

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Klinische und Experimentelle Kardiologie
Univ.-Prof. Dr. Steffen Massberg

Die Rolle von Thrombozyten bei der Arteriogenese im Mausmodell

Said Chosro Farschtschi

**Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.**

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

- 1. Univ.-Prof. Dr. Steffen Massberg**
- 2. Univ.-Prof. Dr. Karl-Ludwig Laugwitz**

**Die Dissertation wurde am 21.10.2013 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin
am 09.07.2014 angenommen.**

Inhaltsverzeichnis

1.	<u>Verzeichnis der Abkürzungen</u>	V
2.	<u>Einleitung</u>	1
	2.1. Hintergrund	1
	2.2. Zielsetzung	2
3.	<u>Literaturteil</u>	3
	3.1. Formen des Gefäßwachstums	3
	3.1.1. Vaskulogenese	3
	3.1.2. Angiogenese	3
	3.1.3. Arteriogenese	5
	3.1.3.1. Grundlagen	5
	3.1.3.2. Mechanismen	7
	3.2. Thrombozytenfunktion	8
4.	<u>Material und Methoden</u>	10
	4.1. Tiere	10
	4.2. Problemstellung und Versuchsplan	10
	4.3. Reagenzien, Lösungen und Arzneien	11
	4.4. Thrombozytenpräparation	12
	4.5. Operation und Femoralis-Ligatur	13
	4.6. Jugulariskatheter	14
	4.7. Intravitalmikroskopie	14
	4.8. Statistik	16
5.	<u>Ergebnisse</u>	17
	5.1. C57BL6	17
	5.1.1. Akutversuche	17

5.1.2. Chronische Versuche (1 Tag nach Ligatur)	18
5.1.3. Chronische Versuche (3 Tage nach Ligatur)	19
5.2. GPIb α /IL4-R-Knockout (3 Tage nach Ligatur)	21
5.3. GPIb α /IL4-R-Wildtyp (3 Tage nach Ligatur)	22
5.4. C57BL6 – Akut mit Injektion der Thrombozyten vor Ligatur	23
5.5. Vergleich der Werte von GPIb α /IL-4R-KO und C57/BL6-Tieren	24
6. <u>Diskussion</u>	25
6.1. Diskussion von Material und Methoden	25
6.1.1. Versuchstiere	25
6.1.2. Operative Verfahren	27
6.1.3. Intravitalmikroskopie	28
6.2. Diskussion der Ergebnisse	28
6.2.1. Rolle der Thrombozyten bei der Arteriogenese	28
6.2.2. Funktionen des thrombozytären Rezeptors GPIb α	31
6.3. Limitationen	32
6.4. Ausblick	32
7. <u>Zusammenfassung</u>	34
8. <u>Summary</u>	35
9. <u>Literaturverzeichnis</u>	36
10. <u>Tabellenverzeichnis</u>	44
11. <u>Abbildungsverzeichnis</u>	45
12. <u>Danksagung</u>	47
13. <u>Lebenslauf</u>	48

Verzeichnis der Abkürzungen

1. Verzeichnis der Abkürzungen

A. fem.	Arteria femoralis
A. prof. fem.	Arteria profunda femoris
ADP	Adenosindiphosphat
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSS	Bernard-Soulier-Syndrom
ca.	circa
CWS	circumferential wall stress
d	Tag(e)
DCF	5-carboxyfluorescein-diacetat-succinimidyl-Ester
EGF	epidermal growth factor
ENA-78	epithelial-derived neutrophil activating factor-78
FGF	fibroblast growth factor
FSS	fluid shear stress
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GPIb-V-IX	Glykoprotein Ib-V-IX
GPIbα	Glykoprotein Ib α
GPIIb/IIIa	Glykoprotein IIb/IIIa
GPVI	Glykoprotein VI
HIF-1	Hypoxia inducible factor 1
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IL-1	Interleukin 1
IL-4-Rα	Interleukin-4 Rezeptor alpha
IL-8	Interleukin 8
i.p.	intraperitoneal
kg	Kilogramm
KHK	Koronare Herzkrankheit
KO	knockout
l	Liter
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MCP-3	monocyte chemotactic protein-3
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm²	Quadratmillimeter
MME	Fentanyl/ Midazolam/ Meditomedine-Gemisch zur intraperitonealen Injektion
mmol	Millimol
MMP	Matrix metalloproteinases
ms	Millisekunde(n)
n	Anzahl
NAP-2	neutrophil-activating peptide-2
NOS	NO-Synthase
O₂	Sauerstoff
PA	plasminogen activator
PAF	platelet activating factor
PAI	plasminogen activator inhibitor
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PD-ECGF	platelet derived endothelial cell growth factor
PDGF-B	platelet derived growth factor subunit B
pro-IL-1β	pro-Interleukin-1 beta
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted
SDF-1α	stromal cell derived factor 1 α
SSRE	shear stress response elements
TGF-β1	transforming growth factor β 1
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
TNFα	Tumornekrosefaktor α
TXA₂	Thromboxan-A2
VCAM	vascular cell adhesion molecule
V. fem.	Vena femoralis
V. prof. fem.	Vena profunda femoris
vWF	Von-Willebrand-Faktor

2. Einleitung

2.1 Hintergrund

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind seit Jahren unangefochten auf Platz eins der Ursachen für Mortalität und Morbidität in der westlichen Welt und lösen bereits in vielen Schwellen- und Entwicklungsländern (Asien, mittlerer Osten) Infektionskrankheiten als Spitzenreiter ab. Trotz der imposanten medizinischen Entwicklung der letzten Jahre und der Bemühungen neue Behandlungswege der Arteriosklerose zu finden, sterben in Deutschland immer noch knapp 42% der Männer und knapp 46% der Frauen an Gefäßerkrankungen. Gründe für diese über die Jahre kaum rückläufige Entwicklung sind in der demographischen Entwicklung mit steigender Lebenserwartung und sinkender Geburtenrate sowie in den in unserer Gesellschaft herrschenden Risikofaktoren zu suchen. Mit 22% ist der Anteil der Raucher immer noch hoch, wobei Adipositas und Hyperlipidämie als Risikofaktoren sogar noch steigen. Mit Behandlungskosten von fast 37 Mrd. Euro jährlich, allein in Deutschland, nehmen kardiovaskuläre Erkrankungen auch in sozioökonomischer Hinsicht den absoluten Spitzenplatz ein (Zahlen: statistisches Bundesamt, WHO).

Das frühere Bild einer degenerativen Alterserkrankung wurde von der modernen Sichtweise einer chronisch inflammatorischen Gefäßerkrankung verdrängt. Ihren akuten Folgen wie dem Myokardinfarkt oder dem Schlaganfall versucht man mit der Entwicklung spezialisierter Chest-Pain- und Stroke-Units gerecht zu werden. Im Hinblick auf die stattfindenden chronisch entzündlichen Umbauvorgänge der Gefäßwand wird jedoch auch deutlich, dass die Möglichkeiten der Behandlung im fortgeschrittenen Stadium limitiert sind. Somit stellen mechanistische Ansätze wie beispielsweise Bypass-Operationen, interventionelle Coronarangioplastien oder gar mutilierende Amputationen folglich nur zeitlich begrenzte, symptomatische Therapien dar. Ein besonderer Stellenwert kommt deswegen der Früherkennung und Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen zu, wie beispielsweise die konsequente medikamentöse Behandlung von Bluthochdruck bereits im jungen Alter.

Pathophysiologisch handelt es sich bei der Arteriosklerose um eine inflammatorische Systemerkrankung der arteriellen Gefäße mit Einlagerungen von Lipiden und Bindegewebe in die Gefäßwand. Dabei handelt es sich um einen komplexen Vorgang an dem viele verschiedene Zelltypen und Zytokine teilhaben. Am Beginn der Erkrankung steht eine endotheliale Dysfunktion, die zur Einwanderung von Monozyten, Proliferation von glatten Muskelzellen und Bindegewebszellen und schlussendlich zur Gefäßverkalkung führt. Einen besonderen Stellenwert nehmen Thrombozyten ein, die sowohl an den initialen Gefäßumbauprozessen als auch an den akuten thrombembolischen Folgen der Arteriosklerose teilhaben. Diese nur begrenzt umkehrbaren Vorgänge münden schließlich in der Stenosierung oder dem Verschluss von Gefäßen bzw. sind Ursache für thrombembolische

Gefäßverschlüsse in nachgeschalteten Gefäßarealen mit der Folge einer Sauerstoffminderversorgung der entsprechenden Gewebe. Symptomatisch werden kardiovaskuläre Erkrankungen meist erst im Spätstadium, wenn die Gefäßveränderungen weitestgehend unumkehrbar sind. So ist bekannt, dass nicht alle Patienten gleichermaßen symptomatisch werden bei einem vergleichbaren Gefäßstatus. Eine herausragende Bedeutung spielen dabei arterielle Kollateralgefäße, die die Blutversorgung nachgeschalteter Versorgungsgebiete sichern, obwohl Hauptblutleiter stenosiert oder verschlossen sind. Die Bildung dieser Umgehungskreisläufe aus bereits bestehenden Arterien wird Arteriogenese genannt. Gebildet werden sie, wenn erhöhte Scherkräfte auf das Endothel einwirken; dabei spielen sowohl der Grad der Stenosierung als auch die Geschwindigkeit, mit der sie entsteht, eine Rolle. In jüngerer Zeit zeigte sich, dass auch die Arteriogenese – ähnlich den chronischen Umbauvorgängen bei der Arteriosklerose – ein maßgeblich inflammatorischer Prozess ist. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Leukozyten in diesen Prozessen zytokinvermittelt eine eminente Bedeutung einnehmen, eine Beteiligung von Thrombozyten jedoch, die gemäß ihrer Rolle als zentraler Interaktionspartner der Leukozyten und Endothelzellen bei inflammatorischen Prozessen zu erwarten ist, wurde bisher nur wenig erforscht. Je nach Kollateralisierung kann ein Arterienverschluß verheerende Folgen haben, gar tödlich sein oder gänzlich asymptomatisch bleiben. Diese Umstände sowie die vermeintlich beteiligten Thrombozyten als potentielle Zielstruktur eröffnen Aussichten auf neue therapeutische Ansätze.

2.2 Zielsetzung

Ziel dieser Dissertation war es die Beteiligung der Thrombozyten – insbesondere des thrombozytären GPIIb α /IL4-Rezeptors - an der Arteriogenese im in-vivo Modell zu untersuchen. Grundlage war das Hinterlauf-Ischämie-Modell der Maus.

Neben Leukozyten, die bekanntermaßen an der Arteriogenese beteiligt sind, sind Thrombozyten die Hauptakteure bei Endothelverletzungen und endothelialer Dysfunktion, wie es schon für die Atherosklerose nachgewiesen wurde (Massberg et al. 2002). Eine Beteiligung von Thrombozyten an der Arteriogenese liegt somit nahe. Untersucht wurden C57/Bl6-Mäuse sowie GPIIb α /IL4-R-Knockout Mäuse mittels fluoreszenzverstärkter Intravitalmikroskopie. Quantifiziert wurden die Ergebnisse durch flächennormierte Auszählung der adhärenen und transienten Interaktion der Thrombozyten mit der Gefäßwand.

3. Literaturteil

3.1. Formen des Gefäßwachstums

3.1.1 Vaskulogenese

Vaskulogenese bezeichnet den Vorgang der Blutgefäßenstehung im embryonalen Organismus mittels In-Situ-Differenzierung von Endothelzellen. Dabei kommt es zur Auswanderung mesodermaler Vorläuferzellen (Progenitorzellen, Angioblasten) und Bildung neuer Blutgefäße durch diese. So wird die Anlage des embryonalen Herzens und eines initialen Gefäßsystems geschaffen (Patan 2004). Mesodermale Zellen des extraembryonalen Dottersackes – sogenannte Hämangioblasten – formieren sich zu Blutinseln (Bussolino et al. 1997). Die innen liegenden Zellen differenzieren zu Vorläuferzellen der hämatopoetischen Reihe, wohingegen die äußeren Zellen zu Endothelzellen werden. Durch den Zusammenschluss mehrerer solcher Blutinseln entstehen die ersten Gefäßplexus (Risau and Flamme 1995). Auch im Embryo formieren sich mesodermale Zellen zu Strängen, die später die großen Arterien und Venen sowie das Endokard bilden. Der Stimulus zur Vaskulogenese wird durch eine feste Abfolge von Zytokin- und Rezeptoraktivitäten bestimmt. Dabei sind sowohl Mesoderm als auch Endoderm beteiligt, die maßgeblich über VEGF die Gefäßproliferation steuern (Flamme 1989; Pardanaud et al. 1989). Nach Einsetzen der Zirkulation geht die Vaskulogenese in die Angiogenese über, um die bisher gefäßfreien Organanlagen mit Blut zu versorgen. Bis auf wenige Ausnahmen bleibt der Mechanismus der Vaskulogenese auf die Embryonalzeit beschränkt (Asahara et al. 1999; Shi et al. 1998). Der embryogenetisch gemeinsame Ursprung erklärt die enge Verwandtschaft von zirkulierenden Blutzellen und residenten Zellen der Gefäßwand (Choi 1998).

Das Wachstum von Blutgefäßen nach der Geburt, d.h. im adulten Organismus, läuft über zwei Mechanismen ab. *Angiogenese* beschreibt das "Aussprossen" von neuen Kapillaren aus bestehenden Gefäßen. Dagegen wird das Wachstum von Arterien aus einem bereits bestehenden Netz kleiner arterieller Verbindungen als *Arteriogenese* bezeichnet.

3.1.2. Angiogenese

Angiogenese stellt eine zweite Form der Gefäßneubildung dar, die zunächst im Zusammenhang mit der plazentaren Entwicklung beschrieben wurde (Hertig 1935). Später wurde der Begriff auch für die Bildung neuer Blutgefäße in soliden Tumoren verwendet (Folkman 1971). Zusammenfassend stellt sie die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Blutleitern dar, entweder als Sprossung oder als Duplikation von Kapillaren. Bei erstgenannter Form kommt es zytokinvermittelt zur

proteolytischen Degradation der Extrazellulärmatrix sowie Migration und Proliferation von Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Perizyten auf den angiogenetischen Reiz hin (z.B. Tumor, Hypoxie) (Pouyssegur et al. 2006; Pouyssegur and Mechta-Grigoriou 2006). In einer zweiten - nicht sprossenden - Variante teilen sich bestehende Gefäße in Form einer Längsspaltung: Es entsteht eine Gefäßduplikation. Dieser Vorgang wird als Intussuszeption bezeichnet (Carmeliet 2000; Carmeliet and Jain 2000; Risau 1997). Beide Formen laufen – in unterschiedlichem Ausmaß und in Abhängigkeit der bestehenden Gefäßversorgung – parallel und synchron in einem Organismus ab (Risau 1997), um dem wachsenden Bedarf an Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Gewebe gerecht zu werden. Abschließend kommt es zu einer Rekrutierung von Perizyten und glatten Muskelzellen sowie zu einer Anastomosierung von benachbarten Kapillaren. In dem auf diese Weise gebildeten dreidimensionalen Gefäßnetzwerk kann nun ein direktonaler Blutfluss einsetzen (Folkman and D'Amore 1996).

Schlüsselreiz für die Initiierung der Angiogenese ist Sauerstoffmangel, der über den Transkriptionsfaktor HIF-1 (hypoxia inducible factor 1) zu einer vermehrten Expression angiogener Wachstumsfaktoren führt (VEGF, FGF-1, IL-8, EGF, PD-ECGF, PDGF, TGF) (Krock et al. 2011; Marmé 2001; Risau 1998; Yancopoulos et al. 1998).

