zwei Minuten mit Aqua dest gespült. Zur Kernfärbung wurde eine Eisenhämatoxylin-Lösung in die Küvette gegossen, in der die Präparate fünf Minuten verblieben. Nach Abgießen der Kernfärbung folgte eine Spülung der Präparate mit 80% Alkohol, zu dem 5 ml 1-molare Salzsäure (HCl 1N, Merck KgaA, Darmstadt) hinzugefügt worden waren, für zwei bis drei Sekunden, dann wurde erneut für zwei bis drei Minuten mit Aqua dest. gespült. Zuletzt erfolgte die Bindegewebsfärbung mit Pikrofuchsin, welches für eine Einwirkzeit von fünf Minuten in die Küvette mit den Präparaten gegossen wurde. Dann durchliefen die Präparate für jeweils drei Sekunden die aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 100%) bis zum Xylol und wurden mit einem Deckglas und einem Tropfen Vitro Clud (Einschlussmittel für mikroskopische Technik R. Langenbrinck, Emmendingen) eingedeckelt. Nach kurzer mikroskopischer Kontrolle der Färbung wurden die Präparate bis zur vollständigen Aushärtung des Klebers 24 Stunden flach liegengelassen.

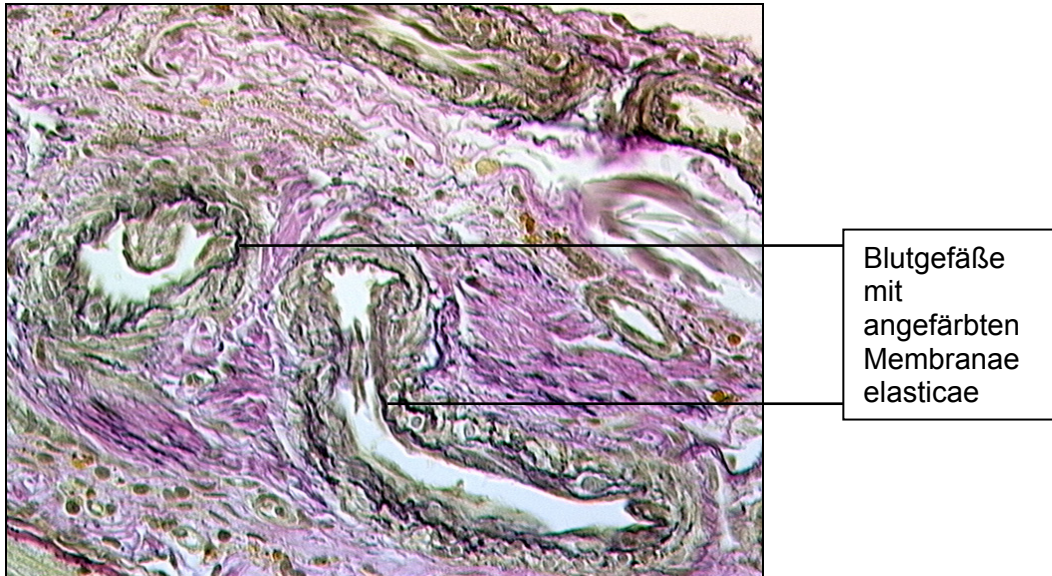


Abbildung 14: Infarziertes Rattenmyokard in Elastica-van Gieson Färbung (400-fache Vergrößerung).

### 3.4.7.3 von Willebrand-Faktor -Immunhistologie

Die Immunhistologie mit von Willebrand-Faktor, einem oligomeren, subendothelial gebundenen Glykoprotein, dient der Darstellung von Endothelzellen. Diese stellen den Hauptbildungsort des von Willebrand-Faktors (vWF), wegen seiner Bindung des Faktor VIII im Blutplasma auch Faktor VIII-assoziiertes Antigen genannt, dar. Bei der Blutgerinnung bindet der von Willebrand-Faktor aktivierte Thrombozyten über einen Glykoprotein-Rezeptor (GPIb) an das Endothel, er ist also ein Vermittler der Thrombozytenadhäsion.<sup>32</sup>

Die Präparate für die Immunhistologie mussten vor Beginn der Färbung über 24 Stunden bei 37 Grad Celsius im Wärmeschrank (Heraeus GmbH, Hanau) bebrütet werden. Nach jeweils vier Minuten in zwei Xylol-Behältern durchliefen sie die absteigende Alkoholreihe von 100% über 96% bis 70% Ethanol, wobei sie für jeweils zwei bis drei Minuten im entsprechenden Behälter verweilten. Anschließend wurde der restliche Alkohol durch ein bis zwei Minuten Spülen mit Aqua dest. entfernt, und die Präparate wurden für fünf Minuten in eine Küvette mit 2% Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro analysi 30%, Merck KgaA, Darmstadt; verdünnt mit Aqua dest.) überführt, um die Peroxidase der im Präparat verbliebenen Erythrozyten zu verbrauchen. In dieser Zeit wurde ein Liter gepufferte Kochsalzlösung (PBS = phosphate buffered saline; PBS

Dulbecco, Biochrom KG, Berlin) angesetzt. Hierzu wurden in einem 1 Liter Messzylinder 9,55 g PBS, die zuvor mit einer Feinwaage (Sartorius AG; Göttingen) abgewogen worden waren, in einem Liter Aqua dest. gelöst und fünf Minuten elektrisch gerührt. Von diesem Ansatz wurden 10 ml in ein Reagenzglas überführt, um mit 1 ml einer 10%igen PBS-BSA-Lösung (Bovines Serum-Albumin als Enzympuffer für die Antikörper; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) einen 0,9%igen PBS-BSA-Ansatz zu erstellen. Nach der Reaktionszeit in der Wasserstoffperoxid-Lösung wurden die Präparate für eine Minute in Aqua dest. gespült und in eine mit PBS gefüllte Küvette überführt. Dann wurde der erste Antikörper, der von Willebrand-Faktor (Rabbit Anti-Human; DAKO Kopenhagen, Dänemark) mit der 0,9%igen PBS-BSA-Lösung angesetzt. Pro Präparat wurden 100 µl PBS-BSA mit einer Mikropipette (Eppendorf Reference, Eppendorf AG, Hamburg) in ein Reagiergefäß (Eppendorf AG, Hamburg) überführt, und es wurde so viel von Willebrand-Faktor zugegeben, dass man eine Verdünnung von 1:200 erhielt. Dieser Ansatz musste für 30 Minuten bei Raumtemperatur gelagert und vorsichtig durchmischt werden. In dieser Zeit wurde eine Metallwanne als feuchte Kammer hergerichtet, indem einige Tropfen Aqua dest. auf dem Boden verteilt wurden. Die Präparate wurden aus der Pufferlösung genommen und die Objektträger vorsichtig mit Zellstoff abgetrocknet, um unspezifische Reaktionen der Antikörper mit dem Puffer zu vermeiden, um dann in der Metallwanne auf Küvettenglasdeckeln einige Zentimeter über dem angefeuchteten Wannensboden abgelegt zu werden. Pro Präparat wurden 95 µl des ersten Antikörper-Ansatzes aufgetragen und vorsichtig mit der Pipettenspitze gleichmäßig verteilt, damit es nicht am Rand der Präparate zu Austrocknungen kommen konnte. Die geschlossene Metallwanne mit den Präparaten wurde dann für eine Stunde bei 37 Grad Celsius im Wärmeschrank bebrütet. In dieser Zeit wurde der zweite Antikörper mit PBS-BSA angesetzt. Dazu wurden pro Präparat 100 µl PBS-BSA benötigt, zu denen Goat Anti-Rabbit Biotin (DAKO, Kopenhagen, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:500 zugegeben wurde. Dieser Ansatz wurde bei Raumtemperatur für eine halbe Stunde vorsichtig durchmischt. Nach einer Stunde Einwirkzeit des ersten Antikörpers wurden die Präparate in PBS für fünf Minuten gespült, anschließend wieder abgetrocknet und mit jeweils 95 µl des zweiten Antikörperansatzes beimpft. Die Einwirkzeit für diesen Antikörper betrug 30 Minuten bei Raumtemperatur in der geschlossenen Metallwanne. In dieser Zeit wurde der dritte Antikörperansatz vorbereitet. Pro Präparat wurden zu 100 µl PBS-BSA die Elite Vectastain® ABC-Reagentien A und B (Vector Laboratories, Burlingame, USA) in einer Verdünnung von 1:50 zugesetzt. Auch dieser Ansatz musste 30 Minuten vor der Verwendung vorsichtig bei Raumtemperatur vermischt werden. Nach der Einwirkzeit des zweiten Antikörpers wurden die Objektträger wiederum in eine mit frischer PBS-Lösung gefüllte Küvette überführt

und fünf Minuten mit PBS gespült. Anschließend wurde der dritte Antikörper-Ansatz zu je 95 µl pro Präparat aufgetragen und die Objektträger verblieben zur Inkubation erneut 30 Minuten bei Raumtemperatur in der geschlossenen Metallwanne. In dieser Zeit wurde ein DAB-Ansatz (3,3'-Diaminobenzidin-Tabletten, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) hergestellt. Dazu wurden 0,3 g Tris-Puffer (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan pro analysi; Merck KgaA, Darmstadt) in 50 ml Aqua dest. mit 1-molarer Salzsäure (HCl 1N; Merck KgaA, Darmstadt) über ein pH-Meter (pH538 MultiCal®, WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim) auf pH 7,6 eingestellt. Drei Tabletten DAB wurden hinzugefügt und in einem verdunkelten Gefäß 20 Minuten elektrisch gerührt. Ein bis zwei Minuten vor Verwendung wurde der DAB-Ansatz durch Zugabe von 30 µl Wasserstoffperoxid 30% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro analysi 30%, Merck KgaA, Darmstadt) aktiviert. Nach der Einwirkzeit von 30 Minuten wurden die Objektträger in eine mit frischer PBS-Lösung gefüllte Küvette überführt, fünf Minuten gespült und für zwei Minuten in eine mit der aktivierten DAB-Lösung gefüllte Küvette gestellt. Nach einer Minute Spülen mit Aqua dest. wurde für zehn Sekunden Hämalaun in die Küvette mit den Präparaten gegossen, anschließend wurden diese für 2 Minuten mit Aqua dest. gespült. Danach durchliefen die Präparate für jeweils zwei Minuten die aufsteigende Alkoholreihe (Bio-Optica, Milano, Italien) von 70% über 96% bis 100% Ethanolgehalt und die beiden Xylol-Behälter. Zuletzt folgte das Eindeckeln der Präparate mit Deckgläsern und dem Einschlussmittel Vitro-Clud (Einschlussmittel für mikroskopische Technik R. Langenbrinck, Emmendingen). Unter dem Mikroskop wurde das Gelingen der Färbung kontrolliert. Bis zum Aushärten des Einschlussmittels mussten die Präparate 24 Stunden waagrecht gelagert werden.

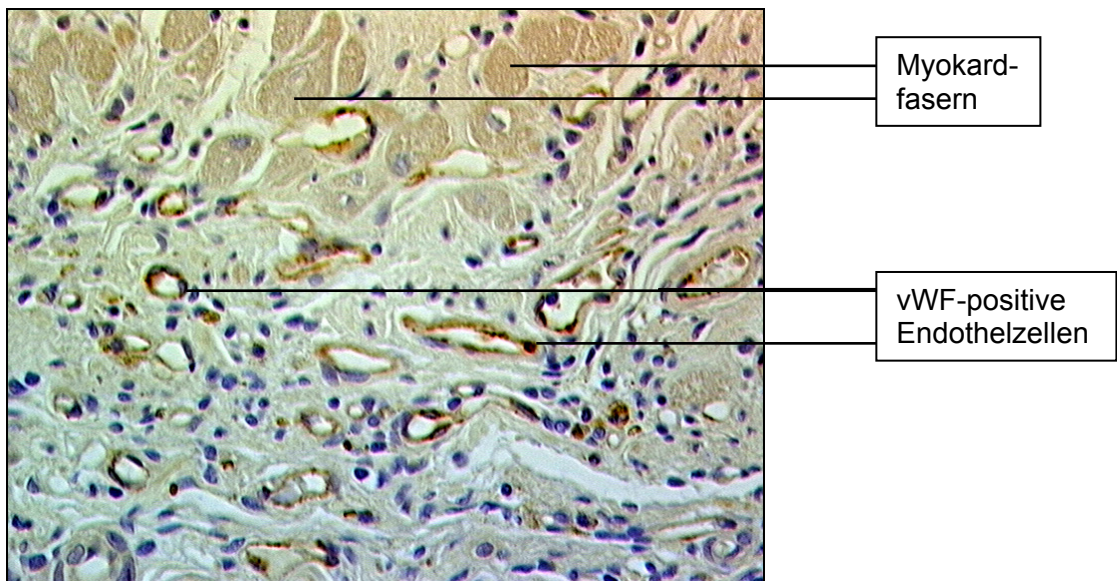


Abbildung 15: Rattenmyokard in von Willebrand-Immunhistologie zur Darstellung der Gefäße (400-fache Vergrößerung). Die Endothelzellen stellen den Produktionsort des von Willebrand-Faktors dar. Durch immunhistologische Anfärbung des von Willebrand-Faktors werden die Endothelzellen selektiv angefärbt.

#### 3.4.7.4 Immunhistologische Färbung des CD 31-Antigens zur direkten Darstellung von Monozyten

Das Zelloberflächenantigen CD 31 ist ein von Endothelzellen sowie Thrombozyten und einigen Leukozyten, unter anderem auch von Monozyten, exprimiertes Glykoprotein. Durch Verwendung eines spezifischen Antikörpers kann es zur Darstellung CD 31-positiver Zellen genutzt werden. In der vorliegenden Arbeit sollte bei vier Tieren im Sinne eines Pilotprojektes exemplarisch gezeigt werden, dass die direkte intramyokardiale Injektion von MCP-1 im Vergleich zur Injektion von NaCl zu einer gesteigerten Invasion von Monozyten in das Gewebe um die Injektionsstelle führt.

Die immunhistologische Färbung mit dem monoklonalen Antikörper gegen das CD 31-Antigen (DAKO Kopenhagen, Dänemark) wurde entsprechend dem Procedere für immunhistologische

Färbungen, wie in Kapitel 3.4.7.3 detailliert für den von Willebrand-Faktor beschrieben, bei vier Tieren durchgeführt. Lediglich die Verdünnungsstufe des Antikörpers in der PBS-BSA-Lösung wurde gemäß den Maßgaben des Herstellers angepasst.

### **3.5 Auswertung**

#### **3.5.1 Auswertung der echokardiographischen Daten**

Die zu den im Studiendesign angegebenen Zeitpunkten durchgeführten Echokardiographien dienten der Ermittlung der linksventrikulären Fraktionsverkürzung (= FS: fractional shortening) als Maß der Schädigung des linken Ventrikels. Hierzu wurden die ermittelten Werte in folgende Formel eingesetzt:

$$FS = \frac{\text{enddiastolische Länge} - \text{endsystolische Länge}}{\text{enddiastolische Länge}} * 100$$

Man erhält einen dimensionslosen Wert, der interpretiert wird als das Maß der systolischen Leistung des linken Ventrikels, vergleichbar mit der Auswurffraktion. Diese geht, anstelle von zweidimensionalen Längenmaßen, von endsystolischen und enddiastolischen Volumina aus. Für eine Abschätzung der Ventrikelfunktion ist die Ermittlung der Fraktionsverkürzung im Rahmen dieser Arbeit ausreichend.

#### **3.5.2 Auswertung der elektrokardiographischen Daten**

Die im zeitlichen Verlauf der Operationen und am Versuchsende aufgezeichneten Herzfrequenzen der Tiere wurden graphisch dargestellt.

### **3.5.3 Auswertung der mikroskopischen Präparate**

In den angefertigten Präparaten wurden, jeweils in den Färbungen HE, EvG und vWF, die Injektionsstelle sowie eine Kontrollstelle an der gegenüberliegenden Seite des Infarkttrands unter einem Mikroskop (Leica DMRB, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim) in 40-facher Vergrößerung aufgesucht. Mittels einer montierten S-VHS-Videokamera (Hitachi HV-C20) wurden die Bilddaten auf einen Personal Computer mit der Bildbearbeitungssoftware Midok II übertragen. Aus diesen Übersichtsdarstellungen wurden jeweils fünf Bildausschnitte bei 400-facher Vergrößerung mit der Videoapparatur abfotografiert und auf Festplatte gespeichert. Nach Überspielen auf Zip-Disketten und anschließendem Brennen auf CD-ROM-Medien wurden die Gefäße der Bildausschnitte für die Färbungen EvG und vWF in einem Grafikprogramm (Adobe Photoshop 5.5, Adobe Systems GmbH, Unterschleißheim) markiert und ausgezählt. Dabei wurden in der von Willebrand-Faktor-Immunhistologie alle bräunlich angefärbten isoliert stehenden Endothelzellen oder Endothelzellverbände gezählt, unabhängig davon, ob ein Gefäßlumen erkennbar war. So konnten parallel zur Schnittebene verlaufende Gefäße ebenfalls erfasst werden. Zur Untersuchung des Gewebes auf Arteriogenese wurden in der Elastica-van Gieson-Färbung alle Gefäßstrukturen mit angefärbter Membrana elastica interna gezählt.

### **3.5.4 Statistische Auswertung**

Wegen der in dieser Studie vorliegenden multiplen Testproblematik, welche immer dann auftritt, wenn anhand eines Kollektivs mehrere statistische Tests bezüglich verschiedener Zielparameter durchgeführt werden, setze ich die Studie explorativ an. Um die signifikant nachweisbaren Ergebnisse von dem hier vorliegenden Kollektiv auf die Grundgesamtheit verallgemeinern zu können sind daher weitere Studien notwendig.

Vom arithmetischen Mittelwert der Daten wurden die Standardabweichung (englisch: standard deviation = S.D.) und der Standardfehler (englisch: standard error of the mean = SEM) errechnet.

$$S. D. = \sqrt{\frac{\sum_{s=1}^m \sum_{i=1}^n (y_{is} - M)^2}{(n_y - 1)}}$$

$$M = \frac{\sum_{s=1}^m \sum_{i=1}^n y_{is}}{n_y}$$

Abbildung 16: Formeln für Standardabweichung und arithmetischen Mittelwert. Dabei gilt:  $s$  = Nummer der Datenreihe,  $i$  = Datenpunktnummer in Datenreihe  $s$ ,  $m$  = Anzahl der Datenreihen des Punktes  $y$  im Diagramm,  $n$  = Anzahl der Punkte je Datenreihe,  $y_{is}$  = Datenwert der Datenreihe  $s$  und des  $i$ -ten Punktes,  $n_y$  = Gesamtzahl der Datenwerte aller Datenreihen,  $S.D.$  = Standardabweichung (engl. standard deviation),  $M$  = Arithmetisches Mittel.

Beim Standardfehler handelt es sich um eine modifizierte Standardabweichung, wie die folgende Formel zeigt:

$$SEM = \frac{S.D.}{\sqrt{n}}$$

Mit Hilfe des Statistik-Computerprogramms GPIS (InStat® GraphPad Software, San Diego, USA), wurden für alle gemessenen Parameter unverbundene t-Tests zum lokalen Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$  durchgeführt, um die Ergebnisse auf signifikante Unterschiede bezüglich ihrer Erwartungswerte zu untersuchen.

In dieser Studie liegt den statistischen Tests die Annahme zugrunde, dass sich die beiden Versuchsgruppen vor den experimentellen Eingriffen bezüglich ihrer Zielparameter nicht unterscheiden.



