

Aus dem Zentrum der Chirurgie
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
Klinik für Gefäß- und Endocvascularchirurgie
Dir.: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Schmitz-Rixen

Die Bedeutung der Scherspannungssteigerung für die
experimentelle Arteriogenese und die Expression von
Cofilin 1 und 2 nach Akutligatur der Arteria femoralis und
Anlage einer arterio-venösen Fistel in einem Tiermodell

Inaugural-Dissertation zu Erlangung des Doktorgrades
im Fachbereich Medizin der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Eingereicht von Gordana Karanovic
aus Osnabrück

Frankfurt am Main 2007

Dekan : Prof. Dr. med. J. M. Pfeilschifter
Referent : Prof. Dr. med. T. Schmitz-Rixen
Korreferent : Prof. Dr. rer. nat. F. Nürnberger

Tag der mündlichen Prüfung: 25.6.2009

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Hintergrund	1
1.2	Das Gefäßsystem	3
1.2.1	Entdeckung	3
1.2.2	Vasculogenese	5
1.2.3	Aufbau des Gefäßsystems	6
1.2.4	Physiologie	9
1.2.5	Hämodynamik	10
1.2.6	Pathologie	19
1.2.7	Angiogenese	21
1.2.8	Arteriogenese	24
1.3	Cofilin 1 und 2	33
1.4	Fragestellung	37
2	Material und Methoden	38
2.1	Tiermodell	38
2.1.1	Tierhaltung	39
2.1.2	Anästhesie	40
2.1.3	Chirurgische Eingriffe	41
2.1.4	Terminalversuch	50
2.2	Digitale Subtraktionsangiographie	53
2.2.1	Angiogrammauswertung - Markierung der Leitgefäße	53
2.2.2	Angiogrammauswertung - Kollateralenausählung	56
2.3	Präparation und Konservierung der Kollateralen	58
2.4	Molekulargenetik	59
2.4.1	Proteine	59

2.4.2	cDNA-Sondenherstellung	62
2.4.3	RNA	70
3	Ergebnisse	74
3.1	Tiermodell	74
3.1.1	Klinische Ergebnisse	74
3.1.2	Chirurgische Ergebnisse	74
3.2	Digitale Subtraktionsangiographie - Kollateralenauszahlung	75
3.3	Molekulargenetische Ergebnisse	77
3.3.1	Proteine	77
3.3.2	Northern Blot	79
3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	82
4	Diskussion	83
4.1	Studie	83
4.2	Übereinstimmung mit anderen Studien	84
4.2.1	Studien mit Wachstumsfaktoren	84
4.2.2	Studien mit Stammzellen	86
4.2.3	Gefäßtraining	87
4.2.4	Studien zur Gefäßpathologie	88
4.3	Definitionen	90
4.4	Tiermodell	93
4.5	Methoden	95
4.5.1	Bildgebung	95
4.5.2	Molekulargenetik	95
4.6	Ergebnisse	97
4.6.1	Kollateralgefäße	97
4.6.2	Molekulargenetik	105
4.7	Schlußfolgerung	115
5	Zusammenfassung	117
6	Summary	118
7	Reagenzien	119
8	Abkürzungen	123

9 Danksagung	193
10 Lebenslauf	196
11 Ehrenwörtliche Erklärung	199

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Hintergrund

In Deutschland gibt es etwa 3,3 Millionen an peripherer arterieller Verschlusskrankheit (PAVK) Erkrankte; das entspricht etwa 4% der Bevölkerung. Da es vor allem eine Alterskrankheit ist, wird sie allein wegen der demographischen Entwicklung weiterhin zunehmen. Es wird geschätzt, daß in Deutschland jährlich etwa 100000 neue Patienten mit einer PAVK in die ambulante Betreuung kommen. In ca. 90% der Fälle sind die Beine betroffen [401]. Leitsymptome sind Beeinträchtigungen beim Gehen, Ruheschmerzen, chronische Ulcera und Gangrän.

Es gibt verschiedene Therapieansätze zur Wiederherstellung einer ausreichenden Blutversorgung. Konservativ werden durchblutungsfördernde und gerinnungshemmende Medikamente eingesetzt. Interventionelle minimalinvasive Eingriffe wie die perkutane transluminale Angioplastie mit Stenteinsatz sind je nach Schweregrad sowie Lokalisation der Durchblutungsstörung nur begrenzt anwendbar. Gefäßchirurgische Eingriffe schaffen mittels venösen oder artifiziellen Bypässen neue Blutstrombahnen oder die verengte Strombahn wird durch Desobliteration und Erweiterungsplastik wiederhergestellt. Allerdings erfolgen diese Eingriffe an bereits affektierten Gefäßen, die nur wenig regenerationsfähig sind und für die der Eingriff ein weiteres Trauma darstellt, das häufig zu einer Restenose führt. Schließlich ist bei Patienten ohne jegliche rekonstruktive Option nur noch die Amputation durchzuführen. Im Jahr 2001 wurden in Deutschland 44252 Amputationen an den unteren Extremitäten durchgeführt [18]. Davon sind 35000 durch eine PAVK bedingt [103]. Die Sterblichkeit amputierter Patienten ist deutlich erhöht [129], die

durchschnittliche Überlebenszeit beträgt nur drei Jahre [401].

In frühen Stadien der Krankheit wird der Gefäßtraining empfohlen [136] [130] [466]. Dabei soll der Erkrankte bis zum Einsetzen der Schmerzen Gehübungen durchführen und diese nach Pausen und Schmerzrückgang wiederholen. Wie bei der Elektro-, Thermo- und Hydrotherapie spielt die Bildung von Kollateralkreisläufen eine wichtige Rolle [369].

Das Wachstum dieser Kollateralgefäße ist vom Grad der Gefäßverengung und von der einwirkenden Scherspannung abhängig [370]. Die Scherspannung bewirkt ein Wachstum der Kollateralgefäße bis zu einem gewissen Grad. Obwohl Beispiele für derartig gut ausgebildete Kollateralkreisläufe existieren, da Menschen mit hochgradig stenotischen Gefäßen völlig symptomlos und die abhängigen Organe voll funktionsfähig sein können [257], erreichen die korkenzieherartig geschlängelten Kollateralgefäße in der Mehrzahl der Fälle jedoch nicht die Kapazität, um das verschlossene Blutgefäß funktionell zu ersetzen. Daraus resultiert die Frage, wie man die Scherspannung erhöhen könnte und ob damit die Kapazität, die Anzahl und das Wachstum der Kollateralen gefördert werden kann. Zur Erörterung dieser Fragen wurde ein Tiermodell entwickelt, das mittels venöser Drainage des Kollateralblutflusses die Scherspannung dauerhaft erhöht.

1.2 Das Gefäßsystem

Das Leben eines Individuums hängt von seinem Gefäßsystem ab. Bedingt durch physiologische Bedürfnisse, nervale, endokrine und exogene Einflüsse ist es ein dynamisches und komplexes System, das ständigen Veränderungen in seiner Entwicklung, Adaption, Kapazität, Stoffwechsel- und Abwehrleistung unterworfen ist. Es transportiert sowohl wichtige Nähr- als auch giftige Abfallstoffe. Als „Organ“ betrachtet besitzt es eine Oberfläche von ca. 1000 m^2 [204] und hat eine Menge „Gesichter“, nämlich die großen elastischen und kleineren und kleinen muskulären Arterien (Aa.; s. Kapitel 1.2.3.1), die Arteriolen, die filigranen Kapillaren und Sinusoide (s. Kapitel 1.2.3.2) und schließlich die dünnwandigen kapazitätsstarken Venolen und Venen (Vv.; s. Kapitel 1.2.3.3).

Der Blutfluß durch diese GefäÙe wird angetrieben vom Herz, das Blut durch die Aa. pumpt, die sich nach ständiger Teilung in die Kapillaren fortsetzen, die den Austausch der Blutgase, Nähr-, Abfall- und Botenstoffe vermitteln. Schließlich sind es die Vv., die den Rücktransport des Blutes zum Herz übernehmen und dabei umgekehrt zu den Aa. immer größer werden (s. Bild 1.1).

1.2.1 Entdeckung

Die Entdeckung des Blutkreislaufs durch den englischen Arzt William Harvey (1578-1657; s. Bild 1.2) stellt zweifellos eines der bedeutendsten und folgeschwersten Forschungsergebnisse neuzeitlicher Medizin dar.

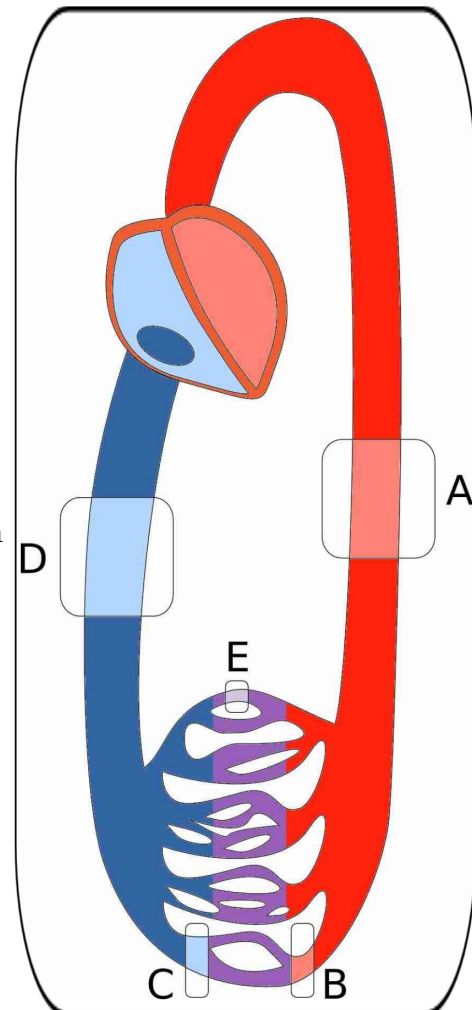


Bild 1.1: Schema des Gefäßsystem; A: Arterie, B: Arteriolen, C: Venolen, D: Vene, E: Kapillare

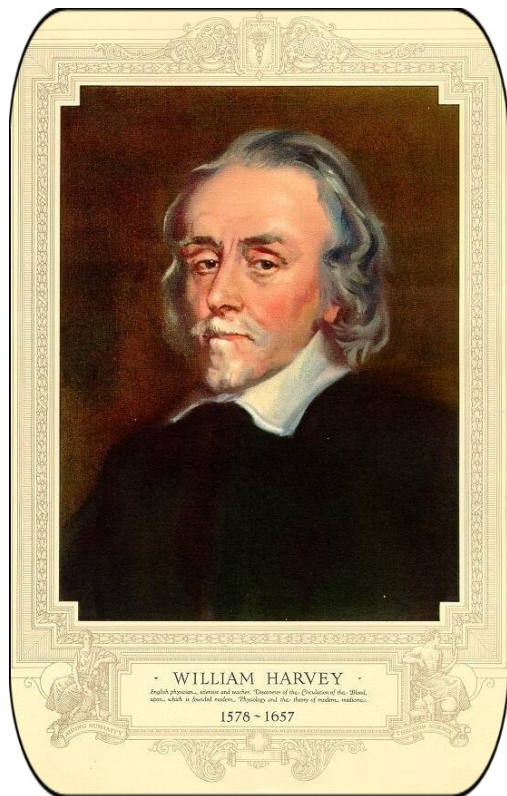


Bild 1.2: William Harvey; mit freundlicher Genehmigung von Clendening History of Medicine Library, University of Kansas Medical Center [287]

1628 wurde dazu sein 72-seitiges Buch mit dem Titel „Exercitatio anatomica de motu cordis et sanguinis in animalibus“ [Über die Bewegung des Herzens und des Blutes in Tieren] in Frankfurt am Main verlegt [303] [150]. Es war das Ergebnis einer Reihe von physiologisch-morphologischen Beobachtungen und mathematisch-gefäßphysiologischen Überlegungen zur Körperblutmenge. Durch einfache tierexperimentelle Untersuchungen, unblutige Stauungsversuche und blutige Experimente, wie z.B. die Venenunterbindung an Menschen oder die herznahe Gefäßunterbindung an Tieren, wurde sie begründet und belegt [266] [304]. Für einen Kreislauf und gegen die vorherrschende Theorie Galens, das Blut würde im Herz verbrennen, sprach die Tatsache, daß das Herzzeitvolumen höher ist als das gesamte im Körper vorhandene Blutvolumen und mehr Blut verbraucht werden müßte, als über die Nahrung zugeführt wird. Durchgesetzt hat sich die Lehre vom Blutkreislauf mit dem Herz als Pumporgan erst im letzten Drittel des 17. Jahrhunderts, nachdem die Kapillaren durch Marcello Malpighi (1628-1694) entdeckt wurden. Damit schloß sich der Kreis zwischen Aa. und Vv. und löste die Theorie Galens ab [266] [255].

1.2.2 Vasculogenese

Der Begriff Vasculogenese beschreibt die Bildung des primären Blutgefäßplexus und der primären Erythrocyten durch Zelldifferenzierung aus den gemeinsamen Vorläuferzellen, den Hämangioblasten aus dem Mesoderm. Der Primärplexus wird anschließend zu einem reifen Gefäßsystem umgebaut.

Bereits in der dritten Embryonalwoche beginnt die Bildung von Blutgefäßen und in der vierten Woche existiert schon ein funktionstüchtiger erster Blutkreislauf, der von Kontraktionen des noch ganz primitiven Herzens in Form eines schlauchförmigen Blutgefäßes bewirkt wird [97]. Es stellt damit auch die hämodynamischen Kräfte bereit, die zur weiteren Entwicklung des Gefäßsystems notwendig sind. Ausschlaggebend für die Induktion der Gefäßvorläuferzellen, den Hämangioblasten, im lateralen und paraxialen Mesoderm sind die Faktoren aus der Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF) [107]. Auch Vertreter aus der Familie der vasculären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF) sind an der Gefäßentwicklung beteiligt. Sie spielen eine Rolle bei der Differenzierung der Angioblasten und deren Anordnung [343] [474]. Des weiteren sind Botenstoffe wie Angiopoetin [408], der transformierende Wachstumsfaktor- β (TGF- β) [94], Plättchen-Wachstumsfaktor (PDGF), der Gewebefaktor und das Gerinnungssystem zu nennen, die die Vasculogenese beeinflussen [63]. Die Vorläuferzellen lagern sich zu Inseln zusammen.

Aus den peripheren Zellen gehen die Endothelzellen hervor und die inneren Zellen entwickeln sich aus der hämatopoetischen Stammzelle zur ersten Population noch zellkernhaltiger Erythrocyten, folgt man der Hypothese der bipotentiellen Vorläuferzelle [97]. Die Endothelzellen fusionieren und bilden ein vasculäres Netzwerk [351], aus mesenchymalen Zellen gehen glatte Muskelzellen und Pericyten hervor, die die Gefäße umranden [63] (s. Bild 1.3).

Die weitere Entwicklung der Plexus vollzieht sich nach dem Prinzip der Angiogenese (s. Kapitel 1.2.7). Die Zellen sprossen in das Zielgewebe und erweitern dadurch das primitive Gefäßsystem der embryonalen Organe [344].

Dieser Vorgang wird als Vasculogenese bezeichnet. Dabei sind die Regression und Differenzierung der Gefäße noch weitgehend unverstandene Prozesse, wobei beobachtet wurde, daß eine Blutflußreduktion eine Rückbildung des Gefäßes bewirkt und eine Erhöhung des Blutflusses und der Scherspannung (s. Kapitel 1.2.5.4) unter anderem einen induktiven Reiz darstellt, um glatte Muskelzellen anzulocken

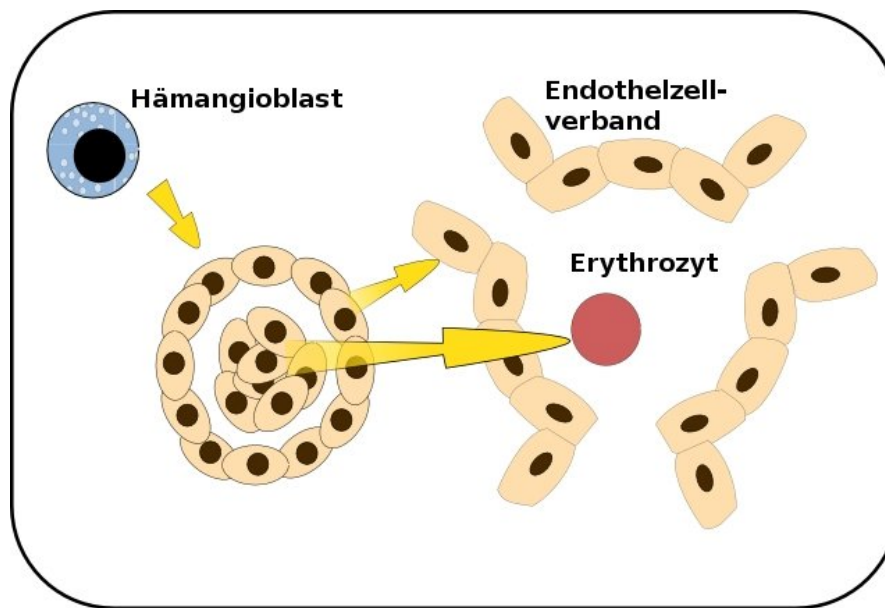


Bild 1.3: Vasculogenese: Die Häangioblasten lagern sich zu Inseln zusammen, aus den peripheren Zellen gehen Endothelzellen hervor, die inneren Zellen entwickeln sich zu Erythrocyten.

und zu einer Entwicklung Richtung V. oder A. zu führen [50]. Beispielsweise wurde bei der Koronarangiogenese beobachtet, daß die Arterialisierung stoppt, wenn sich Äste der sich ausbildenden Koronararterien treffen [104].

Schon 1893 hat der Embryologe Thoma erkannt, daß die Zunahme bzw. Abnahme der Blutflußgeschwindigkeit mit dem Durchmesser einer A. zusammenhängt. Bei Abnahme des Blutflusses beobachtete er eine Atrophie, bei Zunahme ein Wachstum des Gefäßes [416].

1.2.3 Aufbau des Gefäßsystems

Der Grundbauplan der Gefäße ist für die unterschiedlichen Komponenten gleich: er besteht aus drei Schichten, von innen nach außen betrachtet, der Intima, der Media und der Adventitia. Dieser Schichtenbauplan ist an den großen und mittleren Aa. sehr gut zu erkennen, bei den Vv. aber schlechter abzugrenzen und in kleinen Blutgefäßen, wie Arteriolen, Kapillaren und Venolen schwer unterscheidbar.

Die Intima besteht aus der Lamina endothelialis und subendothelialis; bei großen Gefäßen ist auch eine Lamina elastica interna abzugrenzen, die Media be-

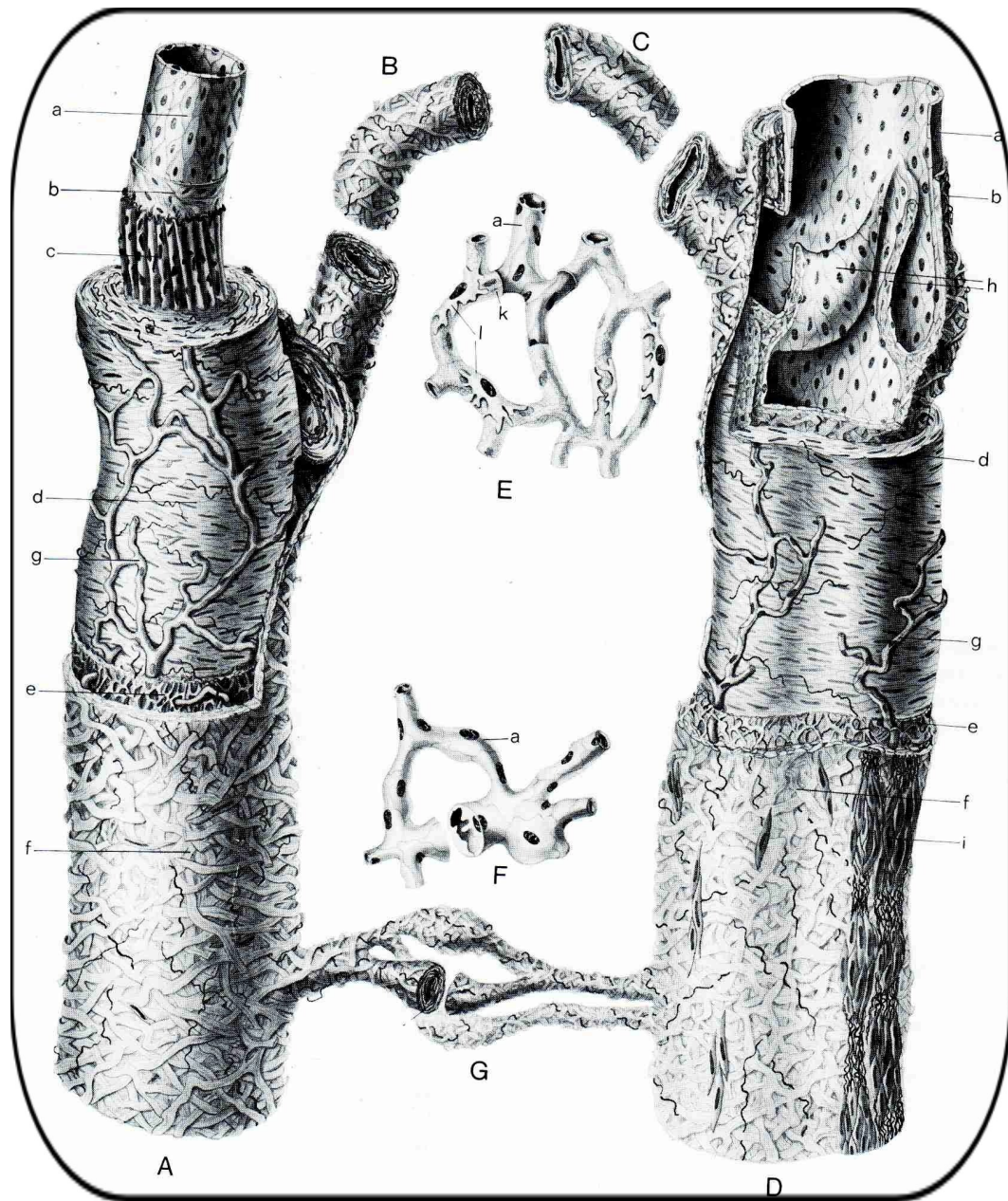


Bild 1.4: Aufbau der Gefäße: A: Arterie, B: Arteriolen, C: Venolen, D: Vene, E: Kapillare, F: Sinusoid, G: arteriovenöse Anastomose a, b, c: Intima: a: Lamina endothelialis, b: Lamina subendothelialis, c: lamina elastica interna, d: Media, e: Lamina elastica externa, f: Adventitia, g: Vasa vasorum, h: Venenklappen, i: Längsmuskulatur der Adventitia, k: Basalmembran, l: Pericyten; [378]; mit freundlicher Genehmigung der Thieme Verlagsgruppe

steht aus glatten Muskelzellen, Kollagen und je nach Gefäßtyp aus mehr oder weniger elastischen Fasern, der Lamina elastica externa. Die Adventitia als äußerste Schicht besteht im wesentlichen aus Kollagen, aber auch glatte längsverlaufende Muskelzellen sind in dieser Schicht besonders bei Vv. vorhanden [405]. Sie dient der Einbettung des Gefäßes sowie der Stabilisierung der Gefäßwand [347] (s. Bild 1.4).

1.2.3.1 Die Arterien

Herznah sind die Aa. strukturell ihrer Aufgabe angepaßt, pulsatil hohe systolische Drücke aufzufangen und die Aufrechterhaltung eines adäquaten diastolischen Druckes nach dem Windkesselprinzip zu gewährleisten. Es sind die Aa. vom elastischen Typ mit hohem Gehalt an elastischen Fasern und makroskopisch gelblicher Beschaffenheit.

In der Media sind scherengitterartige Membranen elastischer Fasern in konzentrischen Lagen zu finden, dazwischen liegen die glatten Muskelzellen in rechts- und linksgewundenen Spiralen und kollagene Fasern.

Je weiter weg die Aa. vom Herzen liegen, desto höher ist der Anteil der glatten Muskelzellen in der Media und der der elastischen Fasern nimmt ab. Außerdem ist bei Aa. eine Lamina elastica externa erkennbar, hier liegen auch die Vasa vasorum und die Gefäßnerven [97] [378] [405] (s. Bild 1.4).

1.2.3.2 Die Mikrozirkulation

Die Mikrozirkulation umfaßt einen zuführenden arteriellen Schenkel, das Kapillarbett und einen abführenden venösen Schenkel.

Afferent finden sich die Arteriolen mit nur einer Schicht glatter Muskelzellen und fragmentierter Lamina elastica interna und die Metarteriolen, deren Muskelschicht lückenhaft ist.

Es folgen die kleinkalibrigen Blutkapillaren, die durch weitgehende Verzweigung der arteriellen Gefäße ein ausgedehntes Maschenwerk ausbilden. Sie sind die feinsten Gefäße mit einem Durchmesser von 5-10 μm , einer Länge von etwa 0,5 mm und je nach Organ sehr zahlreich vorhanden mit bis zu 8000 $\frac{1}{\text{mm}^3}$. Die Kapillarwand besteht aus Endothelzellen, einer Basalmembran und den vereinzelt angelagerten kontraktilen Pericyten. Diese undifferenzierten Mesenchymzellen können zu Makrophagen transformieren und Stoffwechsel- sowie Abwehrfunktionen übernehmen.

Es finden sich Kapillaren mit kontinuierlichem und mit fenestriertem Endothel. Als Sinusoide werden Gefäße bezeichnet, die weiter sind als Kapillaren, aber deren Basalmembran ebenfalls wie das Endothel diskontinuierlich gestaltet ist. Sie kommen in Leber und Milz vor. Der gesamte Kapillarquerschnitt beträgt ca. 2800-3000 cm. Efferent finden sich die postkapillären Venulen, Sammelvenulen und muskularisierte Venulen, deren Media stets aus mehreren Lagen glatter Muskelzellen besteht [97] [378] [405] (s. Bild 1.4).

1.2.3.3 Die Venen

Das Fassungsvermögen des Venensystems ist weitaus größer als das des arteriellen Systems. Vv. schwanken in ihrem Kaliber zwischen 1 mm und 4 cm. Sie haben im Vergleich zu Aa. ein größeres Lumen und eine dünnere Wand. Die Gliederung in die drei Wandbauschichten ist bei den Vv. nicht so deutlich abgrenzbar wie bei den Aa., da die Schichten ohne merkliche Grenzzonen miteinander verwoben sind. Bei den Vv. sind es ebenfalls die herzferneren Venolen, die mit mehr glatten Muskelzellen ausgestattet sind. Je näher die Vv. zum Herzen hin liegen, desto mehr kollagene Anteile enthält die Wand. In den dazwischenliegenden Vv. variieren die Anteile an Kollagen, elastischen Fasern und glatten Muskelzellen. In der Adventitia verlaufen aus der Venenwand heraus kollagene Verspannungsfasern, die das Gefäß in der näheren und weiteren Umgebung verankern. Außerdem ist der Wandbau in weitem Maße vom hydrostatischen Druck abhängig: Vv. der unteren Körperhälfte sind mit kräftiger Muskulatur und Klappen - dünnen halbmond- oder sichelförmigen Intimaduplikaturen - versehen, wohingegen solche der oberen Körperhälfte, insbesondere diejenigen vom Kopf und Hals, dünnwandig, muskel- und klappenarm sind [97] [378] [405] (s. Bild 1.4).

1.2.4 Physiologie

Das Gefäßsystem umschließt ein Blutvolumen von etwa 5 l, der Innendruck bei stillstehendem Herzen beträgt 6-8 mmHg. Durch das vom Herz ins Gefäßsystem bei jedem Schlag beförderte Volumen von ca. 70 ml steigt der Blutdruck auf über 100 mmHg. Dieser Anstieg ist Folge der relativ geringen Elastizität der Arterienwände und des hohen Strömungswiderstandes in den peripheren Abschnitten des arteriellen Systems. Der Druck im Kapillarbett beträgt 20-25 mmHg, im folgenden venösen System noch ca. 5 mmHg [204].

Auf die großen Aa. vom elastischen Typ folgen Aa. vom muskulären Typ. Sie vermögen durch Kontraktion ihrer Media, die Blutdurchflußmenge zu regulieren. Je entfernter die A. vom linken Ventrikel liegt, umso größer ist ihre eigene Regulationskraft. In den zur Mikrozirkulation führenden Arteriolen fällt der Blutdruck sprunghaft ab; sie stellen als Engpaß der Gefäße den Widerstandsregler dar.

Durch die Verteilung der Blutsäule auf eine derart große Anzahl feinsten Gefäße verlangsamt sich die Geschwindigkeit des Blutstromes auf etwa $0,5 \frac{mm}{s}$. Das große Verhältnis von Gefäßoberfläche zu intravasalem Volumen birgt eine große Austauschfläche. Das Kapillarbett hat mit einer Austauschzeit von ca. einer Sekunde optimale Voraussetzungen für Austauschvorgänge für Blutgase, Nährstoffe, Wasser, Mineralien, Hormone, Stoffwechselprodukte, Wärme, zelluläre und nichtzelluläre Blutbestandteile. Vor allem das Endothel hat wichtige Funktionen bei Abwehrvorgängen, der Wundheilung, der Regulation des Gefäßtonus, der Permeabilität, der Antithrombogenität und der Synthese von Wachstumsfaktoren.

Die treibenden Kräfte für den Rückstrom des Blutes in den dünnwandigen und großlumigen Venen sind der niedrige verbleibende Blutdruck (ca. 15 mmHg), der herzgerichtete Sog, der in der Systole durch die Senkung der Herzventilebene entsteht, der Druck durch Bewegung der Skelettmuskulatur (Gelenk-Muskel-Pumpe) und der durch Inspiration entstehende Venensog im Thorax. Das Venensystem wirkt als Blutspeicher, 84% des gesamten Blutvolumens befinden sich darin. Treten in der Venenwand Dehnungskräfte auf, so werden diese zunächst von den elastischen Fasern aufgefangen, kommt es zu höheren Spannungszunahmen, werden die kollagenen Fibrillenbündel mitbeansprucht. Die funktionell parallelgeschalteten Spannungsträger wirken derart zusammen, daß dem kollagenen Fibrillennetz eine Schutzfunktion für die elastischen Fasern zugesprochen werden kann [97].

1.2.5 Hämodynamik

Hämodynamik ist die Lehre von der Bewegung des Blutes im Gefäßsystem und von den Faktoren, die auf den intravasalen Blutfluß einwirken [333].

Das Gefäßsystem reagiert auf akut einwirkende Kräfte funktionell mit Veränderungen des Wandspannungszustandes und auf chronische morphologisch mit Umbau [444].

Zu den konstant auf die Gefäßarchitektur und -elastizität einwirkenden Kräften gehören Blutdruck und Stromstärke. Es entstehen die longitudinale (LWS, s. Ka-

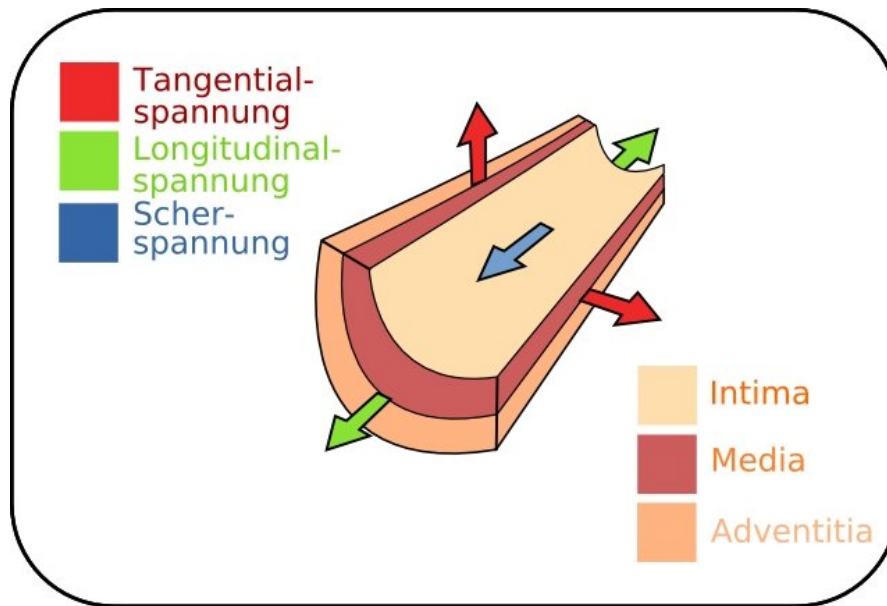


Bild 1.5: Hämodynamische Faktoren

pitel 1.2.5.2) und die tangentiale Wandspannung (TWS, s. Kapitel 1.2.5.3), außerdem die Scherspannung (s. Kapitel 1.2.5.4), die auf den Gefäßdurchmesser einwirken (s. Bild 1.5). Diese Faktoren beeinflussen einander. Eine Abschätzung davon, in welcher Relation die Faktoren zueinander stehen bieten die Gesetze von Hagen und Poiseuille (s. Kapitel 1.2.5.1) und LaPlace (s. Kapitel 1.2.5.3).

1.2.5.1 Hagen-Poiseuille-Gesetz

Das Hagen-Poiseuille-Gesetz beschreibt den Zusammenhang zwischen der Stromstärke, dem Blutdruck als der treibenden Kraft, die Flüssigkeit durch ein Rohrsystem befördert und der Viskosität einer Flüssigkeit in einem zylindrischem Gefäß mit einer bestimmten Länge. Es lautet:

$$Q = \frac{\Delta p \pi r^4}{8 \eta l} \quad (1.1)$$

bzw.

$$R = \frac{8 \eta l}{r^4 \pi} \quad (1.2)$$

Q = Stromstärke, R = Widerstand, p = Druck, r = Gefäßradius η = Viskosität, l = Gefäßlänge

Diese Beziehung gilt nur für konstante, laminare Strömung, für starre Röhren, deren Länge mehr beträgt als ihr Radius, für Newtonsche Flüssigkeiten (η kon-

stant, nicht von Scherspannung abhängig) und nur unter der Annahme, daß die Geschwindigkeit der wand nächsten Flüssigkeitsschicht „Null“ beträgt. Das Gefäßsystem und das Blut erfüllen diese Bedingungen in weiten Teilen nicht: Blut entspricht nicht einer Newtonschen Flüssigkeit; es ist eine inhomogene Suspension von Zellen in Plasma, deren Viskosität von der Größe der einwirkenden Scherspannung abhängt. Man spricht von der apparenten Viskosität η_{app} . Diese beträgt bei hoher Scherspannung, sprich bei schneller Strömung etwa 3,5 mPas und nimmt mit abnehmender Scherspannung deutlich zu. Ursache für das rheologische Verhalten des Blutes sind Deformierungen und Orientierung der Erythrocyten in schneller Strömung, sowie die Bildung von vernetzten Erythrocytenaggregaten bei langsamer Strömung [204]. Weiter gibt es nicht ausschließlich laminare Strömungen, sondern in den Gefäßen treten an Aufzweigungen und Stenosen Turbulenzen auf. Außerdem herrscht keine konstante Strömung, sondern eine pulsierende, die den Gefäßquerschnitt ändert.

Dennoch lassen sich mit dem Gesetz die Wechselwirkungen und Abhängigkeiten der Komponenten qualitativ beschreiben. Es wird verwendet, um die hämodynamischen Gegebenheiten theoretisch annähernd zu formulieren. Mittels des Hagen-Poiseuille-Gesetzes kann erklärt werden, daß der Strömungswiderstand in einem Gewebe besonders von den kleinen Arteriolen und Kapillaren abhängig ist, da diese kleinere Gefäßdurchmesser haben und durch Kontraktion den peripheren Strömungswiderstand stark beeinflussen können. An Gefäßaufzweigungen, Stenosen und Gefäßwindungen kommt es ebenfalls zu Druckverlusten durch Trägheit, Turbulenzen und Geschwindigkeitsänderungen [407]. Außerdem wirken nicht nur physikalische, sondern auch biochemische Kräfte auf die Gefäße ein.

Diesem Gesetz zufolge steigt die Stromstärke, d.h. das pro Zeiteinheit fließende Blutvolumen, proportional zur 4. Potenz des Gefäßradius und mit dem Druckgefälle an. Die Stromstärke vermindert sich, je länger das Gefäß ist und je höher die Viskosität der das Gefäß durchströmenden Flüssigkeit ist [204].

1.2.5.2 Longitudinale Wandspannung

Die longitudinale Wandspannung (LWS) wird auch Spannkraft F_{LWS} genannt, die das Gefäß zwischen zwei fixen Punkten aufspannt [359] (s. Bild 1.6.)

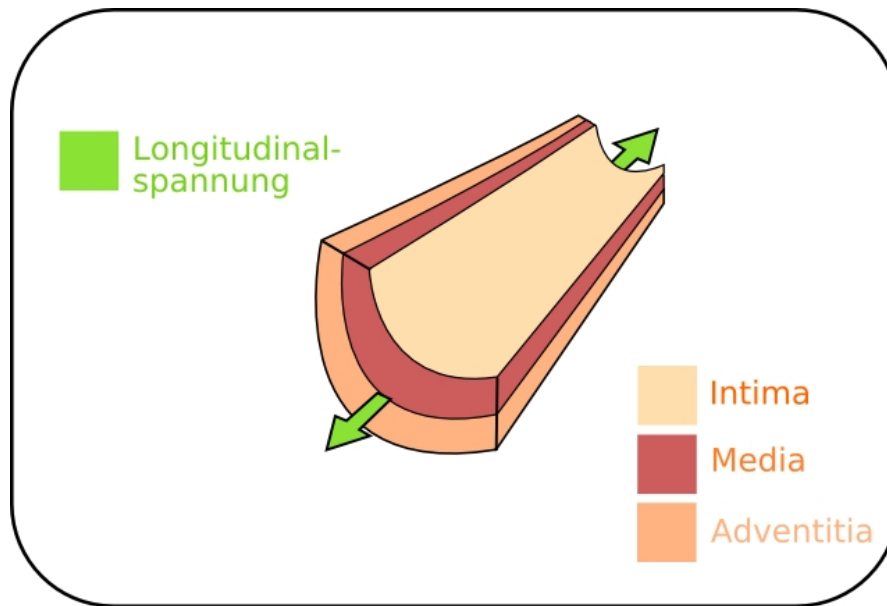


Bild 1.6: Longitudinale Wandspannung

Sie ist über folgende Gleichung definiert:

$$F_{LWS} = \frac{p \pi r^2}{2} \quad (1.3)$$

In situ stehen fast alle Aa. unter longitudinaler Spannung durch die Verankerung an das Umgebungsgewebe und beeinflusst durch den Kontraktionszustand der Muskelzellen der Media. Veränderungen des Umgebungsgewebes beeinflussen die Morphologie der Aa., da diese bei Erhöhung der LWS dazu tendieren nachzuwachsen, um die Normalisierung der Spannkraft zu bewirken. So geschieht es z.B. bei der Entwicklung des Gefäßsystems, einer Schwangerschaft und pathophysiologisch beim Tumorwachstum [185]. Bei einem Druckanstieg, wie es in den Kollateralarterien nach Occlusion des Leitgefäßes der Fall ist, steigt auch die LWS: das Gefäß wird gedehnt, da es dazu tendiert, die LWS in Richtung homeostatischer Werte wieder zu verringern [369].

1.2.5.3 Tangentiale Wandspannung

Der transmurale Druck p_{tm} (Differenz zwischen intra- und extravasalem Druck) dehnt die Gefäßwand und erzeugt die tangentielle Wandspannung S (TWS; s. Bild 1.7).

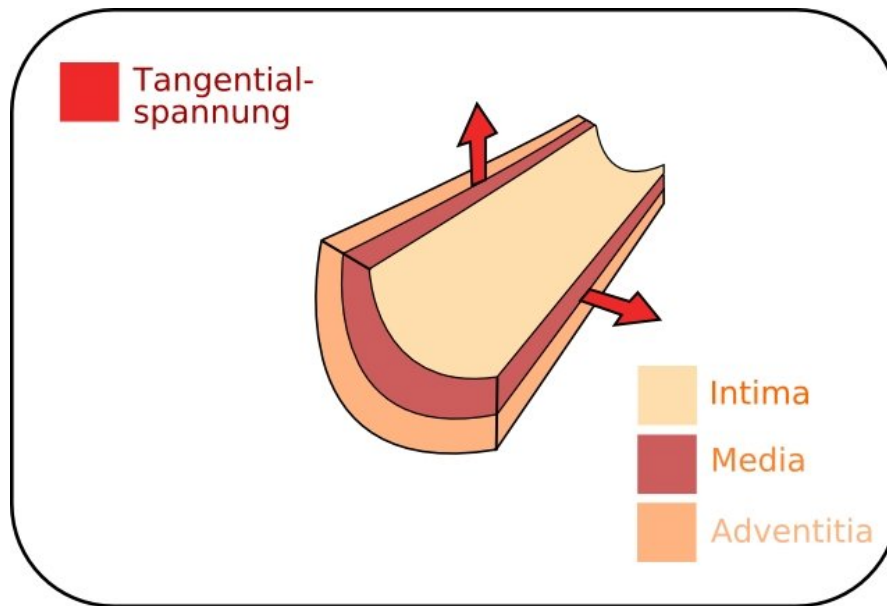


Bild 1.7: Tangentiale Wandspannung

Nach dem Gesetz des französischen Mathematikers und Physikers Laplace (1749-1827) kann dieser Dehnungszustand durch die TWS S beschrieben werden:

$$S = \frac{p_{tm} r}{h}. \quad (1.4)$$

Sie entspricht der Kraft mit der bei einem Schnitt in Längsrichtung durch die Gefäßwand die Schnittträger tangential auseinanderstreben. Dieser Kraft müssen die Gefäßwandelemente entgegenwirken, damit das Gefäß dem dehrenden pulsatilem Einfluß des transmuralen Druckes nicht nachgibt. Die TWS ist direkt proportional zum Blutdruck und Gefäßdurchmesser und umgekehrt proportional zur Wanddicke. Dies lässt sich auch an den unterschiedlichen Wanddicken der Gefäße „ablesen“ (s. Kapitel 1.2.3 und Kapitel 1.2.4). Bei konstantem hydrostatischem Druck im Gefäß ist somit die Wandspannung umso größer, je größer der Radius ist. Diese Wandspannung entspricht aber auch der Kraft, mit der die glatte Gefäßmuskulatur dem Innendruck das Gleichgewicht hält, oder ihm gegenüber das Gefäß verengt. Bei gleichem Innendruck benötigen deshalb kleine Blutgefäße zur Vasokonstriktion weniger Kraft, als große Gefäße. Die tangentielle Wandspannung in einer Röhre ist doppelt so groß wie die longitudinale Spannung [25] (s. Kapitel 1.2.5.2).

Blutgefäße sind keine starren Röhren. Sie sind dehnbar und können auf akute

Veränderungen mittels der glatten Muskelzellen ihren Widerstand variieren. Auf einen chronisch erhöhten Blutdruck reagiert die Gefäßwand mit einem Umbau, um die tangentialen Wandspannung zu normalisieren. So ein Umbau erfolgt auch bei erhöhter longitudinaler Spannung (s. Kapitel 1.2.5.2). Ein prominentes Beispiel dafür ist die Wandverdickung und Versteifung bei der Arteriosklerose, bei der die arterielle Hypertonie eine der wichtigsten Ursachen darstellt (s. Kapitel 1.2.6). Als Folge der Drucksteigerung erhöht sich die Wanddicke, aber der Durchmesser nimmt nicht zu, er verringert sich bei vermehrter Einsteifung der Gefäßwand und bei konstanter tangentialer Wandspannung [369] [155].

1.2.5.4 Scherspannung

Die Scherung ist eine Komponente der tangentialen hämodynamischen Kräfte. Bei der Scherung steht die Scherkraft F mit der Scherspannung τ und der Fläche A , auf die eingewirkt wird, in folgendem Verhältnis:

$$\tau = \frac{F}{A} \quad (1.5)$$

Die Scherspannung ist definiert als Kraft pro Flächeneinheit. Als Komponente des Druckes übt sie reibenden Schub zur parallel verlaufenden Zelloberfläche des Endothels aus [221] (s. Bild 1.8).

Betrachtet man den Fluß in einer Rohrleitung, so besteht die laminare Strömung hier aus vielen unendlich dünnen Flüssigkeitsschichten; diese schieben sich modellhaft gedacht als zylindrische Flüssigkeitsschichten mit konstanter linearer Strömungsgeschwindigkeit \bar{v} aneinander vorbei (s. Bild 1.9).

Dazu wird die Scherkraft F_S mit

$$F_S = \Delta p \pi r^2 \quad (1.6)$$

benötigt, die tangential zur Gefäßlängsachse in Flußrichtung wirkt, um die Reibungskraft F_R auszugleichen.

Für F_R gilt:

$$F_R \propto \frac{2 \pi r l dv}{ds} \rightarrow F_R = \eta \frac{2 \pi r l dv}{ds} \quad (1.7)$$

Verschiebung, ds = Schichtdicke, η = Koeffizient der inneren Reibung bzw. dynamische Viskosität

Weiter ist:

$$F_S = -F_R \quad (1.8)$$

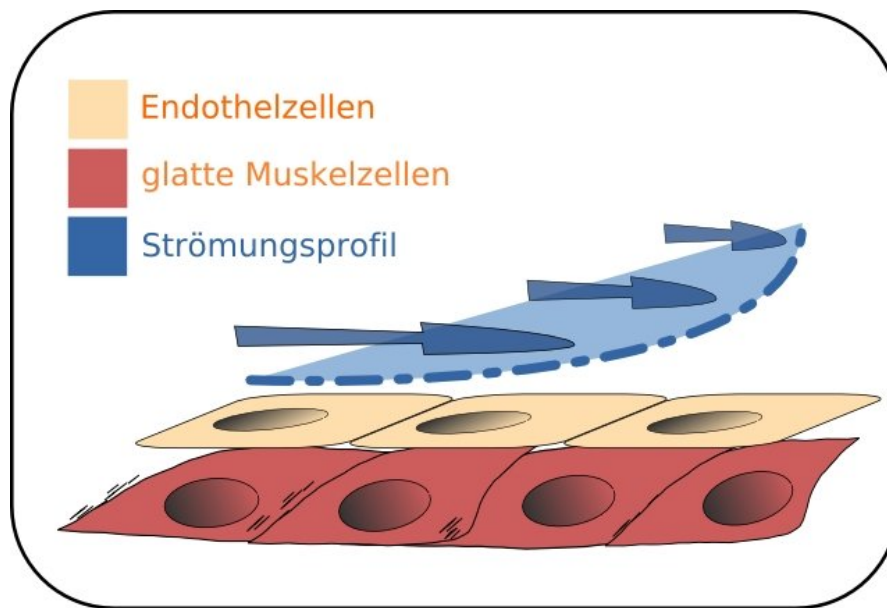


Bild 1.8: Die Scherspannung: Die Scherspannung übt reibenden Schub zur parallel verlaufenden Zelloberfläche des Endothels aus.

und damit

$$\Delta p \pi r^2 = -\eta \frac{2\pi \gamma l dv}{ds} \rightarrow \frac{dv}{ds} = \frac{\Delta p r}{2l\eta} \quad (1.9)$$

Definiert man nun τ als die Scherspannung mit

$$\tau \propto \frac{dv}{ds} \quad (1.10)$$

bzw.

$$\tau = \eta \frac{dv}{ds} \quad (1.11)$$

dann ist

$$\tau = \frac{\Delta p r}{2l} \quad (1.12)$$

$\frac{dv}{ds}$ = Scherwinkelgeschwindigkeit bzw. $\dot{\gamma}$ = Schergrad; $\frac{dv}{ds}$: Schichtdicke s als Funktion der Geschwindigkeit \bar{v} dargestellt.

Also ist

$$\tau = \eta \dot{\gamma} \quad (1.13)$$

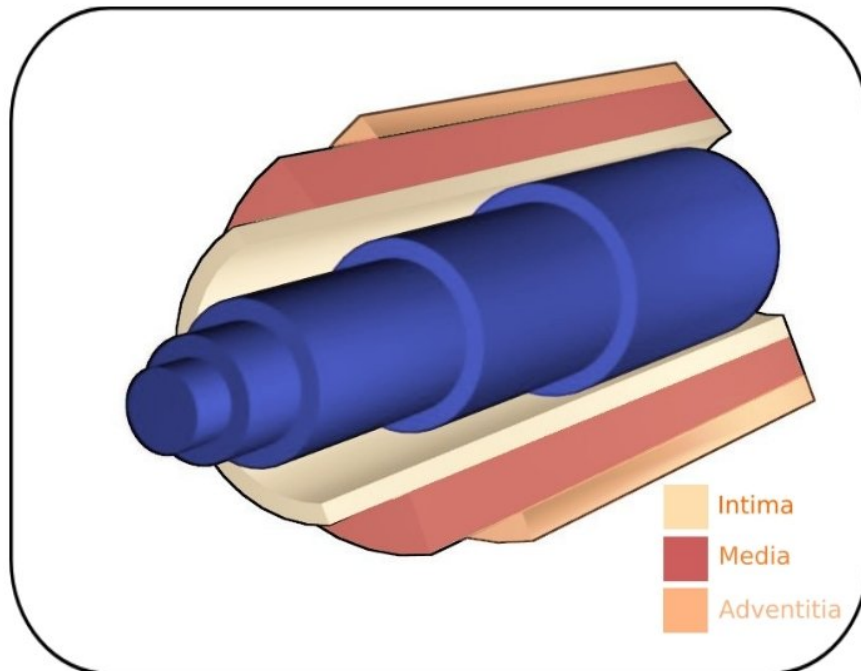


Bild 1.9: Scherspannungsmodell: Fluß in einer Rohrleitung; die laminare Strömung besteht aus vielen unendlich dünnen Flüssigkeitsschichten, die sich als zylindrische Flüssigkeitsschichten mit konstanter linearer Strömungsgeschwindigkeit \bar{v} aneinander vorbeischieben.

Hierbei handelt es sich um das Newtonsche Gesetz, demzufolge eine lineare Beziehung zwischen der auf die strömende Flüssigkeit einwirkenden Scherspannung τ und dem daraus resultierenden Schergrad γ besteht. Eine Umformung des bereits unter (s. Kapitel 1.2.5.1) genannten Hagen-Poiseuille-Gesetzes ergibt nun:

$$\frac{\Delta p r}{2l} = \frac{4\eta Q}{\pi r^3} \quad (1.14)$$

so daß

$$\tau = \frac{4\eta Q}{\pi r^3} \quad (1.15)$$

Für eine mittlere lineare Strömungsgeschwindigkeit \bar{v} gilt:

$$Q = \bar{v} A \quad (1.16)$$

mit

$$A = \pi r^2 \quad (1.17)$$

so daß:

$$\bar{v} = \frac{Q}{\pi r^2} \quad (1.18)$$

und damit:

$$\tau = \frac{4\eta\bar{v}}{r} \quad (1.19)$$

bzw.

$$\tau = \frac{4\eta Q}{\pi r^3} \quad (1.20)$$

[204] [475].

Auch diese Gleichung gilt nur für konstante, laminare Strömung und für starre Röhren und wird bei Berechnungen im Gefäßsystem angewandt, um annähernde Ergebnisse zu berechnen, bzw. Verhältnisse zu formulieren.

Bezogen auf ein Gefäß besagt diese Formel theoretisch, daß sich die Scherspannung proportional zur Viskosität, Strömungsgeschwindigkeit, bzw. der Stromstärke und umgekehrt proportional zum Radius, bzw. zur dritten Potenz des Radius verhält. Die flußinduzierte Scherspannung als formende Kraft wurde im Gesetz der Histogenese des arteriellen Systems das erste Mal von Thoma 1893 formuliert und beschreibt das Verhältnis zwischen dem Durchmesser des arteriellen Systems und der Flußgeschwindigkeit im sich entwickelnden Hühnerembryo [416].

Spätere Studien finden sich vom Autor Clarke im Jahre 1918, in denen gezeigt wurde, daß die Reduktion des Blutflusses zu einer Atrophie kleiner Aa. führt, wobei im Gegensatz dazu die Gefäße, die hoher Scherspannung ausgesetzt sind, stabilisiert werden [79].

Murray postulierte 1926, daß das Gefäßsystem optimal konfiguriert ist, den Betrag an mechanischer und metabolischer Leistung zu minimieren, um einen adäquaten Blutfluß zu gewährleisten. Veränderungen in dieser Konfiguration führen nach Murray zu einer strukturellen Adaptation, die darauf gerichtet ist, das optimale Niveau wiederherzustellen [275] [274].

Trotz der allgemeinen Akzeptanz der Scherspannung als formende Kraft im arteriellen System, blieb aber ihre Rolle bei der Entwicklung des Kollateralkreislaufes kontrovers. Die TWS wurde gegenüber der Scherspannung als die wichtigere Kraft favorisiert [358], da erstere 2500-fach höher ist [369]. Die Scherspannung moduliert aber im Fall der Occlusion eines Leitgefäßes die TWS. Die Scherspannung

wirkt parallel auf die Gefäßoberfläche, damit auf die Endothelzellen ein [234], die daraufhin den Prozeß der Arteriogenese (s. Kapitel 1.2.8) einleiten und schließlich eine strukturelle Durchmesserzunahme des Gefäßes bewirken [133] [338].

1.2.6 Pathologie

Die Pathologie der Aa. spielt eine große Rolle in unserer Gesellschaft. Die Mehrheit der Erkrankungen ist sklerotischer Genese.

Arteriosklerose ist ein Sammelbegriff für primär nicht entzündliche Arterienerkrankungen, bei denen sekundär über einen inflammatorischen Prozeß ein fibröser Umbau zu einer Verdickung, Verhärtung und Elastizitätsverlust der Gefäßwand geführt hat [341].

Atherosklerose ist die von der WHO vorgeschlagene Bezeichnung der Schlagaderverkalkung, definiert als variable Kombination von Intimaveränderungen, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Calciumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia. Die Ätiologie der primären Atherosklerose ist unbekannt, bei der sekundären Form sind kausalpathogenetische Risikofaktoren bekannt. Dazu gehören die Hyperlipidämie, die arterielle Hypertonie, der Nikotinabusus, das männliche Geschlecht und genetische Faktoren [341]. Die oben genannten Faktoren schädigen das Endothel direkt oder in Folge durch in der Intima ablaufende Prozesse. Die Lipoproteine „low density lipoprotein“ (LDL) und „high density lipoprotein“ (HDL) sind in der Lage, auch gesundes Endothel frei zu durchdringen.

Ist die LDL-Konzentration im Lumen hoch, so ist sie das auch in der Gefäßwand. Bei geschädigtem Endothel lagern sich die Lipoproteine, Monozyten und auch Thrombozyten direkt an. Wird LDL nicht aus der Gefäßwand abtransportiert, altert es dort und daraus folgende chemische Modifikationen lösen die Phagozytose durch Makrophagen aus, indem die modifizierten LDL selbst chemotaktisch wirken und in Endothel- und glatten Muskelzellen der Gefäßwand die Synthese von Adhäsionsproteinen (z.B. Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1; ICAM) und dem Monocytenanlockenden Protein-1 (MCP-1) induzieren. Weiter bewirkt hier auch eine durch die Gefäßverengung bedingte Scherspannungserhöhung eine Erhöhung des MCP-1-Gehaltes [392]. Es kommt zu Ansammlung von neutrophilen Granulo-

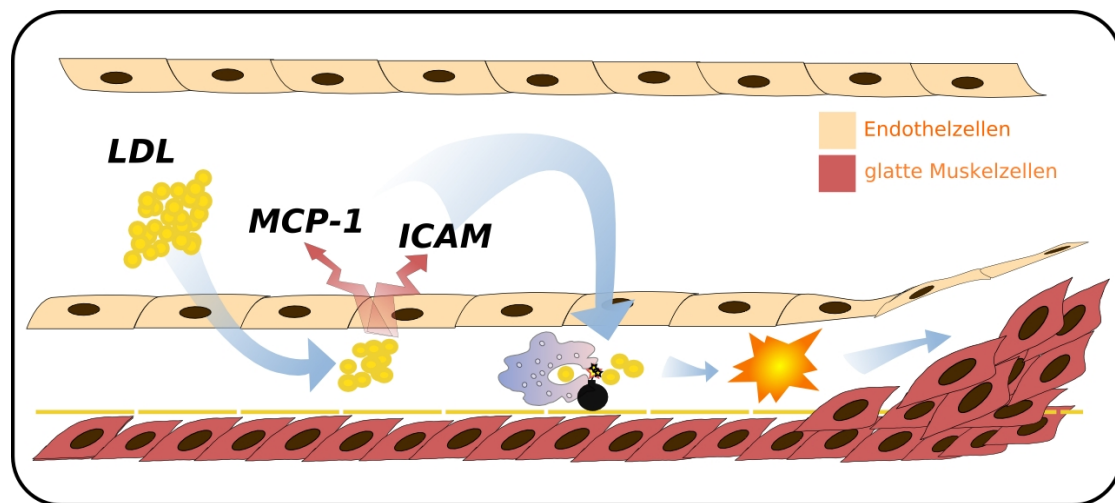


Bild 1.10: Pathologie der Atherosklerose: Bei hoher Konzentration schädigender Faktoren, hier LDL, kommt es zur Entzündungsreaktion in der Gefäßwand und konsekutiv zur Gefäßverengung.

zyten und Makrophagen. Letztere phagozytieren das LDL und erhalten dadurch einen schaumigen Aspekt. In diesen Schaumzellen vollzieht sich die Hydrolyse der Bestandteile der Lipoproteine. Das verbleibende Cholesterin ist aber inert gegen die Enzyme der Makrophagen und muß nun von HDL abtransportiert werden oder es bildet Kristalle, die die Membransysteme der Makrophagen zerstören. Dadurch kommt es dann zur lokalen Entzündung, Freisetzung von hochreaktiven Sauerstoffradikalen, Cytokinen, Interleukinen, Mediatoren und Gerinnungsfaktoren und matrixdegenerierenden Metalloproteinasen (MMP) [63]. Infolge der Nekrose der Schaumzellen finden sich nun wieder Lipide extrazellulär. Es folgt die Schädigung des eventuell noch intakten Endothels, welches vermehrt Endothelin und vermindert Stickstoffmonoxid und Prostacyclin freisetzt, wodurch es zur lokalen Vasokonstriktion kommt. Außerdem lagert sich durch Plasminhemmung Fibrin ab. Die Entzündungsreaktion führt weiter zur Infiltration durch T-Lymphocyten. Diese bewirken eine weitere Aktivierung der Makrophagen mittels Interferon- γ und dem Granulocyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF). Die Makrophagen produzieren Wachstumsfaktoren, u.a. den FGF, den insulinähnlichen Wachstumsfaktor, den Plättchen-Wachstumsfaktor (PDGF), den TGF- β , welche die Proliferation glatter Muskelzellen [404], Myofibroblasten und des Bindegewebes stimulieren, die zu dem Entzündungsherd in der Intima

migrieren. Dabei verändern die glatten Muskelzellen ihren Phänotyp; sie wechseln vom kontraktiven Typ mit vielen Myofilamenten in den synthetischen Typ, der nun Matrixproteine wie Kollagen, Elastin und Proteoglykane produziert. Dieser Typ bildet selbst Faktoren wie GM-CSF, FGF, IGF, PDGF, TGF- β und Cytokine, wie Interleukin 1 und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), was zum Fortgang und Auto-stimulation der beschriebenen Entzündungsreaktion beiträgt [472] (s. Bild 1.10). In deren Verlauf entstehen an der Gefäßwand sichtbare Fettstreifen, die sich durch den dauernden Fortgang der Inflammation zu verkalkenden atheromatösen Plaques entwickeln.