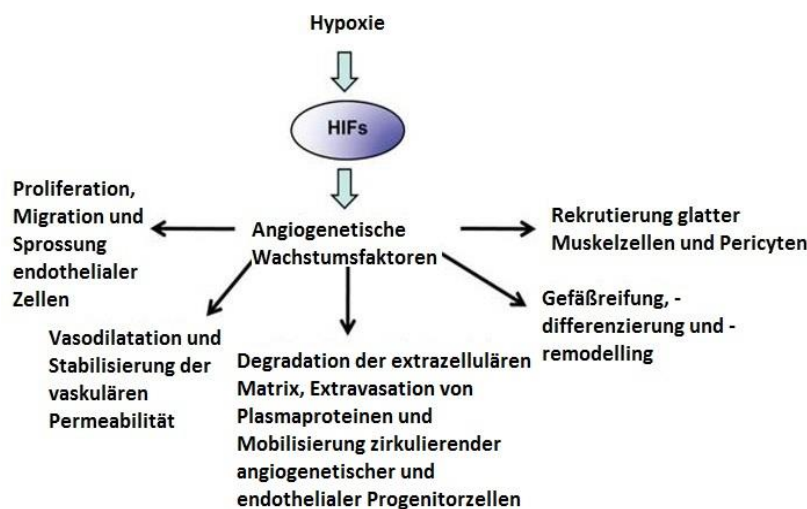


Abbildung 1: Regulation der Transkription angiogenetischer Faktoren mittels Hypoxie-induzierbarer Faktoren (HIFs) mit vielfältigen Wirkungen (Krock et al. 2011)

3.1.3. Arteriogenese

3.1.3.1. Grundlagen

Die Arteriogenese ist die Entwicklung von Arterien bzw. Arteriolen aus kleineren, vorbestehenden, kapillaren Gefäßen aufgrund von Scherkräften, die auf das Endothel wirken, um eine größere Blutmenge befördern zu können (Cai and Schaper 2008; Folkman 2007; Patan et al. 1996; Risau and Flamme 1995; Schaper and Buschmann 1999a). Arteriogenese ist die einzige physiologisch effiziente Form des Blutgefäßwachstums, die dazu in der Lage ist, Blutzirkulationsdefizite nach arteriellen Verschlüssen zu kompensieren. Während die Angiogenese ein Phänomen ist, das nahezu ausschließlich in ischämischen Arealen vorkommt, wie beispielsweise innerhalb von Tumoren, ist die Arteriogenese ein Vorgang, der im Rahmen der vaskulären Umstrukturierung ganzer Gefäßareale auftritt. Dabei spielt weniger die Minderversorgung mit Sauerstoff die entscheidende Rolle (Helisch et al. 2006), sondern vielmehr eine tangentielle Belastung der Gefäßwand in Form von Scherkräften (fluid shear stress - FSS). Das Gefäß, welches im Verlauf die Blutversorgung sicherstellt ist dabei bereits angelegt und entsteht nicht neu (Ito et al. 1997a). Die Vergrößerung des Gefäßdurchmessers beruht dabei nicht auf passiven dilatativen Prozessen, sondern auf aktiven Umbauprozessen der Gefäßwand, an denen sowohl Endothel- als auch glatte Muskelzellen beteiligt sind (van Royen et al. 2009). Wie diese Belastung durch Scherkräfte zur Erweiterung und zum Wachstum von Gefäßen führt, war Gegenstand vieler Studien (Ben Driss et al. 1997; Buus et al. 2001; Eitenmüller et al. 2006; Girard and Nerem 1995; Holtz et al; Ito et al. 1997a; Langille 1993; Resnick et al. 2003; Tronc et al. 1996). Dabei konnten bisher eine Vielzahl an molekularen und interzellulären Mechanismen geklärt werden, die für dieses Phänomen verantwortlich sind (Busse and Fleming; Castier et al. 2005; Davies 1995; Lehoux and Tedgui 2005; Papadaki et al. 1999; Resnick and Gimbrone 1995; Tzima et al. 2005). Leukozyten sind mittels Ausschüttung von Mediatoren und Rezeptorinteraktionen an den hochkomplexen Vorgängen beteiligt. Die Rolle der Leukozyten - insbesondere der Monozyten - konnte bereits umfangreich identifiziert werden, wohingegen die Beteiligung der Thrombozyten nahezu unerforscht ist.

Dabei sind eben genannte Vorgänge nicht nur von akademischem Interesse, sondern könnten auch eminente Bedeutung im klinischen Alltag erlangen. Erkenntnisse auf molekularer Ebene der Arteriogenese und sich somit ergebende Ansätze für pharmakotherapeutische Interventionen könnten wegweisend für die Behandlung von sowohl akuten wie auch chronischen Gefäßverschlusserkrankungen wie beispielsweise dem Herzinfarkt oder der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit haben.

Auch an physiologischen Prozessen ist die Arteriogenese beteiligt. So konnte gezeigt werden, dass ohne Vorhandensein von Ischämie ein Umbauvorgang an den uterinen Gefäßen während der Schwangerschaft stattfindet (Moll 2003).

Die Frage, ob es sich bei der Anlage der Kollateralen nach dem Arkadenprinzip um unvollständig differenzierte Reste des embryonalen Gefäßplexus handelt oder ob die feinen Arterien eine funktionelle Reserve zur Durchblutung der Muskulatur darstellen, bleibt derzeit noch offen. Physiologischerweise können sie bidirektional durchblutet werden, stellen jedoch nach Ausbildung einer Stenose der vorgeschalteten Hauptarterie mittels eines unidirektionalen Flusses die Versorgung peripher gelegener Gewebe sicher (Carmeliet 2000). Die Erstbeschreibung dieses Phänomens stammt bereits aus dem Jahr 1669 von dem englischen Arzt und Transfusionsforscher Richard Lower (Richard Lower 1669), der kollaterale Anastomosen am Herzen postulierte, die einen Versorgungsmangel mit Blut überbrücken könnten. Letztlich waren es Longland (periphere Arterien)(LONGLAND 1953) und Fulton (am Herzen), die diese These belegen konnten. Bereits 1956 konnte mit Hilfe postmortaler Angiografien gezeigt werden, dass selbst am Herzen gesunder Menschen Kollateralgefäße vorkommen (FULTON 1956) und somit die Vorstellung einer Versorgung durch funktionelle Endarterien (ZOLL et al. 1951) hinfällig ist. In den Herzen von Menschen mit koronarer Herzkrankheit findet man angiographisch eine deutliche Kollateralisierung. Dabei fällt vor allem der Durchmesser der Kollateralgefäße ins Gewicht, nicht jedoch ihre Zahl (FULTON 1963). Der bisher geltende Grundsatz der Notwendigkeit eines Sauerstoffmangels wurde für das Arteriogenese-Model mehrfach widerlegt (Arras et al. 1998; Ito et al. 1997a; Ito et al. 1997b; Schaper and Buschmann 1999b). Meist besteht ein erheblicher räumlicher Abstand zwischen dem Ort des Kollateralwachstums und der ischämischen Peripherie (Buschmann and Schaper 2000).

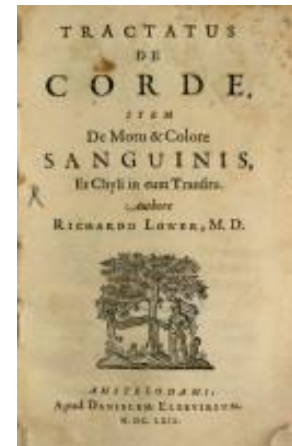


Abbildung 2:
Originalveröffentlichung von
Richard Lower

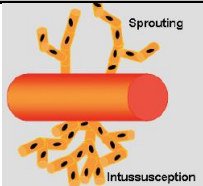
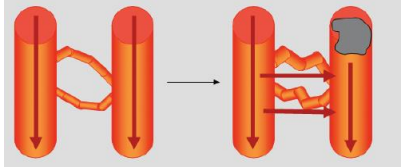
	Angiogenese	Arteriogenese
Definition	Sprossung neuer Kapillaren	Wachstum von Kollateralarterien
Ursprung der Gefäße	Vorbestehende Kapillaren	Vorbestehende Arteriolen
Sauerstoffstatus des Gewebes	Hypoxie	normal
Trigger	Ischämie	Tangentiale endotheliale Scherkräfte
Mechanismus	Inflammation	Inflammation
Blutflusssteigerung	1,5 – 1,7 fach	10 – 20 fach
Kompensation für Gefäßverschluss	Nein	Ja
		

Tabelle 1: Übersicht über die wichtigsten Merkmale und Unterschiede von Angiogenese und Arteriogenese (Buschmann and Schaper 1999; Schaper and Scholz 2003)

3.1.3.2. Mechanismen

Wesentlicher Faktor der Arteriogenese sind Scherkräfte. Nach Ausbildung einer hämodynamisch relevanten Stenose folgt der Blutfluss dem Weg des geringsten Widerstandes über die kollateralen Gefäße, auf die nun als Folge des erhöhten Flusses auch ein erhöhter Druck und somit auch eine erhöhte Schubspannung wirken. Als Folge kommt es zu einem Wachstum der blutführenden Leiter gemäß dem Gesetz der Histiomechanik von Thoma (Thoma R. 1893). Folge der intimalen Belastung durch diese Scherkräfte ist eine endotheliale Aktivierung. Es kommt zur Öffnung von Chloridkanälen, Flüssigkeitseinstrom mit Endothelschwellung (Ziegelstein et al. 1998) sowie Überexpression proarteriogenetischer Chemokine in den Endothelzellen. Dabei werden unter anderem MCP-1, GM-CSF (Chachoua et al. 1994), NOS, PDGF sowie Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 hochreguliert, die letztlich zu einer Monozytenattraktion, -adhäsion und -immigration führen (Chappell et al. 1998; Kosaki et al. 1998; Nagel et al. 1994; Shyy et al. 1994). An der Schnittstelle zwischen mechanischem Reiz und Genexpression fungieren shear stress responsive elements (SSRE) als Vermittler (Bao et al. 1999; Resnick et al. 1997). Die eingewanderten Monozyten bauen mittels TNF- α ein entzündliches Milieu auf und schaffen mithilfe von Matrix-Metallo-Proteinasen die räumlichen Voraussetzungen für eine Gefäßexpansion (Galis and Khatri 2002). Die Proliferation der gefäßbildenden Zellen wiederum wird

durch Zytokine angestoßen, die ebenfalls von den Monozyten gebildet werden (FGF-2, VEGF) (Arras et al. 1998; Clauss et al. 1996).

	Aktivatoren	Inhibitoren
Zytokine	MCP-1, GM-CSF, bFGF, FGF-4, FGFR1, PDGF-B, VCAM, TNF α , PA, MMP, Selectin, TGF β 1, NO, Prostacyclin, VEGF	PAI-1, TIMP
Physikalische Faktoren	FSS, CWS, axiale Spannung	Trägheitskraft (Windung der Arterie), Thrombose, Hypoxie

Tabelle 2: Molekulare und physikalische Aktivatoren und Inhibitoren der Arteriogenese (Carmeliet 2000; Schaper and Scholz 2003)

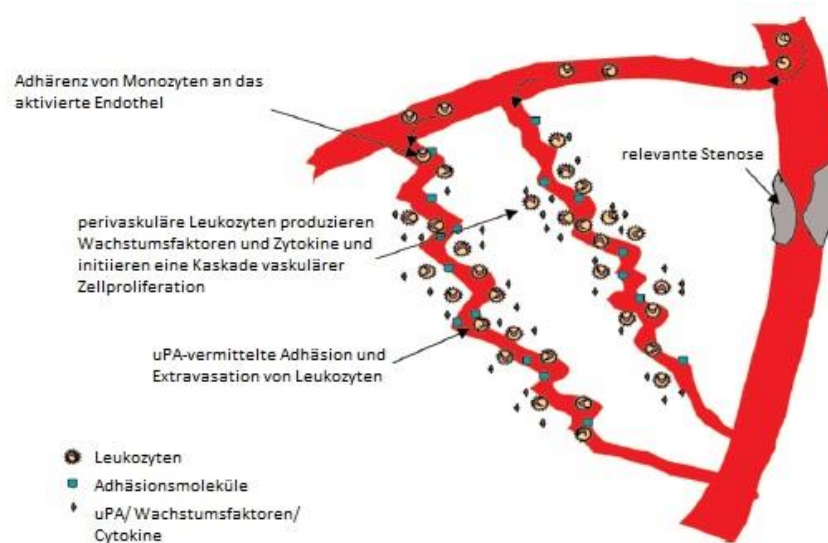


Abbildung 3: Mechanismus der Arteriogenese: Wegen der Stenose wird das Blut in die präexistente Arteriole umgeleitet. Die tangentialen Scherkräfte bewirken eine Aktivierung des Endothels mit Expression von ICAM-1 und uPA. Leukozyten werden rekrutiert, adhären und wandern in das perivaskuläre Gewebe. Durch lokale Produktion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen wie MCP-1, TGF- β 1 oder GM-CSF wird die Kaskade der vaskulären Zellproliferation angestoßen. (Deindl and Schaper 2005; Deindl et al. 2003)

3.2. Thrombozytenfunktion

Thrombozyten haben vielseitige Funktionen als Vermittler der primären Hämostase sowie als Aktivatoren der plasmatischen Gerinnung. Darüber hinaus kommt ihnen im Zuge inflammatorischer Prozesse eine noch nicht vollständig geklärte Funktion als Träger von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Mediatoren zu. Ihre Bedeutung im Rahmen des ischämischen Schlaganfalls oder des Myokardinfarktes ist unbestritten, jedoch wirken Thrombozyten auch maßgeblich am Remodelling der Gefäße mit (Ruggeri 2002). Die Aktivierung und die verschiedenen Wirkungen der Thrombozyten

werden durch hochkomplexe Kaskaden gesteuert, an denen weitere Faktoren aus dem Blut sowie Zellen beteiligt sind. Dabei interagieren Thrombozyten nicht nur mit verletzten, sondern auch mit strukturell intakten Endothelzellen (Frenette et al. 1995; Massberg et al. 1998; Massberg et al. 1999). Ein derart aktiviertes bzw. dysfunktionales Endothel kann beispielsweise durch tangentielle Scherkräfte, wie sie nach einem akuten oder chronischen Verschluss einer Arterie auftreten, entstehen. Dabei kommt es P-Selectin-vermittelt zu einer lockeren Bindung der Thrombozyten an das Endothel und zum Rollen der Thrombozyten. Neben GPVI bindet der Plättchenrezeptor Glykoproteinkomplex Ib-V-IX via von Willebrand Faktor (vWF) entweder an die subendotheliale Matrix oder an dysfunktionales, d.h. aktiviertes Endothel. Diese Bindung ist noch nicht endgültig und wird erst durch die Bindung von GPIIb/IIIa fest. GPIIb/IIIa bindet ebenfalls vWF aber auch Fibrinogen (Shattil and Newman 2004) und ist somit entscheidendes Element zur festen Plättchenbindung und Vernetzung und macht eine Thrombusformation erst möglich (Massberg et al. 2005). Die Thrombozyten sind – wie bereits oben erwähnt – Träger von Zytokinen und in der Lage bei loser oder fester Bindung infolge Rezeptorinteraktion diese auszuschütten, mit der Folge von funktionellen oder strukturellen Veränderungen im Bereich der Gefäße (Massberg et al. 2006).

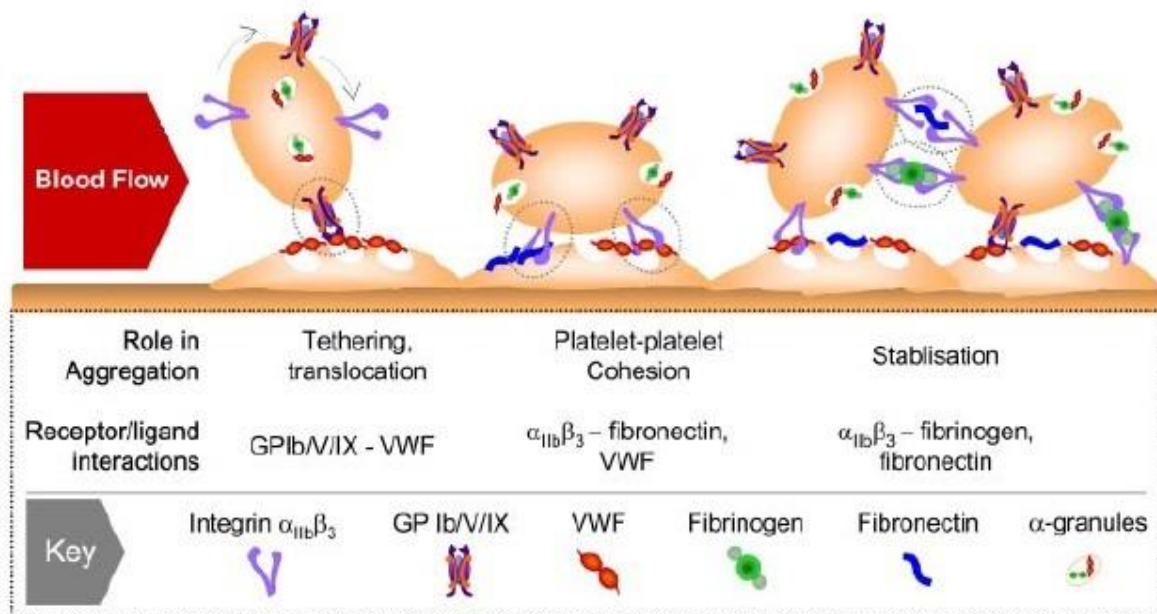


Abbildung 4: Abhängig von den anliegenden Scherkräften kommt es initial zum Tethering der Thrombozyten, das bei strukturell intaktem Endothel vornehmlich mittels nicht kovalenter Bindung des GPIb/V/IX-Komplexes an den vWF vermittelt wird. Bis zu diesem Zeitpunkt ist eine Thrombozytenaktivierung nicht zwingend erforderlich. Danach folgt eine Aktivierung von Thrombozyten sowie eine feste Bindung über das aktivierte Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) (Jackson 2007). An der Aktivierung der Integrine sind unter anderem die thrombozytären Zytokine ADP und TxA2 beteiligt (Varga-Szabo et al. 2008).

4. Material und Methoden

4.1. Tiere

Für alle Experimente wurden spezielle pathogenfreie Mäuse der Firma Charles River Laboratories verwendet. Es wurden für die verschiedenen Versuchsreihen Tiere folgender Stämme verwendet: C57BL6, GPIIb α / IL-4R-Knockout sowie GPIIb α -Wildtyp. Für die Experimente wurden Mäuse in einem Alter zwischen 8 und 13 Wochen verwendet. Alle durchgeführten und beschriebenen Versuche wurden unter strenger Beachtung des deutschen Tierschutzgesetzes und nach Zulassung durch die entsprechenden Behörden durchgeführt.

