

Aus der Klinik für Kardiologie und Angiologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg



**Zelltransplantation zur Förderung der Kollateralenbildung
im murinen Modell der Hinterlauf-Ischämie**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Vorgelegt von Martin Wagner

aus Quedlinburg

Magdeburg 2017

I Dokumentationsblatt und Schlüsselwörter

Bibliographische Beschreibung:

Wagner, Martin:

Zelltransplantation zur Förderung der Kollateralenbildung

im murinen Modell der Hinterlauf-Ischämie – 2017. – 104 Bl., 30 Abb., 11 Tab.,

Schlüsselwörter:

Gefäßerkrankung, Arteriogenese, Angiogenese, Kollateralen, Monozyten, Zelltransplantation

Kurzreferat:

Die hier vorliegende wissenschaftliche Arbeit beschäftigt sich mit den Eigenschaften, sowie der Wirkung humaner Monozyten auf die Prozesse der Arterio- und Angiogenese. Dafür wurden Monozyten aus dem Blut gesunder Spender isoliert und für 24 Stunden unter verschiedenen Konditionen kultiviert. Die isolierten Monozyten wurden in Bezug auf Proteinaufnahme, Zellvitalität und Zellmigration hin untersucht, um so deren Funktionsfähigkeit zu überprüfen.

Es erfolgte eine intravenöse Injektion der isolierten Monozyten in BALB/c- Mäuse, welchen einen Tag vor Injektion die *A. femoralis* einseitig ligiert worden war. Das hier angewandte Modell der Hinterlauf- Ischämie sollte den Zustand einer peripheren, arteriellen Verschlusskrankheit abbilden und so der Entwicklung neuer Behandlungsstrategien dienen.

Die Transplantation der Zellen führte nach 21 Tagen zu einer Verbesserung der Perfusion im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche nur NaCl injiziert bekam. In histologischen Untersuchungen zeigte sich eine verstärkte Arteriogenese durch eine vermehrte Anzahl an Kollateralen im Oberschenkel der zelltransplantierten Tiere. Die so behandelten Mäuse zeigten einen weniger eingeschränkten Allgemeinzustand im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ein aus dem Blutserum der Versuchstiere durchgeführter Zytokinassay sollte Rückschlüsse auf die ablaufenden molekularen Mechanismen erlauben.

Die Ergebnisse der Untersuchungen weisen Funktionalität und Arteriogenese fördernde Wirkung der isolierten Zellen nach und sind daher ein wichtiger Zwischenschritt zur therapeutischen Nutzung der Monozytentransplantation im Menschen.

II Inhaltsverzeichnis

I	Dokumentationsblatt und Schlüsselwörter	II
II	Inhaltsverzeichnis	III
III	Abkürzungsverzeichnis	VI
1	Einführung	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Möglichkeiten des Gefäßwachstums	3
1.2.1	Arteriogenese	3
1.2.2	Vaskulogenese	6
1.2.3	Angiogenese	6
1.3	Therapieansätze zur Steigerung des Gefäßwachstums	8
1.3.1	Gentherapie	8
1.3.2	Zelltherapie	9
1.3.2.1	Vorläuferzellen	9
1.3.2.2	Monozyten	10
1.4	Monozytenbiologie	11
2	Zielsetzung der Arbeit	14
3	Materialien	15
3.1	Versuchstiere	15
3.2	OP- Material und Allgemeine Utensilien	16
3.3	Anästhesie- und Injektionsmaterialien	17
3.4	Zellkultur, Monozytenisolation	18
3.5	Histologie	19
3.6	Antikörper	20
3.7	Durchflusszytometrie	21
3.8	Eigenansätze	21
3.9	Zytokinassay, Blutentnahme	21
3.10	Software	22

4	Methoden	23
4.1	Zellisolation, Kultivierung und Charakterisierung	23
4.1.1	Monozytenisolation aus humanen Leukozytenfiltern	23
4.1.2	Überprüfung der Zellviabilität	25
4.1.3	Phagozytosefunktion humaner Monozyten	25
4.1.4	Prinzip der Durchflusszytometrie	27
4.1.5	Durchführung der Durchflusszytometrie	28
4.2	Vorbereitung und Ablauf des operativen Eingriffs am murinen Hinterlauf	29
4.2.1	Dokumentation und Maßnahmen vor Tierversuchen	29
4.2.2	Narkotisierung der Versuchstiere	29
4.2.3	Operation	31
4.2.4	Prinzip der Laser-Doppler-Messung	33
4.2.5	Durchführung der Perfusionsmessung	34
4.3	Monozytenhoming	35
4.3.1	Zellmarkierung	35
4.3.2	Prinzip der Intravitalmikroskopie	36
4.3.3	Durchführung der Intravitalmikroskopie	38
4.3.4	Zelltransplantation	39
4.4	Histologische Untersuchungen	40
4.4.1	Muskelentnahme	40
4.4.2	Immunhistologie	41
4.4.3	Biometrie	43
4.5	Blutentnahme und Zytokinassay	43
4.6	Statistik	44
5	Ergebnisse	45
5.1	Durchflusszytometrie	45
5.2	Zellviabilität	49
5.3	Überprüfung der Phagozytosefähigkeit humaner Monozyten	51
5.4	Wahl des Mausstammes	52
5.5	Perfusionsmessung nach intravenöser Monozytenapplikation	54
5.6	Klinische Untersuchung der Mäuse	55

5.7	Histologie	57
5.7.1	Kollateralentwicklung im murinen Hinterlauf	57
5.7.2	Angiogenese der Unterschenkelmuskulatur	58
5.7.3	Homing der Monozyten	60
5.8	Intravitalmikroskopie	61
5.9	Zytokinassay	63
6	Diskussion	66
6.1	Isolation und Kultivierung humaner Monozyten	66
6.2	Hinterlauf- Ischämie- Modell und Perfusionsmessung	68
6.3	Histologische Untersuchungen und Intravitalmikroskopie	69
6.4	Transplantation humaner Monozyten	72
6.5	Ausblick	75
7	Zusammenfassung	77
8	Literaturverzeichnis	79
9	Abbildungsverzeichnis	88
10	Tabellenverzeichnis	90
11	Danksagungen	91
12	Ehrenerklärung	92
13	Bildungsweg	93
14	Publikationen, Kongressbeiträge, Stipendien, Preise	94
14.1	Publikationen	94
14.2	Kongressbeiträge	94
14.3	Preise und Stipendien	96

III Abkürzungsverzeichnis

α -SMA	Alpha-Smooth-Muscle-Actin
A.	Arteria
Aa.	Arteriae
Abb.	Abbildung
ABI	Ankle-Brachial-Index
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
APC	Allophycocyanin
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BSA	Bovines Serum Albumin
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzenimeter
cm ³	Kubikzentimeter
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of Differentiation
CFSE	5(6) Carboxyfluorescein diacetate <i>N</i> -succinimidylester
CT	Computertomographie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DiD	1,1'-Dioctodaecyl-3,3,3',3'Tetramethylindodicarbocyanin Perchlorat
DiO	3,3'-Dioctadecyloxacarboocyanin Perchlorat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
FACS	Fluoreszenz-Aktivierte-Zellsortierung
FCS	Fetales Kälberserum
FGF-2	Fibroblast Growth Factor-2
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter
g	Gramm, Gravitationskraft
G	Gravitationsskonstante, Gauge
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen- Kolonie Stimulierender Faktor
HIF-1 α	Hypoxia-Inducible Factor 1-Alpha
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen- Antigen D related

IE	Internationale Einheit
IFN- γ	Interferon-gamma
IGF-1	Insulin-Like Growth Factor-1
IL	Interleukin
KC	Keratinocyte-derived Cytokine
KG	Körpergewicht
LDPI	Laser-Doppler-Perfusion-Imaging
λ	Lambda = Formelzeichen für die Wellenlänge
l	Liter
MCP-1	Makrophagen Chemoattraktorprotein-1
M-CSF	Monozytenkolonien-Stimulierender Faktor
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIP-	Macrophage Inflammatory Protein
min	Minute
Mm	Musculi
mM	Millimolar
Mio.	Millionen
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
N.	Nervus
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
n.s.	Nicht Signifikant
rpm	Revolutions per Minute/ Umdrehungen pro Minute
ml	Milliliter
pAVK	Periphere Arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PE	Phycoerythrin
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion molecule-1
PerCP	Peridinin Chlorophyll Proteinkomplex
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
RANTES	Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed an Secreted

ρ	Rho- Formelzeichen für die Dichte eines Stoffes
SSC	Sideward Scatter
Tab.	Tabelle
tcpO ₂	Transkutaner-Sauerstoffdruck
TGF- β	Transforming Growth Factor-Beta
TNF- α	Tumornekrosefaktor-Alpha
V.	Vena
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vs.	Versus
Vv.	Venae
%	Prozent

1 Einführung

1.1 Einleitung

Lebenserwartung und Lebensstandard heutiger Generationen, vor allem in westlichen Ländern, liegen weit über denen unserer Vorfahren. Dieser glückliche Umstand hat allerdings auch eine Kehrseite: Haupttodesursachen westlicher Industrienationen sind kardiovaskuläre Erkrankungen[1]. Bewegungsmangel, Überernährung, Diabetes, Nikotinkonsum und Bluthochdruck sind die wichtigsten Gründe für Erkrankungen dieser Art. Es kommt zu Cholesterinablagerungen in Gefäßen, der sogenannten Atherosklerose, die die Blutversorgung von Organen durch Entwicklung von Gefäßstenosen einschränkt. Dieser Prozess ist schleichend und wird von Patienten oft erst in Akutsituationen wahrgenommen[2]. Je nach Lokalisation der Gefäßablagerung können Schlaganfall, Herzinfarkt und periphere arterielle Verschlusskrankheit die Folge sein. Neben präventiven Maßnahmen, wie Ernährungsumstellung, Nikotinabstinenz und regelmäßiger sportlicher Betätigung wird versucht, Ursachen und Progress der Atherosklerose durch Medikamente und operative Maßnahmen zu verlangsamen. Statine, ACE-Hemmer, Acetylsalicylsäure bei koronarer Herzerkrankung, Cilostazol[3] bei pAVK und Stickstoffdonatoren bei Angina Pectoris sind Medikamente, die ihren Einsatz bei kardiovaskulären Erkrankungen finden.

Oftmals ist allerdings ein interventioneller Eingriff nötig, um Beschwerden zu bessern. Dies ist beim Vorhandensein hämodynamisch relevanter Stenosen der Fall. Als hämodynamisch relevant werden Stenosen ab 75 % des Durchmessers vom ursprünglichen Gefäßlumen betrachtet. An dieser Stelle gibt es die Möglichkeit ein chirurgisches Verfahren anzuwenden. Bei Bypassoperationen kommt es zur Überbrückung von Stenosen durch körpereigene Materialien. Zum einen gibt es die Möglichkeit Venen zur Überbrückung zu verwenden. Vorwiegend wird dabei die *V. saphena magna* genutzt. Eine andere Möglichkeit zur Überbrückung von Gefäßstenosen bietet die Verwendung biologischer oder künstlicher Gefäßprothesen. Neben der Bypassanlage besteht die Möglichkeit der Entfernung der Plaques durch sogenannte Thrombendarterektomien. Zu den großen chirurgischen Eingriffen lässt sich allerdings sagen, dass die Kosten für die Verfahren oftmals höher und mit längeren Krankenhausaufenthalten für Patienten verbunden sind[4]. Eine weitere Methode, die sowohl am Herzen, als auch bei der pAVK angewandt wird ist die Angioplastie. Hierbei wird mit einem Ballonkatheter, nach angiographischer Darstellung des Gefäßes, die Engstelle aufgedehnt und so eine Rekanalisation erreicht. Eine weitere Möglichkeit ist die Implantation

von Stents. Dabei wird wie bei der Angioplastie ein Ballon genutzt, der dazu dient die Stenose aufzuweiten. Um den Ballon liegt ein expandierendes Drahtgeflecht, welches auf Höhe der Stenose verbleibt und so eine erneute Lumeneinengung verhindern soll. Hierbei gibt es sowohl beschichtete, als auch unbeschichtete Stents, die je nach Patientenbedarf eingesetzt werden können. Beschichtete Stents setzen Wirkstoffe frei, welche einer Reendothelialisierung des Stents entgegen wirken. Dadurch ist zwar einerseits eine längere Gabe gerinnungshemmender Medikamente nötig, um eine Stentthrombose zu verhindern, andererseits zeigen diese Stents auch längere Offenheitsraten im Vergleich mit unbeschichteten Stents[5]. Eine Stentimplantation hat im Gegensatz zur Angioplastie nach zwei Jahren eine längere Offenheitsrate und somit einen entscheidenden Vorteil[6]. Bei komplexen oder langstreckigen Stenosen, können diese minimalinvasiven Methoden allerdings nicht eingesetzt werden und man muss auf oben genannte chirurgische Verfahren zurückgreifen.

Aber auch die invasiven-, operativen Therapieoptionen kommen bei einem oft multimorbiden Patientengut an ihre Grenzen. Dann kommt bei der pAVK oftmals nur die Amputation der betroffenen Gliedmaße in Betracht, da sonst durch eine drohende Sepsis Lebensgefahr bestünde. Neben einer hohen emotionalen Belastung bedeuten solche Amputationen, aufgrund schwerwiegender Komplikationen oft auch einen höheren finanziellen Aufwand im Gegensatz zu den anderen Therapiemöglichkeiten[7].

Durch die Erforschung der zugrunde liegenden Mechanismen der Atherosklerose, aber auch von perfusionsverbessernden endogenen Mechanismen des Körpers, entstehen fortwährend neue Ansätze zur Therapie von Gefäßerkrankungen. Die Anwendung von Wachstumsfaktoren, wie VEGF konnte im Mausmodell zur pAVK vielversprechende Ergebnisse erzielen. Allerdings geht man davon aus, dass die bloße Gabe von Wachstumsfaktoren nicht den erwarteten Durchbruch in der Therapie ischämischer Gefäßkrankheiten bringen kann[8]. Vielmehr liegt die Vermutung nahe die natürlichen Kompensationsmechanismen des Körpers durch die Gabe von Zellen zu fördern. Diese können mit anderen Zellen interagieren und eine Vielzahl von Faktoren sezernieren. Diese Eigenschaften bilden die ablaufenden Prozesse realistischer nach, als die Gabe von Einzelfaktoren. Mononukleäre, autologe Zellen, d.h. Zellen desselben Individuums, aus dem Knochenmark konnten im Tiermodell[9], aber auch bereits bei pAVK- Patienten intramuskulär appliziert eine Besserung des Krankheitsverlaufs durch eine Steigerung des Gefäßwachstums im betroffenen Gebiet erreichen[10]. Diese mononukleären Zellen, allen voran Monozyten spielen eine entscheidende Rolle bei der Arteriogenese, die Reperfusion

ischämischer Gebiete durch die Bildung von Umgehungskreisläufen. Unsere Forschungsgruppe beschäftigt sich mit der Transplantation von Monozyten zur Förderung der Arteriogenese, um Erkenntnisse in naher Zukunft in die klinische Anwendung zu bringen.

1.2 Möglichkeiten des Gefäßwachstums

1.2.1 Arteriogenese

Die Entstehung von Umgehungskreisläufen, sogenannten Kollateralen, bei okklusiven Gefäßerkrankungen wie der peripheren ischämischen Gefäßkrankheit ist enorm wichtig für den Erhalt ischämischer Gewebe und Organe. In den meisten Fällen entstehen diese ischämischen Gefäßkrankheiten durch den schleichenden Prozess der Atherosklerose, die zu einer zunehmenden Verengung von Gefäßen führt. Kommt es zu einer hämodynamisch relevanten Stenose, führt diese zu einem Druckgradienten. Vor der Stenose ist der Druck erhöht, dahinter erniedrigt. Dadurch entstehen unterschiedliche Fließgeschwindigkeiten, die sich mithilfe des Hagen-Poiseuilleschen-Gesetzes erklären lassen. Dieses Gesetz erfasst den Umstand, dass es sich bei Blut um keine homogene Flüssigkeit handelt, denn im Gegensatz zu Wasser enthält Blut zelluläre Bestandteile, Proteine und weitere Inhaltsstoffe, die die Fließeigenschaften und die Viskosität, die Zähigkeit des Blutes, beeinflussen.

$$\mathcal{Q} = \frac{\pi \times r^4 \times \Delta p}{8 \times \eta \times l}$$

Abbildung 1: Hagen-Poiseuille-Gesetz. \mathcal{Q} = Stromstärke; π = Kreiszahl; r = Radius;

Δp = Druckdifferenz; η = Viskosität; l = Gefäßlänge

Aus dieser Formel ist ersichtlich, dass eine erhöhte Druckdifferenz und vor allem ein erhöhter Radius, der durch die 4er Potenz enormen Einfluss ausübt, mit einer erhöhten Stromstärke einhergehen (Abb. 1). Diese erhöhte Stromstärke führt zu einem sogenannten *shear stress*, der als Hauptfaktor für die Ausreifung von Kollateralgefäßen angesehen wird. Dieser *shear stress* übt einen erhöhten Druck auf das Endothel und die umliegende Gefäßwand aus[11]. Das Blut wird durch den erhöhten Druck nun in die unreifen Netzwerke von Kollateralen geleitet (Abb. 2).

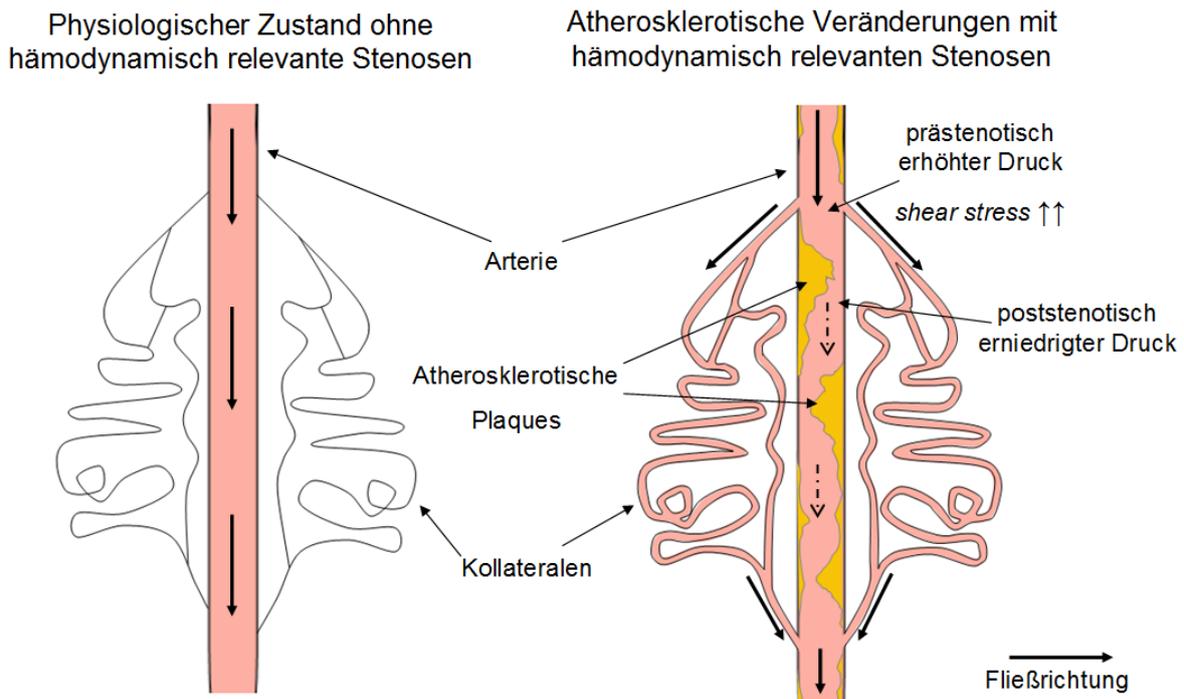


Abbildung 2: Schematischer Mechanismus der Arteriogenese.

Durch die erhöhte mechanische Belastung kommt es zu einer Aktivierung von Gefäßendothelzellen, die nun Zytokine und Wachstumsfaktoren sezernieren, welche eine Differenzierung in funktionstüchtigen Kollateralen bedingen.

Diese Kollateralgefäße bestehen als Arteriolen bereits vor der Entstehung einer Stenose. Die Anzahl und die Entwicklung von präexistenten Kollateralgefäßen unterscheidet sich allerdings sowohl zwischen, aber auch innerhalb verschiedener Spezies[12, 13]. Der Umbau der Kollaterale, das sogenannte *remodelling* ist komplex und die genaue Erforschung des Ablaufs ist Bestandteil früherer und gegenwärtiger Forschung.

Die Endothelzellen sorgen für eine erhöhte Expression von Genen, die die parakrine Ausschüttung von Stickstoffmonoxid, MCP-1, GM-CSF und TNF- α fördern[14]. Stickstoffmonoxid ist ein kurzlebiges Radikal, welches eine Erweiterung der Gefäße bewirkt. MCP-1 sorgt für die Anlockung von Monozyten, die durch Selektine auf ihrer Oberfläche an auf der Endotheloberfläche exprimierten Oberflächenmoleküle, wie ICAM-1 und VCAM-1[15], anheften und in das Gewebe einwandern[11]. Dort sorgen GM-CSF und TNF- α , welche hauptsächlich durch Monozyten ausgeschüttet werden, für ein monozytenfreundliches Milieu[16]. Diese Konstellation ähnelt dem Zustand einer Entzündung, was wiederum erklärt, dass eine Entzündung ein fördernder Faktor für die Entwicklung von Kollateralgefäßen ist[17]. Neben Monozyten werden auch Blutplättchen, Mastzellen, sowie weitere Leukozyten, vor allem CD4- und CD8-positive T-Zellen[18], angezogen. All diese Zellen sezernieren angio- und arteriogenesfördernde Zytokine wie

VEGF, bFGF, TGF- β , IL-8, PDGF, IGF-1 und Proteinasen, wodurch weitere Zellen an Orte der Arteriogenese wandern[19-22]. Sobald Monozyten in das Gewebe, genauer die Media der Gefäße eingewandert sind, entwickeln sie sich zu ortsständigen Makrophagen und führen durch die Ausschüttung von Proteinasen zur Degradierung der extrazellulären Matrix. Dadurch entsteht genügend Raum für die Einwanderung von glatten Muskelzellen und Stromazellen. Des Weiteren kommt es zu einer Auflockerung der *lamina elastica interna*, welche bei Arteriolen im Gegensatz zu den Arterien direkt unterhalb der Endothelzellen liegt. Die glatten Muskelzellen verlieren ihren kontraktilen Charakter und übernehmen Synthese- und Proliferationsfunktionen. Auch die Endothelzellen proliferieren und führen so zu einem weiteren Aufbau der Kollateralen.

Es kommt zu einer Stabilisierung und Vergrößerung des Gefäßes, dessen Durchmesser bis zu 20 fach vergrößert werden kann[21]. Nach einem anfänglich konfusen Aufbau in der ersten Phase kommt es nun zu einer Organisierung der glatten Muskelzellen, die sich ringförmig anordnen und außerdem durch die Produktion von Elastin und Kollagen zu weiterer Stabilität führen[23,24].

Nicht alle Kollateralen durchlaufen einen so komplexen und nachhaltigen Umbau zu suffizienten vergrößerten Gefäßen. Ein Teil der umgebauten Kollateralen wird degradiert und trägt nur geringfügig zur Reperfusion ischämischer Gewebe bei. Ein Grund hierfür kann die fehlende Rekrutierung glatter Muskelzellen sein[25]. Oftmals sind es wenige, aber dafür sehr ausgereifte Kollateralen, die den Blutfluss nach der sukzessiven Entstehung einer Stenose übernehmen. Makroskopisch imponieren diese Gefäße geschlängelt. Der Grund dafür ist nicht bekannt. Eine Theorie ist die lokal unterschiedliche mechanische Belastung der Gefäßwand, die alternierende Hauptrichtungen des Umbaus bewirken[26]. Weiterhin bleibt unklar, wie genau die Endothelzellen, bzw. deren Umgebung den Reiz des *shear stress* wahrnehmen können. Trotz der Entwicklung von Umgehungskreisläufen kann die Perfusion der unterversorgten Gebiete nur zu einem geringen Teil kompensiert werden, was bei Patienten vor allem durch Belastungsschmerz deutlich wird. Experten vermuten als Grund für diese unzureichende endogene Kompensation von Stenosen eine durch die Kollateralisierung zunehmende Abnahme des *shear stress*. Dadurch würde eine weitere Kompensation unterbrochen[27]. In körperlicher Ruhe sind Gefäße oft noch in der Lage den benötigten Blutfluss zu gewährleisten. Durch die Steigerung der Belastung steigt allerdings der Perfusionsbedarf. Dieser kann dann auch trotz der entstandenen Umgehungskreisläufe nicht mehr gewährleistet werden. Erst in Folge hochgradiger Stenosen, und bei akuten Gefäßverschlüssen, kommt es dann auch zu einem Ruheschmerz.

1.2.2 Vaskulogenese

Die Vaskulogenese beschreibt die Entstehung von Gefäßen im Embryo aus Blutgefäßvorläuferzellen, den sogenannten Hämangioblasten. Mesodermale Zellen im Bereich des Dottersacks lagern sich zu Blutinseln zusammen. Der innere Teil dieser Zellen entwickelt sich zu hämatopoetischen Vorläuferzellen, wohingegen der äußere Teil zu Endothelzellen differenziert. Diese Differenzierung wird durch Faktoren wie VEGF, FGF-2[16] und bFGF bestimmt. Im adulten Organismus wurden im Knochenmark, sowie im Blut zirkulierende endotheliale Prekursorzellen gefunden, die auch eine Vaskulogenese im adulten Organismus nahe legen[28,29]. Allerdings vermutet man eine eher untergeordnete Bedeutung. Die Neuentstehung von Gefäßen im adulten Organismus wird hauptsächlich durch die Angiogenese gewährleistet.

1.2.3 Angiogenese

Im Gegensatz zur Arteriogenese beschreibt die Angiogenese eine sogenannte *de novo* Synthese von Gefäßen, die im menschlichen Körper sowohl physiologisch, als auch pathologisch vorkommt. Ein Beispiel für das physiologische Auftreten der Angiogenese ist die Wundheilung sowie das Einwachsen von Gefäßen in das Endometrium des Uterus. Neben diesen Vorkommen spielt die Angiogenese außerdem beim Tumorwachstum und bei Pathologien wie der rheumatoiden Arthritis eine Rolle.

Auch bei Gefäßverschlüssen und Stenosen kommt es zur Angiogenese. Entscheidender Trigger ist hier im Gegensatz zur Arteriogenese die Ischämie. Der Prozess geht von Kapillaren im ischämischen Gebiet aus (Abb. 3).

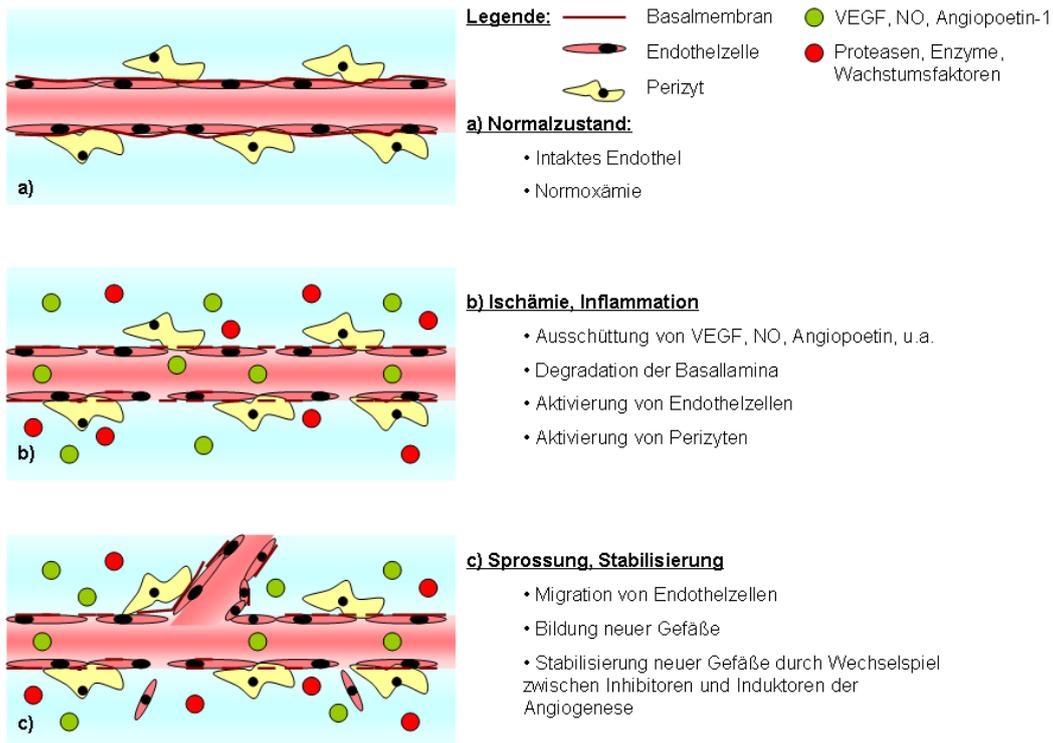


Abbildung 3: Schematischer Ablauf der Angiogenese.