Diese atherosklerotischen Gefäße besitzen nur noch eine eingeschränkte Fähigkeit zum Bluttransport, was zum Mißverhältnis von Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf des Gewebes führt. Außerdem kann die Ruptur eines atheromatösen Plaques mit der Bildung eines Fibringerinnsels eine prothrombotische Reaktion auslösen [417]. Nennenswert ist hier die beobachtete Verminderung der Fibrinolyse durch einen verminderten Gehalt an Gewebs-Plasminogenaktivator bzw. erhöhten Gehalt an Plasminogenaktivator-Inhibitor [372] [189].

Der Prozeß der Entstehung der Gefäßkrankheit vollzieht sich in Schritten, die auch bei der unten beschriebenen Arteriogenese (s. Kapitel 1.2.8) ablaufen. So kommt es bei beiden Prozessen zu einer Veränderung des Blutflusses und zu einer inflammatorischen Phase mit Leukocytenanlockung, der Heraufregulation von MCP-1, Adäsionsmolekülen und MMP [307]. Des weiteren kommt es auch zur Proliferation der glatten Muskelzellen und Formation einer neuen Intima [106]. Auch Wachstumsfaktoren, deren Vorkommen bei der Angiogenese (s. Kapitel 1.2.7) bekannt ist, wirken proatherogen und prothrombotisch. Das Vorkommen all dieser Faktoren ist eine Reaktion des Gefäßes auf die einwirkenden Kräfte. Das Ergebnis ist davon abhängig, wie lange und wie stark welche Kraft wirkt und ob diese Einwirkung lokalisiert oder generell an einem Gefäß geschieht [370] [206] [210].

1.2.7 Angiogenese

Nach Formung des primären Gefäßplexus bei der Vasculogenese (s. Kapitel 1.2.2), vollzieht sich die weitere Gefäßentwicklung nach den Regeln der Angiogenese. Der Vorgang der Angiogenese läuft aber nicht nur als Fortsetzung der Entwicklung des primären Gefäßplexus ab, sondern auch immer wieder im Laufe des Lebens eines Menschen, z.B. im Rahmen des Wachstums, der Wundheilung, der Keim-

zellreifung und Schwangerschaft [111]. Dabei vermehrt sich die Anzahl der Kapillaren [376]. Pathologisch tritt auch beim Tumorwachstum [97] [108] [109], bei der rheumatischen Arthritis, verschiedenen Retinopathien [142] und bei der Gewebischämie Angiogenese auf. Die Ischämie wird sogar als der wichtigste Stimulus für Angiogenese betrachtet [49].

Es sind zwei synchron während der Entwicklung von Organen ablaufende Mechanismen der Angiogenese bekannt (s. Bild 1.11):

Bei der sprossenden Angiogenese sprossen die Kapillaren vom primären Plexus aus. Dies wird vor allem in Organen beobachtet, in denen der Primäplexus zunächst keine Anlage hatte, z.B. im Gehirn. Es kommt zunächst zur proteolytischen Degradation der extrazellulären Matrix, dann zur Chemotaxis und Migration der proliferierenden Endothelzellen ins umliegende Gewebe und schließlich zur Lumenformation und funktionalen Maturation. VEGF wirkt dabei chemotaktisch und kann die Fusion von Kapillaren zu stabileren, größeren Gefäßen bewirken. Diese sind aber nicht von glatten Muskelzellen, höchstens von Pericyten umgeben. Pericyten sind Kapillaren umgebende Zellen, die die kontraktile Elemente Aktin und Myosin enthalten [405]. Es kommt zu keiner nennenswerten Arteriolisierung mit zusammenhängenden glatten Muskelzellen; die Kapillaren sind fragil und dem Blutdruck und dessen Schwankungen ausgesetzt.

Bei der nichtsprossenden Angiogenese, auch Intussuszeption genannt, entstehen neue Tochtergefäße im Ursprungsgefäß. Es proliferieren die sich gegenüberliegenden Endothelzellen in das Lumen des Ursprungsgefäßes und formen zwei Lumen, welche dann durch transkapilläre Matrixstege zerteilt wird. Die Stege setzen sich in axialer Richtung fort, so dass zwei parallele Gefäße entstehen. Die nicht sprossende Angiogenese kommt vor allem in Organen vor, die schon vom Primärgefäßplexus her vaskularisiert sind, z.B. die Lunge [343] [474] [309] [310].

Endothelzellen und Pericyten spielen bei beiden Prozessen der Angiogenese die Hauptrolle. Diese beiden Zelltypen tragen die gesamte genetische Information, um tubuläre Gebilde, Abzweigungsstellen und ganze Netzwerke ausgehend von einem bereits existierenden Blutgefäß zu formen [113]. Die Angiogenese ist stark von der Inhibition der Apoptose und damit dem Überleben der Endothelzellen abhängig. Viele der proangiogenetischen Faktoren bewirken das Überleben der Endothelzellen, welches auch von dem Andocken derselben an die extrazelluläre Matrix und von Zell-Zell-Kontakten abhängt. Dementsprechend bewirkt eine Inhibition der

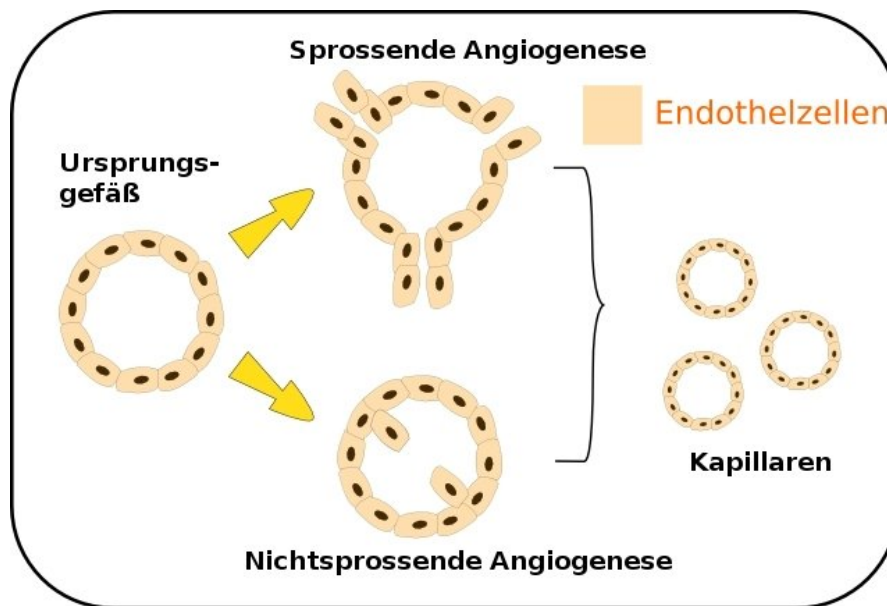


Bild 1.11: Angiogenese

proangiogenetischen Signale oder Adhäsionsmoleküle die Apoptose der Endothelzellen und damit die Inhibition der Angiogenese. Ebenso induzieren einige der antiangiogenetischen Faktoren die Apoptose der Endothelzellen [69] [96].

Hypoxie bewirkt die Aktivierung des Hypoxieinduzierbaren Transkriptionsfaktors. Dieser bindet an die Promoterregion des VEGF-Gens und bewirkt eine Expressionssteigerung von VEGF [426] [37] [64] [11] [425] [243]. Des Weiteren wurde ein Einfluß der Hypoxie auf die Stabilität der VEGF-mRNA nachgewiesen [403] [78]. Der plazentare Wachstumsfaktor (PlGF) moduliert die Aktivität von VEGF [59] [45] und wirkt selbst fördernd auf die Angiogenese ein [479]. Verschiedene weitere Cytokine wurden als Stimulatoren der Proliferation von Endothelzellen, Pericyten und der Migration und Aktivierung von Monocyten identifiziert, beispielsweise MCP-1, FGF-2, VEGF, GM-CSF, TGF- β und PDGF [49] [236] [214] [47]. TGF- β führt u.a. aber auch zur Stabilisierung der Phänotyps der Endothelien und zur Inhibition der Proliferation [343] und PDGF spielt u.a. bei der Pericytenentwicklung eine wichtige Rolle [238]. Auch Thrombospondin ist bekannt, ein Inhibitor der Angiogenese zu sein [111], des Weiteren Angiostatin, ein Fragment des Plasminogen [300] [460], Endostatin, ein Fragment des Kollagen [299] und Faktoren des Gerinnungssystems [231] [301]. Die hämodynamischen Kräfte beeinflussen die Angio- ebenso wie die Vasculo- und Arteriogenese und das bestehende Gefäßsystem.

stem [431] [83].

Mit VEGF und FGF wurden bereits Studien durchgeführt, bei denen die DNA bzw. das Protein selbst in hypoxische Bereiche eingebracht wurde und eine vermehrte Angiogenese bewirkte [142] [413] (s. Kapitel 4.2.1).

1.2.8 Arteriogenese

Arteriogenese ist definiert als die Transformation einer kleinen präexistenten dünnwandigen, aus einer endothelialen Innenschicht, einer Lamina elastica interna und einer oder zwei Lagen glatter Muskelzellen bestehenden Arteriole in eine viel größere leitende A. bei Verschuß der Hauptarterie. Dies geschieht pathophysiologisch bei Verschuß eines arteriellen Leitgefäßes oder auch physiologisch z.B. bei der Wundheilung und der Schwangerschaft im wachsenden Uterus [113]. Diese kleinen Arteriolen mit einem Durchmesser von etwa $50 \mu\text{m}$ als Bestandteil präexistierender arterio-arteriolarer Anastomosen werden infolge Scherspannungszunahme nach Verschuß eines Leitgefäßes in kurzer Zeit zu funktionellen Aa., den Kollateralarterien, umgebaut [370]. Einzelne Bereiche der Kollateralarterien wurden durch Longland definiert als Stamm-, korkenzieherartig ausgeprägte Mittel- und Wiedereintrittszone [244] (s. Bild 1.12).

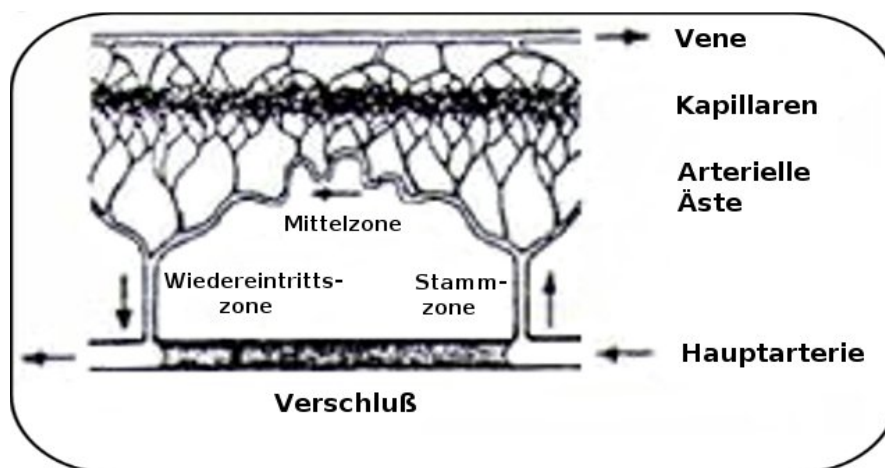


Bild 1.12: Kollateralarterie nach Longland; [244]

Das Vorhandensein dieser Arteriolen ist genetisch determiniert [160]. Die Arteriogenese vollzieht sich nach dem gleichen Prinzip bei Mäusen, Ratten, Kaninchen, Schweinen, Hunden und Menschen, unabhängig davon, ob es sich um Koronar-,

Hirn- oder periphere Aa. handelt.



Bild 1.13: Richard Lower [247]

Kollateralen hat der englische Anatom Richard Lower (s. Bild 1.13) bereits 1669 in seiner Publikation beschrieben: Die Koronargefäße kommunizieren teilweise über Anastomosen, welche einem Versorgungsmangel mit Blut völlig vorbeugen könne. Lower beschrieb damit nicht nur präzise die Kollateralen, sondern war sich schon deren Schutzfunktion im Falle eines Gefäßverschlusses bewußt [247]. Im 18. Jahrhundert führte der Chirurg John Hunter Ligaturen an Hirschgeweihen und Hinterläufen des Hundes durch und erkannte, daß die Kollateralversorgung nach einer bestimmten Zeit einsetzt und die abhängige Strombahn versorgt. Im Jahre 1845 veröffentlichte Luigi Porta (1800-1875) in Milano sein Werk „Delle alterazioni patologiche delle arterie per la ligatura e la torsione“ [Über die pathologischen Veränderungen der Arterie durch Ligatur und Drehung], in dem er die Entstehung einer Kollateralblutversorgung durch Ligatur der A. femoralis in einem Schwein beschrieb. Er berichtete über im Bereich der Ligatur neu entstandene korkenzieherartig geformte Gefäße, die Nekrosen der distalen Extremität verhinderten. Fulton demonstrierte mit mehreren Studien etwa 300 Jahre nach Lower ebenfalls,

daß zwischen den Koronararterien Kollateralgefäße bestehen und entkräftete die damals geltende Ansicht, die Koronararterien wären Endarterien [118] [117] [119] [120] [121] [35].

Wachstum als Mechanismus koronarer Kollateralentwicklung wurde 1967 zum ersten Mal von Schaper et al. beschrieben, und 1971 konnte nachgewiesen werden, daß präexistierende Kollateralarteriolen nicht durch passive Vasodilatation, sondern infolge Proliferation von Endothel und glatter Gefäßmuskulatur und Umbauvorgängen zu großen Kollateralarterien werden [50] [367] [364]. Eine Reihe von Studien zum Anteil des Kollateralwachstums an der Genesung nach Myokardialinfarkt brachte schließlich einen Beweis für die Funktionalität von Kollateralen [286] [379] [146] [457]. Auch für das Gefäßsystem im Gehirn nach einem Schlaganfall ist eine Verbesserung der Durchblutungssituation beschrieben [455]. Unter normalen Flußbedingungen und abhängig vom Druckgradient zwischen den untereinander verbundenen arteriellen Netzwerken gibt es nur einen minimalen gerichteten Fluß, aber kleine oszillierende Flüsse scheinen ständig vorhanden zu sein [370] [363]. Auch versorgen die Kollateralgefäße unter physiologischen Bedingungen das umliegende Gewebe [62], z.B. die Muskulatur bei Beanspruchung im Rahmen der Kontraktion über die Verbindung, die ja proximal und distal zur versorgenden A. vorhanden ist.

In einem Leitgefäß wie z.B. der A. femoralis (fem.) beträgt die Scherspannung etwa $5-40 \frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2}$ [137] [185] [338] [196] [197]. Die Schwankungen kommen durch den pulsatilen Charakter des Blutflusses zustande. Die Scherspannung ist im Normalzustand eher eine schwache Einflußgröße im Gegensatz zu der TWS (s. Kapitel 1.2.5.3), die 2500-fach stärker ist [369] [358] [371]. Experimentell kommt es direkt nach Ligatur dieses Gefäßes zur Steigerung der Scherspannung auf das 200-fache [55]. In diesem Zustand ist die Scherspannung die modulierende Kraft.

Diese Scherspannungserhöhung wirkt auf die Kollateralarterien, die die Seitenäste proximal und distal der Occlusion verbinden entlang des hohen Druckgradienten von proximal nach distal [49] [439] und bewirkt zunächst akut deren funktionelle Dilatation [350] [54] [428].

Die Stufen der strukturellen Veränderung, der Arteriogenese, bestehen aus der Initiierung, der Proliferation und der Maturation (s. Bild 1.14).

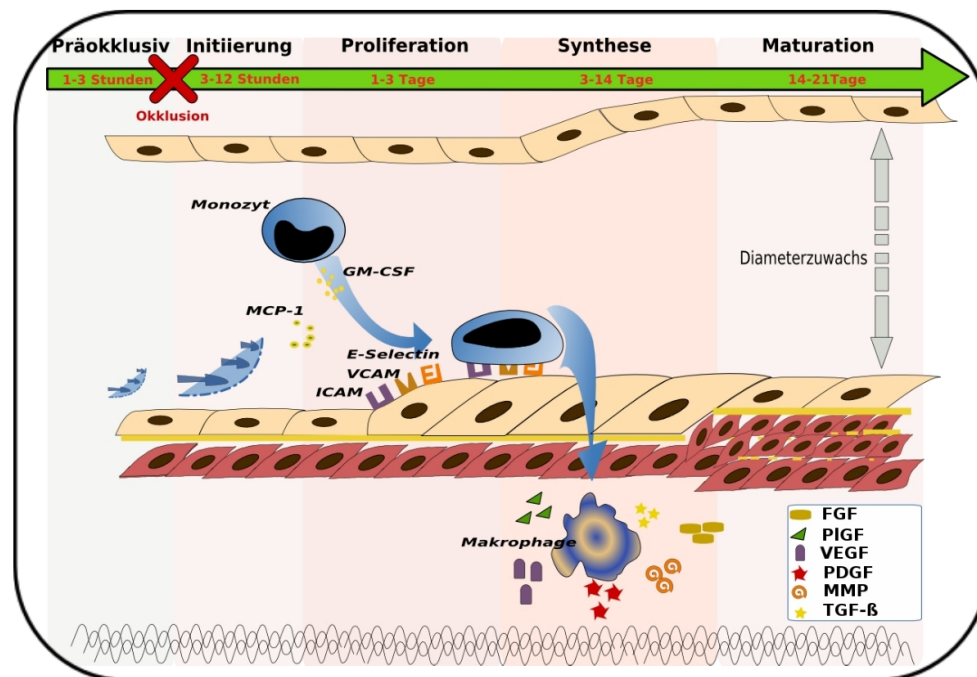
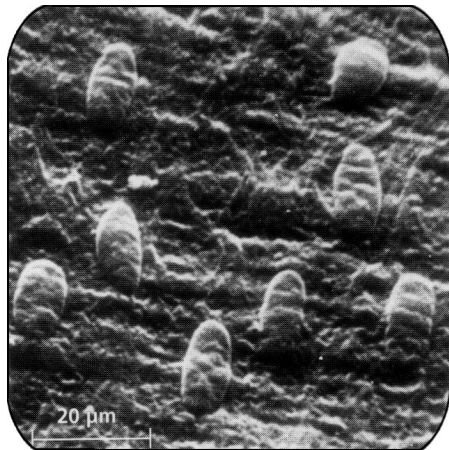


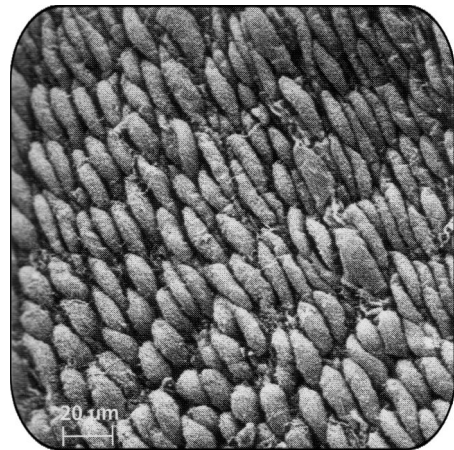
Bild 1.14: Schematischer Ablauf der Arteriogenese: Nach Occlusion eines Leitgefäßes kommt es infolge Scherspannungszunahme zur Transformation der Kollateralarteriole in eine Arterie.

Schon Minuten nach dem Verschluss eines Leitgefäßes führt die erhöhte Scherspannung durch Öffnung von volumenkontrollierenden Chloridkanälen [483] [482] zu einem elektronenmikroskopisch sichtbaren Anschwellen der Endothelzellen (s. Bilder 1.15(a) und Bild 1.15(b)) [282] und zu einer Orientierung in Richtung der einwirkenden Scherspannung [46] [34] [123]. Auch Kaliumkanäle spielen eine Rolle [294] [293] [33] [295] [85] [169] [186]. Der Haupteffekt der Aktivierung der mechanosensitiven Ionenkanälen ist der Influx von Calcium und damit die Depolarisation der Zelle [144] [482] [380] [100] [384] [14].

Des Weiteren wird die erhöhte Scherspannung über Mechanoüberträger des Endothels, die den Extrazellulärraum mit dem Cytoskeleton verbinden, an letzteres weitergeleitet [179] [70]. Es kommt zur Phosphorylierung fokaler Kontakte zwischen den Endothelzellen an ihrer abluminalen Seite [370] [74] und durch diese Aktivierung des Endothels kommt es bereits nach etwa sechs bis zwölf Stunden (h) zu einer Expression von Rezeptoren, Integrinen und Adhäsionsmolekülen, wie dem Vasculären Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1; s. Bild 1.16(a)), dem ICAM-1 (s. Bild 1.16(b)) [68] [277] [75] [270] [429], und E-Selektin an der luminalen Seite



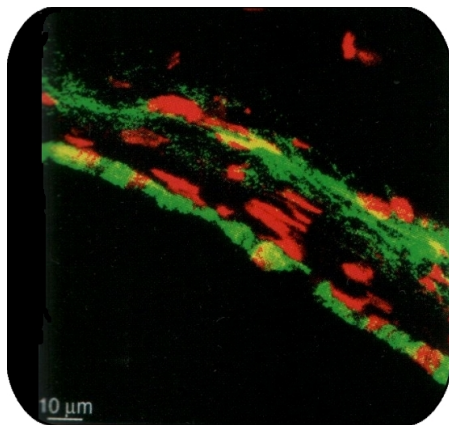
(a) Ruhende Endothelzellen



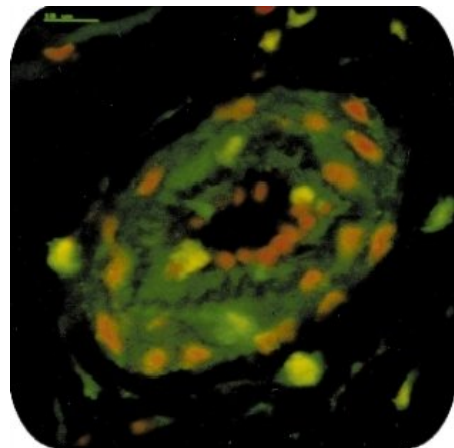
(b) Aktivierte Endothelzellen

Bild 1.15: Endothelzellen [58]; mit freundlicher Genehmigung der Springer Science and Business Media

[72] [436] [383] [423] [448] [352] [452] [40].



(a) VCAM-1 (gelb) [369]



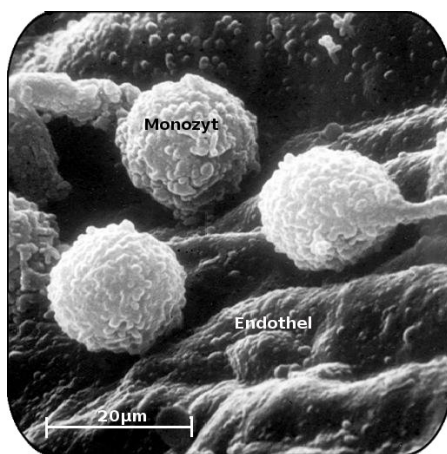
(b) ICAM-1 (gelb) [90]

Bild 1.16: Expression von Adhäsionsmolekülen nach 12 h Occlusion der Femoralarterie im Kaninchen; mit freundlicher Genehmigung der Springer Science and Business Media

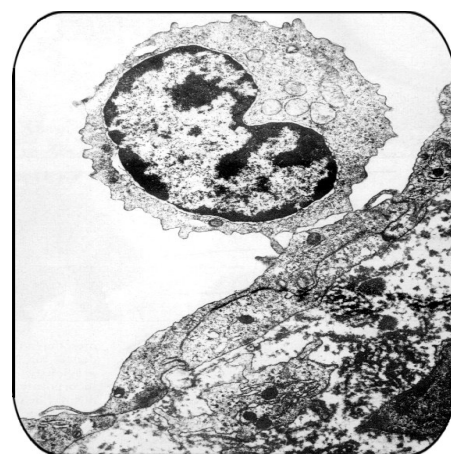
Die gesteigerte Expression solcher Gene wird teilweise durch das Scherspannungsreagible Element im Promotor verschiedener Gene vermittelt (z.B. PDGF, MCP-1) [446] [337] [32] [306] [256]. Chemokine wie MCP-1 [392] [391] [461] [262] und GM-CSF [208] [381] [52], [53] [473] [188] werden vermehrt abgegeben, dabei

ist MCP-1 das potenteste Peptid, um die Arteriogenese zu fördern, da es chemotaktisch auf Monocyten wirkt [50] [436] [183] [450] [400] [259] [335]. In dieser ersten Phase und in der folgenden ist das Endothel die Plattform für die ausgelösten Reaktionen und deren weitere Folge [420] [126].

Schon 12 h nach Verschuß haften die Monocyten am Endothel an (s. Bilder 1.17(a) und 1.17(b)) hierbei spielen die Zell-Zell-Kontakte eine besonders große Rolle [105].



(a) Raster-Tunnel-Mikroskopie Aufnahme [58]



(b) histologischer Schnitt [357]

Bild 1.17: Monocyten-Endothel-Kontakt; mit freundlicher Genehmigung der Springer Science and Business Media

Auch der Urokinasetyp-Plasminogenaktivators ist bei diesem Geschehen an der Monocyteninfiltration beteiligt [91]. An der Gefäßaußenseite wirkt die Adventitia durch Proliferation, Wachstumsfaktorproduktion und extrazelluläre Proteolyse mit [57]. Die Monocyten transmigrieren innerhalb von 72 h nach Occlusion in die Arteriolarwand und akkumulieren in der Adventitia. Dort produzieren sie Wachstumsfaktoren [20] und Proteasen, wie MMP [481] zum Umbau der alten arteriolen Struktur und zur Platzschaffung für die Ausbreitung der Kollateralen [124] [2]. Wie bei der Angiogenese wirken Cytokine wie FGF-2 [466] [26] [462], TGF- β [439] [293] [82] [209] [397], TNF- α [157] [166], PlGF [322], PDGF [172] [254] [174] [355] und VEGF [49] [413] [322] [422] [156] in diesem inflammatorischen Prozeß mit [89]

[44] [356]. In der Phase der Initiierung spielen die Endothelzellen, Monocyten und die einwirkenden Faktoren die wichtigste Rolle [183] [357] [20] [158] [324] [16]. Die Ischämie bildet keinen Stimulus für die Arteriogenese; im Gebiet der Kollateralausbildung herrscht auch kein ischämisches Milieu, dieses ist peripher von der Occlusion lokalisiert [363] [20] [88] [162] [164] [51] [182] [434]. Es verläuft sogar die Geschwindigkeit des Prozesses der Arteriogenese invers zu der Ischämieintensität ab [376].

Es schließt sich die Phase der Proliferation an. Ein bis drei Tage nach dem Verschuß kommt es zur maximalen mitotischen Aktivität der glatten Muskelzellen [233], der Endothelzellen [260] [13] [427] und der Fibroblasten [57] [56] [308]. Anschließend verringert sich die Mitoserate wieder und eine Synthesephase (3.-14. Tag) folgt. Es kommt zur Dedifferenzierung der glatten Muskelzellen vom physiologischen kontraktile in den synthetischen Phänotyp. Die glatten Muskelzellen zeigen einen verminderten Gehalt an den für den kontraktile Typ charakteristischen Proteinen, wie den intermediären Filamenten, Aktin und Myosin, Desmin, Calponin usw. [445].

Die Heraufregulation der Expression und Aktivität der MMP, die extrazelluläre Matrix verdauen, schafft Platz für die wachsenden Kollateralen und bietet den glatten Muskelzellen die Möglichkeit, in Richtung Intima zu migrieren. Zu beobachten ist weiter eine Vergrößerung des endoplasmatischen Retikulums, der Mitochondrienzahl, des Golgi-Apparates und der freien Ribosomenzahl. Es folgt eine Lückenbildung in der Lamina elastica interna [261] als Hauptbarriere für die Gefäßmuskelzellmigration. Die Verbindungen zwischen Gefäßmuskelzellen werden aufgelockert, wodurch die kleine Arteriole dilatiert und durchlässig für Fibrinogen wird. Gefäßmuskelzellen migrieren nun aus der mittleren Gefäßmuskelschicht (Media) in den subendothelialen Raum und bilden eine dicke Gefäßinnenschicht, die Neointima. Außerdem produziert dieser Synthesetyp der Gefäßmuskulatur in dem späten Abschnitt dieser Phase extrazelluläre Matrix, Kollagen, Elastin und schließlich eine neue Lamina elastica interna [375].

Die Reifung vollzieht sich 14-21 Tage nach Verschuß, dabei kommt es zur verminderten Proliferation, Migration und Proteolyse und auch zur Rückkehr der glatten Muskelzellen in kontraktile Typ [375]. Dabei zeigen die luminal gelegenen Muskelzellen unterhalb der neuen Intima eine helikale Orientierung, die abluminaler gelegenen „ursprünglichen“ glatten Muskelzelle der Kollateralen zeigen eine zirkuläre Orientierung. Schließlich ist auch wieder eine vollständige Ba-

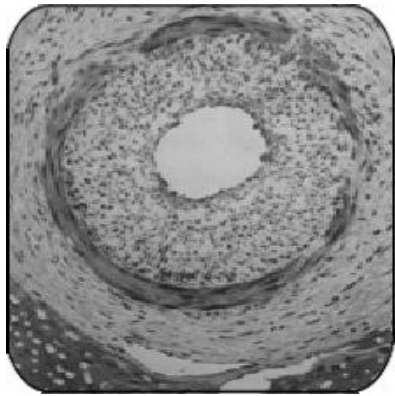
salmembran vorhanden [58]. Zudem ist die Monocytenanlockung bereits beendet und Adhäsionsmoleküle werden nicht länger exprimiert. Bemerkenswert ist, daß in dieser späten Phase der Arteriogenese angiostatische Gene vermehrt exprimiert werden, wie z.B. das Interferon- γ induzierte Protein (IP-10), Monokin induziert durch Interferon- γ (MIG) und MMP12. Dabei sind MMP12 und Angiostatin starke angiostatische Faktoren [139], [39] [228]. Es entsteht auf diese Weise zwei - drei Wochen eine Kollateralarterie, welche sich morphologisch nur geringfügig von einer normalen Arterie unterscheidet [459].

Der endgültige Umbauprozess, der sich in 6-12 Monaten nach Occlusion vollzieht, ist charakterisiert durch den signifikanten Zuwachs an Länge und der damit entstehenden korkenzieherartigen Form der Kollateralen. Es kommt weiter zur Formation einer echten Intima mit einer vollständigen Lamina elastica interna [370]. Als Kennzeichen des Ursprungs aus einer Kollateralarteriole lassen Reste der alten Lamina elastica interna nachweisen [376]. Der PlGF induziert bei der Arteriogenese die Formation großer, stabiler Gefäße [322].

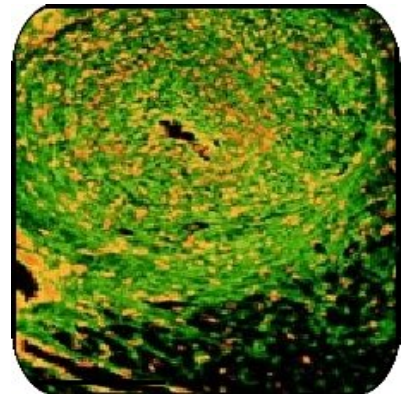
In einigen wachsenden Kollateralarterien nimmt die Dicke der neuen Innenschicht (Neointima) infolge der Gefäßmuskelproliferation derart zu, daß es infolge eines Verschlusses des Lumens zur Regression des Gefäßes kommt, was „pruning“ genannt wird (s. Bilder 1.18(a) und 1.18(b)) [222].

Dies hat mit der Competition um den Blutfluß zu tun: Initial größere Gefäße führen einen beständig zunehmenden Anteil des Gesamtflusses, was die Scherspannung in den kleineren vermindert. Dies führt zur Reduktion des Umbaus bereits mitotisch stimulierter, kleinerer Gefäße und somit zur überschießenden Intimaproliferation, Vermehrung glatter Muskelzellen, verstärkten Fibronectin-Expression und Endothelzellapoptose [390] [127] [395] [76] [191] [95].

Die Kollateralgefäße sind in der Lage, die Struktur und einen Teil der Funktion der ischämisch gefährdeten Areale zu erhalten. Wenn sich durch den arteriogenetischen Prozeß der Blutfluß und die Scherspannung wieder den präocclusiven Werten angleichen, dann hören die Kollateralen auf zu wachsen, bevor sie größen- und mengenmäßig das Leitgefäß ersetzt haben [375].



(a) verengtes Lumen



(b) nahezu vollständiger Verschuß

Bild 1.18: Pruning: In einigen wachsenden Kollateralarterien nimmt die Dicke der Neointima infolge der Gefäßmuskelproliferation derart zu, daß es infolge eines Verschlusses des Lumens zur Regression des Gefäßes kommt; [366] mit freundlicher Genehmigung der American Heart Association

1.3 Cofilin 1 und 2

Die Motilität der Zellen ist bei der Vasculo-, der Angio- und der Arteriogenese von enormer Bedeutung. Cytoskelettelemente und deren Dynamik bestimmen die Cytokinese.

Aktin ist eine Hauptkomponente der Cytoskelettfilamente und polymerisiert sehr schnell *in vitro*, wenn es gereinigt wird. Es wurden drei Regulatorproteingruppen im Embryomuskel, in dem Aktin noch weitgehend unpolymerisiert vorliegt, identifiziert, wovon eine die Cofiline (CFL) sind [3]. Der Name steht für „cofilamentous protein“ und beschreibt damit die aktinfilamentbindende Aktivität der CFL, eine Eigenschaft, die bei der Erstbeschreibung offensichtlicher war als die Einwirkung auf die Depolymerisation [268] [283].



Bild 1.19: Humanes Cofilin 1; Protein Data Bank, Code 1Q8X; [31]

CFL (s. Bild 1.19) gehören zu der Familie der Aktindepolymerisierenden Faktoren (ADF), die sich aus essentiellen, konservierten, weitverbreiteten, kleinen (15-18 kDa) aktinbindenden Proteinen zusammensetzt [268] [29]. Die ADF-Proteine bestehen aus einer einfach gefalteten Domäne. Die Aktin-bindende Struktur ist eine

lange α -Helix [251]. Genetische Studien haben die Wichtigkeit von ADF als Regulatoren der Aktindynamik bei der Bewegung und Morphogenese herausgehoben [61]. Es sind potente und entscheidende Regulatoren der Aktincytoskelettdynamik, deren Funktion es ist, die Aktinfilamentumsatz in Zellen zu beschleunigen [414] [28] [264] [60]. Obwohl ADF und CFL häufig synonym gebraucht werden, ist festzuhalten, dass unterschiedliche Gene für ADF und CFL kodieren [269] [325] [469].

CFL spielen beim Remodeling durch das Teilen der Aktinfilamente eine wichtige Rolle [27]. Sie sind ein Hauptbestandteil der intranukleären und zytoplasmatischen Aktinstäbchen. Es kommt zu Interaktionen sowohl mit dem monomeren/globulären (G-Aktin) als auch polymeren/filamentösen Aktin (F-Aktin) in den rinnenartigen Vertiefungen (s. Bild 1.20), dabei wird die typische Verwindung des Aktins verändert [263] [250]. CFL trennen F-Aktin, binden das G-Aktin in einem 1:1 Komplex, verhindern so dessen neuerliche Polymerisation an gleicher Stelle [268] [284] und die Bindung des Tropomyosin [284], welches in den rinnenartigen Vertiefungen stabilisierend auf die Aktinfilamente wirkt [97]. Das nun freie G-Aktin kann an anderer Stelle polymerisieren und auf die Zellmotilität einwirken [414] [171].

CFL wirken pH-abhängig; durchweg ist die Verstärkung des Aktinfilamentumsatzes durch menschliche CFL dreimal stärker bei einem pH von 8,0 als bei einem pH von 7,0 [61] [41] [153], [252]. Die Aktivität von CFL wird durch Dephosphorylation induziert [6], die schnell als Antwort auf vielfältige Stimuli erfolgt, die die Reorganisation des Aktinzytoskeletts bewirken, z.B. Konzentrationserhöhung des zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP), Wachstumsfaktoren, Insulin, Chemokine [353]. Die phosphorylierten und dephosphorylierten Formen der CFL koexistieren immer in einer Zelle, aber das Verhältnis zwischen beiden variiert [268]. Dabei ist das phosphorylierte CFL nicht gänzlich inaktiv, nur seine Affinität zu Aktin ist 20-fach erniedrigt [339]. Die Reaktivierung durch Dephosphorylation erfolgt durch aktinbindende Phosphatasen, die „Slingshot“ (SSH) genannt werden [101] [285], wohingegen die LIM-Kinase-1 (LIM ist ein Akronym für die drei Genprodukte Lin-11, Isi-1 und Mec-3) identifiziert wurde als die Kinase, die CFL in vivo an Position Serin-3 phosphoryliert und damit inaktiviert [466] [6] [19] [348] [207] [281] [271] [12], die aber auch von SSH negativ beeinflusst wird [369] [398]. Außerdem wird die Aktivität von CFL auch von den Membranlipiden Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylinositol-4-Phosphat (PIP) und Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat

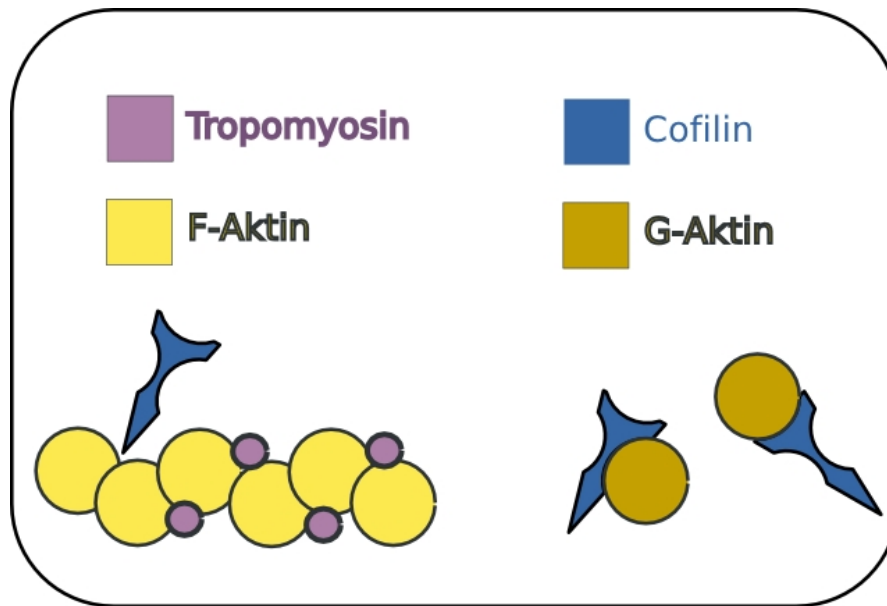


Bild 1.20: CFL-Interaktion mit Aktin: CFL trennen F-Aktin, binden das G-Aktin in einem 1:1 Komplex, verhindern so dessen neuerliche Polymerisation an gleicher Stelle und die Bindung des Tropomyosin.

(PIP2) supprimiert. Diese binden an die Residuen 104-115 der endständigen freien Aminogruppe [276] [471] [213]. Dies ist auch die aktinbindende Stelle des CFL [470]. Mit der testikulären Proteinkinase-1 (TESK-1) wurde eine weitere mit LIMK verwandte Kinase identifiziert, die CFL inhibiert [421].

Von den CFL sind zwei Isoformen - CFL1 und CFL2 - bekannt, die sich in ihrer Fähigkeit, Aktin zu depolymerisieren unterscheiden. Dabei interagiert CFL2 mit F-Aktin mit einer höheren Affinität als CFL1 [298] [280]. CFL1 ist die nicht-muskelspezifische und CFL2 die muskelspezifische Isoform.

Das gesamte Transkript der DNA, die CFL1 kodiert, ist 3,32 kb groß. Das endgültige Protein ist 166 Aminosäuren lang [3], die dazugehörige DNA hat eine Größe von 18502 Dalton (Da), die mRNA ist beim Menschen 1,4 kb, beim Hausschwein 1,2 kb groß. CFL1 ist in verschiedenen Geweben, wie z.B. Hirn, Herz, Lunge, Nieren, Hoden und Leber vorhanden [369], seine chromosomale Lokalisation ist 11q13 [288] [132] [415].

Von CFL 2, der muskelspezifischen Isoform [441] existieren zwei unterschiedlich gespleißte Transkripte, CFL2a und CFL2b mit einer Größe von 1,8 und 3 kb.

CFL2b ist vor allem in humanem Skelettmuskel und Herz exprimiert, während CFL2a in verschiedenen Gewebe anzutreffen ist. Auf Proteinsequenzebene sind die beiden Transkripte mit einer Länge von 166 Aminosäuren identisch [291]. Die dazugehörige DNA ist 18736 Da groß. Die chromosomale Lokalisation lautet 14q12 [289], [415].

CFL verändern die Dynamik des Aktinumsatzes in einer Zelle. Durch Aktivierung und Hemmung der CFL kommt es zu unterschiedlichen Formationen des Aktin und schließlich zu einer kontrollierten Bewegung der Zelle.

1.4 Fragestellung

Aus therapeutischer Sicht bietet sich mit der Arteriogenese die Möglichkeit, nicht die bereits affektierten Leitgefäße zu behandeln, sondern eine alternative Perfusion zu fördern, die dauerhaft die Aufgabe des geschädigten Gefäßes übernehmen kann. Um den Wachstumstopp der Kollateralen vor Erreichen einer ausreichenden Anzahl und Größe zu verhindern, ist eine länger andauernde Scherspannungserhöhung notwendig.

1. Ist es möglich in einem Tiermodell nach Akutligatur einer A. durch Anlage einer arterio-venösen Fistel (AVF) distal der Ligatur, die Ausbildung von Kollateralkreisläufen zu fördern?

Bekannt ist, daß die Scherspannung, die auf die Kollateralgefäße wirkt, sich nach Ligatur um ein mehrfaches steigert (s. Kapitel 1.2.8). Die AVF soll nun dazu beitragen, diese hohe Scherspannung länger aufrecht zu erhalten. Mit den Experimenten dieser Studie soll die Hypothese erörtert werden, ob es möglich ist eine bessere Restitution der Gefäßfunktion durch Vermehrung und Wachstum der Kollateralgefäße zu erreichen, wenn man eine noch stärkere und auch dauerhaftere Erhöhung der Scherspannung herbeiführt, als es bereits der Fall ist bei Occlusion des Leitgefäßes.

2. Welche Veränderungen vollziehen sich durch die Ligatur auf molekularer Ebene und gibt es Unterschiede zwischen der Seite, die nur ligiert ist und der Seite, auf der zusätzlich die AVF angelegt wurde?

Zusätzlich sollen durch molekulargentische Analysen Proteine identifiziert werden, die durch diesen mechanischen Reiz der Scherspannungserhöhung vermehrt oder verringert exprimiert werden. Bei der Arteriogenese spielen die Endothelzellen, Monocyten und glatten Muskelzellen und ihre Beweglichkeit eine wichtige Rolle (s. Kapitel 1.2.8). Am Beispiel des CFL 1 und 2 soll untersucht werden, wie sich die Expression der für die Kontraktilität zuständigen Gene unter Scherspannungserhöhung ändert.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Tiermodell

Zur Erörterung dieser Fragen wurde ein Tierversuchsmodell verwendet, um die Auswirkungen der Scherspannungserhöhung durch Anlage einer AVF Fistel distal einer arteriellen Gefäßocclusion auf die Kollateralisierung und Genexpression von CFL zu evaluieren.

Die Studie wurde genehmigt (Genehmigungs Nr. F93/16) vom zuständigen Regierungspräsidium Darmstadt des Landes Hessen gemäß §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes vom 25. Mai 1998, welches den Richtlinien „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ (US-NIH Publication No. 85-23, revised 1985) des Nationalen Institutes für Gesundheit der Vereinigten Staaten entspricht.

Hausschweinen wurde die A. fem. beidseits ligiert. Eine Woche später wurde auf der linken Seite eine Fistel zwischen V. und A. distal der Ligatur angelegt wurde. Durch die Ligatur kommt es wie oben beschrieben zu einem starken Druckgradienten und zu einer vermehrten Durchblutung der präexistierenden Kollateralarteriolen, die die optimale Verbindung darstellen, um den verschlossenen Teil des Leitgefäßes zu überbrücken. Dies vollzieht sich an beiden Seiten gleich. Durch die Anlage einer AVF distal der Ligatur ergibt sich nun aber die Möglichkeit, daß das Blut, das von den Kollateralgefäßen zum distalen Gefäßstumpf transportiert wird, in das venöse System abfließen kann, da in dem ein deutlich geringerer Widerstand herrscht als im arteriellen. Es kann schneller abfließen und mit wachsender Strömungsgeschwindigkeit nimmt auch die Scherspannung zu (s. Kapitel 1.2.5.4). Nach zwei Wochen wurde der Versuch beendet und die Hinterläufe der Tiere wur-

den angiographisch und molekulargenetisch untersucht (s. Bild 2.1).

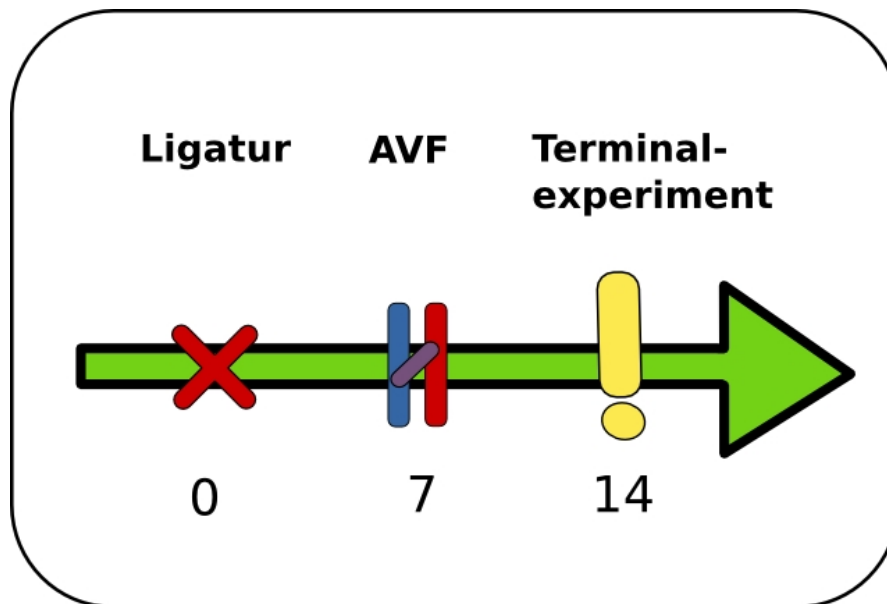


Bild 2.1: Experimentablauf

2.1.1 Tierhaltung

Gesunde, männliche Schweine¹ ($n = 27$) mit einem Durchschnittsgewicht von 47,1 +/- 6,8 kg und einem Alter von zwei Monaten +/- drei Wochen wurden für die Studie herangezogen. Die Tiere hatten vor Versuchsbeginn eine Woche Zeit, sich in der neuen Umgebung zu akklimatisieren.

Sie wurden bei Raumklima, Tageslicht und Innenbeleuchtung bis 20 Uhr in Gruppen (zwei-vier Tiere) in täglich gereinigten und mit Stroh ausgelegten Stallräumen, entsprechend den Europäischen Richtlinien 86/408 und den Richtlinien der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SoLAS) gehalten. Es bestand freie Bewegungsmöglichkeit im Stall und auch außerhalb an der frischen Luft; außerdem freier Zugang zum Wasser. Die Fütterung erfolgte einmal am Tag mit ca. 500 g Haltungsfuttermittel² (s. Tabelle 2.1).

¹Deutsche Landrasse, Ferkelaufzuchtbetrieb Willi Schlosser, Stordorferstrasse 13, Schwalm-tal Vadenrod

²ssniff MPig-H Alleinfutter für Minischweine - Haltung, Pellets 4 mm, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest

<i>Inhaltsstoffe</i>	<i>%</i>	<i>Aminosäuren</i>	<i>%</i>	<i>Vitamine</i>	<i>(je kg)</i>	<i>Spurenelemente</i>	<i>(mg/kg)</i>
Rohprotein	16,0	Lysin	0,8	A	15000 IE	Mangan	90,0
Rohfett	3,0	Methionin	0,3	D3	1000 IE	Kupfer	12,0
Rohfaser	6,0	Cystin	0,3	E	100 mg	Zink	75,0
Rohasche	6,5	Glycin	0,7	B1	10 mg	Jod	2,0
Calcium	1,0	Leucin	1,1	B2	20 mg	Eisen	220,0
Phosphor	0,7	Isoleucin	0,6	B6	12 mg	Selen	0,2
Natrium	0,2	Arginin	0,9	B12	80 μ g	Cobalt	2,0
Magnesium	0,2	Phenylalanin	0,8	Biotin	400 μ g		
Kalium	1,0	Tryptophan	0,3	Pantothensäure	30 mg		
		Histidin	0,4	Cholin	1600 mg		
		Tyrosin	0,5	Folsäure	4 mg		
		Asparaginsäure	1,4	Nikotinsäure	60 mg		
		Glutaminsäure	3,1	K3	5 mg		
		Valin	0,7	Inosit	50 mg		
		Threonin	0,6				

Tabelle 2.1: Zusammensetzung des Haltungsfuttermittels

2.1.2 Anästhesie

2.1.2.1 Prämedikation

Am Tag des Versuches blieben die Versuchstiere bis auf Wassergabe nüchtern. Die Prämedikation erfolgte mit einer intramuskulären Injektion Ketaminhydrochlorid 20-30 mg/kg Körpergewicht (KG)³, Midazolamhydrochlorid 1-1,5 mg/kg KG⁴ und Xylazinhydrochlorid 1-2 mg/kg KG⁵. Es wurden bilateral in die Ohren Venenverweilkanülen⁶ eingebracht und dann wurde das Tier intubiert⁷.

Zur zusätzlichen Analgesie wurde perioperativ 1-1,5 ml Buprenorphinhydrochlorid⁸ intravenös (i.v.) verabreicht. Subkutan wurde ein Depot mit 5 ml antibiotische Prophylaxe als Kombinationspräparat aus Benzylpenicillin, Streptomycin und Benzoat⁹ injiziert.

³Ketavet, Ketaminhydrochlorid 100 mg/ml, Pharmacia und Upjohn GmbH, Erlangen

⁴Dormicum, Midazolamhydrochlorid 5 mg/ml, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen

⁵Rompun, Xylazinhydrochlorid 20 mg/ml, Bayer Vital GmbH, Leverkusen

⁶BD Venflon, Becton Dickinson Infusion Therapy AB, Helsingborg, Erlangen

⁷Endotrachealtubus, Hyperball „Low-Pressure“, Größe 7, Vygon GmbH & Co.KG, Aachen

⁸Temgesic, Buprenorphinhydrochlorid 0,324 mg/ml, Reckitt & Colman Products Ltd., Hull, Großbritannien

⁹Tardomyocel, Benzylpenicillin-Benzathin 82,6 mg/ml, Benzylpenicillin-Procaïn 24,8 mg/ml, Dihydrostreptomycinsulfat 156,3 mg/ml, Methyl-4-Hydroxybenzoat 1,5 mg/ml, Propyl-4-

2.1.2.2 Narkose

Die Intubationsnarkose wurde aufrecht erhalten durch die kontinuierliche i.v.-Infusion von Ketaminhydrochlorid, Midazolamhydrochlorid nach Bedarf¹⁰. Die Beatmung¹¹ erfolgte unter druckkontrollierten Bedingungen, wobei der Zielwert für CO₂ der Bereich zwischen 30-34 mmHg war. Das Verhältnis von Inspiration zu Expiration betrug 1:2. Bei Bedarf wurde den Tieren Flüssigkeit¹² mittels einer Infusionspumpe¹³ substituiert.

2.1.2.3 Monitoring

Beim perioperativen Monitoring wurde eine CO₂-Messung¹⁴ durchgeführt und ein Brustwand-Elektrokardiogramm¹⁵ nach Einthoven abgeleitet. Zusätzlich wurde zur Anästhesietiefenüberwachung ein Elektroenzephalogramm¹⁶ abgeleitet.

2.1.2.4 Lagerung

Das Tier wurde in Rückenlage an den Vorder- und Hinterläufen fixiert. Ein Abdecken der Schweine mit vorgewärmten Tüchern sowie mit einer Wärmedecke¹⁷ verhinderte ein Auskühlen der Tiere.

2.1.3 Chirurgische Eingriffe

Alle chirurgischen Eingriffe wurden unter sterilen Bedingungen gemäß GV-SOLAS-Richtlinien durchgeführt: Das Operationsgebiet wurde großflächig enthaart und mehrmals wischdesinfiziert¹⁸. Nach den Eingriffen folgte der schichtweise Wundverschluß mittels Subkutan-¹⁹ und Hautnaht²⁰ in typischer chirurgischer Nahttech-

Hydroxybenzoat, Bayer Vital, Leverkusen

¹⁰Perfusor Compact, B.Braun AG, Melsungen

¹¹Evita 1, Dräger Medical AG & Co. KgaA, Lübeck

¹²Normofundin OP, B. Braun AG; Melsungen

¹³Infusomat fm, B. Braun AG, Melsungen

¹⁴Capnomac Ultima, Datex-Ohmeda GmbH, Duisburg

¹⁵Tram-RAC 4A, Solar 8000, Marquette Electronics, Inc., Milwaukee, Wisconsin, U.S.A.

¹⁶Aspect BIS XP Performance, Aspect Medical Systems International B.V., Leiden, Niederlande

¹⁷Warm Touch 5700, Mallinckrodt Medical, Hohenheim-Sieg

¹⁸Betaisodona-Tinktur, Mundipharma GmbH, Limburg

¹⁹Vicryl 3/0, Ethicon GmbH, Norderstedt

²⁰Monocryl 3/0, Ethicon GmbH, Norderstedt

nik und die Wunde wurde dann noch mit einem Sprühverband²¹ benetzt. Benutzt wurde Operationsbesteck der Firma Ethicon²².

2.1.3.1 Ligatur

Zum Zeitpunkt $t = 0$ Tage wurde beidseits die A. fem. ligiert²³. Nach Desinfektion und steriler Abdeckung des auf dem Rücken gelagerten Tieres erfolgte eine Querinzision der Haut mit einer Länge von etwa 8 cm in beiden Leisten (s. Bild 2.2).

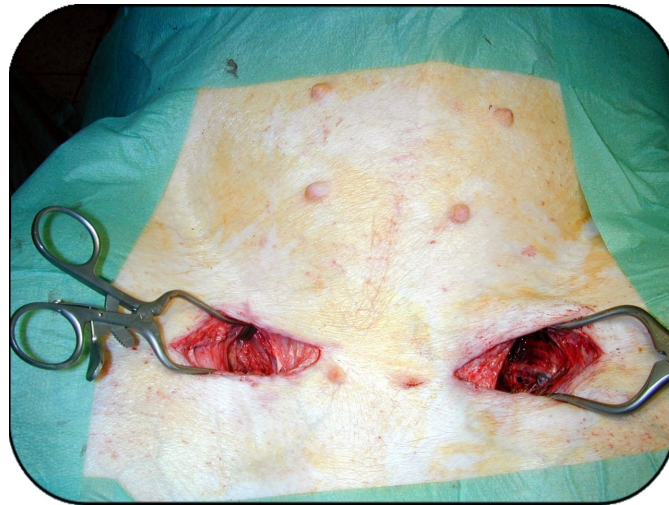


Bild 2.2: Operativer Zugang - Ligatur; eigene Abbildung

Dargestellt wurde durch stumpfe Freipräparation durch das Subcutangewebe das Leistenband. Unterhalb von diesem lässt sich die Aufgabelung der A. iliaca externa in die A. profunda (prof.) fem. und die A. fem. pulsierend palpieren. Nach Freipräparation der Aufzweigung wurde die A.fem. in ihrem weiteren Verlauf dargestellt bis zum Abgang der A. circumflexa fem. lateralis, welcher sich am kranialen Rand des Musculus vastus medialis befindet. Die A. fem. liegt im weiteren Verlauf zwischen diesem Muskel und dem Musculus pectineus. Etwa 1cm proximal des Abgang der A. circumflexa fem. lateralis wurde die A. fem. ligiert (s. Bilder 2.3, 2.4 und 2.5. Nach subtiler Blutstillung²⁴ erfolgte die Subcutan- und Hautnaht

²¹FLINT MED Sprühverband, Togonal Werk AG, München

²²Ethicon GmbH, Norderstedt

²³Mersilene 3/0, Ethicon GmbH, Norderstedt

²⁴Force 2 Electrosurgical Generator, Valleylab, Tyco Healthcare Deutschland GmbH Neustadt/Donau

und die Wundversiegelung mit einem Sprühverband.

