

**AUS DER KLINIK FÜR KARDIOLOGIE, PNEUMOLOGIE UND ANGIOLOGIE  
DER HEINRICH-HEINE-UNIVERSITÄT DÜSSELDORF**

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Malte Kelm

**Einfluss von  $\beta$ 1-Integrin auf Arteriogenese und Angiogenese  
im Hinterlaufischämie-Modell**

**Dissertation**

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

Vorgelegt von  
Patrik Hülsemann aus Solingen

Düsseldorf 2019

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

Gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Christian Heiß

Zweitgutachterin: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Judith Haendeler

## I. Zusammenfassung

**Zielsetzung.** Die periphere arterielle Verschlusskrankheit gehört zu den häufigsten Erkrankungen unserer Zeit. Als Reaktion auf die arterielle Obstruktion kommt es physiologischerweise zu hämodynamischen Veränderungen, die kompensatorische Anpassungsmechanismen wie Angiogenese und Arteriogenese auslösen. Die Rolle von Integrinen ist hierbei noch nicht vollständig geklärt. In dieser experimentellen Studie wurde untersucht, ob  $\beta$ 1-Integrin einen Einfluss auf angiogenetische und arteriogenetische Vorgänge hat.

**Methoden.** In einem Mausmodell mit C57BL/6J wurde operativ durch Ligation der Femoralarterie eine unilaterale Hinterlaufischämie induziert. Zwei Gruppen von Versuchstieren erhielten entweder einen  $\beta$ 1-Integrin blockierenden Antikörper (ITG $\beta$ 1) oder einen passenden Kontrollantikörper (IsoCTR). Die oberflächliche Perfusion der Hinterläufe wurde mittels Laser Doppler Perfusion Imaging untersucht. Arteriolen und Kapillare wurden durch immunhistologische Untersuchungen der Oberschenkel- und Unterschenkelmuskulatur an den postoperativen Tagen 7 und 14 dargestellt. Die Morphologie von Kollateralarterien wurde durch Perfusion mit Kunstharz (PU4ii) abgebildet.

**Ergebnisse.** Unmittelbar nach Ligation der Femoralarterie zeigte sich in beiden Gruppen eine gleichmäßige Abschwächung der Hinterlaufperfusion. In der IsoCTR-Gruppe kam es zu einer raschen Reperfusion innerhalb des Untersuchungszeitraumes, wohingegen die Reperfusion in der ITG $\beta$ 1-Gruppe signifikant abgeschwächt wurde. Zudem verhinderte ITG $\beta$ 1 die Zunahme von Arteriolen im Oberschenkel (Arteriogenese) und von Kapillaren im Unterschenkel (Angiogenese). Die untersuchten Kollateralarterien hatten ebenfalls einen wesentlich geringeren Durchmesser.

**Schlussfolgerung.** Anhand unserer Untersuchungen lässt sich schlussfolgern, dass  $\beta$ 1-Integrin zu angiogenetischen und arteriogenetischen Anpassungsmechanismen im Rahmen einer Hinterlaufischämie beiträgt.

## II. Abstract

**Objective.** Peripheral arterial disease is one of the most frequent diseases of our time. In response to arterial obstruction, hemodynamic changes trigger compensatory adaptive mechanisms such as angiogenesis and arteriogenesis. The role of integrins in the underlying mechanisms are largely unknown. In this experimental study it was investigated whether or not  $\beta$ 1-integrin has an influence on angiogenic and arteriogenetic processes.

**Methods.** Unilateral hindlimb ischemia was induced by surgical ligation of the femoral artery of C57BL/6J. Two groups of animals received either a  $\beta$ 1-integrin blocking antibody (ITG $\beta$ 1) or an isotype matched antibody (IsoCTR). Superficial perfusion of the hindlimbs was examined by Laser Doppler Perfusion Imaging. At day 7 and 14 arterioles and capillaries were examined in the thigh and lower leg using immunofluorescence. The morphology of collateral arteries was visualized by perfusion with resin (PU4ii).

**Results.** Immediately after ligation of the femoral artery, an equal attenuation of hindlimb perfusion was seen in both groups. Rapid reperfusion occurred in the IsoCTR group, whereas it was greatly abolished in the ITG $\beta$ 1 group. Furthermore, we observed a striking increase in arterioles of the thigh and capillaries of the lower leg. Injection of ITG $\beta$ 1 attenuated the increase in arterioles in the thigh (arteriogenesis), but also blocked capillary growth in the lower leg (angiogenesis). Collateral arteries also offered a much smaller diameter.

**Conclusion.** The presented data suggest that  $\beta$ 1-integrin plays an important role in arteriogenetic and angiogenic processes. The results obtained should be followed by further studies focusing on the stimulation of the  $\beta$ 1-integrin pathway aiming at developing proarteriogenetic and proangiogenic therapies for vascular disease patients.

### III. Abkürzungsverzeichnis

<b>A.</b>	Arterie/Arteria
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin
<b>CD</b>	Cluster of differentiation
<b>CI</b>	Claudicatio intermittens
<b>CLI</b>	Critical limb ischemia
<b>DGA</b>	Deutsche Gesellschaft für Angiologie
<b>EC</b>	Endothelial cell
<b>EPC</b>	Endothelial progenitor cell
<b>FGF</b>	Fibroblast growth factor
<b>FSS</b>	Fluid shear stress
<b>HIF</b>	Hypoxia inducible factor
<b>HRE</b>	Hypoxia responsive element
<b>ICAM</b>	Intercellular adhesion molecule
<b>IsoCTR</b>	Isotyp-Kontroll-Antikörper
<b>ITG<math>\beta</math>1</b>	Anti-Integrin- $\beta$ 1-Antikörper
<b>LDL</b>	Low- density Lipoprotein
<b>LDPI</b>	Laserdopplerflussmessung
<b>LFA</b>	Lymphocyte function-associated antigen
<b>M.</b>	Muskel/Musculus
<b>MAC</b>	Macrophage antigen
<b>MCP</b>	Monocyte chemoattractant protein
<b>MMP</b>	Matrixmetalloproteinase
<b>N.</b>	Nerv/Nervus
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>NOS</b>	Nitric oxide synthase
<b>pAVK</b>	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
<b>PBS</b>	Phosphate-buffered saline
<b>PECAM</b>	Platelet and endothelial cell adhesion molecule

<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PTA</b>	Perkutane transluminale Angioplastie
<b>PU</b>	Perfusionseinheiten
<b>PU4ii</b>	Kunstharz/Polyurethane for improved imaging
<b>ROI</b>	Region of interest
<b>SMA</b>	Smooth muscle actin
<b>SMC</b>	Smooth muscle cell
<b>SSRE</b>	Shear stress responsive element
<b>TEA</b>	Thrombendarteriektomie
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor $\alpha$
<b>V.</b>	Vene/Vena
<b>VCAM</b>	Vascular cell adhesion molecule
<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor
<b>VLA</b>	Very late antigen

## IV. Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>- 1 -</b>
<b>1.1 PERIPHERE ARTERIELLE VERSCHLUSSKRANKHEIT</b>	<b>- 1 -</b>
1.1.1 DEFINITION	- 1 -
1.1.2 EPIDEMIOLOGIE	- 1 -
1.1.3 PATHOGENESE DER ATHEROSKLEROSE	- 2 -
1.1.4 KLINISCHE EINTEILUNG UND SYMPTOME	- 3 -
1.1.5 THERAPEUTISCHE GRUNDSÄTZE UND NEUE THERAPIEMÖGLICHKEITEN	- 4 -
<b>1.2 GEFÄßBILDUNG</b>	<b>- 7 -</b>
1.2.1 VASKULOGENESE	- 7 -
1.2.2 ANGIOGENESE	- 8 -
1.2.3 ARTERIOGENESE	- 10 -
<b>1.3 INTEGRINE</b>	<b>- 13 -</b>
<b>1.4 FRAGESTELLUNG DER ARBEIT</b>	<b>- 15 -</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>- 16 -</b>
<b>2.1 FORSCHUNGSDESIGN</b>	<b>- 16 -</b>
<b>2.2 IN-VIVO ANTIKÖRPER</b>	<b>- 17 -</b>
2.2.1 ANTI-INTEGRIN- $\beta$ 1-ANTIKÖRPER	- 17 -
2.2.2 ISOTYP-KONTROLL-ANTIKÖRPER	- 17 -
<b>2.3 TIERVERSUCHE</b>	<b>- 18 -</b>
2.3.1 TIERVERSUCHSGENEHMIGUNG	- 18 -
2.3.2 VERSUCHSTIERE	- 18 -
2.3.3 HINTERLAUF-ISCHEMIE MODELL	- 18 -
<b>2.4 LASER DOPPLER FLUSSMESSUNG</b>	<b>- 21 -</b>
<b>2.5 IMMUNHISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN</b>	<b>- 23 -</b>
2.5.1 GEWEBEENTNAHME UND GEWEBEFIXIERUNG	- 23 -
2.5.2 ANFERTIGUNG VON GEWEBESCHNITTEN	- 25 -
2.5.3 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG	- 25 -
2.5.4 AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE	- 27 -
<b>2.6 KUNSTHARZUNTERSUCHUNGEN</b>	<b>- 27 -</b>
2.6.1 GEWEBEENTNAHME UND GEWEBEVORBEREITUNG	- 27 -
2.6.2 AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE	- 28 -

<b>2.7 STATISTIK</b>	<b>- 29 -</b>
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>- 30 -</b>
<b>3.1 LASER DOPPLER FLUSSMESSUNG</b>	<b>- 30 -</b>
<b>3.2 IMMUNHISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN</b>	<b>- 34 -</b>
<b>3.3 KUNSTHARZUNTERSUCHUNGEN</b>	<b>- 38 -</b>
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>- 40 -</b>
<b>4.1 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE</b>	<b>- 40 -</b>
<b>4.2 VERSUCHSTIERE</b>	<b>- 41 -</b>
<b>4.3 HINTERLAUF-ISCHÄMIE MODELL</b>	<b>- 41 -</b>
<b>4.4 LASER DOPPLER FLUSSMESSUNG</b>	<b>- 43 -</b>
<b>4.5 IMMUNHISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN</b>	<b>- 44 -</b>
<b>4.6 KUNSTHARZUNTERSUCHUNGEN</b>	<b>- 46 -</b>
<b>4.7 THERAPEUTISCHE ANGIOGENESE UND ARTERIOGENESE - POTENTIAL VON INTEGRINEN</b>	<b>- 47 -</b>
<b>4.8 ARTERIOGENESE VERSUS ATHEROGENESE – EIN AUSBLICK</b>	<b>- 50 -</b>
<b>6. VERZEICHNISSE</b>	<b>- 51 -</b>
<b>6.1 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>- 51 -</b>
<b>6.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>- 59 -</b>
<b>6.3 TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>- 59 -</b>
<b>DANKSAGUNG</b>	<b>- 60 -</b>

## **1. Einleitung**

### **1.1 Periphere arterielle Verschlusskrankheit**

#### **1.1.1 Definition**

Unter der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) wird eine stenosierende bis okkludierende Veränderung an den Extremitätenarterien verstanden. In über 95% der Fälle ist die pAVK auf eine Arteriosklerose bzw. ihre symptomatische Form Atherothrombose zurückzuführen. Die zugrundeliegende Erkrankung manifestiert sich zudem in koronararteriellen sowie zerebrovaskulären Gefäßregionen und bestimmt somit die Prognose und Lebenserwartung von Patienten. Damit gehört die Atherothrombose mit ihren Manifestationsformen pAVK, Schlaganfall und Herzinfarkt zu den häufigsten Krankheiten unserer Zeit.

#### **1.1.2 Epidemiologie**

Im Jahr 2010 litten weltweit 202 Millionen Menschen an einer pAVK [1]. Die pAVK betrifft ca. 12-14% der westlichen Bevölkerung, wobei die Prävalenz mit zunehmendem Alter weiter ansteigt. Bei den über 65-Jährigen ist bereits jeder fünfte betroffen [2-5]. Aufgrund der gesteigerten Lebenserwartung und der damit verbundenen Alterung der Weltbevölkerung nahm die Anzahl der Patienten mit pAVK in der letzten Dekade um 24% zu [1]. Es wird vermutet, dass aufgrund des fortschreitenden demografischen Wandels bis zum Jahr 2030 mit einem Zuwachs von 30% zu rechnen ist [6].

Wenn eine Verschlusskrankheit in den Arterien der unteren Extremitäten diagnostiziert wird, liegen sehr wahrscheinlich koronararterielle und zerebrovaskuläre Komorbiditäten vor. Die pAVK kann somit als Indikator für ein systemisches Geschehen herangezogen werden. Bei Patienten mit einer symptomatischen pAVK ließen sich in 68% der Fälle polyvaskuläre

Pathologien nachweisen [7]. Das Risiko, an einem Schlaganfall oder Herzinfarkt zu versterben, ist somit bei diesen Patienten deutlich erhöht.

In den letzten Jahren stiegen die pAVK bedingten Klinikaufenthalte sowie die therapeutischen Behandlungen überproportional stark an. Zwischen 2005 und 2009 erhöhte sich die Gesamtzahl aller Hospitalisationen um 8% von 15 Millionen auf 16,2 Millionen Patienten. Darunter verzeichneten die pAVK bedingten Hospitalisationen eine Zunahme um 21% [8]. Gleichzeitig erhöhten sich die Zahlen endovaskulärer Revaskularisationen und Amputationen, was dazu führte, dass die Vergütungssumme für stationäre pAVK-Patienten um 21% auf 2,56 Milliarden Euro im Jahr 2009 anstieg [8].

### **1.1.3 Pathogenese der Atherosklerose**

Die Arteriosklerose wird als Oberbegriff für alle bindegewebigen Verhärtungen der Arterienwände benutzt. Eine solche Veränderung entsteht überwiegend durch eine Degeneration der inneren Wandschicht. Diese wird als Intima bezeichnet und besteht aus einer Schicht von Endothelzellen. Pathologische Verhärtungen der Intima werden konkret als Atherosklerose bezeichnet und haben im klinischen Alltag die größte Bedeutung.

Zu den stärksten Risikofaktoren gehören Nikotinkonsum sowie arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und Hyperlipoproteinämie. Letztere werden als metabolisches Syndrom zusammengefasst. Wohingegen der Nikotinkonsum in der Bevölkerung etwas rückläufig ist, tritt das metabolische Syndrom immer häufiger auf. So wurde 2002 bei 23% der US-amerikanischen Einwohner ein metabolisches Syndrom nachgewiesen [9]. Die Risikofaktoren potenzieren sich gegenseitig in ihrer Wirkung und stören sowohl Hämodynamik und Hämostase als auch die endotheliale Funktion.

Es gibt zwei Hypothesen, wodurch die Initiierung der Atherogenese beschrieben werden kann.

Gemäß dem *Response-to-injury*-Modell entsteht die Atherosklerose als Reaktion auf kleinste Verletzungen im Endothel [10]. Bei einer arteriellen Hypertonie erhöhen sich die systemischen Strömungsgeschwindigkeiten des Blutes und die auf das Endothel wirkenden Scherkräfte vergrößern sich, wodurch dieses direkt geschädigt wird. Nikotin und eine diabetische Stoffwechsellage versetzen den menschlichen Organismus in einen Zustand des oxidativen

Stresses [11-13]. In diesem Zustand wird weniger Kohlenmonoxid (NO) produziert, welches physiologischerweise vasodilatatorisch wirkt. Der ausbleibende Effekt des NO vergrößert die Scherkräfte und verstärkt die Endothelzellschädigung.

Das *Lipoprotein-induced-arteriosclerosis*-Modell ergänzt die zuvor beschriebene Hypothese [14]. Bedingt durch eine Endothelzellschädigung lagern sich Low-Density-Lipoproteine (LDL) in die Intima ein. Endothelzellen und freie Radikale, die im oxidativen Stress entstehen, oxidieren das LDL (oxLDL). Es entsteht eine entzündliche Reaktion. Entzündungszellen, darunter vor allem Makrophagen und T- Lymphozyten, wandern in die Intima ein. Die Makrophagen phagozytieren das oxLDL und lagern sich als Schaumzellen subendothelial ein, womit sie den späteren Kern der atherosklerotischen Plaque bilden [15]. An der Endothelläsion bleiben Thrombozyten haften. Zusammen mit den T-Lymphozyten produzieren sie Wachstumsfaktoren, die glatte Muskelzellen (Smooth Muscle Cell, SMC) aus der mittleren Gefäßschicht zur Proliferation und Migration in die Intima anregen [16]. Die SMCs produzieren nun extrazelluläre Matrix, bestehend aus Kollagen und Elastin, was zum Größenwachstum der atherosklerotischen Plaque führt. Die Plaques sind instabil und brechen sehr leicht auf. In diesem Fall lagern sich erneut Thrombozyten an die entstandene Läsion an und ein Thrombus entsteht. Der Thrombus kann zu einer chronisch progredienten Stenose der Arterie führen oder mit dem Blutstrom fortgerissen werden und die Arterie an anderer Stelle akut verstopfen. In beiden Fällen kommt es distal der Stenose zur Ischämie, was ein Absterben des Gewebes zur Folge haben kann.

#### **1.1.4 Klinische Einteilung und Symptome**

Die Atherosklerose führt zu einem chronischen oder akuten Verschluss einer Arterie. Typischerweise handelt es sich bei der pAVK um chronisch progrediente Stenosen einer Arterie. Ein akuter Arterienverschluss kann durch einen Thrombus entstehen, der sich entweder aus einer atherosklerotischen Plaque löst oder auf eine kardiale Emboliequelle zurückzuführen ist.

Die pAVK wird im deutschsprachigen Raum durch die Fontaine-Klassifikation in 4 Stadien unterteilt [17]. Zwei Drittel aller Patienten befinden sich in einem asymptomatischen Stadium

I und eine Diagnose wird oft per Zufallsbefund gestellt [3]. Schreitet die Erkrankung voran, manifestiert sich als Leitsymptom ein belastungsabhängiger ischämischer Schmerz (*claudicatio intermittens*, CI; Stadium II). Muskeln, Nerven und Haut werden in Ruhe und bei geringer Belastung noch mit Sauerstoff versorgt und die Extremität kann durch adäquate Therapie erhalten bleiben [18]. Ohne Therapie kann die pAVK im Verlauf jedoch zu einem Ruheschmerz (Stadium III) oder im schlimmsten Fall zu trophischen Störungen wie Ulzerationen oder Nekrosen führen (Stadium IV). Die letzten beiden Stadien werden auch als kritische Extremitätenischämie (*critical limb ischemia*, CLI) bezeichnet. Die Extremität ist in diesen Stadien bereits oft irreversibel geschädigt [18].

Eine akute Extremitätenischämie ist gekennzeichnet durch das plötzliche Auftreten ischämiebedingter Symptome, zu denen nach Gerald Hillary Pratt Schmerz, Blässe, Pulslosigkeit, Schock, Lähmung und Gefühlsstörung zählen. Nach Diagnosestellung ist eine schnellstmögliche interventionelle oder chirurgische Rekanalisation des Gefäßes anzustreben, um den Extremitätenerhalt zu sichern.

### **1.1.5 Therapeutische Grundsätze und neue Therapiemöglichkeiten**

Die Behandlung der pAVK erfolgt stadienadaptiert. Sie orientiert sich an den drei wesentlichen Säulen Prävention, Verbesserung der Lebensqualität bei bestehender Symptomatik und Gliedmaßenerhalt [19]. Dabei stellt die Prävention gleichzeitig den einzigen kausalen Therapieansatz dar. Sonstige Therapiemaßnahmen erzielen vor allem eine symptomatische Besserung.

Die Prävention bzw. kausale Therapie umfasst die Kontrolle und Behandlung der kardiovaskulären Risikofaktoren. Präventionsmaßnahmen finden vor allem in Stadium I Anwendung, sollen aber als Basis einer effektiven Therapie in jedem Stadium begleitend ausgeübt werden [18,20]. Zudem ist eine adäquate antithrombozytäre Therapie durchzuführen [21]. Da die kardiovaskulär vorbelasteten Patienten jedoch in frühen Stadien häufig asymptomatisch sind, ist die Compliance beim Einhalten einer kausalen Therapie gering. Bei fortschreitender pAVK erlangen die symptomatischen Therapien deswegen einen größeren Stellenwert.

Bei bestehender CI ist Gehtraining die Therapie der Wahl, solange dies für den Patienten möglich ist [22]. Laut Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Angiologie (DGA) ist strukturiertes Gehtraining die wichtigste Therapie in Ergänzung zur konsequenten Behandlung der kardiovaskulären Risikofaktoren. Es führt über eine zunehmende Kollateralbildung zu einer verbesserten Durchblutung der Peripherie und dadurch zu einer Zunahme der schmerzfreien Gehstrecke.