## 4. Ergebnisse

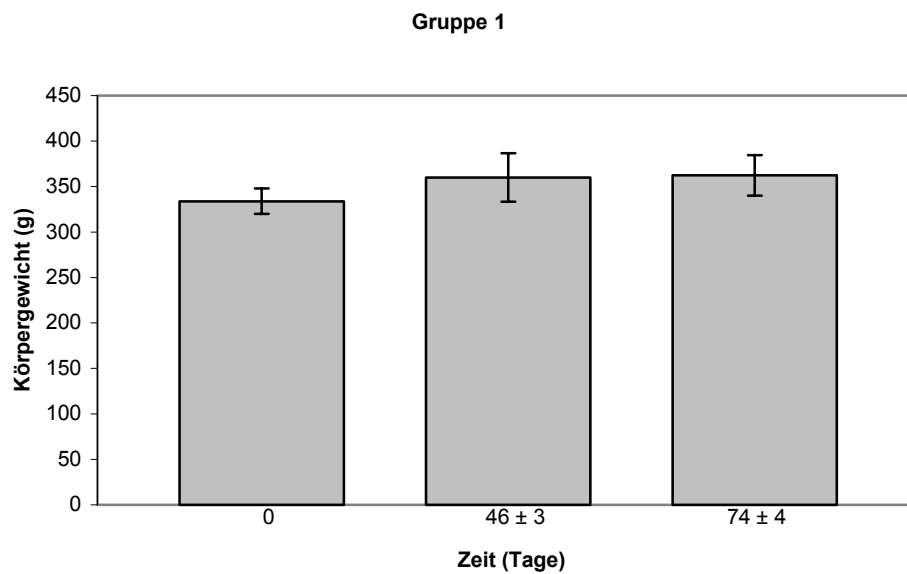
Es wurden insgesamt 40 weibliche Sprague-Dawley Ratten (SPRD) aus der Zucht des Instituts für Versuchstierkunde der Medizinischen Einrichtungen der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen (Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Küpper, Tierzucht und Tierhaltung: Dr. sc. agr. Kluge) verwendet. Für die Vorversuche zur Etablierung der Operationstechnik waren 10 Tiere vorgesehen, von denen 4 die Operation zur Induktion eines Myokardinfarktes überlebten und so im weiteren Verlauf der Versuche eingesetzt werden konnten. Die Hauptschwierigkeit lag darin, einen Infarkt hervorzurufen, der einerseits groß genug aber andererseits nicht so groß sein durfte, dass das Tier primär daran verstarb. Mit fortschreitender Operationserfahrung gelang es zusehends besser, diesen Sachverhalt bei der Koronarokklusion einzuschätzen. Von den 40 operierten Tieren überlebten 26 Tiere die Operation zur Induktion eines Myokardinfarktes. Dies entspricht einer Gesamtletalität von 35%. Neun Tiere verstarben während der Operation an ventrikulären Herzrhythmusstörungen, 5 Tiere verstarben im Zeitraum zwischen dem Ende der Operation und der Visite am darauf folgenden Morgen.

Bei den 26 Tieren, die den zuvor induzierten Myokardinfarkt überlebten, wurde die Operation zur Applikation von MCP-1 oder Kochsalzlösung durchgeführt. Fünf Tiere verstarben unter der Operation, ein Tier verstarb 5 Tage nach der Operation. Die Letalität des operativen Eingriffs zur Applikation von MCP-1 oder Kochsalzlösung beträgt 23%.

Von den 20 Tieren, die bis zum Versuchsende überlebten, wurden 10 Tiere in die statistischen Auswertungen für die Gruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) aufgenommen. Unter den für die Auswertung ausgeschlossenen Tieren sind 4 Ratten mit nicht ausreichend infarzierten Myokardarealen aufgrund einer zu oberflächlich gezogenen Okklusionsnaht, ein Tier mit nicht korrekt intramyokardial erfolgter Injektion sowie ein unter der echokardiographischen Abschlussuntersuchung verstorbenes Tier. Vier Tiere wurden im Sinne eines Pilotversuchs zur qualitativen Demonstration der Primärwirkung von MCP-1 verwendet. 24 Stunden nach Injektion von MCP-1 (n=2) bzw. NaCl (n=2) wurde eine CD 31-Immunhistologie zur Darstellung der Monozyten durchgeführt. Eine quantitative Aussage hierzu ist im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

## 4.1 Körpergewicht im Versuchsverlauf

a)



b)

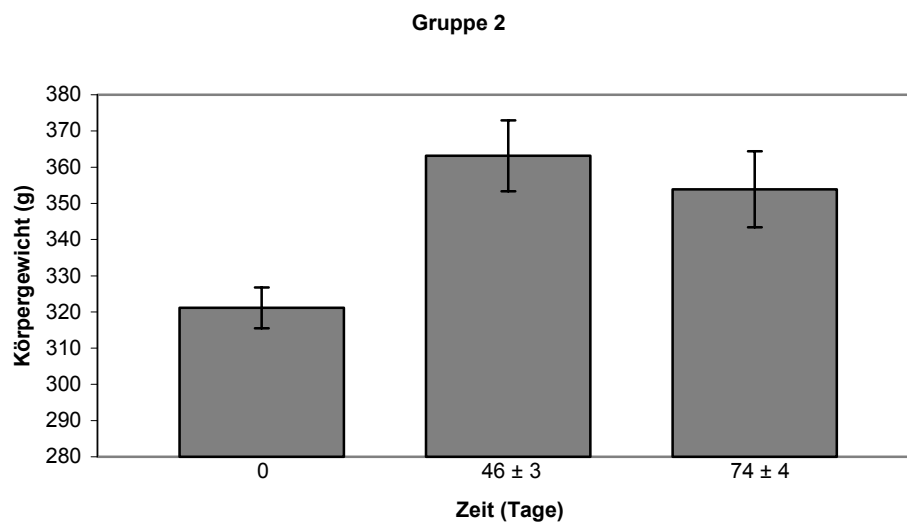


Abbildung 17 a): Darstellung des gemittelten Körpergewichts der Versuchstiergruppe 1 (NaCl, n = 5) im Verlauf, b): Darstellung des gemittelten Körpergewichts der Versuchstiergruppe 2 (MCP-1, n = 5) im Verlauf; Werte  $\pm$  SEM; „0“: Gewicht unmittelbar vor der Koronarokklusions-Operation, „46  $\pm$  3“: Gewicht unmittelbar vor der Injektions-Operation, bei der entweder NaCl (Gruppe 1) oder MCP-1 (Gruppe 2) intramyokardial injiziert wurde, „74  $\pm$  4“: Gewicht unmittelbar vor der Herzentnahme.

Tabelle 2: Gemittelttes Körpergewicht der Tiere der Versuchsgruppen 1 und 2 im Versuchszeitraum, Angabe in Gramm (g).

KG (g)	Tag	0	46 ± 3	74 ± 4
Gruppe 1 (NaCl) n=5	MW (g)	333,22	364,60	362,30
	St-Abw. (g)	31,06	59,25	49,88
	SEM (g)	13,89	26,49	22,31
Gruppe 2 (MCP-1) n=5	MW (g)	321,12	363,20	353,86
	St-Abw. (g)	12,67	21,92	23,48
	SEM (g)	5,66	9,80	10,50

Legende: MW = Mittelwert, St-Abw. = Standardabweichung, SEM = Standard error of the mean, KG (g) = Körpergewicht in Gramm.

## 4.2 Herzgewicht

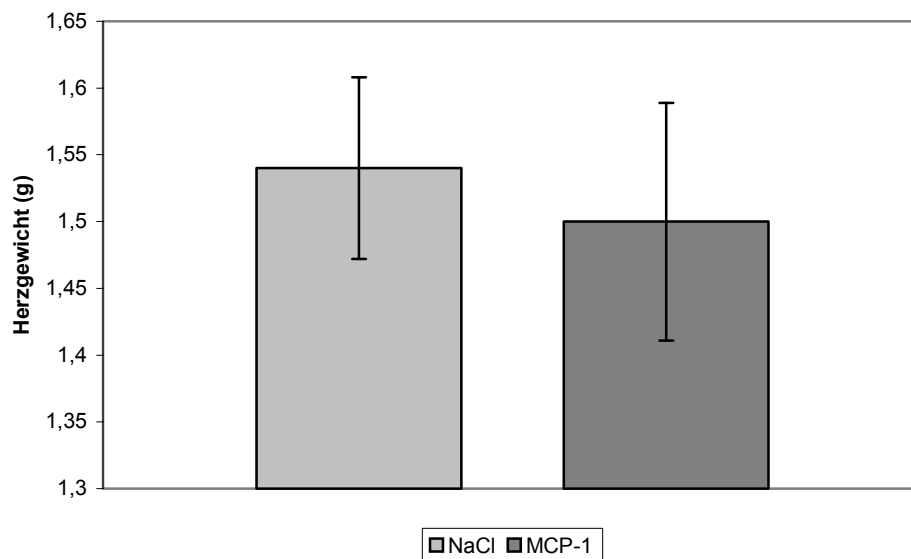


Abbildung 18: Darstellung des gemittelten Herzgewichts der Versuchsgruppen 1 (NaCl, n=5) und 2 (MCP-1, n=5) in Gramm (g) ± SEM.

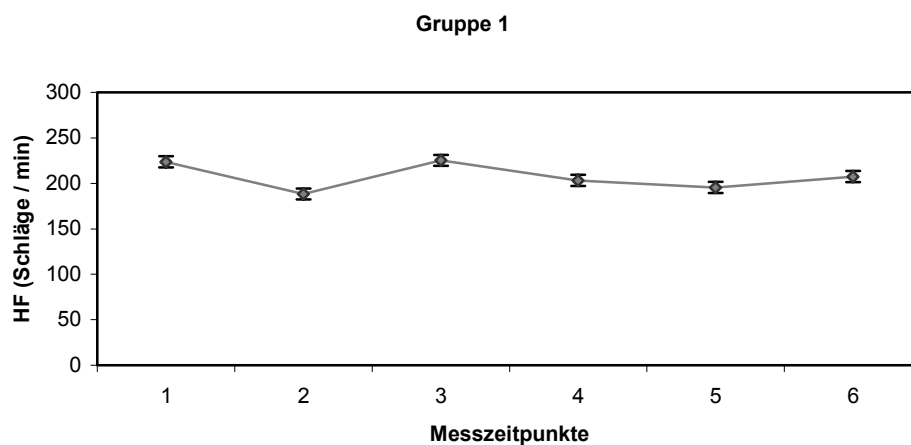
Tabelle 3: Gemittelttes Herzgewicht der Versuchsgruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) nach Versuchsende, Angabe in Gramm (g).

Herzgewicht (g)	Gruppe 1, n=5	Gruppe 2, n=5
MW (g)	1,54	1,50
St.-Abw. (g)	0,15	0,20
SEM (g)	0,07	0,09

Legende: MW = Mittelwert, St-Abw. = Standardabweichung, SEM = Standard error of the mean.

### 4.3 Herzfrequenzen im Versuchsverlauf

a)



b)

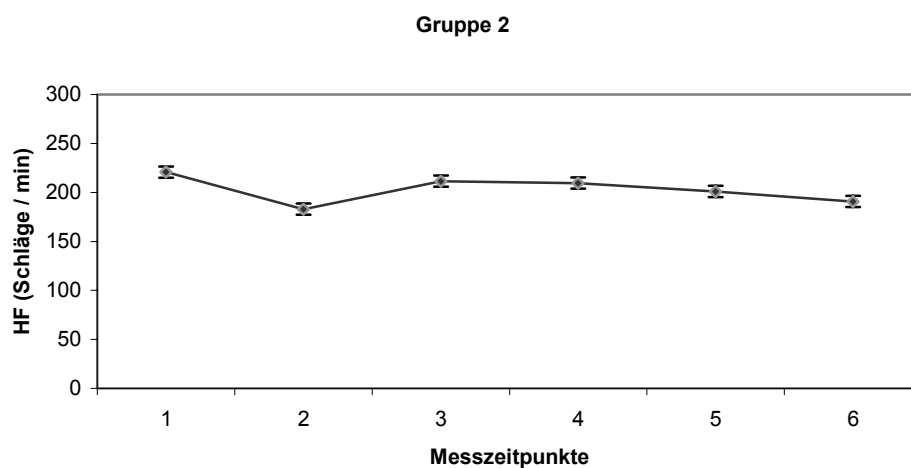


Abbildung 19 a): Darstellung des gemittelten Herzfrequenzverlaufs innerhalb der Gruppe 1 (NaCl) während der beiden operativen Eingriffe, b): Darstellung des gemittelten Herzfrequenzverlaufs innerhalb der Gruppe 2 (MCP-1) während der beiden operativen Eingriffe.

Messzeitpunkte: 1. Herzfrequenz vor 1. OP, 2. Herzfrequenz nach 1. Thorakotomie, 3. Herzfrequenz nach Koronarokklusion, 4. Herzfrequenz vor 2. OP, 5. Herzfrequenz nach 2. Thorakotomie, 6. Herzfrequenz nach intramyokardialer Injektion von NaCl (Gruppe 1) bzw. MCP-1 (Gruppe 2); alle Werte  $\pm$  Standardfehler.

Tabelle 4: Gemittelte Herzfrequenzen der Versuchstiergruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) im Verlauf der operativen Eingriffe. Zwischen den beiden Gruppen besteht zu keinem Messzeitpunkt ein nachweisbar signifikanter Unterschied der Herzfrequenz (alle  $p > 0,05$ ).

Gruppe1	MW	St.-Abw.	SEM	p	
Gruppe2					
HF 1	223,6	35,94	16,07	0,90	<i>nicht signifikant</i>
	220,8	31,44	14,06		
HF 2	118,2	25,33	11,33	0,78	<i>nicht signifikant</i>
	183,0	32,30	14,45		
HF 3	225,2	17,85	7,98	0,26	<i>nicht signifikant</i>
	211,4	18,37	8,21		
HF 4	203,2	33,69	15,07	0,85	<i>nicht signifikant</i>
	209,4	61,85	27,66		
HF 5	195,4	35,33	15,80	0,86	<i>nicht signifikant</i>
	201,0	56,37	25,21		
HF 6	207,4	20,65	9,23	0,51	<i>nicht signifikant</i>
	190,8	50,21	22,46		

Legende: HF = Herzfrequenz, MW = Mittelwert, St-Abw. = Standardabweichung, SEM = Standard error of the mean, p = Maß für die Signifikanz des Unterschieds zweier Parameter (wenn  $p \leq 0,05$ ). Die Zahlen von 1 bis 6 bezeichnen die Messzeitpunkte (siehe Beschriftung der obigen Abbildung).

#### 4.4 Echokardiographische Daten

##### 4.4.1 Linksventrikulärer enddiastolischer Diameter vor Koronarokklusion

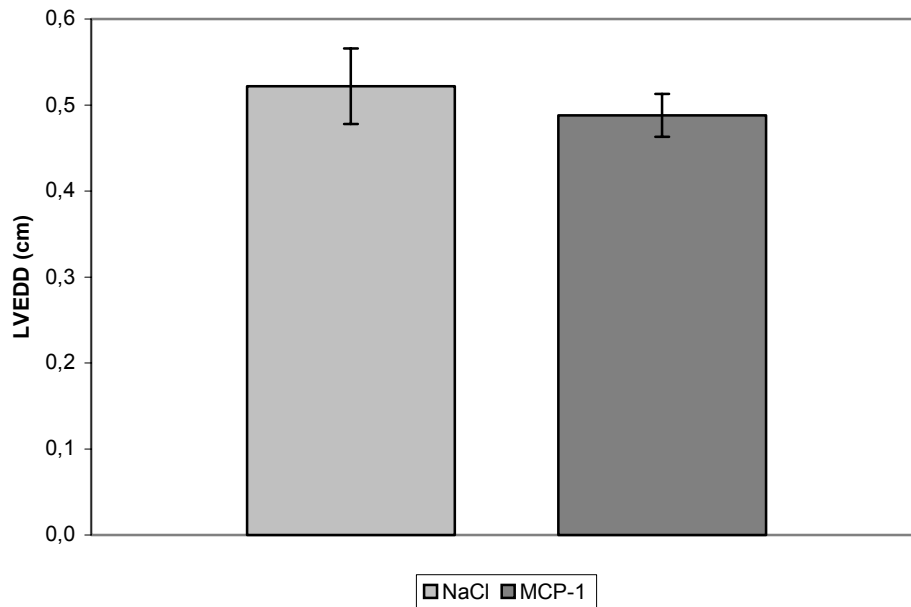


Abbildung 20: Darstellung des gemittelten linksventrikulären enddiastolischen Diameters der Versuchstiergruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) vor Koronarokklusion,  $\pm$  SEM.

Tabelle 5: Vergleich der gemittelten linksventrikulären enddiastolischen Diameter der Versuchsgruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) vor Koronarokklusion. Es besteht kein nachweisbar signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

LVEDD (cm)	Gruppe 1, n=5	Gruppe 2, n=5
MW	0,52	0,49
St.-Abw.	0,10	0,06
SEM	0,04	0,03
p	0,63 – nicht signifikant –	

Legende: LVEDD = linksventrikulärer enddiastolischer Diameter, MW = Mittelwert, St-Abw. = Standardabweichung, SEM = Standard error of the mean, p = Maß für die Signifikanz des Unterschieds zweier Parameter (wenn  $p \leq 0,05$ ).

#### 4.4.2 Linksventrikulärer endsystolischer Diameter vor Koronarokklusion

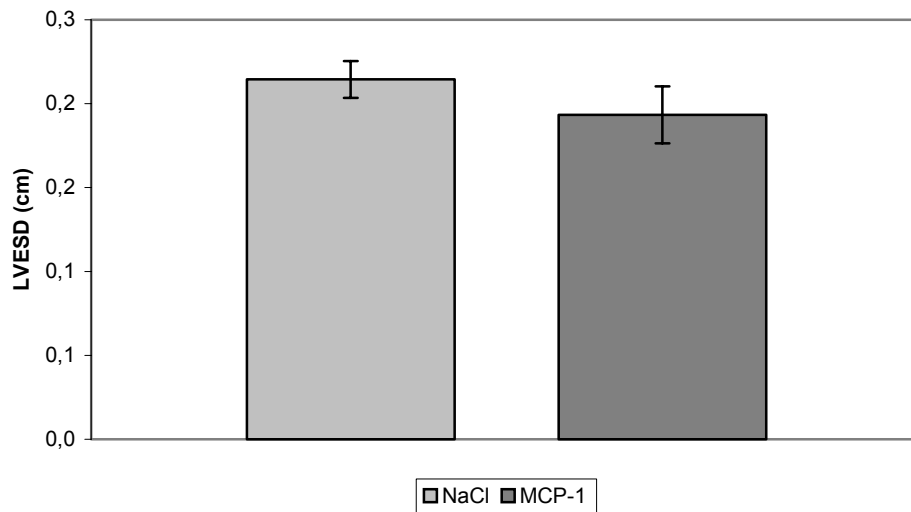


Abbildung 21: Darstellung des gemittelten linksventrikulären endsystolischen Diameters der Versuchstiergruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) vor Koronarokklusion,  $\pm$  SEM.

Tabelle 6: Vergleich der gemittelten linksventrikulären endsystolischen Diameter der Versuchsgruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) vor Koronarokklusion. Es besteht kein nachweisbar signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

LVESD (cm)	Gruppe 1, n=5	Gruppe 2, n=5
MW	0,21	0,19
St.-Abw.	0,02	0,04
SEM	0,01	0,02
p	0,83 – nicht signifikant –	

Legende: LVESD = linksventrikulärer endsystolischer Diameter, MW = Mittelwert, St-Abw. = Standardabweichung, SEM = Standard error of the mean, p = Maß für die Signifikanz des Unterschieds zweier Parameter (wenn  $p \leq 0,05$ ).

