

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I - Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität

Direktor: Prof. Dr. med. G. Steinbeck

**Therapeutische Angiogenese bei chronischer Myokardischämie - Applikation
von FGF-2 mittels selektiver druckregulierter Retroinfusion im
tierexperimentellen Modell am Schwein**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Philip W.J. Raake
aus München

2004

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. P. Boekstegers

2. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Pohl

Mitberichterstatter: Priv.-Doz. Dr. V. Klauss

Priv.-Doz. Dr. R. Huss

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 13.05.2004

1. Einleitung

1.1.	Koronare Herzerkrankung	S. 5
1.2.	Biologie des Gefäßwachstums	S. 6
1.2.1.	Arteriogenese	S. 6
1.2.2.	Angiogenese	S.8
1.2.3.	Vaskuläre Wachstumsfaktoren	S. 8
1.3.	Therapeutische Arterio- und Angiogenese	S. 9
1.4.	Applikationswege für Gefäßwachstumsfaktoren	S. 11
1.5.	Gezielte Medikamentenapplikation in ischämisches Myokard mit der kontinuierlichen druckregulierten Retroinfusion von Koronarvenen (SSR)	S. 14
1.6.	Fragestellungen	S. 17

2. Material und Methoden

2.1.	Versuchsbeschreibung und Protokoll	S. 18
2.1.1.	Vorbereitung, Narkose und Überwachung	S. 18
2.1.2.	Antikoagulation und Antibiotikatherapie	S. 19
2.1.3.	Arterielle und venöse Gefäßzugänge	S. 20
2.2.	Vorserie: Etablierung eines Modells für chronische Myokardischämie durch Implantation des Reduktionsstent	S. 20
2.2.1.	Implantation des Reduktionsstent (Tag 0)	S. 21
2.2.1.1.	Vorbereitung des Reduktionsstent	S. 21
2.2.1.2.	Implantation des Reduktionsstent	S. 22
2.2.2.	Einfluss des Reduktionsstent auf den regionalen myokardialen Blutfluss (Mikrosphären)	S. 24
2.2.3.	Einfluss des Reduktionsstent auf den myokardialen Blutfluss und die myokardiale Vitalität (Positronenemissionstomographie)	S. 25

2.2.4.	Einfluss des Reduktionsstent auf die Infarktgröße	S. 26
2.3.	Therapeutische Angiogenese mittels Retroinfusion von FGF-2 in die Koronarvene und Vergleich mit der antegraden Applikation in die Koronararterie	S. 27
2.3.1.	Versuchstag 0: Implantation des Reduktionsstent	S. 28
2.3.2.	Versuchstag 07: Selektive druckregulierte Retroinfusion und intrakoronare Applikation von FGF-2	S. 29
2.3.2.1.	System der Selektiven Synchronisierten Absaugung und druckregulierten Retroinfusion (SSR)	S. 29
2.3.2.2.	Applikation von FGF-2	S. 31
2.3.2.3.	Myokardiale Gewebefixierung von FGF-2	S. 33
2.3.3.	Versuchstag 28: Messprotokoll am Tag 21 nach selektiver druckregulierter Retroinfusion und intrakoronarer Applikation von FGF-2	S. 34
2.3.3.1.	Regionaler myokardialer Blutfluss: Mikrosphären	S. 36
2.3.3.2.	Regionale Myokardfunktion: Sonomikrometrie	S. 38
2.3.3.3.	Globale Myokardfunktion: Der linksventrikuläre Druck und das Herzzeitvolumen	S. 41
2.3.3.4.	Koronarangiographie/Kollateralen	S. 42
2.3.3.5.	Bestimmung der Kapillardichte	S. 44
2.3.3.6.	Bestimmung der Infarktgröße	S. 44
2.4.	Statistische Datenanalyse	S. 45

3. Ergebnisse

3.1.	Der Reduktionsstent als Modell chronisch experimenteller Myokardischämie	S. 48
3.1.1.	Akuteffekt des Reduktionsstent auf den koronararteriellen Blutfluss	S. 50
3.1.2.	Einfluss des Reduktionsstent auf den myokardialen Blutfluss	S. 50
3.1.3.	Einfluss des Reduktionsstent auf die kontraktile Myokardfunktion	S. 53
3.1.4.	Infarktgröße	S. 54

3.2.	Therapeutische Arterio- und Angiogenese durch Retroinfusion von FGF-2 und Vergleich mit der intrakoronaren Applikation	S. 55
3.2.1.	Gewebebindung ¹²⁵ Jod-markierten FGF-2	S. 55
3.2.2.	Anzahl der Kollateralblutgefäße (Arteriogenese)	S. 58
3.2.3.	Kapillardichte (Angiogenese)	S. 60
3.2.4.	Infarktgröße	S. 62
3.2.5.	Regionaler myokardialer Blutfluss	S. 63
3.2.6.	Regionale Myokardfunktion	S. 65
3.2.7.	Globale linksventrikuläre Myokardfunktion	S. 69
3.2.7.1.	Herzzeitvolumen	S. 69
3.2.7.2.	dP/dt max und LVEDP	S. 70

4. Diskussion

4.1.	Experimentelle Modelle chronischer Myokardischämie am Grosstier	S. 72
4.1.1.	Chirurgische, transthorakale Implantation des Ameroid-Quellring	S. 73
4.1.2.	Kathetergestützte, perkutane Implantation des Reduktionsstent	S. 74
4.2.	Applikation von FGF-2 mittels selektiver druckgeregelter Retroinfusion (SSR) als therapeutisches Prinzip bei der Arterio- und Angiogenese-Induktion und Vergleich mit der intrakoronaren Applikation	S. 76
4.2.1.	Therapeutische Arteriogenese	S. 76
4.2.2.	Therapeutische Angiogenese	S. 78
4.2.3.	Effektivere Gewebebindung nach Retroinfusion von ¹²⁵ Iod-markierten FGF-2	S. 78
4.2.4.	Einfluss auf die regionale myokardiale Perfusion	S. 80
4.2.5.	Einfluss auf die kontraktile Myokardfunktion	S. 82
4.3.	Limitationen	S. 84
4.3.1.	Tierexperimentelles Modell	S. 84

4.3.2. Mögliche Limitationen einer FGF-2-Behandlung am Patienten	S. 85
4.3.3. Mögliche Limitationen einer Retroinfusionsbehandlung am Patienten	S. 86
5. Zusammenfassung	S. 87
6. Literaturverzeichnis	S. 89

1. Einleitung

1.1. Koronare Herzerkrankung

Die koronare Herzerkrankung verursacht die höchste Morbidität und Mortalität in westlichen Industriestaaten ^{99;141;153}. Degenerative, arteriosklerotische Veränderungen der Herzkranzgefäße bewirken eine zunehmende Stenosierung der Gefäßlichtung der Arterie und erlauben nur eine Minderperfusion des abhängigen Myokardareals mit arterialisiertem Blut ^{15;143}. Hierdurch ist die Versorgung des Herzmuskels mit Sauerstoff, energiereichen Phosphatverbindungen und Substraten, insbesondere des oxidativen Stoffwechsels, eingeschränkt; toxische Stoffwechselprodukte, freie Radikale und Protonen steigen aufgrund der fehlenden Durchblutung an; in der Folge kommt es zu einer zunehmenden Hypoxie, energetischen Verarmung und pH-Erniedrigung des betroffenen Gewebes, mit einem progredienten Verlust der kontraktiven Myokardfunktion ^{46;37}. Klinisch manifestiert sich die Erkrankung in zunehmender Angina pectoris und Dyspnoe bei körperlicher Belastung, später auch in Ruhe ²⁵. Rupturiert ein atheromatöser Plaque kann es zum akuten thrombotischen Verschluss der betroffenen Koronararterie kommen; bei Ausbleiben einer adäquaten Therapie resultiert ein akuter Myokardinfarkt, mit den gefürchteten Komplikationen von Herzrhythmusstörungen und kardiogenem Schock ²⁵. Im fortgeschrittenen Stadium kann sich eine ischämische Kardiomyopathie mit einer chronischen Herzinsuffizienz entwickeln, die sich in eingeschränkter körperlicher Belastbarkeit und rezidivierenden kardialen Dekompensationen manifestiert ²⁵. Zur Therapie der Angina pectoris und der ischämischen Kardiomyopathie stehen medikamentöse (z.B. Nitrate und ACE-Hemmer), kardiologisch-interventionelle (z.B. PTCA) sowie operative (z.B. Bypassoperation) Therapieoptionen zur Verfügung ¹⁰⁵. Da diese Therapieverfahren jedoch im allgemeinen das weitere Fortschreiten der Erkrankung lediglich verzögern und nicht gänzlich verhindern können ¹⁶⁰, und sie außerdem nicht bei allen Patienten durchführbar oder ausreichend erfolgreich sind (20-30% der Patienten), kommt es häufig zum Fortschreiten der Erkrankung ¹⁴¹. Insbesondere Patienten mit multiplen peripheren Stenosen (v.a. bei Diabetes mellitus,

Hypercholesterinämie) sind diesen therapeutischen Optionen häufig nicht mehr zugänglich¹⁴¹.

Neue alternative Therapieoptionen zur Behandlung der koronaren Herzerkrankung, wie der therapeutische Einsatz der Arterio- und Angiogenese⁴⁰, werden daher zurzeit intensiv untersucht.

1.2. Biologie des Gefäßwachstums

Angiogenetische Wachstumsprozesse führen zur Anlage und Ausdifferenzierung des Gefäßnetzes während der Embryogenese^{42;43}. Im erwachsenen Organismus werden angiogenetische Wachstumsprozesse aktiviert, wenn es zu einem "Mismatch" zwischen Angebot und Bedarf an arteriellem Blut kommt: z.B. in ischämischem Myokardgewebe aufgrund der eingeschränkten Perfusion bei arteriosklerotisch veränderten Koronararterien¹³¹. Im Verlauf einer progredienten myokardialen Ischämie kann es zum reaktiven Wachstum von Blutgefäßen über zwei verschiedene Mechanismen kommen: (1) *Angiogenese* bezeichnet den Vorgang der Aussprossung neuer Kapillaren in einem minderperfundierten Gewebsareal⁴². Endothelzellen proliferieren, migrieren und ordnen sich zu neuen Gefäßen an, wodurch ein dichteres Kapillarnetz entsteht⁴². (2) Ein verwandter Prozess ist das *Arteriogenese* genannte Kaliberwachstum der zuführenden Kollateralarterien („natürliche Bypässe“)^{42;43}.

1.2.1. Arteriogenese

Arteriogenese oder non-sprouting-Angiogenese ist ein wichtiger physiologischer Adaptationsvorgang, der zu einer Reperfusion eines arteriosklerotisch veränderten und somit

minderperfundierten Stromgebietes führen kann. Pathophysiologisch wird der Prozess der Arteriogenese vor allem mechanisch durch einen zunehmenden Shear-Stress vermittelt ^{4;75}. Entsprechend der Abnahme des Druckes in einer Koronararterie distal einer Stenose kommt es zur zunehmenden Umverteilung des Blutflusses über präexistente Kollateralgefäße, die nun eine Region mit hohem Perfusionsdruck proximal der Stenose mit einer Region mit niedrigem Perfusionsdruck distal der Stenose verbinden ¹³¹. Dieser Zustand verursacht einen Anstieg der Flussgeschwindigkeit und somit zunehmende Scherkräfte (Shear-Stress) in den präformierten Kollateralarterien ⁷⁵. Folglich kommt es zu einer deutlichen Aktivierung des Endothels mit einer zunehmenden Expression von Zytokinen (Granulozyten Makrophagen Kolonie Stimulierender Faktor [GM-CSF], Monocyte-Chemoattracting-Protein-1 [MCP-1]) und von endothelialen Adhäsionsmolekülen (intercellular adhesion molecule 1 [ICAM-1]), die an der Monozytenadhäsion, am Monozytenrolling und der transendothelialen Migration von Monozyten beteiligt sind ^{51;123;124;139}. Die folgende vermehrte Adhärenz von Monozyten und ihre Transformation zu Makrophagen sind obligatorische Voraussetzungen für das Wachstum von Kollateralgefäßen, da diese Zellen Zytokine und Wachstumsfaktoren exprimieren, die eine reaktive Arteriogenese induzieren und regulieren ^{4;76;136}. Zu diesen Faktoren gehören MCP-1, das die Chemoattraktion weiterer Monozyten in das ischämische Myokardareal auslöst, Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α), welches für die notwendige entzündliche Umgebung sorgt, Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2), ein Mitogen für Endothelzellen und glatte Muskelzellen, und Matrix-Metalloproteinasen (MMP), die ein Remodelling der arteriellen Struktur erlauben und somit den notwendigen perivaskulären Raum für die Erweiterung der arteriellen Gefäße schaffen ^{4;76}. Die extrazelluläre Matrix wird aufgelöst und durch Proliferation von Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten gelingt es den Durchmesser eines präformierten Kollateralblutgefäßes auf das 20fache zu erweitern (arterielles Remodelling) ¹³²⁻¹³⁴.

1.2.2. Angiogenese

Neben der Arteriogenese ist die Angiogenese ein wichtiger physiologischer Adaptionsvorgang. Ein Stimulus (z.B. eine Ischämie mit Hypoxie und Hypoglykämie) initiiert über die lokal vermehrte Expression von Transkriptionsfaktoren (z.B. Hypoxia Inducible Factor-1 [HIF-1]) die Bildung von vaskulären Wachstumsfaktoren (Vascular Endothelial Growth Factor [VEGF], FGF-2), die eine Proliferation von Endothelzellen induzieren, und von Entzündungsmediatoren (GM-CSF, MCP-1, TNF- α), die zu einer Vasodilatation, Steigerung der Gefäßpermeabilität und zur Einwanderung von Monozyten und Makrophagen führen^{4;39;65;163}. Diese Entzündungszellen bilden ihrerseits lokale Entzündungsmediatoren und setzen Matrix-Metalloproteinasen (MMP) frei, die die Basalmembran und die Bindegewebsmatrix durch proteolytische Degradation auflösen⁶⁵. Hypoxie sensibilisiert die Endothelzellen für angiogenetische Wachstumsfaktoren (VEGF, FGF-2) durch vermehrte Expression der Rezeptoren auf der Zelloberfläche^{63;73}. In der Folge lösen sich Endothelzellen aus dem Zellverband, migrieren, proliferieren und formen entlang des angiogenetischen Reizes ein neues kapilläres Blutgefäß mit einem Lumen, wodurch ein dichteres Kapillarnetz (Gefäßdurchmesser 5-8 μ m) entsteht⁶⁵. Es resultiert eine Abnahme des peripheren Widerstandes, ein erhöhtes Sauerstoffangebot und eine verbesserte Versorgung ischämischen Myokardgewebes mit Substraten des oxidativen Stoffwechsels⁴³.

1.2.3. Vaskuläre Wachstumsfaktoren

Tierexperimentelle Untersuchungen konnten zeigen, dass die Arterio- und Angiogenese über spezifische Mediatoren, sogenannte vaskuläre Wachstumsfaktoren, vermittelt werden^{27;112;138}. Es konnten mehrere angiogenetische Wachstumsfaktoren identifiziert werden, von denen **Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)** und **Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2)** bezüglich ihrer angiogenetischen Effektivität,

Wirkungsweise und unerwünschten Wirkungen am eingehendsten untersucht sind ^{5;6;8;11;13;29;38;138;149;168}. FGF-2, Mitglied der Fibroblast Growth Factor (FGF)–Familie, ist ein 17,2 kDa Protein, bestehend aus 155 Aminosäuren, und wurde erstmals aus bovinen Gehirnen isoliert ³⁵. Es war das erste Protein, das als angiogenetisches Cytokin identifiziert werden konnte ⁴², und stimuliert die Mitose von Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten und wirkt chemotaktisch auf Endothelzellen ⁴². FGF-2 konnte aus Myokardgewebe isoliert werden ³⁰. Eine Reihe weiterer Zelltypen konnte identifiziert werden, die FGF-2 synthetisieren: Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Fibroblasten, Makrophagen und Tumorzellen ²⁶. FGF-2 kommt in vielen Geweben, gebunden an die Basalmembran und an Heparansulfat-Proteoglykane der subendothelialen extrazellulären Matrix vor und wird vornehmlich durch einen Zell- oder Gewebeschaden und durch proteolytische Enzyme freigesetzt ^{41;42}; FGF-2 fehlt die typische n-terminale Signalsequenz zur Sekretion ⁴². Es wurden vier verschiedene Rezeptoren für FGF (FGFR1, FGFR2, FGFR3 und FGFR4) entdeckt, die als Tyrosinkinaserzeptoren identifiziert werden konnten ⁴⁷ und ihre intrazelluläre Wirkung über den MAP-Kinase pathway, die Bildung von Diacylglycerol, die Aktivierung der Proteinkinase C und die Mobilisierung von Calcium entfalten ⁷⁷; neueren Erkenntnissen zu Folge wird ein beträchtlicher Anteil der Wirkung von FGF-2 zusätzlich über intrazelluläre Rezeptoren vermittelt, die direkt im Zellkern wirken ⁴⁷. Diese Faktoren münden zusammen in einer Zunahme der Genexpression und der DNA-Synthese, bewirken die Mitose der Zelle und die Anordnung der Tochterzellen zu einem Blutgefäß entlang des angiogenetischen Reizes ⁴⁷.

1.3. Therapeutische Arterio- und Angiogenese

Als therapeutische Arterio- und Angiogenese wird die Applikation von angiogenetischen Wachstumsfaktoren bei Ischämie bezeichnet mit dem Ziel, die natürliche, reaktive Arteriogenese und Angiogenese zusätzlich zu stimulieren, und somit den Blutfluss in

minderperfundierten Herzmuskelarealen wiederherzustellen. Hierbei werden entweder rekombinante Wachstumsfaktoren oder für Wachstumsfaktoren kodierende Gene appliziert^{104;140}. Unter den bekannten vaskulären Wachstumsfaktoren sind Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) und Vascular Endothelial Growth Factor 165 (VEGF₁₆₅) bezüglich ihrer angiogenetischen Effektivität, Wirkungsweise und Nebenwirkungen am eingehendsten charakterisiert: die Applikation von FGF-2 bei experimenteller chronischer Myokardischämie (Schwein, Hund) konnte eine deutliche Zunahme der Arteriogenese^{69;94;129} und der Angiogenese^{78 12;52;88;94 93} bewirken und war von einer signifikanten Verbesserung des myokardialen Blutfluss^{52;78;88;90;94;103;121;129;142;156} und der kontraktilen Myokardfunktion begleitet^{52;69;78;88;101;129}. In Infarktmodellen (Hund, Schwein) konnte durch die mit FGF-2 induzierte Arterio- und Angiogenese eine Verkleinerung der Infarktgröße erzielt werden^{62;109;154;168}. Ähnliche Ergebnisse konnten auch nach Applikation von VEGF₁₆₅-Protein, bzw. adenoviraler VEGF₁₆₅-cDNA, in tierexperimentellen Modellen chronischer Myokardischämie (Hund, Schwein) beobachtet werden^{9;59;61;96;101;103;106;116;130}. Trotz viel versprechender tierexperimenteller Ergebnisse erbrachten erste placebokontrollierte klinische Studien noch keine eindeutig positiven Ergebnisse^{54;66;67;80;144}.

Die bis jetzt nicht eindeutigen Ergebnisse könnten u.a. auf eine mangelnde Wirksamkeit der bislang zur Verfügung stehenden klinisch einsetzbaren Applikationsverfahren zurückzuführen sein. Möglicherweise ist die Verlängerung der Verweildauer der Wachstumsfaktoren im Zielareal von entscheidender Bedeutung²². Zusätzlich sind durch die vaskulären Wachstumsfaktoren Nebenwirkungen (promovierende Effekte auf das Tumorwachstum, Arteriosklerose, Nephropathie, proliferative Retinopathie) zu befürchten, die allerdings in ersten klinischen Phase I- und Phase II-Studien bei einmaliger Gabe des angiogenetischen Proteins (FGF-2, VEGF₁₆₅) nicht aufgetreten sind^{54;66;67;80;144} (siehe auch Abschnitt 4.3.2.). Allerdings führt der therapeutische Einsatz von FGF-2 und vor allem VEGF akut zu einer Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) mit einer deutlichen arteriellen Vasodilatation¹⁴⁴. Dieser Effekt führte aufgrund der akut auftretenden arteriellen Hypotension bereits zu einer Dosislimitierung bei ersten klinischen Phase I Studien beider

Wachstumsfaktoren¹⁴⁴. Laham et al. konnten in einer klinischen, placebokontrollierten open-dose Eskalationsstudie⁸⁵ mit der einmaligen intrakoronaren Anwendung von FGF-2 (0,33-48µg/kg KG) nachweisen, dass eine Dosierung von maximal 36µg/kg KG FGF-2 akut nebenwirkungsfrei toleriert wird.

Der therapeutische Einsatz vaskulärer Wachstumsfaktoren verlangt deshalb ein Applikationsverfahren, das den Faktor mit hoher Sicherheit in das Zielgebiet lenkt und durch ausreichende Selektivität das Risiko systemischer Nebenwirkungen minimiert.

1.4. Applikationswege für Gefäßwachstumsfaktoren

Vielversprechende Ansätze (siehe Abschnitt 1.3.) zur Stimulation der Arterio- und Angiogenese als therapeutisches Prinzip für die fortgeschrittene koronare Herzerkrankung werden derzeit intensiv untersucht. In tierexperimentellen und ersten klinischen Studien werden zur Induktion einer therapeutischen Arterio- und Angiogenese rekombinante Wachstumsfaktoren (Protein) oder für Wachstumsfaktoren kodierende Gene (Plasmid-DNA oder adenoviraler Gentransfer) eingesetzt. Hierfür ist ein Applikationsverfahren notwendig das folgende Voraussetzungen erfüllt:

- 1.) eine hohe lokale Substanz-Konzentration im Zielareal mit langer Kontaktzeit gewährleistet (Effektivität);
- 2.) hierbei selektiv das ischämische Areal erreicht, um unerwünschte Wirkungen in benachbarten Geweben bzw. in anderen Organen zu vermeiden (z.B. Promotion von Tumorwachstum) (Selektivität);
- 3.) eine homogene räumliche Verteilung der Genvektoren bzw. Wachstumsfaktoren über das gesamte Zielareal und in allen Gewebeschichten ermöglicht (Homogenität).

Mögliche Applikationsverfahren vaskulärer Wachstumsfaktoren, die in tierexperimentellen und klinischen Studien untersucht werden, sind die direkte intramyokardiale Injektion, die

intrapericardiale Anwendung und die endovaskuläre Applikation (intravenös-systemisch und intrakoronar).

Zur direkten intramyokardialen Injektion wird der vaskuläre Wachstumsfaktor entweder im Rahmen einer operativen Revaskularisation (Bypass-Operation), nach Thorakotomie und Freilegung des Herzens, von transepikardial mit einer Nadel in das Myokardgewebe eingebracht, oder perkutan im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung mit einem Injektionskatheter vom linken Ventrikel aus transendokardial appliziert. Die intramyokardiale Injektion ist daher ein sehr zielgenaues Verfahren (Selektivität), mit langer Verweildauer des angiogenetischen Proteins im Gewebe⁸⁶; allerdings wird ein Grossteil der applizierten Substanzmenge direkt durch den intramyokardialen Stichkanal ausgewaschen, oder durch das venöse und lymphatische System abtransportiert, nur etwa 43% der Substanzmenge bleibt lokal erhalten⁵⁵. Zusätzlich wird das angiogenetische Protein lokal an den Injektionsstellen in einen sehr begrenzten Verteilungsraum appliziert, mit einer kleinen Oberfläche zur Bindung an den Rezeptor; der vaskuläre Wachstumsfaktor kann daher seine Wirkung nur inhomogen im Zielareal und somit deutlich eingeschränkt entfalten¹⁴⁰. Nachteilig zeigt sich beim operativen Vorgehen zusätzlich die Invasivität der unumgänglichen Thorakotomie, mit allen Risiken einer offenen Operation am Herzen, und das Verlangen nach einer spezialisierten Ausrüstung und einem hochqualifizierten Operateur⁸⁶. Erste klinische Phase I Studien mit der operativen, transepikardialen Applikation vaskulärer Wachstumsfaktoren konnten die Sicherheit und Machbarkeit des Verfahrens im Rahmen einer Bypass-Operation zeigen, der zusätzliche Nutzen zu einer operativen Revaskularisation ist nicht erwiesen¹⁴⁰.

Einen alternativen Weg stellt die perikardiale Instillation des Faktors dar, die auch perkutan im Rahmen eines Herzkatheters erfolgen kann^{87;121}. Diese Möglichkeit beschränkt sich aber auf nur einen sehr kleinen Teil der Patienten, die an einer koronaren Herzerkrankung leiden, da 80-90% bereits voroperiert (Bypass-Operation) und damit perikardektomiert sind¹⁴⁴. Zusätzlich ist die perikardiale Applikation mit deutlichen Risiken behaftet (Hämoperikard,

Herzrhythmusstörungen, Kammerflimmern) und bleibt daher auf die Anwendung im tierexperimentellen Modell beschränkt ¹⁴⁴.

Die systemische intravenöse Gabe eines vaskulären Wachstumsfaktors in eine periphere Vene hat sich zur Induktion einer myokardialen Angiogenese in tierexperimentellen Untersuchungen als ineffektiv erwiesen ¹²⁹. Wahrscheinlich wird ein hoher Anteil des angiogenetischen Proteins im Pulmonalkreislauf („first-pass“) durch Rezeptoren (Heparansulfate) gebunden und nur ein kleiner Anteil erreicht unselektiv das ischämische Myokardgewebe ⁸². Zusätzlich würde die systemische intravenöse Gabe den Patienten mit den erheblichen Nebenwirkungen angiogenetischer Wachstumsfaktoren (siehe Abschnitte 1.3. und 4.8.) konfrontieren ⁸².

Mit der direkten intrakoronaren Applikation des vaskulären Wachstumsfaktors kann der Wachstumsfaktor selektiv in das ischämische Myokardgewebe eingebracht werden und sie stellt damit das bislang vielversprechendste, klinisch anwendbare Applikationsverfahren dar. Allerdings ist die Kontaktzeit des Wachstumsfaktors bei Passage der Koronararterien mit dem ischämischen Gewebe zu kurz um eine effektive Bindung des Wachstumsfaktors an seine Rezeptoren zu gewährleisten ¹²¹. In tierexperimentellen Studien war die intrakoronare Gabe vaskulärer Wachstumsfaktoren zur Induktion einer therapeutischen Angiogenese daher nur bei Verlängerung der Applikationsdauer erfolgreich, z.B. durch operative Implantation einer osmotischen Minipumpe ^{9;155} oder durch Mikroembolisation der Kapillaren mit Wachstumsfaktor bestückten Mikrosphären ¹². Die einmalige intrakoronare Injektion war nicht sicher effektiv ¹²¹. Erste klinische Phase I und placebokontrollierte Phase II Studien, mit der einmaligen intrakoronaren Infusion eines vaskulären Wachstumsfaktors bei Patienten mit fortgeschrittener koronarer Herzerkrankung, ohne Möglichkeit der interventionellen oder operativen Revaskularisation, haben ihre primären Studienendpunkte verfehlt ^{54;66;67;80;144}. Zusätzlich ist bei der koronaren Herzerkrankung krankheitsbedingt infolge der Stenosierung oder des Verschlusses einer Koronararterie nicht nur die Versorgung des Myokards mit arteriellem Blut vermindert oder unterbrochen, sondern außerdem ist auch dieser Zugangsweg für die Applikation von vaskulären Wachstumsfaktoren in ischämisches

Myokardgewebe deutlich eingeschränkt ¹⁴⁴. Selbst bei gezielter Einbringung der Wachstumsfaktoren in die betroffene Arterie durch selektive Katheterisierung gelangen die applizierten Substanzen daher über Kollateralen zunächst überwiegend in Areale mit erhaltener Restperfusion, von wo sie schließlich über das venöse System in den großen Kreislauf ausgeschwemmt werden ohne das zentral jenseits der Okklusionsstelle liegende ischämische Zielareal zu erreichen ¹⁴⁴.

Die klinische Anwendung vaskulärer Wachstumsfaktoren zur Induktion einer therapeutischen Arterio- und Angiogenese ist somit unter anderem durch ein effektives und selektives Applikationsverfahren limitiert, das klinisch am Patienten eingesetzt werden kann und eine homogene Verteilung des Wachstumsfaktors im ischämischen Zielareal gewährleistet.

1.5. Gezielte Medikamentenapplikation in ischämisches Myokard mit der kontinuierlichen druckregulierten Retroinfusion von Koronarvenen (SSR)

Das koronarvenöse System bleibt im Gegensatz zu den Koronararterien weitgehend unbeeinflusst von arteriosklerotischen Veränderungen und steht daher als Zugangsweg zur Medikamentenapplikation auch bei fortgeschrittener Grunderkrankung immer offen ^{18;22;159}. Ein viel versprechender Ansatz zu einer effizienten, homogenen und selektiven Applikation von vaskulären Wachstumsfaktoren könnte sich somit aus der neuentwickelten selektiven druckregulierten Retroinfusion von Koronarvenen (SSR-Herzkatheter-Verfahren) ergeben: die Selektive Absaugung und druckgeregelter Retroinfusion von Koronarvenen (SSR) wurde als myokardprotektives perkutanes Herzkatheter-Verfahren zur Verhinderung akuter Ischämieschäden entwickelt (z.B. bei Hochrisiko-PTCA) ^{16-19;50;84}. Während eines akuten Koronararterienverschlusses kann hiermit das ischämische Herzmuskelgewebe retrograd über die Koronarvene gezielt mit arteriellem Blut versorgt werden ^{16-19;22;34;50}. Die

Machbarkeit, Sicherheit und Effektivität dieses perkutanen Herzkatheter-Verfahrens konnte in einer klinischen Studie an inzwischen über 300 Patienten nachgewiesen werden ^{18;50}.

In weiteren tierexperimentellen Untersuchungen am Schwein konnte gezeigt werden, dass mit dem SSR-Verfahren pharmakologische Substanzen (wie z.B. Dobutamin) effektiv und selektiv in ischämisches Myokard appliziert werden können ¹⁵⁹: die regionale Myokardfunktion (gemessen als Segmentverkürzung in % der enddiastolischen Länge) konnte in einem Modell akuter Myokardischämie bei der Retroinfusion von arteriellem Blut und Dobutamin (0,1 µg/kg/min) bei 78±22,3% des Ausgangswertes, im Vergleich zu 57,5±9,2% bei alleiniger Retroinfusion von arteriellem Blut, erhalten werden ¹⁵⁹. Im nichtischämischen Myokard blieb als Ausdruck der selektiven Applikation eine positiv inotrope Wirkung von Dobutamin aus ¹⁵⁹. Eine Veränderung der Herzfrequenz als systemischer Dobutamineffekt trat nicht auf ¹⁵⁹. Somit konnte trotz eines kompletten Verschlusses einer Koronararterie im hinter der Okklusionsstelle liegenden Myokardareal eine signifikante pharmakologische Wirkung erzielt werden, die lokal auf das ischämische Zielareal begrenzt blieb ¹⁵⁹. Ähnlich Ergebnisse konnten Ryden et al. nach Retroinfusion des β-Blockers Metoprolol erzielen ¹²⁸.

In einer weiteren tierexperimentellen Untersuchung wurde die Retroinfusion von adenoviralem Genmaterial mit dem Luciferase-Reportergene (Ad.rsv-Luc) und dem β-Galactosidase-Reportergen (Ad.rsv-βGal) in porcines Myokard untersucht und mit der intracoronaren Applikation der viralen Vektoren verglichen ²¹. Durch retrograde Applikation in die anteriore Herzvene während einer kurzen Ischämiezeit konnte die Reportergenexpression im Zielgebiet (LAD-Areal) signifikant im Vergleich zur antegraden Gabe gesteigert werden; eine homogenere Verteilung der Genexpression im Zielgebiet und in allen Myokardschichten konnte durch die Applikation der doppelten Virenmenge während zwei Ischämiezeiten erreicht werden ²¹. Im Gebiet des Ramus circumflexus (RCX) und in anderen Organen ergab sich kein Hinweis auf eine relevante Reportergenexpression ²¹. Die Verweildauer von Kontrastmittel (1 ml Bolusinjektion) im koronaren Gefäßsystem (Schwein) war deutlich verlängert bei Applikation über die Retroinfusion verglichen mit der

intracoronaren Kontrastmittelgabe ($9,5 \pm 2,5$ s vs. $0,8 \pm 0,4$ s). Die vermehrte Reporterexpression im Bereich des LAD-Zielareals nach Retroinfusion des viralen Vektors wurde somit vor allem auf eine verlängerte Kontaktzeit des viralen Vektors mit dem Myokardgewebe zurückgeführt ²¹.