Interventionelle Maßnahmen sollten erst bei Patienten mit starken Beschwerden und hohem Leidensdruck (ab dem Stadium IIb) durchgeführt werden, aber auch bei einem ausdrücklichen Wunsch des Patienten. Interventionelle Verfahren führen jedoch bei vielen Patienten schneller zu einer Symptombesserung als eine medikamentöse Therapie. Die perkutane transluminale Angioplastie (PTA) mit möglicher Stentimplantation ist deswegen heute die Standardmethode bei der Behandlung einer CI. Trotz aktueller Präventions- und Therapiemöglichkeiten betrifft die symptomatische pAVK in Deutschland ca. 1,8 Millionen Menschen, wovon jährlich 50.000 bis 80.000 Patienten eine CLI entwickeln [18]. Wird die Diagnose einer CLI oder eines akuten Extremitätenverschlusses gestellt sollte schnellstmöglich eine Revaskularisation durchgeführt werden, um dem Patienten ein amputationsfreies Überleben zu ermöglichen. Neben interventionellen Verfahren kommen nun auch operative Verfahren wie eine Thrombendarteriektomie (TEA) oder Bypass-Operationen zur Anwendung. Falls trotz dieser Therapien das Blutvolumen nicht zur Versorgung der Extremität ausreicht, muss ultima ratio eine Amputation erfolgen.

Seit längerem werden neue Therapieansätze erforscht, die auf eine medikamentös induzierte Kollateralbildung abzielen und vor allem bei chronisch progredienter pAVK zur Anwendung kommen. Erfolgreich eingesetzt werden bereits Cilostazol und Naftidrofuryl, die durch Vasodilatation zu einer Verbesserung der Gehleistung nach 6 bzw. 12 Monaten führen [23-25]. Durch die Aktivierung von Bradykinin-Rezeptoren konnte im Tiermodell eine stärkere Kollateralbildung bei ischämischem Hinterlauf erreicht werden [26]. In weiteren Studien (TAMARIS, PROVASA) wurde herausgefunden, dass eine Stammzelltherapie zur therapeutischen Gefäßneubildung beitragen kann [27,28]. In Meta-Analysen wurden die Ergebnisse hinsichtlich mittelfristiger Symptombesserung als gut und die Stammzelltherapie

als sicher bezeichnet [29]. Deswegen wird in der Forschung auch zukünftig ein Schwerpunkt auf die therapeutische Gefäßbildung zur Behandlung der pAVK gelegt werden.

## 1.2 Gefäßbildung

### 1.2.1 Vaskulogenese

Das kardiovaskuläre System ist das erste vollständig ausgebildete Organ des menschlichen Körpers [30]. Bei der embryonalen Entstehung und der Erweiterung dieses Gefäßsystems im adulten Organismus spielen drei wesentliche Formen des Gefäßwachstums eine Rolle. Diese sind Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese.

Die Vaskulogenese ist die dominierende Form des Gefäßwachstums in der Embryonalentwicklung. Hierbei handelt es sich um eine *de novo*-Gefäßbildung. Mesodermale Zellen lagern sich im Dottersack des Embryos zu Blutinseln zusammen, aus denen multipotente Vorläuferzellen, die Hämangioblasten, entstehen. Hämangioblasten werden durch *Fibroblast Growth Factor-2* (FGF-2) stimuliert und differenzieren zu randständigen Angioblasten sowie zentral liegenden hämatopoetischen Stammzellen [31-33]. Die Angioblasten differenzieren unter Stimulation durch *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) und weiteren Einflussfaktoren zu reifen Endothelzellen, die durch Expression von Adhäsionsmolekülen interzelluläre Kontakte entstehen lassen und somit die Gefäßbildung ermöglichen.

Zunächst wurde davon ausgegangen, dass die Vaskulogenese auf die Embryonalentwicklung beschränkt sei. In späteren Studien konnte nachgewiesen werden, dass Angioblasten auch in der Blutzirkulation des adulten Organismus vorkommen [34, 35]. Diese Zellen wurden als *endothelial progenitor cells* (EPC) bezeichnet und sind durch Expression von 3 spezifischen Markern, CD133, CD34 und VEGF-2, charakterisiert. Während des Differenzierungsprozesses ändern sich die exprimierten Zelladhäsionsmoleküle, so dass reife *endothelial cells* (EC) vorwiegend durch CD31 (PECAM-1), VE-Cadherin und den von-Willebrand Faktor charakterisiert sind [36,37].

Die ersten vollständig ausgebildeten Gefäße sind die ab dem 18. Tag bestehenden Umbilikalgefäße.

## 1.2.2 Angiogenese

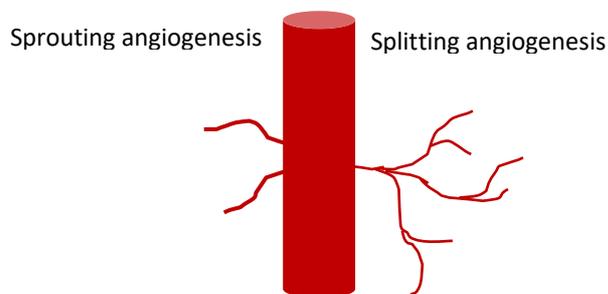
Obwohl der Begriff Angiogenese noch nicht konkret verwendet wurde, wird der Prozess das erste Mal durch den schottischen Anatomen und Chirurgen John Hunter 1794 im Rahmen von Beobachtungen zu Wundheilungen umschrieben [38]. Die aktuellen Forschungen begannen um 1970 mit der Hypothese des angiogeneseabhängigen Tumorwachstums [39]. Publikationen in diesem Forschungsgebiet entwickelten sich in den letzten Jahren explosionsartig, so dass 1980 erst 40 Publikationen und 2010 bereits ca. 6000 Publikationen veröffentlicht wurden [36].

Unter Angiogenese wird eine weitere Form des Gefäßwachstums verstanden. Im Vergleich zur Vaskulogenese entstehen die Gefäße nicht aus Angioblasten, sondern aus proliferierenden Endothelzellen präexistenter Gefäße [30]. Im Ruhezustand bilden Endothelzellen untereinander über Adhäsionsmoleküle interzelluläre Kontakte aus. Sie sind von perivaskulären Zellen, vorwiegend Perizyten und SMC, umgeben. Diese Zellen kontrollieren durch Sekretion von Wachstumsfaktoren die Stabilität der Gefäße. Ob es zur Gefäßneubildung kommt wird durch ein komplexes Zusammenspiel pro- und antiangiogenetischer Faktoren bestimmt.

Durch Ischämie kommt es zur Hypoxie, einem Sauerstoffmangel im Gewebe, welcher als Auslöser der Angiogenese gilt. Der Transkriptionsfaktor *hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1) wird aktiviert und bindet an das *hypoxia-response-element* (HRE) der DNA [40]. Dieser Vorgang induziert die Transkription einer Vielzahl von Genen, durch die unter anderem VEGF und dessen spezifischen Rezeptor VEGFR-1 sowie *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) entstehen.

VEGF wirkt über VEGFR auf das vaskuläre Endothel proangiogenetisch, in dem es durch Auflösung interzellulärer Adhäsionsmoleküle wie PECAM-1 die Gefäßpermeabilität steigert und die Teilung und Migration der Endothelzellen einleitet. NO bewirkt eine Vasodilatation der Arteriolen und steigert nochmals die Synthese von VEGF und FGF [41]. Zudem aktiviert es zusammen mit Plasmin Matrix-Metallo-Proteinasen (MMP), durch welche die Extrazellulärmatrix abgebaut wird. Es kommt zur Extravasation von Plasmaproteinen (Fibrinogen, Fibronectin), die ein provisorisches extrazelluläres Gerüst bilden und für die emigrierenden Endothelzellen eine günstige Umgebung schaffen.

Entscheidend für eine gerichtete Migration sind Integrine, die als Adhäsionsmoleküle neue Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte ermöglichen. Die Expression der Integrine ist abhängig von proangiogenetischen Wachstumsfaktoren und Chemokinen. Integrine fördern die Zellmigration durch die Umgestaltung der intrazellulären Aktinfilamente und den Zug an der Extrazellulärmatrix, wodurch ein gerichteter zytoplasmatischer Fluss erzeugt wird [42]. Die Endothelzellen bilden solide Stränge aus und erlangen Anschluss an bestehende Gefäße. Im Verlauf verdünnen sich die Endothelzellen, so dass sich ein Lumen bildet. Im hypoxischen Areal entsteht ein neues Kapillarnetzwerk. Perivaskuläre Zellen können sich anlagern und die weitere Gefäßreifung initiieren.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Angiogenese.**

Angiogenese beschreibt das Wachstum von Kapillaren ausgehend von präexistenten Gefäßen durch Sprossung (*Sprouting angiogenesis*, links) oder Invagination (*Splitting angiogenesis*, rechts). Initialer Auslöser ist die Hypoxie.

Es gibt zwei wesentliche Formen der Angiogenese, die parallel auftreten und sich ergänzen (siehe Abbildung 1). Besser untersucht ist die zuvor beschriebene Form der Sprossung (*Sprouting*). Hier bilden sich neue Gefäße durch Migration und Proliferation von Endothelzellen aus einem bestehenden Gefäßsystem [43]. Die Intussuszeption oder Invagination ist eine nicht-sprossende Angiogenese. Durch Einwanderung von Gewebszellen kommt es zu einer longitudinalen Gefäßteilung, so dass ein Tochtergefäß entsteht [44,45]. Im Vergleich zur *sprouting angiogenesis* wird hierbei von *splitting angiogenesis* gesprochen.

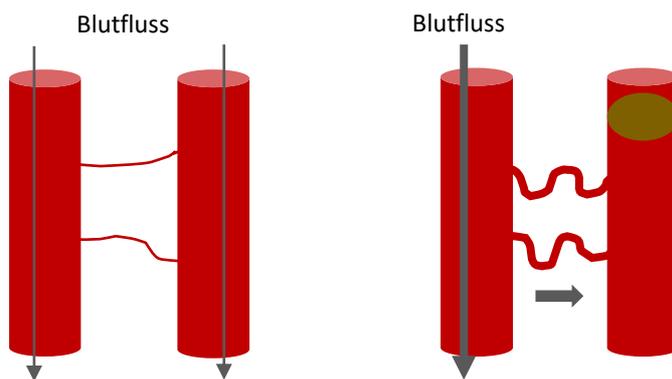
Vaskulogenese und Angiogenese ergänzen sich. Durch die Vaskulogenese entsteht ein primitives Gefäßsystem, welches durch angiogenetische Prozesse umgestaltet und erweitert wird. Die Angiogenese ist die dominierende Form der Gefäßneubildung im adulten Organismus, tritt aber auch bereits pränatal auf.

### 1.2.3 Arteriogenese

Bei der Arteriogenese handelt es sich um die Entstehung von funktionellen Arterien aus präexistenten Arteriolen [46].

Essentiell für den Ablauf der Arteriogenese ist ein bestehendes Gefäßnetzwerk, in welchem anatomisch und funktionell intakte Arteriolen mit einer Arterie anastomosieren. An Herz und Oberschenkel bilden Kollateralarterien ausgeprägte Gefäßnetzwerke. Epikardiale Koronargefäße wurden lange Zeit als Endarterien betrachtet. Heutzutage sind Kollateralen zwischen epikardialen Koronargefäßen bekannt, die das Myokard durch Kompensation des Blutflusses vor Ischämie schützen können und Gegenstand aktueller Forschungen sind [47,48].

Das Gefäßnetzwerk muss ausreichend durchblutet sein, weil die Hämodynamik Form und Funktion der arteriellen Gefäße determiniert. Demnach bestimmt der Blutfluss den Gefäßdurchmesser und der Blutdruck die Gefäßwanddicke. Aus Veränderungen der Hämodynamik resultieren Anpassungen der vaskulären Form und Funktion, so dass sich kleine Gefäße bei zunehmendem Blutfluss und höherem Blutdruck vergrößern. Dieses vaskuläre *Remodeling* ist das Resultat arteriogenetischer Prozesse (siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Arteriogenese.**

In gesunden, parallel verlaufenden Gefäßen herrscht ein gleichmäßiger Blutfluss und präexistente Kollateralarteriolen zwischen den Gefäßen werden durchblutet (links). Nach Stenosierung eines Gefäßes (brauner Punkt) kommt es zur Steigerung des Blutflusses im benachbarten Gefäß. Dadurch erhöhen sich auch Blutfluss und Scherstress in präexistenten Arteriolen, was zum aktiven Wachstum und zur Ausreifung der Kollateralen führt.

*In vivo* gibt es zwei wesentliche hämodynamische Kräfte, die auf die Endothelzellen einwirken: ein periodisch auftretender transmuraler Druckgradient, der zu einer zirkumferentiellen Wandspannung führt, und eine durch den Blutfluss ausgelöste Schubspannung. Es konnte bewiesen werden, dass der entscheidende Auslöser der Arteriogenese eine erhöhte vaskuläre Schubspannung (*Fluid shear stress*, FSS) ist [49]. Durch Stenosierung oder Okklusion einer Arterie entsteht zwischen prä- und poststenotischer Region ein Druckgefälle. Zum Ausgleich dieses Druckgefälles werden Kollateralarteriolen verstärkt durchblutet, so dass es zu einer Erhöhung des FSS kommt. Die Arteriogenese wird also durch physikalische Kräfte ausgelöst.

Als physiologische Antwort auf erhöhten FSS werden Endothelzellen in Richtung des Blutflusses abgeschert und aktiviert. Es findet eine Mechanotransduktion statt, dessen exakter Mechanismus noch nicht vollständig untersucht ist. *Shear stress responsive elements* (SSRE) werden aktiviert, was zur Expression einer Vielzahl von chemotaktisch wirkenden Proteinen führt [50,51]. eNOS wird synthetisiert, welches NO freisetzt und zur arteriellen Dilatation und Produktion von VEGF-A führt. Das *monocyte chemoattractant protein* (MCP-1) wird lokal an der Zelloberfläche exponiert und bildet einen chemotaktischen Gradienten aus. Zudem werden Selektine und Zelladhäsionsmoleküle wie ICAM und VCAM in fokalen Adhäsionskomplexen an der Zelloberfläche exprimiert [52]. Die mit dem Blutfluss vermehrt ankommenden Monozyten bleiben an Selektinen haften und rollen entlang des Endothels. Dieser initiale Schritt der Leukodiapedese wird als *Rolling* bezeichnet.

Die weiteren Schritte werden wesentlich durch Integrine beeinflusst. MCP-1 und einige Wachstumsfaktoren wie auch VEGF stimulieren die Expression von Integrinen auf der Oberfläche der Monozyten [53]. Hierzu gehören VLA-4, MAC-1 und LFA-1, die feste Verbindungen mit ICAM und VCAM bilden und somit eine starke Adhäsion an der Endothelzelloberfläche ermöglichen. Hiernach erfolgt die Migration in tiefer liegende Wandschichten, wo Monozyten zu Makrophagen differenzieren. Diese sezernieren unter anderem MCP-1, TNF $\alpha$ , FGF und MMPs. MCP-1 fördert die weitere Einwanderung von Monozyten. TNF $\alpha$  erzeugt ein lokal inflammatorisches Milieu und MMPs führen zum proteolytischen Abbau der Extrazellulärmatrix, um Wachstumsräume zu schaffen. VEGF-A und FGF-2 initiieren die Proliferation von Endothelzellen und SMC, welche die essentiellen Prozesse der Arteriogenese darstellen [54]. Durch den erneut zunehmenden Kollagengehalt

zwischen den glatten Muskelzellen und das übermäßige Längenwachstum der Arteriolen bildet sich eine typische „korkenzieherartige“ Morphologie aus.

Durch die Arteriogenese kann sich der Durchmesser eines Gefäßes um 25-fache vergrößern, so dass mehr als 60% der Ausgangsperfusion wiederhergestellt werden können [55]. Während des arteriogenetischen Gefäßwachstums nimmt die Flussgeschwindigkeit und die vaskuläre Schubspannung zunehmend ab, so dass eine Selbstregulierung des Wachstumsprozesses stattfindet.

Arteriogenese wurde früher als eine Variante der Angiogenese beschrieben. Zwar gibt es auf molekularer Ebene Übereinstimmungen mit dem Prozess der Angiogenese, jedoch ist das Resultat grundsätzlich verschieden. Nach einem arteriellen Gefäßverschluss ist durch arteriogenetische Prozesse eine nahezu vollständige Kompensation des Blutflusses über Kollateralarterien möglich, so dass das distal des Gefäßverschlusses liegende Gewebe von Hypoxie verschont bleiben kann [56]. Eine Zunahme der Kapillardichte im hypoxischen Gewebe wie bei der Angiogenese kann eine reduzierte Durchblutung aufgrund eines proximalen arteriellen Gefäßverschlusses nicht kompensieren. Des Weiteren findet die Arteriogenese unabhängig von Hypoxie statt. Nach Okklusion einer Arterie konnte im umgebenden Gewebe weder eine zunehmende Expression von HIF-1 $\alpha$ -mRNA noch eine Hochregulation von HIF-1-kontrollierter VEGF-Expression detektiert werden [57]. Vielmehr konnte bewiesen werden, dass das umgebende Gewebe für den Ablauf der Arteriogenese gut oxygeniert sein muss [58].

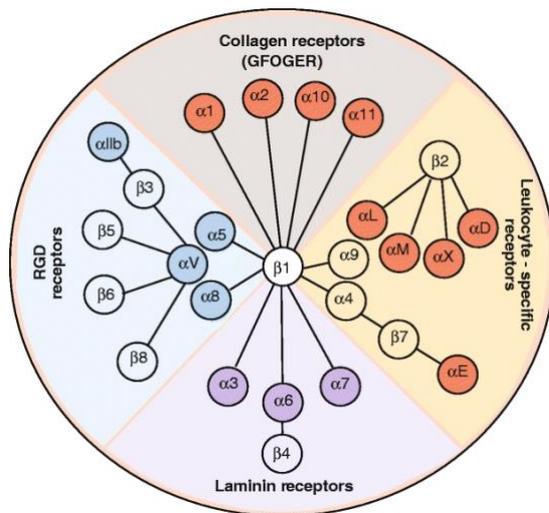
### 1.3 Integrine

Integrine sind in allen tierischen Zellen, außer in Erythrozyten, vorkommende transmembranöse Glykoproteine. Sie bilden Heterodimere, die aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit bestehen [59]. Zum aktuellen Zeitpunkt sind 18  $\alpha$ -Untereinheiten und 8  $\beta$ -Untereinheiten identifiziert, die insgesamt 24 verschiedene heterodimere Integrine bilden [60,61]. Sie sind als Typ-1 Transmembranproteine fest in der Zellmembran verankert und weisen eine große extrazelluläre und eine kleine zytoplasmatische Domäne auf [62].

Integrine befinden sich zunächst in einer inaktiven Form, so dass über die extrazelluläre Domäne keine Signale in das Zellinnere gelangen können. Zytosolische Adaptorproteine wie zum Beispiel Talin und Kindlin können an die zytoplasmatische Domäne binden und Integrine in eine aktive Konformation überführen [63]. Über diese und weitere Adaptorproteine entsteht ebenfalls Kontakt zu dem Aktinnetzwerk der Zelle und die Aktivierung der extrazellulären Domäne wird verstärkt. Dies wird als *inside-out signaling* bezeichnet [64-67].

Durch die Bindung von Liganden an die aktive extrazelluläre Domäne werden zwei grundsätzliche Funktionen der Integrine möglich. Diese sind Zelladhäsion und Signaltransduktion. Die Zelladhäsion entsteht durch die Verbindung von Extrazellulärmatrix mit dem intrazellulären Aktinzytoskelett. Die Signaltransduktion wird durch einen externen Liganden initiiert und führt unter anderem zur Aktivierung der Fokalen Adhäsionskinase und der *Integrin-linked Kinase* [68,69]. Über diesen als *outside-in signaling* bezeichneten Prozess werden Zellwachstum, Zellteilung, zellulärer Differenzierung und Apoptose beeinflusst [70, 71].