#### 4.4.3 Linksventrikuläre Fraktionsverkürzung vor Koronarokklusion

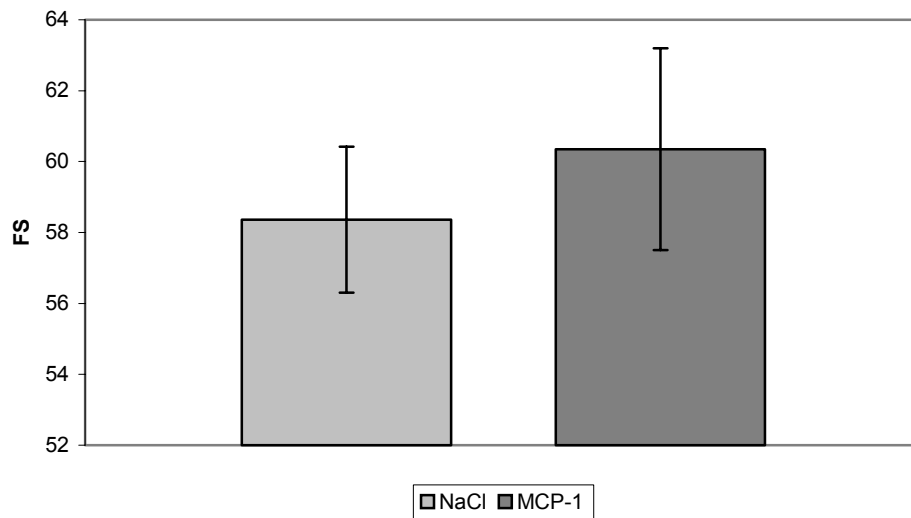


Abbildung 22: Darstellung der gemittelten linksventrikulären Fraktionsverkürzung der Versuchsgruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) vor Koronarokklusion  $\pm$  SEM. FS = fractional shortening (engl. Fraktionsverkürzung).

Tabelle 7: Vergleich der gemittelten linksventrikulären Fraktionsverkürzung der Versuchsgruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) vor Koronarokklusion. Es besteht kein nachweisbar signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

FS	Gruppe 1, n=5	Gruppe 2, n=5
MW	58,36	60,35
St.-Abw.	4,60	6,37
SEM	2,06	2,85
p	0,59 – nicht signifikant –	

Legende: FS = fractional shortening (engl. Fraktionsverkürzung), MW = Mittelwert, St-Abw. = Standardabweichung, SEM = Standard error of the mean, p = Maß für die Signifikanz des Unterschieds zweier Parameter (wenn  $p \leq 0,05$ ).



#### 4.4.4 Linksventrikulärer enddiastolischer Diameter nach Koronarokklusion

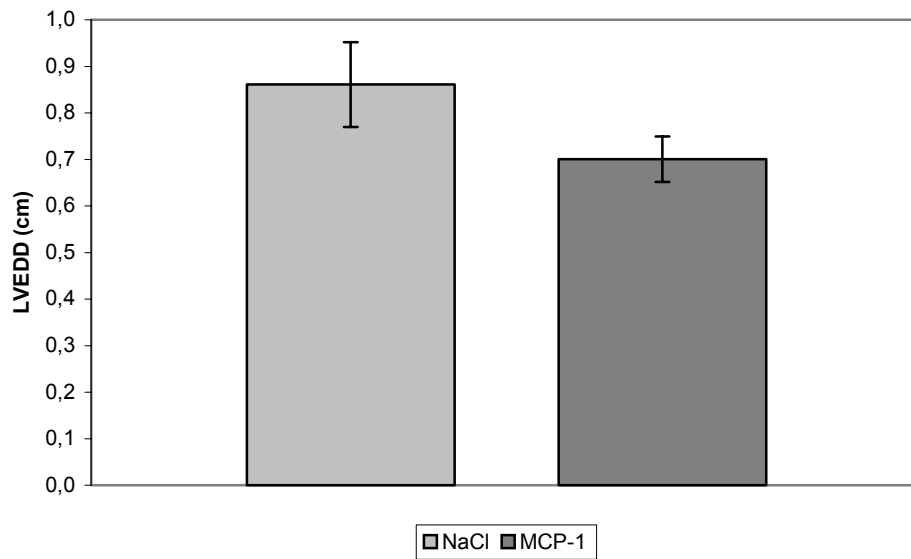


Abbildung 23: Darstellung des gemittelten linksventrikulären enddiastolischen Diameters der Versuchstiergruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) nach Koronarokklusion,  $\pm$  SEM.

Tabelle 8: Vergleich der gemittelten linksventrikulären enddiastolischen Diameter der Versuchsgruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) nach Koronarokklusion. Es besteht kein nachweisbar signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

LVEDD (cm)	Gruppe 1, n=5	Gruppe 2, n=5
<b>MW</b>	0,86	0,70
<b>St.-Abw.</b>	0,20	0,11
<b>SEM</b>	0,09	0,05
<b>p</b>	0,16 – nicht signifikant –	

Legende: LVEDD = linksventrikulärer enddiastolischer Diameter, MW = Mittelwert, St-Abw. = Standardabweichung, SEM = Standard error of the mean, p = Maß für die Signifikanz des Unterschieds zweier Parameter (wenn  $p \leq 0,05$ ).

#### 4.4.5 Linksventrikulärer endsystolischer Diameter nach Koronarokklusion

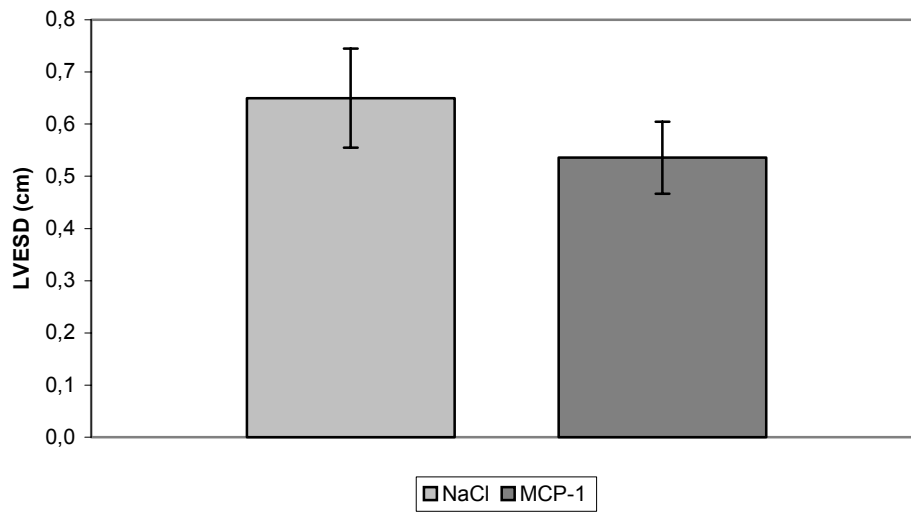


Abbildung 24: Darstellung des gemittelten linksventrikulären endsystolischen Diameters der Versuchstiergruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) nach Koronarokklusion,  $\pm$  SEM.

Tabelle 9: Vergleich der gemittelten linksventrikulären endsystolischen Diameter der Versuchsgruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) nach Koronarokklusion. Es besteht kein nachweisbar signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

LVESD (cm)	Gruppe 1, n=5	Gruppe 2, n=5
<b>MW</b>	0,65	0,54
<b>St.-Abw.</b>	0,21	0,15
<b>SEM</b>	0,01	0,07
<b>p</b>	0,36 <b>– nicht signifikant –</b>	

Legende: LVESD = linksventrikulärer endsystolischer Diameter, MW = Mittelwert, St-Abw. = Standardabweichung, SEM = Standard error of the mean, p = Maß für die Signifikanz des Unterschieds zweier Parameter (wenn  $p \leq 0,05$ ).

#### 4.4.6 Linksventrikuläre Fraktionsverkürzung nach Koronarokklusion

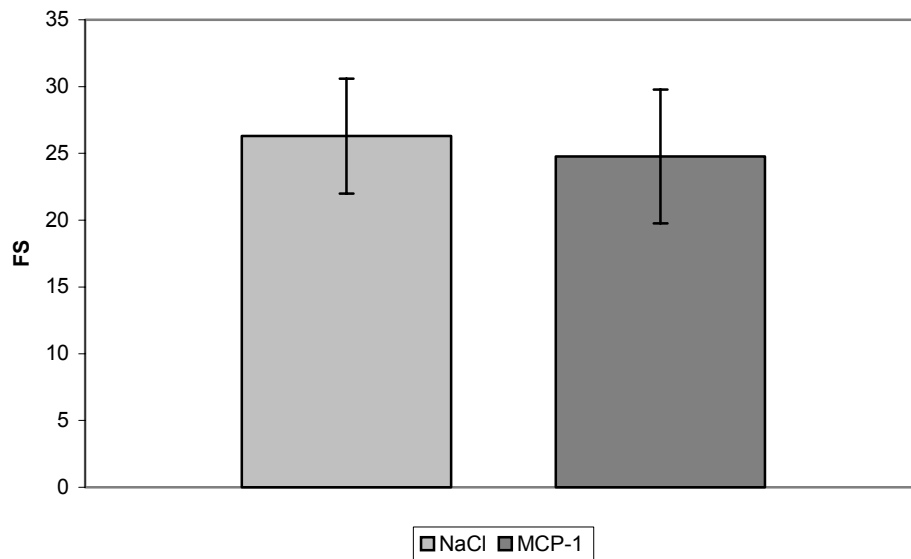


Abbildung 25: Darstellung der gemittelten linksventrikulären Fraktionsverkürzung der Versuchsgruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) nach Koronarokklusion  $\pm$  SEM. FS = fractional shortening (engl. Fraktionsverkürzung).

Tabelle 10: Vergleich der gemittelten linksventrikulären Fraktionsverkürzung der Versuchsgruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) nach Koronarokklusion. Es besteht kein nachweisbar signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

FS	Gruppe 1, n=5	Gruppe 2, n=5
MW	26,29	24,78
St.-Abw.	9,62	11,20
SEM	4,30	5,01
p	0,82 – nicht signifikant –	

Legende: FS = fractional shortening (engl. Fraktionsverkürzung), MW = Mittelwert, St-Abw. = Standardabweichung, SEM = Standard error of the mean, p = Maß für die Signifikanz des Unterschieds zweier Parameter (wenn  $p \leq 0,05$ ).

#### 4.4.7 Linksventrikulärer enddiastolischer Diameter nach Injektionsoperation

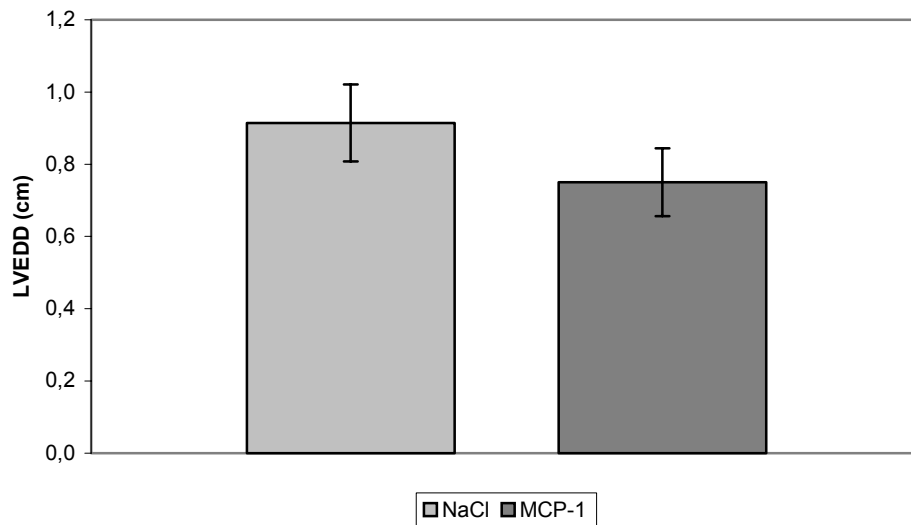


Abbildung 26: Darstellung des gemittelten linksventrikulären enddiastolischen Diameters der Versuchstiergruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) nach Injektionsoperation,  $\pm$  SEM.

Tabelle 11: Vergleich der gemittelten linksventrikulären enddiastolischen Diameter der Versuchsgruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) nach Injektionsoperation. Es besteht kein nachweisbar signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

LVEDD (cm)	Gruppe 1, n=5	Gruppe 2, n=5
<b>MW</b>	0,91	0,75
<b>St.-Abw.</b>	0,24	0,21
<b>SEM</b>	0,11	0,09
<b>p</b>	0,28 – nicht signifikant –	

Legende: LVEDD = linksventrikulärer enddiastolischer Diameter, MW = Mittelwert, St-Abw. = Standardabweichung, SEM = Standard error of the mean, p = Maß für die Signifikanz des Unterschieds zweier Parameter (wenn  $p \leq 0,05$ ).

#### 4.4.8 Linksventrikulärer endsystolischer Diameter nach Injektionsoperation

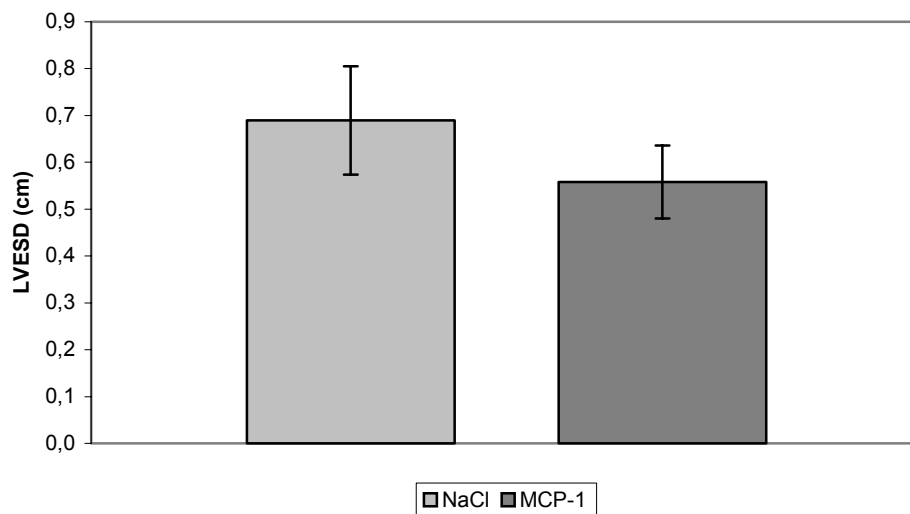


Abbildung 27: Darstellung des gemittelten linksventrikulären endsystolischen Diameters der Versuchstiergruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) nach Injektionsoperation,  $\pm$  SEM.

Tabelle 12: Vergleich der gemittelten linksventrikulären endsystolischen Diameter der Versuchsgruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) nach Injektionsoperation. Es besteht kein nachweisbar signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

LVESD (cm)	Gruppe 1, n=5	Gruppe 2, n=5
<b>MW</b>	0,69	0,56
<b>St.-Abw.</b>	0,26	0,17
<b>SEM</b>	0,12	0,08
<b>p</b>	0,38 <b>– nicht signifikant –</b>	

Legende: LVESD = linksventrikulärer endsystolischer Diameter, MW = Mittelwert, St-Abw. = Standardabweichung, SEM = Standard error of the mean, p = Maß für die Signifikanz des Unterschieds zweier Parameter (wenn  $p \leq 0,05$ ).

#### 4.4.9 Linksventrikuläre Fraktionsverkürzung nach Injektionsoperation

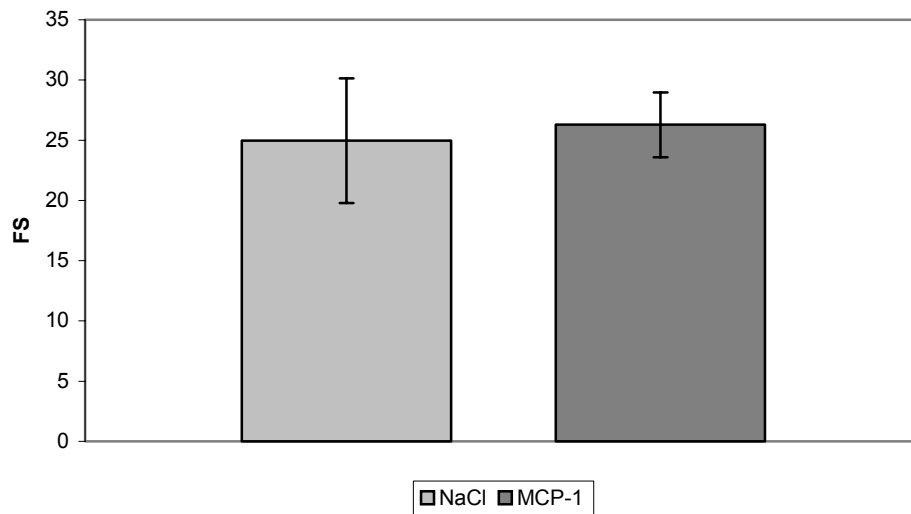


Abbildung 28: Darstellung der gemittelten linksventrikulären Fraktionsverkürzung der Versuchsgruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) nach Injektionsoperation  $\pm$  SEM. FS = fractional shortening (engl. Fraktionsverkürzung).

Tabelle 13: Vergleich der gemittelten linksventrikulären Fraktionsverkürzung der Versuchsgruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) nach Injektionsoperation. Es besteht kein nachweisbar signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

FS	Gruppe 1, n=5	Gruppe 2, n=5
MW	24,95	26,28
St.-Abw.	11,58	6,04
SEM	5,18	2,70
p	0,83 – nicht signifikant –	

Legende: FS = fractional shortening (engl. Fraktionsverkürzung), MW = Mittelwert, St-Abw. = Standardabweichung, SEM = Standard error of the mean, p = Maß für die Signifikanz des Unterschieds zweier Parameter (wenn  $p \leq 0,05$ ).

## 4.5 Anzahl der von Willebrand-Faktor-positiven Zellen

### 4.5.1 von Willebrand-Faktor-positive Zellen im Injektionsbereich

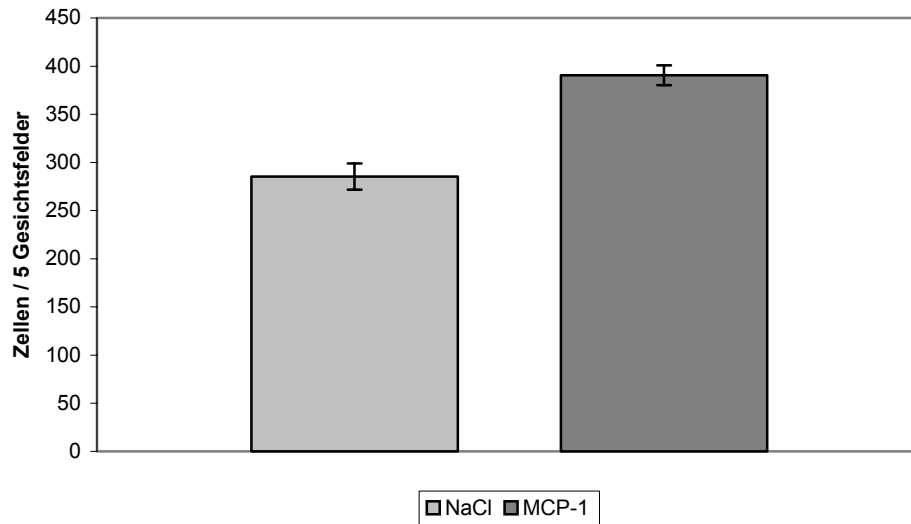


Abbildung 29: Darstellung der gemittelten Anzahl der von Willebrand-Faktor-positiven Zellen im Injektionsbereich von NaCl (Gruppe 1) bzw. MCP-1 (Gruppe 2)  $\pm$  SEM.