Die vorliegenden Daten weisen darauf hin, dass sich die Applikation von angiogenetischen Wachstumsfaktoren mit der SSR als viel versprechender Ansatz einer therapeutischen Angiogenese darstellt:

1. Das Verfahren der synchronisierten Absaugung und Retroinfusion ist ein effektives Applikationsverfahren, das eine homogene räumliche Verteilung der Substanz sowohl im Zielareal als auch transmyokardial bewirkt ^{21;159}.
2. Angiogenese ist ein Prozess der von den Venolen und Kapillaren ausgeht ^{11;42}; mit der Verteilung des Faktors im venösen System (SSR) wird das Zielgebiet direkter und mit einer deutlich höheren Konzentration erreicht ²¹.

Im direkten Vergleich mit der antegraden, intracoronaren Applikation darf man folgende weitere Vorteile der Retroinfusion von vaskulären Wachstumsfaktoren annehmen:

1. Eine arterielle Stenose oder eine Okklusion der Koronararterie verhindert das Einbringen des angiogenetischen Faktors ins Zielgebiet, der Großteil des Faktors wird über Kollateralgefäße ausgewaschen und verursacht systemische Nebenwirkungen ohne im Zielgebiet gewirkt zu haben ⁸².
2. Es könnte sich durch die längere Kontaktzeit des Gefäßwachstumsfaktors mit dem Gewebe eine höhere Gewebefixierung und damit eine höhere Effektivität der induzierten Angiogenese ergeben ²¹.

Zudem ist die selektive Absaugung und druckgeregelte Retroinfusion (SSR) im Herzkatheterlabor des Klinikums Großhadern der Universität München als sicheres und effektives perkutanes Herzkatheterverfahren etabliert (CE-Zulassung) und wurde in der klinischen Routine zur Myokardprotektion während akuter Ischämie an mehr als 300 Patienten ohne Komplikationen eingesetzt ^{18;50}.

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse sollte in der vorliegenden Studie die therapeutische Arterio- und Angiogenese mittels Retroinfusion von FGF-2 bei chronischer Myokardischämie (Schwein) untersucht werden, und mit der intrakoronaren FGF-2-Gabe verglichen werden. Hierfür musste zunächst in einer Vorserie ein tierexperimentelles Modell (Schwein) chronischer myokardialer Ischämie durch perkutane Implantation des Reduktionsstent etabliert werden. Im Hauptteil der vorliegenden Untersuchung wurde zur Induktion einer myokardialen Ischämie der Reduktionsstent implantiert und die myokardiale Arteriogenese und Angiogenese nach Retroinfusion von FGF-2 in die Koronarvene untersucht.

1.6. Fragestellungen

Folgende Fragestellungen wurden in der vorliegenden Untersuchung bearbeitet:

1. Kann durch die perkutane Implantation des Reduktionsstents eine chronische myokardiale Ischämie induziert werden?
2. Ist es möglich mit Hilfe der Retroinfusion von FGF-2 in die Koronarvene eines ischämisch veränderten Herzmuskelareals eine effektive Arterio- und Angiogenese zu erzielen?
3. Welchen Einfluss hat die Retroinfusion von FGF-2 in die Koronarvene, in einem Modell chronischer Myokardischämie, auf den regionalen myokardialen Blutfluss, die regionale und globale Myokardfunktion?
4. Wie effektiv ist die therapeutische Arterio- und Angiogenese nach Retroinfusion von FGF-2 in die Koronarvene im direkten Vergleich mit der intrakoronaren Applikation?

2. Material und Methoden

2.1. Versuchsbeschreibung und Protokoll

Die vorliegende Studie wurde von der Regierung von Oberbayern genehmigt (AZ 2511-106/99) und nach dem deutschen Tierschutzgesetz von 1986 durchgeführt.

2.1.1. Vorbereitung, Narkose und Überwachung

52 Versuchstiere der Rasse deutsches Landschwein wurden zur Überprüfung der Narkotikaverträglichkeit einer Halothan-Vortestung unterzogen (Tierversuchsanstalt der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, Unterschleißheim, BRD).

Die mittlere Körpergewicht der Tiere betrug $22,7 \pm 2$ kg. Die Einleitung der Narkose erfolgte durch intramuskuläre Bolusinjektion von Ketamin 20mg/kg KG (Ketamin 50 Curamed, CuraMED Pharma, Karlsruhe, BRD), Azaperone 10mg/kg KG (Janssen-Cilag, Neuss, BRD) und 0,5 mg Atropinsulfat (Atropinsulfat Braun, B. Braun, Melsungen, BRD). Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe wurde den Tieren ein intravenöser Zugang über eine Ohrvene gelegt und zur Weiterführung der Narkose 15 mg Midazolam (Dormicum[®], Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen, Schweiz) und 15 mg Piritramid (Dipidolor[®], Janssen, Neuss, BRD) intravenös gegeben. Die Tiere wurden endotracheal intubiert und zur Aufrechterhaltung der Narkose mit Sauerstoff und Stickstoff, unter Zumischung von 0,5 - 2 % Enflurane (Ethrane[®], Abbott, Illinois, USA), beatmet (Ventilog[®], Dräger, Lübeck, BRD). Die Beatmung wurde durch regelmäßige Blutgasanalysen (ABL 300, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) kontrolliert. Folgende arterielle Blutgaswerte wurden angestrebt: $100 < pO_2 < 180$ mmHg, $30 < pCO_2 < 40$ mmHg und $7,3 < pH < 7,5$. Nach Lagerung auf dem Rücken auf einem regelbaren Heizkissen wurden die Schweine in waagerechter Lage fixiert.

Zur Überwachung der Herztätigkeit wurde mit Klebeelektroden und einem 4-poligem EKG-Kabel ein EKG abgeleitet. Der Blutdruck wurde nach Einführung der 9F Katheterschleuse (Cordis[®], Reading, Miami, USA) in die rechte, bzw. linke A. carotis über einen Druckabnehmer (Stetham Transducer, Hellige-Monitor, Freiburg, BRD) kontinuierlich gemessen. Das Monitoring der Körpertemperatur erfolgte kontinuierlich über eine rektale Temperatursonde.

2.1.2. Antikoagulation und Antibiotikatherapie

Die Implantation des Reduktionsstent, als äußerst thrombogenem Material, und die Veränderung des Blutflusses an der induzierten Stenose verlangten nach einer ausreichenden Antikoagulation. Am Tag vor dem ersten Eingriff wurde den Tieren eine Sättigungsdosis von 300 mg Clopidogrel (Iscover[®], Bristol-Myers Squibb GmbH, München, BRD) und 100 mg Acetylsalicylsäure (Aspirin[®], Bayer Vital, Leverkusen, BRD) oral verabreicht. Bis zum Ende des Versuches gewährleistete eine tägliche subkutane Injektion von 13,8mg Reviparin (Clivarin[®], Knoll, Ludwigshafen, BRD) und eine Erhaltungsdosis von 75 mg Clopidogrel p.o. und 100 mg ASS p.o. eine ausreichende Hemmung der Blutgerinnung. Zusätzlich wurde den Tieren intraoperativ am 1. (Implantation des Reduktionsstents) und 2. (retrograde und antegrade FGF-2-Applikation) Versuchstag einmalig 500 mg Acetylsalicylsäure i.v. (Aspisol[®], Bayer Vital, Leverkusen, BRD) und 20000 IE Heparin (Ratiopharm, Ulm, BRD) intravenös verabreicht. Am 3. Versuchstag wurde den Tieren einmalig 5000 IE Heparin intravenös appliziert.

Zum Schutz vor Infektionen erhielten die Tiere intraoperativ am 1. und 2. Versuchstag Meronem 1000 mg (Zeneca, Grünenthal, BRD) intravenös.

2.1.3. Arterielle und venöse Gefäßzugänge

Am 1. und 2. Versuchstag erfolgte die Einlage einer 9F Schleuse (Cordis[®], Reading, Miami, USA) in die A. carotis rechts und einer 11F Schleuse (Cordis[®], Reading, Miami, USA) in die V. jugularis externa rechts. Nach Entfernung der Schleuse am Ende des jeweiligen Versuchstages wurden die Gefäße ligiert. Am 3. Versuchstag wurde eine 9F Schleuse in der linken A. carotis communis, eine 11F Schleuse in der linken V. jugularis externa und eine 7F Schleuse (Cordis[®], Reading, Miami, USA) in der linken A. femoralis platziert.

2.2. Vorserie: Etablierung eines Modells für chronische Myokardischämie durch Implantation des Reduktionsstent

In einer Vorserie (Gruppe D, n=7) wurde zunächst der Reduktionsstent als Modell chronischer myokardialer Ischämie etabliert (Versuchsplan siehe Abbildung 1). Hierzu wurde am Versuchstag 1 der Reduktionsstent in den Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie (RIVA oder LAD) eingesetzt. Nach 7 Tagen wurde der regionale myokardiale Blutfluss (fluoreszierende Mikrosphären) unter Ruhebedingungen und unter Adenosin-induzierter maximaler Vasodilatation gemessen. Am Versuchende 28 Tage nach Implantation des Reduktionsstent wurde der regionale myokardiale Blutfluss unter Ruhebedingungen und unter maximaler Vasodilatation erneut bestimmt und die Infarktgröße planimetrisch vermessen (Tetrazoliumchloridfärbung). Bei drei Tieren wurde zusätzlich am Tag 28 mit einer Positronenemissionstomographie (PET) der myokardiale Blutfluss und die myokardiale Vitalität untersucht.

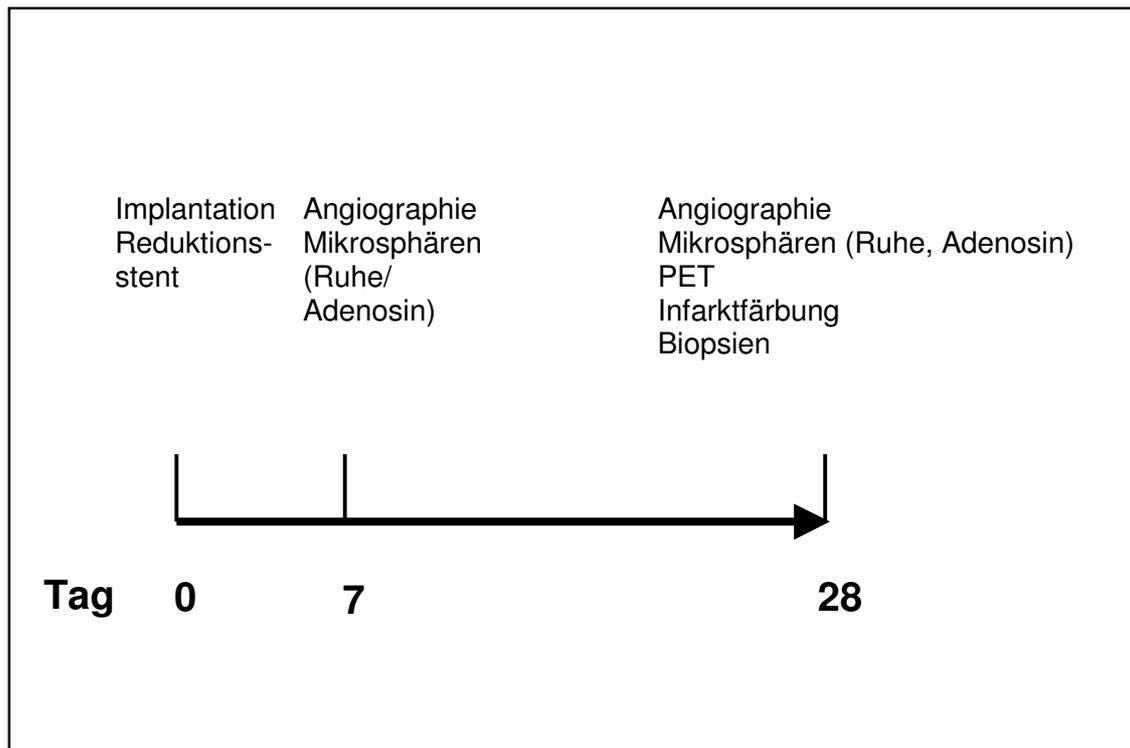


Abbildung 1: Versuchsplan der Vorserie: Etablierung eines Modells für chronische myokardiale Ischämie durch Implantation des Reduktionsstent. PET = Positronenemissionstomogram

2.2.1. Implantation des Reduktionsstent (Tag 0)

Die Platzierung und Kontrolle der Lage der Katheter erfolgte unter Durchleuchtung (Ziehm, Erlangen, BRD). Alle relevanten Katheterinterventionen wurden zur Dokumentation und späteren Auswertung mit einem Videogerät aufgezeichnet.

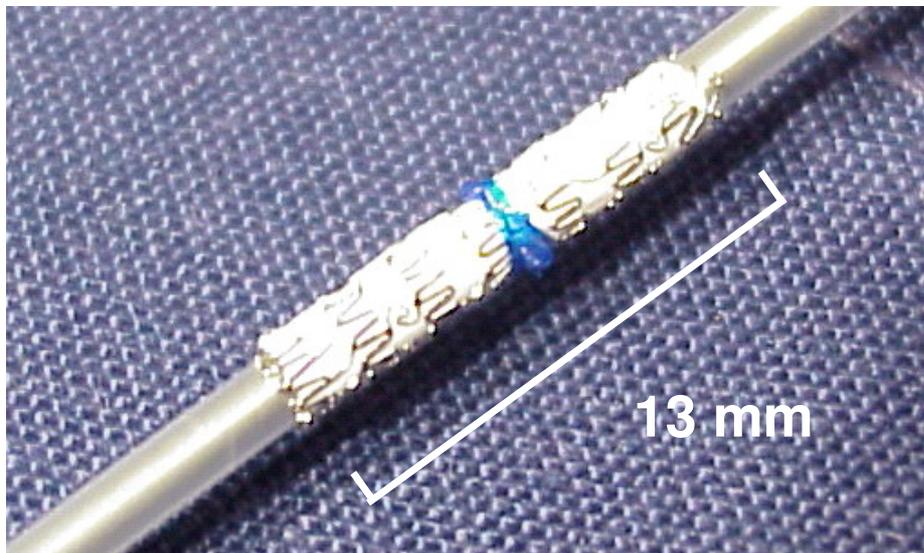
2.2.1.1. Vorbereitung des Reduktionsstent

Ein Teflon Stent-Graft (26 mm) mit einer Polytetrafluorethylen (PTFE)-Membran (Jostent[®], Jomed, Rangendingen, BRD) wurde halbiert und auf einer 16G/1.5mm Kanüle positioniert. Die Mitte des Stents wurde mit einem 5-0 Faden (Prolene[®], Ethicon, Norderstedt, BRD) einmal umwickelt und dann gegenläufig fünfmal einfach geknotet. Der so

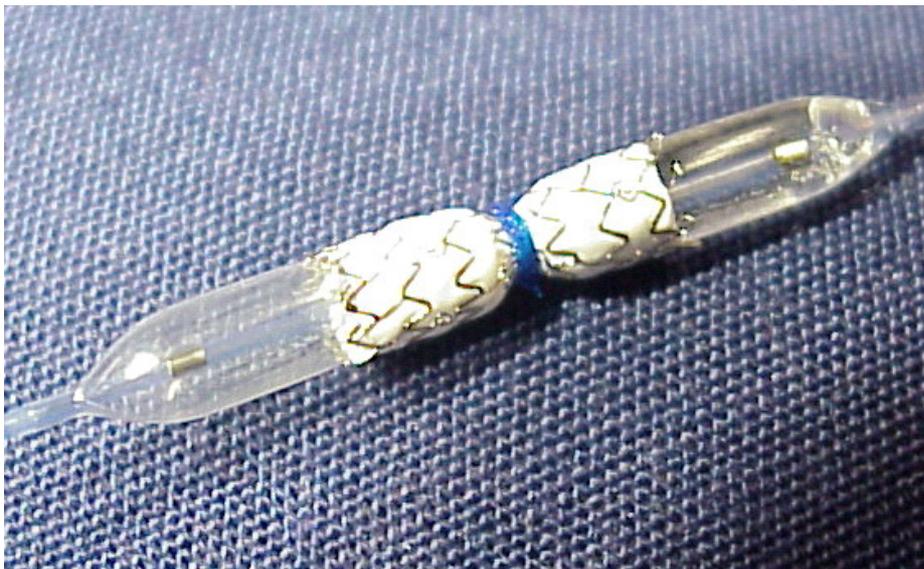
vorbereite Reduktionsstent wurde auf einem 3,0mm dicken und 20mm langem PTCA-Ballon (AMG, Raesfeld-Erle, BRD), der mit 1 atm inflatiert war, gekrempt (siehe Abbildung 2A). Der Ballon blieb bei 1 atm inflatiert, um ein Verrutschen des Stents auf dem Ballon bei der Positionierung zu verhindern.

2.2.1.2. Implantation des Reduktionsstent

Nach Einleitung der Narkose wurde je eine Schleuse in die linke A. carotis (9F, Cordis[®], Reading, Miami, USA) und die linke V. Jugularis externa (8,5F, Arrows[®], Reading, Miami, USA) eingelegt (Gruppe D, n=7). Der linke Hauptstamm wurde mit einem 8F Judkins Rechts Führungskatheter (Cordis[®], Reading, Miami, USA) aufgesucht und mittels Kontrastmittelgabe (Solustrast, Byk-Gulden, BRD) dargestellt. Im Folgenden schob der Untersucher einen 0,014I Führungsdraht (Road Runner Extra Support, Cook, Bjaeverskov, Dänemark) in die LAD vor. Über den, mit der Spitze im distalen Teil, der LAD liegenden Draht, wurde der Ballon in der LAD (left anterior descending coronary artery oder Ramus interventricularis anterior) distal des 1. Diagonalastes gezielt in einem Segment mit einem Durchmesser von 3mm platziert. Es erfolgte die Inflation des Ballon mit einem In-/Deflator (Road Runner Extra Support, Cook, Bjaeverskov, Dänemark); der Ballon wurde für ca. 20 Sekunden mit einem Spitzendruck von 16 atm entfaltet. Anschließend wurde der Ballon deflatiert. Der Stent wurde somit nur an den Enden entfaltet, in der Mitte an der Stelle der Ligatur entstand eine sanduhrförmige Stenose (siehe Abbildung 2). Abschließend erfolgte eine Koronarangiographie (s.o.) zur Überprüfung der korrekten Lage und vollständigen Entfaltung des Reduktionsstent und zur Abschätzung des erzielten Stenosegrades. Nach Entfernung der Katheter und der Schleusen wurde die Wunde unter sterilen Bedingungen schichtweise verschlossen. Anschließend wurde die Narkose ausgeleitet, das Tier extubiert und unter Kontrolle der Vitalparameter zurück in die Stallungen verbracht.



2A



2B

Abbildung 2: Induktion einer chronischen, progredienten myokardialen Ischämie durch Implantation des Reduktionsstent. Abbildung 2A: ein Stent-Graft wird auf einer 1,5mm Kanüle platziert und mit einem chirurgischen Faden in der Mitte ligiert. Abbildung 2B: der vorbereitete Stent-Graft wird auf einem PTCA-Ballon gekrempt und nach Platzierung in der Koronararterie mit einem Druck von 16 atm entfaltet.

Bei drei zusätzlichen Akutversuchen sollte der Akuteffekt der induzierten Stenose nach Implantation des Reduktionsstent untersucht werden. Nach Einleitung der Narkose, Intubation und Legen einer 9F Schleuse (Cordis[®], Reading, Miami, USA) wurde eine mediane Sternotomie durchgeführt. Eine Sonde (Transonic[®] Flowprobe, Transonic Systems In., Ithaca, USA), die nach dem Prinzip der Ultraschall-Doppler-Methode den absoluten Blutfluss in einem Blutgefäß bestimmt, wurde um die LAD zwischen 1. und 2. Diagonalast platziert. Mit einem 3,0 mm dicken und 12 mm langen PTCA-Ballon (ARTHOS Stent Implantation System, AMG, Raesfeld-Erle, BRD) wurde der Ramus interventricularis anterior für 60 sec okkludiert und der maximale Blutfluss in der folgenden reaktiven Hyperämie gemessen. Nach Implantation des Reduktionsstent distal des ersten Diagonalastes wurde der maximale koronararterielle Blutfluss erneut bestimmt. Anschließend wurde der Reduktionsstent mit intravaskulären Ultraschall (IVUS) (Computed Intraluminal Sonography System Console, Jomed Inc., Rancho Cordova, U.S.A.) abgebildet und vermessen. Hierzu wurde ein 6F IVUS-Katheter (Jovus Avamar F/X, Jomed, Rancho Cordova, USA) an die Implantationsstelle des Reduktionsstents in der LAD vorgeschoben und jeweils ein zweidimensionales Ultraschallbild im B-Mode Verfahren an den Enden und im Bereich der maximalen Stenose angefertigt.

2.2.2. Einfluss des Reduktionsstent auf den regionalen myokardialen Blutfluss (fluoreszierende Mikrosphären) im chronischen Experiment

Die Messung der regionalen Durchblutung im ischämischen Myokard erfolgte mit Hilfe der Applikation fluoreszierender Mikrosphären⁸³ (siehe Abschnitt 2.3.3.1) am Tag 7 und am Versuchstag 28 nach Implantation des Reduktionsstent^{1;7;53;58;117;162}. Nach Einleitung der Narkose wurden je eine Schleuse in die rechte A. carotis (9 F, Cordis[®], Reading, Miami, USA) und die rechte V. Jugularis externa (8,5F, Arrows[®], Reading, Miami, USA) eingelegt. Angiographisch wurde zunächst festgestellt ob der Reduktionsstent am Tag 7 offen war oder

sich verschlossen hatte. Tiere mit komplett verschlossenem Reduktionsstent am Tag 7 wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Anschließend wurde zur Injektion der fluoreszierenden Mikrosphären ein 4F Pigtail-Katheter (Infinity™, Cordis®, Roden, Niederlande) im linken Vorhof platziert und für den Abzug der Referenzprobe (Abzugsrate 3,24 ml/min) ein weiterer 4F Pigtail-Katheter in die Aorta abdominalis knapp unterhalb des Zwerchfells eingelegt. Die fluoreszierenden Mikrosphären (10×10^6 Beads/Injektion) wurden über den Zeitraum von einer Minute gleichmäßig in den linken Vorhof injiziert; der Abzug der Referenzprobe erfolgte während der Injektion der Mikrosphären bis 2 min nach Injektion¹⁶². Die Messungen wurden am Versuchstag 7 und am Versuchsende 28 Tage nach Implantation des Reduktionsstent mit unterschiedlich fluoreszierenden Mikrosphären ausgeführt. Es erfolgte je eine Messung unter Ruheflussbedingungen und eine Messung unter Adenosin-induzierter (Adenosin $80 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ intrakoronar über 3 min) maximaler Vasodilatation. Am Versuchsende (Versuchstag 28) wurden nach Entnahme des Herzens aus dem gesamten Bereich des linken Ventrikels Myokardproben gewonnen, in subepikardiale, midmyokardiale und subendokardiale Myokardabschnitte aufgeteilt und in Formalin für 1 Woche fixiert. Anschließend wurde die Fluoreszenzaktivität in der Myokardprobe gemessen (Automatic Single Tube Filtration, siehe Abschnitt 2.3.3.1.) und der regionale myokardiale Blutfluss (transmuraler Blutfluss der jeweiligen Probe bezogen auf ein nicht-ischämisches Kontrollareal [Ischemic Zone/Normal Zone -Ratio, IZ/NZ-Ratio] und Verhältnis subendokardialer zu subepikardialer Blutfluss [Endo/Epi-Ratio]) wie unter Abschnitt 2.3.3.1. dargestellt errechnet.

2.2.3. Einfluss des Reduktionsstent auf den myokardialen Blutfluss und die myokardiale Vitalität (Positronenemissionstomographie) im chronischen Experiment

Am Versuchsende 28 Tage nach Implantation des Reduktionsstent wurde bei einem Tier zusätzlich mit einer Positronenemissionstomographie (PET) der myokardiale Blutfluss

(^{13}N -markierte Ammoniak [$^{13}\text{NH}_3$]-Perfusion) und die myokardiale Vitalität (^{18}F markierte Fluorodesoxyglucose [^{18}FDG]-Aufnahme) untersucht. Für die dynamische Positronenemissionstomographie (PET) wurde ein Ganzkörperscanner (CTI/ECAT 951R/31; Siemens/CTI, München, Deutschland) eingesetzt. Nach Aufzeichnung der Übertragungsabtastung für die Ermittlung der Abschwächungskorrektur wurde zunächst die myokardiale Perfusion gemessen ($^{13}\text{NH}_3$ -Perfusion). Hierzu wurden 20 mCi ^{13}N -markierten Ammoniak ($^{13}\text{NH}_3$) als Bolus mit einer Infusionspumpe verabreicht. Die dynamische PET-Aufzeichnung wurde unter Verwendung unterschiedlicher Aufzeichnungsrahmen ausgeführt (12x10 sec, 6x30 sec, and 3x300 sec). Anschließend wurde die myokardiale Vitalität (^{18}FDG -Aufnahme) untersucht. Hierfür wurde nach 30 min 10 mCi ^{18}FDG als Bolus über 30 sec. infundiert und dynamische Bilder aufgezeichnet (12x10 sec, 6x30 sec, 3x300 sec, 2x600 sec) ^{56;81;158}.

Nach der Datenrekonstruktion mit einem Hannig-Filter, wurden die Bilder räumlich in drei orthogonalen Ebenen reorientiert und die relative segmentale Tracer-Aufnahme in jedem Myokardabschnitt des linken Ventrikels ermittelt. Ein Schwellenwert von < 50% des maximalen Pixel-Count wurde festgelegt um Myokardareale mit einer signifikant verminderten $^{13}\text{NH}_3$ -Aufnahme (Perfusionsdefekt) zu definieren. Die weitere Aufarbeitung und Analyse der Daten erlaubte die automatische Bildkorrektur, die Bestimmung des regionalen myokardialen Blutfluss in $^{13}\text{NH}_3$ -Bildern und die Berechnung der myokardialen ^{18}FDG -Aufnahmerate (myokardiale Vitalität) ^{56;81;113}.

2.2.4. Einfluss des Reduktionsstent auf die Infarktgröße

Die Infarktgröße wurde am Versuchsende 28 Tage nach Implantation des Reduktionsstent bestimmt. Hierzu wurde das Herz entnommen und 15 ml Tetrazolium-Rot (10 %) unter konstantem Druck (80-100mmHg) in den Hauptstamm der linken Koronararterie injiziert ^{17;84}. Der linke Ventrikel wurde anschließend vom Apex ausgehend parallel zur

kurzen Herzachse in 0,5 mm dicke Scheiben geteilt und die Scheiben nacheinander digital fotografiert. Das vitale, rot gefärbte Myokard war von den avitalen, fibrotischen Myokardschwielen deutlich abzugrenzen^{17;84}. Zur Bestimmung der Infarktgröße wurden die gefärbten (vitales Myokard) und die ungefärbten Myokardareale (Infarktnarbe) computergestützt planimetrisch vermessen (Sigma Scan Pro, USA). Die Infarktgröße wurde bezogen auf das linksventrikuläre myokardiale Volumen angegeben^{17;84}.

2.3. Therapeutische Angiogenese mittels Retroinfusion von FGF-2 in die Koronarvene und Vergleich mit der antegraden Applikation in die Koronararterie

Im Hauptteil der vorliegenden Untersuchung wurde die therapeutische Arterio- und Angiogenese nach Retroinfusion von FGF-2 in die Koronarvene in einem Modell chronischer Myokardischämie (Schwein) untersucht, und mit der intrakoronaren Applikation von FGF-2 verglichen (siehe Abbildung 3). Hierzu wurde am 1. Versuchstag wurde bei insgesamt 23 Tieren zur Induktion einer chronischen, myokardialen Ischämie ein Reduktionsstent in die LAD eingesetzt. Nach 7 Tagen erfolgte die Behandlung entsprechend der Gruppeneinteilung: Kontrollen (Gruppe A, n=7), Retroinfusion von FGF-2 (150 µg) in die anteriore Herzvene (Gruppe B, n=7) und intrakoronare Applikation von FGF-2 (150 µg) in die LAD (Gruppe C, n=7). Nach weiteren 21 Tagen wurden der regionale myokardiale Blutfluss mit fluoreszierenden Mikrosphären, die regionale Myokardfunktion mit der Ultraschalllaufzeitmethode (Sonomikrometrie) und die globale Myokardfunktion (LVEDP, HZV) untersucht. Alle Messungen wurden unter Ruhebedingungen und unter Bestimmung der funktionellen Reserve (rechts-atriales Pacing mit einer Stimulationsfrequenz von 120 und 140/min) ausgeführt. Nach Tötung des Tieres und Entnahme des Herzens erfolgte eine post-mortem Koronarangiographie und die Bestimmung der Infarktgröße (histologisch, HE-Färbung). Anschließend wurden Myokardproben zur Messung des regionalen myokardialen

Blutfluss (fluoreszierende Mikrosphären) und zur histologischen Bestimmung der Kapillardichte (Färbung für alkalische Phosphatase/Eosin) entnommen. In zwei zusätzlichen Gruppen wurde 7 Tage nach Implantation des Reduktionsstent die myokardiale Gewebebindung nach Retroinfusion von I¹²⁵-markierten FGF-2 in die Koronarvene (n=3) und anterograde Gabe in die Koronararterie (n=3) untersucht.

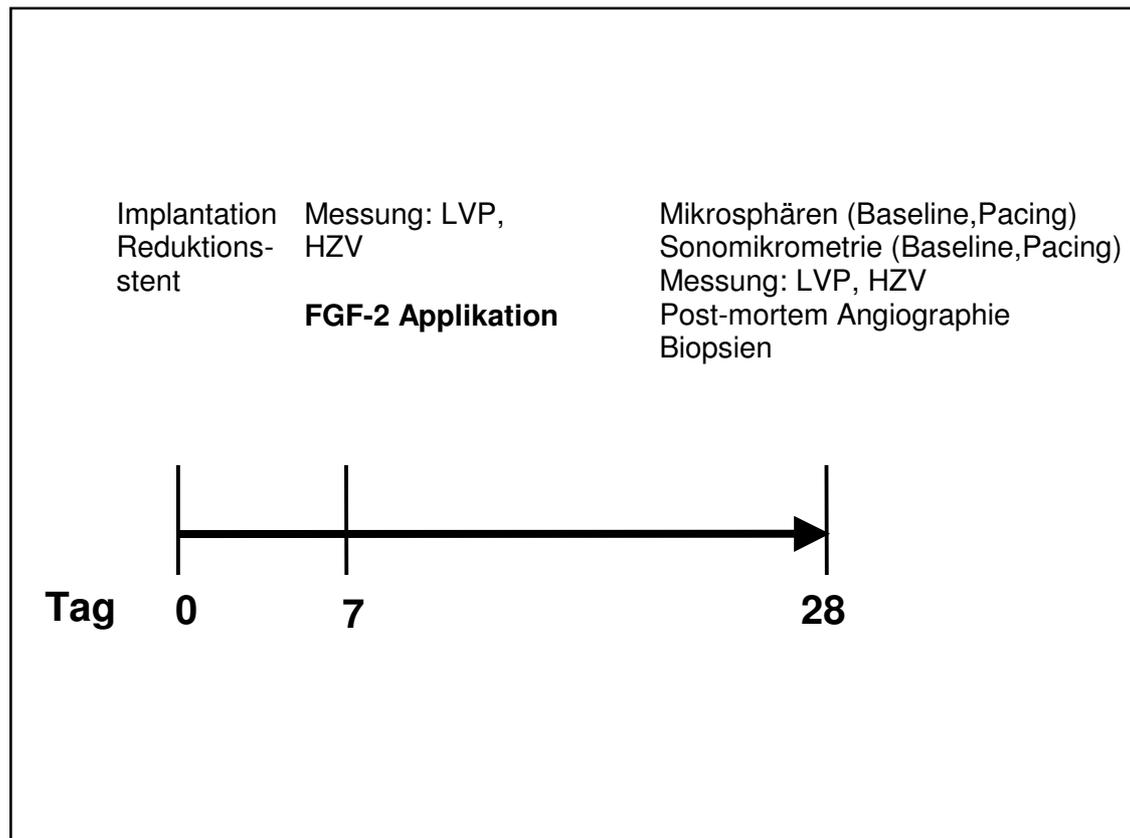


Abbildung 3: Versuchsplan der Hauptgruppen. LVP = Linksventrikulärer Druck, HZV = Herzzeitvolumen

2.3.1. Versuchstag 0: Implantation des Reduktionsstent

Nach Einleitung der Narkose wurde bei insgesamt 23 Tieren je eine Schleuse in die linke A. carotis (11F, Cordis, Miami, USA) und die linke V. Jugularis externa (8,5F, Arrows, Reading, USA) eingelegt. Ein Reduktionsstent wurde wie oben beschrieben vorbereitet und

implantiert (siehe Abschnitt 2.2.1.1.). Abschließend erfolgte eine Koronarangiographie (s.o.) zur Überprüfung der korrekten Lage und vollständigen Entfaltung des Reduktionsstent und zur Abschätzung des erzielten Stenosegrades. Nach Entfernung der Katheter und der Schleusen wurde die Wunde schichtweise unter sterilen Bedingungen verschlossen. Anschließend wurde die Narkose ausgeleitet, das Tier extubiert und unter Kontrolle der Vitalparameter zurück in die Stallungen verbracht.

