

Aus dem
Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie
der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. J. Schrader

**Untersuchungen zur Rolle des von CD73 extrazellulär gebildeten
Adenosins in der Arteriogenese mittels Methoden der
Magnetresonanz**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Yang Chul Böring

2008

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Jürgen Schrader

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Ulrich Mödder

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	5
1.1 Neubildung von Gefäßen	5
1.2 Formen des Gefäßwachstum	5
1.2.1 Vaskulogenese	6
1.2.2 Angiogenese.....	6
1.2.3 Arteriogenese.....	7
1.3 Mechanismus und Regulation der Arteriogenese	8
1.4 Rolle von Adenosin im Prozeß der Gefäßneubildung	9
1.5 Magnet-Resonanz-Angiographie	11
1.5.1 NMR (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>) Historischer Hintergrund	11
1.5.2 Physikalische Grundlagen.....	12
1.5.3 Methoden der Magnetresonanz-Angiographie	13
1.5.4 <i>Time-of-Flight</i> -Angiographie	14
2 Materialien und Methoden	17
2.1 Versuchstiere	17
2.2 Induktion der Hinterlaufischämie	17
2.3 Zeitlicher Versuchsablauf	18
2.4 Gefäßausgusspräparat	19
2.5 Histologische Auswertung	19
2.5.1 Bewertung der Arteriogenese im Bereich der Adduktorenmuskeln.....	20
2.5.2 Bewertung der Angiogenese im <i>M. gastrocnemius</i>	20
2.6 Magnetresonanzuntersuchungen	21
2.6.1 Anästhesie und Vorbereitung	22
2.6.2 Bildakquisition	23
2.6.3 ³¹P-NMR-Spektroskopie des Hinterlaufs	23
2.6.4 Postprozessierung mit ECCET-AngioTux	24
2.7 Statistik	24
3 Ergebnisse	25
3.1 Gefäßausgusspräparat	25
3.2 Optimierung des Protokolls für hochauflösende 3D-MR-Angiographie	26
3.2.1 Einfluss der Körperkerntemperatur auf die Untersuchung	26
3.2.2 Messprotokoll der 3D-MR-Angiographie	27
3.2.3 Datenkonvertierung und AngioTux.....	29

3.2.4	Segmentierung des Volumendatensatzes	31
3.2.5	Die Anatomie der Kollateralgefäße im 3D-Gefäßangiogramm.....	31
3.3	Vergleich der Arteriogenese in den beiden Versuchsgruppen	34
3.3.1	Methoden der Quantifizierung.....	34
3.3.2	Ergebnisse der angiographischen Daten im Wildtyp und CD73 ^{-/-}	35
3.4	Funktionelle und morphologische postoperative Entwicklung.....	38
3.5	Untersuchungen zu Ödementwicklung und Energiestoffwechsels des operierten Hinterlaufs.....	39
3.5.1	Ödementwicklung	39
3.5.2	Energiestoffwechsel	41
3.6	Zusammenfassung der <i>in-vivo</i>-Messungen	43
3.7	Histologische Ergebnisse	44
4	Diskussion.....	47
4.1	Analyse der Kollateralenbildung nach Hinterlaufischämie	48
4.2	Mechanismus der Arteriogenese im CD73 ^{-/-}	50
5	Zusammenfassung.....	53
6	Literaturverzeichnis	54
7	Danksagung	60
8	Lebenslauf	61

1 Einleitung

1.1 Neubildung von Gefäßen

Kardiovaskuläre Erkrankungen führen die Krankenstatistiken der westlichen Industrieländer an und finden in ihren Ausprägungen als koronare Herzkrankheit und Schlaganfall häufig ein letales Ende oder führen in Form einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit zum Verlust einer Gliedmasse. Insgesamt wird die Zahl der Todesfälle in Europa auf dem Boden einer kardiovaskulären Erkrankung auf über 1,5 Mio. pro Jahr (42% aller Todesfälle) geschätzt ¹.

Als Therapieoptionen haben sich die Methoden der Revaskularisierung mittels Bypasschirurgie oder perkutanen Angioplastie mit Stentversorgung etabliert. Daneben wurde aber auch versucht neue Therapieverfahren zu entwickeln. Eine aussichtsreiche Möglichkeit könnte sein, die Neubildung von Gefäßen mit Zytokinen und Wachstumsfaktoren positiv zu beeinflussen und das ischämische Gebiet mit natürlichen Bypassgefäßen neu zu vaskularisieren. In der Tumorthherapie wird die entgegengesetzte Möglichkeit, die Inhibition des Gefäßwachstums, schon klinisch erfolgreich genutzt um die Tumormasse zu verringern ². Zahlreiche gegenwärtige Forschungsansätze an Tiermodellen untersuchen die zugrunde liegenden Mechanismen der Gefäßneubildung, um durch die gezielte Modulation dieser die bestehenden Therapiemöglichkeiten zu erweitern.

1.2 Formen des Gefäßwachstums

Bei der Beschreibung des Gefäßwachstums kommt es in der Literatur immer wieder zu Überschneidungen der verwendeten Begriffe auf Grund nicht ausreichend präziser Begriffsdefinitionen. Das Gefäßwachstum muß hierbei in drei eigenständige Prozesse unterschieden werden: Der Begriff *Vaskulogenese* beschreibt dabei eine echte Neubildung von Gefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen während der Embryogenese und sollte daher nur in diesem Zusammenhang verwendet werden. *Angiogenese* ist das Wachstum von Kapillaren, welches als adaptiver physiologischer oder aber auch pathologischer Prozess fortwährend im Organismus abläuft - hierfür wird Ischämie als einer der auslösenden Trigger angesehen. Die dritte Möglichkeit ist das Wachstum von Kollateralgefäßen bei veränderten Strömungsverhältnissen aus präexistenten Gefäßverbindungen. Dieser Mechanismus, insbesondere durch erhöhten Scherstress an den Endothelzellen hervorgerufen wird *Arteriogenese* genannt.

1.2.1 Vaskulogenese

In der Frühphase der embryonalen Entwicklung bilden sich im viszeralem Mesoderm Blutinseln aus, welche die pluripotenten Vorläuferzellen des Blutkreislaufs (Hämangioblasten) enthalten. Unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren der *fibroblast growth factor*-(FGF) Familie und *vascular endothelial growth factor* (VEGF) differenzieren die inneren Zellen der Blutinseln zu hämatopoetischen Stammzellen, welche in der Folge VEGF-unempfindlich werden. Die äußeren entwickeln sich über Angioblasten zu endothelialen Vorläuferzellen, welche auswandern und sich zu einem primitiven Netzwerk verbinden³. Unter dem stetigen Pulsieren des Herzschlauchs wandelt sich das Kapillarnetz schliesslich in Strombahnen um und es entsteht ein komplexes Netzwerk kommunizierender Gefäße mit zirkulierenden Blutzellen: Der Beginn des fetalen Blutkreislaufs. Neuere Studien konnten zeigen, dass auch im adulten Organismus noch endotheliale Vorläuferzellen (CD34+) im peripheren Blut zirkulieren⁴, so dass der Prozess der Vaskulogenese nicht unbedingt alleine auf die Phase der Embryogenese zu beschränken ist und gerade im Zusammenhang mit der Stammzell-Therapie Gegenstand aktueller Forschung ist.

1.2.2 Angiogenese

Erste Studien zur Gefäßbildung wurden schon in den 30iger Jahren mit Hilfe von transparenten Kammern an Kaninchenohren durchgeführt⁵ und zeigten dass das Wachstum von Tumoren vor allem von der Migration von Gefäßzellen abhängt. Aber erst die 1971 veröffentlichten wegweisenden Überlegungen von Judah Folkman⁶ eröffneten das weite Feld der Angiogeneseforschung mit der Hypothese durch den Einsatz von Angiogeneseinhibitoren das Wachstum von Tumoren einzuschränken bzw. zu unterbrechen. Das Kapillarwachstum ist demnach von existierenden Kapillarnetzen abhängig und findet in Form von *pruning* oder *sprouting* statt⁷. Auswandernde Endothelzellen bilden Zellschichten und formen, ausgehend vom Kapillarnetz, durch Intusseption oder Austülpung ca. 6-8 µm grosse Röhren.

Hauptauslöser für die Angiogenese ist die lokale Ischämie. Hierdurch wird der Transkriptionsfaktor *hypoxia inducible factor-1* (HIF-1) hochreguliert und neben zahlreicher anderer Zellmediatoren wird die Expression von *vascular endothelial growth factor* (VEGF) gesteigert, welches die Gefäßpermeabilität erhöht und über VEGF-Rezeptoren Flt-1 auf Monozyten und Flk-1 auf Endothelzellen eine vermehrte endotheliale Proliferation vermittelt^{8,9}. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass an diesem Prozeß des Kapillarwachstums nur Endothelzellen beteiligt sind und die Kapillaren von keiner glatten Muskelschicht, welche einen Gefäßtonus aufrecht erhalten könnte, umgeben sind. Somit scheidet diese Form des Wachstums für Kapazitätsgefäße aus.

1.2.3 Arteriogenese

Die Existenz einer kollateralen Blutversorgung ist seit langem bekannt. Erste Experimente hierzu wurden von Luigi Porta bereits 1845 durchgeführt. In seinem Werk "Delle alterazioni patologiche delle arterie per la ligatura e la torsione" beschreibt er neu gebildete korkenzieherartig gewundene Gefäße welche die Unterbrechung (Okklusion) in einer Femoralarterie des Schweins überbrückten. Der zu Grunde liegende Prozeß ist nicht die *de-novo*-Synthese von Gefäßen sondern die kontinuierliche Größenzunahme eines präexistierenden Kollateralgefäßes, wie wir heute wissen. In den 50er beschrieb Longland die Existenz solcher Gefäße sowohl in einer kranken als auch gesunden Patientenpopulation¹⁰. Demnach wird das Kollateralgefäß in eine *stem*, *mid-zone* und *re-entry* Zone eingeteilt. Aufgrund der sich ändernden Druckgradienten im prä- und poststenotischen Gefäß ändern sich entsprechend die Strömungsverhältnisse im unterbrochenem Stammgefäß und den kollateral-arteriellen Anastomosen und es kommt zu einer Flußumkehr im distalen *re-entry*-Teil wie in Abbildung 1.1 dargestellt.

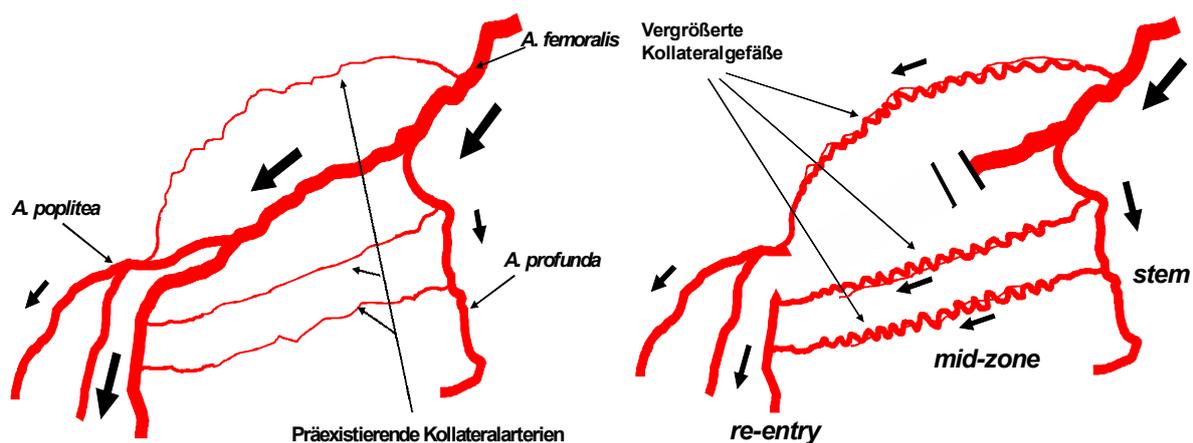


Abb. 1.1: Schematische Darstellung einer Femoralarterie. Die präexistierenden arterio-arteriellen Anastomosen werden nach Okklusion des Stammgefäßes durch einen Remodellingprozeß (Arteriogenese) zu führenden Konduktanzgefäßen, welche die Engstelle überbrücken

Es fließt ein größeres Blutvolumen nun über die kleineren präexistierenden Kollateralen. Dieses erhöht die wirkenden Scherkräfte auf die Endothelzellen der Kollateralgefäße und führt zu einer "Aktivierung" der Endothelzellen, welche in Folge Zytokine freisetzen und Zelladhäsionsmoleküle ausbilden. Hierdurch werden vornehmlich Monozyten angelockt. Diese adhären und verlassen durch Transmigration die Gefäßstrombahn, differenzieren und sezernieren weitere Zytokine sowie Wachstumsfaktoren und setzen hierüber eine lokale Entzündungsreaktion in Gang, bei der im Ergebnis die Proliferation der glatten Muskel- und Endothelzellen zunimmt. Die glatten Muskelzellen wandeln sich anschliessend von der "inaktiven" kontraktilen Form in die "aktive" sezernierende Form um. Zusätzlich wird durch Matrix-Metalloproteinasen der perivaskuläre Raum angedaut, um dem wachsenden Gefäß

Platz zu schaffen. Die herausragende Rolle von Monozyten in diesem Prozeß sowie die Verwendung des Begriffs der Arteriogenese in Abgrenzung zur Angiogenese wurde vor allem durch die Arbeiten der Gruppe um Schaper herausgearbeitet ^{11,12}.

1.3 Mechanismus und Regulation der Arteriogenese

Die auf die Endothelzellen wirkende erhöhte Schubspannung führt zur Öffnung von Chloridkanälen und aufgrund des osmotischen Gradienten kommt es nachfolgend zum Wassereinstrom, der zu einem elektronenmikroskopisch sichtbaren Anschwellen der Zellen führt ¹³. Es erfolgt eine Signalübermittlung (Mechanotransduktion) zum Zellkern in welchem über Aktivierung von *Shear-Stress-Response-Elements* (SSRS) in den Promoterregionen die Genexpression verschiedener Gene wie *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), *granulocyte macrophage-colony stimulation* (GM-CSF), *nitric oxide synthase* (NOS) und *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) gesteigert wird. Die vermehrt exprimierten Adhäsionsmoleküle *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) und ICAM ermöglichen das „Anheften“ der durch das MCP-1 (nun CCL2 genannt) und seinem leukozytären Rezeptor *CC-chemokine receptor-2* (CCR2) angelockten zirkulierenden Monozyten, welche anschliessend durch die Gefäßwand transmigrieren. Der Wachstumsfaktor GM-CSF schafft für die nun in der Adventitia des Gefäßes akkumulierenden Monozyten ein proliferatives Umfeld. Nach Umwandlung zu Makrophagen produzieren diese Zellen weitere Wachstumsfaktoren wie *fibroblast growth factor-2* (FGF-2) und *vascular endothelial growthfactor* (VEGF) und Zytokine wie *tumor necrosis factor- α* (TNF- α).

Dieses inflammatorische Milieu lockt weitere Entzündungszellen an. In der folgenden Proliferationsphase erreicht die Mitoseaktivität des Endothels, der glatten Muskelzellen und Fibroblasten ihr Maximum nach ca. 3 Tagen und es schließt sich die Phase des Remodelings an. Es kommt zur Zerstörung der *Lamina elastica interna* als Hauptbarriere für die Zellmigration. Gefäßmuskelzellen verlassen die Media und wandern in den subendothelialen Raum ein und bilden eine neue *Lamina elastica interna* (Neointima) aus. Über verminderte Aktivität von *tissue inhibitor of matrix-matalloproteinases* (TIMPs) und vermehrte Expression wird die Wirkung der Metalloproteinasen gesteigert, welches Raum für eine Größenzunahme des Gefäßdurchmessers schafft. Dabei ist jedoch vor allem ein übermäßiges Längenwachstum für die neu entstandenen Kollateralgefäße charakteristisch, welches zur typischen „Korkenzieher-Morphologie“ führt.

Die Arteriogenese dient zusammenfassend also dazu, durch Konduktanzzunahme der präexistierenden Kollateralgefäße den Bluttransport zu erhöhen und somit die Stenose bzw. Okklusion eines Leitungsgefäßes zu kompensieren, wohingegen die Angiogenese den gesteigerten lokalen Sauerstoffbedarf im Gewebe zu decken versucht.

1.4 Rolle von Adenosin im Prozeß der Gefäßneubildung

Adenosin ist ein ubiquitär vorkommendes Signalmolekül, welches durch die schrittweise Dephosphorylierung aus ATP entsteht. Die kardiovaskulären Wirkungen von Adenosin wurden schon 1929 von Drury und Szent-Györgi¹⁴ beschrieben. Aufgrund der Tatsache, dass Adenosin ein wirksamer Vasodilatator ist und durch den Abbau des energiereichen ATP anfällt, wurde ihm die Rolle eines „*retaliatory metabolite*“ zugeschrieben^{15,16}. Der Regelkreis stellt eine einfache Möglichkeit dar im hypoxischen Gewebe nach Degradation der Energieträger eine Balance zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot einzustellen. Adenosin erhöht somit das Sauerstoffangebot im Gewebe durch Vasodilatation und steigert den Blutfluss, gleichzeitig wird durch die antiadrenergen Effekte von Adenosin der Sauerstoffbedarf gesenkt. Es besteht somit eine negative Rückkopplung, wenn der Energieverbrauch die Rate der Energieproduktion überschreitet und der vermehrte Abbau von ATP zu einer erhöhten Konzentration von Adenosin führt.

Um jedoch eine langfristige Oxygenierung chronisch hypoxischen Gewebes aufrecht zu erhalten, bedarf es des Wachstums neuer Blutgefäße und es konnte in mehreren Arbeiten gezeigt werden, dass Adenosin nicht nur die Endothelproliferation und Migration unter Hypoxie steigert¹⁷⁻¹⁹, sondern auch das Wachstum neuer Gefäße *in-vivo* stimulieren kann²⁰⁻²².

Die Wirkung des Nukleosids Adenosin wird über spezifische membrangebundene G-Protein-gekoppelte Purin-Rezeptoren (P1-Rezeptoren) vermittelt, von denen bisher 4 Subtypen (A1, A2A, A2B und A3) klassifiziert sind²³, und die ihren Effekt über Konzentrationsänderungen von cAMP entfalten (A2A und A2B interagieren mit dem G₀-Protein, A1 und A3 vermehrt über das G_{i/o}-Protein). Die Rezeptorverteilung und somit der lokale Effekt von Adenosin ist zwischen den Geweben sehr variabel. Generell kann man aber sagen, dass Adenosin als inhibitorisches Signalmolekül wirkt. Es schützt das Herz und cerebrovaskuläre System vor ischämischen Schaden²⁴. Ebenso limitiert es den vaskulären Ischämie- und Reperfusionsschaden durch Reduktion reaktiver Sauerstoffradikale und Hemmung der Plättchenaggregation²⁵. Zudem spielt es eine wichtige Rolle im Rahmen von anti-inflammatorischen Mechanismen²⁶ sowie in der Kontrolle von Zell-Zelladhäsion und der leukozytären Diapedese und gilt als potenter Suppressor des Immunsystems²⁷.

Neben der P1-Rezeptorfamilie existieren P2-Rezeptoren, an welche ATP/ADP als Signalmolekül bindet²⁸ und über ionotrope P2X-, oder G-Protein-gekoppelte P2Y-Rezeptoren die Signaltransduktion initiiert²⁹. ATP und ADP sind an der Regulation der Hämostase und Thrombose maßgeblich beteiligt. Sie steuern die Aktivierung und Aggregation von Plättchen. Die gezielte Blockade von P2Y₁₂-Rezeptoren wird bereits in Form von Clopidogrel zur

Hemmung der Plättchenaggregation klinisch genutzt (CAPRIE³⁰, CURE³¹). Desweiteren modulieren P2-Rezeptoren die Freisetzung verschiedener Cytokine (TNF- α , Interleukin 1-Beta) aus Monozyten und Makrophagen und steuern darüber die Adhäsion von Leukozyten am Endothel³²⁻³⁵. Insgesamt scheinen sich die ATP/ADP-vermittelten Effekte, denen von Adenosin über seine P1-Rezeptoren ausgelösten Wirkungen entgegengesetzt zu verhalten. Das Ausmass und die Dauer der vermittelten Signaltransduktion ist neben der jeweiligen Rezeptordichte auch von der lokalen Konzentration der konkurrierenden Metaboliten abhängig.

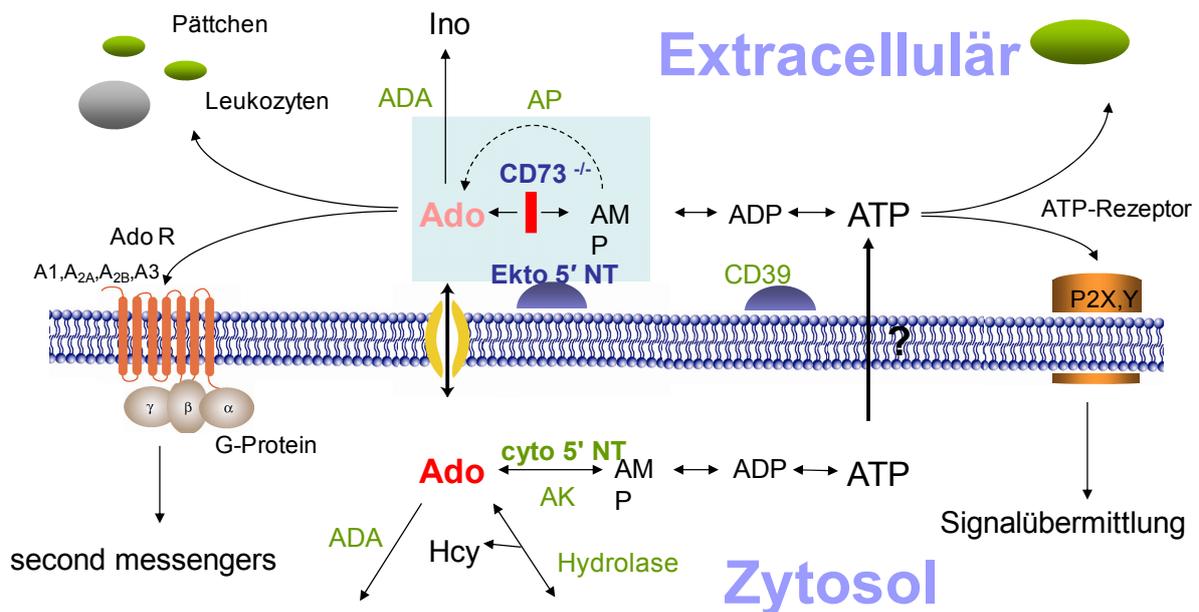


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Adenosinmetabolismus und Stellung der CD73 in der extrazellulären Nucleotidkaskade Knockouts: Zytosolische und extrazelluläre Nucleotidasen bauen ATP zu Adenosin ab, entsprechende Kinasen können Adenosin rephosphorylieren. Die verschiedenen Purinrezeptoren sind nicht nur in unmittelbarer Umgebung, sondern befinden sich auch auf den zirkulierenden Zellen wie z.B. Thrombozyten oder Leukozyten.

Diese wird durch die Aktivität verschiedener Nucleotidasen bestimmt, welche durch den Abbau von Nucleotiden zu Nucleosiden eine verminderte P2-Rezeptoraktivität und eine vermehrte P1-Aktivität zu Folge hat. Abbildung 1.2 stellt den Nucleotidmetabolismus schematisch dar. ATP wird intrazellulär von zytosolischen Nucleotidasen zu Adenosin abgebaut. Der Abbau von extrazellulären ATP erfolgt kaskadenförmig über ADP und AMP zu Adenosin. Der letzte Schritt wird hierbei von der Ekto-5'-Nucleotidase (CD73) katalysiert.

Um die Rolle des extrazellulär gebildeten Adenosins zu untersuchen, wurde in unserem Institut eine CD73-defiziente Mausmutante generiert. In den bisher durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass diese eine vermehrte Leukozytenadhäsion, eine verkürzte Blutungszeit und eine beschleunigte Thrombenbildung nach Gefäßverletzung

aufweisen ³⁶. Zudem konnte in zusätzlichen Experimenten neben einer vermehrten Intimabildung nach Gefäßverletzung ³⁷ auch eine verstärkte Atherosklerosebildung bei Fehlen der CD73 nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen sich sehr gut mit einer verminderten Signalwirkung über P1-Rezeptoren erklären.

Wie oben beschrieben spielt Adenosin wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Angiogenese. Inwiefern extrazellulär gebildetes Adenosin jedoch den Prozeß der Arteriogenese beeinflusst ist weitgehend unbekannt und sollte daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit unter Verwendung eines CD73-defizienten Mausstamms untersucht werden. Hierzu wurde zunächst ein murines Hinterlaufischämiemodell entwickelt. Im weiteren wurde ein Protokoll etabliert, welches die direkte Darstellung und Quantifizierung der neu gebildeten Kollateralgefäße mittels Magnet-Resonanz-Angiographie (MRA) ermöglicht. Anschließend wurde mit Hilfe des entwickelten Protokolls der Verlauf der Kollateralentwicklung in der Mutante und der Wildtypkontrolle verglichen und die erhaltenen Ergebnisse auf histologischer Ebene abgesichert.