Die Kombination aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit der extrazellulären Domäne bestimmt die Ligandenspezifität. Einige Untereinheiten kommen nur in einem einzigen Heterodimer vor, wohingegen die  $\beta$ 1-Untereinheit (CD 29) Bestandteil von 12 Integrinen ist [61]. Die Kombination aus  $\beta$ 1- und  $\alpha$ -Untereinheit kann verschiedene Liganden erkennen (siehe Abbildung 3). Fibronektin und andere extrazelluläre Proteine werden über die Tripeptid-Sequenz Arg-Gly-Asp (RGD) und Leu-Asp-Val (LDV) erkannt, Kollagen über die GFOGER-Sequenz. Die Erkennungssequenz von Laminin ist noch nicht bekannt.



**Abbildung 3: Liganden der Integrine mit  $\beta 1$ - Untereinheit.**

Die  $\beta 1$ -Untereinheit bildet mit verschiedenen  $\alpha$ -Untereinheiten insgesamt 11 heterodimere Integrine. Über einen Komplex mit  $\alpha 5$  oder  $\alpha 8$  kann  $\alpha V$  gebunden werden, so dass insgesamt 12 Integrine mit  $\beta 1$ -Beteiligung entstehen. Die extrazelluläre Domäne der Integrine erkennt Aminosäuresequenzen, so dass verschiedene Liganden gebunden werden können. Über die RGD-Sequenz wird Fibronektin, über GFOGER Kollagen gebunden. Die Liganden lösen eine Signaltransduktion aus, die als *outside-in signaling* bezeichnet wird. (Abbildung von Barczyk et al. [71], mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature)

Durch die Verbindung von Extrazellulärmatrix und intrazellulärem Aktin können über  $\beta 1$ -Integrine bidirektional mechanische Kräfte übertragen werden, was für die Zelladhäsion und -migration entscheidend ist [72]. Endothelzellen exprimieren VCAM-1 (CD 106), welches ein Ligand für Integrin  $\alpha 4\beta 1$  (VLA-4) sowie Integrin  $\alpha 9\beta 1$  auf Leukozyten ist und die Migration von Zellen der Immunabwehr wie Monozyten, Lymphozyten und Eosinophilen reguliert [73,74].

Die hierdurch eingeleitete Immunreaktion spielt bei der Entstehung von Krankheiten wie Multiple Sklerose und bei der Tumormetastasierung eine Rolle. Aufgrund dieser Tatsache wurden bereits Antikörper gegen Integrine (z.B. Natalizumab) entwickelt, um Entzündungsreaktionen zu reduzieren [75]. Ob die Therapie arteriosklerotischer Erkrankungen durch eine Modulation von Integrinen möglich ist, muss noch untersucht werden.

## 1.4 Fragestellung der Arbeit

Integrine befinden sich ubiquitär in der Zellmembran von Endothelzellen und einige tragen essentiell zur Gefäßbildung bei. Die  $\beta 1$ -Untereinheit bildet zusammen mit verschiedenen  $\alpha$ -Untereinheiten den größten Anteil der heterodimeren Transmembrankomplexe. Die Intention dieser Arbeit besteht darin, den Einfluss der  $\beta 1$ -Untereinheit auf die Arteriogenese und Angiogenese zu untersuchen und darzustellen. Hierzu wurde eine experimentelle Laborstudie ausgearbeitet.

Es wurden folgende Hypothesen aufgestellt:

- Die Blockierung des  $\beta 1$ -Integrins durch einen Antikörper führt zu einer Abschwächung der im hypoxischen Gewebe stattfindenden Kapillarbildung als Hinweis für eine reduzierte Angiogenese.
- Die Blockierung des  $\beta 1$ -Integrins durch einen Antikörper führt zu einem abgeschwächten Wachstum von Arteriolen in einem aktivierten Kollateralkreislauf als Hinweis auf eine reduzierte Arteriogenese.

Um diese Hypothesen zu überprüfen, wurden Tierversuche, in denen eine unilaterale Ischämie des Hinterlaufes einer Maus induziert wurde, durchgeführt. Danach wurden die ischämischen Hinterläufe hinsichtlich Kapillardichte und Kollateralengröße auf histologischer und makroskopischer Ebene untersucht.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Forschungsdesign

Die Untersuchungen wurden an einem Kollektiv von C57BL/6J-Mäusen durchgeführt, welche aufgrund der großen humangenetischen Übereinstimmung als Versuchstiere ausgewählt wurden. Das Kollektiv wurde durch Antikörperinjektion in zwei Gruppen aufgeteilt. Die eine Gruppe wurde mit einem Anti-Integrin- $\beta$ 1-Antikörper (ITG $\beta$ 1) behandelt, die andere Gruppe mit einem Isotyp-Kontroll-Antikörper (IsoCTR).

Bei allen Versuchstieren wurde operativ am linken Hinterlauf eine Ligatur der Femoralarterie vorgenommen. Die folglich stärkere Durchblutung präexistenter Kollateralarterien im Oberschenkel führte zu erhöhtem vaskulärem Scherstress, wodurch arteriogenetische Prozesse ausgelöst wurden. Durch die entstehende Ischämie im Unterschenkel wurden angiogenetische Prozesse induziert. Das verwendete Operationsprotokoll wurde zuvor durch Limbourg et. al veröffentlicht [76].

Das Gefäßsystem des Hinterlaufes aller Versuchstiere wurde hinsichtlich arteriogenetischer und angiogenetischer Prozesse am Tag der Operation sowie am 3., 7. und 14. postoperativen Tag histologisch und mittels Laser Doppler Flussmessung untersucht. Eine makroskopische Untersuchung der Kollateralarterien des Oberschenkels wurde am 7. postoperativen Tag unternommen.

Die Untersuchungen fanden in den Laboratorien der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf unter der Aufsicht von Prof. Dr. med. C. Heiß sowie im Institut für Stoffwechselfysiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Aufsicht von Prof. Dr. rer. nat. E. Lammert statt.

## 2.2 In-vivo Antikörper

**Tabelle 1: Zeitpunkte der Antikörperinjektion.**

Die Antikörper wurden präoperativ im Abstand zwischen 20 und 26 Stunden und postoperativ ab dem dritten Tag in Abständen zwischen 70 und 76 Stunden intraperitoneal injiziert.

<u>Zeitpunkt</u>	<u>Zeitintervall</u>	<u>Antikörperinjektion</u>	
-1	20-26 Std. präoperativ	IsoCTR	ITGβ1
0	OP		
+3	70-76 Std. postoperativ	IsoCTR	ITGβ1
+6	70-76 Std. nach +3	IsoCTR	ITGβ1
+9	70-76 Std. nach +6	IsoCTR	ITGβ1
+12	70-76 Std. nach +12	IsoCTR	ITGβ1

### 2.2.1 Anti-Integrin-β1-Antikörper

Die β1-Untereinheit des heterodimeren Transmembranproteins löst verschiedene Signalkaskaden aus. Um nachzuweisen, dass einer dieser Signalkaskaden arteriogenetische und angiogenetische Prozesse initiiert, wurde die β1-Untereinheit des Integrins durch einen Antikörper gehemmt. Als monoklonaler Antikörper wurde ein aufbereiteter NA/LE Hamster Anti-Rat CD29 Clone Ha2/5 (BD Bioscience, U.S.A.) verwendet. Die Lagerung erfolgte bei 4° Celsius.

Der Antikörper wurde den Mäusen am präoperativen Tag in einem Abstand zwischen 20 und 26 Stunden vor geplanter OP und ab dem dritten postoperativen Tag im Abstand von jeweils 70 bis 76 Stunden über den Zeitraum der weiteren Untersuchungen intraperitoneal injiziert (siehe Tabelle 1).

Kreuzreaktionen mit Lymphozyten und Monozyten der Maus wurden beobachtet.

### 2.2.2 Isotyp-Kontroll-Antikörper

Je nach Organismus kann es zu unspezifischen Bindungen des Primärantikörpers kommen. Um das Ausmaß der unspezifischen Bindungen aufzuzeigen wurde ein Kontrollantikörper verwendet. Der Kontrollantikörper besitzt den gleichen Subtyp wie der blockierende Primärantikörper, ist jedoch gegen ein Antigen gerichtet, welches im Organismus von

Säugetieren nicht vorkommt. Als Kontrollantikörper wurde ein aufbereiteter NA/LE Hamster IgM  $\lambda$ 1 Isotype Control Clone G235-1 (BD Bioscience, U.S.A.) verwendet. Der Antikörper bindet spezifisch an Trinitrophenol (TNP), welches unter anderem Grundgerüst der Pikrinsäure ist. Die Lagerung erfolgte auch hier bei 4° Celsius.

Der Antikörper wurde zu den gleichen Zeitpunkten injiziert wie der blockierende Antikörper (siehe Tabelle 1).

## **2.3 Tierversuche**

### **2.3.1 Tierversuchsgenehmigung**

Gemäß Tierschutzgesetz §8 wurde für dieses Projekt vom 22.02.2013 bis zum 29.02.2016 eine Tierversuchsgenehmigung (Aktenzeichen 84-02.04.2012.A404) durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz, Nordrhein-Westfalen, erteilt.

Zudem habe ich, Patrik Hülsemann, an der versuchstierkundlichen Einführung zum Erwerb des Fachkundenachweises gemäß Tierschutzgesetz §9 unter der Aufsicht von PD Dr. med. vet. M. Sager, Direktor der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf, mit Erfolg teilgenommen.

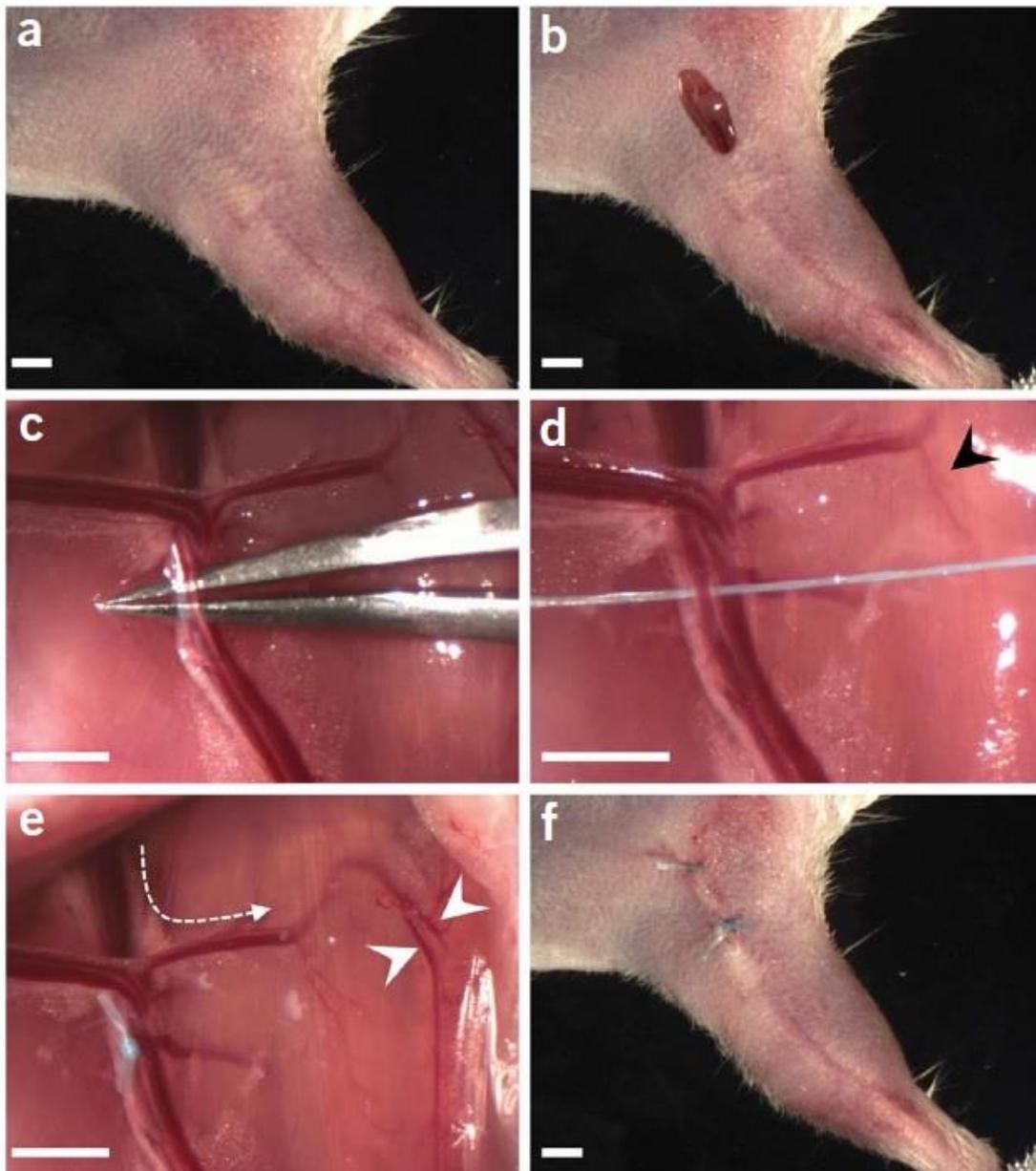
### **2.3.2 Versuchstiere**

Die Versuchstiere waren 10-13 Wochen alte Mäuse (Wissenschaftlicher Name: C57BL/6J). Es wurden ausschließlich männliche Mäuse verwendet, die maximal zu fünf in einem Standardkäfig gehalten wurden. Während des gesamten Versuchszeitraumes bestand *ad libitum* Zugang zu Futtermitteln und Nahrung. Der Tag-Nacht-Rhythmus war auf 12 Stunden terminiert.

### **2.3.3 Hinterlauf-Ischämie Modell**

Das in der Arbeit verwendete Hinterlauf-Ischämie Modell wurde erstmals 1998 von Couffinhal et al. beschrieben und 2009 durch Limbourg et al. modifiziert [76,77].

Zur Untersuchung der Mäuse war eine gewichtsadaptierte Anästhesie notwendig, welche durch intraperitoneale Injektion von 0,08 ml Ketamin 10% (2 mg/kg KG) und Xylazin 2% (10 mg/kg KG) in 0,9% NaCl eingeleitet wurde. Die Narkosetiefe wurde anhand des reflexartigen



**Abbildung 4: Präparation und Ligation der A. femoralis**

Das intraoperative Vorgehen erfolgte gemäß hier dargestelltem Ablauf. Enthaarung des Unterbauches und des Oberschenkels (a). Hautschnitt ausgehend von der Inguinalfalte über ca. 5 mm an der Oberschenkelinnenseite (b). Stumpfe Präparation der A. femoralis und Separierung von V. und N. femoralis (c, d). Ligation der A. femoralis distal des Abganges der A. profunda femoris, nach Ligation bereits makroskopisch gesteigerte Durchblutung der Kollateralen (e, Pfeile). Wundverschluss und Desinfektion (f). (Abbildungen von Limbourg et al. [76], mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature)

Rückzuges der Hinterpfote nach mechanischer Reizung beurteilt. Die Zeit bis zum vollständigen Wirkungseintritt der Anästhesie betrug ca. 10 Minuten.

Die Mäuse wurden auf einer vorgeheizten Wärmeplatte bei 37° Celsius positioniert und an den Pfoten durch Pflaster fixiert. Dabei wurden die Plantarflächen nach außen rotiert. Auf die Augen der Mäuse wurde eine panthenolhaltige Salbe aufgetragen, um die Hornhaut während der Narkosezeit vor Austrocknung und Entzündungen zu schützen. Der Pelz im Bereich des linken Unterbauches und Oberschenkels wurde durch das Auftragen von Enthaarungscreme entfernt. Die Enthaarungscreme wurde durch einen in warmes Wasser getränkten Mulltupfer abgewaschen. Nach Desinfektion des Operationsgebietes mit Betaisadonlösung wurde das Lichtmikroskop auf das Operationsgebiet eingestellt.

Ausgehend von der Inguinalfalte wurde die Haut an der Innenseite des Oberschenkels über ca. fünf Millimeter longitudinal inzidiert. Es erfolgte eine stumpfe Präparation bis zur Freilegung der Gefäße, so dass eine eindeutige Identifizierung von Arterie mit Seitenästen, Vene und Nerv gelang. Um die Arteria (A.) femoralis von Vena (V.) femoralis und Nervus (N.) femoralis zu separieren und diese Strukturen nicht zu verletzen, wurde der umgebene Bindegewebsschlauch mit einer stumpfen Pinzette vorsichtig disseziert. Nachdem der Abgang der A. femoralis profunda aus der A. femoralis dargestellt werden konnte, wurde die A. femoralis distal des Abganges ligiert (Prolene 5-0, Ethicon). Eine zweite Ligatur (Prolene 5-0, Ethicon) erfolgte ein bis zwei Millimeter weiter distal. Das Segment der A. femoralis zwischen den Ligaturen wurde durchtrennt, so dass schließlich eine unilaterale Hinterlaufischämie induziert wurde. Das Operationsgebiet wurde mit 0,9% NaCl gespült und die Haut durch eine fortlaufende Naht verschlossen.

Postoperativ wurden die Mäuse bis zum Abklingen der Anästhesie unter eine Infrarotlampe gelegt, um einer Auskühlung vorzubeugen. Zudem erhielten die Mäuse abhängig vom klinischen Zustand über drei Tage zweimal täglich Buprenorphin subkutan (0,05 mg/kg KG) zur Analgesie.

## 2.4 Laser Doppler Flussmessung

Das Prinzip der Laser Doppler Flussmessung (*Laser Doppler Perfusion Imaging*, LDPI) zur Bestimmung der mikrozirkulatorischen Durchblutung im Hinterlauf einer Maus ist eine etablierte Methode. Das monochromatische Laserlicht hat eine Penetrationstiefe von ca. ein bis zwei Millimetern und kann dadurch die Perfusion in den oberflächlichen Kapillaren sowie tiefer gelegenen Arteriolen nahe der Haut erfassen.

Die Perfusion ist als durchschnittliche Geschwindigkeit der Erythrozyten multipliziert mit der Konzentration der bewegten Erythrozyten definiert. Grundlage der Messungen ist der Doppler-Effekt (Christian Doppler, 1842), welcher die Veränderung eines Signals durch Veränderung des Abstands zwischen Sender und Empfänger beschreibt. Der ausgesendete Laserstrahl trifft auf Gewebe und wird von diesem mit einer bestimmten Wellenlänge reflektiert. Da der Laserstrahl auf bewegte Erythrozyten trifft, wird dieser von dort mit einer anderen Wellenlänge reflektiert. Ein Empfänger im LDPI-Gerät registriert die unterschiedlichen Wellenlängen und berechnet Geschwindigkeit und Konzentration der bewegten Erythrozyten. Diese werden in arbiträre Perfusionseinheiten (PU) umgerechnet und die mikrozirkulatorische Durchblutung kann in einem farbcodierten Perfusionsbild dargestellt werden.

Das LDPI wurde präoperativ und postoperativ (innerhalb der ersten Stunde nach der OP) sowie am dritten und siebten postoperativen Tag durchgeführt. Zur Untersuchung der Mäuse war eine Anästhesie notwendig, welche durch intraperitoneale Injektion von 0,08 ml Ketamin 10% (2 mg/kg KG) und Xylazin 2% (10 mg/kg KG) in 0,9% NaCl eingeleitet wurde.

Zur Standardisierung wurden die Mäuse für fünf Minuten in eine klimatisierte Kammer (37° Celsius) gelegt. Danach wurden sie auf dem Bauch liegend auf einer Unterlage fixiert, so dass die Plantarseite der Pfoten vom Laserstrahl erfasst werden konnte. Es handelte sich um eine nicht-reflektierende Unterlage, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden.