2.3.2. Versuchstag 07: Selektive druckregulierte Retroinfusion und intrakoronare Applikation von FGF-2

2.3.2.1. System der Selektiven Synchronisierten Absaugung und druckregulierten Retroinfusion (SSR)

Das System der selektiven druckregulierten Retroinfusion und Absaugung (SSR) besteht aus einem kleinen Extrakorporalkreislauf, aus einem 4-lumigen 7,8 F-Katheter (MPK 002, PTC Pro-Med Technology Consult GmbH, Mödling, Österreich) und einer Absaugeinheit ^{18;21;84}. Das Gerät enthält eine Rollerpumpe, ein Hochdruckreservoir, ein Exzenter-Ventil mit einer Schrittmotorsteuerung, einen Druckaufnehmer für den Druck in der anterioren Herzvene, eine koronarvenendruckregulierte Volumenabgabe (Fuzzy-Logic) und eine Ballonpumpe. Zusätzlich verfügt das Gerät über eine EKG-Triggerung und eine Absaugeinheit (siehe Abbildung 4) ^{18;21;84}.

Die Rollerpumpe führt, dem vorher mit Natriumchlorid-Lösung befüllten System arterielles Blut aus der in der A. carotis communis liegenden Schleuse zu. Die Rollerpumpe wird über den Druck im Hochdruckreservoir gesteuert. Der Vordruck im Hochdruckreservoir ist frei wählbar. Für die Experimente der vorliegenden Untersuchung wurde ein Vordruck von 1500mbar gewählt. Aus dem Hochdruckreservoir wird das arterielle Blut über den SSR-Katheter in die anteriore Herzvene (AIV) abgegeben. Der Blutfluss im koronarvenösen System wird umgekehrt und das Herz retrograd mit arteriellem Blut versorgt.

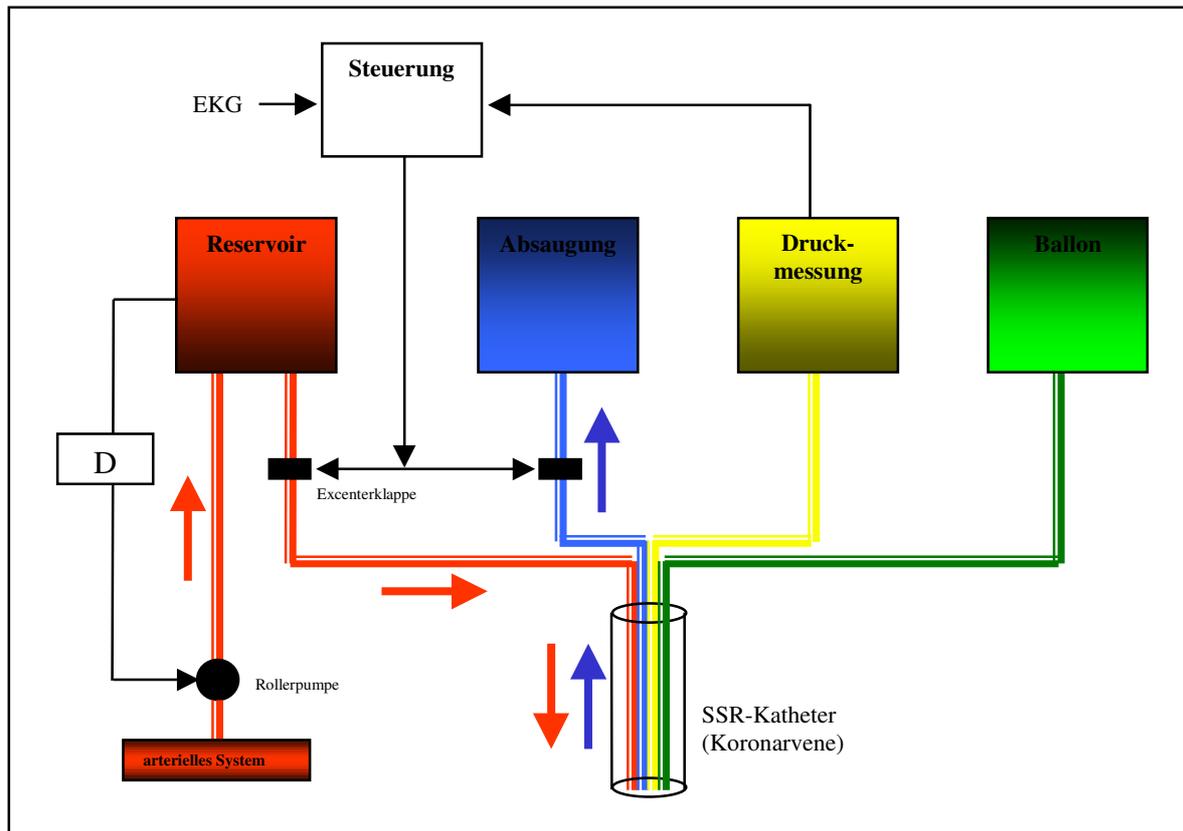


Abbildung 4: Aufbau der selektiven synchronisierten Absaugung und druckregulierten Retroinfusion von Koronarvenen (SSR) (Schematische Darstellung); Pfeile symbolisieren die Flussrichtung des Retroinfusates (rot) und des aus der Koronarvene abgesaugten Blutes (blau).

Das System enthält aus Sicherheitsgründen eine Druckregulierung (gemessen wird der Druck in der AIV), die den Blutfluss in die anteriore Herzvene (AIV) mit Hilfe einer Excenterklappe steuert, um zu hohe, und damit schädliche Spitzendrücke in den Koronarvenen zu vermeiden. Die Messung des Flusses im patientenzuführenden Teil des Systems erfolgt mit einer Transsonic Flow-Probe (Transonic[®] Flowprobe, Transonic Systems In., Ithaca, USA), die vor der Excenterklappe an der Retroinfusionsleitung montiert ist

18;18;19;21;23;50;84;84;159

Die Steuerung des Systems erfolgte über ein, über kutane Klebeelektroden, abgeleitetes EKG-Signal. Es lässt sich das System EKG-getriggert im 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 und 1:8-Modus (Pumpaktion : Herzschlag) betreiben. Die Latenzzeit zwischen R-Zacke und Pumpaktion ist frei wählbar was die Möglichkeit bietet, die Retroinfusion auf die Dauer der Diastole zu beschränken ^{18;21}.

2.3.2.2. Applikation von FGF-2

Nach Einleitung der Narkose wurden je eine Schleuse in die linke A. carotis (11F, Cordis[®], Reading, Miami, USA) und die linke V. Jugularis externa (8,5F, Arrows[®], Reading, USA) eingelegt. Mit einem 8F Judkins rechts Führungskatheter (Cordis[®], Miami, USA) wurde die linke Koronararterie aufgesucht und eine Koronarangiographie durchgeführt, welche zur späteren Abmessung des Stenosegrades auf Video aufgezeichnet wurde. Im Falle einer Komplettokklusion der LAD durch den Reduktionsstent wurde das Tier von der Untersuchung ausgeschlossen. Im Falle einer hochgradigen Stenosierung der LAD wurden die Ausgangsmessungen der Hämodynamik vorbereitet. Hierzu wurde unter Durchleuchtungskontrolle (Siemens, München, BRD) ein 6F Katheterspitzenmonometer (SPG-572, Millar, Houston, USA) zur Registrierung des Druckes im linken Ventrikel platziert. Anschließend wurde ein 3 lumiger 7F Thermodilutionskatheter (Edwards AT-2, Baxter, Unterschleißheim, BRD) in die rechte oder linke A. pulmonalis eingeschwenkt, mit welchem das Herzzeitvolumen nach dem Verfahren der Thermodilution (siehe Abschnitt 2.3.3.3.) bestimmt werden konnte. Zur Bestimmung des regionalen myokardialen Blutfluss (Fluoreszierende Mikrosphären) wurden 5×10^6 fluoreszierende Mikrosphären (Durchmesser $15,5 \mu\text{m} \pm 2\%$, Polystyrene, Molecular Probes, Eugene, USA) in 15 ml Dextran 10% suspendiert und über einen Katheter in den linken Vorhof rasch injiziert⁸³. Über eine 6F-"Pigtail-Katheter" in der Aorta abdominalis wird während der Injektion der Mikrosphären bis 120 Sekunden nach Ende der Injektion Referenzblut entnommen (Entnahmerate 4,1 ml/min) (siehe Abschnitt 2.3.3.1.).

Bei den Tieren der Gruppen A und B wurde eine Retroinfusion von arteriellem Blut mit Zusatz von FGF-2 (Gruppe B), bzw. Trägerlösung (Kontrollgruppe A), durchgeführt. Hierzu wurde nach einer Bolusinjektion von 300 IE Heparin/kg Körpergewicht das Hochdruckreservoir des Retroinfusionssystems zunächst mit Natriumchlorid-Lösung und

anschließend mit arteriellem Blut aus der A. carotis über die Rollerpumpe befüllt. Das System wurde bis zum Beginn des Eingriffs an die in der Vena jugularis liegende 11F-Schleuse angeschlossen, um es kontinuierlich zu spülen und eine Thrombusbildung im System zu vermeiden. Anschließend wurde der Retroinfusionskatheter in die anteriore Herzvene eingelegt. Hierzu wurde zunächst ein 6F Cournand-Katheter (Cordis®, Miami, USA) über die rechte Vena jugularis eingeführt und über den rechten Vorhof in der Vena coris magna platziert. Nun schob der Untersucher einen 0,018I Führungsdraht (Road Runner Extra Support, Cook, Bjaeverskov, Dänemark) in die anteriore Herzvene, welche parallel zur LAD verläuft, vor. Der Führungskatheter wurde anschließend durch den Retroinfusionskatheter (SSR-Katheter) (7,8F) (MPK 002, PTC Pro-Med Technology Consult GmbH, Mödling, Österreich) ersetzt. Der Operateur platzierte den Ballon, der sich an der Spitze des SSR-Katheters befand, in Höhe des Reduktionsstents. Die Lumina des SSR-Katheter wurden verbunden mit (1) dem Ballon, der druckreguliert inflatiert werden kann, (2) mit dem Hochdruckreservoir zur Retroinfusion von arteriellem Blut und (3) mit einem Druckabnehmer zur Überwachung des AIV-Druckes. Bis zum Behandlungsbeginn wurde das System kontinuierlich bei geringem Fluss mit arteriellem Blut gespült. Vor der Intervention wurde die AIV bei erhaltener antegrader Perfusion durch eine Ballon-Okklusion verschlossen und der systolische Venenverschlussdruck (VVD) bestimmt. Der optimale Retroinfusionsdruck in der anterioren Herzvene liegt 20 mmHg über dem VVD¹⁸ und wurde für diese Untersuchungen so gewählt, um eine Über- oder Unterperfusion und damit Druckschäden am venösen System zu vermeiden.

Am Beginn der Intervention wurde der Ballon an der Spitze des Retroinfusionskatheters mit einem Druck von 150 mmHG inflatiert. Die Intervention an der Retroinfusionsmaschine wurde unverzüglich gestartet. In der Gruppe B, die retrograd mit FGF-2 behandelt werden sollte, wurde dem Retroinfusat am zuführenden Schenkel des SSR-Systems Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) (insgesamt 150 µg mit 500IE Heparin [Ratiopharm, Ulm, BRD] versetzt) über einen Perfusor kontinuierlich zugegeben. Bei den Kontrolltieren (Gruppe A) wurde dem Retroinfusat lediglich Trägerlösung (NaCl-Lösung 0,9%) zugesetzt. Bei diesen

Versuchen wurde ein Reservoirdruck von ca. 1500mbar und ein Zieldruck in der AIV von 70 ± 12 mmHG gewählt (s.o.). Die EKG-Triggerung wurde auf 1:1 eingestellt, mit einer Latenzzeit von ca. 5ms zur R-Zacke, so dass in jeder Diastole ein Pumpstoß erfolgte. Um eine optimale Kontaktzeit des FGF-2 mit dem Gewebe zu gewährleisten wurde die Dauer der Retroinfusion auf 30 min festgelegt.

In der Gruppe C wurde der vaskuläre Wachstumsfaktor FGF-2 intrakoronar über einen over-the-wire PTCA-Ballon appliziert. Hierzu führte der Untersucher einen 3,0mm dicken und 9mm langen PTCA-Ballon (NC Ranger[®], Boston Scientific Corporation, Natick, USA) über einen 0,014I Führungsdraht in die LAD ein und platzierte den Ballon unmittelbar vor dem Reduktionsstent. Das FGF-2 (insgesamt 150µg mit 500 IE Heparin [Ratiopharm, Ulm, BRD] versetzt) wurde mit einem Perfusor, der mit dem Lumen des Ballon verbunden war, über 30 min kontinuierlich in die LAD verabreicht.

Am Versuchsende wurden die Katheterschleusen entfernt, die A. carotis communis und die Vena jugularis externa vernäht und die Wunde schichtweise verschlossen. Anschließend wurde die Narkose ausgeleitet und das Tier bei stabiler Eigenatmung extubiert und unter Kontrolle der Vitalparameter in den Tierstall gebracht.

2.3.2.3. Myokardiale Gewebebindung von FGF-2

In sechs zusätzlichen Experimenten wurde die Gewebebindung ¹²⁵Jod-markierten FGF-2 nach Retroinfusion in die Koronarvene (n=3) und nach antegrader Applikation in die Koronararterie (n=3) untersucht. Nach Applikation des radioaktiv markierten FGF-2 und Bestimmung der Radioaktivität in Proben aus dem Myokard konnte die Effektivität der beiden Anwendungsformen verglichen werden; die Radioaktivität aus Biopsien verschiedener weiterer Organe ergab Hinweise auf die Selektivität des Verfahrens. Fibroblast-Growth-Factor-2 wurde unter Zugabe von Chloramin nach der T-Katalyse-Methode ¹⁶¹ mit ¹²⁵Jod radioaktiv markiert. Das radioaktiv markierte FGF-2 wurde uns von Dr. A. Kranz aus der

Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Johannes Waltenberger der Inneren Medizin II des Universitätsklinikums Ulm freundlicherweise überlassen. Die spezifische Radioaktivität des jodierten FGF-2 betrug $11\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$. In sechs Tieren mit einer vergleichbaren Stenosierung der LAD wurden $30\mu\text{g}$ ^{125}Jod -markierten FGF-2 zusammen mit $120\mu\text{g}$ „kalten“ FGF-2 über 30min bei drei Tieren retrograd infundiert und bei drei Tieren antegrad über einen intracoronaren Katheter verabreicht. Die selektive Retroinfusion erfolgte über einen Zeitraum von 30min nach dem gleichen Prinzip wie oben beschrieben. Zur intrakoronaren Applikation führte der Untersucher einen 3,0mm dicken und 9mm langen PTCA-Ballon (NC Ranger[®], Boston Scientific Corporation, Natick, USA) über einen 0,018l Führungsdraht in die LAD ein und platzierte den Ballon vor dem Reduktionsstent. Das FGF-2 wurde mit einem Perfusor, der mit dem Lumen des Ballon verbunden war, kontinuierlich in die LAD verabreicht. 45min nach der Anwendung des radioaktiv markierten FGF-2 wurden die Tiere getötet und Proben zur Bestimmung der Radioaktivität gewonnen. Nach Explantation des Herzens wurden aus dem Versorgungsgebiet der LAD 3 Myokardproben (je 0,5 (=area at risk), 1,5 (Ischämie) und 2,5cm (Ischämie) distal der Stenose) und 2 Proben aus dem RCX-Bereich (Kontrollareal) entnommen. Die systemische Verteilung des ^{125}Jod markierten FGF-2 wurde durch Biopsien verschiedener extrakardialer Organe erfasst. Die Proben wurden gewogen und die Radioaktivität mit einem Multi-Kristall Gammazähler (LB 2111, Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, BRD) gemessen.

2.3.3. Versuchstag 28: Messprotokoll am Tag 21 nach selektiver druckregulierter Retroinfusion und intrakoronarer Applikation von FGF-2

Nach Einleitung der Narkose (s.o.) wurden je eine Schleuse in die rechte A. carotis (11F, Cordis[®], Reading, Miami, USA), die rechte V. Jugularis externa (8,5F, Arrows[®], Reading, USA) und die rechte A. femoralis (8,5F, Arrows[®], Reading, USA) eingelegt. Eine

Koronarangiographie (in-vivo) und die Messungen der Hämodynamik und globalen Myokardfunktion erfolgten wie oben beschrieben (siehe Abbildung 5).

Anschließend erfolgte die mediane Längssternotomie. Hierzu wurde ein Hautschnitt in der Medianlinie von der Incisura jugularis bis ca. 2cm unterhalb des Processus xiphoideus angesetzt. Das subkutane Fettgewebe wurde stumpf abpräpariert und die Brustmuskulatur mit dem Elektrokauter median durchtrennt. Nach stumpfen Ablösen der Striae pericardii vom Sternum erfolgte die Spaltung des Brustbeins mit einer scharfen, stabilen Schere. Der Thoraxspreizer wurde eingesetzt und die Markräume des Sternums mit Knochenwachs verschlossen. Nach Eröffnung des Herzbeutels zur Freilegung des Herzens wurde ein Zentraler-Venen-Katheter ins linke Herzohr eingeführt; dieser Katheter diente der Injektion der fluoreszierenden Mikrosphären in den linken Vorhof zur Messung des regionalen myokardialen Blutfluss. Anschließend wurden die Sonomikrometrie-Kristalle zur Messung der regionalen kontraktile Myokardfunktion eingesetzt. Hierzu wurden drei Sonomikrometrie-Kristallpaare nach einer Stichinzision im Myokard stumpf bis in ihre Position subendokardial vorgeschoben.

Es wurden 2 Kristallpaare im ischämischen LAD-Bereich (1cm und 3cm distal der Stenose senkrecht zur langen Herzachse) und ein Paar als Kontrolle im RCX-Bereich (nicht-ischämisch) platziert. Die regionale Myokardfunktion und der regionale myokardiale Blutfluss wurden gemessen. Anschließend wurde ein Schrittmacher (External Pulse Generator 146 F, Siemens-Elma AG, Solna, Schweden) in den rechten Vorhof eingelegt und das Herz zur Bestimmung der funktionellen Reserve mit einer Frequenz von 120 und 140 Herzaktionen pro Minute stimuliert. Nach 2-minütiger Stimulation wurden die Parameter der globalen und regionalen Myokardfunktion gemessen. Nach 2 min Stimulation mit einer Herzfrequenz von 110/min wurde der regionale Blutfluss bestimmt. Abschließend wurde das Herz entnommen und nach Einbringen eines 8F Führungskatheters in die linke Koronararterie eine post mortem Angiographie angefertigt.

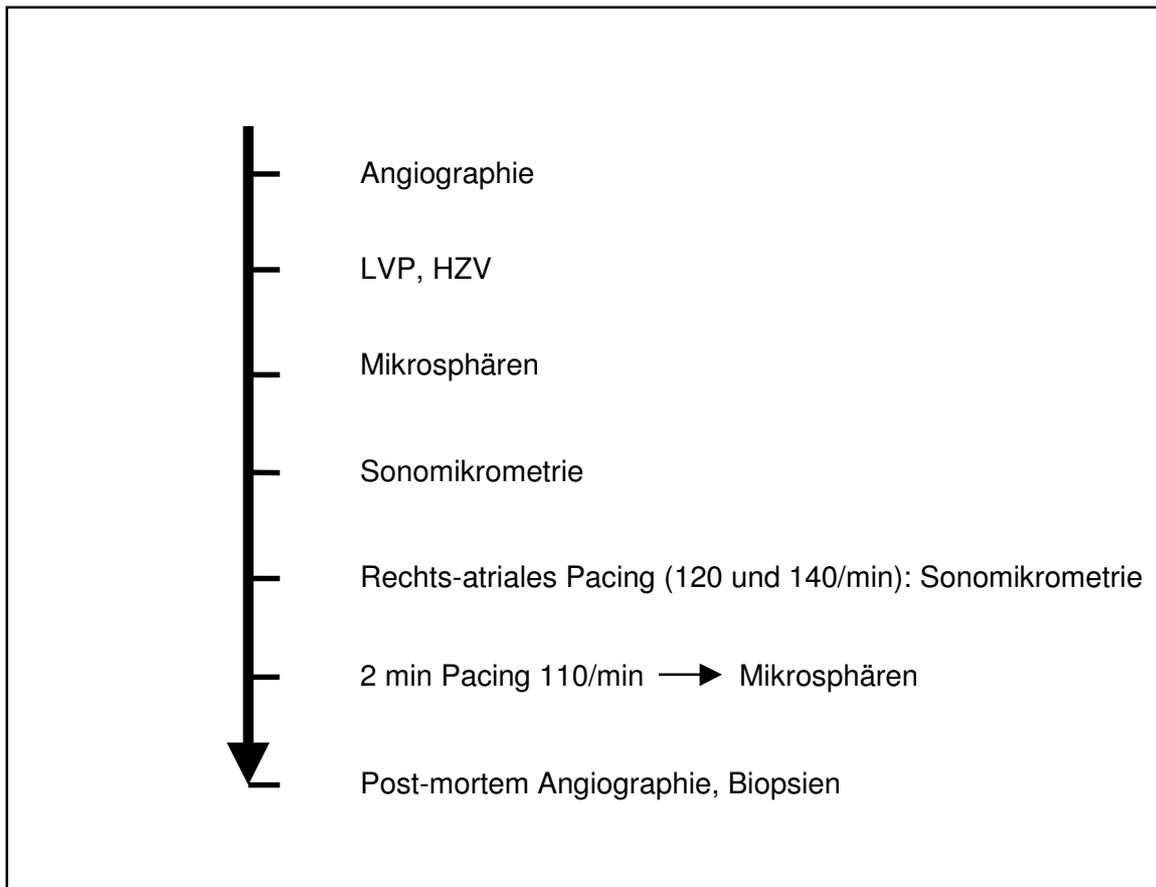


Abbildung 5: Messprotokoll am Tag 28 bei allen Gruppen. LVP = linksventrikulärer Druck, HZV = Herzzeitvolumen.

2.3.3.1. Regionaler myokardialer Blutfluss: Mikrosphären

Die Messung der regionalen Durchblutung im ischämischen Myokard erfolgte mit Hilfe der Applikation fluoreszierender Mikrosphären⁸³. Das Prinzip der Methode besteht in der Injektion von fluoreszierenden Polystyren-Sphären (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) mit einem Durchmesser von $15 \pm 0,1\mu\text{m}$ in den linken Ventrikel⁵³. Die Mikrosphären verteilen sich homogen im Blut, werden mit der Systole in die arterielle Strombahn ausgeworfen und proportional zum Blutfluss den das perfundierte Myokardareal erreicht in den Kapillaren (Durchmesser $6-8\mu\text{m}$) fixiert. Nach Quantifizierung der Mikrosphären-Menge des Gewebestücks anhand des Tracers und Vergleich mit der Tracer-Aktivität in der Referenzprobe lässt sich der regionale Blutfluss berechnen¹¹⁷.

Zur Vorbereitung wurde für die Injektion der fluoreszierenden Mikrosphären ein 4F Pigtail-Katheter (PIG, Infiniti™, Cordis®, Miami, USA) im linken Vorhof platziert^{83;130}; Im weiteren wurde über die in der A. femoralis liegende Schleuse ein 6F Pigtail-Katheter in die Aorta abdominalis knapp unterhalb des Zwerchfells eingelegt; dieser Pigtail-Katheter diente dem Abzug der Referenzprobe. Die Referenzproben wurden über eine Spritzenpumpe (Harvard Apparatus, South Natick, USA) bei einer konstanten Abzugsrate von 3,24 ml/min gewonnen. Bei jeder Messung wurden 10×10^6 fluoreszierende Mikrosphären in den linken Vorhof injiziert. Die Mikrosphären wurden über den Zeitraum von einer Minute gleichmäßig appliziert; der Abzug der Referenzprobe erfolgte während der Injektion der Mikrosphären bis 2 min nach Injektion¹⁶².

Die Bestimmung des regionalen Blutflusses erfolgte am Versuchsende 28 Tage nach Implantation des Reduktionsstent. Es wurden bei jedem Tier zwei Messungen mit jeweils unterschiedlich fluoreszierenden Mikrosphären vorgenommen. Eine Messung wurde unter Ruhebedingungen ausgeführt; eine zweite Messung folgte nach 2 min rechts-atrialem Pacing, wobei eine Stimulationsfrequenz von 110 Herzaktionen pro Minute gewählt wurde.

Am Versuchende (Versuchstag 28) wurden nach Entnahme des Herzens aus dem gesamten Bereich des linken Ventrikels Myokardproben gewonnen, in subepikardiale, midmyokardiale und subendokardiale Myokardabschnitte aufgeteilt und in Formalin für 1 Woche fixiert. Die Myokardproben wurden auf einer Federwaage (Mettler AE50, Mettler Waagen GmbH, Giessen, Schweiz) gewogen. Die Aufbereitung der Proben und die Bestimmung der Fluoreszenzaktivität der Proben erfolgte nach dem von Thein et al. beschriebenen Verfahren (Automatic Single Tube Filtration)^{119;151}. Die einzelnen Myokardproben (Gewicht ca. 1g) und die Referenzblutprobe wurden zermörsert, in 2N äthanolischer KOH im Wasserbad autolysiert^{118;119;151} und nach schrittweiser Dichtegradientenzentrifugation durch Filterung isoliert. Anschließend wurde die Fluoreszenzaktivität des Filtrats im Lumineszenz-Spektrometer (LS50B, Perkin Elmer., Überlingen, Germany) quantitativ gemessen^{53;118;119;151}. Mit Hilfe der so bestimmten Fluoreszenzaktivitäten der einzelnen Myokardproben

und des Referenzblutes wurde der regionale Blutfluss nach der folgenden Formel berechnet

59;68;119;151;152;162.

Formel 1:

$$\frac{\text{Regionaler Blutfluß Probe}}{\text{Fluoreszenzaktivität Probe}} = \frac{\text{Entnahmerate Referenzblut}}{\text{Fluoreszenzaktivität Referenzprobe}}$$

Eine Normierung der so bestimmten regionalen Blutflüsse wurde durch die Division der errechneten Flüsse durch das Gewicht der jeweiligen Myokardprobe erreicht. Zur Besserung Quantifizierung der Flussverhältnisse in der jeweiligen Probe, insbesondere in den endokardnahen Myokardarealen wurde zusätzlich die Verhältnis des Blutflusses in der endokardnahen zur epikardnahen Myokardschicht (Endo/Epi - Ratio) berechnet ⁵⁹. Beidseitige Proben der Nierenrinde wurden analysiert um eine korrekte Mischung und Applikation der Mikrosphären zu gewährleisten ⁹⁴.

2.3.3.2. Regionale Myokardfunktion: Sonomikrometrie

^{10;146}Die regionale Myokardfunktion gilt als sensibler Parameter für die Beeinträchtigung der myokardialen Perfusion ⁷⁹. In dieser Untersuchung wurde die regionale Myokardfunktion mit Hilfe der Ultraschall-Laufzeit-Messmethode, modifiziert nach Bugge-Asperheim ²⁸, gemessen. Im Prinzip besteht die Messmethode aus zwei piezoelektrischen Ultraschallkristallen (Durchmesser ca. 2 mm): einer der Kristalle sendet ein Ultraschallsignal mit einer Frequenz von 5MHz, der zweite Kristall empfängt das Signal zeitverzögert und gibt es an ein Ultraschallentfernungsmessgerät (Sonomicrometer, Triton Technology Inc., San Diego, USA) weiter ⁵⁷ (siehe Abbildung 6)²⁸. Ein Computer (Pentium 200MHz, HSE, March-

Hugstetten, BRD) bestimmt aus der Laufzeit des Ultraschallsignals (0,013-0,02ms) den Abstand der beiden Kristalle nach folgender Formel:

Formel 2:

$$s = v \cdot t$$

*S = Abstand der beiden Kristalle, v = Schallausbreitungsgeschwindigkeit im Myokardgewebe
t = Laufzeit des Ultraschallsignals*

Die Schallausbreitungsgeschwindigkeit im Myokardgewebe wird annäherungsweise der von Blut gleichgesetzt (1500-1560m/s). Aufgrund der Änderung der Laufzeit des Ultraschallsignals proportional zum Abstand der beiden Kristalle und durch die hohe Geschwindigkeit des Ultraschallsignals ist es möglich die Lage der Kristalle mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung, auch bei einer hohen Herzfrequenz, zu erfassen^{28;57}.

Die Messdaten der Sonomikrometrie wurden während des Versuchs zusammen mit dem linksventrikulären Druck (Leycom Sigma-5DF, Cardiodynamics, Zoetermeer, Niederlande) und der Ableitung eines Elektrokardiogramms kontinuierlich angezeigt und für die spätere Auswertung registriert (Rechner Pentium II 200MHz, HSE, March-Hugstetten, BRD). Als Parameter für die regionale Myokardfunktion wurde die Segmentverkürzung in Prozent der enddiastolischen Länge anhand der folgenden Formel nach Harada et al.⁵⁹ berechnet:

Formel 3:

$$SS[\%] = (EDL - ESL) \cdot 100 / EDL$$

*SS = Segmentverkürzung, EDL = Enddiastolische Länge,
ESL = Endsystolische Länge*

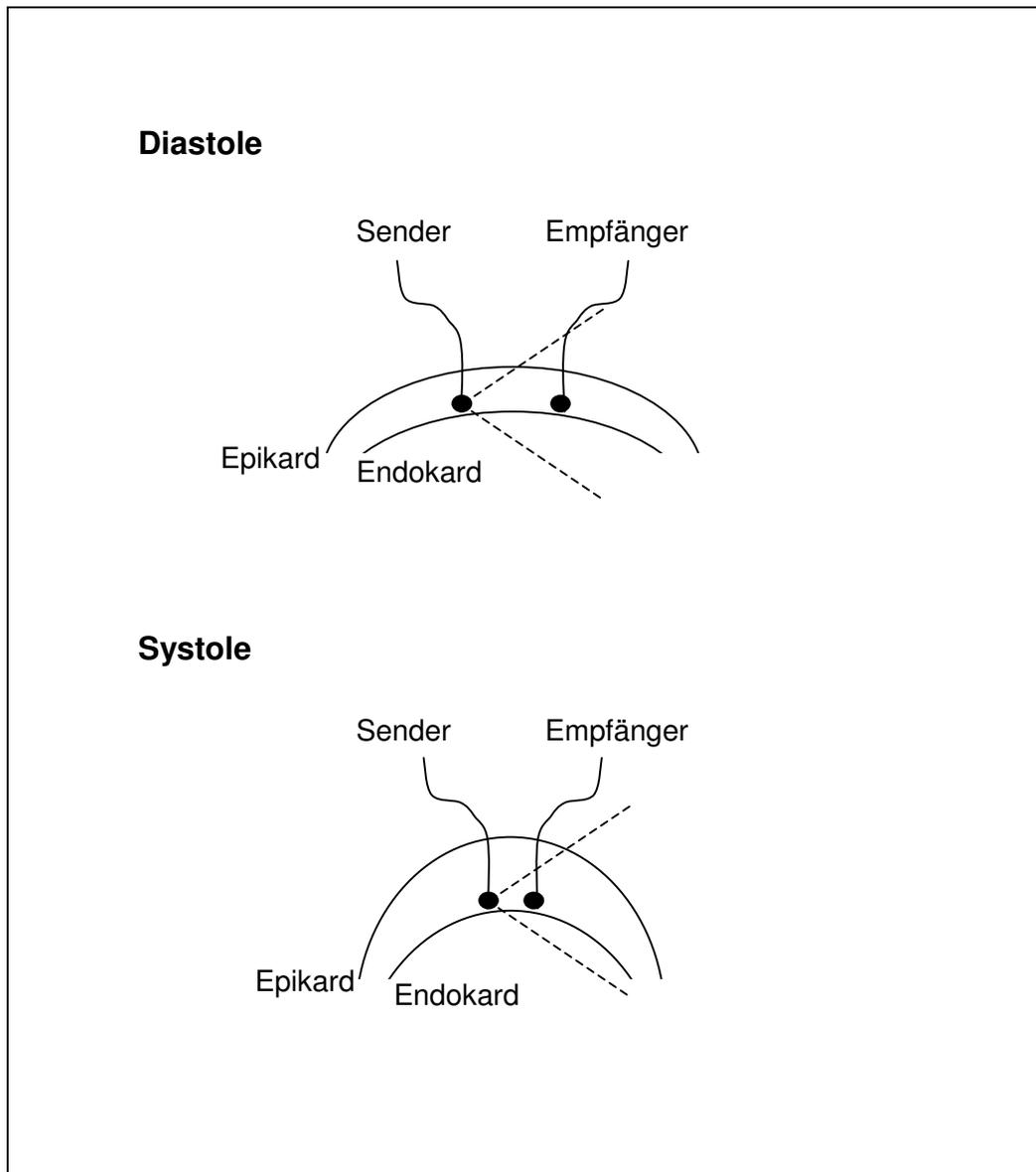


Abbildung 6: Schematische Darstellung der piezoelektrischen Kristalle im Myokard.