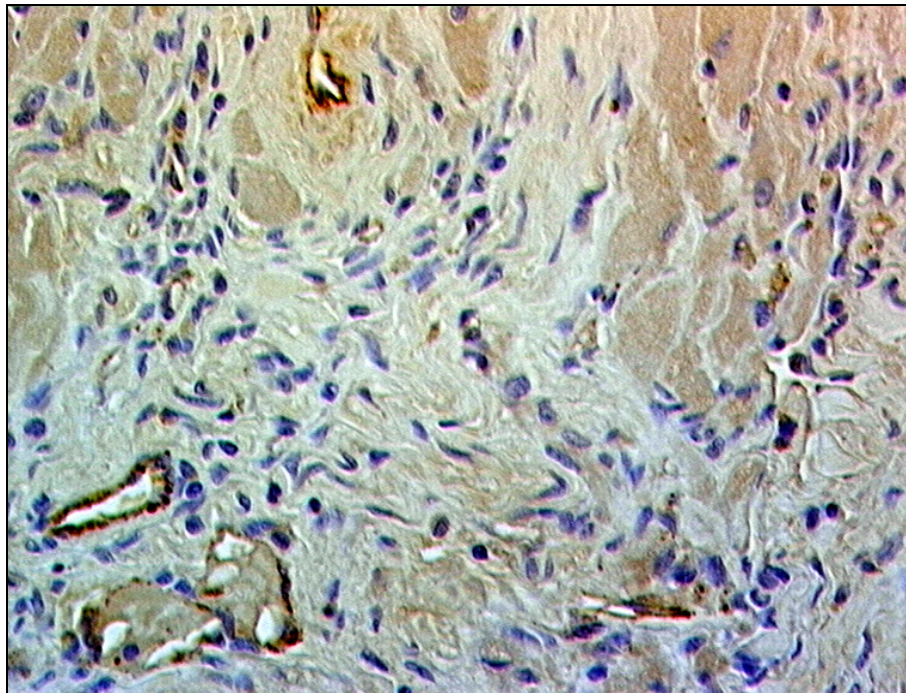


Abbildung 30: Von Willebrand-Faktor-positive Zellen im Injektionsbereich, Gruppe 1 (NaCl), 400-fache Vergrößerung.

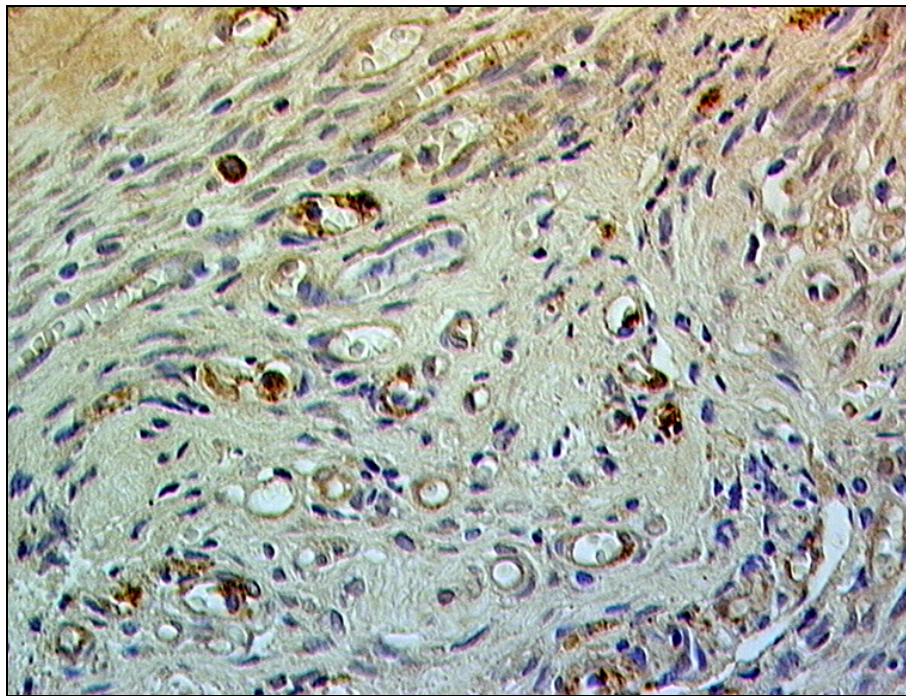


Abbildung 31: Von Willebrand-Faktor-positive Zellen im Injektionsbereich, Gruppe 2 (MCP-1), 400-fache Vergrößerung.

Tabelle 14: Vergleich der gemittelten Anzahl der von Willebrand-Faktor-positiven Zellen im Injektionsbereich von NaCl (Gruppe 1) bzw. MCP-1 (Gruppe 2). Für die Gruppe 2 zeigt sich eine nachweisbar signifikant höhere Zahl vWF-positiver Zellen.

<b>vWF</b>	<b>Gruppe 1, n=5</b>	<b>Gruppe 2, n=5</b>
<b>MW</b>	285,20	390,60
<b>St.-Abw.</b>	30,33	23,17
<b>SEM</b>	13,56	10,36
<b>p</b>	0,0003 – <b>signifikant</b> –	

Legende: vWF = von Willebrand-Faktor, MW = Mittelwert, St-Abw. = Standardabweichung, SEM = Standard error of the mean, p = Maß für die Signifikanz des Unterschieds zweier Parameter (wenn  $p \leq 0,05$ ).



#### 4.5.2 von Willebrand-Faktor-positive Zellen im Kontrollbereich

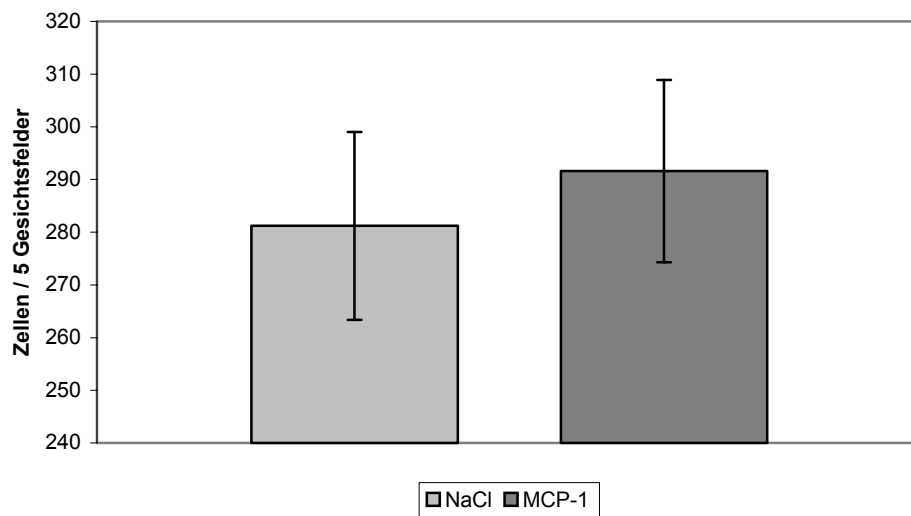


Abbildung 32: Darstellung der gemittelten Anzahl der von Willebrand-Faktor-positiven Zellen im Kontrollbereich  $\pm$  SEM.

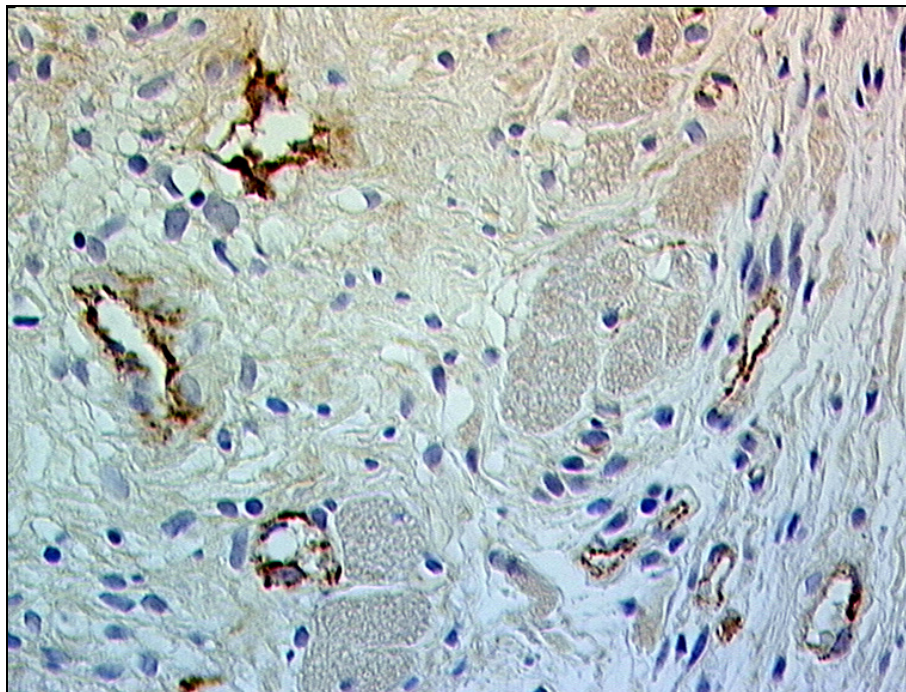


Abbildung 33: Von Willebrand-Faktor-positive Zellen im Kontrollbereich, Gruppe 1 (NaCl), 400-fache Vergrößerung.

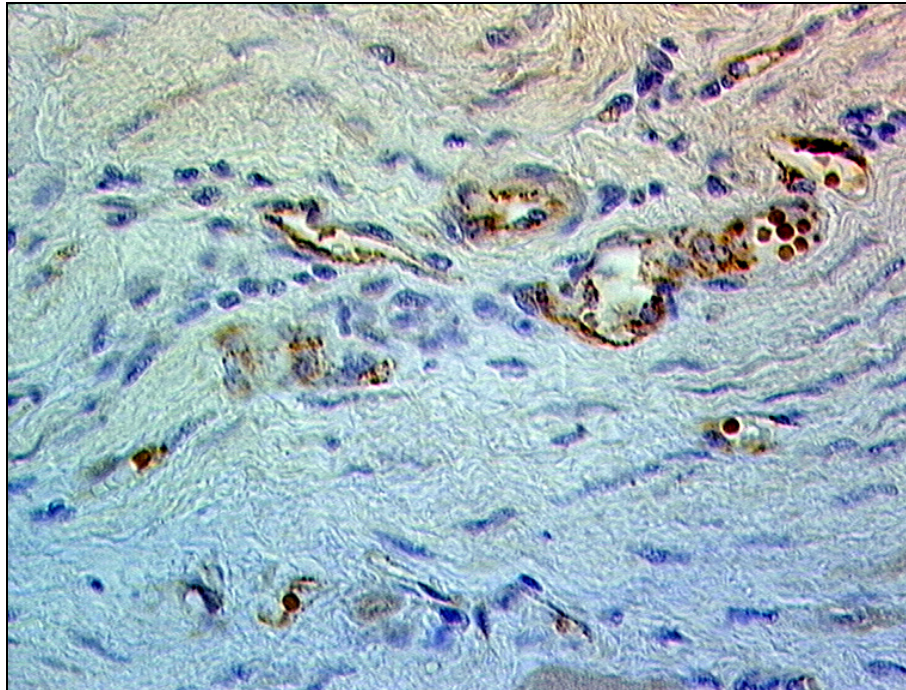


Abbildung 34: Von Willebrand-Faktor-positive Zellen im Kontrollbereich, Gruppe 2 (MCP-1), 400-fache Vergrößerung.

Tabelle 15: Vergleich der gemittelten Anzahl der von Willebrand-Faktor-positiven Zellen im Kontrollbereich des Myokards der Gruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1). Es besteht kein nachweisbar signifikanter Unterschied in der Zahl der vWF-positiven Zellen zwischen den beiden Gruppen.

<b>vWF</b>	<b>Gruppe 1, n=5</b>	<b>Gruppe 2, n=5</b>
<b>MW</b>	281,20	291,60
<b>St.-Abw.</b>	39,87	38,68
<b>SEM</b>	17,83	17,30
<b>p</b>	0,69 <b>– nicht signifikant –</b>	

Legende: vWF = von Willebrand-Faktor, MW = Mittelwert, St-Abw. = Standardabweichung, SEM = Standard error of the mean, p = Maß für die Signifikanz des Unterschieds zweier Parameter (wenn  $p \leq 0,05$ ).

## 4.6 Anzahl der Gefäße mit Membrana elastica interna

### 4.6.1 Gefäße mit Membrana elastica interna im Injektionsbereich

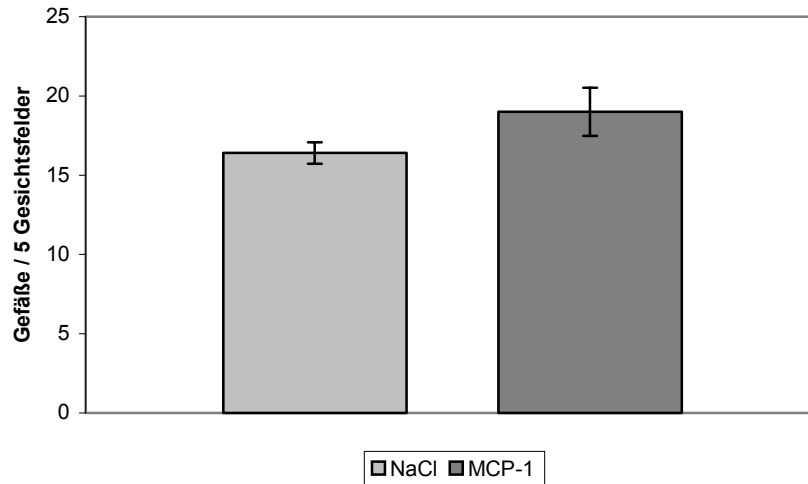


Abbildung 35: Darstellung der gemittelten Anzahl der Gefäße mit Membrana elastica interna nach Elastica van Gieson-Färbung im Injektionsbereich von NaCl (Gruppe 1) bzw. MCP-1 (Gruppe 2)  $\pm$  SEM.

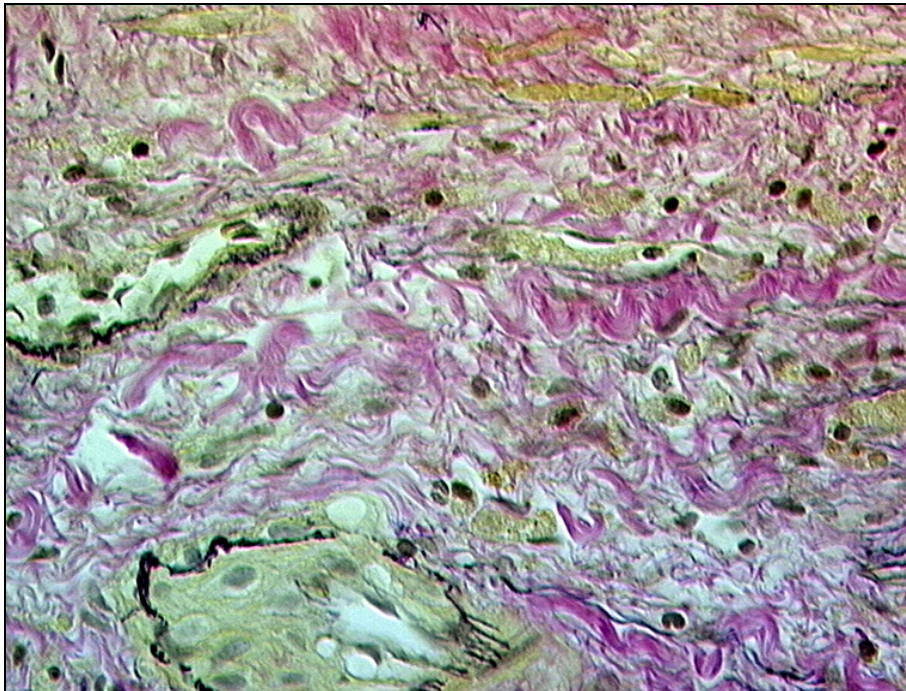


Abbildung 36: Gefäße mit Membrana elastica interna nach Elastica van Gieson-Färbung im Injektionsbereich, Gruppe 1 (NaCl), 400-fache Vergrößerung.



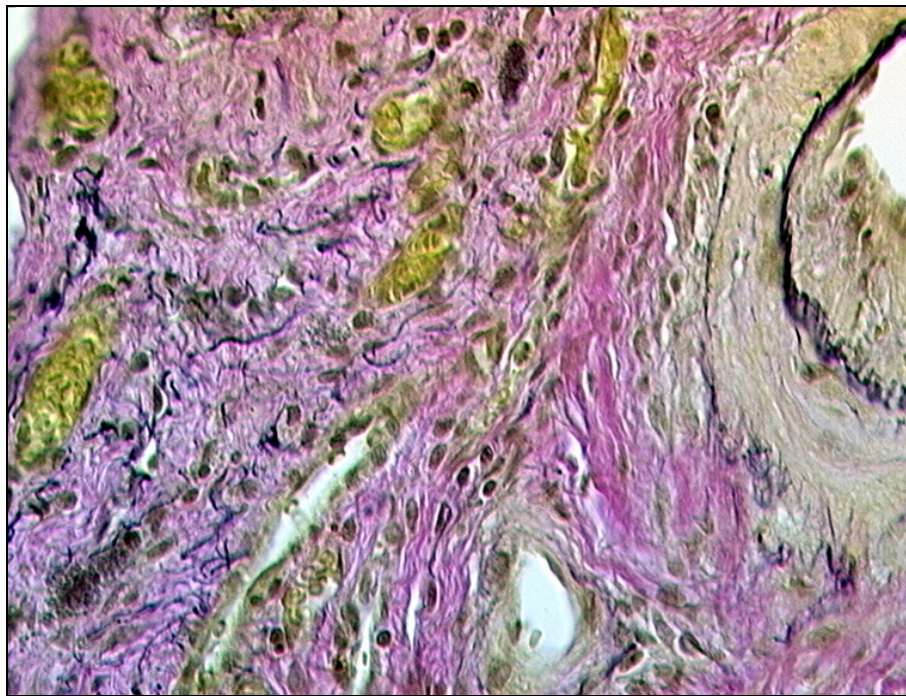


Abbildung 37: Gefäße mit Membrana elastica interna nach Elastica van Gieson-Färbung im Injektionsbereich, Gruppe 2 (MCP-1), 400-fache Vergrößerung.

Tabelle 16: Vergleich der gemittelten Anzahl der Gefäße mit Membrana elastica interna nach Elastica van Gieson-Färbung im Injektionsbereich von NaCl (Gruppe 1) bzw. MCP-1 (Gruppe 2). Es besteht kein nachweisbar signifikanter Unterschied in der Zahl der Blutgefäße mit Membrana elastica interna zwischen den beiden Gruppen.

EvG	Gruppe 1, n=5	Gruppe 2, n=5
MW	16,40	19,00
St.-Abw.	1,52	3,39
SEM	0,68	1,52
p	0,16 – nicht signifikant –	

Legende: EvG = Elastica-van Gieson, MW = Mittelwert, St-Abw. = Standardabweichung, SEM = Standard error of the mean, p = Maß für die Signifikanz des Unterschieds zweier Parameter (wenn  $p \leq 0,05$ ).