4.2. Problemstellung und Versuchsplan

Mit dem vorliegenden Versuchsaufbau wurde der Frage nach der Rolle der Thrombozyten bei der Arteriogenese nachgegangen. Dabei sollte im Hinterlauf-Ischämiemodell der Maus mit Hilfe der Intravitalmikroskopie die Interaktion zwischen zirkulierenden Thrombozyten und dem Endothel visualisiert werden. Um neben qualitativen und quantitativen Beobachtungen auch Aussagen über funktionelle Vorgänge machen zu können, wurden knock-out Mäuse eingesetzt. Damit konnten die thrombozytären Rezeptoren GPIIb α und GPIIb/IIIa selektiv ausgeschaltet werden. Nachdem sich anhand der ersten Versuchsgruppen zeigte, dass eine feste Thrombozytenadhäsion praktisch nicht stattfindet, wurde das besondere Augenmerk auf die transient adhärenen Thrombozyten gerichtet. Die Thrombozyten, so die Hypothese, werden aktiviert und interagieren kurzzeitig mit dem Endothel, um Zytokine und Mediatoren auszuschütten. Jedoch bleiben sie nicht fest adhären am Endothel hängen um einen okkludierenden Thrombus zu bilden, sondern werden anschließend an die kurze Interaktion wieder vom Blutfluss davon getragen. Im direkten Vergleich von Femoralis-okkludierter und nicht ligierter (sham) Seite und im Vergleich der verschiedenen Versuchsgruppen, sollten so Aussagen über die Funktion der eben genannten Rezeptoren möglich werden und deren Beteiligung im Rahmen der Arteriogenese erforscht werden. Um den verschiedenen Phasen der Arteriogenese gerecht zu werden, wurden die Untersuchungen zu drei verschiedenen Zeitpunkten nach Femoralisligatur durchgeführt: Akut nach Ligatur, 1 Tag und 3 Tage nach Ligatur.

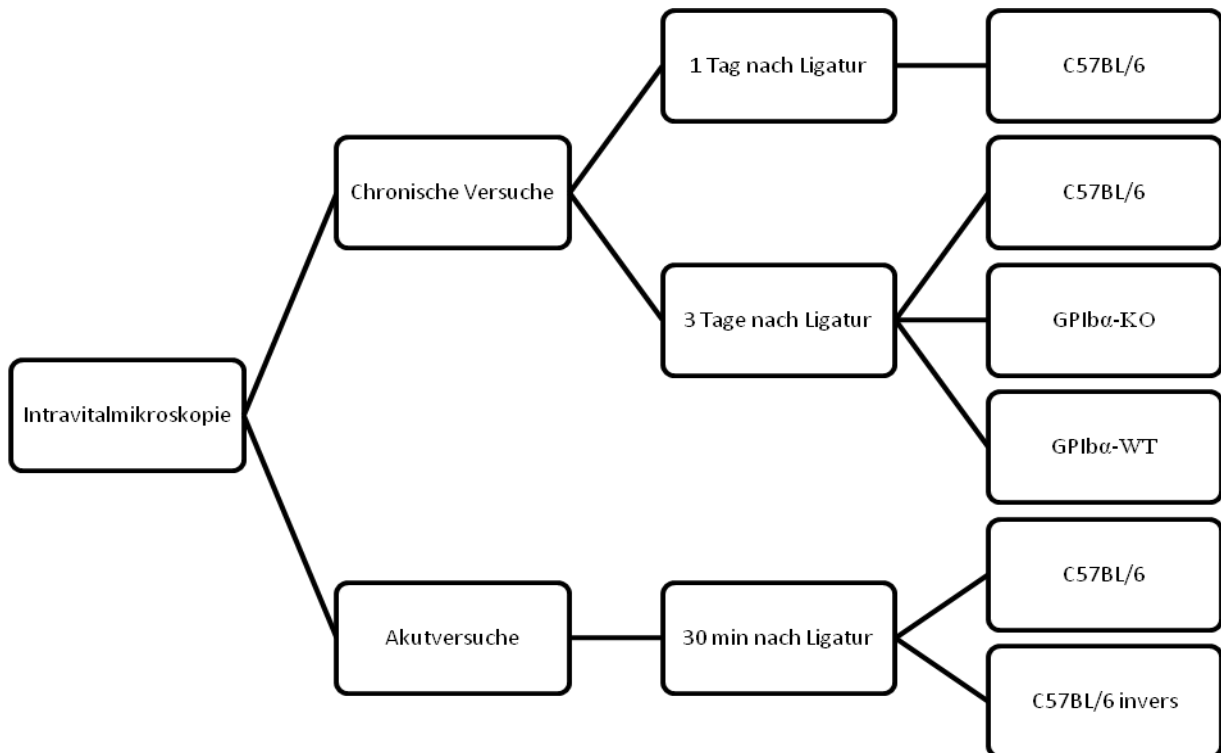


Abbildung 5: Versuchsplan Intravitalmikroskopie

4.3. Reagenzien, Lösungen und Arzneien

Citratantikoagulanz:

- 0,1 ml mit 38mmol/l Zitronensäure
- 75 mmol/l Natriumcitrat
- 100 mmol/l Dextrose

Tyrodes-Pufferlösung:

- 180ml Milliporewasser
- 0,2g D(+)-Glucose
- 0,2g bovines Serumalbumin
- 2ml HEPES-Puffer, 20ml konzentrierter Tyrodes-Puffer
- adjustiert auf pH 6,5 bzw. 7,4

Narkosegas:

- Isofluran-NO₂
- FiO₂ 0.35, 0.015L/L Isoflurane; Furene;
- Abbott GmbH, Wiesbaden, Germany

Intraperitoneale Anästhesie (MME-Anästhesie):

- Midazolam: 5mg/kg Körpergewicht (Ratiopharm)
- Meditomedine 0,5 mg/kg Körpergewicht (Pfizer)
- Fentanyl 0,05 mg/kg Körpergewicht (CuraMed Pharma GmbH)

Intraperitoneale Narkoseantagonisierung:

- Naloxon: Naloxon-hameln; 0,003mg/kg Körpergewicht
- Flumazenil: Anexate, Roche; 0,005 mg/kg Körpergewicht
- Atipamezol: Antisedan, Pfizer; 0,0005mg/kg Körpergewicht

Postoperative Analgesie:

- Buprenorphingabe am Versuchsende
- Temgesic, Essex Pharma GmbH
- 0,05mg/kg Körpergewicht
- Wiederholung nach 6h, 1d, 2d

4.4. Thrombozytenpräparation

Zur Präparation der Thrombozyten wurde Vollblut mittels standardisierter intrakardialer Blutentnahme aus entsprechenden Spendertieren (C57BL6, GPIIb α / IL-4R-Knockout bzw. GPIIb α -Wildtyp) abgenommen (Massberg et al. 1998). Dabei wurden immer die Spendertiere vom selben Genotyp wie die Empfängertiere gewählt. Die Tiere wurden durch Inhalation eines Isofluran-O₂-Gemisches über eine Gesichtsmaske anästhesiert. Zusätzlich wurde Fentanyl i.p. als Analgetikum 5 Minuten vor der Punktion appliziert. Die Blutentnahme erfolgte durch transthorakale Punktion des Herzens. Auf diese Weise konnten ca. 1ml Vollblut pro Maus gewonnen werden. Das Blut wurde in 1mL-Polypropylene-Röhrchen mit Citratantikoagulanzen aufgefangen. Im Folgenden wurde das Blut mit 1ml einer Tyrodes-Pufferlösung pH 6,5 gemischt und bei 250g 20 Minuten zentrifugiert (Heraeus Sepatech Megafuge 1.0). Das thrombozytenreiche Plasma wurde vorsichtig abpipetiert und in ein neues Röhrchen umgefüllt und mit weiteren 2 ml der Tyrodes-Pufferlösung pH 6,5 gemischt. Um die Thrombozyten zu färben wurden 20 μ l 5-carboxyfluorescein-diacetat-succinimidyl-Ester (DCF) hinzugegeben und 1 Minute inkubiert. Darauf folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt, nun mit 2000g für 10 Minuten. Das Pellet mit den darin enthaltenen Thrombozyten wurde in 500 μ l Tyrodes-Pufferlösung (250 μ l Tyrodes pH 6.5, 250 μ l Tyrodes 7.4) resuspendiert und deren Konzentration wurde gemessen (Sysmex KX-21N). Die so entstandene DCF-gefärbte Thrombozytensuspension wurde für den endgültigen Gebrauch auf eine standardisierte Thrombozytenkonzentration von 300.000/ μ l adjustiert. 250 μ l dieser Suspension wurden den Mäusen für die nachfolgende Intravitalmikroskopie über einen Jugulariskatheter injiziert.

4.5. Operation und Femoralisligatur

Zunächst wurden die Tiere durch Inhalation eines Isofluran-O₂-Gemisches narkotisiert, bevor ihnen eine intraperitoneale Injektion mit einem Fentanyl/ Midazolam/ Medetomidin-Gemisch verabreicht wurde. Die Leistenregion sowie die anterioren femoralen Bereiche wurden mit einer elektrischen Haarschneidemaschine rasiert und anschließend mit einer Epilationscreme (Pilca; GlaxoSmithKline) behandelt. Die narkotisierten Tiere wurden rüchlings auf eine Thermomatte gelegt, um eine konstante Körpertemperatur zwischen 36 und 37°C zu gewährleisten. Die Hinterläufe wurden in Supinations-/Abduktionsstellung fixiert. Nun wurden ca. 5 bis 7mm lange Hautinzisionen in der Leiste über der durch die Haut sichtbaren Arteria und Vena femoralis vorgenommen. Die Femoralarterie wurde auf Höhe des Abgangs der A. profunda femoris vom Nervus femoralis und der V. femoralis stumpf separiert. Die rechte A. femoralis wurde zwischen den Abgängen der A. circumflexa femoris und der A. descendens genu mit einem Seidenfaden der Stärke 0.5 (Parsalls Limited Silk Braided Suture Non sterile 0,5mm) unterbunden. Die Ligatur wurde mit mehreren gegenläufigen Knoten gesichert. Auf der linken Seite war die chirurgische Prozedur dieselbe, mit Ausnahme der Ligatur. Hier wurde ein ca. 3mm langes Stück des Seidenfadens lediglich unter die Arterie gelegt (Sham-Operation). Die Arterie wurde dabei nicht komprimiert, Effekte jedoch, die eine Folge der Operation darstellen, sollten so seitengleich auftreten. Für die chronischen Versuche (1 Tag post-OP und 3 Tage post-OP) wurde die Haut mit einem 7.0 Prolene-Faden (ethicon; Johnson & Johnson medical) in Einzelknopfnah-Technik nach Donati verschlossen und mit Betaisodona-Lösung desinfiziert, bevor die Tiere mit einer intraperitonealen Injektion einer antagonistischen Lösung aus Naloxon, Flumazenil und Atipamezol aus der Narkose erweckt wurden. Zur postoperativen Analgesie diente Buprenorphin.



Abbildung 6: Links: Sham-Operation; mitte: Femoralisligatur; rechts: Hautverschluss

4.6. Jugulariskatheter

Am Tag bzw. zum Zeitpunkt der Intravitalmikroskopie (direkt nach Femoralisligatur, bzw. ein oder drei Tage danach) wurde zur Injektion der gefärbten Thrombozyten ein systemischer Zugang benötigt. Deshalb wurde direkt vor der Intravitalmikroskopie ein Jugulariskatheter in die rechte V. jugularis gelegt. Dazu wurde die narkotisierte Maus (Isofluran-O₂, MME; siehe oben) mit dem Rücken auf einer Thermoplatte positioniert. Im ventralen Hals wurde eine ca. 1cm lange Hautinzision vorgenommen. Die großen Speicheldrüsen wurden stumpf zur Seite präpariert. Direkt darunter neben der Trachea liegen die Carotiden und die Jugularvenen. Die Venen wurden freipräpariert und die Zuflüsse aus den Speicheldrüsen unterbunden. Es folgte eine ca. 1mm lange Querinzision der Jugularvene ca. 5mm vor Eintritt in den Thorax. Durch diese Inzision wurde ein ca. 10cm langer Polyethylen-Katheter ca. 5-10mm weit vorgeschoben und mit Prolene-Fäden der Stärke 7-0 fixiert. Blutungen aus der Inzision oder aus Seitenästen wurden mit Prolene-Ligaturen gestoppt. Das distale Ende des Katheters war mit einem 3-Wege-Hahn versehen. Alle Anteile des Katheters waren mit steriler isotoner Kochsalzlösung vorgespült, um Luftembolien zu vermeiden. Für die Dauer des Versuchs wurde die Wunde provisorisch verschlossen.

4.7. Intravitalmikroskopie

Für die intravitalmikroskopischen Aufnahmen wurde ein Mikroskop der Firma Olympus, Typ BX51WI verwendet, Kamera: Hamamatsu ORCA-ER Digital Camera: C4742-80, Software für Durchführung und Auswertung der Versuche: CellR 2.8, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH (build 1235) copyright 1986-2008. Die bereits operierten Tiere (siehe oben, Tag 1 und 3 nach Femoralisligatur) bzw. die unligierten Akuttiere (IVM 30 Minuten nach Femoralisligatur) wurden zunächst mit Isofluran-NO₂ narkotisiert bevor sie mit einer intraperitonealen MME-Injektion (siehe oben) versehen wurden. Die Tiere wurden rücklings auf o.g. Thermomatten mit Supinations-/Abduktionsstellung beider Hinterläufe positioniert. Über eine Gesichtsmaske wurde Sauerstoff zugeführt (ca. 1 l/min). Ein Polyethylen-Katheter (Portex) wurde in die rechte V. jugularis gelegt. 75.000.000 DCF-gefärbte Thrombozyten wurden über diesen Katheter verabreicht. Die intravitalmikroskopische Bildgebung erfolgte 30 Minuten nach der Ligatur für die Akutversuche und 1 Tag bzw 3 Tage nach Ligatur für die chronischen Versuche. Für die chronischen Versuche wurden die Hautnähte in beiden Leisten der Mäuse eröffnet und die Inzisionen erweitert, sodass die A. femoralis sowie die A. profunda femoris mitsamt ihrer Abgänge komplett darstellbar waren. Isotone Kochsalzlösung wurde zur permanenten Befeuchtung während der Bildgebung eingesetzt. Bei der mikroskopischen Darstellung der

Material und Methoden

genannten Gefäße waren zwei Regionen von Interesse: Die A. profunda femoris proximal der Kollateral-Abgänge und die Kollateralgefäße selbst. Zur Darstellung der gefärbten Thrombozyten wurde mit einer Exposure-Time von 5ms belichtet (Binning 2x2). Für jede Region wurden Filme mit 100 Einzelbildern gemacht; zwischen den Einzelbildern lagen jeweils 72ms. Für die Auswertung der so entstandenen Filme wurde ein 50µm langes Gefäßstück ausgewählt. Die Breite des Gefäßes wurde gemessen. So konnten die Thrombozyteninterferenzen (permanente Adhäsion, transiente Adhäsion, Rollen) bezogen auf die Fläche wiedergegeben werden.

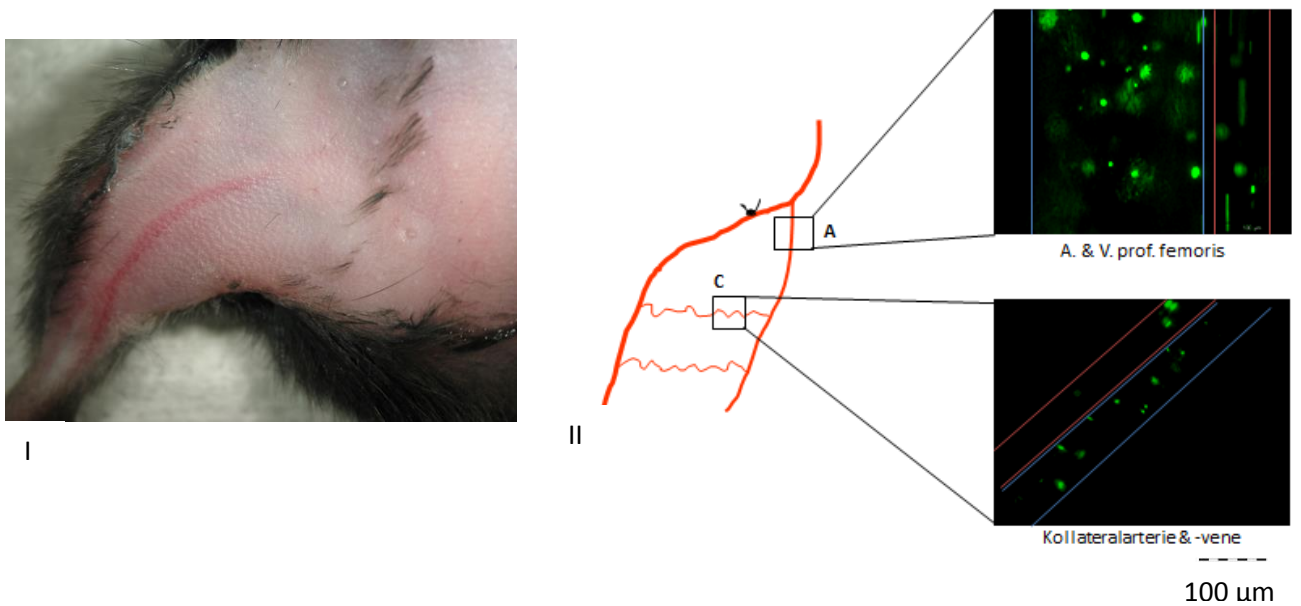


Abbildung 7: I: Lagerung des Maushinterlaufs nach Narkose und Rasur (Vergrößerung: 2x); II: Schematische und intravitalmikroskopische Darstellung des arteriellen Gefäßsystems (A. femoralis, Ligatur) des rechten Hinterlaufs einer Maus mit untersuchten Gefäßabschnitten: **A:** proximale A. profunda femoris; **C:** Kollateralarterie; *rechts:* Intravitalmikroskopische Darstellung der Arterien (rot) und ihrer Begleitvenen (blau)