Die Festlegung der Messzeitpunkte, mit dem Beginn der Systole und der Diastole nach der Druckanstiegsgeschwindigkeit im linken Ventrikel, geht auf die Erkenntnisse von Heimisch et al. zurück und gilt in der Literatur als allgemein anerkannter Referenzwert^{19;20;59;84}. Der Beginn der Systole (=EDL) wurde definiert als der Moment an dem die Druckanstiegsgeschwindigkeit des linksventrikulären Druckes ($dLVP/dt$) gerade noch null war, die endsystolische Länge (ESL) wurde zu dem Zeitpunkt des maximalen Abfall des linksventrikulären Druckes ($dLVP/dt$ min) gemessen⁵⁹. Zu dem entsprechenden

Messzeitpunkt wurden jeweils fünf Werte bestimmt, die Mittelwerte wurden in Formel 3 eingesetzt.

Die regionale Myokardfunktion wurde mit der Sonomikrometrie am Versuchsende 28 Tage nach Implantation des Reduktionsstent gemessen. Nach erfolgter Thorakotomie und Eröffnung des Herzbeutels wurde das Myokard oberflächlich mit einem Skalpell (Nr. 11, Feather, Japan) inzidiert und der piezoelektrische Kristall stumpf bis an den elastisch, federnder Widerstand des Endokard vorgeschoben. Zwei Kristallpaare wurden im ischämischen Myokardareal (LAD proximal und LAD distal) und ein weiteres Kristallpaar als Referenzwert im nichtischämischen Bereich (RCX) platziert. Die Kristalle wurden. Die Kristallpaare wurden, entsprechend den Erkenntnissen und Erfahrungen von Harada et al.⁵⁹ und Boekstegers^{19;20;24;84;159} et al. im Abstand von 1,5-2cm senkrecht zur langen Herzachse eingesetzt⁴⁴ und parallel zu den Myokardfasern, also entlang der Achse der maximalen Kontraktion, implantiert. Nach Platzierung der Kristalle ist der Messfehler bei einer Abweichung von der optimalen Messachse von bis zu 30° vernachlässigbar gering⁴⁴. Die regelrechte Lage der Kristalle wurde am Versuchende nach Entnahme des Herzens überprüft. Die regionale kontraktile Myokardfunktion wurde unter Ruhebedingungen und unter Bedingungen mit gesteigertem Sauerstoffbedarf (rechts-atriales Pacing mit 120 und 140 Herzaktionen pro Minute) gemessen.

2.3.3.3. Globale Myokardfunktion: Der Linksventrikuläre Druck und das Herzzeitvolumen

Als Parameter der globalen Myokardfunktion wurden in der vorliegenden Arbeit der Aortendruck (AP), der linksventrikuläre Druck (LVP), die Anstiegsgeschwindigkeit des linksventrikulären Drucks (dLVP/dt) und das Herzzeitvolumen bestimmt.

Der Aortendruck wurde kontinuierlich über die in der A. carotis liegenden 9F Schleuse (Cordis®, Reading, Miami, USA) über einen Druckabnehmer (Stetham Transducer, Hellige-

Monitor, Freiburg, BRD) gemessen und mit dem Computer (Pentium 200MHz, HSE, March-Hugstetten, BRD) registriert. Zur Bestimmung des linksventrikulären Druckes wurde ein Katheterspitzenmanometer (SPG-572, Millar, Houston, USA) im Apexbereich des linken Ventrikels platziert; die Daten wurden kontinuierlich gespeichert und am Computer analysiert (Leycom Sigma-5DF, Cardiodynamics, Zoetermeer, Niederlande). Der Computer errechnete aus den aufgezeichneten Daten die Anstiegsgeschwindigkeit des linksventrikulären Druckes (dLVP/dt)^{19;20}.

Der Herzzeitvolumen wurde nach dem Prinzip der Thermodilutionsmethode ermittelt^{31;32;36;122}. Ein Thermodilutionskatheter (Edwards AT-2, Baxter, Unterschleißheim, BRD) wurde über die venöse Schleuse und das rechte Herz in die pulmonalarterielle Strombahn eingeschwenkt³⁶. Die korrekte Lage wurde über die Ableitung der typischen Druckkurve während der Platzierung bestätigt und die Messung durch die rasche Injektion (<4s) von 10ml 5°C 0,9% NaCl-Lösung (Braun, Deutschland) in das proximale Lumen des Katheters gestartet³¹. Aufgrund der Abhängigkeit des Herzzeitvolumens vom Atemzyklus wurde die Messung stets endexpiratorisch gestartet^{31;32;36}.

Die Parameter der globalen Myokardfunktion wurden vor und nach FGF-2-Applikation (Tag 7 nach Implantation des Reduktionsstents) und am Versuchsende (Tag 28) intermittierend bestimmt und für die spätere Auswertung am Host-Rechner (Pentium 200MHz, HSE, March-Hugstetten, BRD) gespeichert.

2.3.3.4. Koronarangiographie/Kollateralen

Die Darstellung der Koronargefäße mittels Koronarangiographie in dieser Untersuchung ermöglichte die Bestimmung des mit dem Reduktionsstent erreichten Stenosegrades und erlaubte eine in vivo Beurteilung der Koronararterien und der Kollateralgefäße⁴⁹.

In dieser Studie erfolgte die Darstellung der Koronarien mittels Durchleuchtung (Exposcop 8000, Ziem, BRD und Coroskop HIP, Siemens, München, BRD) und der Injektion nicht-ionischer, jodhaltiger Kontrastmittel (Solutrast, Byk-Gulden, BRD). Nachdem der Untersucher einen 8F Judkins Führungskatheter (Cordis[®], Miami, USA) über die in der A. carotis liegende Schleuse im Ostium des linken Hauptstamms platziert hatte, erfolgte die Injektion von 10 ml des jodhaltigen Kontrastmittels und die Abbildung mittels Durchleuchtung. Alle Koronarangiographien wurden zur Dokumentation auf Video aufgezeichnet und von den relevanten Darstellungen wurde ein Ausdruck (Printer, Sony, Japan) angefertigt.

Am 1. Versuchstag wurde vor und nach der erfolgreichen Implantation des Reduktionsstent eine Koronarangiographie (Exposcop 8000, Ziem, BRD) durchgeführt. Hieraus ergab sich die Möglichkeit den mit dem Reduktionsstent erreichten Stenosegrad angiographisch zu ermitteln. Zur weiteren Kontrolle des Reduktionsstents dienten Koronarangiographien am 2. und 3. Versuchstag.

Um das Kollateralwachstum angiographisch dokumentieren und abschätzen zu können wurde nach Explantation des Herzens eine ex vivo Angiographie angefertigt (Croskop HIP, Siemens, München, BRD). Nach Entnahme und Spülung des Herzens mit NaCl-Lösung und 0,2mg Glycerol-Trinitrat wurde ein 8F Führungskatheter (Judkins rechts 3,5, Cordis[®], Miami, USA) in den Hauptstamm der linken Koronararterie eingeführt und fixiert. Anschließend wurde unter Durchleuchtung (rechte anteriore oblique Projektion) langsam 10ml jodhaltiges Kontrastmittel (Solutrast, Byk-Gulden, BRD) unter einem konstanten Druck von 100mmHg in die linke Koronararterie injiziert, bis sich die distale LAD mit all ihren Verzweigungen darstellte. Von besonderem Interesse war die absolute Anzahl der Kollateralgefäße⁴⁹. Als Kollaterale wurde in dieser Untersuchung ein Blutgefäß definiert, das ein koronararterielles Gefäß (Ramus circumflexus, proximale LAD, 1. Diagonalast) mit einem Gefäßabschnitt der LAD distal der Stenose verbindet und zur Durchblutung der distalen LAD beiträgt^{49;106}. Die Auswertung erfolgte geblindet für das Behandlungsprotokoll durch 2 unabhängige Untersucher.

2.3.3.5. Bestimmung der Kapillardichte

Zur Bestimmung der Anzahl der Kapillaren sowie des Verhältnisses zwischen Kapillaren und Muskelfasern wurden histologische Untersuchungen durchgeführt. Hierzu wurden nach Versuchsende aus der LAD-Region (Ischämie) und einem Kontrollareal (RCX-Gebiet) transversale Gewebeschnitte entnommen, in O.C.T.-Compound eingebettet (Miles Inc., Elkhart, USA) und in flüssigem Stickstoff (N₂) tiefgefroren. Mit einem Kryostat (Leica CM3050, Leica, Bensheim, BRD) wurden anschließend 5 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt, wobei darauf geachtet wurde die Muskelfasern senkrecht anzuschneiden¹⁴. Die Schnitte wurden auf einem Objektträger platziert und mit der Indoxyl-Tetrazolium-Methode gefärbt, die eine Detektion der kapillären Endothelzellen erlaubt⁸. Nach Gegenfärbung mit Eosin wurden die Kapillaren unter 20-facher Vergrößerung ausgezählt (insgesamt 20 Felder) (Zeiss, Oberkochen, BRD. Um Fehlerquellen durch eventuelle Muskelatrophie oder Ödeme auszuschließen wurde außerdem das Verhältnis Kapillaren/Muskelfasern in jedem histologischen Schnitt bestimmt.

2.3.3.6. Bestimmung der Infarktgröße

Die Infarktgröße wurde am Versuchsende 28 Tage nach Implantation des Reduktionsstent bestimmt. Hierzu wurde das Herz entnommen und 15 ml Tetrazolium-Rot (10 %) unter konstantem Druck (80-100mmHg) in den Hauptstamm der linken Koronararterie injiziert^{17;84}. Der linke Ventrikel wurde anschließend vom Apex ausgehend parallel zur kurzen Herzachse in 0,5 mm dicke Scheiben geteilt und die Scheiben nacheinander digital fotografiert. Das vitale, rot gefärbte Myokard war von den avitalen, fibrotischen Myokardschwelen deutlich abzugrenzen^{17;84}. Zur Bestimmung der Infarktgröße wurden die gefärbten (vitales Myokard) und die ungefärbten Myokardareale (Infarkttnarbe)

computergestützt planimetrisch vermessen (Sigma Scan Pro, USA). Die Infarktgröße wurde bezogen auf das linksventrikuläre myokardiale Volumen angegeben^{17;84}.

2.4. Statistische Datenanalyse

Die Daten wurden mit Microsoft Excel 2000 (Microsoft Corporation, Seattle, USA) und SPSS (SPSS 11.0.1., SPSS Inc., Chicago, USA) analysiert. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SEM) dargestellt. Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen A, B und C wurden mit dem Anova-Test untersucht. Im Falle eines statistisch signifikanten Unterschiedes nach dem Anova-Test, wurde ein Gruppenvergleich nach dem Mann-Whitney-Test durchgeführt. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

52 Tiere (deutsches Landschwein) wurden in der vorliegenden Studie eingesetzt. Mit insgesamt 7 Tieren wurde der Reduktionsstent als Modell chronischer Myokardischämie etabliert. An weiteren 6 Tieren wurde die myokardiale Gewebebindung radioaktiv markierten FGF-2 nach introkoronarer Gabe und nach Retroinfusion in die Koronarvene untersucht. 21 Tiere wurden eingesetzt um die therapeutische Angiogenese 28 Tage nach drei unterschiedlichen Behandlungsprotokollen (Gruppen A, B und C) zu untersuchen. Von den verbleibenden 18 Tieren starben 11 Tiere vor Erreichen von Tag 7 der vorliegenden Untersuchung und 5 Tiere wurden ausgeschlossen, da der Reduktionsstent am Tag 7 komplett verschlossen war. Zwei Tiere (ein Tier der Gruppe A und ein Tier der Gruppe C) starben vor Erreichen des Versuchstages 28 und wurden ebenfalls von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Am Versuchstag 7 und 28 Tage nach Implantation des Reduktionsstent bestanden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren der drei Behandlungsgruppen (Gruppen A, B und C) hinsichtlich des Körpergewichtes und der Infarktgröße. Wie ebenfalls aus Tabelle 1 ersichtlich ist waren alle hämodynamischen Basisdaten am Tag 7 vergleichbar (Herzfrequenz [HF], systolischer linksventrikulärer Druck [LVP_{sys}], Herzzeitvolumen [HZV], maximale und minimale Druckerhöhungsgeschwindigkeit des linken Ventrikels [dLVP/dt max und dLVP/dt min]). (siehe Tabelle 1)

Die im folgenden dargestellten Messergebnisse sind entweder als Absolutwerte (z.B. mmHg) oder normalisiert auf den Ausgangswert (% Ausgangswert) angegeben. Zur Vollständigkeit und besseren Übersicht sind alle Versuchsergebnisse als Absolutwerte jeweils in Tabellen zusammengefasst.

	Gruppe A (Kontrollen, n=7)		Gruppe B (FGF-2 retrograd, n=7)		Gruppe C (FGF-2 antegrad, n=7)	
	Tag 7	Tag 28	Tag 7	Tag 28	Tag 7	Tag 28
Körpergewicht [kg]	23 ± 2,1	38,8 ± 3,6	22,1 ± 2,7	40,6 ± 4,4	22,8 ± 3,3	39,6 ± 2,4
Infarktgröße	-	1,9 ± 0,3	-	1,8 ± 0,3	-	1,9 ± 0,4
Hämodynamik						
HF [/min]	73,3 ± 0,9	79,0 ± 2,8	74,0 ± 10,0	74,0 ± 3,5	74,8 ± 1,8	76,3 ± 3,1
LVPsys [mmHg]	74,0 ± 2,5	80,8 ± 9,2	77,0 ± 15,4	78,0 ± 2,8	77,2 ± 4,5	79,1 ± 3,3
LVEDP [mmHg]	10,7 ± 3,8	16,1 ± 3,8 *	9,5 ± 5,2	9,8 ± 3,1 #	10,2 ± 3,2	13,3 ± 0,5
HMV [l/min]	2,6 ± 0,5	3,4 ± 0,4	2,4 ± 0,4	3,3 ± 0,2	2,5 ± 0,3	3,3 ± 0,4
dP/dt max [mmHg/s ²]	886 ± 123	861 ± 81	957 ± 245	1115 ± 371	902 ± 81	921 ± 110
dP/dt min [mmHg/s ²]	-1036 ± 99	-870 ± 306	-1029 ± 111	-963 ± 125	-1010 ± 98	-880 ± 156

Tabelle 1. Körpergewicht, Infarktgröße und Hämodynamik; Kontrollen (Gruppe A), Retroinfusion von FGF-2 (Gruppe B) und antegrade Applikation von FGF-2 (Gruppe C). Messungen wurden am Tag 7 und Tag 28 nach Implantation des Reduktionsstent durchgeführt. Infarktgröße angegeben in % linksventrikuläres myokardiales Volumen, HF: Herzfrequenz, LVPsys: systolischer linksventrikulärer Druck, LVEDP linksventrikulärer enddiastolischer Druck, HZV Herzzeitvolumen, dP/dt max maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit des linken Ventrikels, dP/dt min minimale Druckanstiegsgeschwindigkeit des linken Ventrikels; Mittelwert ± SEM; n=7/Gruppe); # = p<0,05 Gruppe B vs. Gruppe A Tag 28; * = p<0,05 Gruppe B Tag 28 vs. Tag 7.

3.1. Der Reduktionsstent als Modell chronisch experimenteller Myokardischämie

Die Implantation eines Reduktionsstents in die LAD distal des 1. Diagonalastes induzierte angiographisch eine sanduhrförmige Stenose (siehe Abbildung 7). Die Größe des verwendeten PTCA-Ballons bei einem Inflationsdruck von 18atm definierte den Durchmesser des Reduktionsstent nach der Implantation: an den Enden erreichte der Stent einen Durchmesser von 3,55mm und in der Mitte entstand eine Stenose mit einem minimalen Durchmesser von 1,4mm, vorgegeben durch den Durchmesser der Kanüle (16 Gauche) auf der der Stent gebunden wurde (siehe Abschnitt 2.1.1.). Die errechnete Fläche des Reduktionsstent betrug somit 9,9mm² an den Enden des Reduktionsstent und minimal 1,3mm² im Bereich der Stenose. Im Intravaskulären Ultraschall konnte planimetrisch eine minimale Fläche von durchschnittlich 1,4mm² im Bereich der Stenose beobachtet werden (siehe Abbildung 8 A und B). Angiographisch konnte somit unmittelbar nach dem Einsetzen des Reduktionsstent ein Stenosegrad von 72±3% (n=28) in der LAD distal des Diagonalastes erzielt werden. Nach 7 Tagen konnte angiographisch eine Zunahme des Stenosegrades der proximalen LAD auf 91±3% (n=28) verzeichnet werden. Am Tag 28 der Untersuchung konnte angiographisch (in-vivo Angiographie) bei allen Tieren ein kompletter Verschluss der proximalen LAD durch den Reduktionsstent festgestellt werden. Hinsichtlich des erzielten Stenosegrades der proximalen LAD durch den Reduktionsstent konnte zwischen den vier Gruppen der vorliegenden Untersuchung kein signifikanter Unterschied festgestellt werden: Tag 0: 71,7±1,3% (Kontrollgruppe A) vs. 73,0±4,3% (FGF-2 retrograd, Gruppe B) vs. 70,9±3,8% (FGF-2 antegrad, Gruppe C) vs. 72,4±2,8% (Gruppe D), Tag 7: 89,3±3,3% vs. 91,0±2,0% vs. 91,4±4,2% vs. 92,2±3,2%. Die Entwicklung von Kollateralgefäßen nach Implantation des Reduktionsstent (Versuchstag 0) bis zur Behandlung (Tag 7) war in allen vier Gruppen der vorliegenden Untersuchung vergleichbar.

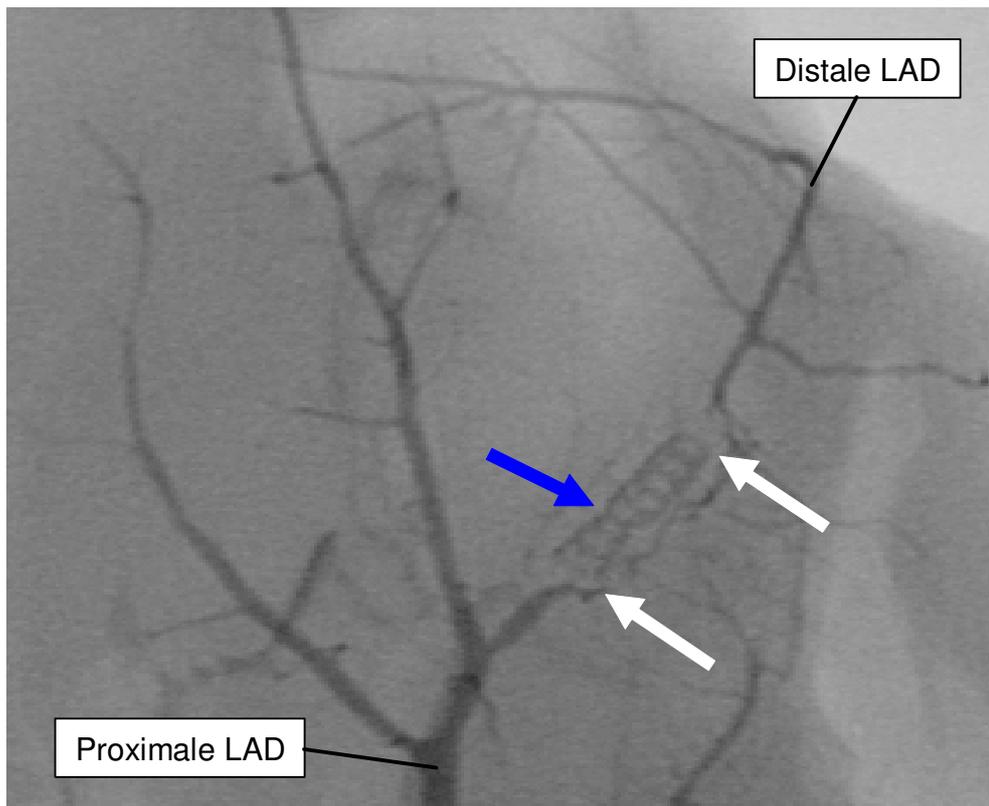


Abbildung 7: Post-mortem Angiographie 28 Tage nach Implantation des Reduktionsstent. Die weissen Pfeile kennzeichnen das proximale und distale Ende des Reduktionsstent. Die sanduhrförmige Verengung in der Mitte des Reduktionsstent ist klar erkennbar (blauer Pfeil). Der Kontrastmittelfluss in der LAD ist unterbrochen, hinweisend auf eine Totalokklusion verursacht durch den Reduktionsstent. Die distale LAD füllt sich über Kollateralarterien.

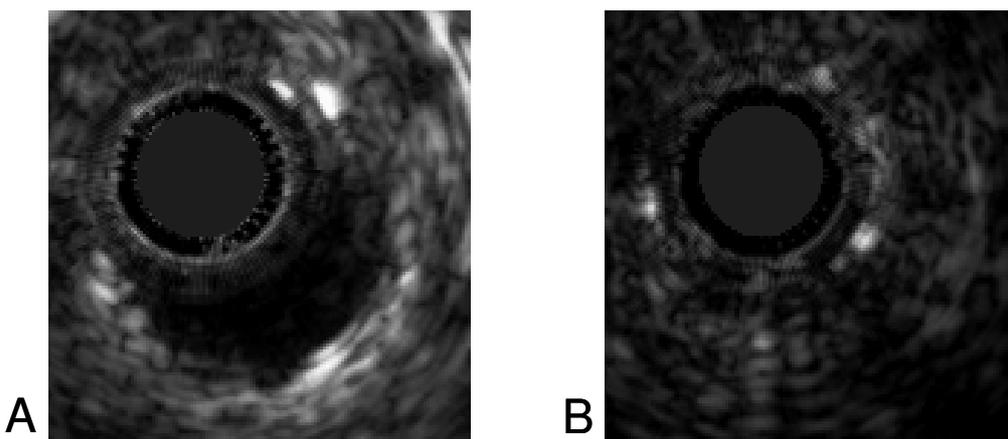


Abbildung 8: Querschnitt einer Koronararterie im intravaskulären Ultraschall nach Implantation eines Reduktions-Stent-Graft. Abbildung 8A: entfaltetes Ende des Reduktionsstent. Abbildung 8B: an der chirurgischen Ligatur in der Mitte des Reduktionsstent entfaltet sich der Reduktionsstent nicht und verursacht eine koronararterielle Stenose

3.1.1. Akuteffekt des Reduktionsstent auf den koronararteriellen Blutfluss

In drei zusätzlichen Experimenten konnte dopplersonographisch (Transsonic Flow Probe) unmittelbar nach Implantation des Reduktionsstent eine Verminderung des Gesamtflusses in der distalen LAD nachgewiesen werden: unter Ausgangsbedingungen zeigte sich eine Abnahme des Ruheblutflusses der LAD (11-37% Flussreduktion, n=3), mit einer deutlichen Verminderung des maximalen, koronararteriellen Blutfluss (25-54% Flussreduktion, n=3) unter reaktiver Hyperämie (60 sec Ballonokklusion).

3.1.2. Einfluss des Reduktionsstent auf den myokardialen Blutfluss

Der regionale myokardiale Blutfluss (fluoreszierende Mikrosphären) wurde am Versuchstag 1 unmittelbar nach Implantation des Reduktionsstent und nach 7 und 28 Tagen myokardialer Ischämie untersucht (Gruppe D, n=7). Die Messungen wurden unter Ruheflussbedingungen und unter Bestimmung des Maximalflusses (Adenosin induzierte Flussreserve) ausgeführt. Am Tag 28 wurde bei drei Tieren der Gruppe D zusätzlich mit einem Positronenemissionstomogramm (PET) der Blutfluss im Myokardgewebe (Ammoniak [NH₃]- Perfusion) und die myokardiale Vitalität (Fluorodesoxyglucose [FDG]-Aufnahme) untersucht.

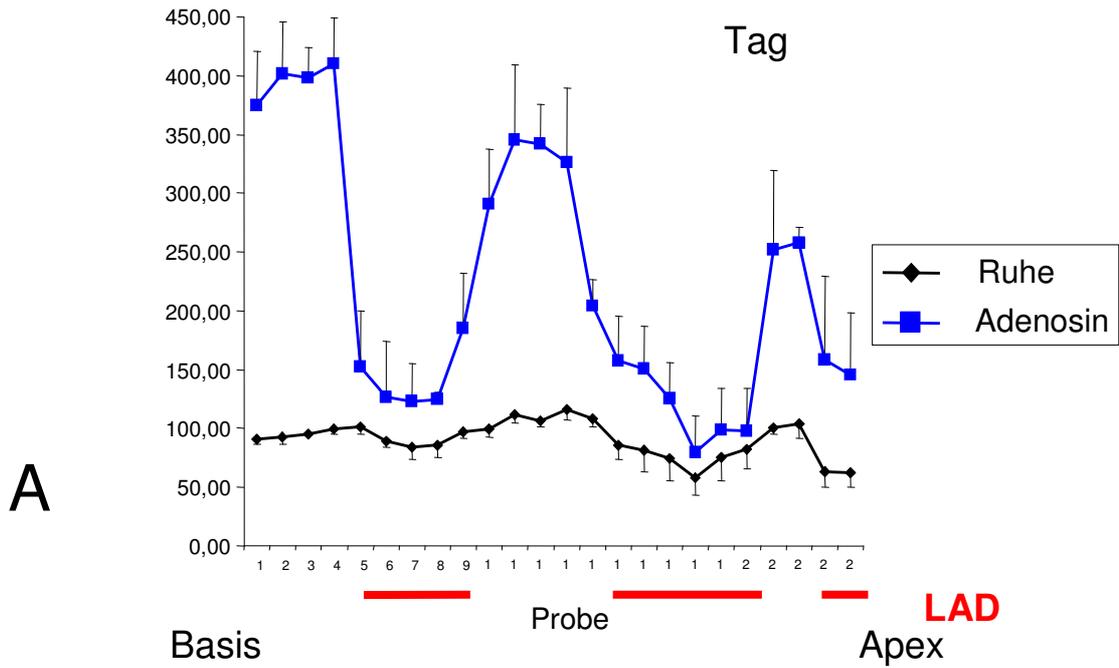
7 Tage nach Implantation des Reduktionsstent fand sich eine deutliche Abnahme (signifikant) des transmuralen Ruheblutfluss (Mikrosphären) im LAD-abhängigen Myokardareal (LAD: $1,1 \pm 0,08 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ vs. CX: $1,6 \pm 0,11 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) und ein deutlicher Rückgang des Adenosin-induzierten Maximalfluss im Vergleich zum nicht-ischämischen RCX-Kontrollareal (LAD: $1,32 \pm 0,1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ vs. CX: $4,6 \pm 0,18 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$; $p < 0,05$, n=7). Am Tag 28 nach Implantation des Reduktionsstent konnte eine signifikante Verminderung des transmuralen Ruheblutfluss (LAD: $0.65 \pm 0.1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ vs. CX: $1.41 \pm 0.15 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$;

p<0,05, n=7) und des Adenosin-induzierten Maximalfluss (transmural) (LAD: $0,72 \pm 0,06$ ml*min⁻¹*g⁻¹ vs. $4,34 \pm 0,23$ ml*min⁻¹*g⁻¹, p<0,05) verzeichnet werden (siehe Abbildung 9).

Betrachtet man die Verteilung des regionalen myokardialen Blutfluss (fluoreszierende Mikrosphären) im Bereich der subepikardialen und der subendokardialen Myokardabschnitte, so konnte sowohl 7 als auch 28 Tage nach Implantation des Reduktionsstent die deutlichste Flussreduktion im Bereich der distalen, endokardnahen Myokardareale erzielt werden (siehe Tabelle 2).

Im Positronenemissionstomogramm (Tag 28, Gruppe D, n=3) zeigte sich im Bereich der LAD distal des Reduktionsstent eine signifikant verminderte myokardiale Durchblutung (Ammoniak (NH₃) – Perfusion) im Vergleich zum nicht-ischämischen Kontrollareal (RCX) ($0,351$ ml/min vs. $0,62$ ml/min, p<0,05) und eine deutlich vermehrte Fluorodesoxyglucose (FDG) – Aufnahme, hinweisend auf minderperfundiertes aber noch vitales Myokard (siehe Abbildung 10).

**Regionaler myokardialer Blutfluss
[in % nicht-ischämisches RCX-Gebiet]**



**Regionaler myokardialer Blutfluss
[in % nicht-ischämisches RCX-Gebiet]**

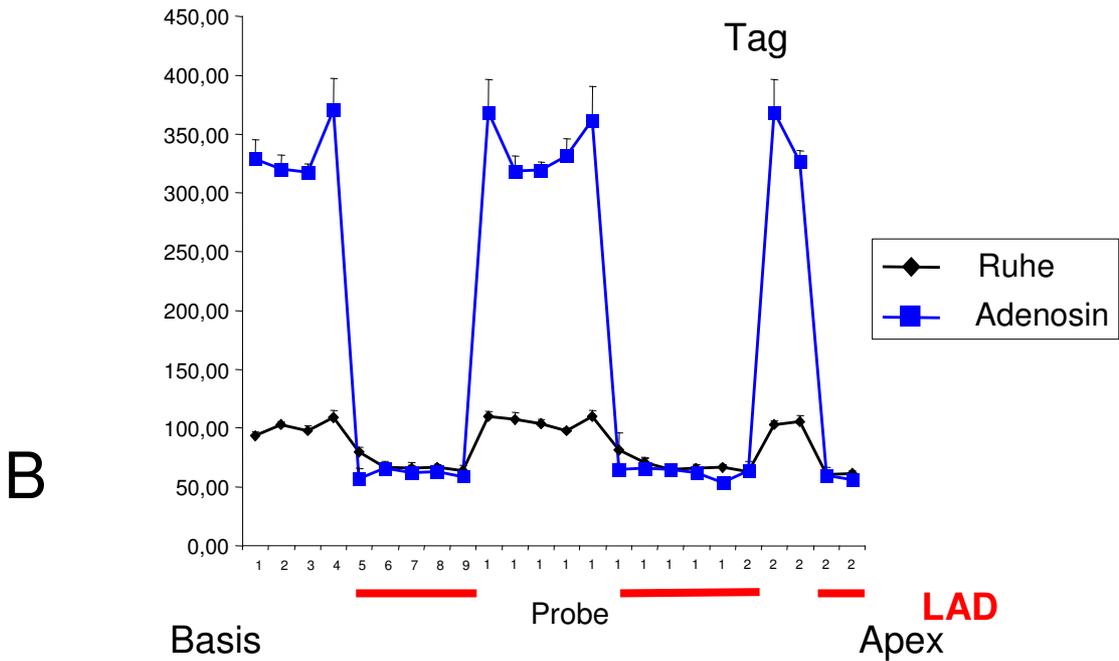


Abbildung 9: Regionaler myokardialer Blutfluss des linken Ventrikels nach Teilung des Herz in Scheiben parallel zur kurzen Herzachse von der Basis zum Apex. Abbildung 9A: 7 Tage nach Implantation des Reduktionsstent. Abbildung 9B: 28 Tage nach Implantation des Reduktionsstent. LAD = LAD-Gebiet das vom Blutfluss durch den Reduktionsstent abhängig ist; Probe = Nummer der transmuralen Probe; Ruhe = regionaler myokardialer Blutfluss unter Ruhebedingungen; Adenosin = regionaler myokardialer Blutfluss nach 3 min Adenosin intrakoronar.