#### 4.6.2 Gefäße mit Membrana elastica interna im Kontrollbereich

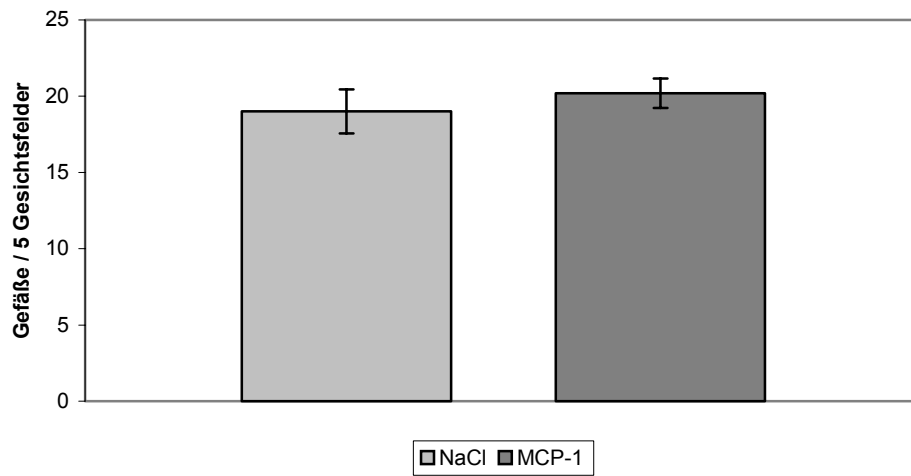


Abbildung 38: Darstellung der gemittelten Anzahl der Gefäße mit Membrana elastica interna im Kontrollbereich  $\pm$  SEM.

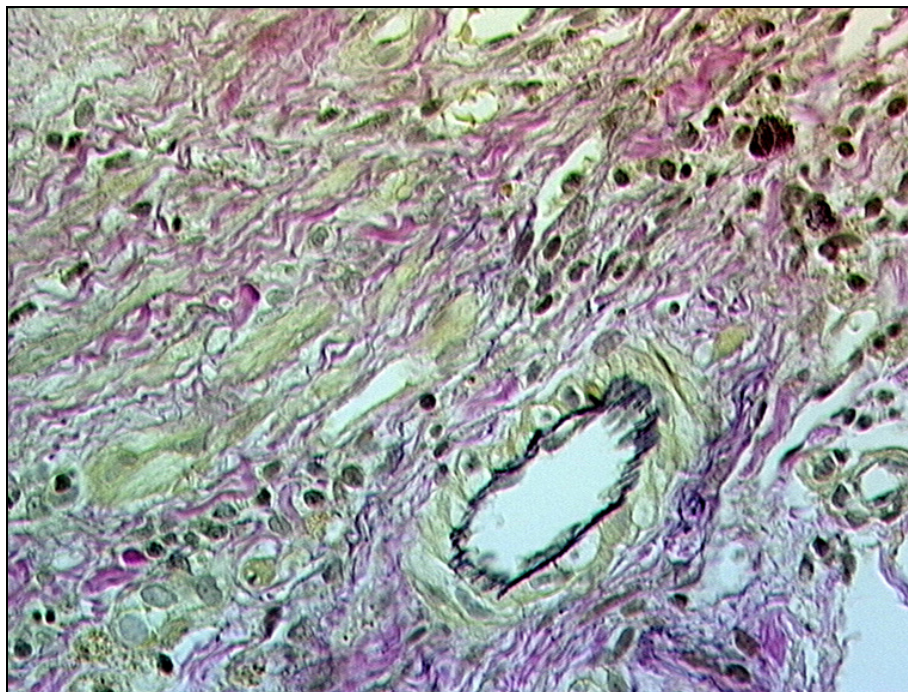


Abbildung 39: Gefäße mit Membrana elastica interna nach Elastica van Gieson-Färbung im Kontrollbereich, Gruppe 1 (NaCl), 400-fache Vergrößerung.



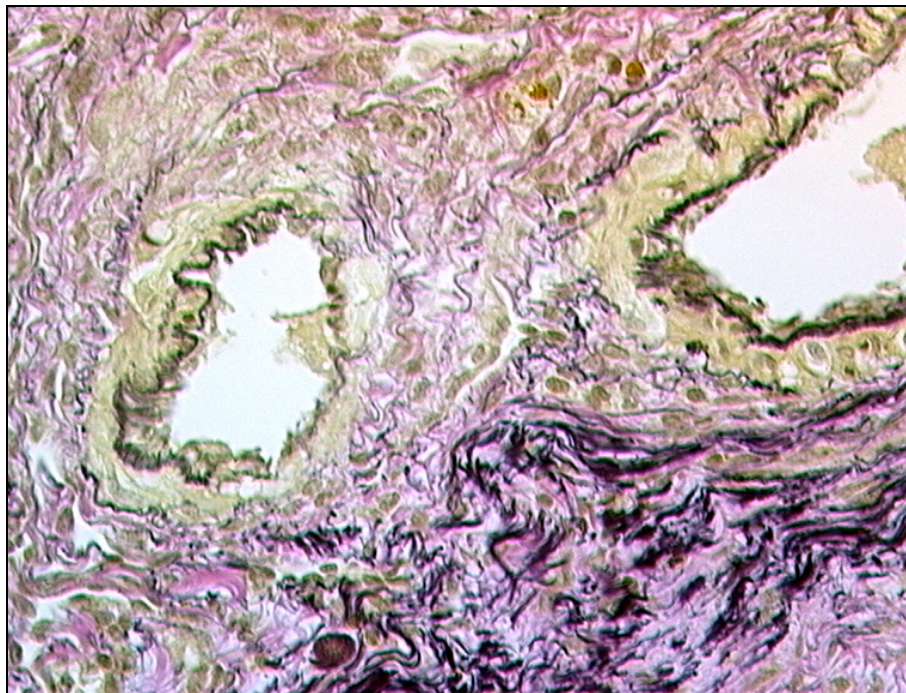


Abbildung 40: Gefäße mit Membrana elastica interna nach Elastica van Gieson-Färbung im Kontrollbereich, Gruppe 2 (MCP-1), 400-fache Vergrößerung.

Tabelle 17: Vergleich der gemittelten Anzahl der Gefäße mit Membrana elastica interna nach Elastica van Gieson-Färbung im Kontrollbereich von NaCl (Gruppe 1) bzw. MCP-1 (Gruppe 2). Es besteht kein nachweisbar signifikanter Unterschied in der Zahl der Blutgefäße mit Membrana elastica zwischen den beiden Gruppen.

<b>EvG</b>	<b>Gruppe 1, n=5</b>	<b>Gruppe 2, n=5</b>
<b>MW</b>	19,00	20,20
<b>St.-Abw.</b>	3,24	2,17
<b>SEM</b>	1,45	0,97
<b>p</b>	0,51 – nicht signifikant –	

Legende: EvG = Elastica-van Gieson, MW = Mittelwert, St-Abw. = Standardabweichung, SEM = Standard error of the mean, p = Maß für die Signifikanz des Unterschieds zweier Parameter (wenn  $p \leq 0,05$ ).

#### 4.7 CD 31-Immunhistologie zur Darstellung der Monozyteninfiltration

Die primäre Wirkung von MCP-1 besteht in der Attraktion von Monozyten. Deren Infiltration im Gewebe wurde im Sinne eines Pilotprojektes mittels der CD 31-Immunhistologie bei vier Tieren vergleichend dargestellt. So zeigte sich 24 Stunden nach intramyokardialer Injektion von MCP-1 (n=2) eine größere Anzahl CD 31-positiver Zellen im infarzierten Myokard als nach Injektion von NaCl (n=2).

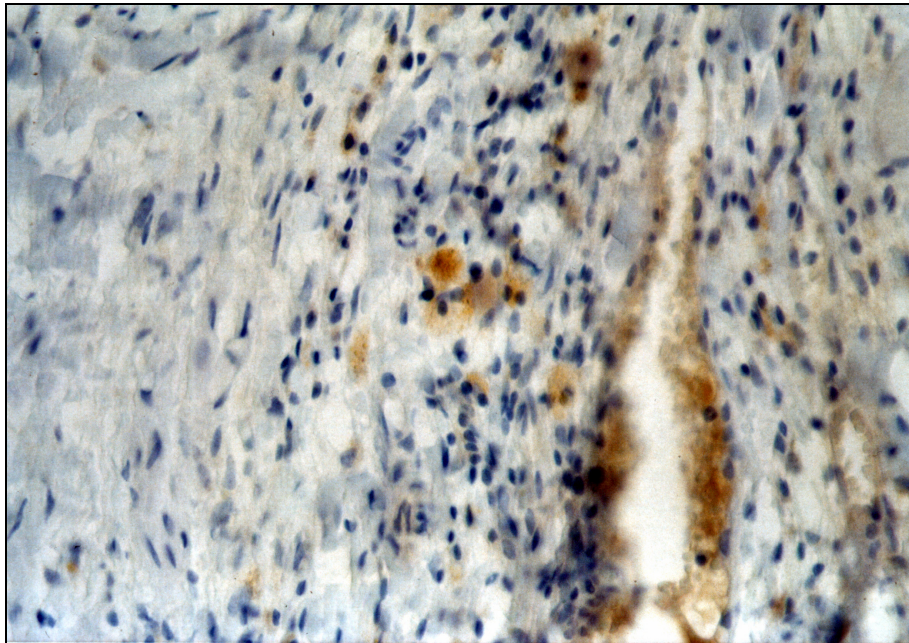


Abbildung 41: Darstellung der Monozyten in infarziertem Rattenmyokard mittels CD 31-Immunhistologie (400-fache Vergrößerung) 24 Stunden nach intramyokardialer Injektion von NaCl.

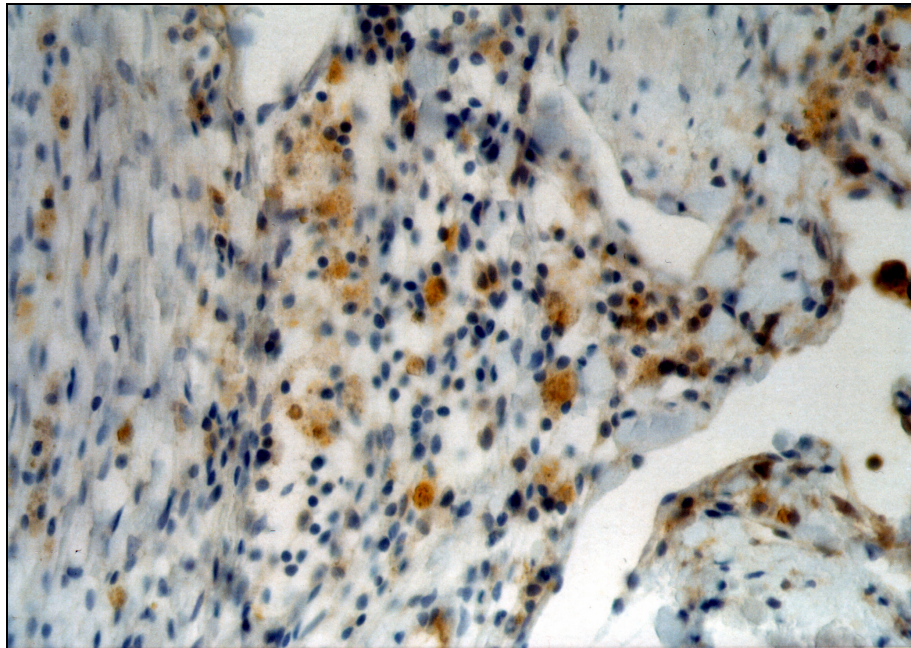


Abbildung 42: Darstellung der Monozyten in infarziertem Rattenmyokard mittels CD 31-Immunhistologie (400-fache Vergrößerung) 24 Stunden nach intramyokardialer Injektion von MCP-1. Man erkennt eine deutlich höhere Zahl CD 31-positiver Zellen (gelbbraun markierte Zellen) als in Abbildung 41.



## 5. Zusammenfassung der Ergebnisse

Eine singuläre intramyokardiale Injektion einer Dosis von 3 µg MCP-1 in die Randbereiche chronisch infarzierter Rattenherzen führte bei Anwendung des zweiseitigen unverbundenen t-Tests zu:

1. einer in der immunhistologischen Färbung mit dem Antikörper gegen von Willebrand-Faktor nachweisbar signifikant höheren Zahl myokardialer Blutgefäße im Injektionsbereich von MCP-1 (Gruppe 2,  $390,6 \pm 10,4$  SEM) im Vergleich zum Injektionsbereich von NaCl (Gruppe 1,  $285,2 \pm 13,6$  SEM,  $p < 0,001$ ).
2. keinem nachweisbar signifikanten Unterschied in der Anzahl der myokardialen Blutgefäße im Kontrollbereich zwischen den Gruppen 1 (NaCl,  $281,2 \pm 17,8$  SEM) und 2 (MCP-1,  $291,6 \pm 17,3$  SEM,  $p = 0,69$ ) in der immunhistologischen Färbung mit dem Antikörper gegen von Willebrand-Faktor.
3. keinem nachweisbar signifikanten Unterschied in der Zahl der Blutgefäße mit histologisch dargestellter Membrana elastica interna und externa in der Elastica van Gieson-Färbung zwischen den Gruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) sowohl im Injektionsbereich ( $16,4 \pm 0,7$  SEM vs.  $19,0 \pm 1,5$  SEM,  $p = 0,16$ ) als auch im Kontrollbereich ( $19,0 \pm 1,5$  SEM vs.  $20,2 \pm 1,0$  SEM,  $p = 0,51$ ).
4. keinem nachweisbar signifikanten Unterschied der echokardiographisch ermittelten linksventrikulären enddiastolischen und endsystolischen Diameter sowie der daraus ermittelten Fraktionsverkürzung als Parameter der linksventrikulären Funktion zwischen den Tieren der Versuchsgruppen 1 (NaCl,  $25,0 \pm 5,2$  SEM) und 2 (MCP-1,  $26,3 \pm 2,7$  SEM,  $p = 0,83$ ).

## 6. Diskussion

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Applikation des Zytokins MCP-1 und dessen Einfluss auf Angiogenese und Arteriogenese. Die wesentlichen Resultate sind:

1. Eine einmalige intramyokardiale Injektion von MCP-1 induziert eine nachweisbar signifikante Zunahme der Anzahl der Blutgefäße im chronischen Myokardinfarktmodell der Ratte. Durch die CD 31-Immunhistologie konnte eine Zunahme der Monozyten-Infiltration in den Injektionsbereich von MCP-1 am Rand des Myokardinfarkts im Vergleich zu einer Injektion von NaCl dargestellt werden.
2. Im Vergleich zur Kontrollgruppe bestand jedoch kein nachweisbar signifikanter Unterschied in der Anzahl der Blutgefäße mit Membrana elastica interna, das heißt, es konnte kein statistisch signifikanter Nachweis einer relevanten Arteriogenese in diesem Modell geführt werden.
3. Die echokardiographisch erfassten Parameter linksventrikulärer enddiastolischer Diameter, linksventrikulärer endsystolischer Diameter sowie die linksventrikuläre Fraktionsverkürzung als Ausdruck der kontraktilen Myokardfunktion zeigten in den untersuchten Gruppen keine nachweisbar signifikanten Unterschiede.

Folgende Aspekte der vorliegenden Arbeit werden im Einzelnen diskutiert:

1. Wahl des Ischämie Modells: akut versus chronisch
2. Wahl des Wachstumsfaktors / Zytokins
3. Applikationsformen von Wachstumsfaktoren: Plasmid versus Protein
4. Applikationsmodi für Wachstumsfaktoren und Zytokine
5. Therapeutische Angiogenese: Chancen und Risiken

## **6.1 Wahl des Ischämie-modells: akut versus chronisch**

Im akuten Ischämie-/Reperfusionmodell lässt sich eine Induktion der Ausschüttung chemoattraktiver Substanzen<sup>36+37</sup> sowie endogener Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF<sup>2</sup>) und Zytokinen (z.B. MCP-1<sup>38</sup>) nachweisen. Im Rahmen der inflammatorischen Reaktion auf die Reperfusion kommt es zu einer verstärkten Ausschüttung von MCP-1 aus Endothelzellen, Monozyten und (Gewebs-) Makrophagen.<sup>34</sup> Im Anschluss an diese inflammatorische Phase als Reaktion auf Ischämie und Zelluntergang folgt die bis etwa 4 Wochen nach dem Ereignis andauernde Granulationsphase.<sup>39</sup> Sie ist charakterisiert durch die bindegewebige Organisation und Abheilung des infarzierten Myokards und geht in eine sogenannte Reparations- und Remodeling-Phase über, die das Endstadium des Infarkts in Form einer fibrösen Narbe beschreibt. In dem hier verwendeten, in der kardiologischen Forschung erprobten, chronischen Ischämie-modell<sup>4, 28, 33</sup> ist die akute Ischämie als Stimulus der endogenen Wachstumsfaktoren- und Zytokinausschüttung zum Zeitpunkt der Injektion des MCP-1 bereits 6 Wochen zuvor abgelaufen. So sollte der Einfluss der „endogenen Angiogenese“ infolge einer akuten Ischämie vermindert werden. Die nachweisbar signifikante Angiogenese ist somit auf den Effekt der in diesem Modell applizierten Substanz MCP-1 zurückzuführen.

Diesem Zusammenhang ist entgegenzuhalten, dass Ito und Mitarbeiter<sup>15</sup> hämodynamisch messbare Perfusionsverbesserungen sowie angiographisch sichtbare arterielle Kollateralen in einem Modell mit Infusion von MCP-1 bei akuter Ischämie des Hinterlaufs von Kaninchen zeigen konnten. Hier scheint der natürliche Stimulus der Ischämie neben der Applikation von MCP-1 von entscheidender Bedeutung für die Arteriogenese gewesen zu sein, die sich, wie oben geschildert, in unserem chronischen Modell histologisch nicht darstellen ließ. Eine Angiogenese in Form einer Sprossung von Kapillaren scheint hingegen gemäß den Daten der hier vorgelegten Arbeit auch ohne den Stimulus einer akuten Ischämie durch MCP-1 induzierbar.

## **6.2 Wahl des Wachstumsfaktors / Zytokins**

Zu einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren sind Untersuchungen hinsichtlich ihres Einflusses auf Ischämie und Angiogenese zu finden. Zu den bislang am besten untersuchten

Wachstumsfaktoren zählen VEGF<sup>2-4, 6+7</sup> und FGF-2<sup>8-10, 71</sup>, die nicht nur tierexperimentell, sondern auch bereits in Studien an Patienten mit KHK<sup>16-23</sup> und pAVK<sup>24+25</sup> untersucht wurden.

Das Zytokin MCP-1 wurde bislang nur unzureichend auf seine proangiogenetische Wirkung am ischämischen Rattenherzen untersucht. Den Zusammenhang zwischen Ischämie und endogener Ausschüttung von MCP-1 untersuchten Kakio und Mitarbeiter<sup>38</sup> und konnten in der Reperusionsphase nach Ischämie einen signifikanten Anstieg der MCP-1 mRNA-positiven Zellen im Myokard der Ratte nachweisen. Moldovan und Mitarbeiter<sup>48</sup> konnten an transgenen Mäusen, bei denen eine gezielte Überexpression von MCP-1 in Kardiomyozyten induziert wurde, eine verstärkte Invasion von Monozyten/Makrophagen in das ischämische Myokard zeigen. Histologisch fanden sich zum Teil Erythrozyten enthaltende Metalloelastase-positive Kanäle ohne durchgehendes Endothel, die als prävasculäre Strukturen gedeutet werden könnten. Eine Angiogenese oder Arteriogenese in Form neuer Kapillaren bzw. Arteriolen konnte nicht gezeigt werden. Bendeck<sup>49</sup> stellt eine lokale Hypoxie als wichtigen Cofaktor für die Monozyten-chemoattraktive Wirkung von MCP-1 heraus. Die in das ischämische Gewebe eingewanderten Monozyten sezernieren eine Vielzahl von biologisch aktiven Molekülen, unter anderem auch das Peptid PR 39, dessen zentrale Rolle als Induktor der Angiogenese in den Koronargefäßen transgener Mäuse von Li und Mitarbeitern<sup>50</sup> demonstriert wurde. Durch MCP-1-Infusion bei Kaninchen nach Femoralarterienverschluß konnten Ito und Mitarbeiter<sup>15</sup> angiographisch eine arterielle Kollateralisation nachweisen.