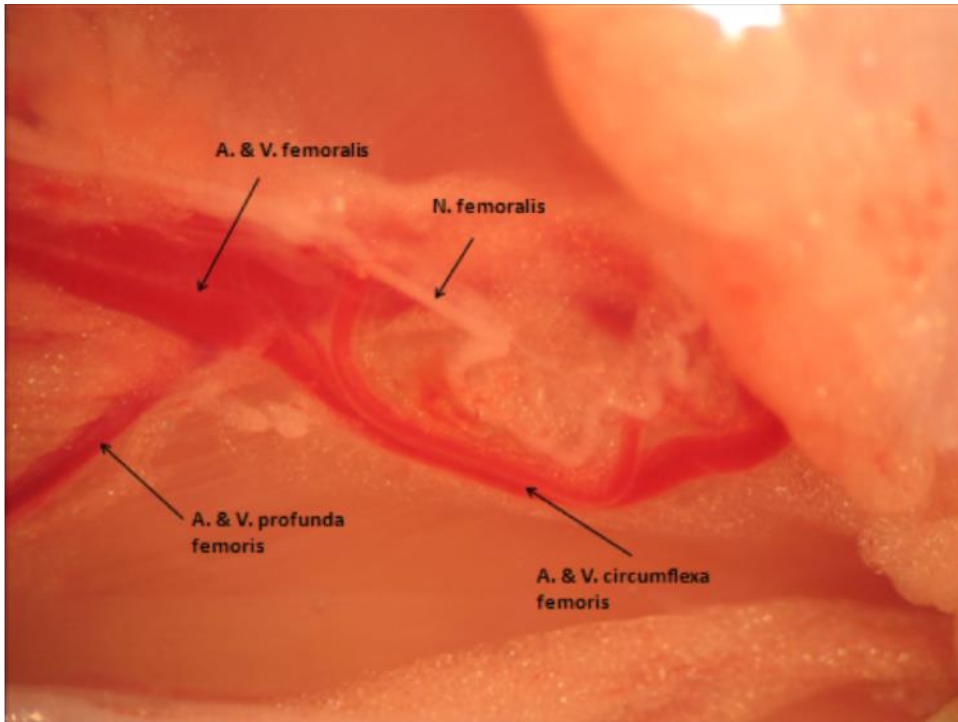


Abbildung 8: Vergrößerte Darstellung der Gefäße und Nerven am rechten Hinterlauf der Maus (6x)

4.8. Statistik

Die Aufbereitung sämtlicher Daten und Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Microsoft Excel (Version 14.0.6123.5001 (32 Bit); ©2010 Microsoft Corporation). Die statistischen Berechnungen der Signifikanzen und die graphische Darstellung erfolgten auf der Basis des T-Tests für unverbundene Stichproben nach Welch mit Hilfe der Software GraphPad (GraphPad Prism; Version 6.00; ©2012 GraphPad Software Inc.). Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als Grundlage für eine statistische Signifikanz herangezogen.

5. Ergebnisse

Für die intravitalmikroskopischen Versuche wurden Tiere 30 Minuten nach Femoralisligatur (Akutversuche; 3 Tiere) oder 1 (3 Tiere) bzw. 3 Tage (5 Tiere) nach Ligatur (chronische Versuche) untersucht. Akutversuche wurden mit C57BL6-Mäusen durchgeführt, chronische Versuche mit C57BL6, GPIIb/IIIa-IL-4R-Knockout sowie GPIIb/IIIa-IL-4R-Wildtyp Tieren.

5.1. C57BL6

5.1.1. Akutversuche

Auf der ligierten Seite waren in den Kollateralgefäßen mit 26556 Plättchen/mm² fast doppelt so viele transient adhärenz wie auf der sham-operierten Seite (13859 Plättchen/mm²); dies ist ein hoch signifikanter Unterschied (p=0.0039; 95%-CI: -17655,35 - -7738,65). Auch in der A. profunda femoris ist die Anzahl der transient adhärenz Thrombozyten höher auf der ligierten Seite (17774 im Vergleich zu 10206 Plättchen/mm²), wenngleich aufgrund der niedrigen Fallzahl nicht statistisch signifikant (p=0.1449; 95%-CI: -21528,18 – 6392,18). Fest adhärenz Thrombozyten waren deutlich weniger zu beobachten. Hier war ein Unterschied nur in den Kollateralgefäßen zu verfolgen (300 vs. 0 Plättchen /mm²), wohingegen die Zahlen in der A. profunda femoris auf beiden Seiten sehr ähnlich sind (106 vs. 89 Plättchen /mm²).

Tier	Sham-Seite (links)		Ligierte Seite (rechts)	
	A. prof. femoris	Kollateralarterie	A. prof. femoris	Kollateralarterie
1	12667	11467	23111	28667
2	8800	16444	19733	24333
3	9150	13667	10476	26667
Durchschnitt	10206	13859	17774	26556
Standardabweichung	1746	2037	5341	1771
SEM	1008	1176	3084	1022
Unterschied in %	100	100	174,2	191,6

Tabelle 3: C57BL6 30min nach Ligatur, gezählte transient adhärenz Thrombozyten pro mm²; n=3

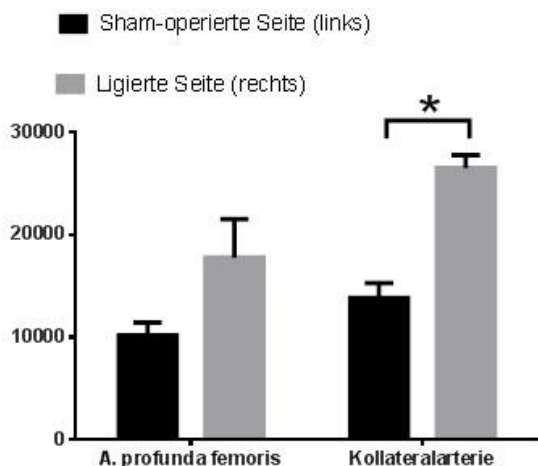


Abbildung 9: C57BL6 30min nach Ligatur, graphische Darstellung der gezählten transient adhärenz Thrombozyten pro mm²; n=3 (Balken: mean; error bars: SEM, *p < 0,050)

Ergebnisse

Tier	Sham-Seite (links)		Ligierte Seite (rechts)	
	Profunda	Kollaterale	Profunda	Kollaterale
1	0	0	0	667
2	267	0	0	233
3	0	0	318	0
Mean	89	0	106	300
STABWN	126	0	150	276
SEM	73	0	86	160
Unterschied in %	100	100	119,1	Div/0

Tabelle 4: C57BL6 30min nach Ligatur gezählte fest adhärenete Thrombozyten pro mm²; n=3

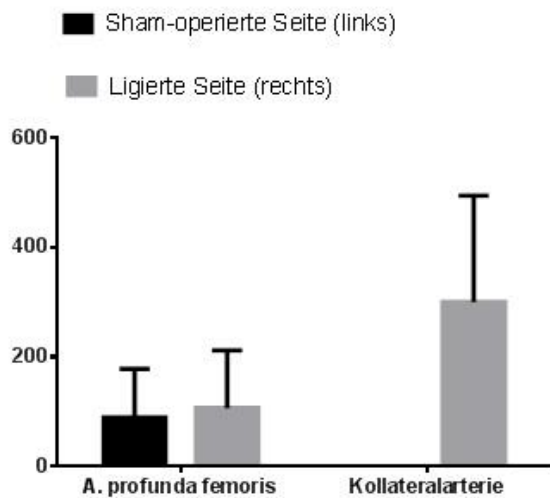


Abbildung 10: C57BL6 30min nach Ligatur, graphische Darstellung der gezählten fest adhäreneten Thrombozyten pro mm²; n=3 (Balken: mean; error bars: SEM, *p < 0,050)

5.1.2. Chronische Versuche (1 Tag nach Ligatur)

Bei den transient adhäreneten Thrombozyten ergeben sich auf beiden Seiten sehr ähnliche Werte sowohl in der A. profunda femoris (12626 auf der sham Seite vs. 13380 Plättchen/mm² auf der ligierten Seite) als auch in den Kollateralarterien (21369 vs. 21418 Plättchen/mm²). Wiederum waren im Vergleich zu den transient adhäreneten, nur wenige fest adhärenete Thrombozyten zu beobachten. Die Anzahl der fest adhäreneten Plättchen war auf der ligierten Seite höher, jedoch statistisch nicht signifikant.

Tier	Sham-Seite (links)		Ligierte Seite (rechts)	
	Profunda	Kollaterale	Profunda	Kollaterale
1	14000	23768	13656	17143
2	11515	26400	10769	29333
3	12364	13939	15714	17778
Durchschnitt	12626	21369	13380	21418
Standardabweichung	1031	5362	2028	5603
SEM	595	3096	1171	3235
Unterschied in %	100	100	106,0	100,2

Tabelle 5: C57BL6 1d nach Ligatur, gezählte transient adhärenete Thrombozyten pro mm²; n=3

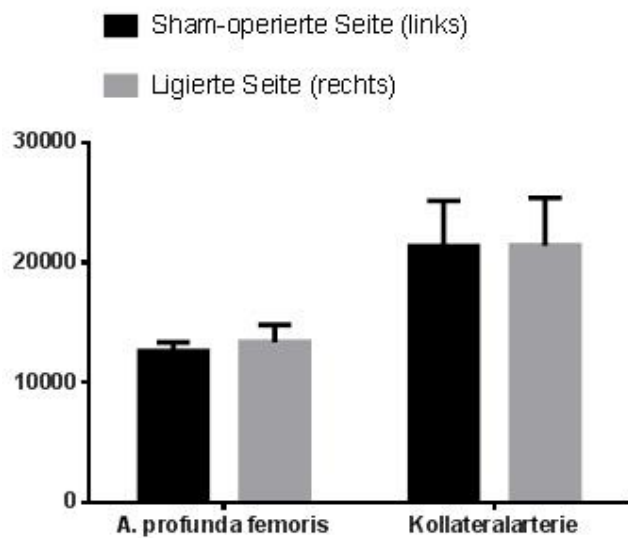


Abbildung 11: C57BL/6 1d nach Ligatur, graphische Darstellung der gezählten **transient adherenten** Thrombozyten pro mm²; n=3 (Balken: mean; error bars: SEM, *p < 0,050)

Tier	Sham-Seite (links)		Ligierte Seite (rechts)	
	Profunda	Kollaterale	Profunda	Kollaterale
1	0	290	0	333
2	0	0	0	0
3	0	0	476	222
Durchschnitt	0	97	159	185
Standardabweichung	0	137	225	139
SEM	0	79	130	80
Unterschied in %	100	100	Div/0	191,6

Tabelle 6: C57BL/6 1d nach Ligatur, gezählte **fest adhären**te Thrombozyten pro mm²; n=3

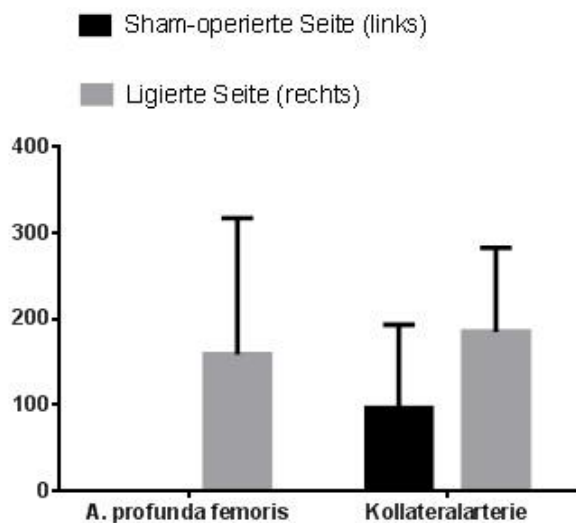


Abbildung 12: C57BL/6 1d nach Ligatur, graphische Darstellung der gezählten **fest adhären**te Thrombozyten pro mm²; n=3 (Balken: mean; error bars: SEM, *p < 0,050)

5.1.3. Chronische Versuche (3 Tage nach Ligatur)

Nach drei Tagen sind die Kollateralgefäße deutlich hervorgetreten und „korkenzieherförmig“ geschlängelt. Es ist ein deutlicher makroskopischer Unterschied zwischen ligierter und sham-operierter Seite zu erkennen. Dies zeigt sich auch auf der Zellebene, sowohl bei den transient- als auch bei den fest adhärenten Thrombozyten. Auf der sham-operierten Seite zeigte sich eine transiente Adhäsion von 10531 T/mm² in der A. profunda femoris und in den Kollateralen 13931 T/mm². Auf der ligierten Seite sind es 13337 T/mm² in der Arteria profunda und 21835 T/mm² in den

Ergebnisse

kollateralen Gefäßen. Eine statistische Signifikanz besteht somit nur für die transient adhärenenten Thrombozyten in den Kollateralgefäßen (7904 mehr als auf der Sham-Seite; $p=0.0312$; 95%-CI: -14750,02 - -1057,98). Die fest adhärenenten Thrombozyten zeigten sich wiederum als ein selteneres Ereignis im Vergleich zu den transient adhärenenten Ereignissen, zudem war kein statistischer Unterschied gegeben. Die fest adhärenenten Thrombozyten sind mit 111 T/mm² auf der sham-operierten Seite (nicht signifikant) häufiger als auf der ligierten mit 20 T/mm² (A. profunda femoris). In den Kollateralgefäßen hingegen wird deutlich, dass auf der ligierten Seite mehr Thrombozyten fest adhärenieren (447 vs. 267 T/mm²), wiederum jedoch ohne statistische Signifikanz .

Tier	Sham-Seite (links)		Ligierte Seite (rechts)	
	Profunda	Kollaterale	Profunda	Kollaterale
1	15061	12424	12778	17778
2	15200	13867	14709	23778
3	6202	8444	2267	22029
4	9306	24444	20363	23210
5	6889	10476	16566	22381
Durchschnitt	10531	13931	13337	21835
Standardabweichung	3894	5565	6075	2120
SEM	1742	2489	2717	948
Unterschied in %	100	100	126,6	156,7

Tabelle 7: C57BL6 3d nach Ligatur, gezählte transient adhärenente Thrombozyten pro mm²; n=5

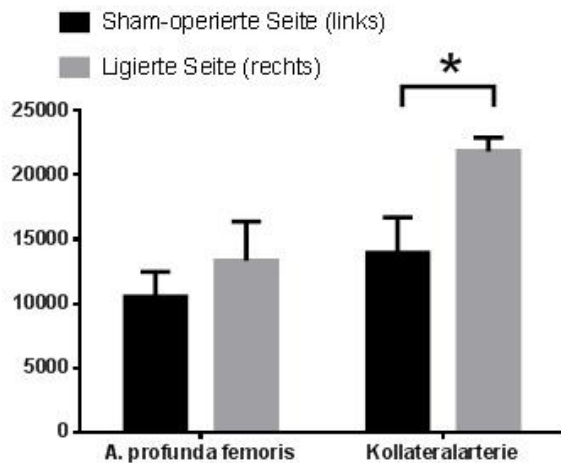


Abbildung 13: C57BL6 3d nach Ligatur, graphische Darstellung der gezählten transient adhärenenten Thrombozyten pro mm²; n=5 (Balken: mean; error bars: SEM, * $p < 0,050$)

Ergebnisse

Tier	Sham-Seite (links)		Ligierte Seite (rechts)	
	Profunda	Kollaterale	Profunda	Kollaterale
1	0	0	0	667
2	0	0	0	0
3	0	1333	0	580
4	556	0	0	988
5	0	0	101	0
Durchschnitt	111	267	20	447
Standardabweichung	222	533	40	389
SEM	99	239	18	174
Unterschied in %	100	100	18,2	167,6

Tabelle 8: C57BL6 3d nach Ligatur, gezählte fest adhärenente Thrombozyten pro mm²; n=5

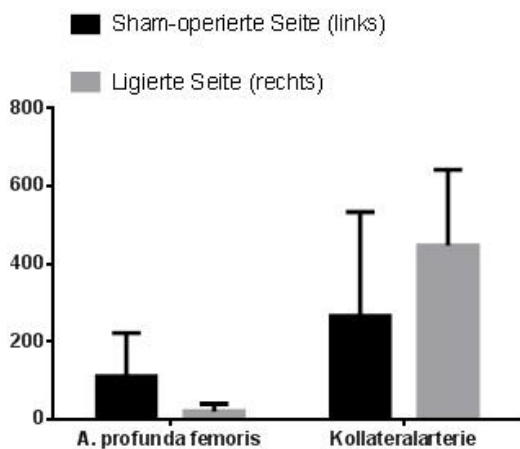


Abbildung 14: C57BL6 3d nach Ligatur, graphische Darstellung der gezählten fest adhärenenten Thrombozyten pro mm²; n=5 (Balken: mean; error bars: SEM, *p < 0,050)

5.2. GPIIb/IIIa-Knockout (3 Tage nach Ligatur)

Bei den Knockouttieren fällt auf, dass die Anzahl der transient adhärenenten Thrombozyten in der A. profunda femoris beider Seiten nahezu gleich sind (9286 auf der sham Seite vs. 8179 Plättchen/mm² auf der ligierten Seite; p=0.5002). Auch der Unterschied in den Kollateralgefäßen ist nicht mehr so groß: 10095 vs. 13435 Plättchen/mm² (Sham vs. Ligatur; p=0.3795). Fest adhärenente Thrombozyten finden sich erwartungsgemäß nur sehr vereinzelt mit Überwiegem auf der ligierten Seite.