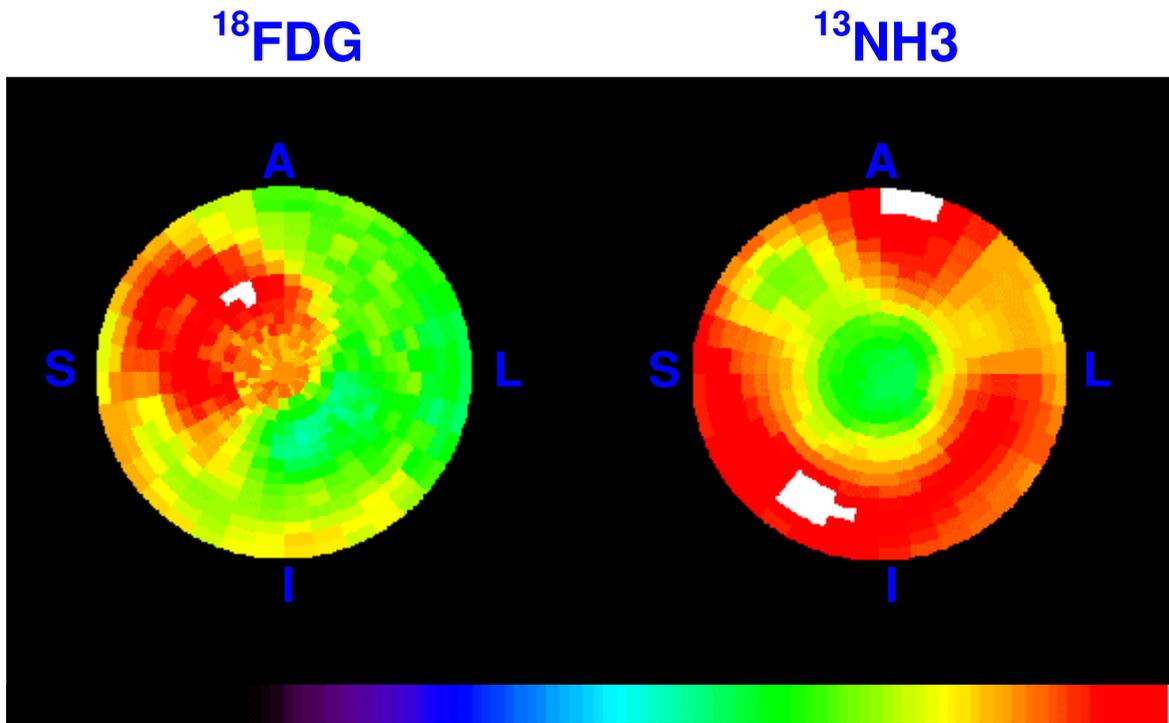


Abbildung 10: Polaransicht der regionalen myokardialen ^{18}F FDG- und ^{13}N H₃-Aufnahme eines Tieres 28 Tage nach Implantation des Reduktionsstent. In dieser Darstellungsart sind die basalen linksventrikulären Wandsegmente in den äußeren Ringen repräsentiert, während apexnahen Anteile im Zentrum der Karte dargestellt sind. A = anteriore Herzwand, L = Laterale Herzwand, I = Inferiore Herzwand, S = Septum; die Bilder sind auf die maximale Pixeldichte normalisiert; Segmente mit helleren Farben repräsentieren höhere myokardiale Aufnahme. Im Gebiet der LAD findet sich ein großer Aufnahmedefekt für NH₃ (ca. 20% des linken Ventrikels); im selben Areal ist die ^{18}F FDG-Aufnahme deutlich erhöht.

3.1.3. Einfluss des Reduktionsstent auf die kontraktile Myokardfunktion

Die regionale kontraktile Myokardfunktion (Sonomikrometrie) wurde am Tag 28 im Bereich des ischämischen LAD-Areals proximal und distal gemessen und mit einem nicht-ischämischen Kontrollareal (RCX) verglichen (Kontrollgruppe A, n=7). Die Messungen wurden unter Ruhebedingungen und Bestimmung der funktionellen Reserve (rechts-atriales Pacing 120 und 140 Schläge/min) ausgeführt.

Entsprechend der Verminderung des myokardialen Blutfluss (siehe Abschnitt 4.1.3.) konnte im Bereich des proximalen und distalen ischämischen Myokardareals (LAD) unter

Ruhebedingungen, verglichen mit dem nicht-ischämischen Kontrollareal (RCX), eine signifikante Abnahme der kontraktilen Myokardfunktion (Hypokinesie) nachgewiesen werden: $6,2 \pm 2,2\%$ (Segmentverkürzung in % der Enddiastolischen Länge) und $3,8 \pm 1,3\%$ vs. $20,9 \pm 1,1\%$, $p < 0,05$. Unter Bedingungen mit gesteigertem Sauerstoffbedarf (rechts-atriales Pacing 120/min) zeigte sich eine weitere Verminderung der kontraktilen Myokardfunktion gegenüber dem nicht-ischämischen Kontrollareal: $3,9 \pm 1,1$ (LAD prox.) und $0,8 \pm 0,9\%$ (LAD dist.) vs. $21,4 \pm 1,6\%$ (RCX), $p < 0,05$. Bei einer Stimulationsfrequenz von 140 Schlägen pro Minute konnte eine weitere Abnahme der Kontraktilität im Bereich der proximalen LAD beobachtet werden ($2,5 \pm 0,8\%$ [LAD proximal] vs. $20,2 \pm 0,9\%$ [RCX], $p < 0,05$), mit einer deutlichen Dyskinesie im Bereich der distalen LAD ($-3,4 \pm 0,9\%$ vs. $20,2 \pm 0,9\%$, $p < 0,05$).

3.1.4. Infarktgröße

Die Infarktgröße des linken Ventrikels wurde, 28 Tage nach Implantation des Reduktionsstent in die LAD distal des 1. Diagonalastes, nach Explantation des Herzens und Färbung des noch vitalen Gewebes mit Tetrazoliumchlorid planimetrisch vermessen (Gruppe D, n=7). Nach 28 Tagen chronischer Ischämie durch den Reduktionsstent konnte somit eine Infarzierung von $2,0 \pm 0,4\%$ der linksventrikulären Masse beobachtet werden (siehe Abbildung 11).

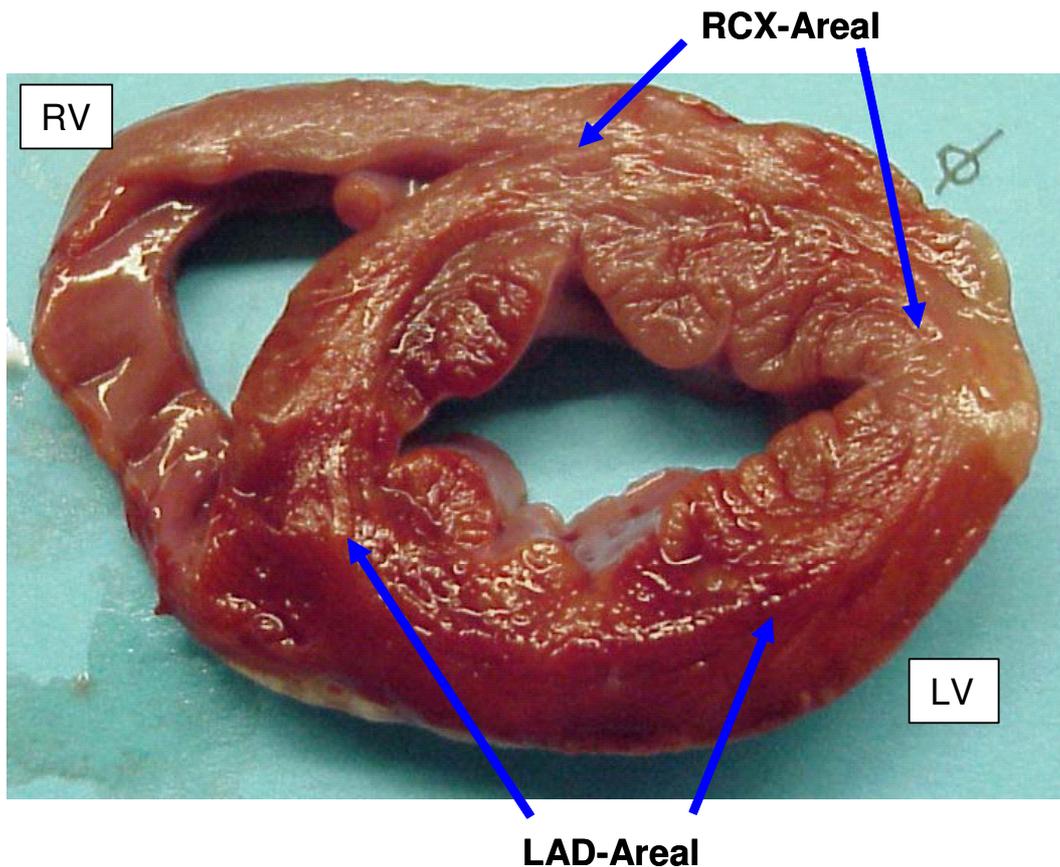


Abbildung 11: Repräsentativer Querschnitt des mittleren linken Ventrikels parallel zur kurzen Herzachse 28 Tage nach Implantation des Reduktionsstent. Nach Injektion von Tetrozoliumchlorid (TTC) in die LAD distal des komplett okkludierten Reduktionsstent zeigt sich kein Hinweis auf eine myokardiale Infarzierung.

3.2. Therapeutische Angiogenese durch Retroinfusion von FGF-2 und Vergleich mit der intrakoronaren Applikation

3.2.1. Gewebebindung ¹²⁵Jod-markierten FGF-2

Zur Untersuchung der Gewebebindung und der systemischen Verteilung von FGF-2 wurde in zwei zusätzlichen Experimenten 45 min nach Retroinfusion (SSR), bzw. intrakoronarer Applikation, von ¹²⁵Jod - markierten FGF-2 die Radioaktivität in Gewebeproben aus dem Myokard und in repräsentativen Organproben untersucht.

¹²⁵I-Radioaktivität [cpm/g Myokardgewebe]

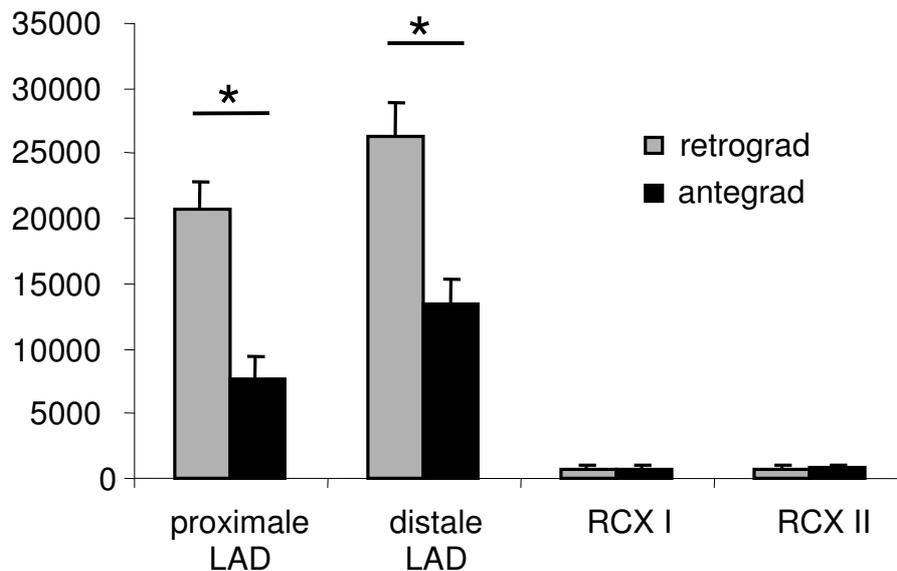


Abbildung 12: Myokardiale ¹²⁵I-FGF-2 Gewebefindung nach antegrader Applikation in die Koronararterie (schwarze Balken) und nach Retroinfusion in die Koronarvene (graue Balken) 7 Tage nach Implantation des Reduktionsstent. Gewebeaktivität in CPM [Counts Per Minute] pro Gramm Myokardgewebe; n=3/Gruppe, MW ± SEM, *: p<0,05 retrograd vs. antegrad.

Nach antegrader Applikation über 30 min mit einem selektiv platzierten intracoronaren Katheter konnte eine berechnete Menge von etwa 4,5 % des gesamten infundierten (¹²⁵Jod markierten) FGF-2 im von der LAD perfundierten Myokard nachgewiesen werden. Mit der selektiven druckregulierten Retroinfusion der gleichen Menge (¹²⁵Jod markierten) FGF-2 konnte die Gewebefindung auf etwa 10 % der Gesamtaktivität gesteigert werden. Die mittlere Radioaktivität im LAD-Bereich betrug bei antegrader Applikation 104789 ± 18199 CPM/g Myokardgewebe, bei retrograder Anwendung konnte eine durchschnittliche Aktivität von 235381 ± 23085 CPM/g Myokard gemessen werden. Interessanterweise konnte unabhängig von der Applikationsform ein Gradient der myokardialen Radioaktivität im LAD-Zielgebiet von distal nach proximal verzeichnet werden (siehe Abbildung 12). Im Vergleich zum Kontrollareal (RCX) konnte nach intrakoronarer Applikation eine 15-fach und nach Retroinfusion eine 30-fach höhere Gewebefindung im Zielareal der LAD beobachtet werden. Die myokardiale Gewebefindung des radioaktiv markierten FGF-2 im Kontrollareal der RCX

war bei retrograder und antergrader Applikation vergleichbar (siehe Abbildung 12). In den nicht-myokardialen Organproben konnte nach Retroinfusion in die Koronarvene eine signifikant niedrigere FGF-2-Gewebebindung in der Lunge beobachtet werden; in der Leber und in der Milz konnte eine vergleichbare Gewebeaktivität nach beiden Applikationsverfahren nachgewiesen werden (siehe Abbildung 13).

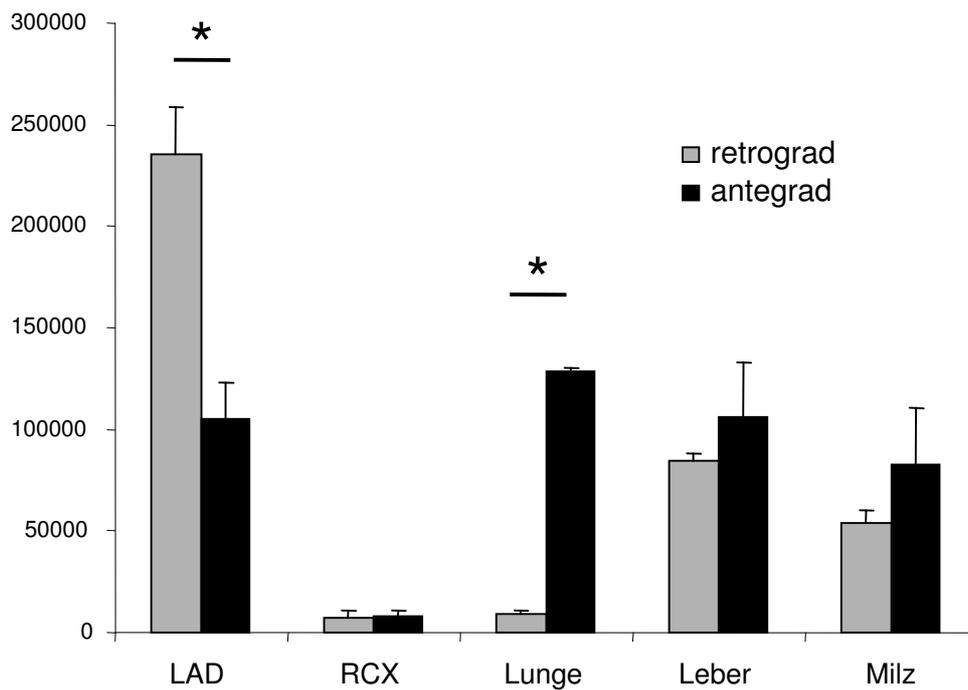


Abbildung 13: Systemische ^{125}I -FGF-2 Gewebebindung nach antergrader Applikation in die Koronararterie (schwarze Balken) und nach Retroinfusion in die Koronarvene (graue Balken) 7 Tage nach Implantation des Reduktionsstent. Gewebeaktivität in Counts Per Minute [CPM] pro Gramm Gewebe. Mittelwerte \pm SEM, n=3/Gruppe. *: p<0,05 retrograde vs. antergrade Applikation.

3.2.2. Anzahl der Kollateralblutgefäße (Arteriogenese)

Am Tag 28 nach Implantation des Reduktionsstent, also 21 Tage nach Applikation von FGF-2, wurde die Anzahl der Kollateralblutgefäße im LAD-Bereich angiographisch (post-mortem Angiographie) ausgezählt (Kollateralenscore) (siehe Abbildung 14 A, B und C).

Nach Retroinfusion von arteriellem Blut (Kontrollgruppe A) konnten $2,95 \pm 0,4$ Kollateralgefäße beobachtet werden. Die intrakoronare Gabe von FGF-2 (Gruppe C) führte zu einer leichten Zunahme der Anzahl der Kollateralarterien ($3,3 \pm 0,3$), dieses Ergebnis erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Bei den retrograd mit FGF-2 behandelten Tieren (Gruppe B) entwickelten sich signifikant mehr Kollateralen als in der Kontrollgruppe ($5,2 \pm 1,1$ vs. $2,95 \pm 0,4$, $p < 0,05$) und als bei den antegrad mit FGF-2 behandelten Tieren ($5,2 \pm 1,1$ vs. $3,3 \pm 0,3$, $p < 0,05$) (siehe Abbildung 15).

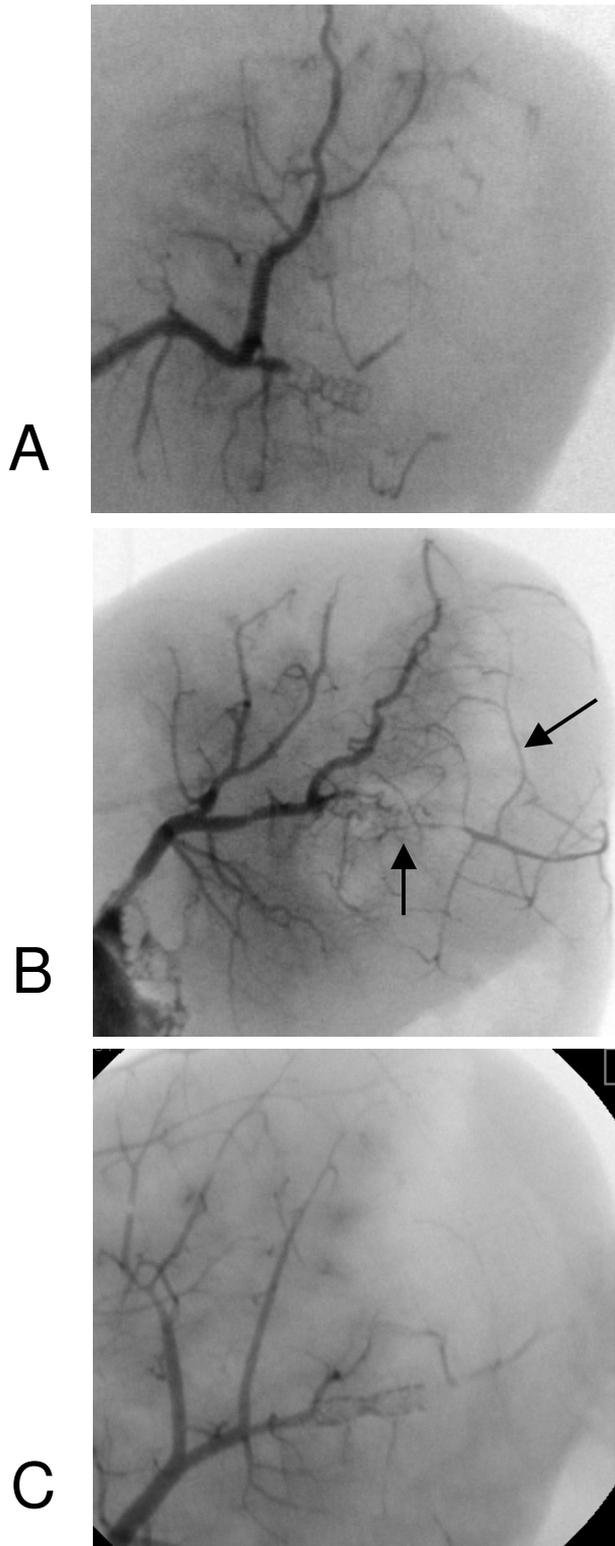


Abbildung 14: Repräsentative post-mortem Angiographien 28 Tage nach Implantation des Reduktionsstent. Abbildung 14A: Kontrolltier. Abbildung 14B: Tier nach Retroinfusion von FGF-2 in die anteriore Herzvene. Abbildung 14C: Tier nach intrakoronarer FGF-2 Applikation. Die Pfeile kennzeichnen Kollateralarterien die vom 1. Diagonalast oder der LAD proximal der Stenose zur distalen LAD führen.

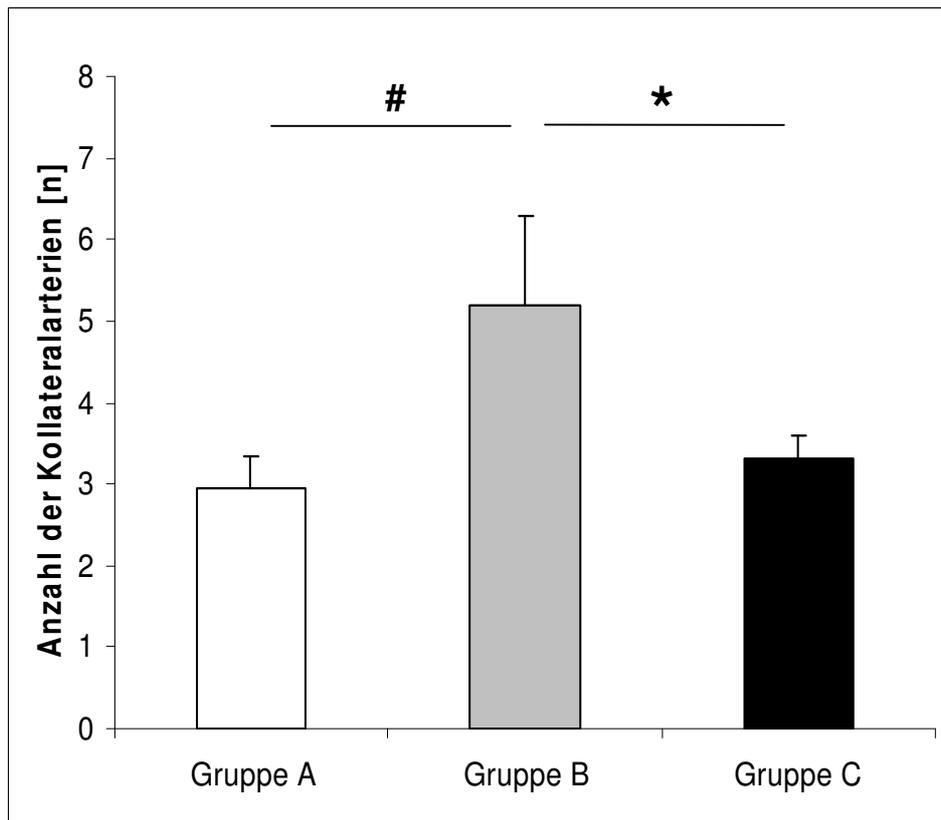


Abbildung 15: Angiographische Anzahl der Kollateralblutgefäße 28 Tage nach Implantation des Reduktionsstent. Gruppe A: unbehandelte Kontrolltiere; Gruppe B: Retroinfusion von FGF-2; Gruppe C: intrakoronare FGF-2 Applikation. Mittelwerte \pm SEM, $n=7$ /Gruppe; #: $p<0,05$ Gruppe B vs. Gruppe A, *: $p<0,05$ Gruppe B vs. Gruppe C.

3.2.3. Kapillardichte (Angiogenese)

Am Tag 21 nach Applikation des FGF-2 wurde die Kapillardichte (Verhältnis Kapillaren/Myozyten) histologisch (Färbung: alkalisch Phosphatase/Eosin) in Myokardproben aus dem LAD-Areal bestimmt (siehe Abbildung 16 A, B und C).

In der unbehandelten Kontrollgruppe (Gruppe A) konnte im ischämischen LAD-Areal eine Kapillardichte von $1,0 \pm 0,17$ (Verhältnis Kapillaren/Myozyten) beobachtet werden. Nach Retroinfusion von FGF-2 (Gruppe B) konnte eine signifikant höhere Kapillardichte im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren (Gruppe A) ($1,45 \pm 0,2$ vs. $1,0 \pm 0,17$, $p<0,05$)

und den antegrad mit FGF-2 behandelten Tieren (Gruppe C) ($1,45 \pm 0,2$ vs. $1,05 \pm 0,15$, $p < 0,05$) erzielt werden (siehe Abbildung 17).

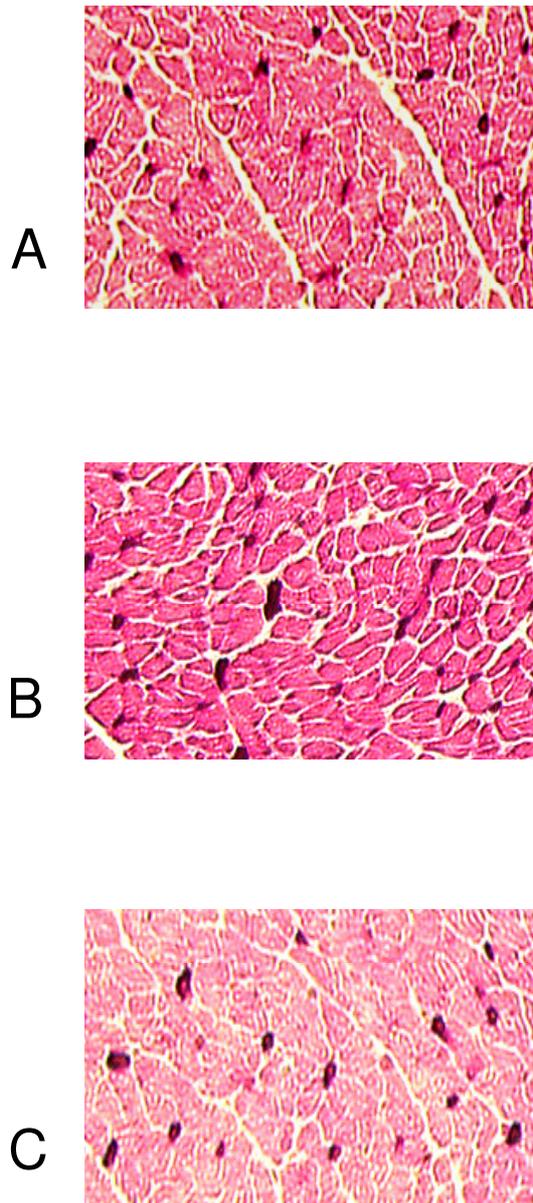


Abbildung 16: Repräsentative histologische Schnitte ($6\mu\text{m}$) von myokardialen Gewebeproben aus dem ischämischen LAD-Areal 28 Tage nach Implantation des Reduktionsstent. Färbung für alkalische Phosphatase und Gegenfärbung mit Eosin. K= Kapillare; M = Muskelfaser. Abbildung 16A: Gruppe A, unbehandelte Kontrolltiere; Abbildung 16B: Gruppe B, Retroinfusion von FGF-2; Abbildung 16C: Gruppe C, intrakoronare FGF-2 Applikation. Mittelwerte \pm SEM, $n=7/\text{Gruppe}$.

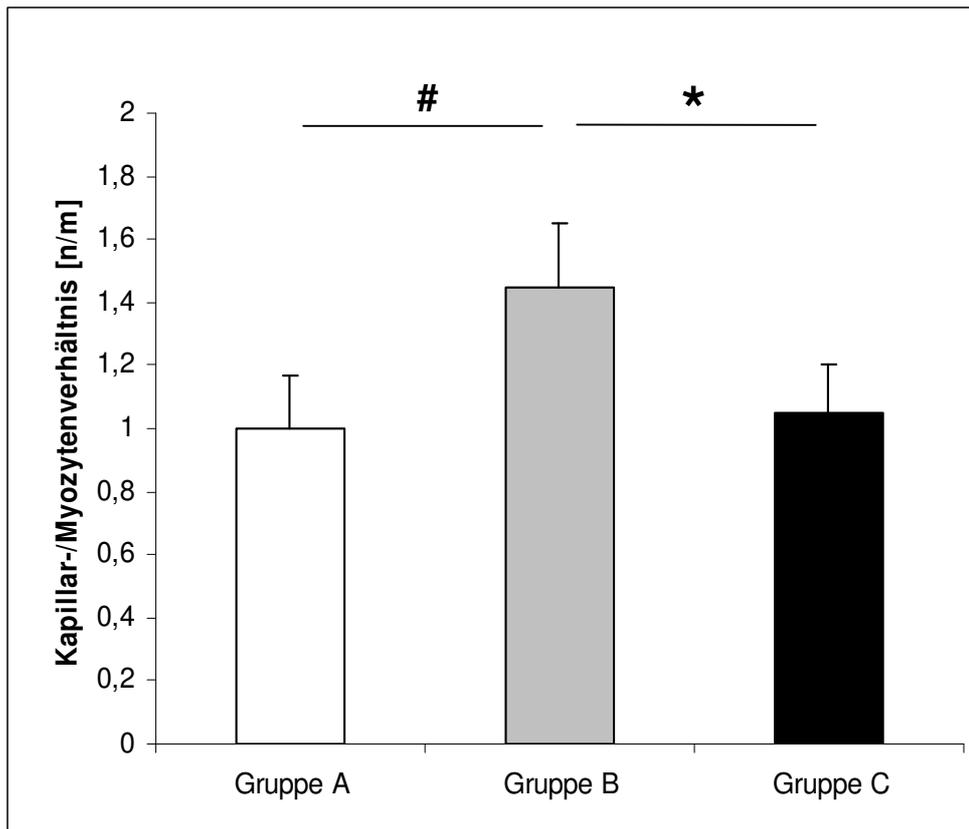


Abbildung 17: Kapillardichte (Kapillar-/Myozytenverhältnis) im ischämischen LAD-Areal 28 Tage nach Implantation des Reduktionsstent. Gruppe A: unbehandelte Kontrolltiere; Gruppe B: Retroinfusion von FGF-2; Gruppe C: intrakoronare FGF-2 Applikation. Mittelwerte \pm SEM, n=7/Gruppe; #: $p < 0,05$ Gruppe B vs. Gruppe A, *: $p < 0,05$ Gruppe B vs. Gruppe C.

3.2.4. Infarktgröße

Die Infarktgröße wurde Am Tag 28 nach Entnahme des Herzens mit Hilfe der Tetrazoliumchloridfärbung bestimmt. Ein signifikanter Unterschied hinsichtlich Infarktgröße zwischen der Gruppe A ($1,9 \pm 0,3\%$ Infarktgröße in % des linksventrilukären Volumens), der Gruppe B ($1,8 \pm 0,3\%$) und der Gruppe C ($1,9 \pm 0,4\%$) konnte nicht festgestellt werden.

3.2.5. Regionaler myokardialer Blutfluss

Der Einfluss der induzierten Arteriogenese und Angiogenese auf den regionalen Blutfluss wurde mit fluoreszierenden Mikrosphären 21 Tage nach der Behandlung mit FGF-2 gemessen. Die Messungen wurden unter Ruhebedingungen und unter Bestimmung der funktionellen Reserve (rechts-atriales Pacing 110/min) ausgeführt.

Regionaler myokardialer Blutfluss
[ml/min/g]

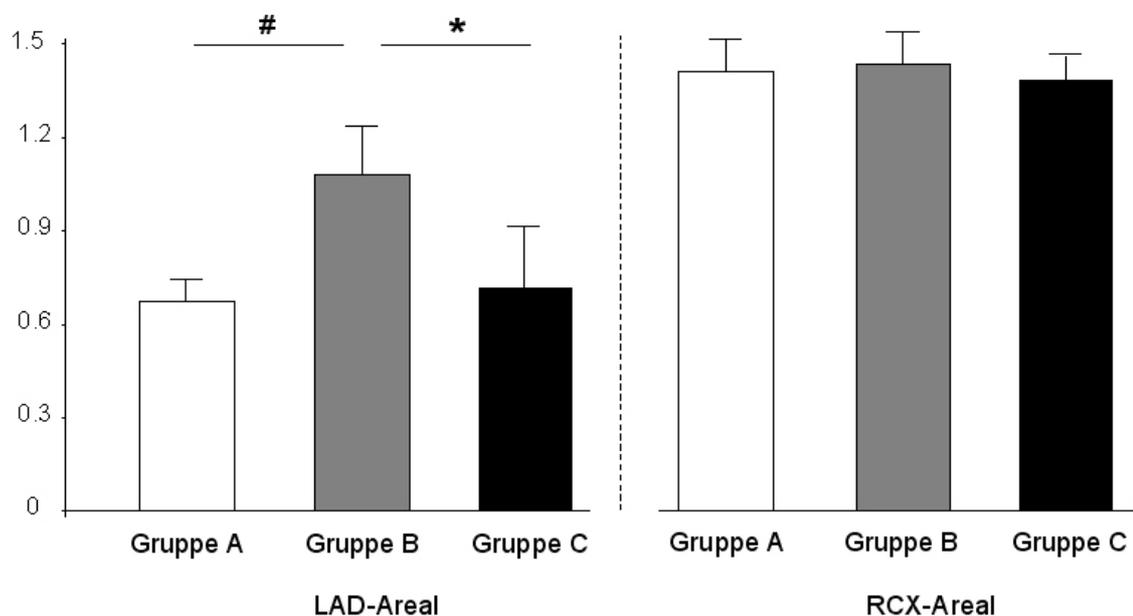


Abbildung 18: Regionaler transmyokardialer Blutfluss 28 Tage nach Implantation des Reduktionsstent. LAD-Areal: Ischämisches, vom Blutfluss durch den Reduktionsstent abhängiges Myokardgewebe; RCX-Areal: vom Ramus circumflexus versorgtes, nicht-ischämisches Myokardgewebe. Gruppe A: Kontrollen, Gruppe B: Retroinfusion von FGF-2 in die anteriore Herzvene, Gruppe C: intrakoronare FGF-2 Applikation. Mittelwerte \pm SEM, $n=7$ /Gruppe; #: $p<0,05$ Gruppe B vs. Gruppe A, *: $p<0,05$ Gruppe B vs. Gruppe C.