Die hier vorgelegte Arbeit sollte die Wirkung einer einzelnen Injektion von MCP-1 auf das ischämische Myokard der Ratte aufzeigen.

### **6.3 Applikationsformen von Wachstumsfaktoren: Plasmid versus Protein**

In der Literatur sind unterschiedliche Methoden erprobt worden, um den zu untersuchenden Wachstumsfaktor in der Zielregion anzureichern. Zum einen wird die Substanz direkt appliziert. Dies kann durch Bolusinjektion oder über Infusionssysteme, die eine wiederholte<sup>9</sup> oder kontinuierliche<sup>15, 71</sup> Gabe der Substanz ermöglichen, geschehen. Um bei der Bolusinjektion eine längere Gewebelagerungszeit der Substanz zu erreichen, wurden von einigen Gruppen verzögert

resorbierbare Trägermaterialien wie Heparinalginat-Kugeln<sup>51</sup> oder Ethylvinylacetat-Copolymer<sup>42</sup> verwendet.

Andere Arbeitsgruppen favorisieren die Einbringung des für die zu untersuchende Substanz codierenden Genabschnitts mittels Injektion von adenoviralen Vektoren oder modifizierter Plasmid-DNA. Dabei wird die für den zu untersuchenden Wachstumsfaktor codierende Gensequenz mit Hilfe von Restriktionsenzymen in eine Träger-DNA eingebracht, die dann in das zu untersuchende Gewebe injiziert wird. Ein Teil der Zellen des Empfängers nimmt die DNA auf und das Wachstumsfaktor-Protein wird durch die Empfängerzelle synthetisiert. Dieses Verfahren ist ebenfalls tierexperimentell etabliert<sup>26</sup> und bereits bei Patienten mit KHK zur Anwendung gekommen.<sup>18,44</sup> Der Vorteil der Applikation des codierenden Genabschnitts liegt in der verlängerten lokalen Produktion der Substanz im Vergleich zu der kurzen Gewebelbhaltszeit der proangiogenetischen Proteine.<sup>35</sup> Patterson und Runge<sup>53</sup> hingegen beschreiben, dass Plasmide von den meisten Zellen schlecht aufgenommen werden und den zellulären Schutzmechanismen hilflos ausgeliefert sind. Post und Mitarbeiter<sup>35</sup> weisen darauf hin, dass die Auswirkungen der unvorhersehbar prolongierten und nicht steuerbaren Produktion von Wachstumsfaktoren auf das kranke sowie das umliegende gesunde Gewebe nicht vollends zu überblicken sind. In diesem Zusammenhang zeigten Schwarz und Mitarbeiter<sup>4</sup> bei Ratten die Entstehung von Angiomen nach Injektion des für VEGF codierenden Plasmids phVEGF<sub>165</sub>. Auch beim Menschen scheint dieses Verfahren nicht risikolos zu sein, denn nach Gabe von phVEGF<sub>165</sub> bei einer Patientin mit pAVK fanden Isner und Mitarbeiter<sup>24</sup> eine Woche nach Gentransfer Angiome vom Spider naevus - Typ an der Haut im Bereich distal der Applikationsstelle. Dennoch favorisieren Freedman und Isner<sup>61</sup> die Gentherapie als Methode der Wahl zur therapeutischen Angiogenese. Sie beschreiben, dass sowohl mittels Plasmid-DNA als auch viraler Vektoren eine transiente Transfektion für den zur Induktion von Angiogenese erforderlichen Zeitraum möglich ist.

Der dritte Weg der Beeinflussung der Angiogenese, die gezielte myokardiale Überexpression durch Mutation, bleibt zurzeit dem zell- und tierexperimentellen Bereich der Forschung vorbehalten. Fernandez und Mitarbeiter<sup>52</sup> konnten mit dem Modell der transgenen Maus eine verstärkte Arteriogenese durch FGF-1-Überexpression nachweisen. Interessanterweise waren nur die Arterien und Arteriolen von diesem Effekt betroffen, was sich auch hämodynamisch bestätigen ließ. Eine Angiogenese des kapillaren Netzwerks fand sich demgegenüber nicht. Versuche mit transgenen Mäusen, deren Myokard eine Überexpression von MCP-1 aufwies,

konnten hingegen die Entwicklung von prävasculären Strukturen in Form von nichtendothelialisierten Kanälen, die zum Teil jedoch Erythrozyten enthielten, aufzeigen.<sup>48</sup>

In dieser Arbeit wurde die direkte Injektion des Proteins bevorzugt. Dies ist, gemäß den Ausführungen von Post und Mitarbeitern,<sup>35</sup> in der schlechten Steuerbarkeit des Gentransfers und der einfacheren Applikationsmöglichkeit des gelösten Proteins begründet.

#### **6.4 Applikationsmodi für Wachstumsfaktoren und Zytokine**

In der Literatur ist eine Vielzahl von Möglichkeiten zur Applikation von Wachstumsfaktoren und anderen proangiogenetischen Zytokinen sowohl tierexperimentell als auch im Rahmen klinischer Studien angegeben. Die intramyokardiale Injektion von Wachstumsfaktoren oder Plasmiden mit für Wachstumsfaktoren codierenden Gensequenzen ist häufig genutzt. Sellke und Mitarbeiter<sup>42</sup> injizierten bei Schweinen intramyokardial FGF-1, welches mittels eines Ethylenvinylacetat-Copolymers verzögert an das umgebende Gewebe abgegeben wurde. Kobayashi und Mitarbeiter<sup>43</sup> injizierten eine Suspension von Knochenmarkszellen intramyokardial bei Ratten und konnten eine vermehrte Angiogenese im Injektionsbereich histologisch nachweisen. Ein für VEGF codierendes Plasmid wurde von Schwarz und Mitarbeitern<sup>4</sup> intramyokardial bei Ratten injiziert und führte zu einer histologisch sichtbaren Angiogenese und zur Angiombildung im Injektionsbereich. Inzwischen wurde bei klinischen Studien<sup>18, 44</sup> ein für VEGF codierendes Plasmid (phVEGF<sub>165</sub>) nach Mini-Thorakotomie intramyokardial beim Menschen injiziert. Den bislang veröffentlichten Ergebnissen zufolge verbesserte sich die mittels SPECT bestimmte Myokardperfusion unter Belastung bei vermindertem Nitratbedarf und verringertem Schweregrad der Angina pectoris - Beschwerden gemäß der Einteilung nach CCS (Canadian Cardiovascular Society, Einteilung der stabilen Angina pectoris in 5 Grade von 0 bis IV). Die transendokardiale intramyokardiale Injektion von VEGF-codierendem Plasmid mittels eines speziellen Katheters wurde von Kornowski und Mitarbeitern<sup>45</sup> am ischämischen Schweinmodell getestet und lieferte vergleichbare Ergebnisse zur ebenfalls untersuchten transepikardialen Injektion.

Als Therapie der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit erprobten Baumgartner und Mitarbeiter<sup>25</sup> die intramuskuläre Injektion eines für VEGF codierenden Plasmids und konnten

mittels digitaler Subtraktionsangiographie und Angio-Magnetresonanztomographie eine vermehrte Kollateralisierung im Unterschenkel zeigen. Die zuvor nichtheilenden Ulcera cruris der Patienten konnten zumindest teilweise zur Abheilung gebracht werden.

Bei der intravasalen Applikation unterscheidet man zwischen arterieller Injektion bei pAVK, intrakoronarer Injektion und koronarvenöser Injektion. Boekstegers und Mitarbeiter<sup>46</sup> favorisieren die retrograde Infusion von Wachstumsfaktoren in die Koronarvenen, weil so der Ort der Minderperfusion distal der verschlossenen Koronararterie gut zugänglich zur Applikation von proangiogenetischen Substanzen ist. Im Vergleich zur koronararteriellen Infusion ist zudem die Passagezeit von injizierten Substanzen etwa 10-fach verlängert, wie angiographische Studien der Kontrastmittelpassagezeiten in Koronargefäßen von Schweinen zeigten.<sup>46</sup> Andere Gruppen wählten die intrakoronare Applikation. Hendel und Mitarbeiter<sup>22</sup> injizierten rekombinantes humanes VEGF bei Patienten mit KHK in die Koronararterie. Mittels SPECT konnte bei den meisten Patienten eine Perfusionsverbesserung nachgewiesen werden. Ebenfalls intrakoronar, jedoch distal der verschlossenen Koronararterie, injizierten Unger und Mitarbeiter<sup>8</sup> bei Hunden FGF-2 für 28 Tage über einen zuvor angelegten Katheter. Mit einem ähnlichen Versuchsprotokoll applizierten Lazarous und Mitarbeiter<sup>9</sup> FGF-2 und VEGF bei Hunden für 7 Tage über einen in den linken Vorhof platzierten Katheter. Hier zeigte sich bei den Versuchstieren mit Infusion von FGF-2 eine Zunahme des kollateralen Blutflusses.

Auch bei pAVK wurden die Möglichkeiten der intraarteriellen Injektion erprobt. Isner und Mitarbeiter<sup>24</sup> brachten für VEGF codierende Plasmid-DNA (phVEGF<sub>165</sub>) in die Arteria poplitea einer Patientin mit pAVK vom Oberschenkeltyp ein. Hierzu verwendeten sie einen Ballonkatheter, an dessen Spitze die DNA an ein Hydrogel-Polymer gebunden vorlag und durch Inflation des Ballons in die Gefäßwand eingebracht wurde. Angiographisch zeigte sich eine deutliche Kollateralisierung. Ito und Mitarbeiter<sup>15</sup> brachten einen Katheter in die okkludierte Femoralarterie von Kaninchen ein und applizierten MCP-1 über einen Zeitraum von 7 Tagen mit einer osmotischen Minipumpe, die den Tieren subkutan implantiert wurde. In den post mortem-Angiographien zeigte sich eine deutliche Zunahme der arteriellen Kollateralisierung.

Laham und Mitarbeiter<sup>10</sup> applizierten FGF-2 bei Schweinen mittels einer einmaligen intraperikardialen Injektion. Sie konnten eine Angiogenese sowohl angiographisch als auch histologisch nachweisen.

Die intraperitoneale Injektion von GM-CSF über 21 Tage wurde von Li und Mitarbeitern<sup>33</sup> untersucht. Es zeigte sich eine Zunahme der Anzahl von Monozyten im Bereich des zuvor induzierten Myokardinfarkts.

Die intramyokardiale Injektion wird von einigen Autoren als vorteilhaft beschrieben. Kornowski und Mitarbeiter<sup>47</sup> stellen heraus, dass der Vorteil gegenüber der intrakoronaren Applikation im direkten Zugang zum Zielgewebe liegt und systemische Verluste praktisch ausgeschlossen sind. Post und Mitarbeiter<sup>35</sup> stellen 2 Varianten der intramyokardialen Injektion, die transendokardiale und die transepikardiale Injektion, in ihrer Effektivität gleich. Mit beiden Methoden lässt sich eine myokardiale Resorptionsquote von 25 bis 30% erreichen. Zusätzlich bieten diese Applikationsmöglichkeiten eine retardierende Komponente der Resorption, da intramyokardial injizierte Substanzen erst nach etwa drei Tagen vollständig resorbiert worden sind.

Für die vorliegende Arbeit schieden Verfahren wie die intrakoronare Infusion oder die transendokardiale Injektion mangels technischer Möglichkeiten und den anatomischen Gegebenheiten bei Ratten aus. Die direkte und offene („open-chest“) intramyokardiale Injektion war aufgrund der genannten Vorteile die Methode der Wahl zur Applikation des Zytokins MCP-1.

## **6.5 Therapeutische Angiogenese: Chancen und Risiken**

Die Nutzung der Angiogenese als supportive oder alleinige Therapie bei koronarer Herzkrankheit oder peripherer arterieller Verschlusskrankheit steckt trotz ermutigender Berichte einiger Gruppen noch in den Kinderschuhen. Das hängt vornehmlich damit zusammen, dass viele auf biochemischer und zellulärer Ebene ablaufende Grundzusammenhänge noch nicht aufgeklärt sind. Das komplexe Zusammenspiel der verschiedensten proangiogenetischen Substanzen bleibt trotz viel versprechender Forschungsansätze, wie die gezielte Untersuchung des von Monozyten sezernierten proangiogenetischen Peptids PR 39 durch Li und Mitarbeiter,<sup>50</sup> bislang ungeklärt. Dennoch zeigen sich Erfolge in klinischen Studien bei Patienten mit KHK<sup>18, 22, 44</sup> oder pAVK<sup>24, 25</sup> schon beim Einsatz eines einzelnen Wachstumsfaktors oder des dafür codierenden Genabschnitts. Doch die Folgen für die Patienten sind vor allem beim Gentransfer noch nicht vollständig absehbar, da die Transkription der eingebrachten Gensequenz nicht



steuerbar ist. Dies zeigte eine tierexperimentelle Studie zum Gentransfer von phVEGF<sub>165</sub>, einem für VEGF codierenden Genabschnitt.<sup>4</sup> Im Bereich der Applikationsstelle der DNA kam es zur Bildung von Angiomen. Bei einer Patientin mit pAVK bildeten sich eine Woche nach Gentransfer von phVEGF<sub>165</sub> Angiome vom Spider naevus - Typ distal der Applikationsstelle.<sup>24</sup> Welche Folgen des Gentransfers von proangiogenetischen Substanzen noch auf die Forscher und vor allem auf die Patienten zukommen, muss durch weiterführende Grundlagenforschung, vornehmlich im Tierexperiment, geklärt werden. Daher erscheint die Anwendung der proangiogenetischen Substanzen selbst weitaus risikoärmer, weil die Halbwertszeit dieser Proteine durch die Abbaumechanismen des Organismus begrenzt ist.

Doch Neoangiogenese ist in mancher Hinsicht ein unerwünschter Effekt: so bedingt die retinale Neoangiogenese, vermutlich durch VEGF ausgelöst,<sup>55</sup> bei Diabetikern eine erhebliche Visusverminderung bis hin zur Erblindung. Neueste Untersuchungen lassen vermuten, dass VEGF und TGF- $\beta$  an der Pathogenese der vaskulären Demenz und des Morbus Alzheimer beteiligt sind.<sup>72</sup> Weitaus gefährlicher noch ist die Rolle der Neoangiogenese als zentrale Voraussetzung für das Wachstum von malignen Tumoren.<sup>56</sup> Deshalb wird von vielen Forschern der Ablauf der Angiogenese zum Zweck der Entwicklung einer antiangiogenetischen Therapie von Tumoren untersucht.<sup>57</sup> Wie Fiedler und Mitarbeiter<sup>58</sup> darstellen, laufen bereits diverse Erfolg versprechende klinische Studien mit verschiedenen Angiogenese-Inhibitoren.

In der Forschung der therapeutischen Angiogenese sollte dieser Aspekt der unerwünschten Angiogenese berücksichtigt werden. Schließlich ist es durchaus denkbar, dass ein Teil der applizierten Wachstumsfaktoren durch Aufnahme in das Gefäßsystem in ein Organ des behandelten Patienten gelangt, in dem geschädigte Zellen mit Potential zur malignen Transformation vorliegen. So würde man ungewollt den Ausbruch oder die Größenzunahme eines malignen Prozesses beschleunigen.

Trotz der experimentellen und klinischen Fortschritte auf dem Gebiet der therapeutischen Angiogenese gibt es kritische Stimmen. Gonçalves<sup>59</sup> merkt an, dass Angiogenese zur Therapie des akuten Myokardinfarkts nicht in Frage kommt, weil die Zeit bis zum ersten Auftreten neuer vaskulärer Strukturen im infarzierten Myokard Tage beträgt, während der Untergang des kontraktiven Gewebes innerhalb von Stunden verläuft. Carmeliet weist darauf hin, dass die Verzweigung der neuen Gefäßstrukturen, ihr Anschluss an das bestehende Gefäßsystem und die Lebensdauer der neu gebildeten Gefäße weiterer Beachtung bedürfen.<sup>60</sup> Er sieht in einer

unkontrollierten Angiogenese die Gefahr der Rückentwicklung der neu gebildeten Gefäße nach Beendigung der Therapie.

## 6.6 Methodenkritik

In dieser Arbeit wurde ein Rattenmodell verwendet. Die zugrunde liegenden pathophysiologischen Vorgänge bei einem Myokardinfarkt sind mit denen beim Menschen vergleichbar. Das verwendete chronische Ischämie-Modell der Ratte ist in der kardiologischen Forschung etabliert.<sup>4, 26, 28, 43</sup> Es bietet gegenüber den Modellen mit Hunden<sup>8, 34</sup> und Schweinen<sup>10, 12, 13</sup> den Vorteil, dass die Versuche nur geringen operativen und personellen Aufwand bedürfen und keine großen Räumlichkeiten erforderlich sind. So konnten die operativen Eingriffe bei gewissenhafter Vorbereitung von einer Person durchgeführt werden.

Es ist unklar, ob der richtige Zeitpunkt der Injektion des MCP-1 gewählt wurde. Die echokardiographischen Untersuchungen konnten keine nachweisbar signifikante Kontraktilitätsverbesserung 4 Wochen nach Injektion des MCP-1 zeigen. Dieser Sachverhalt kann durch das chronische Ischämie-Modell mit abgeheiltem Infarkt erklärt werden: eine Angiogenese im Bereich der Infarkttrandzone vermag bei einem mehrere Wochen alten, bereits narbig organisierten Infarktareal keine Steigerung der Kontraktilität mehr auszulösen. Um einen funktionell bedeutsamen Effekt des MCP-1 auf Angiogenese und Arteriogenese zum Beispiel echokardiographisch nachzuvollziehen, bedarf es möglicherweise einer früheren Applikation des MCP-1. Dies wird verständlich, wenn man die Aussage von Gonçalves<sup>59</sup> zur Myokardvaskularisation mit einbezieht. Er führt an, dass die Zeit bis zum ersten Auftreten neuer vaskulärer Strukturen in infarziertem Myokard Tage beträgt, während der Untergang des kontraktilen Gewebes innerhalb von Stunden verläuft, und daher eine Angiogenese-induzierende Therapie zu spät Erfolg zeigen würde.

Die Applikation des MCP-1 erfolgte mittels einer Spritze mit einer im Winkel von 90° umgebogenen Nadel. So konnte sichergestellt werden, dass die Nadel nur oberflächlich in das Gewebe eingestochen wurde. Die korrekte intramyokardiale Injektion wurde anhand des Entstehens eines so genannten „Bubble“, einer weißen, sich vorwölbenden Blase im subepikardialen Myokard, erkannt. Eine mögliche Fehlerquelle ist hier das Zurücklaufen der

Injektionslösung aus dem Stichkanal. Deshalb wurde vor der Injektion eine Naht im Bereich der geplanten Injektionsstelle angelegt, durch deren Zuziehen ein Auslaufen der Substanz größtenteils verhindert wurde.