Tier	Sham-Seite (links)		Ligierte Seite (rechts)	
	Profunda	Kollaterale	Profunda	Kollaterale
1	7460	9048	5556	6250
2	10370	11795	10476	25600
3	6095	5079	5148	7011
4	9667	10222	8103	11778
5	12840	14333	11613	16533
Durchschnitt	9286	10095	8179	13435
Standardabweichung	2344	3070	2575	7116
SEM	1048	1373	1151	3183
Unterschied in %	100	100	88,1	133,1

Tabelle 9: GPIIb/IIIa-KO 3d nach Ligatur, gezählte transient adhärenente Thrombozyten pro mm²; n=5

Ergebnisse

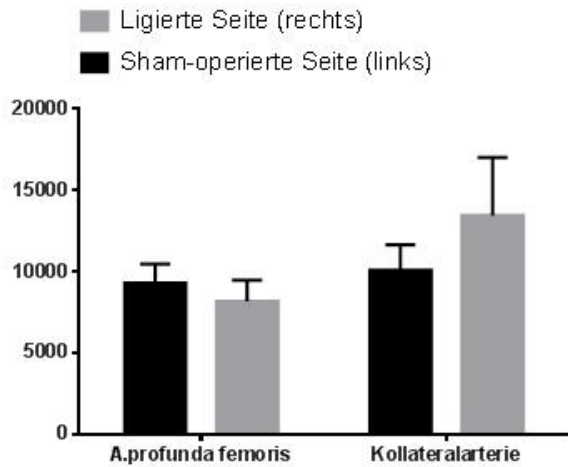


Abbildung 15: GPIIb/IIIa-/- 3d nach Ligatur, graphische Darstellung der gezählten **transient** **adhärenten** Thrombozyten pro mm²; n=5 (Balken: mean; error bars: SEM, *p < 0,050)

Tier	Sham-Seite (links)		Ligierte Seite (rechts)	
	Profunda	Kollaterale	Profunda	Kollaterale
1	635	0	139	0
2	0	0	0	267
3	0	0	169	0
4	111	0	410	222
5	370	0	538	0
Durchschnitt	223	0	251	98
Standardabweichung	246	0	195	121
SEM	110	0	87	54
Unterschied in %	100	100	112,5	DIV/0

Tabelle 10: GPIIb/IIIa-/- 3d nach Ligatur, gezählte **fest** **adhärente** Thrombozyten pro mm²; n=5

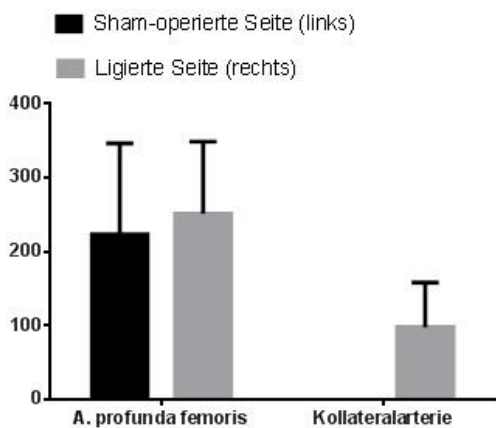


Abbildung 16: GPIIb/IIIa-/- 3d nach Ligatur, graphische Darstellung der gezählten **fest** **adhärenten** Thrombozyten pro mm²; n=5 (Balken: mean; error bars: SEM, *p < 0,050)

5.3. GPIIb/IIIa-Wildtyp (3 Tage nach Ligatur)

Zur besseren Vergleichbarkeit wurde auch ein GPIIb/IIIa-Wildtyp-Tier 3 Tage nach Ligatur vermessen. Die Unterschiede zu den BL6-Tieren sind nicht signifikant (siehe Abbildung 13), sodass die BL6-Gruppe als Vergleichsgruppe zu den Knockout-Tieren verwendet wurde.

Ergebnisse

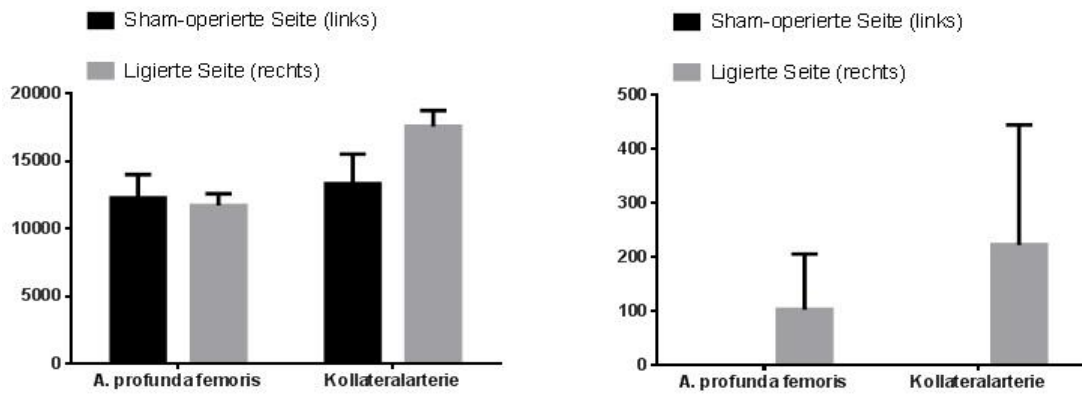


Abbildung 17: GPIIb/IIIa-IL4-R-WT 3d nach Ligatur, graphische Darstellung der gezählten **transient adhärenenten (links)** sowie **fest adhärenenten (rechts)** Thrombozyten pro mm²; n=5 (Balken: mean; error bars: SEM, *p < 0,050)

5.4. C57BL6 – Akut mit Injektion der Thrombozyten vor Ligatur

Zur Evaluation weiterer Versuchsprotokolle wurden zwei C57BL6 Mäuse erst nach Injektion von gefärbten Thrombozyten operiert und anschließend untersucht. Dieses Modell erwies sich jedoch als weniger praktikabel. Die Ergebnisse sind in der Tabelle dargestellt.

Tier	Sham-Seite (links)		Ligierte Seite (rechts)	
	Profunda	Kollaterale	Profunda	Kollaterale
1	8554	13667	15077	17333
2	8667	9667	13436	15200
Durchschnitt	8610	11667	14256	16267
Standardabweichung	57	2000	821	1067
SEM	40	1414	580	754
Unterschied in %	100	100	DIV/0	DIV/0

Tabelle 11: C57BL6 invers, gezählte **transient adhärenente** Thrombozyten pro mm²; n=2

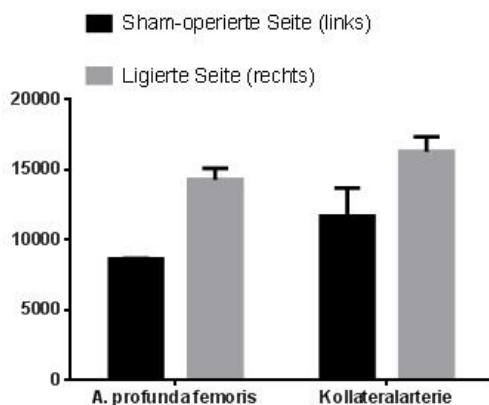


Abbildung 18: C57BL6 invers, graphische Darstellung der gezählten **transient adhärenenten** Thrombozyten pro mm²; n=2 (Balken: mean; error bars: SEM, *p < 0,050)

Ergebnisse

Tier	Sham-Seite (links)		Ligierte Seite (rechts)	
	Profunda	Kollaterale	Profunda	Kollaterale
1	0	0	0	0
2	0	0	0	533
Durchschnitt	0	0	0	267
Standardabweichung	0	0	0	267
SEM	0	0	0	189
Unterschied in %	100	100	100	DIV/0

Tabelle 12: C57BL6 invers, gezählte fest adhärenente Thrombozyten pro mm²; n=2

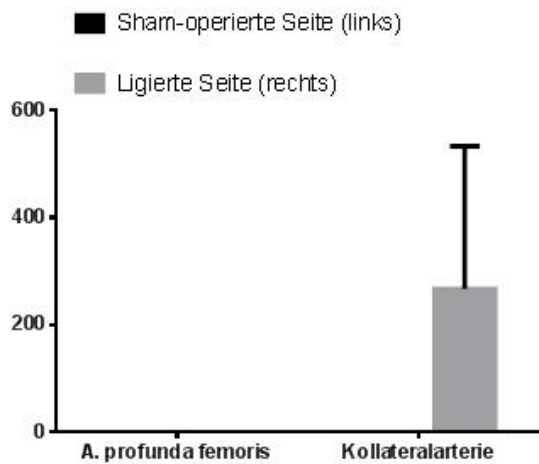


Abbildung 19: C57BL6 invers, graphische Darstellung der gezählten fest adhärenente Thrombozyten pro mm²; n=2 (Balken: mean; error bars: SEM, *p < 0,050)

5.5. Vergleich der Werte von GPIb α /IL-4R-KO und C57/BL6-Tieren

Im Vergleich der Werte der transient adhärenente Thrombozyten (ligierte Seite, Kollateralgefäße) von GPIb α -Knockout-Tieren mit der Kontrollgruppe der C57/BL6-Tiere wird eine signifikant geringere Interaktion der Thrombozyten mit dem Endothel der Knockout-Tiere ersichtlich.

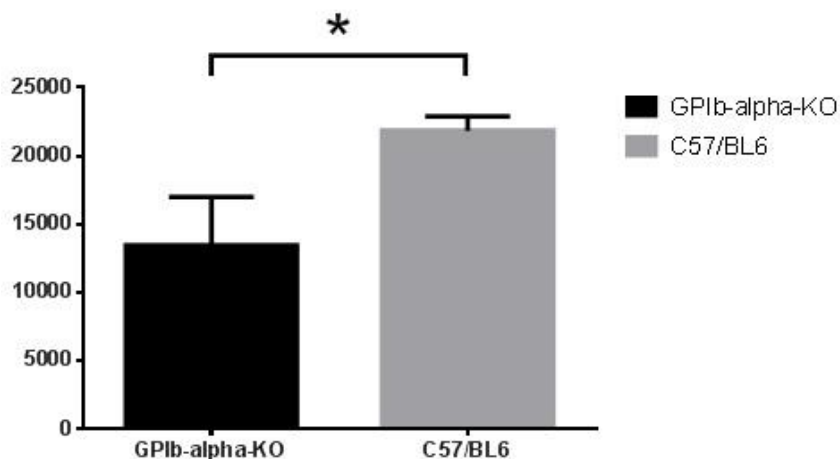


Abb. 20: Vergleich der transient adhärenente Thrombozyten in GPIb- α -KO und C57/BL6-Tieren pro mm²; n=5 (Balken: mean; error bars: SEM, *p < 0,050)

6. Diskussion

6.1 Diskussion von Material und Methoden

6.1.1. Versuchstiere

Die Arteriogenese ist ein dynamischer Prozess, der experimentell am besten mittels in-vivo Modellen darzustellen ist, da beträchtliche Veränderungen der Gefäßstruktur und -funktion in kurzer Zeit ablaufen. Aufgrund der schnellen Reproduktion, der hohen Wurfrate sowie der Möglichkeit der genetischen Manipulation in unzähligen etablierten Modellen, eignet sich die Maus als Versuchstier in idealer Weise für die beschriebenen Versuche.

In Laser-Doppler-Studien (Limbourg et al. 2009) konnte gezeigt werden, dass sich nach Ligatur der Blutfluss der ligierten Seite auf weniger als 25% der Sham-Seite verringert, damit innerhalb von 7 – 28 Tagen - je nach Mausstamm – wieder eine Normalisierung des Blutflusses stattfindet. Histologisch können bereits nach 3 Tagen signifikante Unterschiede der Lumina in den Kollateralen nachgewiesen werden. Entsprechend wurden in der vorliegenden Versuchsplanung die Zeitpunkte für die Intravitalmikroskopie akut, 1 Tag und 3 Tage nach Ligatur gewählt, in der Erwartung die Thrombozyten-Endothel-Interaktion in der frühen Phase des Gefäßwachstums darzustellen.

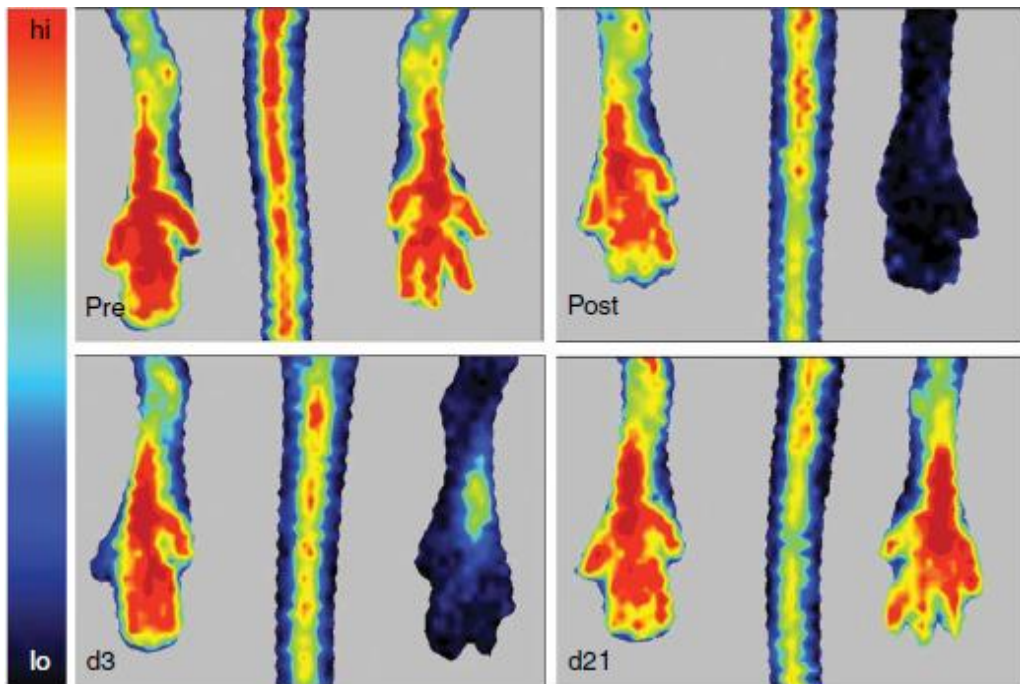


Abbildung 21: Laser-Doppler-Imaging (LDI): Farbkodierte Darstellung des Blutflusses im Hinterlauf der Maus vor (Pre), direkt nach (Post) sowie 3 (d3) bzw. 21 (d21) Tage nach Ligatur der A. femoralis superficialis (Limbourg et al. 2009)

Da die Rolle der Thrombozyten als Protagonisten der physiologischen, aber auch pathologischen Blut-Endothel-Interaktion bekannt ist, ist ihre Beteiligung im Rahmen der Arteriogenese geradezu suggestiv. Dabei gilt für cerebro- bzw. kardiovaskuläre Erkrankungen und die Arteriogenese

gleichermaßen, dass sie in einem inflammatorischen Milieu ablaufen. Zytokine wie TNF α oder IL-1 stoßen einen prokoagulatorischen Prozess an, der über vermehrte Thromboplastinexpression (Neumann et al. 1997) in Endothelzellen zu einer pro-IL-1 β Produktion in Thrombozyten (Lindemann et al. 2001) führt. Dabei ist die Vorstellung einer einfachen und immer gleich ablaufenden Vernetzung der Blutplättchen über den Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) zu einem festen Thrombus als Endstrecke einer Plättchenaktivierung längst hinfällig: Es scheint vielmehr, als sei der Ablauf, die Geschwindigkeit und die endgültige Form der Thrombusformation über diverse Rezeptor-Liganden-Interaktionen von vielfältigen Einflussfaktoren abhängig, unter anderem von rheologischen Bedingungen wie einem Scherkraft-Gradienten (Jackson 2007; Nesbitt et al. 2009). Dabei bestimmt das Maß der Scherkräfte den Mechanismus zur Thrombusformation (Frojmovic 1998; Goto et al. 1998). Das Einwirken von Scherkräften ist auch eine plausible Erklärung, warum eine Thrombozyten-Endothel-Interaktion ohne das Vorhandensein einer endothelialen Diskontinuität oder einer Plaqueruptur – somit also auf strukturell intaktem Endothel - abläuft (Gawaz et al. 2005; Nishimura et al. 2012). Eine zentrale Rolle in der Initiation der Thrombusformation kommt dem Von-Willebrand-Faktor (vWF) zu. Gebildet wird er in Endothelzellen und Megakaryozyten; darüber hinaus kommt er jedoch auch in den α -Granula der Thrombozyten sowie in freier Form in der Extrazellulärmatrix und im Blutplasma vor (Ruggeri 2007). Nach Aktivierung des Endothels kommt es zur Ausschüttung des vWF in großen Mengen aus den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen (Michaux et al. 2006; Vischer et al. 1995). Dabei scheint eine Verbindung des GPIIb α -Rezeptors via vWF an das Endothel der initiale Schritt der Thrombusformation zu sein (Nishimura et al. 2012).