Endothelzellen werden durch Wachstumsfaktoren wie VEGF oder Transkriptionsfaktoren wie HIF-1 α stimuliert, die von verschiedenen Zellen im unterversorgten Gewebe sezerniert werden. Eine entscheidende Bedeutung für die Ausschüttung von VEGF spielen CD4-positive T-Helferzellen. CD4^{-/-}-Knock-out-Mäuse zeigten eine verminderte Reperfusion im ischämischen Hinterlauf-Modell im Vergleich zu CD4^{-/-}-Knock-out-Mäusen, welche CD4⁺-Lymphozyten injiziert bekommen haben[30]. Ähnlich großen Einfluss auf den VEGF-Spiegel haben neutrophile Granulozyten, die somit ebenfalls einen nicht unerheblichen Teil an der Angiogenese haben[31]. Der Einfluss dieser Zelltypen auf die Arteriogenese scheint hingegen gering zu sein[31]. Neben der Hypoxie führen auch weitere Ursachen, wie beispielsweise eine Azidose oder Hypoglykämie oder die Faktoren FGF-2[32], und PDGF zu einer verstärkten Transkription des VEGF, welcher einen der wichtigsten Mediatoren für eine effektive Angiogenese darstellt[16]. VEGF führt zu einer erhöhten Permeabilität des Gefäßendothels, die durch eine Umverteilung von PECAM-1 (CD31) zustande kommt, welches eine antiapoptische Wirkung auf Endothelzellen hat[33]. Die Aktivierung von Gefäßendothelzellen führt wie bei der Arteriogenese zur Aktivierung von Proteasen und zur Rekrutierung von Perizyten. Proteasen führen zur Degradierung der extrazellulären Matrix und schaffen somit die Möglichkeit zur Zellmigration von Endothelzellen, die durch VEGF zur Teilung angeregt werden. Perizyten sorgen für die Stabilisierung der Endothelzellen. Ein entscheidender Faktor für die Rekrutierung von Perizyten ist Angiopoetin-1. Angiopoetin-1

bindet an den Tie2-Tyrosinkinase-Rezeptor, der entscheidende Bedeutung für die Reifung und Differenzierung von Gefäßnetzwerken hat[34,35].

Bei der Angiogenese handelt es sich um ein Wechselspiel zwischen Inhibitoren und Induktoren des Gefäßwachstums[36]. Die oben genannten Faktoren wie VEGF, Angiopoietin-1 und PECAM-1 wirken antiapoptotisch und zählen zu den Induktoren der Angiogenese. Gegenspieler dieses Vorgangs sind Angiostatin[37], Endostatin[38], sowie Thrombospondin-1[39]. Die Angiogenese in ischämischen Gebieten ist oftmals nicht ausreichend um eine Reperfusion mit einem funktionellen Erhalt von Gewebe zu erreichen. Da die durch die Arteriogenese entwickelten Kollateralen Anschluss an das arterielle Hochdrucksystem haben, können diese im Vergleich zur Angiogenese eine effektivere Reperfusion ermöglichen.

1.3 Therapieansätze zur Steigerung des Gefäßwachstums

1.3.1 Genterapie

Die endogenen Möglichkeiten zur Steigerung der Perfusion in ischämischen Gebieten bei Stenosen oder Verschlüssen der Gefäße sind in den meisten Fällen nicht ausreichend. Es kommt zunächst zu Belastungsschmerzen in den betroffenen Gebieten, die im Verlauf in Ruheschmerzen übergehen. Der Endpunkt dieser Erkrankungen wird durch die ischämiebedingte Amputation gesetzt.

Obwohl es heutzutage eine Vielzahl von Methoden gibt, die eine Verbesserung der Beschwerden beim Patienten hervorrufen, gibt es immer noch Fälle in denen keine ausreichende Linderung erzielt werden kann. In verschiedenen Studien wurde versucht, durch Steigerung der Angiogenese oder Arteriogenese eine Reperfusion zu erreichen.

So wurde z.B. durch intraarterielle sowie intramuskuläre Applikation von Wachstumsfaktoren im Zuge einer Genterapie eine bessere Perfusion unterversorgter Gewebe bei Patienten mit pAVK hervorgerufen. Der für die Angiogenese entscheidende Faktor VEGF wurde auf seine perfusionsverbessernde Wirkung in vielen Studien getestet. Nicht randomisierte Studien mit kleinen Patientengruppen zeigten hier erfolgversprechende Ergebnisse. Allerdings kam es durch Applikation des Wachstumsfaktors auch zu Nebenwirkungen wie Beinödemen[40,41]. Ähnliche Erfolge konnten bei der koronaren Herzerkrankung durch eine Genterapie mit VEGF erzielt werden[42,43]. In größeren Studien zur pAVK konnten die positiven Effekte allerdings nicht mehr nachgewiesen werden. Auch in diesen Versuchen konnten zunehmend Nebenwirkungen, wie Beinödeme beobachtet werden[44,45].

Neben der Nutzung des Faktors VEGF kam es auch zu Therapieversuchen mit FGF. Hier konnten nach intramuskulärer Gentherapie ebenfalls positive Effekte in der Behandlung der pAVK erzielt werden[46]. Randomisierte Studien zeigten aber auch bei der Gentherapie mit FGF unterschiedliche, zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. So wurde in der TALISMAN- und der TRAFFIC- Studie ein positiver Effekt von FGF nachgewiesen[47,48], wohingegen in der TAMARIS- Studie kein positiver Effekt nachgewiesen wurde[49].

Es wurden weitere Gentherapieversuche am Menschen mit den Faktoren HIF-1 α [50] und GM-CSF[51] durchgeführt, die ebenfalls keinen großen Durchbruch in der Therapie der pAVK erbrachten.

Grundsätzlich lässt sich zu den Gentherapiestudien sagen, dass bei kleineren Patientenkollektiven durchaus positive Effekte erzielt wurden, die allerdings in placebokontrollierten und randomisierten Studien oftmals nicht nachgewiesen werden konnten. Die Gründe hierfür sind vielfältig und umfassen beispielsweise verschiedene Kriterien bei der Patientenauswahl, unterschiedliche Studienendpunkte, aber auch Unterschiede bei der Applikation[52]. Weiterhin ist davon auszugehen, dass die Gabe einzelner Faktoren nicht in der Lage ist, komplexe Prozesse, wie den der Angio- oder Arteriogenese nachzubilden. Dieser Gedanke führte zum therapeutischen Einsatz von Zellen, die diese Prozesse umfassender beeinflussen können.

1.3.2 Zelltherapie

1.3.2.1 Vorläuferzellen

Eine Interaktion verschiedenster Akteure ist nötig um minderperfundierte Gebiete langfristig wieder mit der notwendigen Blutmenge zu versorgen. Neben den eben genannten Wachstumsfaktoren sind daran auch verschiedenste Zellen beteiligt. In der Therapie von Gefäßerkrankungen von Patienten bei denen herkömmliche Therapiemethoden keine Alternative bieten, kamen dabei bisher vor allem Vorläuferzellen zum Einsatz. Diese leiten sich entweder aus dem Knochenmark ab oder sind im peripheren Blutkreislauf vorzufinden. Die Gabe autologer Knochenmarkszellen durch multiple intramuskuläre Injektionen entlang der okkludierten Arterien, konnte positive Ergebnisse erzielen. Hier wurde beim Patientengut eine Verbesserung der initialen Laufstrecke, des ABI-Index sowie des tcpO₂ erreicht. Auch eine Verminderung der Major-Amputationen, d.h. der Amputationen oberhalb des Kniegelenks, trat auf[53,54]. Weiterhin zeigte sich, dass eine intramuskuläre Injektion der autologen Zellen im Vergleich zu einer intraarteriellen Injektion, ein besseres Outcome zu haben schien[55]. In einer Meta-Analyse von 2013 mit Studien über den Einsatz von

Knochenmarksvorläuferzellen bei Patienten mit kritischer Bein-Ischämie zeigte sich ebenfalls ein positiver Effekt der Therapie[56]. Bereits 2015 wurde diese Studie allerdings durch eine Meta-Analyse mit einem größeren Patientenkollektiv entkräftet. Lediglich der tcpO_2 , der ABI und die Schmerzwahrnehmung konnten verbessert werden. Ein Unterschied im Überleben oder in der Anzahl der Major-Amputationen im Vergleich zur Kontrollgruppe fehlte[57].

Neben Vorläuferzellen des Knochenmarks wurde auch der Effekt zirkulierender Vorläuferzellen untersucht. Bei Patienten mit kritischer Beinischämie sind diese allerdings in ihrer Anzahl vermindert und haben im Vergleich zu den Vorläuferzellen des Knochenmarks einen eher geringen Einfluss auf perfusionsverbessernde Prozesse[58,59].

Auch in der Therapie der koronaren Gefäßerkrankungen konnte die Therapie mit autologen Stammzellen des Knochenmarks positive Effekte erzielen. Hier kam es vor allem zu einer Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion und einer Verbesserung der Perfusion im Infarktgebiet[60-62]. Langfristig konnten allerdings keine Unterschiede zu Kontrollgruppen festgestellt werden[63].

Die Versuche mit autologen Stammzellen zeigen zusammenfassend durchwachsene Ergebnisse, die weitere Studien nötig machen. Auch muss geklärt werden, ob diese Zellen durch ihre Integration in das Gewebe oder durch die Sekretion von Zytokinen und die Stimulation anderer Zellen zu den perfusionsverbessernden Prozessen beitragen[64,65].

1.3.2.2 Monozyten

Die Schlüsselrolle von Monozyten in der Arteriogenese wird ebenfalls therapeutisch ausgenutzt. Diese Zellen sind durch Interaktion mit anderen Zellen und die Ausschüttung von arteriogenen Substanzen dazu in der Lage, die reperfundierenden Prozesse aktiv zu fördern. So konnten beim Kaninchen exogen zugeführte allogene Monozyten, d.h. Zellen vom Individuum derselben Spezies, eine Verstärkung der Arteriogenese erreichen[66]. Auch in der Maus zeigte die Gabe von Monozyten einen positiven Effekt auf die Arteriogenese. Nach Gabe syngener Monozyten, d.h. Zellen des genetisch identischen Tieres, konnten allerdings keine positiven Effekte nachgewiesen werden[67]. Aufgrund dieser Tatsache ist davon auszugehen, dass es bei der Gabe allogener Monozyten zu einer *host vs. graft*-Reaktion kommt, die die inflammatorische Komponente der reperfundierenden Prozesse erhöht. Unter solch einer Reaktion versteht man im Allgemeinen eine immunologische Abwehrreaktion des Empfängerorgans gegen das Transplantat. Die Inflammation als treibender Faktor der Arteriogenese führt somit zur Verstärkung der Kollateralenbildung. Diese These wird auch durch ein weiteres Experiment von Francke et al. gestützt, bei dem nach der Gabe des

immunsuppressiven Medikamentes Cyclosporin A eine verstärkte Kollateralisierung nach Transplantation allogener Monozyten ausblieb[67].

Da eine Gabe allogener Monozyten neben der überschießenden Immunreaktion auch Infektionsrisiken birgt, wurde versucht, syngene Monozyten mit Tetanustoxoid zu modifizieren. Dadurch wiederum waren auch syngene Monozyten in der Lage bei immunisierten Empfängertieren eine arteriogene Antwort auszulösen[68].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Gabe von Monozyten einer systemischen Applikation von Wachstumsfaktoren vorzuziehen ist, da diese direkt am Ort der Stenose wirken, mit anderen Zellen interagieren und verschiedene Wachstumsfaktoren sezernieren. Dennoch bietet auch diese Therapie Gefahren. Eine Verstärkung des Wachstums endogener Tumore durch die Gabe von Monozyten, muss in folgenden Studien genauer untersucht werden[69]. Aber auch Retinopathien oder die verstärkte Bildung atherosklerotischer Plaques könnten Langzeitfolgen dieser Therapien darstellen[70].

1.4 Monozytenbiologie

Monozyten sind eine Unterart der Leukozyten. Ihr Anteil an den weißen Blutzellen beträgt 4-10 %, bei einer Gesamtzahl von $4-10 \times 10^9$ Leukozyten pro Liter Blut. Sie reifen aus multipotenten hämatopoetischen Stammzellen und entwickeln sich über die Stufe der myeloiden Vorläuferzelle. Neben Monozyten gehen auch Erythrozyten, Thrombozyten, Mastzellen und Granulozyten aus der myeloiden Vorläuferzelle hervor[71]. Durch die Einwirkung verschiedener Differenzierungsfaktoren wie M-CSF, GM-CSF und IL-3 im Knochenmark, differenzieren die myeloiden Vorläuferzellen dann zu Monozyten. Die Neubildungsrate der Monozyten im Knochenmark beläuft sich auf 7×10^6 Monozyten/kg KG/h[72]. Nach Freisetzung aus dem Knochenmark zirkulieren die Zellen ein bis drei Tage im Blut[73,74]. Diese Zeit kann bei pathologischen Veränderungen wie einer Leukozytose verlängert sein. Unter einer Leukozytose versteht man die Erhöhung der Leukozytenzahl über die Norm hinaus. Allerdings wurde auch bei kardiovaskulären Erkrankungen oder septischen Zuständen eine erhöhte Anzahl an Monozyten im Blut betroffener Patienten gefunden[75,76]. Nach der Zirkulation im Blut wandern sie in das Gewebe aus. Ein Teil der Monozyten entwickelt sich zu Makrophagen. Diese spielen eine wichtige Rolle für das Immunsystem, aber auch für lokale Umbauvorgänge[77,78]. Zusammen mit den gewebständigen Makrophagen bilden die Monozyten das mononukleäre Phagozytosesystem. Monozyten sind in der Lage Fremdstoffe zu phagozytieren und deren Bestandteile an ihrer Oberfläche über MHC-Moleküle zu präsentieren. Im Gegensatz zu den MHC Klasse I- Molekülen, die alle

kernhaltigen Zellen in ihrer Membran enthalten, können die Monozyten über MHC Klasse II-Moleküle auch mit T-Helferzellen kommunizieren und sind so nicht nur fester Bestandteil des angeborenen, sondern auch des adaptiven Immunsystems[71]. Weiterhin sind Makrophagen dazu in der Lage Zytokine zu produzieren, die Immun- und Entzündungsreaktionen regulieren können. Zu diesen zählen beispielsweise $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, IL-8 oder IL-10, aber auch noch viele weitere, die die Inflammation verstärken oder abschwächen können[79]. Der Rest der Monozyten differenziert zu dendritischen Zellen[80]. Dendritische Zellen sind im Gegensatz zu Makrophagen zusätzlich in der Lage in lymphatische Organe auszuwandern und dort naive T-Zellen zu aktivieren[81].

Es handelt sich bei Monozyten keineswegs um eine einheitliche Zellpopulation. Sie unterscheiden sich in Größe und Granularität und können anhand ihrer Oberflächenrezeptoren in unterschiedliche Untergruppen eingeteilt werden (Abbildung 4).

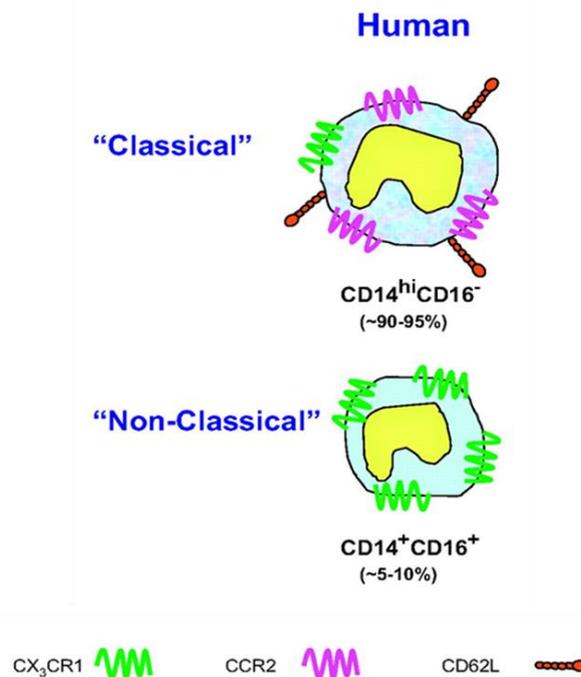


Abbildung 4: Darstellung der zwei größten Monozytensubpopulationen. Die Monozytensubpopulationen werden in 4 verschiedene Gruppen unterteilt. Die hier dargestellten Subpopulationen machen den größten Anteil der Monozyten aus. Sie unterscheiden sich sowohl in Größe und Granularität, aber auch anhand ihrer Chemokinrezeptoren ($\text{CX}_3\text{CR1}$ (Fraktalkin-Rezeptor), CCR2 (MCP-1-Rezeptor)), Chemokinliganden (CD62L (L-Selektin)) und Oberflächenmoleküle (CD14 , CD16). Abgewandelt nach Strauss-Ayali et al.[82].

Man unterscheidet im peripheren Blut die klassischen $CD14^{++}/CD16^{-}$ Monozyten, die beim gesunden Patienten einen Anteil von 90-95 % haben und die nicht klassischen $CD14^{+}/CD16^{+}$ mit einem Anteil von 5-10 %. Außerdem gibt es noch eine dritte Untergruppe $CD14^{++}/CD16^{+}$, die als Übergangsphase von der klassischen zur nichtklassischen Monozyte gilt[83,84]. Es wird vermutet, dass eine Differenzierung von den klassischen Monozyten in Richtung der nichtklassischen Monozyten abläuft, da die nichtklassischen sowie die intermediären Monozytenpopulation Eigenschaften dendritischer Zellen besitzen[85,86]. Diese Differenzierung der klassischen Monozyten in nichtklassische Monozyten wird unter anderem durch eine Stimulation der Monozyten mit $INF-\gamma$ oder LPS hervorgerufen[87]. Weiterhin unterscheiden sich klassische Monozyten durch eine vermehrte Expression des MCP-1-Rezeptors und von L-Selektin, wohingegen die nichtklassischen Monozyten vorwiegend den Fraktalkinrezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren (Abbildung 4). Diese Tatsache führt zu unterschiedlichen Migrationseigenschaften der beiden Monozytenunterarten[88], deren Analyse momentan Gegenstand der Forschung ist. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal der Monozytenpopulationen ist ihre Zytokinsekretion. Nichtklassische Monozyten sezernieren weniger des antiinflammatorischen IL-10 im Vergleich zu den klassischen Monozyten, die im Gegenzug geringere Mengen des proinflammatorischen $TNF-\alpha$ sezernieren[89-91]. Ein weiterer Unterschied zwischen den Populationen ist eine vermehrte Expression des HLA-DR-Oberflächenrezeptors auf der Oberfläche der nichtklassischen Monozyten. Dieser Rezeptor zählt zu den MHC Klasse II- Molekülen, der für die Präsentation von Antigenen zuständig ist[89].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass klassische $CD14^{++}/CD16^{-}$ Monozyten eher antiinflammatorisch wirken, wohingegen die nichtklassischen $CD14^{+}/CD16^{+}$ Monozyten durch die Ausschüttung genannter Zytokine zu einer Zunahme des inflammatorischen Milieus beitragen und somit auch indirekt die durch eine Inflammation begünstigte Arteriogenese fördern.

2 Zielsetzung der Arbeit

Unsere Arbeitsgruppe befasst sich bereits seit längerer Zeit mit dem Einfluss von Monozyten auf die Arteriogenese. Es konnten bereits erfolgversprechende Ergebnisse in Kaninchen- und Mausmodellen erzielt werden. Anspruch dieser Versuche soll es sein, eine Therapieoption für Patienten mit okklusiven Gefäßerkrankungen zu schaffen.

Ziele dieser experimentellen Arbeit waren:

- die Charakterisierung humaner Monozyten nach Isolation aus Leukozytenfiltern und Kultivierung unter dem Einfluss von INF- γ
- die Überprüfung der Monozytenviabilität und -funktionalität
- die Untersuchung der Wirkung humaner Monozyten auf die Arteriogenese und Angiogenese im murinen Hinterlauf-Ischämie-Modell
- Nachweis des Homings der transplantierten Monozyten mithilfe der Intravitalmikroskopie

Die Ergebnisse setzen den Grundstein für eine Nutzung humaner Zellen in weiteren Tiermodellen und stellen damit einen wichtigen Zwischenschritt zur therapeutischen Nutzung der Monozyten im Menschen dar.

3 Materialien

3.1 Versuchstiere

Für die hier beschriebenen Versuche wurden spezifisch pathogenfreie C57BL/6NCrI- und BALB/cAnNCrI- Inzuchstämme verwendet. Weiterhin waren sämtliche Versuchstiere männlich und in einem Alter zwischen 8 und 14 Wochen. Die Mäuse wurden vor ihrer Auslieferung auf Viren, Mykoplasmen, Bakterien, Parasiten und äußere Verletzungen hin untersucht. Vor Versuchsbeginn bekamen die Tiere eine Eingewöhnungszeit von einer Woche, in welcher keine Versuche durchgeführt wurden. Die Tiere wurden in Typ 3 Käfigen mit Hartholzgranulateinstreu zu maximal fünf Mäusen gehalten. Nahrung und Wasser bekamen die Tiere ad libitum. Der Tag/Nacht- Zyklus betrug jeweils zwölf Stunden. Die Pflege der Mäuse und die wöchentliche Reinigung der Käfige wurden von Bereichstierpflegern übernommen. Die Versuchstiere wurden bei 20 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 53 % gehalten. Ein Tierarzt war jederzeit verfügbar. Die Versuche und die Haltung der Tiere wurden auf der Grundlage des geltenden Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Tabelle 1: Versuchstierverwendung

Mausart und Anzahl	Verwendungszweck
BALB/c: n=10	Methodenetablierung
BALB/c: n=17	Kontrollgruppe (BALB/c- Ko)
C57/BL/6NCrI: n=10	Kontrollgruppe (C57BL/6)
BALB/c: n=12	Injektion 2,5 Mio humane Monozyten (HuMo)
BALB/c: n=5	Monozytenhoming
BALB/c: n=5	Intravitalmikroskopie

Die Bestellung und Verwendung der hier in Experimenten genutzten Tiere erfolgte auf Grundlage der Tierversuchsanträge mit den Aktenzeichen G-01-898-08 und G-02-1333-15. Die Versuche wurden nach geltendem Tierschutzgesetz durchgeführt (§8, Paragraph 1 des

deutschen Tierschutzgesetzes vom 18.05.2006-BGBl. I S 1206, 1313, §31 TierSchVersV vom 13.08.2013).

3.2 OP- Material und Allgemeine Utensilien

Produkt	Hersteller
Anatomische Pinzetten	Outils Rubis SA, Stabio, Schweiz
Anatomische Schere	World Precision Instruments, Inc., Sarasota, USA
Desinfektionsschaumspray	Ecolab Healthcare, Wien, Österreich
Dewar Transportgefäß	Karlsruher Glastechnisches Werk- Schieder GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Doppelseitiges Klebeband	TESA SE, Hamburg, Deutschland
Eindeckschälchen	Sakura Finetek, Aalphen aan den Rijn, Niederlande
Einwegklinge	Feather Safety razor Co.Ltd, Osaka, Japan
Einwegskalpell	Feather Safety razor Co.Ltd, Osaka, Japan
Enthaarungscreme	Veet, Reckitt Benckiser, Wien, Österreich
Feder- Mikroschere	Precision Instruments, Inc., Sarasota, USA
Feindosierungsspritze (1ml) mit Spardorn	Omnifix, Latex-free, B. Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Hautdesinfektion	Octenisept, Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Latex- Handschuhe	Rösner-Matby Meditrade GmbH, Kiefersfelden, Deutschland
Lidspreizer	ALCO-Albert GmbH & Co.KG, Arnsberg, Deutschland
Methylbutan	E. Merck, Darmstadt, Deutschland
Nahtmaterial	Ethicon Atralog 6-0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland
OP Mikroskop	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar, Deutschland
OP Mikroskopkamera	MC1000, 1,3 Megapixel Motic Deutschland GmbH, Wetzlar, Deutschland
Scanner	Periscan PIM II, Perimed Instruments GmbH, Rommerskirchen, Deutschland
Schlinggazetupfer	Fuhrmann, Much, Deutschland

Spitze Pinzetten(gebogen)	Outils Rubis SA, Stabio, Schweiz
Spitze Pinzetten(gerade)	World Precision Instruments, Inc., Sarasota, USA
Stumpfe Pinzette	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Tuberkulinspritze (1ml)	Omnifix, Latex-free, B. Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Waage	Mettler PM4800 Delta Range, Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Wärmeplatte	Hot Plate 062, Labotect GmbH, Göttingen, Deutschland

3.3 Anästhesie- und Injektionsmaterialien

Produkt	Hersteller
Augengel	Vidisic, Bausch + Lomb GmbH, Berlin, Deutschland
Isofluran	Baxter, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Kanülen (20G, 28G, 29G, 30 G)	Sterican, B. Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Ketaminhydrochlorid (10%)	Ketavet, Pfizer Deutschland GmbH, Berlin , Deutschland
Maus- Fixierung	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Messbecher 2l	Vitlab GmbH, Grossostheim, Deutschland
NaCl	Berlin Chemie AG, Berlin, Deutschland
Xylazinhydrochlorid (2%)	Ceva Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf, Deutschland

3.4 Zellkultur, Monozytenisolation

Produkt	Hersteller
Absauggerät Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH Co. KG, Eberstadt, Deutschland
CFSE (5(6) Carboxyfluorescein diacetate <i>N</i> -succinimidylester)	Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland
Dialyse- Kassetten	Slide-A-Lyzer™, Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
EDTA	Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland
Ethanol, 70 %	Otto Fischer GmbH und Co KG, Saarbrücken, Deutschland
Ethidiumbromid	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
FCS	Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland
<i>Fluorodish</i> Zellkulturschale	World Precision Instruments, Inc., Sarasota, USA
Hoechst 33342	Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland
Injectomat Spritze (50 ml)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Inkubator, Incu safe	Ewald Innovationstechnik GmbH, Bad Nenndorf, Deutschland
Interferon- γ (BMS303)	eBioscience, Inc., San Diego, Kalifornien, USA
Ionomycin	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Leukozytentrennröhrchen	Bio one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Lymphozytentrennmedium LSM 1077	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
LysoTrackerRed DND- 99 (L7528)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Medium 199	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank, Hera safe	Thermo Electron, LED GmbH, Langenselbold, Deutschland
Mikroskop Zellkultur: Axiovert 40 C	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	PanReac Applichem, Darmstadt, Deutschland

Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH und Co.KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Polystyrol (PS) Röhrchen	Cellstar, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland
Percollstammlösung	Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland
Petrischalen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettierköpfe	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Röhrchen mit Deckel(50 ml, 15 ml)	Greiner bio one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
6-well-Platten	Corning Incorporated, NY, USA
6-well-ultra- low-attachement-Platten	Corning Incorporated, NY, USA
Spritzenvorsatzfilter 0,2 µm, Cellulose Acetat	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Trypanblau	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Vorsatzfilter, Steritop-GP, 0,22 µm	E. Merck, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad, Julabo SW22	Julabo Labortechnik GmbH Seelbach, Deutschland
Zentrifuge, Allegra® X-15R	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland

3.5 Histologie

Produkt	Hersteller
Bovines Serum Albumin	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Deckgläser	Thermo scientific Menzel-Gläser, Menzel GmbH und Co.KG, Braunschweig, Deutschland
Erlenmeyer Kolben	GVB, Herzogenrath, Deutschland
Fluoreszenz- Fixations- Medium	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Gewebe- Gefriermedium	Jung, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Kleine Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
Kryotom, Leica CM1950	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Magnetrührgerät, biq squid	IKA- Werke GmbH & Co. KG, Staufen,

Mikroskop Histologie: Axiovert 200M	Deutschland Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland
Mikroskop Zweiphotonenmikroskopie	Leica SP5 Confocal microscope, Cameleon, Coherent, USA
Minizentrifuge	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Objektträger Superfrost Plus	Superfrost Plus Thermo Scientific Inc., Waltham, USA
Phosphate buffered saline	Life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pipetten(10 ml, 100 ml, 200 ml, 1000 ml)	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Präparatekasten	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Rhodamindextran	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Roti liquid barrier marker	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Schüttelmaschine MS2 Minishaker	MS2 Minishaker, IKA- Werke GmbH&Co. KG, Staufen, Deutschland
Ultraschallbad	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

3.6 Antikörper

Produkt	Hersteller
DAPI	Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland
DiO, DiD, Dil	Vybrant Cell-Labeling Solutions, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Maus smooth muscle actin, 1A4, Sigma F3777, FITC	Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland
Rabbit anti mouse CD31, polyclonal antibody, ab28364	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Sheep anti rabbit IgG (whole molecule)	Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland
F(ab') ₂ -Cy3, polyclonal antibody, C2306-1ML	Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland

3.7 Durchflusszytometrie

Produkt	Hersteller
FACS- Antikörper Anti- human CD 14- PerCP , Klon: MφP9	Becton, Dickinson and Company, Franklyn Lakes, New Jersey, USA
FACS- Antikörper Anti- human CD 16- APC, Klon: MHCD1605	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
FACS- Antikörper Anti- human CD 45-FITC, Klon: HI30	Biolegend, San Diego, Kalifornien, USA
FACS- Antikörper Anti- human CD 86-PE, Klon: HA5.2B7	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Sytox Dead Cell Stain	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland

3.8 Eigenansätze

Lösung	Zusammensetzung
FACS-Puffer	PBS, 10% FCS
PBS/EDTA 5 mM	500 ml PBS, 5 ml 0,5 M EDTA
(Monozyten)- waschpuffer	500 ml PBS, 10 ml 0,5% BSA, 2 ml 0,5 M EDTA
Percoll Lösung (Dichte: 1,064 g*cm ⁻³)	10 ml Percollstammlösung+ 9,933 ml 0,9% NaCl
Zellkulturmedium	M199, 10% FCS, 1% Antibiotikum(Penicillin/Streptomycin)

3.9 Zytokinassay, Blutentnahme

Produkt	Hersteller
Bio-Plex Pro Mouse Cytokine 23-plex Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Bio-Plex 200 Systems	Bio-Rad Laboratories GmbH, München,

Taumelnder Plattformschüttler, Heidolph Polymax 1040 Blutentnahmeröhrchen	Deutschland Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland Radiometer GmbH, Willich, Deutschland
---	--

3.10 Software

Produkt	Hersteller
ImageJ-Software	National Institutes of Health, MD, USA
Excel	Microsoft Corporation, Redmont, USA
SPSS (Version 24)	IBM, Armonk, New York, USA

4 Methoden

4.1 Zellisolation, Kultivierung und Charakterisierung

4.1.1 Monozytenisolation aus humanen Leukozytenfiltern

Das Ausgangsmaterial für die Monozytenisolation wurde durch die Blutbank der Universität Magdeburg zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um Leukozytenfilter, welche im Rahmen der Vollblutspende von gesunden anonymisierten Spendern, freiwilligen Probanden sowie Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe als Restprodukt anfielen. Diese Leukozytenfilter fanden keinerlei weitere Verwendung in der Therapie oder Diagnostik von Patienten. Die Persönlichkeitsrechte der Spender wurden hierbei nicht beeinträchtigt. Alle Verarbeitungsschritte im Zusammenhang mit den Filtern erfolgten ausnahmslos steril, an einem Arbeitsplatz mit kontinuierlichem, laminarem Raumlufthog.