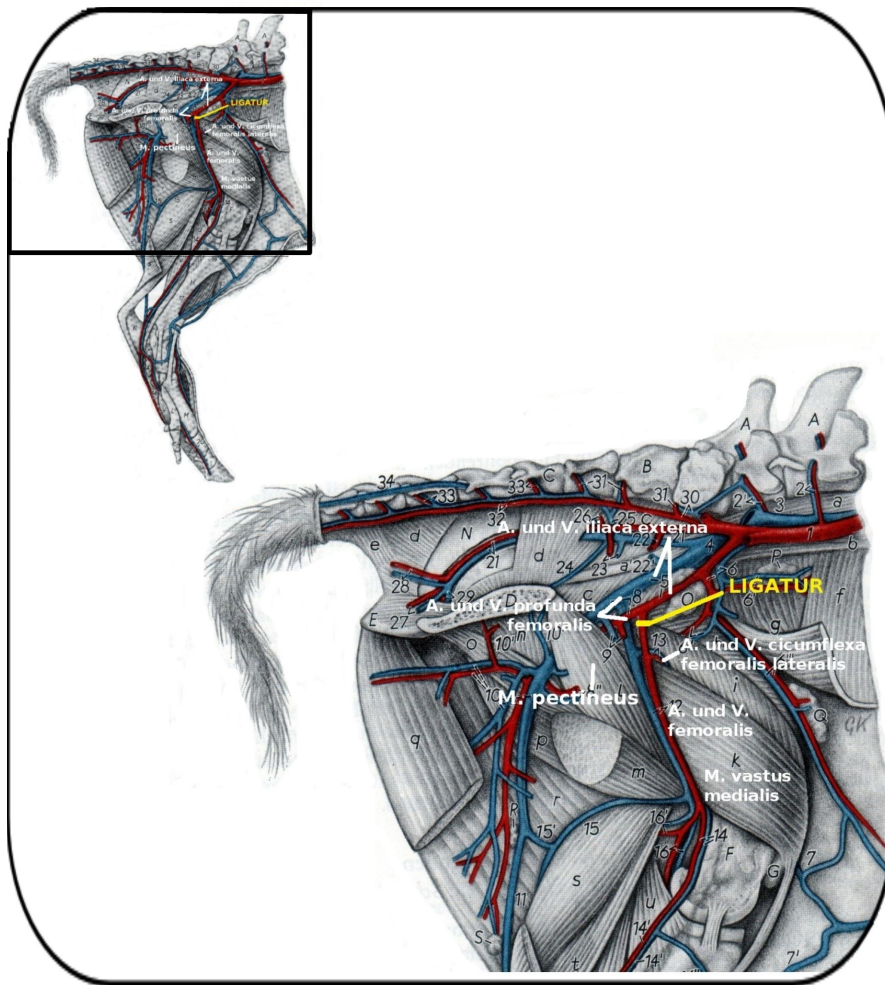


Bild 2.3: Anatomie des Hinterlaufes des Schweines und Lokalisation der Ligatur; [378]; Bickhardt, K., 1961, Diss. vet. Hannover; mit freundlicher Genehmigung der Bibliothek der Tierärztlichen Hochschule Hannover

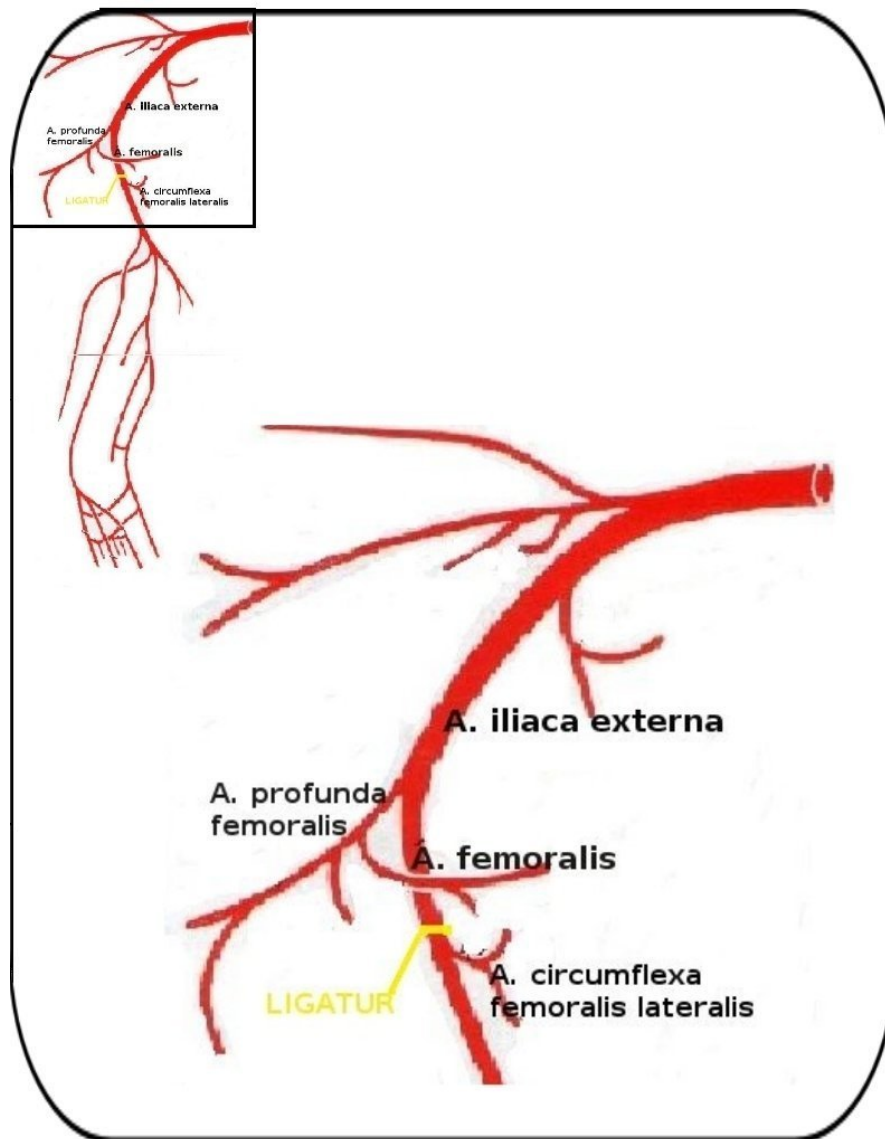


Bild 2.4: Arterien des Hinterlaufes des Schweines und Lokalisation der Ligatur; [378];
mit freundlicher Genehmigung der Thieme Verlagsgruppe

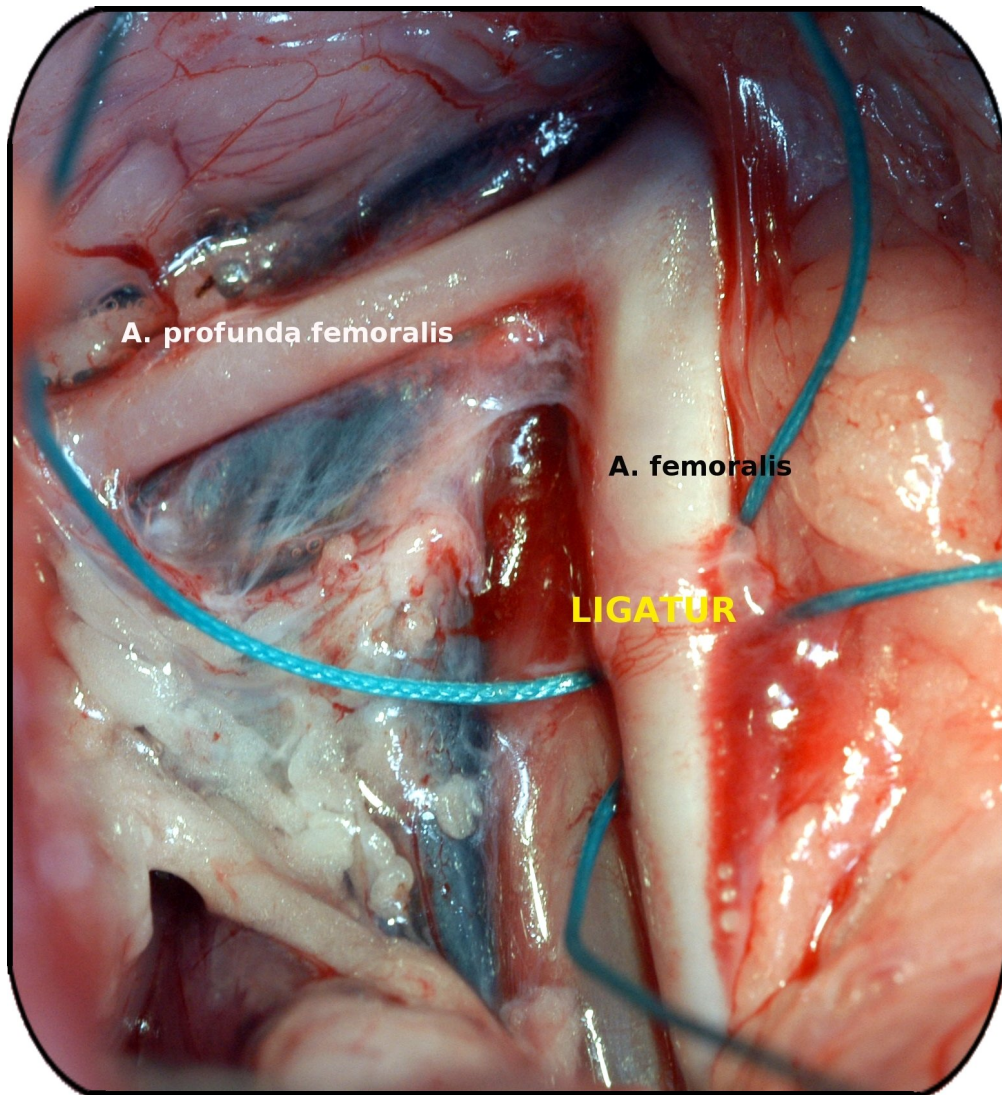


Bild 2.5: Intraoperativer Situs - Ligatur; eigene Abbildung

2.1.3.2 Arterio-venöse Fistel

Eine Woche später ($t = 7$ Tage) wurden beide Aa. fem. reexponiert. Dazu wurden nicht die Hautschnitte verwendet, über die ligiert wurde, sondern etwa 5 cm distal davon wurde parallel die Haut quer auf einer Länge von ca. 8 cm inzidiert. Nach stumpfer Freipräparation des subcutanen Gewebes stellen sich von laterocaudal kommend die oberflächlichen Äste der A. und V. circumflexa ilium prof. dar. Sie liegen laterocaudal auf dem Musculus rectus fem. und teils auf dem Musculus vastus medialis. Nach Auffindem von letzterem wurde dieser nach medial verfolgt. Wie oben erwähnt liegt die A. fem. in ihrem Verlauf zwischen dem Musculus vastus medialis und dem Musculus pectineus. Etwa 1,5 cm distal der Ligatur wurde auf der linken Seite eine AVF in Seit-zu-Seit-Technik in fortlaufender Naht²⁵ zwischen A. und V. fem. angelegt (s. Bilder 2.6, 2.7 und 2.8).

Die Fistellänge betrug 11 mm, was der Schnittlänge der Branchen der verwendeten Pott'schen Schere entsprach (s. Bild 2.9). Rechts wurde eine Scheinoperation durchgeführt. Hier erfolgte nach Darstellung des Situs ohne weitere Intervention. Wie auf der Gegenseite erfolgte nach Blutstillung der schichtweise Wundverschluß und die Anlage eines Sprühverbandes.

Perioperativ erhielten die Tiere zur Antikoagulation 5000 internationale Einheiten (i.E.) Heparin-Natrium²⁶.

²⁵Prolene-6/0, Ethicon GmbH, Norderstedt

²⁶Liquemin N 25000; Heparin-Natrium 5000 i.E./ml; Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen

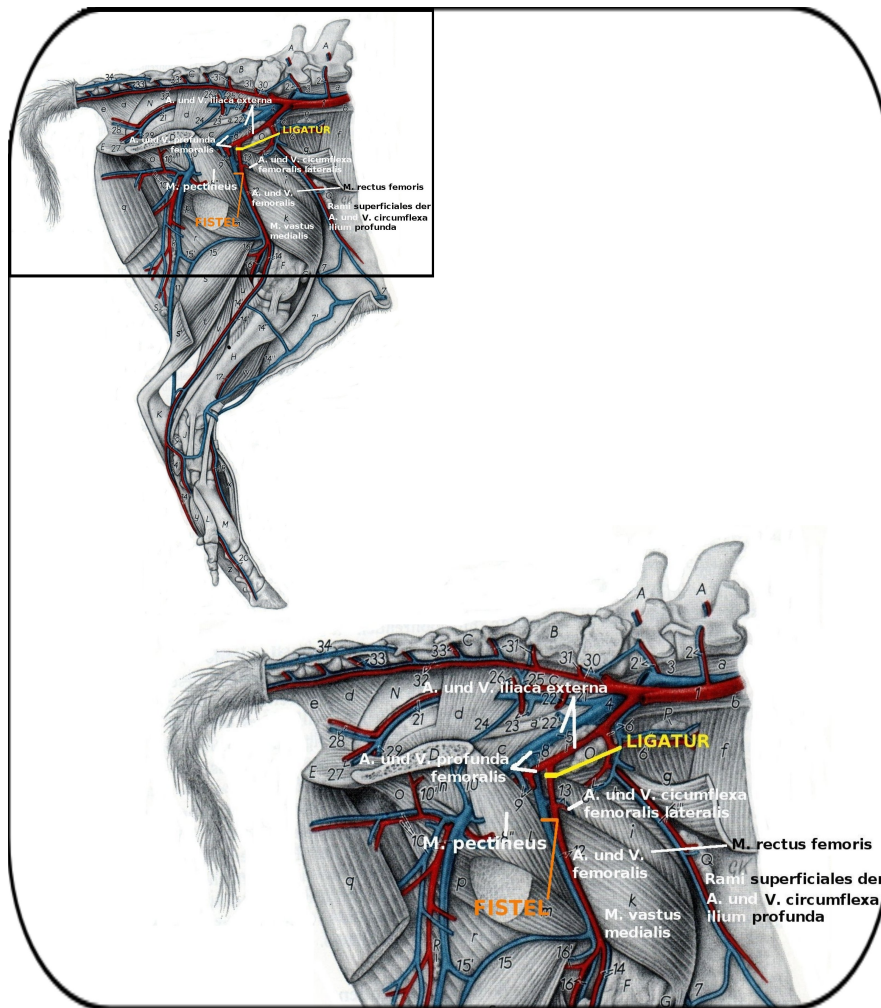


Bild 2.6: Anatomie des Hinterlaufes des Schweines und Lokalisation der Ligatur und der arteriovenösen Fistel; [378]; Bickhardt, K., 1961, Diss. vet. Hannover; mit freundlicher Genehmigung der Bibliothek der Tierärztlichen Hochschule Hannover

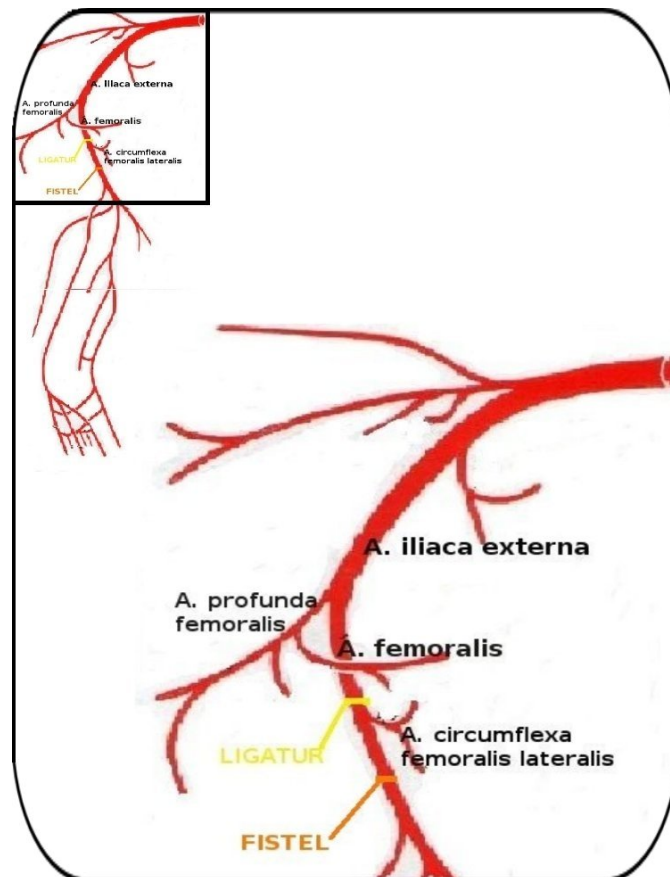


Bild 2.7: Arterien des Hinterlaufes des Schweines und Lokalisation der Ligatur und der arteriovenösen Fistel; [378]; mit freundlicher Genehmigung der Thieme Verlagsgruppe

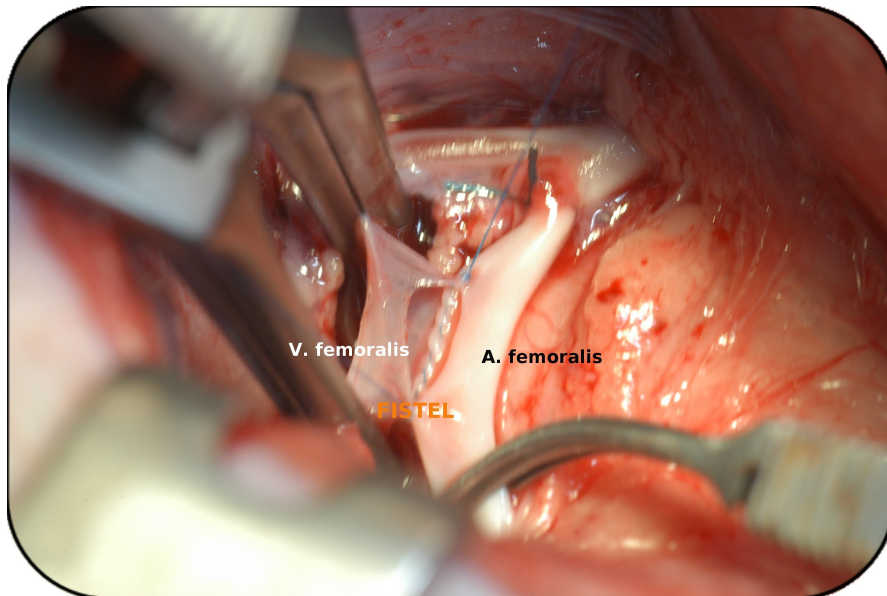


Bild 2.8: Intraoperativer Situs - Arteriovenöse Fistel; eigene Abbildung

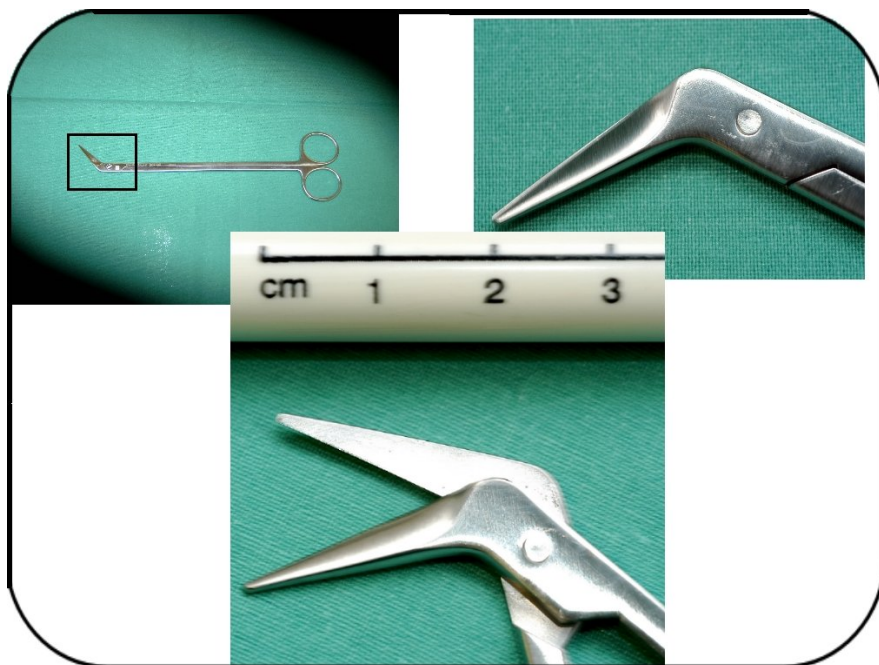


Bild 2.9: Pott'sche Schere; eigene Abbildung

2.1.3.3 Postoperativ

Nach den operativen Eingriffen wurden die Tiere, nachdem die Spontanatmung wieder eingesetzt hatte, extubiert. Die venösen Zugänge wurden entfernt und die Tiere zurück in den Stall gebracht. Bis zum Versuchsende wurde die Wundheilung täglich kontrolliert. Die postoperative Schmerztherapie erfolgte mit 1 ml Buprenorphinhydrochlorid²⁷ subcutan für drei Tage postoperativ.

2.1.4 Terminalversuch

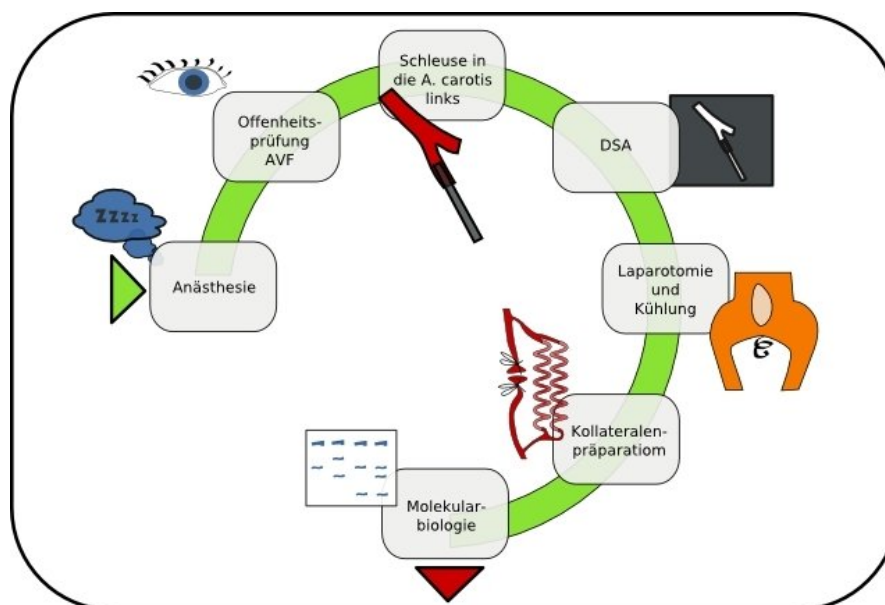


Bild 2.10: Terminalexperimentablauf

Nach einem Zeitraum von 7 ± 1 Tagen nach Anlage der AVF wurde das Experiment beendet (s. Bild 2.10). Dazu wurden die Tiere nach o.g. Verfahren erneut anästhesiert. Zunächst wurde die Offenheit der AVF palpatorisch, sowie mittels einer Ultraschalluntersuchung²⁸ kontrolliert, wobei sich das typische Geräusch des Nommensausens zeigt, das durch die pulsatile Strömung in der V. zustande kommt. Schließlich wurde auch mit der Angiographie die Durchgängigkeit der AVF festgestellt.

²⁷Temgesic, Buprenorphinhydrochlorid 0,324 mg/ml, Reckitt & Colman Products Ltd., Hull, Großbritannien

²⁸Handultraschallgerät, HNE Diagnostics/Healthcare for Datascope Corp., Manalapan, New Jersey, USA

Nach einer i.v.-Gabe von 5000 i.E. Heparin-Natrium, wurde nach einer etwa 8 cm messende paratrachealen Längsinzision der Haut die linke A. carotis communis (s. Bilder 2.11 und 2.12) stumpf freipräpariert und mittels des Verfahrens nach Seldinger [382] in diese eine arterielle Schleuse²⁹ eingebracht. Nach Blutstillung wurde die Haut adaptierend verschlossen.

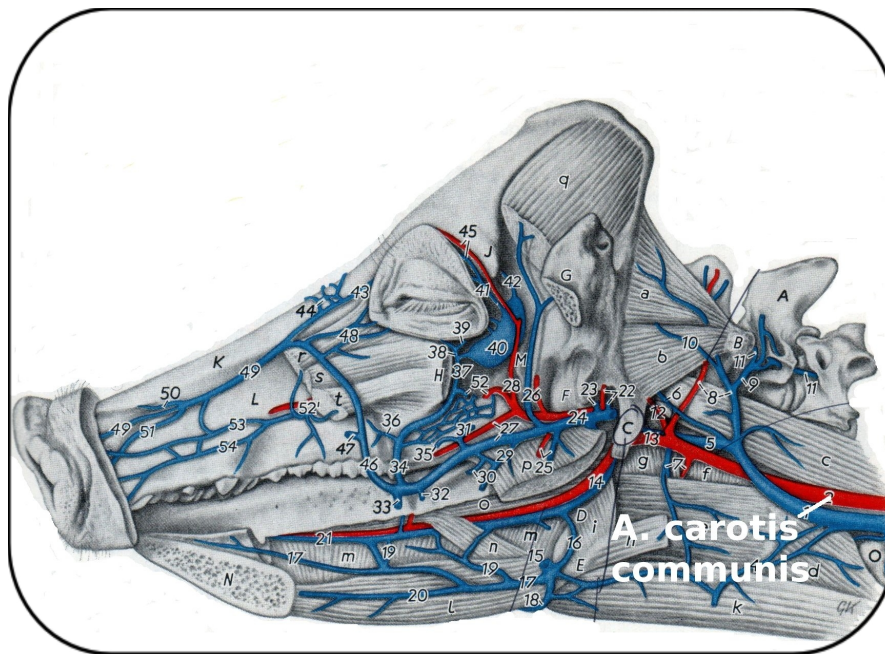


Bild 2.11: Arterien und Venen am Kopf des Schweines; [378]; Becker H., 1960, Diss. vet Hannover; mit freundlicher Genehmigung der Bibliothek der Tierärztlichen Hochschule Hannover

Im Anschluß erfolgte die Durchführung der digitalen Subtraktionsangiographie (DSA; s. Kapitel 2.2), daraufhin die Laparotomie mittels Längsinzision in der Paramedianlinie des Abdomens. Nach Eventration des Darmes erfolgte die Kanülierung der abdominalen Aorta. Das Versuchstier wurde zu diesem Zeitpunkt durch eine letale Dosis (40 ml) von Embutramid, Mebenzoniumjodid und Tetracainhydrochlorid³⁰ getötet. Über den aortalen Zugang wurde bei 4°C gekühlte „University of Wisconsin“-Lösung³¹ infundiert, die über einen Entlastungsschnitt in der V. ca-

²⁹Medikit Insert Super Sheath, 8 F, Boston Scientific Corporation, Natick, Massachusetts, USA

³⁰T61; Embutramid 0,2 g/ml, Mebenzoniumjodid 0,05 g/ml und Tetracainhydrochlorid 0,005 g/ml, Intervet International GmbH, Wiesbaden

³¹ViaSpan, DuPont Pharma GmbH, Bad Homburg

2.2 Digitale Subtraktionsangiographie

Um das Ausmaß des Kollateralarterienwachstums zu beurteilen wurde eine Angiographie durchgeführt.

Nach Kontrastmittelinjektion³² über einen Pigtailkatheter³³, der über den arteriellen Zugang in der linken A. carotis communis bis in die abdominale Aorta eingebracht wurde, wurden in der angiographischen Einheit digitale Subtraktionsangiogramme im posterior-anterioren Strahlengang vom Versuchstierunterleib angefertigt³⁴, auf Speichermedien³⁵ abgespeichert und nach Markierung der Leitgefäße die einzelnen Kollateralen ausgezählt.

2.2.1 Angiogrammauswertung - Markierung der Leitgefäße

Um die auf den Angiogrammen (n=5, s. Bild 2.13) sichtbaren Kollateralarterien zu quantifizieren, wurden diese mittels der Adobe Photoshop Software 5.0³⁶ betrachtet und bearbeitet³⁷. Dazu wurden auf jedem Bild zunächst farblich die Aorta, die Aa. iliacae communes, die Aa. iliacae internae und externae, die Aa. femorales, Aa. femorales profundae und größere Gefäße, die auf beiden Seiten symmetrisch vorhanden sind, markiert (s. Bilde 2.14).

³²Visipaque 320, Iodixanol 625 mg/ml, Amersham Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig

³³5 F, Cordis Endovascular, Warren, New Jersey

³⁴AXIOM Multistar, Siemens Polytron T.O.P. DICOM Products, Siemens, Erlangen

³⁵Kodak Compact disc Gold Ultima, 650 MB, Eastman Kodak Company, New York, USA

³⁶Adobe Systems Incorporated, San Jose, Kalifornien, USA

³⁷Intel kompatibler x86 PC mit 850MHz AMD Duron als Prozessor, Advanced Micro Devices, Dresden



Bild 2.13: Angiogramm; eigene Abbildung

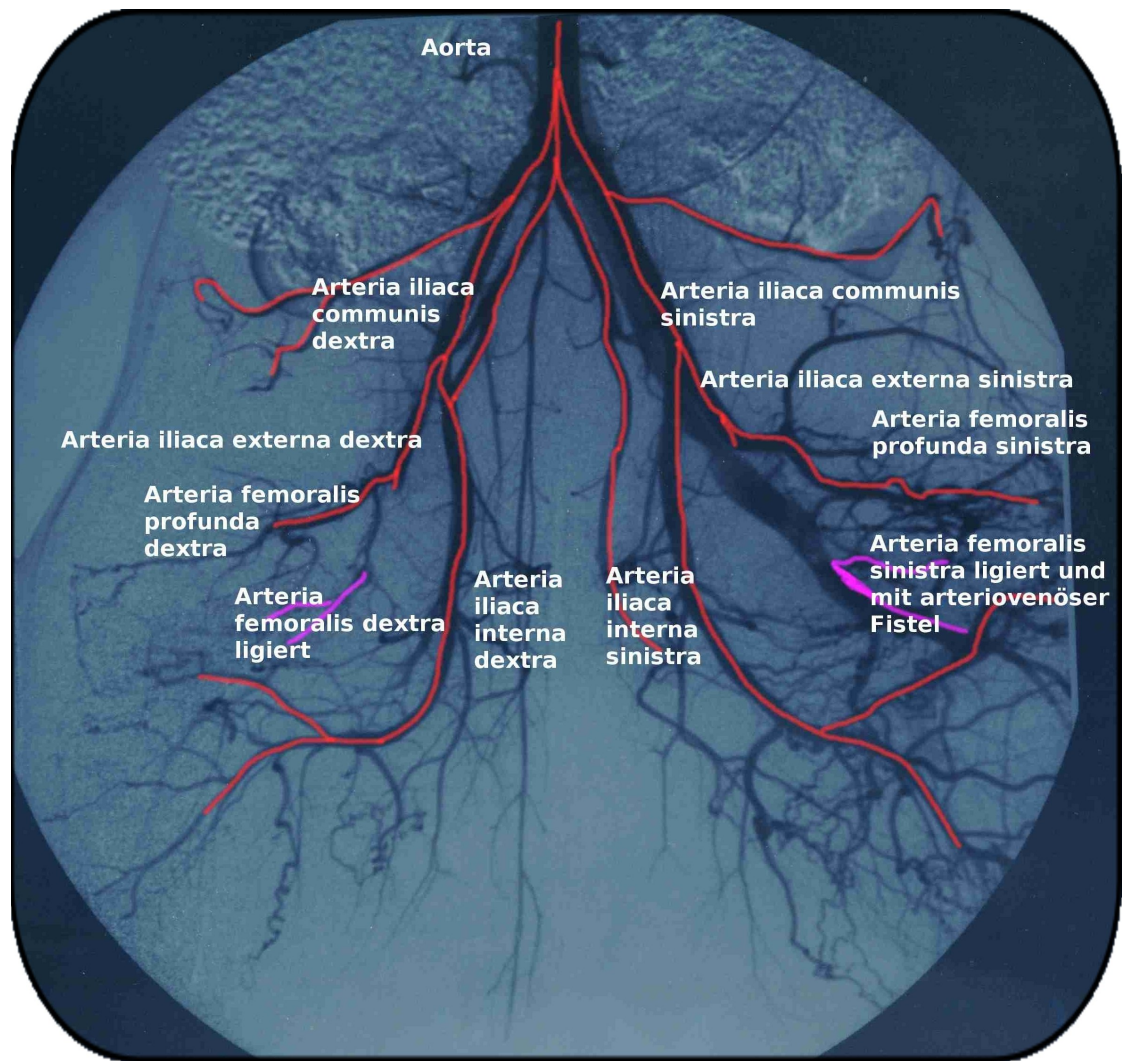


Bild 2.14: Angiogramm mit markierten Leitgefäßen; eigene Abbildung

2.2.2 Angiogrammauswertung - Kollateralenausählung

Nach Markierung der Leitgefäße wurden die angiographisch sichtbaren die Gefäßocclusion überbrückenden Kollateralarterien für jedes Bein einzeln farblich markiert und ausgezählt.

Dabei wurden entsprechend der „Longland-Classification“ vom 4.2.1953 (s. Kapitel 1.2.8) nur solche Gefäße als Kollateralgefäße gezählt und als absolute Zahlen angegeben, die von proximal der Ligatur mit einer erkennbaren Stammzone, einer folgenden Mittelzone und dann distal der Ligatur mit einer Wiedereintrittszone verliefen. Gefäße ohne proximale oder distale Verbindung zum arteriellen Gefäßsystem wurden nicht mitgezählt (s. Bild 2.15). Die Daten wurden als Median, Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Für die Analysen wurde computergestütztes Softwareprogramm³⁸ benutzt.

Um die Variationen des einzelnen Auszählenden und der Auszählenden untereinander zu berücksichtigen, wurden die Zählungen von vier Personen unabhängig voneinander durchgeführt. Zwei Auszählenden war das Tiermodell und die Fragestellung nicht bekannt.

³⁸Windows Excel, Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleissheim

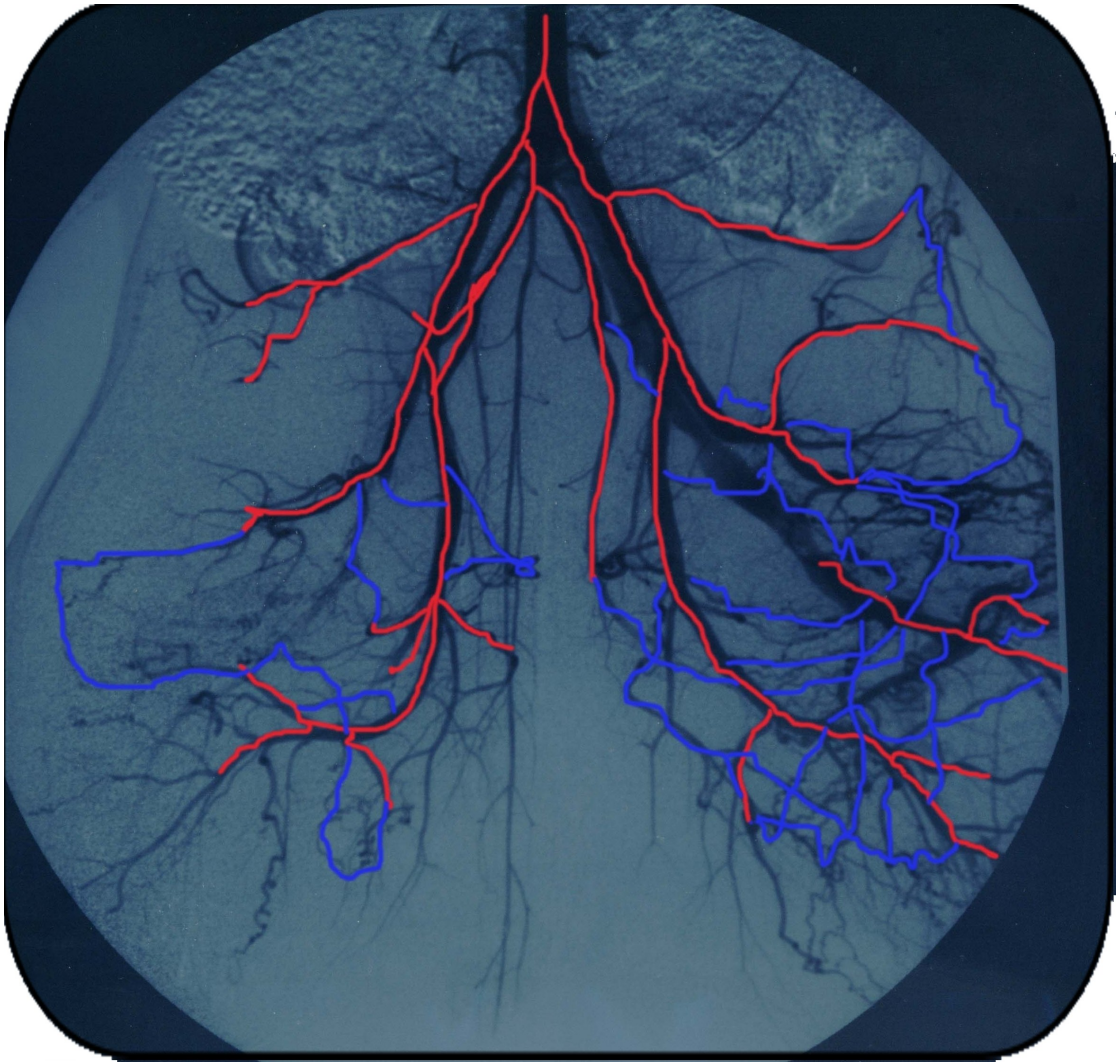


Bild 2.15: Angiogramm mit markierten Kollateralen; eigene Abbildung

2.3 Präparation und Konservierung der Kollateralen

Um die Kollateralen und die enthaltenen Nukleinsäuren möglichst lange zu konservieren, wurde über den aortalen Zugang mittels Infusionspumpe³⁹ eine Perfusion mit 4 l gekühlter „University of Wisconsin“-Lösung durchgeführt. Der Unterleib des Versuchstiers wurde zusätzlich mit zerkleinertem Eis gekühlt. Es erfolgte die Freipräparation der Kollateralen (s. Bild 2.16) mit nachfolgender Aufbewahrung derselben in flüssigem Stickstoff. Schließlich wurde das Gewebe der Kollateralgefäße molekulargenetischen Untersuchungen zugeführt.

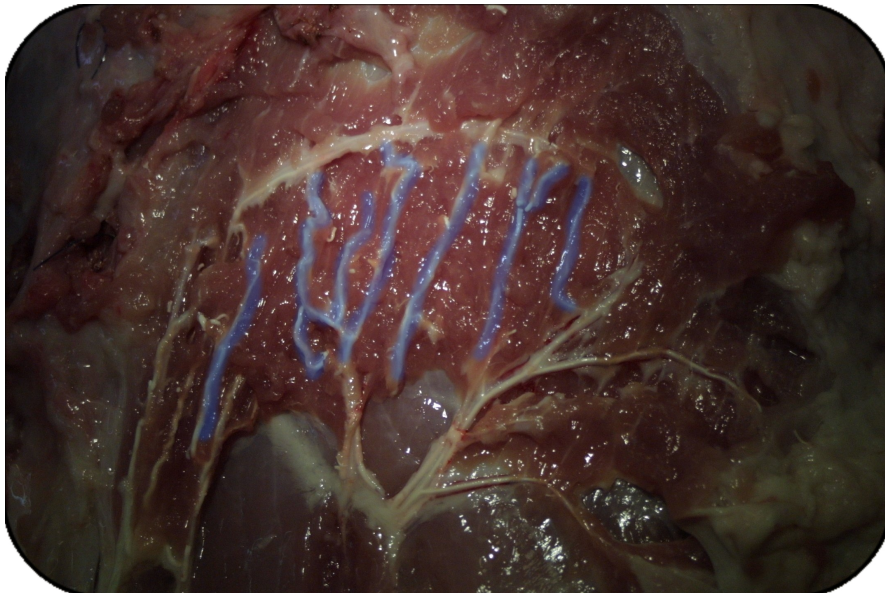


Bild 2.16: Kollateralen in situ, blau hervorgehoben; eigene Abbildung

³⁹Infusomat fm, B. Braun AG, Melsungen

2.4 Molekulargenetik

2.4.1 Proteine

2.4.1.1 2-Dimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Definition

Die Untersuchung der Proteinexpression wurde mittels der 2-Dimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE) durchgeführt, um Expressionsveränderungen in den Kollateralen der Ligaturseite und der Seite mit der AVF zu analysieren. Diese von O'Farrell [290] zuerst beschriebene Methode ist in der Lage mehr als 1000 Polypeptide aus zellulären Extrakten aufzulösen.

Es wird dabei aber nicht der isoelektrische Punkt fokussiert (IEF). Diese Bestimmung beruht darauf, daß die Nettoladung eines Proteins sich mit dem pH der umgebenden Lösung ändert. Bei dem für jedes Protein charakteristischen isoelektrischen Punkt hat das Protein keine Nettoladung und wandert deshalb im elektrischen Feld nicht. Bei der oben erstgenannten Methode wird aber eine Elektrophorese mit nicht äquilibriertem pH-Gradient (NEPHGE) verwendet. Der Hauptunterschied zwischen NEPHGE und IEF besteht darin, daß die Proben im ersten Fall auf der sauren Seite des Gels aufgetragen werden und daß das Volt x Zeit-Produkt kleiner ist als bei der IEF. Unter solchen Bedingungen erreicht der pH-Gradient nicht das volle Gleichgewicht. Als Resultat werden die Proteine nicht vollkommen an ihrem isoelektrischen Punkt fokussiert wie bei der IEF. Trotzdem werden die meisten Proteine auch in NEPHGE - Gelen entsprechend ihrer Ladungsunterschiede getrennt und es ist zur Auftrennung basischer Proteine besser geeignet als die Auftrennung nach IEF.

In der ersten Dimension wurde eine elektrische Fokussierung bei nicht-equilibriertem pH-Gradient in einem dünnen Röhrchen, in dem durch die Mischung bestimmter Puffer in einem Polyacrylamidgel ein pH-Gradient hergestellt worden ist, durchgeführt. Nach dieser Fokussierung wird das Gelröhrchen auf SDS-Plattenpolyacrylamidgel transferiert, so daß die nach ihrer Ladung aufgetrennten Proteine jetzt in der zweiten Dimension, nämlich zusätzlich noch nach ihrem Molekulargewicht in einer zur elektrischen Fokussierung senkrechten Ebene aufgetrennt werden. Das hochvernetztes Polyacrylamidgel wird direkt vor dem Lauf durch Polymerisierung von Monomeren hergestellt. Dabei kann die Porengröße durch den Vernetzungsgrad variiert werden. Die Proteine wandern in einem elektrischen Feld in Richtung po-

sitiver Elektrode (Anode), wobei größere Proteine langsamer vorankommen. Dies entspricht dem zweidimensionalen Muster, bei dem jedes Protein hinsichtlich Molekulargewicht und elektrischem Punkt genau charakterisiert werden kann.

Durchführung

Die 2D-PAGE wurde durchgeführt mit Gewebeproben der Kollateralgefäße beider Seiten. 50 mg des gefrorenen Gewebes wurden in flüssigem Stickstoff pulverisiert und in 6 Vol IEF Probenpuffer (s. Kapitel 7) solubilisiert. Nach 30min langsamen Erwärmens auf Raumtemperatur wurden die Proben 30 min bei Raumtemperatur und 100000 g^{40} zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 70°C eingefroren. Die Proteine wurden mit einer Groß-Gel 2D-Technik (Gel-Größe $30 \times 23 \times 0,1\text{ cm}$) basierend auf den Methoden von Klose and Kobalz aufgetrennt [205]. Zur Bestimmung des Grades der Kontamination mit Skelettmuskeln in den Kollateralproben wurden dafür typische Muskelproteine wie Aktin, Tropomyosin und Desmin verwendet. In der ersten Dimension wurde die NEPHGE in Gelröhrchen (s. Kapitel 7) durchgeführt. Dazu wurden $100\text{ }\mu\text{g}$ oder $400\text{-}500\text{ }\mu\text{g}$ (s. Kapitel 2.4.1.1) und (s. Kapitel 2.4.1.1) der Proteinproben auf die Anodenseite des Gelröhrchens aufgetragen und bei 8870 Vh fokussiert. Nach der Fokussierung wurden die Gele in Äquilibriumspuffer (s. Kapitel 7) für 10 min inkubiert und dann auf SDS-Gelplatten transferiert. Die Elektrophorese wurde über 6 h bei 150 mA durchgeführt, bis die Front das Gelende erreicht hatte.

Silberfärbung der 2D-PAGE

Zur Silberfärbung der analytischen 2D-Gele entsprechend der Methode von Jungblut und Seifert [190] wurden $100\text{ }\mu\text{g}$ Proteinprobe verwendet.

Blaufärbung 2D-PAGE und Massenspektrometrie

Zur Proteinidentifikation mittels Massenspektrometrie wurden $400\text{-}500\text{ }\mu\text{g}$ der Proteinproben auf mikropräparative 2D-Gele geladen und mit Coomassie Brilliant Blau G250⁴¹ gefärbt. Dies ist eine Färbung, die im Gegensatz zur Silberfärbung kompatibel mit der Massenspektrometrie ist. Analysiert wurden die präparierten Gele mit dem Proteomeweaver⁴². Dabei wurden nur die Spots analysiert, bei de-

⁴⁰ $\text{g} = 9,81\frac{\text{m}}{\text{s}^2}$ Erdschwerebeschleunigung

⁴¹Serva, Heidelberg

⁴²2D-Image-analysis-Software, Research Systems, Boulder, Colorado, USA

nen der Expressionsunterschied über einem bestimmten Grenzwert lag, also unter strenger Evaluierung durchgeführt. Aus dem präparativen Gel wurden die Spots ausgeschnitten, die die größten Unterschiede im Vergleich zwischen der gefistelten und der Kontrollseite aufwiesen.

Die in den Spots vorhandenen Proteine wurden mittels Massenspektrometrie identifiziert. Bei der Massenspektrometrie werden die Proteine zunächst im Gel durch Trypsin aufgeschlossen und die Peptidmischung durch die Aufnahme eines Protons ionisiert und in die Gasphase überführt. Die fliegenden Proteine werden beschleunigt und bewegen sich im Hochvakuum über eine Messstrecke von ca. 1-3 m. Über die Flugzeit wird die Größe der Proteine berechnet⁴³ und das Ergebnis mit Datenbanken abgeglichen, um die Proteine, die im Spot enthalten waren zu identifizieren [122].

2.4.1.2 Western Blots

Durchführung

Als Bestätigung der Ergebnisse der 2D-PAGE und der Quantifizierung der jeweiligen Proteinmengen wurden zusätzlich Western Blots angefertigt. Die Konzentration des Polyacrylamids im Gel bestimmt neben der Ladung und dem Gewichtes der Proteine deren Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld, da die Porengröße des Gels von der Polyacrylamidkonzentration abhängt. Die Proteine wurden unter Verwendung des RIPA-Puffers (s. Kapitel 7) aus dem Gewebe der Kollateralen beider Seiten isoliert. Der Proteingehalt (25 μg) wurde mit einem Fertigsatz⁴⁴ bestimmt. Die denaturierten Proben werden unter Verwendung der Morpholinoethansulfonsäure (MES)-SDS-Laufpuffers (s. Kapitel 7) negativ geladen und bilden einen Protein-SDS-Komplex, der sich in Richtung Anode bewegt. Dieser Puffer ist v.a. für Proteine mit einer Größe zwischen 25-60 kDa geeignet. Die negative Ladung ist proportional zur Proteingröße. Bei 200 V erfolgt die elektrophoretische Auftrennung auf 4-12% Bis/Tris-Gelen⁴⁵. Danach wurde die Gelplatte auf Nitrozellulosefilter⁴⁶ per Naßblot transferiert. Gefärbt wurde der Western Blot

⁴³Time-of-flight Reflex MALDI-MS, Bruker, Bremen

⁴⁴Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

⁴⁵4-12% Bis/Tris-Polyacrylamid-Fertiggele, Invitrogen, Groningen, Niederlande

⁴⁶Invitrogen, Groningen, Niederlande

mit Ponceau S-Lösung⁴⁷. Dazu wird der Nitrozellulosefilter 5 min in Ponceau S-Lösung geschwenkt und dann unter fließendem Wasser bis zur Erkennbarkeit der Proteinbanden entfärbt.

Inkubation mit Antikörpern

Zur Inkubation mit Antikörpern wurde der Nitrozellulosefilter 1 h bei Raumtemperatur mit TBS-T/2.5% BSA fettsäurefrei⁴⁸ (s. Kapitel 7) geblockt und anschließend über Nacht mit Maus-ADF-Antikörper⁴⁹ inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei 4°C über zwei Nächte. Danach wurde mehrmals mit TBS-T gewaschen. Im Anschluß wurde als zweiter Antikörper der Anti-Maus-Antikörper gekoppelt mit Peroxidase 1:10000⁴⁹ eine Stunde bei Raumtemperatur eingesetzt.

Detektion des Western Blots

Zur Detektion der Proteine wurde ein Fertigsatz⁴⁹ verwendet. Da der zweite Antikörper mit Peroxidase gekoppelt ist, erfolgt bei Anwendung des Substrates Lumi-nol dessen katalytische Oxidation unter alkalischen Bedingungen. Dadurch entsteht eine Chemilumineszenz bei einer Wellenlänge von ca. 428 nm. Im Anschluß wurden diese Lumineszenzsignale mit blaulicht-sensitiven Röntgenfilmen⁵⁰ detektiert⁵¹. Die Daten wurden als Median, Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Für die Analysen wurde computergestütztes Softwareprogramm⁵² benutzt.

2.4.2 cDNA-Sondenherstellung

Entsprechend den Proteinen, die in der 2D-PAGE identifiziert wurden, wurden cDNA-Sonden in Escheria coli-Bakterienstämmen (XL-1blue⁵³ oder JM109⁵⁴) hergestellt, die zur Northern Blot Hybridisierung verwendet wurden (s. Kapitel 2.4.3.4). Dazu wurden die bereits vorgefertigten rekombinanten Plasmide von humaner

⁴⁷0.5% Ponceau S-Lösung in 40% Methanol (MetOH), 15% Eisessig Merck, Darmstadt/Roth, Karlsruhe

⁴⁸BSA, fettsäurefrei Sigma, Deisenhofen

⁴⁹ECL-Kit, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

⁵⁰Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

⁵¹PhosphoImager und ImageQuant software, Storm 860, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

⁵²Windows Excel, Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleissheim

⁵³Promega, Heidelberg

⁵⁴Stratagene, Heidelberg

CFL1-cDNA⁵⁵ und CFL2-cDNA vom Hasen [43] als extrachromosomales zirkuläres DNA-Molekül in das Bakterium eingebracht (Transformation, s. Kapitel 2.4.2.2). Das Plasmid vermehrt sich unabhängig von der Bakterien-DNA.

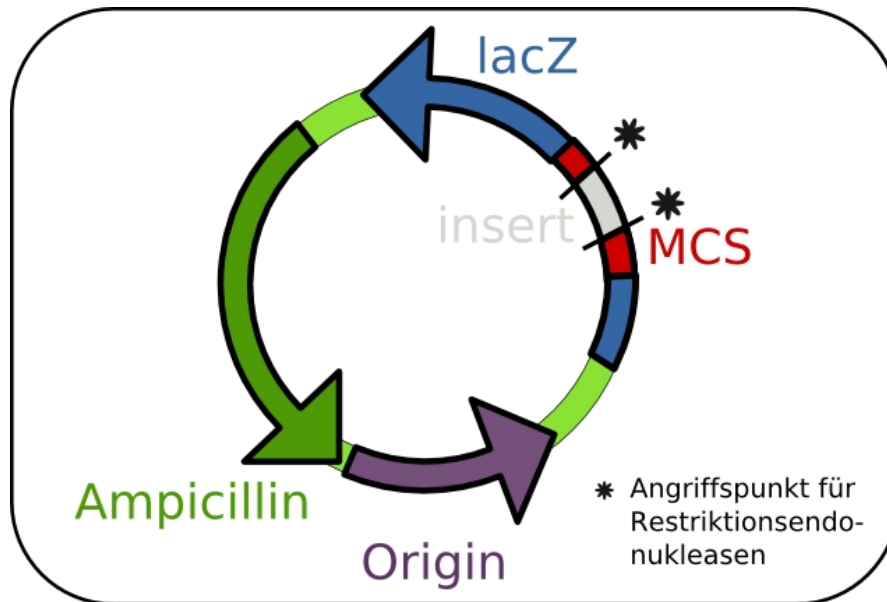


Bild 2.17: Schema des Klonierungsvektors: Plasmid mit benötigten DNA-Sonden (insert), außerdem Gen für die Antibiotikaresistenz (Ampicillin), Gen für β -Galaktosidase (lacZ), Replikationsursprung (origin) und künstlich eingefügter multipler Klonierungssequenz (MCS) mit Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen (*)

Das Plasmid trägt außer der benötigten DNA-Sonden noch ein Gen für eine bestimmte Antibiotikaresistenz, das Gen zum Abbau der β -Galaktosidase, einen Replikationsursprung für ihre Vermehrung und eine künstlich eingefügte Region, die multiple Klonierungssequenz (MCS, s. Bild 2.17). In dieser Region sind einzelne Schnittstellen für den späteren Einsatz der Restriktionsendonukleasen enthalten. Alle Nachkommen der ursprünglichen Wirtszelle sind identisch, also Klone. Außerdem wurde ein „antisense“-Oligonukleotid für 18S-rRNA synthetisiert, um Ladungsunterschiede bei der Hybridisierung auszugleichen⁵⁶.

⁵⁵RZPD IMAGp998F246269

⁵⁶MWG, Ebersberg, Germany; 5'-CGGAACTACGACGGTATC-3'; Acc. No. X01117, nucleotide 1080-1061

2.4.2.1 Induktion der Bakterienkompetenz mittels CaCl_2 -Methode

Damit Bakterien Fremd-DNA aufnehmen (Transformation, s. Kapitel 2.4.2.2), müssen sie vorbereitet werden. Dies geschieht, indem man sie mit zweiwertigen Ionen, hier Calcium Ca^{2+} in Calciumchlorid (CaCl_2) behandelt. Diese befähigen die Bakterien aufgrund eines bisher nicht verstandenen Mechanismus in der exponentiellen Wachstumsphase zur Plasmidaufnahme.

Zunächst wurde der entsprechende Escheria coli-Bakterienstamm (XL-1blue oder JM109) auf einer Luria-Bertani (LB)-Platte⁵⁷ ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Überführung einer Kolonie in LB-Medium (s. Kapitel 7) wurde dieses über Nacht bei 37°C und 250 rpm in einem Wasserbadschüttler⁵⁸ kultiviert. Nach 1:50-Verdünnung der Kultur ließ man diese bis zu einer optischen Dichte von $\text{OD}_{550} = 0.4 - 0.5$, d.h. bis zur logarithmischen Wachstumsphase wachsen. Anschließend wurde die Kultur in einem Eiswasserbad für 10 min unter leichtem Schütteln abgekühlt und es erfolgte eine Zentrifugation bei 2500 g und 4°C. Nach Resuspension des Bakterienpellets in 250 ml eiskalter 0,1 M CaCl_2 -Lösung⁵⁹ und 30-minütiger Inkubation auf Eis, erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt. Erneut wird das Pellet in 20 ml eiskalter 0,1 M CaCl_2 -Lösung gelöst und unter Zugabe von Glycerin (in einer Endkonzentration von 15%) aufgenommen. Zur Steigerung der Kompetenz zur Fremd-DNA-Aufnahme wurde diese Lösung noch über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Lagerung der Aliquots erfolgte bis zur Verwendung zu je 1ml in Eppendorfröhrchen⁶⁰ in flüssigem Stickstoff schockgefroren bei -80°C.

2.4.2.2 Transformation von Bakterien

Der Begriff Transformation beschreibt den Vorgang der direkten Plasmidaufnahme und dessen stabile Weitergabe.