1.5 Magnetresonanz-Angiographie

1.5.1 NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) - Historischer Hintergrund

Ähnlich wie die Einführung der Röntgenstrahlen zur Durchleuchtung des menschlichen Körpers zum Ende des 19. Jahrhunderts durch Wilhelm Conrad Röntgen, hat die Magnetresonanztomographie (MRT) die Medizin revolutioniert. Nach der initialen Beschreibung des Phänomens der magnetischen Kernresonanz (NMR = *nuclear magnetic resonance*) von Otto Stern und Isidor Rabi ³⁸, konnten im Jahr 1946 in den Arbeitsgruppen um Felix Bloch und Edward Purcell unabhängig voneinander erste NMR-Experimente in flüssiger und fester Phase durchgeführt werden ^{39,40}. Diese zeigten, dass sich die magnetischen Kerneigenschaften bestimmter Atomkerne durch die Resonanzabsorption im Radiowellenbereich in einem statischen Magnetfeld abbilden lassen. Durch die Erkenntnis, dass das NMR-Signal eines Atomkerns von dessen Umgebung sowie chemischer Bindung beeinflusst wird, und dass die Signalintensität proportional der Konzentration des Stoffes ist, eröffnete sich hiermit ein neues Feld der analytischen Methodik: Die NMR-Spektroskopie.

Die Möglichkeiten der Bildgebung und der weiten medizinischen Anwendung dieser Technik ergaben sich jedoch erst, nachdem Paul Lauterbur erkannte, dass die Kombination des statischen äusseren Magnetfeldes mit einem zusätzlichen variablen schwächeren Magnetfeld, einem Gradientenfeld, eine räumliche Zuordnung der NMR-Signale erlaubt.

Dieses Verfahren wurde 1973 unter dem Namen *Zeugmatographie* vorgestellt⁴¹ und stellte den Beginn der Magnetresonanzbildgebung (MRI = *Magnetic Resonance Imaging*) dar, welches durch stetige Fortschritte, vor allem durch die Entwicklung neuer Pulssequenzen wie der FLASH-Sequenz (*Fast Low Angle Shot*) von A. Haase und J. Frahm⁴², die die Untersuchungszeiten wesentlich verkürzten, seit Anfang der 80-iger Jahre ein immer größer werdendes Anwendungsgebiet findet. Die Verwendung von supraleitenden Magneten höherer Feldstärken und leistungsfähigeren Computersystemen zur schnelleren Datenverarbeitung ermöglichen heutzutage Untersuchungen von hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung. Neben der reinen anatomischen, morphologischen Abbildung haben sich noch weitere Anwendungsbereiche wie MR-Angiographie und Kardio-MRT etabliert. Darüberhinaus sind inzwischen Untersuchungen zu dynamischen Prozessen wie Perfusion und Diffusion bis hin zu funktioneller Aktivität (fMRI) weit verbreitete Verfahren.

1.5.2 Physikalische Grundlagen

Im Gegensatz zur Röntgenbildgebung, die energiereiche elektromagnetische Wellen von 10^{18} - 10^{20} Hz zur Durchleuchtung verwendet, beruht das in der Kernspintomographie genutzte NMR-Signal auf Wechselwirkungen von nichtionisierenden Wellen im Radiofrequenzbereich (10-400 MHz) mit Atomkernen. Da für das Phänomen der Magnetresonanz die Kerne hinsichtlich ihrer Anzahl an Protonen und Neutronen bestimmte Kriterien erfüllen müssen, sind nicht alle Isotope NMR-aktiv. Weiterhin sollten diese ein möglichst großes gyromagnetisches Verhältnis für eine ausreichende Signalintensität haben. Die wichtigsten Kerne in der NMR sind ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{23}Na und ^{31}P , wobei der ^1H -Kern aufgrund seines reichhaltigen Vorkommens in biologischen Geweben in der MRI die bedeutendste Rolle einnimmt.

Werden die Kerne in ein magnetisches Feld B_0 eingebracht, richten diese sich entlang des Feldes aus und nehmen im Gleichgewicht einen bevorzugt parallelen Energiezustand ein. Betrachtet man alle Kerne einer Probe, so resultiert ein magnetischer Summenvektor, der in Richtung des Magnetfeldes zeigt und die Grundlage für die Erzeugung des NMR-Signals bildet. Zusätzlich beginnen die Kern-Spins im Magneten eine Präzessionsbewegung um die Hauptfeldrichtung mit ihrer sogenannten Larmorfrequenz auszuführen, welche vom gyromagnetischen Verhältnis des jeweiligen Kernes sowie der magnetischen Flussdichte B_0 abhängig ist. Diese Abhängigkeit wird in der Larmorgleichung formuliert:

$$\omega = \gamma \times B_0$$

Wobei ω die Larmorfrequenz (MHz), γ das gyromagnetische Verhältnis des entsprechenden Kernes (MHz/T) und B_0 die magnetische Flussdichte des Feldes (T) ist. Der magnetische Summenvektor (M_0) ist aufgrund des ihn überlagernden starken B_0 -Feldes im Ruhezustand

nicht zu detektieren sondern erst nach Auslenkung in eine zu B_0 senkrechten Ebene. Um nun ein NMR-Signal von Protonen einer Probe im MR-Spektrometer messen zu können, wird ein Radiofrequenzpuls über eine Sendespule eingestrahlt, dessen Wellenlänge der Larmorfrequenz des Protonenkerns entspricht und im Resonanzzustand den Magnetisierungsvektor M_0 aus der B_0 -Richtung des Feldes abzulenken vermag, so dass er anschliessend mit einer entsprechenden Empfangspule (Antenne) detektiert werden kann.

Das Maß der Auslenkung wird von der Intensität und Dauer des Radiowellenpulses bestimmt, wobei ein Puls, der den M_0 -Vektor um genau 90° (den sogenannten Anregungswinkel α) kippt, entsprechend 90° -Puls genannt wird. Nach Auslenkung des Magnetisierungsvektors in die zu B_0 Senkrechte kann die komplexe Rotationsbewegung des Summenvektors während der Rückkehr in den Gleichgewichtszustand als sogenannter FID (*Free Induction Decay*) registriert werden. Dabei ist die Zeitkonstante, welche die Rate der Rückkehrbewegung in den Gleichgewichtszustand beschreibt, stark gewebeabhängig und wird T1-Relaxationszeit (Longitudinal- oder auch Spin-Gitter-Relaxationszeit) genannt. Durch zusätzliche magnetische Gradientenfelder in die drei orthogonalen Richtungen ist eine räumliche Zuordnung der empfangenen MR-Signale möglich, so dass in der Folge aus dem Frequenzspektrum des FID mit Hilfe einer mathematischen Operation, der Fouriertransformation, an einem Computer ein Bild berechnet werden kann. Die unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften des in den Geweben gebundenen Wassers ermöglichen die Erzeugung eines Kontrastes zwischen den verschiedenen Gewebearten.

1.5.3 Methoden der Magnetresonanz-Angiographie (MRA)

Zur selektiven Darstellung des Gefäßsystems kann man unter Verzicht auf ein Kontrastmittel die Eigenschaften des fließenden Blutes nutzen. Hierzu stehen zwei grundsätzlich verschiedene Methoden zur Verfügung.

Die *Time-of-Flight*-Angiographie nutzt das *in-flow-enhancement* von fließendem Blut (Abb. 1.3), um einen Kontrast zum gesättigten statischen Gewebe herzustellen⁴³. Bei der PC-Angiographie (*phase contrast*) hingegen ist die Pulsabfolge so angeordnet, dass die Phasenverschiebung von statischen und sich bewegenden Kernen zueinander gemessen wird und die Signalintensität zudem eine Geschwindigkeitsinformation enthält. Der Versuchsaufbau hierzu ist jedoch sehr komplex, da man die Phasenverschiebung entlang aller drei Achsen messen muss. Weiterhin ist die Untersuchungsdauer entsprechend lang, so dass dieses kein Standardverfahren darstellt und daher nicht weiter erläutert wird.

Zusätzlich gibt es die Möglichkeit, vergleichbar mit der klassischen Angiographie, durch Gabe eines intravaskulären paramagnetischen Kontrastmittels die T1-Relaxationszeit des Blutes zu verkürzen und somit die Signalintensität der Gefäße zu erhöhen. Dieses wird auch ceMRA (*contrast enhanced*) genannt. Hier ergeben sich jedoch Limitationen im Untersuchungsobjekt Maus, da ein sehr schneller Ausgleich des Kontrasts durch das geringe Blutvolumen bei gleichzeitig hohem Herzminutenvolumen (aufgrund der hohen Herzfrequenz von ca. 600 Schläge/min), stattfindet.

1.5.4 Time-of-Flight Angiographie

Bei diesem Verfahren erzielt man durch die Abfolge von vielen schnellen repetitiven Anregungspulsen eine Signalsättigung des Gewebe in der Untersuchungsschicht. Da fließendes Blut sich durch die Schicht bewegt, können 'frische', 'ungesättigte' Spins ein Signal liefern.

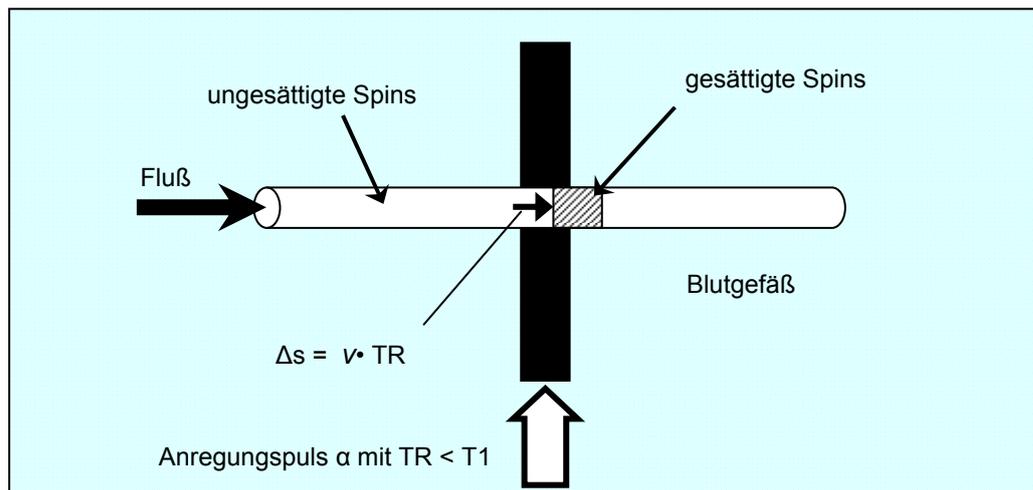


Abb. 1.3: Prinzip des *in-flow-enhancement*:

Abk.: TR = Repititionszeit., v = Flussgeschwindigkeit, Δs = Wegstrecke der angeregten Spins des fließenden Blutes. T1 = T1-Relaxationszeit

Die Anregungsschicht sollte sich möglichst senkrecht zur Flussrichtung befinden, um ein maximales *in-flow-enhancement* zu erreichen. Die Unterdrückung von entgegengesetzt fließendem venösem Signal ist durch die Applikation eines distalen Sättigungspulses möglich. Zusätzlich ist die Höhe des Signalkontrastes von mehreren Faktoren wie der T1-Zeit des statischen Gewebes, der Repetitionszeit (TR) und des Anregungswinkels (α) des eingestrahlten Radiofrequenz-Pulses (RF-Puls), der Schichtdicke und der Flussgeschwindigkeit des Blutes abhängig.

Man unterscheidet 2D- von 3D-Angiographie. Die 2D-MRA ist sehr sensitiv, da sie auch langsam fließendes Blut gut darstellen kann. Durch die kontinuierliche Schichtung von 2D-

Aufnahmen ist eine 3-dimensionale Berechnung eines Gefäßabschnitts möglich, jedoch ist sie in der Wahl der individuellen Schichtdicke limitiert. Die 3D-MRA ermöglicht es dagegen, isotrope Voxelgrößen auch bei hoher planarer Auflösung aufzunehmen, was die Grundlage für eine genaue Quantifizierung der Angiogramme bildet. Nachteilig bei der 3D MRA ist, dass das Signal von Blut in Flussrichtung immer mehr abnimmt, weil es während der Verweildauer im Abbildungsvolumen mehrere Anregungspulse erfährt und dadurch der Kontrast zum gesättigtem statischem Gewebe eingeschränkt wird. Dieser Effekt wird umso stärker, je langsamer das Blut fließt.

Dieses Problem kann durch die Verwendung eines sogenannten TONE (*tilted optimized non-excitation*) Pulses gemindert werden ⁴⁴. Hierbei regen RF-Pulse das Volumen mit einem in Flussrichtung linear ansteigendem Flipwinkel an und erzielen hierdurch eine homogenere Darstellung der Gefäße (Abb. 1.4).

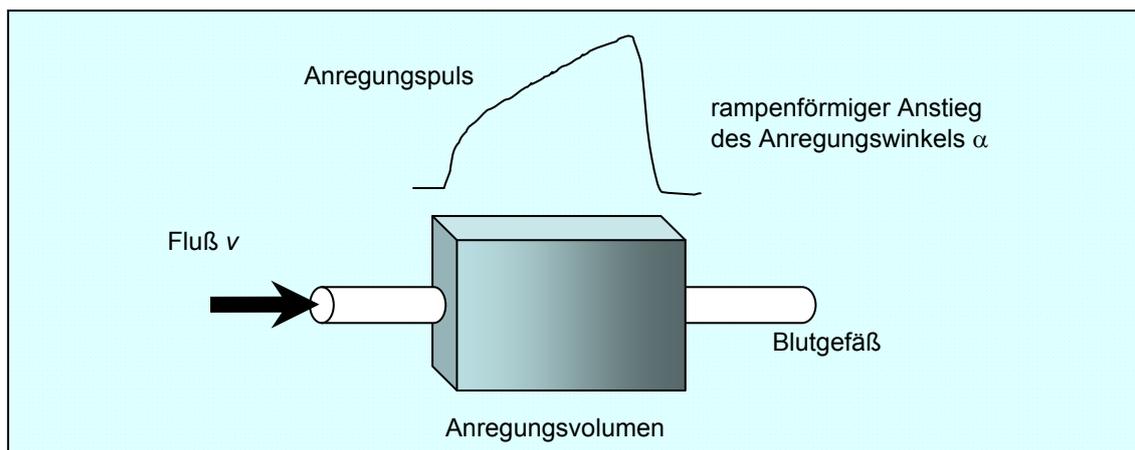


Abb. 1.4: TONE Puls. Durch den rampenförmigen Anstieg des Anregungswinkels werden die proximalen Spins weniger gesättigt und haben dadurch zum distalen Ende noch mehr Längsmagnetisierung für die Signalerzeugung.

In dieser Arbeit wurde eine andere Möglichkeit verfolgt: Die sequentielle Aufnahme von mehreren kleinen Quadern, 'slabs', welche das gesamte Gefäßvolumen abdecken und die Spinsättigung innerhalb der einzelnen Volumina reduzieren.

Hierbei werden die einzelnen slabs in Überlappung aufgenommen, um das nicht optimale Schichtprofil des 3D-Anregungspulses zu den Rändern hin sowie die partielle distale Sättigung des Blutes auszugleichen (Abb. 1.5).

Schematische Darstellung der TOF-MR Messung

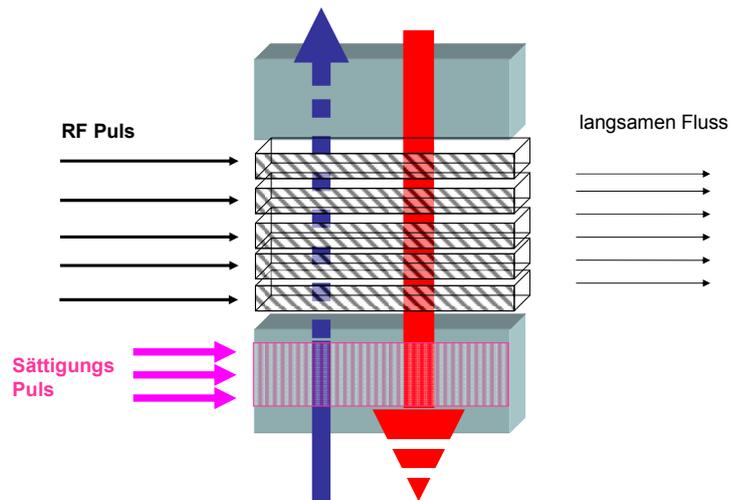


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der TOF-Messung. Das zu untersuchende Volumen wird in mehrere *slabs* unterteilt und sequentiell mit den entsprechenden RF-Pulsen angeregt, um auch langsamen Fluß zum distalen Ende des Volumens darzustellen. In *rot* der arterielle Fluß in distaler Richtung. In *blau* der venöse Fluß in proximaler Flußrichtung.

Dieses Prinzip wurde 1991 von Parker beschrieben (MOTSA: *multiple overlapping thin slice acquisition*⁴⁵). Zusätzlich kann durch die Nutzung des Magnetisierungstrfers (MT) der Gefäßkontrast weiter erhöht werden, indem das Hintergrundsignal durch einen speziellen Anregungspuls wie unter Abb. 1.6 dargestellt, reduziert wird⁴⁶. Bei den durchgeführten Messungen am Hinterlauf der Maus konnte hiermit jedoch keine signifikante Kontrastverbesserung erzielt werden.

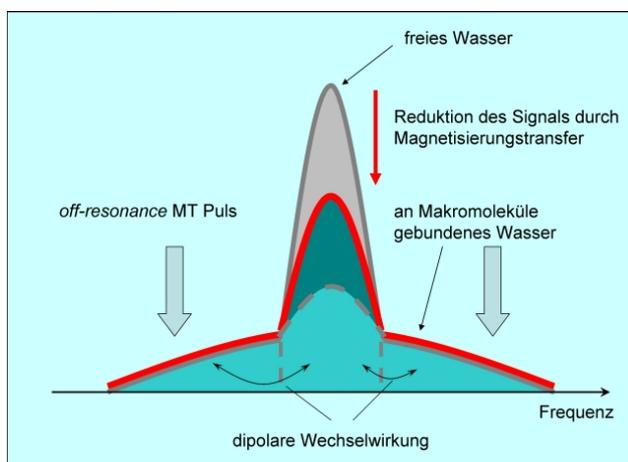


Abb. 1.6: Durch einen *off-resonanten* MT-Puls werden die ^1H -Atome von gebundenem Wasser angeregt; dies reduziert über dipolare Wechselwirkungen (*cross-relaxation-effects*) die Magnetisierung des freien Wassers und vermindert somit das Hintergrundsignal. Modifiziert nach⁴⁷

2 Materialien und Methoden

2.1 Versuchstiere

Das Versuchsvorhaben wurde mit den am Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie der Universität Düsseldorf generierten homozygoten CD73^{-/-}- Mäusen der C57BL/6 -Linie und den entsprechenden Wildtypkontrolltieren durchgeführt.

Der konstitutive Knockout wurde über die Deletion des Exons 2 mittels des Cre/lox System erreicht, welches zum Translationsabbruch und zum Verlust von aktivem Zentrum sowie GPI-Anker der CD73 führte⁴⁸. Alle Experimente sind mit 8-12 Wochen alten Versuchstieren mit einem Körpergewicht von 20-30 g durchgeführt worden und entsprachen den Vorgaben der Tierschutzverordnung.

2.2 Induktion der Hinterlaufischämie

Die Narkose der Versuchstiere wurde mit einer i.p. Injektion von 0,1 ml eines Ketamin/Xylazin Gemisches (20 und 4 mg/ml in 0,9% NaCl Lösung) herbeigeführt. Die Tiere wurden dann auf einem beheizten OP-Tisch (37°C) positioniert, die Innenseite des rechten Hinterlaufs wurde rasiert und mit *Cutasept*® desinfiziert. Mit einer Schere wurde eine Hautinzision über ca. 6 mm Länge im medialen Schenkel durchgeführt. Unter Nutzung eines Stereomikroskops (Leica) wurde der femorale Gefäßnervenstrang aufgesucht und das umliegende Fettgewebe vorsichtig entfernt. Dabei wurde die im Fettgewebe isoliert verlaufende *A. circumflexa superficialis* ligiert und durchtrennt, so dass eine freie Sicht auf die *A. femoralis* ermöglicht wurde. Die *A. femoralis* wurde nun unter Schonung des *N. femoralis* atraumatisch von der Vene mit der Pinzette über die volle Länge proximal des Abgangs der *A. femoralis profunda* bis distal der Abgänge der *A. poplitea* und *A. saphena* mobilisiert. Der Stamm und die jeweiligen distalen Abgänge wurden nun mit Faden (Prolene Ethicon 7-0) ligiert und das gesamte Segment der Arterie von ca. 5 mm Länge exzisiert, entsprechend der in Abb. 2.1 A dargestellten Gefäßanatomie.

Die in Abb. 2.1 B dargestellte Operationsmethode zeigte bei den Versuchstieren eine nur ungenügende Ischämie im Hinterlauf, so dass diese nicht zur Anwendung kam. Nach Spülen der Wunde mit Desinfektionslösung wurde die Haut mit Faden (Prolene Ethicon 6-0) und vier Stichen verschlossen und die Maus bis zum Aufwachen beobachtet

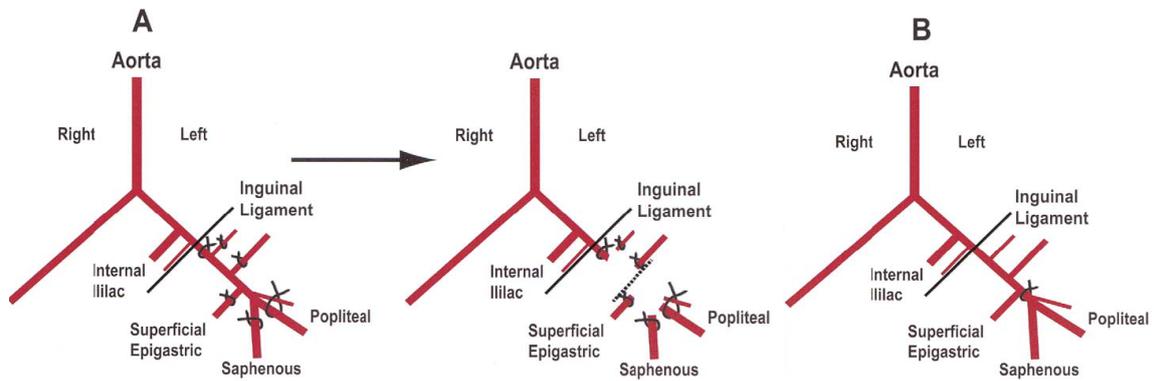


Abb. 2.1: Verschiedene Modelle zur Induktion einer Hinterlaufischämie (aus Tang et al, *J of Vasc Surg* 2004). A zeigt die Operationsprozedur zur Induktion einer schweren Ischämie. B hat nur eine milde Ischämie des Hinterlaufs zur Folge.

2.3 Zeitlicher Versuchsablauf

Nach Operation der Tiere (Tag 0) wurden an den Tagen 3, 7, 14 und 21 nach Operation jeweils die MR-Angiographie und Spektroskopie-Messungen durchgeführt sowie die Versuchstiere hinsichtlich der funktionellen Nutzung des Beines und der morphologischen Ischämiezeichen bewertet und das Körpergewicht festgestellt (Abb 2.2). An Tag 7 bzw. 21 erfolgte an jeweils 8 Tieren Gewebeentnahmen aus dem Hinterlauf zur histologischen Untersuchung.

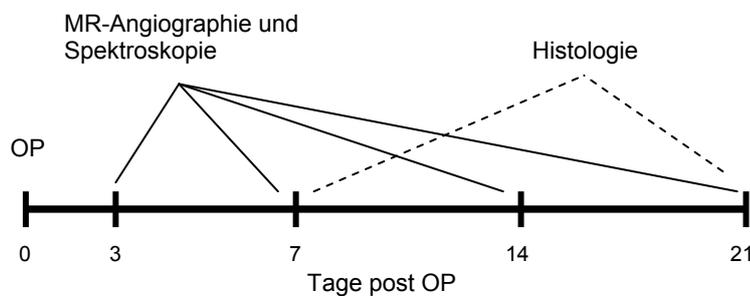


Abb. 2.2: Zeitablauf

Funktioneller Score

- 0 = keine aktive Bewegung des Beins
- 1 = Mitführen des Beins
- 2 = aktive Bewegung des Fusses
- 3 = keinerlei Einschränkungen

Morphologischer Score

- 1 = dunkler Zehennagel
- 2 = mehr als drei dunkle Zehen oder Hautirritationen
- 3 = Nekrosen
- 4 = Amputation

2.4 Gefäßausgusspräparat

Um vor Anwendung und Optimierung des bildgebenden Verfahrens eine anatomische Vorstellung der Größenverhältnisse und der Gefäßstruktur im Hinterlaufgebiet zu gewinnen, wurden zu Beginn dieser Arbeit mehrere Gefäßausgusspräparate des Becken-Bein-Bereichs der Maus hergestellt.

Hierzu wurde das Versuchstier zunächst mit 0,5 ml 15% Urethan i.p. getötet und mit 100 UI Heparin antikoaguliert. Nach Eröffnung der Bauchdecke wurde die abdominale Aorta aufgesucht, diese mit einem Butterfly (21G) kaudalwärts kanüliert und mit einem Faden fixiert. Nach Eröffnung des rechten Vorhofs wurde das Kreislaufsystem mit 20 ml PBS-Lösung mit 0,5 ml Heparin vorsichtig blutleer gespült. 10 ml des Kunststoffharzes (Acrifix® 500, Röhm Darmstadt) wurden in einem Glasbehälter unter Vermeidung von Bläschenbildung mit einem gelben Farbstoff (FARBSTOFF Gelb 8074, Röhm Darmstadt) gleichmäßig vermischt. Unter ständigem Rühren erfolgte die Zugabe von 80 µl eines Katalysators (Katalysator 20, Röhm Darmstadt). Danach wurde das Gemisch in eine 10-ml-Spritze aufgezogen und über ein Butterfly mit gleichmäßigem Druck in das Gefäßsystem gespritzt. Die Haut und der Oberkörper des Tieres wurden abgetrennt und der Hinterlauf in 25%-iger KOH-Lösung über 24 h bei 50°C mazeriert. Nach vorsichtiger Reinigung wurde das fertige Präparat unter einem Stereomikroskop fotografiert.