Zunächst wurden die Filter mit 70 % Alkohol besprüht und im Anschluss daran die Schläuche am oberen und unteren Ende eröffnet. Die Schläuche dienten dem Spülen der Filter und waren gewissermaßen Ein- und Ausflußtrakt der Spülflüssigkeit. Für das Spülen eines Filters waren ca. 150 ml PBS/EDTA 5 mM notwendig. Die Spülflüssigkeit/-lösung wurde in einen Erlenmeyerkolben gefüllt, wodurch sich nun eine einfachere Handhabung gewährleisten ließ. Eine 50 ml Spritze wurde mit PBS/EDTA 5 mM gefüllt und auf den unteren Schlauch des Filters gestülpt. Nun wurde der Filter entgegengesetzt der Laufrichtung gespült. Dabei wurde anfangs auf ein blasenfreies und vorsichtiges Spülen geachtet, um die Zellen vollständig und schonend zu ernten. Die ersten 30 ml PBS/EDTA wurden gleichmäßig auf drei 50 ml Falcons aufgeteilt, die restlichen 20 ml wurden dann ebenfalls gleichmäßig auf die Reaktionsgefäße verteilt. Es folgte die Spülung mit zwei weiteren 50 ml Spritzen, sodass am Ende des Spülvorganges drei Reaktionsgefäße mit jeweils 50 ml Zellsuspension gefüllt worden. Beim letztmaligen Aufziehen der Spritze mit PBS/EDTA 5 mM wurde darauf geachtet, dass ca. 10 ml Luft eingesogen wurden, um so die Restflüssigkeit aus dem Filter zu spülen. Eine effektive Spülung des Filters war an einer einheitlichen Entfärbung des Filters zu erkennen. Die drei Röhrchen wurden nun bei 400 x g für 15 min bei Raumtemperatur und aktivierter Bremse zentrifugiert. Die Zeit während der Zentrifugation wurde genutzt um zwei Leukozytentrennröhrchen mit jeweils 15 ml Lymphozytentrennmedium zu befüllen und nach Beendigung der Zellzentrifugation kurz zu zentrifugieren. Dieses Medium mit einer Dichte von $\rho=1,077 \text{ g} \times \text{cm}^3$ diente zur Trennung der Lymphozyten von den Erythrozyten. Polymere Substanzen lagern sich bei diesem Schritt an die Erythrozyten an, sodass diese am Boden des

Reaktionsgefäßes sedimentieren und die Lymphozyten in der Interphase (weißer Ring, s.u.) verbleiben.

Nach der Zentrifugation musste zunächst der Überstand bis zu der 15 ml-Markierung entfernt werden. Alle Röhren wurden mit PBS/EDTA 5 mM bis zur 22,5 ml Markierung aufgefüllt. Die daraufhin resuspendierten Zellen ließen sich vorsichtig auf die zwei vorbereiteten Leukozytentrennröhren aufteilen. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 1000 x g für 15 min bei deaktivierter Bremse. Nach diesem Schritt wurde im Röhren ein weißer Ring sichtbar, welcher die mononukleären Zellen des peripheren Blutes enthielt. Dieser wurde nun vorsichtig mit der Pipette abgenommen und in ein neues Röhren überführt. Dabei war darauf zu achten, möglichst wenig von dem darunter liegenden, zelltoxischen Trennmedium aufzunehmen. Im nächsten Schritt wurde das Röhren bis zur 50 ml- Markierung mit Waschpuffer aufgefüllt. Es schloss ich eine weitere Zentrifugation mit aktivierter Bremse, bei 250 x g, für 10 min, bei Raumtemperatur an. Das Waschen wurde im Folgenden zwei weitere Male wiederholt. Eine abschließende Zentrifugation für 10 min bei 100 x g, Raumtemperatur und aktivierte Bremse, diente der Entfernung der Thrombozyten. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in 7 ml Waschpuffer resuspendiert.

Um die Reinheit der Zellsuspension im Bezug auf die Monozyten zu erhöhen, erfolgte nun eine Percoll- Dichtegradientenzentrifugation. Mit dieser Methode konnten die T-Zellen aus der Zellsuspension entfernt werden, womit sich der Reinheitsgrad der Suspension im Bezug auf die Monozytenfraktion erhöhte. Im ersten Arbeitsschritt wurden dazu 7 ml Percoll-Lösung in ein Polystyrol-Röhren gegeben und sehr vorsichtig mit der Zellsuspension überschichtet. Das Röhren wurde nun bei 800 x g für 20 min bei deaktivierter Bremse und Raumtemperatur zentrifugiert. Die nach der Zentrifugation sichtbare Interphase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Röhren (Polypropylen) überführt. Im Anschluss erfolgte die Auszählung der Zellen. Dafür wurden 20 µl der Zellsuspension mit 180 µl Trypanblau versetzt und auf eine Neubauer Zählkammer aufgetragen. Mithilfe des Lichtmikroskops erfolgte nun die Auszählung der Zellen. Die endgültige Zellzahl in der Suspension wurde mit folgender Formel bestimmt:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\text{Zellzahl}}{4} \times \text{Verdünnung}(10) \times 10000$$

Abbildung 5: Formel zur Zellzahlberechnung.

Nach der Zellzählung reihte sich eine weitere Zentrifugation in den Arbeitsablauf bei 200 x g für 10 min bei Raumtemperatur und aktivierter Bremse ein. Anschließend wurde der

Zellüberstand abgesaugt und die Zellen mit Zellkulturmedium resuspendiert. Daraufhin erfolgte die Aussäung auf *6-well-ultra-low-attachment*-Platten. Die Zelldichte lag nach diesem Schritt bei ca. 1×10^6 Zellen/ml. Für unsere Versuche haben wir die Zellsuspensionen außerdem mit 8 ng/ml IFN- γ versetzt, um die Monozyten zu stimulieren. Die Zellschalen wurden im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ für 24 h kultiviert, um sie den Versuchstieren am nächsten Tag intravenös zu verabreichen.

4.1.2 Überprüfung der Zellviabilität

Um den Einfluss dieser Kultivierungsbedingungen auf die Zellviabilität zu untersuchen, wurden Zellsuspensionen unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Für dieses Experiment wurden die Monozyten eines Spenders wie oben beschrieben isoliert und auf drei herkömmlichen Zellkulturplatten- Wells mit einer Dichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen pro ml ausgesät. Im ersten Well fügten wir 8 ng/ml IFN- γ hinzu. In den anderen Wells wurde kein IFN- γ hinzugefügt, da diese Zellen später als Negativ- bzw. Positivkontrolle dienten. Es erfolgte die Kultivierung bei 37 °C und 5 % CO₂ für 24h. Am nächsten Tag wurden die Zellen dreimal gewaschen. Dafür wurde das Well angekantet und der Überstand abgesaugt. Es folgten die Zugabe von 2 ml Zellkulturmedium und zwei weitere Waschgänge. Durch die Verwendung herkömmlicher Zellkulturschalen blieben die Zellen im Gegensatz zu *6-well-ultra-low-attachment*-Platten adhärent und gingen durch das Absaugen des Überstandes nicht verloren. Nach dem letzten Waschschrift wurde jeweils 1,5 ml Zellkulturmedium in die Wells gegeben. In das dritte Well wurde nun zusätzlich 1 μ l/ml Ionomycin gegeben. Ionomycin ist ein Stoff, der von Bakterien produziert wird, über Calciumkanäle in die Zelle gelangt und dort den Zelltod einleitet. Die Zellen im dritten Well wurden nun für eine Stunde unter oben genannten Bedingungen inkubiert und dienten anschließend als Positivkontrolle für tote Zellen. Abschließend erfolgte die Färbung der Zellen aller Wells mit 4 μ g/ml Hoechst 33342 und 4 μ g/ml Ethidiumbromid. Hoechst 33342 ist ein Fluoreszenz- Farbstoff, der an die DNA sämtlicher Zellen bindet. Der Farbstoff wird bei einer Wellenlänge von 340 nm angeregt und emittiert Licht im blauen Spektrum bei 465 nm. Ethidiumbromid bindet lediglich die DNA toter Zellen. Es wird bei einer Wellenlänge von 302 nm angeregt und emittiert Licht im orange-roten Bereich bei 605 nm. Nach zehn Minuten Inkubationszeit wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

4.1.3 Phagozytosefunktion humaner Monozyten

Eine der Hauptfunktionen von Monozyten und Makrophagen ist die Phagozytose körperfremder Antigene und deren Präsentation auf Ihrer Oberfläche.

Die Funktionalität und Phagozytosefähigkeit der unter Punkt 4.1.1 isolierten Monozyten wurde durch die Aufnahmefähigkeit von mit CFSE markiertem BSA unter dem Fluoreszenzmikroskop überprüft. Ein 0,5 M NaHCO₃-Puffer, frisch angesetzt, mit einem pH-Wert von 8,3 bildete die Grundlage für die BSA-Markierung. Im ersten Schritt wurden 10 mg BSA in 1 ml Pufferlösung unter ständigem Schwenken gelöst. Die so entstandene Lösung wurde mit 100 µl 10 mM CFSE für eine Stunde, bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Entfernung des ungebundenen CFSE's mithilfe einer Dialyse, um eine unspezifische Färbung der Zellen zu verhindern. Dafür wurde die Lösung mit einer 20 G-Kanüle in eine Dialyse- Kasette injiziert und überflüssige Luft aus der Dialysekammer entfernt. Räumlich wird die Dialysekammer beidseits von Dialysemembranen abgegrenzt, welche wiederum in einem Kunststoffrahmen befestigt sind. Die Dialysemembranen wurde vor der Injektion für 2 min in 0,9 prozentiger Natriumchloridlösung eingeweicht. Die Kasette wurde in einem Schaumstoffschwimmer befestigt und in ein 1 l Becherglas gehängt, welches mit 0,9 prozentiger Natriumchloridlösung, sowie einem Magnetührstab gefüllt worden war. Während der Dialyse wurde der Becher auf ein Magnetührgerät gestellt um eine effektive Dialyse zu garantieren. Nach zwei Stunden erfolgte der Wechsel des NaCl. Nach weiteren zwei Stunden wurde der Wechsel wiederholt und die Dialyse wurde über Nacht fortgeführt. Am nächsten Morgen erfolgte die Entnahme des aufgereinigten CFSE-BSA-Konjugats durch erneute Punktion mit einer 20 G-Kanüle. Zunächst wurde etwas Luft in die Kammer injiziert um danach die Lösung zu aspirieren. Es erfolgte eine sterile Filtration und eine Lagerung des Konjugats bei 4 °C.

Die unter Punkt 4.1.1 gewonnenen Monozyten wurden unmittelbar nach ihrer Isolation mit 50 µg/ml, 100 µg/ml oder 200 µg/ml CFSE- markiertem BSA versetzt und wie unter Punkt 4.1.1 beschrieben kultiviert. Um eine Toxizität des markierten Proteins auszuschließen wurden unterschiedliche Konzentrationen des CFSE- BSA's genutzt und die Zellviabilität der Zellsuspensionen mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie verglichen (siehe Punkt 4.1.2).

Die Kultivierung der Zellen bei diesem Experiment erfolgte auf *fluorodishes*. Dabei handelt es sich um Zellkulturschalen, welche eine bessere Bildaufnahme mit dem Mikroskop möglich machten. Die Zellen wurden vor der Untersuchung unter dem Fluoreszenzmikroskop mit Hoechst 33342, wie im Punkt 4.1.2 markiert. Weiterhin erfolgte die Markierung der Zellen mit LysoTrackerRed DND- 99 (Synonym: L7528) 1 mM in einer 1:1000 Verdünnung und anschließender Inkubation für eine halbe Stunde im Inkubator bei 37 °C und 5 % Kohlendioxid. Dieser zweite Farbstoff diente der Anfärbung der Lysosomen, welche für die Prozessierung des markierten Proteins zuständig sind. Er wird mit Licht der Wellenlänge

577 nm angeregt und emittiert Licht der Wellenlänge 590 nm.

4.1.4 Prinzip der Durchflusszytometrie

Unter der Durchflusszytometrie, auch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS) genannt, versteht man ein weit verbreitetes Verfahren zur Bestimmung charakteristischer Eigenschaften von Zellen. Zu diesen Eigenschaften zählen Größe, Granularität und Fluoreszenz. Das 1968 in Münster entwickelte Verfahren findet heute breite Anwendung in der Analyse von Zellen und ist fester Bestandteil wissenschaftlicher Forschung geworden.

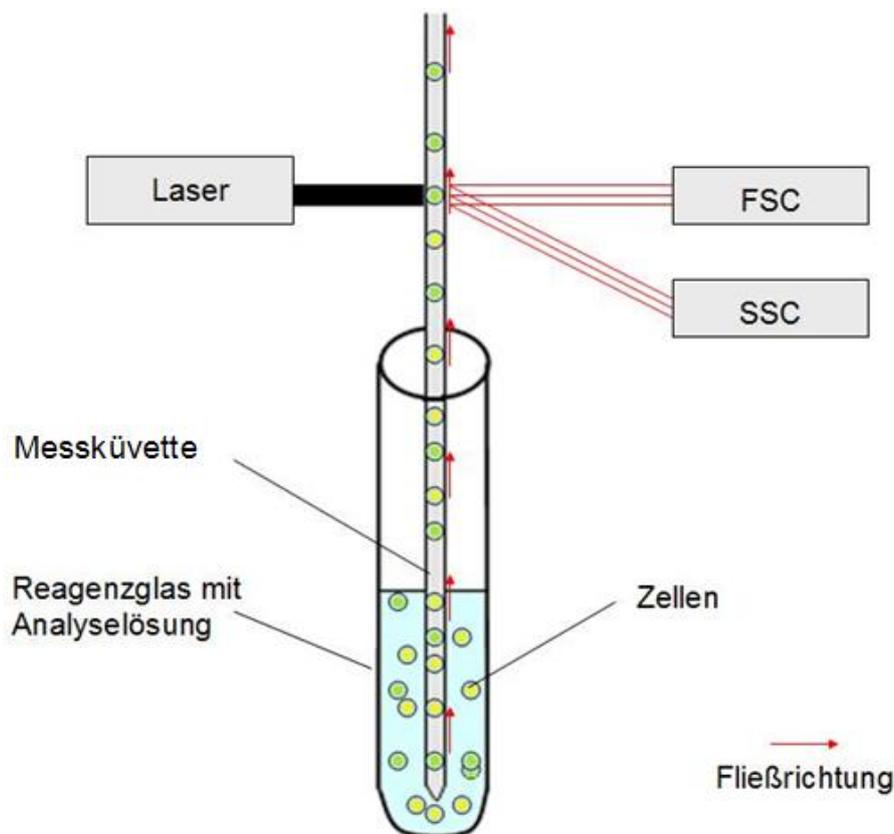


Abbildung 6: Schematische Übersicht der Durchflusszytometrie.

Durch eine dünne Glas- oder Quarzkapillare wird die zu untersuchende Zellsuspension angesogen, wobei der Durchmesser der Glaskapillare nur den Durchtritt einzelner Zellen erlaubt. Diese Zellen werden dann durch einen Laser angestrahlt (Abb. 6). Je nach Beschaffenheit der Zelle wird das Laserlicht reflektiert und von Detektoren erfasst. Das nach vorne gestreute Licht der Zelle wird dabei als *forward scatter* (FSC) bezeichnet und korreliert mit der Zellgröße. Das seitlich abgelenkte Licht, *sideward scatter* (SSC), dient als Maß für die Zellgranularität. Raue, granulareiche Zellen wie Granulozyten streuen das Licht des Lasers demnach stärker als glatte, granulaarme Lymphozyten und können daher in der FACS-Analyse voneinander unterschieden werden.

FSC und SSC lassen bereits die Unterscheidung einzelner Zellpopulationen zu, allerdings ist es ebenso möglich Untergruppen innerhalb einer Zellpopulation zu differenzieren, indem unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten vom FACS- Gerät detektiert werden. Dazu werden Zellen mit Antikörpern inkubiert, die an Oberflächenproteine, die sogenannten *Cluster of differentiation* (CD) oder aber auch an intrazelluläre Bestandteile binden können. Die Antikörper selbst tragen Fluorochrome, welche dazu dienen, die an CD- bzw. an intrazelluläre Bestandteile gebundene Antikörper unter dem Fluoreszenzmikroskop zu identifizieren. Zellen gleicher Populationen, aber unterschiedlicher Subpopulation binden nun unterschiedlich stark Antikörper. Je nach Stärke der Bindung unterscheidet sich auch die Emission von fluoreszierendem Licht. Durch Unterscheidung der Lichtintensität ist es dadurch möglich Subpopulationen voneinander zu unterscheiden.

4.1.5 Durchführung der Durchflusszytometrie

Die durchflusszytometrische Analyse der Zellsuspension erfolgte nach einem Tag Inkubation unter Punkt 4.1.1 genannten Standardbedingungen und dem Zusatz von 8 ng/ml IFN- γ .

Zunächst wurden die Zellen durch vorsichtiges Pipettieren von der Zellschale gelöst und in 15 ml Röhrchen überführt. Vorsichtiges Arbeiten mit einem Zellschaber diente dem Ablösen adhärenter Zellen von der Kulturschalenoberfläche, wodurch nahezu alle Zellen aufgenommen werden konnten. Es folgte eine Zellzählung unter dem Lichtmikroskop (Abb. 5), sowie eine anschließende Zentrifugation bei 250 x g für 2 min bei 20 °C. Im nächsten Arbeitsschritt wurde der Überstand verworfen und die Zellsuspension mit 2 ml Waschpuffer resuspendiert. Es erfolgte die Aufteilung der Zellen in 1,5 ml Reaktionsgefäße. Es wurden sechs Reaktionsgefäße mit jeweils mindestens 250.000- und eines mit mindestens 500.000 Zellen befüllt. Daraufhin folgte eine weitere Zentrifugation bei 250 x g für 5 min. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und die Zellen mit jeweils 100 μ l FACS-Puffer resuspendiert. Um spektrale Überlappungen der einzelnen Fluorochrome zu kompensieren und Zellpopulationen korrekt gegeneinander abzugrenzen, wurden Einzelfärbungen der Marker angesetzt. Darauf entfielen fünf der sieben Reaktionsgefäße. Das Verhältnis zwischen Antikörpern und FACS-Puffer war von dem jeweiligen Antikörper abhängig und musste entsprechend den Herstellerangaben angepasst werden. In diesem Falle wurden die Antikörper CD14-PerCP, CD45-FITC, CD86-PE, CD16-APC und ein Marker für abgestorbene Zellen (Sytox) verwendet, von denen jeweils 20 μ l in die Reaktionsgefäße mit mindestens 250.000 Zellen gegeben wurden. Generell wurde bei der Arbeit mit Fluorochromgekoppelten- Antikörpern darauf geachtet, die Proben aufgrund der bestehenden

Lichtsensitivität vor Licht zu schützen. Neben den Antikörperansätzen wurde eine ungefärbte Kontrolle mitgeführt, in der sich kein Antikörper, sondern lediglich die Zellen befanden, um die Autofluoreszenz der Zellen festzustellen. Wie die Einzelfärbungen diente dieser Schritt einer besseren Abgrenzung der Zellpopulationen untereinander. Diese Probe enthielt ebenfalls 250.000 Zellen. In einem letzten Reaktionsgefäß wurden mindestens 500.000 Zellen mit sämtlichen Markern versetzt. Die Gefäße konnten anschließend geschüttelt und für 1 h bei 4 °C, in Dunkelheit inkubiert werden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde zu jeder Probe 1 ml FACS- Puffer gegeben und erneut bei 250 x g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Im nächsten Schritt erfolgte die zweimalige Wiederholung des Schrittes und es schloss sich die letztmalige Resuspendierung in 300 µl FACS-Puffer an. Die Zellsuspensionen wurden nun in Durchflusszytometrieröhrchen gegeben und waren so präpariert bereit für die Zellanalyse.

4.2 Vorbereitung und Ablauf des operativen Eingriffs am murinen Hinterlauf

4.2.1 Dokumentation und Maßnahmen vor Tierversuchen

Den Tieren wurde nach Anlieferung eine mindestens einwöchige Eingewöhnungszeit gewährt, damit diese sich an die neue Umgebung gewöhnen konnten. Auf diese Weise konnte der Einfluss möglicher Störfaktoren auf Messwerte so klein wie möglich gehalten werden. Vor den Operationen wurden die Mäuse nach einem Protokoll genau dokumentiert. Eingang in diese Dokumentation fanden: Geschlecht, Alter, Stamm, Gewicht, besondere Auffälligkeiten. Weiterhin wurde der Operationsverlauf, Zellapplikation sowie die genutzte Menge Anästhetikum vermerkt. An den Tagen der Laser- Doppler- Messung wurde die Konstitution der Maus außerdem mithilfe eines Klinikscores genauer beschrieben (siehe Punkt 5.6, Tab. 11).

4.2.2 Narkotisierung der Versuchstiere

Für invasive Maßnahmen war es nötig die Tiere in Narkose zu versetzen. Dadurch konnten sowohl die Schmerzen und Funktionsbeeinträchtigungen als auch der Stress für das Tier verringert werden. Für Eingriffe wie Gefäßligaturen, Blutentnahmen und Laser-Doppler-Messungen war es nötig die Mäuse auf zwei verschiedene Arten zu betäuben. Initial erfolgte eine Isofluran-Inhalationsnarkose, an die sich eine intraperitoneale Anästhesie anschloss. Die Inhalationsnarkose wurde mit einer 5 % Isoflurankonzentration in einem geschlossenen

2 l-Messbecher durchgeführt. Für die intraperitoneale Injektionsnarkose der Maus verwendeten wir eine Mischinjektion aus 2,4 ml Ketamin (10 %), 0,8 ml Xylazin (2 %) und 6,8 ml NaCl (0,9 %). Injiziert wurde die Lösung mit einer 1 ml Insulinspritze und einer 29 G Kanüle. Die Kanülenstärke wurde möglichst klein gewählt, um dem Tier zusätzliche Schmerzen zu ersparen. In der Vorbereitung war es wichtig, dass Narkosemittel auf ca. 37 °C zu erwärmen, da es vor Gebrauch im Kühlschrank lagerte.

Bei der Entnahme aus dem Käfig sollte durch ein besonders behutsames Vorgehen unnötiger Stress für das Tier vermieden werden. Die Maus wurde vorsichtig am Schwanz gefasst und in 2 l-Messbecher gesetzt, der auf einer Waage stand. Vor der Narkose wurde das Gewicht der Maus erfasst, wodurch sich nun die benötigte Menge Anästhetikum für die intraperitoneale Injektion ermitteln ließ (Abb. 7).

$$\text{Injektionsdosis in } \mu\text{l} = (\text{Mausgewicht(g)} \times 10) - 100$$

Abbildung 7: Formel zur Berechnung des zu injizierenden Narkotikavolumens.

Nach Berechnung der Menge des Narkosemittels wurde ein in Isofluran getränkter Schlingzangentupfer in den Messbecher gelegt und abgewartet bis die Maus sediert war. Die Maus wurde so lange im Gefäß belassen, bis die Narkosetiefe ausreichte, um die Maus sicher zu fassen und die intraperitoneale Injektion durchzuführen. Die Inhalationsnarkose wurde so kurz wie möglich gehalten, da bei einer längeren Isofluranexposition die Komplikationsrate (Aspiration, Atemdepression, erhöhte intraoperative Sterblichkeit) anstieg.

Nun wurde die Maus zügig aus dem Gefäß entnommen und bauchwärts auf die Arbeitsplatte gelegt um diese sicher greifen zu können. Die Maus wurde zwischen Daumen und Zeigefinger im Nacken gefasst und in die Handfläche gedreht. Durch vorsichtigen Zug am Schwanz mit dem kleinen Finger der gleichen Hand erfolgte eine leichte Überstreckung, die jetzt die intraperitoneale Injektion mit der rechten Hand möglich machte.

Die Injektion erfolgte ca. einen halben Zentimeter kranio-medial des Oberschenkelansatzes in einem 45° Winkel.

Nach der Injektion wurde die Maus behutsam zurück in den Käfig gesetzt. Sie erwachte meist kurz aus der Isofluran- Inhalationsnarkose, um ca. eine Minute später durch die einsetzende Wirkung der Injektionsnarkose erneut sediert zu werden. Vibrissenbewegung und Lidreflex dienten als Kontrollmarker für die Narkosetiefe. Sistierte beides, war von einem ausreichenden Narkosestadium auszugehen. Nach ausreichender Sedierung wurde das Tier bauchwärts für 5 min auf eine Wärmeplatte mit 37 °C gelegt.

4.2.3 Operation

Nach Erfassung aller Daten zum Tier und ordnungsgemäßer Vorbereitung des Versuches, wie unter 4.2.1 und 4.2.2 beschrieben, erfolgten zunächst die Rasur des Operationsgebietes und die Enthaarung der Beine im Scangebiet (siehe Abb. 8). Dafür wurde zunächst eine ausreichende Narkosetiefe abgewartet. Die Maus wurde auf dem Rücken auf Zellstoff platziert und die Beine mit Rasierschaum eingecremt. Dabei wurden beide Beine sowie die zu operierende Seite bis ca. 2 cm oberhalb des Oberschenkelansatzes benetzt. Die Einwirkzeit des Rasierschaums belief sich auf 5 min. Die Rasiercreme ließ sich anschließend mit einem Plastikrasierspatel und etwas warmem Wasser vollständig entfernen. Nach der Rasur wurde die Maus mit Papierhandtüchern abgetrocknet und für 5 min bauchwärts erneut auf die 37 °C warme Wärmeplatte gelegt. Durch Auftragen eines Augengels wurden die Augen des Tieres vor Austrocknung geschützt. Anschließend erfolgte die erste Laser- Doppler- Messung auf der Wärmeplatte, um den präoperativen Perfusionszustand in den Beinen der Maus festzustellen.

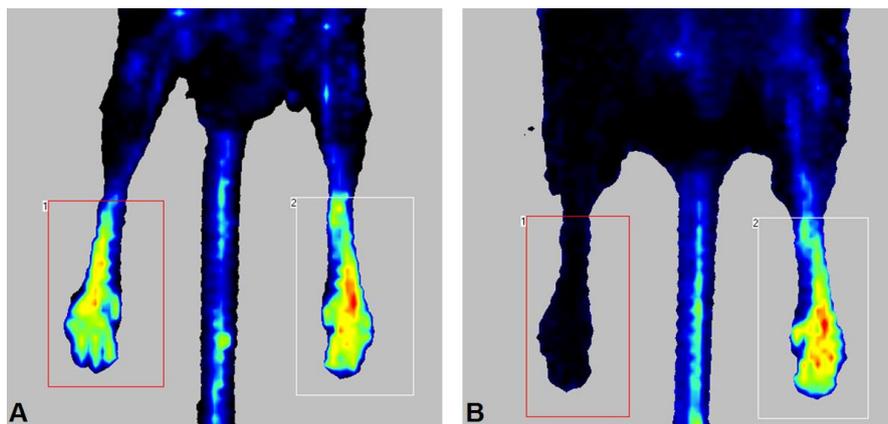


Abbildung 8: Laser-Doppler-Perfusionsmessung. Dargestellt sind die präoperative Durchblutung im murinen Hinterlauf (A), sowie die postoperative Darstellung der Perfusion (B), die gleichzeitig als Erfolgskontrolle für die Operation diente. Die Rechtecke grenzen das Messgebiet ein. In diesem Gebiet erfolgte eine Haarentfernung um eine störungsfreie Messung der Perfusion zu garantieren.