Die durch die angewandte CaCl_2 -Methode nun transformationskompetenten Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut. 100 ng der Plasmid-DNA wurden zugegeben. Es erfolgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis, anschließend ein Hitzeschock bei 42°C für 45-60 s. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium, erfolgte eine erneute einstündige Inkubation bei 37°C. In dieser Zeit können die Bakterien, die Plasmide aufgenommen haben, die Antibiotikaresistenz aufbauen und phänotypisch

⁵⁷LB-Medium 7, 1,5% Agar, Roth, Karlsruhe

⁵⁸Bakterienschüttler Certomat HK, B.Braun, Biotech, Melsungen

⁵⁹Merck, Frankfurt am Main

⁶⁰Eppendorf, Hamburg

ausprägen. Im Anschluß wurden die Bakterien pelletiert, in 100 μl LB-Medium re-suspendiert, auf einer LB-Platte mit entsprechendem Antibiotikum⁶¹ zur Selektion ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert.

2.4.2.3 Blau-Weiß-Selektion

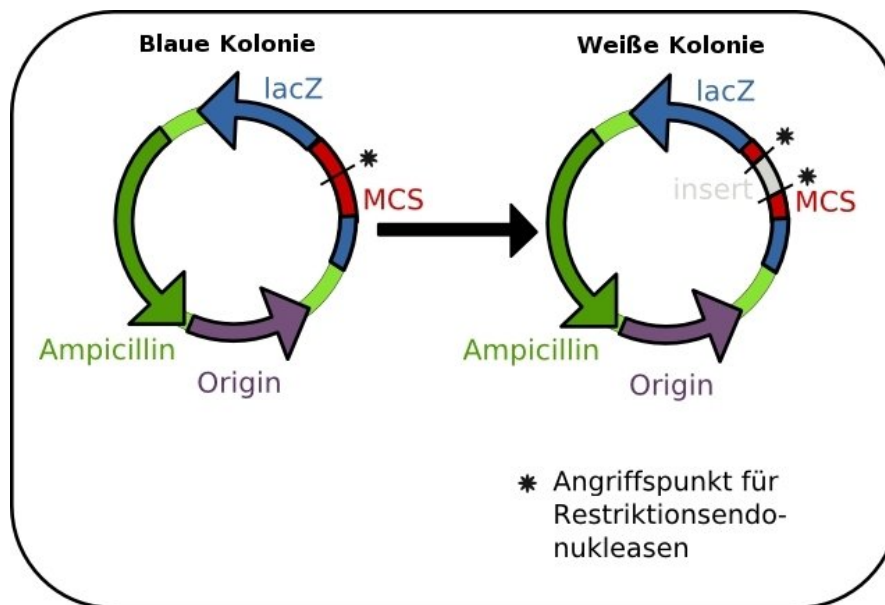


Bild 2.18: Schema Blau-Weiß-Selektion: Die weißen Kolonien sind die, die im Plasmid das Insert tragen und mit denen weiter verfahren wird; das Insert mit der DNA-Sonde kommt beim Einbau in den Vektor in den Bereich des „lacZ-Gen“ zu liegen, das für die β -Galaktosidase kodiert, die zum Abbau des Indikator-Galaktosids benötigt wird. Bei dessen Abbau, kommt es zur Freisetzung eines blauen Farbstoffes. Ist das Insert eingebaut, kann das Wirtsbakterium keine β -Galaktosidase synthetisieren, das Galaktosid nicht verwerten und die Kolonie hat eine weiße Farbe. Ist kein Insert im Plasmid vorhanden, kann das Bakterium das Galaktosid abbauen und verfärbt sich blau.

Die Bakterien, die Plasmide und die damit verbundene Antibiotikaresistenz aufgenommen haben, können auf entsprechenden antibiotikahaltigen LB-Platten selektiv gegenüber anderen Bakterien wachsen.

Außerdem wurde mit den Plasmiden auch das „lacZ-Gen“, das für die β -Galaktosidase

⁶¹ Ampicillin, Roth, Karlsruhe; in LB-Medium 7 auf 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verdünnt Kanamycin Sigma, Deisenhofen; in LB-Medium auf 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verdünnt

kodiert aufgenommen. Daß die aufgenommenen Plasmide als Vektor auch die benötigten DNA-Sonden tragen, prägen die Bakterien also phänotypisch aus: das Insert mit der DNA-Sonde kommt beim Einbau in den Vektor in den Bereich des „lacZ-Gens“ zu liegen. Dieses kodiert für die β -Galaktosidase, die zum Abbau eines Indikator-Galaktosids benötigt wird. Wird dieses spezielle Galaktosid abgebaut, kommt es zur Freisetzung eines blauen Farbstoffes. Ist das Insert eingebaut, kann das Wirtsbakterium keine β -Galaktosidase synthetisieren, das Galaktosid nicht verwerten und die Kolonie hat eine weiße Farbe. Ist kein Insert im Plasmid vorhanden, kann das Bakterium das Galaktosid abbauen und verfärbt sich blau (s. Bild 2.18). Es zeigt damit, daß es transformiert wurde, allerdings aber auch, dass das Plasmid keine DNA-Sonde als Insert trägt.

Bei der durchgeführten Blau-Weiß-Selektion wurde der Transformationsansatz (s. Kapitel 2.4.2.2) auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikazusatz ausgestrichen. Zuvor erfolgte eine Präparation der LB-Platten, indem mit Hilfe eines Drygalskispatels 40 μ l 5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid (X-Gal)⁶² und 4 μ l Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG)⁶³ gleichmäßig verteilt wurden. Die so präparierten Platten wurden bei 37°C mindestens 1 h vor dem Ausplattieren des Transformationsansatzes inkubiert.

Nach dem Ausplattieren des Transformationsansatzes wurde die Platte über Nacht bei 37°C bebrütet. Es kommt zur Ausbildung phänotypisch unterschiedlicher Kolonien, nämlich blauer und weißer.

Die weißen Bakterien sind die, die im Plasmid das Insert tragen und mit denen weiter verfahren wird.

2.4.2.4 Vorrat und Lagerung der Bakterienklone

Um einen Vorrat an Bakterienklonen zu haben und ihn lagern zu können, wurde ein Glyzerinstock der weißen Bakterienklone angelegt. Dazu wurden 850 μ l einer über-Nacht-Kultur mit 150 μ l Glyzerin (86%) gemischt und bei -80°C gelagert. Zur Vermehrung aufbewahrter Kulturen wurden die Bakterienklone mit einer Impföse ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Anschließend konnte mit der Plasmidpräparation (s. Kapitel 2.4.2.6) fortgefahren werden.

⁶²X-Gal AppliChem, Darmstadt in 20 mg/ml-Stammlösung in Dimethylformamid, Roth, Karlsruhe

⁶³IPTG, 200 mg/ml in H₂O dest., Sigma, Deisenhofen

2.4.2.5 Vermehrung der Kolonien

Zum Ansetzen der über-Nacht-Minikulturen wurden Kolonien von der über Nacht inkubierten LB-Platte gepickt und in 3 ml Medium gegeben.

Die Midikultur wurde aus 10 μ l der Minikultur gemischt mit 50 - 100 ml Medium hergestellt und über Nacht bei 37°C und 250 rpm im Wasserbadschüttler bebrütet.

2.4.2.6 Plasmidpräparation

Prüfung der Vektoren auf Inserteinbau

Um zu prüfen, ob die verschiedenen als Plasmid-DNA in die Bakterien aufgenommenen Vektoren jeweils „ihr“ Insert, also die benötigten DNA-Sonden, enthalten, wurde der Schnelltest nach Rinji Akada [9] verwendet. Dies ist nötig, da ein Bakterium, das mehrere Plasmide aufnehmen soll, mit der Aufnahme eines Plasmids inklusive Insert ja schon die Antibiotikaresistenz und die Störung im Galaktosidabbau ausprägt, so dass durch die Blau-Weiß-Selektion (s. Kapitel 2.4.2.3) nur der Einbau mindestens eines Plasmids mit Insert nachgewiesen werden kann, aber keine Aussage über die Aufnahme anderer Plasmide getroffen werden kann.

Nach 10-sekündigem Mischen von 100 μ l der über-Nacht-Minikulturen, 50 μ l Phenol/Chloroform und 10 μ l DNA-Proben-Puffer erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 1500 g. So erreicht man die Trennung der oberen wäßrigen Phase, welche die Nukleinsäuren enthält und der unteren organischen Phase. Mittels der mit 40 μ l der wässrigen Phase durchgeführten Elektrophorese erreicht man die Auftrennung von Plasmiden, welche einen Größenunterschied von mehr als 200 Basenpaaren haben und so ist erkennbar, ob und welche verschiedenen Plasmide, deren Größe ja bekannt ist, vorhanden sind. Außerdem kommt es zur Auftrennung bakterieller genomischer DNA und RNA.

Plasmidaufreinigung

Nachdem der Nachweis für das Vorhandensein der benötigten Plasmide resp. Inserts (s. Kapitel 2.4.2.6) in der Minikultur erbracht ist, wird aus dieser die Midikultur hergestellt (s. Kapitel 2.4.2.5).

Anschließend wurde die DNA nach der Anleitung eines Fertigsatzes⁶⁴ präpariert; die Präparation erfolgte gemäß dem Protokoll von Wang [451].

⁶⁴Wizard©Plus Mini/Midiprep Purification System, Promega, Mannheim

Nach der Präparation sind nun die reinen Vektoren aus der Kultur extrahiert. Die genomische DNA und RNA sind herausgetrennt.

Restriktionsverdau

Um aus den Vektoren die gewünschte DNA-Sonde zu isolieren, werden entsprechende Restriktionsendonukleasen⁶⁵ eingesetzt. Diese erkennen und spalten DNA innerhalb spezifischer Erkennungssequenzen, nämlich der MCS (s. Kapitel 2.4.2). Die Einheiten, die pro Enzym eingesetzt werden müssen, ergeben sich aus der Relation der Schnittstellen in der DNA des Vektors und der zu untersuchenden DNA-Sonden.

30-50 μg der DNA wurden in einem Gesamtvolumen von 100-200 μl des die Restriktionsendonukleasen enthaltenden Reaktionspuffers für 2 Stunden oder über Nacht bei 37°C verdaut. Die DNA wurde danach elektrophoretisch aufgetrennt und die gewünschten Fragmente aus dem Gel aufgereinigt (s. Kapitel 2.4.2.6).

Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der Restriktion wurden die einzelnen Inserts mit dem GeneClean III-Kit⁶⁶ aus dem Gel aufgereinigt und anschließend deren Konzentration bestimmt.

Das ausgeschnittene Gelstück wurde bei dieser Methode in 0,5 Vol TBE-Modifizierer (s. Kapitel 7) und 4,5 Vol NaJ-Lösung bei 55°C gelöst. Diese Lösung wurde dann mit 7 μl der mitgelieferten Glasmilch gemischt und es erfolgte eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Durch die hohe Salzkonzentration der NaJ-Lösung löst sich die Agarose und die Nukleinsäuren binden während der Inkubationszeit an die Silica-Matrix. Im Anschluß erfolgte ein 5-sekündiger Zentrifugationsschritt bei 15000 g. Das Pellet wurde dreimal mit Waschlösung mit niedriger Salzkonzentration gewaschen und dann in 20 μl destiliertem Wasser aufgenommen und abzentrifugiert. Mit diesem Schritt eluiert man die jeweiligen DNA-Sonden von der Silica-Matrix und kann diese in ein neues Reaktionsgefäß überführen.

Quantifizierung der DNA-Inserts

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte durch photometrische Messung⁶⁷

⁶⁵Promega, Mannheim; Stratagene, Heidelberg; Amersham, Freiburg; Gibco, Karlsruhe

⁶⁶Dianova, Hamburg

⁶⁷Spektrophotometer 4054, UV/visible Pharmacia Biosystems, Freiburg

der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dies entspricht dem Absorptionsmaximum. Bei einer OD=1 hat man eine Konzentration von 50 ng/ μ l der DNA-Sonden resp. 40 ng/ μ l RNA.

Außerdem erfolgte eine weitere Messung bei 280 nm. Aus dem Quotient $\frac{OD_{260}}{OD_{280}}$ kann man auf die Reinheit resp. die Verunreinigung durch Proteine und Phenolreste aus der Präparation der Nukleinsäuren schließen. Der Wert liegt zwischen 1.5 und 2.0. Nach Konzentrationsbestimmung kann man immer gleiche Mengen (hier 10 μ g) in die Spuren des Northern Blots laden.

³²P-Markierung von Sonden

Die hergestellten cDNA-Sonden wurden für die Northern-Blot Analyse nach dem Zufallsprinzip mittels 40 μ Ci des α^{32} P-Desoxycytidine 5'-Triphosphats⁶⁸ (PdCTP; 3000 Ci/mmol) an eine spezifische Aktivität von etwa 108 cpm/mg radioaktiv markiert.

Das Oligonukleotid wurde radioaktiv 5'-markiert mittels T4-Polynukleotidkinase⁶⁹. Dazu wurden 10 pmol Oligonukleotid, 5 μ l des 10 x Kinasepuffers, 6 μ l (70 μ Ci) γ^{32} P γ -ATP, 20 U T4-Polynukleotidkinase gemischt. Nach 30-minütiger Inkubation des Ansatzes bei 37°C, wurde diese durch Zugabe von 2 μ l 0.5 M EDTA (Ethylendiamintetraacetat) oder 5-minütiges Erhitzen auf 65°C gestoppt. Um die markierten Nukleotide von den unmarkierten zu trennen, wurde in einem Zentrifugationsschritt eine Gelfiltration⁷⁰ durchgeführt.

Bei der cDNA-Sondenmarkierung⁷¹ hybridisieren verschiedene Hexanukleotide mit der zu markierenden DNA-Sonde. Sie dienen dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I als Startpunkt. Die Polymerase synthetisiert einen komplementären Strang, und baut dabei das radioaktiv markierte Nukleotid α^{32} P-dCTP ein.

Für die Markierung wurden 50 ng cDNA in einem Vol von 46 μ l 5 min gekocht und damit denaturiert. Zu der Lösung wurde das Pellet des Markierungssets, welches das Klenow-Fragment, Hexanukleotide, dATP, dTTP und dGTP enthält, gegeben. Weiter wurden 4 μ l α^{32} P-dCTP hinzugefügt und es erfolgte eine Inkubation bei 37°C über mindestens 10 min.

Um festzustellen, wieviel vom radioaktiven Nukleotid eingebaut wurde, brachte

⁶⁸Amersham Pharmacia, Freiburg

⁶⁹Promega, Mannheim

⁷⁰Chroma-Spin Columns, Clontech, Heidelberg

⁷¹rediprime II[®], RandomPrime Labeling Kit, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Germany

man 1 μl des Ansatzes auf einen Streifen Chromatographiepapier⁷². In eine Pufferwanne mit 0,5 M Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung kommt es zur chromatographischen Auftrennung der freien Nukleotide und dem markierten, bzw. zu markierendem Fragment, da die Nukleotide schneller wandern. Nach dem Trocknen des Streifens kann man jeweils im oberen und unteren Abschnitt in einem Szintillationsröhrchen die Zerfälle pro min messen. Dabei liegen die markierten resp. zu markierenden Fragmente näher an der Auftragsstelle und sollten eine Einbaurrate von mindestens 30% zeigen. Die bei den Northern Blots verwendete Hybridisierungslösung sollte pro ml eine Million Zerfälle vorweisen.

Die nun markierten cDNA-Sonden können für die Hybridisierung mit Northern Blots verwendet werden (s. Kapitel 2.4.3.5).

2.4.3 RNA

Aus dem gefrorenen Gewebe von Arterien und der Kollateralgefäße beider Seiten wurde nach der Methode von Chomczynski and Sacchi [77] „totale“ RNA isoliert (s. Kapitel 2.4.3.1) und ein Northern-Blot (s. Kapitel 2.4.3.4) nach der Standardprozedur durchgeführt.

2.4.3.1 RNA-Isolation

Um die RNA aus dem Gewebe zu isolieren, wurde eine abgewandelte Version des Protokolls von Chomczynski und Sacchi verwendet. Alle Schritte erfolgten auf Eis. Nach Homogenisation⁷³ von 0,4 g Gewebe in 4ml Guanidiniumpuffer (s. Kapitel 7) in Polypropylen-Zentrifugenröhrchen⁷⁴ wurden 0,4 ml 2 M Natriumacetat pH 4, 0,8 ml Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) und 4 ml Phenol (mit Wasser gesättigt) zugegeben und gemischt. Nach 15-minütiger Inkubation der Lösung schloß sich ein 40-minütiger Zentrifugationsschritt (5000 g) bei 4°C an. Die obere Phase wurde abpipetiert und mit 1 Vol Isopropanol gemischt. Nach Inkubation für 1 h oder über Nacht bei -20°C wurde erneut für 20-30 min bei 4°C und 7800 g zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und in 800 μl Guanidiniumpuffer aufgenommen. Nach Überführung in ein Eppendorfröhrchen⁷⁵ wurde 1 Vol

⁷²DE 81, Whatman, Kent, United Kingdom

⁷³Ultra Turrax, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen

⁷⁴Falcon, Le Pont de Claix, Frankreich

⁷⁵Eppendorf, Hamburg

Isopropanol zugeben, gemischt und für 1 h bei -20°C belassen. Darauf folgte ein dritter Zentrifugationsschritt für 20 min bei 4°C und 15000 g und eine Wäsche mit 70% Ethanol. Abschließend erfolgte die Aufnahme des RNA-Pellets in 50-100 μl Diethylpyrocarbonat (DEPC)- H_2O (s. Kapitel 7) und zur Lösung eine 10-minütige Inkubation bei 65°C .

Damit ist die Isolation der RNA abgeschlossen und nur noch die reine RNA vorhanden.

2.4.3.2 Quantifizierung der RNA

Um immer gleiche Mengen an RNA für die Beladung der Gelelektrophoretaschen zu haben, kann die Konzentration der RNA photometrisch bestimmt werden. Hierbei entspricht die $OD_{260} = 1$ bei RNA einer Konzentration von $40 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$. Die Reinheit der Nukleinsäuren läßt sich durch den Quotienten aus $\frac{OD_{260}}{OD_{280}}$ ermitteln, welcher zwischen 1,5 und 2,0 liegt. Die OD_{280} ermöglicht eine Aussage über die Verunreinigung durch Proteine und Phenolreste aus der Präparation.

$$c(\text{RNA}) = \frac{\text{Ext}_{260} * \text{Verd.} * 40}{10^6} \quad (2.1)$$

$c(\text{RNA})$ = Konzentration der RNA in $\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$, Verd. = Verdünnung

2.4.3.3 Formaldehyd-Elektrophorese

Die Phorese der im Formaldehydgel einzelsträngigen RNA erfolgt durch ihre Wanderung in Richtung Anode aufgrund der negativen Ladung ihres Phosphat-Zuckerrückgrates. So kommt es zur Auftrennung nach Gewicht bzw. Größe.

15 μg der aus Kontroll- und Fistelseite isolierten RNA (s. Kapitel 2.4.3.1) wurden nach Eintrocknung in der Vakuumzentrifuge⁷⁶ und Lösung in 15 μl Proben-Puffer (1 μl Ethidiumbromid⁷⁷ [$1 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$] und 14 μl RNA-Proben-Puffer, (s. Kapitel 7) verwendet. Es erfolgte eine 15-minütige Denaturierung bei 65°C . Dann wurde die Lösung auf ein 1%-iges Agarosegel in MOPS und 0,66 M Formaldehyd geladen und bei $10 \frac{\text{V}}{\text{cm}}$ nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Beurteilung der Integrität der RNA geschah unter Ultraviolettlicht.

⁷⁶Vakuum Konzentrador Speed Vac GMI, Clearwater, USA

⁷⁷Ethidiumbromid, $10 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$, Roth, Karlsruhe

2.4.3.4 Northern Blot Analyse

An die elektrophoretische Auftrennung schloß sich der Transfer auf eine positiv geladene Nylonmembran⁷⁸ mit Natriumchlorid-Citarat-Puffer (SSC) als Transferpuffer an.

Um das Formaldehyd zu entfernen, wurde die Gelplatte 10 min in destiliertem Wasser und anschließend in 10 x SSC (s. Kapitel 7) geschwenkt. Auf zwei Schalen wurde eine Platte gelegt, auf diese ein Stapel Zellstoff und darauf drei Lagen 3MM-Papier⁷⁹ gelegt. Das obere Papier wurde mit 10 x SSC getränkt. Die Nylonmembran wurde mit Wasser äquilibriert, dann ebenfalls mit 10 x SSC getränkt. Dann wurde die Nylonmembran auf das oberste 3MM-Papier gelgt und die Gelplatte auf die Nylonmembran. Schließlich wurden auf das Gel zwei Lagen in SSC getränktes 3MM-Papier gelegt und alles mit einer Glasplatte beschwert. Der Aufbau wurde auf zwei mit 10 x SSC gefüllte Wannen positioniert. In die Wannen ragten die Enden des oberhalb der Gelplatte aufliegenden 3MM-Papiers (s. Bild 2.19).

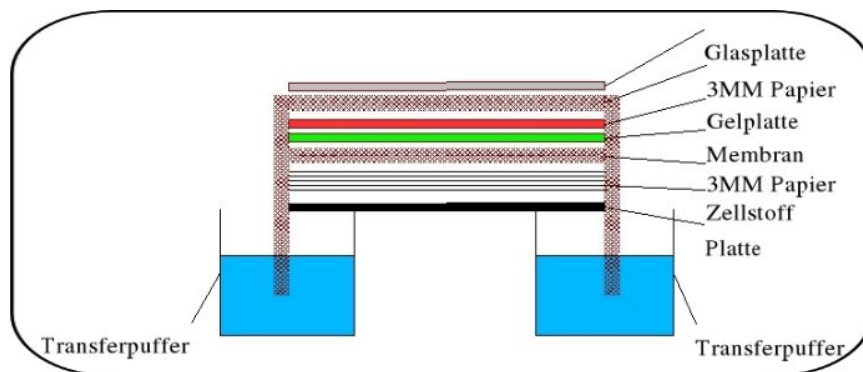


Bild 2.19: Northern Blot Aufbau

Der Blotvorgang erfolgte über Nacht. Dann wurde die Membran in 2 x SSC geschwenkt, um Salz auszuwaschen. Es erfolgte dann die Fixierung der RNA an die Membran mittels Ultraviolett-Querverbindung⁸⁰; die Position 18S-rRNA wurde markiert.

⁷⁸Hybond-N+ membrane, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

⁷⁹Whatman, Kent, UK

⁸⁰120 mJ/cm² mit UV-Stratalinker, Stratagene, Heidelberg

2.4.3.5 Hybridisierung mit cDNA-Sonden und Oligonukleotiden

Die Hybridisierungen von Northern Blots mit den cDNA-Sonden erfolgten nach Hersteller-Anleitung⁸¹ der verwendeten Membran mit entsprechendem Puffer (s. Kapitel 7). Nach mindestens einstündiger Prähybridisierung bei 42°C schloß sich die Hybridisierung über Nacht ebenfalls bei 42°C an. Es wurden folgende Antikörper benutzt: anti-human-CFL vom Hasen⁸², der an das CFL1-cDNA-Plasmid bindet und anti-Hase-IgG/Peroxidase vom Esel⁸³, der an das Plasmid CFL2-cDNA vom Hasen und das o.g. anti-human-CFL vom Hasen bindet. Dann wurde die Membran stringent gewaschen: auf zweimalige Waschung mit SSC/0,1% SDS bei Raumtemperatur folgte je nach Sonde und Stringenz eine Verringerung der Salzkonzentration oder Erhöhung der Temperatur. In einer PhosphorImager-Kassette oder auf einem Röntgenfilm wurde die in Frischhaltefolie eingeschlagene feuchte Membran über Nacht belassen und ausgewertet.

2.4.3.6 Quantifizierung der Signale

Die Auswertung der Membransignale wurde mit dem PhosphoImager und der ImageQuant-Software⁸⁴ durchgeführt. Ladungsunterschiede wurden ausgeglichen, indem die Werte der Hybridisierungen durch die der 18S-Werte geteilt und damit normiert wurden. Die Kontrolle wurde 100% gesetzt. Alle Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Für die Analysen wurde computer-gestütztes Softwareprogramm⁸⁵ benutzt.

⁸¹Stratagene, Heidelberg, Germany

⁸²Sigma, Deisenhofen

⁸³Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

⁸⁴Storm 860, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

⁸⁵Windows Excel, Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleissheim

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Tiermodell

3.1.1 Klinische Ergebnisse

Kein Tier starb während oder nach den ersten beiden Eingriffen. Alle Tiere waren nach dem Erwachen aus der Narkose in der Lage aufzustehen, umherzugehen, zu trinken und zu fressen. Weder nach Ligatur der Aa. fem. beidseits noch nach Anlage der AVF Fistel links zeigten sich klinische Anzeichen einer Ischämie, im Sinne einer Gangrän oder eines Funktionsverlustes. Auch die Operationsbereiche zeigten keine Anzeichen von Nekrosen, Infekten oder Wundheilungsstörungen. Bei vier Tieren kam es zur Ausbildung eines Seroms im Wundbereich.

3.1.2 Chirurgische Ergebnisse

Bei vier Tieren kam es aus unbekanntem Gründen zu einem Spontanverschluß der AVF, damit ergab sich eine Erfolgsrate von 85%

3.2 Digitale Subtraktionsangiographie - Kollateralenauszahlung

Auf den im Laufe des Terminalexperiments angefertigten Diagrammen der intraarteriellen digitalen Subtraktionsangiographie zeigten sich auf der linken Seite mit AVF in Zahl und Größe deutlich erhöhte Kollateralennetzwerke im Vergleich zur nur ligierten Kontrollseite ohne Fistel rechts. Der Median der angiographisch ermittelten Anzahl an sichtbaren Kollateralgefäßen auf der Fistelseite betrug zwölf Kollateralen je Hinterbein, der der Ligaturseite lag bei sechs. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Versuchstiere sind in Tabelle 3.1 wiedergegeben. Die Auszahlungswerte lagen zwischen drei und zwölf auf der Ligaturseite und zwischen sechs und 17 auf der Fistelseite (s. Bild 3.1).

Die Übereinstimmung zwischen den Betrachtern ($n = 4$) war ausgezeichnet, es kamen alle zu höheren Werten auf der Fistelseite.

Versuchstier	Ligaturseite		Fistelseite	
	MW	SW	MW	SW
1	8,3	2,5	12,5	3,4
2	6,5	1,1	11,5	2,9
3	5,8	1,1	11,8	2,5
4	4,3	1,3	9,3	2,9
5	6,8	2,4	13,3	2,9

Tabelle 3.1: Anzahl der Kollateralen; Angaben der Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SW) der einzelnen Versuchstiere

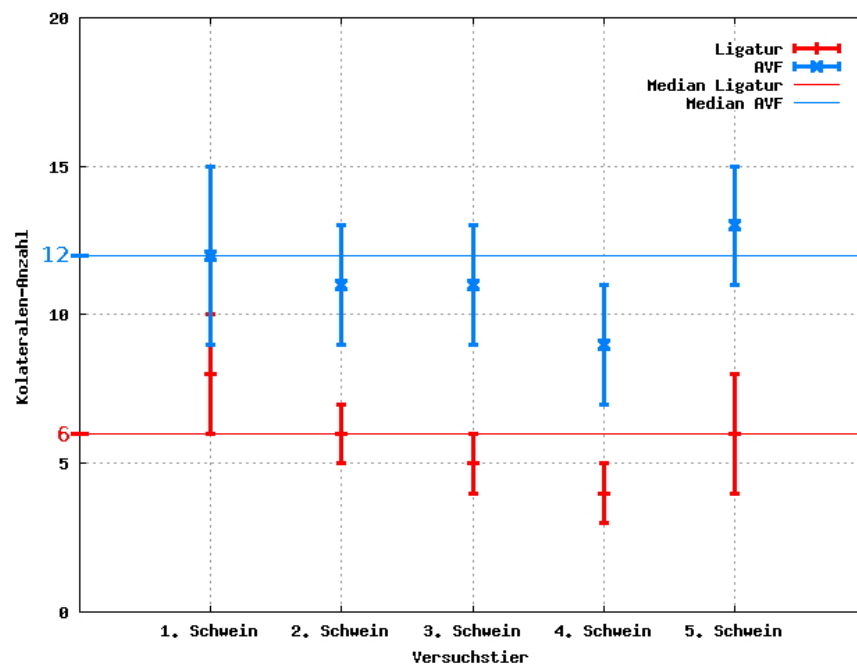


Bild 3.1: Median, Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Versuchstiere

3.3 Molekulargenetische Ergebnisse

3.3.1 Proteine

3.3.1.1 2D-Page

Die 2D-PAGE-Analyse der Kollateralarterien der Ligatur- und Fistelseite zeigte ein in bestimmten Teilen unterschiedliches Proteinexpressionsmuster. Mehr als 1000 Proteine wurden auffindig gemacht; um die 50 Proteine waren bei den Kollateralgefäßproben unterschiedlich ausgeprägt. 22 Proteine mit alternierender Expression wurden identifiziert. Eine relativ große Gruppe von Proteinen war beteiligt an der Regulation des Aktincytoskeletts und damit der Zellmobilität beteiligt, wie z.B., Destrin und Transgelin2 CFL 1 und 2. Unter den identifizierten Proteinen waren CFL 1 und 2 die mitunter am stärksten in ihrer Expression veränderten (s. Bild 3.2).

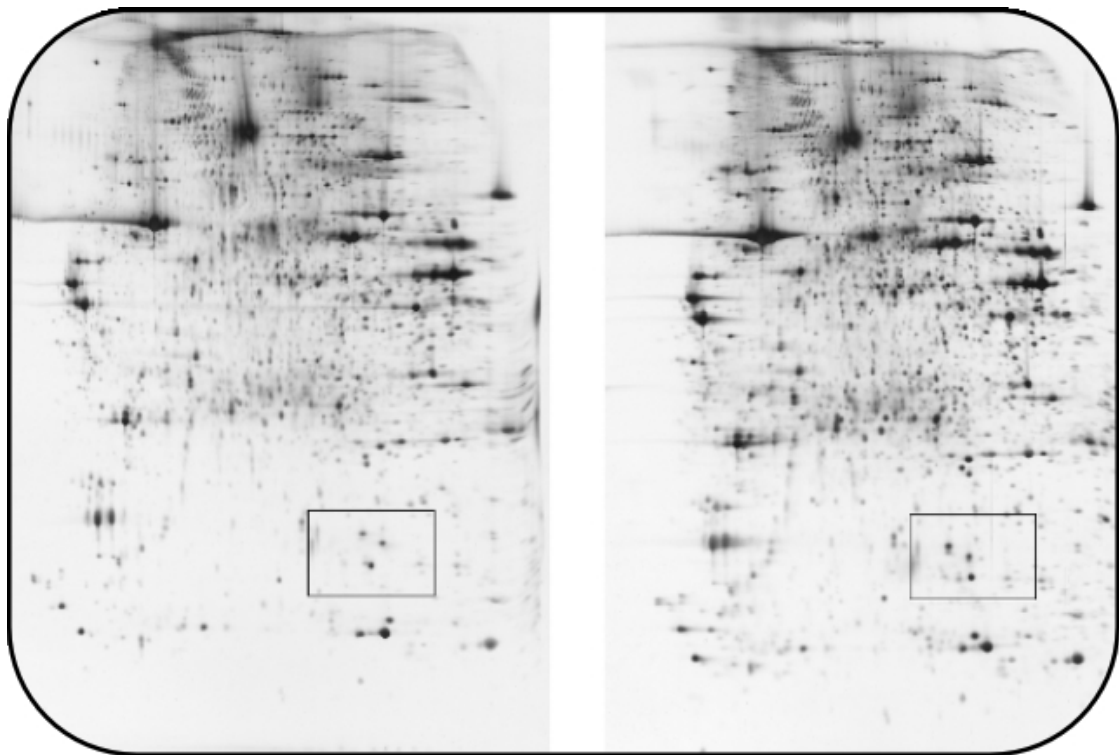


Bild 3.2: 2D-PAGE-Analyse: links aus Kollateralengewebe der Ligatuseite, rechts aus Kollateralengewebe der Fistelseite, Auswahl zeigt CFL-Bereich; eigene Abbildung

3.3.1.2 Western Blot

Es wurden erhöhte Mengen an ADF-Protein, zu denen die CFL gehören, in den Kollateralarterien der Ligaturseite im Vergleich zu der Fistelseite gefunden (s. Bilder 3.3, 3.4 und Tabelle 3.2). Der Median der ADF-Expression in % auf der Fistelseite betrug 16, der der Ligaturseite lag bei 38. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 3.2 dargestellt. Die Veränderungen auf den 2D-Gelen konnten somit bestätigt werden.

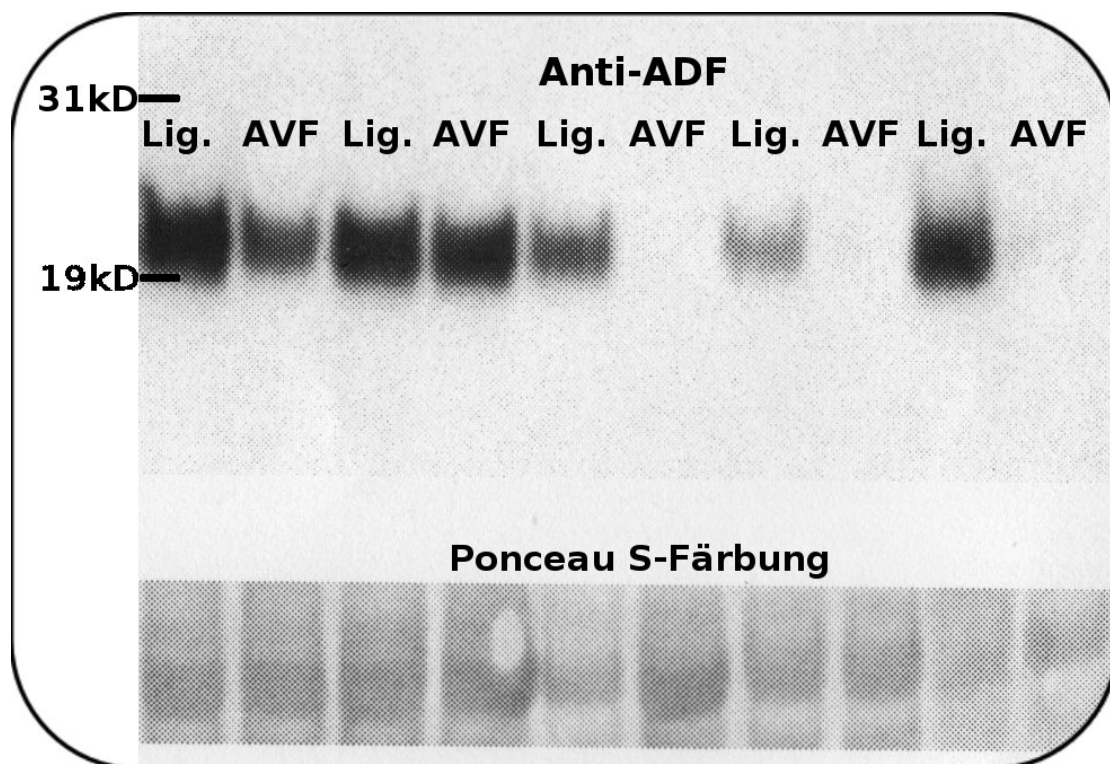


Bild 3.3: Western Blot, Lig.=Kollateralgewebe der Ligaturseite, AVF = Kollateralgewebe der Fistelseite; eigene Abbildung

	Mittelwert	Standardabweichung	Median
<u>Ligaturseite</u>	44,1	23,1	38,1
<u>Fistelseite</u>	22,2	20,3	15,9

Tabelle 3.2: ADF-Expression: Mittelwerte, Standardabweichungen und Median

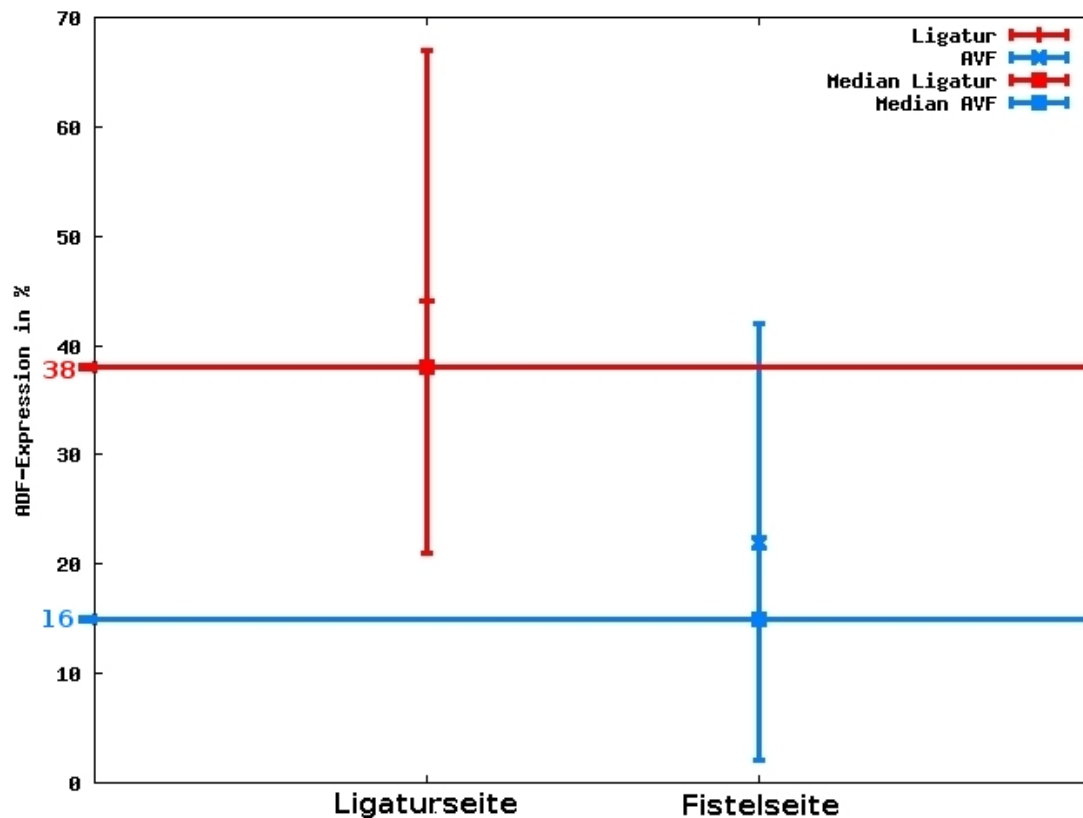


Bild 3.4: ADF-Expression: Mittelwerte, Standardabweichungen, Median

3.3.2 Northern Blot

Die unterschiedliche Expression der Proteine wurde bestätigt mit Northern Blot-Analysen unter Verwendung von spezifischen cDNA-Proben.

Die beiden CFL-Isoformen zeigten in der Northern Blot-Analyse ein reziprokes Expressionsmuster.

Die RNA von CFL 1 ist hochreguliert im Gegensatz zur CFL 2-mRNA, die herunterreguliert ist im Gewebe der wachsenden Kollateralarterien der Fistelseite.

Die RNA von CFL 2 findet sich auf der Ligaturseite im Vergleich zu Fistelseite erhöht, im Gegensatz dazu ist das CFL 1 erniedrigt.

Vergleicht man die Expression von CFL 2 der Kollateralen der Ligaturseite mit denen der Kontrollarterien („einfaches“ arterielles Gewebe) findet man eine Steigerung in der Expression in den wachsenden Kollateralen zwei Wochen nach Ligatur.

Die Expression von CFL 1 auf der Fistelseite zeigt keine große Veränderung im Vergleich zur Kontrollarterie (s. Bilder 3.5 und 3.6 und Tabellen 3.3 und 3.4). Alle

Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

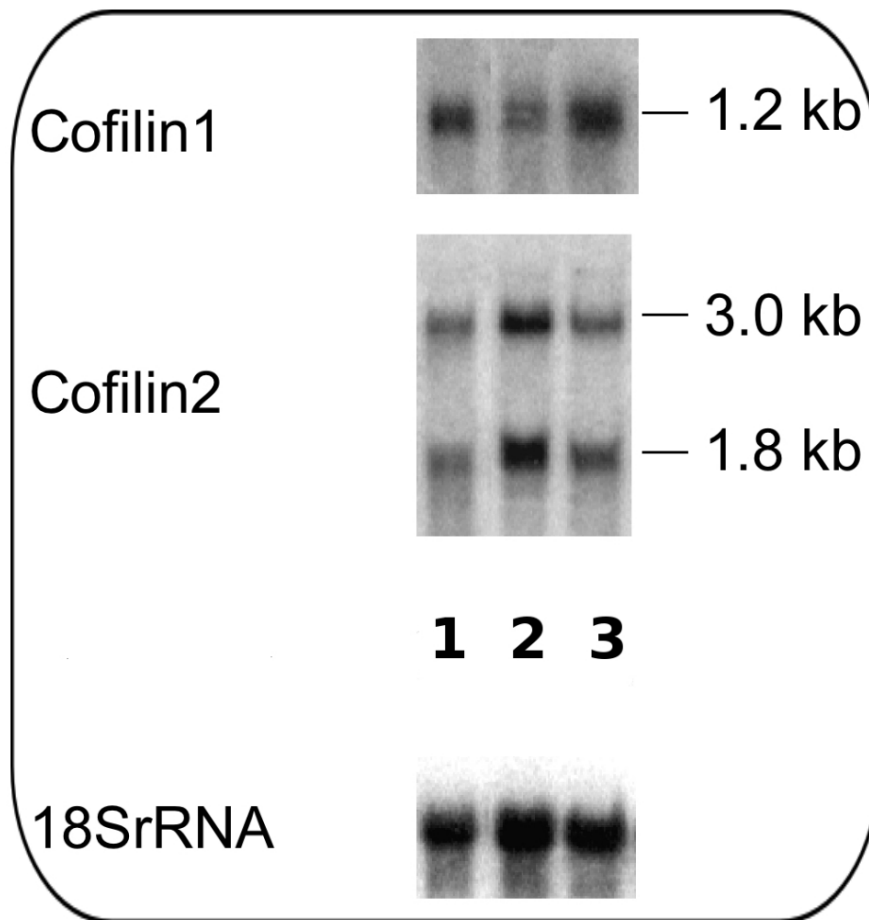


Bild 3.5: Northern Blot, 1=Arterie, 2=Kollateralgewebe der Ligaturseite, 3=Kollateralgewebe der Fistelseite; eigene Abbildung

	Ligaturseite			Fistelseite		
	CFL 2a	CFL 2b	CFL 1	CFL 2a	CFL 2b	CFL 1
Mittelwert	303,6	270,9	52,5	239,2	189,9	88,8
Standardabweichung	8,8	8,9	10,0	5,9	15,9	17,3

Tabelle 3.3: Cofilin-Expression: Kollateralen der Ligatur- und Fistelseite; Mittelwerte und Standardabweichungen; CFL=Cofilin

	CFL 2a	CFL 2b	CFL 1
Kontrollarterie	203,5	188,3	88,5

Tabelle 3.4: Cofilin-Expression: Kontrollarterie; CFL=Cofilin

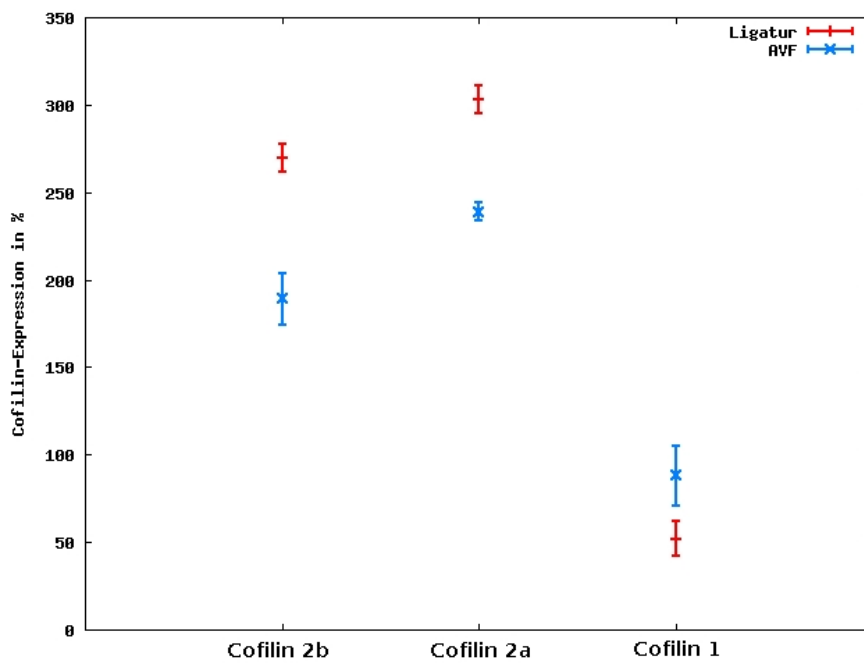


Bild 3.6: Cofilin-Expression: Mittelwerte und Standardabweichungen

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Nach zweiwöchigem Bestehen der Ligatur und einwöchigem Bestehen der AVF zeigte sich in den Angiogrammen eine Erhöhung von Anzahl und Größe der Kollateralgefäße im Vergleich zur Kontrollseite ohne AVF. Der Median der angiographisch ermittelten Anzahl an sichtbaren Kollateralgefäßen auf der Fistelseite beträgt zwölf Kollateralen je Hinterbein, der der Ligaturseite liegt bei sechs.

2. Die Erhöhung der Scherspannung durch die zusätzliche Anlage der AVF bewirkte eine Veränderung der Expression von CFL 1 und 2.

Es fanden sich im Western Blot erhöhte Mengen an ADF-Protein, welche CFL beinhalten, in den Kollateralen der Ligaturseite ohne AVF.

Die unterschiedliche Expression zeigte sich im Northern Blot. Sie war erhöht für CFL 1 auf der Fistelseite, erniedrigt auf der Ligaturseite. Die CFL 2-Expression war gesteigert auf der Ligaturseite im Vergleich zu Fistelseite, dort war CFL 2 erniedrigt. Im Vergleich zur Kontrollarterie zeigte CFL 1 hier ähnliche Werte wie auf der Fistelseite, das CFL 2 der Ligaturseite war allerdings über Kontrollarterieniveau erhöht.

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Studie

Bei der durchgeführten Studie handelt es sich um Grundlagenforschung, bei der die klinische Übertragbarkeit noch nicht abzuschätzen ist. Hier wurde an gesunden Gefäßen von Jungtieren operiert, die allein von der morphologischen Beschaffenheit nicht mit pathologisch alterierten Gefäßen meist älterer gefäßkranker und multimorbider Menschen verglichen werden können [363] [48].

Allerdings kam es zum grundsätzlichen Nachweis der Kollateralenmaximierung durch Scherspannungssteigerung nach Fistelanlage und dieses positive Ergebnis bietet das Fundament für Anschlußstudien. Diese müssen aber unter dem Aspekt konzipiert werden, daß eine AVF bei entsprechender Größe eine Herzinsuffizienz und eine Verschlechterung der Perfusionssituation im gefährdeten Areal zur Folge haben kann, da das sauerstoffreiche Blut im venösen System unbenutzt verloren geht. Möglicherweise müssen andere Wege gefunden werden, um die Scherspannung zu erhöhen oder andere Schritte im arteriogenetischen Prozeß zu modifizieren. Trotz der Multimorbidität der meist älteren Patienten mit Koronarer Herzkrankheit (KHK) oder PAVK bleibt zu beachten, daß auch der alternde Organismus die Fähigkeit besitzt, auf die Arteriogenese fördernde Signale mit Vermehrung und Vergrößerung der Kollateralen zu reagieren, wenn auch in vermindertem Maße als gesunde [462] [456] [48] [464] [465] [463] [1].

4.2 Übereinstimmung mit anderen Studien

Es gibt zahlreiche Studien zu Wachstumsfaktorsubstitution, Stammzell- und Gefäßtraining, die teils übereinstimmende Ergebnisse bzw. ähnliche Tendenzen im Vergleich zu dieser Studie beschreiben. Außerdem gibt es Ähnlichkeiten im Prozeß der Kollateralenentstehung und der Pathologie der Gefäße.

4.2.1 Studien mit Wachstumsfaktoren

Präklinische und frühe klinische adjuvante oder isolierte Substitutionstherapien mit Wachstumsfaktoren wie VEGF zeigten positive Wirkung auf die Durchblutungssituation bei arteriellen Verschußkrankheiten [36] [409] [418] [246] [349] [140] [437] [424] [412] [345] [30] [67]. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für PlGF [322] [249], HIF-1 [443], TGF β [438], MCP-1 [183] [182], GM-CSF [381] und FGF [217] [224] [334] [223] [377] [393] [141] [227] [433] [245] [226] [314] [147] [135] für Arterio- und Angiogenese vorgestellt. Auch synergistisch und agonistisch-antagonistisch wirkende Kombinationen [249] [279] [316] [340] wurden angewandt. Allerdings wurde die Mortalität im Vergleich zur bekannten medikamentösen und interventionellen Therapie nicht gesenkt [180] bzw. läßt die klinische Anwendung bei morbidem Patienten und die Analyse in Doppelblindstudien Erfolge fehlen, die experimentell vorhanden waren [393] [346] [176] [199] [342].

Die Applikationsart, das Trägermedium und die Abgabe der Wachstumsfaktoren sind Faktoren, die noch Optimierung erfordern [125] [215] [216] [149] [311] [320] [177] [98] [229] [385] [305]. So stehen systemische intravenöse oder -arterielle Verabreichung der hochwirksamen Stoffe der lokalen Gabe direkt in die ischämischen Areale bzw. deren Umgebungsgewebe gegenüber. Außerdem findet die Injektion des nackten DNA-Plasmids ebenso Verwendung wie die Applikation mit Hilfe eines Trägervirus oder künstlicher Polymergerüste. Der Pegel und das Andauern der Genexpression der applizierten Plasmide sind immer zeitlich begrenzt [314] [279] und von der jeweiligen Zellhomeostase abhängig [320], die teils invasive Gabe muß in regelmäßigen Abständen wiederholt werden. Die Pathogenität des Vektors mit und ohne Spontanmutationen ist stets präsent. Nach wiederholter Applikation des Vektors kann der Empfänger diesen durch erfolgte Desensibilisierung mit einer gezielten Immunreaktion zerstören, bevor die Wirkung eintreten konnte.

Die systemische oder ständig höherdosierte Applikation der Wachstumsfaktoren

[181] [161] beinhaltet auch immer das Risiko einer Tumorentstehung oder -progression [230] [102].

Als weitere Nebenwirkung der Substitutionstherapie mit Wachstumsfaktoren stellt sich die Progression von atheromatösen Plaques dar [223] [66] [326], die Inhibition der Plaqueprogression durch Angiogeneseinhibitoren ist ein bekanntes Phänomen [272].

Außerdem zeigten sich durch VEGF-Gabe verursachte Hypotension in sowieso schon minderperfundierten ischämischen Arealen [148].

Schließlich kommt es unter Wachstumsfaktorsubstitutionstherapie vermehrt zu Unterschenkelödemen und arteriovenösen Malformationen [279] [180] [319] und zu gesteigerter Lymphangiogenese [345]. Unter dem Einfluß der Ischämie im gefährdeten Areal und VEGF entstehen vor allem Kapillarenetzwerke und keine großen Arterien. Um dies auszugleichen wird eine enorme Anzahl von Kapillaren benötigt, die ineffizient sind, den Blutfluß weiterzuleiten. Nach dem Gesetz von Hagen-Poiseuille kommt es zu großen Strömungsgeschwindigkeitsverlusten, da der Blutdruck in den Kapillaren gering ist.

Diese Gefahren unterstreichen die Wichtigkeit von Folgestudien, in denen wie bei jedem Medikament, eine optimale Dosis zwischen klinischem Erfolg und Toxizität gefunden werden muß und eine Möglichkeit, das substituierte Agens zu regulieren [230]. Hier ist vor allem die genetische Prädisposition zur Tumorentstehung, das Alter und der Allgemeinzustand des Patienten zu beachten [42].

Abschließend ist zu erwähnen, daß eine *restitutio ad integrum* mittels Wachstumsfaktorsubstitution in den bisherigen Studien nicht erreicht wurde, für Wachstumsfaktorapplikation im arteriogenetischen Prozess existiert nach der arteriellen Occlusion nur ein enges zeitliches Fenster von wenigen Tagen [165] [167] [323].

Eine Substitutionstherapie mit einzelnen oder synergistisch und gegensätzlich wirkenden Wachstumsfaktoren bei der Angio- und Arteriogenese beinhaltet die Herausforderung, das multifaktorielle Geschehen zu bestimmten Zeiten zu simulieren mit einer dahingehend beeinflussten Dosis bestimmter Stoffe, die eine verbesserte Durchblutungssituation schafft und die unerwünschten Wirkungen so niedrig wie möglich hält. Dies ist in unserer Studie nicht von Notwendigkeit, da hier an einem sehr frühen Punkt des Gefäßmodellings mit einer einzelnen Veränderung lokal eingegriffen und die homeostatische Regulierung des multifaktoriellen Geschehens belassen wird.

4.2.2 Studien mit Stammzellen

Die Rolle von Stammzellen in Angio- und Arteriogenese wird kontrovers diskutiert. Eine Wirkung als Produzent von Wachstumsfaktoren und Cytokinen im inflammatorischen Milieu der Gefäßentwicklung steht einer Integration in das wachsende Gefäß und damit einer Ausdifferenzierung zur Endothel- oder Muskelzelle gegenüber.

Seit der Beobachtung, daß multipotente Stammzellen in Bereiche aktiver Angio- und Arteriogenese inkorporiert werden, wird diesen eine wichtige Rolle beim Kollateralenwachstum zugeschrieben [22] [193] [115] [195] [200] [389] [411] [273] [477]. Der Anteil der Stammzellen, die sich in das wachsende Gefäß als differenzierte Endothelzelle integrieren, sind die Endothelialen Progenitorzellen (EPZ), die aus hämatopoetischen Stammzellen hervorgehen sollen [193] [388] [386] [21] [258] [81] [318]. Durch zusätzliche Erhöhung von VEGF [194] [192] [23] [21] [184], PlGF [66] [151] [374] oder durch eine Gefäßverletzung [131] können mehr Stammzellen mobilisiert werden, auch der Anteil an Zellen, die sich zu Endothelzellen entwickeln, erhöht sich nach VEGF-Stimulation *in vitro* [315].

Allerdings zeigen viele Studienergebnisse, daß aus der hämatopoetischen Stammzelllinie vor allem mononukleare Zellen hervorgehen, die die für das angio- und arteriogenetische Geschehen wichtigen Mediatoren produzieren und daß der Anteil der EPZ, die zu ausdifferenzierten Endothelzellen heranreifen, in dieser Zelllinie sehr klein ist bzw. daß die Ausdifferenzierung gar nicht auftritt [376] [22] [115] [195] [315] [447] [480] [336].

Es scheint daher wahrscheinlicher, daß sich die Stammzellen, die in Bereichen aktiver Angio- und Arteriogenese inkorporiert werden, nur zu einem geringen Anteil zu Endothelzellen entwickeln und proliferieren, sondern zu Monocyten werden und ihr wachstumsfördernder Effekt durch die Produktion von Mediatoren und Cytokinen bedingt ist und die durch das inflammatorische Milieu in entsprechende Bereiche gelockt werden.

Damit spielt die Vasculogenese mittels Stammzellen wie sie beim Embryo vorkommt [152] (s. Kapitel 1.2.2) bei der Gefäßbildung beim Erwachsenen eher eine untergeordnete Rolle. Die Stammzellen stellen eher den Mehrbedarf an Monocyten im inflammatorischen Milieu im arteriogenetischen Prozeß (s. Kapitel 1.2.8) und daher einen Teilschritt bei der Kollateralenvergrößerung dar, als daß sie ei-

ne komplett neue Strategie bieten, das Gefäßwachstum zu fördern. Die erwartete Neubildung von Gefäßen durch die Einbringung von multipotenten Vorstufenzellen in Gebiete mit occludierten Leitgefäßen geschieht nicht durch die Stammzellen, sondern durch Proliferation der vorhandenen Zellen als Reaktion auf die von den Stammzellen produzierten und sezernierten Faktoren. Durch Einbringen der Stammzellen in Bereiche der Gefäßentwicklung verstärkt man das natürliche Aufkommen der benötigten Faktoren und die Folgeeffekte, die zu einem vermehrten Gefäßwachstum führen [110] [435] [296] [203] [202] [17] [178].

4.2.3 Gefäßtraining

Wie in Kapitel 1.1 beschrieben, wird in frühen Stadien der PAVK das Gefäßtraining [136] [130] [466] empfohlen.

Gefäßtraining wird betrieben, indem der Patient, der an PAVK leidet, solange geht, bis er Schmerzen bekommt. Bei Auftreten von Symptomen wird eine Ruhephase eingelegt. Dieser Vorgang soll mehrmals wiederholt werden. Das Ziel ist es, immer längere Strecken zu zurücklegen zu können, bis eine Pause benötigt wird.

Durch Anwendung dieser Übung wird ein starker angio- und arteriogenetischer Stimulus produziert. Außerdem erhöht das Gefäßtraining die Flußkapazität durch Vergrößerung der Durchmesser der zuführenden Arterien. Diese Adaptationen werden erreicht durch den Prozess der Angio- und Arteriogenese und konsekutiv erhöhter Kapillaren- und Kollateralendichte [332].