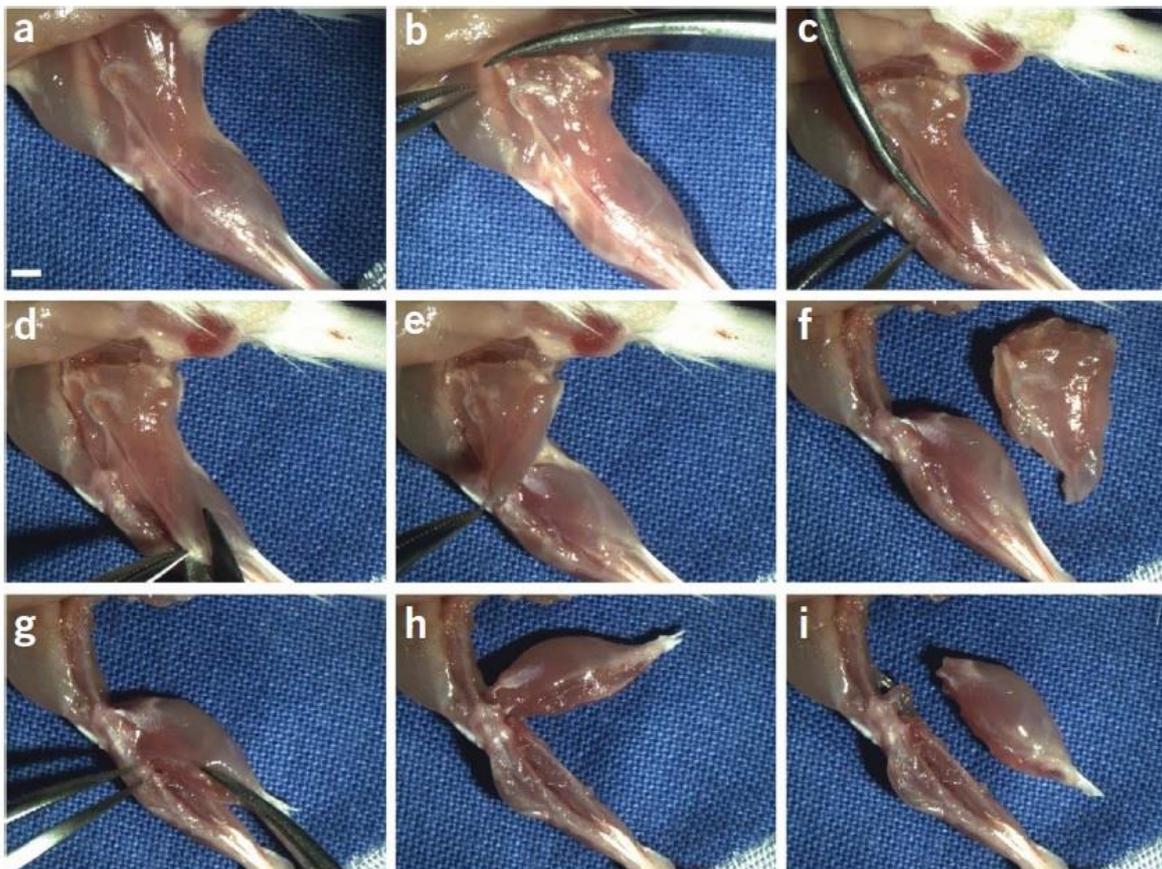
Zum LDPI wurde der Laser Doppler Imager Moor LDI2-IR (Moore Instruments, U.K.) verwendet. Für die Verarbeitung der Datensätze wurde die Software LDPI Win 3.1 benutzt. Das System tastete ein vorher festgelegtes Areal, welches beide Pfoten der Maus bis zum

Beginn des Unterbauchs vollständig umfasste, Zeile um Zeile ab. Vom Untersucher wurde manuell eine *region of interest* (ROI) festgelegt, aus welcher die durchschnittliche Perfusion, angegeben in PU, berechnet wurde. Die Auflösung wurde auf 256 x 256 Pixel eingestellt, die Scan-Rate für eine Fläche von 1,7 x 3,0 cm wurde auf 4 ms/px festgelegt. Die Messungen wurden an jeder Maus und zu jedem Zeitpunkt dreimal durchgeführt. Ein Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung wurde berechnet und in PU dokumentiert.

## 2.5 Immunhistologische Untersuchungen

### 2.5.1 Gewebeentnahme und Gewebefixierung

An dem Tag der OP und an den postoperativen Tagen 7 und 14 erfolgte die Explantation der Ober- und Unterschenkelmuskulatur, welche für die histologische Aufarbeitung benötigt wurde.



#### **Abbildung 5: Explantation der Ober- und Unterschenkelmuskulatur**

a-f: Explantation der Oberschenkelmuskulatur. Als erstes wird der Muskel proximal der A. profunda femoris inzidiert, was als die Basis des späteren Exzidats festgelegt wird (b). Nach weiterer Inzision lateral der A. femoralis (c) ergibt sich ein nahezu rechteckiges Exzidat (f).

g-h: Explantation der Unterschenkelmuskulatur. Nach distaler Durchtrennung der Achillessehne wird der Muskel proximal an den beiden Köpfen des M. gastrocnemius abgesetzt.

(Abbildungen von Limbourg et al. [76], mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature)

Die Mäuse erhielten zunächst Heparin (1000 IE/ kg KG) intraperitoneal, um einer Blutgerinnung vorzubeugen. Durch intraperitoneale Injektion einer Überdosis von Ketamin 10% (100 mg/kg KG) und Xylazin 2% (8 mg/kg KG) wurden die Mäuse euthanasiert.

Die Mäuse wurden auf der Operationsplatte unter dem Lichtmikroskop platziert und die Extremitäten mit Pflastern fixiert. Brustkorb und Abdominalraum wurden eröffnet und nach stumpfer Präparation konnte das Herz mitsamt der großen Gefäße dargestellt werden.

Es erfolgte eine Perfusionsfixierung, um durch Denaturierung der Proteine die Lebensvorgänge in Zellen und Gewebe zu beenden. Der linke Ventrikel des Herzens wurde kanüliert und das Gefäßsystem über zwei Minuten bei einem Druck von 100 mmHg mit einer Dilatationslösung perfundiert. Die Dilatationslösung enthielt 0,9 % Adenosin, 0,1% Natrium Nitroprussid und 0,05% *Bovine Serum Albumin* (BSA) in Ringer-Lösung, temperiert auf 37° Celsius. Nach maximaler Vasodilatation erfolgte die Perfusion des Gefäßsystems mit 4% Paraformaldehyde (PFA) in *Phosphate-buffered Saline* (PBS) bei einem pH von 7,4 über 10 Minuten. Im Anschluss wurde das Gefäßsystem mit PBS über 2 Minuten perfundiert, um PFA auszuwaschen.

Nach der Gewebefixierung wurde die Explantation der Ober- und Unterschenkelmuskulatur durchgeführt. Im Bereich der medialen Seite des Oberschenkels wurde die Haut nach Enthaarung inzidiert. Unter Berücksichtigung der Gefäßanatomie der Kollateralarterien wurde die Adduktorenmuskulatur in einer visuell rechtwinkligen Dreiecksform exzidiert. Als Basis des Exzidats wurde die proximal des Abgangs der A. femoralis profunda liegende Seite verwendet. Die zweite Seite verlief lateral der A. femoralis, die dritte Seite ergab sich aus dem physiologischen Verlauf der Adduktorenmuskulatur. Bei der Entnahme der Unterschenkelmuskulatur wurde nach Enthaarung und medianer Hautinzision die Achillessehne distal durchtrennt. Proximal wurde die Unterschenkelmuskulatur an Caput mediale und Caput laterale des Musculus (M.) gastrocnemius sowie am Ansatz des M. soleus an der Tibia abgesetzt. Die exzidierte Unterschenkelmuskulatur bestand somit anteilig aus M. gastrocnemius, M. soleus und M. plantaris.

Nach der Exzision wurden die Gewebe zur Anfertigung von histologischen Schnitten vorbereitet. Die entnommenen Muskeln wurden jeweils in ein Eppendorfgefäß gelegt,

welches mit 10%-iger Saccharose-Lösung gefüllt war. In dieser hyperosmolaren Lösung wirkten die Muskeln über 15 Minuten bei Raumtemperatur ein bis diese durch Dehydratation auf den Grund des Eppendorfgefäßes sedimentierten. Danach wurden die Muskeln in eine 25%-ige Saccharose-Lösung umgefüllt und über 15 Stunden bei 4° Celsius gelagert. Hiernach erfolgte die Immersion der Muskeln in einem Einbettmedium (Tissue-Tek O.C.T. Compound). Das Einbettmedium wurde in ein Probengefäß gefüllt und die Muskeln wurden aufrecht in diesem platziert. Bei der Oberschenkelmuskulatur bildete die Basis des Exzidats das obere Ende, bei der Unterschenkelmuskulatur die beiden Capita des M. gastrocnemius. Nach Platzierung des Probengefäßes auf Trockeneis (festes Kohlenstoffdioxid CO<sub>2</sub> bei -78,48° Celsius) konnten die Muskeln rasch in vorher beschriebener Position eingefroren werden. Die Proben wurden bei -20° Celsius eingelagert.

### **2.5.2 Anfertigung von Gewebeschnitten**

Für die histologischen Untersuchungen wurde Gewebeschnitte in einem Mikrotom (Tissue-Tek® Cryo3® Mikrotom/Kryostat) angefertigt. Die Kammertemperatur wurde auf -20 ° Celsius, die Objekttemperatur auf -23 ° Celsius eingestellt.

Der eingefrorene Block aus Muskulatur und Tissue-Tek wurde mit zusätzlichem Tissue-Tek fest auf dem Blockträger fixiert. Ober- und Unterschenkelmuskulatur wurden ausgehend von der Basis transversal in 3 Ebenen geschnitten (3000 µm, 5000 µm, 7000 µm). In jedem Bereich wurden jeweils 10 Schnitte mit einer Schichtdicke von 12 µm, gefolgt von 4 Schnitten mit einer Schichtdicke von 50 µm angefertigt und auf einen Objekträger aufgezogen. Die Gewebeschnitte wurden bei einer Temperatur von -20° Celsius gelagert.

### **2.5.3 Immunfluoreszenzfärbung**

Die histologischen Schnitte tauten über 30 Minuten auf. Jeder Gewebeschnitt wurde mit einem PAP Pen umkreist, dessen Markierung eine hydrophobe Barriere darstellte.

Das Gewebe wurde über 15 Minuten bei einer Temperatur von 4° Celsius mit PFA 4% fixiert und im Anschluss dreimal über 15 Minuten mit PBS gewaschen. Danach wurden die

Gewebeschnitte über 60 Minuten mittels *blocking solution* geblockt, um unspezifische Antikörperbindungen zu reduzieren.

Die 12 µm Gewebeschnitte wurden bei einer Temperatur von 37° Celsius über eine Stunde mit primären Antikörpern gefärbt, welche an CD-31 (Rat anti-mouse/CD31, 1:50, BD Bioscience) und Smooth-muscle actin (Rabbit anti-mouse/SMA, 1:100, Sigma Aldrich) bindeten (siehe Tabelle 2).

**Tabelle 2: Verwendete Antikörper in der CD31-Färbung.**

Zunächst erfolgte eine Inkubation mit primären Antikörpern. Durch CD31 wurden Endothelzellen und durch SMA glatte Muskelzellen markiert. Nach der Inkubation mit den fluoreszierenden sekundären Antikörpern konnten die primären Antikörper sowie die markierten Zielstrukturen sichtbar gemacht werden.

Zielstruktur	Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper	Fluoreszenz
<b>PECAM-1 auf Endothelzellen</b>	CD31 1:50 Rat anti-mouse	Cy3 1:500 Goat anti-rat	Rot
<b>Glatte Muskelzellen in Arteriolen</b>	SMA 1:100 Rabbit anti-mouse	AlexaFluor 488 1:500 Goat anti-rabbit	Grün
<b>DNS/Zellkerne</b>		DAPI	Blau

Die Gewebeschnitte wurden im Anschluss dreimal über 15 Minuten mit PBS gewaschen und mit sekundären Antikörpern inkubiert, um die primären Antikörper durch Fluoreszenz sichtbar zu machen. Ein sekundärer Antikörper (Goat anti-rat, Konjugat: Cy3, 1:500, Jackson ImmunoResearch) hat an den primären CD-31-Antikörper gebunden, ein weiterer sekundärer Antikörper (Goat anti-Rabbit, Konjugat: AlexaFluor 488, 1:500, ThermoFischer Scientific) an den primären SMA-Antikörper. Die Inkubation erfolgte über eine Stunde in einer dunklen Kammer bei Raumtemperatur.

Nach erneutem Waschen in PBS über dreimal 10 Minuten wurden die Gewebeschnitte mit *Vectashield antifade mounting medium with DAPI* (4', 6'-Diamidino-2-Phenyl-Indol) fixiert, um die fluoreszierende Photostabilität zu erhalten und Zellkerne anzufärben.

Die Lagerung erfolgte in einer Dunkelkammer bei einer Temperatur von 4° Celsius.

## **2.5.4 Auswertung der Ergebnisse**

Zur Auswertung der CD31-Färbung wurden zehn zufällig ausgewählte Gewebeschnitte (12 µm) aus den drei Ebenen der Ober- und Unterschenkelmuskulatur mikroskopisch nach Arteriolen und Kapillaren durchsucht. Die Bilder wurden durch ein fokales Mikroskop (Nikon Eclipse Ti-S inverted microscope system, Japan) mit integriertem Bildverarbeitungsprogramm (NIS-Elements Imaging Software, Japan) aufgenommen. Pro Gewebeschnitt wurden 5 Bilder mit einer 20-fachen Vergrößerung aufgenommen, so dass pro Oberschenkel bzw. Unterschenkel 50 Bilder ausgewertet werden konnten.

Die weitere Beurteilung der Bilder erfolgte anhand des Bildverarbeitungsprogramms Image J (Fiji). Hierbei wurden Kollateralarterien in absoluter Anzahl gezählt und ein Mittelwert gebildet. Große Arterien und präexistente Kollateralarterien wurden nicht gezählt. Letztere konnte durch eine begleitende Vene und/oder einen begleitenden Nerv als solche erkannt werden. Im zweiten Schritt wurden Kapillare und Muskelfasern gezählt und in Verhältnis zueinander gesetzt, so dass die Dichte der Kapillaren als Anzahl pro Muskelfaser bestimmt werden konnte.

## **2.6 Kunstharzuntersuchungen**

### **2.6.1 Gewebeentnahme und Gewebepvorbereitung**

Am siebten postoperativen Tag wurden die Mäuse durch intraperitoneale Injektion einer Überdosis von Ketamin 10% (100 mg/kg KG) und Xylazin 2% (8 mg/kg KG) euthanasiert. Um eine Blutgerinnung zu verhindern erhielten die Mäuse Heparin (1000 IE/ kg KG) intraperitoneal.

Die euthanasierte Maus wurde auf einem Operationstisch an den Extremitäten fixiert. Die Haut des Brustkorbs wurde ventral durch eine longitudinale Inzision eröffnet und das Brustbein mit angrenzenden Rippen wurden mit einer Schere vollständig entfernt. Das Herz wurde mit einer Pinzette vorsichtig fixiert, so dass eine Kanüle von der Herzspitze nach kranial parallel zum Septum in den linken Ventrikel vorgeschoben werden konnte. Um den linken

Vorhof nicht zu penetrieren, wurde die Kanüle maximal drei Millimeter vorgeschoben. Als nächstes wurde eine Spritze auf die Kanüle gesetzt und das Gefäßsystem über zwei Minuten bei einem Druck von 100 mmHg mit einer Dilatationslösung (0,1% Adenosin und 0,5% BSA in PBS, pH 7,4) perfundiert. Im Anschluss wurde eine neue Spritze aufgesetzt, welche das Kunstharz *Polyurethane for improved imaging* (PU4ii, VasQtec, Schweiz) gemischt mit dem im Kit beigefügten Härtungsmittel (VasQtec, Schweiz) enthielt. Das Gemisch wurde rasch unter der Vermeidung von Luftblasen injiziert. Nach vollständiger Applikation wurde die Kanüle aus dem linken Ventrikel entfernt.

Die Maus wurde auf einen weiteren Operationstisch transferiert. Der Pelz des Unterkörpers wurde mit Ethanol 70% befeuchtet. Die Muskulatur des Oberschenkels wurde wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben entnommen und in einer 1%-igen Natriumhydroxid-Lösung (PanReac AppliChem, Deutschland) dehydriert, so dass die dreidimensionale Gefäßarchitektur, abgebildet durch PU4ii, schließlich im durchsichtigen Muskelgewebe klar zu erkennen war.

### **2.6.2 Auswertung der Ergebnisse**

Je nach Länge der Kollaterale wurde der Diameter des einzelnen Gefäßes an 7-15 verschiedenen, zufällig ausgewählten Arealen gemessen. Die Bilder wurden durch ein Stereomikroskop (Nikon SMZ 1500, Japan) in 20-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Messung der Diameter erfolgte durch Verwendung des Bildverarbeitungsprogramms Image J (Fiji).

## 2.7 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit Prism 7.0 für macOS (GraphPad Software Inc.) sowie Microsoft Excel 2016 für macOS durchgeführt. Alle Daten wurden als Mittelwert mit Standardabweichung präsentiert. Der Vergleich kontinuierlicher Variablen wurde mit dem *Students t-Test* durchgeführt. Für den Vergleich multipler Gruppen wurde der *one-way-ANOVA* oder der *two-way-ANOVA* benutzt, bei Signifikanz wurde ein *post hoc* Test (*Tukey-Test*) durchgeführt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit ist in  $p$  angegeben, wobei  $p$ -Werte kleiner als 0,05 als signifikant und  $p$ -Werte kleiner 0,001 als hoch signifikant gewertet wurden.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Laser Doppler Flussmessung

Um die mikrozirkulatorische Perfusion in den Hinterläufen der Mäuse zu objektivieren wurde das LDPI durchgeführt. Untersucht wurden zwei Gruppen von Mäusen, wovon eine Gruppe den blockierenden Antikörper (ITG $\beta$ 1, n=5) und die andere Gruppe den Kontrollantikörper (IsoCTR, n=5) erhielt.

**Tabelle 3: Ergebnisse des LDPI.**

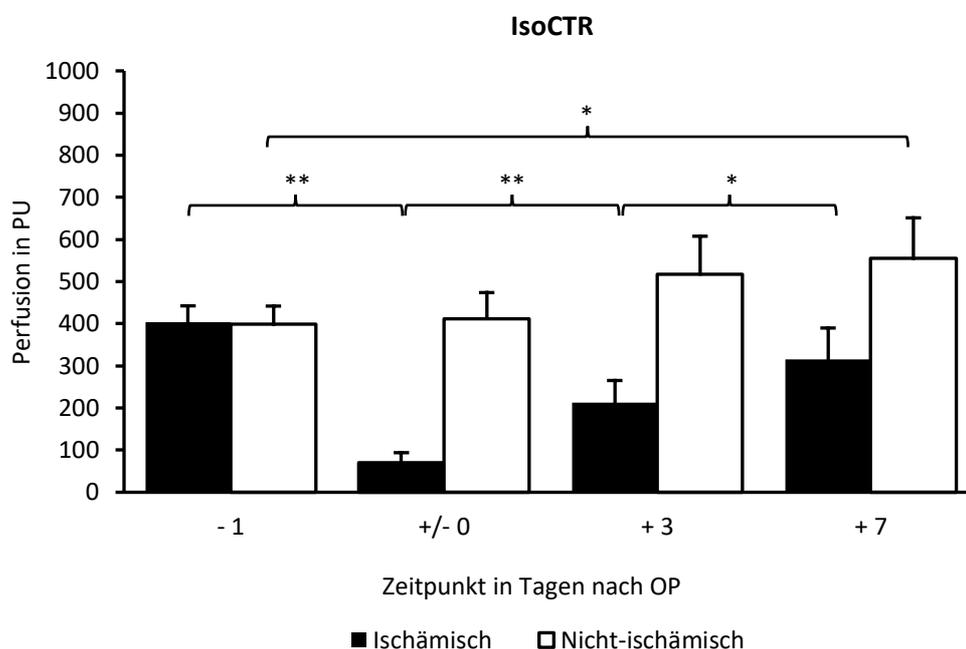
Angaben in arbiträren Perfusionseinheiten (PU). Zu jedem Zeitpunkt wurden pro Gruppe die ischämischen und nicht-ischämischen Hinterläufe von jeweils 5 Tieren untersucht. Hier abgebildet ist der Mittelwert der Einzelergebnisse mit Standardabweichung (SD).

<u>Zeitpunkte</u>	<u>IsoCTR, n=5</u>		<u>ITG<math>\beta</math>1, n=5</u>	
	Ischämisch	Nicht-ischämisch	Ischämisch	Nicht-ischämisch
<b>-1</b>	404 $\pm$ 39	398 $\pm$ 44	405 $\pm$ 39	408 $\pm$ 39
<b>0</b>	70 $\pm$ 24	412 $\pm$ 62	65 $\pm$ 20	555 $\pm$ 97
<b>3</b>	213 $\pm$ 52	518 $\pm$ 90	112 $\pm$ 69	597 $\pm$ 330
<b>7</b>	315 $\pm$ 75	555 $\pm$ 96	168 $\pm$ 67	589 $\pm$ 143

Aus Tabelle 3 ist zu entnehmen, dass am präoperativen Tag (Zeitpunkt -1) in den Hinterläufen beider Gruppen eine gleichmäßige Ausgangsperfusion herrscht (mittlerer Bereich: 398 PU bis 408 PU). Die als „ischämisch“ markierten Hinterläufe zu dem Zeitpunkt sind korrekterweise noch nicht ischämisch, da noch keine Operation stattgefunden hat. Durch die Ligatur der Femoralarterie wurde der physiologische Blutfluss in der linken unteren Extremität unterbunden. Die postoperativen Kontrollen sind ab dem Zeitpunkt 0 dokumentiert.