In allen drei Behandlungsgruppen war der regionale Blutfluss unter Ruhebedingungen im ischämischen Myokard (LAD) niedriger als im Bereich des Kontrollareals (RCX: $1,48\pm 0,15$ ml \cdot min $^{-1}\cdot$ g $^{-1}$). In der Kontrollgruppe (Gruppe A) konnte unter Ruhebedingungen im LAD-abhängigen Myokardareal ein Blutfluss von $0,66\pm 0,07$ ml \cdot min $^{-1}\cdot$ g $^{-1}$ beobachtet werden. Die Retroinfusion von FGF-2 in die Koronarvene (Gruppe B) führte zu einer deutlichen Zunahme des regionalen myokardialen Ruheblutfluss im Zielgebiet der LAD, mit einem signifikant

höheren Blutfluss als bei den antegrad behandelten Tieren (Gruppe C) ($1,07 \pm 0,14 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ vs. $0,72 \pm 0,17 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$, $p < 0,05$) und den unbehandelten Tieren (Gruppe A) ($1,07 \pm 0,14 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ vs. $0,66 \pm 0,07 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$, $p < 0,05$) (siehe Abbildung 18). In allen Gruppen konnte im Bereich des von der LAD versorgten Myokard ein Gradient des regionalen myokardialen Blutfluss von proximal nach distal und von epikardial nach endokardial beobachtet werden (siehe Tabelle 2). Nach Retroinfusion von FGF-2 (Gruppe B) in die Koronarvene konnte eine signifikant höhere Endo/Epi-Ratio (Verhältnis subendokardialer Blutfluss zu subepikardialer Blutfluss) ($0,88 \pm 0,1$) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren ($0,88 \pm 0,1$ vs. $0,7 \pm 0,2$, $p < 0,05$) und den antegrad mit FGF-2 behandelten Tieren ($0,88 \pm 0,1$ vs. $0,65 \pm 0,1$, $p < 0,05$) erzielt werden.

Unter Bestimmung der funktionellen Reserve (rechts-atriales Pacing 110/min) konnte nach Retroinfusion von FGF-2 in die Koronarvene eine leichte Zunahme des transmuralen myokardialen Blutfluss beobachtet werden ($1,3 \pm 0,3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$), bei den unbehandelten Kontrolltieren und den antegrad mit FGF-2 behandelten Tieren blieb der regionale myokardiale Blutfluss unter rechts-atrialem Pacing unverändert ($0,63 \pm 0,19 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ und $0,69 \pm 0,22 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$).

	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C
LAD prox. epimyokardial	0,82 ± 0,11	1,35 ± 0,14*	1,06 ± 0,2
LAD prox. midmyokardial	0,67 ± 0,08	1,28 ± 0,13*	0,72 ± 0,11
LAD prox. endomyokardial	0,61 ± 0,09	1,23 ± 0,15*	0,65 ± 0,23
LAD prox. endo-/epimyokardial	0,74 ± 0,1	0,91 ± 0,12*	0,61 ± 0,08
LAD dist. epimyokardial	0,65 ± 0,04	0,82 ± 0,13*	0,7 ± 0,18
LAD dist. midmyokardial	0,59 ± 0,08	0,96 ± 0,13*	0,68 ± 0,14
LAD dist. endomyokardial	0,43 ± 0,04	0,69 ± 0,15*	0,48 ± 0,14
LAD dist. endo-/epimyokardial	0,66 ± 0,15	0,84 ± 0,2*	0,69 ± 0,11
RCX epimyokardial	1,46 ± 0,08	1,49 ± 0,11	1,47 ± 0,13
RCX midmyokardial	1,32 ± 0,11	1,36 ± 0,10	1,41 ± 0,12
RCX endomyokardial	1,21 ± 0,06	1,21 ± 0,13	1,27 ± 0,15
RCX endo-/epimyokardial	0,83 ± 0,12	0,81 ± 0,11	0,86 ± 0,10

Tabelle 2: Regionaler myokardialer Blutfluss (Fluoreszierende Mikrosphären) unter Ruhebedingungen: Gruppe A (Kontrollen), Gruppe B (Retroidfusion von FGF-2) und nicht-randomisierte Gruppe C (Intracoronare Applikation von FGF-2); Absolutwerte in ml/min/g; Mittelwert ± SEM, n=7 pro Gruppe; *: p<0,05 vs. Kontrollen (Gruppe A) and intracoronare FGF-2 Gabe (Gruppe C).

3.2.6. Regionale Myokardfunktion

Der Einfluss, der durch FGF-2 induzierten Arterio- und Angiogenese, auf die regionale, kontraktile Myokardfunktion (Sonomikrometrie) wurde 21 Tage nach Applikation des Wachstumsfaktors Fibroblast Growth Factor-2 untersucht. Die Messungen erfolgten sowohl unter Ruhebedingungen, als auch unter Bedingungen mit gesteigertem Sauerstoffbedarf (rechts-atriales Pacing mit 120 und 140 Herzaktionen/min).

Ein beachtlicher Erhalt der kontraktiven Myokardfunktion konnte im LAD-Zielareal nach Retroinfusion von FGF-2 in die Koronarvene (Gruppe B) erzielt werden. Die Effizienz nahm jedoch ab, je weiter distal des Reduktionsstent die Messung erfolgte.

Im Bereich der proximalen LAD (area at risk, Sonomikrometrie-Kristallpaar 1) konnte unter Ruhebedingungen nach Retroinfusion von FGF-2 eine normale kontraktile Myokardfunktion (Segmentverkürzung in % der enddiastolischen Länge) beobachtet werden, mit einer signifikant höheren myokardialen Kontraktilität verglichen mit den unbehandelten Tieren ($18,5 \pm 4,1$ [FGF-2 retrograd] vs. $5,7 \pm 2,9$ [Kontrollen] %EDL, $p < 0,05$) und den antegrad mit FGF-2 behandelten Tieren ($18,5 \pm 4,1$ [FGF-2 retrograd] vs. $8,2 \pm 1,4$ [FGF-2 antegrad] %EDL, $p < 0,05$). Unter Bedingungen mit gesteigertem Sauerstoffbedarf (rechts-atriales Pacing 120 und 140/min) konnte in allen Gruppen eine Verminderung der kontraktiven Myokardfunktion nachgewiesen werden; die Retroinfusion von FGF-2 (SSR, Gruppe B) in die Koronarvene konnte den höchste Erhalt der myokardialen Kontraktilität erzielen, mit einer signifikant besseren Myokardfunktion im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren (Gruppe A) und den antegrad mit FGF-2 behandelten Tieren (Gruppe C) (siehe Abbildung 19 und Tabelle 3).

Im Bereich der distalen LAD (area at risk, Sonomikrometrie-Kristallpaar 2) konnte bei allen Tieren eine deutliche Verminderung der regionalen kontraktiven Myokardfunktion festgestellt werden (siehe Abbildung 19 und Tabelle 3). Unter Bestimmung der funktionellen Reserve zeigte sich in allen drei Gruppen der vorliegenden Untersuchung bei rechts-atrialem Pacing mit 120

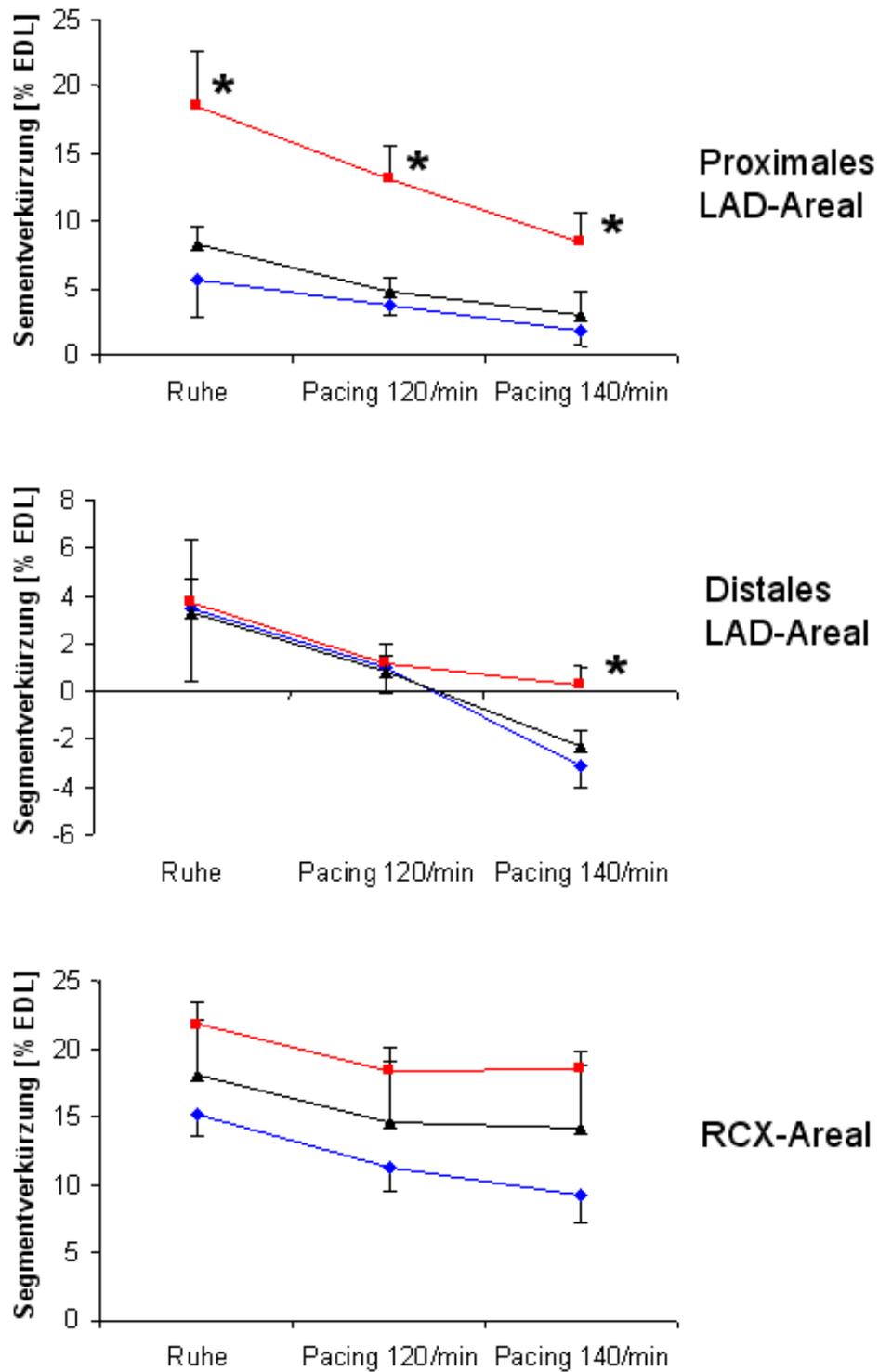


Abbildung 19: Regionale Myokardfunktion (Sonomikrometrie) 28 Tage nach Implantation des Reduktionsstent. Proximales und distales LAD-Areal: Ischämisches, vom Blutfluss durch den Reduktionsstent abhängiges Myokardgewebe; RCX-Areal: vom Ramus circumflexus versorgtes nicht-ischämisches Myokardgewebe. Pacing = rechts-atriale Schrittmacherstimulation. Gruppe A (blaue Linie, Rauten): Kontrollen, Gruppe B (rote Linie, Quadrate): Retroinfusion von FGF-2 in die anteriore Herzvene, Gruppe C (schwarze Linie, Dreiecke): intrakoronare FGF-2 Applikation. Mittelwerte \pm SEM, n=7/Gruppe; *: $p < 0,05$ Gruppe B vs. Gruppe A und Gruppe B vs. Gruppe C.

Herzaktionen pro Minute eine weitere Abnahme der kontraktiven Myokardfunktion. Bei einer Herzfrequenz von 140 Herzaktionen pro Minute konnte in der Kontrollgruppe (Gruppe A) und bei den antegrad mit FGF-2 behandelten Tieren (Gruppe C) eine deutliche Dyskinesie beobachtet werden, nur nach Retroinfusion von FGF-2 (Gruppe B) konnte die regionale myokardiale Kontraktilität erhalten werden (siehe Abbildung 19 und Tabelle 3).

	Ruhe	Pacing 120/min	Pacing 140/min
<i>Proximales LAD-Areal</i>			
Gruppe A	5,7 ± 2,9	3,71 ± 0,8	1,82 ± 1,1
Gruppe B	18,5 ± 4,1*	13,1 ± 2,4*	8,35 ± 2,2*
Gruppe C	8,2 ± 1,4	4,6 ± 1,2	3 ± 1,8
<i>Distales LAD-Areal</i>			
Gruppe A	3,5 ± 3,1	0,96 ± 1,02	-3,1 ± 0,96
Gruppe B	3,7 ± 2,6	1,23 ± 0,77	0,25 ± 0,8*
Gruppe C	3,3 ± 1,4	0,83 ± 0,68	-2,28 ± 0,66
<i>RCX-Areal</i>			
Gruppe A	15,1 ± 1,5	11,2 ± 1,6	9,3 ± 2,1
Gruppe B	21,8 ± 1,6	18,4 ± 1,7	18,5 ± 1,3
Gruppe C	18,1 ± 4,1	14,7 ± 4,4	14,2 ± 4,7

Tabelle 3: Regionale Myokardfunktion (Sonomikrometrie) unter Ruhebedingungen Bedingungen mit gesteigertem Sauerstoffbedarf (rechts-atriales Pacing 120 und 140/min): Gruppe A (Kontrollen), Gruppe B (Retroinfusion von FGF-2) und Gruppe C (Intracoronare Applikation von FGF-2); Werte angegeben als Segmentverkürzung in % Enddiastolische Länge; Mittelwert ± SEM, n=7 pro Gruppe; *: p<0,05 vs. Kontrollen (Gruppe A) and intracoronare FGF-2 Applikation (Gruppe C).

Interessanterweise konnte sowohl unter Ruhebedingungen als auch unter Bestimmung der funktionellen Reserve (rechts-atriales Pacing 120 und 140/min) im Bereich des Kontrollareals (nicht-ischämisches RCX-Areal) nach Retroinfusion von FGF-2 (Gruppe B) eine höhere regionale Myokardfunktion als bei den antegrad (Gruppe C) und den unbehandelten (Gruppe A) Tieren nachgewiesen werden (siehe Tabelle 3 und Abbildung 19).

3.2.7. Globale linksventrikuläre Myokardfunktion

3.2.7.1. Herzzeitvolumen

In allen drei Gruppen dieser Untersuchung konnte am Tage der Behandlung mit FGF-2, also 7 Tage nach Implantation des Reduktionsstent, kein signifikanter Unterschied des Herzminutenvolumens unter Ruhebedingungen festgestellt werden (siehe Abbildung 20). Am Tag 28 konnte in allen Gruppen ein Anstieg des Herzzeitvolumens beobachtet werden, ohne signifikante Unterschiede zwischen den Tieren der einzelnen Gruppen (siehe Abbildung 20).

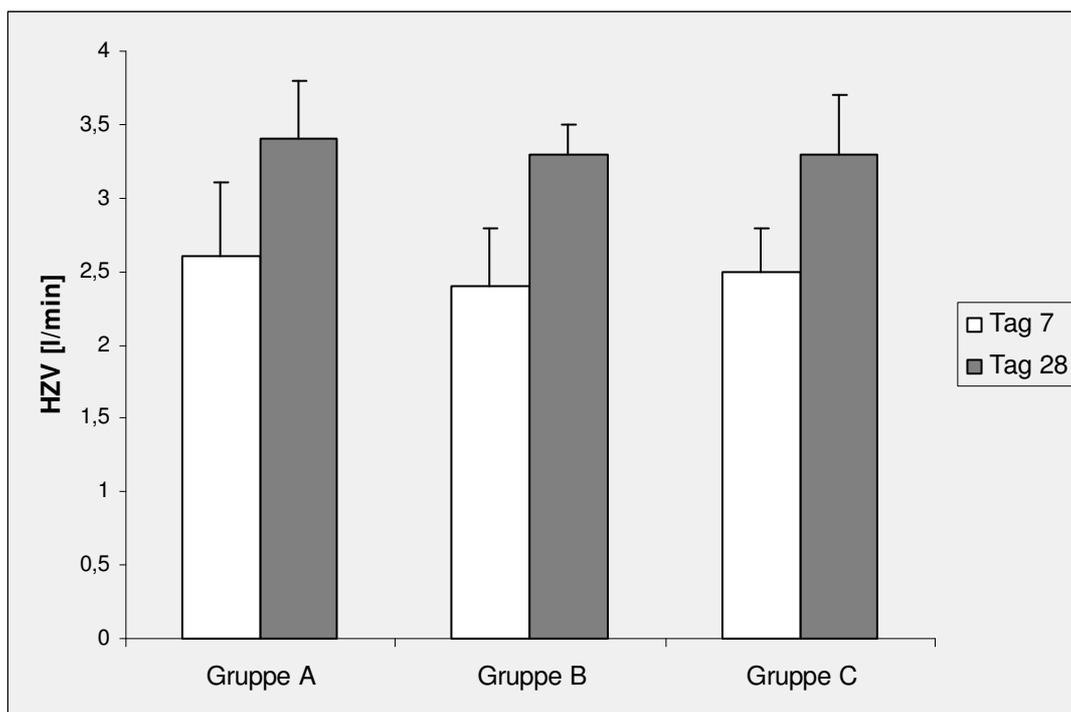


Abbildung 20: Herzzeitvolumen (HZV) 7 (weiße Balken) und 28 Tage (graue Balken) nach Implantation des Reduktionsstent. Gruppe A: unbehandelte Kontrolltiere; Gruppe B: Retroinfusion von FGF-2; Gruppe C: intrakoronare FGF-2 Applikation. Mittelwerte \pm SEM, n=7/Gruppe.

3.2.7.2. dP/dt max und LVEDP

Die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit des linken Ventrikels (dP/dt max) war am Tag 7 und am Tag 28 bei allen Gruppen vergleichbar (siehe Tabelle 1). Nach Retroinfusion von FGF-2 konnte am Tag 28 ein leichter, nicht signifikanter Anstieg des dP/dt max nachgewiesen werden (1115 ± 371 [Tag 28] vs. 957 ± 245 mmHg/s² [Tag 7]).

Der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) war am Tag 7 nach Implantation des Reduktionsstent in allen drei Gruppen der vorliegenden Untersuchung vergleichbar ($10,7 \pm 3,8$ mmHg [Gruppe A] vs. $9,5 \pm 5,2$ mmHg [Gruppe B] vs. $10,2 \pm 3,2$ mmHg [Gruppe C]; statistisch nicht signifikant) (siehe Tabelle 1).

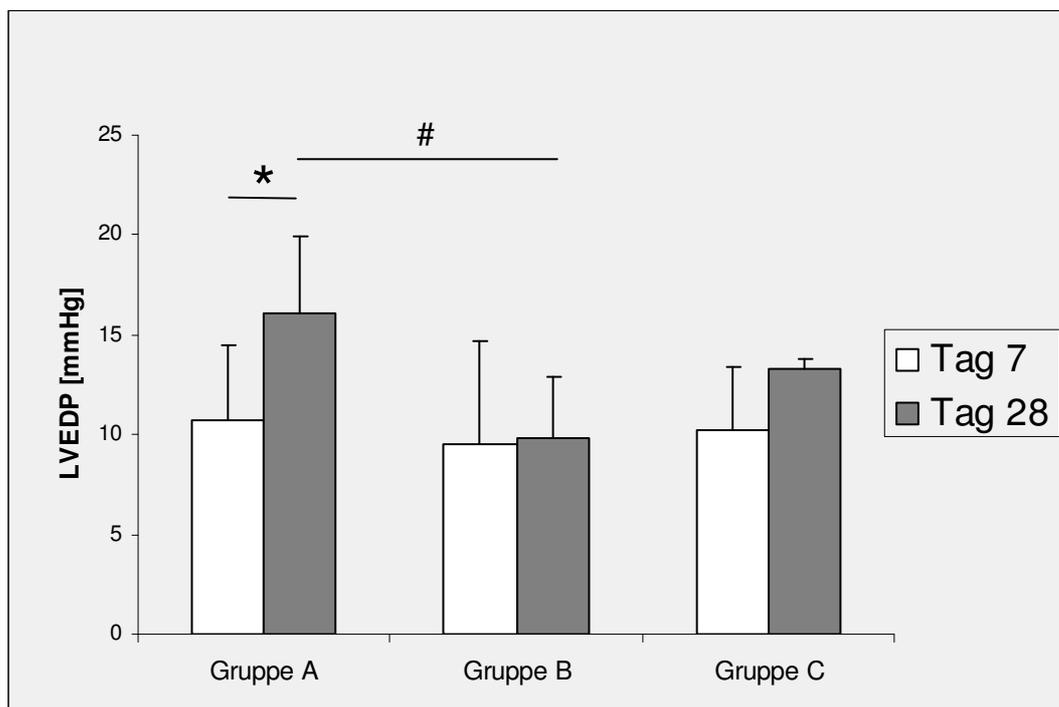


Abbildung 21: Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP) 7 (weiße Balken) und 28 Tage (graue Balken) nach Implantation des Reduktionsstent. Gruppe A: unbehandelte Kontrolltiere; Gruppe B: Retroinfusion von FGF-2; Gruppe C: intrakoronare FGF-2 Applikation. Mittelwerte \pm SEM, n=7/Gruppe; #: $p < 0,05$ Gruppe B Tag 28 vs. Gruppe A Tag 28, *: $p < 0,05$ Gruppe A Tag 28 vs. Gruppe A Tag 7.

Am Tag 28 der Untersuchung konnte bei den Kontrolltieren (Gruppe A) und nach intrakoronarer FGF-2 Gabe (Gruppe C) als Hinweis auf eine verminderte globale linksventrikuläre Funktion ein Anstieg des linksventrikulären enddiastolischen Druck beobachtet werden (siehe Abbildung 21 und Tabelle 1). Nur nach Retroinfusion von FGF-2 blieb der LVEDP unverändert und lag deutlich niedriger als bei den unbehandelten Kontrolltieren (Gruppe A) und den antegrad mit FGF-2 behandelten Schweinen (siehe Abbildung 21 und Tabelle 1).

4. Diskussion

4.1. Experimentelle Modelle chronischer Myokardischämie am Grosstier

In der vorliegenden Studie wurde die Retroinfusion von Fibroblast-Growth-Factor-2 (FGF-2) in die anteriore Herzvene als Prinzip der therapeutischen Arterio- und Angiogenese in einem Modell chronisch myokardialer Ischämie untersucht. Hierfür wurde zunächst ein tierexperimentelles Modell einer hochgradigen koronararteriellen Stenose mit einer signifikanten Reduktion des Blutflusses im Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie (LAD) etabliert. Ein wichtiges Kriterium für die Wahl des tierexperimentellen Modells für regionale Ischämiestudien ergibt sich aus der kollateralen Blutversorgung des Myokard. In der koronararteriellen Anatomie und der Ausprägung des kollateralen Gefäßnetzes ergibt sich beim Schwein eine größere Übereinstimmung mit der menschlichen Anatomie und Physiologie als zum Beispiel beim Hund ^{48;137;148;157;164}. Bei einem akuten, kompletten Verschluss einer Koronararterie verbleibt beim Schwein ein kollateraler Restfluss von ca. 1,5 %, im Vergleich zu 8-37% beim Hund ^{145;166}. Schweine weisen aus diesem Grund eine größere Empfindlichkeit für eine akute koronare Okklusion auf ¹³⁵. Bei chronischer Ischämie entwickelt sich beim Hund vorwiegend eine üppige Kollateralzirkulation in der Ebene des Epikards, beim Schwein hingegen formiert sich zusätzlich ein subendokardialer Gefäßplexus ¹³⁵; auch in diesem Zusammenhang weist das Schwein eine größere Übereinstimmung mit dem Menschen auf. Die Grenzen zwischen ischämischen und nicht-ischämischen Arealen bei chronischer, myokardialer Ischämie sind beim Schwein - ähnlich der menschlichen Anatomie - deutlich homogener, beim Hund hingegen ist bedingt durch die reichere, natürliche Ausstattung mit Kollateralen die Randzone einer Ischämie mit zahlreichen Inseln erhaltener Restperfusion durchsetzt ^{145;166}. Das Ausmaß des präformierten Kollateralnetzes und die Fähigkeit eine Kollateralzirkulation bei chronischer Ischämie aufzubauen ist von entscheidender Bedeutung für die Überlebens- und Funktionsfähigkeit des Myokard bei regional begrenzter Ischämie, und ist daher von grundlegender Bedeutung für die Wahl des Tiermodells beim Studium des Einflusses der Angiogenese auf chronisch

ischämisches Myokard. Aus diesem Grund wurde in dieser Studie und zunehmend auch in aktuellen experimentellen Studien der Angiogenese das Schwein (deutsches Landschwein) als Versuchstier eingesetzt.

4.1.1. Chirurgische, transthorakale Implantation des Ameroid-Quellring

Ein Modell am Grosstier zur Induktion einer chronischen myokardialen Ischämie war bis zur vorliegenden Untersuchung nur chirurgisch meist in Form des Ameroid-Quellring realisiert worden ^{9;90;115;127}. Nach anterolateraler Thorakotomie wird beim chirurgischen Vorgehen ein Ameroid-Quellring um die Koronararterie (RCX) platziert. Nach 3-4 Wochen entwickelt sich durch die zunehmende Quellung des Ringes eine zirkuläre Stenose der Koronararterie, mit einer Abnahme des maximalen Blutflusses und der kontraktiven Myokardfunktion unter einem vasodilatativen Stimulus (Adenosin) oder unter funktioneller Belastung mit einem Herzschrittmacher; der koronararterielle Blutfluss und die Myokardfunktion unter Ruhebedingungen werden durch den Ameroid-Quellring kaum beeinflusst ^{60;115;126}. Der Ameroid-Quellring ist als experimentelles Modell chronischer myokardialer Ischämie für den Ramus circumflexus der linken Koronararterie etabliert und standardisiert ^{115;167}.

Die koronarvenöse Anatomie des Schweins mit der Vena hemiazygos, die in die obere Hohlvene drainiert, und einer hohen Variabilität der Venae marginales lässt jedoch eine zuverlässige und reproduzierbare Retroinfusionsbehandlung im RCX-Areal nicht zu; da die koronarvenöse Anatomie der anterioren Herzvene, die das Blut aus dem Bereich der LAD drainiert, im Schwein wesentlich konstanter ist, wurden frühere tierexperimentelle Untersuchungen der selektiven druckregulierten Retroinfusion an der anterioren Herzvene durchgeführt ^{18;19;21;84}. Andererseits ist der Ameroid-Quellring für eine Platzierung um die LAD nicht etabliert und standardisiert, und verursacht nach dem Einsetzen um die LAD mit einer hohen Inzidenz Kammerflimmern ^{115;167}. Zusätzlich ist eine gleichzeitige Kompression oder

Okklusion der die Koronararterie begleitenden Herzvene durch den Ameroid-Quellring oft unvermeidbar ^{115;167}; ein ungehinderter physiologischer Blutfluss in der anterioren Herzvene ist jedoch für eine effektive Retroinfusionsbehandlung unerlässlich ^{18;19}. Zusätzlich verlangt die Implantation eines Ameroid-Ringes eine Thorakotomie ¹²⁷. Die Operation und das Infektionsrisiko stimulieren ihrerseits die Vorgänge der Angiogenese und hätten die Trennung eines therapeutischen Erfolges von operationsbedingten Einflüssen erschwert.

4.1.2. Kathetergestützte, perkutane Implantation des Reduktionsstent

In der vorliegenden Untersuchung wurde deshalb zur Induktion einer chronischen myokardialen Ischämie am Grosstier (deutsches Landschwein) ein neues perkutanes Modell etabliert. In Anbetracht der Anforderungen an das pathophysiologische Modell unserer Studie wurde ein auf einem Herzkatheterverfahren basierendes System mit der Implantation der in unserem Labor entwickelten Art des Reduktionsstent gewählt. Am Tag 0 der vorliegenden Untersuchung konnte somit unmittelbar nach kathetergestützter Implantation des Reduktionsstent angiographisch ein Stenosegrad von 72% des Ramus interventricularis anterior erzielt werden. Im Verlauf konnte am Tag 7 nach Implantation des Reduktionsstent angiographisch eine Zunahme des Stenosegrades auf 92% beobachtet werden. Verglichen mit dem nicht-ischämischen RCX-Gebiet konnte somit im Bereich der LAD eine leichte Verminderung des regionalen myokardialen Blutfluss in Ruhe und eine signifikante Abnahme des Maximalflusses unter Adenosin-induzierter Vasodilatation erzielt werden (siehe Abbildung 9). Der Grad der Ischämie 7 Tage nach Implantation des Reduktionsstent entspricht somit dem erzielten Grad der Ischämie mehrere Wochen nach dem Einsetzen eines Ameroid-Quellring um den Ramus circumflexus, mit einer leichten Verminderung des Ruheblutflusses und einer signifikanten Verminderung des maximalen Blutflusses ^{115;167}. Ähnlich dem Ameroid-Quellring Model lässt sich nach Implantation des Reduktionsstent der genaue Zeitpunkt des Verschlusses der Koronararterie weder exakt vorhersagen noch

dokumentieren ⁷⁴. In die Gruppen dieser Untersuchung wurden nur Tiere aufgenommen die am Tag 7 einen ersichtlichen Restfluss durch das native LAD-Gefäß und die Stenose zeigten.

Da bei allen Tieren nach 28 Tagen ein kompletter Verschluss der LAD beobachtet wurde, musste zwischen den Tagen 7 und 28 der Untersuchung eine Totalokklusion des Reduktionsstent eingetreten sein. Am Tag 28 war der myokardiale Blutfluss (fluoreszierende Mikrosphären, NH₃-PET) im ischämischen LAD-Bereich verglichen mit dem nicht-ischämischen RCX-Bereich unter Ruhebedingungen signifikant vermindert, unter Adenosin-induzierter Vasodilatation konnte keine Zunahme des Blutfluss beobachtet werden (siehe Abbildungen 9 und 10). Da eine regelrechte Myokardfunktion an eine ausreichende arterielle Versorgung gebunden ist ³³, verursacht die chronische Minderperfusion im Bereich des Myokard, das distal des Reduktionsstent von der LAD versorgt wird, eine Abnahme der regionalen (-30% unter Ruhebedingungen; -38% während intrakoronarer Adenosingabe) und globalen myokardialen Funktion. Das Ausmaß der myokardialen Infarzierung (Tetrazoliumchlorid-Färbung) 28 Tage nach Implantation des Reduktionsstent in die LAD distal des 1. Diagonalastes betrug $1,9 \pm 0,4\%$ der linksventrikulären Masse. Diese Erkenntnis entspricht den Beobachtungen nach Platzierung eines Ameroid-Quellrings im Bereich der RCX, die zu einer funktionell unbedeutenden linksventrikulären Infarzierung von 1,2-6% des Myokard führt ^{60;127}. Dieser pathophysiologische Zustand, nach Implantation des Reduktionsstent, mit einer Verminderung des myokardialen Blutfluss und einer Abnahme der kontraktile Myokardfunktion unter Ruhebedingungen, bei erhaltener myokardialer Vitalität, erfüllt die Definition von „hibernating myocardium“ ¹²⁰. Grundsätzlich sei an dieser Stelle bemerkt, dass mit der in der Literatur beschriebenen Anwendung des Ameroid-Quellring (RCX) im chronischen Modell lediglich eine Abnahme des maximalen Blutflusses unter einem vasodilatativen Stimulus (Adenosin) oder unter funktioneller Belastung mit einem Herzschrittmacher zu erzielen ist ^{60;115;126}. Eine Verminderung des Blutflusses in der Koronararterie und der regionalen myokardialen Perfusion unter Ruhebedingungen mit einer

signifikanten Abnahme der kontraktiven Myokardfunktion („hibernating“-Myokard) konnte nur nach Implantation des Reduktionsstent beobachtet werden.