Therapeutisch angewandtes Gefäßtraining scheint eine Abmilderung der atherosklerotischen Inflammation zu bewirken und ist wichtige Option bei der Claudicatiobehandlung [419]. Hierbei muß zwischen der atherosklerotischen Inflammation, die abgeschwächt wird und der inflammatorischen Reaktion bei Arteriogenese (s. Kapitel 1.2.8) zum Kollateralenwachstum unterschieden werden. Diese beiden Reaktionen laufen wie in Kapitel 1.2.6) und Kapitel 1.2.8. beschrieben in ähnlichen Stufen unter Mitwirken gleicher Mediatoren ab. Wichtig ist, daß beim Gefäßtraining der arteriogenetische Prozeß gefördert wird, indem - getrieben durch die Betätigung - ein vermehrter Fluß [467] durch und damit eine verstärkte Scherspannungseinwirkung auf die Kollateralen erreicht wird und bedingt durch das Stoppen der Übungen beim Auftreten der Schmerzen die Ischämiezeit nur kurz ist. So wird die Kollateralenentstehung gefördert, aber ohne den atherosklerotischen Prozeß anzukurbeln. Im Verlauf der regelmäßig angewandten Übungen wird

die Phase der Arteriogenesestimulierung immer länger, da durch die wachsenden Kollateralen mehr Betätigung möglich ist, weil sie den Mehrbedarf an Blut zum Abnehmer Muskel transportieren. Außerdem kommt es immer später, wenn überhaupt zu ischämischen Phasen, so daß die „schlechte“ Entzündungsreaktion gar nicht mehr in Gang kommt. Es tritt eine positive Selbstverstärkung des „heilenden“ Kollateralenwachstums an.

Idealerweise übernehmen die Kollateralen bei genügender Anzahl und Größe die Aufgabe des Leitgefäßes und die PAVK ist „ausgeheilt“. Beim Gefäßtraining wird über die Mehrbeanspruchung der Muskulatur die Mehrdurchblutung der Kollateralen bewirkt, bei unserem Tiermodell wird durch die AVF eine Mehrdurchblutung der Kollateralen erreicht. Diese Studie bietet den morphologischen und molekulargenetischen Beweis für die Effektivität von Gefäßtraining: durch Scherspannungserhöhung kommt es zum verstärktem Kollateralenwachstum. Ganz gleich wie es zu der Mehrdurchblutung kommt, ist sie das gewünschte Ziel, da sie den Prozeß der Arteriogenese initiiert, unterhält und zu einer Restitutio ad integrum führen kann.

4.2.4 Studien zur Gefäßpathologie

Sowohl bei der Arteriogenese (s. Kapitel 1.2.8) als auch bei der Atherosklerose (s. Kapitel 1.2.6) kommt es zur Alteration im Flußmuster des Blutes [24] [211] [87] [134] [93]. Allerdings liegt bei einem atherosklerotisch veränderten Gefäß ein Schaden vor, der einerseits erst die Ursache für die Veränderung des Flußmusters darstellt, andererseits aber der Grund für das Unvermögen ist, im Sinne der Arteriogenese bzw. Heilung auf diese Änderung zu reagieren. An den Stellen, an denen der Gefäßplaque ausgebildet ist, kann auch die Scherspannung nicht einwirken, da das Endothel als Aufnehmer defekt ist und damit die Scherspannung schon zu Beginn ohne Effekt bleibt. Andererseits ist ein Plaque oft an Stellen, an denen Scherspannung vermindert einwirkt zu finden [212] [198]. Hier kommt es zu einer Minderaktivierung des Endothels und die inflammatorische Reaktion bei der Entstehung von Gefäßplaque hat bei vorhandener Pathologie die Oberhand. Damit sind Bereiche, die wenig Scherspannung erfahren besonders gefährdet für eine Plaqueentstehung und können aber nach Plaqueentstehung, wenn sie den Scherspannungseffekt erfahren, nicht mehr von diesem profitieren.

Eine homogene Aktivierung ist nicht gegeben, das Gefäß kann keinen gleichmäßi-

gen Durchfluß bieten. Dieser ist aber nötig, damit das Gefäß erhalten bleibt. Es kommt zu der gleichen Selektion, wie sie bei den Kollateralarterien auftritt. Diese erfahren durch ihre Schlingelung und dadurch bedingte unhomogene Flußmuster eine unterschiedliche Aktivierung durch Scherspannung (s. Kapitel 4.6.1.3). Gemäß den Grundsätzen von Clarke, Thoma und Murray (s. Kapitel 1.2.5.4) atrophieren sowohl beim atherosklerotischen als auch beim arteriogenetischen Prozeß die Gefäße, die einen ungenügenden Fluß fördern.

Außerdem bewirkt die erhöhte Scherspannung in einem atherosklerotischen Gefäß nur dann eine Proliferation mit konsekutiver Umfangsvermehrung des Gefäßes, wenn die Läsion nicht mehr als 40% der Lamina elastica interna einnimmt [138]. Dann wirkt sich der Proliferationsprozeß nicht mehr im Sinne der Umfangsvermehrung nach außen aus, da dies durch den Plaque nicht mehr erfolgen kann, sondern vollzieht sich im Inneren des bereits verengten Gefäßes.

Ebenso wie in Kapitel 4.2.2 ist es fraglich, ob Atherosklerose die Differenzierung von Stammzellen zu glatten Muskelzellen bewirkt, die sich in der Intima ansammeln und somit zum Gefäßverschluß führen [354]. Vielmehr ist es wahrscheinlich, daß die Stammzellen sich zu Monocyten ausbilden, die die Inflammation und Plaqueprogression fördern.

Bei der Entstehung eines Gefäßplaques wirken Flußalteration und Inflammation zusammen. Dabei bedingen sie einander, bzw. beeinflussen einander so, daß ein Ungleichgewicht in der Homeostase des Gefäßes zustandekommt ist und das Gefäß in diesem nicht funktionierenden Zusammenspiel seiner Transportaufgabe nicht nachkommen kann [370].

4.3 Definitionen

Es existieren viele Begriffe und Definitionen zu den verschiedenen Gefäßumbau- und -neubildungsprozessen, von denen einige synonym zueinander gebraucht werden können, andererseits aber ein gleicher Begriff zur Benennung zweier unterschiedlicher Abläufe herangezogen wird.

Wie in (s. Kapitel 1.2.2) beschrieben, lagern sich bei der Vasculogenese Hämagioblasten aus dem lateralen und paraxialen Mesoderm zu Inseln zusammen. Aus den peripheren Zellen gehen die Endothelzellen hervor und die inneren Zellen entwickeln sich aus der hämatopoetischen Stammzelle zur ersten Population noch zellkernhaltiger Erythrocyten [97]. Die Endothelzellen fusionieren und bilden ein vasculäres Netzwerk [19], aus mesenchymalen Zellen gehen glatte Muskelzellen und Pericyten hervor, die die Gefäße umranden [63].

Wenn man annimmt, daß die Vasculogenese nicht nur in der Embryonalzeit stattfindet, sondern auch nach der Geburt, muß man unterscheiden zwischen der oben beschriebenen - damit pränatalen - Vasculogenese und der postnatalen Vasculogenese.

Als postnatale Vasculogenese bzw. postnatale Neovascularisation wird einerseits die Gefäßentwicklung gemäß der sprossenden Angiogenese und außerdem aber auch die Gefäßentstehung durch die Differenzierung und Inkorporation von zirkulierenden EPZ aus dem Knochenmark bezeichnet. Es wird bei der postnatalen Neovascularisation nochmal zwischen physiologischer und pathologischer Neovascularisation unterschieden [21] [258] [194]. Die physiologische Neovascularisation vollzieht sich demnach beim Erhaltungsprozeß von Organen und beim weiblichen Zyklus, die pathologische beim Tumorwachstum und der PAVK. Wird bei der pathologischen Neovascularisation zur Ersatzgefäßneubildung bei der PAVK nachgeholfen mittels zusätzlicher Stammzell- oder Wachstumsfaktorsubstitution, bezeichnet man dies als therapeutische Neovascularisation [193] [194]. Wie bereits bei (s. Kapitel 4.2.2) dargestellt, macht dieser Prozeß - wenn überhaupt - nur einen geringen Anteil bei der Gefäßneu- oder -ausbildung aus.

Postnatale Vascularisation beschreibt die Proliferation und Migration von präexisten- ten voll differenzierten Endothelzellen in Ursprungsgefäße [108]. Dieser Begriff wurde verwendet vor der Hypothese bzw. Beobachtung, daß EPZ an postnataler Vascularisation teilnehmen und dieses dann ja der postnatalen Vasculogenese bzw.

Neovascularisation entsprechen würde.

Angiogenese wurde als Begriff 1935 von Hertig [163] verwendet, um die Entstehung neuer Blutgefäße in der Plazenta zu beschreiben. 1971 bezeichnet Folkman mit diesem Begriff die Neovascularisation, die das Wachstum solider Tumoren möglich macht [108] [112]. Die Gefäßbildung bei Tumoren, Retinopathien und im Gefäßplaque wird pathologische Angiogenese genannt [22].

Asahara benennt das Kollateralgefäßwachstum im Ischämiegewebe therapeutische Angiogenese [22]. Wie in Kapitel 1.2.8 erläutert, kommt es im Ischämiegebiet aber nicht zur Kollateralentwicklung, sondern im Bereich des verschlossenen Gefäßes, das die Ischämie im abhängigen Stromgebiet bedingt.

Nach Longland bezeichnet man Kollateralarterien als korkenzieherartig ausgeprägte Gefäße, die eine Stamm-, Mittel- und Wiedereintrittszone haben und ein verschlossenes Gefäß überbrücken. Kollateralarterien entwickeln sich aus präexistenten Arteriolen, die wie übliche Arteriolen von Nerven und Venen begleitet werden und die ihrerseits die Leitgefäße begleiten [376]; im Ischämiegebiet kommt es zu zusätzlicher Entwicklung von Kapillaren. Dementsprechend kann der Begriff Kollateralgefäß synonym verwendet werden. Es muß dann klar die Lokalisation der Kollateralen benannt werden - Occlusions- oder Ischämiegebiet - und die Beschaffenheit - Arteriolen oder Kapillaren.

Zusätzlich wird bei Koronarien zwischen erworbenen und kongenitalen Kollateralen unterschieden. Letztere bestehen bei angiographisch gesunden Koronarien, haben eine intersulcale Lokalisation, zeigen keine Verjüngung und Tortuosität und schützende Rolle bei Entwicklung von Arteriosklerose [5] [73] [242] [232]. Sie sind eher eine anatomische Variante.

Im Allgemeinen werden aber die erworbenen Kollateralarteriolen, die als Konsequenz einer arteriellen Verschlusskrankheit, bzw. pathologischer Hypertrophie oder Hypoxämie des von ihnen abhängigen Gewebes, z.B. des Herzmuskels entstehen, als Kollateralen bezeichnet; so auch in dieser Studie: mit dem Begriff Kollaterale ist die Kollateralarterie gemäß Longlands Definition gemeint.

Mit dem Begriff der Arteriogenese wird die Entwicklung und das Wachstum von Kollateralarterien beschrieben [159]. Carmeliet unterscheidet die embryologische von der pathologischen Arteriogenese. Erstere ist die Morphogenese der ersten Arterien mit Ummantelung mit glatten Muskelzellen, synonym gebraucht er den

Begriff physiologische Arteriogenese.

Der Begriff pathologische Arteriogenese beschreibt die pathologische Vergrößerung von präexistierenden Kollateralen bei PAVK oder KHK [62].

De novo-Arteriogenese ist der Prozeß, bei dem Kollateralarterien von frisch entstandenen Kapillaren abstammen, die glatte Muskelzellen aus dem Gewebe als Ummantelung erhalten haben und damit neu entstandene Aa. wären, wie sie in der Embryonalzeit entstehen und was nach Carmeliet mit der embryologischen Arteriogenese gleichzusetzen wäre [62] [65] [240] bzw. mit der postnatalen Neovascularisation (s.o.).

Abschließend läßt sich zusammenfassen, daß man mit weitaus weniger Begriffen auskommen kann, um Gefäßneu- und umbau zu benennen, wenn man die Gefäßart, die Lokalisation, die Situation und den Zeitpunkt im Leben des Individuums klar angibt, bei welchem ein bestimmter Prozeß auftritt.

4.4 Tiermodell

Ein Tiermodell ist immer ein Kompromiß und nie ein Ideal. Das ideale Versuchstier für Studienzwecke müsste klein, leicht zu halten und zu operieren sein und Ähnlichkeit zum Mensch bzw. seinen biologischen Antworten auf Veränderungen haben [432]. So ein ideales Versuchstier existiert nicht. Aufgrund der Ähnlichkeit zum Aufbau des menschlichen Organismus haben wir uns für das Hausschwein entschieden.

Die Übertragbarkeit von Studien an Versuchstieren auf den Menschen ist immer schwierig, wobei diese beim Schwein eher gegeben sind als bei z.B. der Ratte als Versuchstier. Beim Hausschwein sind von der anatomischen, physiologischen, hämodynamischen und genetischen Seite Ähnlichkeiten mit dem menschlichen Organismus zu verzeichnen (z.B. sind sogenannte Bioherzklappen vom Schwein „kompatibel“, d.h. können als Ersatzklappen beim Menschen verwendet werden).

Bei Verwendung der Hausschweine als Versuchstiere kommt man dem Menschen in Organismus- und vor allem Gefäßgrößenverhältnis und -komplexizität sehr nahe. Ebenso ist es bei der Eingriffkomplexizität in Bezug auf die chirurgische „Zugänglichkeit“. Dies heißt, dass die interessierenden Gefäße an gut exponierbarer Stelle liegen, aber beinhaltet auch den Nachteil, dass die Kollateralen, die in möglichst kurzer Zeit herauspräpariert werden sollen, tief im reichlich vorhandenen Muskelgewebe sitzen. Im Vergleich dazu ist die chirurgische Maßnahme beim Kaninchen aufwendiger, hingegen die Präparation und die Haltung deutlich einfacher. Allerdings finden sich bei geringeren Gefäßdurchmessern auch häufiger Anastomosenheilungsstörungen mit konsekutiven Stenosen, muralen Thrombosen und Intimahyperplasie, die zur Blutflußreduktion führen und damit beeinträchtigend auf den Experimentenerfolg wirken können. Bemerkenswert ist hier aber die Tatsache, daß die Ausbildung einer Neointima, die sich in unserer Studie mit dem Schwein als Versuchstier im Arteriogeneseprozess 10-14 Tage nach Occlusion des Leitgefäßes zeigt, bei der Maus nicht vorkommt und beim Kaninchen deutlich geringer ist als beim Hund [58].

Der Wahl der Hausschweine als Versuchstiere könnte man entgegensetzen, daß bei diesen das präexistente Kollateralenetzwerk eher spärlich ausgebildet ist [58], allerdings ist es angeboren und dem des Menschen ähnlich [432]. Kollateralen im Herz sind eher bei Hunden, Katzen und Meerschweinchen vorhanden, wohingegen diese bei Ratten, Mäuse und Schweinen eher spärlich bis gar nicht ausgebildet sind

[361] [257].

Bei ähnlichem Versuchsaufbau kam es bei Kleintieren, wie Ratten und Kaninchen zu einer 100%-igen restitutio ad integrum durch Kollateralenmaximierung nach Fistelanlage [369]. Bei Kleintieren, wie z.B. der Ratte ist weiterhin von Vorteil, daß das Genom im Gegensatz zu dem des Schweines komplett aufgeschlüsselt ist. Von Bedeutung erscheint auch die Tatsache, daß die präexistenten Kollateralen in den verschiedenen Spezies in etwa die gleichen Durchmesser haben (30-50 μm). Auch die Zellteilungszeiten bei den verschiedenen Spezies sind gleich. Die Kollateralen der Maus verdoppeln im Falle des Leitgefäßverschlusses ihre Durchmesser, beim Kaninchen erreichen sie eine Größe von 200-300 μm , beim Hund erreichen sie eine 20-fache Vergrößerung [368] und beim Menschen findet man Durchmesser von ca. 2 mm, also eine 40-fache Durchmesserzunahme. Die benötigten Zellteilungen und damit die Zeit bis zum Erreichen der gebrauchten Zellanzahl hängen also maßgeblich von der Speziesgröße ab [440]. Daher bietet sich das Hausschwein als Versuchstier auch bezüglich dieser Gegebenheit eher an als eine kleinere Spezies, um abzuschätzen, welche Kollateralendurchmesser erreichbar sind und erreicht wurden, d.h. wie erfolgreich der Versuch war, die Kollateralen zu maximieren.

Wie einleitend erwähnt vollzieht sich der Prozeß der Arteriogenese nach dem gleichen Prinzip bei Mäusen, Ratten, Kaninchen, Hunden oder Schweinen, unabhängig davon, ob es sich um Koronar- oder periphere Arterien handelt. Das Vorhandensein der präexistenten Kollateralarteriolen ist genetisch determiniert. Um Verhältnisse zu simulieren wie sie im menschlichen Organismus herrschen, haben wir das Hausschwein gewählt.

4.5 Methoden

4.5.1 Bildgebung

Zur bildlichen Darstellung der Kollateralarterien wurde die DSA verwendet. Dies entspricht dem klinischen Goldstandard und gibt Auskunft über die Kollateralentwicklung. Allerdings sind hier auch nur die makroskopisch erkennbaren Gefäße verwertbar. Die Magnetresonanztomographie bietet ebenfalls keine bessere Auflösung. Die Sonographie ist bei den gegebenen Kollateralendimensionen nicht anwendbar. Zu berücksichtigen sind Variationen im Blutfluß, die Variationen im Anfluten des Kontrastmittels bedingen. Solche Abweichungen würden durch eine postmortale Angiographie aufgehoben werden, allerdings ist dann logistisch die Präparation der Kollateralen schwierig, da diese schnell erfolgen muß. Außerdem würde am Kollateralengewebe ein Ischämieschaden entstehen, der es unverwertbar machen würde. Schließlich birgt die Postmortem-Angiographie den Nachteil der Unwiederholbarkeit.

Beim Auswerten vor allem der Durchmesser der zuführenden Arterien ist zu bedenken, daß der gemessene Durchmesser vom Gefäßtonus und -widerstand in den folgenden Gefäßen abhängt, außerdem von der Injektionstechnik des Kontrastmittels, der Orientierung der Gefäße und dem Detektorabstand der Röhre und Rahmenanwahl ab [432]. Zur Standardisierung der Injektionstechnik wurde die zur Angiographieeinheit gehörende Pumpe verwendet, der Detektorabstand der Röhre wurde nicht verändert, die Rahmen wurden bei allen Versuchstieren gleich angewählt.

So bietet die DSA hier eher qualitative und semiquantitative Beurteilung der Kollateralarterien und Durchmessergrößen.

4.5.2 Molekulargenetik

Die Bestimmung der beteiligten und veränderten Faktoren, die bei der Arteriogenese eine Rolle spielen, wurde mittels mehrerer Techniken durchgeführt.

Dabei müssen zur Anwendung des Western Blots zu den Proteinen passende Antikörper vorhanden sein, beim Northern Blot passende Sonden. Sie sind zur Identifizierung neuer Proteine nicht geeignet. Die 2D-PAGE bietet schon mengenmäßig eine bessere Möglichkeit, neue Proteine zu identifizieren, die bei der Arteriogenese eine Rolle spielen. Da man nicht zuvor Sonden und Antikörper auswählen muß, hat

man hier die Möglichkeit unvoreingenommen vorzugehen: Es wurde nicht versucht, Proteine zu bestätigen, mit deren Vorkommen man rechnet oder die eine aufgestellte Hypothese bestätigen, ohne auf andere mögliche wichtige Gene zu achten, da man nur seine Hypothese bestätigen möchte, sondern man wird aufmerksam auf starke Veränderungen, die ggf. zwischen der Fistel- und der der Kontrollseite bestehen. Damit wird ermöglicht, Änderungen bei unerwarteten Proteinen zu identifizieren und interpretieren. Das Blotting ist bei neu zu erforschenden Gebieten eher als Bestätigung zu verwenden und die 2-D-PAGE ist vorzuziehen, da sie Möglichkeit bietet, neue Hypothesen aufzustellen durch die Entdeckung neuer Proteine.

Es ist daher sinnvoll, mittels mehreren Techniken Genexpressionsprofile zu bestimmen, zu bestätigen und zu vergleichen, um multifaktorielle Geschehen zu überblicken [262] [453] [15].

4.6 Ergebnisse

Die Studie hat gezeigt, daß es möglich ist durch eine Verlängerung der erhöhten Scherspannungseinwirkung auf die Gefäße, die Ausbildung von Kollateralkreisläufen zu verstärken.

Das aktinmodulierende Protein CFL ändert unter Scherspannungseinfluß seine Expression und Aktivität.

4.6.1 Kollateralgefäße

Die Anlage der AVF distal der Ligatur der A. fem. führte zu einem Anstieg in Größe und Zahl der korkenzieherartig gewundenen Kollateralgefäße auf der Fistelseite im Vergleich zur Seite, die nur ligiert wurde (s. Bilder 4.1(a)) und (s. Bild 4.1(b)). Die Fistel verhinderte den Abfall der Scherspannung, der im späten arteriogenetischen Prozeß durch Durchmesserzunahme bei den Kollateralen zustande kommt, auch bevor die Kollateralarterien das Leitgefäß ersetzen können.

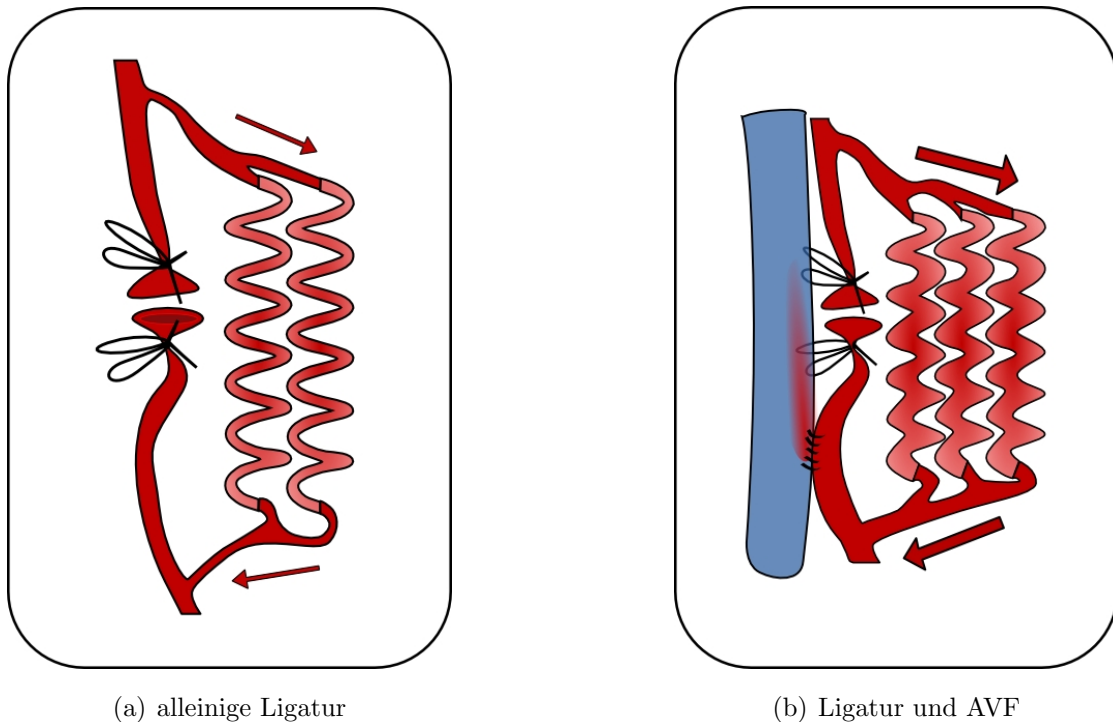


Bild 4.1: Schema der Kollateralentwicklung

4.6.1.1 Scherspannung als arteriogenetisch wirksame Kraft

Es ist bekannt, daß die Scherspannung beim Umbau von Gefäßen und damit auch der Arteriogenese eine wichtige Rolle spielt (s. Kapitel 1.2.5.4 und 1.2.8), die nicht nur für die Initiierung, sondern auch für den Fortbestand des ablaufenden Prozesses und schließlich für die Unterhaltung von Arterien durchmessern von Bedeutung ist [358] [133] [420] [182] [427] [244]. Die Scherspannung moduliert dabei im Falle der Occlusion eines Leitgefäßes die viel stärkere tangentielle Wandspannung, die ein bekannter Stimulus für die Proliferation von glatten Muskelzellen ist. Also ruht die Scherspannung bis zur „Notwendigkeit“ ihres Einsatzes, obwohl beide Kräfte benötigt werden [370]. Vorhergehende Studien haben gezeigt, daß der Kollateralkreislauf sowohl im Kaninchen- und Schweineherz [367] [365], als auch in Kaninchen- und Schweinehinterläufen sein Wachstum stoppt, bevor eine optimale Adaption erreicht ist [165] [328].

Dies wird auf die Verringerung der Scherspannung zurückgeführt, die auftritt, bevor die Kollateralen die benötigte Anzahl und Größe erreicht haben. Unser Modell ist so konzipiert, daß die Scherspannung erhöht wird, ohne dabei die tangentielle Wandspannung zu beeinflussen. Durch die Anlage der arterio-venösen Fistel wird ein großer und anhaltender Druckgradient geschaffen, der bewirkt, daß der Blutfluß durch die Kollateralen den Weg in das venöse Niederdrucksystem bevorzugt und nur ein kleiner Teil in die arterielle Peripherie abströmt, die ebenfalls dilatiert ist und wenig Widerstand leistet. So ist die tangentielle Wandspannung zumindest zu Beginn nicht erhöht, jedoch der Fluß und damit die Scherspannung extrem stark. Der sich daraus ergebenden zunächst funktionellen Dilatation schließt sich die durch Wachstum bedingte strukturelle Durchmesserzunahme der Kollateralgefäße an. Diese läßt die Scherspannung wieder abfallen, da sich diese zum Radius invers verhält. Allerdings fällt die Scherspannung nicht auf ursprüngliche Werte zurück, da der erhöhte Radius den Fluß, von dem wiederum die Scherspannung abhängt, steigen läßt. So bleiben der Fluß und entsprechend die Scherspannung trotz Durchmesserzunahme des Kollateralgefäßes erhöht, solange der Druckgradient hoch bleibt. Durch den vergrößerten Radius erhöht sich nun auch wieder die tangentielle Wandspannung, da der Druck im Gefäß wieder steigt und der Kollateralenwiderstand sinkt. Wahrscheinlich arbeitet das System eine kurze Zeit mit einer positiven Selbstverstärkung, indem das Wachstum den Fluß verstärkt und der Fluß das Wachstum [327].

Schließlich kehrt aber auch die Autoregulation der Gefäße in der Peripherie zurück, wenn die Kollateralgefäße in der Lage sind, den Fluß in genügenden Mengen zu liefern und den Blutfluß auf ein Minimum des für den metabolischen Umsatz geforderten Bedarfes bereitzustellen [80] [331] [330] [84] [317]. Das Gefäßremodeling ist beendet, wenn die Scherspannung auf einem homeostatischen Wert angelangt ist [196] [197] [248] [219].

So endet die Arteriogenese, wenn der Widerstand der arterio-venösen Fistel dem markant reduzierten Widerstand der Peripherie und der Kollateralen gleicht. Letztendlich bestimmt allein die Größe der arterio-venösen Fistel und darausfolgend deren Widerstand weitere Anstiege [369] [321].

In unserem Tiermodell führte die hohe Scherspannung zu einer erhöhten Anzahl an Kollateralen und zu deren Größenzunahme. Dies war auch möglich, nachdem der arteriogenetische Prozeß schon im vorgeschrittenen Stadium war: die Scherspannungserhöhung durch die AVF trat erst eine Woche nach der Ligatur ein, zu einem Zeitpunkt, in dem das „natürliche“ Potential der „ursprünglichen“ Scherspannung schon verwertet wurde.

Beobachtungen bei Experimenten mit AVF zwischen der A. carotis und der Vena jugularis oder A. und V. iliaca zeigten, daß der Durchmesser der proximal der AVF gelegenen Arterie zunimmt [394] [476]. Erfolgt eine Durchmesseränderung distaler Gefäße bringt dies auch eine Veränderung der Durchmesser in der proximalen Strombahn mit sich, da der erhöhte Blutfluß die Scherspannung erhöht und einen adaptiven Umbau bewirkt (s. Kapitel 1.2.8) [474] [85] [420] [219] [312] [313] [220]. Im Gegensatz dazu bewirkt ein erniedrigter Blutfluß und daraus resultierend eine erniedrigte Scherspannung eine arterielle Durchmesserreduktion; dies wird aber nur bei intaktem Endothel beobachtet [219], das ja auch bei der Scherspannungserhöhung und konsekutiver Durchmesserzunahme der betroffenen Gefäße eine große Rolle spielt (s. Kapitel 1.2.8).

Eine Erhöhung der Scherspannung über das bei einer Occlusion „natürlich“ vorhandene Niveau bewirkt über den Fortgang des Gefäßumbaus im Sinne der Arteriogenese das Entstehen einer neuen Strombahn, die näher an das Ideal, nämlich der gleichen Leitfähigkeit wie das occludierte Gefäß, herankommt. Mittels der AVF wird die noch vorhandene Wachstumsreserve der Kollateralarterien in stärkerem Maße ausgenutzt und damit dieser Umgehungsweg zur Hauptstrasse umgebaut, die für das abhängige Stromgebiet adäquat sorgen kann.

Abschließend läßt sich zusammenfassen, daß die Scherspannung, die bei Occlusion

eines Leitgefäßes entsteht, in einem komplexen Organismus, wie dem des Menschen oder in unserer Studie des Hausschweins nicht ausreicht, um ein Kollateralsystem auszubilden, das die notwendigen Blutmengen transportieren kann. Danach braucht es eine künstliche Aufrechterhaltung der Scherspannung, die durch die AVF erreicht wird, um Kollateralen mit entsprechenden Größen und Durchmessern zu erzielen.

4.6.1.2 Scherspannung als selektierender Faktor

Erhöhte Scherspannungseinwirkung bewirkt ein Gefäßumbau im Sinne eines Wachstumsvorganges; wirkt aber die Scherspannung auf bestimmte Gefäße mehr ein als auf andere, entwickeln sich erstere weiter, letztere erhalten nicht die benötigte „Dosis“ an Scherspannung. Somit gibt es bevorzugte Kollateralarterien, die vermehrt durchblutet werden und als Leitgefäßersatz fungieren und solche, die „nur“ als kleines Nebengefäß vorhanden bleiben oder sich verschließen (s. Kapitel 1.2.8 und Bilder 1.18(a) und 1.18(b)).

In einem theoretisch-mathematischen Modellexperiment mit einem künstlichen Gefäßnetzwerk, durch das konstanter Fluß mit einem konstanten Druck mit variablen Widerständen geleitet wurde, mit dem Ziel den Einfluß der Scherspannung in engen physiologischen Grenzen zu prüfen und zu berechnen, hat sich keine Stabilität einstellen können. Es wurden die wenigen großen Verbindungen bevorzugt auf Kosten der kleineren, die sich zurückbildeten. Daraus wurde geschlußfolgert, daß diese Ergebnisse nicht kompatibel sind mit anatomischen und physiologischen Beobachtungen in stabilen Netzwerken, wie sie in einem komplexen Mechanismus vorkommen. Die Scherspannung konnte demnach nicht die wichtigste formende Kraft sein, weil das mathematische Modell vorhersagte, daß in einem Netzwerk von parallelen Arteriolen mit kleinen Variationen im Durchmesser, die größeren begünstigt werden und wachsen und die kleineren sich zurückbilden würden. Das Ergebnis wäre eine einzige arteriovenöse Verbindung. Es wurde angezweifelt, daß dies den natürlichen Ablauf wiedergeben würde [168] [145] [173]. Jedoch ist es genau das, was natürlicherweise geschieht und der Prozeß der Regression der kleinen Arteriolen, die anfangs in der Entwicklung teilnahmen, wird „pruning“, d.h. Ausdünnen genannt in Analogie zu dem Prozess in der Entwicklung des Embryos (s. Kapitel 1.2.8 und Bilder 1.18(a) und 1.18(b)) [165]. Dabei kommt es zur Regression des Gefäßes durch intimale Proliferation und Endothelzellapoptose [390]

[265]. Natürlich spielen auch metabolische Faktoren und Mediatoren eine wichtige Rolle, die ein Abweichen vom vorausgesehenem Verlauf bewirken können [329] [331], aber der mechanische Stimulus ist der stärkste gefäßmodulierende Reiz [428] [328] [330]. Durch einen erhöhten Fluß und damit höhere Scherspannungseinwirkung wird eine Regression verhindert [478].

Dies konnte auch im Verlauf dieses Versuchsmodells und in weiteren Studien beobachtet werden: das oben beschriebene mathematische Netzwerk verhält sich exakt so wie das Kollateralennetzwerk, das ja auch große Kollateralen favorisiert und Regression der kleineren bewirkt [144] [212] [368] [362] [373]. Dies entspricht den unter (s. Kapitel 1.2.5.4) beschriebenen Grundsätzen von Clarke, Thoma und Murray. Thoma beschreibt im Gesetz der Histiogenese das Verhältnis zwischen dem Durchmesser des arteriellen Systems und der Flußgeschwindigkeit im sich entwickelnden Hühnerembryo [416], Clarke die Atrophie kleiner Aa. bei Blutflußreduktion [79] und Murray die These, daß das Gefäßsystem sich so optimal nivelliert, daß mit minimaler Leistung ein adäquater Blutfluß vorhanden ist [275] [274].

Es bedarf also einer formenden Kraft, durch deren Einwirkung genügend das Leitgefäß ersetzende Kollateralarterien entstehen, die leistungsoptimiert das Stromgebiet versorgen.

Diese selektierende Kraft im arteriogenetischen Prozeß ist die Scherspannung. Regression von vielen kleinen Kollateralen wird hingenommen, um wenige große Kollateralen persistieren zu lassen. Diese Tatsache findet Beachtung im Hagen-Poiseuille-Gesetz, das vorhersagt, daß es enorme Energieverluste gibt, wenn der zusammengesetzte Gefäßquerschnitt auf viele Gefäßgebiete verteilt wird. Indem die Scherspannung auf bestimmte Gefäße mehr einwirkt, werden diese „ausgewählt“ und wachsen, um optimale Leitverhältnisse bei wenig Energieverlust zu bewerkstelligen. In diesem Zusammenhang ist die korkenzieherartige Form der Kollateralen von Bedeutung (s. Kapitel 4.6.1.3).

Interessant ist hier auch die Beobachtung, daß die in die Intima der Kollateralen gewanderten glatten Muskelzellen bei Verringerung der Scherspannung in der Intima bleiben (Medialisation der Intima). Bei Regress der Kollaterale verschließen sie wie oben erläutert das Lumen (s. Kapitel 1.2.8). Wenn aber die Scherspannung noch einmal erhöht wird, experimentell bei erneutem Verschuß der Leitarterie, klinisch denkbar als Reocclusion einer zuvor thrombembolktomierten oder endarteriektomierten Arterie, dann dienen die glatten Muskelzellen in der Intima der nun wieder mehr perfundierten Kollateralen als Reservelager und das Kollatera-

lenwachstum vollzieht sich schneller, als es sich nach der ersten Occlusion vollzogen hat [369] [478].

Es kommt zu einem Boost-Effekt, vergleichbar mit einem Gedächtnis- bzw. Lern-effekt bei der Antikörperbildung: Ein bekanntes Agens bewirkt bei nochmaligem Auftreten eine schnellere Reaktion. So geschieht es auch bei den Kollateralen: Ein nochmaliges Einwirken der Scherspannung lässt den Prozeß der Arteriogenese schneller starten und fortschreiten, da sich die Muskelzellen bereits in einem fortgeschrittenen Stadium befinden, in dem sie bis zur neuerlichen Aktivierung „eingefroren“ waren.

Durch Scherspannung und ihre Einwirkung auf die sich entwickelnden Kollateralarterien findet eine Selektion statt und die optimal lokalisierten Gefäße, die mehr Scherspannungseinwirkung erfahren, wachsen stärker und bleiben als versorgende Gefäße bestehen.

4.6.1.3 Erscheinungsbild der Kollateralen: Korkenzieherstruktur

Kollateralen sind keine linearen Röhren, sondern mehr oder weniger korkenzieherartig gewundene Gefäße. Sie haben ihre Elastizität in Längsrichtung verloren. Es kommt durch diese Struktur zu Einbußen beim Bluttransport und Wachstum. Die Vielzahl der kleinen Gefäße, die eine occludierte Arterie ersetzen sind ineffizient gemäß dem Poissieuille'schen Gesetz: Durch den Kurvenreichtum haben die Kollateralen Überlänge; da der Widerstand linear mit der Länge zunimmt kommt es zu hohen Energieverlusten. Außerdem verstärken die Zentrifugal- und Trägheitskräfte den Widerstand nochmalig [407].

Laut der die LWS beschreibenden Formel (s. Kapitel 1.2.5.2) steigt diese mit dem Gefäßradiusquadrat und dem im Gefäß herrschenden Druck [369]. Nach Ligatur kommt es im Tiermodell zu einer Radiuszunahme in den Kollateralen. Nach Anlage der AVF entsteht ein enormer Druckgradient zwischen den Kollateralen und der Peripherie. Die erhöhten Radius- und Druckwerte bewirken eine Verringerung der Wanddicke. Durch diese initiale funktionelle Dehnung der Arterie wird diese in ihrer morphologischen Struktur instabil. Es kommt zu einer Längsdehnung zwischen zwei fixen Punkten und dies führt zur Korkenzieherbildung; diese Gefäße haben ihre Längselastizität nicht mehr [185]. Es stellt sich hier die Frage, ob die Kollateralen zu schwach sind, den enormen Drücken [187], die plötzlich auf sie

einwirken, standzuhalten und ihre Elastizität nicht genügend ausgeprägt ist, da sie „auszuleiern“ scheinen.

An manchen Stellen der Kollateralwand kommt es durch die Tortuosität zu mehr Aktivierung und an anderen weniger, damit bei ersteren zu einer Mehradhäsion von Monocyten durch mehr Integrine und mehr Chemotaxine. Abschnittsweise vollzieht sich eine höhere und niedrigere Proliferationsrate und verstärkt die asymmetrische korkenzieherartige Morphologie [157] [278]. So findet durch die Ausbildung der Windungen eine Präselektion statt und die dann nur asymmetrisch einwirkenden Kräfte haben eine endgültige Selektion wie bei (s. Kapitel 4.6.1.2) beschrieben zur Folge, da Scherspannung und Fluß nicht mehr konstant auf alle Gefäßabschnitte einwirken [212] [86]. Vergleichbar vollzieht es sich bei der Arteriosklerose, bei der die Läsionen an Stellen mit niedriger Scherspannung und komplexem Flußmuster beobachtet werden. Die Scherspannung scheint hier nicht mehr die schützende Aktivierung des Endothels zu bewirken [212]. Dadurch wird diese besonders unterlegene Stelle zur Prädilektionsstelle für einen Plaque, der sich ohne entgegenwirkenden Einfluß der Scherspannung weiterentwickeln kann (s. Kapitel 4.2.4).

Der Grad an Verwindungen ist entscheidend für den Erhalt der Kollaterale. Bei geringem effektivem Durchmesser, hohen Energieverlusten und wenig Blutfluß kommt es im weiteren Fortgang der Arteriogenese durch Selektion zur Elimination der stark geschlängelten Kollateralen, da hier nun wieder die in Kapitel 1.2.5.4 beschriebenen Grundsätze von Clarke, Thoma und Murray greifen.

Damit ist der Grad der Tortuosität der Kollateralen für ihre Ausbildung von großer Bedeutung und die Scherspannung wirkt hier als wachstumfördernder und selektierender Faktor (s. Kapitel 4.6.1.2).

Das Längenwachstum zur Verringerung der LWS wird nach dem akuten Längszug auf Dauer durch die glatten Muskelzellen vermittelt. Diese Zellpopulation bewirkt auch einen Umbau als Antwort auf veränderte TWS. Sie können zwischen dehnenden Kräften, die in zwei verschiedenen Richtungen wirken unterscheiden und dementsprechend unabhängige adaptive Umbauvorgänge auslösen [185], [219] [218]. Die glatten Muskelzellen zeigen dabei eine circumferentiell orientierte Ausrichtung. Aus dieser Tatsache erklärt sich auch das Unvermögen, die LWS zu reetablieren [187] [175]. Durch die hauptsächlich circumferentiell angeordneten glatten Muskelzellen ist deren längskontraktile Funktion verhindert. Es scheint nur eine Reaktion in Richtung Wachstum möglich zu sein, aber eine kontrollierte Apoptose

zur Verringerung der Länge scheint nicht möglich zu sein [38].

Beobachtungen zeigen, daß die dehnende Längskraft bis zu einem Maximalwert am 21. Tag nach Leitgefäßocclusion stetig ansteigt, im Gegensatz zum Proliferationsgeschehen und der Durchmesseränderung, die ein Maximum während der ersten Woche nach Occlusion hat. Dies zeigt, daß Kollateralwachstum ein biphasischer Prozeß ist, der beginnt mit einer Phase der rapiden Proliferation, gefolgt von extensivem Umbau in radialer und longitudinaler Richtung, wobei der Umbau in Längsrichtung länger anhält und dadurch in Relation zu stark ausgeprägt ist [20] [164]. Dies könnte eine zusätzliche Erklärung für die Überlänge sein.

Außerdem entsteht bei den Umbauvorgängen nach Leitgefäßverschluß durch die Matrixdegeneration viel Platz in der Umgebung des Kollateralgefäßes. Die Kollaterale verbleibt in einer relativen Umgebungsleere, so daß keine Möglichkeit für eine verankernde Aufhängung gegeben ist, um Längsspannung zwischen zwei fix aufgehängten Punkten zu etablieren, ein weiterer Faktor in Richtung kornenzieherartigen Verwindungen [175] [38].

Bei Betrachtung der kornenzieherartigen Struktur der Kollateralen darf man nicht vergessen, daß dies Gefäße sind, die im Laufe des Lebens mitaltern und im Alter kommt es bei Arterien zu einem langsamen Längenwachstum. So kommt es auch zu dem Kinking der Aorta, der größten Arterie des Menschen [225] [92]. Daher ist zu bedenken, daß die Tortuosität der Kollateralen schon vor dem Leitgefäßverschluß da gewesen sein könnte und nicht erst durch die akut auftretenden veränderten hämodynamischen Kräfte ausgebildet wurde. Andererseits schwindet die Tortuosität der Kollateralen nicht, wenn man eine Occlusion schon im jungen Alter durchführt [170], so wie es in dieser Studie auch war. Die Hausschweine waren etwa 14 Wochen alt und zeigten in der DSA geschlängelte Kollateralen. Vielleicht haben die Kollateralen die Tendenz dazu, eher zu altern und ein Kinking zu zeigen, da sie eigentlich nur für die Embryonalzeit angelegt sind, in Analogie zu den Umbilikalgefäßen, die schon einen Monat nach Geburt einen hohen Gehalt an lipidhaltigen Zellen i.S. einer Alterung aufweisen [402] [410].

Wenn man annimmt, die Kollateralarterie hatte zu Beginn der Gefäßentwicklung die gleiche genetische Information, wie das parallel laufende und später bevorzugte Leitgefäß, dann würde das bedeuten, daß die Kollateralarterie so lang werden kann wie das ursprüngliche Leitgefäß. Demnach wäre die Kollaterale das Reservegefäß, das in seiner Entwicklung stehengeblieben ist, da ein anders mehr durchflossenes Gefäß der gleichen Leitbahn optimalere Voraussetzungen hatte, Blutdurchfluß

adäquat bereitzustellen. Wenn das Kollateralgefäß aber nun gefordert wird und die Scherspannung das Programm weiterlaufen läßt, wächst dieses auf vorprogrammierte Länge und die Schlingelung ist eine unverhinderliche Konsequenz der absoluten räumlichen Begrenzung.

Mit hoher Wahrscheinlichkeit kommt die korkenzieherartige Struktur der Kollateralen durch das Zusammenwirken der erhöhten Längskraft, der unhomogenen Scherspannungseinwirkung, der circumferentiellen Anordnung der glatten Muskelzellen, der verlängerten Wachstumsphase in Längsrichtung, des durch die Matrixdegeneration bedingten Fehlens der Aufhängung und des genetischen Programmes zustande.

Was auch immer der Hauptfaktor für die typische Kollateralenstruktur sein mag, wichtig ist, daß die erhöhte Gefäßlänge durch Widerstandserhöhung zu Energieverlust und einem verringerten Fluß [407] [366], [360] und daraus resultierend zu einer verringerten Scherspannung führt, was auch bei entsprechend großen Kollateralen ein selbstlimitierender Faktor für die Arteriogenese ist [370] [185]. Beim Gefäßtraining beobachtet man Kollateralen mit weniger Tortuosität. In der Annahme, daß Gefäßtraining die Scherspannung erhöht, würde dies bedeuten, daß auch in unserer Studie die Kollateralen der Fistelseite, die erhöhter Scherspannung ausgesetzt sind ein ausgeprägteres Wachstum mit weniger Tortuosität zeigen. Morphologisch ist diese Annahme aber aus den Angiogrammen nicht zu bestätigen, da die Kollateralen auf beiden Seiten sehr variabel ausgeprägt sind und man nicht zwei korrespondierende Kollateralen zum direkten Vergleich auswählen kann. Die Anzahl der Windungen müßte in Relation zum Durchmesser betrachtet werden: auch bei hoher Schlingelung ist der Durchmesser von entscheidender Bedeutung, d.h. ein großes Kollateralgefäß kann durchaus viele Windungen aufweisen, aber es wird positiv selektioniert, wenn es genügend Durchfluß bietet, um unter Scherspannung zu wachsen

4.6.2 Molekulargenetik

Indem die Genexpression der Kollateralen der Kontroll- und Fistelseite verglichen wurde, konnte man Proteine identifizieren, die eine Rolle im arteriogenetischen Prozeß spielen und deren gesamte oder seitenabhängige Ausprägung unterschiedlich ist. CFL gehören zu den Proteinen, deren Expression und Aktivität durch

Scherspannung verändert wird. Damit kommt es durch Einwirkung auf CFL zu einer scherspannungsbedingten Änderung der Aktindynamik, die bei Bewegungsvorgängen von Zellen eine wichtige Rolle spielt.

4.6.2.1 ADF-Expressionsveränderung durch Scherspannung

Der ADF-Gehalt zeigt im Western Blot einen höheren Wert auf der Ligatur- als auf der Fistelseite. Unter dem ADF sind CFL 1 und 2 und weitere Mitglieder der ADF-Familie zusammengefaßt. Aus der Zusammenschau mit den Ergebnissen aus dem Northern Blot läßt sich erkennen, daß CFL 2 in einer mehr als doppelt höheren Menge als CFL 1 sowohl auf Fistel- als auch auf Ligatuseite vorhanden ist. Hier erklärt sich der im Western Blot vermehrte ADF-Gehalt auf seiten der Ligatur, da CFL 2 hier vermehrt exprimiert wird und mengenmäßig einen höheren Anteil als CFL 1 aufweist, das auf der Fistelseite vermehrt exprimiert wird. Diese Veränderung ist aus dem Western Blot nicht ersichtlich, da CFL 1 hier mengenmäßig unter den ADF deutlich weniger ausmacht als CFL 2.

Mittels des Western Blots wurde lediglich die veränderte Expression zwischen Ligatur- und Fistelseite, die man bei der 2D-PAGE beobachtet hatte, bestätigt. Interessant für die Interpretation ist aber nicht der Gesamtgehalt an ADF oder beiden CFL auf Ligatur- und Fistelseite, vielmehr ist der relative Unterschied zwischen CFL 1 und 2-Expression auf beiden Seiten interessant, den man erst aus den Ergebnissen des Northern Blots erkennen kann.

4.6.2.2 CFL-Expressions-Veränderung durch Scherspannung

Unter Einwirkung der Scherspannung ist die Expression von CFL 1 und CFL 2 auf Fistel- und Kollateralseite unterschiedlich. Daran ist zu erkennen, daß sich die beiden Seiten in einem unterschiedlichen Stadium der Arteriogenese befinden.

Es finden sich höhere Beträge an RNA von CFL 1 auf seiten der Fistel im Vergleich zur Ligaturseite. Die Werte für CFL 1 der Fistelseite gleichen aber denen der Kontrollarterie. Allerdings ist der Gehalt an CFL 2 auf seiten der Ligatur sowohl im Vergleich zur Kollateralen der Fistelseite als auch zur Kontrollarterie erhöht.

Dies ist eine Momentaufnahme zum Zeitpunkt des Terminalexperimentes, also nachdem die Ligatur der A. fem. beidseits zwei Wochen und die Fistel auf der linken Seite eine Woche bestanden hat. Da die Ligaturseite ohne Fistel keiner verstärkt erhöhten Scherspannung mehr ausgesetzt ist, sondern diese sich durch

den arteriogenetischen Prozeß immer mehr den präocclusiven Werten angeglichen hat und der arteriogenetische Prozeß schon fortgeschritten ist, scheint das muskelspezifische CFL 2 eher in der späten Phase der Arteriogenese bei der Etablierung und Maturation der Kollateralen wichtig zu sein. In dieser Phase, die nach der etwa 14-tägigen Proliferations- und Synthesephase folgt, redifferenzieren sich die glatten Muskelzellen wieder. Der erhöhte Gehalt an muskelspezifischem CFL 2 entspricht dieser Phase.

Auf seiten der Fistel, wo sich der arteriogenetische Prozess noch in der Synthesephase befindet, findet sich das muskelspezifische CFL 2 erniedrigt, was zum dedifferenzierten Status der glatten Muskelzellen paßt [396] [56]. Das muskelunspezifische CFL 1 zeigt sich entsprechend erhöht im Vergleich zur Ligaturseite, im Vergleich zur Kontrollarterie aber nicht wesentlich verändert. Damit scheint das Ligaturseitengewebe eine Momentaufnahme in der Maturationsphase der Kollateralen und das Fistelseitengewebe die der Synthesephase zu zeigen. Eine Veränderung i.S. einer erniedrigten Expression erfährt das CFL 2 gemäß dem Differenzierungsgrad der glatten Muskelzelle in der De- und das CFL 1 in der Redifferenzierungsphase (s. Tabelle 4.1).

<i>Ligaturseite</i>	<i>Fistelseite</i>
seit zwei Wochen bestehende Ligatur der A. femoralis	seit zwei Wochen bestehende Ligatur der A. femoralis
Scherspannung → präocclusive Werte	seit einer Woche bestehende Fistel zwischen A. und V. femoralis
Cofilin1 ↓	Scherspannung ↑
Cofilin2 ↑	Cofilin1 ↑
Redifferenzierungsphase der glatten Muskelzellen	Cofilin2 ↓
Maturationsphase	Dedifferenzierungsphase der glatten Muskelzellen
	Synthesephase

Tabelle 4.1: Momentaufnahme der CFL-Expression zum Zeitpunkt des Terminalexperimentes

In Studien mit Ligatur der A. fem. bei Kaninchen zeigte sich aber eine Erhöhung der Expression von CFL 2 cDNA bei Messungen nach 24 Stunden und nach drei

Tagen, also in der frühen Phase der Arteriogenese [43].

Das kann man damit erklären, daß die Zellen beginnen zu proliferieren und in den ersten drei Tagen nach Occlusion die höchste Mitoserate zeigen [57] [427] [56]. Die Scherspannung leitet die Proliferation der Zellen ein u.a. durch FGF, das mitogen wirkt. Es kommt zunächst zur Expressionserhöhung des in den -differenzierten und sich in Proliferation befindenden- glatten Muskelzellen vorhandenen CFL 2. Der CFL 2-Gehalt steigt. Erst dann schließt sich die Synthesephase an und damit die Dedifferenzierung der glatten Muskelzellen in den entsprechenden Synthesephänotyp. Dazu paßt auch die Beobachtung, daß die frühe CFL 2-Erhöhung mit der Herunterregulation muskelspezifischer Proteine einhergeht [58] [43] [484]. Hier fließen die Proliferations- und Synthesephase nahtlos ineinander über. So sind in dieser Übergangszeit einige bis spät in der Proliferationsphase exprimierte muskelspezifische Faktoren, wie das CFL 2 noch erhöht, aber gleichzeitig andere bereits weniger vorhanden, da diese in der Synthesephase früh reduziert werden. In dieser Phase befindet sich die Fistelseite: CFL 2 ist noch so hoch wie die Werte der Kontrollarterie, obwohl diese ja durch ihren Differenzierungsstatus deutlich mehr CFL 2-Gehalt aufweisen müsste als die Kollateralarterie der Fistelseite, die sich in der dedifferenzierten Phase befindet. Bedenkt man aber, daß der Fistelseite der weitere Abfall von CFL 2 noch bevorsteht erklärt dies den gleichen CFL-Gehalt in Kontroll- und Kollateralarterie der Fistelseite, denn so ist es in diesem Moment auch, aber in einer dynamischen Beobachtung würde es im weiteren Verlauf zu einem Abfall der CFL 2-Werte auf der Fistelseite kommen. Im weiteren Fortlauf wird CFL 2 inhibiert, u.a. vom Mitogen FGF [241] [239] [114]. Die FGF-Expression der glatten Muskelzellen ist bei erhöhtem Fluß an Tag drei und sieben gesteigert und FGF wird eine wichtige Rolle beim Kollateralenwachstum vor allem in der Initiierungsphase zugeschrieben [89] [321] [394] [399] [468] [116]. Die Erhöhung des FGF und der dann stattfindende Abfall von CFL2 paßt zeitlich in das beschriebene Schema der Arteriogenese (s. Kapitel 1.2.8).

Das CFL 1 wird in der Proliferationsphase nicht verändert, es ist und bleibt für die muskelunspezifischen Prozesse als muskelunspezifisches Protein vorhanden.

Im Verlauf der Kollateralenentwicklung wird wie beschrieben CFL 2 zunächst in der Proliferationsphase erhöht und dann in der Synthesephase erniedrigt. Dies passiert auf Ligatur- und Fistelseite, aber die Momentaufnahme der RNA-Expression zum Zeitpunkt des Terminalexperimentes zeigt nur, daß die Ligaturseite ein erniedrigtes CFL 1 und ein erhöhtes CFL 2 im Vergleich zur Fistelseite und Kontroll-

larterie aufweist. Das bedeutet, daß CFL 2 auch auf der Kontroll- und Fistelseite nach Durchführung der Ligatur zunächst erhöht war. Dann wurde es auf beiden Seiten durch Scherspannungserhöhung nach Ligatur beim Eingang in die Synthesephase erniedrigt und im weiteren Verlauf der Arteriogenese mit Erniedrigung der Scherspannung ist die Expression in der Maturationsphase wieder angestiegen. Dieses Stadium findet man in der Momentaufnahme auf der Ligaturseite und würde man auf der Fistelseite ebenso beobachten, wenn diese in die späte Phase der Arteriogenese eintritt (s. Tabelle 4.2).

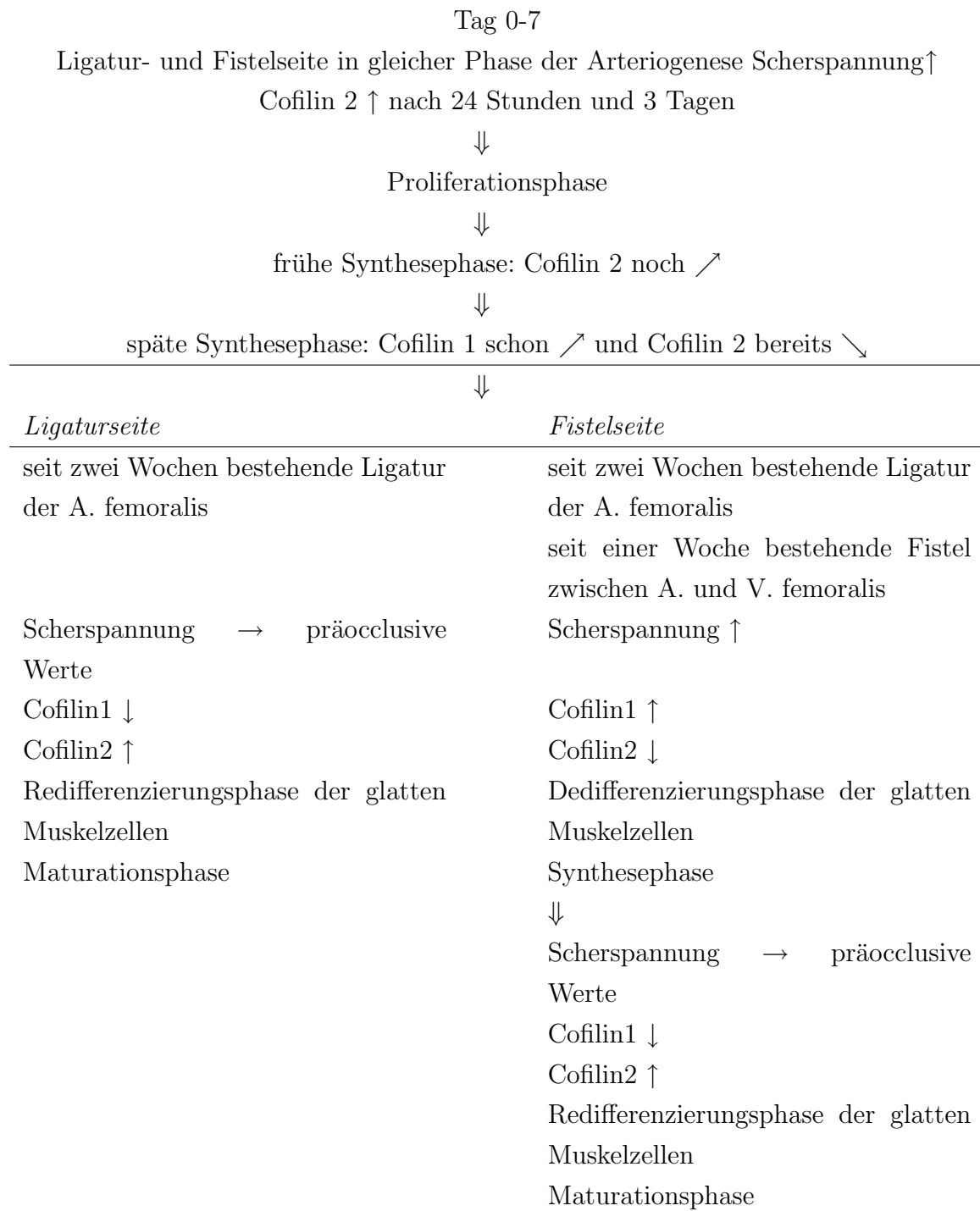


Tabelle 4.2: Angenommener Verlauf der CFL-Expression im Fortgang der Arteriogenese

Zum Ende der Synthesephase wird die Redifferenzierung der glatten Muskelzellen zum kontraktilen Typ durch Abnehmen der zuvor erhöhten Scherspannung

eingeleitet und es steigen die muskelspezifischen Proteine und damit auch CFL2 wieder an. Es hat in dieser Phase den höheren Anteil und scheint überschießend erhöht, das muskelunspezifische CFL1 scheint überschießend erniedrigt. Es ist anzunehmen, daß es mit zunehmender Maturation der Kollateralen zu einer Angleichung der CFL1- und CFL2-Werte kommt, die denen einer einfachen Kontrollarterie gleichen. Ein Grund für die überschießende Erhöhung könnte eine gewünschte Beschleunigung der Migrationsprozesse sein, denn durch den Mehrgehalt CFL verläuft die Aktindynamik schneller und außerdem wird durch erhöhtes CFL auch eine Mehrexpression des Aktins ausgelöst, das zur Lokomotion zur Verfügung steht [171] [8]. Es ist nicht genau bekannt, wann das CFL2 in der späten Phase der Arteriogenese seinen höchsten Anstieg aufzeigt. Denkbar wäre, daß es bereits vor unserer Messung in der Überlappungsphase zwischen Synthese und Maturation sein Maximum hatte und nun während der späten Maturation langsam auf Werte fällt, die denen einer normalen Arterie gleichen. Dann wird ein Gleichgewichtszustand zwischen polymerisiertem und depolymerisiertem Aktin erreicht, bei dem das erstere dominiert. Polymerisiertes Aktin bewirkt eine Erhaltung des kontraktilen Phänotypen der glatten Muskelzellen [10]. So ein Verhalten würde auch zu der späten Phase der Arteriogenese passen, wenn die Migrationsprozesse abnehmen (s. Kapitel 1.2.8).