Abbildung 6 zeigt die postoperativen Kontrollen in der IsoCTR-Gruppe. Zum Zeitpunkt 0 bestand im ischämischen Hinterlauf eine statistisch hoch signifikant abgeschwächte Perfusion im Vergleich zum präoperativen Zeitpunkt -1 (404 PU  $\pm$  39 PU vs. 70 PU  $\pm$  24 PU;  $p < 0,001$ ). In

den ischämischen Hinterläufen war zwischen den Zeitpunkten 0 und 3 sowie zwischen den Zeitpunkten 3 und 7 eine kontinuierlich stärkere Perfusion zu messen. Die Zunahme der Perfusion zwischen den Zeitpunkten 0 und 3 war hoch signifikant ( $70 \text{ PU} \pm 24 \text{ PU}$  vs.  $213 \pm 52 \text{ PU}$ ,  $p < 0,001$ ) und zwischen den Zeitpunkten 3 und 7 nochmals signifikant ( $213 \pm 52 \text{ PU}$  vs.  $315 \pm 75 \text{ PU}$ ,  $p < 0,05$ ) zu. Am Zeitpunkt 7 wurde eine Perfusion erreicht, die 78% der Ausgangsperfusion entsprach. Im nicht-ischämischen Hinterlauf nahm die Perfusion zwischen den Zeitpunkten -1 und 7 auch signifikant zu ( $398 \text{ PU} \pm 44 \text{ PU}$  vs.  $555 \text{ PU} \pm 96 \text{ PU}$ ,  $p < 0,05$ ).



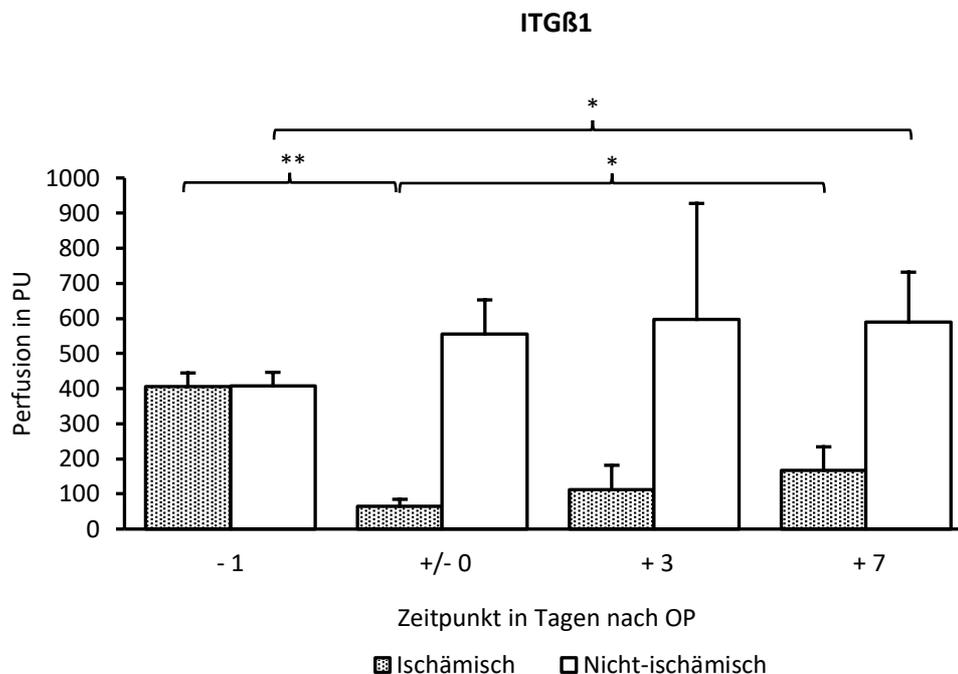
**Abbildung 6: Ergebnisse des LDPI für die IsoCTR-Gruppe.**

Angaben der Hinterlaufperfusion in Perfusionseinheiten (PU) mit Standardabweichung.

Nach Ligatur der Femoralarterie nimmt die Perfusion im ischämischen Hinterlauf zwischen den Zeitpunkten -1 und 0 hochsignifikant ab (\*\*). In den postoperativen Kontrollen (Zeitpunkte 3 und 7) kommt es wieder zu einer hochsignifikanten (\*\*) und signifikanten (\*) Zunahme der Perfusion im ischämischen Hinterlauf. Die Perfusion im nicht-ischämischen Hinterlauf nimmt zwischen den Zeitpunkten -1 und +7 ebenfalls signifikant zu.

Abbildung 7 zeigt die postoperativen Kontrollen in der ITGβ1-Gruppe. Auch hier war die Perfusionsabschwächung im ischämischen Hinterlauf zum Zeitpunkt 0 im Vergleich zum präoperativen Zeitpunkt -1 statistisch hoch signifikant ( $405 \text{ PU} \pm 39 \text{ PU}$  vs.  $65 \text{ PU} \pm 20 \text{ PU}$ ,  $p < 0,001$ ). Zwischen den Zeitpunkten 0 und 3 sowie 3 und 7 konnte jeweils eine Perfusionssteigerung festgestellt werden, jedoch bestand keine Signifikanz. Eine signifikante Zunahme der Hinterlaufperfusion konnten zwischen den Zeitpunkten 0 und 7 registriert

werden ( $65 \pm 20$  vs.  $168 \pm 67$ ,  $p < 0,05$ ). Wie in der IsoCTR-Gruppe nimmt die Perfusion des nicht-ischämischen Hinterlaufes bis zum Zeitpunkt 7 ebenfalls signifikant zu ( $408 \text{ PU} \pm 39 \text{ PU}$  vs.  $589 \text{ PU} \pm 143 \text{ PU}$ ,  $p < 0,05$ ).



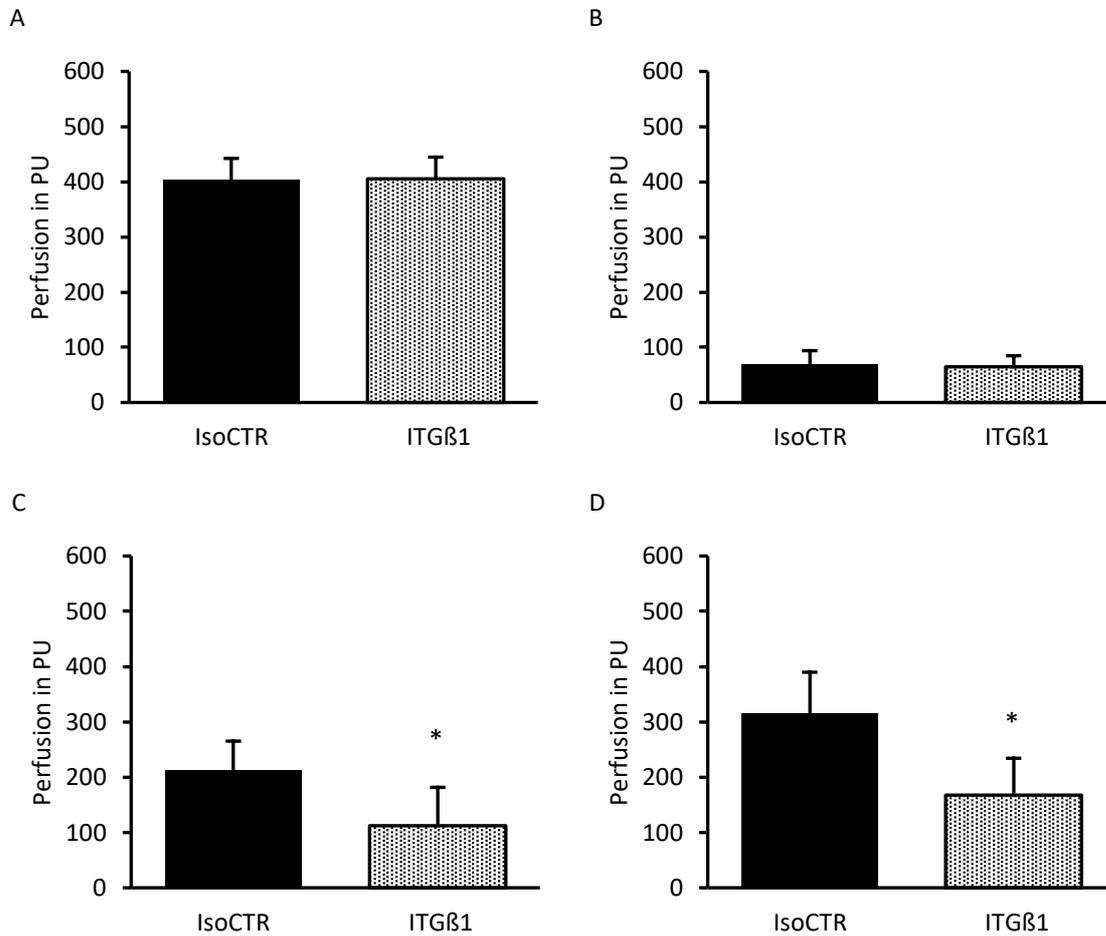
**Abbildung 7: Ergebnisse des LDPI für die ITGβ1-Gruppe.**

Angaben der Hinterlaufperfusion in Perfusionseinheiten (PU) mit Standardabweichung.

Nach Ligatur der Femoralarterie nimmt die Perfusion im ischämischen Hinterlauf zwischen den Zeitpunkten 0 und +/-0 hochsignifikant ab (\*\*). In den postoperativen Kontrollen nimmt die Perfusion zwischen den Zeitpunkten 0 und +7 ebenfalls signifikant zu (\*). Die Perfusion im nicht-ischämischen Hinterlauf nimmt zwischen den Zeitpunkten -1 und +7 signifikant zu.

Im Vergleich der ischämischen Hinterläufe der beiden Gruppen wird die schwächere Reperfusion in der ITGβ1-Gruppe deutlich (Abbildung 8). Zum Zeitpunkt 0 konnte eine gleichwertige Abschwächung der Ausgangsperfusion in beiden Gruppen erreicht werden (IsoCTR: 17% der Ausgangsperfusion vs. ITGβ1: 16% der Ausgangsperfusion), ein signifikanter Unterschied bestand nicht. An den Zeitpunkten 3 und 7 wurden in der ITGβ1-Gruppe signifikant niedrigere Werte als in der IsoCTR-Gruppe gemessen (Zeitpunkt 3: ITGβ1  $112 \pm 69$  PU vs. IsoCTR  $213 \pm 52$  PU,  $p < 0,05$ ; Zeitpunkt 7: ITGβ1  $168 \pm 67$  PU vs. IsoCTR  $315 \pm 75$  PU,  $p < 0,05$ ).

**IsoCTR vs. ITGβ1**



**Abbildung 8: Vergleich der ischämischen Hinterläufe der IsoCTR- und ITGβ1-Gruppe.**

Angaben der Hinterlaufperfusion in Perfusionseinheiten (PU) mit Standardabweichung.

A Zeitpunkt -1: Die Ausgangsperfusion der Hinterläufe ist in beiden Gruppen vergleichbar stark ausgeprägt.

B Zeitpunkt 0: Unmittelbar postoperativ nimmt die Perfusion der ischämischen Hinterläufe in gleichem Ausmaß ab.

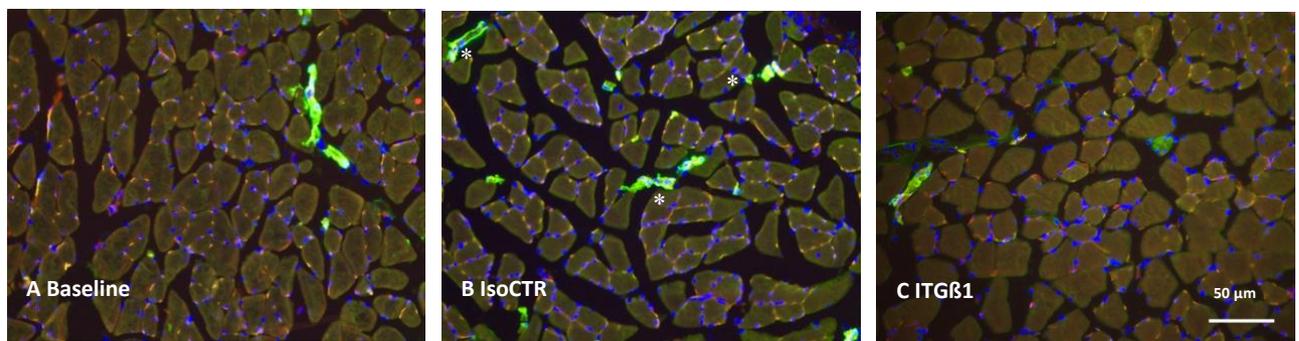
C Zeitpunkt 3: Die Perfusion der ischämischen Hinterläufe der ITGβ1-Gruppe ist drei Tage postoperativ signifikant schwächer (\*) als in der IsoCTR-Gruppe.

D Zeitpunkt 7: Auch nach sieben postoperativen Tagen konnte eine signifikant schwächere Perfusion in der ITGβ1-Gruppe (\*) als in der IsoCTR-Gruppe festgestellt werden.

### 3.2 Immunhistologische Untersuchungen

Durch die immunhistochemischen Färbungen wurden das Wachstum von Arteriolen und die Zunahme der Kapillardichte evaluiert. Von insgesamt 31 Mäusen wurden Oberschenkelmuskulatur (n=15) und Unterschenkelmuskulatur (n=16) hinsichtlich arteriogenetischer und angiogenetischer Anpassungsprozesse nach Ligatur der Femoralarterie untersucht.

#### CD31-Färbung der Oberschenkelmuskulatur



**Abbildung 9: Immunhistologische CD31-Färbung der Oberschenkelmuskulatur.**

Postoperativer Tag 7. 20-fache Vergrößerung.

Farblgende: Rot= Endothel/Kapillare, Grün= Glatte Muskelzellen/Arteriolen, Blau= Zellkerne.

A Baseline-Population: Nachweis einer Arteriole im Untersuchungsfeld.

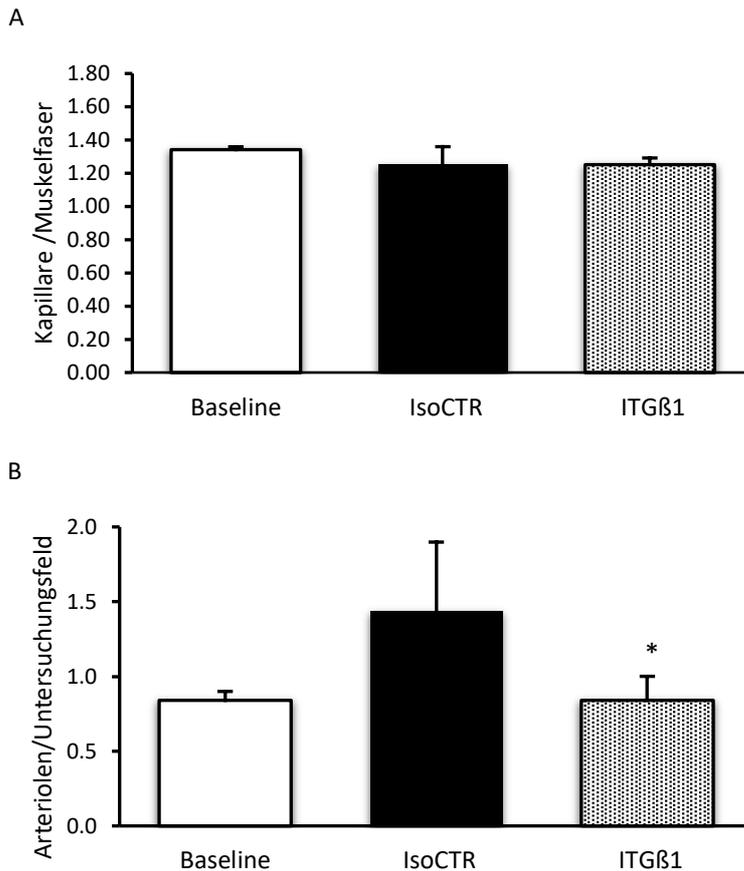
B IsoCTR-Gruppe: Zunehmende Arterioldichte, Wertung als 3 vollständig ausgebildete Arteriolen (\*).

C ITGβ1-Gruppe: Arterioldichte unverändert zur Baseline-Population, Nachweis einer Arteriole.

7 Tage nach Ligatur der Femoralarterie wurde die ischämische Oberschenkelmuskulatur der Kontrollgruppe (IsoCTR, n=5) und der Integrin Gruppe (ITGβ1, n=5) mit einer Baseline-Population (Baseline, n=5) verglichen, dessen Tiere ohne Ligatur der Femoralarterie untersucht wurden (Abbildung 9).

Aus Abbildung 10A ist zu entnehmen, dass die Kapillardichte in der Oberschenkelmuskulatur im Vergleich zwischen Baseline-Population, IsoCTR-Gruppe und ITGβ1-Gruppe keine wesentlichen Unterschiede zeigt. Statistisch signifikante Unterschiede finden sich im Bereich der Oberschenkelmuskulatur insbesondere bei der Arterioldichte (Arteriolen pro Untersuchungsfeld). Abbildung 10B zeigt eine signifikante Zunahme der Arterioldichte in der IsoCTR-Gruppe verglichen mit der Baseline-Population (IsoCTR  $1,44 \pm 0,46$  vs. Baseline

0,84 ± 0,06, p < 0,05). In der ITGβ1-Gruppe waren am siebten postoperativen Tag im Vergleich zur IsoCTR-Gruppe wiederum signifikant weniger Arteriolen pro Untersuchungsfeld zu dokumentieren (IsoCTR 1,44 ± 0,46 vs. ITGβ1 0,84 ± 0,16, p < 0,05). Im Vergleich zur Baseline-Population blieb die Arterioldichte nahezu unverändert.



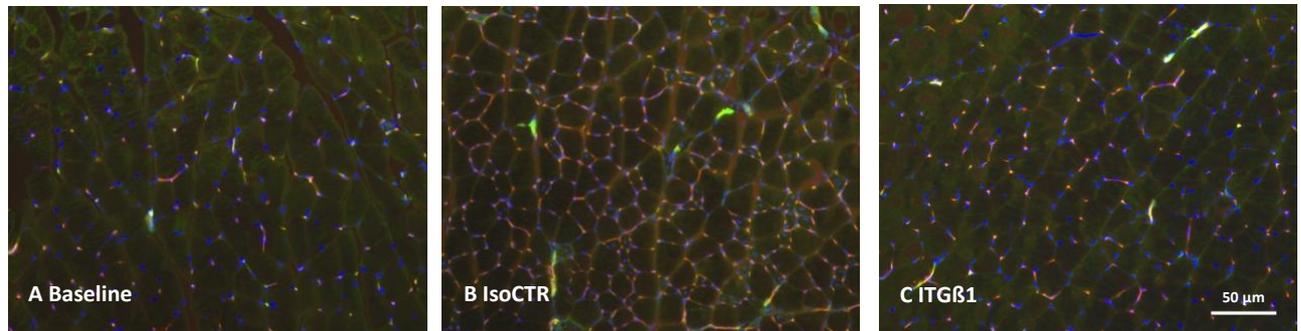
**Abbildung 10: Auswertung der immunhistologischen CD31-Färbung der Oberschenkelmuskulatur.**

Angaben mit Standardabweichung. Vergleich Baseline mit Untersuchungsgruppen am postoperativen Tag 7.

- A Im Vergleich zur Baseline-Population weisen die Untersuchungsgruppen keine Unterschiede hinsichtlich der Kapillardichte auf.
- B Im Vergleich zur Baseline-Population nimmt die Arterioldichte in der IsoCTR-Gruppe deutlich zu, die Arterioldichte in der ITGβ1-Gruppe bleibt nahezu unverändert. Im Vergleich der beiden Untersuchungsgruppen fällt eine signifikant geringere Arterioldichte in der ITGβ1-Gruppe auf (\*).

Zusammenfassend kommt es in der ischämischen Oberschenkelmuskulatur der IsoCTR-Gruppe zu einer Zunahme der Arterioldichte. Diese Zunahme ist nach Injektion des ITGβ1-Antikörpers signifikant schwächer. Die Kapillardichte bleibt in beiden Untersuchungsgruppen nahezu unbeeinflusst und zeigt keine signifikanten Unterschiede.