In Vorbereitung der eigentlichen Operation legten wir die Maus mit dem Rücken auf eine Styroporplatte und fixierten die Hinterläufe mit Klebestreifen. Anschließend wurde das OP-Gebiet desinfiziert. Zunächst musste die durch die Haut schimmernde, an der Oberschenkelinnenseite auffindbare, *V. femoralis* aufgesucht werden. Der sichtbare Abschnitt der Vene verschwindet kurz vor der Inguinalregion. Ca. einen Zentimeter oberhalb des letzten

sichtbaren Venenabschnittes wurde die Haut mit einer stumpfen Pinzette gefasst und mithilfe einer Schere eine Hautinzision von ca. 0,5 cm, entsprechend des Venenverlaufs durchgeführt.

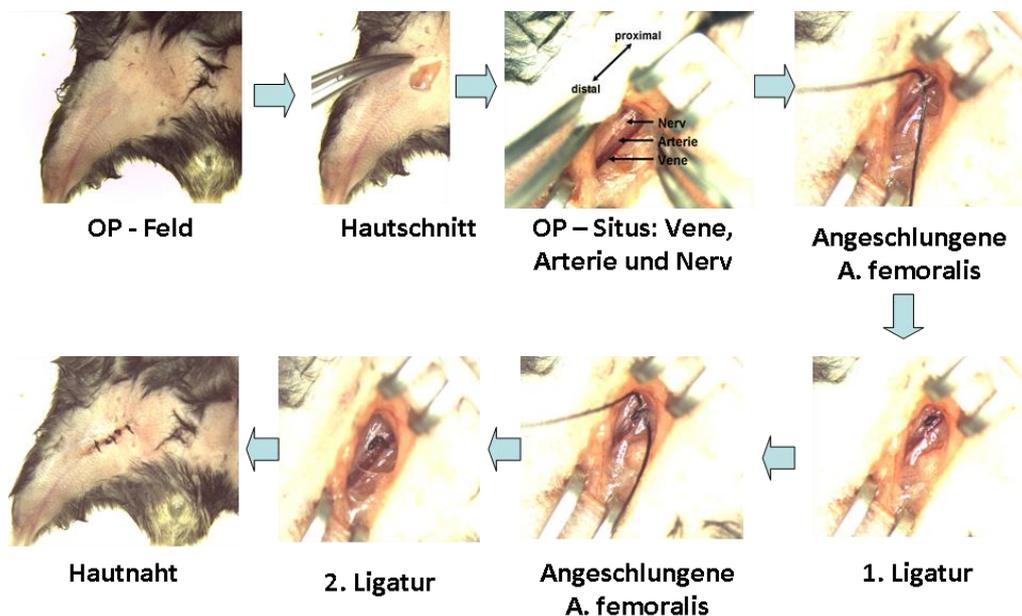


Abbildung 9: Übersicht über den Ablauf der Operation.

Nun wurde vorsichtig mit der spitzen, gebogenen Pinzette in die Tiefe vorpräpariert. Die gerade, spitze Pinzette wurde zur Offenhaltung des OP- Gebietes verwendet. Die Präparation erfolgte bis zur Sichtung der femoralen Gefäß- Nervenstraße (Abb. 9). Für eine bessere Übersicht über das OP- Feld und eine einfachere Ligatur kam ein Wundspreizer zum Einsatz. Nun wurde das weißlich schimmernde Leistenband aufgesucht. Von medial nach lateral lagen jetzt *V. femoralis*, *A. femoralis* und der *N. femoralis* frei. Eine weitere Faszie war von den Leitstrukturen zu entfernen. Im folgenden Schritt wurde das Muskelgewebe neben letztgenannten Strukturen mit einer Pinzette gefasst und mit der anderen Pinzette zunächst der Nerv und anschließend die Vene von der Arterie separiert. Etwaige Blutungen wurden mittels Stieltupfer gestillt. Als Nächstes musste die Arterie zum Teil mobilisiert werden, um sie schließlich mit der gebogenen Pinzette sanft anzuheben. Die Stelle für die Ligatur lag möglichst nah am Leistenband, zwischen der *A. caudalis femoris* kranial und der *A. epigastrica superficialis* caudal. Es wurde mit einem nicht- resorbierbaren 6-0-Faden ligiert. Die Ligatur wurde mittels Doppelknoten durchgeführt. Zur Sicherheit wurde eine zweite Ligatur in unmittelbarer Nachbarschaft der Ersten gelegt. Anschließend erfolgte ein Kontrollscan mit dem Laser-Doppler, damit konnte die erfolgreiche Ligatur überprüft werden (Abb. 8). Nach dem Scan wurde die Haut mit vier bis fünf Einzelknopfnähten (Fadenstärke 6-0, nicht-resorbierbar) verschlossen. Anschließend erfolgte eine erneute Desinfektion des OP- Gebietes.

4.2.4 Prinzip der Laser-Doppler-Messung

Bei der Messung mittels Laser- Doppler-Verfahren wird die Mikrozirkulation, d.h. der Blutfluss in Kapillaren, Arteriolen, Venolen und Shuntgefäßen eines Gebietes, gemessen.

Hierzu gibt der Laser Licht einer bestimmten Wellenlänge (780 nm) ab. Dieses Licht wird beim Auftreffen auf Gewebe sowohl absorbiert, als auch reflektiert (Abb. 10). Beim Auftreffen auf bewegte Objekte, wie z.B. Blutzellen, ändert sich diese Wellenlänge (Dopplerverschiebung).

Trifft das Licht hingegen auf unbewegte Objekte, bleibt die Wellenlänge des Lichts unverändert.

Licht, in seiner Wellenlänge verändert, trifft auf einen Empfänger in der Sonde, der die Information in ein elektrisches Signal umwandelt und analysiert.

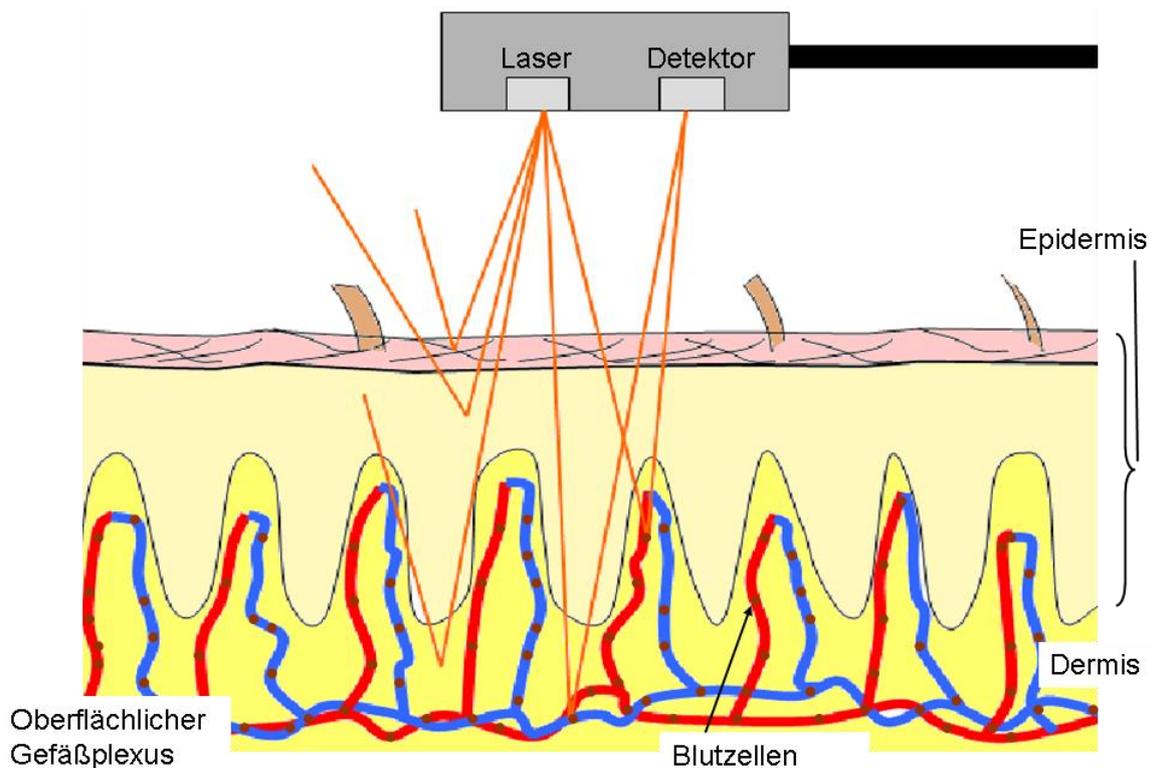


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Laser- Doppler- Perfusionsmessung.

Dabei korrelieren Stärke und Frequenz des Signals mit Menge und Geschwindigkeit bewegter Blutzellen. Somit ergibt sich die Perfusion aus dem Produkt der Geschwindigkeit und der Menge der bewegten Blutzellen. Die Messtiefe der Laser-Doppler-Methode ist abhängig von der Pigmentierung und Struktur der Haut, darüber hinaus nehmen folgende Faktoren Einfluss: Dichte des Kapillarbettes, Oxygenierung des Blutes, Wellenlänge des Laserlichts und zuletzt der Abstand zwischen Sender und Empfänger. Die Eindringtiefe der Messstrahlen ist folglich

in gut durchblutetem Gewebe schlechter als in minderperfundierten Bereichen, wie z. B. nach Ligatur. Das Ergebnis der Laser-Doppler-Messung wird nicht als Perfusionsrate, wie etwa in ml/min angegeben, sondern in vom Hersteller definierten Perfusionseinheiten (PU). Um Ergebnisse vergleichbar machen zu können, ist es daher unerlässlich den Versuchsaufbau zu standardisieren und die Geräte nach Protokoll des Herstellers zu kalibrieren. Die Perfusionssmessung mittels Laser-Doppler bietet eine nichtinvasive, einfache und kostengünstige Methode um die Durchblutung in einem festgelegten Gebiet, in Echtzeit zu messen.

4.2.5 Durchführung der Perfusionssmessung

In unseren Experimenten wurde die Perfusion in den Hinterläufen beider Seiten der Versuchstiere gemessen. Vor der Untersuchung erfolgte eine Rasur des entsprechenden Gebietes auf einer 37 °C warmen Wärmeplatte. Die eigentliche Messung erfolgte auf der gleichen Wärmeplatte mit einem schwarzen Hintergrund. Der Scanner wurde mit einem grünen Tuch bedeckt, um den Einfluss durch Raumlicht zu vermindern. Das Versuchstier wurde zunächst wie unter Punkt 4.2.2 beschrieben anästhesiert, danach rasiert und anschließend für 5 min auf die Wärmeplatte gelegt. Die Maus wurde mit Hilfe doppelseitigen Klebandes unterhalb der Fußsohlen auf der Wärmeplatte fixiert. Im Anschluss daran wurde die Fläche festgelegt, die der Laser abtasten sollte. Pro Scandurchlauf wurden drei Bilder direkt hintereinander in gleicher Position erstellt, um am Ende einen Durchschnittswert der Perfusion zu erhalten. Die Messungen erfolgten präoperativ, unmittelbar postoperativ zur Erfolgskontrolle der Ligatur, sowie an Tag 7, 14 und 21.

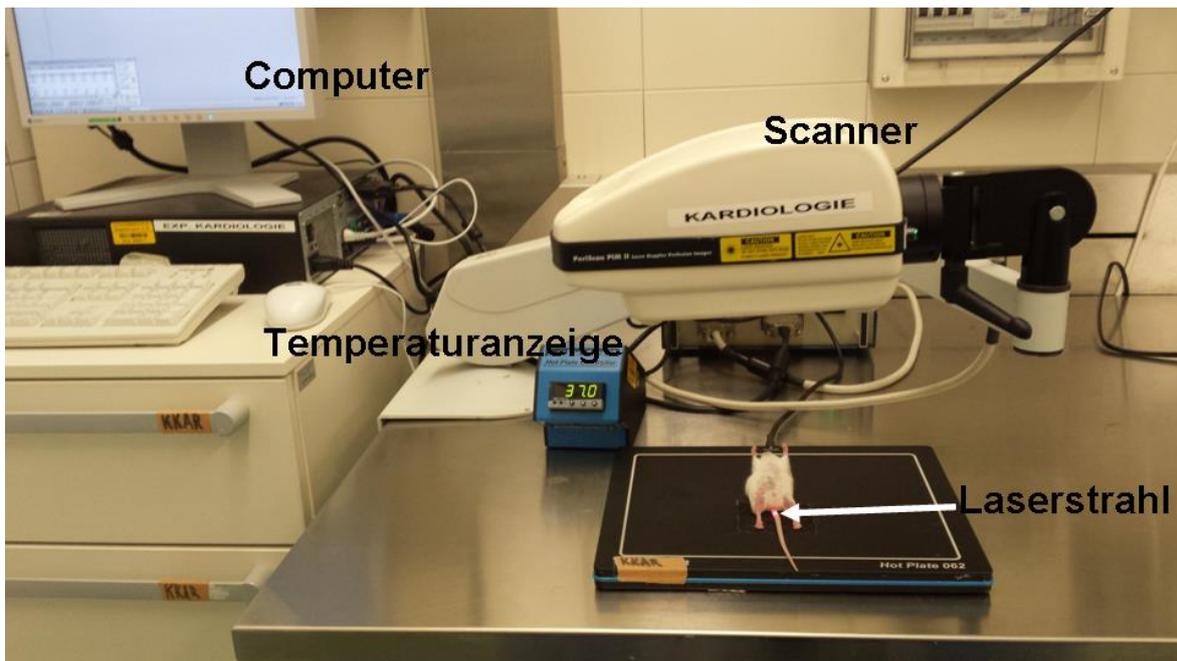


Abbildung 11: Übersicht über den Laborarbeitsplatz während einer Laser-Doppler-Messung. Dargestellt ist das Versuchstier, welches mit doppelseitigem Klebeband auf der Wärmeplatte fixiert wurde. Der Laserstrahl ist auf die Mitte des Scanfildes gerichtet. Im Hintergrund sind die Temperaturanzeige der Wärmeplatte, sowie der PC mit geöffneter Software zu erkennen.

4.3 Monozytenhoming

4.3.1 Zellmarkierung

Durch die lokale Zufuhr von Faktoren und die Interaktion mit anderen Zellen sind Monozyten wichtige Mediatoren der Arteriogenese. Sie entfalten ihre Wirkung lokal an Orten der Entzündung, in unserem Fall in der Nähe der Gefäßligatur. Die Monozyten wurden intravenös 24 h nach Ligatur über die Schwanzvene injiziert, um so an inflammatorische Umgebungen zu gelangen und die Arteriogenese zu fördern.

Zum Nachweis der injizierten Monozyten an Orten der Entzündung, des sogenannten *Monozytenhomings*, wurden die Zellen vor der Schwanzveneninjektion mit DiO oder DiD markiert. Diese Farbstoffe lagern sich mit ihren langen, lipophilen Kohlenstoffketten in die Zellmembran der zu färbenden Zelle ein. Dadurch werden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar. DiO besitzt sein Absorptionsmaximum bei 484 nm und ein Emissionsmaximum bei 501 nm. DiD hingegen hat sein Absorptionsmaximum bei 644 nm und ein Emissionsmaximum von 665 nm.

Um die Zellen zu markieren, wurde die gewünschte Anzahl an Zellen in kulturfreiem Medium mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro ml resuspendiert. Pro ml Zellsuspension wurden $5 \mu\text{l}$

DiO/DiD hinzugefügt und mit der Zellsuspension durch vorsichtiges Pipettieren vermischt. Die Zellsuspension wurde nun für 20 min bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation mit 300 x g, für 5 min, bei 20 °C, mit aktivierter Bremse. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen anschließend mit 37 °C warmem Zellkulturmedium resuspendiert. Dieser zuletzt genannte Schritt wurde im Folgenden noch 2 weitere Male wiederholt. Zum Schluss erfolgte eine Zellzählung und die Zellen wurden mit NaCl resuspendiert. Zu diesem Zeitpunkt sind die Zellen ausreichend präpariert um in gewünschter Menge appliziert zu werden.

4.3.2 Prinzip der Intravitalmikroskopie

Mit der Intravitalmikroskopie ist es möglich das Verhalten der transplantierten Monozyten *in vivo* nachzuvollziehen und die Zellen in Echtzeit auf ihrem Weg zu Orten der Entzündung zu beobachten. Bisher war es uns lediglich möglich das *homing* der Zellen *post mortem* in histologischen Präparaten nachzuweisen, welche anfällig für Präparationsartefakte sind. Diese spezielle Mikroskopiertechnik macht es uns möglich Zellen in einer realistischen Umgebung zu beobachten. Für die Intravitalmikroskopie haben wir uns der Fluoreszenz-Multiphotonenmikroskopie bedient.

Bei einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop wird durch Licht bestimmter Wellenlänge ein fluoreszierender Stoff angeregt. Dabei wird ein Elektron durch ein Photon in einer höhere Energiestufe versetzt. Beim „Zurückspringen“ in die niedrigere Energieebene, wird Energie in Form von Photonen abgegeben, die dann als Fluoreszenz ausgestrahlt wird. Dabei ist der Strahlenverlauf linear und es kommt zu Autofluoreszenzen, diese entstehen durch die Bestrahlung von Gewebe vor und hinter der Fokusebene (Abbildung 12). Zum Ausschalten dieser Autofluoreszenz wird beim konfokalen Fluoreszenzmikroskop eine Lochblende verwendet.

Beim Multiphotonenmikroskop addiert sich die Energie von mehreren Photonen und regt so den fluoreszierenden Stoff an. Damit die Photonen gemeinsam wirken können, müssen sie zeitlich zur gleichen Zeit, d. h. im Femtosekundenbereich (1×10^{-15}), auftreffen. Um dies zu gewährleisten ist eine hohe Photonendichte des Laserstrahls nötig.

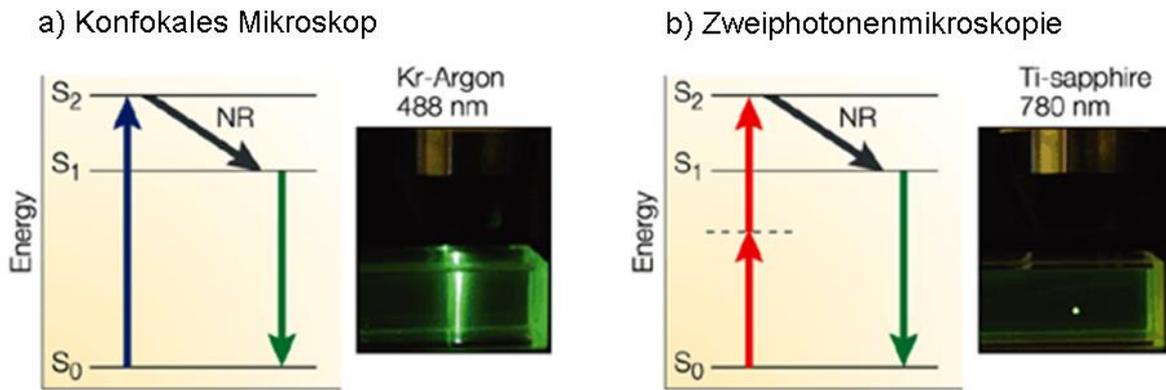


Abbildung 12: Vergleich zwischen konfokaler- und Zweiphotonenfluoreszenzmikroskopie.

a) Konfokales Mikroskop: Photonen blauen, energiereichen Lichts ($\lambda = 488 \text{ nm}$) eines Krypton-Argon-Lasers bringen Elektronen aus dem Grundzustand (S_0) in einen höherenergetischen Zustand (S_2). Das Energieniveau kann nur kurzfristig gehalten werden und es kommt zu einer nichtstrahlenden Relaxation des Elektrons auf ein niedrigeres Energieniveau (S_1). Durch die Abgabe von Photonenstrahlung kommt das Elektron wieder auf Ausgangsniveau (S_0). Die Photonenstrahlung ist langwelliger, als die Wellenlänge der anregenden Photonenstrahlung. Dieses Phänomen ist als „Stokes Shift“ bekannt. Die Photonenstrahlung wird als Fluoreszenz wahrgenommen. Foto unter **a)** Photonen werden auf dem gesamten Weg des Lichtstrahls emittiert. **b) Zweiphotonenmikroskopie:** Photonen infraroten, energiearmen Lichts ($\lambda = 780 \text{ nm}$) eines pulsierenden Titan-Saphir-Lasers regen gleichzeitig ein Elektron an und bringen es so in einen energiereicheren Zustand. Die Emission erfolgt auf die gleiche Weise wie bei der konfokalen Mikroskopie, allerdings ist die Lichtemission nur punktförmig an einer einzigen Stelle vorzufinden (Foto unter **b)**).

Abgewandelt nach Cahalan et al.[92].

Im Gegensatz zur konfokalen Fluoreszenzmikroskopie besteht bei der Multiphotonenfluoreszenzmikroskopie die Möglichkeit Aufnahmen tieferer Gewebeschichten zu machen. Dabei sind Eindringtiefen bis zu einem Millimeter möglich. Diese Eindringtiefen sind durch die Nutzung von Licht im infraroten Bereich, d.h. mit größerer Wellenlänge als bei konfokalen Mikroskopen realisierbar. Des Weiteren werden Fluoreszenzfarbstoffe durch den punktförmigen Fokus geschont. Die Intravitalmikroskopie erfolgte wie der histologische Nachweis des Monozytenhomings einen Tag nach der Injektion markierter Monozyten.

4.3.3 Durchführung der Intravitalmikroskopie

Um die Intravitalmikroskopie durchführen zu können, wurden die Tiere zunächst durch eine intraperitoneale Anästhesie (siehe Punkt 4.2.2) betäubt und auf einer auf 37 °C temperierten Wärmeplatte platziert. Die Pfoten wurden mit Klebeband befestigt und die zu untersuchende Stelle, in direkter Nähe zur Ligatur, in diesem Falle die rechte Leiste, großflächig mit Enthaarungscreme von Haaren befreit. Die Haut wurde daraufhin mit einer Stumpfen Pinzette gegriffen und mit einem sterilen Skalpell wurde ein Hautlappen von circa 0,5 cm x 0,5 cm freipräpariert. Die präparierte Stelle wurde mit NaCl feucht gehalten, um eine Schädigung des Gewebes zu verhindern. Zu beiden Seiten des rechten Oberschenkels wurden aus Knetmasse geformte Stempel, zu beiden Seiten des Mäusebeins platziert und bildeten so die Halterung für den Objektträger (Abb. 13). Er wurde mit direktem Kontakt zu dem untersuchten Areal aufgelegt.



Abbildung 13: Bein zwischen Stempeln mit Objektträger über dem zu untersuchenden Areal.

Aus Wagner et al.[93].

Zur besseren Darstellung der Gefäße wurden 50 µl Rhodamindextran retrobulbär injiziert. Bei längeren Untersuchungen fand eine Entfärbung der Gefäße statt, sodass die Applikation wiederholt werden musste. Die nach diesem Schema präparierte Maus, war nun bereit unter dem Mikroskop untersucht zu werden.

4.3.4 Zelltransplantation

Die Transplantation der Zellen fand durch eine Injektion in eine Vene am Schwanz der Tiere statt. Um die Applikation der präparierten Monozyten durch eine Schwanzveneninjektion adäquat durchführen zu können, musste die Injektionstechnik absolut sicher beherrscht werden. Nur so ließ sich gewährleisten, dass jede Maus eine ähnlich große Monozytenanzahl systemisch verabreicht bekommen konnte.

Zunächst wurden die Tiere unter einer Wärmelampe oder auf der Wärmeplatte platziert. Dabei war es wichtig die Tiere zu beobachten, um Anzeichen einer Überhitzung frühzeitig erkennen und intervenieren zu können.

Für die Schwanzveneninjektion wurden die Tiere mit 100 µl Narkoselösung intraperitoneal anästhesiert. Die Narkose diente zum Einen dazu den Stress für die Versuchstiere möglichst gering zu halten und zum Anderen konnte so eine optimale Injektion erreicht werden.

Die in NaCl in einem Reaktionsgefäß resuspendierten Monozyten wurden vor dem Aufziehen in die Spritze vorsichtig geschüttelt, um so eine gleichmäßige Verteilung der Monozyten in der Injektionslösung zu gewährleisten. Die Monozytenlösung wurde nun in eine 1 ml Insulinspritze mit Sparstempel aufgezogen. Im herkömmlichen Insulinspritzen-Typ verbleibt eine kleine Menge Volumen im apikalen Spritzenteil. Mit dem Sparstempel konnten allerdings auch die letzten Monozyten aus der Spitze abgegeben werden. Pro Maus wurden 2,5 Mio. Monozyten auf ein entsprechendes Volumen injiziert. Genauer wurden pro g KG nicht mehr als 5 µl Volumen langsam injiziert. Auch hier wurde eine kleine Kanüle zwischen 28 G und 30 G gewählt, um dem Tier unnötige Schmerzen zu ersparen.

Zunächst wurde die Maus in einer Fixationsvorrichtung eingespannt und diese wiederum auf dem Labortisch fixiert. Beim Einspannen der Maus musste genau darauf geachtet werden, dass keine Extremitäten eingeklemmt wurden und sie nach Schließen des Fixateurs noch genug Luft zum Atmen bekam. Dann wurde die Stelle für die Injektion gründlich desinfiziert. Um die Venen besser sichtbar zu machen, wurde der venöse Rückfluss proximal der Injektionsstelle mit zwei Fingern kurz abgeklemmt. Nach einer 90° Drehung des Schwanzes waren die Venen dorsal lokalisiert. Die Kanüle wurde in einem 45° Winkel eingestochen (Abb. 14).

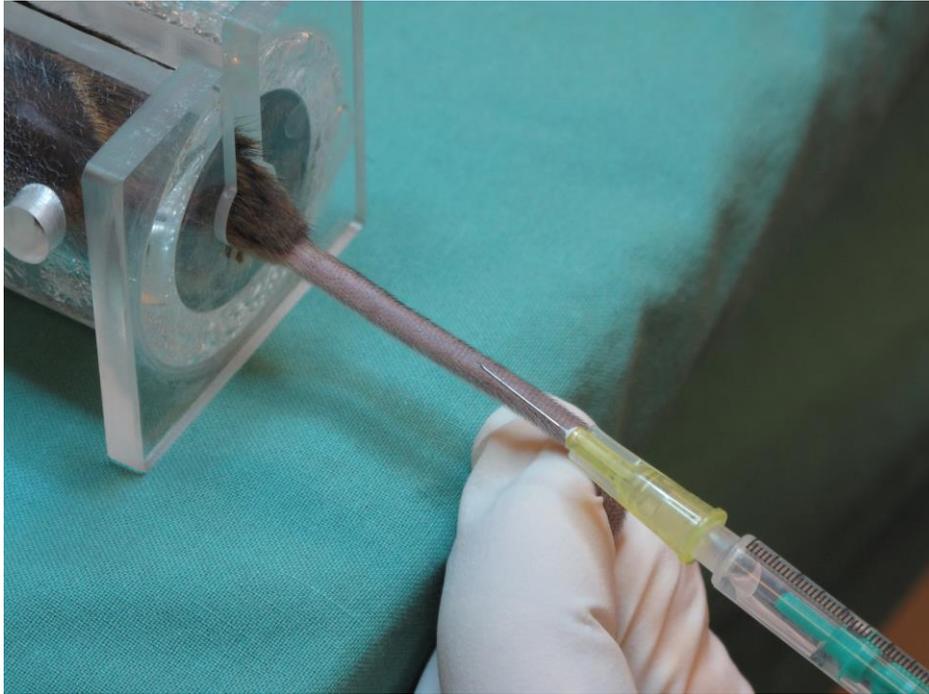


Abbildung 14: Ausgangsposition für die Schwanzveneninjektion. Darstellung des Venenverlaufs an der Spitze der Kanüle. Für eine optimale Injektion befindet sich die Maus in einer Fixationsvorrichtung (Restraint). Aus Wagner et al.[94].

Sobald die Vene getroffen war, ließ sich die Monozytenlösung leicht injizieren. Blutungen aus der Injektionsstelle wurden durch leichten Druck für ca. eine Minute gestoppt. Danach wurde das Tier vorsichtig aus dem Restraint gezogen und behutsam zurück in den Käfig gelegt, der weiterhin unter einer Wärmelampe bzw. auf der Heizplatte stand. Die Maus wurde anschließend bis zum Erwachen aus der Narkose beobachtet.