Um die Rolle der thrombozytären Rezeptoren bei der Arteriogenese zu untersuchen, können Oberflächenmoleküle durch monoklonale Antikörper selektiv geblockt werden. Alternativ können die genannten Moleküle durch Verwendung von Mauslinien mit spezifischen Gendefekten, sog. Knock-out Mäusen, gezielt ausgeschaltet werden. Dafür ist eine Mauslinie mit defizientem GPIIb α -Rezeptor – besser bekannt als von-Willebrand-Faktor-Rezeptor – erhältlich, die im vorliegenden Versuchsplan eingesetzt wurde. Die Entwicklung dieser Mauslinie beruht auf Untersuchungen bezüglich des sehr seltenen, autosomal-rezessiv vererbten Bernard-Soulier-Syndroms (BSS) (Ware et al. 2000). In Folge eines Mangels oder einer Dysfunktion des Glykoprotein-Ib-V-IX-Komplexes kommt es beim Menschen zur Bildung funktionsgestörter Makrothrombozyten (Durchmesser 4-10 μ m) sowie in unterschiedlicher Ausprägung zu einer Thrombozytopenie (30.000 – 200.000 T/ μ l) (López et al. 1998). Klinisch hat dieses Krankheitsbild eine relevante Blutungsneigung (Epistaxis, gingivale Blutungen, Petechien, Menorrhagien) zur Folge. Im Tiermodell kann eine isolierte Ausschaltung der extrazellulären GPIIb α -Domäne durch transgene Veränderung erzielt werden. Die so hergestellten Mäuse exprimieren ein Fusionsprotein auf den Thrombozyten mit einer extrazytoplasmatischen,

humanen IL-4-Rezeptor- α -Domäne (IL-4-R α) und einer transmembranen bzw. intrazytoplasmatischen, humanen GPIIb α -Domäne (Kanaji et al. 2002).

Die Maus eignet sich auch hervorragend zur Anwendung im Rahmen der Intravitalmikroskopie aufgrund des leichten operativen Zuganges zu den femoralen Gefäßen und der übersichtlichen Anatomie. Dabei finden sich in der Regel – wie bereits für den C57BL/6-Stamm beschrieben (Wagner et al. 2004) – 8 verbindende Kollateralen zwischen dem tiefen und dem oberflächlichen femoralen Stromgebiet, von denen zwei problemlos intravitalmikroskopisch dargestellt werden können.

Die Ergebnisse sind vor dem Hintergrund zu werten, dass jeder Versuch mit einem erheblichen technischen Aufwand und einem massiven Eingriff in die Gefäßphysiologie verbunden ist. So ist unbestritten, dass Narkose, Operation und Intravitalmikroskopie einen nicht wegzudenkenden Störfaktor darstellen. Da jedoch alle Tiere streng unter denselben Bedingungen operiert und mikroskopiert wurden und alle Versuche mit einer sozusagen intrinsischen Kontrolle der Gegenseite (Sham-Operation) durchgeführt wurden, sind die Ergebnisse vergleichbar und aussagekräftig. Die Zahl der Versuchstiere ist in den einzelnen Gruppen relativ gering, nicht zuletzt, weil die Komplexität der Versuche aufwändige Vorversuche nötig gemacht hat. Es werden weitere Versuchsreihen notwendig sein, um genauere Aussagen über die Endothel-Thrombozyten-Interaktion treffen zu können.

6.1.2. Operative Verfahren

Die für die vorliegende Versuchsreihe gewählte Operation am Hinterlauf der Maus mit Ligatur der A. femoralis superficialis stellt eine standardisierte und bewährte Methode für ein Ischämie- bzw. Revaskularisationsmodell dar (Limbourg et al. 2009). Die A. femoralis wird distal des Abganges der A. profunda femoris ligiert, wodurch infolge hämodynamischer Veränderungen ein relevanter Kollateralkreislauf entsteht (Heil et al.). Die Methode ermöglicht eine selektive Ausschaltung eines Stromgebietes zugunsten der kapillären Kollateralen. Dabei zeigt sich eine Ischämie im distalen Hinterlauf der Maus (Heil et al; Limbourg et al. 2009), nicht jedoch im Bereich der Kollateralen (Helisch et al. 2006; Scholz et al. 2002). Dies ist für ein Modell zur Darstellung der Arteriogenese eine Voraussetzung. Dabei gilt diese Methode vor allem auch als Modell für Revaskularisationsvorgänge bei der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit beim Menschen (Hirsch et al. 2006).

6.1.3. Intravitalmikroskopie

Die Intravitalmikroskopie erwies sich als sehr komplexe Methode mit zahlreichen Unwägbarkeiten. Dennoch ist sie ein sehr feines und genaues Instrument, das sich hervorragend zu in-vivo-Beobachtungen am Mausmodell eignet. Bei unseren Versuchen ging es in erster Linie um die Interaktionen von Thrombozyten mit dem Endothel. Unsere Hypothese war, dass das Endothel seine Eigenschaften bezüglich der Adhäsion von Thrombozyten ändert, sobald veränderte Druck- und Strömungseigenschaften im Gefäß herrschen. Diese Veränderungen am so genannten dysfunktionalen Endothel und der daraus resultierenden verstärkten Interaktion mit den Thrombozyten führt über thrombozytäre Mediatoren zu langfristigen Umbauvorgängen des Endothels und der Gefäßwand. Dabei wurde erstmalig die Intravitalmikroskopie auf das Hinterlauf-Ischämie-Modell angewendet und die Thrombozyten-Endothel-Interaktion selektiv in-vivo dargestellt.

In unserem Modell wurden zu vorher definierten Beobachtungszeitpunkten (direkt nach Ligatur (akut), 1 bzw. 3 Tag(e) nach Ligatur (chronisch)) Aufnahmen über je knapp 8s Dauer angefertigt. Dabei wurden mehrere verschiedene Gefäßabschnitte à 50µm beobachtet. Die Anzahl der jeweiligen adhärennten bzw. transient adhärennten Thrombozyten wurde entsprechend der Gefäßbreite auf ein einheitliches Flächenmaß (1mm²) umgerechnet und die Werte mehrerer serieller Abschnitte gemittelt. Somit konnte ein vergleichsweise kleiner Ausschnitt nur über eine kurze Zeit abgebildet werden. Die Auswahl der Abbildungslokalisationen wurde bisweilen durch anatomische Gegebenheiten erschwert; so haben häufig Muskelzüge Abschnitte der Kollateralgefäße, insbesondere abgangsnah an der A. profunda femoris verdeckt oder Anlagevarianten der Kollateralgefäße zwangen uns zu alternativen Aufnahmeorten. Diesem Sachverhalt versuchten wir durch Aufnahme mehrerer serieller Abschnitte und konsekutiver Mittelung der Werte gerecht zu werden. Durch das aufwändige experimentelle Protokoll lag die Ausfallquote (hämodynamische Insuffizienz bzw. Tod der Mäuse) bei annähernd 20% für die Akutversuche bzw. 40% für die chronischen Versuche.

6.2. Diskussion der Ergebnisse

6.2.1. Rolle der Thrombozyten bei der Arteriogenese

Es stellt sich zunächst die Frage, ob überhaupt, und wenn ja, in welcher Weise Thrombozyten an der Arteriogenese beteiligt sind. In den durchgeführten Versuchen konnte nach Ligatur der A. femoralis bei C57BL/6-Mäusen eine deutliche Zunahme der Adhärenz von Thrombozyten im Bereich der

Kollateralen nachgewiesen werden. Dabei waren weniger die operationsnahen Abschnitte in der A. profunda femoris als vielmehr die Kollateralen betroffen, was eine Veränderung der Endothel-Thrombozyten-Interaktion an diesen Gefäßen vermuten lässt, die nicht verletzungsbedingt ist. Dass das Endothel durch Scherkräfte aktiviert werden kann und somit durch Expression von MCP-1 und ICAM-1 Leukozyten - insbesondere Monozyten - bindet, ist bereits bekannt (Schaper and Scholz 2003). Auch die Bindung von Thrombozyten an strukturell intakte Endothelzellen konnte gezeigt werden (Frenette et al. 1995; Massberg et al. 1998; Massberg et al. 1999). Insbesondere wurde bereits die P-Selectin-vermittelte Adhärenz von Thrombozyten an Endothelzellen in ischämischem Gewebe untersucht. Aus solchen Ischämie-Reperfusionstudien ist beispielsweise bekannt, dass aktivierte Thrombozyten an Endothel binden und ähnlich den Leukozyten rollen können (Massberg et al. 1998). Dabei wird eine ganze Reihe an proinflammatorischen und chemotaktischen Molekülen aus den Thrombozyten freigesetzt, die wiederum Einfluss auf Endothelzellen und Leukozyten nehmen. Neben der Produktion von PAF, ENA-78, NAP-2, RANTES, Platelet Factor 4, Serotonin, IL-8, und MCP-3 (Massberg et al. 1998) wird auch die Produktion von MCP-1 in Leukozyten stimuliert (Weyrich et al. 1996), das als bisher stärkster bekannter proarteriogenetischer Faktor nach dem FSS gilt (Schierling et al. 2009). Nun ist jedoch Ischämie ein Faktor, der im vorliegenden Modell an den untersuchten Kollateralen keine Rolle spielt (Helisch et al. 2006), ja sogar hinderlich sein kann bezüglich der Leukozytenchemotaxis (Grimshaw and Balkwill 2001). Entscheidend für das Interaktionspotential ist - neben der Ischämie - der Aktivierungsgrad des Endothels. Dabei ist bekannt, dass Scherkräfte, wenngleich sie auch im Vergleich zur Wandspannung verschwindend gering sind (Schaper and Scholz 2003), einen maßgeblichen Faktor zur Endothelaktivierung darstellen und als stärkster Promotor der Arteriogenese gelten. Diese mutmaßlich über Mechanorezeptoren transduzierte Kraft bewirkt eine Expression von Chemokinen wie MCP-1 aber auch von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 (Schaper and Scholz 2003). Angelockte Monozyten adhären, wandern in die Gefäßwand und zerstören mithilfe von Proteasen und TNF α die arterielle Media (Schaper and Ito 1996). Wachstumsfaktoren (bFGF, PDGF-B, TGF- β 1), die von aktivierten Endothelzellen ausgeschüttet werden, sorgen für das Einwandern glatter Muskelzellen und führen so zu einem Gefäßwachstum (Carmeliet 2000).

Unsere Ergebnisse zeigen eindrücklich, dass durch Ausschalten einzelner Komponenten dieses Systems - wie z.B. dem GPIIb α -Rezeptor - diese Vorgänge massiv verändert werden. Da sich vorwiegend die Zahl der transient, nicht jedoch der fest adhärenen Thrombozyten in den Knockout Tieren verringerte und außerdem die Arteriogenese in ihrem Ausmaß deutlich reduziert wurde, kann man von einem deutlich proarteriogenetischen Einfluss dieses Rezeptors bzw. der von ihm vermittelten Thrombozyten-Endothel-Interaktion ausgehen. Die transiente Adhäsion und die damit verbundene Ausschüttung von Mediatoren scheint ganz im Gegensatz zu der festen

Plättchenadhäsion und der Aggregation essentiell für plastische Umbauvorgänge der Gefäßwand zu sein. Während die feste Adhäsion, wie sie zum Beispiel bei Gefäßverletzungen oder Plaquerupturen auftritt, durch Aggregation von Plättchen und somit Thrombenbildung okklusiv wirkt, ist die transiente Adhäsion von Thrombozyten eine davon deutlich zu unterscheidende Plättchenfunktion, die über parakrine Einflüsse langfristige prozirkulatorische Veränderungen bewirkt.

Diese Umbauvorgänge sind äußerst schnell, wie unsere und vorangegangene Versuche zeigen. Schon nach 3 Tagen ist mit bloßem Auge ein deutlicher struktureller Gefäßumbau zu sehen. Die vorher geraden kapillären Kollateralen sind zu deutlich kaliberstärkeren blutführenden Arterien gewachsen, die eine bizarre korkenzieherartige Form aufweisen (Deindl and Schaper 2005). Die Gefäße wachsen folglich sowohl in ihrer Breite als auch in ihrer Länge. Unter dem Mikroskop erkennt man, dass der Pendelfluss der kleinen Kapillaren zu einem starken unidirektionalen Blutstrom geworden ist. Vor dem Hintergrund der eminenten Bedeutung der A. femoralis superficialis als Hauptblutversorgung der unteren Extremität wird das Ausmaß der Arteriogenese deutlich. Ohne erkennbare Einschränkungen der Extremitätenfunktion oder Ischämiefolgen bleibt die Blutversorgung des Maushinterlaufs erhalten.

Vor diesem Hintergrund scheint eine Beteiligung der Thrombozyten als Interaktionspartner für das aktivierte Endothel sinnvoll und logisch. Dabei ist die Rolle der Thrombozyten bei vaskulären Remodellingprozessen nicht unbekannt. Durch Produktion des Chemokins SDF-1 α haben die Thrombozyten Einfluss auf die Migration von Progenitorzellen (Massberg et al. 2006), die maßgeblich am Remodelling von Gefäßen beteiligt sind (Sata 2003; Simper 2002; Werner 2002). Da bei diesen Interaktionen neben P-Selectin auch der GPIIb/IIIa-Rezeptor beteiligt ist (Massberg et al. 2006), kommt es zu intrazellulären Signalkaskaden in den Thrombozyten, die die Ausschüttung von Zytokinen zur Folge haben (May 2002). Dabei fällt paradoxerweise auf, dass Arteriogenese und Arteriosklerose maßgebliche Mechanismen (Schaper and Scholz 2003) und Signaltransduktionswege (Conti and DiGiacchino 2001) teilen: Eine Inflammation bewirkt zytokinvermittelt die Invasion von Monozyten und unterhält einen nachhaltigen Umbau der arteriellen Media. Der wesentliche Unterschied ist der resultierende Durchmesser der Arterie, der bei der Arteriogenese größer wird, wohingegen die Arteriosklerose einen okklusiven Prozess darstellt.

In den vorliegenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten - nach Okklusion des Bluthauptstroms - in den kollateralen Arterien vermehrt adhären, ohne einen Thrombus zu formieren. Ohne relevante Funktionseinbußen wurde die Perfusion des Hinterlaufs durch Wachstum der Kollateralarterien kompensiert.

6.2.2. Funktionen des thrombozytären Rezeptors GPIb α

Analog wurden die Versuche mit den GPIb α /IL-4R knock-out Mäusen durchgeführt. Dabei fiel auf, dass im Vergleich zu den C57BL/6 und zu den GPIb α /IL-4R-WT Mäusen im Kollateralstromgebiet deutlich weniger Thrombozyten transient adhärent waren. In Laser Doppler Studien (Pagel et al, unveröffentlichte Daten) konnte gezeigt werden, dass nach selektiver Blockade des GPIb α -Rezeptors mittels Antikörper die Bildung eines suffizienten Kollateralkreislaufes nach Femoralisligatur deutlich eingeschränkt ist im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Diese Beobachtungen wurden durch Laser Doppler Messungen an GPIb α /IL-4R knock-out Mäusen bestätigt. Auf der anderen Seite zeigen GPIIb/IIIa knock-out Mäuse in Laser Doppler Messungen eine verbesserte Hinterlauf-Perfusion und somit ein erhöhtes Maß an arteriogenetischer Potenz (Pagel et al., unveröffentliche Daten). Dies deutet auf eine erhebliche Bedeutung des GPIb α -Rezeptors bei der Interaktion zwischen Thrombozyten und aktiviertem Endothel hin. Während Thrombozyten via ihrem GPIb α -Rezeptor als Promotoren der Arteriogenese zu wirken scheinen und in der Lage sind, Leukozyten und Endothelzellen zu aktivieren, wirkt der GPIIb/IIIa-Rezeptor eher hinderlich für die Arteriogenese. Diese Tatsache wird durch seine Eigenschaft als Vermittler der festen Thrombusformation und somit Gefäßokklusion plausibel erklärt.

Kürzlich wurde eindrucksvoll gezeigt, dass Thrombozyten verschiedene Mechanismen der Aggregation unter verschiedenen rheologischen Bedingungen zeigen. Insbesondere unter hohen Scherkräften, wie sie im Rahmen eines Gefäßverschlusses in den Kollateralen auftreten, scheint dem GPIb-Rezeptor eine entscheidende und initiale Bedeutung zuzukommen (Jackson 2007; Maxwell et al. 2007). Via vWF wird eine lose Bindung an das Endothel gewährleistet, was aufgrund des gesteigerten Blutflusses nicht eine vollständige Thrombusformation zur Folge hat, sondern vielmehr ein Rollen der einzelnen Plättchen bzw. kleiner Aggregate aus sphärischen Thrombozyten (unveröffentlichte Daten Erik Westein und P. Jackson). Dem sonst so bedeutenden GPIIb/IIIa kommt unter diesen Bedingungen keine wesentliche Bedeutung mehr zu. Vergleichbar dem beim Leukozytenrolling beobachtbaren Phänomenen der parakrinen und Rezeptor-Liganden-gesteuerten Stimulation (Abbal et al. 2006; Laudanna and Alon 2006), ist ein Effekt der rollenden und transient adhärierenden Thrombozyten auf die Endothelzellen, aber auch auf andere mit dem aktivierten Endothel interagierende Zellen vorstellbar. Generell ist ein ausreichender Effekt der GPIb- oder auch GPIIb/IIIa-Aktivierung zur Thrombusformation ohne eine Stimulation durch TXA₂, Kollagen oder ADP nicht belegt (Jackson et al. 2003), dennoch ist eine komplexe, teils reversible Interaktion der beiden Rezeptoren bekannt (Mazzucato et al. 2002; Nesbitt et al. 2002).

6.3. Limitationen

Die Intravitalmikroskopie stellt ein Verfahren zur morphologischen und funktionellen Untersuchung dar, ohne jedoch molekulare Mechanismen darzustellen. Mit Hilfe von knock-out Mäusen ist eine Darstellung verschiedener Funktionseinheiten möglich. Dabei kann nie ein Mechanismus isoliert untersucht werden, da alle auf ein System einwirkenden Faktoren bei in-vivo Modellen erhalten bleiben. Durch Ausschaltung einzelner Elemente können zwar Rückschlüsse erfolgen, sie müssen jedoch stets vor dem Hintergrund des ganzen (Organ-) Systems gesehen werden. So wurde natürlich in den vorliegenden Versuchen durch Ausschaltung des GPIIb α -Rezeptors seine Interaktion mit dem Endothel untersucht, weitere Einflüsse - von Seiten der Leukozyten beispielsweise - blieben unberücksichtigt. Auch bei einem hohen Maß an Standardisierung bleiben in-vivo Modelle einer größeren Variabilität unterworfen als in-vitro Versuche. Dafür sind zu viele Einflüsse unveränderbar oder gar unbekannt.