2.5 Histologische Auswertung

Die Erstellung und Auswertung der histologischen Schnitte erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Matthias Heil am Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim; die immunohistochemischen Färbungen sowie die Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen wurden zum Teil von seiner Mitarbeiterin Sandra Rühl durchgeführt.

Die Gewebeentnahme erfolgte nach Perfusionsfixation an Tag 7 nach Operation. Hierzu wurden die Tiere mit einer letalen Dosis Ketamin/Xylazin 0,3 ml getötet und mit 500 UI Heparin antikoaguliert. Der Thorax wurde eröffnet, der linke Ventrikel mit einem 21G Butterfly kanüliert und das Tier über Eröffnung des rechten Vorhofes entblutet, wobei der Blutkreislauf über die Kanüle mit der Spüllösung (Tris-Buffer-NaCl mit Adenosin 0,1%) für 2 Min. perfundiert wurde. Nachdem das Blut restlos aus dem Gefäßsystem ausgewaschen war, erfolgte die Perfusionsfixierung des Gewebes mit 3% Paraformaldehyd (PFA) über weitere 7 Minuten. Danach wurden jeweils zwei Gewebestücke der operierten Seite (rechts) und als Kontrolle von der nicht operierten Seite (links) des Hinterlaufs entnommen. Dabei wurde für die morphometrische Auswertung der Kollateralgefäße das oberflächliche Muskelgewebe der Adduktorenmuskulatur abgetrennt. Für die Bewertung der Angiogenese, welche im Versorgungsgebiet distal der Ligatur zu erwarten ist, wurde der gesamte *M. gastrocnemius*

entnommen. Die Gewebstücke wurden dann in 15 ml Zentrifugenröhren (Falcon) für 2 h in 3% PFA-Lösung nachfixiert und anschließend in jeweils 10 % und 25 % Saccharoselösung für 2 h bzw. 4 h eingelegt, um Gefrierrißartefakte zu verhindern. Danach wurden die Muskeln in Tissue-Tek[©] eingebettet und in mit flüssigem Stickstoff gekühltem Ethylbutylbutan bei -60° C eingefroren.

2.5.1 Bewertung der Arteriogenese im Bereich der Adduktorenmuskeln

Vom Gewebblock wurden mittels eines Kryostaten (Leica, 1720, Bensheim) 6 µm dicke Schnitte angefertigt, wobei je zwei Schnitte aus dem oberen, mittleren und unteren Drittel des einzelnen Adduktormuskels stammten. Die Gewebe wurden auf einen Objektträger aufgenommen, kurze Zeit luftgetrocknet und in PBS-Lösung überführt. Unspezifische AK- (Antikörper) Bindungen wurden mit 0,4% Glycin und 0,2% BSA (*Bovine Serum Albumin*) in PBS für 30 min bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend erfolgte die Färbung der glatten Muskelzellen mit einem an *Fluoreszeinisothiocyanat* (FITC) gekoppeltem α -*alpha-smooth-muscle-actin*-(α -smc)-Antikörper (Sigma F3777), der in einer 1:500-Verdünnung in PBS bei Raumtemperatur (RT) inkubiert wurde. Nach 3 × 5 min Waschen in PBS für die Entfernung nichtgebundener Antikörper wurden die Endothelien mit an *Tetramethyl Rhodamine Iso-Thiocyanate* (TRITC) gekoppeltem BS-1 (*Bandereia simplicifolia*) Lectin (1:30, 45 min bei RT) gefärbt (Sigma L5264), welches spezifisch an die Endothelzellen bindet. Der Lectinüberschuß wurde mit PBS (3 × 5 min) abgewaschen und eine Zellkernfärbung mit DAPI (4',6-Diamidino-2'-phénylindole Dihydrochlorid; Molecular Probes D-3571, 1:1000, 10 min bei RT) durchgeführt. Nach einem letzten Waschschrift (3 × 5 Min. in PBS) wurden die Schnitte in Mowiol[®] eingedeckt.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden von allen arteriellen Gefäßen, die anhand ihrer α -smc-Färbung identifiziert wurden, bei 40-facher Vergrößerung Fotos angefertigt. Die planimetrische Auswertung erfolgte am Computer mittels ImageJ, wobei der Innen- und Außendurchmesser und die zugehörige Oberfläche jeder Arterie bestimmt wurden.

2.5.2 Bewertung der Angiogenese im *M. gastrocnemius*

Von jedem Muskel wurden insgesamt 9 je 6 µm dicke Schnitte angefertigt, wobei je 3 Schnitte aus dem oberen, mittleren und unteren Drittel entnommen wurden. Die Immunohistochemie wurde wie oben beschrieben durchgeführt, es wurde jedoch keine α -smc-AK-Färbung vorgenommen, da hier nur die Anzahl der Kapillaren quantifiziert werden sollte. Es wurden je 3 Fotos pro Schnitt, also insgesamt 27 Bilder pro Muskel, bei 25-facher Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop angefertigt. Die Bewertung der Kapillardichte erfolgte durch Auszählen der Kapillaren.

2.6.1 Magnetresonanzuntersuchungen

Alle Experimente wurden an einem vertikalen supraleitenden Oxford Spectrospin Magnet mit einer magnetischen Feldstärke von $B_0 = 9.4$ Tesla und einer Bohrung von 89 mm (DRX 400 MHz Widebore-NMR der Firma Bruker Ettlingen) durchgeführt (Abb 2.2). Um ortskodierte Messungen durchführen zu können, wurde ein aktiv abgeschirmtes Gradientensystem mit einer maximalen Gradientenstärke von 1 T/m (Micro2.5, Innendurchmesser 40 mm, Bruker Ettlingen) innerhalb der Bohrung platziert. Für die Angiographieuntersuchungen wurde ein auf Protonen abgestimmter Volumenresonator mit "sägezahnförmiger" Anordnung der Sende- und Empfangselemente der Firma Bruker verwendet. Der sensitive Bereich beträgt 30 mm in z-Richtung bei einem Innendurchmesser des Probenkopfes von 30 mm. Für die anatomischen und spektroskopischen Messungen des einzelnen Hinterbeins wurde eine bewegliche $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ Tilt-Spule (Bruker) mit einem empfindlichen Bereich von 20 mm in z-Richtung bei 10 mm Innendurchmesser verwendet.

Die Ansteuerung der Hochfrequenzspulen sowie des Gradientensystems erfolgt über eine Bruker AVANCE Konsole, welche mit einer graphischen Benutzeroberfläche ParaVision 4 (Bruker Biospin) auf einer Linux Workstation (Red Hat Enterprise Linux 3) kontrolliert wird. Die spektroskopischen Untersuchungen wurden mit TopSpin 1.3 durchgeführt.

Die Steuersoftware ParaVision ermöglicht neben der Wahl sämtlicher Sequenzparameter und Erstellung definierter Messprotokolle verschiedene Möglichkeiten der graphischen Rekonstruktion der akquirierten MR-Datensätze, wie beispielsweise die Darstellung als *Maximum Intensity Projection* (MIP).



Abb. 2.3: 400 MHz Widebore-NMR mit Konsole und Workstation

2.6.1 Anästhesie und Vorbereitung

Um den Körpertemperaturabfall in der Maus unter Narkose, der mehr als 6°C betragen kann⁴⁹, zu verringern, wurde der Arbeitsplatz mit einer Rotlichtlampe erwärmt. Die Anästhesie der Versuchstiere wurde über eine spezielle Atemmaske initial mit 2,5 vol % Isofluran aus einem Vaporisator (Isoflurane Vapor, Drägerwerk AG, Lübeck) in einem Stickstoff/Sauerstoff Gasmischung (70:30) eingeleitet. Die Narkose wurde im folgenden mit 1,5 vol % Isofluran aufrechterhalten und die Tiere in einem speziell an den Probenkopf angepassten "Animal-Handling"-System positioniert (Abb. 2.3). Die Maus wurde vorsichtig mit Klebestreifen (Leukoplast) fixiert, um Bewegungsartefakte zu verhindern. Dabei wurde auf die immer exakte gleiche Positionierung der Hinterläufe geachtet. Eine Temperatursonde (Pt10Rh-Pt Thermoelement, Greisinger, Regenstauf) wurde dem Versuchstier rektal eingeführt und mit einem externen A/D-Wandler (Small Animal Instruments) verbunden. Zur Atemfrequenzkontrolle wurde zudem eine Drucksonde unter den Brustkorb platziert. Anschließend wurde das Versuchstier mit der Halterung in den Probenkopf eingeführt und das gesamte System vertikal in den Magneten eingebracht, so dass die Hinterläufe im Isozentrum des Magneten positioniert waren. Das Gradientenrohr wurde über ein extern temperiertes Wasserkreislaufsystem (Haake UKW 45) auf 36°C beheizt. Die Körperkern-temperatur und die Atmung wurden mit Hilfe einer Monitoringsoftware (SA Instruments M 1025) während der gesamten Messdauer überwacht. Über einen zusätzlich eingeführten Druckluftschlauch wurde für eine regulierbare Luftzirkulation im Inneren des Gradientenrohrs gesorgt, um bei dem geringen Raumangebot einen Hitzestau und somit einen kritischen Anstieg der Körpertemperatur des Tieres zu verhindern.

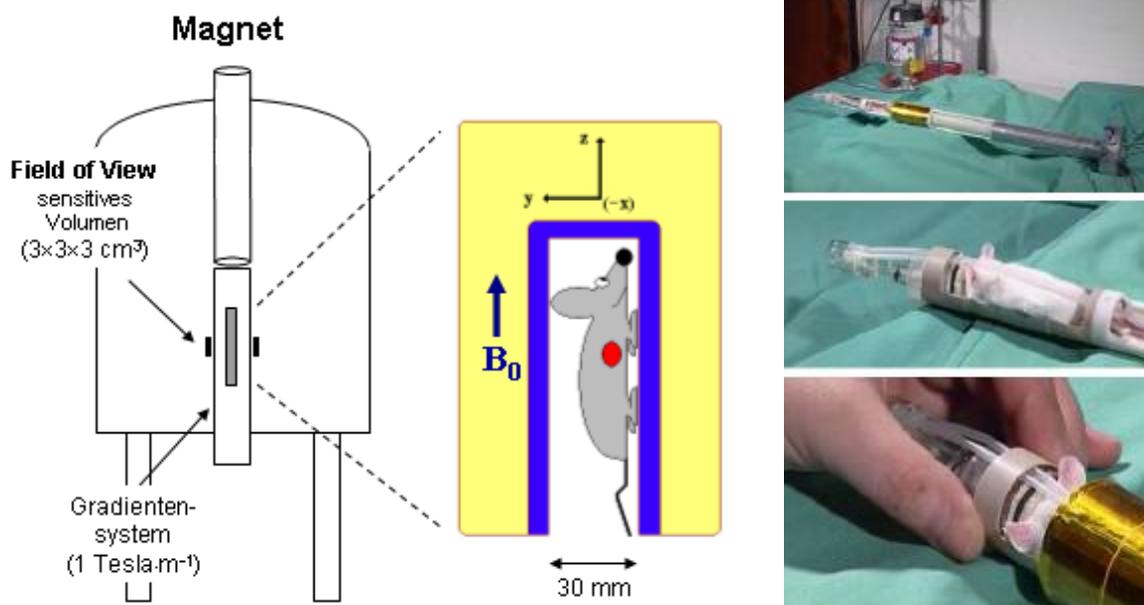


Abb. 2.4: Schematische Darstellung des Magneten und der Messvorrichtung für die Versuchstiere

2.6.2 Bildakquisition

Nach manuellem Tuning und Matching erfolgte zur groben Orientierung die Erstellung eines Pilotskans mit folgenden Parametern: Gradientenechosequenz mit drei orthogonalen Schichten (axial, coronar und sagittal), FLASH, TE = 5 ms, TR = 100 ms, $\alpha = 10^\circ$, Field of View (FoV) = 3,0×3,0 cm² bei 1 mm Schichtdicke, Matrix = 128×128 .

Bei korrekter Positionierung des Versuchstieres wurde im folgenden die Magnetresonanz-Angiographie durchgeführt. Dabei wurde jedoch darauf geachtet, dass die MRA-Messungen erst 10 Minuten nach Einbringen in den Magneten gestartet wurde, um eine ausreichende Adaptation des Versuchstieres an die Orthostase zu gewährleisten. Ausserdem sollte die Körperkerntemperatur mind. 38°C erreicht haben, um eine temperaturbedingte periphere Vasokonstriktion und somit verminderten Blutfluss in den Hinterläufen zu verhindern.

Alle Messungen wurden in einem Temperaturbereich von 38-39° C durchgeführt, um eine vergleichbare Abbildungsqualität zu erreichen.

2.6.3 ³¹P-NMR Spektroskopie des Hinterlaufs

Das Versuchstier wurde wie oben beschrieben anästhesiert und im Animal-Handlingsystem fixiert. Der operierte Hinterlauf wurde mit einem Leukoplaststreifen innerhalb der Tilt-Spule positioniert und anschliessend das Haltesystem vertikal in den Magneten eingeführt. Nach manuellem Matching und Tuning auf den ¹H-Kern wurde mit Hilfe der Shimspulen die Homogenität des B₀ Magnetfeldes optimiert. Danach erfolgte die Abstimmung des ³¹P-Kerns. Die ³¹P-NMR-Spektroskopie wurde dann mit folgenden Parametern durchgeführt: Spektrale Bandbreite 6460 Hz, 2048 Scans, TR = 23 ms, Pulswinkel $\alpha \sim 30^\circ$, Akquisitionszeit 12 min.

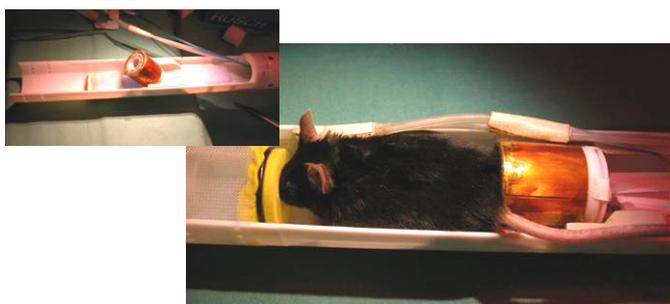


Abb. 2.5: Position des Versuchstiers im Tilt-Probenkopf

Die chemische Verschiebung im Phosphorspektrum wurde auf das Signal von Phosphokreatin bei -2,52 ppm bezogen. Nach Phasen- und Basislinienkorrektur erfolgte die Integration der Signale für ATP und Phosphokreatin.

Im Anschluss wurden anatomische Schnittbilder durch den Hinterlauf mittels einer Turbo-Spin-Echo-Sequenz (RARE, Rarefaktor 8, TE 12 ms, TR 4200 ms mit 2 Averages,

FoV 1,0×1,0 cm, Matrix 128×128, Schichtdicke 0,78 cm) angefertigt, um den Verlauf der ischämiebedingte Ödembildung bzw. dessen Regression mit nachfolgender Atrophie der Muskelmasse zu beobachten. Dies wurde anhand des Beinumfangs in Höhe des Unterschenkels bestimmt, wo der *M. gastrocnemius* die größte Muskelmasse ausmacht. Die Auswertung erfolgte mit dem in ParaVision implementierten *Region of Interest-Tool* (ROI), mit dem in sechs aufeinander folgenden Bildschichten die Fläche des Unterschenkels ausgemessen wurde, wobei das erste Bild immer der ersten Schicht direkt unterhalb der Kondylen des Tibiaknochen entsprach.

2.6.4 Postprozessierung mit ECCET-AngioTux

Am Institut für Informatik der Universität Düsseldorf wurde von Dr. Andreas Beck das Softwarepaket ECCET (<http://eccet.acs.uni-duesseldorf.de>) zur Verarbeitung und Visualisierung von voxelbasierten Volumendaten entwickelt. ECCET arbeitet unter einem Linux Betriebssystem (Debian GNU/Linux) und bietet auf einer gemeinsamen Plattform einzelne Anwendungsmodule für verschiedene Bearbeitungsprozesse von medizinischen Bilddaten an. Dabei werden die Volumendatensätze verschiedener Aufnahmemodalitäten (CT, MRT) in 3D visualisiert und in Echtzeit gerendert, bei gleichzeitiger Darstellung der orthogonalen 2D Schichtebenen. Bei freier Blickwinkelwahl und achsenunabhängiger Rotation des Objektes ist eine manuelle Echtzeitnavigation im Volumen und somit eine sinnvolle Segmentierung der Daten möglich. Daneben stehen Algorithmen wie eine mathematische Funktion zur kantenerhaltenden Glättung für die Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses zu Verfügung. *ColoTux* ist beispielsweise eine Anwendung, welche erfolgreich für die Erstellung virtueller Video-Coloskopien aus CT-Schichtaufnahmen verwendet wird⁵⁰⁻⁵².

Wir verwendeten für die Bildbearbeitung unserer MR-Angiographie-Daten das Softwarepaket ECCET 1.0.0-14 mit einem für unsere Bedürfnisse angepassten Programmmodul *AngioTux*. Als Workstation diente ein Dual Prozessor 64-bit x86 2GHz System mit 2 GB Arbeitsspeicher unter einem Debian 3.1.1 Linux Betriebssystem.

2.7 Statistik

Bei allen Versuchsreihen wurden zunächst die Mittelwerte mit zugehörigen Standardabweichungen berechnet und das Ergebnis als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. Die graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe des Softwareprogramms Origin 7.0. Die statistischen Berechnungen wurden mit MS Excel 2004 durchgeführt. Zum Signifikanztest zwischen den zwei Versuchsgruppen wurde der zweiseitige ungepaarte Studentische t-Test angewendet, wobei ein signifikanter Unterschied bei $p < 0,05$ angenommen wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Gefäßausgusspräparat

Um einen ersten Eindruck über die Gefäßanatomie des Maushinterlaufs zu gewinnen und die Zielgefäße zu lokalisieren, welche die Kollateralen ausbilden, wurden zunächst Gefäßausgusspräparate von Tieren, welche 7 Tage zuvor nach der unter 2.1 beschriebener Methode operiert wurden, angefertigt und unter einem Stereomikroskop dokumentiert. Man sieht in Abb. 3.1 zum Größenvergleich einen Streichholzkopf. Die Unterbrechung der *A. femoralis* ist deutlich zu erkennen, den Ort der proximalen Ligatur kennzeichnet der blaue Faden, der Knoten der distalen Ligatur ist während des Präparationsprozesses verlorengegangen. Die roten Pfeile deuten auf die in typischer Weise gewundenen neu ausgebildeten Kollateralgefäße, welche sich im Bereich des *M. adductor* befinden.

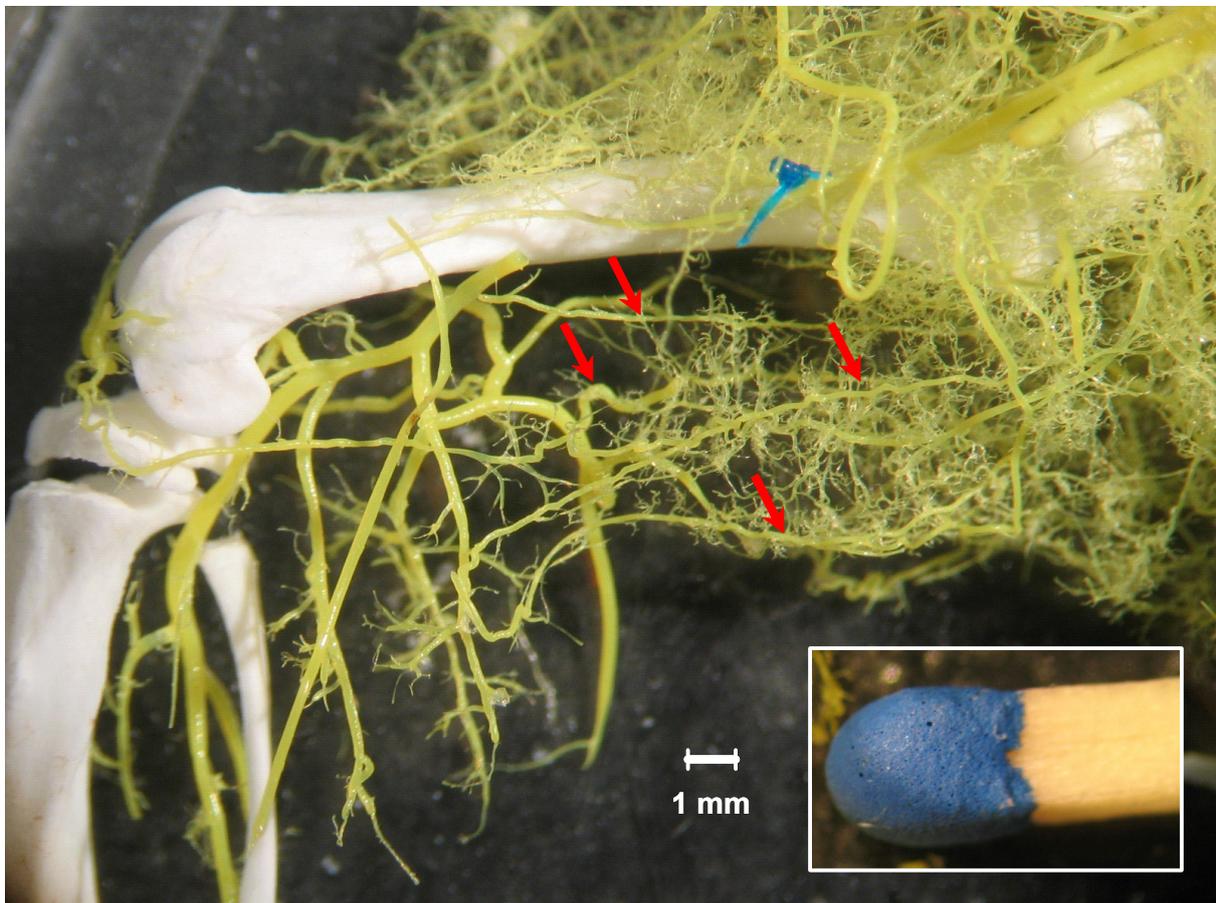


Abb. 3.1: Foto eines Gefäßausgusspräparats 7 Tage nach Ligatur der *A. femoralis*

Die Kollateralgefäße nehmen ihren Ursprung im Gebiet der *A. profunda* und der tiefer liegenden *Aa. Iliacae* und inserieren unter Umgehung der Okklusionstelle im distalen Teil der *A. femoralis* bzw. deren Folgeäste der *A. poplitea*.

Im folgenden wird nun die schrittweise Etablierung eines optimalen Protokolls zur nichtinvasiven Darstellung dieser Gefäße *in vivo* dargestellt.

3.2 Optimierung des Protokolls für hochauflösende 3D-MR-Angiographie

3.2.1 Einfluss der Körperkerntemperatur auf die Untersuchung

Abb. 3.2 stellt *Maximum-Intensity-Projektionen* (MIP) des gleichen Versuchstieres für die bei verschiedenen Körpertemperaturen gemessenen MR-Angiographien dar. Es ist klar zu erkennen, dass die Durchblutung der Gefäße von der Körpertemperatur deutlich beeinflusst wird, welches sich am ehesten durch eine kältebedingte periphere Vasokonstriktion in den Versuchstieren erklären läßt. Wegen der reduzierten Durchblutung der Hinterlaufgefäße wird folglich das Signal für die MR-Angiographie stark vermindert.

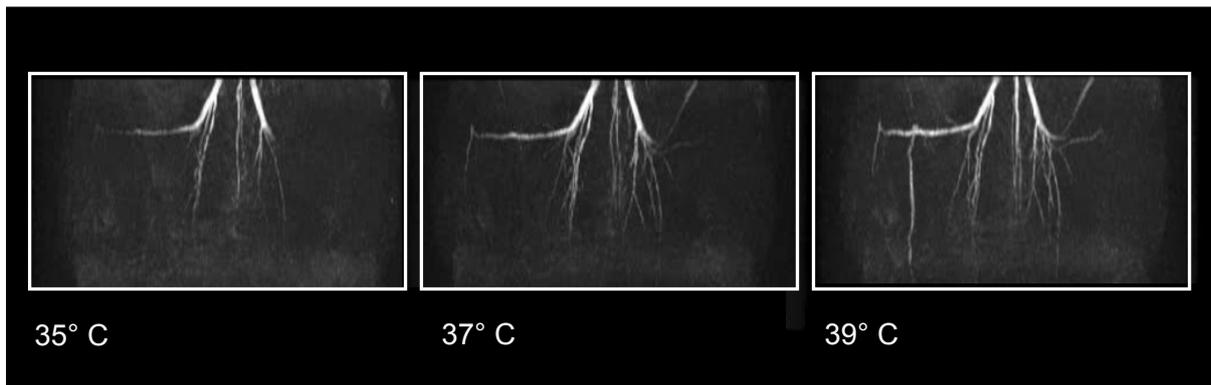


Abb. 3.2: Einflussgröße Körperkerntemperatur auf die MR-Angiographie

Der narkosebedingte Abfall der Körpertemperatur des Versuchstieres erfordert daher über die Untersuchungsdauer eine kontinuierliche Temperierung, um einen regelrechten Vasotonus und somit ausreichend Blutfluß sicherzustellen. Die physiologische Körpertemperatur der C57/BL6 Mäuse lag in Übereinstimmung mit der Literatur bei 38°C⁵³. Der Temperaturabfall nach Narkoseeinleitung betrug im Mittel ca. 4°C.

Sind die Tiere im Magneten führt dies zu einem langsamen Temperaturanstieg, so dass nach einer Stunde ungefähr die physiologische Körperkerntemperatur erreicht wird. Bei weiterem Verbleib des Versuchstieres im Magneten misst man nach 2 Stunden eine Körpertemperatur jenseits von 40°C, was durch einen Hitzestau aufgrund mangelnder Luftzirkulation in dem Tierhaltungssystem bedingt ist. Bringt man jedoch durch einen zusätzlichen Druckluftschlauch zirkulierende Frischluft in die Röhre, so erfolgt wieder eine Annäherung an physiologische Werte.