4.4 Histologische Untersuchungen

4.4.1 Muskelentnahme

Für die histologische Auswertung erfolgte 21 Tage nach der Operation die Entnahme der Muskeln in beiden Mausbeinen. Nach der letzten Laserscan- Messung erfolgte die Tötung der narkotisierten Maus durch dorsale Dislokation im Bereich der Halswirbelsäule. Im Anschluss entnahmen wir aus beiden Beinen auf gleicher Höhe Gewebeproben aus drei verschiedenen Muskeln: *M. quadriceps femoris*, *Mm. adductores*, *M. gastrocnemius*. Die Muskeln wurden in einem, mit Gewebe- Gefriermedium gefülltem, Plastikschälchen von 6 cm² Größe aufbewahrt, welche dann auf Trockeneis gelegt wurden. Hier erfolgte das langsame Einfrieren mit einer anschließenden Lagerung bei -80 °C.

Zur sachgemäßen Muskelentfernung wurden zunächst die Extremitäten der Maus auf einer Styroporplatte mittels Kanülen fixiert. Zunächst erfolgte eine Entfernung der Haut im Bereich der Beine. Als nächstes wurde zur Entfernung des *M. quadriceps femoris* der Muskel unmittelbar proximal der Patella abgetrennt und die Patellasehne mit einer stumpfen Pinzette gefasst. Die Sehne diente auch gleichzeitig als Markierung des distalen Muskelendes. Nun wurde das Skalpell entlang der ventralen Oberfläche des Femurs bis zu den proximalen Ursprüngen des Muskels geführt. An dieser Stelle erfolgte ein zweiter Schnitt und der Muskel konnte entfernt werden.

Als nächstes wurden die *Mm. adductores* an ihren Ansatzstellen am Becken der Mäuse abgetrennt, dann wurde das Adduktorenpaket mit einer stumpfen Pinzette vorsichtig gefasst und das Skalpell medial des Femurs proximal bis zu den Muskelursprüngen geführt. Hier erfolgte der zweite Schnitt, der die *Mm. adductores* abtrennte. Das distale Ende des Muskels wurde mit einem Faden markiert.

Zuletzt wurde der am Unterschenkel befindliche *M. gastrocnemius* entfernt. Mit einer stumpfen Pinzette wurde dafür die Achillessehne gefasst, welche der distalen Markierung des Muskels diente und mit einem Skalpell der Muskel an seinem Ursprung, den medialen und lateralen Femurkondylen, abgetrennt. Die Markierung des proximalen und distalen Endes der Muskeln war nötig, für eine bessere Orientierung am Präparat während der Weiterverarbeitung der Muskelproben.

4.4.2 Immunhistologie

Die Herstellung der mikroskopischen Präparate erfolgte an einem Kryotom, einem Gerät zum Schneiden von gefrorenen Präparaten. Zu Beginn wurde das Präparat auf einem Metallstempel mit Einbettmedium fixiert und von proximal nach distal angeschnitten. Die Dicke der Schnitte betrug für alle Immunfloreszenz- Präparate 5 µm. Anschließend erfolgte eine Färbung der Präparate mit verschiedenen Markern zur Differenzierung des angeschnittenen Gewebes (Abb. 15).

Zunächst wurde die Kälberlösung, welche man zum Blocken unspezifischer Bindungen auf dem Präparat und für die Herstellung der Antikörperansätze benötigte, hergestellt. Dafür wurden 10 g BSA vollständig aufgetaut und mit 90 ml aqua destillata auf einem Magnetrührgerät in einem Erlenmeyerkolben in Lösung gebracht. Des Weiteren wurde ein leerer Präparatekasten mit aqua destillata getränktem Zellstoff ausgelegt. Dieser Kasten diente zur Aufbewahrung der zu färbenden Präparate und sollte, durch die darin herrschende hohe Luftfeuchtigkeit, einer Austrocknung der Präparate vorbeugen. Aus Rücksicht auf die hohe

Photosensitivität der fluoreszierenden Antikörper, war der Kasten mit den Objektträgern stets geschlossen zu halten. Die zu färbenden Schnitte wurden vor der ersten Behandlung mit *liquid barrier marker* umkreist, um so möglichst sparsam und mit einer gleichmäßig hohen Antikörperkonzentration zu arbeiten. Nachdem der Lack getrocknet war, folgte für alle Schnitte eine Inkubation von 30 min mit Kälberlösung. Während der Inkubationszeit ließen sich der primäre α -SMA-Antikörper, sowie der sekundäre CD31-Antikörper vorbereiten. Dazu wurden beide aus dem Kühlschrank entnommen und zunächst geschüttelt. In ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde Kälberlösung mit den Antikörpern in einem Verhältnis von 1:100 vermischt und anschließend erneut geschüttelt. Pro Schnitt verwendeten wir 50 μ l der BSA-Antikörperlösung. Nach Ablauf der Inkubationszeit von einer Stunde wurde die Antikörperlösung mit PBS abgewaschen und darauf geachtet, dass das Präparat nicht austrocknet. Die vorbereitete Antikörperlösung wurde nun aufgebracht. Im nächsten Schritt wurde der sekundäre Antikörper (Anti-rabbit-IgG-Cy-3) vorbereitet. Auch dieser wurde aus dem Kühlschrank entnommen, zunächst geschüttelt und anschließend in einer 1:100 Verdünnung mit Kälberlösung vermischt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit für den primären Antikörper wurden die Präparate erneut mit PBS gewaschen. Die Schnitte der Präparate wurde für eine weitere Stunde mit 50 μ l der sekundären Antikörper-BSA-Lösung pro Schnitt inkubiert.

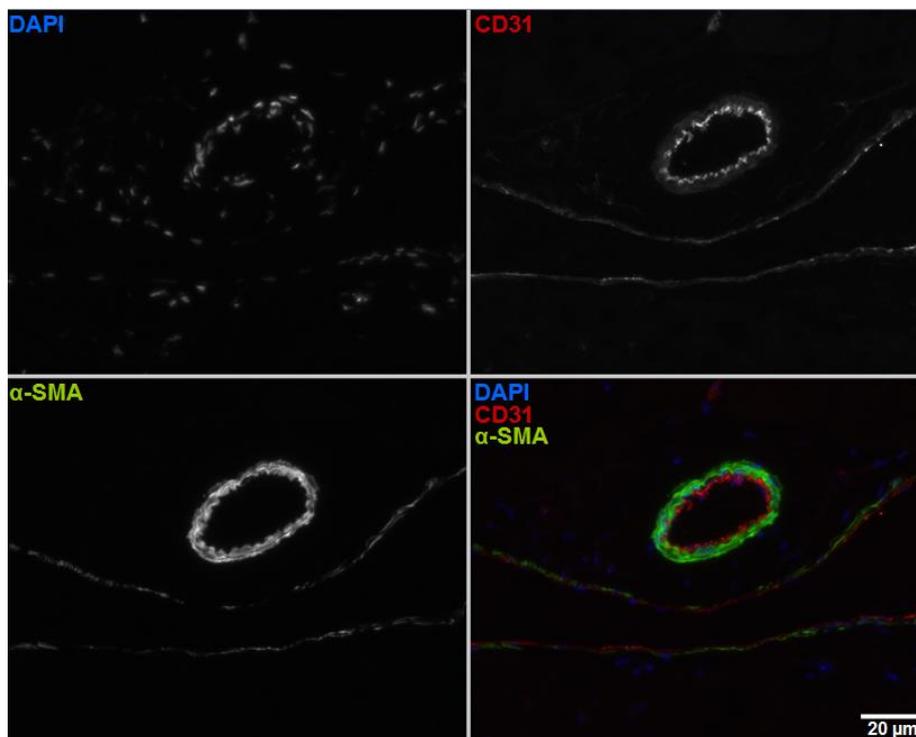


Abbildung 15: Übersicht über die verschiedenen immunhistochemischen Gefäßfärbungen. 40er Objektiv (arterielles Gefäß oben, venöses Gefäß unten): DAPI, CD31, α -SMA, gemischt.

Nachfolgend musste der DNA- Marker DAPI in einer 1:1000 Verdünnung mit Kälberlösung verdünnt werden. Nach Abwaschen des sekundären Antikörpers mit PBS erfolgte eine Inkubation aller Präparate mit der DAPI- Lösung von 15 Minuten. Anschließend erfolgte ein zweimaliges Waschen der Präparate mit PBS. Restliche Flüssigkeit auf den Objektträgern ließ sich mit etwas Zellstoff oder der Saugung gut entfernen. Bei diesem Manöver wurde jedoch erneut strengstens darauf geachtet ein Austrocknen der Präparate zu verhindern. Abschließend erfolgte die Eindeckung der Präparate mit Fluoreszenz- Fixations- Medium und Deckgläschen.

4.4.3 Biometrie

Die Auswertung der gefärbten Muskelpräparate erfolgte unter dem Mikroskop und mithilfe der Bildverarbeitungssoftware *ImageJ*®. Die Schnitte wurden sowohl auf die Dichte an Kapillaren, als auch auf die Anzahl an Kollateralgefäßen hin untersucht. Für die Messung der Kapillaren wurden CD31-positive, zirkuläre Signale berücksichtigt, die eine Größe zwischen 2 und 13 μm hatten. Unter 40-facher Vergrößerung wurde ein 1 mm^2 großer repräsentativer Bildausschnitt gewählt, in welchem nun automatisiert alle oben beschriebenen Objekte per Bildbearbeitungssoftware ausgezählt wurden.

Die Zählung der Kollateralen erfolgte mit 10- fach vergrößerten Bildern des gesamten Präparats. Gezählt wurden α -Actin positive Signale. Dabei wurden nur Objekte gezählt, die eine eindeutige Zirkulärität aufwiesen und zwischen 10 μm und 100 μm Durchmesser aufwiesen. Die Zählung erfolgte manuell, da die komplexe Morphologie der Kollateralgefäße eine automatische Auswertung verhinderte.

Bei beiden Zählungen wurde die genaue Bezeichnung des Schnittes, also eine eindeutige Angabe von Muskel und Versuchreihe, dem Auswertenden nicht mitgeteilt, um eine Beeinflussung der Ergebnisse auszuschließen.

4.5 Blutentnahme und Zytokinassay

Für Zytokinbestimmungen im Blut, wurden den Tieren Serumproben abgenommen. Eine effektive Methode zur Blutentnahme bei der Maus ist die retrobulbäre Punktion eines venösen Plexus mithilfe einer Glaskapillare. Die Blutproben wurden zu 7 unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen. Eine erste Probe wurde den Tieren eine Woche vor der Durchführung jeglicher Experimente entnommen. Weitere Serumproben wurden dann zu den Zeitpunkten 8 h, 24 h und 72 h nach Injektion, sowie 7 und 14 Tage nach der Zellinjektion gewonnen.

Zunächst wurde das Versuchstier sachgemäß, wie bereits im Unterpunkt 4.2.2 beschrieben, betäubt und mit dem Bauch auf die Arbeitsfläche gelegt. Zur Blutentnahme wurde ein Venenplexus genutzt, der sich hinter dem Augenhilf des Tieres befindet. Die Glaskapillare für die Punktion war einseitig angeschliffen und maß ca. 2 mm im Durchmesser. In einem ersten Schritt wurde die Kapillare im Angulus orbicularis medialis angesetzt und dann mit einer mit einer leichten Drehbewegung hinter dem Auge platziert. Das scharfe Ende der Kapillare punktierte den Plexus und das Blut konnte in einem Eppendorfer Gefäß aufgefangen werden. Pro Blutentnahme wurden dem Tier ca. 100 µl Vollblut entnommen und mit gleicher Menge NaCl durch eine intraperitoneale Injektion substituiert. Nach Entnahme verblieb das Blut zunächst auf Eis. Wichtig war jedoch, es schnellstmöglich dem nächsten Arbeitsschritt zukommen zu lassen. Es folgte eine Zentrifugation mit 2000 x g, bei 4 °C, für 10 min. Der Überstand (Serum) wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Bis zur Weiterverarbeitung wurde die Probe bei -80 °C eingefroren.

Die Zytokinmessungen aus dem Serum der Tiere wurden mithilfe eines 23-Plex-Immunassays der Firma BioRad bestimmt. Zur Durchführung der Experimente wurde das Protokoll des Herstellers verwendet.

4.6 Statistik

Für die statistische Auswertung wurden die Ergebnisse zunächst in das Programm *Excel*® überführt, um nachfolgend mit dem Programm *SPSS*® (*Version 24*) ausgewertet zu werden.

Die stetigen Merkmale werden in der Form Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt.

Für eine Primäranalyse wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse genutzt (SPSS: allgemeines lineares Modell mit Messwertwiederholungen), in der die Behandlung als Hauptfaktor und die Zeit als Wiederholungsfaktor eingesetzt werden. Dazu wird die Wechselwirkung dieser beiden Faktoren im Modell berücksichtigt. Aussagen über den Zeiteffekt basieren auf den nach Huynh-Feldt adjustierten p-Werten.

Für Detailbetrachtungen werden die Gruppen anschließend mit dem t-Test (Welch) und die zeitabhängigen Veränderungen innerhalb der Gruppen mit dem Paardifferenzen-t-Test beurteilt. Diese werden ohne alpha-Adjustierung durchgeführt und haben explorativen Charakter. Diese sollten daher bei in den Tierexperimenten genutzten Stichprobenumfängen nicht als allumfassende, konfirmatorische, statistische Entscheidung interpretiert werden.

Die Signifikanzen wurden mit $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ angegeben. Ergebnisse mit $p > 0,05$ wurden als nicht signifikant betrachtet.

5 Ergebnisse

5.1 Durchflusszytometrie

Aus dem Blut gesunder Probanden wurden, wie unter Punkt 4.1.1 beschrieben, Monozyten isoliert, welche nun genauer untersucht werden sollten. Nach der Injektion sollte der Einfluss der Monozyten auf die Arteriogenese untersucht werden. Vor jeder intravenösen Applikation waren durchflusszytometrische Analysen notwendig. Die Ermittlung des Monozyten-Anteils im Isolat besaß eine grundlegende Bedeutung, da der Anteil der Monozyten in einem gewissen Rahmen methoden- und patientenbedingt variierte. Ein weiterer Grund für die Analysen bestand darin, dass es sich bei den Isolaten um heterogene Zellsuspensionen handelte. Daher war es ebenso nötig den Anteil und die Art der übrigen Zellen zu charakterisieren. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Durchflusszytometrie schrittweise anhand einer repräsentativen Zellsuspension in den Abb. 16-19 dargestellt.

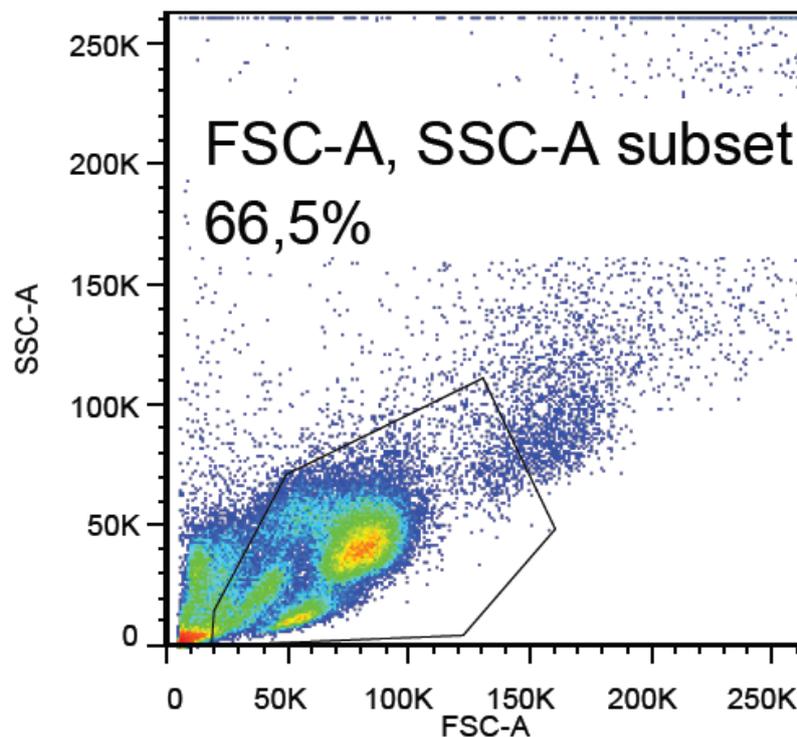


Abbildung 16: Darstellung der analysierten Zellsuspension im Forwardscatter (FSC), der gegenüber dem Sidewardscatter (SSC) aufgetragen wurde. Um die relevanten Ereignisse zu erfassen, wurde ein erstes elektronisches Fenster (Gate) gesetzt, welches 66,5 % aller Ereignisse der analysierten Zellsuspension erfasste.

Das in der Abb. 16 dargestellte Diagramm gibt einen Überblick über die durchflusszytometrisch erfassten Ereignisse der Zellsuspension. Am Anfang jeder Analyse

wurden die Zellen auf Granularität (SSC) und Größe (FSC) hin untersucht. Durch diese Darstellung ließen sich bereits einzelne Zellpopulationen abgrenzen. Für deren genaue Bestimmung waren weitere Analysen notwendig. Um Verunreinigungen, Zellaggregate und tote Zellen aus der Analyse auszuschließen, wurde ein Gate gesetzt. Da die hier ausgeschlossenen Ereignisse in der Zellzählung nach dem Ernten nicht mitgezählt wurden, entsprechen die 66,5 % der Zellsuspension 100 % aller ausgezählten Zellen. Im nächsten Schritt wurden einzelne Zellen von Dubletten diskriminiert.

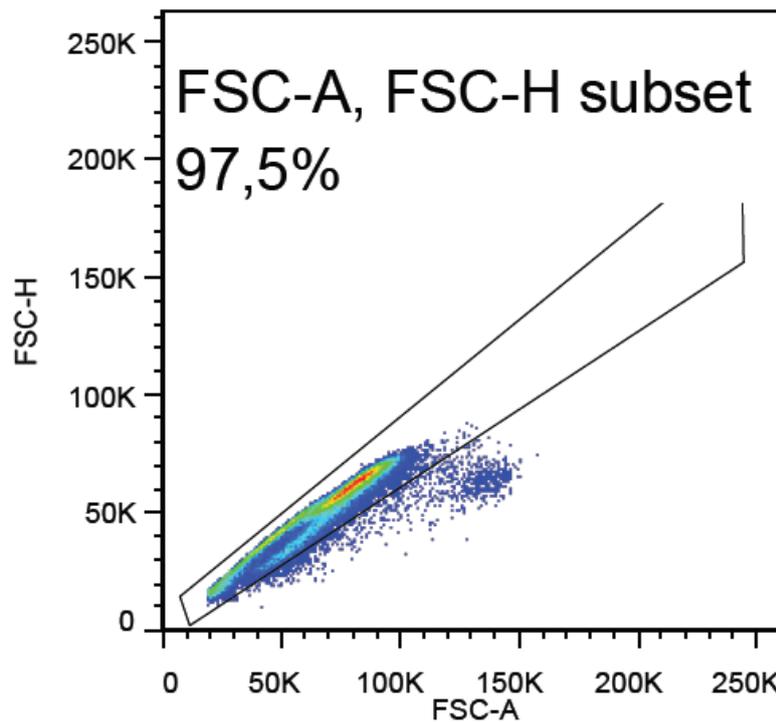


Abbildung 17: Darstellung der analysierten Zellsuspension im FSC (Area-Fläche), der gegenüber dem FSC (Height-Höhe) aufgetragen wurde. Die relevanten Zellen aus dem ersten Diagramm wurden erneut eingegrenzt um Dubletten zu diskriminieren. Die einzelnen Zellen (singlets) haben einen Anteil von 97,5 % an der Auswahl von den Ereignissen aus Abb. 16.

Die in Abb. 17 durch ein zweites Gate eingeschlossenen Ereignisse sind einzelne Zellen, die nun, getrennt von Dubletten, im nächsten Diagramm dargestellt wurden. Hier zeigt sich nun, dass 97,5 % der Ereignisse des Gates aus Abb. 16 einzelne Zellen sind.

Diese ersten beiden Diagramme sind unabhängig von Zellfärbungen und Oberflächenrezeptoren und dienen einer ersten Charakterisierung der Ereignisse, die während der durchflusszytometrischen Analyse erfasst wurden. Die so durch entsprechende Gates ausgewählte Zellpopulation wurde im nächsten Schritt anhand ihrer Oberflächenrezeptoren genauer klassifiziert.

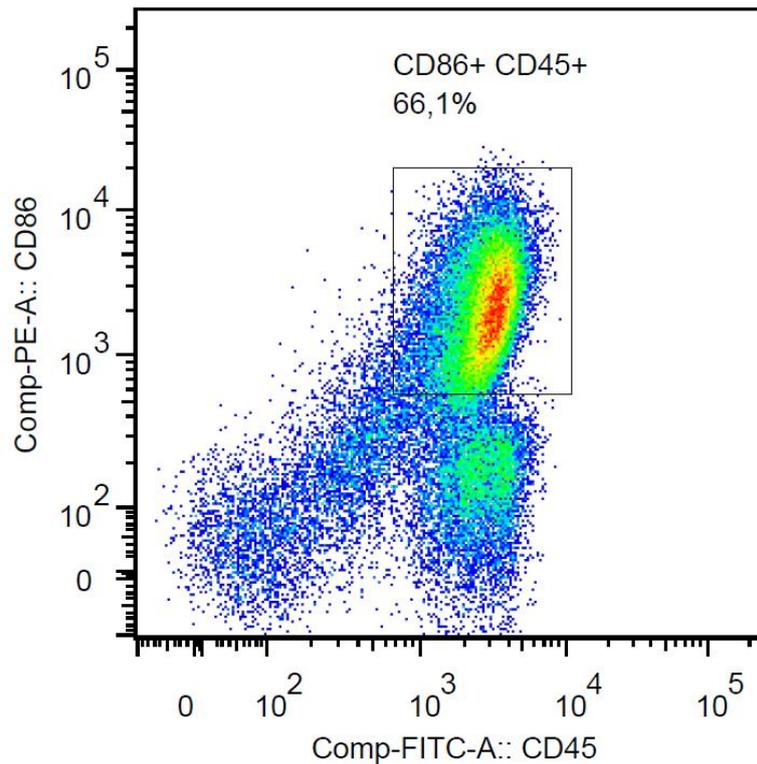


Abbildung 18: Darstellung der analysierten Zellsuspension in der CD45-FITC-Färbung, die gegenüber der CD86-PE-Färbung aufgetragen wurde. In dieser Darstellung wird die Diskrimination verschiedener Populationen möglich. Den größten Anteil hat die ausgewählte Fraktion, welche den CD86⁺/CD45⁺ Monozyten entspricht.

Das hier dargestellte Diagramm (Abb. 18) dient durch die Wahl der Oberflächenmarker der Abgrenzung verschiedener Zelltypen. CD45 ist ein Oberflächenprotein, welches von allen Leukozyten exprimiert wird. Folglich ist davon auszugehen, dass es sich bei allen CD45 positiven Zellen um Leukozyten handelt. CD 86 ist ein Protein, welches an der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen exprimiert wird. Neben den gefensternten 66,1 % CD86⁺/CD45⁺ Zellen liegt eine zweite Population vor, die CD45⁺/CD86⁻ ist. Hierbei handelt es sich um neutrophile Granulozyten und Lymphozyten. Beide Zelltypen sind positiv für CD45, aber negativ für CD86. Sie stellen somit die größte „Verunreinigung“ dar. Eine weitere Population in der linken unteren Ecke ist für beide Marker negativ, dass würde z.B. auf die Zellgruppe der Erythrozyten zutreffen.

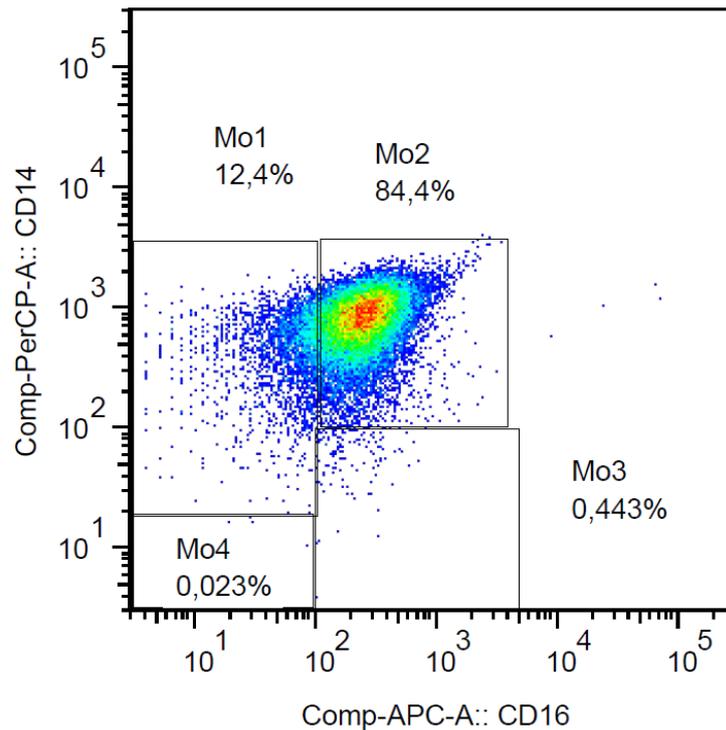


Abbildung 19: Darstellung der analysierten Zellsuspension in der CD16-APC-Färbung, die gegenüber der CD14-PerCP-Färbung aufgetragen wurde. In diesem Diagramm sind ausschließlich Monozyten dargestellt, die anhand der beiden Färbungen in 4 verschiedene Subpopulationen aufgeteilt werden können (Mo1-4).

Die im vorherigen Diagramm dargestellten Ereignisse wurden im nächsten Schritt auf die Oberflächenproteine CD16-APC und CD14 Per-CP hin untersucht (Abb. 19). Diese Darstellung dient der Einteilung der Monozyten in unterschiedliche Subpopulationen. Im Vollblut gesunder Patienten ist laut Literatur[82] und der Versuche befreundeter Arbeitsgruppen der Großteil der Monozyten (90 %- 95 %) CD14⁺⁺/CD16⁻ (Mo1). Dieser Anteil entspricht den klassischen Monozyten. Rund 5-10 % der Monozyten sind laut Literatur CD14⁺/CD16⁺[82], was der Gruppe Mo3, also den nichtklassischen Monozyten, entsprechen würde (Vgl. Abb. 4).

In unseren Versuchen sind die Monozyten der Mo2-Gruppe mit 84,4 % überproportioniert. Wir führen dies auf die Inkubation mit INF- γ , sowie auf die 24-stündige Kultivierung zurück. Analysen von Zellsuspensionen ohne den Zusatz von INF- γ ergaben außerdem ein vermehrtes Vorkommen von Zellen der Mo1-Gruppe, was diese These stützt. Die Monozyten der Gruppe Mo2 gelten, wie im Einleitungsteil (siehe Punkt 4.4) beschrieben als Intermediärstufe zwischen den klassischen und nichtklassischen Monozyten[82]. Diese sind bereits differenzierter als klassische Monozyten. Die Durchfluszytometrie- Analysen der

Zellsuspensionen ergaben einen durchschnittlichen Monozytenanteil von 53,41 % \pm 15,15 % (n=9). Um zu garantieren, dass pro Zelltransplantation 2,5 Millionen Zellen übertragen wurden, diente dieser Anteil als Richtwert.

5.2 Zellviabilität

Die Viabilität der Zellen wurde einen Tag nach Isolation und Kultivierung mit 8 ng/ml IFN- γ untersucht. Die Zellen wurden hierbei auf herkömmlichen Zellkulturschalen ausgesät, wodurch eine Reifung der Monozyten gefördert wurde. Durch mehrmaliges Waschen der Zellen mit Zellkulturmedium wurden tote Zellen und Debris entfernt, allerdings gingen hierdurch auch nicht adhärente Monozyten aus der Zellsuspension verloren. Da für die Berechnung der Viabilität allerdings ein Quotient verwendet wurde, der neben den lebenden Zellen auch tote Zellen beinhaltet, die durch den Waschvorgang ebenfalls zum Teil entfernt wurden, konnte dieser Verlust kompensiert werden. Für die Fluoreszenzmikroskopaufnahmen wurde ein möglichst repräsentatives Gesichtsfeld ausgesucht. Nun wurden in einem rechteckigen Bereich, 35 Einzelaufnahmen bei einer 10-fachen Vergrößerung erstellt. In der Übersicht waren bereits die charakteristischen Monozytenkerne in der Hoechst 33342-Färbung zu erkennen (Abb. 20, **D**). Mit der Software *ImageJ*® wurden die Zellen automatisiert ausgezählt.