Aus dem Expressionsmuster lässt sich der Schluß ziehen, daß nach Anlage der AVF der beidseits fortgeschrittene arteriogenetische Prozeß durch die nun erneut erhöhte Scherspannung neu gestartet wurde und die Fistelseite sich demnach noch in einem nicht so fortgeschrittenen Stadium befindet wie die Ligaturseite, in das sie aber im weiteren Verlauf kommen wird.

Durch den Neustart und längeren Fortgang der Arteriogenese kommt es auf der Fistelseite zu in Anzahl und Größe vermehrten Kollateralen.

Pathologisch werden erhöhte CFL-Werte in denervierten [387] und dystrophischen Muskeln gefunden [154] [267].

CFL2 ist mit Myopathien verbunden. Während der frühen Phase der Regeneration im Mausmodell, in dem man Muskelschäden induziert, ist CFL2 runterreguliert und zum Teil ersetzt durch CFL1. In einem späteren Stadium der Regeneration, ist das phosphorylierte CFL2 stark reduziert und das dephosphorylierte dominiert. CFL2 spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der normalen Muskelfunktion

und Umbauvorgängen bei der Muskelregeneration. Vergleichbare Beobachtungen wurden bei chronisch regenerierenden dystrophin-defizienten Mäusemuskeln und Muskeln von an der Duchenne-Muskeldystrophie erkrankten Patienten gemacht. Dort kommt es zu konstanten Zyklen der Muskelfasernekrose und -regeneration. Es kommt zu starken Veränderungen im Transkriptionsmuster, z.B. persistiert die Expression des Herzaktins in Duchenne-Muskelfasern, was darauf hinweist, daß es zu einer chronischen Dedifferenzierung der glatten Muskelzellen kommt [71].

Dieses Verhalten von CFL deckt sich mit den Ergebnissen unserer Studie. Bei den Umbauvorgängen kommt es zur Dedifferenzierung der glatten Muskelzellen und dann ist das muskelunspezifische CFL1 von Bedeutung, während bei der Etablierung und Maturation der Kollaterale und damit der Redifferenzierung der glatten Muskelzellen wieder das muskelspezifische CFL2 eine Rolle spielt.

4.6.2.3 CFL-Aktivitätsregulation durch Scherspannung

Scherspannung löst den arteriogenetischen Prozess aus und bewirkt die Reorganisation des Cytoskeletts [123]. Wie in der Einleitung (s. Kapitel 1.3) beschrieben spielen CFL bei der Aktindynamik eine wichtige Rolle. Diese Proteine werden nicht nur wie oben beschrieben in ihrem Expressionsmuster durch die Scherspannung beeinflusst, sondern auch in ihrer Aktivität, so daß die Scherspannung auch über diesen Weg aktinmodulierend wirkt. Die Mechanotransduktion zwischen Scherspannung, CFL und schließlich dem auf Aktin basierenden Cytoskelett ist in Abb. (s. Bild 4.2) dargestellt.

Scherspannung wirkt über Integrine der Endothelzellmembran auf die integri-nassozierte Rho-GTPase ein. Dadurch wird die Kinaseaktivität der Rho-assozierte Kinase (ROCK) erhöht [143] [235] [406] [430] [458] [128] [7] [449].

Es folgt eine Phosphorylierung der LIMK an Position Threonine 508 [99] und ihre Aktivität wird gesteigert [12] [292] [253]. Als Folge davon wird CFL phosphoryliert [207] [237]. Durch die CFL-Phosphorylation wird dessen aktinbindende Aktivität aufgehoben, die Aktinfilamente werden freigegeben und können an benötigter Stelle polymerisieren [27] [207] [12] [484] [8] [10] [4] [297] [201] [442].

Die Aktivität der CFL wird aber im Sinne des pulsatilen Auftretens der Scherspannung beeinflusst, so daß es zu einer schnellen Phosphorylation und Dephosphorylation und damit zu einem schnellen Wechsel erhöhter und erniedrigter Affinität von CFL zu Aktin kommt [339] [442]. So wird F-Aktin mit großer Geschwindigkeit ge-

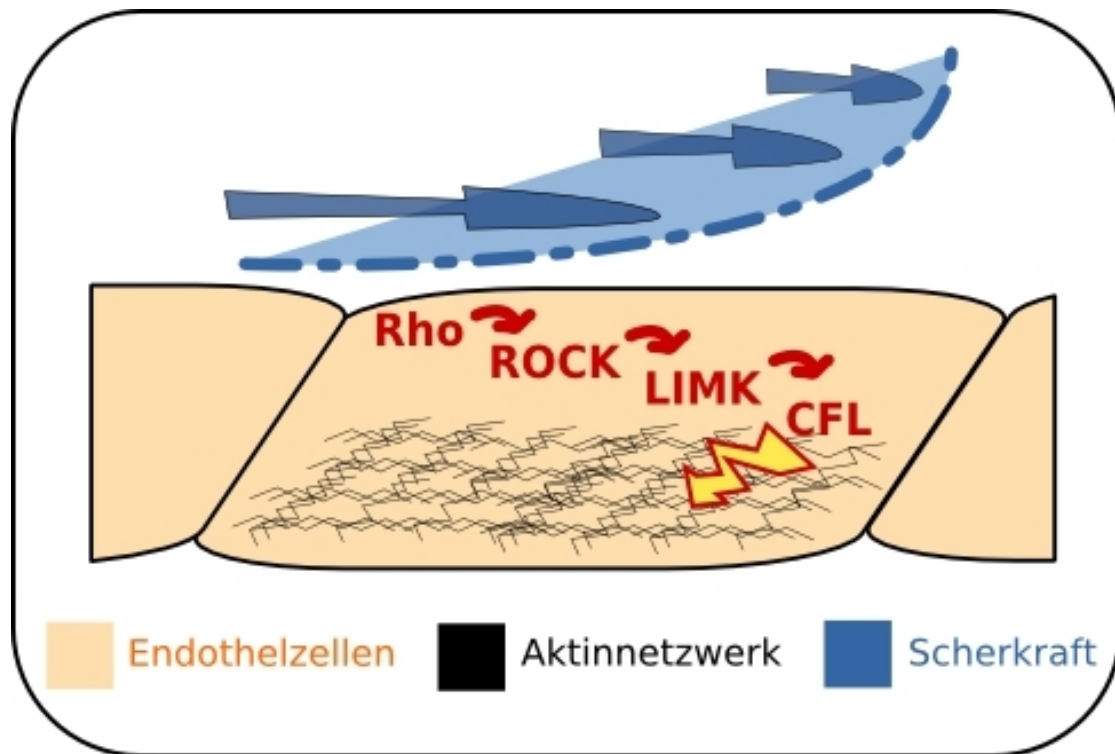


Bild 4.2: Mechanotransduktion in einer Endothelzelle, über die Scherspannung über Zwischenschritte Einfluß auf CFL und damit Aktin hat

trennt, es entsteht an CFL gebundenes G-Aktin, welches wieder freigegeben wird, wenn die Affinität des CFL durch Phosphorylierung sinkt. Das G-Aktin kann dann an benötigter Stelle wieder polymerisieren und so eine Zellbewegung bewirken. Auch wenn beschrieben wurde, daß die Reaktion des Transkriptionsfaktors Rho nach über 15 min und die Phosphorylation von CFL erst nach über einer Stunde nach Einwirken des mechanischen Stimulus einsetzen [10], kann dieser schnelle Wechsel an verschiedenen Stellen der Zelle in hoher Geschwindigkeit erfolgen und eine Bewegung verursachen, denn es existieren immer phosphoryliertes und unphosphoryliertes CFL gleichzeitig in der Zelle [268]. Daher scheint es sich hier um eine ständige Verschiebung eines Gleichgewichts zwischen hoch- und niedrigaffinem CFL zu handeln.

Als weitere Möglichkeit mit der Scherspannung die Aktivität von CFL beeinflussen kann, ist noch der Weg über PIP und PIP2 zu nennen. Hier bewirkt der mechanische Reiz eine vermehrte Synthese von PIP2 durch Phosphorylierung von PIP [302] [454]. Wie in der Einleitung erläutert (s. Kapitel 1.3), supprimiert PIP2 die

Aktivität von CFL und beeinflusst dessen Verhalten gegenüber Aktin wie oben beschrieben und damit die Zellmotilität.

Über diese Regulationsmechanismen der CFL wirkt der mechanische Einfluß der Scherspannung auf die Zellmotilität über aktinmodulierende Prozesse und Modifikationen entlang des Cytoskeletts ein. Neben den vielen beschriebenen und noch unbeschriebenen Vorgängen scheint dies ein wichtiger Schritt im arteriogenetischen Geschehen zu sein, da die Zellmigration eine große Rolle spielt.

4.7 Schlußfolgerung

1. Die zeitversetzte Anlage einer AVF distal der Akutligatur der A. fem. förderete die Ausbildung von Kollateralkreisläufen. Durch die Fistel wurde die Scherspannung länger auf erhöhtem Niveau gehalten als sie mit der alleinigen Ligatur gewesen wäre. Der Abfall der Scherspannung, der im späten arteriogenetischen Prozeß durch Durchmesserzunahme bei den Kollateralen zustande kommt, auch bevor die Kollateralarterien das Leitgefäß ersetzen können, wurde somit auf der Fistelseite verhindert. Dadurch kam es zu einem längeren Fortgang der Arteriogenese als auf der Kontrollseite mit alleiniger Ligatur, so daß das neu entstehende Gefäßsystem näher an das Ideal herankommt, nämlich die gleiche Leitfähigkeit wie das verschlossene Gefäß zu erbringen. Mittels der AVF wurde die noch vorhandene Wachstumsreserve der Kollateralarterien in stärkerem Maße ausgenutzt und damit dieser Umgehungsweg zur Hauptstrasse umgebaut, die für das abhängige Stromgebiet adäquat sorgen kann.

2. Auf molekulare Ebene wurden durch den mechanischen Reiz der Scherspannungserhöhung CFL1 und 2 als Regulatorproteine der Zellmotilität auf Ligatur- und Fistelseite verändert exprimiert und aktiviert. Bei der Arteriogenese spielt die Bewegung und Mitose von Endothelzellen, Monocyten und glatten Muskelzellen eine wichtige Rolle. Das für glatte Muskelzellen unspezifische CFL1 findet sich im Vergleich zur Ligaturseite vermehrt auf der Fistelseite, die noch inmitten der verlängerten Kollateralentwicklung steckt, das für glatte Muskelzellen spezifische CFL2 findet sich erhöht auf der Ligaturseite, die ihre Kollateralentwicklung zum großen Teil bereits abgeschlossen hat und eine spezifische Differenzierung bezüglich der Muskelproteine aufweist. Dies zeigt, daß durch die AVF der arteriogenetische Prozeß verlängert wird, wodurch die Ausbildung von suffizienteren Kollateralen gefördert wird.

Anstrebenswert ist eine komplette restitutio ad integrum der Perfusion über den alternativen Kollateralkreislauf wie sie bei Kleintieren bereits erreicht wurde.

Anschlußstudien mit Fistel-Experimenten, die über einen längeren Zeitraum bei verschiedenen Tierarten durchgeführt werden, Kombinationen mit Stammzell- und Wachstumsfaktorentherapie und Inhibition der Arteriosklerose werden sich

mit der Herausforderung beschäftigen, das multifaktorielle Geschehen in einem komplexen Organismus auf molekularer Ebene in verschiedenen Entwicklungsstadien zu erforschen, nachzuahmen und zu modulieren, um irgendwann die Arteriogenese als therapeutische Maßnahme beim Gefäßpatienten durchführen zu können.

Kapitel 5

Zusammenfassung

In dieser Studie wurde ein Tiermodell mit chronischer erhöhter Scherspannung verwendet. Es wurde eine arteriovenöse Seit-zu-Seit-Anastomose zwischen der Arteria und Vena femoralis angelegt, eine Woche nachdem die Arteria femoralis proximal beidseits ligiert wurde. Auf diesem Weg entleerte sich ein großer Teil des Kollateralblutflusses in das venöse Niederdrucksystem, was zu einem erhöhten Fluß führte. Nach einer weiteren Woche wurde das Experiment nach Durchführung einer digitalen Subtraktionsangiographie beendet. Im Anschluß erfolgte die Präparation von Kollateralarterien, Muskel und Kontrollarterien von beiden Seiten. Mit den Gewebeproben wurden 2-dimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophoresen, Western und Northern Blots durchgeführt.

Im Vergleich zur nur ligierten Seite fand sich auf der Fistelseite eine signifikant erhöhte Zahl an angiographisch sichtbaren Kollateralgefäßen.

Die 2-dimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigte etwa 1000 Spots, von denen fast 50 in ihrer Expression verändert waren; darunter war das auf die Aktindynamik und damit Zellbewegung einwirkende Cofilin, das starke Expressionsunterschiede zwischen Ligatur- und Fistelseite aufwies. Diese Ergebnisse wurden mittels den Blotverfahren bestätigt und die unterschiedliche Ausprägung der Isoformen Cofilin 1 und 2 ausgewertet. Dabei entspricht das erstere dem undifferenzierten Status und das zweite dem differenzierten Status der glatten Muskelzellen. Dieses Tiermodell demonstriert, daß anhaltende Scherkrafterhöhung einen anhaltenden arteriogenetischen Prozeß unterhält und daß Zellmigration eine wichtige Rolle in diesem spielt, was durch die Veränderungen in der Cofilinexpression während der Kollateralentwicklung deutlich wird.

Kapitel 6

Summary

In this study we used an animal model with chronically increased shear stress. We constructed a side-to-side arterio-venous fistula between the femoral artery and vein, one week after we have ligated the proximal femoral artery on both sides. On this path a large part of the collateral bloodflow was drained in the venous system with a small resistance which increase the flow and shear stress.

After one more week we carried out digital subtraction angiography and the animals were euthanised. The dissection of collateral arteries, muscle and control arteries from both sides followed and 2-dimensional polyacrylamide gelelectrophoresis, western and northern blot analysis were performed.

In comparison to the only ligated side the number of angiographically visible collaterals of the hindlimb with the fistula significantly increased.

The 2-D-gel electrophoresis of collateral proteins showed about 1000 spots, of which almost 50 were differentially regulated, containing actin- and thereby cellmotility-modulating cofilin, which showed high degree of differential expression. These results were confirmed and subdivided into both isoforms cofilin 1 and 2 by the blot analyses; the isoform cofilin 1 comply to the undifferentated state and cofilin 2 to the differantated state of smooth muscle cells.

This animal model demonstrates that durable arised levels of shear stress cause an ongoing strong arteriogenic response and that cellmigration plays an important role in the arteriogenic process, demonstrated via the changes in cofilin expression during collateral development.

Kapitel 7

Reagenzien

IEF Probenpuffer:

9 M Harnstoff, ultrarein; Amersham, Freiburg

70 mM DTT, ultrarein; Serva, Heidelberg

25 mM Tris/HCl; Roth, Karlsruhe

pH 7,1

50 mM KCl; Roth, Karlsruhe

3 mM EDTA; Roth, Karlsruhe

0,1 μ M Pepstatin; PeptaNova GmbH, Sandhausen

1 mM PMSF; Roth, Karlsruhe

0,05% Benzamidin; Roth, Karlsruhe

2,1 μ M Leupeptin; Roth, Karlsruhe

2% Trägerampholyte; Sigma-Aldrich, Hamburg

pH 2-4

NEPHGE-Gelröhrchen:

9 M Harnstoff, ultrarein; Amersham, Freiburg

3,5% Arcylamid; Roth, Karlsruhe

0,3% Piperazindiacrylamide; Roth, Karlsruhe

4% Trägerampholyte; Sigma-Aldrich, Hamburg

pH 2-11

Äquibrierungspuffer 2D-PAGE:

125 mM Tris/Phosphat; Roth, Karlsruhe

pH 6,9

40% Glyzerin; Roth, Karlsruhe

70 mM DTT, ultrarein; Serva, Heidelberg

3% SDS; Roth, Karlsruhe

RIPA-Puffer:

150 mM NaCl; Roth, Karlsruhe

10 mM Tris; Roth, Karlsruhe

pH 7,4

0,1% SDS; Roth, Karlsruhe

1% Triton X-100; Roth, Karlsruhe

1% Deoxycholat; Roth, Karlsruhe

0,57 mM PMSF; Roth, Karlsruhe

1 mM Natrium Orthovanadate; Sigma-Aldrich, Hamburg

MES-SDS-Laufpuffer (20 x); Invitrogen, Groningen, Niederlande:

1 M MES

1 M Tris/HCl

69,3 mM SDS

20,5 mM EDTA

pH 7,3

TBS-T-Puffer:

TBS:

20 mM Tris/HCl; Roth, Karlsruhe

137 mM NaCl; Roth, Karlsruhe

pH 7,6

zusätzlich 0,1% Tween-20; Roth, Karlsruhe

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium):

10 g/l Pepton aus Casein tryptisch verdaut; Roth, Karlsruhe

5 g/l Hefeextrakt; Roth, Karlsruhe

5 g/l NaCl; Roth, Karlsruhe

pH 7,0

Sterilisieren (Autoklavieren; Autoklav, Varioklav, Typ 500 H-P Labortechnik, München)

TBE:

100 mM Tris; Roth, Karlsruhe
100 mM Borsäure; Roth, Karlsruhe
2 mM EDTA; Roth, Karlsruhe
pH 8,0

Guanidiniumpuffer:

4 M Guanidiniumthiocyanat; Roth, Karlsruhe
25 mM Na-citrat, pH 7; Roth, Karlsruhe
0,5% N-Lauryl-Sarcosylsarcosin; Sigma, Deisenhofen
0,1 M β -Mercaptoethanol in DEPC- ; Roth, Karlsruhe

DEPC-H₂O:

0,1% DEPC in H₂O; Roth, Karlsruhe
über Nacht bei 37°C und autoklavieren

RNA-Proben- Puffer:

750 μ l deionisiertes Formamid (bei - 20°C lagern); Gibco, Karlsruhe
150 μ l 10 x MOPS; Roth, Karlsruhe
240 μ l Formaldehyd; Merck, Frankfurt a. M.
100 μ l Glyzerin; Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau; Roth, Karlsruhe
Xylencyanol; Sigma, Deisenhofen
ad 1,5 ml mit H₂O
Lagerung bei -20°C

10 x SSC-Puffer:

1,5 M NaCl; Roth, Karlsruhe
0,15 M Natriumzitat x 2 ; Roth, Karlsruhe
pH 7,0

Hybridisierungspuffer für Northern Blot:

50% deionisiertes Formamid; Gibco, Karlsruhe
10% Dextransulfat; Roth, Karlsruhe

1% (w/v) SDS; Roth, Karlsruhe

1 M NaCl; Roth, Karlsruhe

100 $\mu\text{g/ml}$ ssDNA; Sigma, Deisenhofen

Kapitel 8

Abkürzungen

A.	Arterie
Aa.	Arterien
Abb.	Abbildung
ADF	Aktindepolymerisierender Faktor
AVF	arterio-venöse Fistel
BSA	bovines Serum-Albumin
°C	Grad Celsius
$CaCl_2$	Calciumchlorid
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CFL	Cofilin
Ci	Curie
cm	Zentimeter
CO_2	Kohlenstoffdioxid
cpm	Zerfälle pro min, counts per minute
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dATP	Desoxyadenosin 5'-Triphosphat
dCTP	Desoxycytidin 5'-Triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin 5'-Triphosphat
DSA	Digitale Subtraktionsangiographie
DTT	Dithiothreitol

dTTP	Desoxythymidin 5'-Triphosphat
dyn	Dyn(e)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPZ	Endotheliale Progenitorzellen
F	French
F-Aktin	polymeres/filamentöses Aktin
fem.	femoralis/femorales
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktoren, fibroblast growth factor
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G-Aktin	monomeres/globuläres Aktin
GM-CSF	Granulocyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor, granulocyte macrophage - colony stimulating factor
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde - Society for Laboratory Animal Science
h	Stunde, hour
HCL	Chlorwasserstoffsäure
HDL	high density lipoprotein
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
i.E.	internationale Einheit
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
IP-10	Interferon- γ -induziertes Protein 10
kb	Kilobasen
KCL	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
km	Kilometer
l	Liter
lacZ'Gen	Gen zur Bildung des Enzyms β -Galaktosidase
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium

LDL	low density lipoprotein
LIMK	LIM-Kinase, LIM ist ein Akronym für die drei Genprodukte Lin-11, Isi-1 und Mec-3
LWS	longitudinale Wandspannung
M	molar
μCi	Mikrocurie
MCP-1	Monocytenanlockendes Protein-1, monocyte chemoattractant protein-1
MCS	multiple Klonierungssequenz, multiple cloning site
MES	Morpholinoethansulfonsäure
MetOH	Methanol
μg	Mikrogramm
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
MIG	Monokin induziert durch Interferon- γ
min	Minute(n)
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
μm	Mikrometer
mm	Millimeter
μM	mikromolar
mM	millimolar
MMP	matrixdegenrierenden Metalloproteinasen
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mPa	Millipascal
mRNA	Boten-RNA, messenger RNA
Na	Natrium
NaJ	Natriumjod
NEPHGE	Elektrophorese mit nicht äquilibriertem pH-Gradient, non equilibrium pH gradient electrophoresis
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
P	Phosphat

Pa	Pascal
PAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PC	personal computer
PdCTP	$\alpha^{32}P$ -Desoxycytidine 5'-Triphosphats
PDGF	Plättchen-Wachstumsfaktor, platelet-derived growth factor
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+ -Ionen-Konzentration
PI	Phosphatidylinositol
PIP	Phosphatidylinositol-4-Phosphat
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PIGF	plazentarer Wachstumsfaktor, placenta growth factor
pmol	picomol
PMSF	Phenylmethylylsulfonyl-Fluorid
prof.	profunda
RNA	Ribonucleinsäure
ROCK	Rho-assoziierte Kinase
rpm	Rotation pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat, sodium dodecyl sulphate
s	Sekunde(n)
SSC	Natriumchlorid-Citrat-Puffer, standard saline citrat, sodium saline citrate
SSH	„Slingshot“-Phosphatasen
t	Zeit, time
TESK-1	Testikuläre Proteinkinase-1
TGF- β	transformierender Wachstumsfaktors, transforming Growth Factor β ,
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TWS	tangentiale Wandspannung
U	Einheit, unit
US-NIH	Nationales Institut für Gesundheit der Vereinigten Staaten, US National Institute of Health
V	Volt
V.	Vene
Vv.	Venen
VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1, vascular cell adhesion molecule-1

VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor, vascular endothelial growth factor,
Vol	Volumen
WHO	Weltgesundheitsorganisation, World Health Organisation
X-Gal	5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid
2D-PAGE	2-dimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese
2D	zweidimensional

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schema des Gefäßsystem; A: Arterie, B: Arteriole, C: Venole, D: Vene, E: Kapillare	3
1.2	William Harvey; mit freundlicher Genehmigung von Clendening History of Medicine Library, University of Kansas Medical Center [287]	4
1.3	Vasculogenese: Die Hämangioblasten lagern sich zu Inseln zusammen, aus den peripheren Zellen gehen Endothelzellen hervor, die inneren Zellen entwickeln sich zu Erythrocyten.	6
1.4	Aufbau der Gefäße: A: Arterie, B: Arteriole, C: Venole, D: Vene, E: Kapillare, F: Sinusoid, G: arteriovenöse Anastomose a, b, c: Intima: a: Lamina endothelialis, b: Lamina subendothelialis, c: lamina elastica interna, d: Media, e: Lamina elastica externa, f: Adventitia, g: Vasa vasorum, h: Venenklappen, i: Längsmuskulatur der Adventitia, k: Basalmembran, l: Pericyten; [378]; mit freundlicher Genehmigung der Thieme Verlagsgruppe	7
1.5	Hämodynamische Faktoren	11
1.6	Longitudinale Wandspannung	13
1.7	Tangentiale Wandspannung	14
1.8	Die Scherspannung: Die Scherspannung übt reibenden Schub zur parallel verlaufenden Zelloberfläche des Endothels aus.	16
1.9	Scherspannungsmodell: Fluß in einer Rohrleitung; die laminare Strömung besteht aus vielen unendlich dünnen Flüssigkeitsschichten, die sich als zylindrische Flüssigkeitslamellen mit konstanter linearer Strömungsgeschwindigkeit \bar{v} aneinander vorbeischieben.	17
1.10	Pathologie der Atherosklerose: Bei hoher Konzentration schädigender Faktoren, hier LDL, kommt es zur Entzündungsreaktion in der Gefäßwand und konsekutiv zur Gefäßverengung.	20

1.11	Angiogenese	23
1.12	Kollateralarterie nach Longland; [244]	24
1.13	Richard Lower [247]	25
1.14	Schematischer Ablauf der Arteriogenese: Nach Occlusion eines Leitgefäßes kommt es infolge Scherspannungszunahme zur Transformation der Kollateralarteriole in eine Arterie.	27
1.15	Endothelzellen [58]; mit freundlicher Genehmigung der Springer Science and Business Media	28
1.16	Expression von Adhäsionsmolekülen nach 12 h Occlusion der Femoralarterie im Kaninchen; mit freundlicher Genehmigung der Springer Science and Business Media	28
1.17	Monocyten-Endothel-Kontakt; mit freundlicher Genehmigung der Springer Science and Business Media	29
1.18	Pruning: In einigen wachsenden Kollateralarterien nimmt die Dicke der Neointima infolge der Gefäßmuskelproliferation derart zu, daß es infolge eines Verschlusses des Lumens zur Regression des Gefäßes kommt; [366] mit freundlicher Genehmigung der American Heart Association	32
1.19	Humanes Cofilin 1; Protein Data Bank, Code 1Q8X; [31]	33
1.20	CFL-Interaktion mit Aktin: CFL trennen F-Aktin, binden das G-Aktin in einem 1:1 Komplex, verhindern so dessen neuerliche Polymerisation an gleicher Stelle und die Bindung des Tropomyosin.	35
2.1	Experimentablauf	39
2.2	Operativer Zugang - Ligatur; eigene Abbildung	42
2.3	Anatomie des Hinterlaufes des Schweines und Lokalisation der Ligatur; [378]; Bickhardt, K., 1961, Diss. vet. Hannover; mit freundlicher Genehmigung der Bibliothek der Tierärztlichen Hochschule Hannover	43
2.4	Arterien des Hinterlaufes des Schweines und Lokalisation der Ligatur; [378]; mit freundlicher Genehmigung der Thieme Verlagsgruppe	44
2.5	Intraoperativer Situs - Ligatur; eigene Abbildung	45
2.6	Anatomie des Hinterlaufes des Schweines und Lokalisation der Ligatur und der arteriovenösen Fistel; [378]; Bickhardt, K., 1961, Diss. vet. Hannover; mit freundlicher Genehmigung der Bibliothek der Tierärztlichen Hochschule Hannover	47

2.7	Arterien des Hinterlaufes des Schweines und Lokalisation der Ligatur und der arteriovenösen Fistel; [378]; mit freundlicher Genehmigung der Thieme Verlagsgruppe	48
2.8	Intraoperativer Situs - Arteriovenöse Fistel; eigene Abbildung	49
2.9	Pott´sche Schere; eigene Abbildung	49
2.10	Terminalexperimentablauf	50
2.11	Arterien und Venen am Kopf des Schweines; [378]; Becker H., 1960, Diss. vet Hannover; mit freundlicher Genehmigung der Bibliothek der Tierärztlichen Hochschule Hannover	51
2.12	Lage der A. carotis communis; [378]	52
2.13	Angiogramm; eigene Abbildung	54
2.14	Angiogramm mit markierten Leitgefäßen; eigene Abbildung	55
2.15	Angiogramm mit markierten Kollateralen; eigene Abbildung	57
2.16	Kollateralen in situ, blau hervorgehoben; eigene Abbildung	58
2.17	Schema des Klonierungsvektors: Plasmid mit benötigten DNA-Sonden (insert), außerdem Gen für die Antibiotikaresistenz (Ampicillin), Gen für β -Galaktosidase (lacZ), Replikationsursprung (origin) und künstlich eingefügter multipler Klonierungssequenz (MCS) mit Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen (*)	63
2.18	Schema Blau-Weiß-Selektion: Die weißen Kolonien sind die, die im Plasmid das Insert tragen und mit denen weiter verfahren wird; das Insert mit der DNA-Sonde kommt beim Einbau in den Vektor in den Bereich des „lacZ-Gens“ zu liegen, das für die β -Galaktosidase kodiert, die zum Abbau des Indikator-Galaktosids benötigt wird. Bei dessen Abbau, kommt es zur Freisetzung eines blauen Farbstoffes. Ist das Insert eingebaut, kann das Wirtsbakterium keine β -Galaktosidase synthetisieren, das Galaktosid nicht verwerten und die Kolonie hat eine weiße Farbe. Ist kein Insert im Plasmid vorhanden, kann das Bakterium das Galaktosid abbauen und verfärbt sich blau.	65
2.19	Northern Blot Aufbau	72
3.1	Median, Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Versuchstiere	76

3.2 2D-PAGE-Analyse: links aus Kollateralengewebe der Ligatuseite, rechts aus Kollateralengewebe der Fistelseite, Auswahl zeigt CFL-Bereich; eigene Abbildung 77

3.3 Western Blot, Lig.=Kollateralengewebe der Ligatuseite, AVF = Kollateralengewebe der Fistelseite; eigene Abbildung 78

3.4 ADF-Exression: Mittelwerte, Standardabweichungen, Median 79

3.5 Northern Blot, 1=Arterie, 2=Kollateralengewebe der Ligatuseite, 3=Kollateralengewebe der Fistelseite; eigene Abbildung 80

3.6 Cofilin-Exression: Mittelwerte und Standardabweichungen 81

4.1 Schema der Kollateralenentwicklung 97

4.2 Mechanotransduktion in einer Endothelzelle, über die Scherspannung über Zwischenschritte Einfluß auf CFL und damit Aktin hat . 113

Falls nicht explizit erwähnt stammen die Abbildungen von Florian Remek.

Tabellenverzeichnis

2.1	Zusammensetzung des Haltungsfuttermittels	40
3.1	Anzahl der Kollateralen; Angaben der Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SW) der einzelnen Versuchstiere	75
3.2	ADF-Expression: Mittelwerte, Standardabweichungen und Median .	78
3.3	Cofilin-Expression: Kollateralen der Ligatur- und Fistelseite; Mittelwerte und Standardabweichungen; CFL=Cofilin	81
3.4	Cofilin-Expression: Kontrollarterie; CFL=Cofilin	81
4.1	Momentaufnahme der CFL-Expression zum Zeitpunkt des Terminalexperimentes	107
4.2	Angenommener Verlauf der CFL-Expression im Fortgang der Arteriogenese	110

Literaturverzeichnis

- [1] A. Abaci, A. Oguzhan, S. Kahraman, N. K. Eryol, S. Unal, H. Arinc, and A. Ergin. Effect of diabetes mellitus on formation of coronary collateral vessels. *Circulation*, 99(17):2239–42, 1999. 1524-4539 (Electronic) Journal Article.
- [2] T. A. Abbruzzese, R. J. Guzman, R. L. Martin, C. Yee, C. K. Zarins, and R. L. Dalman. Matrix metalloproteinase inhibition limits arterial enlargements in a rodent arteriovenous fistula model. *Surgery*, 124(2):328–34; discussion 334–5, 1998. 0039-6060 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- [3] H. Abe, T. Endo, K. Yamamoto, and T. Obinata. Sequence of cdnas encoding actin depolymerizing factor and cofilin of embryonic chicken skeletal muscle: two functionally distinct actin-regulatory proteins exhibit high structural homology. *Biochemistry*, 29(32):7420–5, 1990. 0006-2960 Journal Article.
- [4] H. Abe, R. Nagaoka, and T. Obinata. Cytoplasmic localization and nuclear transport of cofilin in cultured myotubes. *Exp Cell Res*, 206(1):1–10, 1993. 0014-4827 Journal Article.
- [5] R. Abhaichand, Y. Louvard, T. Lefevre, and M. C. Morice. Collateral coronary circulation in the absence of obstructive coronary artery disease. *J Invasive Cardiol*, 14(6):331–3, 2002. 1042-3931 (Print) Case Reports Journal Article.
- [6] B. J. Agnew, L. S. Minamide, and J. R. Bamburg. Reactivation of phosphorylated actin depolymerizing factor and identification of the regulatory site. *J Biol Chem*, 270(29):17582–7, 1995. 0021-9258 (Print) Journal Article.

- [7] S. Ai, M. Kuzuya, T. Koike, T. Asai, S. Kanda, K. Maeda, T. Shibata, and A. Iguchi. Rho-rho kinase is involved in smooth muscle cell migration through myosin light chain phosphorylation-dependent and independent pathways. *Atherosclerosis*, 155(2):321–7, 2001. 0021-9150 (Print) Journal Article.
- [8] H. Aizawa, K. Sutoh, and I. Yahara. Overexpression of cofilin stimulates bundling of actin filaments, membrane ruffling, and cell movement in dictyostelium. *J Cell Biol*, 132(3):335–44, 1996. 0021-9525 (Print) Journal Article.
- [9] R. Akada. Quick-check method to test the size of escherichia coli plasmids. *Biotechniques*, 17(1):58, 1994. 0736-6205 (Print) Journal Article.
- [10] S. Albinsson, I. Nordstrom, and P. Hellstrand. Stretch of the vascular wall induces smooth muscle differentiation by promoting actin polymerization. *J Biol Chem*, 279(33):34849–55, 2004. 0021-9258 (Print) Journal Article.
- [11] R. W. Alexander. Theodore cooper memorial lecture. hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. *Hypertension*, 25(2):155–61, 1995. 0194-911X (Print) Journal Article Review.
- [12] T. Amano, K. Tanabe, T. Eto, S. Narumiya, and K. Mizuno. Lim-kinase 2 induces formation of stress fibres, focal adhesions and membrane blebs, dependent on its activation by rho-associated kinase-catalysed phosphorylation at threonine-505. *Biochem J*, 354(Pt 1):149–59, 2001. 0264-6021 (Print) Journal Article.
- [13] J. Ando, H. Nomura, and A. Kamiya. The effect of fluid shear stress on the migration and proliferation of cultured endothelial cells. *Microvasc Res*, 33(1):62–70, 1987. 0026-2862 (Print) Journal Article.
- [14] J. Ando, A. Ohtsuka, Y. Katayama, R. Korenaga, C. Ishikawa, and A. Kamiya. Intracellular calcium response to directly applied mechanical shearing force in cultured vascular endothelial cells. *Biorheology*, 31(1):57–68, 1994. 0006-355X (Print) Journal Article.
- [15] J. Ando, H. Tsuboi, R. Korenaga, K. Takahashi, K. Kosaki, M. Isshiki, T. Tojo, Y. Takada, and A. Kamiya. Differential display and cloning of shear

- stress-responsive messenger rnas in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 225(2):347–51, 1996. 0006-291X (Print) Journal Article.
- [16] M. Anghelina, P. Krishnan, L. Moldovan, and N. I. Moldovan. Monocytes and macrophages form branched cell columns in matrigel: implications for a role in neovascularization. *Stem Cells Dev*, 13(6):665–76, 2004. 1547-3287 (Print) Journal Article.
- [17] M. Anghelina, P. Krishnan, L. Moldovan, and N. I. Moldovan. Monocytes/macrophages cooperate with progenitor cells during neovascularization and tissue repair: conversion of cell columns into fibrovascular bundles. *Am J Pathol*, 168(2):529–41, 2006. 0002-9440 (Print) Journal Article.
- [18] Wissenschaftliches Institut der AOK (WIdO) AOK-Bundesverband. Hohe Zahl an Amputationen bestätigt Bedarf an besserer Diabetikerversorgung, 12.02.03, 02 2003. URL: http://wido.de/meldung_archiv+M56ab3a2f0a4.html?&encryptionKey= ; zugegriffen am 01.06.2007.
- [19] S. Arber, F. A. Barbayannis, H. Hanser, C. Schneider, C. A. Stanyon, O. Bernard, and P. Caroni. Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by lim-kinase. *Nature*, 393(6687):805–9, 1998. 0028-0836 Journal Article.
- [20] M. Arras, W. D. Ito, D. Scholz, B. Winkler, J. Schaper, and W. Schaper. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest*, 101(1):40–50, 1998. 0021-9738 Journal Article.
- [21] T. Asahara, H. Masuda, T. Takahashi, C. Kalka, C. Pastore, M. Silver, M. Kearne, M. Magner, and J. M. Isner. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*, 85(3):221–8, 1999. 0009-7330 (Print) Journal Article.
- [22] T. Asahara, T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Zee, T. Li, B. Witzenbichler, G. Schatteman, and J. M. Isner. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275(5302):964–7, 1997. 0036-8075 (Print) Journal Article.

- [23] T. Asahara, T. Takahashi, H. Masuda, C. Kalka, D. Chen, H. Iwaguro, Y. Inai, M. Silver, and J. M. Isner. Vegf contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Embo J*, 18(14):3964–72, 1999. 0261-4189 (Print) Journal Article.
- [24] T. Asakura and T. Karino. Flow patterns and spatial distribution of atherosclerotic lesions in human coronary arteries. *Circ Res*, 66(4):1045–66, 1990. 0009-7330 (Print) Journal Article.
- [25] H. Bader. Dependence of wall stress in the human thoracic aorta on age and pressure. *Circ Res*, 20(3):354–61, 1967. 0009-7330 (Print) Journal Article.
- [26] R. Baffour, J. Berman, J. L. Garb, S. W. Rhee, J. Kaufman, and P. Friedmann. Enhanced angiogenesis and growth of collaterals by in vivo administration of recombinant basic fibroblast growth factor in a rabbit model of acute lower limb ischemia: dose-response effect of basic fibroblast growth factor. *J Vasc Surg*, 16(2):181–91, 1992. 0741-5214 (Print) Journal Article.
- [27] J. R. Bamburg. Proteins of the adf/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 15:185–230, 1999. 1081-0706 Journal Article Review Review, Academic.
- [28] J. R. Bamburg and D. Bray. Distribution and cellular localization of actin depolymerizing factor. *J Cell Biol*, 105(6 Pt 1):2817–25, 1987. 0021-9525 Journal Article.
- [29] J. R. Bamburg, H. E. Harris, and A. G. Weeds. Partial purification and characterization of an actin depolymerizing factor from brain. *FEBS Lett*, 121(1):178–82, 1980. 0014-5793 (Print) Journal Article.
- [30] S. Banai, M. T. Jaklitsch, M. Shou, D. F. Lazarous, M. Scheinowitz, S. Biro, S. E. Epstein, and E. F. Unger. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation*, 89(5):2183–9, 1994. 0009-7322 (Print) Journal Article.
- [31] Protein Data Bank. Protein data bank; code 1q8x. URL: www.rcsb.org; zugegriffen am 01.06.2007.

- [32] X. Bao, C. Lu, and J. A. Frangos. 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*, 19(4):996–1003, 1999. 1079-5642 Journal Article.
- [33] A. I. Barakat, E. V. Leaver, P. A. Pappone, and P. F. Davies. A flow-activated chloride-selective membrane current in vascular endothelial cells. *Circ Res*, 85(9):820–8, 1999. 1524-4571 (Electronic) Journal Article.
- [34] K. A. Barbee, P. F. Davies, and R. Lal. Shear stress-induced reorganization of the surface topography of living endothelial cells imaged by atomic force microscopy. *Circ Res*, 74(1):163–71, 1994. 0009-7330 (Print) Journal Article.
- [35] G. Baroldi, O. Mantero, and G. Scomazzoni. The collaterals of the coronary arteries in normal and pathologic hearts. *Circ Res*, 4(2):223–9, 1956. 0009-7330 (Print) Journal Article.
- [36] I. Baumgartner, A. Pieczek, O. Manor, R. Blair, M. Kearney, K. Walsh, and J. M. Isner. Constitutive expression of phvegfl65 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation*, 97(12):1114–23, 1998. 0009-7322 (Print) Journal Article.
- [37] C. Bauters, T. Asahara, L. P. Zheng, S. Takeshita, S. Bunting, N. Ferrara, J. F. Symes, and J. M. Isner. Physiological assessment of augmented vascularity induced by vegf in ischemic rabbit hindlimb. *Am J Physiol*, 267(4 Pt 2):H1263–71, 1994. 0002-9513 (Print) Journal Article.
- [38] I. M. Bayer, S. L. Adamson, and B. L. Langille. Atrophic remodeling of the artery-cuffed artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19(6):1499–505, 1999. 1079-5642 (Print) Journal Article.
- [39] J. A. Belperio, M. P. Keane, D. A. Arenberg, C. L. Addison, J. E. Ehlert, M. D. Burdick, and R. M. Strieter. Cxc chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol*, 68(1):1–8, 2000. 0741-5400 (Print) Journal Article Review.
- [40] B. C. Berk, M. A. Corson, T. E. Peterson, and H. Tseng. Protein kinases as mediators of fluid shear stress stimulated signal transduction in endothelial

- cells: a hypothesis for calcium-dependent and calcium-independent events activated by flow. *J Biomech*, 28(12):1439–50, 1995. 0021-9290 (Print) Journal Article.
- [41] B. W. Bernstein, W. B. Painter, H. Chen, L. S. Minamide, H. Abe, and J. R. Bamberg. Intracellular ph modulation of adf/cofilin proteins. *Cell Motil Cytoskeleton*, 47(4):319–36, 2000. 0886-1544 (Print) Journal Article.
- [42] H. M. Blau and A. Banfi. The well-tempered vessel. *Nat Med*, 7(5):532–4, 2001. 1078-8956 (Print) News.
- [43] K. Boengler, F. Pipp, K. Broich, B. Fernandez, W. Schaper, and E. Deindl. Identification of differentially expressed genes like cofilin2 in growing collateral arteries. *Biochem Biophys Res Commun*, 300(3):751–6, 2003. 0006-291X (Print) Journal Article.
- [44] M. Borgers, J. Schaper, R. Xhonneux, and W. Schaper. Hydrocortisone influences developing collaterals. 2. a cytochemical study. *Virchows Arch A Pathol Pathol Anat*, 361(4):283–97, 1973. 0042-6423 (Print) Journal Article.
- [45] M. J. Bottomley, N. J. Webb, C. J. Watson, L. Holt, M. Bukhari, J. Denton, A. J. Freemont, and P. E. Brenchley. Placenta growth factor (plgf) induces vascular endothelial growth factor (vegf) secretion from mononuclear cells and is co-expressed with vegf in synovial fluid. *Clin Exp Immunol*, 119(1):182–8, 2000. 0009-9104 (Print) Journal Article.
- [46] M. Braddock, J. L. Schwachtgen, P. Houston, M. C. Dickson, M. J. Lee, and C. J. Campbell. Fluid shear stress modulation of gene expression in endothelial cells. *News Physiol Sci*, 13:241–246, 1998. 0886-1714 (Print) Journal article.
- [47] D. M. Brown, S. P. Hong, C. L. Farrell, G. F. Pierce, and R. K. Khouri. Platelet-derived growth factor bb induces functional vascular anastomoses in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(13):5920–4, 1995. 0027-8424 (Print) Journal Article.
- [48] R. D. Brownlee and B. L. Langille. Arterial adaptations to altered blood flow. *Can J Physiol Pharmacol*, 69(7):978–83, 1991. 0008-4212 (Print) Journal Article.

- [49] I. Buschmann, M. Heil, M. Jost, and W. Schaper. Influence of inflammatory cytokines on arteriogenesis. *Microcirculation*, 10(3-4):371–9, 2003. 1073-9688 Journal Article Review Review, Tutorial.
- [50] I. Buschmann and W. Schaper. Arteriogenesis versus angiogenesis: Two mechanisms of vessel growth. *News Physiol Sci*, 14:121–125, 1999. 0886-1714 Journal article.
- [51] I. Buschmann and W. Schaper. The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis). *J Pathol*, 190(3):338–42, 2000. 0022-3417 (Print) Journal Article Review.
- [52] I. R. Buschmann, H. J. Busch, G. Mies, and K. A. Hossmann. Therapeutic induction of arteriogenesis in hypoperfused rat brain via granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Circulation*, 108(5):610–5, 2003. 1524-4539 (Electronic) Journal Article.
- [53] I. R. Buschmann, I. E. Hoefer, N. van Royen, E. Katzer, R. Braun-Dulleaus, M. Heil, S. Kostin, C. Bode, and W. Schaper. Gm-csf: a strong arteriogenic factor acting by amplification of monocyte function. *Atherosclerosis*, 159(2):343–56, 2001. 0021-9150 Journal Article.
- [54] I. R. Buschmann, M. Voskuil, N. van Royen, I. E. Hoefer, K. Scheffler, S. Grundmann, J. Hennig, W. Schaper, C. Bode, and J. J. Piek. Invasive and non-invasive evaluation of spontaneous arteriogenesis in a novel porcine model for peripheral arterial obstructive disease. *Atherosclerosis*, 167(1):33–43, 2003. 0021-9150 (Print) Journal Article.
- [55] Ivo Buschmann and Wolfgang Schaper. The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis). *Journal of Pathology*, 190:338–342, 2000.
- [56] C. L. Buus, F. Pourageaud, G. E. Fazzi, G. Janssen, M. J. Mulvany, and J. G. De Mey. Smooth muscle cell changes during flow-related remodeling of rat mesenteric resistance arteries. *Circ Res*, 89(2):180–6, 2001. 1524-4571 (Electronic) Journal Article.
- [57] W. J. Cai, S. Koltai, E. Kocsis, D. Scholz, S. Kostin, X. Luo, W. Schaper, and J. Schaper. Remodeling of the adventitia during coronary arteriogenesis.

- Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284(1):H31–40, 2003. 0363-6135 (Print) Journal Article.
- [58] W. J. Cai, D Scholz, T. Ziegelhoeffer, and J. Schaper. Structural remodeling during growth of collateral vessels. In J. Schaper and W. Schaper, editors, *Arteriogenesis*, pages 21–53. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London, 2004.
- [59] Y. Cao, P. Linden, D. Shima, F. Browne, and J. Folkman. In vivo angiogenic activity and hypoxia induction of heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. *J Clin Invest*, 98(11):2507–11, 1996. 0021-9738 (Print) Journal Article.
- [60] M. F. Carlier, V. Laurent, J. Santolini, R. Melki, D. Didry, G. X. Xia, Y. Hong, N. H. Chua, and D. Pantaloni. Actin depolymerizing factor (adf/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol*, 136(6):1307–22, 1997. 0021-9525 (Print) Journal Article.
- [61] M. F. Carlier, F. Ressay, and D. Pantaloni. Control of actin dynamics in cell motility. role of adf/cofilin. *J Biol Chem*, 274(48):33827–30, 1999. 0021-9258 Journal Article Review Review, Tutorial.
- [62] P. Carmeliet. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, 6(4):389–95, 2000. 1078-8956 Journal Article Review Review, Tutorial.
- [63] P. Carmeliet and D. Collen. Vascular development and disorders: molecular analysis and pathogenic insights. *Kidney Int*, 53(6):1519–49, 1998. 0085-2538 (Print) Journal Article Review.
- [64] P. Carmeliet, Y. Dor, J. M. Herbert, D. Fukumura, K. Brusselmans, M. Dewerchin, M. Neeman, F. Bono, R. Abramovitch, P. Maxwell, C. J. Koch, P. Ratcliffe, L. Moons, R. K. Jain, D. Collen, and E. Keshert. Role of hif-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*, 394(6692):485–90, 1998. 0028-0836 (Print) Journal Article.
- [65] P. Carmeliet, L. Moons, A. Luttun, V. Vincenti, V. Compernelle, M. De Mol, Y. Wu, F. Bono, L. Devy, H. Beck, D. Scholz, T. Acker, T. DiPalma,

- M. Dewerchin, A. Noel, I. Stalmans, A. Barra, S. Blacher, T. Vandendriesche, A. Ponten, U. Eriksson, K. H. Plate, J. M. Foidart, W. Schaper, D. S. Charnock-Jones, D. J. Hicklin, J. M. Herbert, D. Collen, and M. G. Persico. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med*, 7(5):575–83, 2001. 1078-8956 (Print) Journal Article.
- [66] F. L. Celletti, J. M. Waugh, P. G. Amabile, A. Brendolan, P. R. Hilfiker, and M. D. Dake. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med*, 7(4):425–9, 2001. 1078-8956 (Print) Journal Article.
- [67] J. K. Chae, I. Kim, S. T. Lim, M. J. Chung, W. H. Kim, H. G. Kim, J. K. Ko, and G. Y. Koh. Coadministration of angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor enhances collateral vascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20(12):2573–8, 2000. 1524-4636 (Electronic) Journal Article.
- [68] David C. Chappell, Signe E. Varner, Robert M. Nerem, Russell M. Medford, and R. Wayne Alexander. Oscillatory shear stress stimulates adhesion molecule expression in cultured human endothelium. *Circulation Research*, 82(5):532–539, 1998.
- [69] E. Chavakis and S. Dimmeler. Regulation of endothelial cell survival and apoptosis during angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22(6):887–93, 2002. 1524-4636 Journal Article Review Review, Tutorial.
- [70] C. S. Chen, M. Mrksich, S. Huang, G. M. Whitesides, and D. E. Ingber. Geometric control of cell life and death. *Science*, 276(5317):1425–8, 1997. 0036-8075 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- [71] Y. W. Chen, P. Zhao, R. Borup, and E. P. Hoffman. Expression profiling in the muscular dystrophies: identification of novel aspects of molecular pathophysiology. *J Cell Biol*, 151(6):1321–36, 2000. 0021-9525 (Print) Journal Article.
- [72] J. J. Cheng, B. S. Wung, Y. J. Chao, and D. L. Wang. Cyclic strain enhances adhesion of monocytes to endothelial cells by increasing intercellular adhe-

- sion molecule-1 expression. *Hypertension*, 28(3):386–91, 1996. 0194-911X (Print) Journal Article.
- [73] T. O. Cheng. Arteriographic demonstration of intercoronary arterial anastomosis in a living man without coronary artery disease. *Angiology*, 23(2):76–88, 1972. 0003-3197 (Print) Journal Article.
- [74] S. Chien, S. Li, and Y. J. Shyy. Effects of mechanical forces on signal transduction and gene expression in endothelial cells. *Hypertension*, 31(1 Pt 2):162–9, 1998. 0194-911X (Print) Journal Article Review.
- [75] J. J. Chiu, B. S. Wung, J. Y. Shyy, H. J. Hsieh, and D. L. Wang. Reactive oxygen species are involved in shear stress-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17(12):3570–7, 1997. 1079-5642 (Print) Journal Article.
- [76] A. Cho, L. Mitchell, D. Koopmans, and B. L. Langille. Effects of changes in blood flow rate on cell death and cell proliferation in carotid arteries of immature rabbits. *Circ Res*, 81(3):328–37, 1997. 0009-7330 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- [77] P. Chomczynski and N. Sacchi. Single-step method of rna isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162(1):156–9, 1987. 0003-2697 (Print) Journal Article.
- [78] K. P. Claffey, S. C. Shih, A. Mullen, S. Dziennis, J. L. Cusick, K. R. Abrams, S. W. Lee, and M. Detmar. Identification of a human vpf/vegf 3' untranslated region mediating hypoxia-induced mrna stability. *Mol Biol Cell*, 9(2):469–81, 1998. 1059-1524 Journal Article.
- [79] ER Clark. Studies on the growth of blood vessels in the tail of frog larvae. *Am J Anat*, 23:37–88, 1918.
- [80] A. J. Cornelissen, J. Dankelman, E. VanBavel, and J. A. Spaan. Balance between myogenic, flow-dependent, and metabolic flow control in coronary arterial tree: a model study. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 282(6):H2224–37, 2002. 0363-6135 Journal Article.

- [81] J. R. Crosby, W. E. Kaminski, G. Schatteman, P. J. Martin, E. W. Raines, R. A. Seifert, and D. F. Bowen-Pope. Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. *Circ Res*, 87(9):728–30, 2000. 1524-4571 (Electronic) Journal Article.
- [82] A. Cucina, A. V. Sterpetti, V. Borrelli, S. Pagliei, A. Cavallaro, and L. S. D’Angelo. Shear stress induces transforming growth factor-beta 1 release by arterial endothelial cells. *Surgery*, 123(2):212–7, 1998. 0039-6060 (Print) Journal Article.
- [83] J. P. Cullen, S. Sayeed, R. S. Sawai, N. G. Theodorakis, P. A. Cahill, J. V. Sitzmann, and E. M. Redmond. Pulsatile flow-induced angiogenesis: role of g(i) subunits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22(10):1610–6, 2002. 1524-4636 (Electronic) Journal Article.
- [84] Q. Dang, H. Gregersen, B. Duch, and G. S. Kassab. Indicial response functions of growth and remodeling of common bile duct postobstruction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 286(3):G420–7, 2004. 0193-1857 (Print) Journal Article.
- [85] P. F. Davies. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev*, 75(3):519–60, 1995. 0031-9333 (Print) Journal Article Review.
- [86] P. F. Davies, A. Remuzzi, E. J. Gordon, Jr. Dewey, C. F., and Jr. Gimbrone, M. A. Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(7):2114–7, 1986. 0027-8424 (Print) Journal Article.
- [87] P. F. Davies, C. Shi, N. Depaola, B. P. Helmke, and D. C. Polacek. Hemodynamics and the focal origin of atherosclerosis: a spatial approach to endothelial structure, gene expression, and function. *Ann N Y Acad Sci*, 947:7–16; discussion 16–7, 2001. 0077-8923 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov’t Research Support, U.S. Gov’t, P.H.S.
- [88] E. Deindl, I. Buschmann, I. E. Hoefler, T. Podzuweit, K. Boengler, S. Vogel, N. van Royen, B. Fernandez, and W. Schaper. Role of ischemia and of hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit. *Circ Res*, 89(9):779–86, 2001. 1524-4571 Journal Article.

- [89] E. Deindl, I. E. Hoefler, B. Fernandez, M. Barancik, M. Heil, M. Strniskova, and W. Schaper. Involvement of the fibroblast growth factor system in adaptive and chemokine-induced arteriogenesis. *Circ Res*, 92(5):561–8, 2003. 1524-4571 (Electronic) Journal Article.
- [90] E Deindl and W Schaper. Collateral and capillary formation - a comparison. In JA Dormandy, WP Dole, and GM Rubanyi, editors, *Therapeutic Angiogenesis Ernst Schering Research Foundation - Workshop 28*, pages 67–86. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1999.
- [91] E. Deindl, T. Ziegelhoffer, S. M. Kanse, B. Fernandez, E. Neubauer, P. Carmeliet, K. T. Preissner, and W. Schaper. Receptor-independent role of the urokinase-type plasminogen activator during arteriogenesis. *Faseb J*, 17(9):1174–6, 2003. 1530-6860 (Electronic) Journal Article.
- [92] L. Del Corso, D. Moruzzo, B. Conte, M. Agelli, A. M. Romanelli, F. Pastine, M. Protti, F. Pentimone, and G. Baggiani. Tortuosity, kinking, and coiling of the carotid artery: expression of atherosclerosis or aging? *Angiology*, 49(5):361–71, 1998. 0003-3197 (Print) Journal Article.
- [93] Jr. Dewey, C. F., S. R. Bussolari, Jr. Gimbrone, M. A., and P. F. Davies. The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. *J Biomech Eng*, 103(3):177–85, 1981. 0148-0731 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- [94] M. C. Dickson, J. S. Martin, F. M. Cousins, A. B. Kulkarni, S. Karlsson, and R. J. Akhurst. Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development*, 121(6):1845–54, 1995. 0950-1991 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- [95] S. Dimmeler, J. Haendeler, V. Rippmann, M. Nehls, and A. M. Zeiher. Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells. *FEBS Lett*, 399(1-2):71–4, 1996. 0014-5793 (Print) Journal Article.
- [96] S. Dimmeler and A. M. Zeiher. Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression. *Circ Res*, 87(6):434–9, 2000. 1524-4571 (Electronic) Journal Article Review.