Letztlich ist – wie stets in Tiermodellen – die Übertragung der Beobachtungen auf den Menschen nur mit Einschränkung und unter Vorbehalt möglich.

6.4. Ausblick

Arteriogenese ist ein universeller Mechanismus aus dem Formenkreis des vaskulären Remodellings. Dabei kann sie Teil eines physiologischen oder auch pathologischen Prozesses sein, um die Blutversorgung veränderten Bedingungen anzupassen. Klinische Relevanz erhält dieser Vorgang vor allem bei akuten und chronischen arteriellen Gefäßverschlüssen wie der arteriellen Verschlusskrankheit oder dem akuten Herzinfarkt. In der westlichen Welt stellen kardiovaskuläre Erkrankungen immer noch den Hauptgrund für Morbidität und Mortalität dar.

Innerhalb der pharmakotherapeutischen Ansätze zur Behandlung von Gefäßerkrankungen stellen Thrombozyten ein gut erforschtes Ziel medikamentöser Interventionen dar, nicht zuletzt wegen ihrer zentralen Rolle bei hämostasiologischen und inflammatorischen Vorgängen. Dass Thrombozyten darüber hinaus auch proarteriogenetische Funktionen haben, war bisher wenig erforscht und eröffnet weitere Optionen für klinische Therapieregime. In experimentellen Studien konnte bereits die Arteriogenese als Interventionsgrundlage genutzt werden (Schierling et al. 2009). Auf der Ebene der Thrombozyten scheint in Anbetracht der Vielzahl bereits bekannter Therapieoptionen eine differenzierte Intervention denkbar.

Um die Rolle der Thrombozyten genauer zu charakterisieren werden weitere Versuche nötig sein, um die molekularen Mechanismen, die letztlich die morphologischen Veränderungen bewirken,

Diskussion

aufzudecken. Auch die Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten, die bereits in anderen Studien belegt werden konnte (Massberg et al. 2006), ist in Bezug auf die Arteriogenese von großem Interesse.

Bei alledem bleibt offen, ob diese Vorgänge beim Menschen in gleicher oder ähnlicher Weise ablaufen. So könnte eine Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion oder -zahl einen Risikofaktor für den Verlauf von akuten oder chronischen Gefäßverschlüssen darstellen. Dabei muss dem Gleichgewicht der Rezeptorfunktionen vor dem Hintergrund der medikamentösen Behandlung besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden: Eine proarteriogenetische Therapie könnte arteriosklerotische Wirkung besitzen, auf der anderen Seite ist es möglich, dass durch die etablierte Medikation bei Arteriosklerose das arteriogenetische Potential nicht ganz ausgeschöpft werden kann (Schaper and Scholz 2003). Inwieweit letztendlich eine Unterstützung der Arteriogenese in der Lage ist, bei genannten Erkrankungen Vorteile zu erzielen oder ob diesem Prozess natürliche Grenzen gesetzt sind (Schaper and Ito 1996), bleibt noch weitgehend offen.

7. Zusammenfassung

Arteriogenese ist die Entwicklung von Blutgefäßen aus bereits vorbestehenden kapillaren Kollateralgefäßen nach akuten oder chronischen Arterienverschlüssen aufgrund erhöhter tangentialer Scherkräfte. Dabei ist bekannt, dass die Endothelzellen aktiviert werden und veränderte Bindungseigenschaften aufweisen, um so Leukozyten via MCP-1 und ICAM-1 zu binden. Durch weitere Mediatoren und Zytokine wird die Proliferation von glatten Muskelzellen und Endothelzellen angeregt. Auf diese Weise wachsen die Gefäße in ihrem Durchmesser wie in ihrer Länge, sodass ein suffizienter Umgehungskreislauf entsteht, der in der Lage ist, die Perfusion des minderversorgten Gebietes wiederherzustellen.

Mit der vorliegenden Arbeit ist der Frage nachgegangen worden, ob Thrombozyten an diesem Prozess beteiligt sind und welche Mechanismen die Arteriogenese fördern bzw. hemmen. Als repräsentatives Modell wurde das Extremitätenischämiemodell der Maus gewählt. Mittels fluoreszierend markierter Thrombozyten und der Intravitalmikroskopie wurde die Interaktion der Thrombozyten mit der Gefäßwand visualisiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass nach akutem Verschluss der femoralen Blutbahn deutlich mehr Thrombozyten transient an den Endothelzellen der kollateralen Gefäße, die auch für die Restitution der Extremitätenperfusion verantwortlich sind, adhären. Zur Untersuchung der molekularen Mechanismen wurden GPIIb/IIIa-knockout Mäuse eingesetzt. Von diesen ist aus Laser-Doppler-Messungen (unveröffentlichte Daten) bekannt, dass deren arteriogenetische Potenz aufgrund der Rezeptordefizienz eingeschränkt ist. Bei GPIIb/IIIa-knockout Tieren zeigte sich eine deutlich verminderte Interaktion der Thrombozyten mit dem Endothel in Form von transient adhärenen Thrombozyten, was die gemessene verminderte Perfusionsleistung auf einer zellulären bzw. molekularen Ebene erklären würde.

Vor dem Hintergrund der vielfältigen Funktionen der Thrombozyten als Träger von Mediatoren und Zytokinen und der bereits gut erforschten Interaktionen mit aktivierten Endothelzellen, ist deren Rolle als Promotoren der Arteriogenese bisher wenig erforscht worden. Dabei zeigt sich, dass Thrombozyten entscheidenden Anteil am Prozess der Arteriogenese haben, indem sie mit Hilfe ihres GPIIb/IIIa-Rezeptors einen transienten Kontakt zum Endothel aufbauen und eine noch weitgehend unbekannt Kaskade an Mechanismen anstoßen, die in einem strukturellen Umbau der Gefäßarchitektur mündet. Dabei nehmen Thrombozyten eine herausragende Stellung bezüglich der klinischen Relevanz ein, da sie zahlreiche Möglichkeiten der pharmakotherapeutischen Intervention bieten.

8. Summary

Arteriogenesis is the development of preexistent collateral arteries into functional bypasses after chronic or acute occlusion of major arteries due to increased fluid shear stress. It is known that activated endothelial cells exhibit altered binding properties to recruit leucocytes via MCP-1 and ICAM-1. Through further mediators and cytokines the proliferation of smooth muscle cells and endothelial cells is promoted. In this way the vessels grow in diameter as in their length, thereby creating a sufficient collateral circuit, that is capable of restoring the perfusion of a poorly supplied area.

With this study the question is to be investigated, whether platelets are involved in this process and which mechanisms promote or inhibit arteriogenesis. As a representative model the hindlimb-ischemia model of the mouse was chosen. By using fluorescently labeled platelets and intravital microscopy the interaction between platelets and the activated vessel wall could be visualized during the early phase of collateral growth. It was shown that after acute occlusion of the femoral artery significantly more platelets adhere transiently at the endothelial cells of the collateral arteries, which are important for restitution of the hindlimb perfusion. For the investigation of the specific mechanisms GPIb α knockout mice were used, from whom it is known that their arteriogenic potential is very poor because of the lacking GPIb α -Receptor (unpublished laser doppler hind limb perfusion measurements). In these mice there was quite a lower interaction detectable between platelets and endothelial cells with a lower amount of platelets adhering transiently.

Given the multiple functions of platelets as carrier of mediators and cytokines and their already well-studied interactions with the endothelial cells, their role as promoters of arteriogenesis is poorly investigated. It is shown that platelets have a crucial role in the process of arteriogenesis by transient contact with the activated endothelium with the help of their GPIb α receptor and initiating a cascade of largely unknown mechanisms, which lead to a structural remodeling of the vascular architecture. Platelets take a prominent position with respect to the clinical relevance, since they provide numerous opportunities for pharmacological interventions.

9. Literaturverzeichnis

- Abbal C, Lambelet M, Bertaggia D, Gerbex C, Martinez M, Arcaro A, Schapira M, Spertini O. Lipid raft adhesion receptors and Syk regulate selectin-dependent rolling under flow conditions. *Blood* 2006; 108(10): 3352–3359.
- Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J. Clin. Invest* 1998; 101(1): 40–50.
- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ. Res* 1999; 85(3): 221–228.
- Bao X, Lu C, Frangos JA. Temporal gradient in shear but not steady shear stress induces PDGF-A and MCP-1 expression in endothelial cells: role of NO, NF kappa B, and egr-1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 1999; 19(4): 996–1003.
- Ben Driss A, Benessiano J, Poitevin P, Levy BI, Michel JB. Arterial expansive remodeling induced by high flow rates. *Am. J. Physiol* 1997; 272(2 Pt 2): H851-8.
- Buschmann I, Schaper W. Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth. *News Physiol. Sci* 1999; 14: 121–125.
- Buschmann I, Schaper W. The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis). *J. Pathol* 2000; 190(3): 338–342.
- Busse R, Fleming I. Pulsatile stretch and shear stress: physical stimuli determining the production of endothelium-derived relaxing factors. *J. Vasc. Res*; 35(2): 73–84.
- Bussolino F, Mantovani A, Persico G. Molecular mechanisms of blood vessel formation. *Trends Biochem. Sci* 1997; 22(7): 251–256.
- Buus CL, Pourageaud F, Fazzi GE, Janssen G, Mulvany MJ, Mey JG de. Smooth muscle cell changes during flow-related remodeling of rat mesenteric resistance arteries. *Circ. Res* 2001; 89(2): 180–186.
- Cai W, Schaper W. Mechanisms of arteriogenesis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2008; 40(8): 681–692.
- Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med* 2000; 6(4): 389–395.
- Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407(6801): 249–257.
- Castier Y, Brandes RP, Leseche G, Tedgui A, Lehoux S. p47phox-dependent NADPH oxidase regulates flow-induced vascular remodeling. *Circ. Res* 2005; 97(6): 533–540.

Literaturverzeichnis

- Chachoua A, Oratz R, Hoogmoed R, Caron D, Peace D, Liebes L, Blum RH, Vilcek J. Monocyte activation following systemic administration of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1994; 15(3): 217–224.
- Chappell DC, Varner SE, Nerem RM, Medford RM, Alexander RW. Oscillatory shear stress stimulates adhesion molecule expression in cultured human endothelium. *Circ. Res* 1998; 82(5): 532–539.
- Choi K. Hemangioblast development and regulation. *Biochem. Cell Biol* 1998; 76(6): 947–956.
- Clauss M, Grell M, Fangmann C, Fiers W, Scheurich P, Risau W. Synergistic induction of endothelial tissue factor by tumor necrosis factor and vascular endothelial growth factor: functional analysis of the tumor necrosis factor receptors. *FEBS Lett* 1996; 390(3): 334–338.
- Conti P, DiGiacchino M. MCP-1 and RANTES are mediators of acute and chronic inflammation. *Allergy Asthma Proc* 2001; 22(3): 133–137.
- Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol. Rev* 1995; 75(3): 519–560.
- Deindl E, Schaper W. The art of arteriogenesis. *Cell Biochem. Biophys* 2005; 43(1): 1–15.
- Deindl E, Ziegelhöffner T, Kanse SM, Fernandez B, Neubauer E, Carmeliet P, Preissner KT, Schaper W. Receptor-independent role of the urokinase-type plasminogen activator during arteriogenesis. *FASEB J* 2003; 17(9): 1174–1176.
- Eitenmüller I, Volger O, Kluge A, Troidl K, Barancik M, Cai W, Heil M, Pipp F, Fischer S, Horrevoets AJG, Schmitz-Rixen T, Schaper W. The range of adaptation by collateral vessels after femoral artery occlusion. *Circ. Res* 2006; 99(6): 656–662.
- Flamme I. Is extraembryonic angiogenesis in the chick embryo controlled by the endoderm? A morphology study. *Anat. Embryol* 1989; 180(3): 259–272.
- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med* 1971; 285(21): 1182–1186.
- Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6(4): 273–286.
- Folkman J, D'Amore PA. Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell* 1996; 87(7): 1153–1155.
- Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1995; 92(16): 7450–7454.
- Frojmovic MM. Platelet aggregation in flow: differential roles for adhesive receptors and ligands. *Am. Heart J* 1998; 135(5 Pt 2 Su): S119–31.
- Fulton WF. Chronic generalized myocardial ischemia with advanced coronary artery disease. *Br Heart J* 1956(18): 341–354.

Literaturverzeichnis

- Fulton WF. Arterial anastomoses in the coronary circulation. Anatomical features in normal and diseased hearts demonstrated by stereoarteriography. *Scott Med J* 1963; 8: 420–434.
- Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ. Res* 2002; 90(3): 251–262.
- Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J. Clin. Invest* 2005; 115(12): 3378–3384.
- Girard PR, Nerem RM. Shear stress modulates endothelial cell morphology and F-actin organization through the regulation of focal adhesion-associated proteins. *J. Cell. Physiol* 1995; 163(1): 179–193.
- Goto S, Ikeda Y, Saldívar E, Ruggeri ZM. Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions. *J. Clin. Invest* 1998; 101(2): 479–486.
- Grimshaw MJ, Balkwill FR. Inhibition of monocyte and macrophage chemotaxis by hypoxia and inflammation--a potential mechanism. *Eur. J. Immunol* 2001; 31(2): 480–489.
- Heil M, Eitenmüller I, Schmitz-Rixen T, Schaper W. Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. *J. Cell. Mol. Med*; 10(1): 45–55.
- Helisch A, Wagner S, Khan N, Drinane M, Wolfram S, Heil M, Ziegelhoeffer T, Brandt U, Pearlman JD, Swartz HM, Schaper W. Impact of mouse strain differences in innate hindlimb collateral vasculature. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 2006; 26(3): 520–526.
- Hertig AT. Angiogenesis in the early human chorion and in the primary placenta of the macaque monkey. *Contributions to embryology*; Carnegie Institution of Washington publication 1935; 1935(vol. 25, no. 146): 37–43.
- Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzner NR, Bakal CW, Creager MA, Halperin JL, Hiratzka LF, Murphy WRC, Olin JW, Puschett JB, Rosenfield KA, Sacks D, Stanley JC, Taylor LM, White CJ, White J, White RA, Antman EM, Smith SC, Adams CD, Anderson JL, Faxon DP, Fuster V, Gibbons RJ, Hunt SA, Jacobs AK, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B. ACC/AHA 2005 guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): executive summary 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. *J. Am. Coll. Cardiol* 2006; 47(6): 1239–1312.
- Holtz J, Förstermann U, Pohl U, Giesler M, Bassenge E. Flow-dependent, endothelium-mediated dilation of epicardial coronary arteries in conscious dogs: effects of cyclooxygenase inhibition. *J. Cardiovasc. Pharmacol*; 6(6): 1161–1169.

Literaturverzeichnis

- Ito WD, Arras M, Scholz D, Winkler B, Htun P, Schaper W. Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion. *Am. J. Physiol* 1997a; 273(3 Pt 2): H1255-65.
- Ito WD, Arras M, Winkler B, Scholz D, Schaper J, Schaper W. Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ. Res* 1997b; 80(6): 829–837.
- Jackson SP. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood* 2007; 109(12): 5087–5095.
- Jackson SP, Nesbitt WS, Kulkarni S. Signaling events underlying thrombus formation. *J. Thromb. Haemost* 2003; 1(7): 1602–1612.
- Kanaji T, Russell S, Ware J. Amelioration of the macrothrombocytopenia associated with the murine Bernard-Soulier syndrome. *Blood* 2002; 100(6): 2102–2107.
- Kosaki K, Ando J, Korenaga R, Kurokawa T, Kamiya A. Fluid shear stress increases the production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by endothelial cells via mRNA stabilization. *Circ. Res* 1998; 82(7): 794–802.
- Krock BL, Skuli N, Simon MC. Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. *Genes Cancer* 2011; 2(12): 1117–1133.
- Langille BL. Remodeling of developing and mature arteries: endothelium, smooth muscle, and matrix. *J. Cardiovasc. Pharmacol* 1993; 21 Suppl 1: S11-7.
- Laudanna C, Alon R. Right on the spot. Chemokine triggering of integrin-mediated arrest of rolling leukocytes. *Thromb. Haemost* 2006; 95(1): 5–11.
- Lehoux S, Tedgui A. Making up and breaking up: the tortuous ways of the vascular wall. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 2005; 25(5): 892–894.
- Limbourg A, Korff T, Napp LC, Schaper W, Drexler H, Limbourg FP. Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia. *Nat Protoc* 2009; 4(12): 1737–1748.
- Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA, Weyrich AS. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J. Cell Biol* 2001; 154(3): 485–490.
- LONGLAND CJ. Collateral circulation in the limb. *Postgrad Med J* 1953; 29(335): 456–458.
- López JA, Andrews RK, Afshar-Kharghan V, Berndt MC. Bernard-Soulier syndrome. *Blood* 1998; 91(12): 4397–4418.
- Marmé D. Tumorangiogenese: Neue Ansätze zur Krebstherapie. *Onkologie* 2001; 24 Suppl 1: 1–5.