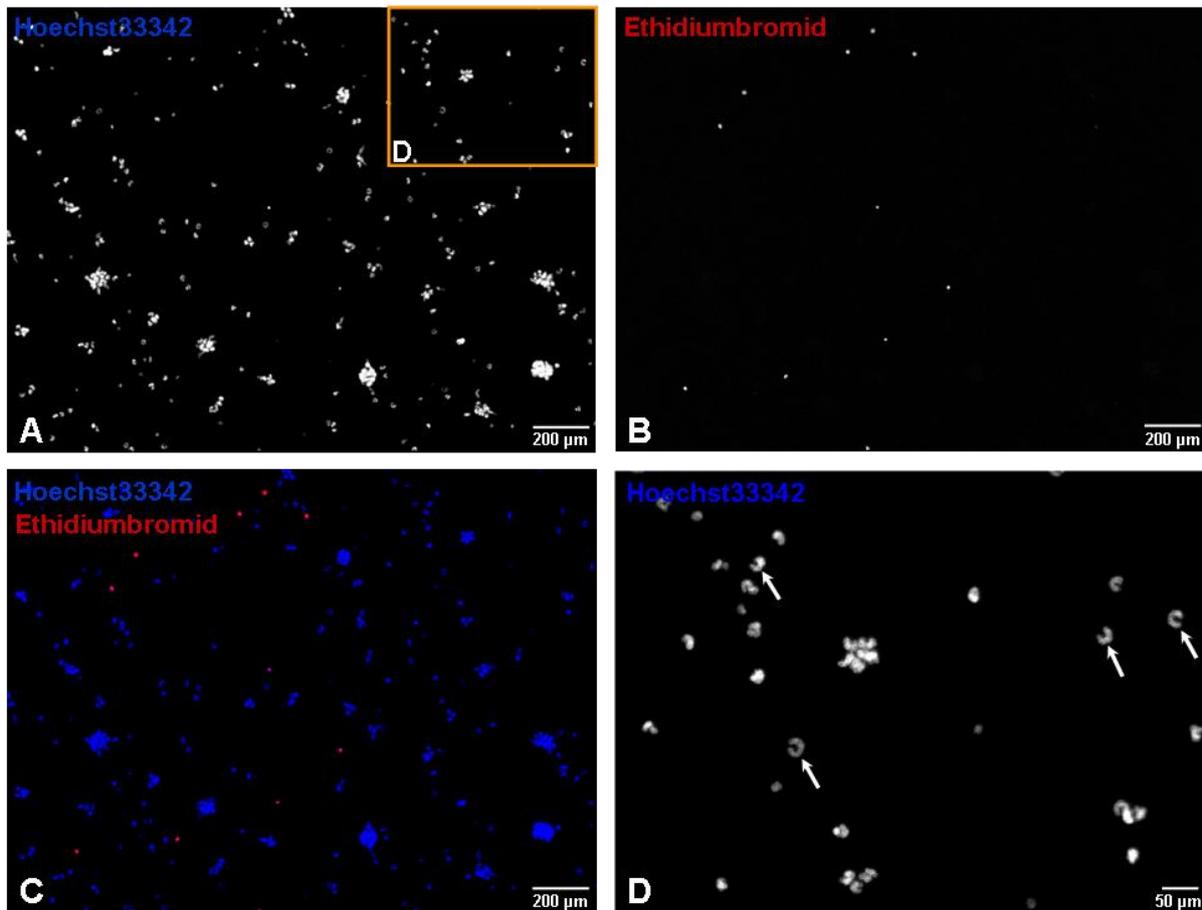


Abbildung 20: Repräsentative Einzelaufnahme, 10-fach vergrößert. Aufnahmen wurden in unterschiedlichen Fluoreszenzkanälen erstellt (**A**, **B**) und zur Übersicht übereinander gelegt (**C**). In der Vergrößerung ist die charakteristische, nierenförmige Kernstruktur der Monozyten zu erkennen (**D**).

Die Anzahl an toten Zellen, welche allen Ethidiumbromid-positiven Ereignissen (Abb. 20: **B**) entsprach, wurde durch die Anzahl aller Zellen, d.h. sämtliche Hoechst 33342-positiv Ereignisse (Abb. 20: **A**), dividiert. Der so errechnete Quotient beschreibt den Anteil toter Zellen in der Zellsuspension. Bei einer Kulturdauer von einem Tag unter Standardbedingungen und dem Zusatz von 8 ng/ml IFN- γ haben wir eine Sterblichkeit von $3,79 \% \pm 0,008 \%$ (n=5) ermittelt. In unseren Negativproben, d.h. ohne Zugabe von IFN- γ zur Zellsuspension, konnten wir eine Zunahme des Anteils toter Zellen auf $10,9 \%$ (n=2) feststellen. Diese Beobachtung wurde auf die fehlende Stimulation der Monozyten durch IFN- γ zurückgeführt.

5.3 Überprüfung der Phagozytosefähigkeit humaner Monozyten

Um die Phagozytosefähigkeit der isolierten Monozyten zu testen, wurde die Zellsuspension nach der im Methodenteil beschriebenen (siehe Punkt 4.1.1) Kultivierung unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht (Abb. 21).

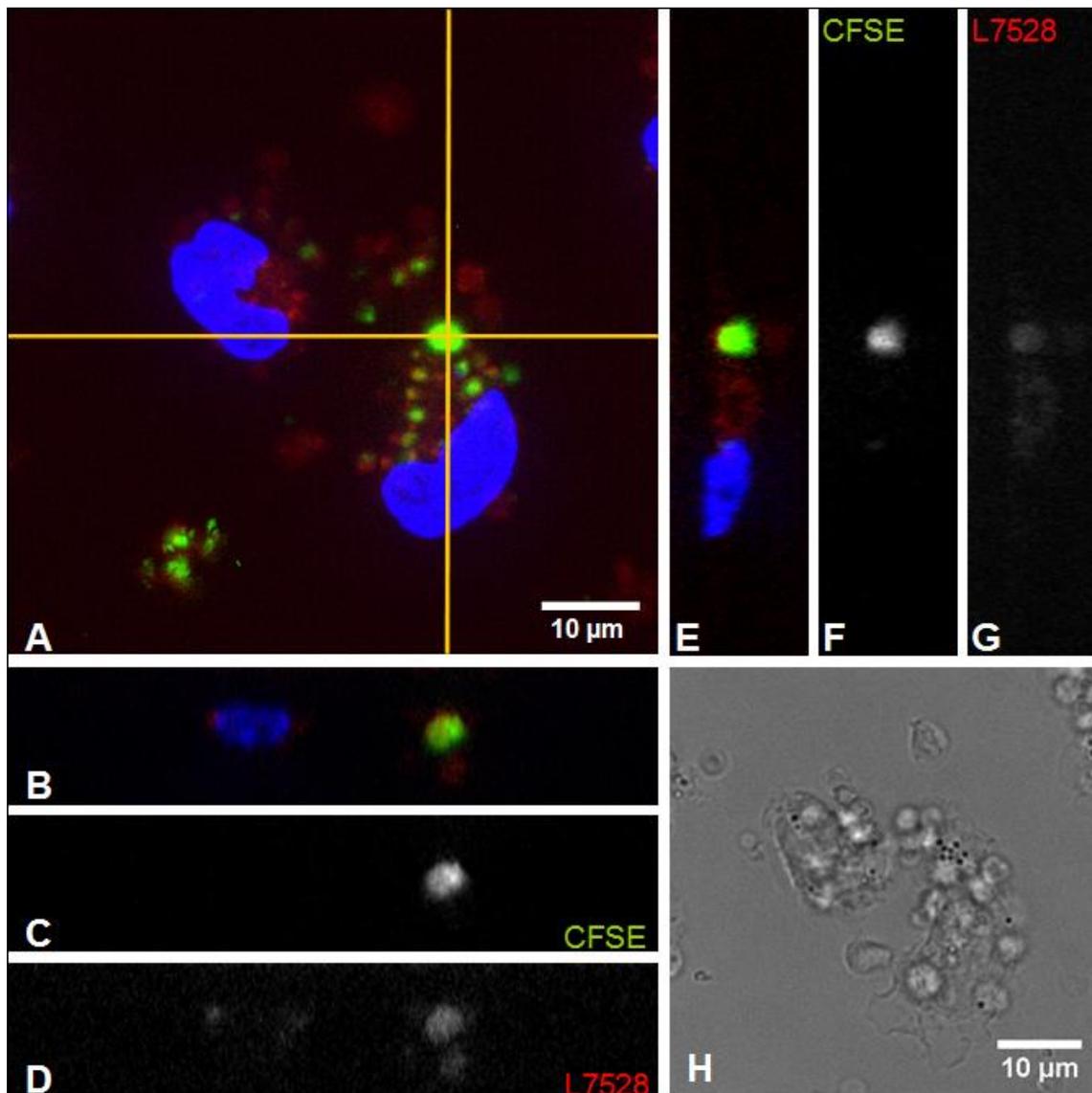


Abbildung 21: Fluoreszenzmikroskopie zweier Monozyten in 60-facher Vergrößerung. Dargestellt sind die nierenförmigen Zellkerne (blau, Hoechst 33342) zweier Monozyten mit umgebendem Zytoplasmasaum. Im Zytoplasma, sowie in den Lysosomen (rot) befindet sich das prozessierte CFSE-BSA (grün) (A). Die intrazelluläre Kolokalisation von Lysosomen und CFSE-BSA wurde mit orthogonalen Schnittebenen dargestellt (B, C, D, E, F, G). Zur besseren Übersicht und Zuordnung von Strukturen, wurde eine Durchlichtaufnahme erstellt (H).

Die Monozyten konnten bereits in der Hoechst 33342- Färbung (Abb.21: **A, H**) an ihren charakteristischen nierenförmigen Zellkernen erkannt werden. Ein Fehlen von Zellausläufern half bei der Unterscheidung gegenüber Makrophagen. Bei der Mikroskopie wurde darauf geachtet, die Aufnahmen möglichst zügig zu erstellen, um ein Absterben der Zellen außerhalb der Inkubationskammer zu vermeiden. Die Zugabe von CFSE-BSA zur Zellsuspension erfolgte in unterschiedlichen Konzentrationsstufen (50 µg/ml, 100 µg/ml und 200 µg/ml). Je höher die Konzentration des Farbstoffs in der Zellsuspension, desto besser ließen sich Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop machen. Die Zellviabilität wurde von der Konzentration des CFSE-BSA nicht beeinträchtigt. Das markierte BSA zeigte ein rasches Ausbleichen bei langen Belichtungszeiten, vor allem in den niedrigen Konzentrationen. Daher bemühten wir uns um möglichst kurze Belichtungszeiten. Ähnlich gestaltete sich die Aufnahme der mit L7524 gefärbten Zellorganellen. Hier war das Signal zudem schwächer. Um eine extrazelluläre Anlagerung des Proteins an die Zelle, von einer intrazellulären Anreicherung zu unterscheiden, wurden Bilder der Objekte in verschiedenen Ebenen der Z-Achse erstellt, sodass eine dreidimensionale Rekonstruktion der Zellen möglich war. Durch die Einstellung von orthogonalen Ebenen, konnte zwischen extra- und intrazellulären Proteinanteilen unterschieden werden (Abb. 21: **B, C, D, E, F, G**). Eine extrazelluläre Markierung der Zellen konnte nicht festgestellt werden. Aufgenommene Proteine werden von Zellen unter anderem in den Lysosomen prozessiert, sodass wir das Protein dort vermuteten. Mit der L7528- Färbung, einem Farbstoff, der saure Zellorganellen markiert, konnte eine Lokalisation des markierten Proteins in den Lysosomen nachgewiesen werden (Abb. 21: **D, G**).

5.4 Wahl des Mausstammes

Die Kompensationsmöglichkeiten bei Gefäßkrankheiten unterscheiden sich von Mensch zu Mensch oft erheblich. Gründe dafür können eine unterschiedliche Anzahl an präexistierenden Kollateralen, Krankheiten oder das Alter sein[95-97]. Bei Mäusen ist dies ähnlich[13]. Um einen besseren Effekt unserer Therapie zu erreichen, war es nötig einen Mausstamm zu finden, mit dem eine Verbesserung der Perfusion klinisch, histologisch und per Dopplermessung sensitiv nachzuweisen ist. Aufgrund der häufigen Verwendung in Studien[9,98] und für eine bessere Vergleichbarkeit unserer Daten wählten wir zwischen C57BL/6- Mäusen und BALB/c- Mäusen. Bisherige Studien zeigten eine bessere Reperfusion nach Ligatur der *A. femoralis* bei der C57BL/6- Maus im Vergleich zur BALB/c- Maus. Grund dafür sind vermehrte präexistierende Arteriolen[99] bei der C57BL/6- Maus, die

sowohl histologisch als auch angiologisch nachgewiesen werden konnten[13]. Neben dem Mausstamm spielte auch die OP- Methode eine entscheidende Rolle für die Reperfusion nach Ligatur der *A. femoralis*[100]. Um diese Behauptung zu überprüfen, sowie zu einer Evaluation unserer OP-Methode, verglichen wir beide Mausstämme im murinen Modell der Hinterlauf- Ischämie (Abb. 22). Den BALB/c- Mäusen wurde einen Tag nach Ligatur NaCl über die Schwanzvene injiziert, um diese Tiere als Kontrollgruppe für nachfolgend beschriebene Versuche zu nutzen. Die Injektion hat das Perfusionsergebnis im Vergleich zur Literatur nicht verändert.

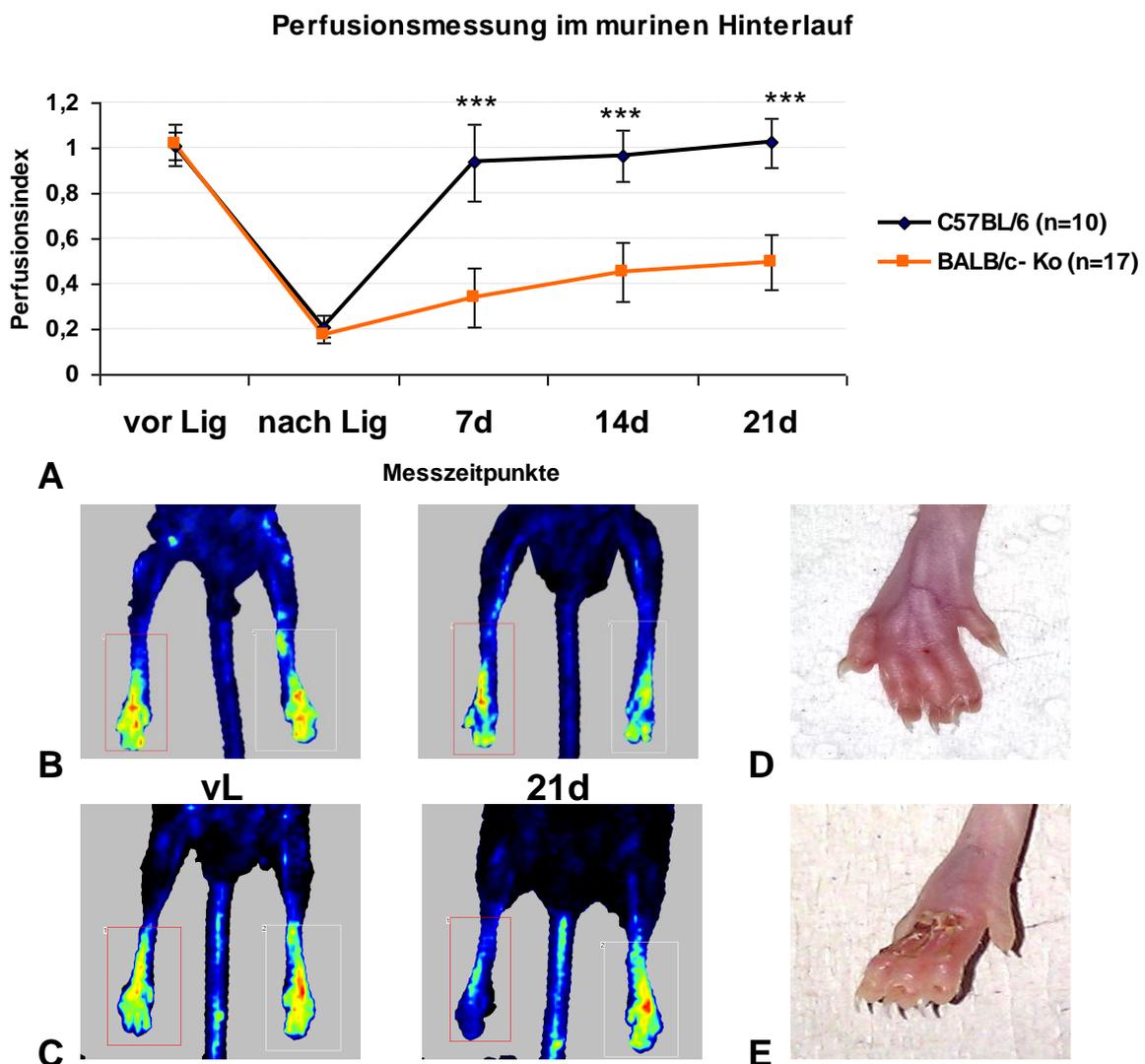


Abbildung 22: Vorversuch zur Bestimmung des Mausstammes. Vergleich von BALB/c- mit C57BL/6- Mäusen anhand von Laserdopplerperfusionmessungen im Zeitverlauf über 21 Tage (A). Vergleich von repräsentativen LDPI- Bildern vor Ligatur (vL) und 21 Tage postoperativ(21d) zwischen C57BL/6- (B) und BALB/c- Mäusen (C). Unterschiedliche Klinik nach 21 Tagen anhand beispielhafter Befunde: Hinterlauf ohne funktionellen Schaden (D), sowie Ulzerationen/ Gangrän am Hinterlauf mit enormer Funktionseinschränkung (E).

Unsere Laserdopplermessungen bestätigten die in der Literatur angegebenen Messungen. In der Abb. 22 (A) sind auf der X-Achse die Messzeitpunkte im Zeitverlauf angegeben. Auf der Y-Achse wird der Perfusionsindex angezeigt, der sich aus der Perfusionsmessung des ligierten Beines dividiert durch die Perfusionswerte des unligierten Beines ergibt.

In der zweifaktoriellen Varianzanalyse zeigten sich hier hochsignifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (**p<0,001).

Vor und unmittelbar nach Ligatur zeigen sich hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mausstämmen. Am Tag 7 befindet sich die C57BL/6-Maus jedoch mit $0,94 \pm 0,17$ (n=10) fast wieder auf Perfusionsausgangsniveau im Vergleich zur BALB/c-Maus mit $0,33 \pm 0,13$ (n=17, **p<0,001). Am Tag 14 zeigen die Messwerte ähnliche hohe Unterschiede zwischen C57BL/6 mit $0,97 \pm 0,11$ (n=10) und BALB/c-Ko mit $0,45 \pm 0,13$ (n=17, **p<0,001). Am Tag 21 kommt es mit $1,02 \pm 0,11$ in C57BL/6-Stamm (n=10) und $0,49 \pm 0,12$ bei den BALB/c-Ko-Mäusen (n=17, **p<0,001) zum größten Unterschied.

Da die C57BL/6-Gruppe sich enorm schnell von einer einseitigen Ligatur der *A. femoralis* erholte, ließe sich der Nutzen einer perfusionsverbessernden Maßnahme hier nur schwer nachweisen. Bei erhöhtem Verbesserungspotenzial in Klinik und histologischen Merkmalen des BALB/c-Mausstammes, kamen wir zu der Entscheidung diese Tiere für unsere Versuche zu nutzen.

5.5 Perfusionsmessung nach intravenöser Monozytenapplikation

Abb. 23 zeigt den Vergleich der Perfusionsdaten der monozytentransplantierten BALB/c-Mäuse gegenüber der Kontrollgruppe, dargestellt im Zeitverlauf über 21 Tage. Die Behandlung der Mäuse mit Monozyten erfolgte einen Tag nach Ligatur der rechten *A. femoralis*. Die Interventionsgruppe hat 2,5 Millionen in NaCl resuspendierte, humane Monozyten über die Schwanzvene injiziert bekommen (HuMo). Der Kontrollgruppe wurde einen Tag nach Operation ein entsprechendes Volumen NaCl ohne Zellen injiziert.

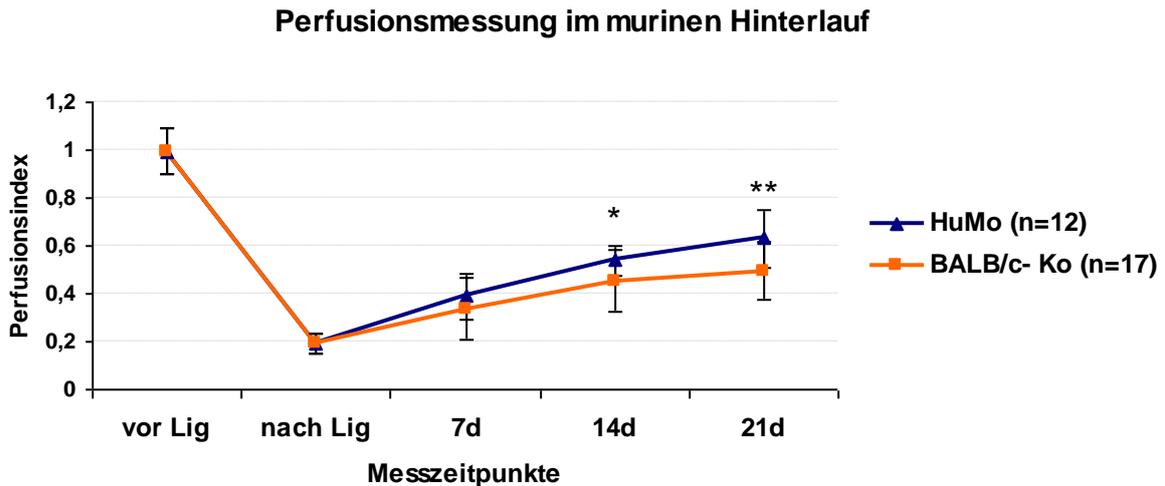


Abbildung 23: Darstellung der Laser-Doppler-Perfusions-Messdaten von BALB/c- Mäusen nach intravenöser Applikation humaner Monozyten vs. Kontrollgruppe im Zeitverlauf.

Aufgrund der gleichen Ausgangslage beider Versuchsgruppen, wurden die Messzeiten vor und nach Ligatur gemeinsam gemittelt.

In der zweifaktoriellen Varianzanalyse zeigt sich ein Gruppenunterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen (* $p < 0,05$). Weiterhin zeigt sich, dass der Zuwachs des Unterschieds mit der Zeit immer geringer wird.

Der Perfusionsindex betrug vor Ligatur $0,99 \pm 0,09$ und fiel nach der Ligatur auf $0,19 \pm 0,04$ ($n=29$). An Tag 7 gab es einen leicht verbesserte Perfusion in HuMo mit $0,39 \pm 0,10$ ($n=12$) im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $0,34 \pm 0,13$ ($n=17$, nicht signifikant (n.s.)). In der vierten Messung an Tag 14 stiegen die Index-Werte weiter an. Die Interventionsgruppe behielt das höhere Perfusionsniveau mit $0,54 \pm 0,06$ ($n=12$). Die Kontrollgruppe erreichte $0,45 \pm 0,13$ ($n=17$, * $p < 0,05$). An Tag 21 wurde der Unterschied zwischen beiden Gruppen am deutlichsten, HuMo $0,63 \pm 0,12$ ($n=12$) im Unterschied zur Kontrollgruppe $0,50 \pm 0,12$ ($n=17$, ** $p < 0,01$). In diesem Versuch zeigte sich, dass die Transplantation humaner Monozyten zu einem signifikanten Perfusionsanstieg führte.

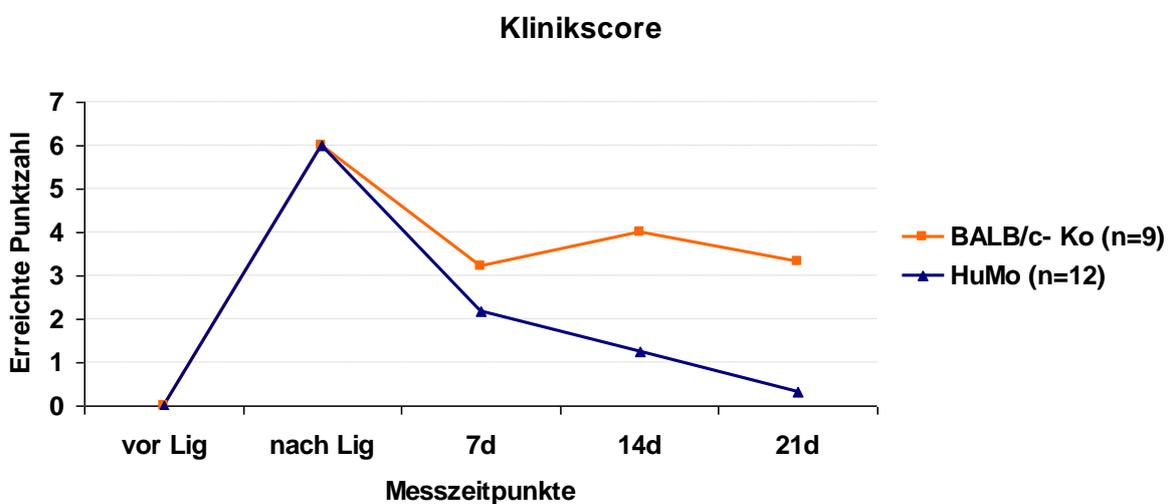
5.6 Klinische Untersuchung der Mäuse

Um die Ergebnisse Perfusionsmessung besser zu verdeutlichen, haben wir einen Klinikscore entwickelt (siehe Tab. 11).

Tabelle 11: Klinikscore zur Einschätzung des körperlichen Zustandes der Versuchstiere.

Kriterium	Punkte
Verhalten	0- unauffällig 1- auffällig
Hautbeschaffenheit des operierten Beines	0- unauffällig 1- leichte Rötung 2- livide Verfärbung 3- Gangrän
Beweglichkeit der operierten Extremität	0- unauffällig 1- leichte Störung 2- mittlere Störung 3- Unbeweglichkeit
Wundheilung	0- unauffällig 1- auffällig

Je niedriger die erreichte Punktzahl, desto besser der Zustand des Tieres. Zwischen den Tieren wurde im Zeitverlauf ein großer Unterschied deutlich, der sich beispielsweise mit den in der Abb. 22 gezeigten Veränderungen am Hinterlauf bemerkbar machte.

**Abbildung 24:** Klinikscore im Zeitverlauf über 21 Tage.

Vor der Ligatur war der Zustand der Tiere identisch. Ähnlich verhielt es sich in umgekehrter Weise nach der Ligatur. Die ersten sicher zu beurteilenden Unterschiede zeigten sich an Tag 7 mit einem Klinikscore von 3,2 in BALB/c- Ko im Vergleich zu 2,17 in HuMo. An Tag 14 verschlechterte sich der klinische Zustand in BALB/C- Ko im Vergleich zu Tag 7 auf 4,0. Die Tiere der Interventionsgruppe waren zum Zeitpunkt der vierten Messung an Tag 14 in einer besseren Verfassung, der Score sank von 2,17 auf 1,25 ab. An Tag 21 erreichte die HuMo-Gruppe mit 0,33 fast den Ausgangswert vor der Operation, im Gegensatz zur Kontrollgruppe mit 3,33 Punkten, die nach wie vor einen reduzierten Allgemeinzustand zeigte.

Dieser Score soll einen Eindruck geben, wie sich die erhobenen Daten im klinischen Zustand der Tiere widerspiegeln und macht hier einen deutlichen Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen klar.

5.7 Histologie

5.7.1 Kollateralenentwicklung im murinen Hinterlauf

Das in dieser Arbeit angewandte Modell der murinen Hinterlauf-Ischämie versucht, die Zustände bei einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit abzubilden. Durch die einseitige Ligatur der *A. femoralis* kommt es zu einem erhöhten *shear-stress*, der wie unter Punkt 1.2.1 beschrieben die Ausbildung von Kollateralen fördert. Bei ausbleibender Kollateralenbildung kommt es durch die resultierende Ischämie zur vermehrten Kapillarenbildung, der sogenannten Angiogenese, in distal der Stenose gelegenen Gewebeabschnitten.

Die zuvor ermittelten Entwicklungen im Perfusionsverlauf und der klinische Zustand der verschiedenen Mausgruppen haben ihren Ursprung in histologischen Korrelaten. Um die Ursachen der erfassten Daten zu ergründen, haben wir histologische Untersuchungen der Beinmuskulatur, aber auch von Organen angestellt. Bei der Untersuchung der Extremitätenmuskulatur fokussierten wir uns auf den Nachweis der ablaufenden Arteriogenese und Angiogenese. Dabei haben wir uns auf die Untersuchung der *Mm. adductores* und des *M. gastrocnemius* des ligierten Beines konzentriert. In diesem Abschnitt soll es zunächst um den Nachweis der Arteriogenese gehen. Hierbei haben wir die *Mm. adductores* histologisch auf die Anzahl der Kollateralen hin untersucht.

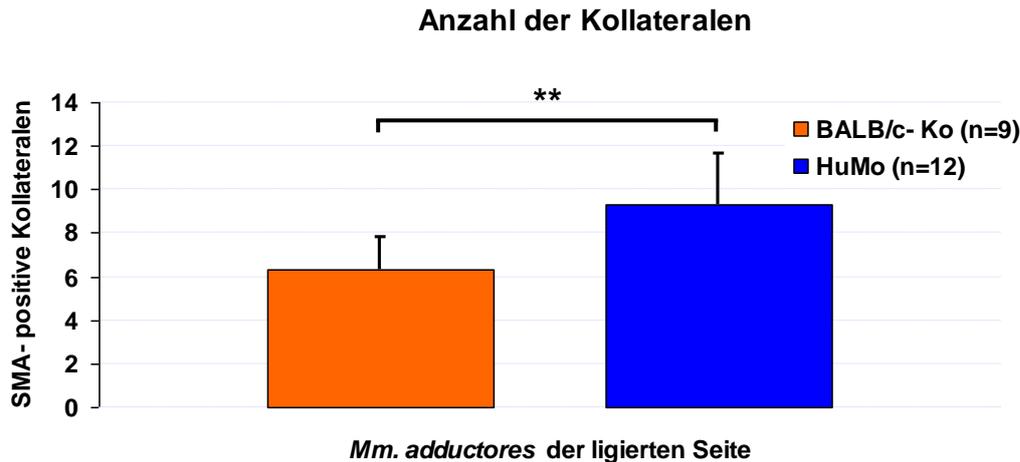


Abbildung 25: Darstellung der Kollateralenanzahl in den *Mm. adductores* der ligierten Seite.