In dieser Arbeit wurden 3 µg MCP-1, gelöst in 0,15 ml Kochsalzlösung, den Tieren der Gruppe 2 als einmalige Dosis in den Randbereich des infarzierten Rattenmyokards injiziert. Diese Menge entspricht der Dosis, die Ito und Mitarbeiter<sup>15</sup> bei Kaninchen über den Zeitraum von 7 Tagen in die okkludierte Arteria femoralis infundierten. Sie konnten angiographisch eine Arteriogenese nachweisen. In der hier vorliegenden Studie konnte kein histologischer Nachweis einer durch MCP-1 induzierten Arteriogenese im Vergleich zur NaCl-Kontrollgruppe geführt werden. Bei einer in der Literatur mit bis zu 30 % angegebenen Resorptionsrate<sup>35</sup> des myokardialen Depots würde - eine Resorptionszeit von bis zu 3 Tagen<sup>35</sup> vorausgesetzt - eine durchschnittliche Tages-Gewebemenge von 0,3 µg vorliegen. Ito und Mitarbeiter<sup>15</sup> infundierten eine durchschnittliche Tagesmenge von 0,43 µg in einen bedeutend größeren Gewebsabschnitt. Daher ist die in dieser Arbeit gewählte relative Gewebekonzentration im Vergleich mit der Arbeit von Ito<sup>15</sup> ausreichend hoch gewählt. Möglicherweise ist jedoch die Wirkdauer des MCP-1, aufgrund der einmaligen Applikation und der nach 3 Tagen vollständigen Resorption aus dem myokardialen Gewebe, zu kurz, um eine Arteriogenese zu induzieren. Eine Dauerinfusion über 7 Tage, beispielsweise über eine osmotische Minipumpe, wie sie von Ito und Mitarbeitern<sup>15</sup> verwendet wurde, könnte in zukünftigen Versuchen zur Prüfung eines chronischen Effektes von MCP-1 am infarzierten Rattenmyokard eingesetzt werden.

Die immunhistologische CD 31-Färbung der Präparate, durch die im Sinne eines Pilotprojekts die primäre Wirkung des MCP-1 mittels Anfärbung der Monozyten dargestellt wurde, ermöglicht keine quantitative Aussage zur Monozyteninfiltration. Dies ist darin begründet, dass die Färbung nach mehreren Fehlversuchen nur bei zwei Tieren erfolgreich gelang. Dennoch lässt die Darstellung die qualitative Aussage einer erkennbar gesteigerten Monozyteninfiltration zu (siehe Abbildungen 41 und 42).

## 7. Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit konnte der Einfluss des Zytokins Monozyten-Chemoattraktives Protein-1 (MCP-1) auf Gefäßneubildung im chronischen Myokardinfarktmodell der Ratte im Sinne einer nachweisbar signifikanten Angiogenese gezeigt werden. Die einmalige Injektion von MCP-1 scheint hingegen zur Induktion einer Arteriogenese nicht geeignet zu sein. Es sind weitere Modelle notwendig, die den Einfluss einer Dauerinfusion von MCP-1 am ischämischen Myokard über einen längeren Zeitraum untersuchen. Eine mögliche therapeutische Anwendung am Patienten ist limitiert durch die Invasivität der Applikation sowie die zu kurze Gewebelbhaltszeit. Die Kombination von MCP-1 mit Depot-Trägersubstanzen wie Heparinalginat-Kugeln<sup>51</sup> oder Ethylenvinylacetat-Copolymer<sup>42</sup> könnte einen ähnlichen Effekt wie die Dauerinfusion über mehrere Tage erzielen. Um die Invasivität einer Mini-Thorakotomie<sup>18, 19</sup> zu vermeiden, ist eine transendokardiale Applikation im Rahmen einer Koronarangiographie möglich. Dieser transendokardiale Zugang<sup>35</sup> könnte eine dem transepikardialen Zugang vergleichbare Effektivität bezüglich der Deposition der Substanz darstellen.

Das Interesse an der Angiogenese als therapeutisches Prinzip bei kardiovaskulären Erkrankungen hat im Verlauf der letzten Jahre ständig zugenommen. Ebenso ist das Wissen um die pathophysiologischen Vorgänge bei Ischämie und die Vielzahl von proangiogenetisch wirksamen Substanzen angewachsen. Ohne die vollständige Entschlüsselung der zellulären und biochemischen Mechanismen der Gefäßneubildung bleiben tierexperimentelle und klinische Studien Steine eines unvollständigen Mosaiks.

## 8. Literaturverzeichnis

- 1 Kloner RA, Ellis SG, Lange R, Braunwald E: Studies of experimental coronary artery reperfusion. Effects on infarct size, myocardial function, biochemistry, ultrastructure and microvascular damage. *Circulation* 1983;68(Suppl I):I-8 – I-15
- 2 Banai S, Shweiki D, Pinson A, Chandra M, Lazarovici G, Keshet E: Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: implications for coronary angiogenesis. *Cardiovascular Research* 1994;28:1176-1179
- 3 Hashimoto E, Ogita T, Takashi N, Matsuoka R, Takao A, Kira Y: Rapid induction of vascular endothelial growth factor expression by transient ischemia in rat heart. *Am J Physiol* 1994;267:H1948-H1954
- 4 Schwarz ER, Speakman MT, Patterson M, Hale SS, Isner JM, Kedes LH, Kloner RA: Evaluation of the Effects of Intramyocardial Injection of DNA Expressing Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in a Myocardial Infarction Model in the Rat – Angiogenesis and Angioma Formation. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:1323-1330
- 5 Schaper W, Ito WD: Molecular Mechanisms of Coronary Collateral Vessel Growth. *Circ Res* 1996;79:911-919
- 6 Inoue M, Itoh H, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Komatsu R, Doi K, Ogawa Y, Tamura N, Takaya K, Igaki T, Yamashita J, Chun T, Masatsugu K, Becker AE, Nakao K: Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression in Human Coronary Atherosclerotic Lesions – Possible Pathophysiological Significance of VEGF in Progression of Atherosclerosis. *Circulation* 1998;98:2108-2116
- 7 Levy AP, Levy NS, Loscalzo J, Calderone A, Takahashi N, Yeo K, Koren G, Colucci WS, Goldberg MA: Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor in Cardiac Myocytes. *Circ Res* 1995;76:758-766
- 8 Unger EF, Banai S, Shou M, Lazarous DF, Jaklitsch MT, Scheinowitz M, Correa R, Klingbeil C, Epstein SE: Basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral flow in an canine model. *Am J Physiol* 1994;266:H1588-H1595

- 9 Lazarous DF, Shou M, Scheinowitz M, Hodge E, Thirumurti V, Kitsiou AN, Stiber JA, Lobo AD, Hunsberger S, Guetta E, Epstein SE, Unger EF: Comparative Effects of Basic Fibroblast Growth Factor on Coronary Collateral Development and the Arterial Response to Injury. *Circulation* 1996;94:1074-1082
- 10 Laham RJ, Rezaee M, Post M, Novicki D, Sellke FW, Pearlman JD, Simons M, Hung D: Intrapericardial Delivery of Fibroblast Growth Factor-2 Induces Neovascularization in a Porcine Model of Chronic Myocardial Ischemia. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;292:795-802
- 11 Laham RJ, Hung D, Simons M: Therapeutic Myocardial Angiogenesis Using Percutaneous Intrapericardial Drug Delivery. *Clin Cardiol* 1999;22(Suppl I):I-6-I-9
- 12 Kluge A, Zimmermann R, Münkkel B, et. al.: Insulin-like growth factor I is involved in inflammation linked angiogenic processes after microembolisation in porcine heart. *Cardiovasc Res* 1995;29:407-415
- 13 Kluge A, Zimmermann R, Weihrauch D, Mohri M, Sack S, Schaper J, Schaper W: Coordinate expression of the insulin-like growth factor system after microembolisation in porcine heart. *Cardiovasc Res* 1997;33:324-331
- 14 Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Sasyama S: Enhanced Expression of Hepatocyte Growth Factor/c-Met by Myocardial Ischemia and Reperfusion in an Rat Model. *Circulation* 1997;95:2552-2558
- 15 Ito WD, Arras M, Winkler B, Scholz D, Schaper J, Schaper W: Monocyte Chemotactic Protein-1 Increases Collateral and Peripheral Conductance After Femoral Artery Occlusion. *Circ Res* 1997;80:829-837
- 16 Schumacher B, Pecher P, von Specht BU, Stegmann Th: Induction of Neoangiogenesis in Ischemic Myocardium by Human Growth Factors: First Clinical Results of a New Treatment of Coronary Heart Disease. *Circulation* 1998;97:645-650

17 Laham RJ, Sellke FW, Ware JA, Pearlman JD, Edelman ER, Simons M: Results of a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Local Perivascular Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) Treatment in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Surgery. *J Am Coll Cardiol* 1999:383A-384A (abstract 874-2)

18 Losordo DW, Vale PR, Symes JF, Dunnington CH, Esakof DD, Maysky M, Ashare AB, Lathi K, Isner JM: Gene Therapy for Myocardial Angiogenesis: Initial Clinical Results With Direct Myocardial Injection of phVEGF<sub>165</sub> as Sole Therapy for Myocardial Ischemia. *Circulation* 1998;98:2800-2804

19 Vale PR, Losordo DW, Dunnington CH, Lathi K, Esakof DD, Symes JF, Isner JM: Direct Intramyocardial Injection of VEGF Results in Effective Gene Transfer for Patients With Chronic Myocardial Ischemia. *J Am Coll Cardiol* 1999: 384A (abstract 874-3)

20 Henry TD, Annex BH, Azrin MA, McKendall GR, Willerson JT, Hendel RC, Giordano FJ, Klein R, Gibson CM, Berman DS, Luce CA, McCluskey ER: Double Blind, Placebo Controlled Trial of Recombinant Human Vascular Endothelial Growth Factor – The VIVA Trial. *J Am Coll Cardiol* 1999: 384A (abstract 874-4)

21 Henry TD, Rocha-Singh K, Isner JM, Kereiakes DJ, Giordano FJ, Simons M, Losordo DW, Hendel RC, Bonow RO, Rothman JM, Borbas ER, McCluskey ER: Results of Intracoronary Recombinant Human Vascular Endothelial Growth Factor (rhVEGF) Administration Trial. *J Am Coll Cardiol* 1998: 65A (abstract 810-1)

22 Hendel RC, Henry TD, Rocha-Singh K, Isner JM, Kereiakes DJ, Giordano FJ, Simons M, Bonow RO: Effect of Intracoronary Recombinant Human Vascular Endothelial Growth Factor on Myocardial Perfusion. Evidence for a Dose-Dependent Effect. *Circulation* 2000;101:118-121

23 Laham RJ, Leimbach M, Chronos NA, Vansant JP, Pearlman JD, Pettigrew R, Guler HP, Whitehouse MJ, Hung D, Baim DS, King III SP, Simons M: Intracoronary Administration of Recombinant Fibroblast Growth Factor-2 (rFGF-2) in Patients With Severe Coronary Artery Disease: Results of Phase I. *J Am Coll Cardiol* 1999:383A (abstract 874-1)

- 24 Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, Asahara T, Rosenfield K, Razvi S, Walsh K, Symes JF: Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF<sub>165</sub> in patient with ischaemic limb. *Lancet* 1996;348:370-374
- 25 Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K, Isner JM: Constitutive Expression of phVEGF<sub>165</sub> After Intramuscular Gene Transfer Promotes Collateral Vessel Development in Patients With Critical Limb Ischemia. *Circulation* 1998;97:1114-1123
- 26 Leor J, Quiñones MJ, Patterson M, Kedes L, Kloner RA: Adenovirus-mediated Gene Transfer Into Infarcted Myocardium: Feasibility, Timing and Location of Expression. *J Moll Cell Cardiol* 1996;28:2057-2067
- 27 Quiñones MJ, Leor J, Kloner RA, Ito M, Patterson M, Witke WF, Kedes L: Avoidance of Immune Response Prolongs Expression of Genes Delivered to the Adult Rat Myocardium by Replication-Defective Adenovirus. *Circulation* 1996;94:1394-1401
- 28 Leor J, Patterson M, Quiñones MJ, Kedes LH, Kloner RA: Transplantation of Fetal Myocardial Tissue Into the Infarcted Myocardium of Rat. A Potential Method for Repair of Infarcted Myocardium? *Circulation* 1996;94[suppl II]:II-332-II-336
- 29 Kramer S: Perioperatives Narkosemanagement bei Kleinsäufern. *Tierärztl Prax* 1998;26(K):129-135
- 30 Biesterfeld S, Liebich I, Veuskens U: Anleitung zum Kurs der Allgemeinen Histopathologie. S. Biesterfeld, Institut für Pathologie der RWTH Aachen 1994/97:14
- 31 Biesterfeld S, Liebich I, Veuskens U: Anleitung zum Kurs der Allgemeinen Histopathologie. S. Biesterfeld, Institut für Pathologie der RWTH Aachen 1994/97:14-15
- 32 Schmidt RF, Thews G: Physiologie des Menschen. Axel Springer Verlag, 26. Auflage 1995:427-435
- 33 Li J, Brown LF, Laham RJ, Volk R, Simons M: Macrophage-dependent Regulation of Syndecan Gene Expression. *Circ Res* 1997;81:785-796



- 34 Kumar AG, Ballantyne CM, Michael LH, Kukielka GL, Youker KA, Lindsey ML, Hawkins HK, Birdsall HH, MacKay CR, LaRosa GJ, Rossen RD, Smith WC, Entman ML: Induction of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in the Small Veins of the Ischemic and Reperfused Canine Myocardium. *Circulation* 1997;95:693-700
- 35 Post MJ, Laham R, Sellke FW, Simons M: Therapeutic angiogenesis in cardiology using protein formulations. *Cardiovasc Res* 2001;49:522-531
- 36 Neumann FJ, Richardt G, Schneider M, Ott I, Haupt HM, Tillmanns H, Schömig A, Rauch B: Cardiac release of chemoattractants after ischaemia induced by coronary balloon angioplasty. *Br Heart J* 1993;70:27-34
- 37 Neumann FJ, Ott I, Wilhelm A, Katus H, Tillmanns H, Schömig A: Release of chemoattractants and neutrophil activation in acute myocardial infarction immediately after successful recanalization of the infarct-related vessel by angioplasty. *Eur Heart J* 1994;15:171-178
- 38 Kakio T, Matsumori A, Ono K, Ito H, Matsushima K, Sasayama S: Roles and Relationship of Macrophages and Monocyte Chemotactic and Activating Factor/Monocyte Chemoattractant Protein-1 in the Ischemic and Reperfused Rat Heart. *Lab Invest* 2000;80:1127-1136
- 39 Cleutjens JPM, Blankesteyn WM, Daemen MJAP, Smits JFM: The infarcted myocardium: Simply dead tissue, or a lively target for therapeutic interventions. *Cardiovasc Res* 1999;44:232-241
- 40 Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL: *Harrisons Innere Medizin*. McGraw-Hill International (UK) Ltd., Übersetzung der 14. Auflage 1999;2:2063
- 41 Pepro Tech: Product Information Recombinant Human MCAF (Human MCP-1). *TEBU supplying discovery tools catalogue* 1997: 19
- 42 Sellke FW, Li J, Stamler A, Lopez JJ, Thomas KA, Simons M: Angiogenesis induced by acidic fibroblast growth factor as an alternative method of revascularization for chronic myocardial ischemia. *Surgery* 1996;120:182-188

- 43 Kobayashi T, Hamano K, Li TS, Katoh T, Kobayashi S, Matsuzaki M, Esato K: Enhancement of Angiogenesis by the Implantation of Self Bone Marrow Cells in a Rat Ischemic Heart Model. *J Surg Res* 2000;89:189-195
- 44 Vale PR, Losordo DW, Milliken CE, Maysky M, Esakof DD, Symes JF, Isner JM: Left Ventricular Electromechanical Mapping to Assess Efficacy of phVEGF165 Gene Transfer for Therapeutic Angiogenesis in Chronic Myocardial Ischemia. *Circulation* 2000;102:965-974
- 45 Kornowski R, Leon MB, Fuchs S, Vodovotz Y, Flynn MA, Gordon DA, Pierre A, Kovesdi I, Keiser JA, Epstein SE: Electromagnetic Guidance for Catheter-Based Transendocardial Injection: A Platform for Intramyocardial Angiogenesis Therapy. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:1031-1039
- 46 Boekstegers P, Degenfeld G von, Giehrl W, Kupatt C, Franz W, Steinbeck G: Selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins as an alternative access of ischemic myocardium: implications for myocardial protection, myocardial gene transfer and angiogenesis. *Z Kardiol* 2000;89(Suppl IX):IX/109-IX/112
- 47 Kornowski R, Fuchs S, Leon, MB, Epstein SE: Delivery Strategies to Achieve Therapeutic Myocardial Angiogenesis. *Circulation* 2000;101:454-458
- 48 Moldovan NI, Goldschmidt-Clermont PJ, Parker-Thornburg J, Shapiro SD, Kolattukudy PE: Contribution of Monocytes/Macrophages to Compensatory Neovascularization. The Drilling of Metalloelastase-Positive Tunnels in Ischemic Myocardium. *Circ Res* 2000;87:378-384
- 49 Bendeck MP: Mining the Myocardium With Macrophage Drills. A Novel Mechanism for Revascularization. *Circ Res* 2000;87:341-343
- 50 Li J, Post M, Volk R, Gao Y, Li M, Metais C, Sato K, Tsai J, Aird W, Rosenberg RD, Hampton TG, Li J, Sellke F, Carmeliet P, Simons M: PR39, a peptide regulator of angiogenesis. *Nature Medicine* 2000;6:49-55
- 51 Sellke FW, Simons M: Angiogenesis in Cardiovascular Disease. Current Status and Therapeutic Potential. *Drugs* 1999;58:391-396

- 52 Fernandez B, Buehler A, Wolfram S, Kostin S, Espanion G, Franz WM, Niemann H, Doevendans PA, Schaper W, Zimmermann R: Transgenic Myocardial Overexpression of Fibroblast Growth Factor-1 Increases Coronary Artery Density and Branching. *Circ Res* 2000;87:207-213
- 53 Patterson C, Runge MS: Therapeutic Myocardial Angiogenesis Via Vascular Endothelial Growth Factor Gene Therapy: Moving on Down the Road. *Circulation* 2000;102:940-942
- 54 Schaper W: Angiogenesis in the adult heart. *Basic Res Cardiol* 1991;86(Suppl 2):51-56
- 55 Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL: *Harrisons Innere Medizin*. McGraw-Hill International (UK) Ltd., Übersetzung der 14. Auflage 1999;2:2441-2442
- 56 Folkman J: Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *New Engl J Med* 1971;285:1182-1186
- 57 Augustin HG: Antiangiogenic tumor therapy: will it work? *Trends Pharmacol Sci* 1998;19:216-222
- 58 Fiedler W, Gehling U, Mende T, Hossfeld DK: Neoangiogenese und Tumorwachstum. Pathophysiologie und neue therapeutische Ansätze. *Dt Ärztebl* 2001;98:A1392-1394[Heft 21]
- 59 Gonçalves LM: Angiogenic growth factors: potential new treatment for acute myocardial infarction? *Cardiovasc Res* 2000;45:294-302
- 60 Carmeliet P: Fibroblast Growth Factor-1 Stimulates Branching and Survival of Myocardial Arteries. *Circ Res* 2000;87:176-178
- 61 Freedman SB, Isner JM: Therapeutic Angiogenesis for Ischemic Cardiovascular Disease. *J Moll Cell Cardiol* 2001;33:379-393
- 62 Kersten JR, Pagel PS, Chilian WM, Warltier DC: Multifactorial basis for coronary collateralization: a complex adaptive response to ischemia. *Cardiovasc Res* 1999;43:44-57