### CD31-Färbung der Unterschenkelmuskulatur



**Abbildung 11: Immunhistologische CD31-Färbung der Unterschenkelmuskulatur.**

Postoperativer Tag 14. 20-fache Vergrößerung.

Farblgende: Rot= Endothel/Kapillare, Grün= Glatte Muskelzellen/Arteriolen, Blau= Zellkerne.

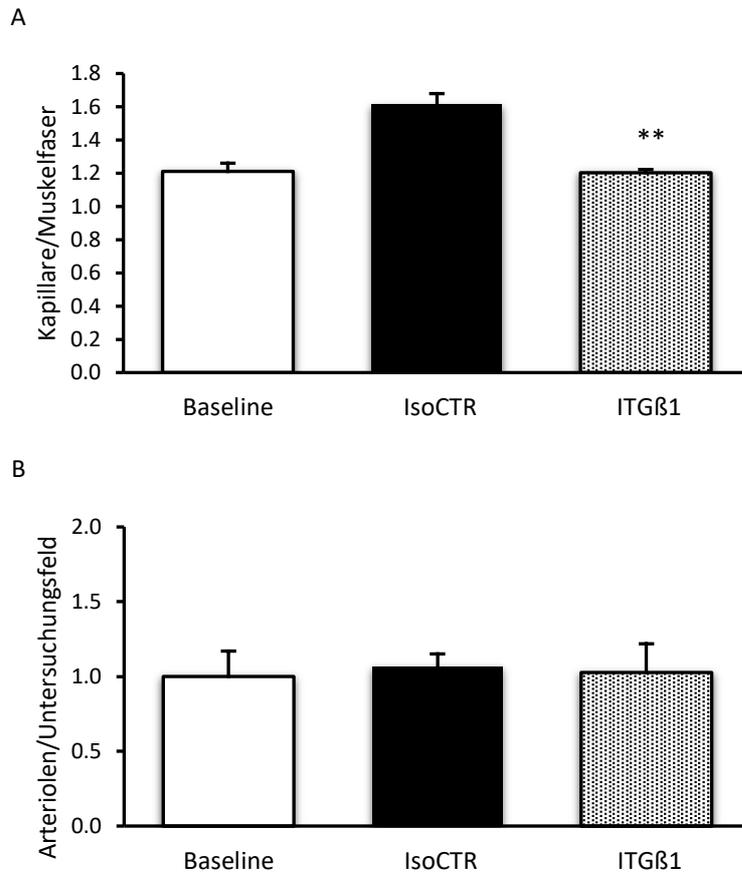
A Baseline-Population

B IsoCTR-Gruppe: Signifikante Zunahme der Kapillardichte im ischämischen Gewebe

C ITGβ1-Gruppe: Im Mittel keine Änderung der Kapillardichte zur Baseline-Population.

14 Tage nach Ligatur der Femoralarterie wurde die ischämische Unterschenkelmuskulatur von Kontrollgruppe (IsoCTR, n=5) und Integringruppe (ITGβ1, n=6) mit einer Baseline-Population (Baseline, n=5) verglichen, dessen Tiere ohne Ligatur der Femoralarterie untersucht wurden (Abbildung 11).

Aus Abbildung 12A geht hervor, dass im Vergleich zur Baseline-Population die Zunahme der Kapillardichte in der IsoCTR-Gruppe hoch signifikant ist (IsoCTR  $1,61 \pm 0,07$  vs. Baseline  $1,21 \pm 0,05$ ,  $p < 0,001$ ). Verglichen mit der ITGβ1-Gruppe besteht ebenfalls ein hoch signifikanter Unterschied (IsoCTR  $1,61 \pm 0,07$  vs. ITGβ1  $1,20 \pm 0,02$ ,  $p < 0,001$ ). Es sind deutlich weniger Kapillaren pro Muskelfaser in der ITGβ1-Gruppe zu quantifizieren als in der IsoCTR-Gruppe. Die Kapillardichte bleibt im Vergleich zu den Ausgangswerten der Baseline-Population hier nahezu unverändert. Hinsichtlich der Arteriolendichte ist aus Abbildung 12B zu entnehmen, dass es nach 14 Tagen weder in der IsoCTR-Gruppe noch in der ITGβ1-Gruppe einen signifikanten Unterschied zu der Baseline-Population gibt. Auch zwischen den beiden Untersuchungsgruppen besteht kein signifikanter Unterschied in der Arteriolendichte (IsoCTR  $1,07 \pm 0,08$  vs. ITGβ1  $1,03 \pm 0,19$ ,  $p = 0,65$ ).



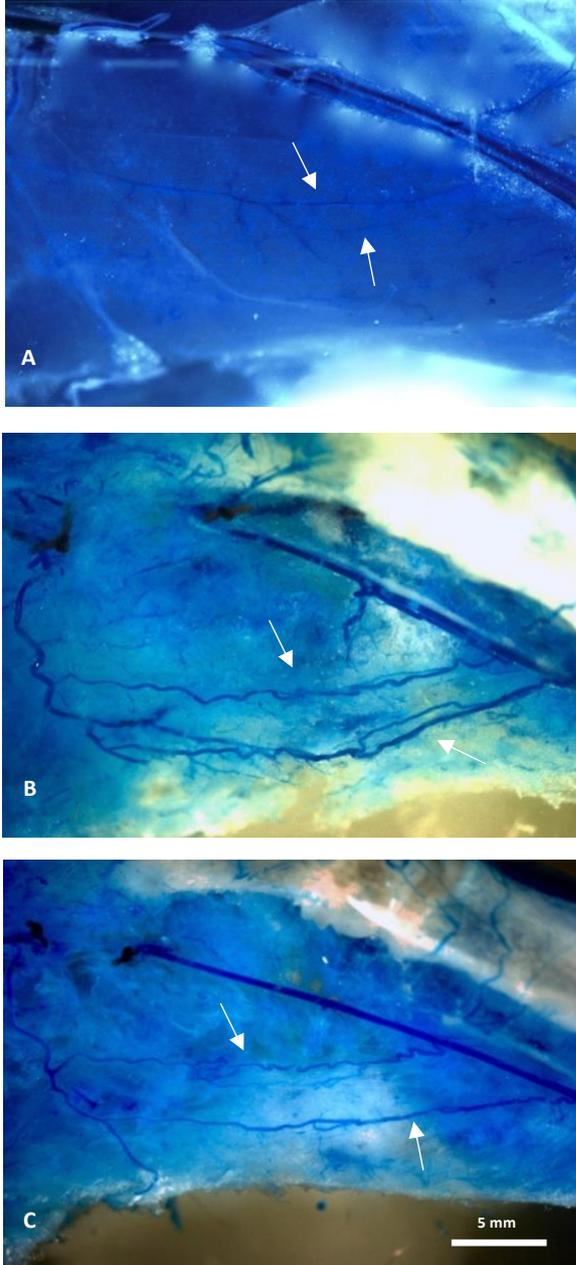
**Abbildung 12: Auswertung der immunhistologischen CD31-Färbung der Unterschenkelmuskulatur.**

Angaben mit Standardabweichung. Vergleich Baseline mit Untersuchungsgruppen am postoperativen Tag 14.

- A Im Vergleich zur Baseline-Population ist die Kapillardichte in der IsoCTR-Gruppe größer. Die Kapillardichte in der ITGβ1-Gruppe ist im Vergleich mit der IsoCTR-Gruppe hoch signifikant geringer (\*\*).
- B Im Vergleich zur Baseline-Population ist die Arterioldichte in den Untersuchungsgruppen nahezu unverändert, signifikante Unterschiede bestehen auch nicht zwischen IsoCTR- und ITGβ1-Gruppe.

In der Gesamtheit ergeben die immunhistologischen Auswertungen der IsoCTR-Gruppe, dass es in der Oberschenkelmuskulatur nach Ligatur der Femoralarterie zu einer Zunahme der Arteriolen und in der Unterschenkelmuskulatur zu einer Zunahme der Kapillardichte kommt. In der ITGβ1-Gruppe fällt diese Zunahme sowohl der Arteriolen in der Oberschenkelmuskulatur als auch der Kapillaren in der Unterschenkelmuskulatur signifikant schwächer aus.

### 3.3 Kunstharzuntersuchungen



**Abbildung 13: Kunstharzuntersuchungen an der ischämischen Oberschenkelmuskulatur.**

Übersichtsaufnahme. Kollaterale mit Pfeil markiert.

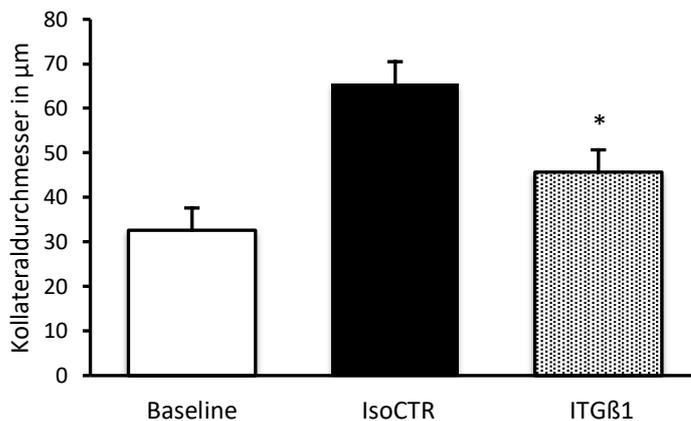
A Baseline-Population: Nach Ligatur der Femoralarterie sind zwei feine Kollateralarterien zu erkennen. Anpassungsprozesse haben zu diesem frühen Zeitpunkt noch nicht stattgefunden.

B IsoCTR-Gruppe, Tag 7: Makroskopisch ist bereits eine deutliche Zunahme des Kollateraldurchmessers mit typischen Korkzieherstruktur zu erkennen.

C ITGβ1-Gruppe, Tag 7: Im Vergleich zur IsoCTR-Gruppe sichtbar geringere Zunahme des Kollateraldurchmessers.

Um die Morphologie der Kollateralarterien darzustellen, wurde das Gefäßsystem der Hinterläufe der Mäuse mit Kunstharz (PU4ii) perfundiert (Abbildung 13).

Es wurden insgesamt 25 Mäuse untersucht. Die Ausgangswerte waren auf eine Baseline-Population (Baseline, n=5) zurück zu führen, dessen Tiere innerhalb von 2 Stunden nach Ligatur der Femoralarterie untersucht wurden. 7 Tage nach der Operation wurde eine Kontrollgruppe (IsoCTR, n=10) und eine Integringruppe (ITGβ1, n=10) untersucht. Zwei Mäuse aus der Kontrollgruppe und eine Maus aus der Integringruppe sind vor der Untersuchung verstorben, so dass sich die Größe des Untersuchungskollektivs verändert hat (IsoCTR n=8; ITGβ1 n=9).



**Abbildung 14: Auswertung der Kunstharzuntersuchungen.**

Der mittlere Gefäßdurchmesser in der IsoCTR-Gruppe nahm bis zum postoperativen Tag 7 signifikant zu. In der ITGβ1-Gruppe konnte im Vergleich zur IsoCTR am selben Zeitpunkt ein signifikant geringerer Kollateraldurchmesser dokumentiert werden.

Abbildung 14 zeigt, dass der mittlere äußere Durchmesser der Kollateralarterien der Baseline-Population  $32,63 \mu\text{m} \pm 1,20 \mu\text{m}$  betrug. Im Vergleich dazu nahm der Gefäßdurchmesser in der IsoCTR-Gruppe am siebten postoperativen Tag deutlich zu ( $65,48 \mu\text{m} \pm 5,26 \mu\text{m}$ ). In der ITGβ1-Gruppe konnte im Vergleich zur Baseline-Population ebenso eine Zunahme des Gefäßdurchmessers verzeichnet werden ( $45,68 \mu\text{m} \pm 3,96 \mu\text{m}$ ). Bei der Gegenüberstellung der zwei Untersuchungsgruppen fiel schließlich ein signifikant geringerer Gefäßdurchmesser in der ITGβ1-Gruppe auf ( $65,48 \mu\text{m} \pm 5,26 \mu\text{m}$  vs.  $45,68 \mu\text{m} \pm 3,96 \mu\text{m}$ ,  $p < 0,05$ ).

## 4. Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die genauen biologischen Mechanismen der Arteriogenese und der Angiogenese sind komplex und bisher unvollständig verstanden. Molekulare Mechanismen, die durch Scherstress oder Hypoxie ausgelöst werden und zu Gefäßwachstum führen, wurden bereits in vielen verschiedenen Studien untersucht [78,79]. Zahlreiche Signalkaskaden, die am Ablauf arteriogenetischer und angiogenetischer Prozesse beteiligt sind, wurden identifiziert. Troidl et al. haben zum Beispiel den Stellenwert scherstress-sensitiver Ionenkanäle, der Rho-Signalkaskade und der NOS-Signalkaskade herausgearbeitet [80-82]. Einen Zusammenhang zwischen VEGF-Stimulation, Migration von Monozyten und erhöhter Integrinexpression stellten Heil et al. her [53].

In der vorliegenden Arbeit wurde systematisch untersucht, ob und inwiefern die  $\beta$ 1-Untereinheit von Integrinen eine zentrale Bedeutung im Ablauf von Arteriogenese und Angiogenese hat.

Folgende Ergebnisse ließen sich aus der Studie schlussfolgern:

- In der Oberschenkelmuskulatur bleibt die Kapillardichte unverändert als Hinweis auf eine ausbleibende Ischämie.
- In der Oberschenkelmuskulatur kommt es postoperativ zu einer Zunahme der Arterioldichte sowie zu einem Wachstum der Kollateralarterien, was durch die Blockierung von  $\beta$ 1-Integrin abgeschwächt wird.
- In der ischämischen Unterschenkelmuskulatur kommt es postoperativ zu einer Zunahme der Kapillardichte. Durch die Blockierung von  $\beta$ 1-Integrin wird diese Zunahme abgeschwächt.

$\beta$ 1-Integrin hat einen wesentlichen Einfluss auf den Ablauf von Arteriogenese und Angiogenese. Durch die Blockierung des  $\beta$ 1-Integrins werden beide Formen des Gefäßwachstums signifikant abgeschwächt, aber nicht vollständig unterbunden.

## 4.2 Versuchstiere

Das postischämische Gefäßwachstum wurde bereits an vielen unterschiedlichen Tierarten untersucht und weiterentwickelt. Untersuchungen wurden an Großtieren wie Schweinen oder Kleintieren wie Kaninchen und Ratten durchgeführt [78,83]. Die Untersuchungen an Mäusen bieten im Vergleich dazu große Vorteile. Nach der Entschlüsselung des Genoms der Maus im Jahr 2002 ist bekannt, dass eine Übereinstimmung von 98% mit dem menschlichen Genom besteht. Dadurch lassen sich Mäuse genetisch verändern, so dass ein direkter Einblick in molekulare Zusammenhänge des Gefäßwachstums erlangt werden kann. Somit ist das Mausmodell inzwischen zum Referenzmodell zur Untersuchung arteriogenetischer und angiogenetischer Prozesse geworden.

In der Forschung werden zahlreiche verschiedene Mäusestämme verwendet. Der Stamm C57BL/6J weist im Vergleich zu anderen Stämmen wie zum Beispiel BALB/c oder A/J ein stärker ausgeprägtes präexistentes Kollateralnetzwerk auf, so dass C57BL/6J wesentlich schnellere postischämische Erholungszeiten zeigen und schwerwiegende Ischämien seltener auftreten [84]. Die in der Arbeit untersuchten Mäuse waren 10-13 Wochen alt, wobei ein schnelleres Erholungspotential nach Hinterlaufischämie für jüngere Mäuse (6-8 Wochen) beschrieben wurde [85]. Es konnte herausgefunden werden, dass weibliche C57BL/6J im Vergleich zu männlichen C57BL/6J vermindertes angiogenetisches Potential und eine beeinträchtigte Reaktion auf Vasodilatoren aufweisen. Zudem haben weibliche Mäuse einen vier- bis fünftägigen Sexualzyklus, in dem unterschiedliche Hormonkonzentrationen Einfluss auf das Gefäßwachstum nehmen [58,86]. Nach diesen Abwägungen schien es sinnvoller mit männlichen C57BL/6J zu arbeiten.

## 4.3 Hinterlauf-Ischämie Modell

Das Hinterlauf-Ischämie Modell wurde erstmals durch Couffinhal et al. angewendet, um endogene VEGF-Expression nach Ligatur der Femoralarterie zu messen [77]. Das in dieser Studie verwendete Protokoll wurde durch Limbourg et al. modifiziert [76]. Das Ziel dieses Modells besteht darin, durch Induktion einer einheitlichen Hinterlaufischämie die Wachstumsreaktion präexistenter Kollateralarteriolen und Kapillaren zu untersuchen.

Anatomisch gibt die A. femoralis nach Passage des Inguinalligaments die A. profunda femoris ab. Diese versorgt ein im M. semimembranosus und M. semitendinosus gelegenes Kollateralnetzwerk, welches knapp oberhalb des Knies wieder in die A. femoralis mündet. Kochi et al. haben eine sehr detaillierte Beschriftung dieser Anatomie ausgearbeitet, welche als Orientierung diente [87]. Durch Ligation der A. femoralis distal des Abganges der A. profunda kommt es zu einer Änderung der Hämodynamik im Kollateralnetzwerk, was zur stärkeren Perfusion des Kollateralkreislaufes führt [49].

Es ist wichtig nach einem standardisierten Verfahren vorzugehen, weil das Ausmaß der Ischämie von der Lokalisation der Ligatur abhängt. Die Ligatur distal des Abganges der A. profunda femoris führt aufgrund des gut ausgebildeten präexistenten Kollateralnetzwerkes nicht zu einer schwerwiegenden Ischämie [88]. Dennoch muss kritisch hinterfragt werden, ob die Operation nicht eher eine akute Ischämie induziert. Im Vergleich zwischen 6 Hinterlauf-Ischämie Modellen wurde jedoch geschlussfolgert, dass durch dieses Modell eine chronisch milde Ischämie erzeugt wird [89]. Andere Studien sehen in diesem Modell die Erzeugung einer akuten Ischämie und haben alternative Untersuchungen mit Ameroid-Konstriktoren durchgeführt, die über ein bis drei Tage zum allmählichen, subakuten Verschluss einer Arterie führen [90, 91]. Schließlich handelt es sich dabei jedoch um ein neuartiges, nicht etabliertes Modell, welches bislang große intra- und interindividuelle Unterschiede im Operationsablauf aufweist [92].

Bei dem etablierten Modell handelt sich um einen einfachen und komplikationsarmen chirurgischen Eingriff. Verglichen mit anderen Modellen, in der die das Ohr versorgenden Arterien oder die Carotiden ligiert wurden, besteht eine insgesamt niedrigere Mortalitätsrate [93,94]. In dieser Studie sind nach Etablierung der standardisierten Operation periprozedural keine Versuchstiere verstorben. Herausfordernd bei der Operation war die Trennung der A. femoralis von der V. femoralis. Durch den größeren Durchmesser und die dünnere Wand der Vene ist diese anfällig für Fehlpunktionen oder Zerreißung. Um die Wahrscheinlichkeit dafür zu reduzieren wurde das Operationsgebiet mit PBS feucht gehalten und der Bindegewebsschlauch mit einer stumpfen Pinzette disseziert. Bei insgesamt sechs Versuchstieren traten in dieser Studie geringfügige Blutungen auf. Diese Versuchstiere wurden entsprechend gekennzeichnet, um den Einfluss der dadurch entstandenen

Inflammation im Gewebe auf die Ergebnisse zu evaluieren. In der Auswertung der Ergebnisse bestanden keine bedeutenden Unterschiede zu den Versuchstieren ohne geringfügige Blutung. Schwerwiegende Blutungen traten nicht auf.

Zusammenfassend wurde in dieser Studie ein wissenschaftlich etabliertes Modell der Hinterlaufischämie erfolgreich angewendet, so dass Vergleiche zu anderen Studien möglich wurden. Da jedoch Komorbiditäten wie Übergewicht, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus oder Arteriosklerose bei den Versuchstieren fehlen, ist die eigentliche, komplexe Pathologie der pAVK durch das Modell nicht exakt abzubilden [92].

#### **4.4 Laser Doppler Flussmessung**

Für die Ermittlung des Blutflusses stehen verschiedene Messmethoden zur Verfügung. Eine verbreitete Messmethode zur Ermittlung der mikrozirkulatorischen Perfusion des Hinterlaufes ist das LDPI. Durch diese Messmethode konnten bereits in vielen Forschungsgebieten reproduzierbare Ergebnisse erreicht werden [76,95-97].