Hinzukommt ein weiterer Faktor: Bei Verwendung der MR-Angiographie-Sequenz kommt es per se zu einem sehr raschen Anstieg der Körpertemperatur. Dies ist zum einen die Folge der Erwärmung des Gradientenrohrs durch das für das Messprotokoll erforderliche extrem

schnelle Schalten der Gradienten, zum anderen jedoch auch durch die Absorption der elektromagnetischen Strahlung verursachte Energiedeposition (Technisch ausgedrückt in der SAR = Spezifische Absorptionsrate) in dem Gewebe des Versuchstieres. Diese Beobachtungen machen eine kontinuierliche Messung der Körpertemperatur und Kontrolle über eine regulierbare Luftzirkulation während des Messablaufs unabdingbar.

3.2.2 Messprotokoll der 3D-MR-Angiographie

Zur selektiven Darstellung der arteriellen Becken-Bein-Gefäße der Maus kam eine flusskompensierte 3D-Gradientenecho Sequenz (3D GEFC, *gradient echo flow compensated*) mit einem distalen Sättigungspuls zur venösen Flussättigung zum Einsatz. Nach umfangreichem Optimierungsprozeß wurden hierbei folgende Parameter verwendet: TE = 3,5 ms, TR = 23 ms, sinc10H Puls mit $\alpha \sim 30^\circ$, distale Sättigungsschicht 0,4 cm, Akquisitionszeit von 6,17 min. Zu Beginn einer Messung wurde zur Überprüfung der korrekten Erfassung des gesamten Gefäßbaums und Bestimmung des optimalen Pulswinkels ein 3D-GEFC Scan niedriger Auflösung und anisotroper Voxelgröße über das gesamte Field of View erstellt (FoV = $2,56 \times 2,56 \times 1,28 \text{ cm}^3$, Matrixgröße von $256 \times 128 \times 64$) und dieser mit Hilfe der Bildverarbeitungssoftware Paravision 4 (Bruker, Ettlingen) in einer Maximum Intensity Projection (MIP) dargestellt.

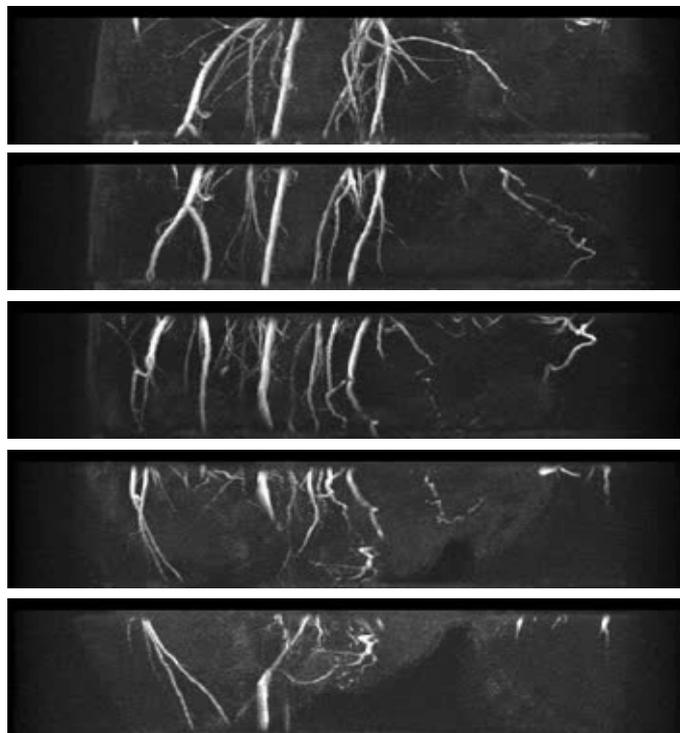


Abb. 3.3: MR-Angiographie in *Maximum Intensity Projection*. Fünf sequentielle Messungen decken das *Field of View (FoV)* mit sich überlappenden Datensätze ab.

Für hochauflösende Angiogramme wurde nun das FoV auf $2,56 \times 2,56 \times 0,64 \text{ cm}^3$ verkleinert und die Matrixgröße auf $256 \times 256 \times 64$ erhöht, welches einer isotropen Voxelgröße von 0,1 mm Kantenlänge und einem Volumen von 1 nl entspricht. I

m folgenden wurde dann mit der unter 1.5.4 beschriebenen MOTSA-Technik der Hinterlauf des Versuchstiers in sequentiellen Messungen mit den o.g. Parametern untersucht (Abb. 3.3). Hierbei wurde das FoV bei jedem Scan um jeweils 32 mm in z-Richtung verschoben, um das Objektvolumen schließlich in fünf einzelne, sich exakt zur Hälfte überlappende Datensätze zu unterteilen.

Am Ende der Untersuchungszeit von $5 \times 6,28 \text{ min}$ erhält man entsprechend fünf einzelne Datensätze, welche zusammen das Untersuchungsvolumen von $2,56 \times 2,56 \times 1,92 \text{ cm}^3$ in isotroper Voxelgröße von 1 nl darstellen (Abb. 3.4). Zur exakten Quantifizierung dieser überlappenden Datensätze wurden die Daten in das in Zusammenarbeit mit Dr. A. Beck (Institut für Informatik - Bild und Signalverarbeitung - Universität Düsseldorf) optimierte Angiotux-Modul importiert.

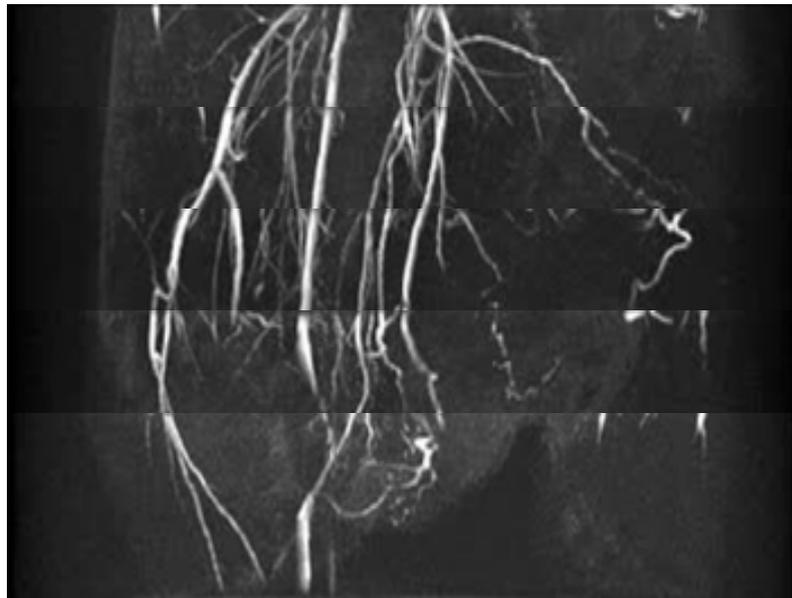


Abb. 3.4: Darstellung der MIP-Angiographie nach Überlagerung der einzelnen Datensätze aus Abb. 3.3

3.2.3 Daten-Konvertierung und AngioTux

Die 3D-Volumendaten einer Messung werden unter ParaVision nach erfolgter Fouriertransformation in einer 16-bit Integer-Datei gespeichert, welche die Grauwertinformationen der einzelnen Voxel in sequentieller Abfolge enthält. Für die Bearbeitung mit AngioTux wird diese Datei ihrer Matrixgröße entsprechend in fortlaufend nummerierte Einzeldateien des *Portable Pixelmap* Bildformats (*.ppm) konvertiert, wobei x, y die planare Pixelauflösung der Bilder und z die Anzahl der Dateien bestimmt. Das bedeutet, dass das 3D-Volumen der Messung mit der Matrixgröße von 256×256×64 in 64 einzelne 2D-Bilddateien mit einer Auflösung von 256×256 Pixel aufgeteilt wird.

Für die Darstellung des gesamten Aufnahmevolumens werden die sich überlappenden 5 Rohdatensätze (Abb. 3.5) in die entsprechende Anzahl an 2D-Bilddateien umgewandelt und eine Neunummerierung in der Form vorgenommen, dass der distale Anteil jedes Bildvolumens (der letzte ausgenommen) ab der 41. Schicht vom jeweils folgenden Datensatz abgebildet wird, was einer Überlappung der einzelnen Slabs von ungefähr 37% entspricht. Die ersten 8 Schichten wurden ab dem zweiten Datensatz ebenfalls nicht für die Rekonstruktion verwendet, da es hier auf Grund der Unschärfe des Anregungspulses zu den Rändern hin zu inhärenten Artefaktbildungen kommt.

Diese Bilderstapel, auch *Stacks* genannt, werden nun in fortlaufender Reihenfolge in den Arbeitsspeicher von AngioTux geladen und auf vier Fenstern der Arbeitsfläche abgebildet. Die ersten drei Fenster zeigen die orthogonalen Abbildungen in den xy-, xz- und yz-Ebenen und ermöglichen so ein Navigieren durch die Einzelschichten des Volumens.

Im vierten Fenster erfolgt die Darstellung der Daten bei Echtzeitrendering im dreidimensionalen Raum in einer maximalen Intensitäts-Projektion (MIP), welche sich zur 3D-Darstellung der unsegmentierten Angiographiedaten am besten eignet (Abb. 3.5). Hierbei werden dem einzelnen Pixel auf der Projektionsfläche der zu ihm im senkrechten Strahlengang liegende größte Intensitätswert im Volumen zugeordnet, so dass bei gesättigtem, signalarmen Hintergrund die Gefäßstruktur räumlich gut abgebildet werden kann. In diesem 3D-Fenster ist eine freie achsenunabhängige Navigation durch das ganze Objektvolumen möglich, wobei die Visualisierung in Echtzeit von der Größe des eingelesenen Datensatzes abhängig ist und bei Dateien größer als 48 MB deutlichen Einschränkungen unterliegt.

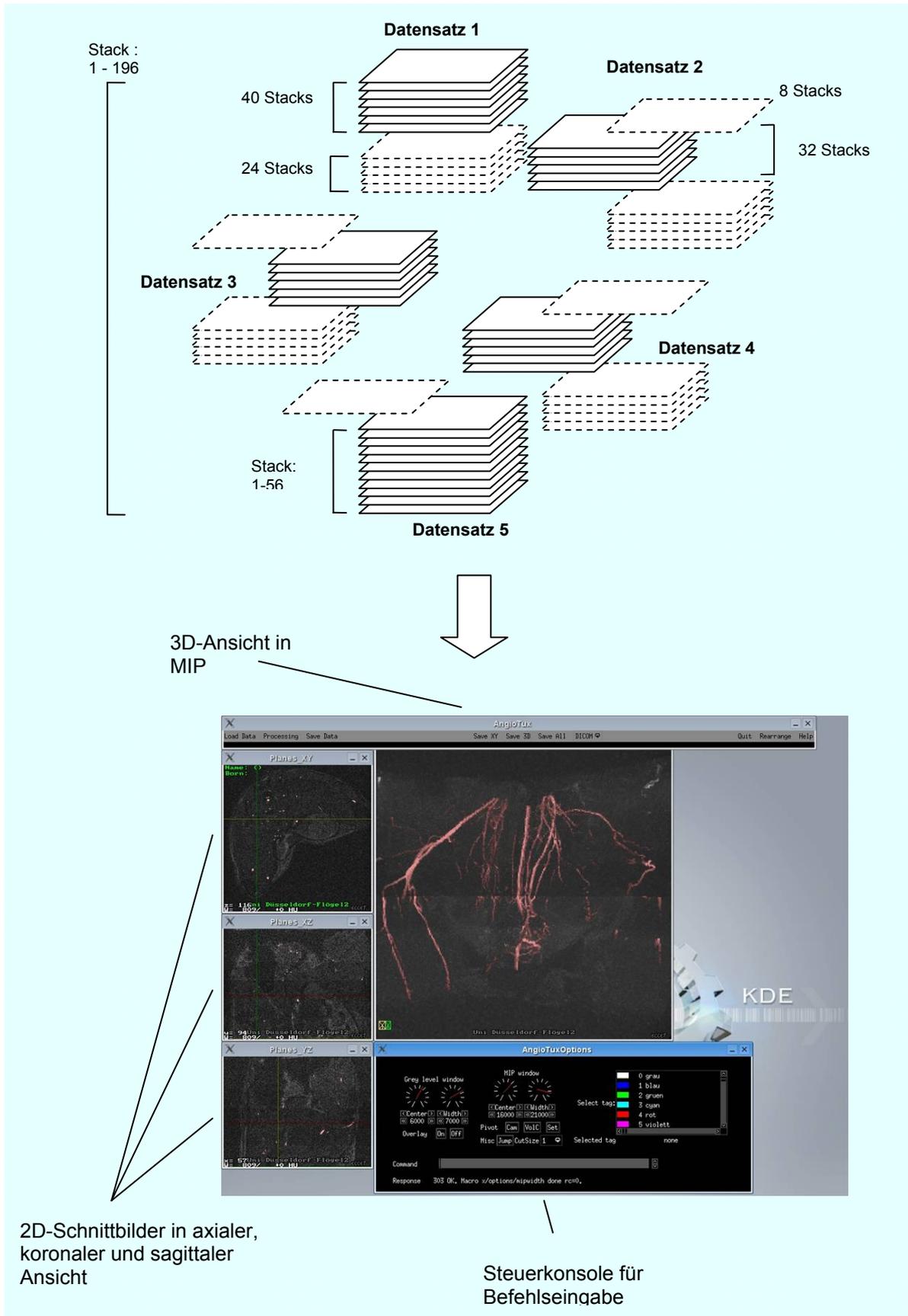


Abb. 3.5: Im oberen Teil der Abb. ist die Konvertierung und Fusion der einzelnen Datensätze, welche aus Bilderstapeln (*stacks*) bestehen, dargestellt. Im unteren Teil die Bedieneroberfläche der AngioTux-Software.

3.2.4 Segmentierung des Volumendatensatzes

Mit AngioTux werden die Grauwerte analog zum MR-Rohdatensatz in einem Wertebereich von 0 - 32.767 abgebildet, wobei die Flusssignale sich in einem Abschnitt von ca. 8.000 aufwärts befinden. Um im Weiteren eine sinnvolle Darstellung und Auswertung zu ermöglichen, gilt es im nächsten Schritt die Gefäßgrenzen klar zu definieren. Hierzu werden die Ortskoordinaten der Helligkeitswerte verschiedenen Farbklassen zugeordnet. Leider reicht für die Bearbeitung von MR-Bildern der Maus eine reine Schwellenwert-Segmentation, sprich einer automatischen Detektion aller Gefäße oberhalb eines bestimmten Schwellenwerts, aufgrund des geringen Signal-zu-Rauschens (SNR) nicht aus, so dass man sich hier mit einer Kombination aus Schwellenwert- und manueller Segmentierung behelfen muss. Die obere Schwellenwertgrenze wurde ausreichend hoch gewählt, um die maximalen Signale noch sicher zu erfassen (<32.767); der untere Schwellenwert wurde in Abhängigkeit vom Hintergrundsignal bestimmt und lag in einem Bereich zwischen 6.500 und 13.500. Messungen, die ober- oder unterhalb dieses Fensters lagen, wurden verworfen, da bei zu niedrigen Werten ein zu geringes SNR vorlag oder bei zu hoch gemessenen Werten von einer zu grossen Sättigung schwächerer Flusssignale auszugehen war. Dieser neu definierte Wertebereich (*Klasse*) sollte nun sicher alle Gefäßstrukturen oberhalb der Nachweisgrenze beinhalten. Im nächsten Schritt wurde durch manuelle Segmentierung nach anatomischen Gesichtspunkten (diskontinuierlicher Gefäßverlauf, zusammenhängenden Strukturen, Helligkeitssprünge) unter Kontrolle der achsenparallelen 2D-Schichten das restliche Rauschen und die nicht zugehörigen Elemente entfernt. Nach der Segmentierung erfolgte die volumetrische Auswertung der einzelnen Segmente.

3.2.5 Die Anatomie der Kollateralgefäße im 3D-Angiogramm

Um die visuelle Inspektion der *in vivo* gemessenen MR-angiographischen Datensätze zu erleichtern, wurde ein Oberflächenrendering gewählt. Abb. 3.6 zeigt in Form eines repräsentativen Versuches den Gefäßbaum des Hinterlaufs einer CD73^{-/-}-Maus drei Wochen nach Operation der linken Femoralarterie aus verschiedenen Blickwinkeln. Der Ort der Ligatur ist durch einen weißen Querbalken verdeutlicht. Aus den Abbildungen lässt sich klar erkennen, wo die Kollateralgefäße entspringen und dass sie innerhalb von 3 Wochen deutlich an Größe gewonnen haben. Zudem bilden sie die für den Arteriogeneseprozess typische Korkenziehermorphologie aus. Dieses wird durch ein Überwiegen des Längs- gegenüber des Querwachstums des Gefäßes erklärt, so dass es zu einer vermehrten Stauchung mit Windungen des Gefäßrohres kommt. Betrachtet man die Lokalisation der Kollateralen, so liegen diese vornehmlich in drei Regionen. Zum einem im *M. quadriceps*, mehrere kleine Gefäße in den *Mm. adductores* sowie in der ischialen Muskelgruppe des Hinterlaufs. Der distale Anteil, der dem ursprünglichen Gefäßbett entspricht ist in rot

dargestellt. Auf der Gegenseite befindet sich die intakte *A. femoralis*, der erste mediale Gefäßabgang entspricht der *A. femoralis profunda*, im weiteren findet sich die Abzweigung in die *A. poplitea* sowie *A. tibialis anterior*. Die *Aa. Iliacae interna* und *externa* bilden im Becken ein nicht immer eindeutig zuzuordnendes Gefäßnetz; diese sind am Arteriogeneseprozeß nicht unmittelbar beteiligt. Desweiteren ist die *A. coccygea* mit dorsal gerichteten kleinen Segmentarterien zu finden, welche nochmals die hohe Auflösung verdeutlicht.

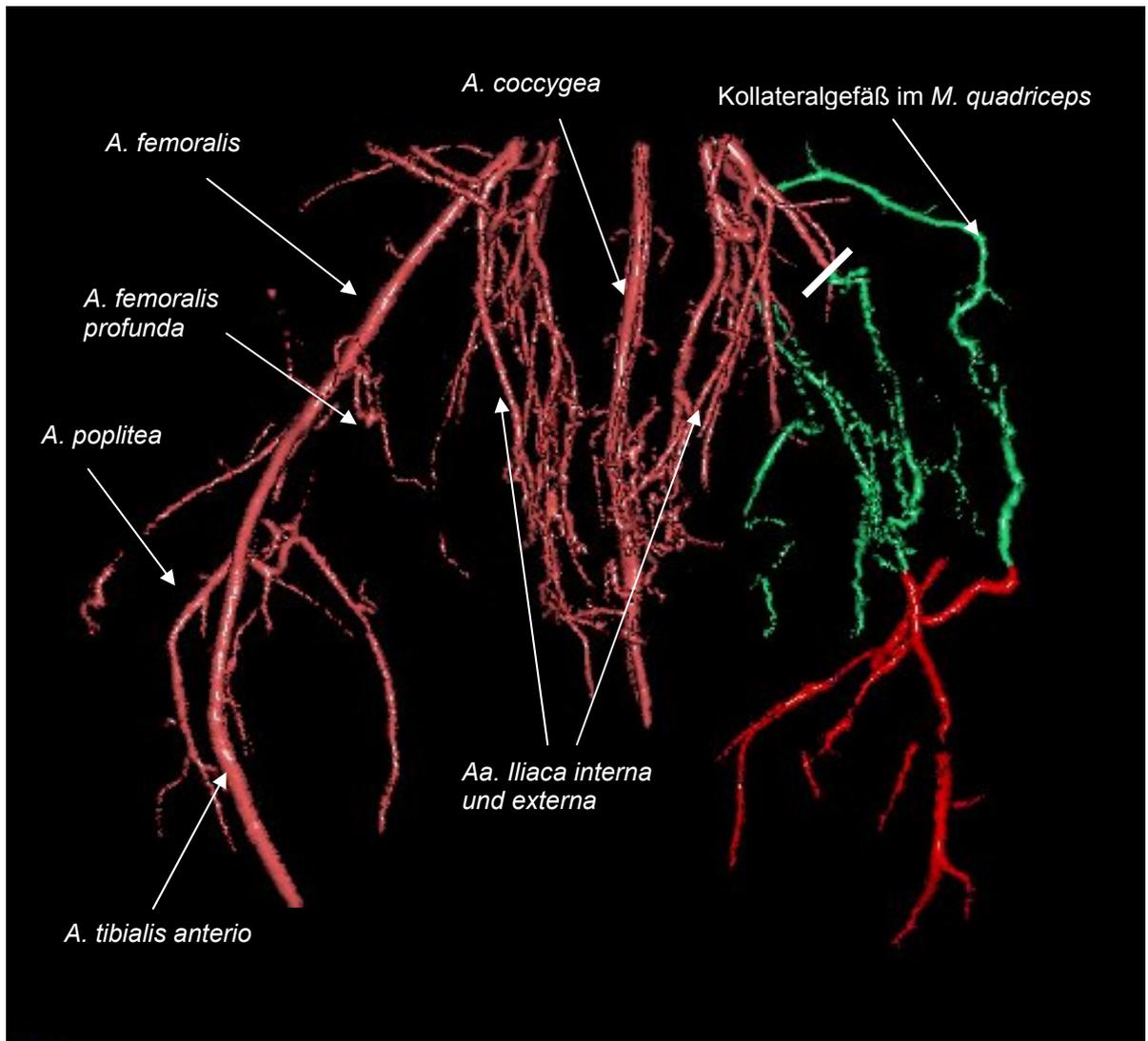
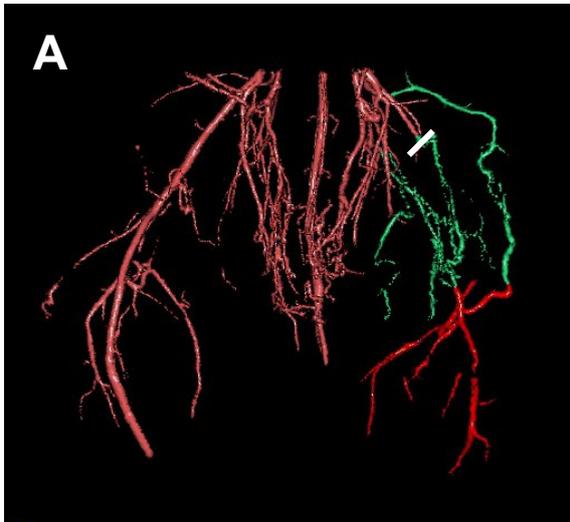
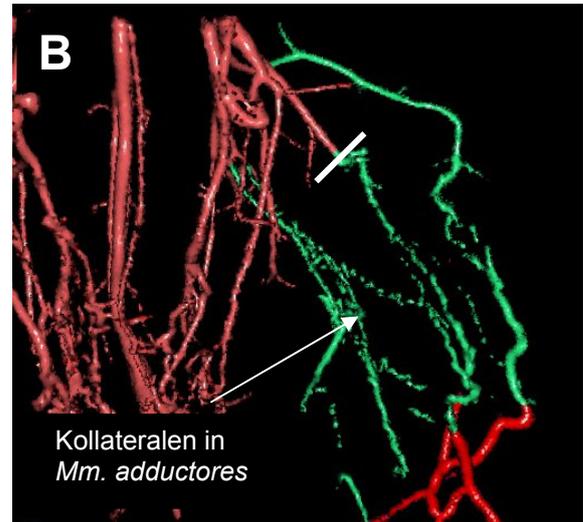


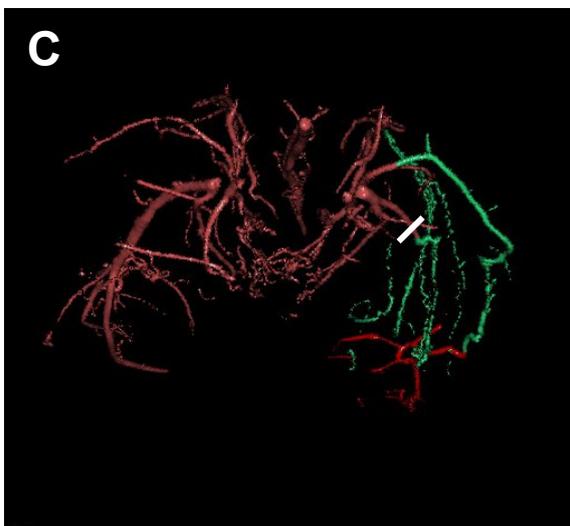
Abb. 3.6: Gefäßangiogramm des Hinterlaufs nach Oberflächenrendering mit den jeweiligen Gefäßbezeichnungen (siehe Text). Weißer Balken = Gefäßligatur.