- [97] D Drenckhahn. *Benninghoff Anatomie, Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen*, volume 1. Urban&Schwarzenberg, München Wien Baltimore, 15 edition, 1994.
- [98] E. R. Edelman, E. Mathiowitz, R. Langer, and M. Klagsbrun. Controlled and modulated release of basic fibroblast growth factor. *Biomaterials*, 12(7):619–26, 1991. 0142-9612 (Print) Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- [99] D. C. Edwards, L. C. Sanders, G. M. Bokoch, and G. N. Gill. Activation of lim-kinase by pak1 couples rac/cdc42 gtpase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol*, 1(5):253–9, 1999. 1465-7392 (Print) Journal Article.
- [100] I. Eichler, J. Wibawa, I. Grgic, A. Knorr, S. Brakemeier, A. R. Pries, J. Hoyer, and R. Kohler. Selective blockade of endothelial ca²⁺-activated small- and intermediate-conductance k⁺-channels suppresses edhf-mediated vasodilation. *Br J Pharmacol*, 138(4):594–601, 2003. 0007-1188 (Print) Journal Article.
- [101] M. Endo, K. Ohashi, Y. Sasaki, Y. Goshima, R. Niwa, T. Uemura, and K. Mizuno. Control of growth cone motility and morphology by lim kinase and slingshot via phosphorylation and dephosphorylation of cofilin. *J Neurosci*, 23(7):2527–37, 2003. 1529-2401 Journal Article.
- [102] S. E. Epstein, S. Fuchs, Y. F. Zhou, R. Baffour, and R. Kornowski. Therapeutic interventions for enhancing collateral development by administration of growth factors: basic principles, early results and potential hazards. *Cardiovasc Res*, 49(3):532–42, 2001. 0008-6363 (Print) Journal Article Review.
- [103] Deutsche Gefäßliga e.V. URL: <http://www.deutsche-gefaessliga.de>; zugegriffen am 01.06.2007.
- [104] B. Fernandez. Embryonic development of collateral arteries. In W. Schaper and J. Schaper, editors, *Arteriogenesis*, pages 11–19. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London, 2004.
- [105] B. Fernandez and K. Broich. Cell-cell and cell-matrix interactions. In W. Schaper and J. Schaper, editors, *Arteriogenesis*, pages 173–189. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London, 2004.

- [106] Borja Fernandez, Alexandra Buehler, Swen Wolfram, Sawa Kostin, Gudrun Espanion, Wolfgang M. Franz, Heiner Niemann, Pieter A. Doevendans, Wolfgang Schaper, and Rene Zimmermann. Transgenic myocardial overexpression of fibroblast growth factor-1 increases coronary artery density and branching. *Circulation Research*, 87(3):207–213, 2000.
- [107] I. Flamme and W. Risau. Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. *Development*, 116(2):435–9, 1992. 0950-1991 (Print) Journal Article.
- [108] J. Folkman. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, 285(21):1182–6, 1971. 0028-4793 Journal Article Review.
- [109] J. Folkman. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst*, 82(1):4–6, 1990. 0027-8874 (Print) Editorial.
- [110] J. Folkman, T. Browder, and J. Palmblad. Angiogenesis research: guidelines for translation to clinical application. *Thromb Haemost*, 86(1):23–33, 2001. 0340-6245 (Print) Journal Article Review.
- [111] J. Folkman and M. Klagsbrun. Angiogenic factors. *Science*, 235(4787):442–7, 1987. 0036-8075 Journal Article Review.
- [112] J. Folkman, E. Merler, C. Abernathy, and G. Williams. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med*, 133(2):275–88, 1971. 0022-1007 Journal Article.
- [113] J. Folkman and Y. Shing. Angiogenesis. *J Biol Chem*, 267(16):10931–4, 1992. 0021-9258 Journal Article Review Review, Academic.
- [114] J. C. Fox and J. R. Shanley. Antisense inhibition of basic fibroblast growth factor induces apoptosis in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 271(21):12578–84, 1996. 0021-9258 (Print) Journal Article.
- [115] S. Fuchs, R. Baffour, Y. F. Zhou, M. Shou, A. Pierre, F. O. Tio, N. J. Weissman, M. B. Leon, S. E. Epstein, and R. Kornowski. Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol*, 37(6):1726–32, 2001. 0735-1097 (Print) Journal Article.

- [116] M. Fujita, M. Ikemoto, M. Kishishita, H. Otani, R. Nohara, T. Tanaka, S. Tamaki, A. Yamazato, and S. Sasayama. Elevated basic fibroblast growth factor in pericardial fluid of patients with unstable angina. *Circulation*, 94(4):610–3, 1996. 0009-7322 (Print) Journal Article.
- [117] W. F. Fulton. Arterial anastomoses in the coronary circulation. i. anatomical features in normal and diseased hearts demonstrated by stereoarteriography. *Scott Med J*, 143:420–34, 1963. 0036-9330 (Print) Journal Article.
- [118] W. F. Fulton. Arterial anastomoses in the coronary circulation. ii. distribution, enumeration and measurement of coronary arterial anastomoses in health and disease. *Scott Med J*, 42:466–74, 1963. 0036-9330 (Print) Journal Article.
- [119] W. F. Fulton. The dynamic factor in enlargement of coronary arterial anastomoses, and paradoxical changes in the subendocardial plexus. *Br Heart J*, 26:39–50, 1964. 0007-0769 (Print) Journal Article.
- [120] W. F. Fulton. The time factor in the enlargement of anastomoses in coronary artery disease. *Scott Med J*, 37:18–23, 1964. 0036-9330 (Print) Journal Article.
- [121] W.F.M. Fulton. Arterial anastomoses in the coronary circulation. In W.F.M. Fulton, editor, *The Coronary Arteries. Arteriography, Microanatomy, and Pathogenesis of Obliterative Coronary Artery Disease*, pages 72–128. Thomas, C.C., Springfield, Illinois, 1965.
- [122] Medizinische Hochschule Hannover; Institut für Toxikologie, 06 05. Institut für Toxikologie; Massenspektrometrie, Stand: 08.06.2005 09:13:40; URL: <http://www.mh-hannover.de/institute/toxikologie/massenspektrometrie.htm>; zugegriffen am 01.06.2007.
- [123] C. G. Galbraith, R. Skalak, and S. Chien. Shear stress induces spatial reorganization of the endothelial cell cytoskeleton. *Cell Motil Cytoskeleton*, 40(4):317–30, 1998. 0886-1544 (Print) Journal Article.

- [124] Z. S. Galis and J. J. Khatri. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res*, 90(3):251–62, 2002. 1524-4571 Journal Article Review Review, Tutorial.
- [125] L. Garcia, D. S. Baim, M. Post, M. Simons, and R. J. Laham. Therapeutic angiogenesis using endocardial approach to administration: Techniques and results. *Curr Interv Cardiol Rep*, 1(3):222–227, 1999. 1523-3839 (Print) Journal article.
- [126] G. Garcia-Cardena, J. Comander, K. R. Anderson, B. R. Blackman, and Jr. Gimbrone, M. A. Biomechanical activation of vascular endothelium as a determinant of its functional phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(8):4478–85, 2001. 0027-8424 (Print) Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- [127] R. L. Geary, T. R. Kohler, S. Vergel, T. R. Kirkman, and A. W. Clowes. Time course of flow-induced smooth muscle cell proliferation and intimal thickening in endothelialized baboon vascular grafts. *Circ Res*, 74(1):14–23, 1994. 0009-7330 (Print) Journal Article.
- [128] B. Geiger and A. Bershadsky. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Curr Opin Cell Biol*, 13(5):584–92, 2001. 0955-0674 (Print) Journal Article Review.
- [129] getABI Study group. getabi german epidemiological trial on ankle brachial index for elderly patients in family practice to detect peripheral arterial disease, significant marker for high mortality. *Vasa*, 31(4):241–8, 2002. 0301-1526 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- [130] S. Gielen, G. Schuler, and R. Hambrecht. Exercise training in coronary artery disease and coronary vasomotion. *Circulation*, 103(1):E1–6, 2001. 1524-4539 (Electronic) Journal Article Review.
- [131] M. Gill, S. Dias, K. Hattori, M. L. Rivera, D. Hicklin, L. Witte, L. Girardi, R. Yurt, H. Himel, and S. Rafii. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of vegfr2(+)/ac133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res*, 88(2):167–74, 2001. 1524-4571 (Electronic) Clinical Trial Journal Article.

- [132] G. T. Gillett, M. F. Fox, P. S. Rowe, C. M. Casimir, and S. Povey. Mapping of human non-muscle type cofilin (cfl1) to chromosome 11q13 and muscle-type cofilin (cfl2) to chromosome 14. *Ann Hum Genet*, 60 (Pt 3):201–11, 1996. 0003-4800 Journal Article.
- [133] Jr. Gimbrone, M. A., K. R. Anderson, J. N. Topper, B. L. Langille, A. W. Clowes, S. Berceles, M. G. Davies, K. R. Stenmark, M. G. Frid, M. C. Weiser-Evans, A. A. Aldashev, R. A. Nemenoff, M. W. Majesky, T. E. Landerholm, J. Lu, W. D. Ito, M. Arras, D. Scholz, B. Imhof, M. Aurrand-Lions, W. Schaper, T. E. Nagel, N. Resnick, C. F. Dewey, M. A. Gimbrone, and P. F. Davies. Special communication - the critical role of mechanical forces in blood vessel development, physiology and pathology. *J Vasc Surg*, 29(6):1104–51, 1999. 0741-5214 Journal article.
- [134] Jr. Gimbrone, M. A., J. N. Topper, T. Nagel, K. R. Anderson, and G. Garcia-Cardena. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, 902:230–9; discussion 239–40, 2000. 0077-8923 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review.
- [135] F. J. Giordano, P. Ping, M. D. McKirnan, S. Nozaki, A. N. DeMaria, W. H. Dillmann, O. Mathieu-Costello, and H. K. Hammond. Intracoronary gene transfer of fibroblast growth factor-5 increases blood flow and contractile function in an ischemic region of the heart. *Nat Med*, 2(5):534–9, 1996. 1078-8956 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- [136] B. Girolami, E. Bernardi, M. H. Prins, J. W. Ten Cate, R. Hettiarachchi, P. Prandoni, A. Girolami, and H. R. Buller. Treatment of intermittent claudication with physical training, smoking cessation, pentoxifylline, or nafronyl: a meta-analysis. *Arch Intern Med*, 159(4):337–45, 1999. 0003-9926 (Print) Journal Article Review.
- [137] S. Glagov, R. Vito, D. P. Giddens, and C. K. Zarins. Micro-architecture and composition of artery walls: relationship to location, diameter and the distribution of mechanical stress. *J Hypertens Suppl*, 10(6):S101–4, 1992. 0952-1178 (Print) Journal Article.

- [138] S. Glagov, E. Weisenberg, C. K. Zarins, R. Stankunavicius, and G. J. Koletis. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*, 316(22):1371–5, 1987. 0028-4793 (Print) Journal Article.
- [139] M. J. Gorrin-Rivas, S. Ariei, M. Furutani, M. Mizumoto, A. Mori, K. Hanaki, M. Maeda, H. Furuyama, Y. Kondo, and M. Imamura. Mouse macrophage metalloelastase gene transfer into a murine melanoma suppresses primary tumor growth by halting angiogenesis. *Clin Cancer Res*, 6(5):1647–54, 2000. 1078-0432 (Print) Journal Article.
- [140] L. H. Gowdak, L. Poliakova, Z. Li, R. Grove, E. G. Lakatta, and M. Talan. Induction of angiogenesis by cationic lipid-mediated vegf165 gene transfer in the rabbit ischemic hindlimb model. *J Vasc Surg*, 32(2):343–52, 2000. 0741-5214 (Print) Journal Article.
- [141] L. H. Gowdak, L. Poliakova, X. Wang, I. Kovesdi, K. W. Fishbein, A. Zacheo, R. Palumbo, S. Straino, C. Emanuelli, M. Marrocco-Trischitta, E. G. Lakatta, P. Anversa, R. G. Spencer, M. Talan, and M. C. Capogrossi. Adenovirus-mediated vegf(121) gene transfer stimulates angiogenesis in normoperfused skeletal muscle and preserves tissue perfusion after induction of ischemia. *Circulation*, 102(5):565–71, 2000. 1524-4539 (Electronic) Journal Article.
- [142] J. D. Grossman and W. Grossman. Angiogenesis. *Rev Cardiovasc Med*, 3(3):138–44, 2002. 1530-6550 Journal Article Review Review, Tutorial.
- [143] S. R. Gudi, C. B. Clark, and J. A. Frangos. Fluid flow rapidly activates g proteins in human endothelial cells. involvement of g proteins in mechanochemical signal transduction. *Circ Res*, 79(4):834–9, 1996. 0009-7330 (Print) Journal Article.
- [144] X. Guo and G. S. Kassab. Distribution of stress and strain along the porcine aorta and coronary arterial tree. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286(6):H2361–8, 2004. 0363-6135 (Print) Journal Article.
- [145] W. J. Hacking, E. VanBavel, and J. A. Spaan. Shear stress is not sufficient to control growth of vascular networks: a model study. *Am J Physiol*, 270(1 Pt 2):H364–75, 1996. 0002-9513 (Print) Journal Article.

- [146] J. F. Hansen. Coronary collateral circulation: clinical significance and influence on survival in patients with coronary artery occlusion. *Am Heart J*, 117(2):290–5, 1989. 0002-8703 (Print) Journal Article.
- [147] K. Harada, W. Grossman, M. Friedman, E. R. Edelman, P. V. Prasad, C. S. Keighley, W. J. Manning, F. W. Sellke, and M. Simons. Basic fibroblast growth factor improves myocardial function in chronically ischemic porcine hearts. *J Clin Invest*, 94(2):623–30, 1994. 0021-9738 (Print) Journal Article.
- [148] M. D. Hariawala, J. R. Horowitz, D. Esakof, D. D. Sheriff, D. H. Walter, B. Keyt, J. M. Isner, and J. F. Symes. Vegf improves myocardial blood flow but produces edrf-mediated hypotension in porcine hearts. *J Surg Res*, 63(1):77–82, 1996. 0022-4804 (Print) Journal Article.
- [149] B. G. Harvey, N. R. Hackett, T. El-Sawy, T. K. Rosengart, E. A. Hirschowitz, M. D. Lieberman, M. L. Lesser, and R. G. Crystal. Variability of human systemic humoral immune responses to adenovirus gene transfer vectors administered to different organs. *J Virol*, 73(8):6729–42, 1999. 0022-538X (Print) Clinical Trial Journal Article.
- [150] William Harvey. *Exercitatio anatomica de motu cordis et sanguinis in animalibus*. Wilhelm Fitzer, Frankfurt am Main, 1628.
- [151] K. Hattori, B. Heissig, Y. Wu, S. Dias, R. Tejada, B. Ferris, D. J. Hicklin, Z. Zhu, P. Bohlen, L. Witte, J. Hendriks, N. R. Hackett, R. G. Crystal, M. A. Moore, Z. Werb, D. Lyden, and S. Rafii. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting vegfr1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med*, 8(8):841–9, 2002. 1078-8956 (Print) Journal Article.
- [152] A. K. Hatzopoulos, J. Folkman, E. Vasile, G. K. Eiselen, and R. D. Rosenberg. Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from mouse embryos. *Development*, 125(8):1457–68, 1998. 0950-1991 (Print) Journal Article.
- [153] M. Hawkins, B. Pope, S. K. Maciver, and A. G. Weeds. Human actin depolymerizing factor mediates a ph-sensitive destruction of actin filaments. *Biochemistry*, 32(38):9985–93, 1993. 0006-2960 (Print) Journal Article.

- [154] K. Hayakawa, N. Minami, S. Ono, Y. Ogasawara, T. Totsuka, H. Abe, T. Tanaka, and T. Obinata. Increased expression of cofilin in dystrophic chicken and mouse skeletal muscles. *J Biochem (Tokyo)*, 114(4):582–7, 1993. 0021-924X (Print) Journal Article.
- [155] A. M. Heagerty, C. Aalkjaer, S. J. Bund, N. Korsgaard, and M. J. Mulvany. Small artery structure in hypertension. dual processes of remodeling and growth. *Hypertension*, 21(4):391–7, 1993. 0194-911X (Print) Journal Article Review.
- [156] M. Heil, M. Clauss, K. Suzuki, I. R. Buschmann, A. Willuweit, S. Fischer, and W. Schaper. Vascular endothelial growth factor (vegf) stimulates monocyte migration through endothelial monolayers via increased integrin expression. *Eur J Cell Biol*, 79(11):850–7, 2000. 0171-9335 (Print) Journal Article.
- [157] M. Heil and E. Deindl. Monocytes and cytokines. In W. Schaper and J. Schaper, editors, *Arteriogenesis*, pages 131–157. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London, 2004.
- [158] M. Heil, T. Ziegelhoeffer, F. Pipp, S. Kostin, S. Martin, M. Clauss, and W. Schaper. Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283(6):H2411–9, 2002. 0363-6135 Journal Article.
- [159] A. Helisch and W. Schaper. Arteriogenesis: the development and growth of collateral arteries. *Microcirculation*, 10(1):83–97, 2003. 1073-9688 Journal Article Review Review, Academic.
- [160] A. Helisch, S. Wagner, N. Khan, M. Drinane, S. Wolfram, M. Heil, T. Ziegelhoeffer, U. Brandt, J. D. Pearlman, H. M. Swartz, and W. Schaper. Impact of mouse strain differences in innate hindlimb collateral vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26(3):520–6, 2006. 1524-4636 (Electronic) Journal Article.
- [161] R. C. Hendel, T. D. Henry, K. Rocha-Singh, J. M. Isner, D. J. Kereiakes, F. J. Giordano, M. Simons, and R. O. Bonow. Effect of intracoronary recombinant human vascular endothelial growth factor on myocardial perfusion: evidence

- for a dose-dependent effect. *Circulation*, 101(2):118–21, 2000. 1524-4539 (Electronic) Clinical Trial Clinical Trial, Phase I Journal Article.
- [162] J. C. Hershey, E. P. Baskin, J. D. Glass, H. A. Hartman, D. B. Gilberto, I. T. Rogers, and J. J. Cook. Revascularization in the rabbit hindlimb: dissociation between capillary sprouting and arteriogenesis. *Cardiovasc Res*, 49(3):618–25, 2001. 0008-6363 (Print) Journal Article.
- [163] A.T. Hertig. Angiogenesis in the early human chorion and in the primary placenta of the macaque monkey. In *Contributions to embryology*, pages 37–81. Carnegie Institute of Washington Publication, Washington, 1935.
- [164] S. Herzog, H. Sager, E. Khmelevski, A. Deylig, and W. D. Ito. Collateral arteries grow from preexisting anastomoses in the rat hindlimb. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283(5):H2012–20, 2002. 0363-6135 (Print) Journal Article.
- [165] I. E. Hoefler, N. van Royen, I. R. Buschmann, J. J. Piek, and W. Schaper. Time course of arteriogenesis following femoral artery occlusion in the rabbit. *Cardiovasc Res*, 49(3):609–17, 2001. 0008-6363 Journal Article.
- [166] I. E. Hoefler, N. van Royen, J. E. Rectenwald, E. J. Bray, Z. Abouhamze, L. L. Moldawer, M. Voskuil, J. J. Piek, I. R. Buschmann, and C. K. Ozaki. Direct evidence for tumor necrosis factor- α signaling in arteriogenesis. *Circulation*, 105(14):1639–41, 2002. 1524-4539 (Electronic) Journal Article.
- [167] I.E. Hoefler, I.R. Buschmann, and N. van Royen. Is arteriogenesis inducible when collateral arteries are already recruited. *J Am Coll Cardiol*, 35 (Suppl. A):278A, 1999.
- [168] J. I. Hoffman and J. A. Spaan. Pressure-flow relations in coronary circulation. *Physiol Rev*, 70(2):331–90, 1990. 0031-9333 (Print) Journal Article Review.
- [169] J. H. Hoger, V. I. Ilyin, S. Forsyth, and A. Hoger. Shear stress regulates the endothelial kir2.1 ion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(11):7780–5, 2002. 0027-8424 (Print) Journal Article.

- [170] N. K. Hollenberg. Collateral arterial growth and reactivity: lessons from the limb and renal blood supply. In W. Schaper and J. Schaper, editors, *Collateral Circulation: Heart, Brain, Kidney, Limbs*, pages 1–15. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London, 1993.
- [171] P. Hotulainen, E. Paunola, M. K. Vartiainen, and P. Lappalainen. Actin-depolymerizing factor and cofilin-1 play overlapping roles in promoting rapid f-actin depolymerization in mammalian nonmuscle cells. *Mol Biol Cell*, 16(2):649–64, 2005. 1059-1524 (Print) Comparative Study Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- [172] H. J. Hsieh, N. Q. Li, and J. A. Frangos. Shear stress increases endothelial platelet-derived growth factor mrna levels. *Am J Physiol*, 260(2 Pt 2):H642–6, 1991. 0002-9513 (Print) Journal Article.
- [173] A. G. Hudetz and M. F. Kiani. The role of wall shear stress in microvascular network adaptation. *Adv Exp Med Biol*, 316:31–9, 1992. 0065-2598 (Print) Journal Article.
- [174] A. D. Hughes, G. F. Clunn, J. Refson, and C. Demoliou-Mason. Platelet-derived growth factor (pdgf): actions and mechanisms in vascular smooth muscle. *Gen Pharmacol*, 27(7):1079–89, 1996. 0306-3623 (Print) Journal Article Review.
- [175] G. M. Hutchins, M. M. Miner, and B. H. Bulkley. Tortuosity as an index of the age and diameter increase of coronary collateral vessels in patients after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*, 41(2):210–5, 1978. 0002-9149 (Print) Journal Article.
- [176] H. Huwer, C. Welter, C. Ozbek, M. Seifert, U. Straub, P. Greilach, G. Kalweit, and H. Isringhaus. Simultaneous surgical revascularization and angiogenic gene therapy in diffuse coronary artery disease. *Eur J Cardiothorac Surg*, 20(6):1128–34, 2001. 1010-7940 (Print) Journal Article.
- [177] H. Huwer, J. Winning, B. Vollmar, J. Rissland, C. Welter, H. J. Schafers, and M. D. Menger. Microvascularization and ventricular function after local alginate-encapsulated angiogenic growth factor treatment in a rat

- cryothermia-induced myocardial infarction model. *Microvasc Res*, 62(2):211–4, 2001. 0026-2862 (Print) Journal Article.
- [178] O. Iba, H. Matsubara, Y. Nozawa, S. Fujiyama, K. Amano, Y. Mori, H. Kojima, and T. Iwasaka. Angiogenesis by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs. *Circulation*, 106(15):2019–25, 2002. 1524-4539 (Electronic) Journal Article.
- [179] D. E. Ingber. Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology. *Circ Res*, 91(10):877–87, 2002. 1524-4571 (Electronic) Journal Article Review.
- [180] J. M. Isner, P. R. Vale, J. F. Symes, and D. W. Losordo. Assessment of risks associated with cardiovascular gene therapy in human subjects. *Circ Res*, 89(5):389–400, 2001. 1524-4571 (Electronic) Journal Article Review.
- [181] J. M. Isner, K. Walsh, J. Symes, A. Pieczek, S. Takeshita, J. Lowry, K. Rosenfield, L. Weir, E. Brogi, and D. Jurayj. Arterial gene transfer for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. *Hum Gene Ther*, 7(8):959–88, 1996. 1043-0342 (Print) Journal Article.
- [182] W. D. Ito, M. Arras, D. Scholz, B. Winkler, P. Htun, and W. Schaper. Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion. *Am J Physiol*, 273(3 Pt 2):H1255–65, 1997. 0002-9513 (Print) Journal Article.
- [183] W. D. Ito, M. Arras, B. Winkler, D. Scholz, J. Schaper, and W. Schaper. Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ Res*, 80(6):829–37, 1997. 0009-7330 (Print) Journal Article.
- [184] H. Iwaguro, J. Yamaguchi, C. Kalka, S. Murasawa, H. Masuda, S. Hayashi, M. Silver, T. Li, J. M. Isner, and T. Asahara. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation*, 105(6):732–8, 2002. 1524-4539 (Electronic) Journal Article.
- [185] Z. S. Jackson, A. I. Gotlieb, and B. L. Langille. Wall tissue remodeling regulates longitudinal tension in arteries. *Circ Res*, 90(8):918–25, 2002. 1524-4571 (Electronic) Journal Article.

- [186] E. R. Jacobs, C. Cheliakine, D. Gebremedhin, E. K. Birks, P. F. Davies, and D. R. Harder. Shear activated channels in cell-attached patches of cultured bovine aortic endothelial cells. *Pflugers Arch*, 431(1):129–31, 1995. 0031-6768 (Print) Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- [187] M. Jakob, D. Spasojevic, O. N. Krogmann, H. Wiher, R. Hug, and O. M. Hess. Tortuosity of coronary arteries in chronic pressure and volume overload. *Cathet Cardiovasc Diagn*, 38(1):25–31, 1996. 0098-6569 (Print) Journal Article.
- [188] S. Jalali, Y. S. Li, M. Sotoudeh, S. Yuan, S. Li, S. Chien, and J. Y. Shyy. Shear stress activates p60src-ras-mapk signaling pathways in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18(2):227–34, 1998. 1079-5642 (Print) Journal Article.
- [189] I. Juhan-Vague and D. Collen. On the role of coagulation and fibrinolysis in atherosclerosis. *Ann Epidemiol*, 2(4):427–38, 1992. 1047-2797 (Print) Journal Article Review.
- [190] P. R. Jungblut and R. Seifert. Analysis by high-resolution two-dimensional electrophoresis of differentiation-dependent alterations in cytosolic protein pattern of hl-60 leukemic cells. *J Biochem Biophys Methods*, 21(1):47–58, 1990. 0165-022X (Print) Journal Article.
- [191] D. Kaiser, M. A. Freyberg, and P. Friedl. Lack of hemodynamic forces triggers apoptosis in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 231(3):586–90, 1997. 0006-291X (Print) Journal Article.
- [192] C. Kalka, H. Masuda, T. Takahashi, R. Gordon, O. Tepper, E. Gravereaux, A. Pieczek, H. Iwaguro, S. I. Hayashi, J. M. Isner, and T. Asahara. Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ Res*, 86(12):1198–202, 2000. 1524-4571 (Electronic) Clinical Trial Journal Article Randomized Controlled Trial.
- [193] C. Kalka, H. Masuda, T. Takahashi, W. M. Kalka-Moll, M. Silver, M. Kearney, T. Li, J. M. Isner, and T. Asahara. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(7):3422–7, 2000. 0027-8424 (Print) Journal Article.

- [194] C. Kalka, H. Tehrani, B. Laudenberg, P. R. Vale, J. M. Isner, T. Asahara, and J. F. Symes. Vegf gene transfer mobilizes endothelial progenitor cells in patients with inoperable coronary disease. *Ann Thorac Surg*, 70(3):829–34, 2000. 0003-4975 (Print) Journal Article.
- [195] H. Kamihata, H. Matsubara, T. Nishiue, S. Fujiyama, Y. Tsutsumi, R. Ozono, H. Masaki, Y. Mori, O. Iba, E. Tateishi, A. Kosaki, S. Shintani, T. Murahara, T. Imaizumi, and T. Iwasaka. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation*, 104(9):1046–52, 2001. 1524-4539 (Electronic) Journal Article.
- [196] A. Kamiya, R. Bukhari, and T. Togawa. Adaptive regulation of wall shear stress optimizing vascular tree function. *Bull Math Biol*, 46(1):127–37, 1984. 0092-8240 (Print) Journal Article.
- [197] A. Kamiya and T. Togawa. Adaptive regulation of wall shear stress to flow change in the canine carotid artery. *Am J Physiol*, 239(1):H14–21, 1980. 0002-9513 (Print) Journal Article.
- [198] T. Karino and H. L. Goldsmith. Role of blood cell-wall interactions in thrombogenesis and atherogenesis: a microrheological study. *Biorheology*, 21(4):587–601, 1984. 0006-355X (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- [199] J. Kastrup, E. Jorgensen, A. Ruck, D. Tagil, K. Glogar, W. Ruzyllo, H. E. Botker, D. Dudek, V. Drvota, B. Hesse, L. Thuesen, P. Blomberg, M. Gyongyosi, and C. Sylven. Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-a165 gene therapy in patients with stable severe angina pectoris a randomized double-blind placebo-controlled study: the euroinject one trial. *Journal of the American College of Cardiology*, 45:982–8, April 2005.
- [200] A. Kawamoto, H. C. Gwon, H. Iwaguro, J. I. Yamaguchi, S. Uchida, H. Masuda, M. Silver, H. Ma, M. Kearney, J. M. Isner, and T. Asahara. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation*, 103(5):634–7, 2001. 1524-4539 (Electronic) Journal Article.

- [201] S. M. Keezer, S. E. Ivie, H. C. Krutzsch, A. Tandle, S. K. Libutti, and D. D. Roberts. Angiogenesis inhibitors target the endothelial cell cytoskeleton through altered regulation of heat shock protein 27 and cofilin. *Cancer Res*, 63(19):6405–12, 2003. 0008-5472 Journal Article.
- [202] T. Kinnaird, E. Stabile, M. S. Burnett, C. W. Lee, S. Barr, S. Fuchs, and S. E. Epstein. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res*, 94(5):678–85, 2004. 1524-4571 (Electronic) Journal Article.
- [203] T. Kinnaird, E. Stabile, M. S. Burnett, M. Shou, C. W. Lee, S. Barr, S. Fuchs, and S. E. Epstein. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*, 109(12):1543–9, 2004. 1524-4539 (Electronic) Evaluation Studies Journal Article.
- [204] R. Klinke and S. Silbernagel. *Lehrbuch der Physiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 2. edition, 1994.
- [205] J. Klose and U. Kobalz. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis*, 16(6):1034–59, 1995. 0173-0835 (Print) Journal Article.
- [206] T. R. Kohler, T. R. Kirkman, L. W. Kraiss, B. K. Zierler, and A. W. Clowes. Increased blood flow inhibits neointimal hyperplasia in endothelialized vascular grafts. *Circ Res*, 69(6):1557–65, 1991. 0009-7330 (Print) Journal Article.
- [207] S. Konakahara, K. Ohashi, K. Mizuno, K. Itoh, and T. Tsuji. Cd29 integrin- and limk1/cofilin-mediated actin reorganization regulates the migration of haematopoietic progenitor cells underneath bone marrow stromal cells. *Genes Cells*, 9(4):345–58, 2004. 1356-9597 (Print) Journal Article.
- [208] Keisuke Kosaki, Joji Ando, Risa Korenaga, Takahide Kurokawa, and Akira Kamiya. Fluid shear stress increases the production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by endothelial cells via mrna stabilization. *Circulation Research*, 82(7):794–802, 1998.

- [209] N. Koyama, T. Koshikawa, N. Morisaki, Y. Saito, and S. Yoshida. Bifunctional effects of transforming growth factor-beta on migration of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 169(2):725–9, 1990. 0006-291X (Print) Journal Article.
- [210] L. W. Kraiss, T. R. Kirkman, T. R. Kohler, B. Zierler, and A. W. Clowes. Shear stress regulates smooth muscle proliferation and neointimal thickening in porous polytetrafluoroethylene grafts. *Arterioscler Thromb*, 11(6):1844–52, 1991. 1049-8834 (Print) Journal Article.
- [211] D. N. Ku, D. P. Giddens, D. J. Phillips, and Jr. Strandness, D. E. Hemodynamics of the normal human carotid bifurcation: in vitro and in vivo studies. *Ultrasound Med Biol*, 11(1):13–26, 1985. 0301-5629 (Print) Journal Article.
- [212] D. N. Ku, D. P. Giddens, C. K. Zarins, and S. Glagov. Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress. *Arteriosclerosis*, 5(3):293–302, 1985. 0276-5047 (Print) Journal Article.
- [213] K. Kusano, H. Abe, and T. Obinata. Detection of a sequence involved in actin-binding and phosphoinositide-binding in the n-terminal side of cofilin. *Mol Cell Biochem*, 190(1-2):133–41, 1999. 0300-8177 (Print) Journal Article.
- [214] K. Kuwabara, S. Ogawa, M. Matsumoto, S. Koga, M. Clauss, D. J. Pinsky, P. Lyn, J. Leavy, L. Witte, J. Joseph-Silverstein, and et al. Hypoxia-mediated induction of acidic/basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor in mononuclear phagocytes stimulates growth of hypoxic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(10):4606–10, 1995. 0027-8424 (Print) Journal Article.
- [215] R. J. Laham, L. Garcia, D. S. Baim, M. Post, and M. Simons. Therapeutic angiogenesis using basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor using various delivery strategies. *Curr Interv Cardiol Rep*, 1(3):228–233, 1999. 1523-3839 (Print) Journal article.
- [216] R. J. Laham, M. Rezaee, M. Post, F. W. Sellke, R. A. Braeckman, D. Hung, and M. Simons. Intracoronary and intravenous administration of basic fibroblast growth factor: myocardial and tissue distribution. *Drug Metab Dispos*, 27(7):821–6, 1999. 0090-9556 (Print) Journal Article.

- [217] R. J. Laham, F. W. Sellke, E. R. Edelman, J. D. Pearlman, J. A. Ware, D. L. Brown, J. P. Gold, and M. Simons. Local perivascular delivery of basic fibroblast growth factor in patients undergoing coronary bypass surgery: results of a phase i randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Circulation*, 100(18):1865–71, 1999. 1524-4539 (Electronic) Clinical Trial Clinical Trial, Phase I Journal Article Randomized Controlled Trial.
- [218] B. L. Langille. Arterial remodeling: relation to hemodynamics. *Can J Physiol Pharmacol*, 74(7):834–41, 1996. 0008-4212 (Print) Journal Article Review.
- [219] B. L. Langille and F. O'Donnell. Reductions in arterial diameter produced by chronic decreases in blood flow are endothelium-dependent. *Science*, 231(4736):405–7, 1986. 0036-8075 (Print) Journal Article.
- [220] B.L. Langille. Blood flow-induced remodeling of the artery wall. In J.A. Bevan, G. Kaley, and G.M. Rubanyi, editors, *Flow-Dependent Regulation of VascularFunction*, pages 277–299. Oxford University Press, New York, 1995.
- [221] M. B. Lawrence, C. W. Smith, S. G. Eskin, and L. V. McIntire. Effect of venous shear stress on cd18-mediated neutrophil adhesion to cultured endothelium. *Blood*, 75(1):227–37, 1990. 0006-4971 (Print) Journal Article.
- [222] D. F. Lazarous, M. Scheinowitz, M. Shou, E. Hodge, S. Rajanayagam, S. Hunsberger, Jr. Robison, W. G., J. A. Stiber, R. Correa, and S. E. Epstein. Effects of chronic systemic administration of basic fibroblast growth factor on collateral development in the canine heart. *Circulation*, 91(1):145–53, 1995. 0009-7322 Journal Article.
- [223] D. F. Lazarous, M. Shou, M. Scheinowitz, E. Hodge, V. Thirumurti, A. N. Kitsiou, J. A. Stiber, A. D. Lobo, S. Hunsberger, E. Guetta, S. E. Epstein, and E. F. Unger. Comparative effects of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on coronary collateral development and the arterial response to injury. *Circulation*, 94(5):1074–82, 1996. 0009-7322 (Print) Journal Article.
- [224] D. F. Lazarous, E. F. Unger, S. E. Epstein, A. Stine, J. L. Arevalo, E. Y. Chew, and A. A. Quyyumi. Basic fibroblast growth factor in patients with intermittent claudication: results of a phase i trial. *J Am Coll Cardiol*,

- 36(4):1239–44, 2000. 0735-1097 (Print) Clinical Trial Clinical Trial, Phase I Journal Article Randomized Controlled Trial.
- [225] B. M. Learoyd and M. G. Taylor. Alterations with age in the viscoelastic properties of human arterial walls. *Circ Res*, 18(3):278–92, 1966. 0009-7330 (Print) Journal Article.
- [226] C. Lebherz, G. von Degenfeld, A. Karl, A. Pfosser, P. Raake, F. Pachmayr, D. Scholz, C. Kupatt, and P. Boekstegers. Therapeutic angiogenesis/arteriogenesis in the chronic ischemic rabbit hindlimb: effect of venous basic fibroblast growth factor retroinfusion. *Endothelium*, 10(4-5):257–65, 2003. 1062-3329 (Print) Journal Article.
- [227] R. J. Lederman, F. O. Mendelsohn, R. D. Anderson, J. F. Saucedo, A. N. Tenaglia, J. B. Hermiller, W. B. Hillegass, K. Rocha-Singh, T. E. Moon, M. J. Whitehouse, and B. H. Annex. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the traffic study): a randomised trial. *Lancet*, 359(9323):2053–8, 2002. 0140-6736 (Print) Clinical Trial Journal Article Randomized Controlled Trial.
- [228] C. W. Lee, E. Stabile, T. Kinnaird, M. Shou, J. M. Devaney, S. E. Epstein, and M. S. Burnett. Temporal patterns of gene expression after acute hindlimb ischemia in mice: insights into the genomic program for collateral vessel development. *J Am Coll Cardiol*, 43(3):474–82, 2004. 0735-1097 (Print) Journal Article.
- [229] K. Y. Lee, M. C. Peters, K. W. Anderson, and D. J. Mooney. Controlled growth factor release from synthetic extracellular matrices. *Nature*, 408(6815):998–1000, 2000. 0028-0836 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov’t Research Support, U.S. Gov’t, P.H.S.
- [230] R. J. Lee, M. L. Springer, W. E. Blanco-Bose, R. Shaw, P. C. Ursell, and H. M. Blau. Vegf gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression. *Circulation*, 102(8):898–901, 2000. 1524-4539 (Electronic) Journal Article.
- [231] T. H. Lee, T. Rhim, and S. S. Kim. Prothrombin kringle-2 domain has a growth inhibitory activity against basic fibroblast growth factor-stimulated

- capillary endothelial cells. *J Biol Chem*, 273(44):28805–12, 1998. 0021-9258 (Print) Journal Article.
- [232] T. Lefevre and A. Bernard. [intercoronary anastomoses of congenital origin. apropos of a case]. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 82(6):949–52, 1989. 0003-9683 (Print) Journal Article Review.
- [233] R. M. Lehman, G. K. Owens, N. F. Kassell, and K. Hongo. Mechanism of enlargement of major cerebral collateral arteries in rabbits. *Stroke*, 22(4):499–504, 1991. 0039-2499 (Print) Journal Article.
- [234] S. Lehoux and A. Tedgui. Signal transduction of mechanical stresses in the vascular wall. *Hypertension*, 32(2):338–45, 1998. 0194-911X (Print) Journal Article Review.
- [235] S. Li, B. P. Chen, N. Azuma, Y. L. Hu, S. Z. Wu, B. E. Sumpio, J. Y. Shyy, and S. Chien. Distinct roles for the small gtpases cdc42 and rho in endothelial responses to shear stress. *J Clin Invest*, 103(8):1141–50, 1999. 0021-9738 (Print) Journal Article.
- [236] S. Liekens, E. De Clercq, and J. Neyts. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol*, 61(3):253–70, 2001. 0006-2952 (Print) Journal Article Review.
- [237] T. Lin, L. Zeng, Y. Liu, K. DeFea, M. A. Schwartz, S. Chien, and J. Y. Shyy. Rho-rock-link-cofilin pathway regulates shear stress activation of sterol regulatory element binding proteins. *Circ Res*, 92(12):1296–304, 2003. 1524-4571 (Electronic) Journal Article.
- [238] P. Lindahl, B. R. Johansson, P. Leveen, and C. Betsholtz. Pericyte loss and microaneurysm formation in pdgf-b-deficient mice. *Science*, 277(5323):242–5, 1997. 0036-8075 (Print) Journal Article.
- [239] V. Lindner, D. A. Lappi, A. Baird, R. A. Majack, and M. A. Reidy. Role of basic fibroblast growth factor in vascular lesion formation. *Circ Res*, 68(1):106–13, 1991. 0009-7330 (Print) Journal Article.
- [240] V. Lindner and T. Maciag. The putative convergent and divergent natures of angiogenesis and arteriogenesis. *Circ Res*, 89(9):747–9, 2001. 1524-4571 (Electronic) Comment Editorial.

- [241] V. Lindner and M. A. Reidy. Proliferation of smooth muscle cells after vascular injury is inhibited by an antibody against basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(9):3739–43, 1991. 0027-8424 (Print) Journal Article.
- [242] 3rd Linsenmeyer, G. J. and J. F. Schneider. Angiographically visible inter-coronary collateral circulation in the absence of obstructive coronary artery disease. *Am J Cardiol*, 53(7):954–6, 1984. 0002-9149 (Print) Case Reports Journal Article.
- [243] Y. Liu, S. R. Cox, T. Morita, and S. Kourembanas. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. identification of a 5' enhancer. *Circ Res*, 77(3):638–43, 1995. 0009-7330 Journal Article.
- [244] C. J. Longland. The collateral circulation of the limb; arris and gale lecture delivered at the royal college of surgeons of england on 4th february, 1953. *Ann R Coll Surg Engl*, 13(3):161–76, 1953. 0035-8843 Journal Article.
- [245] J. J. Lopez, E. R. Edelman, A. Stamler, M. G. Hibberd, P. Prasad, K. A. Thomas, J. DiSalvo, R. P. Caputo, J. P. Carrozza, P. S. Douglas, F. W. Sellke, and M. Simons. Angiogenic potential of perivascularly delivered afg in a porcine model of chronic myocardial ischemia. *Am J Physiol*, 274(3 Pt 2):H930–6, 1998. 0002-9513 (Print) Journal Article.
- [246] D. W. Losordo, P. R. Vale, J. F. Symes, C. H. Dunnington, D. D. Esakof, M. Maysky, A. B. Ashare, K. Lathi, and J. M. Isner. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phvegf165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation*, 98(25):2800–4, 1998. 0009-7322 (Print) Case Reports Clinical Trial Clinical Trial, Phase I Journal Article.
- [247] Richard Lower. *Tractus de Corde. Item de motu & colore sanguinis et chyli in eum transitu*. Impensis J. Allestry, London, 1669.
- [248] X. Lu, J. B. Zhao, G. R. Wang, H. Gregersen, and G. S. Kassab. Remodeling of the zero-stress state of femoral arteries in response to flow overload. *Am*

- J Physiol Heart Circ Physiol*, 280(4):H1547–59, 2001. 0363-6135 (Print) Journal Article.
- [249] A. Luttun, M. Tjwa, L. Moons, Y. Wu, A. Angelillo-Scherrer, F. Liao, J. A. Nagy, A. Hooper, J. Priller, B. De Klerck, V. Compernelle, E. Daci, P. Bohlen, M. Dewerchin, J. M. Herbert, R. Fava, P. Matthys, G. Carmeliet, D. Colleen, H. F. Dvorak, D. J. Hicklin, and P. Carmeliet. Revascularization of ischemic tissues by plgf treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-flt1. *Nat Med*, 8(8):831–40, 2002. 1078-8956 (Print) Journal Article.
- [250] S. K. Maciver. How adf/cofilin depolymerizes actin filaments. *Curr Opin Cell Biol*, 10(1):140–4, 1998. 0955-0674 (Print) Journal Article.
- [251] S. K. Maciver and P. J. Hussey. The adf/cofilin family: actin-remodeling proteins. *Genome Biol*, 3(5):reviews3007, 2002. 1465-6914 Journal Article Review Review, Tutorial.
- [252] S. K. Maciver, B. J. Pope, S. Whytock, and A. G. Weeds. The effect of two actin depolymerizing factors (adf/cofilins) on actin filament turnover: ph sensitivity of f-actin binding by human adf, but not of acanthamoeba actophorin. *Eur J Biochem*, 256(2):388–97, 1998. 0014-2956 (Print) Journal Article.
- [253] M. Maekawa, T. Ishizaki, S. Boku, N. Watanabe, A. Fujita, A. Iwamatsu, T. Obinata, K. Ohashi, K. Mizuno, and S. Narumiya. Signaling from rho to the actin cytoskeleton through protein kinases rock and lim-kinase. *Science*, 285(5429):895–8, 1999. 0036-8075 (Print) Journal Article.
- [254] A. M. Malek, G. H. Gibbons, V. J. Dzau, and S. Izumo. Fluid shear stress differentially modulates expression of genes encoding basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor b chain in vascular endothelium. *J Clin Invest*, 92(4):2013–21, 1993. 0021-9738 (Print) Journal Article.
- [255] Marcello Malpighi. De pulmonibus observationes anatomicae. In Thomas Bartholin, editor, *De pulmonum substantia et motu diatribe*. P. Hauboldum, Copenhagen, 1663.

- [256] R. N. Martins, J. O. Chleboun, P. Sellers, M. Sleigh, and J. Muir. The role of pdgf-bb on the development of the collateral circulation after acute arterial occlusion. *Growth Factors*, 10(4):299–306, 1994. 0897-7194 (Print) Journal Article.
- [257] Finocchiaro ML Maseri A, Araujo L. Collateral development and function in man. In Schaper W eds Schaper J, editor, *Collateral Circulation - Heart, Brain, Kidney, Limbs*, pages 381–402. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London, 1993.
- [258] H. Masuda, C. Kalka, and T. Asahara. Endothelial progenitor cells for regeneration. *Hum Cell*, 13(4):153–60, 2000. 0914-7470 (Print) Journal Article Review.
- [259] H. Masuda, K. Kawamura, T. Sugiyama, and A. Kamiya. Effects of endothelial denudation in flow-induced arterial dilatation. *Front Med Biol Eng*, 5(1):57–62, 1993. 0921-3775 (Print) Journal Article.
- [260] H. Masuda, K. Kawamura, K. Tohda, T. Shozawa, M. Sageshima, and A. Kamiya. Increase in endothelial cell density before artery enlargement in flow-loaded canine carotid artery. *Arteriosclerosis*, 9(6):812–23, 1989. 0276-5047 (Print) Journal Article.
- [261] H. Masuda, Y. J. Zhuang, T. M. Singh, K. Kawamura, M. Murakami, C. K. Zarins, and S. Glagov. Adaptive remodeling of internal elastic lamina and endothelial lining during flow-induced arterial enlargement. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19(10):2298–307, 1999. 1079-5642 (Print) Journal Article.
- [262] S. M. McCormick, S. G. Eskin, L. V. McIntire, C. L. Teng, C. M. Lu, C. G. Russell, and K. K. Chittur. Dna microarray reveals changes in gene expression of shear stressed human umbilical vein endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(16):8955–60, 2001. 0027-8424 (Print) Journal Article.
- [263] A. McGough, B. Pope, W. Chiu, and A. Weeds. Cofilin changes the twist of f-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *J Cell Biol*, 138(4):771–81, 1997. 0021-9525 (Print) Journal Article.

- [264] P. J. Meberg, S. Ono, L. S. Minamide, M. Takahashi, and J. R. Bamburg. Actin depolymerizing factor and cofilin phosphorylation dynamics: response to signals that regulate neurite extension. *Cell Motil Cytoskeleton*, 39(2):172–90, 1998. 0886-1544 Journal Article.
- [265] A. Meeson, M. Palmer, M. Calton, and R. Lang. A relationship between apoptosis and flow during programmed capillary regression is revealed by vital analysis. *Development*, 122(12):3929–38, 1996. 0950-1991 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- [266] T. Meyer-Steineg and K. Sudhoff. *Illustrierte Geschichte der Medizin*. G. Fischer, Stuttgart, 5. edition, 1965.
- [267] L. S. Minamide, W. B. Painter, G. Schevzov, P. Gunning, and J. R. Bamburg. Differential regulation of actin depolymerizing factor and cofilin in response to alterations in the actin monomer pool. *J Biol Chem*, 272(13):8303–9, 1997. 0021-9258 (Print) Journal Article.
- [268] A. Moon and D. G. Drubin. The adf/cofilin proteins: stimulus-responsive modulators of actin dynamics. *Mol Biol Cell*, 6(11):1423–31, 1995. 1059-1524 Journal Article Review Review, Tutorial.
- [269] T. E. Morgan, R. O. Lockerbie, L. S. Minamide, M. D. Browning, and J. R. Bamburg. Isolation and characterization of a regulated form of actin depolymerizing factor. *J Cell Biol*, 122(3):623–33, 1993. 0021-9525 (Print) Journal Article.
- [270] M. Morigi, C. Zoja, M. Figliuzzi, M. Foppolo, G. Micheletti, M. BontemPELLI, M. Saronni, G. Remuzzi, and A. Remuzzi. Fluid shear stress modulates surface expression of adhesion molecules by endothelial cells. *Blood*, 85(7):1696–703, 1995. 0006-4971 (Print) Journal Article.
- [271] K. Moriyama, K. Iida, and I. Yahara. Phosphorylation of ser-3 of cofilin regulates its essential function on actin. *Genes Cells*, 1(1):73–86, 1996. 1356-9597 (Print) Journal Article.
- [272] K. S. Moulton, E. Heller, M. A. Konerding, E. Flynn, W. Palinski, and J. Folkman. Angiogenesis inhibitors endostatin or tnp-470 reduce intimal

- neovascularization and plaque growth in apolipoprotein e-deficient mice. *Circulation*, 99(13):1726–32, 1999. 0009-7322 (Print) Journal Article.
- [273] T. Murohara, H. Ikeda, J. Duan, S. Shintani, K. Sasaki, H. Eguchi, I. Onitsuka, K. Matsui, and T. Imaizumi. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest*, 105(11):1527–36, 2000. 0021-9738 (Print) Journal Article.
- [274] C. D. Murray. The physiological principle of minimum work: I. the vascular system and the cost of blood volume. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 12(3):207–14, 1926. 0027-8424 (Print) Journal Article.
- [275] CD Murray. The physiological principle of minimum work applied to the angle of branching arteries. *J Gen Physiol*, 9:835–841, 1926.
- [276] R. Nagaoka, K. Kusano, H. Abe, and T. Obinata. Effects of cofilin on actin filamentous structures in cultured muscle cells. intracellular regulation of cofilin action. *J Cell Sci*, 108 (Pt 2):581–93, 1995. 0021-9533 (Print) Journal Article.
- [277] T. Nagel, N. Resnick, W. J. Atkinson, C. F. J. Dewey, and M. A. J. Gimbrone. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation*, 94:885–891, 1994.
- [278] T. Nagel, N. Resnick, Jr. Dewey, C. F., and Jr. Gimbrone, M. A. Vascular endothelial cells respond to spatial gradients in fluid shear stress by enhanced activation of transcription factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19(8):1825–34, 1999. 1079-5642 (Print) Journal Article.
- [279] J. A. Nagy, A. M. Dvorak, and H. F. Dvorak. Vegf-a(164/165) and plgf: roles in angiogenesis and arteriogenesis. *Trends Cardiovasc Med*, 13(5):169–75, 2003. 1050-1738 (Print) Journal Article Review.
- [280] K. Nakashima, N. Sato, T. Nakagaki, H. Abe, S. Ono, and T. Obinata. Two mouse cofilin isoforms, muscle-type (mcf) and non-muscle type (nmcf), interact with f-actin with different efficiencies. *J Biochem (Tokyo)*, 138(4):519–26, 2005. 0021-924X (Print) Journal Article.

- [281] G. Nebl, S. C. Meuer, and Y. Samstag. Dephosphorylation of serine 3 regulates nuclear translocation of cofilin. *J Biol Chem*, 271(42):26276–80, 1996. 0021-9258 (Print) Journal Article.
- [282] B. Nilius, J. Eggermont, T. Voets, and G. Droogmans. Volume-activated cl-channels. *Gen Pharmacol*, 27(7):1131–40, 1996. 0306-3623 (Print) Journal Article Review.
- [283] E. Nishida, S. Maekawa, E. Muneyuki, and H. Sakai. Action of a 19k protein from porcine brain on actin polymerization: a new functional class of actin-binding proteins. *J Biochem (Tokyo)*, 95(2):387–98, 1984. 0021-924X (Print) Journal Article.
- [284] E. Nishida, S. Maekawa, and H. Sakai. Cofilin, a protein in porcine brain that binds to actin filaments and inhibits their interactions with myosin and tropomyosin. *Biochemistry*, 23(22):5307–13, 1984. 0006-2960 Journal Article.
- [285] R. Niwa, K. Nagata-Ohashi, M. Takeichi, K. Mizuno, and T. Uemura. Control of actin reorganization by slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate adf/cofilin. *Cell*, 108(2):233–46, 2002. 0092-8674 (Print) Journal Article.
- [286] R. Nohara, H. Kambara, T. Murakami, K. Kadota, S. Tamaki, and C. Kawai. Collateral function in early acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*, 52(8):955–9, 1983. 0002-9149 (Print) Journal Article.
- [287] University of Kansas Medical Center. Clendening history of medicine library and museum, digital clendening, portrait collection. <http://clendening.kumc.edu/dc/pc/harvey04.jpg>; zugegriffen am 01.06.2007.
- [288] Weizmann Institute of Science. Genecard for gene cfl1 gc11m065397, 03 07. Stand: 23.03.2007; URL: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CFL1&search=CFL1&suff=txt>; zugegriffen am 01.06.2007.

- [289] Weizmann Institute of Science. Genecard for gene *cff2* gc14m033169, 03 07. Stand: 23.03.2007; URL: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CFL2&search=CFL2&suff=txt>; zugegriffen am 01.06.2007.
- [290] P. H. O'Farrell. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, 250(10):4007–21, 1975. 0021-9258 (Print) Journal Article.
- [291] K. Ogawa, M. Tashima, Y. Yumoto, T. Okuda, H. Sawada, M. Okuma, and Y. Maruyama. Coding sequence of human placenta cofilin cDNA. *Nucleic Acids Res*, 18(23):7169, 1990. 0305-1048 (Print) Journal Article.
- [292] K. Ohashi, K. Nagata, M. Maekawa, T. Ishizaki, S. Narumiya, and K. Mizuno. Rho-associated kinase rock activates lim-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop. *J Biol Chem*, 275(5):3577–82, 2000. 0021-9258 (Print) Journal Article.
- [293] M. Ohno, J. P. Cooke, V. J. Dzau, and G. H. Gibbons. Fluid shear stress induces endothelial transforming growth factor beta-1 transcription and production. modulation by potassium channel blockade. *J Clin Invest*, 95(3):1363–9, 1995. 0021-9738 (Print) Journal Article.
- [294] M. Ohno, G. H. Gibbons, V. J. Dzau, and J. P. Cooke. Shear stress elevates endothelial cGMP. role of a potassium channel and G protein coupling. *Circulation*, 88(1):193–7, 1993. 0009-7322 (Print) Journal Article.
- [295] S. P. Olesen, D. E. Clapham, and P. F. Davies. Haemodynamic shear stress activates a K⁺ current in vascular endothelial cells. *Nature*, 331(6152):168–70, 1988. 0028-0836 (Print) Journal Article.
- [296] T. J. O'Neill, B. R. Wamhoff, G. K. Owens, and T. C. Skalak. Mobilization of bone marrow-derived cells enhances the angiogenic response to hypoxia without transdifferentiation into endothelial cells. *Circ Res*, 97(10):1027–35, 2005. 1524-4571 (Electronic) Journal Article.
- [297] S. Ono, H. Abe, R. Nagaoka, and T. Obinata. Colocalization of ADF and cofilin in intranuclear actin rods of cultured muscle cells. *J Muscle Res Cell Motil*, 14(2):195–204, 1993. 0142-4319 Journal Article.

- [298] S. Ono, N. Minami, H. Abe, and T. Obinata. Characterization of a novel co-filin isoform that is predominantly expressed in mammalian skeletal muscle. *J Biol Chem*, 269(21):15280–6, 1994. 0021-9258 (Print) Journal Article.
- [299] M. S. O'Reilly, T. Boehm, Y. Shing, N. Fukai, G. Vasios, W. S. Lane, E. Flynn, J. R. Birkhead, B. R. Olsen, and J. Folkman. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 88(2):277–85, 1997. 0092-8674 (Print) Journal Article.
- [300] M. S. O'Reilly, L. Holmgren, Y. Shing, C. Chen, R. A. Rosenthal, M. Moses, W. S. Lane, Y. Cao, E. H. Sage, and J. Folkman. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a lewis lung carcinoma. *Cell*, 79(2):315–28, 1994. 0092-8674 (Print) Journal Article.
- [301] M. S. O'Reilly, S. Pirie-Shepherd, W. S. Lane, and J. Folkman. Antiangiogenic activity of the cleaved conformation of the serpin antithrombin. *Science*, 285(5435):1926–8, 1999. 0036-8075 (Print) Comment Journal Article.
- [302] P. A. Oude Weernink, P. Schulte, Y. Guo, J. Wetzel, M. Amano, K. Kaibuchi, S. Haverland, M. Voss, M. Schmidt, G. W. Mayr, and K. H. Jakobs. Stimulation of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase by rho-kinase. *J Biol Chem*, 275(14):10168–74, 2000. 0021-9258 (Print) Journal Article.
- [303] W Pagel. *William Harvey's biological ideas. Selected aspects and historical background*. Hafner Publishing Co., Basel New York, 1967.
- [304] W Pagel. *New Light on William Harvey*. Karger, Basel New York, 1976.
- [305] M. Palasis, Z. Luo, J. J. Barry, and K. Walsh. Analysis of adenoviral transport mechanisms in the vessel wall and optimization of gene transfer using local delivery catheters. *Hum Gene Ther*, 11(2):237–46, 2000. 1043-0342 (Print) Journal Article.
- [306] R. Palumbo, C. Gaetano, A. Antonini, G. Pompilio, E. Bracco, L. Ronnstrand, C. H. Heldin, and M. C. Capogrossi. Different effects of high and low shear stress on platelet-derived growth factor isoform release by endothelial cells: consequences for smooth muscle cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22(3):405–11, 2002. 1524-4636 (Electronic) Journal Article.