LDPI ist abhängig von der Umgebungstemperatur. Es wurde festgestellt, dass eine Temperatur um 37°C zu einer signifikant höheren muskulären Perfusion führte als bei niedrigen Temperaturen um 34°C [98]. Zur Standardisierung wurden alle Tiere vor der Untersuchung für fünf Minuten in eine klimatisierte Kammer gelegt. Um die zusätzliche Wärmeproduktion durch intrinsische Muskelaktivität zu verhindern, fand bereits vor Lagerung in der klimatisierten Kammer eine Anästhesie statt. In den präoperativen Messungen waren schließlich innerhalb der Populationen und zwischen den Hinterläufen der einzelnen Maus keine Unterschiede in der Perfusion der Hinterläufe messbar.

In der ersten postoperativen Messung kommt es als Nachweis einer erfolgreichen Ligatur zu einer deutlichen Perfusionsminderung in den ischämischen Hinterläufen. Die verbliebene Perfusion fand ausschließlich über das präexistente Kollateralnetzwerk statt. Die initiale, flussabhängige Vasodilatation der Arteriolen kann somit in der Akutphase den Blutfluss nicht ausreichend kompensieren. Mit dem Verschluss der Femoralarterie werden arteriogenetische Prozesse initiiert, welche ein aktives Wachstum der kollateralen Arteriolen zur Folge haben. Ab dem dritten postoperativen Tag lässt sich bereits eine signifikant gesteigerte Perfusion in

der IsoCTR-Gruppe nachweisen. Am siebten postoperativen Tag werden ca. 80% der Ausgangsperfusion erreicht. Demgegenüber wurde in der ITG $\beta$ 1-Gruppe am siebten postoperativen Tag eine Ausgangsperfusion von 40% erreicht, so dass eine deutlich abgeschwächte Reperfusion im ischämischen Hinterlauf festgehalten werden konnte. Aufgrund des eingeschränkten Untersuchungszeitraumes bleibt ungeklärt, ob sich die Reperfusion nach längerer Latenz weiter erholt. Vorherige Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass die maximale physiologische Reperfusion nach ca. sieben Tagen erreicht wird und eine blockierte Arteriogenese auch zwischen den postoperativen Tagen 7 bis 21 nicht zu einer stärkeren Reperfusion des ischämischen Hinterlaufes führt [95,99].

Auffällig ist die große Standardabweichung am dritten postoperativen Tag im nicht-ischämischen Hinterlauf der ITG $\beta$ 1-Gruppe (Abbildung 8). Mittels LDPI wurde hier bei einer Maus eine fast dreifach stärkere Perfusion nachgewiesen, die auch im ischämischen Hinterlauf dieser Maus auftrat. Am siebten postoperativen Tag wurde bei dieser Maus weder im nicht-ischämischen noch im ischämischen Hinterlauf eine stärkere Perfusion gemessen. Da die Ergebnisse zu dem Zeitpunkt 3 auch nach wiederholten Messungen reproduziert wurden, muss von einer zu dem Zeitpunkt bestehenden systemischen Erwärmung, verstärkter Muskeleigenaktivität vor der Messung durch unzureichende Anästhesie oder einer einmaligen Fehlinjektion des Antikörpers ausgegangen werden.

Zusammenfassend zeigte diese Untersuchung, dass sich die mikrozirkulatorische Perfusion des Hinterlaufes nach Injektion des ITG $\beta$ 1 langsamer erholt und insgesamt schwächer ausgeprägt ist. Da die Erholung der Perfusion auf arteriogenetische Prozesse zurückzuführen ist, ist davon auszugehen, dass die Blockade von  $\beta$ 1-Integrin arteriogenetische Prozesse abschwächt.

## 4.5 Immunhistologische Untersuchungen

Um die Auswirkungen des injizierten ITG $\beta$ 1 auf das Wachstumsverhalten von Arteriolen und Kapillaren zu quantifizieren, wurden die immunhistologischen Untersuchungen durchgeführt. Hierbei wurden CD31, SMA und Zellkerne fluoreszenzmikroskopisch identifiziert. CD31 ist ein Membranprotein, welches auch als Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül

(PECAM-1) bezeichnet wird und in hoher Konzentration von Endothelzellen aller Gefäße exprimiert wird. SMA ist ein Myofilament der glatten Muskelzelle, welche sich unter anderem in der Tunica media der Gefäße wiederfindet. Die Tunica media reicht jedoch nur bis zu den Arteriolen und fehlt bei den Kapillaren, wodurch eine Differenzierung der beiden verschiedenen Gefäßsegmente möglich wurde.

Am postoperativen Tag 7 konnte in der untersuchten Oberschenkelmuskulatur der Kontrollgruppe eine höhere Dichte an Arteriolen nachgewiesen werden, was auf den Ablauf arteriogenetischer Anpassungsprozesse zurückzuführen ist. Dies bestätigt ebenfalls Ergebnisse vorheriger Publikationen und zeigt, dass Kollateralwachstum im Bereich der okkludierten Arterien und somit proximal zur ischämischen Region stattfindet [49,57,58]. Durch die Injektion des ITG $\beta$ 1 konnte eine deutlich geringere Dichte an Arteriolen gegenüber der Kontrollgruppe und eine nahezu unveränderte Dichte gegenüber der Baseline-Population erreicht werden. Es ist davon auszugehen, dass durch die Blockade des  $\beta$ 1-Integrins das Wachstum der Arteriolen unterdrückt wird. Die Kapillardichte nimmt in beiden untersuchten Gruppen nicht zu, was sich mit Resultaten früherer Forschungen deckt [100]. Folglich hat sich nach Ligatur der Femoralarterie keine Ischämie in der Oberschenkelmuskulatur entwickelt.

In Voruntersuchungen wurde eine maximale Proliferationsaktivität im ischämischen Unterschenkeln am postoperativen Tag 7 beschrieben, welche zu einer signifikanten und konsolidierten Zunahme der Kapillardichte bis zum postoperativen Tag 14 führte [77]. Am Untersuchungszeitpunkt fand sich in der ischämischen Unterschenkelmuskulatur der Kontrollgruppe eine höhere Kapillardichte bei unveränderter Arterioldichte. Durch die induzierte Ischämie kann somit auf eine abgelaufene Angiogenese geschlossen werden. Die Muskelgruppen der Unterschenkelmuskulatur reagieren unterschiedlich sensibel auf Ischämie. M. tibialis anterior und M. soleus wiesen starke nekrotische Anteile auf, wohingegen im M. gastrocnemius weniger ausgeprägte nekrotische Areale zu finden waren [101]. Während der histologischen Auswertung wurde nicht zwischen den drei explantierten Muskelanteilen (Mm. soleus, gastrocnemius, plantaris) unterschieden, so dass hier die mittlere Kapillardichte der gesamten hinteren Unterschenkelmuskulatur ausgewertet wurde. Verglichen mit der höheren mittleren Kapillardichte in der Kontrollgruppe blieb durch Injektion von ITG $\beta$ 1 die Kapillardichte unverändert im Vergleich zu den Ausgangswerten.

Schließlich ließ sich durch die Unterdrückung des  $\beta 1$ -Integrins die angiogenetische Wirkung abschwächen.

## 4.6 Kunstharzuntersuchungen

Die Herstellung von vaskulären Ausgusspräparaten ist als Methode etabliert, um die dreidimensionale Gefäßarchitektur von Blutgefäßen zu rekonstruieren. Die optimierte Darstellung ausgewaschener Blutgefäße ist seit langer Zeit Gegenstand von Forschungen. Es wurden bereits viele verschiedene Materialien ausprobiert. Anfangs wurden natürliche Materialien wie Gelatine oder konzentriertes Leinsamenöl verwendet, im Laufe der chemischen Weiterentwicklung synthetische Materialien wie Silikon und Acrylharze [102,103]. Die Voraussetzungen für eine optimale Darstellung der Blutgefäße erfüllten diese Materialien nicht. Nach Krucker et al. musste das verwendete Material folgende Eigenschaften aufweisen: eine niedrige Viskosität zur Darstellung kleinster Blutgefäße, eine zeitnahe Polymerisation, einen minimalen Volumenverlust nach Aushärtung, Elastizität und Widerstandsfähigkeit um Mazeration zu vermeiden [104,105]. Im Vergleich zu häufig verwendeten Acrylharzen (Mercox, Clear Flex 95) war durch das Kunstharz *Polyurethane for improved imaging* (PU4ii, VasQtec, Schweiz) eine deutlich bessere Darstellung der Gefäße möglich [104].

Durch das LDPI und die immunhistochemischen Untersuchungen konnte bereits geschlussfolgert werden, dass nach Ligatur der Femoralarterie arteriogenetische Anpassungsprozesse in der Oberschenkelmuskulatur initiiert und durch ITG $\beta 1$  unterdrückt wurden. Diese Ergebnisse konnten nach morphometrischer Auswertung der Kollateralarterien bestätigt werden.

Durch den zunehmenden Kollagengehalt zwischen den glatten Muskelzellen kommt es während der Arteriogenese zu einem übermäßigen Längenwachstum der neu entstandenen Kollateralgefäße. Dadurch entsteht die typische korkenzieherförmige Morphologie, die bereits röntgenologisch in Voruntersuchungen nachgewiesen werden konnte [106]. Da ein größeres Blutvolumen mit geringerem Widerstand in den großen Kollateralarterien fließt, entwickelt sich in kleinen Kollateralgefäßen ein höherer Widerstand und es kann eine

Regression beobachtet werden [107]. Auf die Darstellung kleiner Arteriolen wurde jedoch aufgrund des komplexeren Untersuchungsaufwandes verzichtet.

Makroskopisch ist eine Zunahme des Gefäßdurchmessers nach Ligatur der Femoralarterie in beiden Gruppen sichtbar. Der mittlere Gefäßdurchmesser hat sich in der IsoCTR-Gruppe verzweifacht, jedoch ist eine mögliche Zunahme des Gefäßdurchmessers auf das bis zu 25-fache wie bei Scholz et al. in unserer Studie nicht nachvollziehbar [55]. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die untersuchten Arteriolen der C57BL/6J bereits vor Ligatur ein ausgeprägtes Kollateralnetzwerk bilden und eine Veränderung der Hämodynamik dadurch keinen maximalen Proliferationsreiz setzen kann. Ein weiterer Grund wäre, dass die veränderte Hämodynamik nach Ligatur im Bereich großer Arteriolen, wie in dieser Studie untersucht, einen geringeren Proliferationsreiz setzt als in Arteriolen mit kleinerem Durchmesser. Insgesamt lässt sich jedoch auch in den Kunstharzuntersuchungen eine abgeschwächte arteriogenetische Antwort nach Blockierung von  $\beta$ 1-Integrin feststellen, so dass der Gefäßdurchmesser im Mittel um ca. 30 % kleiner war.

Durch die Darstellung der Kollateralarterien mittels PU4ii konnten die histologischen Untersuchungen bestätigt werden. Arteriogenese findet in dem nicht-ischämischen Gewebe der Oberschenkelmuskulatur statt. Eine Vergrößerung des Gefäßdurchmessers der Kollateralarterien führt zu einer Teilkompensation der Durchblutung im ischämischen Unterschenkel. Die Blockierung von  $\beta$ 1-Integrin schwächt das Wachstum der Kollateralarterien und die Reperfusion des ischämischen Gewebes ab.

## **4.7 Therapeutische Angiogenese und Arteriogenese - Potential von Integrinen**

Aufgrund der zentralen Rolle von Integrinen in nahezu allen Abläufen der Humanbiologie als auch in der Pathophysiologie vieler Erkrankungen sind diese seit langem im Fokus biotechnologischer und pharmazeutischer Industrien. Im Jahr 2016 hat *ClinicalTrial.gov* 80 klinische Studien gelistet, in denen Integrine als therapeutischer Angriffspunkt untersucht wurden. Die im Vordergrund stehenden Erkrankungen sind maligne Tumore, Autoimmunerkrankungen, HIV oder Osteoporose. Integrine werden in diesem

Zusammenhang jedoch eher blockiert [108]. Die pAVK steht dabei noch nicht im unmittelbaren Fokus, da eine gezielte Aktivierung der Gefäßbildung als neues Therapiekonzept noch Schwierigkeiten bereitet.

Derzeitig sind 3 von den 24 bekannten, heterodimeren Integrinen therapeutische Angriffspunkte. Natalizumab bindet an  $\alpha 4\beta 1$  und  $\alpha 4\beta 7$  auf Lymphozyten und wird zur Therapie von Multipler Sklerose und Morbus Crohn verwendet. Das Medikament wird effektiv eingesetzt, jedoch sind wenige Fälle einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie als schwerwiegende Nebenwirkung beschrieben. Vedolizumab zielt ebenfalls auf  $\alpha 4\beta 7$  zur Behandlung von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa [109]. Die einzigen kardiovaskulär eingesetzten Integrinantagonisten sind Abciximab, Eptifibatid und Tirofiban, welche  $\alpha 2b\beta 3$  hemmen. Hauptziel ist die Prophylaxe von thrombotischen Komplikationen nach perkutaner Koronarintervention [110-112].

Angiogenese spielt pathophysiologisch insbesondere eine Rolle im Wachstum und in der Metastasierung maligner Tumore. Bekannte Angiogenese-Inhibitoren wie unter anderem Thalidomid, Bevacizumab oder Sorafenib richten sich vor allem gegen VEGF [113-115]. Cilengitide ist der erste antiangiogenetische Wirkstoff, der durch eine interne RGD-Sequenz Integrine ( $\alpha v\beta 3$  und  $\alpha v\beta 5$ ) als Angriffspunkte fixiert. Der Wirkstoff befindet sich in einer klinischen Phase III-Studie zur Behandlung von Glioblastomen [116]. Hinsichtlich der Behandlung der pAVK besitzt die Angiogenese einen nur geringen Stellenwert, da Angiogenese eine fehlende Durchblutung aufgrund eines arteriellen Gefäßverschlusses nicht kompensieren kann. Somit ist davon auszugehen, dass auch zukünftig die Entwicklung proangiogenetischer Wirkstoffe für die Prävention oder die Therapie der pAVK nicht im Mittelpunkt der Forschung stehen wird.

Durch Arteriogenese kann der Blutfluss in Kollateralarterien jedoch so stark gesteigert werden, dass die durch einen Gefäßverschluss entstandene Minderdurchblutung kompensiert werden kann. Dadurch hat die Arteriogenese im Vergleich zur Angiogenese eine größere medizinische Bedeutung in der Behandlung der pAVK.

Laut Leitlinien der DGA ist strukturiertes Gehtraining die wichtigste Therapiesäule bei der Behandlung der pAVK. Die Grundlage dieser Empfehlung ist die Kenntnis, dass eine arterielle

Kollateralisierung durch Bewegung gefördert wird. Bewegung führt zu einer stärkeren Durchblutung der Kollateralen, erhöht unter anderem den FSS und fördert somit eine therapeutische Arteriogenese. Das Gehtraining ist in erster Linie zur Prävention fortschreitender pAVK geeignet, bedarf einer hohen Patientencompliance und sollte in symptomfreien Stadien praktiziert werden. In fortgeschrittenen Stadien werden aktuell revaskularisierende oder operative Maßnahmen durchgeführt. Nicht alle Patienten sind für solche Verfahren geeignet, so dass ultima ratio eine Gliedmaßenamputation nötig werden kann. Um dies zu verhindern, wird erforscht, wie therapeutische Arteriogenese unabhängig von körperlicher Bewegung zu ermöglichen ist.

Buschmann et al. haben die Herz hose entwickelt, die durch externe Gegenpulsation die Kollateralisierung der Koronararterien bei schwerer KHK stimuliert [117]. Dieses Verfahren wurde 2016 für Patienten mit pAVK weiterentwickelt. Die als individuelle Schergeschwindigkeits-Therapie bezeichnete Methode simuliert die Wirkung körperlichen Trainings auf die Arterien und konnte in ersten kleinen Studien die schmerzfreie Gehstrecke verlängern [118]. Neben der Stimulation der Arteriogenese durch physikalische Kräfte werden molekulare Mechanismen untersucht. GM-CSF verlängert die Lebensdauer von Monozyten. Seiler et al. konnten nachweisen, dass GM-CSF Arteriogenese im Menschen induzieren kann [119]. In späteren Studien musste eine sichere Anwendung jedoch bei gehäuftem Auftreten von akuten Koronarsyndromen während der Therapieepisode in Frage gestellt werden [120]. Positive Resultate aus Tierversuchen mit VEGF führten zu vielen kleineren klinischen Studien, welche auf einen vermeintlich proarteriogenetischen Effekt bei Patienten mit KHK oder pAVK schließen ließen [121,122]. Größere Erhebungen wie die VIVA-Studie konnten diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigen [123]. Der Einfluss von Integrinen auf die Arteriogenese ist bekannt. Die Forschungen in diesem Bereich sind jedoch noch nicht weit fortgeschritten.

In dieser Studie konnte ein deutlicher Einfluss der  $\beta$ 1-Untereinheit von Integrinen auf die Arteriogenese nachgewiesen werden. Hiermit konnte ein Beitrag geleistet werden, dass das komplexe Feld der therapeutischen Arteriogenese neue Ansatzpunkte findet.

## 4.8 Arteriogenese versus Atherogenese – ein Ausblick

Bereits 1984 wurde durch Barger et al. vermutet, dass Angiogenese den atherosklerotischen Prozess stimulieren kann [124]. In dem Reifungsprozess und der Morphogenese von Kollateralarterien lassen sich ebenfalls viele Überschneidungen zwischen Arteriogenese und Atherogenese finden: die inflammatorische Reaktion, die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen, die Invasion von Monozyten oder die Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen. Es ist bisher auch noch nicht bekannt, ob die Stimulation der Arteriogenese auch zu einer stärkeren Plaquebildung in vorgeschädigten Gefäßen führen kann.

Integrine als wichtige interzelluläre Kontakte beeinflussen sowohl Arteriogenese als auch Atherogenese, insofern kann die einfache Stimulation der Integrine nicht ausschließlich proarteriogenetische Effekte auslösen. In der vorliegenden Studie wurde belegt, dass die Blockade der  $\beta$ 1-Untereinheit einen deutlich abschwächenden Einfluss auf die Arteriogenese hat. Insofern sind weitere Studien durchzuführen, in welchen der Fokus auf eine Stimulation der  $\beta$ 1-Untereinheit gelegt wird. Aufgrund der Komplexität und der pathophysiologischen Übereinstimmungen zwischen Arteriogenese und Atherogenese bedarf es darüber hinaus weiterführender Untersuchungen mit dem Ziel zukünftig proarteriogenetische Angriffspunkte ohne atherogenen Nebeneffekt zu finden.

## 6. Verzeichnisse

### 6.1 Literaturverzeichnis

1. Fowkes, F.G., et al., *Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis*. Lancet, 2013. **382**(9901): p. 1329-40.
2. Fowkes, F.G.R., et al., *Edinburgh Artery Study: Prevalence of Asymptomatic and Symptomatic Peripheral Arterial Disease in the General Population*. International Journal of Epidemiology, 1991. **20**(2): p. 384-392.
3. Diehm, C., *getABI: German epidemiological trial on ankle brachial index for elderly patients in family practice to detect peripheral arterial disease, significant marker for high mortality*. Vasa, 2002. **31**(4): p. 241-8.
4. Meijer, W.T., et al., *Peripheral arterial disease in the elderly: The Rotterdam Study*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(2): p. 185-92.
5. Criqui, M.H., et al., *The prevalence of peripheral arterial disease in a defined population*. Circulation, 1985. **71**(3): p. 510-5.
6. Mendelson, G., W.S. Aronow, and C. Ahn, *Prevalence of coronary artery disease, atherothrombotic brain infarction, and peripheral arterial disease: associated risk factors in older Hispanics in an academic hospital-based geriatrics practice*. J Am Geriatr Soc, 1998. **46**(4): p. 481-3.
7. Ohman, E.M., et al., *The REduction of Atherothrombosis for Continued Health (REACH) Registry: an international, prospective, observational investigation in subjects at risk for atherothrombotic events-study design*. Am Heart J, 2006. **151**(4): p. 786.e1-10.
8. Malyar, N., et al., *Recent trends in morbidity and in-hospital outcomes of in-patients with peripheral arterial disease: a nationwide population-based analysis*. Eur Heart J, 2013. **34**(34): p. 2706-14.
9. Ford, E.S., W.H. Giles, and W.H. Dietz, *Prevalence of the metabolic syndrome among us adults: Findings from the third national health and nutrition examination survey*. JAMA, 2002. **287**(3): p. 356-359.
10. Ross, R., J. Glomset, and L. Harker, *Response to injury and atherogenesis*. Am J Pathol, 1977. **86**(3): p. 675-84.
11. Celermajer, D.S., et al., *Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults*. Circulation, 1993. **88**(5 Pt 1): p. 2149-55.
12. Mayhan, W.G. and G.M. Sharpe, *Effect of cigarette smoke extract on arteriolar dilatation in vivo*. J Appl Physiol (1985), 1996. **81**(5): p. 1996-2003.