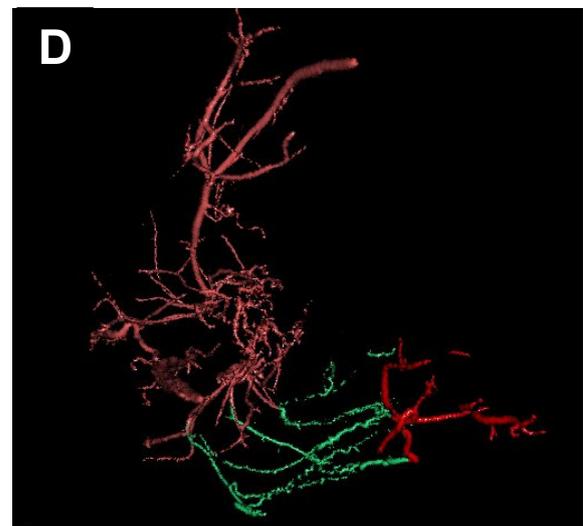
Frontale Projektion



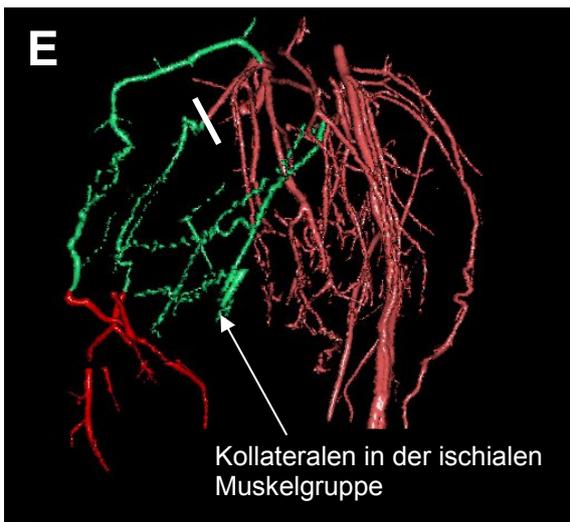
Zoom auf die Kollateralen
Kollateralen in
Mm. adductores



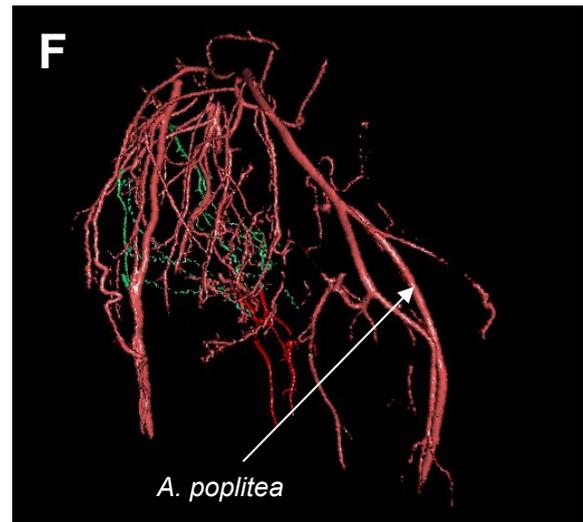
Projektion von cranial



Projektion von caudal



Projektion von posterolateral



Projektion von lateral
A. poplitea

Abb. 3.7: Repräsentative Ansichten des Gefäßangiogramms aus verschiedenen Projektionsebenen

3.3 Vergleich der Arteriogenese in beiden Versuchsgruppen

3.3.1 Methoden der Quantifizierung

Um Zahl und Größe der gebildeten Kollateralgefäße in den Versuchstieren exakt zu quantifizieren, wurde hierzu in den jeweiligen Tieren nach erfolgter Segmentierung der Gefäße das Gefäßvolumen der Kollateralen auf die nichtoperierte Seite bezogen und eine entsprechende Ratio berechnet (siehe Abb. 3.8). Die Berechnung dieser Verhältnisse dient zum Ausgleich von Schwankungen, die sowohl in den Messungen (Signal-zu-Rauschen) als auch in den einzelnen Tierindividuen (Größe, Gewicht) ihren Ursprung haben können. Die Kollateralgefäße wurden anhand ihrer Lokalisation und Form erkannt und durch ihre anatomischen Begrenzungen von *Stem-* und *Re-entry-Zone* eingegrenzt. Das Gefäßvolumen distal der *Re-entry-Zone* wurde nicht zu den Kollateralgefäßen gerechnet, da dieses dem ursprünglichen Gefäßverlauf entspricht und dementsprechend nicht direkt am Remodeling beteiligt ist (in Abb. 3.9 in Cyan dargestellt). In den folgenden Abbildungen sind die Kollateralgefäße in grüner und das Referenzvolumen der intakten Femoralarterie in blauer Farbe dargestellt. Um in den einzelnen Tieren ein vergleichbares Referenzvolumen zu erhalten, wurde dieses innerhalb spezifischer anatomischer Landmarken eingegrenzt. Dabei wurde als proximale Begrenzung der letzte Gefäßabgang im iliacalen Abschnitt der Femoralarterie, als distale die erste Verzweigung der *A. poplitea* verwendet.

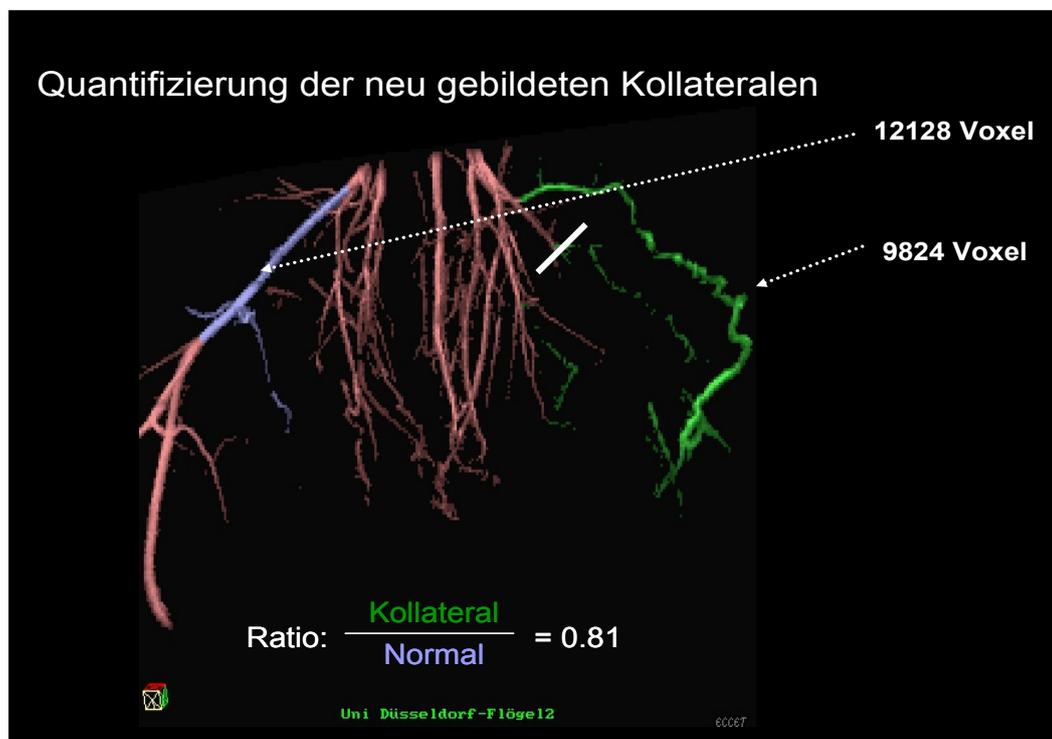


Abb. 3.8: Gefäßangiogramm des Hinterlaufs nach Bearbeitung mit Angiotux. (Weißer Balken=Ligatur) Die volumetrische Auswertung der Gefäße erfolgt nach Segmenten (Grün: Kollateralgefäß. Blau: Kontrollgefäß) und wird zur Bildung einer Ratio verwendet.

3.3.2 Ergebnis der angiographischen Daten im Wildtyp und CD73^{-/-}

In der Abb. 3.9 ist die Entwicklung der Arteriogenese anhand repräsentativer Angiogramme aus beiden Versuchsgruppen zu den jeweiligen Messzeitpunkten 3 Tage, 7 Tage, 14 Tage und 21 Tage nach Induktion der Hinterlaufschämie dargestellt. Es ist zu erkennen wie das Kollateralgefäßvolumen über die Zeit in beiden Gruppen zunimmt. In der CD73^{-/-}-Gruppe ist jedoch ein deutlich schnellerer Zuwachs des Gefäßvolumens auf der operierten Seite zu beobachten. Die Auswertung von fünf Versuchen bestätigen diesen Eindruck.

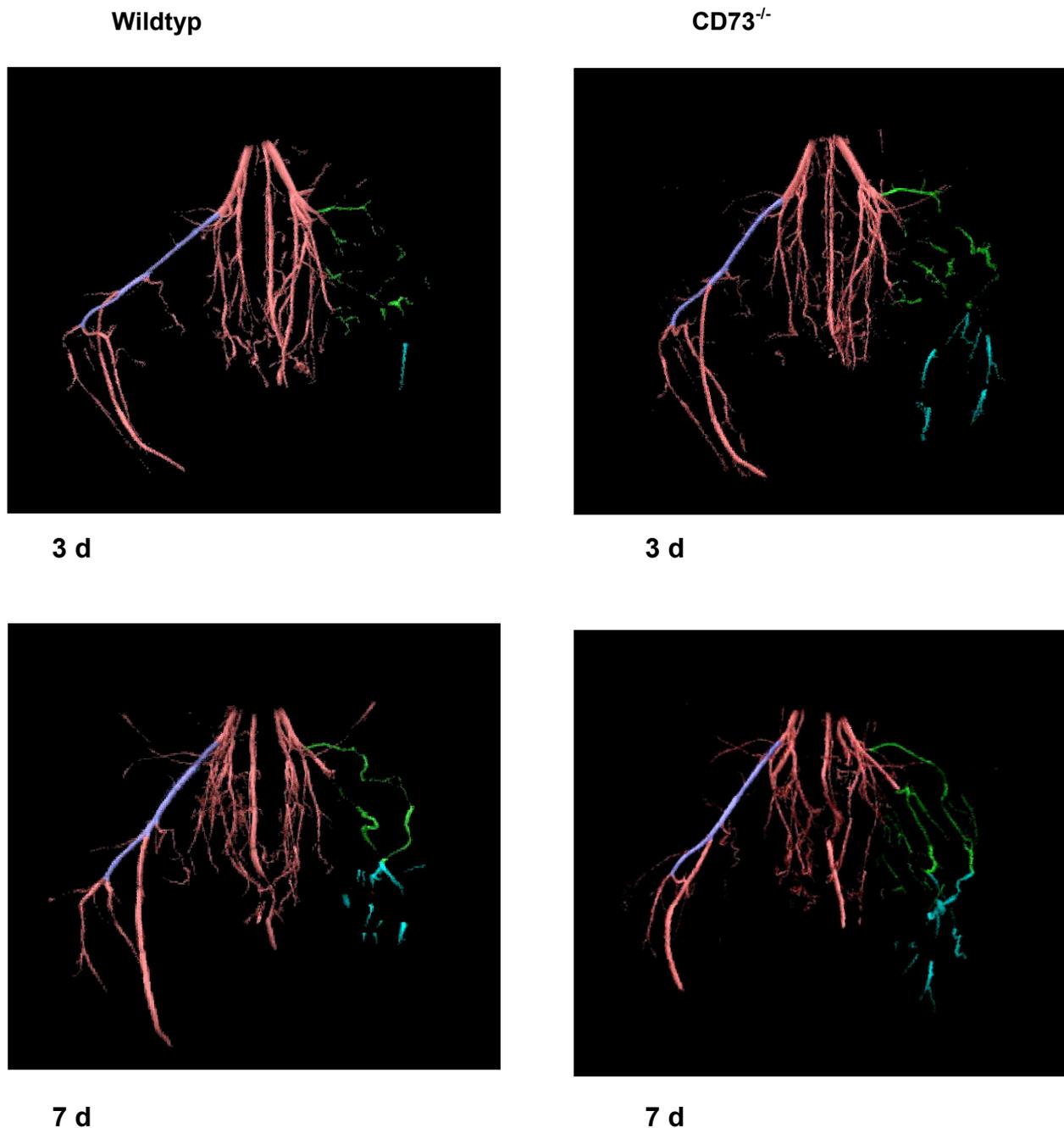
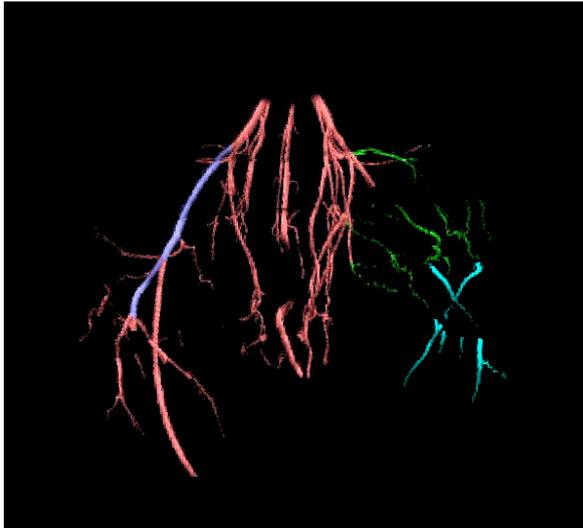


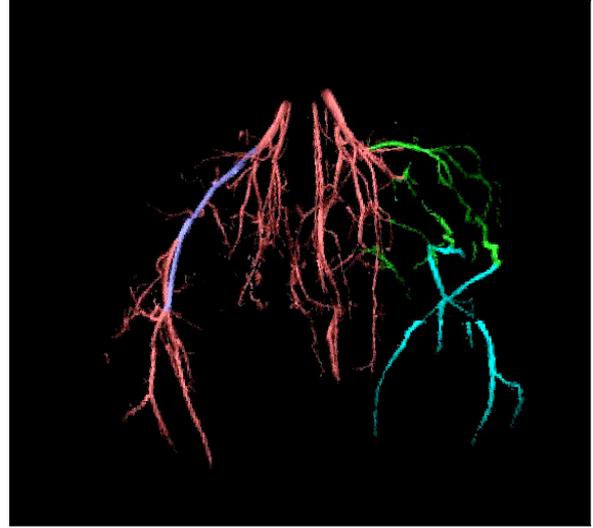
Abb. 3.9: Repräsentative angiographische Darstellungen der beiden Versuchsgruppen. Linke Seite: Wildtyp. Rechte Seite: CD73^{-/-}. *Abb. wird auf der Folgeseite fortgesetzt.*

Wildtyp

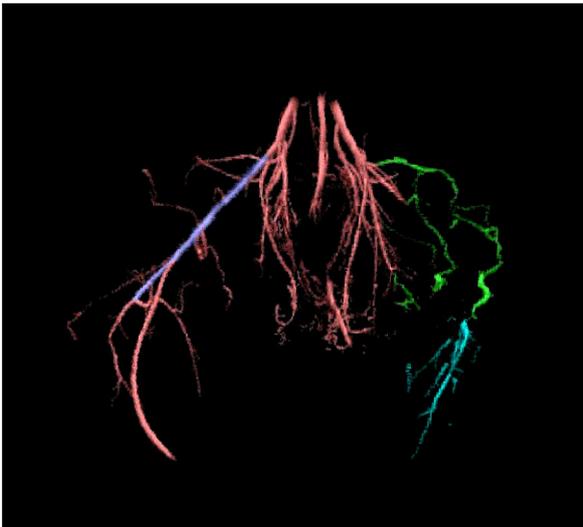


14 d

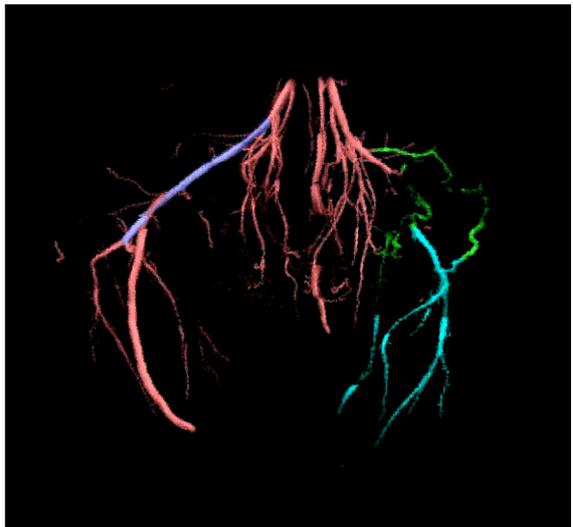
CD73^{-/-}



14 d



21 d



21 d

Abb. 3.9

Repräsentative angiographische Darstellung der Kollateralgefäßentwicklung in den beiden Versuchsgruppen. Links: Wildtyp. Rechts: CD73^{-/-}. Man erkennt die kontinuierliche Zunahme des Gefäßvolumens der operierten Seite in beiden Versuchsgruppen. Die Entwicklung der Kollateralgefäße scheint in der transgenen Gruppe schneller zu verlaufen, wie man anhand Anzahl und Größe der Gefäße an den Tagen 7 und 14 erkennen kann.

Die Quantifizierung aller Daten aus fünf Versuchen mit Hilfe der in den vorangegangenen Abschnitten vorgestellten Werkzeuge ist in Abb. 3.10 wiedergegeben. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Kollateralentwicklung anhand der berechneten Ratio zwischen Kollateralgefäßvolumen und intakter Femoralarterie (vgl. 3.3.1). Hierbei lässt sich ab Tag 3 nach Ligatur ein Trend zu einer verbesserten Kollateralentwicklung in der transgenen Gruppe erkennen. Dieser Unterschied ist am Tag 7 am deutlichsten (ca. 90% größere Ratio), wird dann jedoch geringer und ist nach 3 Wochen nicht mehr nachweisbar.

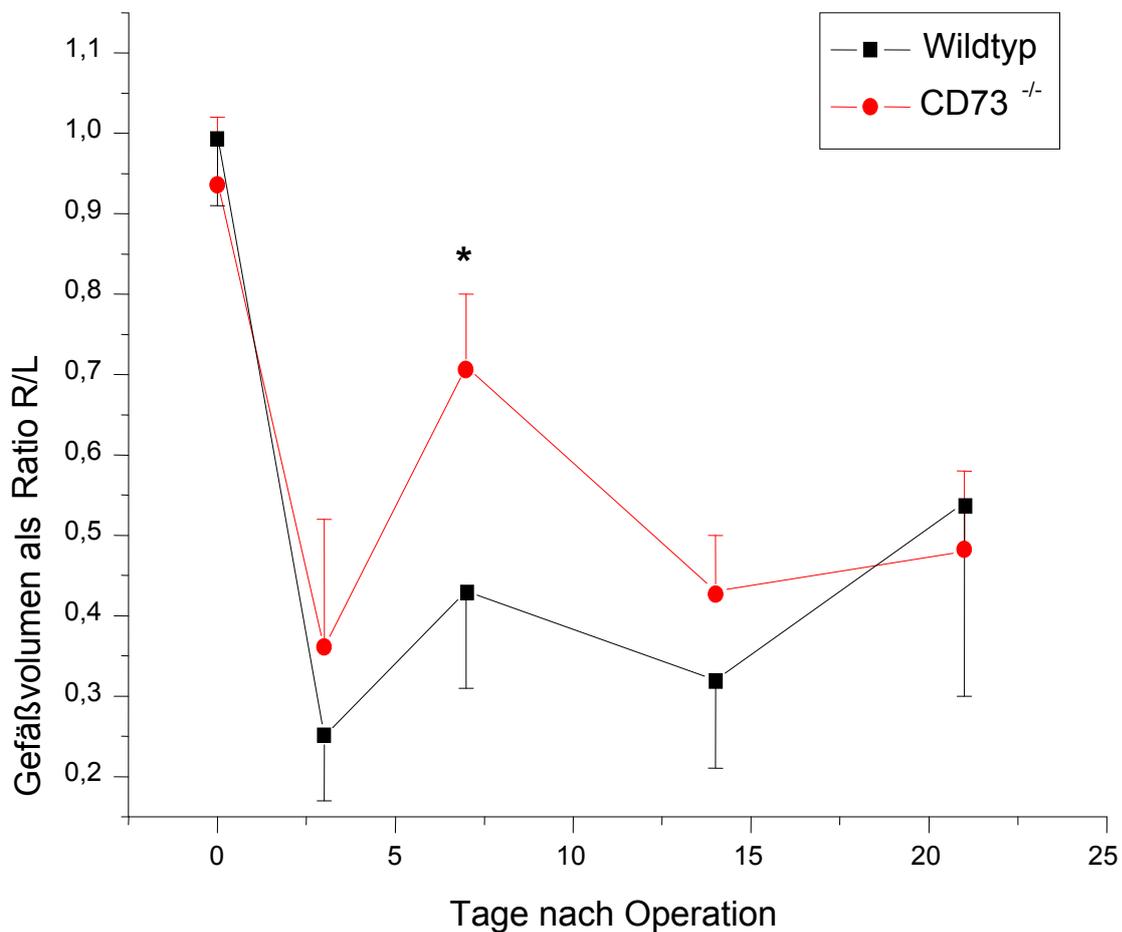


Abb. 3.10: Ergebnis der MR-Angiographie, * $p < 0,01$; $n = 5$. Nach Induktion der Hinterlaufischämie ist ein Absinken der gemessenen Ratio des Gefäßvolumens zu erkennen. In der Folge kommt es zu einem schnelleren Anwachsen des Kollateralgefäßvolumens in der Mutante als im Wildtyp.

3.4 Funktionelle und morphologische postoperative Entwicklung

Parallel zu den angiographischen Messungen wurden die Versuchstiere an den Tagen 3, 7, 14 und 21 nach Operation am Hinterlauf hinsichtlich verschiedener funktioneller Parameter, die im folgenden näher erläutert werden, untersucht. Nach Vergabe von Punkten für die aktive Benutzung des operierten Beins wurde der in der Abb. 3.11 gezeigte Graph für die zwei Versuchsgruppen erstellt. Es zeigt sich eine initiale schwere Funktionseinschränkung nach Operation und über den weiteren Verlauf eine nahezu vollständige Erholung aller Versuchstiere. Eine signifikant verbesserte Erholung für die CD73^{-/-}-Gruppe ist an Tag 7 zu erkennen. Dieser Unterschied zum Wildtyp verliert sich jedoch im weiteren Verlauf. Hinsichtlich der Untersuchung nach morphologischen Ischämiezeichen ergab sich kein Unterschied zwischen den zwei Versuchsgruppen, so dass auf eine Darstellung des Graphen verzichtet wurde. Einige Tiere zeigten dunkel verfärbte Zehen sowie kleine Hautirritationen, welche sich innerhalb der ersten Woche zurückentwickelten. Nekrosen oder gar Amputationen wurden bei keinem Tier beobachtet

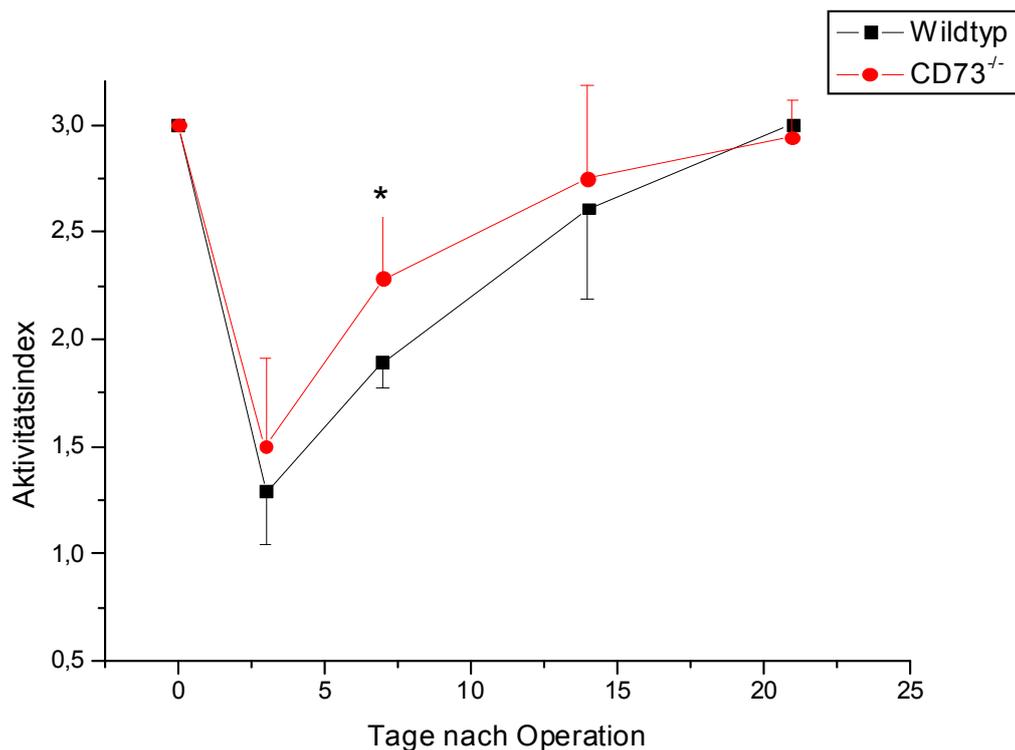


Abb. 3.11: Aktivitätsindex nach Induktion der Hinterlaufischämie im Wildtyp vs. CD73^{-/-}, * p<0,05; n=6.

Im weiteren wurde die Entwicklung des durchschnittlichen Körpergewichts der Tiere untersucht, Hier zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen im postoperativen Verlauf (Abb. 3.12). Die transient schnellere Kolla-

teralenentwicklung spiegelt sich im funktionellen Aktivitätsindex aber offensichtlich nicht in den übrigen Messparametern wider.