Dieses Diagramm zeigt die Auswertung der Muskelschnitte des ligierten Beines, 21 Tage nach Operation. Für die Untersuchung wurden die Muskelschnitte wie unter Punkt 4.4.3 beschrieben ausgewertet. Im Diagramm ist ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe mit $6,33 \pm 1,5$ ($n=9$) und HuMo mit $9,33 \pm 2,31$ ($n=12$, $**p<0,01$) zu erkennen. Dieses Ergebnis korreliert mit den Ergebnissen der Laser- Doppler- Messungen, sowie mit dem Klinikscore. Durch die höhere Anzahl an Kollateralen kam es zu einer besseren Perfusion des Hinterlaufs und damit auch zu einem besseren klinischen Zustand des Tieres. Neben der Auszählung der Kollateralen haben wir außerdem noch nach Unterschieden im Gefäßdurchmesser der Kollateralen beider Gruppen gesucht, um so Rückschlüsse auf die Suffizienz der Kollateralen ziehen zu können. Hier ergaben sich allerdings keine Differenzen zwischen HuMo und BALB/c- Ko.

5.7.2 Angiogenese der Unterschenkelmuskulatur

Wie im Einleitungstext unter Punkt 1.2.3 erläutert, bietet die Angiogenese neben der Arteriogenese eine Möglichkeit minderperfundierte Gewebe erneut zu versorgen. Meist ist diese allerdings ineffektiver als die Arteriogenese. Ein starker Induktor der Angiogenese ist die Ischämie. Diese tritt in dem hier angewandten Mausmodell nach einseitiger Ligatur der *A. femoralis* im Unterschenkel auf. Durch die Ausbildung von Kollateralen im Oberschenkel, die die künstlich provozierte Engstelle überbrücken, kommt es zur Verminderung der Ischämie im Unterschenkel und damit auch zu einer verminderten Angiogenese. Damit würde eine verminderte Kollateralisierung im umgekehrten Fall mit einer verstärkten Gefäßneubildung einhergehen. Zur Untersuchung der Angiogenese haben wir histologische Schnitte des *M. gastrocnemius* der ligierten Seite auf die Anzahl an Kapillaren hin untersucht.

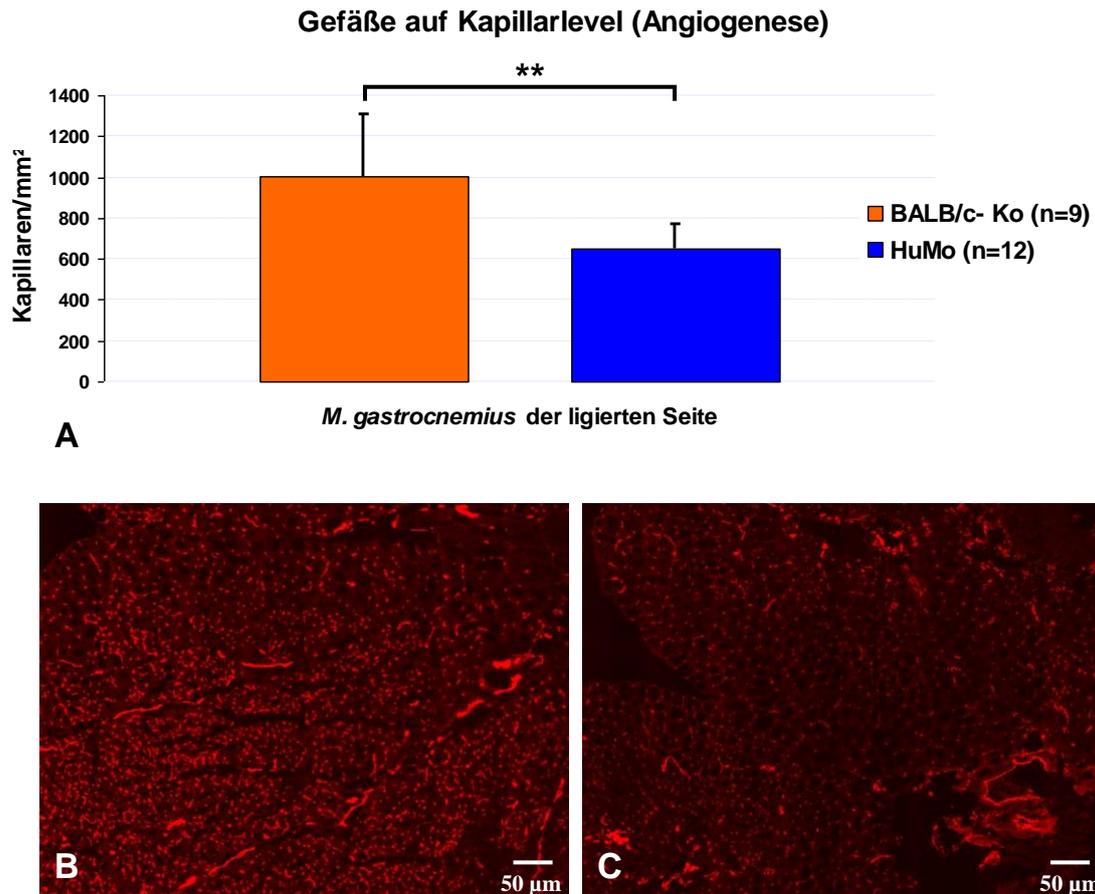


Abbildung 26: Untersuchung der Angiogenese im murinen Hinterlauf. Vergleich der Anzahl an Kapillaren pro mm² im *M. gastrocnemius* der ligierten Seite zwischen BALB/c-Ko und HuMo 21 Tage nach Operation (A). Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des *M. gastrocnemius* der ligierten Seite nach CD31- Endothelfärbung zur Darstellung der Kapillaren von Kontrollgruppe (B) und HuMo (C).

Das Diagramm in Abb. 26 (A) vergleicht die Anzahl an CD31 positiven Kapillaren im *M. gastrocnemius* 21 Tage nach Ligatur. Die Auszählung erfolgte automatisch mit der Bildanalysesoftware *ImageJ*® auf einer repräsentativen Fläche von 1 mm². Es zeigte sich bei dieser Untersuchung ein signifikanter Unterschied zwischen BALB/c- Ko mit 1001,22 ± 304,78 (n=9) und HuMo mit 652,17 ± 121,21 (n=12, **p<0,01). Wir vermuten, dass die unterschiedliche Anzahl an Kapillaren auf die unterschiedliche Kollateralisierung zurückzuführen ist. Durch die bessere Kollateralisierung nach der Transplantation von 2,5 Millionen humanen Monozyten kommt es hier in HuMo zu einer besseren Durchblutung des *M. gastrocnemius* und dadurch wiederum zu einer verminderten Angiogenese. Bei der Kontrollgruppe findet nur eine unzureichende Reperfusion nach der Operation statt, was zu einer vermehrten Anzahl an Kapillaren führt. In den mit dem Fluoreszenzmikroskop

aufgenommenen Bildern fällt eine verminderte Dichte an CD31 positiven Signalen (Kapillaren) in HuMo (C) im Vergleich zur Kontrollgruppe (B) auf. Neben einer vermehrten Anzahl an Kapillaren konnte in der Kontrollgruppe auch eine zunehmende Atrophie der Unterschenkelmuskulatur festgestellt werden, die in der monozytentransplantierten Gruppe weniger ausgeprägt war. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Vermutungen bezogen auf die Entwicklung von Kollateralen und Kapillaren zutreffend waren und die Monozytentransplantation einen positiven Einfluss auf die Reperfusion hatte.

5.7.3 Homing der Monozyten

Um die Beteiligung der transplantierten Monozyten an den histologischen Veränderungen nachzuweisen, haben wir ihre Einwanderung in das Gewebe untersucht. Das sogenannte *Homing* bezeichnet die Einwanderung von Monozyten in Gewebe. Eine vorliegende Entzündung im entsprechenden Gewebe fördert diese Migration. Sie ist Voraussetzung für einen Beitrag der injizierten Monozyten zu Vorgängen, wie dem der Arteriogenese. Hierfür haben wir die isolierten Monozyten mit DiD markiert (siehe Punkt 4.3.1).

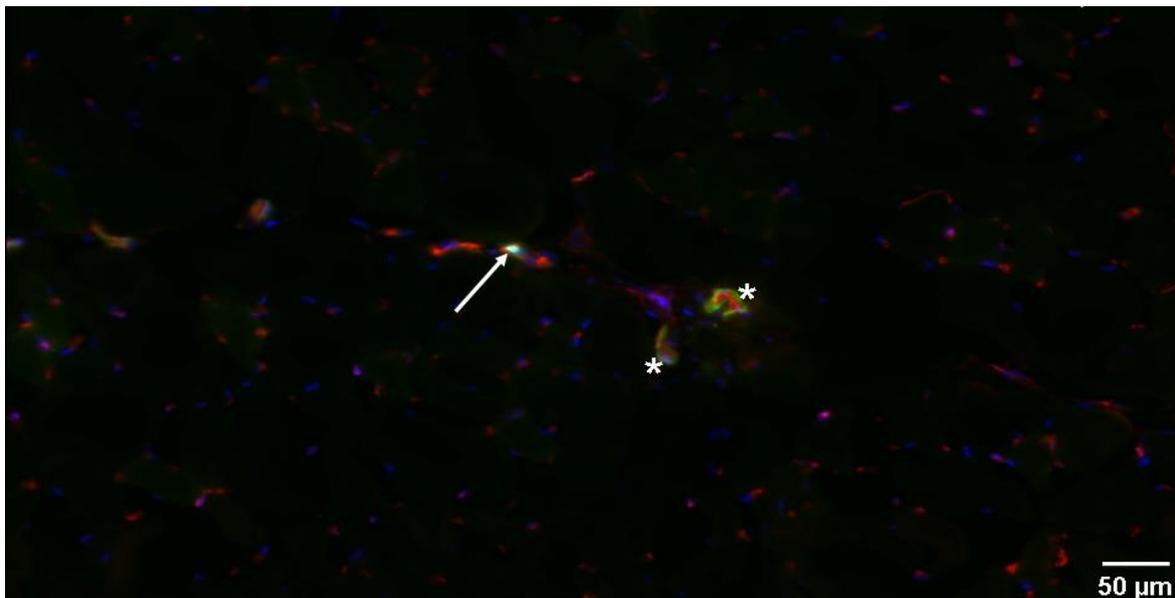


Abbildung 27: Homing markierter Monozyten in die *Mm. adductores* der ligierten Seite, einen Tag nach Schwanzveneninjektion. Vierfachfärbung mit α -SMA (grün), CD31 (rot), DAPI (blau) der *Mm. adductores* mit Nachweis eines markierten Monozyten (DiD, Pfeil) neben einer Kapillare (rot) in räumlicher Nähe zu zwei Arteriolen (Sterne).

Die markierten Zellen fanden sich vor allem im Adduktorenbereich der ligierten Seite, teilweise aber auch im *M. gastrocnemius* der gleichen Seite. Keine bzw. nur sehr selten konnten die Monozyten im unligierten Bein der Mäuse gefunden werden. Neben

Ansammlungen im Muskel wurden viele Monozyten auch in Geweben wie Lunge, Milz und Leber nachgewiesen, was wahrscheinlich mit der Filterfunktion dieser Organe zusammenhängt. Im Herzmuskelgewebe kam es nur sehr vereinzelt zur Anhaftung der injizierten Monozyten. In den Nieren fanden sich keinerlei Monozyten.

Mit diesem Experiment konnte nachgewiesen werden, dass Monozyten zu einem gewissen Teil in der Nähe des künstlich erzeugten Gefäßverschlusses adhäreren und somit in der Lage sind, lokal arteriogen zu wirken. Systemische Nebenwirkungen konnten trotz der Ablagerung in zahlreichen Organen nicht beobachtet werden.

5.8 Intravitalmikroskopie

Das *homing* der Monozyten konnte bisher nur *post mortem* mithilfe histologischer Schnitte untersucht werden. Die Nutzung der Intravitalmikroskopie macht es möglich den Weg der injizierten Monozyten *in vivo* und in Echtzeit nachzuverfolgen. Dadurch umgeht man die bei der histologischen Auswertung von Muskelschnitten entstehenden Artefakte, die beispielsweise durch das Herauspräparieren der Muskeln oder bei der Erstellung von Gefrierschnitten entstehen. Außerdem kann man die Zellen so zusätzlich in einer natürlicheren Umgebung beobachten. Neben dem Nachweis von Monozyten in Gebieten der Inflammation, wie wir sie häufig bei der Arteriogenese finden, soll uns diese Methode dabei helfen, Interaktionen zwischen Zellen nachzuweisen. Mithilfe der Intravitalmikroskopie soll in Zukunft außerdem die Auswirkung der Monozytentransplantation auf ein endogenes Tumorwachstum untersucht werden.

Ähnlich wie bei der Untersuchung des Monozytenhomings in der *post mortem* Fluoreszenzmikroskopie haben wir der Maus zunächst markierte Monozyten injiziert.

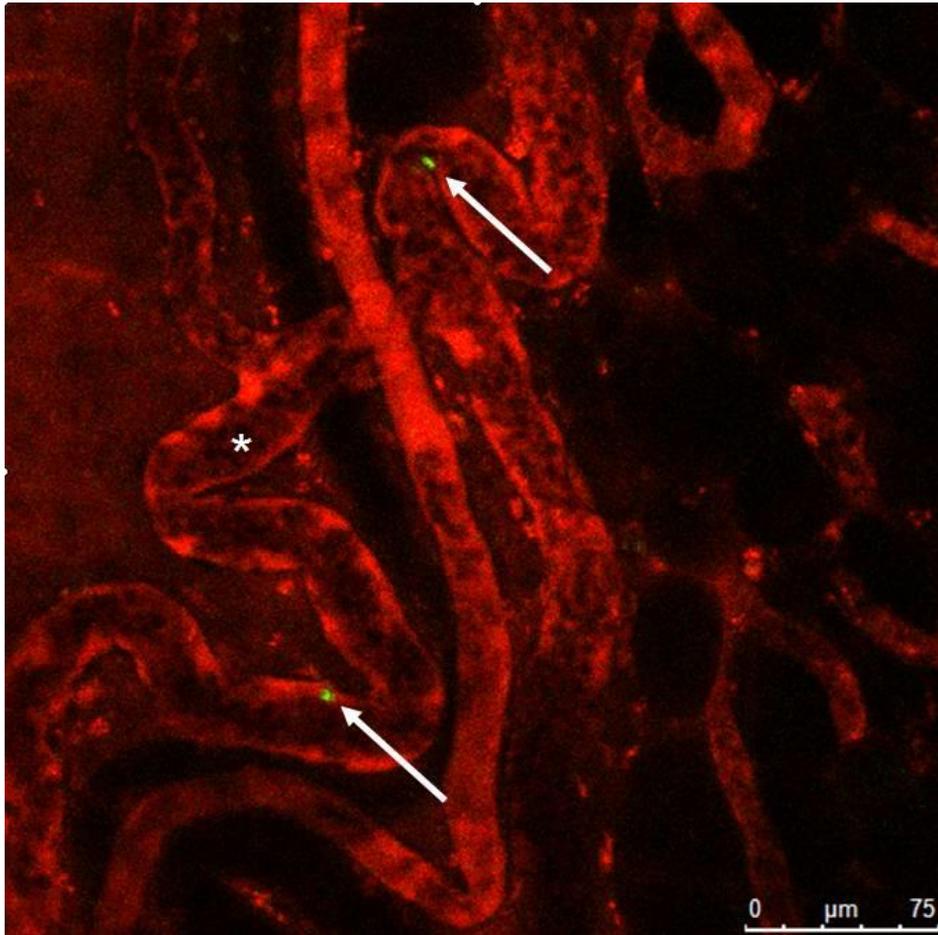


Abbildung 28: Intravitalmikroskopie einer Kollaterale auf Höhe der Gefäßligatur zwei Tage nach Verschluss der A. femoralis. Zwei markierte Monozyten (grün (DiO), Pfeile) in einem Gefäß mit ca. 30 µm Durchmesser (Stern). Aus Wagner et al.[93].

Bei der Intravitalmikroskopie wurden die Monozyten mit DiO markiert. Eine Färbung mit DiD wie in Abb. 27, war nicht nötig, da hier nur 2 Färbungen verwendet wurden und eine Unterscheidung der Fluoreszenzfarben aufgrund fehlender Spektralüberlappung keine Probleme bereitete. Die Gefäße wurden durch die retrobulbäre Injektion von Rhodamindextran sichtbar gemacht. Bei längerer Dauer der Mikroskopie kam es zu einem Entfärben der Gefäße und das Rhodamindextran musste erneut appliziert werden. Nach Eröffnung der Haut am Oberschenkel wurde eine Region auf Höhe der Ligatur fokussiert, da wir hier Kollateralarterien erwarteten. Es zeigten sich geschlängelte, korkenzieherartige Gefäße, die eine charakteristische Morphologie der Kollateralarterien darstellen. In diesen Gefäßen konnten wir, wie repräsentativ in der Abb. 28 dargestellt, wandständige Monozyten nachweisen.

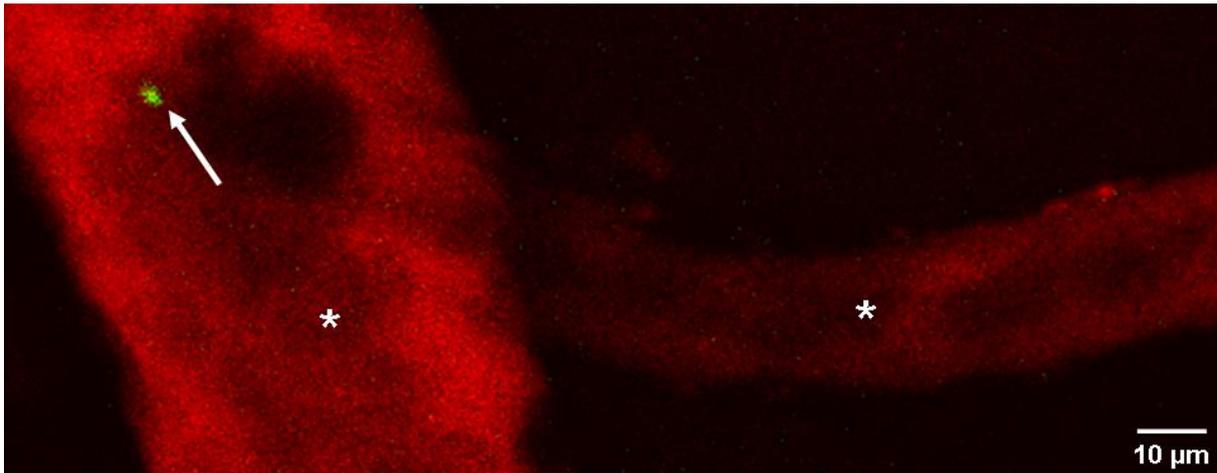


Abbildung 29: Monozyt im Gefäß. Ein DiO gefärbter Monozyt (Pfeil) wurde aus dem rechten zuführenden Gefäß (Stern) in das linke, größere Gefäß gespült. Aus Wagner et al.[93].

Auch in anderen Gefäßen, bei denen es sich ihrer Lokalisation und Morphologie nach wahrscheinlich nicht um Kollateralarterien handelte, konnten Monozyten detektiert werden. Allerdings adhärten die markierten Zellen hier nicht an der Wand, sondern fanden sich im Blutfluss.

Diese zwei Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die über die Schwanzvene injizierten Monozyten auch nach 24 h noch systemisch verfügbar sind, gleichzeitig aber auch in der Lage sind in das Gewebe auszuwandern (siehe Abb. 29). Dies ermöglicht im Bereich der Ligatur einen Beitrag zum inflammatorischen Milieu und somit zur Arteriogenese. Diese 2 Tatsachen sind Grundvoraussetzungen für die Verbesserung der Perfusion durch Gabe humaner Monozyten.

5.9 Zytokinassay

Um den zugrunde liegenden Mechanismus der Wirkung einer humanen Monozytentransplantation im murinen Organismus genauer zu ergründen, führten wir einen Zytokinassay durch, welcher die Serumkonzentration von verschiedenen Zytokinen untersuchte. Die Serumproben wurden hierfür wie unter Punkt 4.5 beschrieben gewonnen.

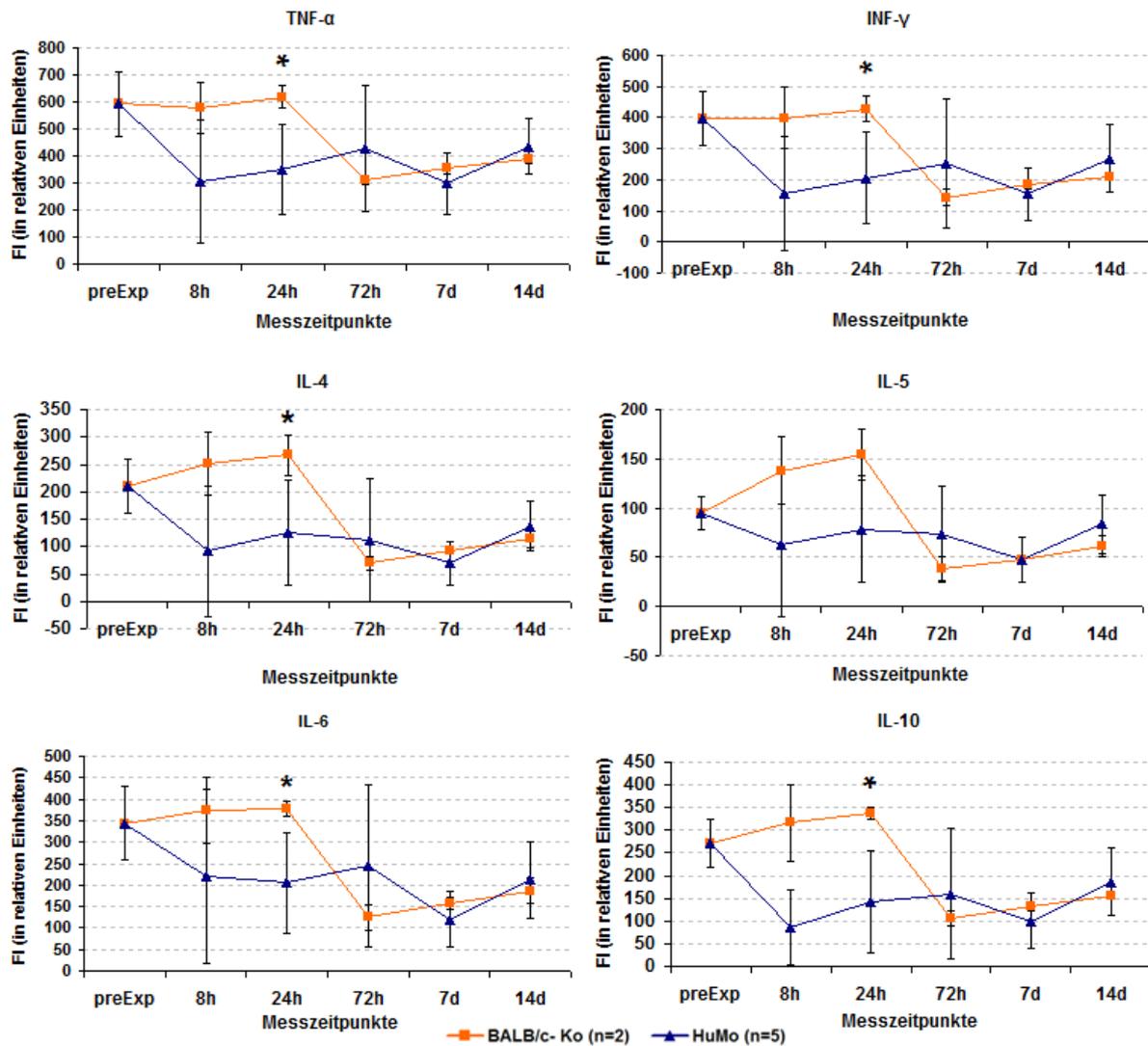


Abbildung 30: Zytokinmessung repräsentativer Zytokine im Serum der Versuchstiere im Zeitverlauf über 14 Tage.

Die Zytokine G-CSF, IL2, IL5 und IL12 (p40), KC zeigten keinerlei signifikante Unterschiede im Zeitverlauf zwischen Kontrollgruppe und der mit Monozyten behandelten Mäuse. Die Zytokine Eotaxin, GM-CSF, IFN γ , IL1 α , IL1 β , IL3, IL4, IL6, IL9, IL10, IL12 (p70), IL13, IL17A, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , TNF α , RANTES zeigten bei einem insgesamt ähnlichen Konzentrationsverlauf über die Zeit signifikante Unterschiede 24 h nach Injektion der humanen Monozyten (*p<0,05). Zu den anderen Messzeitpunkten konnten keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Insgesamt fällt auf, dass die Zytokine im Vergleich untereinander auffallend ähnliche Kurvenverläufe in beiden Versuchsgruppen zeigen (siehe Abb. 30). In der Kontrollgruppe zeigt sich bis zu 24 h nach Injektion von NaCl ein höherer Zytokinspiegel im Serum der Versuchstiere. Am Messzeitpunkt 3 Tage nach Injektion sinken die Zytokinspiegel der Mäuse der Kontrollgruppe

auf geringere Werte als in der monozytentransplantierten Gruppe, wenn auch nicht signifikant. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigt sich in der monozytentransplantierten Versuchsgruppe zunächst ein Abfall der Zytokinkonzentrationen. Nach diesem Abfall folgt in der Gruppe, welcher Monozyten transplantiert wurden ein leichter Anstieg der Zytokinkonzentration. Nach 72 h gleichen sich beide Kurvenverläufe einander an.

6 Diskussion

Diese wissenschaftliche Arbeit befasst sich mit den Eigenschaften und der Wirkung humaner Monozyten auf Prozesse der Arterio- und Angiogenese. Hierfür wurden aus dem Blut gesunder Probanden Zellen isoliert und für einen Tag unter verschiedenen Konditionen kultiviert. Zum Beleg der Funktionstüchtigkeit der Zellen erfolgten Untersuchungen zu Proteinaufnahme und Zellvitalität, sowie zur Migration. Die so untersuchten Zellen wurden durch eine intravenöse Injektion Mäusen zugeführt, welchen einen Tag vorher die *A. femoralis* einseitig ligiert worden war. Dieses sogenannte Hinterlauf- Ischämie Modell der Maus simuliert den Zustand der arteriellen, peripheren Gefäßkrankheit und soll damit der Untersuchung eben dieser Erkrankung dienen. Die xenogene Transplantation, d.h. eine Übertragung artfremder, humaner Monozyten in BALB/c- Mäuse führte zu einer Verbesserung der Perfusion nach 21 Tagen. Zurückzuführen ist dies auf eine gesteigerte Arteriogenese im Oberschenkel, die durch eine erhöhte Anzahl an Kollateralen nachgewiesen wurde. Eben diese Kollateralen sind auch für eine verminderte Angiogenese im Unterschenkel bei monozytenbehandelten Mäusen zuständig. Die behandelten Mäuse zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe auch einen weniger eingeschränkten Allgemeinzustand. In der Zusammenschau all dieser Ergebnisse konnte die arteriogene Wirkung und Funktionalität humaner Monozyten nachgewiesen werden. Dies ist ein weiterer, wichtiger Schritt um Monozyten in Zukunft zu therapeutischen Zwecken auch am Menschen einzusetzen.