- [307] G. Pasterkamp, A. H. Schoneveld, D. J. Hijnen, D. P. de Kleijn, H. Teepen, A. C. van der Wal, and C. Borst. Atherosclerotic arterial remodeling and the localization of macrophages and matrix metalloproteases 1, 2 and 9 in the human coronary artery. *Atherosclerosis*, 150(2):245–53, 2000. 0021-9150 (Print) Journal Article.
- [308] S. Pasyk, W. Schaper, J. Schaper, K. Pasyk, G. Miskiewicz, and B. Steinseifer. Dna synthesis in coronary collaterals after coronary artery occlusion in conscious dog. *Am J Physiol*, 242(6):H1031–7, 1982. 0002-9513 (Print) Journal Article.
- [309] S. Patan, B. Haenni, and P. H. Burri. Implementation of intussusceptive microvascular growth in the chicken chorioallantoic membrane (cam): 1. pillar formation by folding of the capillary wall. *Microvasc Res*, 51(1):80–98, 1996. 0026-2862 Journal Article.
- [310] S. Patan, L. L. Munn, S. Tanda, S. Roberge, R. K. Jain, and R. C. Jones. Vascular morphogenesis and remodeling in a model of tissue repair: blood vessel formation and growth in the ovarian pedicle after ovariectomy. *Circ Res*, 89(8):723–31, 2001. 1524-4571 (Electronic) Journal Article.
- [311] S. R. Patel, L. Y. Lee, C. A. Mack, D. R. Polce, T. El-Sawy, N. R. Hackett, A. Ilercil, E. C. Jones, R. T. Hahn, O. W. Isom, T. K. Rosengart, and R. G. Crystal. Safety of direct myocardial administration of an adenovirus vector encoding vascular endothelial growth factor 121. *Hum Gene Ther*, 10(8):1331–48, 1999. 1043-0342 (Print) Journal Article.
- [312] C.W. Patrick, R. Sampath, and L.V. McIntire. Fluid shear stress effects on cellular function. In J.D. Bronzino, editor, *Biomedical Engineering Handbook*, pages 1636–1655. CRC Press, Boca Raton, 1995.
- [313] Jr. Patrick, C. W. and L. V. McIntire. Shear stress and cyclic strain modulation of gene expression in vascular endothelial cells. *Blood Purif*, 13(3-4):112–24, 1995. 0253-5068 (Print) Journal Article Review.
- [314] P. Pecher and B. A. Schumacher. Angiogenesis in ischemic human myocardium: clinical results after 3 years. *Ann Thorac Surg*, 69(5):1414–9, 2000.

- 0003-4975 (Print) Clinical Trial Journal Article Randomized Controlled Trial.
- [315] M. Peichev, A. J. Naiyer, D. Pereira, Z. Zhu, W. J. Lane, M. Williams, M. C. Oz, D. J. Hicklin, L. Witte, M. A. Moore, and S. Rafii. Expression of vegfr-2 and ac133 by circulating human cd34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*, 95(3):952–8, 2000. 0006-4971 (Print) Journal Article.
- [316] S. M. Peirce, R. J. Price, and T. C. Skalak. Spatial and temporal control of angiogenesis and arterialization using focal applications of vegf164 and ang-1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286(3):H918–25, 2004. 0363-6135 (Print) Journal Article.
- [317] S. M. Peirce and T. C. Skalak. Microvascular remodeling: a complex continuum spanning angiogenesis to arteriogenesis. *Microcirculation*, 10(1):99–111, 2003. 1073-9688 (Print) Journal Article Review.
- [318] M. Pesce, A. Orlandi, M. G. Iachininoto, S. Straino, A. R. Torella, V. Rizzuti, G. Pompilio, G. Bonanno, G. Scambia, and M. C. Capogrossi. Myoendothelial differentiation of human umbilical cord blood-derived stem cells in ischemic limb tissues. *Circ Res*, 93(5):e51–62, 2003. 1524-4571 (Electronic) Journal Article.
- [319] A. Pettersson, J. A. Nagy, L. F. Brown, C. Sundberg, E. Morgan, S. Jungles, R. Carter, J. E. Krieger, E. J. Manseau, V. S. Harvey, I. A. Eckelhoefer, D. Feng, A. M. Dvorak, R. C. Mulligan, and H. F. Dvorak. Heterogeneity of the angiogenic response induced in different normal adult tissues by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Lab Invest*, 80(1):99–115, 2000. 0023-6837 (Print) Journal Article.
- [320] J. G. Pickering, S. Takeshita, L. Feldman, D. W. Losordo, and J. M. Isner. Vascular applications of human gene therapy. *Semin Interv Cardiol*, 1(1):84–8, 1996. 1084-2764 (Print) Journal Article Review.
- [321] F. Pipp, S. Boehm, W. J. Cai, F. Adili, B. Ziegler, G. Karanovic, R. Ritter, J. Balzer, C. Scheler, W. Schaper, and T. Schmitz-Rixen. Elevated fluid shear stress enhances postocclusive collateral artery growth and gene expression

- in the pig hind limb. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24(9):1664–8, 2004. 1524-4636 Journal Article.
- [322] F. Pipp, M. Heil, K. Issbrucker, T. Ziegelhoeffer, S. Martin, J. van den Heuvel, H. Weich, B. Fernandez, G. Golomb, P. Carmeliet, W. Schaper, and M. Clauss. Vegfr-1-selective vegf homologue plgf is arteriogenic: evidence for a monocyte-mediated mechanism. *Circ Res*, 92(4):378–85, 2003. 1524-4571 (Electronic) Journal Article.
- [323] Frederic Christian Pipp. *Die Rolle der VEGF-Rezeptoren bei der Arteriogenese im peripheren Kreislauf des Kaninchens*. Inaugural-Dissertation, Justus-Liebig-Universität, 2003.
- [324] P. J. Polverini, P. S. Cotran, Jr. Gimbrone, M. A., and E. R. Unanue. Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature*, 269(5631):804–6, 1977. 0028-0836 (Print) Journal Article.
- [325] B. J. Pope, K. M. Zierler-Gould, R. Kuhne, A. G. Weeds, and L. J. Ball. Solution structure of human cofilin: actin binding, ph sensitivity, and relationship to actin-depolymerizing factor. *J Biol Chem*, 279(6):4840–8, 2004. 0021-9258 (Print) Journal Article.
- [326] M.J. Post and J.A. Ware. Angiogenesis in atherosclerosis and restenosis. In J.A. Ware and M. Simons, editors, *Angiogenesis and Cardiovascular Disease*, pages 143–158. Oxford University Press, New York, 1999.
- [327] F. Pourageaud and J. G. De Mey. Structural properties of rat mesenteric small arteries after 4-wk exposure to elevated or reduced blood flow. *Am J Physiol*, 273(4 Pt 2):H1699–706, 1997. 0002-9513 (Print) Journal Article.
- [328] R. J. Price, J. R. Less, E. J. Van Gieson, and T. C. Skalak. Hemodynamic stresses and structural remodeling of anastomosing arteriolar networks: design principles of collateral arterioles. *Microcirculation*, 9(2):111–24, 2002. 1073-9688 (Print) Journal Article.
- [329] A. R. Pries, B. Reglin, and T. W. Secomb. Structural adaptation of microvascular networks: functional roles of adaptive responses. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281(3):H1015–25, 2001. 0363-6135 (Print) Journal Article.

- [330] A. R. Pries, B. Reglin, and T. W. Secomb. Structural response of micro-circulatory networks to changes in demand: information transfer by shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284(6):H2204–12, 2003. 0363-6135 (Print) Journal Article.
- [331] A. R. Pries, T. W. Secomb, and P. Gaehtgens. Structural adaptation and stability of microvascular networks: theory and simulations. *Am J Physiol*, 275(2 Pt 2):H349–60, 1998. 0002-9513 (Print) Journal Article.
- [332] B. M. Prior, P. G. Lloyd, H. T. Yang, and R. L. Terjung. Exercise-induced vascular remodeling. *Exerc Sport Sci Rev*, 31(1):26–33, 2003. 0091-6331 (Print) Journal Article Review.
- [333] Willibald Pschyrembel. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. Walter de Gruyter, Berlin, New York, 257 edition, 1994.
- [334] M. A. Rajanayagam, M. Shou, V. Thirumurti, D. F. Lazarous, A. A. Quyyumi, L. Goncalves, J. Stiber, S. E. Epstein, and E. F. Unger. Intracoronary basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral perfusion in dogs. *J Am Coll Cardiol*, 35(2):519–26, 2000. 0735-1097 (Print) Journal Article.
- [335] G. J. Randolph and M. B. Furie. A soluble gradient of endogenous monocyte chemoattractant protein-1 promotes the transendothelial migration of monocytes in vitro. *J Immunol*, 155(7):3610–8, 1995. 0022-1767 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- [336] J. Rehman, J. Li, C. M. Orschell, and K. L. March. Peripheral blood endothelial progenitor cells are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*, 107(8):1164–9, 2003. 1524-4539 (Electronic) Journal Article.
- [337] N. Resnick, H. Yahav, L. M. Khachigian, T. Collins, K. R. Anderson, F. C. Dewey, and Jr. Gimbrone, M. A. Endothelial gene regulation by laminar shear stress. *Adv Exp Med Biol*, 430:155–64, 1997. 0065-2598 Journal Article.
- [338] N. Resnick, H. Yahav, A. Shay-Salit, M. Shushy, S. Schubert, L. C. Zilberman, and E. Wofovitz. Fluid shear stress and the vascular endothelium: for

- better and for worse. *Prog Biophys Mol Biol*, 81(3):177–99, 2003. 0079-6107
Journal Article Review Review, Tutorial.
- [339] F. Ressad, D. Didry, G. X. Xia, Y. Hong, N. H. Chua, D. Pantaloni, and M. F. Carlier. Kinetic analysis of the interaction of actin-depolymerizing factor (adf)/cofilin with g- and f-actins. comparison of plant and human adfs and effect of phosphorylation. *J Biol Chem*, 273(33):20894–902, 1998. 0021-9258 (Print) Journal Article.
- [340] T. P. Richardson, M. C. Peters, A. B. Ennett, and D. J. Mooney. Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotechnol*, 19(11):1029–34, 2001. 1087-0156 (Print) Journal Article.
- [341] UN Riede and HE Schaefer. *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 4 edition, 1999.
- [342] R. S. Ripa, E. Jorgensen, Y. Wang, J. J. Thune, J. C. Nilsson, L. Sondergaard, H. E. Johnsen, L. Kober, P. Grande, and J. Kastrup. Stem cell mobilization induced by subcutaneous granulocyte-colony stimulating factor to improve cardiac regeneration after acute st-elevation myocardial infarction: result of the double-blind, randomized, placebo-controlled stem cells in myocardial infarction (stemmi) trial. *Circulation*, 113(16):1983–92, April 2006.
- [343] W. Risau. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386(6626):671–4, 1997. 0028-0836 Journal Article Review Review, Tutorial.
- [344] W. Risau and I. Flamme. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 11:73–91, 1995. 1081-0706 (Print) Journal Article Review.
- [345] T. T. Rissanen, J. E. Markkanen, M. Gruchala, T. Heikura, A. Puranen, M. I. Kettunen, I. Kholova, R. A. Kauppinen, M. G. Achen, S. A. Stacker, K. Alitalo, and S. Yla-Herttuala. Vegf-d is the strongest angiogenic and lymphangiogenic effector among vegfs delivered into skeletal muscle via adenoviruses. *Circ Res*, 92(10):1098–106, 2003. 1524-4571 (Electronic) Journal Article.
- [346] A. Roguin, S. Nitecki, I. Rubinstein, E. Nevo, A. Avivi, N. S. Levy, Z. A. Abassi, E. Sabo, O. Lache, M. Frank, A. Hoffman, and A. P. Levy. Vascular

- endothelial growth factor (vegf) fails to improve blood flow and to promote collateralization in a diabetic mouse ischemic hindlimb model. *Cardiovasc Diabetol*, 2:18, 2003. 1475-2840 (Electronic) Journal Article.
- [347] J.W. Rohen and I E. Lütjen-Drecol. *Funktionelle Histologie*. Schattauer, 4. edition, 2000.
- [348] J. Rosenblatt and T. J. Mitchison. Actin, cofilin and cognition. *Nature*, 393(6687):739–40, 1998. 0028-0836 Comment News.
- [349] T. K. Rosengart, L. Y. Lee, S. R. Patel, T. A. Sanborn, M. Parikh, G. W. Bergman, R. Hachamovitch, M. Szulc, P. D. Kligfield, P. M. Okin, R. T. Hahn, R. B. Devereux, M. R. Post, N. R. Hackett, T. Foster, T. M. Grasso, M. L. Lesser, O. W. Isom, and R. G. Crystal. Angiogenesis gene therapy: phase i assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing vegf121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation*, 100(5):468–74, 1999. 1524-4539 (Electronic) Clinical Trial Clinical Trial, Phase I Journal Article.
- [350] S. L. Rosenthal and A. C. Guyton. Hemodynamics of collateral vasodilatation following femoral artery occlusion in anesthetized dogs. *Circ Res*, 23(2):239–48, 1968. 0009-7330 (Print) Journal Article.
- [351] TW Sadler. *Medizinische Embryologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 9. edition, 1998.
- [352] R. Sampath, G. L. Kukielka, C. W. Smith, S. G. Eskin, and L. V. McIntire. Shear stress-mediated changes in the expression of leukocyte adhesion receptors on human umbilical vein endothelial cells in vitro. *Ann Biomed Eng*, 23(3):247–56, 1995. 0090-6964 (Print) Journal Article.
- [353] Y. Samstag, C. Eckerskorn, S. Wesselborg, S. Henning, R. Wallich, and S. C. Meuer. Costimulatory signals for human t-cell activation induce nuclear translocation of pp19/cofilin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(10):4494–8, 1994. 0027-8424 (Print) Journal Article.
- [354] M. Sata, A. Saiura, A. Kunisato, A. Tojo, S. Okada, T. Tokuhisa, H. Hirai, M. Makuuchi, Y. Hirata, and R. Nagai. Hematopoietic stem cells differentiate

- into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med*, 8(4):403–9, 2002. 1078-8956 (Print) Journal Article.
- [355] Y. Sato, R. Hamanaka, J. Ono, M. Kuwano, D. B. Rifkin, and R. Takaki. The stimulatory effect of pdgf on vascular smooth muscle cell migration is mediated by the induction of endogenous basic fgf. *Biochem Biophys Res Commun*, 174(3):1260–6, 1991. 0006-291X (Print) Journal Article.
- [356] J. Schaper, M. Borgers, R. Xhonneux, and W. Schaper. Cortisone influences developing collaterals. 1. a morphologic study. *Virchows Arch A Pathol Pathol Anat*, 361(4):263–82, 1973. 0042-6423 (Print) Journal Article.
- [357] J. Schaper, R. Konig, D. Franz, and W. Schaper. The endothelial surface of growing coronary collateral arteries. intimal margination and diapedesis of monocytes. a combined sem and tem study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*, 370(3):193–205, 1976. 0340-1227 Journal Article.
- [358] W. Schaper. Tangential wall stress as a molding force in the development of collateral vessels in the canine heart. *Experientia*, 23(7):595–6, 1967. 0014-4754 Journal Article.
- [359] W. Schaper. Collateral circulation. v. mechanisms of collateral enlargement. In W. Schaper, editor, *The Pathophysiology of Myocardial Perfusion*, pages 458–470. Elsevier, North-Holland, Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford, 1979.
- [360] W. Schaper. Collateral anatomy and blood flow: its potential role in sudden coronary death. *Ann N Y Acad Sci*, 382:69–75, 1982. 0077-8923 (Print) Journal Article.
- [361] W. Schaper. Experimental infarcts and the microcirculation. In D.J. Hearse and D.M. Yellon, editors, *Therapeutic Approaches to Myocardial Infarct Size Limitation*, pages 79–90. Raven Press, New York, 1984.
- [362] W. Schaper. Quo vadis collateral blood flow? a commentary on a highly cited paper. *Cardiovasc Res*, 45(1):220–3, 2000. 0008-6363 (Print) Comment Journal Article Review.

- [363] W. Schaper and I. Buschmann. Collateral circulation and diabetes. *Circulation*, 99(17):2224–6, 1999. 1524-4539 (Electronic) Editorial.
- [364] W. Schaper, M. De Brabander, and P. Lewi. Dna synthesis and mitoses in coronary collateral vessels of the dog. *Circ Res*, 28(6):671–9, 1971. 0009-7330 (Print) Journal Article.
- [365] W. Schaper, W. Flameng, B. Winkler, B. Wusten, W. Turschmann, G. Neugebauer, M. Carl, and S. Pasyk. Quantification of collateral resistance in acute and chronic experimental coronary occlusion in the dog. *Circ Res*, 39(3):371–7, 1976. 0009-7330 Journal Article.
- [366] W. Schaper and W. D. Ito. Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circulation Research*, 79(5):911–9, 1996. Review.
- [367] W. Schaper, A. Jageneau, and R. Xhonneux. The development of collateral circulation in the pig and dog heart. *Cardiologia*, 51(6):321–35, 1967. Journal Article.
- [368] W. Schaper, J.J. Piek, R. Munoz-Chapuli, C. Wolf, and W. Ito. Collateral circulation of the heart. In J.A. Ware and M. Simons, editors, *Angiogenesis and Cardiovascular Disease*, pages 159–198. Oxford University Press, New York, 1999.
- [369] W. Schaper, F. Pipp, D. Scholz, S. Boehm, E. Deindl, Baracik M., Eitenmuller I., Ziegelhoeffer T., A. Kluge, and T. Schmitz-Rixen. *Arteriogenesis*, chapter Physical Forces and their Translation into Molecular Mechanisms, pages 73–113. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London, 2004.
- [370] W. Schaper and D. Scholz. Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23(7):1143–51, 2003. 1524-4636 Journal Article.
- [371] K.W. Scheel, E.M. Fitzgerald, R.O. Martin, and R.A. Larsen. The possible role of mechanical stresses on coronary collateral development during gradual coronary occlusion. In W. Schaper, editor, *The Pathophysiology of Myocardial Perfusion*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford, 1979.

- [372] J. Schneiderman, M. S. Sawdey, M. R. Keeton, G. M. Bordin, E. F. Bernstein, R. B. Dilley, and D. J. Loskutoff. Increased type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in atherosclerotic human arteries. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(15):6998–7002, 1992. 0027-8424 (Print) Journal Article.
- [373] D. Scholz, W. J. Cai, and W. Schaper. Arteriogenesis, a new concept of vascular adaptation in occlusive disease. *Angiogenesis*, 4(4):247–57, 2001. 0969-6970 (Print) Journal Article Review.
- [374] D. Scholz, H. Elsaesser, A. Sauer, C. Friedrich, A. Luttun, P. Carmeliet, and W. Schaper. Bone marrow transplantation abolishes inhibition of arteriogenesis in placenta growth factor (plgf) $-/-$ mice. *J Mol Cell Cardiol*, 35(2):177–84, 2003. 0022-2828 (Print) Journal Article.
- [375] D. Scholz, W. Ito, I. Fleming, E. Deindl, A. Sauer, M. Wiesnet, R. Busse, J. Schaper, and W. Schaper. Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis). *Virchows Arch*, 436(3):257–70, 2000. 0945-6317 Journal Article.
- [376] D. Scholz, T. Ziegelhoeffer, A. Helisch, S. Wagner, C. Friedrich, T. Podzuweit, and W. Schaper. Contribution of arteriogenesis and angiogenesis to postocclusive hindlimb perfusion in mice. *J Mol Cell Cardiol*, 34(7):775–87, 2002. 0022-2828 (Print) Journal Article.
- [377] B. Schumacher, T. Stegmann, and P. Pecher. The stimulation of neoangiogenesis in the ischemic human heart by the growth factor fgf: first clinical results. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 39(6):783–9, 1998. 0021-9509 (Print) Clinical Trial Journal Article Randomized Controlled Trial.
- [378] A. Schummer, H. Wilkens, B. Vollmerhaus, and K.-H. Habermehl. Kreislaufsystem, haut und hautorgane. In R. Nickel, A. Schummer, and E. Seiferle, editors, *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*, volume 3, pages 8–13, 138–154, 244–258. Paul Parey, Berlin- Hamburg, 1. edition, 1976.
- [379] H. Schwartz, R. L. Leiboff, R. J. Katz, A. G. Wasserman, G. B. Bren, P. J. Varghese, and A. M. Ross. Arteriographic predictors of spontaneous improvement in left ventricular function after myocardial infarction. *Circulation*, 71(3):466–72, 1985. 0009-7322 (Print) Clinical Trial Journal Article.

- [380] G. Schwarz, G. Callewaert, G. Droogmans, and B. Nilius. Shear stress-induced calcium transients in endothelial cells from human umbilical cord veins. *J Physiol*, 458:527–38, 1992. 0022-3751 (Print) Journal Article.
- [381] C. Seiler, T. Pohl, K. Wustmann, D. Hutter, P. A. Nicolet, S. Windecker, F. R. Eberli, and B. Meier. Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Circulation*, 104(17):2012–7, 2001. 1524-4539 (Electronic) Clinical Trial Journal Article Randomized Controlled Trial.
- [382] S. I. Seldinger. Catheter replacement of the needle in percutaneous arteriography; a new technique. *Acta Radiol*, 39(5):368–76, 1953. 0001-6926 (Print) Journal Article.
- [383] A. Shay-Salit, M. Shushy, E. Wolfovitz, H. Yahav, F. Breviario, E. Dejana, and N. Resnick. Vegf receptor 2 and the adherens junction as a mechanical transducer in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(14):9462–7, 2002. 0027-8424 (Print) Journal Article.
- [384] J. Shen, F. W. Lusinskas, A. Connolly, Jr. Dewey, C. F., and Jr. Gimbrone, M. A. Fluid shear stress modulates cytosolic free calcium in vascular endothelial cells. *Am J Physiol*, 262(2 Pt 1):C384–90, 1992. 0002-9513 (Print) Journal Article.
- [385] M. H. Sheridan, L. D. Shea, M. C. Peters, and D. J. Mooney. Bioabsorbable polymer scaffolds for tissue engineering capable of sustained growth factor delivery. *J Control Release*, 64(1-3):91–102, 2000. 0168-3659 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- [386] Q. Shi, S. Rafii, M. H. Wu, E. S. Wijelath, C. Yu, A. Ishida, Y. Fujita, S. Kothari, R. Mohle, L. R. Sauvage, M. A. Moore, R. F. Storb, and W. P. Hammond. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*, 92(2):362–7, 1998. 0006-4971 (Print) Journal Article.
- [387] Y. Shinagawa, H. Abe, K. Saiga, and T. Obinata. Increased expression of cofilin in denervated chicken skeletal muscle. *Zoological Science*, 10:611–618, 1993.

- [388] S. Shintani, T. Murohara, H. Ikeda, T. Ueno, T. Honma, A. Katoh, K. Sasaki, T. Shimada, Y. Oike, and T. Imaizumi. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*, 103(23):2776–9, 2001. 1524-4539 (Electronic) Clinical Trial Controlled Clinical Trial Journal Article.
- [389] S. Shintani, T. Murohara, H. Ikeda, T. Ueno, K. Sasaki, J. Duan, and T. Imaizumi. Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation*, 103(6):897–903, 2001. 1524-4539 (Electronic) Journal Article.
- [390] E. Sho, M. Sho, T. M. Singh, C. Xu, C. K. Zarins, and H. Masuda. Blood flow decrease induces apoptosis of endothelial cells in previously dilated arteries resulting from chronic high blood flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21(7):1139–45, 2001. 1524-4636 (Electronic) Journal Article.
- [391] J. Y. Shyy, M. C. Lin, J. Han, Y. Lu, M. Petrime, and S. Chien. The cis-acting phorbol ester "12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate responsive element is involved in shear stress-induced monocyte chemotactic protein 1 gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(17):8069–73, 1995. 0027-8424 (Print) Journal Article.
- [392] Y.-J. Shyy, H.-J. Hsieh, S. Usami, and S. Chien. Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemotactic protein 1 expression in vascular endothelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91:4678–4682, 1994.
- [393] M. Simons, B. H. Annex, R. J. Laham, N. Kleiman, T. Henry, H. Daurman, J. E. Udelson, E. V. Gervino, M. Pike, M. J. Whitehouse, T. Moon, and N. A. Chronos. Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2: double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Circulation*, 105(7):788–93, 2002. 1524-4539 (Electronic) Clinical Trial Journal Article Multicenter Study Randomized Controlled Trial.
- [394] T. M. Singh, K. Y. Abe, T. Sasaki, Y. J. Zhuang, H. Masuda, and C. K. Zarins. Basic fibroblast growth factor expression precedes flow-induced arterial enlargement. *J Surg Res*, 77(2):165–73, 1998. 0022-4804 (Print) Journal Article.

- [395] T. M. Singh, Y. J. Zhuang, H. Masuda, and C. K. Zarins. Intimal hyperplasia in response to reduction of wall shear stress. *Surg Forum*, 48:444–446, 1997.
- [396] P. G. Smith, T. Tokui, and M. Ikebe. Mechanical strain increases contractile enzyme activity in cultured airway smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 268(6 Pt 1):L999–1005, 1995. 0002-9513 (Print) Journal Article.
- [397] R. H. Song, H. K. Kocharyan, J. E. Fortunato, S. Glagov, and H. S. Bassiouny. Increased flow and shear stress enhance in vivo transforming growth factor-beta1 after experimental arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20(4):923–30, 2000. 1079-5642 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- [398] J. Soosairajah, S. Maiti, O. Wiggan, P. Sarmiere, N. Moussi, B. Sarcevic, R. Sampath, J. R. Bamburg, and O. Bernard. Interplay between components of a novel lim kinase-slingshot phosphatase complex regulates cofilin. *Embo J*, 24(3):473–86, 2005. 0261-4189 (Print) Journal Article.
- [399] S. Srivastava, R. L. Terjung, and H. T. Yang. Basic fibroblast growth factor increases collateral blood flow in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285(3):H1190–7, 2003. 0363-6135 (Print) Journal Article.
- [400] E. Stabile, M. S. Burnett, C. Watkins, T. Kinnaid, A. Bachis, A. la Sala, J. M. Miller, M. Shou, S. E. Epstein, and S. Fuchs. Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in cd4-knockout mice. *Circulation*, 108(2):205–10, 2003. 1524-4539 (Electronic) Journal Article.
- [401] Zweigstelle Bonn vertreten durch den Präsidenten Statistische Bundesamt. Gesundheitsberichterstattung des Bundes: Gesundheitsbericht für Deutschland, Kapitel 5.4 Periphere arterielle Verschlusskrankheit, 1998. URL: <http://www.gbe-bund.de/>; zugegriffen am 01. Juni 2007.
- [402] W. E. Stehbens, J. S. Wakefield, E. Gilbert-Barnes, and J. M. Zuccollo. Histopathology and ultrastructure of human umbilical blood vessels. *Fetal Pediatr Pathol*, 24(6):297–315, Nov-Dec 2005.
- [403] I. Stein, M. Neeman, D. Shweiki, A. Itin, and E. Keshet. Stabilization of vascular endothelial growth factor mrna by hypoxia and hypoglycemia and

- coregulation with other ischemia-induced genes. *Mol Cell Biol*, 15(10):5363–8, 1995. 0270-7306 Journal Article.
- [404] O. Stein and Y. Stein. Smooth muscle cells and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 6(5):269–74, 1995. 0957-9672 Journal Article Review Review, Tutorial.
- [405] A. Stevens and J. Lowe. *Histologie*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1992.
- [406] T. Sumi, K. Matsumoto, Y. Takai, and T. Nakamura. Cofilin phosphorylation and actin cytoskeletal dynamics regulated by rho- and cdc42-activated lim-kinase 2. *J Cell Biol*, 147(7):1519–32, 1999. 0021-9525 (Print) Journal Article.
- [407] L. Sunder-Plassmann. Hämodynamische Aspekte bei gefäßchirurgischen Eingriffen. In G. Heberer and van R.J.A.M. Dongen, editors, *Gefäßchirurgie*, pages 39–45. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, London, Paris, 1987.
- [408] C. Suri, P. F. Jones, S. Patan, S. Bartunkova, P. C. Maisonpierre, S. Davis, T. N. Sato, and G. D. Yancopoulos. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the tie2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*, 87(7):1171–80, 1996. 0092-8674 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- [409] J. F. Symes, D. W. Losordo, P. R. Vale, K. G. Lathi, D. D. Esakof, M. Mayskiy, and J. M. Isner. Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease. *Ann Thorac Surg*, 68(3):830–6; discussion 836–7, 1999. 0003-4975 (Print) Clinical Trial Clinical Trial, Phase I Journal Article.
- [410] T. Takagi, T. Toda, D. Leszczynski, and F. Kummerow. Ultrastructure of aging human umbilical artery and vein. *Acta Anat (Basel)*, 119(2):73–9, 1984.
- [411] T. Takahashi, C. Kalka, H. Masuda, D. Chen, M. Silver, M. Kearney, M. Mägner, J. M. Isner, and T. Asahara. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*, 5(4):434–8, 1999. 1078-8956 (Print) Journal Article.

- [412] S. Takeshita, Y. Tsurumi, T. Couffinahl, T. Asahara, C. Bauters, J. Symes, N. Ferrara, and J. M. Isner. Gene transfer of naked dna encoding for three isoforms of vascular endothelial growth factor stimulates collateral development in vivo. *Lab Invest*, 75(4):487–501, 1996. 0023-6837 (Print) Journal Article.
- [413] S. Takeshita, L. P. Zheng, E. Brogi, M. Kearney, L. Q. Pu, S. Bunting, N. Ferrara, J. F. Symes, and J. M. Isner. Therapeutic angiogenesis. a single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest*, 93(2):662–70, 1994. 0021-9738 (Print) Journal Article.
- [414] J. A. Theriot. Accelerating on a treadmill: Adf/cofilin promotes rapid actin filament turnover in the dynamic cytoskeleton. *J Cell Biol*, 136(6):1165–8, 1997. 0021-9525 Comment Journal Article Review Review, Tutorial.
- [415] C. Thirion, R. Stucka, B. Mendel, A. Gruhler, M. Jaksch, K. J. Nowak, N. Binz, N. G. Laing, and H. Lochmuller. Characterization of human muscle type cofilin (cfl2) in normal and regenerating muscle. *Eur J Biochem*, 268(12):3473–82, 2001. 0014-2956 Journal Article.
- [416] R Thoma. *Untersuchungen über die Histogenese und Histomechanik des Gefäßsystems*. Enke, Stuttgart, 1893.
- [417] U Till. *Pathophysiologie/Pathobiochemie systematisch*. UNI-MED Verlag AG, Bremen, 1. edition, 1999.
- [418] R. A. Tio, T. Tkebuchava, T. H. Scheuermann, C. Lebherz, M. Magner, M. Kearny, D. D. Esakof, J. M. Isner, and J. F. Symes. Intramyocardial gene therapy with naked dna encoding vascular endothelial growth factor improves collateral flow to ischemic myocardium. *Hum Gene Ther*, 10(18):2953–60, 1999. 1043-0342 (Print) Journal Article.
- [419] P. V. Tisi and C. P. Shearman. Biochemical and inflammatory changes in the exercising claudicant. *Vasc Med*, 3(3):189–98, 1998. 1358-863X (Print) Journal Article Review.
- [420] K. Tohda, H. Masuda, K. Kawamura, and T. Shozawa. Difference in dilatation between endothelium-preserved and -desquamated segments in the

- flow-loaded rat common carotid artery. *Arterioscler Thromb*, 12(4):519–28, 1992. 1049-8834 (Print) Journal Article.
- [421] J. Toshima, J. Y. Toshima, T. Amano, N. Yang, S. Narumiya, and K. Mizuno. Cofilin phosphorylation by protein kinase testicular protein kinase 1 and its role in integrin-mediated actin reorganization and focal adhesion formation. *Mol Biol Cell*, 12(4):1131–45, 2001. 1059-1524 Journal Article.
- [422] E. Toyota, D. C. Warltier, T. Brock, E. Ritman, C. Kolz, P. O'Malley, P. Roccic, M. Focardi, and W. M. Chilian. Vascular endothelial growth factor is required for coronary collateral growth in the rat. *Circulation*, 112(14):2108–13, 2005. 1524-4539 (Electronic) Journal Article.
- [423] H. Tsuboi, J. Ando, R. Korenaga, Y. Takada, and A. Kamiya. Flow stimulates icam-1 expression time and shear stress dependently in cultured human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 206(3):988–96, 1995. 0006-291X (Print) Journal Article.
- [424] Y. Tsurumi, S. Takeshita, D. Chen, M. Kearney, S. T. Rossow, J. Passeri, J. R. Horowitz, J. F. Symes, and J. M. Isner. Direct intramuscular gene transfer of naked dna encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion. *Circulation*, 94(12):3281–90, 1996. 0009-7322 (Print) Journal Article.
- [425] Y. Tsuzuki, D. Fukumura, B. Oosthuysse, C. Koike, P. Carmeliet, and R. K. Jain. Vascular endothelial growth factor (vegf) modulation by targeting hypoxia-inducible factor-1alpha - hypoxia response element - vegf cascade differentially regulates vascular response and growth rate in tumors. *Cancer Res*, 60(22):6248–52, 2000. 0008-5472 Journal Article.
- [426] R. M. Tuder, B. E. Flook, and N. F. Voelkel. Increased gene expression for vegf and the vegf receptors kdr/flk and flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. modulation of gene expression by nitric oxide. *J Clin Invest*, 95(4):1798–807, 1995. 0021-9738 (Print) Journal Article.
- [427] D. A. Tulis, J. L. Unthank, and R. L. Prewitt. Flow-induced arterial remodeling in rat mesenteric vasculature. *Am J Physiol*, 274(3 Pt 2):H874–82, 1998. 0002-9513 (Print) Journal Article.

- [428] J. L. Tuttle, R. D. Nachreiner, A. S. Bhuller, K. W. Condict, B. A. Connors, B. P. Herring, M. C. Dalsing, and J. L. Unthank. Shear level influences resistance artery remodeling: wall dimensions, cell density, and enos expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281(3):H1380–9, 2001. 0363-6135 (Print) Journal Article.
- [429] E. Tzima, M. A. Del Pozo, W. B. Kiosses, S. A. Mohamed, S. Li, S. Chien, and M. A. Schwartz. Activation of *rac1* by shear stress in endothelial cells mediates both cytoskeletal reorganization and effects on gene expression. *Embo J*, 21(24):6791–800, 2002. 0261-4189 (Print) Journal Article.
- [430] E. Tzima, M. A. del Pozo, S. J. Shattil, S. Chien, and M. A. Schwartz. Activation of integrins in endothelial cells by fluid shear stress mediates rho-dependent cytoskeletal alignment. *Embo J*, 20(17):4639–47, 2001. 0261-4189 Journal Article.
- [431] A. Ueda, M. Koga, M. Ikeda, S. Kudo, and K. Tanishita. Effect of shear stress on microvessel network formation of endothelial cells with in vitro three-dimensional model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287(3):H994–1002, 2004. 0363-6135 (Print) Journal Article.
- [432] E. F. Unger. Experimental evaluation of coronary collateral development. *Cardiovasc Res*, 49(3):497–506, 2001. 0008-6363 (Print) Journal Article Review.
- [433] E. F. Unger, S. Banai, M. Shou, D. F. Lazarous, M. T. Jaklitsch, M. Scheinowitz, R. Correa, C. Klingbeil, and S. E. Epstein. Basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral flow in a canine model. *Am J Physiol*, 266(4 Pt 2):H1588–95, 1994. 0002-9513 (Print) Journal Article.
- [434] J. L. Unthank, J. C. Nixon, H. M. Burkhart, S. W. Fath, and M. C. Dalsing. Early collateral and microvascular adaptations to intestinal artery occlusion in rat. *Am J Physiol*, 271(3 Pt 2):H914–23, 1996. 0002-9513 (Print) Journal Article.
- [435] C. Urbich, A. Aicher, C. Heeschen, E. Dernbach, W. K. Hofmann, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor

- cells. *J Mol Cell Cardiol*, 39(5):733–42, 2005. 0022-2828 (Print) Journal Article.
- [436] C. Urbich, E. Dernbach, A. Reissner, M. Vasa, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler. Shear stress-induced endothelial cell migration involves integrin signaling via the fibronectin receptor subunits alpha(5) and beta(1). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22(1):69–75, 2002. 1524-4636 Journal Article.
- [437] P. R. Vale, D. W. Losordo, C. E. Milliken, M. Maysky, D. D. Esakof, J. F. Symes, and J. M. Isner. Left ventricular electromechanical mapping to assess efficacy of phveg(165) gene transfer for therapeutic angiogenesis in chronic myocardial ischemia. *Circulation*, 102(9):965–74, 2000. 1524-4539 (Electronic) Clinical Trial Journal Article.
- [438] N. van Royen, I. Hoefler, I. Buschmann, M. Heil, S. Kostin, E. Deindl, S. Vogel, T. Korff, H. Augustin, C. Bode, J. J. Piek, and W. Schaper. Exogenous application of transforming growth factor beta 1 stimulates arteriogenesis in the peripheral circulation. *Faseb J*, 16(3):432–4, 2002. 1530-6860 (Electronic) Journal Article.
- [439] N. van Royen, J. J. Piek, I. Buschmann, I. Hoefler, M. Voskuil, and W. Schaper. Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. *Cardiovasc Res*, 49(3):543–53, 2001. 0008-6363 Journal Article Review.
- [440] N. Van Royen, J. J. Piek, W. Schaper, C. Bode, and I. Buschmann. Arteriogenesis: mechanisms and modulation of collateral artery development. *J Nucl Cardiol*, 8(6):687–93, 2001. 1071-3581 (Print) Journal Article Review.
- [441] M. K. Vartiainen, T. Mustonen, P. K. Mattila, P. J. Ojala, I. Thesleff, J. Partanen, and P. Lappalainen. The three mouse actin-depolymerizing factor/cofilins evolved to fulfill cell-type-specific requirements for actin dynamics. *Mol Biol Cell*, 13(1):183–94, 2002. 1059-1524 (Print) Journal Article.
- [442] E. Vial, E. Sahai, and C. J. Marshall. Erk-mapk signaling coordinately regulates activity of rac1 and rhoa for tumor cell motility. *Cancer Cell*, 4(1):67–79, 2003. 1535-6108 (Print) Journal Article.

- [443] K. A. Vincent, K. G. Shyu, Y. Luo, M. Magner, R. A. Tio, C. Jiang, M. A. Goldberg, G. Y. Akita, R. J. Gregory, and J. M. Isner. Angiogenesis is induced in a rabbit model of hindlimb ischemia by naked dna encoding an hif-1alpha/vp16 hybrid transcription factor. *Circulation*, 102(18):2255–61, 2000. 1524-4539 (Electronic) Journal Article.
- [444] J. A. Vita, C. B. Treasure, P. Ganz, D. A. Cox, R. D. Fish, and A. P. Selwyn. Control of shear stress in the epicardial coronary arteries of humans: impairment by atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*, 14(5):1193–9, 1989. 0735-1097 (Print) Journal Article.
- [445] S. Vogel, T. Kubin, M. Barancik, E. Deindl, D. von der Ahe, and R. Zimmermann. Signal transduction pathways in smooth muscle cells. In W. Schaper and J. Schaper, editors, *Arteriogenesis*, pages 213–231. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London, 2004.
- [446] M. Voskuil, N. van Royen, I. E. Hoefer, R. Seidler, B. D. Guth, C. Bode, W. Schaper, J. J. Piek, and I. R. Buschmann. Modulation of collateral artery growth in a porcine hindlimb ligation model using mcp-1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284(4):H1422–8, 2003. 0363-6135 (Print) Journal Article.
- [447] A. J. Wagers, R. I. Sherwood, J. L. Christensen, and I. L. Weissman. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science*, 297(5590):2256–9, 2002. 1095-9203 (Electronic) Journal Article.
- [448] P. L. Walpola, A. I. Gotlieb, M. I. Cybulsky, and B. L. Langille. Expression of icam-1 and vcam-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 15(1):2–10, 1995. 1079-5642 (Print) Journal Article.
- [449] S. V. Walsh, A. M. Hopkins, J. Chen, S. Narumiya, C. A. Parkos, and A. Nusrat. Rho kinase regulates tight junction function and is necessary for tight junction assembly in polarized intestinal epithelia. *Gastroenterology*, 121(3):566–79, 2001. 0016-5085 (Print) Journal Article.
- [450] D. L. Wang, B. S. Wung, Y. J. Shyy, C. F. Lin, Y. J. Chao, S. Usami, and S. Chien. Mechanical strain induces monocyte chemotactic protein-1 gene expression in endothelial cells. effects of mechanical strain on monocyte

- adhesion to endothelial cells. *Circ Res*, 77(2):294–302, 1995. 0009-7330 (Print) Journal Article.
- [451] L. F. Wang, R. Voysey, and M. Yu. Simplified large-scale alkaline lysis preparation of plasmid dna with minimal use of phenol. *Biotechniques*, 17(1):26, 28, 1994. 0736-6205 (Print) Journal Article.
- [452] N. Wang, J. P. Butler, and D. E. Ingber. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science*, 260(5111):1124–7, 1993. 0036-8075 (Print) Journal Article.
- [453] S. M. Wasserman, F. Mehraban, L. G. Komuves, R. B. Yang, J. E. Tomlinson, Y. Zhang, F. Spriggs, and J. N. Topper. Gene expression profile of human endothelial cells exposed to sustained fluid shear stress. *Physiol Genomics*, 12(1):13–23, 2002. 1531-2267 (Electronic) Journal Article.
- [454] P. A. Weernink, Y. Guo, C. Zhang, M. Schmidt, C. Von Eichel-Streiber, and K. H. Jakobs. Control of cellular phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels by adhesion signals and rho gtpases in nih 3t3 fibroblasts involvement of both phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase and phospholipase c. *Eur J Biochem*, 267(16):5237–46, 2000. 0014-2956 (Print) Journal Article.
- [455] L. Wei, J. P. Erinjeri, C. M. Rovainen, and T. A. Woolsey. Collateral growth and angiogenesis around cortical stroke. *Stroke*, 32(9):2179–84, 2001. 1524-4628 (Electronic) Journal Article.
- [456] G. S. Werner, B. M. Richartz, S. Heinke, M. Ferrari, and H. R. Figulla. Impaired acute collateral recruitment as a possible mechanism for increased cardiac adverse events in patients with diabetes mellitus. *Eur Heart J*, 24(12):1134–42, 2003. 0195-668X (Print) Journal Article.
- [457] D. O. Williams, E. A. Amsterdam, R. R. Miller, and D. T. Mason. Functional significance of coronary collateral vessels in patients with acute myocardial infarction: relation to pump performance, cardiogenic shock and survival. *Am J Cardiol*, 37(3):345–51, 1976. 0002-9149 (Print) Journal Article.
- [458] B. Wojciak-Stothard and A. J. Ridley. Shear stress-induced endothelial cell polarization is mediated by rho and rac but not cdc42 or pi 3-kinases. *J Cell Biol*, 161(2):429–39, 2003. 0021-9525 (Print) Journal Article.

- [459] C. Wolf, W. J. Cai, R. Vosschulte, S. Koltai, D. Mousavipour, D. Scholz, A. Afsah-Hedjri, W. Schaper, and J. Schaper. Vascular remodeling and altered protein expression during growth of coronary collateral arteries. *J Mol Cell Cardiol*, 30(11):2291–305, 1998. 0022-2828 Journal Article.
- [460] Z. Wu, M. S. O'Reilly, J. Folkman, and Y. Shing. Suppression of tumor growth with recombinant murine angiostatin. *Biochem Biophys Res Commun*, 236(3):651–4, 1997. 0006-291X (Print) Journal Article.
- [461] B. S. Wung, J. J. Cheng, Y. J. Chao, J. Lin, Y. J. Shyy, and D. L. Wang. Cyclical strain increases monocyte chemotactic protein-1 secretion in human endothelial cells. *Am J Physiol*, 270(4 Pt 2):H1462–8, 1996. 0002-9513 (Print) Journal Article.
- [462] H. T. Yang and Y. Feng. bfgf increases collateral blood flow in aged rats with femoral artery ligation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 278(1):H85–93, 2000. 0363-6135 (Print) Journal Article.
- [463] H. T. Yang, Y. Feng, L. A. Allen, A. Protter, and R. L. Terjung. Efficacy and specificity of bfgf increased collateral flow in experimental peripheral arterial insufficiency. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 278(6):H1966–73, 2000. 0363-6135 (Print) Journal Article.
- [464] H. T. Yang, R. W. Ogilvie, and R. L. Terjung. Peripheral adaptations in trained aged rats with femoral artery stenosis. *Circ Res*, 74(2):235–43, 1994. 0009-7330 (Print) Journal Article.
- [465] H. T. Yang, R. W. Ogilvie, and R. L. Terjung. Training increases collateral-dependent muscle blood flow in aged rats. *Am J Physiol*, 268(3 Pt 2):H1174–80, 1995. 0002-9513 (Print) Journal Article.
- [466] H. T. Yang, R. W. Ogilvie, and R. L. Terjung. Exercise training enhances basic fibroblast growth factor-induced collateral blood flow. *Am J Physiol*, 274(6 Pt 2):H2053–61, 1998. 0002-9513 (Print) Journal Article.
- [467] H. T. Yang, J. Ren, M. H. Laughlin, and R. L. Terjung. Prior exercise training produces no-dependent increases in collateral blood flow after acute arterial occlusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 282(1):H301–10, 2002. 0363-6135 (Print) Journal Article.

- [468] H. T. Yang, Z. Yan, J. A. Abraham, and R. L. Terjung. Vegf(121)- and bfgf-induced increase in collateral blood flow requires normal nitric oxide production. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280(3):H1097–104, 2001. 0363-6135 (Print) Journal Article.
- [469] S. Yeoh, B. Pope, H. G. Mannherz, and A. Weeds. Determining the differences in actin binding by human adf and cofilin. *J Mol Biol*, 315(4):911–25, 2002. 0022-2836 (Print) Journal Article.
- [470] N. Yonezawa, Y. Homma, I. Yahara, H. Sakai, and E. Nishida. A short sequence responsible for both phosphoinositide binding and actin binding activities of cofilin. *J Biol Chem*, 266(26):17218–21, 1991. 0021-9258 (Print) Journal Article.
- [471] N. Yonezawa, E. Nishida, K. Iida, I. Yahara, and H. Sakai. Inhibition of the interactions of cofilin, destrin, and deoxyribonuclease i with actin by phosphoinositides. *J Biol Chem*, 265(15):8382–6, 1990. 0021-9258 (Print) Journal Article.
- [472] J. L. Young, P. Libby, and U. Schonbeck. Cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost*, 88(4):554–67, 2002. 0340-6245 Journal Article Review Review, Tutorial.
- [473] H. Yu, Y. Zeng, J. Hu, and C. Li. Fluid shear stress induces the secretion of monocyte chemoattractant protein-1 in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Clin Hemorheol Microcirc*, 26(3):199–207, 2002. 1386-0291 (Print) Journal Article.
- [474] A. Zakrzewicz, T. W. Secomb, and A. R. Pries. Angioadaptation: keeping the vascular system in shape. *News Physiol Sci*, 17:197–201, 2002. 0886-1714 (Print) Journal Article Review.
- [475] M. Zamir. Shear forces and blood vessel radii in the cardiovascular system. *J Gen Physiol*, 69(4):449–61, 1977. 0022-1295 (Print) Journal Article.
- [476] C. K. Zarins, M. A. Zatina, D. P. Giddens, D. N. Ku, and S. Glagov. Shear stress regulation of artery lumen diameter in experimental atherogenesis. *J Vasc Surg*, 5(3):413–20, 1987. 0741-5214 (Print) Journal Article.

- [477] Z. G. Zhang, L. Zhang, Q. Jiang, and M. Chopp. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse. *Circ Res*, 90(3):284–8, 2002. 1524-4571 (Electronic) Journal Article.
- [478] Y. J. Zhuang, T. M. Singh, C. K. Zarins, and H. Masuda. Sequential increases and decreases in blood flow stimulates progressive intimal thickening. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 16(4):301–10, 1998. 1078-5884 (Print) Journal Article.
- [479] M. Ziche, D. Maglione, D. Ribatti, L. Morbidelli, C. T. Lago, M. Battisti, I. Paoletti, A. Barra, M. Tucci, G. Parise, V. Vincenti, H. J. Granger, G. Viglietto, and M. G. Persico. Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic, and angiogenic. *Lab Invest*, 76(4):517–31, 1997. 0023-6837 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- [480] T. Ziegelhoeffer, B. Fernandez, S. Kostin, M. Heil, R. Voswinckel, A. Helisch, and W. Schaper. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ Res*, 94(2):230–8, 2004. 1524-4571 Journal Article.
- [481] T. Ziegelhoeffer, I.E. Hofer, N. van Royen, and I.R. Buschmann. Effective reduction in collateral artery formation through matrix metalloproteinase inhibitors. *Circulation*, 100(Suppl. I):3719, 1999.
- [482] T. Ziegelhoeffer, D. Scholz, C. Friedrich, A. Helisch, S. Wagner, B. Fernandez, and W. Schaper. Inhibition of collateral artery growth by mibefradil: possible role of volume-regulated chloride channels. *Endothelium*, 10(4-5):237–46, 2003. 1062-3329 (Print) Journal Article.
- [483] R. C. Ziegelstein, P. S. Blank, L. Cheng, and M. C. Capogrossi. Cytosolic alkalization of vascular endothelial cells produced by an abrupt reduction in fluid shear stress. *Circ Res*, 82(7):803–9, 1998. 0009-7330 Journal Article.
- [484] R. Zimmermann, K. Boengler, A. Kampmann, B. fernandez, E. Deindl, and W. Schaper. Expression profiling of growing collateral arteries/hunting for new genes. In W. Schaper and J. Schaper, editors, *Arteriogenesis*, pages 233–251. Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London, 2004.

Kapitel 9

Danksagung

Ich möchte ganz herzlich Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Thomas Schmitz-Rixen, Leiter des Schwerpunktes Gefäß- und Endovascularchirurgie des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main für die Vergabe des Themas, Betreuung und Mithilfe bei den operativen Eingriffen und seine unbeschreiblich enorme Unterstützung danken, die ich während des Studiums und der Anfertigung der Dissertation genießen durfte und auch heute noch genießen darf.

Zu danken habe ich außerdem Herrn Privatdozent Dr. med. Farzin Adili, Oberarzt des Schwerpunktes Gefäß- und Endovascularchirurgie des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main und Herrn Dr. med. Ralf-Gerhard Ritter, seinerzeit leitender Oberarzt ebendort, für die Betreuung und Mithilfe bei den operativen Eingriffen.

Herr Professor Dr. med. Dr. h. c. Wolfgang Schaper, Direktor des Max-Planck-Institut für Physiologische und Klinische Forschung, W.G. Kerckhoff-Institut, Abteilung für Experimentelle Kardiologie, Bad Nauheim, danke ich für seine geistige Unterstützung bei diesem interessanten Thema, für die durchweg vorhandene Ansprechbarkeit, die bereichernde und kritische Diskussion bei Experimentaufbau und -durchführung und die Möglichkeit, mit dem Max-Planck-Institut zusammenzuarbeiten. Es ist eine Ehre und macht unheimlichen Spaß, wissenschaftlich zu arbeiten, wenn man jemanden wie Prof. Schaper dabei hat, der entgegenkommend und greifbar ist.

Weiterer Dank geht an Herr Dr. vet. med. Frederic Pipp und an Frau Dr. rer. nat. Stefanie Böhm, ihrerzeit im Max-Planck-Institut für Physiologische und Klinische Forschung, W.G. Kerckhoff-Institut, Abteilung für Experimentelle Kardiologie, Bad Nauheim tätig, für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung dieser Studie.

Ganz besonders zu Dank verpflichtet bin ich Herrn Dr. vet. med. Alf Theisen, jetzigem Leiter der Zentralen Forschungseinrichtung des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, der mit seiner enormen Erfahrung und endlosen Geduld einen wichtigen Anteil zum Gelingen dieser Studie beigetragen hat. Hier möchte ich auch Herrn Dr. vet. med. Martin Kock, dem vormaligen Leiter der Zentralen Forschungseinrichtung, für seine Betreuung und Beratung danken.

Für die fachliche und ausdauernde Hilfe bei der Anfertigung der Angiogramme spreche ich Herrn Privatdozent Dr. med. Jörn Balzer, seinerzeit leitender Oberarzt im Zentrum der Radiologie des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main und Herrn Dr. med. Jan Schmitt, seinerzeit Arzt ebendort, meinen Dank aus.

Frau Karen Nelson, Medizinisch-technische Assistentin im Gefäßchirurgischen Labor des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, danke ich für das Korrekturlesen der Dissertationsschrift und die motivierende Beratung.

Herrn Bela Ziegler möchte ich danken für die tolle Zusammenarbeit an dieser Studie.

Großen Dank schulde ich meinem besten Freund Herrn Florian Remek für die kritische Auseinandersetzung mit dem Thema, die Hilfe bei allen computertechnischen Problemen und für die exklusive Anfertigung der Abbildungen.

Schließlich danke ich meinen Eltern und meiner Familie für ihre Unterstützung und ihren Glauben an mich.

Meinem Freund Alexander Kastinger danke ich für die immerwährende Motivation und seine Liebe.

Kapitel 10

Lebenslauf

Gordana Karanovic

Persönliche Daten

geboren am:	11.12.1977
in:	Osnabrück
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Konfession:	orthodox
Familienstand:	ledig
Schulbildung	
1984 - 1988	Grundschule Osnabrück
1988 - 1990	Orientierungsstufe, Gesamtschule Schinkel
1990 - 1997	Gymnasium, Gesamtschule Schinkel
Hochschulbildung	
4/1998 - 4/2004	Studium der Humanmedizin an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
8/6/2004	Abschluß des Studiums

Abschlüsse/Examina

6/1997	Allgemeine Hochschulreife (Note 2,0)
3/2000	Ärztliche Vorprüfung (Note 1,3)
3/2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,0)
4/2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1,0)
6/2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1,0) und Bestehen der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote 1,16)

Promotion

2007 Promotion bei Prof. Dr. Thomas Schmitz-Rixen, Leiter des Schwerpunktes Gefäß- und Endovascular-chirurgie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

Thema: Die Bedeutung der Scherspannungssteigerung für die experimentelle Arteriogenese und die Expression von Cofilin 1 und 2 nach Akutligatur der Arteria femoralis und Anlage einer arterio-venösen Fistel in einem Tiermodell

Veröffentlichungen

2002 Abstract, Deutscher Chirurgenkongress, Köln
“Venous shunting of collateral flow after femoral artery occlusion markedly increases collateral vessel growth in a porcine model: implications for therapeutic arteriogenesis“

2002 Poster, American Heart Congress, New York
„Venous Shunting of Collateral Flow after Femoral Artery Occlusion Markedly Increases Collateral Vessel Growth in a Chronic Pig Model“

2004 Artikel, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, Elevated Fluid Shear Stress Enhances Postocclusive Collateral Artery Growth and Gene Expression in the Pig Hind Limb

Praktische Erfahrung	
Famulaturen	2000 Famulatur, Chirurgie, St.Elisabethen-Krankenhaus, Frankfurt am Main 2001 Famulatur, Gefäßchirurgie, Universitätsklinikum Frankfurt am Main 2002 Famulatur, Orthopädie, Allgemeines Krankenhaus Wien 2003 Praxis-Famulatur, Innere Medizin, Frankfurt am Main
Praktisches Jahr	4/2003 - 8/2003 Chirurgie, Universitätsklinikum Frankfurt am Main 8/2003 - 12/2003 Orthopädie, Allgemeines Krankenhaus Wien 12/2003 - 3/2004 Innere Medizin, Universitätsklinikum Frankfurt am Main
Nebentätigkeit	10/01 - 3/04 Studentische Hilfskraft am Universitätsklinikum Frankfurt am Main, Schwerpunkt Gefäß- und Endovascularchirurgie 5/05 - 9/05 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Fresenius AG
Berufserfahrung	11/2004-11/2006 Chirurgie, St. Rochus-Krankenhaus Dieburg, Facharztausbildung 11/2006-05/2007 Chirurgie, Hochwaldkrankenhaus Bad Nauheim, Facharztausbildung 06/2007-z.Z. Chirurgie, Klinikum Hanau, Facharztausbildung
Sprachen	Deutsch Serbo-kroatisch Englisch
Interessen und Hobbies	Sport Reisen Lesen

Kapitel 11

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Medizin zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel *Die Bedeutung der Scherspannungssteigerung für die experimentelle Arteriogenese und die Expression von Cofilin 1 und 2 nach Akutligatur der Arteria femoralis und Anlage einer arterio-venösen Fistel in einem Tiermodell* im Zentrum der Chirurgie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, Klinik für Allgemein- und Gefäßchirurgie, Schwerpunkt Gefäß- und Endovascularchirurgie unter Leitung von Prof. Dr. med. Schmitz-Rixen mit Unterstützung durch Prof. Dr. med. Schmitz-Rixen ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde im September 2004 in folgendem Publikationsorgan *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* unter dem Titel *Elevated fluid shear stress enhances postocclusive collateral artery growth and gene expression in the pig hind limb* veröffentlicht.

Frankfurt am Main, den 07.08.2007

gez.

Gordana Karanovic