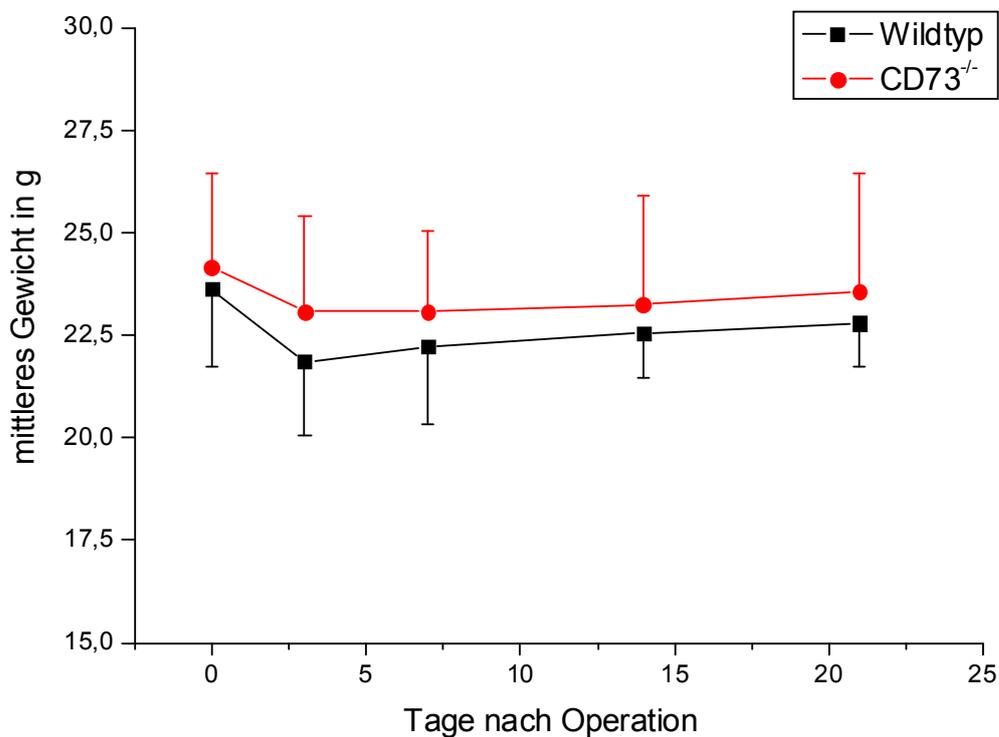


Abb. 3.12: Gewichtsentwicklung nach Operation Wildtyp vs. CD73^{-/-}; n=6

3.5 Untersuchungen zu Ödementwicklung und Energiestoffwechsel des operierten Hinterlaufs

3.5.1 Ödementwicklung

Als weiterer Parameter wurde die Größe des sich entwickelnden Ödems als Folge der Ischämie des Hinterlaufs quantifiziert. Hierzu wurden hochaufgelöste T1-gewichtete Spin-Echo-Aufnahmen über den gesamten Hinterlauf angefertigt und die Veränderung des Beinumfangs im Verlauf nach der Operation gemessen. Man erkennt in Abb. 3.13 die einzelnen Muskelgruppen im Unterschenkel des Hinterlaufs, wobei der dorsal gelegene *M. gastrocnemius* die größte Muskelmasse ausmacht. Nach anfänglich deutlicher Zunahme des Beinumfangs durch die entzündungsbedingte Ödembildung, verringert sich der Beinumfang in der Folge kontinuierlich bis er unterhalb des Ausgangswerts gemessen wird, welches wahrscheinlich die Atrophie des Muskelgewebes als Folge der Funktionseinschränkung widerspiegelt. Wie in Abb 3.14 zusammengefaßt zeigten sich weder in der ödematösen noch in der atrophischen Phase Unterschiede zwischen CD73^{-/-} und Wildtyp.

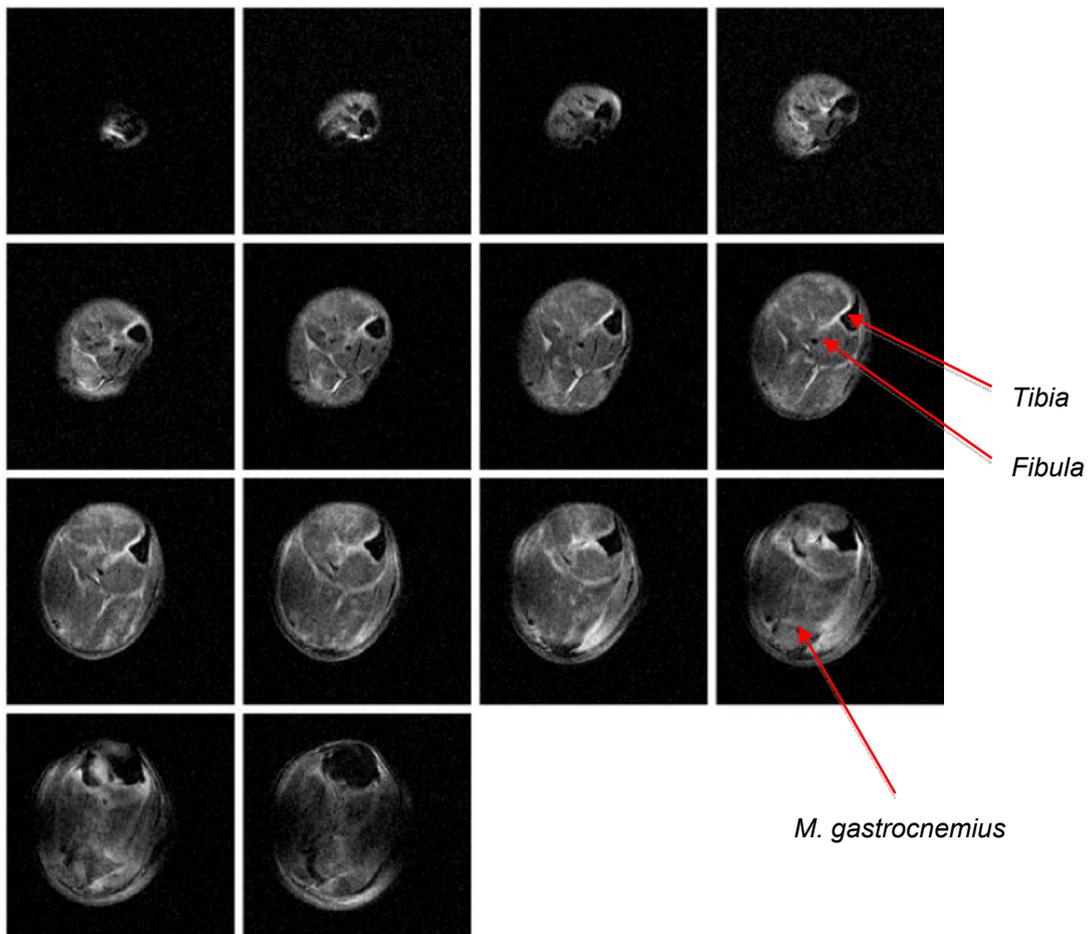


Abb. 3.13: Repräsentative Abbildung aneinandergrenzender T1-gewichteter axialer Schnitte durch den operierten Hinterlaufs an Tag 7 nach Ligatur. FoV 1,0×1,0 cm²; Matrix 128×128; isotrope Kantenlänge 0,78 mm)

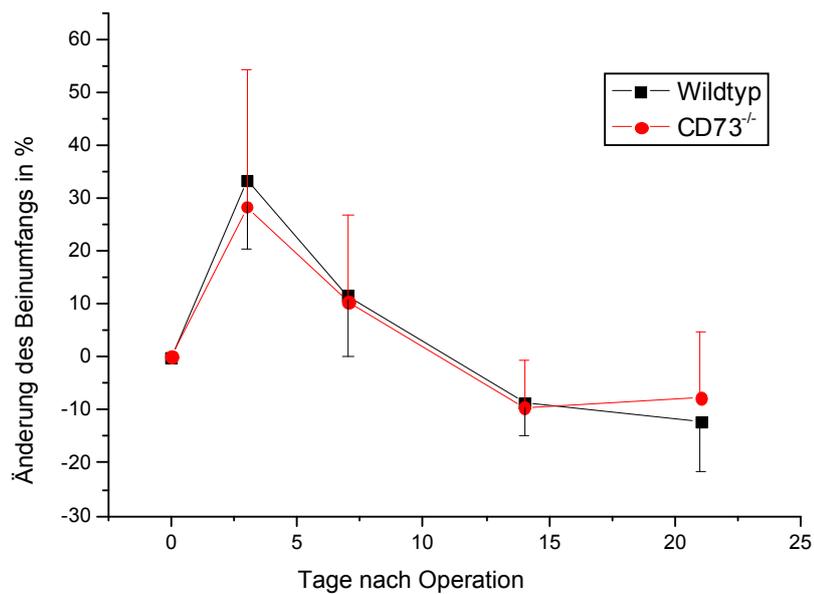


Abb. 3.14: Änderung des Beinumfangs als Zeichen der entzündungsbedingten Ödembildung und anschließenden Atrophie im Wildtyp und CD73^{-/-} nach Hinterlaufischämie; n=6.

3.5.2 Energiestoffwechsel

Zeitgleich zur angiographischen Darstellung der Gefäße wurden mit Hilfe der Phosphor-NMR-Spektroskopie die energiereichen Verbindungen ATP und Phosphokreatin spektroskopisch untersucht. Abb. 3.15 zeigt ein Spektrum eines nicht operierten Hinterlaufs, wobei eine quantitative Bestimmung der ATP- und Phosphokreatinmenge im Gewebe durch die Integration der Fläche unter den jeweiligen Peaks möglich ist. Die Phosphorspektren nach Induktion der Hinterlaufischämie in einer repräsentativen Wildtyp- und einer CD73^{-/-}-Maus sind in Abb. 3.16 dargestellt. Im Vergleich zum Wildtyp nimmt der Gewebegehalt von ATP aber auch von Phosphokreatin im Transgen direkt nach Induktion der Hinterlaufischämie weniger stark ab. Im weiteren Verlauf kommt es dann in beiden Gruppen zu einer kontinuierlichen Zunahme der Energieträger. Im CD73^{-/-} zeigt sich, ganz ähnlich wie bei den angiographischen Untersuchungen, eine eindeutig schnellere Wiederherstellung des Gehaltes an energiereichen Phosphatverbindungen. Die in Abb. 3.17 zusammengefasste quantitative Auswertung aller 8 Versuche belegt, dass sich am 7. und 14. postoperativen Tag, signifikante Unterschiede im Gewebegehalt von Phosphokreatin- sowie ATP-Spiegeln nachweisen lassen

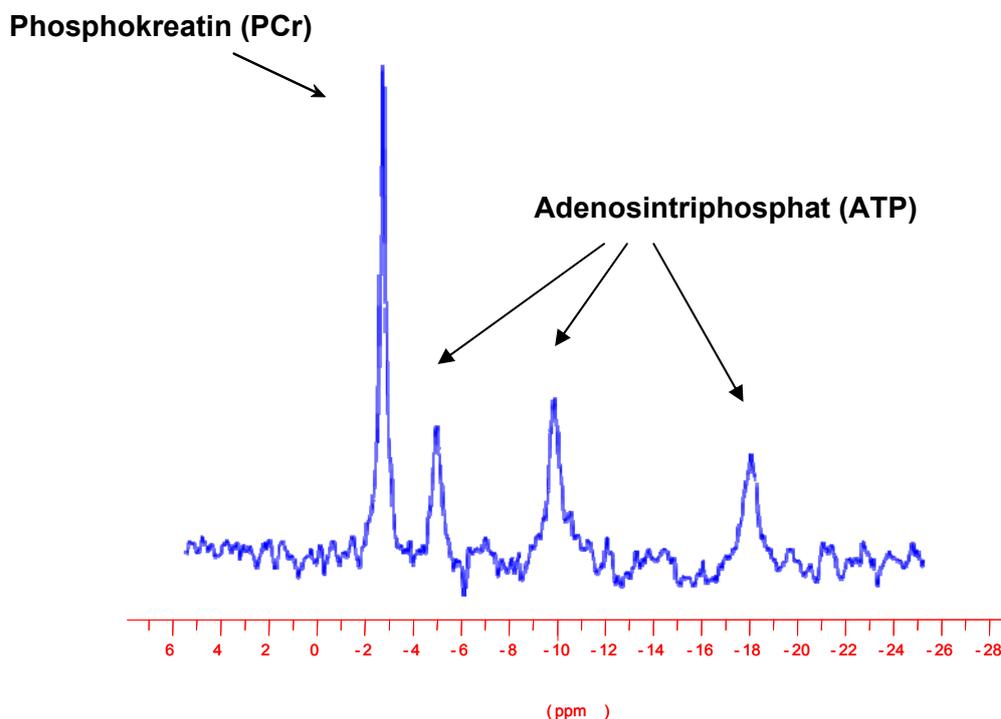


Abb. 3.15: Kontrollspektrum eines Hinterlaufs vor Hinterlaufischämie. Das prominente Signal resultiert von der Phosphorgruppe im Phosphokreatin. Die drei kleineren Signale stammen vom jeweiligen Phosphat in γ -, α - und β -Position im ATP-Molekül.

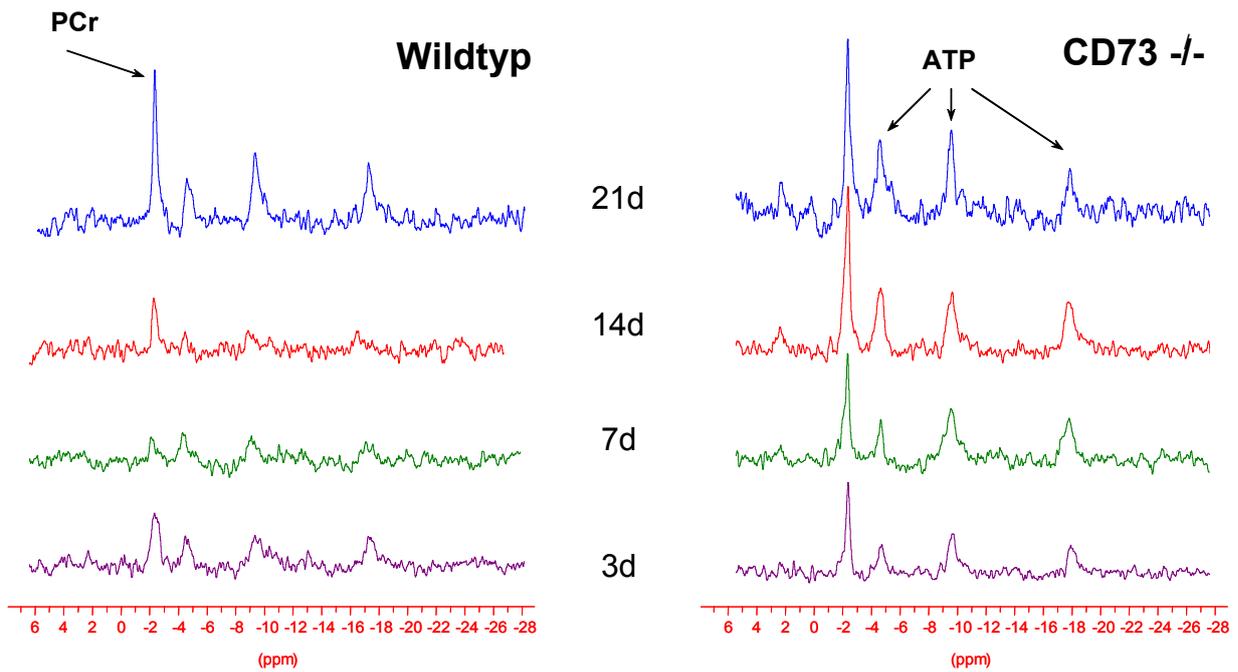


Abb. 3.16: ^{31}P -MR-Spektroskopie des operierten Hinterlaufs im Verlauf der Regeneration.

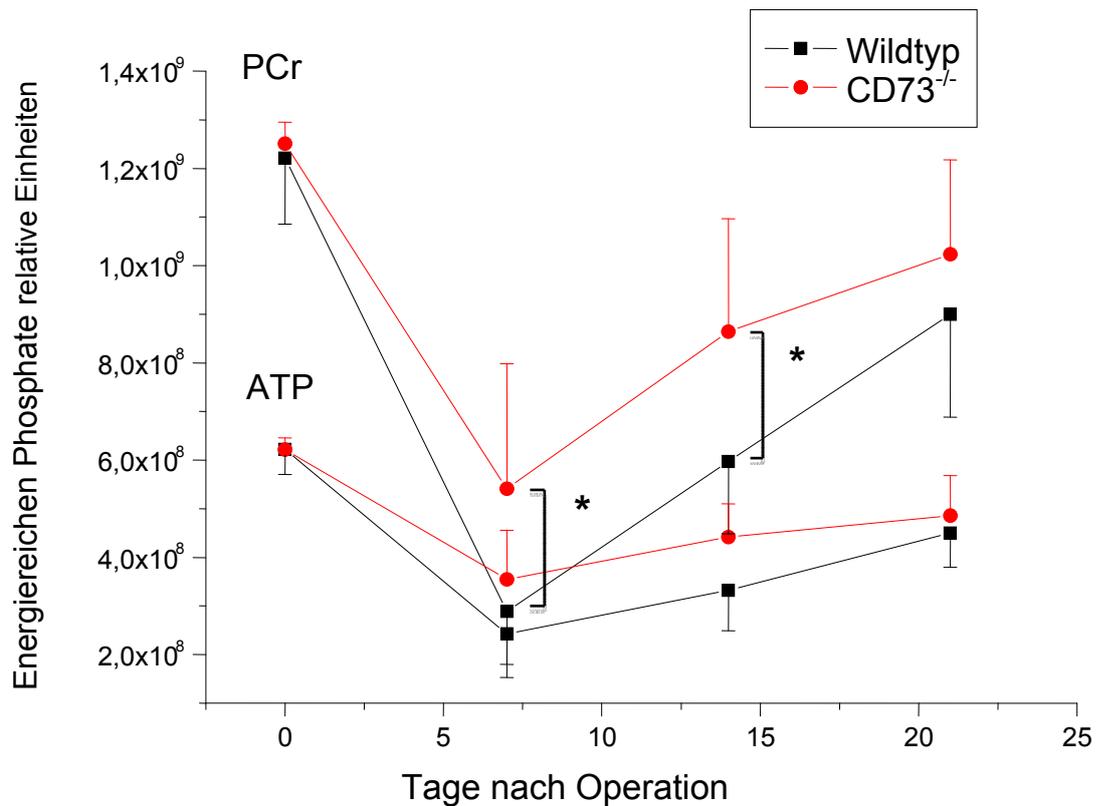


Abb. 3.17: Zeitverlauf der Veränderungen der energiereichen Phosphatverbindungen nach Hinterlaufischämie; * $p < 0,05$; $n = 8$.

3.6 Zusammenschau der *in-vivo* Messungen

Die *in vivo* Experimente ergeben in der Zusammenschau ein konsistentes Bild. Sowohl die angiographischen als auch die metabolischen Untersuchungen zeigen ein transient verbessertes Erholungsverhalten der Mutante. Dieses spiegelt sich auch in dem funktionellen Aktivitätsindex wider. Die Ödementwicklung in den beiden Versuchsgruppen liess jedoch keine Unterschiede erkennen..

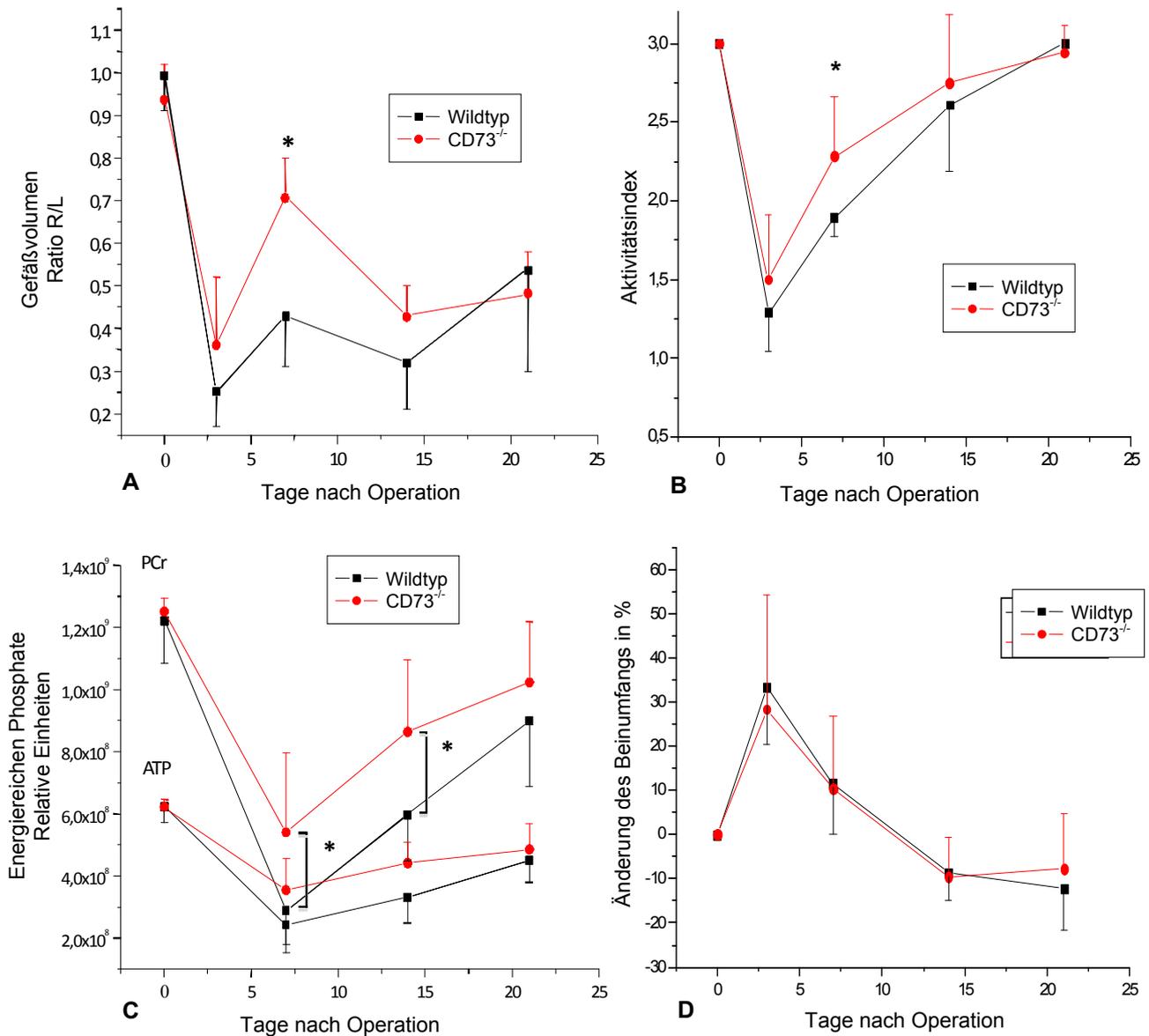


Abb. 3.18: Zusammenschau der funktionellen, angiographischen und metabolischen Ergebnisse in WT und CD73^{-/-} nach Hinterlaufischämie. A) Angiographie, B) Funktion C) energiereichen Phosphate und D) Ödembildung.

3.7 Histologische Ergebnisse

In Ergänzung der funktionellen Befunde wurden an Tag 7 nach Hinterlaufischämie, dem Zeitpunkt, an dem *in vivo* die größten Unterschiede gemessen wurden, in einer weiteren experimentellen Serie der ischämische Muskel histologisch untersucht.

Abb. 3.19 stellt repräsentative Kollateralgefäße einer Wildtyp-Maus und der CD73 Mutante dar. In grünelber Fluoreszenz (FITC) sind die glatten Muskelzellen des Kollateralgefäßes markiert, die Endothelzellen erscheinen hellrot (TRITC) und die DAPI-Färbung lässt die Kerne der umliegenden Zellen blau erscheinen. In insgesamt 8 Versuchen wurden der Innen-, Aussen- und Wanddiameter des Kollateralgefäßes bestimmt, zusätzlich erfolgte die Berechnung der Wandfläche des jeweiligen Gefäßes. Um einen besseren Vergleich zwischen den beiden Versuchsgruppen zu ermöglichen, wurden die Werte auf die Gefäßgröße der nicht-operierten Seite bezogen und eine Ratio berechnet. In Abb. 3.20 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammengefasst.

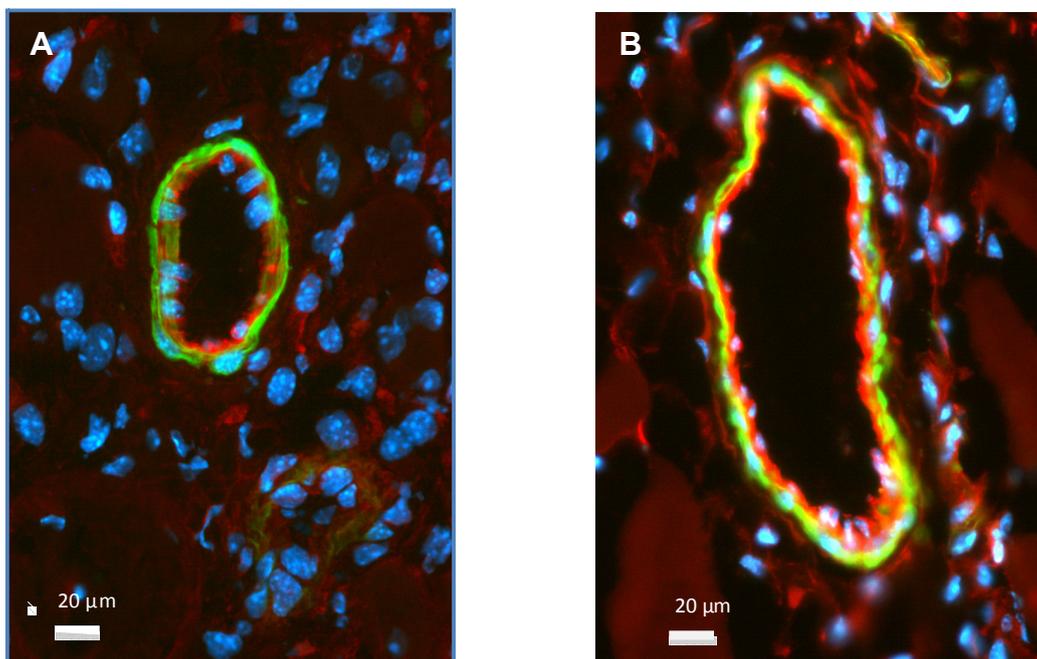


Abb. 3.19: Repräsentative Kollateralgefäße des operierten Hinterlaufs an Tag 7 nach Ligatur. A) Wildtyp und B) CD73^{-/-}. Mit grünelber Fluoreszenz (FITC) sind die glatten Muskelzellen markiert; Hellrot (TRITC), Endothelzellen; Blau, DAPI-Kernfärbung.