13. Creager, M.A., et al., *Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I*. *Circulation*, 2003. **108**(12): p. 1527-32.
14. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis*. *Annu Rev Biochem*, 1977. **46**: p. 897-930.
15. Ferrieres, J., *Effects on coronary atherosclerosis by targeting low-density lipoprotein cholesterol with statins*. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2009. **9**(2): p. 109-15.
16. Tennant, M. and J.K. McGeachie, *Platelet-derived growth factor and its role in atherogenesis: a brief review*. *Aust N Z J Surg*, 1991. **61**(7): p. 482-8.
17. Fontaine, R., M. Kim, and R. Kieny, *[Surgical treatment of peripheral circulation disorders]*. *Helv Chir Acta*, 1954. **21**(5-6): p. 499-533.
18. Norgren, L., et al., *Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II)*. *J Vasc Surg*, 2007. **45 Suppl S**: p. S5-67.
19. Shammas, N.W., *Epidemiology, classification, and modifiable risk factors of peripheral arterial disease*. *Vasc Health Risk Manag*, 2007. **3**(2): p. 229-34.
20. Hirsch, A.T., et al., *ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease): endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation*. *Circulation*, 2006. **113**(11): p. e463-654.
21. Alonso-Coello, P., et al., *Antithrombotic therapy in peripheral artery disease: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines*. *Chest*, 2012. **141**(2 Suppl): p. e669S-e690S.
22. Hiatt, W.R., *Medical treatment of peripheral arterial disease and claudication*. *N Engl J Med*, 2001. **344**(21): p. 1608-21.
23. Regensteiner, J.G., et al., *Effect of cilostazol on treadmill walking, community-based walking ability, and health-related quality of life in patients with intermittent claudication due to peripheral arterial disease: meta-analysis of six randomized controlled trials*. *J Am Geriatr Soc*, 2002. **50**(12): p. 1939-46.
24. de Backer, T.L., et al., *Naftidrofuryl for intermittent claudication*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2012. **12**: p. Cd001368.
25. Marcial, J.M., et al., *Non-Invasive Therapy of Peripheral Arterial Disease*. *Bol Asoc Med P R*, 2015. **107**(3): p. 52-7.

26. Hillmeister, P., et al., *Arteriogenesis is modulated by bradykinin receptor signaling*. *Circ Res*, 2011. **109**(5): p. 524-33.
27. Nikol, S., et al., *Therapeutic angiogenesis with intramuscular NV1FGF improves amputation-free survival in patients with critical limb ischemia*. *Mol Ther*, 2008. **16**(5): p. 972-8.
28. Walter, D.H., et al., *Intraarterial administration of bone marrow mononuclear cells in patients with critical limb ischemia: a randomized-start, placebo-controlled pilot trial (PROVASA)*. *Circ Cardiovasc Interv*, 2011. **4**(1): p. 26-37.
29. Liu, Y., et al., *Therapeutic Efficacy of Stem Cell-based Therapy in Peripheral Arterial Disease: A Meta-Analysis*. *PLoS One*, 2015. **10**(4): p. e0125032.
30. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis*. *Nature*, 1997. **386**(6626): p. 671-4.
31. Schmidt, A., K. Brixius, and W. Bloch, *Endothelial precursor cell migration during vasculogenesis*. *Circ Res*, 2007. **101**(2): p. 125-36.
32. Risau, W. and I. Flamme, *Vasculogenesis*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1995. **11**: p. 73-91.
33. Pinter, E., et al., *Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) tyrosine phosphorylation state changes during vasculogenesis in the murine conceptus*. *Am J Pathol*, 1997. **150**(5): p. 1523-30.
34. Asahara, T., et al., *Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis*. *Science*, 1997. **275**(5302): p. 964-7.
35. Ribatti, D., et al., *Postnatal vasculogenesis*. *Mech Dev*, 2001. **100**(2): p. 157-63.
36. Adair, T.H. and J.P. Montani, *Integrated Systems Physiology: from Molecule to Function to Disease*, in *Angiogenesis*. 2010, Morgan & Claypool Life Sciences
37. Hristov, M., W. Erl, and P.C. Weber, *Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(7): p. 1185-9.
38. Hunter, J., *A treatise on the blood, inflammation, and gun-shot wounds*. 1794. *Clin Orthop Relat Res*, 2007. **458**: p. 27-34.
39. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. *N Engl J Med*, 1971. **285**(21): p. 1182-6.
40. Wang, G.L., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(12): p. 5510-4.
41. Dulak, J., et al., *Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. **20**(3): p. 659-66.
42. Avraamides, C.J., B. Garmy-Susini, and J.A. Varner, *Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis*. *Nat Rev Cancer*, 2008. **8**(8): p. 604-17.
43. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. *Nat Med*, 2000. **6**(4): p. 389-95.

44. Burri, P.H. and M.R. Tarek, *A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation*. Anat Rec, 1990. **228**(1): p. 35-45.
45. Djonov, V., O. Baum, and P.H. Burri, *Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis*. Cell Tissue Res, 2003. **314**(1): p. 107-17.
46. Heil, M. and W. Schaper, *Cellular mechanisms of arteriogenesis*. Exs, 2005(94): p. 181-91.
47. Meier, P., et al., *The collateral circulation of the heart*. BMC Med, 2013. **11**: p. 143.
48. Schirmer, S.H., et al., *Stimulation of collateral artery growth: travelling further down the road to clinical application*. Heart, 2009. **95**(3): p. 191-7.
49. Heil, M., et al., *Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences*. J Cell Mol Med, 2006. **10**(1): p. 45-55.
50. Silberman, M., et al., *Shear stress-induced transcriptional regulation via hybrid promoters as a potential tool for promoting angiogenesis*. Angiogenesis, 2009. **12**(3): p. 231-42.
51. Chien, S. and J.Y. Shyy, *Effects of hemodynamic forces on gene expression and signal transduction in endothelial cells*. Biol Bull, 1998. **194**(3): p. 390-1; discussion 392-3.
52. Heil, M. and W. Schaper, *Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (arteriogenesis)*. Circ Res, 2004. **95**(5): p. 449-58.
53. Heil, M., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates monocyte migration through endothelial monolayers via increased integrin expression*. Eur J Cell Biol, 2000. **79**(11): p. 850-7.
54. Schaper, W., *Collateral circulation: past and present*. Basic Res Cardiol, 2009. **104**(1): p. 5-21.
55. Scholz, D., W.J. Cai, and W. Schaper, *Arteriogenesis, a new concept of vascular adaptation in occlusive disease*. Angiogenesis, 2001. **4**(4): p. 247-57.
56. Cai, W. and W. Schaper, *Mechanisms of arteriogenesis*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2008. **40**(8): p. 681-92.
57. Deindl, E., et al., *Role of ischemia and of hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit*. Circ Res, 2001. **89**(9): p. 779-86.
58. Helisch, A., et al., *Impact of mouse strain differences in innate hindlimb collateral vasculature*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(3): p. 520-6.
59. Hynes, R.O., *Integrins: a family of cell surface receptors*. Cell, 1987. **48**(4): p. 549-54.
60. Hynes, R.O., *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines*. Cell, 2002. **110**(6): p. 673-87.
61. Humphries, J.D., A. Byron, and M.J. Humphries, *Integrin ligands at a glance*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 19): p. 3901-3.

62. Springer, T.A. and J.H. Wang, *The three-dimensional structure of integrins and their ligands, and conformational regulation of cell adhesion*. Adv Protein Chem, 2004. **68**: p. 29-63.
63. Moser, M., et al., *The tail of integrins, talin, and kindlins*. Science, 2009. **324**(5929): p. 895-9.
64. Campbell, I.D. and M.J. Humphries, *Integrin structure, activation, and interactions*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(3).
65. Shattil, S.J., C. Kim, and M.H. Ginsberg, *The final steps of integrin activation: the end game*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(4): p. 288-300.
66. Geiger, B., et al., *Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(11): p. 793-805.
67. Calderwood, D.A., *Integrin activation*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 5): p. 657-66.
68. Mitra, S.K., D.A. Hanson, and D.D. Schlaepfer, *Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(1): p. 56-68.
69. Legate, K.R., et al., *ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(1): p. 20-31.
70. Schwartz, M.A. and R.K. Assoian, *Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 14): p. 2553-60.
71. Barczyk, M., S. Carracedo, and D. Gullberg, *Integrins*. Cell Tissue Res, 2010. **339**(1): p. 269-80.
72. Evans, E.A. and D.A. Calderwood, *Forces and bond dynamics in cell adhesion*. Science, 2007. **316**(5828): p. 1148-53.
73. Carlos, T.M. and J.M. Harlan, *Leukocyte-endothelial adhesion molecules*. Blood, 1994. **84**(7): p. 2068-101.
74. Springer, T.A., *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm*. Cell, 1994. **76**(2): p. 301-14.
75. Polman, C.H., et al., *A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis*. N Engl J Med, 2006. **354**(9): p. 899-910.
76. Limbourg, A., et al., *Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia*. Nat Protoc, 2009. **4**(12): p. 1737-46.
77. Couffinhal, T., et al., *Mouse model of angiogenesis*. Am J Pathol, 1998. **152**(6): p. 1667-79.
78. Pipp, F., et al., *Elevated fluid shear stress enhances postocclusive collateral artery growth and gene expression in the pig hind limb*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(9): p. 1664-8.
79. Eitenmuller, I., et al., *The range of adaptation by collateral vessels after femoral artery occlusion*. Circ Res, 2006. **99**(6): p. 656-62.

80. Troidl, C., et al., *Trpv4 induces collateral vessel growth during regeneration of the arterial circulation*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(8b): p. 2613-21.
81. Troidl, K., et al., *Actin-binding rho activating protein (Abra) is essential for fluid shear stress-induced arteriogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(12): p. 2093-101.
82. Troidl, K., et al., *Effects of endogenous nitric oxide and of DETA NONOate in arteriogenesis*. J Cardiovasc Pharmacol, 2010. **55**(2): p. 153-60.
83. Joviliano, E.E., et al., *Inferior canine hindlimb ischemia and reperfusion impairs femoral artery endothelium-dependent wall relaxation*. Vasc Endovascular Surg, 2005. **39**(1): p. 39-46.
84. Chalothorn, D. and J.E. Faber, *Strain-dependent variation in collateral circulatory function in mouse hindlimb*. Physiol Genomics, 2010. **42**(3): p. 469-79.
85. Niiyama, H., et al., *Murine model of hindlimb ischemia*. J Vis Exp, 2009(23).
86. Peng, X., et al., *Gender differences affect blood flow recovery in a mouse model of hindlimb ischemia*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **300**(6): p. H2027-34.
87. Kochi, T., et al., *Characterization of the arterial anatomy of the murine hindlimb: functional role in the design and understanding of ischemia models*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e84047.
88. Skjeldal, S., et al., *Model for skeletal muscle ischemia in rat hindlimb: evaluation of reperfusion and necrosis*. Eur Surg Res, 1991. **23**(5-6): p. 355-65.
89. Goto, T., et al., *Search for appropriate experimental methods to create stable hind-limb ischemia in mouse*. Tokai J Exp Clin Med, 2006. **31**(3): p. 128-32.
90. Tang, G.L., et al., *The effect of gradual or acute arterial occlusion on skeletal muscle blood flow, arteriogenesis, and inflammation in rat hindlimb ischemia*. J Vasc Surg, 2005. **41**(2): p. 312-20.
91. Yang, Y., et al., *Cellular and molecular mechanism regulating blood flow recovery in acute versus gradual femoral artery occlusion are distinct in the mouse*. J Vasc Surg, 2008. **48**(6): p. 1546-58.
92. Padgett, M.E., et al., *Methods for Acute and Subacute Murine Hindlimb Ischemia*. J Vis Exp, 2016(112).
93. Demicheva, E., M. Hecker, and T. Korff, *Stretch-induced activation of the transcription factor activator protein-1 controls monocyte chemoattractant protein-1 expression during arteriogenesis*. Circ Res, 2008. **103**(5): p. 477-84.
94. Schierling, W., et al., *Increased intravascular flow rate triggers cerebral arteriogenesis*. J Cereb Blood Flow Metab, 2009. **29**(4): p. 726-37.
95. Heil, M., et al., *Collateral artery growth (arteriogenesis) after experimental arterial occlusion is impaired in mice lacking CC-chemokine receptor-2*. Circ Res, 2004. **94**(5): p. 671-7.

96. Stucker, M., et al., *High-resolution laser Doppler perfusion imaging aids in differentiating between benign and malignant melanocytic skin tumours*. Acta Derm Venereol, 2002. **82**(1): p. 25-9.
97. Devgan, L., et al., *Modalities for the assessment of burn wound depth*. J Burns Wounds, 2006. **5**: p. e2.
98. Dines, K.C., et al., *Effects of body and hindlimb temperature on laser Doppler blood flow and vascular conductance in rat sciatic nerve and skeletal muscle*. J Neurol Sci, 1997. **148**(1): p. 7-13.
99. Limbourg, A., et al., *MAP-Kinase Activated Protein Kinase 2 Links Endothelial Activation and Monocyte/macrophage Recruitment in Arteriogenesis*. PLoS One, 2015. **10**(10): p. e0138542.
100. Scholz, D., et al., *Angiogenesis and myogenesis as two facets of inflammatory post-ischemic tissue regeneration*. Mol Cell Biochem, 2003. **246**(1-2): p. 57-67.
101. Shireman, P.K., et al., *MCP-1 parallels inflammatory and regenerative responses in ischemic muscle*. J Surg Res, 2006. **134**(1): p. 145-57.
102. Taylor, G.I. and J.H. Palmer, *The vascular territories (angiosomes) of the body: experimental study and clinical applications*. Br J Plast Surg, 1987. **40**(2): p. 113-41.
103. Lametschwandtner, A., U. Lametschwandtner, and T. Weiger, *Scanning electron microscopy of vascular corrosion casts--technique and applications: updated review*. Scanning Microsc, 1990. **4**(4): p. 889-940; discussion 941.
104. Krucker, T., A. Lang, and E.P. Meyer, *New polyurethane-based material for vascular corrosion casting with improved physical and imaging characteristics*. Microsc Res Tech, 2006. **69**(2): p. 138-47.
105. Meyer, E.P., et al., *Polyurethane elastomer: a new material for the visualization of cadaveric blood vessels*. Clin Anat, 2007. **20**(4): p. 448-54.
106. Ito, W.D., et al., *Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion*. Am J Physiol, 1997. **273**(3 Pt 2): p. H1255-65.
107. Schaper, W. and D. Scholz, *Factors regulating arteriogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(7): p. 1143-51.
108. Goodman, S.L. and M. Picard, *Integrins as therapeutic targets*. Trends Pharmacol Sci, 2012. **33**(7): p. 405-12.
109. Ley, K., et al., *Integrin-based therapeutics: biological basis, clinical use and new drugs*. Nat Rev Drug Discov, 2016. **15**(3): p. 173-83.
110. Collier, B.S., *Platelet GPIIb/IIIa antagonists: the first anti-integrin receptor therapeutics*. J Clin Invest, 1997. **99**(7): p. 1467-71.
111. Collier, B.S., *Anti-GPIIb/IIIa drugs: current strategies and future directions*. Thromb Haemost, 2001. **86**(1): p. 427-43.
112. Phillips, D.R. and R.M. Scarborough, *Clinical pharmacology of eptifibatide*. Am J Cardiol, 1997. **80**(4a): p. 11b-20b.

113. D'Amato, R.J., et al., *Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(9): p. 4082-5.
114. Shih, T. and C. Lindley, *Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies*. Clin Ther, 2006. **28**(11): p. 1779-802.
115. Liu, L., et al., *Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5*. Cancer Res, 2006. **66**(24): p. 11851-8.
116. Mas-Moruno, C., F. Rechenmacher, and H. Kessler, *Cilengitide: the first anti-angiogenic small molecule drug candidate design, synthesis and clinical evaluation*. Anticancer Agents Med Chem, 2010. **10**(10): p. 753-68.
117. Buschmann, E.E., et al., *Improvement of fractional flow reserve and collateral flow by treatment with external counterpulsation (Art.Net.-2 Trial)*. Eur J Clin Invest, 2009. **39**(10): p. 866-75.
118. Buschmann, E.E., et al., *Adaptation of external counterpulsation based on individual shear rate therapy improves endothelial function and claudication distance in peripheral artery disease*. Vasa, 2016. **45**(4): p. 317-24.
119. Seiler, C., et al., *Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study*. Circulation, 2001. **104**(17): p. 2012-7.
120. Zbinden, S., et al., *Safety and efficacy of subcutaneous-only granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for collateral growth promotion in patients with coronary artery disease*. J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(9): p. 1636-42.
121. Baumgartner, I. and J.M. Isner, *Stimulation of peripheral angiogenesis by vascular endothelial growth factor (VEGF)*. Vasa, 1998. **27**(4): p. 201-6.
122. Hendel, R.C., et al., *Effect of intracoronary recombinant human vascular endothelial growth factor on myocardial perfusion: evidence for a dose-dependent effect*. Circulation, 2000. **101**(2): p. 118-21.
123. Henry, T.D., et al., *The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis*. Circulation, 2003. **107**(10): p. 1359-65.
124. Barger, A.C., et al., *Hypothesis: vasa vasorum and neovascularization of human coronary arteries. A possible role in the pathophysiology of atherosclerosis*. N Engl J Med, 1984. **310**(3): p. 175-7.

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Angiogenese.

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Arteriogenese.

Abbildung 3: Liganden der Integrine mit  $\beta 1$ - Untereinheit.

Abbildung 4: Präparation und Ligation der A. femoralis.

Abbildung 5: Explantation der Ober- und Unterschenkelmuskulatur.

Abbildung 6: Ergebnisse des LDPI für die IsoCTR-Gruppe.

Abbildung 7: Ergebnisse des LDPI für die ITG $\beta 1$ -Gruppe.

Abbildung 8: Vergleich der ischämischen Hinterläufe der IsoCTR- und ITG $\beta 1$ -Gruppe.

Abbildung 9: Immunhistologische CD31-Färbung der Oberschenkelmuskulatur.

Abbildung 10: Auswertung der immunhistologischen CD31-Färbung der  
Oberschenkelmuskulatur.

Abbildung 11: Immunhistologische CD31-Färbung der Unterschenkelmuskulatur.

Abbildung 12: Auswertung der immunhistologischen CD31-Färbung der  
Unterschenkelmuskulatur.

Abbildung 13: Kunstharzuntersuchungen an der ischämischen Oberschenkelmuskulatur.

Abbildung 14: Auswertung der Kunstharzuntersuchungen.

## 6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zeitpunkte der Antikörperinjektion.

Tabelle 2: Verwendete Antikörper in der CD 31- Färbung.

Tabelle 3: Ergebnisse des LDPI.

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Christian Heiß danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die Motivation und Begeisterung für die Forschung und die Medizin. Seine Ausdauer, seine Sorgfalt und sein Vertrauen waren sehr hilfreich, neue Aufgaben zu bewältigen und nicht aufzugeben.

Besonders möchte ich Herrn Dr. med. Dimitrios Dimitroulis für die exzellente Betreuung und Zusammenarbeit danken. Er hatte ein stets offenes Ohr und ließ mich durch seine ermutigende Zusprache nie das Ziel aus den Augen verlieren.

Außerdem möchte ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Eckhard Lammert danken, dass ich die Räumlichkeiten des Instituts nutzen durfte und somit auch von Ratschlägen, Erfahrungen sowie konstruktiver Kritik aus seinem Team profitieren konnte.

Auch allen Mitarbeitern des kardiologischen Labors und allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für eine überaus lehrreiche Zeit und für eine gute Zusammenarbeit.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner gesamten Familie bedanken. Ihre Unterstützung während des gesamten Studiums, ihre freudige Erwartung meines Dokortitels und ihre aufmunternden Worte während der Anfertigung der Dissertation waren sehr wichtig für mich.