Literaturverzeichnis

- Massberg S, Brand K, Grüner S, Page S, Müller E, Müller I, Bergmeier W, Richter T, Lorenz M, Konrad I, Nieswandt B, Gawaz M. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J. Exp. Med* 2002; 196(7): 887–896.
- Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F, Messmer K. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood* 1998; 92(2): 507–515.
- Massberg S, Enders G, Matos FC, Tomic LI, Leiderer R, Eisenmenger S, Messmer K, Krombach F. Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood* 1999; 94(11): 3829–3838.
- Massberg S, Konrad I, Schürzinger K, Lorenz M, Schneider S, Zohlnhoefer D, Hoppe K, Schiemann M, Kennerknecht E, Sauer S, Schulz C, Kerstan S, Rudelius M, Seidl S, Sorge F, Langer H, Peluso M, Goyal P, Vestweber D, Emambokus NR, Busch DH, Frampton J, Gawaz M. Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *J. Exp. Med* 2006; 203(5): 1221–1233.
- Massberg S, Schürzinger K, Lorenz M, Konrad I, Schulz C, Plesnila N, Kennerknecht E, Rudelius M, Sauer S, Braun S, Kremmer E, Emambokus NR, Frampton J, Gawaz M. Platelet adhesion via glycoprotein IIb integrin is critical for atheroprogession and focal cerebral ischemia: an in vivo study in mice lacking glycoprotein IIb. *Circulation* 2005; 112(8): 1180–1188.
- Maxwell MJ, Westein E, Nesbitt WS, Giuliano S, Dopheide SM, Jackson SP. Identification of a 2-stage platelet aggregation process mediating shear-dependent thrombus formation. *Blood* 2007; 109(2): 566–576.
- May AE, Kälsch T, Massberg S, Herouy Y, Schmidt R, Gawaz M. Engagement of Glycoprotein IIb/IIIa (alphaIIbbeta3) on Platelets Upregulates CD40L and Triggers CD40L-Dependent Matrix Degradation by Endothelial Cells. *Circulation* 2002; 106(16): 2111-2117.
- Mazzucato M, Pradella P, Cozzi MR, Marco L de, Ruggeri ZM. Sequential cytoplasmic calcium signals in a 2-stage platelet activation process induced by the glycoprotein Ibalpha mechanoreceptor. *Blood* 2002; 100(8): 2793–2800.
- Michaux G, Abbitt KB, Collinson LM, Haberichter SL, Norman KE, Cutler DF. The physiological function of von Willebrand's factor depends on its tubular storage in endothelial Weibel-Palade bodies. *Dev. Cell* 2006; 10(2): 223–232.
- Moll W. Structure adaptation and blood flow control in the uterine arterial system after hemochorial placentation. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol* 2003; 110 Suppl 1: S19-27.
- Nagel T, Resnick N, Atkinson WJ, Dewey CF, Gimbrone MA. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest* 1994; 94(2): 885–891.
- Nesbitt WS, Kulkarni S, Giuliano S, Goncalves I, Dopheide SM, Yap CL, Harper IS, Salem HH, Jackson SP. Distinct glycoprotein Ib/V/IX and integrin alpha IIbbeta 3-dependent calcium

Literaturverzeichnis

signals cooperatively regulate platelet adhesion under flow. *J. Biol. Chem* 2002; 277(4): 2965–2972.

- Nesbitt WS, Westein E, Tovar-Lopez FJ, Tolouei E, Mitchell A, Fu J, Carberry J, Fouras A, Jackson SP. A shear gradient-dependent platelet aggregation mechanism drives thrombus formation. *Nat. Med* 2009; 15(6): 665–673.
- Neumann FJ, Ott I, Marx N, Luther T, Kenngott S, Gawaz M, Kotsch M, Schömig A. Effect of human recombinant interleukin-6 and interleukin-8 on monocyte procoagulant activity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 1997; 17(12): 3399–3405.
- Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Kakuta S, Iwakura Y, Takayama N, Oebara J, Otsu M, Kamiya A, Petrich BG, Urano T, Kadono T, Sato S, Aiba A, Yamashita H, Sugiura S, Kadowaki T, Nakauchi H, Eto K, Nagai R. In vivo imaging visualizes discoid platelet aggregations without endothelium disruption and implicates contribution of inflammatory cytokine and integrin signaling. *Blood* 2012; 119(8): e45-56.
- Papadaki M, Eskin SG, Ruef J, Runge MS, McIntire LV. Fluid shear stress as a regulator of gene expression in vascular cells: possible correlations with diabetic abnormalities. *Diabetes Res. Clin. Pract* 1999; 45(2-3): 89–99.
- Pardanaud L, Yassine F, Dieterlen-Lievre F. Relationship between vasculogenesis, angiogenesis and haemopoiesis during avian ontogeny. *Development* 1989; 105(3): 473–485.
- Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treat. Res* 2004; 117: 3–32.
- Patan S, Haenni B, Burri PH. Implementation of intussusceptive microvascular growth in the chicken chorioallantoic membrane (CAM): 1. pillar formation by folding of the capillary wall. *Microvasc. Res* 1996; 51(1): 80–98.
- Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 2006; 441(7092): 437–443.
- Pouyssegur J, Mehta-Grigoriou F. Redox regulation of the hypoxia-inducible factor. *Biol. Chem* 2006; 387(10-11): 1337–1346.
- Resnick N, Gimbrone MA. Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. *FASEB J* 1995; 9(10): 874–882.
- Resnick N, Yahav H, Khachigian LM, Collins T, Anderson KR, Dewey FC, Gimbrone MA. Endothelial gene regulation by laminar shear stress. *Adv. Exp. Med. Biol* 1997; 430: 155–164.
- Resnick N, Yahav H, Shay-Salit A, Shushy M, Schubert S, Zilberman LCM, Wofovitz E. Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse. *Prog. Biophys. Mol. Biol* 2003; 81(3): 177–199.
- Richard Lower. *Tractus de Corde*. Elsevier Amsterdam 1669.
- Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386(6626): 671–674.
- Risau W. Development and differentiation of endothelium. *Kidney Int. Suppl* 1998; 67: S3-6.

Literaturverzeichnis

- Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* 1995; 11: 73–91.
- Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat. Med* 2002; 8(11): 1227–1234.
- Ruggeri ZM. The role of von Willebrand factor in thrombus formation. *Thromb. Res* 2007; 120 Suppl 1: S5-9.
- Sata M. Origin of Smooth Muscle Progenitor Cells: Different Conclusions From Different Models. *Circulation* 2003; 107(16): e106-e107
- Schaper W, Buschmann I. Arteriogenesis, the good and bad of it. *Eur. Heart J* 1999a; 20(18): 1297–1299.
- Schaper W, Buschmann I. Collateral circulation and diabetes. *Circulation* 1999b; 99(17): 2224–2226.
- Schaper W, Ito WD. Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circ. Res* 1996; 79(5): 911–919.
- Schaper W, Scholz D. Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 2003; 23(7): 1143–1151.
- Schierling W, Troidl K, Troidl C, Schmitz-Rixen T, Schaper W, Eitenmül, Iler IK. The Role of Angiogenic Growth Factors in Arteriogenesis. *J Vasc Res* 2009; 46(4): 365–374.
- Scholz D, Ziegelhoeffer T, Helisch A, Wagner S, Friedrich C, Podzuweit T, Schaper W. Contribution of arteriogenesis and angiogenesis to postocclusive hindlimb perfusion in mice. *J. Mol. Cell. Cardiol* 2002; 34(7): 775–787.
- Shattil SJ, Newman PJ. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood* 2004; 104(6): 1606–1615.
- Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998; 92(2): 362–367.
- Shyy YJ, Hsieh HJ, Usami S, Chien S. Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemoattractant protein 1 gene expression in vascular endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1994; 91(11): 4678–4682.
- Simper D, Stalboerger PG, Panetta CJ, Wang S, Caplice NM. Smooth Muscle Progenitor Cells in Human Blood. *Circulation* 2002; 106(10): 1199-1204.
- Thoma R. Untersuchungen über die Histiogenese und Histiomechanik des Gefäßsystems 1893.
- Tronc F, Wassef M, Esposito B, Henrion D, Glagov S, Tedgui A. Role of NO in flow-induced remodeling of the rabbit common carotid artery. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 1996; 16(10): 1256–1262.

Literaturverzeichnis

- Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, Dejana E, Schultz DA, Engelhardt B, Cao G, DeLisser H, Schwartz MA. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature* 2005; 437(7057): 426–431.
- van Royen N, Piek JJ, Schaper W, Fulton WF. A Critical Review of Clinical Arteriogenesis Research. *Journal of the American College of Cardiology* 2009; 55(1): 17–25.
- Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 2008; 28(3): 403–412.
- Vischer UM, Jornot L, Wollheim CB, Theler JM. Reactive oxygen intermediates induce regulated secretion of von Willebrand factor from cultured human vascular endothelial cells. *Blood* 1995; 85(11): 3164–3172.
- Wagner S, Helisch A, Ziegelhoeffer T, Bachmann G, Schaper W. Magnetic resonance angiography of collateral vessels in a murine femoral artery ligation model. *NMR Biomed* 2004; 17(1): 21–27.
- Ware J, Russell S, Ruggeri ZM. Generation and rescue of a murine model of platelet dysfunction: the Bernard-Soulier syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2000; 97(6): 2803–2808.
- Werner N, Priller J, Laufs U, Endres M, Böhm M, Dirnagl U, Nickenig G. Bone Marrow-Derived Progenitor Cells Modulate Vascular Reendothelialization and Neointimal Formation: Effect of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(10): 1567-1572.
- Weyrich AS, Elstad MR, McEver RP, McIntyre TM, Moore KL, Morrissey JH, Prescott SM, Zimmerman GA. Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J. Clin. Invest* 1996; 97(6): 1525–1534.
- Yancopoulos GD, Klagsbrun M, Folkman J. Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border. *Cell* 1998; 93(5): 661–664.
- Ziegelstein RC, Blank PS, Cheng L, Capogrossi MC. Cytosolic alkalization of vascular endothelial cells produced by an abrupt reduction in fluid shear stress. *Circ. Res* 1998; 82(7): 803–809.
- Zoll PM, Wessler S, Blumgart HL. Angina pectoris; a clinical and pathologic correlation. *Am. J. Med* 1951; 11(3): 331–357.

10. Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1:** Übersicht über die wichtigsten Merkmale und Unterschiede von Angiogenese und Arteriogenese (Buschmann and Schaper 1999; Schaper and Scholz 2003)
- Tabelle 2:** Molekulare und physikalische Aktivatoren und Inhibitoren der Arteriogenese (Carmeliet 2000; Schaper and Scholz 2003)
- Tabelle 3:** C57BL6 30min nach Ligatur, gezählte transient adhärenente Thrombozyten pro mm²; n=3
- Tabelle 4:** C57BL6 30min nach Ligatur gezählte fest adhärenente Thrombozyten pro mm²; n=3
- Tabelle 5:** C57BL6 1d nach Ligatur, gezählte transient adhärenente Thrombozyten pro mm²; n=3
- Tabelle 6:** C57BL6 1d nach Ligatur, gezählte fest adhärenente Thrombozyten pro mm²; n=3
- Tabelle 7:** C57BL6 3d nach Ligatur, gezählte transient adhärenente Thrombozyten pro mm²; n=5
- Tabelle 8:** C57BL6 3d nach Ligatur, gezählte fest adhärenente Thrombozyten pro mm²; n=5
- Tabelle 9:** GPIb α /IL4-R-KO 3d nach Ligatur, gezählte transient adhärenente Thrombozyten pro mm²; n=5
- Tabelle 10:** GPIb α /IL4-R-KO 3d nach Ligatur, gezählte fest adhärenente Thrombozyten pro mm²; n=5
- Tabelle 11:** C57BL6 invers, gezählte transient adhärenente Thrombozyten pro mm²; n=2
- Tabelle 12:** C57BL6 invers, gezählte fest adhärenente Thrombozyten pro mm²; n=2

11. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Regulation der Transkription angiogenetischer Faktoren mittels Hypoxie induzierbarer Faktoren (HIFs) mit vielfältigen Wirkungen (Krock et al. 2011)
- Abbildung 2:** Originalveröffentlichung von Richard Lower
- Abbildung 3:** Mechanismus der Arteriogenese (Deindl and Schaper 2005; Deindl et al. 2003)
- Abbildung 4:** Modell der Thrombozytenfunktion (Jackson 2007)
- Abbildung 5:** Versuchsplan Intravitalmikroskopie
- Abbildung 6:** Links: Sham-Operation; mitte: Femoralisligatur; rechts: Hautverschluss
- Abbildung 7:** I: Lagerung des Maushinterlaufs nach Narkose und Rasur (Vergrößerung: 2x); II: Schematische und intravitalmikroskopische Darstellung des arteriellen Gefäßsystems (A. femoralis, Ligatur) des rechten Hinterlaufs einer Maus mit untersuchten Gefäßabschnitten: A: proximale A. profunda femoris; C: Kollateralarterie; rechts: Intravitalmikroskopische Darstellung der Arterien (rot) und ihrer Begleitvenen (blau)
- Abbildung 8:** Vergrößerte Darstellung der Gefäße und Nerven am rechten Hinterlauf der Maus
- Abbildung 9:** C57BL6 30min nach Ligatur, graphische Darstellung der gezählten transient adhärenen Thrombozyten pro mm²; n=3
- Abbildung 10:** C57BL6 30min nach Ligatur, graphische Darstellung der gezählten fest adhärenen Thrombozyten pro mm²; n=3
- Abbildung 11:** C57BL6 1d nach Ligatur, graphische Darstellung der gezählten transient adhärenen Thrombozyten pro mm²; n=3
- Abbildung 12:** C57BL6 1d nach Ligatur, graphische Darstellung der gezählten fest adhärenen Thrombozyten pro mm²; n=3
- Abbildung 13:** C57BL6 3d nach Ligatur, graphische Darstellung der gezählten transient adhärenen Thrombozyten pro mm²; n=5
- Abbildung 14:** C57BL6 3d nach Ligatur, graphische Darstellung der gezählten fest adhärenen Thrombozyten pro mm²; n=5
- Abbildung 15:** GPIb α /IL4-R-KO 3d nach Ligatur, graphische Darstellung der gezählten transient adhärenen Thrombozyten pro mm²; n=5
- Abbildung 16:** GPIb α /IL4-R-KO 3d nach Ligatur, graphische Darstellung der gezählten fest adhärenen Thrombozyten pro mm²; n=5
- Abbildung 17:** GPIb α /IL4-R-WT 3d nach Ligatur, graphische Darstellung der gezählten transient adhärenen (links) sowie fest adhärenen (rechts) Thrombozyten pro mm²; n=5
- Abbildung 18:** C57BL6 invers, graphische Darstellung der gezählten transient adhärenen Thrombozyten pro mm²; n=2

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 19:** C57BL6 invers, graphische Darstellung der gezählten fest adhärenen Thrombozyten pro mm²; n=2
- Abbildung 20:** Vergleich der transient adhärenen Thrombozyten in GPIIb- α -KO und C57/BL6-Tieren pro mm²; n=5 (Balken: mean; error bars: SEM, *p < 0,05)
- Abbildung 21:** Laser-Doppler-Imaging (LDI): Farbkodierte Darstellung des Blutflusses im Hinterlauf der Maus vor (Pre), direkt nach (Post) sowie 3 (d3) bzw. 21 (d21) Tage nach Ligatur der A. femoralis superficialis (Limbourg et al. 2009)

12. Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für experimentelle Kardiologie des Deutschen Herzzentrums der Technischen Universität München.

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Steffen Massberg, dem früheren Leiter des Forschungslabors im Deutschen Herzzentrum und jetzigem Direktor der Medizinischen Klinik und Poliklinik I der Ludwig-Maximilians-Universität München, der diese Arbeit angeregt und gefördert hat.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. vet. Marie-Luise von Brühl, die mich in die Laborarbeiten eingeführt und diese Arbeit unterstützt hat sowie Ansprechpartnerin für zahllose Detailfragen war.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. med. Judith Pagel für die enge und freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken.

13. Lebenslauf

Name: Said Chosro Farschtschi

Geburtsdatum und -ort: 09. Juli 1985 in Heidelberg

Ausbildung:

- 1991 - 1995: Amberieu-Grundschule Mering
- 1995 - 2004: Wernher-von-Braun-Gymnasium Friedberg
- 2004 - 2005: Zivildienst
- 2005 - 2007: Studium der Medizin, TU/LMU München
- 2007: Erste Ärztliche Prüfung
- 2007 - 2011: Studium der Medizin, TU München
- 2011: Zweite Ärztliche Prüfung & Approbation
- Seit 2012: Assistenzarzt in der Klinik und Poliklinik für Neurologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Erfahrungen:

- 2006/2007: Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für medizinische Psychologie der LMU München, Prof. Dr. Ernst Pöppel
Förderung im Rahmen des undergraduate research opportunities program (UROP)
- 2008: Famulatur Hessing Stiftung Augsburg, Anästhesie
- 2009: Famulatur Deutsches Herzzentrum München, Chest Pain Unit
- 2010: Famulatur Deutsches Herzzentrum München, Kardiologie
- 2010: Famulatur Dr. med. G. Naib, Bremen, urologische Praxis
- 2010: Praktisches Jahr, Chirurgie, Universitätsklinik Bern (Inselspital), Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie
- 2010/2011: Praktisches Jahr, Innere Medizin, Krankenhaus Landshut-Achdorf, Abteilung für Innere Medizin
- 2011: Praktisches Jahr, Wahlfach Neurologie, Klinikum rechts der Isar, Neurologische Klinik und Poliklinik

Förderung: Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes

Doktorarbeit: „Rolle der Thrombozyten bei der Arteriogenese im Mausmodell“, DHZ und 1. Med. Klinik der TU München