- 63 Schaper W: Quo vadis collateral blood flow? A commentary on a highly cited paper. *Cardiovasc Res* 2000;45:220-223
- 64 Herold G et al.: *Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung. Ausgabe 2002*:205
- 65 Dimmeler S, Jadidi AS, Rössig L, Urbich C, Zeiher AM: Posttranskriptionelle Inaktivierung des Zellzyklusinhibitors p21Cip1/Waf1 durch Akt-vermittelte Phosphorylierung. *Z Kardiol* 89 (Suppl 5) 2000:V308 (abstract)
- 66 Höfer I, Buschmann I, Heil M, Katzer E, Royen Nv, Piek JJ, Schaper W: Chemoattraktion und Monozytensurvival: Zwei unterschiedliche Mechanismen steuern die Arteriogenese. *Z Kardiol* 89 (Suppl 5) 2000:V306 (abstract)
- 67 Witzenbichler B: Therapeutische Angiogenese. *Z Kardiol* 89 (Suppl 5) 2000:H436
- 68 Schaper W: Stimulation der Angiogenese. *Z Kardiol* 89 (Suppl 5) 2000:H433
- 69 Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL: *Harrisons Innere Medizin. McGraw-Hill International (UK) Ltd., Übersetzung der 14. Auflage* 1999;1:1619
- 70 Miyagawa S, Sawa Y, Taketani S, Kawaguchi N, Nakamura T, Matsuura N, Matsuda H: Myocardial regeneration therapy for heart failure: hepatocyte growth factor enhances the effect of cellular cardiomyoplasty. *Circulation*;2002;105(21):2556-2561
- 71 Scheinowitz M, Kotlyar AA, Zimand S, Leibovitz I, Varda-Bloom N, Ohad D, Goldberg I, Engelberg S, Savion N, Eldar M: Effect of basic fibroblast growth factor on left ventricular geometry in rats subjected to coronary occlusion and reperfusion. *Isr Med Assoc J* 2002;2:109-113
- 72 Tarkowski E, Issa R, Sjogren M, Wallin A, Blennow K, Tarkowski A, Kumar P: Increased intrathecal levels of the angiogenic factors VEGF and TGF-beta in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurobiol Aging* 2002;23(2):237-43

## 9. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: schematische Darstellung der drei möglichen Gefäßneubildungen (modifiziert nach Schaper W, Hauptvortrag H 433 auf dem Deutschen Kongress für Kardiologie in Mannheim 2000). 6
- Abbildung 2: Immunhistologische Darstellung der Monozyten-Adhäsion (links) und – Akkumulation (rechts) in der Gefäßwand (aus Ito WD et. al: Monocyte Chemotactic Protein-1 Increases Collateral and Peripheral Conductance After Femoral Artery Occlusion. Circ Res 1997;80:829-837; mit freundlicher Genehmigung von Prof. W. Schaper). 13
- Abbildung 3: post mortem-Angiogramme bei Kaninchen nach 7-tägiger Okklusion der Arteria femoralis, links: ohne MCP-1 (Kontrolle), rechts: nach 7-tägiger kontinuierlicher Administration von MCP-1 über eine osmotische Minipumpe (aus Ito WD et. al: Monocyte Chemotactic Protein-1 Increases Collateral and Peripheral Conductance After Femoral Artery Occlusion. Circ Res 1997;80:829-837; mit freundlicher Genehmigung von Prof. W. Schaper). 14
- Abbildung 4: Sprague-Dawley Ratte. 20
- Abbildung 5: Studiendesign. 22
- Abbildung 6: Ratte nach Intubation. Man erkennt das über die vorderen Schneidezähne gelegte Gummiband, welches den Kopf in der leichten Reklination fixiert (rot), außerdem das äußere Ende der als Tubus verwendeten Venenverweilkanüle (grau) sowie das Ansatzstück, welches den Tubus mit dem Schlauch des Beatmungsgeräts konnektiert. 26
- Abbildung 7: Thorakotomie. Links: Hautschnitt, Blick auf die Thoraxmuskulatur. Rechts: nach Eröffnung des Thorax und Perikardinzision; ein Thoraxspanner spreizt die Rippen, um ein größeres Sichtfenster für den Blick auf das Herz zu schaffen. 27
- Abbildung 8: Verschluss der Thoraxmuskulatur in Einzelknopfnähten mit resorbierbarem Faden (links) und Hautnaht in Einzelknopfnähten mit nicht resorbierbarem Faden (rechts). 29
- Abbildung 9: Noch narkotisierte aber bereits extubierte und spontan atmende Ratte nach Thoraxnaht. Im linken Bild sieht man die EKG-Elektroden, die mit Sicherheitsnadeln perkutan an den Extremitäten der Ratte befestigt sind. 30
- Abbildung 10: Rattenherz nach Myokardinfarkt und intramyokardialer Injektion. Die Naht apexwärts des linken Herzhohrs wurde in der ersten Operation zum Verschluss der linken Koronararterie angelegt, die apexnahe Naht markiert die Stelle der intramyokardialen Injektion. Deutlich zu erkennen ist die helle, fibröse Narbe nach linksventrikulärem Myokardinfarkt. 32

Abbildung 11: Schematische Darstellung des Rattenherzens mit dem Ort der intramyokardialen Injektion. LCA = linke Koronararterie.	33
Abbildung 12: Rattenherz nach Myokardinfarkt, in drei Scheiben geschnitten. Man erkennt deutlich die ausgedünnte Infarkt Narbe im Bereich der Vorderwand des linken Ventrikels.	34
Abbildung 13: Hämatoxylin-Eosin Färbung von infarziertem Rattenmyokard (400-fache Vergrößerung). Links im Bild erkennt man noch Herzmuskelfasern, der überwiegende Bildausschnitt zeigt narbig umgebautes Herzgewebe.	36
Abbildung 14: Infarziertes Rattenmyokard in Elastica-van Gieson Färbung (400-fache Vergrößerung).	38
Abbildung 15: Rattenmyokard in von Willebrand-Immunhistologie zur Darstellung der Gefäße (400-fache Vergrößerung). Die Endothelzellen stellen den Produktionsort des von Willebrand-Faktors dar. Durch immunhistologische Anfärbung des von Willebrand-Faktors werden die Endothelzellen selektiv angefärbt.	41
Abbildung 16: Formeln für Standardabweichung und arithmetischen Mittelwert. Dabei gilt: $s$ = Nummer der Datenreihe, $i$ = Datenpunktnummer in Datenreihe $s$ , $m$ = Anzahl der Datenreihen des Punktes $y$ im Diagramm, $n$ = Anzahl der Punkte je Datenreihe, $y_{is}$ = Datenwert der Datenreihe $s$ und des $i$ -ten Punktes, $n_y$ = Gesamtzahl der Datenwerte aller Datenreihen, $S.D.$ = Standardabweichung (engl. standard deviation), $M$ = Arithmetisches Mittel.	44
Abbildung 17 a): Darstellung des gemittelten Körpergewichts der Versuchstiergruppe 1 (NaCl, $n = 5$ ) im Verlauf, b): Darstellung des gemittelten Körpergewichts der Versuchstiergruppe 2 (MCP-1, $n = 5$ ) im Verlauf; Werte $\pm$ SEM; „0“: Gewicht unmittelbar vor der Koronarokklusions-Operation, „46 $\pm$ 3“: Gewicht unmittelbar vor der Injektions-Operation, bei der entweder NaCl (Gruppe 1) oder MCP-1 (Gruppe 2) intramyokardial injiziert wurde, „74 $\pm$ 4“: Gewicht unmittelbar vor der Herzentnahme.	46
Abbildung 18: Darstellung des gemittelten Herzgewichts der Versuchsgruppen 1 (NaCl, $n=5$ ) und 2 (MCP-1, $n=5$ ) in Gramm (g) $\pm$ SEM.	47
Abbildung 19 a): Darstellung des gemittelten Herzfrequenzverlaufs innerhalb der Gruppe 1 (NaCl) während der beiden operativen Eingriffe, b): Darstellung des gemittelten Herzfrequenzverlaufs innerhalb der Gruppe 2 (MCP-1) während der beiden operativen Eingriffe.	49
Abbildung 20: Darstellung des gemittelten linksventrikulären enddiastolischen Diameters der Versuchstiergruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) vor Koronarokklusion, $\pm$ SEM.	50

Abbildung 21: Darstellung des gemittelten linksventrikulären endsystolischen Diameters der Versuchstiergruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) vor Koronarokklusion, $\pm$ SEM.	51
Abbildung 22: Darstellung der gemittelten linksventrikulären Fraktionsverkürzung der Versuchsgruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) vor Koronarokklusion $\pm$ SEM. FS = fractional shortening (engl. Fraktionsverkürzung).	52
Abbildung 23: Darstellung des gemittelten linksventrikulären enddiastolischen Diameters der Versuchstiergruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) nach Koronarokklusion, $\pm$ SEM.	53
Abbildung 24: Darstellung des gemittelten linksventrikulären endsystolischen Diameters der Versuchstiergruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) nach Koronarokklusion, $\pm$ SEM.	54
Abbildung 25: Darstellung der gemittelten linksventrikulären Fraktionsverkürzung der Versuchsgruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) nach Koronarokklusion $\pm$ SEM. FS = fractional shortening (engl. Fraktionsverkürzung).	55
Abbildung 26: Darstellung des gemittelten linksventrikulären enddiastolischen Diameters der Versuchstiergruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) nach Injektionsoperation, $\pm$ SEM.	56
Abbildung 27: Darstellung des gemittelten linksventrikulären endsystolischen Diameters der Versuchstiergruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) nach Injektionsoperation, $\pm$ SEM.	57
Abbildung 28: Darstellung der gemittelten linksventrikulären Fraktionsverkürzung der Versuchsgruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) nach Injektionsoperation $\pm$ SEM. FS = fractional shortening (engl. Fraktionsverkürzung).	58
Abbildung 29: Darstellung der gemittelten Anzahl der von Willebrand-Faktor-positiven Zellen im Injektionsbereich von NaCl (Gruppe 1) bzw. MCP-1 (Gruppe 2) $\pm$ SEM.	59
Abbildung 30: Von Willebrand-Faktor-positiv Zellen im Injektionsbereich, Gruppe 1 (NaCl), 400-fache Vergrößerung.	59
Abbildung 31: Von Willebrand-Faktor-positiv Zellen im Injektionsbereich, Gruppe 2 (MCP-1), 400-fache Vergrößerung.	60
Abbildung 32: Darstellung der gemittelten Anzahl der von Willebrand-Faktor-positiven Zellen im Kontrollbereich $\pm$ SEM.	61
Abbildung 33: Von Willebrand-Faktor-positiv Zellen im Kontrollbereich, Gruppe 1 (NaCl), 400-fache Vergrößerung.	61
Abbildung 34: Von Willebrand-Faktor-positiv Zellen im Kontrollbereich, Gruppe 2 (MCP-1), 400-fache Vergrößerung.	62
Abbildung 35: Darstellung der gemittelten Anzahl der Gefäße mit Membrana elastica interna nach Elastica van Gieson-Färbung im Injektionsbereich von NaCl (Gruppe 1) bzw. MCP-1 (Gruppe 2) $\pm$ SEM.	63

Abbildung 36: Gefäße mit Membrana elastica interna nach Elastica van Gieson-Färbung im Injektionsbereich, Gruppe 1 (NaCl), 400-fache Vergrößerung.	63
Abbildung 37: Gefäße mit Membrana elastica interna nach Elastica van Gieson-Färbung im Injektionsbereich, Gruppe 2 (MCP-1), 400-fache Vergrößerung.	64
Abbildung 38: Darstellung der gemittelten Anzahl der Gefäße mit Membrana elastica interna im Kontrollbereich $\pm$ SEM.	65
Abbildung 39: Gefäße mit Membrana elastica interna nach Elastica van Gieson-Färbung im Kontrollbereich, Gruppe 1 (NaCl), 400-fache Vergrößerung.	65
Abbildung 40: Gefäße mit Membrana elastica interna nach Elastica van Gieson-Färbung im Kontrollbereich, Gruppe 2 (MCP-1), 400-fache Vergrößerung.	66
Abbildung 41: Darstellung der Monozyten in infarziertem Rattenmyokard mittels CD 31-Immunhistologie (400-fache Vergrößerung) 24 Stunden nach intramyokardialer Injektion von NaCl.	67
Abbildung 42: Darstellung der Monozyten in infarziertem Rattenmyokard mittels CD 31-Immunhistologie (400-fache Vergrößerung) 24 Stunden nach intramyokardialer Injektion von MCP-1. Man erkennt eine deutlich höhere Zahl CD 31-positiver Zellen (gelbbraun markierte Zellen) als in Abbildung 41.	68



## 10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1, modifiziert nach Augustin HG: Antiangiogenic tumor therapy: will it work? Trends Pharmacol Sci 1998; 19: 216-222	8
Tabelle 2: Gemittelttes Körpergewicht der Tiere der Versuchsgruppen 1 und 2 im Versuchszeitraum, Angabe in Gramm (g).	47
Tabelle 3: Gemittelttes Herzgewicht der Versuchsgruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) nach Versuchsende, Angabe in Gramm (g).	48
Tabelle 4: Gemittelte Herzfrequenzen der Versuchstiergruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) im Verlauf der operativen Eingriffe. Zwischen den beiden Gruppen besteht zu keinem Messzeitpunkt ein nachweisbar signifikanter Unterschied der Herzfrequenz (alle $p > 0,05$ ).	49
Tabelle 5: Vergleich der gemittelten linksventrikulären enddiastolischen Diameter der Versuchsgruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) vor Koronarokklusion. Es besteht kein nachweisbar signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.	50
Tabelle 6: Vergleich der gemittelten linksventrikulären endsystolischen Diameter der Versuchsgruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) vor Koronarokklusion. Es besteht kein nachweisbar signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.	51
Tabelle 7: Vergleich der gemittelten linksventrikulären Fraktionsverkürzung der Versuchsgruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) vor Koronarokklusion. Es besteht kein nachweisbar signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.	52
Tabelle 8: Vergleich der gemittelten linksventrikulären enddiastolischen Diameter der Versuchsgruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) nach Koronarokklusion. Es besteht kein nachweisbar signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.	53
Tabelle 9: Vergleich der gemittelten linksventrikulären endsystolischen Diameter der Versuchsgruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) nach Koronarokklusion. Es besteht kein nachweisbar signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.	54
Tabelle 10: Vergleich der gemittelten linksventrikulären Fraktionsverkürzung der Versuchsgruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) nach Koronarokklusion. Es besteht kein nachweisbar signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.	55
Tabelle 11: Vergleich der gemittelten linksventrikulären enddiastolischen Diameter der Versuchsgruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) nach Injektionsoperation. Es besteht kein nachweisbar signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.	56

Tabelle 12: Vergleich der gemittelten linksventrikulären endsystolischen Diameter der Versuchsgruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) nach Injektionsoperation. Es besteht kein nachweisbar signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.	57
Tabelle 13: Vergleich der gemittelten linksventrikulären Fraktionsverkürzung der Versuchsgruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1) nach Injektionsoperation. Es besteht kein nachweisbar signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.	58
Tabelle 14: Vergleich der gemittelten Anzahl der von Willebrand-Faktor-positiven Zellen im Injektionsbereich von NaCl (Gruppe 1) bzw. MCP-1 (Gruppe 2). Für die Gruppe 2 zeigt sich eine nachweisbar signifikant höhere Zahl vWF-positiver Zellen.	60
Tabelle 15: Vergleich der gemittelten Anzahl der von Willebrand-Faktor-positiven Zellen im Kontrollbereich des Myokards der Gruppen 1 (NaCl) und 2 (MCP-1). Es besteht kein nachweisbar signifikanter Unterschied in der Zahl der vWF-positiven Zellen zwischen den beiden Gruppen.	62
Tabelle 16: Vergleich der gemittelten Anzahl der Gefäße mit Membrana elastica interna nach Elastica van Gieson-Färbung im Injektionsbereich von NaCl (Gruppe 1) bzw. MCP-1 (Gruppe 2). Es besteht kein nachweisbar signifikanter Unterschied in der Zahl der Blutgefäße mit Membrana elastica interna zwischen den beiden Gruppen.	64
Tabelle 17: Vergleich der gemittelten Anzahl der Gefäße mit Membrana elastica interna nach Elastica van Gieson-Färbung im Kontrollbereich von NaCl (Gruppe 1) bzw. MCP-1 (Gruppe 2). Es besteht kein nachweisbar signifikanter Unterschied in der Zahl der Blutgefäße mit Membrana elastica zwischen den beiden Gruppen.	66

## 11. Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. med. E.R. Schwarz (z. Zt. University of Texas Medical Branch) für die Möglichkeit, diese Arbeit zu erstellen sowie für seine Begutachtung. Ebenso danke ich Herrn Professor Dr. med. C. Weber (Molekulare Kardiologie, Universitätsklinikum der RWTH Aachen) für seine Begutachtung dieser Arbeit, der Abteilung für Versuchstierkunde der RWTH Aachen unter der Leitung von Professor Dr. med. vet. W. Küpper für ihre Unterstützung sowie Herrn Dr. med. C.E. Skobel (Medizinische Klinik I der RWTH Aachen) für seine wertvollen Anregungen. Weiterhin möchte ich mich bei Frau Vera Mevissen und Frau Roswitha Langenberg (Medizinische Klinik I der RWTH Aachen) sowie bei Herrn Priv.-Doz. B. Klosterhalfen (Institut für Pathologie am Universitätsklinikum der RWTH Aachen) und Herrn MTA L. Muys für ihre Unterstützung bedanken. Herrn Professor Dr. med. C. Mittermayer (Institut für Pathologie, RWTH Aachen) möchte ich dafür danken, dass er mir sein Videomikroskop zur Verfügung gestellt hat.

Ein besonderer Dank gilt meinem Freund und Studienkollegen Herrn Dr. med. Philipp H. Kersting für die konstruktive und muntere Zusammenarbeit.

Den größten Dank richte ich an meine Eltern, ohne deren Unterstützung mir ein Studium der Medizin nicht möglich gewesen wäre.



## 12. Lebenslauf

Dennis Alexander Meven

Geburtsdatum: 27. Mai 1975  
Geburtsort: Düsseldorf  
Familienstand: verheiratet  
Nationalität: deutsch  
Konfession: römisch-katholisch  
E-Mail: d.meven@gmx.de

### Schulbildung

08/1981 – 07/1985 Grundsule Burgbongert, Mönchengladbach  
08/1985 – 06/1994 Gymnasium Odenkirchen, Mönchengladbach  
31.05.1994 Abitur am Gymnasium Odenkirchen, Mönchengladbach

### Studium

10/1995 – 05/2002 Studium der Humanmedizin an der RWTH Aachen  
10/1995 – 09/1997 Vorklinischer Studienabschnitt an der RWTH Aachen  
10/1997 – 04/2001 Klinischer Studienabschnitt an der RWTH Aachen  
01.09.1997 Ärztliche Vorprüfung  
27.08.1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
02.04.2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
13.05.2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Beruf

06/2002 – 12/2003 Beschäftigung als Arzt im Praktikum in der Medizinischen  
Klinik des Hermann-Josef-Krankenhauses Erkelenz  
Seit 12/2003 Beschäftigung als Assistenzarzt in der Medizinischen  
Klinik des Hermann-Josef-Krankenhauses Erkelenz

## **Publikationen**

Schwarz ER, Kersting PH, Reffelmann T, Meven DA, Al-Dashti R, Skobel EC, Klosterhalfen B, Hanrath P: Cardioprotection by Carvedilol: antiapoptosis is independent of beta-adrenoceptor blockage in the rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2003;8(3):207-215

Reffelmann T, Kersting PH, Meven DA, Skobel CE, Schwarz ER: Infarktgrößenreduktion durch Carvedilol und den Carvedilol-Metaboliten BM 91.0228 bei Rattenherzen. *Z Kardiol* 89, Suppl 5 (2000):22 (abstract 330)