Mit dem Reduktionsstent ist es somit nun erstmals möglich therapeutische Arterio- und Angiogenese im LAD-Bereich über die Bestimmung der Flussreserve unter Belastung hinaus auch unter Ruheflussbedingungen zu beobachten, ohne eine funktionell relevante myokardiale Infarzierung des linken Ventrikels zu induzieren. Der neuentwickelte und in der vorliegenden Studie erstmals eingesetzte Reduktionsstent bietet somit ein perkutanes Modell zur Untersuchung des therapeutischen Effektes angiogenetischer Wachstumsfaktoren auf chronisch ischämisches Myokard.

4.2. Applikation von FGF-2 mittels selektiver druckgeregelter Retroinfusion (SSR) als therapeutisches Prinzip bei der Arterio- und Angiogenese-Induktion und Vergleich mit der intracoronaren Applikation

4.2.1. Therapeutische Arteriogenese

Ein zentraler Parameter der anatomischen Beurteilung nach therapeutischer Applikation eines angiogenetischen Proteins in hypoxisches/minderperfundiertes Myokard ist die Induktion des Wachstums von Kollateralblutgefäßen (therapeutische Arteriogenese). Trotz der gering ausgebildeten Anlage des Kollateralgefäßnetzes im porcinen Myokard bei akuter Ischämie, kann bei Einwirkung chronisch myokardialer Ischämie bereits ohne therapeutische Intervention eine leichte Zunahme der Kollateralversorgung entstehen, wie O`Konski et al. und White et al. bereits nachweisen konnten ^{115;167}. In präklinischen Studien chronischer myokardialer Ischämie (Hund und Schwein) konnte nach systemisch-venöser Gabe von FGF-2 keine zusätzliche (signifikante) Zunahme des Wachstums von Kollateralen gegenüber unbehandelten Kontrolltieren erzielt werden ^{121;129}. Allerdings konnte tierexperimentell nach kontinuierlicher und einmaliger perikardialer Applikation und nach intramyokardialer Injektion des vaskulären Wachstumsfaktors FGF-2 eine Zunahme der

Kollateralen beobachtet werden ^{69;87;90;100;156}. Da diese Applikationsverfahren sehr invasiv sind (siehe Abschnitt 1.4.), wurde FGF-2 in zwei tierexperimentellen Studien direkt in die Koronararterie injiziert. Sato et al. ¹²⁹ und Rajanayagam et al. ¹²¹ konnten nur nach kontinuierlicher bzw. zweimaliger intrakoronarer Gabe von insgesamt 10µg/kg Körpergewicht FGF-2 eine signifikante Zunahme der Kollateralgefäße erreichen. Die einmalige intrakoronare Anwendung von FGF-2 war hingegen in beiden Protokollen nicht sicher effektiv. In der vorliegenden Untersuchung konnte ebenfalls nach einmaliger intrakoronarer Gabe von 150µg FGF-2 (Gruppe C) eine leichte, nicht-signifikante Zunahme der Anzahl der Kollateralarterien gegenüber den unbehandelten Kontrolltieren (Gruppe A) beobachtet werden (siehe Abbildung 18). Die identifizierten Kollateralblutgefäße sorgten entsprechend ihrer Definition als arterio-arterielle Anastomosen für die Durchblutung des ischämischen Myokardgewebes distal des Reduktionsstent und verfügten über eine typische korkenzieherartige Form, die bereits Schaper et al. ¹³³ beobachten konnten. In der gegenwärtigen Untersuchung konnte dieser Effekt durch den Einsatz der selektiven druckgeregelten Retroinfusion als Applikationsweg für FGF-2 im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren signifikant gesteigert werden (5.20 ± 1.10 vs. 2.75 ± 0.16 Kollateralblutgefäße). Auch im Vergleich zur intrakoronaren Applikation konnte bei retrograder Anwendung der gleichen Menge FGF-2 signifikant mehr Kollateralen im LAD-Bereich nachgewiesen werden; dieser zusätzliche Effekt wird vor allem auf eine Verlängerung der Kontaktzeit des vaskulären Wachstumsfaktors mit dem ischämischen Myokardgewebe zurückgeführt ²¹.

4.2.2. Therapeutische Angiogenese

Ein beträchtlicher Anteil der therapeutischen Wirkung angiogenetischer Wachstumsfaktoren ist nach den Erkenntnissen von Schaper et al. ^{65;75;97;131} einer Zunahme der Gefäßversorgung ischämischen Myokards auf der Ebene der Kapillaren (therapeutische

Angiogenese) zuzuschreiben. Eine einmalige Applikation von FGF-2 mit der selektiven druckregulierten Retroinfusion (SSR) in die anteriore Herzvene führte zu einer Zunahme der Kapillardichte, die gegenüber Kontrolltieren und der Gruppe mit intrakoronarer Applikation statistisch signifikant war. Da bei intrakoronarer Anwendung und Retroinfusion von b-FGF die gleichen Mengen Protein eingesetzt wurden und der Zeitraum für die Applikation in beiden Gruppen identisch war, ist der zusätzliche therapeutische Effekt bei retrograder Infusion am ehesten auf die Verlängerung der Kontaktzeit²¹ des angiogenetischen Wachstumsfaktors mit dem ischämischen Myokardgewebe zurückzuführen.

4.2.3. Effektivere Gewebefixierung nach Retroinfusion von ¹²⁵Iod-markierten FGF-2

Pharmakodynamische Untersuchungen nach Anwendung von radioaktiv markierten FGF-2 erlaubten uns genauere Einsichten in die myokardiale Gewebefixierung und die systemische Verteilung der vaskulären Wachstumsfaktoren bei chronisch myokardialer Ischämie. In der vorliegenden Untersuchung konnten 4,5% der Gesamtmenge des antegrad über einen intracoronaren Katheter in das ischämische LAD-Areal injizierten FGF-2 in den myokardialen Gewebeproben nachgewiesen werden. Diese Erkenntnisse entsprechen den Ergebnissen von Lazarous et al.⁹⁵, die am Hund nach antegrader Injektion in die LAD 3-5% der gesamten FGF-2 Aktivität im Herzen beobachten konnten. Eine Steigerung der intramyokardialen Gewebefixierung auf 10% der systemischen Gesamtaktivität konnte in unserer Untersuchung nach Applikation der gleichen Menge radioaktiv markierten FGF-2 mit der selektiven druckregulierten Retroinfusion in das LAD-Zielareal über die anteriore Herzvene erreicht werden. Interessanterweise führten in der vorliegenden Untersuchung sowohl die antegrade Anwendung als auch die Retroinfusion von b-FGF zu einer intensiveren Bindung von FGF-2 im distalen LAD-Zielgebiet, mit einem Gradient der myokardialen Gewebeaktivität von distal nach proximal. Diese Beobachtung erklärt sich am ehesten durch eine Zunahme des ischämischen Stimulus im distalen LAD-Areal, der eine

vermehrte Expression der Rezeptoren für vaskuläre Wachstumsfaktoren und damit eine Steigerung der Bindungsmöglichkeiten für FGF-2 bewirkt hat^{63;73}.

Verglichen mit dem nicht-ischämischen RCX-Areal konnte im LAD-Zielgebiet nach antegrader Injektion, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Lazarous et al.⁹⁵, eine 5 bis 6-fache Zunahme der myokardialen Aktivität erreicht werden; eine weitere Zunahme auf die 15 bis 20-fache Aktivität des Kontrollareals konnte nach retrograder Applikation beobachtet werden. Diese beträchtliche Steigerung der Gewebefixierung des radioaktiv markierten FGF-2 bei Anwendung der Retroinfusion lässt sich am ehesten durch die Verlängerung der Kontaktzeit der vaskulären Wachstumsfaktoren mit dem ischämischen Myokard erklären²¹. Zusätzlich finden sich bei Arteriosklerose Stenosen und Okklusionen der zuführenden arteriellen Gefäßen, so dass ein beträchtlicher Anteil koronararteriell applizierter Wachstumsfaktoren über „Steal“-Gefäße ausgeschwemmt wird, ohne das ischämische Myokardareal zu erreichen⁸². Das venöse System bleibt von arteriosklerotischen Veränderungen unbeeinflusst und erlaubt somit einen direkteren Zugang zum ischämischen Myokardgewebe.

Die absolute FGF-2 Gewebeaktivität im nicht-ischämischen RCX-Kontrollareal und in den untersuchten extrakardialen Organen war bei antegrader und retrograder Applikation vergleichbar, ein Anzeichen für eine relativ hohe Tendenz zur Rezirkulation bei beiden Verfahren. Ein hoher Anteil des radioaktiv markierten FGF-2 wurde bei beiden Anwendungsformen, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Lazarous et al.⁹⁵ und Laham et al.⁸⁸, in der Leber abgelagert. Diese Erkenntnisse bestätigen frühere Beobachtungen, welche die Leber als Organ der Elimination für an α_2 -Makroglobulin gebundenes FGF-2 identifizieren konnten^{92;165}. Ein hoher Anteil des antegrad applizierten FGF-2 wurde zusätzlich in der Lunge abgelagert (siehe Abschnitt 3.2.1.); ursächlich sind hierfür vor allem Rezeptoren (Heparansulfate) in der Lungenstrombahn von Bedeutung, die FGF-2 mit niedriger Affinität binden⁸².

4.2.4. Einfluss auf die regionale myokardiale Perfusion

In präklinischen Untersuchungen, in Hunde- und Schweinemodellen chronisch myokardialer Ischämie (Ameroid-Quellring), konnte gezeigt werden, dass die intramyokardiale, die intraperikardiale und die perivaskuläre Applikation von vaskulären Wachstumsfaktoren (FGF-2, VEGF165) eine signifikante Verbesserung der regionalen myokardialen Perfusion bewirken können^{59;62;78;85;96;100;101;103;106;108;156}. Da die genannten Applikationsverfahren für den Einsatz am Patienten im klinischen Routineeinsatz zu invasiv und komplikationsträchtig erscheinen (siehe Abschnitt 1.4.), wurde die endovaskuläre Gabe (systemisch-intravenös, intrakoronar) von vaskulären Wachstumsfaktoren in beiden Modellen untersucht. Die systemisch-intravenöse Applikation in eine periphere Vene konnte keine Verbesserung der regionalen myokardialen Perfusion erzielen^{121;129;130}; die intrakoronare Gabe war nur bei wiederholten (täglich für 7 bis 28 Tage) Anwendungen des angiogenetischen Faktors erfolgreich; die einmalige intrakoronare Gabe konnte keine signifikante Zunahme des regionalen myokardialen Blutfluss unter Ruhebedingungen gegenüber unbehandelten Kontrolltieren induzieren¹⁵⁶. In einer kürzlich veröffentlichten tierexperimentellen Untersuchung konnten Sato et al.¹²⁹ erstmals nach einmaliger intrakoronarer Applikation von 6µg/kg KG FGF-2 eine leichte Zunahme des regionalen myokardialen Blutfluss (fluoreszierende Mikrosphären) im ischämischen Myokardgewebe unter Adenosin-induzierter maximaler Vasodilatation verglichen mit den unbehandelten Kontrolltieren beobachten. Unter Ruhebedingungen konnte keine Zunahme des regionalen Blutfluss durch die intrakoronare FGF-2 Applikation erzielt werden. In der zitierten Studie von Sato et al.¹²⁹ wurde als Modell chronisch myokardialer Ischämie ein Ameroid-Quellring eingesetzt, der im Gegensatz zum Reduktionsstent den koronaren Blutfluss nur unter myokardialer Belastung einschränkt (siehe Abschnitt 4.1.). In der vorliegenden Untersuchung wurde der regionale myokardiale Blutfluss mit der Mikrosphären-Methode untersucht. Der Vergleich, der in der vorliegenden Studie am Tag 28 ermittelten Ausgangswerte (Absolutwerte) der regionalen myokardialen Perfusion im Bereich des nicht-ischämischen

Myokardareal ($1,35 \pm 0,21$ ml/min/g, gemittelter Wert der Gruppen A, B und C aus Tabelle 2) mit den bei Anwendung der gleichen Technik in der Literatur beschriebenen Referenzwerten von 1,19-1,48 ml/min/g zeigt eine hohe Übereinstimmung^{59;83;118;162}. Nach Einsetzen des Reduktionsstent in die LAD konnte in allen drei Behandlungsgruppen - auch unter Ruhebedingungen verglichen mit dem nicht-ischämischen RCX-Areal - eine signifikante Verminderung des regionalen myokardialen Blutfluss (fluoreszierende Mikrosphären) verzeichnet werden („hibernating“-Myokard) (siehe Abschnitt 3.1.2.). Entsprechend dem Ausbleiben eines signifikanten Kollateral- und Kapillarwachstums in der Gruppe C (intrakoronare Applikation von 150µg FGF-2) konnte in Ergänzung zu den Ergebnissen von Sato et al.¹²⁹ nachgewiesen werden, dass die 30 minütige intrakoronare FGF-2 Applikation in einem Modell mit „hibernating“-Myokard keine signifikante Verbesserung des regionalen myokardialen Blutfluss unter Ruhebedingungen gegenüber den unbehandelten Kontrolltieren erzielen kann; unter Bedingungen mit gesteigertem Sauerstoffbedarf (rechts-atriales Pacing 140 Herzaktionen/min) konnte in der vorliegenden Arbeit eine leichte, nicht-signifikante Zunahme des regionalen myokardialen Blutfluss beobachtet werden. In der Gruppe B konnte hingegen nach Retroinfusion von FGF-2 eine signifikante Zunahme der Anzahl der Kollateralgefäße und Kapillardichte beobachtet werden; dazu passend konnte in dieser Gruppe auch eine signifikante Zunahme des regionalen myokardialen Blutfluss im ischämischen Myokardareal (1,1 ml/min/g Gewebe) gegenüber den Kontrolltieren und den antegrad mit FGF-2 behandelten Tieren schon unter Ruhebedingungen nachgewiesen werden; der Blutfluss im LAD-Areal distal des Reduktionsstent lag aber dennoch deutlich unterhalb des normalen regionalen myokardialen Blutfluss nicht-ischämischer Myokardareale (RCX-Areal: 1,4-1,5 ml/min/g Gewebe, siehe Abbildung 18). Als Hinweis für eine erhaltene funktionelle Reserve nach Retroinfusion von FGF-2 stieg der regionale myokardiale Blutfluss unter Bedingungen mit gesteigertem Sauerstoffbedarf (rechts-atriales Pacing 140/min) an und war signifikant höher als bei der unbehandelten Kontrollgruppe und den antegrad mit FGF-2 behandelten Tieren.

Interessanterweise verfügten alle Tiere, die retrograd mit FGF-2 behandelt wurden, über den höchsten Erhalt der regionalen myokardialen Perfusion in den subepikardialen Myokardschichten. Frühere Studien, die die transmyokardiale Verteilung von pharmakologischen Substanzen^{64;128} und Genvektoren²¹ untersuchten, konnten ein deutliches Konzentrationsgefälle zwischen subepikardialen und subendokardialen Myokardschichten nach koronarvenöser Applikation beobachten. Ein analoge transmyokardiale Verteilung und therapeutische Wirkung von FGF-2 auch in der vorliegenden Untersuchung ist somit naheliegend und erklärt am ehesten den höchsten Erhalt des regionalen myokardialen Blutfluss in den subepikardialen Myokardschichten.

4.2.5. Einfluss auf die kontraktile Myokardfunktion

Ein bedeutender Parameter und zentrales Ziel einer therapeutischen Arterio- und Angiogenese am ischämischen Herzen ist der Erhalt oder die Wiederherstellung der kontraktile Myokardfunktion. In tierexperimentellen Untersuchungen chronischer myokardialer Ischämie (Hund und Schwein) konnte nur nach intramyokardialer, perivaskulärer und intraperikardialer Applikation eines vaskulären Wachstumsfaktors (FGF-2, VEGF₁₆₅) eine signifikante Zunahme der kontraktile Myokardfunktion gegenüber unbehandelten Kontrolltieren erzielt werden^{59;69;78;101;103;106}, nicht jedoch nach endovaskulärer Anwendung (systemisch-intravenös und intrakoronar)^{9;12;61;121;129;130}. Hierzu passend konnte in der vorliegenden Untersuchung nach antegrader Applikation von FGF-2 in die Koronararterie ebenfalls kein signifikanter Effekt auf die kontraktile Myokardfunktion beobachtet werden. Hingegen führte der Anstieg des regionalen myokardialen Blutfluss bei den retrograd mit FGF-2 behandelten Tieren zu einer signifikanten Verbesserung der kontraktile Myokardfunktion (siehe Abschnitt 3.3.2.). Die Segmentverkürzung im Bereich des proximalen LAD-Areals war signifikant höher sowohl unter Ruhebedingungen als auch unter Bedingungen mit gesteigertem Sauerstoffbedarf (rechts-atriales Pacing 120 und

140/min), in Übereinstimmung mit einem fast normalen Ruheblutfluss in diesen Myokardabschnitten 21 Tage nach Retroinfusion von FGF-2. Im Bereich der distalen LAD konnte unter Ruhebedingungen kein Unterschied in der myokardialen kontraktilen Funktion zwischen den Gruppen festgestellt werden. Unter Belastung (rechts-atriales Pacing) hingegen konnte eine weitere Abnahme der myokardialen Kontraktilität bis hin zur Dyskinesie nur nach Retroinfusion von FGF-2 verhindert werden.

Interessanterweise zeigte sich eine signifikante Abnahme der regionalen kontraktilen Myokardfunktion im nichtischämischen RCX-Areal bei der Kontrollgruppe verglichen mit den retrograd mit FGF-2 behandelten Tieren, sowohl unter Ruhebedingungen als auch unter Bedingungen mit gesteigertem Sauerstoffbedarf (rechts-atriales Pacing) (siehe Abbildung 19). Dieser Befund könnte durch den chronisch erhöhten linksventrikulären enddiastolischen Druck (siehe Abbildung 21) in dieser Gruppe erklärt werden, der zusammen mit einer Zunahme der subendokardialen Wandspannung und einem gesteigerten Sauerstoffbedarf, eine Verminderung der regionalen Myokardfunktion verursachen kann.

4.3. Limitationen

4.3.1. Tierexperimentelles Modell

Die Übertragbarkeit, der in dieser Studie am Schweinemodell gewonnenen Erkenntnisse auf die klinische Situation des Patienten, kann in einigen Punkten jedoch in Frage gestellt werden. Es ist bekannt, dass einige pharmakologische Substanzen, insbesondere volatile Anästhetika, eine negativ inotrope Wirkung entfalten können⁷¹; aus diesem Grund wurde zur Aufrechterhaltung der inhalativen Anästhesie Enflurane eingesetzt, das von den volatilen Anästhetika den geringsten negativ inotropen Effekt aufweist^{70;71}. Auf pharmakologische Substanzen, die eine weitere Beeinflussung der myokardialen Perfusion und Funktion bewirken könnten, wurde bewusst verzichtet. An dieser Stelle sei bemerkt, dass Heparine über eine gewisse angiogenetische Wirksamkeit verfügen^{45;150}; nach

eingehendem Literaturstudium konnten nur Nachweise dieses Effektes nach mehrmaliger Applikation von hochmolekularem Heparin gefunden werden, für die in dieser Studie eingesetzten niedermolekularen Heparine steht eine Untersuchung dieser Wirkung noch aus. In dieser Studie konnte jedoch zur Prophylaxe eines akuten Verschluss des Reduktionsstents durch einen arteriellen Thrombus nicht auf die Anwendung niedermolekularer Heparine verzichtet werden. Die niedermolekularen Heparine wurden jedoch in allen drei Gruppen der vorliegenden Untersuchung identisch appliziert; daher sind Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen unabhängig von der Gabe niedermolekularer Heparine zu sehen. Auch wenn in dieser Untersuchung konsequent auf minimale Traumatisierung, geringen Blutverlust und zügige Präparation geachtet wurde können Störeffekte durch das Operationstrauma, die Thorakotomie, einen geringen unvermeidbaren Blutverlust, die künstliche Beatmung und die Dauer der Versuchsreihe nicht ausgeschlossen werden. Generell stellt sich die Frage inwieweit die in dieser Untersuchung gewonnenen Erkenntnisse, im Tiermodell mit an sich gesunden Koronararterien, auf die klinische Situation arteriosklerotisch veränderter Herzkranzgefäße übertragen werden können.

4.3.2. Mögliche Limitationen einer FGF-2-Behandlung am Patienten

In Studien an Tiermodellen und in frühen klinischen Untersuchungen sind einige klinisch relevante chronische und akute Nebenwirkungen erkannt worden, die vor allem mit der Anwendung von VEGF und FGF-2 assoziiert sind. Eine chronische Nebenwirkung stellt eine bei therapeutischer Anwendung von FGF-2 auftretende Niereninsuffizienz dar; pathophysiologisch zeigt sich eine membranöse Nephropathie, die typischerweise von einer Proteinurie begleitet wird¹⁰⁷. Ferner kann der Einsatz vaskulärer Wachstumsfaktoren (FGF und VEGF) aufgrund der breiten mitotischen und chemotaktischen Aktivität, v.a. bei Makrophagen, und durch Stimulation der Angiogenese in den Vasa vasorum das Wachstum

atherosklerotischer Plaques fördern^{72;110;147} und deren anatomische Struktur somit destabilisieren^{98;111;114;144}; es droht eine Plaqueruptur und ein akuter Arterien- oder Koronarverschluss. Eine weitere zu befürchtende chronische unerwünschte Wirkung einer therapeutischen Angiogenese besteht bei Patienten mit diabetischer Retinopathie in der Stimulation des Wachstums retinaler Blutgefäße^{2;3}. Erhöhte Konzentrationen des angiogenetischen Wachstumsfaktors VEGF wurden in der Glaskörperflüssigkeit dieser Patienten beobachtet³ und die Anwendung VEGF-neutralisierender Antikörper im Tierexperiment konnte das Fortschreiten der retinalen Neoangiogenese verhindern³. In Tumorgewebe kommt es aufgrund der hohen Zellteilungsrate zum erhöhten Bedarf an Sauerstoff und Stoffwechselsubstraten, der über die vermehrte lokale Expression von vaskulären Wachstumsfaktoren zur Angiogeneseinduktion führen kann^{40;42}. Die verbesserte Gewebepfusion ermöglicht ein weiteres ungehemmtes Tumorstadium^{40;42}.

Neuere klinische Untersuchungen (Phase I- und Phase II- Studien) an mehreren hundert Patienten mit der Anwendung angiogenetischer Wachstumsfaktoren in therapeutisch relevanten Dosierungen konnten die Befürchtungen bezüglich der chronischen Nebenwirkungen (Niereninsuffizienz, proliferative Retinopathie und Tumorstadium) nicht bestätigen^{67;89;91;104;125;140}. Allerdings führt der therapeutische Einsatz von FGF-2 und vor allem VEGF akut zu einer Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) mit einer deutlichen arteriellen Vasodilatation^{67;102}. Dieser Effekt führte aufgrund der akut auftretenden arteriellen Hypotension bereits zu einer Dosislimitierung bei ersten klinischen Phase I Studien beider Wachstumsfaktoren¹⁴⁴. Laham et al. konnten in einer klinischen, placebokontrollierten open-dose Eskalationsstudie⁸⁵ mit der einmaligen systemischen intravenösen Anwendung von FGF-2 (0,33-48µg/kg KG) nachweisen, dass eine Dosierung von maximal 36µg/kg KG FGF-2 akut nebenwirkungsfrei toleriert wird. In der vorliegenden Untersuchung wurde daher eine submaximale Konzentration von FGF-2 (5µg/kg KG) eingesetzt, ausreichend um nach retrograder Applikation in die Koronarvene mit der selektiven druckregulierten Retroinfusion eine funktionell relevante therapeutische Arterio- und Angiogenese zu induzieren.

4.3.3. Mögliche Limitationen einer Retroinfusionsbehandlung am Patienten

Folgende Einschränkungen einer klinischen Anwendung einer Retroinfusionsbehandlung (SSR) sind denkbar. Klinische Untersuchungen der SSR-Behandlung haben gezeigt, dass in durchschnittlich 5% der Fälle eine Sondierung des Koronarsinus nicht möglich war, so dass auf eine retrograde Behandlung verzichtet werden musste¹⁸. Außerdem haben anatomische Untersuchungen gezeigt, dass eine eindeutige Zuordnung einer drainierenden Vene zu einer Arterie, wie sie für die AI-Vene und die LAD-Arterie regelmäßig besteht, bei der rechten Koronararterie und der RCX in bis zu 25% der Fälle nicht gegeben ist. In diesen Fällen könnte die Retroinfusionsbehandlung nicht selektiv durchgeführt werden, wobei Effektivitätseinbußen zu erwarten wären. Ernsthaftes klinische Komplikationen durch die Katheterisierung der Koronarvene und die SSR-Behandlung (Perikardtamponade, Herzrhythmusstörungen) sind bei bisher über 300 klinischen Anwendungen der Retroinfusionsbehandlung zur Myokardprotektion nicht aufgetreten¹⁸.

5. Zusammenfassung

Die Applikation vaskulärer Wachstumsfaktoren zur Stimulation des Kollateral- (therapeutische Arteriogenese) und des Kapillarwachstums (therapeutische Angiogenese) stellt einen möglichen neuen Ansatz in der Behandlung der koronaren Herzerkrankung dar. Der klinische Einsatz vaskulärer Wachstumsfaktoren ist derzeit aber vor allem durch ein klinisch verfügbares sicheres und effektives Applikationsverfahren limitiert. Die selektive synchronisierte druckregulierte Retroinfusion (SSR) von Koronarvenen ist ein klinisch etabliertes Herzkatheterverfahren und erlaubt eine effektive Applikation von Medikamenten und Genvektoren in ischämisches Myokardgewebe. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Auswirkung der Retroinfusion des vaskulären Wachstumsfaktors FGF-2 in die Koronarvene auf das Kollateralwachstum (Arteriogenese), das Kapillarwachstum (Angiogenese), den myokardialen Blutfluss und die kontraktile Myokardfunktion bei chronischer, experimenteller Myokardischämie (Schwein) untersucht, und mit der intrakoronaren Applikation von FGF-2 verglichen. Eine hochgradige koronararterielle Stenose, mit Progression zur Komplettokklusion bis zum Tag 28 der Untersuchung, wurde durch Implantation eines Reduktionsstent-Graft in die LAD induziert. Nach 7 Tagen wurde eine 30 minütige Retroinfusion (anteriore Herzvene) ohne (Kontrollgruppe A, n=7) und unter Zugabe von 150µg FGF-2 (Gruppe B, n=7) durchgeführt, und mit der antegraden Infusion (30 min) von FGF-2 in die Koronararterie (LAD) verglichen (Gruppe C, n=7). 28 Tage nach Implantation des Reduktionsstent erfolgte die Bestimmung der Anzahl der Kollateralarterien (post-mortem Angiographie) und der Kapillardichte (Histologie, Färbung für alkalische Phosphatase). Der regionale myokardiale Blutfluss (fluoreszierende Mikrosphären) und die kontraktile Myokardfunktion (Sonomikrometrie) wurden unter Ruhebedingungen und Bedingungen mit gesteigertem Sauerstoffbedarf (rechts-atriales Pacing) gemessen. Am Versuchende, 28 Tage nach Implantation des Reduktionsstent, konnte die Retroinfusion von FGF-2 in die Koronarvene (Gruppe B), verglichen mit den unbehandelten Kontrolltieren (Gruppe A) und der antegraden Applikation von FGF-2 in die Koronararterie (Gruppe C),

eine signifikante Zunahme der Kollateralarterien ($5,2 \pm 1,1$ vs. $2,95 \pm 0,4$ vs. $3,3 \pm 0,3$, $p < 0,05$) und der Kapillardichte ($1,45 \pm 0,2$ vs. $1,0 \pm 0,17$ vs. $1,05 \pm 0,15$ [Kapillaren/Myozyt], $p < 0,05$) erzielen. Der regionale myokardiale Blutfluss im ischämischen LAD-Areal war signifikant höher nach Retroinfusion von FGF-2 ($1,07 \pm 0,14$ vs. $0,66 \pm 0,07$ vs. $0,72 \pm 0,17$ $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$, $p < 0,05$). Entsprechend wurde nach Retroinfusion von FGF-2 auch eine signifikante Verbesserung der regionalen kontraktiven Myokardfunktion unter Ruhebedingungen ($18,5 \pm 4,1\%$ vs. $5,7 \pm 2,9\%$ vs. $7,9 \pm 1,8\%$ [Segmentverkürzung in % der enddiastolischen Länge], $p < 0,05$) und Bedingungen mit gesteigertem Sauerstoffbedarf beobachtet. Der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) als Maß für die globale Myokardfunktion konnte statistisch signifikant lediglich mit der Retroinfusion von FGF-2 in die anteriore Herzvene, nicht jedoch bei den unbehandelten Kontrolltieren und den antegrad mit FGF-2 behandelten Tieren günstig beeinflusst werden. Die selektive druckregulierte Retroinfusion von FGF-2 in die Koronarvene konnte somit eine funktionell relevante therapeutische Arterio- und Angiogenese induzieren, und war signifikant effektiver als die intrakoronare Applikation von FGF-2.

Um die Frage nach der Ursache für die effektivere Arterio- und Angiogenese nach Retroinfusion von FGF-2 in die Koronarvene zu klären, wurde in zusätzlichen Experimenten 7 Tage nach Implantation des Reduktionsstent I^{125} -markiertes FGF-2 über 30 min mit der Retroinfusion in die anteriore Herzvene ($n=3$) und antegrad in die Koronararterie ($n=3$) verabreicht. 45 min nach Applikation konnte eine höhere myokardiale Aktivität im LAD-Areal nach Retroinfusion von I^{125} FGF-2 verglichen mit der intrakoronaren Gabe erzielt werden. Verglichen mit dem nicht-ischämischen RCX-Areal konnte nach retrograder Applikation eine auf das 15-30 fach erhöhte myokardiale Gewebepbindung im LAD-Zielareal beobachtet werden. Die signifikant effektivere therapeutische Arterio- und Angiogenese nach Retroinfusion von FGF-2 in die Koronarvene wird daher vor allem auf eine deutlich vermehrte Gewebepbindung von FGF-2 im ischämischen Myokardgewebe zurückgeführt.

6. Literaturverzeichnis

1. Abel FL, Cooper RH, Beck RR. Use of fluorescent latex microspheres to measure coronary blood flow distribution. *Circ.Shock* 1993; **41**: 156-161.
2. Adamis AP, Miller JW, Bernal MT *et al.* Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am.J.Ophthalmol.* 1994; **118**: 445-450.
3. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG *et al.* Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N.Engl.J.Med.* 1994; **331**: 1480-1487.
4. Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J.Clin.Invest* 1998; **101**: 40-50.
5. Asahara T, Bauters C, Pastore C *et al.* Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Circulation* 1995; **91**: 2793-2801.
6. Asahara T, Bauters C, Zheng LP *et al.* Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation* 1995; **92/9 SUPPL.:** -II371).
7. Austin GE, Tuvlin MB, Martino-Salzman D *et al.* Determination of regional myocardial blood flow using fluorescent microspheres. *Am.J.Cardiovasc.Pathol.* 1993; **4**: 352-357.
8. Baffour R, Berman J, Garb JL, Rhee SW, Kaufman J, Friedmann P. 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.* 1992; **16**: 181-191.
9. Banai S, Jaklitsch MT, Shou M *et al.* Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation* 1994; **89**: 2183-2189.
 10. Barry WH. Mechanical dysfunction of the heart during and after ischemia. Unraveling the causes. *Circulation* 1990; **82**: 652-654.
 11. Battegay EJ. Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J Mol Med* 1995; **73**: 333-346.
 12. Battler A, Scheinowitz M, Hasdai D *et al.* Intracoronary injection of basic fibroblast growth factor enhances angiogenesis in infarcted swine myocardium. *J.Am.Coll.Cardiol.* 1993; **22/7**: -2006).
 13. Bauters C, Asahara T, Zheng LP *et al.* Recovery of disturbed endothelium-dependent flow in the collateral-perfused rabbit ischemic hindlimb after administration of vascular endothelial growth factor [see comments]. *Circulation* 1995; **91**: 2802-2809.
 14. Bauters C, Asahara T, Zheng LP *et al.* Site-specific therapeutic angiogenesis after systemic administration of vascular endothelial growth factor. *J.Vasc.Surg.* 1995; **21**: 314-324.
 15. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM *et al.* Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 1995; **91**: 2488-2496.