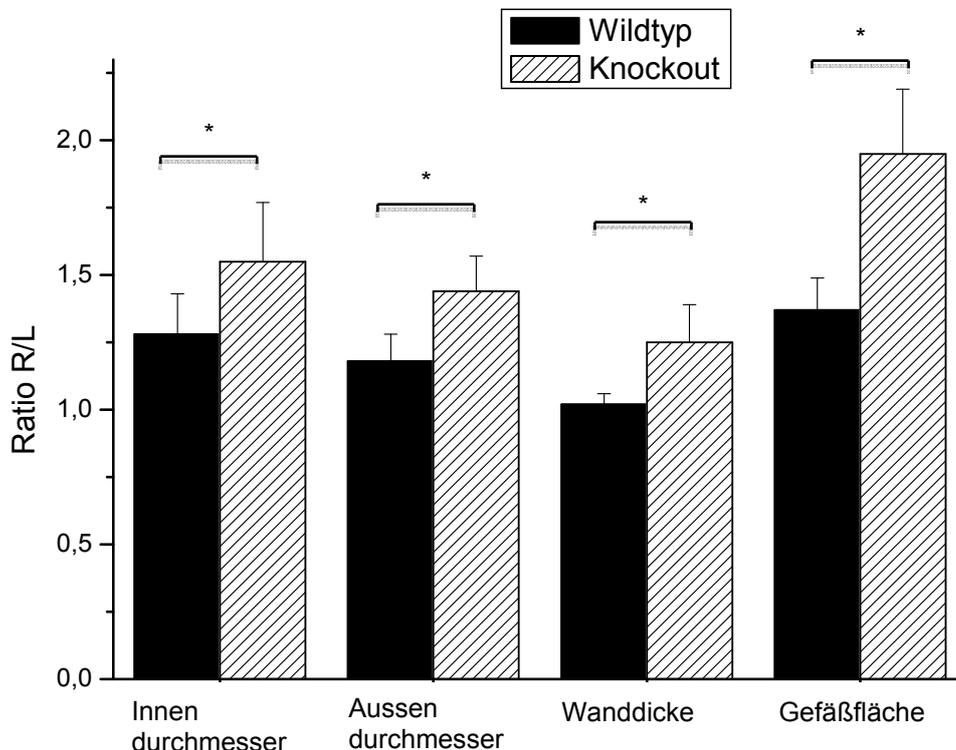


Abb. 3.20: Berechnete Ratio der Kollateralgefäßen in den histologischen Bildern an Tag 7 nach Operation;* $p < 0,05$, $n=8$.

Es zeigt sich in Übereinstimmung mit den *in vivo* Ergebnissen, dass in $CD73^{-/-}$ -Mäusen nach Hinterlaufischämie ein stärkeres Wachstum der Kollateralgefäße stattfindet. Am 7. postoperativen Tag ist die Ratio sowohl der Innen- wie auch der Aussendiameter der Kollateralgefäße in der $CD73$ Mutante signifikant höher als im Wildtyp. Dieser Unterschied findet sich auch in der Wanddicke. Am deutlichsten stellt sich der Unterschied zwischen den zwei Gruppen in den berechneten Wandflächen dar.

Zusätzlich wurde im Muskelgewebe am 7.Tag nach Hinterlaufischämie die Kapillardichte bestimmt. Wie Abb 3.21 zeigt, kommt es gegenüber der nichtoperierten Kontrollseite zu einer deutlichen Zunahme der Kapillardichte. Vergleicht man jedoch die Kapillardichte zwischen Wildtyp und $CD73^{-/-}$ nach Hinterlaufischämie, so finden sich keine Unterschiede zwischen beiden experimentellen Gruppen (Abb. 3.22)

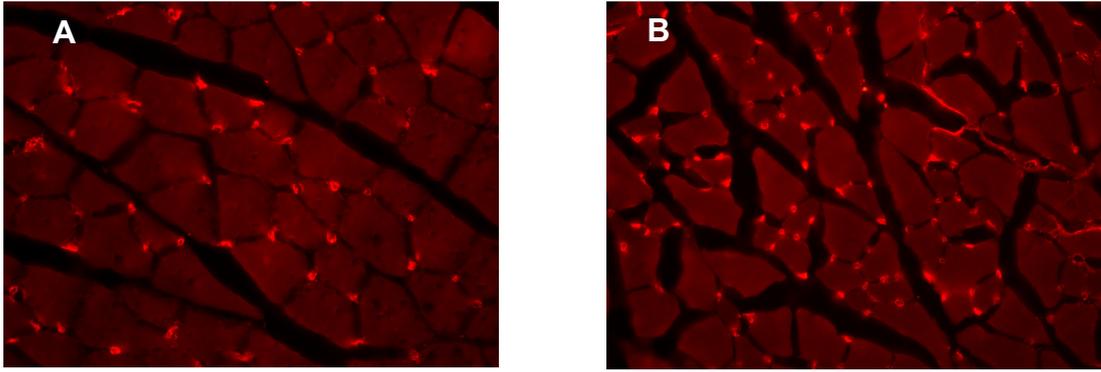


Abb. 3.21: *M. gastrocnemius* 7 Tage nach Induktion der Hinterlaufischämie: BS-1-lectin-Färbung der Kapillaren. A) Kontrollseite. B) Ischämische Region.

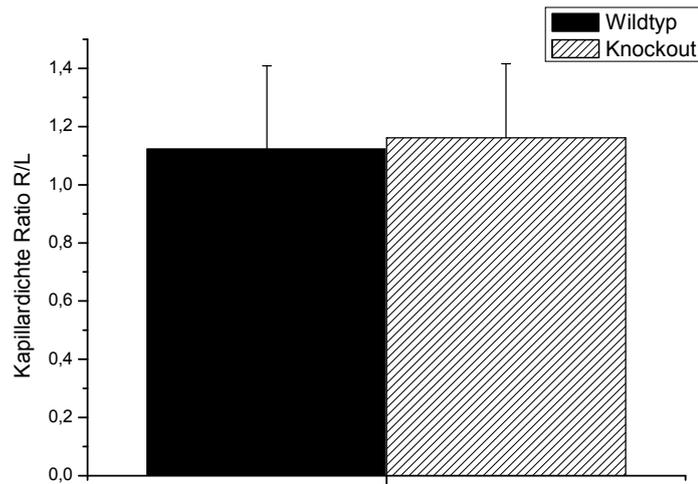


Abb. 3.22: Berechnete Ratio der Kapillardichte an Tag 7 nach Operation; n=8.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde ein reproduzierbares murines Hinterlauf-Ischämiemodell zur vergleichenden Beobachtung der Arteriogenese in Wildtyp und CD73^{-/-}-Tieren etabliert und ein MR-basiertes Messprotokoll entwickelt, welches mittels MR-Angiographie eine hochauflösende Darstellung des murinen Gefäßbaums erlaubt und die Detektion der sich entwickelnden Kollateralgefäße ermöglicht. Unter Verzicht auf ein Kontrastmittel konnten Tiere erstmals in seriellen Messungen untersucht und die Kollateralentwicklung im Prozeß der Arteriogenese über die Zeit kontinuierlich beobachtet werden. In den CD73^{-/-}-Mäusen fand sich mit diesem Verfahren 7 Tage nach Hinterlaufischämie eine verstärkte Kollateralgefäßbildung. Zusätzlich wurde der Energiestoffwechsel des ischämischen Hinterlaufs mittels ³¹P-MR-Spektroskopie im zeitlichen Verlauf verfolgt. Auch hier zeigten die transgenen Tiere eine schnellere Erholung und eine vermehrte aktive Fußbewegung, welches sich in einem höheren funktionellen Score ausdrückt. Abschliessende histologische Untersuchungen sind in Übereinstimmung mit den funktionellen *in vivo* Daten: Sie zeigen eine gesteigert Arteriogenese in den CD73-Verlustmutanten; allerdings war die Kapillardichte als Maß der Angiogenese zwischen beiden experimentellen Gruppen unverändert.

4.1 Analyse der Kollateralenbildung nach Hinterlaufischämie

Für das Studium des adaptiven Gefäßwachstums sind in der Vergangenheit verschiedene Tiermodelle und Methoden der Auswertung entwickelt worden. Die Gruppe um Isner hat für das Studium des Kollateralwachstums ein Ischämiemodell mittels Okklusion der Femoralarterie im Kaninchen schon Mitte der 90iger Jahre etabliert ^{54,55}, wobei die Auswertung mittels Röntgenangiographie und Histologie erfolgte. In nachfolgenden Arbeiten hat Couffinal et al ^{56,57} das Hinterlaufischämiemodell für die Maus angepasst und erstmals mittels serieller *Laser Doppler perfusion imaging* (LPDI) die zeitliche Entwicklung des Blutfluß als Maß für das Kollateralenwachstum bestimmt

Der Vorteil der Maus als Versuchstier liegt neben der einfachen Verfügbarkeit und Tierhaltung vor allen in der großen Anzahl vorhandener transgener Mausstämmen bzw. in der Möglichkeit solche zu generieren. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die verschiedenen Labormauslinien einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund besitzen und im unterschiedlichen Maße zur Arteriogenese befähigt sind. So konnte in der Arbeit von Helisch et al.⁵⁸ gezeigt werden, dass im systematischen Vergleich der Stämme 129S2/Sv, BALB/c und C57BL/6 für den zuletzt genannten Stamm ein schnelleres und für die BALB/c ein deutlich verlangsames Kollateralenwachstum zu beobachten ist. Schließlich

beeinflussen interindividuelle Unterschiede zwischen den Mäusen hinsichtlich der Anzahl präexistierender kollateraler Anastomosen den postoperativen Verlauf, wie in der Arbeit von Zbinden et al.⁵⁹ gezeigt werden konnte.

Die gängigen Methoden der Kollateralenquantifizierung sind *per se* Endpunktuntersuchungen, da sie mit der Tötung des Versuchstieres einhergehen. Die Auswertung des Kollateralenwachstums wird im allgemeinen und auch in dieser Arbeit anhand histologischer Schnittpreparate durchgeführt, wobei der Umfang der lokalisierten Arteriolen bestimmt wird und mit der unbehandelten Gegenseite in ein Verhältnis gesetzt wird. Ob diese morphologische Methode als Goldstandard zu betrachten ist, scheint eher fraglich. Neben einer unsicheren Erfassung der Zielgefäße im Präparat ist der Gefäßdurchmesser von der Vasoreaktivität abhängig und das Gefäß wird nicht immer senkrecht getroffen. Trotz dieser Nachteile ist die Histologie vor allem wegen immunohistochemischer Nachweismöglichkeiten unabdingbar. Die Verwendung von hochauflösenden Röntgenangiographien zur direkten Visualisierung des Kollateralgefäßnetzes im Hinterlauf der Maus ist eine etablierte Methode. Hierbei lassen sich die *post mortem* mit Kontrastmittel gefüllten Gefäße mit einer Auflösung bis zu 30-50 µm darstellen⁶⁰. Jedoch ist hierbei der Gefäßdiameter sehr vom Füllungsdruck bei Kontrastmittelapplikation abhängig. Zudem lassen sich die Versuchstiere nicht in longitudinalen Studien beobachten. Eine Variation dieser Methode sind Darstellungen der Kollateralen mittels micro-CT, welche inzwischen auch in sehr hoher Auflösung möglich sind und eine dreidimensionale Darstellung der Gefäße erlauben^{61,62}. Eine verlässliche Methode zur Messung des Blutflusses ist die Verwendung von Mikrosphären⁶³. Fluoreszenzmarkierte Mikrosphären werden intrakardial oder aortal appliziert, welche anschliessend im Kapillarnetz hängen bleiben und mittels Spektroskopie nach Gewebeextraktion quantifiziert werden⁶⁴. Gerade im Seitenvergleich lassen sich hierdurch Aussagen zu Perfusionsunterschieden auf Grund der Kollateralentwicklung treffen. Die Verwendung von Mikrosphären für die Hinterlaufischämie im Kleintiermodell der Maus ist jedoch sehr aufwändig und für serielle Messungen weniger geeignet.

Das von Couffinhal et al.^{56,57} verwendete LDPI -Verfahren erlaubte erstmals *in vivo* Messungen im Mausmodell über einen zeitlichen Verlauf zu erfassen. Die ursprünglichen Geräte hatten nur eine geringe Eindringtiefe (1-2 mm) und tiefer liegende Gefäße liessen sich daher nicht darstellen. Die neueren Scanner konnten hierin verbessert werden, jedoch begrenzt das zugrundeliegende Meßprinzip über den Dopplereffekt, welches bewegliche Teilchen in Abhängigkeit der Fliessrichtung und Geschwindigkeit durch Laserlichtreflexion misst, die Genauigkeit der Messung. Parameter wie Umgebungstemperatur, Vasokonstri-

tion, Hautpigmentation und das Fell beeinflussen wesentlich das Messergebnis wie vergleichende Perfusionmessungen mit Mikrosphären gezeigt haben⁶⁵.

Die Nutzung der MR-Angiographie im Kleintiermodell wurde erstmals von Beckmann et al zur Darstellung der Gefäßanatomie der Hirnarterien in Mäusen und Ratten beschrieben^{66,67}. Die Methode ermöglicht serielle nicht-invasive Messungen mit einer Auflösung bis zu 100 µm bei Verzicht auf ein Kontrastmittel. Wagner et al.⁶⁸ aus der Arbeitsgruppe Schaper verwendeten eine 2D-TOF-Sequenz um die Kollateralgefäße in einem murinen Hinterlaufischämie-Modell zu visualisieren. Durch Mehrfach-Akquisition konnte hierbei der Kontrast zum Hintergrundrauschen verstärkt werden und die Kollateralgefäße im Querschnitt sicher identifiziert werden. Eine 3-dimensionale Darstellung wurde über eine entsprechende Anordnung der 2-dimensionalen Schichten erreicht, welche in einer MIP-Angiographie resultierte und anschließend die Identifizierung der Kollateralen anhand ihrer Morphologie und Lokalisation erlaubte. Diese von Wagner et al. verwendete Methode ist jedoch weder in der Lage die Kollateralgefäße in isotroper noch in der gleich hohen Auflösung, wie in dieser Arbeit herausgearbeitet, darzustellen und somit eine exakte Volumenbestimmung zu ermöglichen.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine optimierte 3-dimensionale *in-flow*-Sequenz entwickelt, welche durch überlappende Schachtelung der Volumina auch Gefäße mit langsamem Blutfluß sicher identifiziert und die Kollateralen in einem mit 100 µm isotroper Voxelgröße hochauflösenden Gefäßangiogramm darstellt. Dabei ist die Detektion der Gefäße nicht auf 100 µm begrenzt, da auch kleinere Gefäße durch einen partiellen Volumeneffekt noch signalgebend sein können. Die Aufnahme in isotroper Auflösung ist gerade für eine genaue volumetrische Auswertung des sich verzweigenden Gefäßnetzes unabdingbar. Mit Hilfe der AngioTux-Software konnte neben der rein morphologischen Darstellung eine sinnvolle Quantifizierung der Gefäßvolumina durchgeführt werden, wobei keine Einzelbewertung der Gefäßdiameter stattfand, sondern das Gefäßvolumen der nicht-operierten Seite zum Kompensationsvolumen des sich entwickelnden Umgehungskreislaufs in Verhältnis gesetzt wurde. Dieses wurde zur Kompensation interindividueller Unterschiede (Größe, Gewicht, Gefäßtonus) der Tiere, unterschiedlicher Signalintensitäten aufgrund von partiellen Sättigungseffekten bei verschiedenen Flußgeschwindigkeiten sowie unter Umständen auftretenden Schwankungen des Signal-zu-Rauschen durchgeführt. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die so ermittelten Werte gut mit den histologischen Ergebnissen korrelieren⁶⁹. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden die zur Arteriogenese erhobenen *in vivo* Daten abschliessend anhand histologischer Schnittpräparate validiert.

Zusätzlich zu der rein morphologischen Darstellung wurde die ^{31}P -NMR-Spektroskopie eingesetzt, um die Auswirkungen der Arteriogenese für den Energiestoffwechsel des ischämischen Muskels zu untersuchen. Ein ähnliches Verfahren wurde erstmals von Chaliss et al.⁷⁰ bereits 1986 in einem Ischämiemodell der Ratte mit unilateraler Femorallegatur eingesetzt. Dabei wurde die Phosphokreatinkonzentration im distalen Muskelgewebe und deren Erholung nach Muskelstimulation bestimmt. Eine Anwendung dieses spektroskopischen Verfahrens für Mäuse ist aufgrund der geringen Muskelmasse in dieser Spezies schwierig und wurde bisher noch nicht für das Modell der Hinterlaufischämie eingesetzt.

Die in dieser Arbeit neu entwickelten Bildgebungsverfahren zur Beurteilung der Arteriogenese nach Hinterlaufischämie in Kombination mit spektroskopischen Messungen zum Energiestoffwechsel haben folgende biologisch relevante Fragen beantwortet:

- Mit Hilfe der 3D-MR-Angiographie konnte gezeigt werden, dass die $\text{CD73}^{-/-}$ -Mäuse eine verstärkte Arteriogenese zeigen, die am siebten Tag nach Hinterlaufischämie am ausgeprägtesten war.
- Das größere Konduktanzvolumen der Kollateralgefäße in der CD73 -Verlustmutante spiegelt sich auch in einem weniger starken Abfall der Konzentration von Phosphokreatin und ATP im betroffenen Muskel wieder.
- Durch serielle Messungen der gleichen Tiere über einen längeren Zeitraum war es möglich zu zeigen, dass der beobachtete Unterschied in der Perfusion und im Energiestoffwechsel transienter Natur ist und nach 3 Wochen nicht mehr nachweisbar ist.

4.2 Mechanismus der Arteriogenese in der $\text{CD73}^{-/-}$ Maus

Wie bereits in der Einleitung beschrieben scheint neben der initialen Scherstress-Erhöhung, die Adhäsion und Aktivierung von Monozyten an die Endothelzellen für den Beginn der Arteriogenese essentiell zu sein. So konnten Heil et al.¹² in verschiedenen Experimenten eine positive Korrelation zwischen der Konzentration zirkulierender Monozyten und der arteriogenen Antwort in Mäusen nachweisen. In der gleichen Arbeitsgruppe zeigte Ito et al.⁷¹, dass die Infusion von MCP-1 in gleicher Weise zu einer Steigerung der kollateralen Konduktanz führt. Entsprechend führte das Fehlen des entsprechenden Chemokinrezeptors CCR2 zu einer dramatischen Reduktion der Arteriogenese⁷². Schließlich konnte gezeigt werden, dass nach Hinterlaufischämie die Akkumulation der Monozyten an Tag 3 nach Operation am höchsten ist und mit gesteigerter bFGF-Produktion einhergeht¹¹, wobei bFGF dafür bekannt ist, das Kollateralenwachstum und die Angiogenese zu verstärken^{73,74}.

Hinzukommt dass Monozyten TNF- α sezernieren, welches die Expression von Zelladhäsionsmolekülen steigert^{75,76}. Neben den Monozyten sind aber noch weitere Zellen der Leukozytenpopulation wie CD4⁺ und Mastzellen für die Arteriogenese von wesentlicher Bedeutung^{77,78}.

In der Arbeit von Koszalka et al.³⁶ wird in einem Ischämie-Reperusionsmodell des *M. cremasters* eine vermehrte Leukozytenadhäsion an das Gefäßendothel in CD73^{-/-}-Mäusen beschrieben. Diese ist gegenüber dem Wildtyp um mehr als das Doppelte gesteigert und erreichte schon nach 10-15 min das Maximum. In weiteren Experimenten wurde gezeigt, dass in der *A. carotis*, welche *ex-vivo* mit Fluoreszenz-markierten Monozyten perfundiert wurde, im CD73-Knockout eine mehr als 6-fach höhere Akkumulation der Monozyten stattfindet. Diese Monozyten adhärten nicht nur, wie bei atherosklerotischen Läsionen typisch an der Bifurkation, sondern auch entlang der *A. carotis* wo geringere Scherkräfte vorherrschen. Die Adhäsion der Monozyten ist abhängig von der Interaktion von VLA4 (*very late antigen-4*), auch $\alpha_4\beta_1$ -Integrin genannt, mit VCAM-1 und wird durch Interleukin 8 (IL-8) getriggert⁷⁹. Bouma et al.⁸⁰ konnten zeigen, dass Adenosin die Ausschüttung von Interleukin 8 hemmt und die Expression von VCAM-1 reduziert. Da durch das Fehlen der CD73 in dem von uns untersuchten Mausmodell die extrazelluläre Adenosinkonzentration reduziert ist, könnte die in dieser Arbeit beschriebene gesteigerte Arteriogenese über die vorher beschriebene gesteigerte Monozytenadhäsion erklärt werden.

Cronstein et al. beschrieben schon 1986 dass Adenosin eine starke antiinflammatorische Potenz besitzt und die Aktivierung von Neutrophilen hemmt⁸¹. Außerdem ist bekannt, dass Adenosin über A2A-Rezeptoren die Expression von VLA-4 in Neutrophilen reduziert⁸² und die Ausschüttung von TNF- α vermindert⁸³. Hettinen et al.⁸⁴ konnten in ihren Experimenten weiterhin zeigen, dass adhärerende Lymphozyten die endotheliale Adenosinbildung durch direkte Hemmung der CD73-Aktivität reduzieren. Zusätzlich ist bekannt, dass Adenosin die Permeabilität des Endothels erniedrigt und die Barrierefunktion aufrecht erhält⁸⁵⁻⁸⁷.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Ekto-5'-Nukleotidase ein Schlüsselenzym in der Balance inflammatorischer und antiinflammatorischer Wirkungen des Purinstoffwechsels ist. Das Fehlen des an der endothelialen Oberfläche lokal gebildeten Adenosins und teilweise auch an den zirkulierenden Lymphozyten (5-15%), Monozyten und Granulozyten besitzen keine CD73-Aktivität, und das Überwiegen von ATP/ADP als Signalkleotid führt 1) zu einer vermehrten Rekrutierung von Monozyten und Neutrophilen, 2) zu einer gesteigerten Attraktion und Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen, 3) zu einer verstärkten Plättchenaktivierung und Aggregation^{32,88,89}, 4) zu einer Erhöhung der

endothelialen Permeabilität und somit 5) zu einer erleichterten leukozytären Transmigration. Die genannten Faktoren sind, wie in der Einleitung beschrieben, für den Arteriogeneseprozess von großer Bedeutung und könnten somit die nachgewiesene schnellere arteriogene Antwort in unserem CD73^{-/-}-Modell erklären. Synnestvedt et al.⁹⁰, konnten zeigen, dass Hypoxie über HIF-1 die Expression von CD73 steigert, da das CD73 Gen über eine HIF-1 sensitive Sequenz in seiner Promoterregion verfügt. Dieser Wirkmechanismus scheint aber im Prozess der Arteriogenese nur von geringer Bedeutung zu sein, da diese unabhängig von Gewebshypoxie stattfindet, wie die Arbeit von Deindl et al.⁹¹ demonstrieren konnte.

In unseren Experimenten konnte im distalen Gebiet der Okklusion im Bereich des *M. gastrocnemius*, ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Kapillardichte als Parameter der Ischämie getriggerten Angiogenese zwischen Wildtyp und CD73-Verlustmutante festgestellt werden. Das Maximum des Gefäßvolumens wird sowohl in der Mutante als auch im Wildtyp an Tag 7 nach Okklusion der Femoralarterie erreicht. Dieses deckt sich mit den Beobachtungen von Herzog et al.⁹², welche in einem Hinterlaufischämiemodell der Ratte ebenfalls nach 7 Tagen den maximalen Gefäßdurchmesser der Kollateralarterien feststellten. Sie beschreiben in ihrer Arbeit einen biphasischen Prozess des Kollateralenwachstums, wobei nach einer initial schnellen Proliferationsphase das Wachstum nach einer Woche sistiert und in einer Phase des Remodelings durch Neointimaformation und Zunahme der Gefäßwanddicke es sogar zu einem Rückgang des Gefäßdurchmessers kommt. Dies ist in Übereinstimmung mit den von uns gemachten Beobachtungen. Die anfängliche Steigerung der Arteriogenese im CD73^{-/-}-Tier (beinahe 90%) verliert sich in der Phase des Remodeling. Eine vermehrte Neointima-Bildung wie sie von Zerneck et al. im CD73^{-/-} mit vermehrter Expression von VCAM-1 nachgewiesen wurde³⁷ könnte hierfür eine mögliche Erklärung sein.