16. Boekstegers P. Perspectives on selective retroinfusion of coronary veins as an alternative approach for myocardial gene transfer and angiogenesis. *J.Invasive.Cardiol.* 2001; **13**: 339-342.
17. Boekstegers P, Diebold J, Weiss C. Selective ECG synchronised suction and retroinfusion of coronary veins: first results of studies in acute myocardial ischaemia in dogs. *Cardiovascular Research* 1990; **24**: 456-464.
18. Boekstegers P, Giehl W, von Degenfeld G, Steinbeck G. Selective suction and pressure-regulated retroinfusion: an effective and safe approach to retrograde protection against myocardial ischemia in patients undergoing normal and high risk percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J.Am.Coll.Cardiol.* 1998; **31**: 1525-1533.
19. Boekstegers P, Peter W, von Degenfeld G *et al.* Preservation of regional myocardial function and myocardial oxygen tension during acute ischemia in pigs: Comparison of selective synchronized suction and retroinfusion of coronary veins to synchronized coronary venous retroperfusion. *J.Am.Coll.Cardiol.* 1994; **23/2**: -469).
20. Boekstegers P, Raake P, Al Ghobainy R *et al.* Stent-based approach for ventricle-to-coronary artery bypass. *Circulation* 2002; **20;106**: 1000-1006.
21. Boekstegers P, von Degenfeld G, Giehl W *et al.* Myocardial gene transfer by selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins. *Gene Ther.* 2000; **7**: 232-240.
22. Boekstegers P, von Degenfeld G, Giehl W, Kupatt C, Franz W, Steinbeck G. Selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins as an alternative access of ischemic myocardium: implications for myocardial protection, myocardial gene transfer and angiogenesis. *Z.Kardiol.* 2000; **89 Suppl 9:IX/109-12.**: IX/109-IX/112.

23. Boekstegers P, von Degenfeld G, Heinrich D, Hullin R, Franz WM. Regional myocardial gene transfer with high efficacy using selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins. *Z.Kardiol.* 1998; **87**: 265-265.
24. Boekstegers P, Weidenhofer S, Kapsner T, Werdan K. [Continuous measurement of peripheral oxygen availability in skeletal muscle of patients with infection]. *Infusionsther.Transfusionsmed.* 1993; **20 Suppl 1:21-8; discussion 28**: 21-28.
25. Braunwald E, Jones RH, Mark DB *et al.* Diagnosing and managing unstable angina. Agency for Health Care Policy and Research. *Circulation* 1994; **90**: 613-622.
26. Brindle NP. Growth factors in endothelial regeneration. *Cardiovasc.Res.* 1993; **27**: 1162-1172.
27. Brogi E, Wu T, Namiki A, Isner JM. Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation* 1994; **90**: 649-652.
28. Bugge-Asperheim B, Leraand S, Kiil F. Local dimensional changes of the myocardium measured by ultrasonic technique. *Scand.J.Clin.Lab Invest* 1969; **24**: 361-371.
29. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat.Med.* 2000; **6**: 389-395.
30. Casscells W, Speir E, Sasse J *et al.* Isolation, characterization, and localization of heparin-binding growth factors in the heart. *J.Clin.Invest* 1990; **85**: 433-441.
31. Conway J. Clinical assessment of cardiac output. *Eur.Heart J.* 1990; **11 Suppl I:148-50**: 148-150.

32. Conway J, Lund-Johansen P. Thermodilution method for measuring cardiac output. *Eur.Heart J.* 1990; **11 Suppl I:17-20.**: 17-20.
33. Conzen PF, Habazettl H, Christ M *et al.* Left ventricular surface tissue oxygen pressures determined by oxygen sensitive multiwire electrodes in pigs. *Cardiovascular Research* 1991; **25**: 207-216.
34. Dirschinger J, Neumann FJ, Hausleiter J *et al.* Randomisierter, multizentrischer Vergleich 5 verschiedener Stenttypen. *Z.Kardiol.* 1998; **87**: 39.
35. Esch F, Baird A, Ling N *et al.* Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1985; **82**: 6507-6511.
36. Fagard R, Conway J. Measurement of cardiac output: Fick principle using catheterization. *Eur.Heart J.* 1990; **11 Suppl I:1-5.**: 1-5.
37. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995; **92**: 657-671.
38. Ferrara N, Alitalo K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat.Med.* 1999; **5**: 1359-1364.
39. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat.Med.* 1995; **1**: 27-31.
40. Folkman J. Therapeutic angiogenesis in ischemic limbs [editorial; comment]. *Circulation* 1998; **97**: 1108-1110.
41. Folkman J, Klagsbrun M, Sasse J, Wadzinski M, Ingber D, Vlodavsky I. A heparin-binding angiogenic protein--basic fibroblast growth factor--is stored within basement membrane. *Am.J.Pathol.* 1988; **130**: 393-400.

42. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; **267**: 10931-4.
43. Freedman SB, Isner JM. Therapeutic angiogenesis for coronary artery disease. *Ann.Intern.Med.* 2002; **136**: 54-71.
44. Freeman GL, LeWinter MM, Engler RL, Covell JW. Relationship between myocardial fiber direction and segment shortening in the midwall of the canine left ventricle. *Circ.Res.* 1985; **56**: 31-39.
45. Fujita M, Sasayama S, Asanoi H, Nakajima H, Sakai O, Ohno A. Improvement of treadmill capacity and collateral circulation as a result of exercise with heparin pretreatment in patients with effort angina. *Circulation* 1988; **77**: 1022-1029.
46. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N.Engl.J.Med.* 1992; **326**: 242-250.
47. Galzie Z, Kinsella AR, Smith JA. Fibroblast growth factors and their receptors. *Biochem.Cell Biol.* 1997; **75**: 669-685.
48. Geary GG, Smith GT, McNamara JJ. Defining the anatomic perfusion bed of an occluded coronary artery and the region at risk to infarction. A comparative study in the baboon, pig and dog. *Am.J.Cardiol.* 1981; **47**: 1240-1247.
49. Gibson CM, Ryan K, Sparano A *et al.* Angiographic methods to assess human coronary angiogenesis. *Am.Heart J.* 1999; **137**: 169-179.
50. Giehrl W, von Degenfeld G, Heinrich D, Boekstegers P. High-risk stent implantation in patients with substantially increased risk for bypass operation. *Europ Heart J* 1998; **19**: 502.

51. Gimbrone MA, Jr., Resnick N, Nagel T, Khachigian LM, Collins T, Topper JN. Hemodynamics, endothelial gene expression, and atherogenesis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1997; **811:1-10; discussion 10-1.**: 1-10.
52. Giordano FJ, Ping P, McKirnan MD *et al.* Intracoronary gene transfer of fibroblast growth factor-5 increases blood flow and contractile function in an ischemic region of the heart [see comments]. *Nat.Med.* 1996; **2**: 534-539.
53. Glenny RW, Bernard S, Brinkley M. Validation of fluorescent-labeled microspheres for measurement of regional organ perfusion. *J.Appl.Physiol* 1993; **74**: 2585-2597.
54. Grines CL, Watkins MW, Helmer G *et al.* Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. *Circulation* 2002; **% 19;105**: 1291-1297.
55. Grossman PM, Han Z, Palasis M, Barry JJ, Lederman RJ. Incomplete retention after direct myocardial injection. *Catheter.Cardiovasc.Interv.* 2002; **55**: 392-397.
56. Haas F, Augustin N, Holper K *et al.* Time course and extent of improvement of dysfunctioning myocardium in patients with coronary artery disease and severely depressed left ventricular function after revascularization: correlation with positron emission tomographic findings. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2000; **36** : 1927-1934.
57. Hagl S, Heimisch W, Meisner H *et al.* [Direct measurement of papillary muscle dynamics in the intact canine left ventricle during acute coronary occlusion (author's transl)]. *Thoraxchir.Vask.Chir* 1976; **24**: 303-308.
58. Hale SL, Alker KJ, Kloner RA. Evaluation of nonradioactive, colored microspheres for measurement of regional myocardial blood flow in dogs. *Circulation* 1988; **78**: 428-434.

59. Harada K, Friedman M, Lopez JJ *et al.* Vascular endothelial growth factor administration in chronic myocardial ischemia. *Am.J.Physiol* 1996; **270**: H1791-H1802.
60. Harada K, Grossman W, Friedman M *et al.* Basic fibroblast growth factor improves myocardial function in chronically ischemic porcine hearts. *J.Clin.Invest* 1994; **94**: 623-630.
61. Hariawala MD, Horowitz JR, Esakof D *et al.* VEGF improves myocardial blood flow but produces EDRF-mediated hypotension in porcine hearts. *J.Surg.Res.* 1996; **63**: 77-82.
62. Hasegawa T, Kimura A, Miyataka M, Inagaki M, Ishikawa K. Basic fibroblast growth factor increases regional myocardial blood flow and salvages myocardium in the infarct border zone in a rabbit model of acute myocardial infarction. *Angiology* 1999; **50**: 487-495.
63. Hashimoto E, Ogita T, Nakaoka T, Matsuoka R, Takao A, Kira Y. Rapid induction of vascular endothelial growth factor expression by transient ischemia in rat heart. *Am.J.Physiol* 1994; **267**: H1948-H1954.
64. Hatori N, Sjoquist PO, Regardh C, Ryden L. Pharmacokinetic analysis of coronary sinus retroinfusion in pigs. Ischemic myocardial concentrations in the left circumflex coronary arterial area using metoprolol as a tracer. *Cardiovasc.Drugs Ther.* 1991; **5**: 1005-1010.
65. Helisch A, Schaper W. Angiogenesis and arteriogenesis--not yet for prescription. *Z.Kardiol.* 2000; **89**: 239-244.
66. Henry TD, Abraham JA. Review of Preclinical and Clinical Results with Vascular Endothelial Growth Factors for Therapeutic Angiogenesis. *Curr.Interv.Cardiol.Rep.* 2000; **2**: 228-241.

67. Henry, T. D., Annex, B. H., Azrin, M. A., McKendall, G. R., Willerson, J. T., Hendel, R. C., Giordano, F. J., Klein, R., Gibson, M., Berman, D. S., Luce, C. A., and McKluskey, E. R. Double-blind, placebo controlled trial of recombinant human vascular endothelial growth factor: the VIVA trial. *J Am Coll Cardiol* 33(Suppl.A), 383A. 1999.
Ref Type: Abstract
68. Heymann MA, Payne BD, Hoffman JI, Rudolph AM. Blood flow measurements with radionuclide-labeled particles. *Prog.Cardiovasc.Dis.* 1977; **20**: 55-79.
69. Horvath KA, Doukas J, Lu CY *et al.* Myocardial functional recovery after fibroblast growth factor 2 gene therapy as assessed by echocardiography and magnetic resonance imaging. *Ann.Thorac.Surg.* 2002; **74**: 481-486.
70. Housmans PR. Negative inotropy of halogenated anesthetics in ferret ventricular myocardium. *Am.J.Physiol* 1990; **259**: H827-H834.
71. Housmans PR. Mechanisms of negative inotropy of halothane, enflurane and isoflurane in isolated mammalian ventricular muscle. *Adv.Exp.Med.Biol.* 1991; **301:199-204.**: 199-204.
72. Ignatescu MC, Gharehbaghi-Schnell E, Hassan A *et al.* Expression of the angiogenic protein, platelet-derived endothelial cell growth factor, in coronary atherosclerotic plaques: In vivo correlation of lesional microvessel density and constrictive vascular remodeling. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1999; **19**: 2340-2347.
73. Ikeda E, Achen MG, Breier G, Risau W. Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J.Biol.Chem.* 1995; **270**: 19761-19766.

74. Inou T, Tomoike H, Watanabe K *et al.* A newly developed X-ray transparent ameroid constrictor for study on progression of gradual coronary stenosis. *Basic Res. Cardiol.* 1980; **75**: 537-543.
75. Ito WD, Arras M, Scholz D, Winkler B, Htun P, Schaper W. Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion. *Am.J.Physiol* 1997; **273**: H1255-H1265.
76. Ito WD, Arras M, Winkler B, Scholz D, Schaper J, Schaper W. Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ.Res.* 1997; **80**: 829-837.
77. Jaye M, Schlessinger J, Dionne CA. Fibroblast growth factor receptor tyrosine kinases: molecular analysis and signal transduction. *Biochim.Biophys.Acta* 1992; **1135**: 185-199.
78. Kawasuji M, Nagamine H, Ikeda M *et al.* Therapeutic angiogenesis with intramyocardial administration of basic fibroblast growth factor. *Ann.Thorac.Surg.* 2000; **69**: 1155-1161.
79. Kihara Y, Grossman W, Morgan JP. Direct measurement of changes in intracellular calcium transients during hypoxia, ischemia, and reperfusion of the intact mammalian heart. *Circ.Res.* 1989; **65**: 1029-1044.
80. Kleiman NS, Califf RM. Results from late-breaking clinical trials sessions at ACCIS 2000 and ACC 2000. American College of Cardiology. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2000; **36**: 310-325.
81. Klein C, Nekolla SG, Bengel FM *et al.* Assessment of myocardial viability with contrast-enhanced magnetic resonance imaging: comparison with positron emission tomography. *Circulation* 2002; **105**: 162-167.

82. Kornowski R, Fuchs S, Leon MB, Epstein SE. Delivery strategies to achieve therapeutic myocardial angiogenesis. *Circulation* 2000; **101**: 454-458.
83. Kowallik P, Schulz R, Guth BD *et al.* Measurement of regional myocardial blood flow with multiple colored microspheres. *Circulation* 1991; **83**: 974-982.
84. Kupatt C, Wichels R, Deiss M *et al.* Retroinfusion of NFkappaB decoy oligonucleotide extends cardioprotection achieved by CD18 inhibition in a preclinical study of myocardial ischemia and retroinfusion in pigs. *Gene Ther.* 2002; **9**: 518-526.
85. Laham RJ, Chronos NA, Pike M *et al.* Intracoronary basic fibroblast growth factor (FGF-2) in patients with severe ischemic heart disease: results of a phase I open-label dose escalation study. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2000; **36**: 2132-2139.
86. Laham RJ, Garcia L, Baim DS, Post M, Simons M. Therapeutic Angiogenesis Using Basic Fibroblast Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Using Various Delivery Strategies. *Curr.Interv.Cardiol.Rep.* 1999; **1**: 228-233.
87. Laham RJ, Rezaee M, Post M *et al.* Intrapericardial delivery of fibroblast growth factor-2 induces neovascularization in a porcine model of chronic myocardial ischemia. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2000; **292**: 795-802.
88. Laham RJ, Rezaee M, Post M *et al.* Intracoronary and intravenous administration of basic fibroblast growth factor: myocardial and tissue distribution. *Drug Metab Dispos.* 1999; **27**: 821-826.
89. Laham RJ, Sellke FW, Edelman ER *et al.* 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* 1999; **100**: 1865-1871.

90. Laham RJ, Simons M, Tofukuji M, Hung D, Sellke FW. Modulation of myocardial perfusion and vascular reactivity by pericardial basic fibroblast growth factor: insight into ischemia-induced reduction in endothelium-dependent vasodilatation. *J.THORAC.CARDIOVASC.SURG.* 1998; **116**: 1022-1028.
91. Laitinen M, Hartikainen J, Hiltunen MO *et al.* Catheter-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer to human coronary arteries after angioplasty. *HUM.GENE THER.* 2000; **20**;11: 263-270.
92. LaMarre J, Wollenberg GK, Gonias SL, Hayes MA. Cytokine binding and clearance properties of proteinase-activated alpha 2-macroglobulins. *Lab Invest* 1991; **65**: 3-14.
93. Landau C, Jacobs AK, Haudenschild CC. Intrapericardial basic fibroblast growth factor induces myocardial angiogenesis in a rabbit model of chronic ischemia. *Am.Heart J.* 1995; **129**: 924-931.
94. Lazarous DF, Scheinowitz M, Shou M *et al.* Effects of chronic systemic administration of basic fibroblast growth factor on collateral development in the canine heart. *Circulation* 1995; **91**: 145-153.
95. Lazarous DF, Shou M, Stiber JA *et al.* Pharmacodynamics of basic fibroblast growth factor: route of administration determines myocardial and systemic distribution. *Cardiovasc.Res.* 1997; **36**: 78-85.
96. Lee LY, Patel SR, Hackett NR *et al.* Focal angiogen therapy using intramyocardial delivery of an adenovirus vector coding for vascular endothelial growth factor 121. *Ann.Thorac.Surg.* 2000; **69**: 14-23.

97. Lewis BS, Flugelman MY, Weisz A, Keren-Tal I, Schaper W. Angiogenesis by gene therapy: a new horizon for myocardial revascularization? *Cardiovasc.Res.* 1997; **35**: 490-497.
98. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995; **91**: 2844-2850.
99. Lloyd-Jones DM, Larson MG, Beiser A, Levy D. Lifetime risk of developing coronary heart disease. *Lancet* 1999; **353**: 89-92.
100. Lopez JJ, Edelman ER, Stamler A *et al.* Basic fibroblast growth factor in a porcine model of chronic myocardial ischemia: a comparison of angiographic, echocardiographic and coronary flow parameters. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 1997; **282**: 385-390.
101. Lopez JJ, Edelman ER, Stamler A *et al.* Angiogenic potential of perivascularly delivered aFGF in a porcine model of chronic myocardial ischemia. *Am.J.Physiol* 1998; **274**: H930-H936.
102. Lopez JJ, Laham RJ, Carrozza JP *et al.* Hemodynamic effects of intracoronary VEGF delivery: evidence of tachyphylaxis and NO dependence of response. *Am.J.Physiol* 1997; **273**: H1317-H1323.
103. Lopez JJ, Laham RJ, Stamler A *et al.* VEGF administration in chronic myocardial ischemia in pigs. *Cardiovasc.Res.* 1998; **40**: 272-281.
104. Losordo DW, Vale PR, Symes JF *et al.* Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* 1998; **98**: 2800-2804.

105. Louis AA, Manousos IR, Coletta AP, Clark AL, Cleland JG. Clinical trials update: The Heart Protection Study, IONA, CARISA, ENRICHED, ACUTE, ALIVE, MADIT II and REMATCH. Impact Of Nicorandil on Angina. Combination Assessment of Ranolazine In Stable Angina. ENhancing Recovery In Coronary Heart Disease patients. Assessment of Cardioversion Using Transoesophageal Echocardiography. AzimiLide post-Infarct surVival Evaluation. Randomised Evaluation of Mechanical Assistance for Treatment of Chronic Heart failure. *Eur.J.Heart Fail.* 2002; **4**: 111-116.
106. Mack CA, Patel SR, Schwarz EA *et al.* Biologic bypass with the use of adenovirus-mediated gene transfer of the complementary deoxyribonucleic acid for vascular endothelial growth factor 121 improves myocardial perfusion and function in the ischemic porcine heart. *J.THORAC.CARDIOVASC.SURG.* 1998; **115**: 168-176.
107. Mazue G, Bertolero F, Jacob C, Sarmientos P, Roncucci R. Preclinical and clinical studies with recombinant human basic fibroblast growth factor. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1991; **638:329-40.**: 329-340.
108. Miyamae M, Fujiwara H, Kida M *et al.* Preconditioning improves energy metabolism during reperfusion but does not attenuate myocardial stunning in porcine hearts. *Circulation* 1993; **88**: 223-234.
109. Miyataka M, Ishikawa K, Katori R. Basic fibroblast growth factor increased regional myocardial blood flow and limited infarct size of acutely infarcted myocardium in dogs. *Angiology* 1998; **49**: 381-390.
110. Moulton KS, Heller E, Konerding MA, Flynn E, Palinski W, Folkman J. Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 1999; **99**: 1726-1732.

111. Nabel EG, Yang ZY, Plautz G *et al.* Recombinant fibroblast growth factor-1 promotes intimal hyperplasia and angiogenesis in arteries in vivo. *Nature* 1993; **362**: 844-846.
112. Namiki A, Brogi E, Kearney M *et al.* Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *J.Biol.Chem.* 1995; **270**: 31189-31195.
113. Nekolla SG, Miethaner C, Nguyen N, Ziegler SI, Schwaiger M. Reproducibility of polar map generation and assessment of defect severity and extent assessment in myocardial perfusion imaging using positron emission tomography. *Eur.J.Nucl.Med.* 1998; **25** : 1313-1321.
114. O'Brien ER, Garvin MR, Dev R *et al.* Angiogenesis in human coronary atherosclerotic plaques. *Am.J.Pathol.* 1994; **145**: 883-894.
115. O'Konski MS, White FC, Longhurst J, Roth D, Bloor CM. Ameroid constriction of the proximal left circumflex coronary artery in swine. A model of limited coronary collateral circulation. *Am.J.Cardiovasc.Pathol.* 1987; **1**: 69-77.
116. Pearlman JD, Hibberd MG, Chuang ML *et al.* Magnetic resonance mapping demonstrates benefits of VEGF-induced myocardial angiogenesis. *Nat.Med.* 1995; **1**: 1085-1089.
117. Pearse DB, Dahms TE, Wagner EM. Microsphere-induced bronchial artery vasodilation: role of adenosine, prostacyclin, and nitric oxide. *Am.J.Physiol* 1998; **274**: H760-H768.
118. Prinzen FW, Glenny RW. Developments in non-radioactive microsphere techniques for blood flow measurement. *Cardiovasc.Res.* 1994; **28**: 1467-1475.
119. Raab S, Thein E, Harris AG, Messmer K. A new sample-processing unit for the fluorescent microsphere method. *Am.J.Physiol* 1999; **276**: H1801-H1806.

120. Rahimtoola SH. The hibernating myocardium. *Am.Heart J.* 1989; **117**: 211-221.
121. Rajanayagam MA, Shou M, Thirumurti V *et al.* Intracoronary basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral perfusion in dogs. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2000; **35**: 519-526.
122. Renner LE, Morton MJ, Sakuma GY. Indicator amount, temperature, and intrinsic cardiac output affect thermodilution cardiac output accuracy and reproducibility. *Crit Care Med.* 1993; **21**: 586-597.
123. Resnick N, Gimbrone MA, Jr. Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. *FASEB J.* 1995; **9**: 874-882.
124. Resnick N, Yahav H, Khachigian LM *et al.* Endothelial gene regulation by laminar shear stress. *Adv.Exp.Med.Biol.* 1997; **430:155-64.**: 155-164.
125. Rosengart TK, Lee LY, Patel SR *et al.* 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* 1999; **100**: 468-474.
126. Ross J, Jr., Gallagher KP, Matzusaki M, Lee JD, Guth B, Goldfarb R. Regional myocardial blood flow and function in experimental myocardial ischemia. *Can.J.Cardiol.* 1986; **Suppl A:9A-18A.**: 9A-18A.
127. Roth DM, Maruoka Y, Rogers J, White FC, Longhurst JC, Bloor CM. Development of coronary collateral circulation in left circumflex Ameroid-occluded swine myocardium. *Am.J.Physiol* 1987; **253**: H1279-H1288.

128. Ryden L, Tadokoro H, Sjoquist PO *et al.* Pharmacokinetic analysis of coronary venous retroinfusion: a comparison with anterograde coronary artery drug administration using metoprolol as a tracer. *J.Am.Coll.Cardiol.* 1991; **18**: 603-612.
129. Sato K, Laham RJ, Pearlman JD *et al.* Efficacy of intracoronary versus intravenous FGF-2 in a pig model of chronic myocardial ischemia. *Ann.Thorac.Surg.* 2000; **70**: 2113-2118.
130. Sato K, Wu T, Laham RJ *et al.* Efficacy of intracoronary or intravenous VEGF165 in a pig model of chronic myocardial ischemia. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2001; **37**: 616-623.
131. Schaper W. Collateral vessel growth in the human heart: Role of fibroblast growth factor-2. *Circulation* 1996; **94/4**: -601.
132. Schaper W. Quo vadis collateral blood flow? A commentary on a highly cited paper [comment]. *Cardiovasc.Res.* 2000; **45**: 220-223.
133. Schaper W, Buschmann I. Arteriogenesis, the good and bad of it. *Cardiovasc.Res.* 1999; **43** : 835-837.
134. Schaper W, Buschmann I. Collateral circulation and diabetes [editorial]. *Circulation* 1999; **99**: 2224-2226.
135. Schaper W, Gorge G, Winkler B, Schaper J. The collateral circulation of the heart. *Prog.Cardiovasc.Dis.* 1988; **31**: 57-77.
136. Schaper W, Ito WD. Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circ.Res.* 1996; **79**: 911-919.
137. Schaper W, Jageneau A, Xhonneux R. The development of collateral circulation in the pig and dog heart. *Cardiology* 1967; **51**: 321-335.

138. Schaper W, Sharma HS, Quinkler W, Markert T, Wunsch M, Schaper J. Molecular biologic concepts of coronary anastomoses. *J.Am.Coll.Cardiol.* 1990; **15**: 513-518.
139. Scholz D, Ito W, Fleming I *et al.* Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis). *Virchows Arch.* 2000; **436**: 257-270.
140. Schumacher B, Pecher P, Von Specht BU, Stegmann T. Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors: first clinical results of a new treatment of coronary heart disease. *Circulation* 1998; **97**: 645-650.
141. Seiler C, Pohl T, Wustmann K *et al.* Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Circulation* 2001; **104**: 2012-2017.
142. Sellke FW, Li J, Stamler A, Lopez JJ, Thomas KA, Simons M. Angiogenesis induced by acidic fibroblast growth factor as an alternative method of revascularization for chronic myocardial ischemia. *Surgery* 1996; **120**: 182-188.
143. Selwyn AP, Yeung AC, Ryan TJ, Jr., Raby K, Barry J, Ganz P. Pathophysiology of ischemia in patients with coronary artery disease. *Prog.Cardiovasc.Dis.* 1992; **35**: 27-39.
144. Simons M, Bonow RO, Chronos NA *et al.* Clinical trials in coronary angiogenesis: issues, problems, consensus: An expert panel summary. *Circulation* 2000; **102**: E73-E86.
145. Sjoquist PO, Duker G, Almgren O. Distribution of the collateral blood flow at the lateral border of the ischemic myocardium after acute coronary occlusion in the pig and the dog. *Basic Res.Cardiol.* 1984; **79**: 164-175.

146. Stern MD, Silverman HS, Houser SR *et al.* Anoxic contractile failure in rat heart myocytes is caused by failure of intracellular calcium release due to alteration of the action potential. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1988; **85**: 6954-6958.
147. Sueishi K, Kumamoto M, Sakuda H, Tanaka K. Angiogenic processes in the pathogenesis of human coronary atherosclerosis. *Curr.Top.Pathol.* 1993; **87:47-58**: 47-58.
148. Swindle MM. Swine as replacements for dogs in the surgical teaching and research laboratory. *Lab Anim Sci.* 1984; **34**: 383-385.
149. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E *et al.* Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J.Clin.Invest* 1994; **93**: 662-670.
150. Tateno S, Terai M, Niwa K *et al.* Alleviation of myocardial ischemia after Kawasaki disease by heparin and exercise therapy. *Circulation* 2001; **103**: 2591-2597.
151. Thein E, Raab S, Harris AG, Messmer K. Automation of the use of fluorescent microspheres for the determination of blood flow. *Comput.Methods Programs Biomed.* 2000; **61**: 11-21.
152. Tsurumi Y, Takeshita S, Chen D *et al.* Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion. *Circulation* 1996; **94**: 3281-3290.
153. Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Amouyel P, Arveiler D, Rajakangas AM, Pajak A. Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization MONICA Project. Registration procedures, event rates, and case-fatality rates in 38 populations from 21 countries in four continents. *Circulation* 1994; **90**: 583-612.

154. Uchida Y, Yanagisawa-Miwa A, Nakamura F *et al.* Angiogenic therapy of acute myocardial infarction by intrapericardial injection of basic fibroblast growth factor and heparin sulfate: an experimental study. *Am.Heart J.* 1995; **130**: 1182-1188.
155. Unger EF, Banai S, Shou M *et al.* A model to assess interventions to improve collateral blood flow: Continuous administration of agents into the left coronary artery in dogs. *Cardiovasc.Res.* 1993; **27/5**: -791).
156. Unger EF, Banai S, Shou M *et al.* Basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral flow in a canine model. *Am.J.Physiol* 1994; **266**: H1588-H1595.
157. Verdouw PD, Wolffenbuttel BH, van der Giessen WJ. Domestic pigs in the study of myocardial ischemia. *Eur.Heart J.* 1983; **4 Suppl C:61-7.**: 61-67.
158. vom DJ, Herman WH, Hicks RJ *et al.* Myocardial glucose uptake in patients with insulin-dependent diabetes mellitus assessed quantitatively by dynamic positron emission tomography. *Circulation* 1993; **88**: 395-404.
159. von Degenfeld G, Giehrl W, Boekstegers P. Targeting of dobutamine to ischemic myocardium without systemic effects by selective suction and pressure-regulated retroinfusion. *Cardiovasc.Res.* 1997; **35**: 233-240.
160. Wahrborg P. Quality of life after coronary angioplasty or bypass surgery. 1-year follow-up in the Coronary Angioplasty versus Bypass Revascularization investigation (CABRI) trial. *Eur.Heart J.* 1999; **20**: 653-658.
161. Waltenberger J, Usuki K, Fellstrom B, Funa K, Heldin CH. Platelet-derived endothelial cell growth factor. Pharmacokinetics, organ distribution and degradation after intravenous administration in rats. *FEBS Lett.* 1992; **313**: 129-132.

162. Walter B, Bauer R, Gaser E, Zwiener U. Validation of the multiple colored microsphere technique for regional blood flow measurements in newborn piglets. *Basic Res. Cardiol.* 1997; **92**: 191-200.
163. Ware JA, Simons M. Angiogenesis in ischemic heart disease. *Nat. Med.* 1997; **3**: 158-164.
164. Weaver ME, Pantely GA, Bristow JD, Ladley HD. A quantitative study of the anatomy and distribution of coronary arteries in swine in comparison with other animals and man. *Cardiovasc. Res.* 1986; **20**: 907-917.
165. Whalen GF, Shing Y, Folkman J. The fate of intravenously administered bFGF and the effect of heparin. *Growth Factors* 1989; **1**: 157-164.
166. White FC, Bloor CM. Coronary collateral circulation in the pig: correlation of collateral flow with coronary bed size. *Basic Res. Cardiol.* 1981; **76**: 189-196.
167. White FC, Carroll SM, Magnet A, Bloor CM. Coronary collateral development in swine after coronary artery occlusion. *Circulation Research* 1992; **71**: 1490-1500.
168. Yanagisawa-Miwa A, Uchida Y, Nakamura F *et al.* Salvage of infarcted myocardium by angiogenic action of basic fibroblast growth factor. *Science* 1992; **257**: 1401-1403.

Curriculum vitae

Persönliche Daten:	Philip Wolfram Joseph Raake geboren am 21. April 1975 in München
Eltern:	Prof. Dr. Dr. Wolfram Raake, Pharmakologe Helga Raake, Apothekerin
Nationalität:	Deutsch
Familienstand:	ledig
Ersatzdienst: 12/1994-11/2001	Katastrophenschutz des Bayerischen Roten Kreuzes des Landkreises Ebersberg
Schulbildung: 1981-1985 1985-1994 1994	Grundschule München-Denning und Baldham Gymnasium Vaterstetten Abitur: Leistungskurse Mathematik und Biologie (Note 1,9)
Studium: 1994-1995 1995-1997 März 1997 1997-1998 März 1998 1998-2000 September 2000 Oktober 2000 – September 2001 November 2001	Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes in Homburg Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians- Universität München Physikum Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians- Universität München Erstes Staatsexamen (Note gut) Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians- Universität München Zweites Staatsexamen (Note gut) Praktisches Jahr Drittes Staatsexamen (Note sehr gut)
Förderung: 11/1999-10/2000	Förderung durch die Rudolf und Brigitte Zenner Stiftung
Berufliche Tätigkeit: seit Januar 2002	Arzt im Praktikum an der Medizinischen Klinik I, Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Peter Boekstegers möchte ich sehr für die Überlassung des Themas und die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe danken. Durch sein ständiges aufmunterndes Interesse und seine wertvollen Anregungen trug er entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Mein besonderer Dank gilt ebenso Herrn Dr. med. Georges von Degenfeld für die Einführung in die wissenschaftliche Arbeit auf einem hochinteressanten experimentellen Forschungsgebiet. Unter seiner Anleitung in methodischen und inhaltlichen Fragen kamen maßgebliche Teile dieser Arbeit zustande.

Allen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe, insbesondere Frau Susanne Helbig und Frau Elisabeth Ronft, möchte ich für die vielfältige Unterstützung danken, ohne die die vorliegende Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Herr Prof. Dr. med. K. Meßmer stellte uns die Räumlichkeiten des Institutes für Chirurgische Forschung zur Durchführung unserer Experimente zur Verfügung, wofür ich mich sehr herzlich bedanken möchte. Für die freundliche Aufnahme am Institut für Chirurgische Forschung sowie die vielfachen bereitwilligen Hilfen möchte ich allen Mitarbeitern des Institutes danken.