5 Zusammenfassung

Adenosin ist das Dephosphorylierungsprodukt von ATP, das als Signalmolekül auch extrazellulär entsteht und über einen ubiquitär ablaufenden Nukleotidkatabolismus bis zum Adenosin abgebaut wird. Adenosin wirkt über spezifische Adenosinrezeptoren und nachgeschaltete *second messenger* auf vielfältige Weise auf den Zellmetabolismus ein und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Gefäßtonus und bei Entzündungsreaktionen. Da die Rolle von Adenosin in der Arteriogenese bisher noch nicht näher untersucht war, wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe einer CD73-defizienten Maus, welche nicht in der Lage ist AMP zu Adenosin abzubauen, die Rolle von extrazellulär gebildetem Adenosin auf die Arteriogenese untersucht. Hierzu wurde ein reproduzierbares murines Hinterlaufischämiemodell durch einseitige Ligatur der Femoralarterie etabliert. Im Weiteren wurde ein neues MR-Protokoll ausgearbeitet, welches durch hochauflösende Angiographie des Hinterlaufs die direkte, kontinuierliche Darstellung der Kollateralgefäßentwicklung ermöglichte. Mit diesem Verfahren konnte gezeigt werden, dass die CD73-defizienten Tiere eine transient beschleunigte Kollateralentwicklung aufwiesen. Zusätzlich konnte mittels ³¹P-NMR-Spektroskopie gezeigt werden dass die Konzentration der energiereichen Phosphatverbindungen ATP und Phosphokreatin nach Hinterlaufischämie auf Grund der gesteigerten Arteriogenese weniger stark abfallen. Diese funktionellen Befunde konnten durch separate histologische *post-mortem* Analysen abgesichert werden: CD73^{-/-}-Mäuse bildeten Kollateralgefäße mit größeren Gefäßdurchmessern aus.

Aus unseren Ergebnissen läßt sich schliessen, dass extrazellulär gebildetes Adenosin ein wichtiger endogener Modulator der Arteriogenese ist. Wird Adenosin vermindert gebildet, wie z.B. bei der CD73^{-/-}-Maus, so führt dies zur Ausbildung eines proinflammatorischen Milieus am Gefäß mit konsekutiver proarteriogenen Wirkung.

6 Literaturverzeichnis

1. British Heartfoundation. European Cardiovascular Disease Statistics. b 2000.
2. Cao Y. Molecular mechanisms and therapeutic development of angiogenesis inhibitors. *Adv Cancer Res* 2008;100:113-31.
3. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997 Apr;386(6626):671-4.
4. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000 Feb;95(3):952-8.
5. Clark ER, Clark EL. Observations on living preformed blood vessels as seen in a transparent chamber inserted into the rabbit ear. *Am J Anat* 1932;(49): 441-7.
6. Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 1972;175(3):409-16.
7. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000 Apr;6(4):389-95.
8. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 1998 Jul;394(6692):485-90.
9. Carmeliet P, Moons L, Lutun A, Vincenti V, Compornolle V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H, Scholz D, Acker T, DiPalma T, Dewerchin M, Noel A, Stalmans I, Barra A, Blacher S, Vandendriessche T, Ponten A, Eriksson U, Plate KH, Foidart JM, Schaper W, Charnock-Jones DS, Hicklin DJ, Herbert JM, Collen D, Persico MG. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001 May;7(5):575-83.
10. Longland CJ. Collateral circulation in the limb. *Postgrad Med J* 1953 Sep;29(335):456-8.
11. Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest* 1998 Jan;101(1):40-50.
12. Heil M, Ziegelhoeffer T, Pipp F, Kostin S, Martin S, Clauss M, Schaper W. Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002 Dec;283(6):H2411-H2419.
13. Nilius B, Gerke V, Prenen J, Szucs G, Heinke S, Weber K, Droogmans G. Annexin II modulates volume-activated chloride currents in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1996 Nov;271(48):30631-6.
14. Drury AN, Szent-Györgyi A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* 1929;68:213-37.
15. Berne RM. Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. *Am J Physiol* 1963;204:317-22.
16. Berne RM, Knabb RM, Ely SW, Rubio R. Adenosine in the local regulation of blood flow: a brief overview. *Fed Proc* 1983;42:3136-42.
17. Ethier MF, Chander V, Dobson JG, Jr. Adenosine stimulates proliferation of human endothelial cells in culture. *Am J Physiol* 1993 Jul;265(1 Pt 2):H131-H138.

18. Grant MB, Davis MI, Caballero S, Feoktistov I, Biaggioni I, Belardinelli L. Proliferation, migration, and ERK activation in human retinal endothelial cells through A(2B) adenosine receptor stimulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001 Aug;42(9):2068-73.
19. Teuscher E, Weidlich V. Adenosine nucleotides, adenosine and adenine as angiogenesis factors. *Biomed Biochim Acta* 1985;44(3):493-5.
20. Adair TH, Montani JP, Strick DM, Guyton AC. Vascular development in chick embryos: a possible role for adenosine. *Am J Physiol* 1989 Jan;256(1 Pt 2):H240-H246.
21. Belardinelli R, Belardinelli L, Shryock JC. Effects of dipyridamole on coronary collateralization and myocardial perfusion in patients with ischaemic cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2001 Jul;22(14):1205-13.
22. Montesinos MC, Shaw JP, Yee H, Shamamian P, Cronstein BN. Adenosine A(2A) receptor activation promotes wound neovascularization by stimulating angiogenesis and vasculogenesis. *Am J Pathol* 2004 Jun;164(6):1887-92.
23. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 1998 Sep;50(3):413-92.
24. Obata T. Adenosine production and its interaction with protection of ischemic and reperfusion injury of the myocardium. *Life Sci* 2002 Sep;71(18):2083-103.
25. Ely SW, Berne RM. Protective effects of adenosine in myocardial ischemia. *Circulation* 1992 Mar;85(3):893-904.
26. Cronstein BN. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *J Appl Physiol* 1994 Jan;76(1):5-13.
27. Spychala J, Mitchell BS, Barankiewicz J. Adenosine metabolism during phorbol myristate acetate-mediated induction of HL-60 cell differentiation: changes in expression pattern of adenosine kinase, adenosine deaminase, and 5'-nucleotidase. *J Immunol* 1997 May;158(10):4947-52.
28. Burnstock G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. *Cell Membrane Receptors for Drug and Hormones: A multidisciplinary approach* ed Straub, R W & Bolis 1978;New York: Raven Press:107-18.
29. Burnstock G, Kennedy C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol* 1985;16(5):433-40.
30. [Anonymous]. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. *Lancet* 1996 Nov;348(9038):1329-39.
31. Boucher M, Pharand C, Skidmore B. A critical appraisal of the CURE trial: role of clopidogrel in non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. *Can J Clin Pharmacol* 2004;11(1):e156-e167.
32. Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, Torboli M, Bolognesi G, Baricordi OR. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 2001 Feb;97(3):587-600.
33. Kunapuli SP, Daniel JL. P2 receptor subtypes in the cardiovascular system. *Biochem J* 1998 Dec;336 (Pt 3):513-23.
34. MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A. Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity* 2001 Nov;15(5):825-35.

35. Le Feuvre RA, Brough D, Iwakura Y, Takeda K, Rothwell NJ. Priming of macrophages with lipopolysaccharide potentiates P2X7-mediated cell death via a caspase-1-dependent mechanism, independently of cytokine production. *J Biol Chem* 2002 Feb;277(5):3210-8.
36. Koszalka P, Ozuyaman B, Huo Y, Zerneck A, Fogel U, Braun N, Buchheiser A, Decking UK, Smith ML, Sevigny J, Gear A, Weber AA, Molojavyi A, Ding Z, Weber C, Ley K, Zimmermann H, Godecke A, Schrader J. Targeted disruption of cd73/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response. *Circ Res* 2004 Oct;95(8):814-21.
37. Zerneck A, Bidzhekov K, Ozuyaman B, Fraemohs L, Liehn EA, Luscher-Firzlaff JM, Luscher B, Schrader J, Weber C. CD73/ecto-5'-nucleotidase protects against vascular inflammation and neointima formation. *Circulation* 2006 May;113(17):2120-7.
38. Rabi II, Zacharias JR, Millman S, Kusch P. Milestones in magnetic resonance: 'a new method of measuring nuclear magnetic moment' . 1938. *J Magn Reson Imaging* 1992 Mar;2(2):131-3.
39. Bloch F, Hanson WW PM. Nuclear induction. *Phy Rev* 1946;69:127.
40. Purcell EM, Torrey HC, Pound RV. Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. *Pys Rev* 1946;69:37-8.
41. Lauterbur PC. Image Formation by Induced Local Interaction: Examples Employing Magnetic Resonance. *Nature* 1973 Mar;242:190-1.
42. Frahm J, Haase A, Matthaei D. Rapid NMR imaging of dynamic processes using the FLASH technique. *Magn Reson Med* 1986 Apr;3(2):321-7.
43. Edelman RR, Chien D, Atkinson DJ, Sandstrom J. Fast time-of-flight MR angiography with improved background suppression. *Radiology* 1991 Jun;179(3):867-70.
44. Atkinson D, Brant-Zawadzki M, Gillan G, Purdy D, Laub G. Improved MR angiography: magnetization transfer suppression with variable flip angle excitation and increased resolution. *Radiology* 1994 Mar;190(3):890-4.
45. Parker DL, Yuan C, Blatter DD. MR angiography by multiple thin slab 3D acquisition. *Magn Reson Med* 1991 Feb;17(2):434-51.
46. Edelman RR, Ahn SS, Chien D, Li W, Goldmann A, Mantello M, Kramer J, Kleefield J. Improved time-of-flight MR angiography of the brain with magnetization transfer contrast. *Radiology* 1992 Aug;184(2):395-9.
47. Rinck P.A. *Magnetic Resonance in Medicine: The Basic Textbook of the European Magnetic Resonance Forum*. Blackwell Verlag GmbH; 2001.
48. Koszalka P, Ozuyaman B, Huo Y, Zerneck A, Fogel U, Braun N, Buchheiser A, Decking UK, Smith ML, Sevigny J, Gear A, Weber AA, Molojavyi A, Ding Z, Weber C, Ley K, Zimmermann H, Godecke A, Schrader J. Targeted disruption of cd73/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response. *Circ Res* 2004 Oct;95(8):814-21.
49. Sansom JM, Wood PJ. P-31 MRS of Tumor Metabolism in Anesthetized Vs Conscious Mice. *Nmr in Biomedicine* 1994 Jun;7(4):167-71.
50. Cohnen M, Vogt C, Aurich V, Beck A, Haussinger D, Modder U. Multi-slice CT-colonography in low-dose technique--Preliminary results. *Rofo* 2002 Jul;174(7):835-8.
51. Andersen K, Blondin D, Beck A, Aurich V, Vogt C, Modder U, Cohnen M. [Assessment of two different software solutions for the evaluation of CT colonography]. *Rofo* 2005 Sep;177(9):1227-34.

52. Branschofsky M, Vogt C, Aurich V, Beck A, Modder U, Cohnen M. Feasibility of ultra-low-dose multi-detector-row CT-colonography: detection of artificial endoluminal lesions in an in-vitro-model with optimization of image quality using a noise reduction filter algorithm. *Eur J Med Res* 2006 Jan;11(1):13-9.
53. McLaren A. Some Causes of Variation of Body Temperatur in Mice. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* 1961;46:38-45.
54. Takeshita S, Gal D, Leclerc G, Pickering JG, Riessen R, Weir L, Isner JM. Increased gene expression after liposome-mediated arterial gene transfer associated with intimal smooth muscle cell proliferation. In vitro and in vivo findings in a rabbit model of vascular injury. *J Clin Invest* 1994 Feb;93(2):652-61.
55. Takeshita S, Rossow ST, Kearney M, Zheng LP, Bauters C, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Time course of increased cellular proliferation in collateral arteries after administration of vascular endothelial growth factor in a rabbit model of lower limb vascular insufficiency. *Am J Pathol* 1995 Dec;147(6):1649-60.
56. Couffinhal T, Kearney M, Witzenbichler B, Chen D, Murohara T, Losordo DW, Symes J, Isner JM. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) in normal and atherosclerotic human arteries. *Am J Pathol* 1997 May;150(5):1673-85.
57. Couffinhal T, Silver M, Kearney M, Sullivan A, Witzenbichler B, Magner M, Annex B, Peters K, Isner JM. Impaired collateral vessel development associated with reduced expression of vascular endothelial growth factor in ApoE^{-/-} mice. *Circulation* 1999 Jun;99(24):3188-98.
58. Helisch A, Wagner S, Khan N, Drinane M, Wolfram S, Heil M, Ziegelhoeffer T, Brandt U, Pearlman JD, Swartz HM, Schaper W. Impact of mouse strain differences in innate hindlimb collateral vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 Mar;26(3):520-6.
59. Zbinden S, Clavijo LC, Kantor B, Morsli H, Cortes GA, Andrews JA, Jang GJ, Burnett MS, Epstein SE. Interanimal variability in preexisting collaterals is a major factor determining outcome in experimental angiogenesis trials. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007 Apr;292(4):H1891-H1897.
60. Hoefer IE, van Royen N, Jost MM. Experimental models of arteriogenesis: differences and implications. *Lab Anim (NY)* 2006 Feb;35(2):36-44.
61. Duvall CL, Taylor WR, Weiss D, Guldberg RE. Quantitative microcomputed tomography analysis of collateral vessel development after ischemic injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004 Jul;287(1):H302-H310.
62. Li W, Shen W, Gill R, Corbly A, Jones B, Belagaje R, Zhang Y, Tang S, Chen Y, Zhai Y, Wang G, Wagle A, Hui K, Westmore M, Hanson J, Chen YF, Simons M, Singh J. High-resolution quantitative computed tomography demonstrating selective enhancement of medium-size collaterals by placental growth factor-1 in the mouse ischemic hindlimb. *Circulation* 2006 May;113(20):2445-53.
63. Barbee RW, Perry BD, Re RN, Murgo JP. Microsphere and dilution techniques for the determination of blood flows and volumes in conscious mice. *Am J Physiol* 1992 Sep;263(3 Pt 2):R728-R733.
64. Hale SL, Alker KJ, Kloner RA. Evaluation of nonradioactive, colored microspheres for measurement of regional myocardial blood flow in dogs. *Circulation* 1988 Aug;78(2):428-34.
65. Hoefer IE, van Royen N, Rectenwald JE, Bray EJ, Abouhamze Z, Moldawer LL, Voskuil M, Piek JJ, Buschmann IR, Ozaki CK. Direct evidence for tumor necrosis factor-alpha signaling in arteriogenesis. *Circulation* 2002 Apr;105(14):1639-41.

66. Beckmann N, Stirnimann R, Bochelen D. High-resolution magnetic resonance angiography of the mouse brain: application to murine focal cerebral ischemia models. *J Magn Reson* 1999 Oct;140(2):442-50.
67. Reese T, Bochelen D, Sauter A, Beckmann N, Rudin M. Magnetic resonance angiography of the rat cerebrovascular system without the use of contrast agents. *NMR Biomed* 1999 Jun;12(4):189-96.
68. Wagner S, Helisch A, Ziegelhoeffer T, Bachmann G, Schaper W. Magnetic resonance angiography of collateral vessels in a murine femoral artery ligation model. *NMR Biomed* 2004 Feb;17(1):21-7.
69. Jacoby C, Böring Y.C., Beck A., Zerneck A, Aurich V., Weber C., Schrader J, Flögel U. Dynamic changes in murine vessel geometry assessed by high resolution magnetic resonance angiography: a 9.4 T study. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 2008;in Druck.
70. Challiss RA, Hayes DJ, Petty RF, Radda GK. An investigation of arterial insufficiency in rat hindlimb. A combined ³¹P-n.m.r. and bloodflow study. *Biochem J* 1986 Jun;236(2):461-7.
71. 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 Jun;80(6):829-37.
72. Heil M, Ziegelhoeffer T, Wagner S, Fernandez B, Helisch A, Martin S, Tribulova S, Kuziel WA, Bachmann G, Schaper W. Collateral artery growth (arteriogenesis) after experimental arterial occlusion is impaired in mice lacking CC-chemokine receptor-2. *Circ Res* 2004 Mar;94(5):671-7.
73. Lazarous DF, Scheinowitz M, Shou M, Hodge E, Rajanayagam S, Hunsberger S, Robison WG, Jr., Stiber JA, Correa R, Epstein SE, . Effects of chronic systemic administration of basic fibroblast growth factor on collateral development in the canine heart. *Circulation* 1995 Jan;91(1):145-53.
74. 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 a canine model. *Am J Physiol* 1994 Apr;266(4 Pt 2):H1588-H1595.
75. Neumann B, Machleidt T, Lifka A, Pfeffer K, Vestweber D, Mak TW, Holzmann B, Kronke M. Crucial role of 55-kilodalton TNF receptor in TNF-induced adhesion molecule expression and leukocyte organ infiltration. *J Immunol* 1996 Feb;156(4):1587-93.
76. Mackay F, Loetscher H, Stueber D, Gehr G, Lesslauer W. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55. *J Exp Med* 1993 May;177(5):1277-86.
77. Wolf C, Cai WJ, Vosschulte R, Koltai S, Mousavipour D, Scholz D, Afsah-Hedjri A, Schaper W, Schaper J. Vascular remodeling and altered protein expression during growth of coronary collateral arteries. *J Mol Cell Cardiol* 1998 Nov;30(11):2291-305.
78. Stabile E, Burnett MS, Watkins C, Kinnaid T, Bachis A, la Sala A, Miller JM, Shou M, Epstein SE, Fuchs S. Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in CD4-knockout mice. *Circulation* 2003 Jul;108(2):205-10.
79. Huo Y, Hafezi-Moghadam A, Ley K. Role of vascular cell adhesion molecule-1 and fibronectin connecting segment-1 in monocyte rolling and adhesion on early atherosclerotic lesions. *Circ Res* 2000 Jul;87(2):153-9.
80. Bouma MG, van den Wildenberg FA, Buurman WA. Adenosine inhibits cytokine release and expression of adhesion molecules by activated human endothelial cells. *Am J Physiol* 1996 Feb;270(2 Pt 1):C522-C529.

81. Cronstein BN, Levin RI, Belanoff J, Weissmann G, Hirschhorn R. Adenosine: an endogenous inhibitor of neutrophil-mediated injury to endothelial cells. *J Clin Invest* 1986 Sep;78(3):760-70.
82. Sullivan GW, Lee DD, Ross WG, DiVietro JA, Lappas CM, Lawrence MB, Linden J. Activation of A2A adenosine receptors inhibits expression of alpha 4/beta 1 integrin (very late antigen-4) on stimulated human neutrophils. *J Leukoc Biol* 2004 Jan;75(1):127-34.
83. Kreckler LM, Wan TC, Ge ZD, Auchampach JA. Adenosine inhibits tumor necrosis factor-alpha release from mouse peritoneal macrophages via A2A and A2B but not the A3 adenosine receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2006 Apr;317(1):172-80.
84. Henttinen T, Jalkanen S, Yegutkin GG. Adherent leukocytes prevent adenosine formation and impair endothelial barrier function by Ecto-5'-nucleotidase/CD73-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2003 Jul;278(27):24888-95.
85. Lennon PF, Taylor CT, Stahl GL, Colgan SP. Neutrophil-derived 5'-adenosine monophosphate promotes endothelial barrier function via CD73-mediated conversion to adenosine and endothelial A2B receptor activation. *J Exp Med* 1998 Oct;188(8):1433-43.
86. Haselton FR, Alexander JS. Platelets and a platelet-released factor enhance endothelial barrier. *Am J Physiol* 1992 Dec;263(6 Pt 1):L670-L678.
87. Thompson LF, Eltzschig HK, Ibla JC, Van De Wiele CJ, Resta R, Morote-Garcia JC, Colgan SP. Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *J Exp Med* 2004 Dec;200(11):1395-405.
88. Guckelberger O, Sun XF, Sevigny J, Imai M, Kaczmarek E, Enjyoji K, Kruskal JB, Robson SC. Beneficial effects of CD39/ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 in murine intestinal ischemia-reperfusion injury. *Thromb Haemost* 2004 Mar;91(3):576-86.
89. Marcus A, Broekman M, Drosopoulos J, Pinsky D, Islam N, Gayle R, III, Maliszewski C. Thromboregulation by endothelial cells: significance for occlusive vascular diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001 Feb;21(2):178-82.
90. Synnestvedt K, Furuta GT, Comerford KM, Louis N, Karhausen J, Eltzschig HK, Hansen KR, Thompson LF, Colgan SP. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J Clin Invest* 2002 Oct;110(7):993-1002.
91. Deindl E, Buschmann I, Hofer IE, Podzuweit T, Boengler K, Vogel S, van Royen N, Fernandez B, Schaper W. Role of ischemia and of hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit. *Circ Res* 2001 Oct;89(9):779-86.
92. Herzog S, Sager H, Khmelevski E, Deylig A, Ito WD. Collateral arteries grow from preexisting anastomoses in the rat hindlimb. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002 Nov;283(5):H2012-H2020.

7 Danksagung

Ich möchte mich bei allen die für das Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben bedanken. Ganz besonders möchte ich mich bei **Prof. Dr. med. Jürgen Schrader** für die Bereitstellung des Themas sowie die stetige Unterstützung in der Planung und Durchführung dieser Arbeit bedanken.

Ich danke meinem Betreuer **Dr. Ulrich Flögel** für die große Geduld und die Bemühungen, mit der er zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat. Durch viele Anregungen und seine große Diskussionsbereitschaft hat er mich maßgeblich in der Durchführung und Auswertung der Experimente sowie in der Erstellung des Manuskriptes und der Vorbereitung zu Fachvorträgen unterstützt.

Ich bedanke mich bei **Dr. Christoph Jacoby** für seine große Diskussionsbereitschaft und Hilfestellung in der Einarbeitung zum Thema. Ich danke **Dr. Zaopin Ding** für die Erläuterung der Operationsmethoden und Frau **Jutta Ziemann** und Frau **Dr. Emde** für die labortechnische Unterstützung und Einarbeitung sowie allen Mitarbeitern des Instituts für die gute Arbeitsatmosphäre.

Ich möchte mich bei **Dr. Beck** für die Hilfestellung und Optimierung seines Softwareprogramms bedanken. Ich danke ganz herzlich **Dr. Heil**, **Dr. Tribulova** und Frau **Sandra Rühl** in Bad Nauheim für die Kooperation und Diskussionsbereitschaft und die Bearbeitung der histologischen Schnitte.

Ich danke ganz herzlich all meinen Freunden, insbesondere Carmen und Julius, die mir mit ihrer steten Unterstützung die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglicht haben.

8 Lebenslauf

Name: Yang Chul Böring
Geburtsdatum: 05.10.1976 in Incheon Namguchung / Südkorea

Schulbildung:

1983-1984: Grundschule Denklingen
1984-1987: Grundschule Ganderkesee
1987-1989: Orientierungsstufe Ganderkesee
1989-1996: Gymnasium Ganderkesee
1996: Abitur

Hochschulbildung:

1997-1999: Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
1999: Ärztliche Vorprüfung
1999-2004: Studium der Humanmedizin an der Universität Leipzig
2000: 1. Staatsexamen
2003: 2. Staatsexamen
2004: 3. Staatsexamen

Arbeitserfahrung:

2004-2005 Assistenzarzt in der Klinik für Kardiologie, Angiologie und Pulmologie des Universitätsklinikums Düsseldorf
2005-2007 Promotion am Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
2007-2008 Assistenzarzt in der Medizinischen Klinik I, Universitätsklinikum der RWTH Aachen

Aachen, im Juli 2008

LITERATUR

Originalarbeiten:

Jacoby, C., **Böring, Y. C.**, Beck, A., Zerneck, A., Aurich, V., Weber, C., Schrader, J., Flögel, U.: Dynamic changes in murine vessel geometry assessed by high-resolution magnetic resonance angiography: a 9.4T study. *J. Magn. Reson. Imaging* 28: 637-645 (2008)

Vorträge:

Böring, Y. C., Flögel, U., Jacoby, C., Schrader, J. Assessment of blood flow restoration and collateral vessel growth in a murine hindlimb ischemia model with 3D MR angiography in vivo. International Symposium on Biomedical Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy at Very High Fields, Würzburg, 07, 2006.

Flögel, U., Jacoby, C., **Böring, Y. C.**, Schrader, J. In vivo assessment of murine vascular morphology and function by high-resolution magnetic resonance techniques. *J. Vasc. Res.* 43(6): 540-541, 2006.

Annual Meeting of the Society for Microcirculation and Vascular Biology, München.

Böring, Y. C., Flögel, U., Jacoby, C., Schrader, J. In vivo 3D-MR-Angiographie zeigt bei CD73^{-/-}-Mäusen eine schnellere Entwicklung von Kollateralgefäßen im Modell der Hinterlaufischämie. *Clin. Res. Cardiol.* 96(Suppl. 1): V791, 2007.

73. Jahrestagung, Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim.

Poster:

Flögel, U., Jacoby, C., **Böring, Y. C.**, Zerneck, A., Weber, C., Beck, A., Aurich, V., Schrader, J. Neue Aspekte der Detektion von Veränderungen des Gefäßsystems mit Hilfe von MRI in der Maus. Kardiologen-Physiologen-Workshop Gefäßalteration bei Hypertonie und metabolischem Syndrom, Lübeck, 2005.

Jacoby, C., Zerneck, A., Flögel, U., **Böring, Y. C.**, Beck, A., Aurich, V., Weber, C., Schrader, J. High resolution 2D and 3D magnetic resonance imaging of murine carotid arteries in vivo. Proceedings of the International Society of Magnetic Resonance in Medicine 14th Meeting, Seattle, p 1951, 2006.

Jacoby, C., Flögel, U., **Böring, Y. C.**, Schrader, J. High resolution 2D and 3D MRI of murine carotid arteries in vivo. International Symposium on Biomedical Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy at Very High Fields, Würzburg, P2, 2006.

Jacoby, C., **Böring, Y. C.**, Beck, A., Zerneck, A., Aurich, V., Weber, C., Schrader, J., Flögel, U. Dynamic changes in murine vessel geometry assessed by high resolution magnetic resonance angiography. Joint Annual Meeting, International Society of Magnetic Resonance in Medicine and European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology 15th ISMRM Meeting, Berlin, p 2500, 2007.

Flögel, U., **Böring, Y. C.**, Jacoby, C., Schrader, J. In vivo 3D MR angiography reveals accelerated collateral vessel growth in CD73^{-/-} mice after hindlimb ischemia. *Circulation* 118(18), S692, 2008. 81st Scientific Sessions, American Heart Association, New Orleans.