6.1 Isolation und Kultivierung humaner Monozyten

Bei der Isolation der verwendeten Zellen haben wir uns die Methode der Dichtezentrifugation zu Nutze gemacht[101]. Diese Technik ist aufgrund ihrer weiten Verbreitung, Reproduzierbarkeit sowie ihrer Kosteneffektivität eine gute Alternative zu anderen Isolationsmethoden. Dazu zählt beispielsweise die magnetische Zellsortierung (MACS), oder die durchflusszytometrische Zellsortierung. Die Wahl des Isolationsverfahrens spielt auch für die Eigenschaften der gewonnenen Zellen eine große Rolle[102]. Die als Ausgangsmaterial verwendeten Leukozytenfilter fielen als biologisches Restmaterial der Blutspende an. Durch die ausführliche Anamnese in Form von Fragebögen, sowie einer Visite durch einen Arzt vor jeder Blutspende, ist es möglich von der Gesundheit der Spender auszugehen. Aus datenschutzrechtlichen Gründen und zum Schutz der Persönlichkeitsrechte der Spender erfolgte eine Anonymisierung der Patientenproben. Daher war es nicht möglich patientenspezifische Daten zu den Proben zu erheben. Pro Spender konnten im Durchschnitt

zwei Mäuse mit 2,5 Millionen Monozyten behandelt werden. Obwohl von einem einwandfreien Gesundheitszustand der Spender auszugehen ist, gibt es natürlicherweise Schwankungen bei der Anzahl peripherer Monozyten im Patientenblut, die sich später auch in der durchflusszytometrischen Analyse zeigen sollte. Durch Anpassung der applizierten Zellzahl, je nach Ergebnis der Durchflusszytomtrie, wurden diese Differenzen allerdings wieder ausgeglichen. Nichtsdestotrotz wäre es durch einen Ersatz der Dichtezentrifugationsmethode beispielsweise durch MACS möglich gewesen, eine Erhöhung der Monozytenreinheit auf über 90 % zu erreichen[103] und somit durch die höhere Reinheit weniger Zellen zu injizieren. Die Isolation der Zellen durch eine Dichtezentrifugation bot allerdings den Vorteil einer Differenzierung der Monozyten von der klassischen Monozytenform in die Intermediärform[83] (Mo2, siehe Punkt 8.1). Diese Form der Monozyten hat die Eigenschaften, die zum Teil auch den nichtklassischen Monozyten entsprechen, die laut Literatur, im Gegensatz zu den klassischen Monozyten, das inflammatorische Milieu fördern und damit stärker arteriogen wirken könnten (siehe Punkt 1.4).

Nach der Isolation der Zellen wurden diese unter Zusatz von 8 ng/ml IFN- γ im Brutschrank inkubiert. Dies hatte zwei Gründe: Zum einen zeigte sich in der Vitalitätsanalyse der Zellen eine erhöhte Sterblichkeit der Zellen bei Kultivierung ohne zusätzlichen Stimulus und zum anderen erfolgt durch IFN- γ eine Heraufregulierung der MHC Klasse II- Moleküle, die ihre Bedeutung für eine Antigenpräsentation haben[104]. Eine der größten Herausforderungen bei der Kultivierung der Zellen war die stark ausgeprägte Differenzierungstendenz der Monozyten zu Makrophagen, die durch das IFN- γ noch verstärkt wurde. Um die Differenzierung in Makrophagen zu unterbinden wurde eine Kultivierungsperiode von lediglich 24 h gewählt. Weiterhin wurden die Zellen auf *6-well-ultra-low-attachment*-Platten ausgesät, um so eine adhärenzgetriggerte Differenzierung zu unterbinden. Bei längeren Kultivierungszeiträumen, sowie bei der Nutzung herkömmlicher Kulturschalen war bereits lichtmikroskopisch ein deutlich höherer Makrophagenanteil in der Zellsuspension zu erkennen. Ein Nachteil dieser kurzen Kultivierungsdauer ist allerdings die vorhandene Verunreinigung mit weiteren Zelltypen wie Lymphozyten oder neutrophilen Granulozyten, die im Falle längerer Kultivierungszeiten aufgrund fehlender Stimuli absterben würden[105,106].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl Isolations-, als auch die Kultivierungsmethode zweckmäßig und effektiv zur Umsetzung dieser Arbeit beigetragen haben.

6.2 Hinterlauf- Ischämie- Modell und Perfusionsmessung

Das hier angewandte Tiermodell ist eine häufig angewandte Methode für die Untersuchung von Prozessen wie dem der Arteriogenese oder der Angiogenese im Zusammenhang mit der pAVK. Ziel ist es durch eine Ligatur der *A. femoralis* eine Unterbrechung der Perfusion im betroffenen Bein zu erreichen. Klassischerweise erfolgen Laser- Doppler-Perfusionsmessungen im Zeitverlauf um Veränderungen der Durchblutung zu dokumentieren. Leider sind die bei diesem Modell angewandten Operationsmethoden sehr vielfältig und zum Teil mit unterschiedlichen Messergebnissen behaftet. Neben einfachen Ligaturen der *A. femoralis*, über die Entfernung eines Teilabschnitts der Arterie oder der zusätzlichen Entfernung der *V. femoralis* gibt es viele Möglichkeiten der Perfusionsunterbrechung. In dieser Arbeit wurde die *A. femoralis* doppelt unmittelbar oberhalb der *A. epigastrica superficialis* ligiert. Durch die hier gewählte Lokalisation der Ligatur ist die Möglichkeit der Ausbildung von Kollateralarterien, im Gegensatz zu weiter *proximal* gelegenen Unterbrechungen der Blutzufuhr, weiterhin gegeben. Gleichzeitig ist die Perfusion aber auch ausreichend eingeschränkt um perfusionsverbessernde Therapien zu testen[100]. Zudem ergaben sich während der OP kaum Komplikationen. Blutungen durch Perforationen der unmittelbar zur Arterie benachbarten Vene konnten gut kontrolliert und mit nur geringem Blutverlust gestillt werden. Auch Infektionen im Bereich des OP-Gebietes konnten bei keinem Versuchstier beobachtet werden.

Neben der tatsächlichen OP hatte auch die Narkose mit Ketamin, Xylazin und Natriumchlorid einen Einfluss auf Messergebnisse und Vitalparameter der Maus. Vor allem die Inhalationsnarkose durch Isofluran führte bei den Tieren in den ersten 30 min häufig zu einer Verminderung der Atemfrequenz. Diesem Phänomen konnte durch eine möglichst geringe Liegedauer der Tiere im Isofluran-Luftgemisch entgegengewirkt werden. Die Injektionsnarkose wiederum wurde gut toleriert, auch Infektionen durch die intraperitoneale Injektion blieben aus. Allerdings wirkte sich diese auch auf die Perfusion aus. Zunächst kam es durch das Narkotikum zu einer Vasodilatation, die an einer leicht verstärkten Perfusion zu erkennen war. Nach einer gewissen Eingewöhnungszeit normalisierte sich die Durchblutung allerdings wieder und fiel mit steigender Narkosetiefe sogar leicht ab. Um diesen und andere systemische Fehler zu vermeiden wurden zum einen drei Perfusionsmessungen durchgeführt, deren Werte gemittelt wurden und zum anderen wurde ein Perfusionsquotient gebildet. Hierdurch wurde nicht der absolute Wert des ligierten Beines in die Auswertung der Daten genommen, sondern das Verhältnis zwischen ligierter- und unligierter Seite.

Dennoch wurde die Maus um einen Wärmeverlust zu verhindern und konstante Umgebungstemperaturen zu gewährleisten, während der Messung auf einer Wärmeplatte positioniert. Die Perfusionsmessung wurde dann nach einer gewissen Eingewöhnungszeit bei allen Tieren in gleicher Weise durchgeführt. Auch wenn es möglich ist methodische Fehler zu umgehen, so weist die Methode der Laser-Doppler-Perfusionsmessung technische Grenzen auf. So kann durch die geringe Eindringtiefe des Lasers nur die Perfusion der oberflächlichen Hautschichten gemessen werden. Dadurch führt eine Anwendung unterschiedlicher Messmethoden, wie beispielsweise der Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie, zu anderen Ergebnissen[107]. Weitere Verfahren, die anstelle einer LDPI Messung eingesetzt werden und zusätzlich auch morphologische Aspekte der veränderten Perfusion aufdecken können, sind: Angiographie[108], Micro-CT[100], Injektion von Mikropartikeln[7], sowie die Magnetresonanztomographie[7]. Nichtsdestotrotz hat sich aufgrund der einfachen und standardisierten Handhabung das Prinzip der LDPI-Messung in vielen Arbeitsgruppen etabliert. Aufgrund der genannten Unterschiede der Messungen im Vergleich mit anderen Messverfahren sollten diese Ergebnisse allerdings nur im Zusammenhang mit weiteren Untersuchungen gedeutet werden. Dazu zählt beispielsweise die Histologie, die Intravitalmikroskopie aber auch der klinische Eindruck des Tieres.

6.3 Histologische Untersuchungen und Intravitalmikroskopie

Ziel der histologischen Untersuchungen war es, die morphologischen Korrelate der in der Perfusionsmessung gefundenen Veränderungen zu finden. Mit anderen Worten sollten die Arteriogenese, aber auch die Angiogenese mithilfe histologischer Untersuchungen der Beinmuskulatur der Versuchstiere untersucht werden. Weiterhin wurde das Monozytenhoming sowohl histologisch als auch mit der Intravitalmikroskopie untersucht. Der Prozess der Arteriogenese, der in erster Linie durch Inflammation getriggert wird, zeigt sich in einer vermehrten Anzahl an Kollateralen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Wie im Einleitungsteil beschrieben (Punkt 1.2.1), dienen diese Gefäße der Überbrückung von Engstellen, in diesem Fall der artifiziellen Okklusion des Gefäßes. Für die Quantifizierung dieser Gefäße war die Analyse proximaler Muskeln, in diesem Falle der *Mm. adductores*, nötig. Der *M. quadriceps femoris* eignete sich aufgrund seines geringeren Volumens und seiner ventralen Lage am Oberschenkel nicht zur Quantifizierung der Kollateralen und zeigte in seiner Auswertung auch keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe der monozytentransplantierten Mäuse. In den *Mm. adductores* der ligierten Seite zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der

Gefäße. Eine maschinelle Auswertung war aufgrund der unterschiedlichen Gefäßanschnitte nicht möglich, sodass eine manuelle Auszählung durchgeführt wurde. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Auszählung verblindet, durch nur einen Untersucher durchgeführt wurde. Eine qualitative Überlegenheit der Kollateralen, die anhand des Gefäßdurchmessers überprüft wurde, konnte gegenüber der Kontrollgruppe nicht festgestellt werden. Diese Tatsache könnte allerdings auch auf die bereits erwähnte morphologische Diversität der Gefäße im histologischen Schnittbild zu erklären sein, die eine genaue Analyse des Gefäßdurchmessers schwierig macht. Hier könnten Methoden wie die MRI-Untersuchung oder die Mikro-CT zukünftig Abhilfe schaffen. Diese Methoden bieten gegenüber herkömmlichen Histologieuntersuchungen den Vorteil einer besseren räumlichen Auflösung, können allerdings wenig Aufschluss über molekulare Mechanismen bieten. Dadurch werden klassische Antikörperfärbungen auch in Zukunft ihren Stellenwert haben. Die inflammatorische Komponente im Prozess der Arteriogenese konnte ebenfalls durch den Nachweis endogener Makrophagen um Kollateralgefäße nachgewiesen werden, die vor allem am dritten Tag nach der Monozyteninjektion gefunden wurden. Aber auch am Experimentende nach 21 Tagen konnten Makrophagen gefunden werden, die nun allerdings in geringerer Anzahl und größerer Entfernung zum Gefäß vorkamen. Diese Erkenntnisse waren allerdings schwer quantifizierbar und waren außerdem in beiden Versuchsgruppen vorhanden. Aufschlussreicher war an dieser Stelle der Nachweis transplanteder Monozyten in die Nähe von Kollateralen, sowohl durch die Intravitalmikroskopie, als auch durch herkömmliche histologische Techniken, wie bereits im Ergebnisteil gezeigt. Die histologische Aufarbeitung der Präparate war aufgrund der notwendigen Entnahmetechniken nicht immer artefaktfrei möglich. Beispielsweise kam es zur Zerreißen von Teilen des Muskels durch ischämiebedingte Atrophie oder durch Zug am Präparat bei der Heraustrennung. Diese Artefakte konnten durch die Verwendung der Intravitalmikroskopie umgangen werden. Monozyten wurden vor der Injektion mit dem Farbstoff DiO markiert und über die Schwanzvene injiziert. Die Mikroskopie erfolgte dann wie im Ergebnisteil beschrieben einen Tag nach der Injektion. Hier wird die korkenzieherartige Struktur der Gefäße, die typisch für Kollateralen ist, deutlicher sichtbar als in der herkömmlichen Histologie. Außerdem ist durch die Untersuchung am lebenden Tier die Beobachtung des *homings* in einer realistischeren Umgebung möglich. Eine Quantifizierung der applizierten Monozyten war jedoch aufgrund der geringen Anzahl der nachgewiesenen Monozyten in einzelnen Schnittebenen nur bedingt aussagekräftig. Auch wenn vielversprechende Aufnahmen durch die Intravitalmikroskopie entstanden sind, gibt es weiterhin Probleme die geklärt werden müssen. Durch die Aufnahme

an der lebenden Maus ist es schwierig, Artefakte durch Atembewegungen auszuschalten. Eine Fixierung des Tieres ist nur bedingt möglich, da eine zu starke Kompression auf die zu untersuchende Stelle zu einer Stase des Blutes in den Gefäßen führt und so die Beobachtungen beeinträchtigt. Weiterhin wird es in der Zukunft Ziel sein Zell-Zell-Interaktionen sichtbar zu machen, um so mehr über das Zusammenspiel verschiedener Zellen im Prozess der Arteriogenese zu erfahren. Trotz dieser Herausforderungen bietet die Intravitalmikroskopie bereits jetzt interessante Möglichkeiten zur Darstellung des Monozytenhomings in vivo und stellt eine gute Ergänzung zur herkömmlichen Histologie dar. Diese Experimente konnten beweisen, dass die applizierten Monozyten an Gefäßen im inflammatorischen Milieu der künstlich erzeugten Stenose adhäreren und in das Gewebe einwandern. Hier sollen sie durch das Hervorrufen einer *host vs. graft*- Reaktion zu einer weiteren Verstärkung der Inflammation führen, wodurch die Arteriogenese verstärkt werden soll. Diese These der *host vs. graft*- Reaktion wird durch Autoren anderer Studien gestützt, die feststellen konnten, dass durch die Gabe von Immunsuppressiva eine arteriogene Wirkung der Zelltransplantationen ausbleibt[67,109]. Endokrine Effekte können durch den schnellen Abbau der Monozyten durch eben diesen *host vs. graft*- Effekt eher vernachlässigt werden[109].

Neben der Untersuchung der Arteriogenese und des Monozytenhomings wurden die Hinterläufe der Mäuse außerdem auf Angiogenese hin untersucht. Der entscheidende Faktor für diese ist, wie im Einleitungsteil erwähnt, die Ischämie. Diese entsteht durch eine Minderversorgung durch Arterien proximal der ischämischen Gewebe, in diesem Falle durch die rechtsseitige Ligatur der *A. femoralis*. In der Muskulatur des *M. gastrocnemius* der ligierten Seite in der Kontrollgruppe fand sich eine größere Kapillardichte als in der monozytentransplantierten Gruppe. Diese ist auf die geringere Arteriogenese im Oberschenkel der ligierten Seite in der Kontrollgruppe zurückzuführen. Daraus resultiert eine geringere Perfusion im Unterschenkel und es kommt kompensatorisch zu einer vermehrten Kapillarisation in den betroffenen Muskeln. In der proximalen Muskulatur des ligierten Beines konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass die vorbestehenden Kollateralen zwar für eine ausreichende Durchblutung des Oberschenkels sorgen können, aber für eine suffiziente Versorgung des Unterschenkels bei Versuchstieren der Kontrollgruppe nicht differenziert genug sind. Die Auswertung der Kapillardichte konnte aufgrund der relativ homogenen Größe und Form der Kapillaren im histologischen Bild maschinell erfolgen. Dadurch konnte eine einheitliche Auswertung gewährleistet werden. Schwierigkeiten entstanden durch teilweise atrophe

Muskelbereiche, vor allem in der Unterschenkelmuskulatur der Kontrollgruppe. Dadurch kam es des Öfteren zu einem Zerreißen der Muskulatur beim Schneiden der Präparate. Auch die Präparation des Muskels gestaltete sich schwieriger und musste sehr behutsam erfolgen. Trotz dieser Schwierigkeiten konnte eine histologische Analyse aller Präparate erfolgen und eine erhöhte Kapillardichte im Unterschenkel der Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

6.4 Transplantation humaner Monozyten

In bisherigen Experimenten, in denen es zum Einsatz allogener, d.h. zu einem Transfer von Zellen unterschiedlicher Individuen in die gleiche Spezies kam, konnten im Tierexperiment bereits vielversprechende Ergebnisse erzielt werden[66,67]. Allogene Zelltransplantationen sind in Form von Stammzelltransplantationen bereits Alltag in der Behandlung bösartiger hämatologischer Erkrankungen. Trotz der Anwendung dieser Therapien sind diese mit der Gefahr nicht zu kontrollierender Abstoßungsreaktionen und Infektionen behaftet. In dieser Arbeit handelt es sich um eine xenogene Transplantation. Über xenogene Monozytentransplantationen, d.h. über den Transfer von Zellen eines Individuums auf ein Individuum einer anderen Spezies, ist in der Literatur bisher wenig bekannt. Xenogene Transplantation werden beispielsweise bei der Transplantation von porcinen Langerhans-Zell-Inseln bei der Therapie des Diabetes mellitus Typ I angewandt. Allerdings werden die Inseln hierbei mit Alginat umkapselt, um eine Abstoßungsreaktion zu verhindern[110]. Um weitere Abstoßungsreaktionen zu verhindern wird oftmals eine zusätzliche Immunsuppression nötig. Weiterhin gibt es bei xenogenen Transplantationen die Möglichkeit der Übertragung tierischer Pathogene auf den Menschen, wodurch die Entstehung von Zoonosen gefördert wird[111]. In den hier durchgeführten Experimenten konnte keine dieser Nebenwirkungen festgestellt werden. Dennoch würde diese Form der Zelltransplantation im Umkehrschluss, bezogen auf die vorliegende Arbeit bedeuten, dass Menschen zur Therapie von okklusiven Gefäßerkrankungen murine Zellen transplantiert bekommen. Dieses Vorhaben sollte allein aus ethischen Gründen Schwierigkeiten haben, in die Tat umgesetzt zu werden. Daher war der Gedanke bei dieser Arbeit in erster Linie die Funktions- und Einsatzfähigkeit der humanen Monozyten sowohl *ex vivo* als auch *in vivo* im lebenden Organismus zu testen, um diese später in der Therapie von Patienten einsetzen zu können.

Bei der Kultivierung der Monozyten unter der Stimulation von INF- γ zeigte sich in der Durchflusszytometrie ein vermehrter Anteil an intermediären Monozyten und damit zunehmende Differenzierungstendenz in die nichtklassische inflammatorische Mo3-Klasse (siehe Punkt 5.1). Eine fehlende Stimulation führte zu einem verminderten Anteil an

intermediären Monozyten (Mo2) hin zum klassischen antiinflammatorischen Typ (Mo1). Wie unter Punkt 6.1 bereits erwähnt, liegt der Grund dafür an der gewählten Isolationsmethode. Monozyten des nichtklassischen Typs spielen eine Rolle bei inflammatorischen Vorgängen, wie dem der Atherosklerose, der okklusiven Gefäßerkrankungen in den meisten der Fälle zu Grunde liegt. Bei diesen Patienten lässt sich oftmals eine erhöhte Menge an Monozyten im Blut nachweisen[112,113]. Durch einen veränderten Zytokinspiegel im peripheren Blut kommt es durch Expression des Fraktalkin-Rezeptors auf der Oberfläche des Gefäßendothels zu einer vermehrten Migration der nichtklassischen Monozyten. Ohne diesen veränderten Zytokinspiegel überwiegt die Migration klassischer Monozyten[114]. Da bei kardiovaskulären Erkrankungen ein eher inflammatorisches Milieu herrscht[115], sollte durch die Differenzierung der klassischen in die nichtklassischen Monozyten durch die Stimulation mit $\text{INF-}\gamma$ eine Migration in das Gewebe gefördert werden. Da nichtklassische Monozyten vorwiegend das proinflammatorische $\text{TNF-}\alpha$ sezernieren, können diese nach ihrer Migration und Differenzierung zu Makrophagen die Inflammation aufrechterhalten, wenn nicht sogar steigern. Dadurch würde die Arteriogenese, deren Haupttrigger die Inflammation darstellt (siehe Punkt 1.2.1), gesteigert werden. Aufgrund dieser Überlegungen wurde in dieser Arbeit eine Isolation der Zellen anhand des Dichtegradienten mit anschließender $\text{INF-}\gamma$ -Stimulation gewählt. Dadurch sollte eine Differenzierung in Richtung der nichtklassischen Monozyten gefördert werden[83]. Neben diesem positiven Einfluss der Monozyten ist vor einem klinischen Einsatz auch die Beteiligung von Monozyten an pathologischen Prozessen zu bedenken. Sie bewirken durch eine Ausschüttung von Matrix- Metalloproteasen eine Instabilität atherosklerotischer Plaques und führen damit zu einer erhöhten Gefahr von Plaquerupturen, die wiederum mit akuten Gefäßverschlüssen einhergehen können[116,117]. Zur Überprüfung der Wirkung einer Monozytentransplantation auf die Vorgänge der Atherosklerose werden weitere Versuche nötig sein. In dieser Arbeit ist eine proinflammatorische Wirkung der Monozyten aufgrund der Zytokinausschüttung wegen ihres schnelleren Abbaus durch eine *host vs. graft*- Reaktion unwahrscheinlich. Die Steigerung der Arteriogenese in dieser Arbeit ist eher auf eine Reaktion des Körpers auf die fremden Zellen und eine damit einhergehende vermehrte Aktivierung und Rekrutierung endogener Monozyten zurückzuführen. Abstoßungsreaktionen mit einem nicht kalkulierbaren Ausgang, die ähnlich auch bei allogenen Zelltransplantationen ablaufen und Infektionen müssen bei klinischen Untersuchungen beim Menschen. Körpereigene Monozyten, sogenannte autologe Zellen, sollen anstelle körperfremder Zellen übertragen werden. Damit auch körpereigene Monozyten eine arteriogene Reaktion hervorrufen, sollen diese durch eine vorherige *ex vivo*

Stimulation mit Antigenen, wie dem bekannten Tetanustoxoid inkubiert werden. Nach einer Übertragung in zuvor immunisierte Empfänger, wird eine spezifische Entzündungsreaktion hervorgerufen, die mit weniger systemischen Nebenwirkungen zu einer vermehrten Ausbildung von Kollateralen führt. Diese positive Wirkung der so behandelten Monozyten konnte im Tierexperiment bereits nachgewiesen werden[68]. Bevor dieser Ansatz allerdings am Menschen zum Einsatz kommen kann, sind weitere Versuche nötig. Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche mit ihren Ergebnissen bilden eine erste Grundlage für weitere Versuche mit humanen Monozyten. Es wurde gezeigt, dass humane, ex vivo stimulierte Monozyten voll funktionstüchtig sind und auch im lebenden Organismus zu einer Veränderung des Gefäßwachstums führen können. Diese Erkenntnis ist eine unbedingte Voraussetzung für einen Einsatz dieser vielversprechenden Therapiemethode am Patienten.

Die Arbeit erbrachte die Erkenntnis, dass die transplantierten Zellen eine perfusionsfördernde Wirkung im Mausmodell zeigen. Dieser Wirkung liegt am ehesten eine *host vs. graft*-Reaktion zugrunde. Um diese zumindest im Ansatz näher zu untersuchen wurde ein Zytokinassay durchgeführt, dessen Ergebnisse unter 5.9 dargestellt sind.

Hier ist auffällig, dass in der Kontrollgruppe bis 24 h nach Injektion von NaCl die Zytokinspiegel der meisten Zytokine oberhalb der der monozytentransplantierten Gruppe liegen. Ein Erklärungsansatz hierfür ist eine Hemmung der Immunreaktion nach Monozytentransplantation, welche dann in sämtlichen Zytokinen zunächst zu einem Abfall im Vergleich zur Kontrollgruppe führt. Diese Hemmung könnte z.B. notwendig sein, um einer überschießenden Immunreaktion nach xenogener Zelltransplantation entgegenzuwirken. Zur weiteren Untersuchung dieses Sachverhaltes wären weitere Experimente mit dem Einsatz immunsuppressiver Medikamente denkbar.

Unklar bleibt weiterhin, warum in der monozytentransplantierten Gruppe sowohl inflammatorische (z.B. TNF- α , INF- γ) als auch antiinflammatorische Zytokine (z.B. IL-4, IL-10) gleichermaßen in ihren Zytokinspiegeln abfallen.

Drei Tage nach Zelltransplantation gleichen sich die Zytokinlevel der Versuchsgruppen an. Möglicherweise ist diese Beobachtung der Zirkulationszeit der injizierten Monozyten geschuldet. Wie bereits im Einleitungsteil erwähnt (Punkt 1.4) liegt die durchschnittliche Zirkulationszeit von Monozyten im Blutkreislauf nach ihrer Freisetzung zwischen 24 und 72 Stunden[73,74]. Aufgrund der vermuteten *host vs. graft*- Reaktion ist diese Zirkulationszeit nach einer xenogenen Transplantation möglicherweise verkürzt. Die Ursache hierfür könnte beispielsweise in einer erhöhten Aktivität CD4- positiver Zellen liegen, die zu einem schnelleren Abbau der Zellen führen[109]. Andererseits wäre auch eine beschleunigte

Migration der durch $\text{INF-}\gamma$ bereits aktivierten, injizierten Zellen in das umliegende Gewebe möglich[88]. Hierfür müsste man die Zytokinkonzentrationen in noch kürzeren Zeitabständen messen, was mit den hier verwendeten Messmethoden tierethisch nicht vertretbar wäre.

Das initial erhöhte Zytokinlevel in der Kontrollgruppe lässt sich eventuell auch durch die stattgehabte Operation und Injektion erklären.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Zytokinassay mit durchaus bemerkenswerten Ergebnissen einen Ansatz zur Aufklärung des Mechanismus bietet, der zu einer Steigerung der Durchblutung nach Monozytentransplantation im murinen Modell der Hinterlauf-Ischämie führt. Durch diese Ergebnisse wurden allerdings auch einige neue Fragen aufgeworfen, welche es in weiteren Versuchen zu beantworten gilt.

6.5 Ausblick

In vielen Studien wurde die Beteiligung von Monozyten am Prozess der Arteriogenese nachgewiesen (siehe Punkt 1.2.1). Nach fehlenden Erfolgen bei Therapieversuchen mit einzelnen Wachstumsfaktoren, bietet der Einsatz von Monozyten eine vielversprechende Alternative. Monozyten haben neben der Ausschüttung verschiedener Zytokine zusätzlich den Vorteil der Möglichkeit einer Interaktion mit anderen Zellen. Sie sind daher am ehesten dazu in der Lage, den Prozess der Arteriogenese lokal am Ort der Entzündung gezielt in seiner Komplexität nachzubilden. Bisherige Erfolge in der Gabe von Monozyten zur Steigerung der Kollateralenentwicklung konnten vorwiegend durch murine Zellen im Tiermodell gezeigt werden. Um die Nutzung dieser Methoden am Menschen möglich zu machen, sind Experimente mit humanen Zellen nötig. Diese Versuche müssen zum Einen *ex vivo*, aber gleichzeitig auch *in vivo* im Tiermodell erfolgen. Mit dieser Arbeit konnten bereits wichtige Fragen zur Vitalität und Funktionalität der humanen Monozyten nach *ex vivo* Stimulation geklärt werden. Auch die Versuche im murinen Hinterlauf-Ischämie-Modell waren vielversprechend und konnten eine Wirkung der Zellen im Tierversuch nachweisen. Allerdings ist eine Transplantation muriner Zellen auf den Menschen schlecht vertretbar und sollte auch nicht Ziel der zugrunde liegenden Arbeit sein. In weiteren Experimenten sollte der Einsatz an immundefizienten Tieren erfolgen, in denen eine Abstoßungsreaktion aufgrund einer fehlenden Immunantwort ausgeschlossen ist. Hierdurch könnte die Arteriogenität der eingesetzten Monozyten weitgehend losgelöst vom xenogenen Effekt untersucht werden. Da hier wahrscheinlich auch die *host vs. graft*- Reaktion ausbleiben würde und die Arteriogenese fördernde Inflammation in lediglich abgeschwächter Form auftreten würde, wäre hier von einer Verminderung der perfusionverbessernden Wirkung der Monozyten auszugehen.

Ein weiterer Schritt, vor dem Einsatz in der klinischen Therapie, wird die Stimulation humaner Monozyten mit Tetanustoxoid und die anschließende intravenöse Applikation im Tiermodell sein. Hier muss die arteriogene Wirkung sowohl in immunisierten, als auch in nicht immunisierten Individuen analog zu Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe getestet werden[68]. Neben den bereits erwähnten Versuchen zur Auswirkung einer Monozytentransplantation auf die Entwicklung atherosklerotischer Plaques, muss beispielsweise auch der Einfluss auf das Wachstum endogener Tumore untersucht werden. Hierfür könnte ein Matrigel-Maus-Modell genutzt werden. Bei Matrigel handelt es sich um basalmembranartige, extrazelluläre Matrix des Engelbreth-Holm-Swarm Sarkoms der Maus. Dieser Tumor wird in der Forschung verwendet um das Wachstum von Tumorzellen zu untersuchen[118]. Hierfür wird Matrigel subkutan in die Flanke des Tieres injiziert und in bestimmten Zeitabständen nach der systemischen Applikation von Monozyten histologisch untersucht. Auch die Intravitalmikroskopie kann bei der Examination des Tumors und vor allem der tumorassoziierten Tumorangiogenese genutzt werden. Insbesondere soll hier der Fokus auf die Wirkung von Hif-1 α gelegt werden. Der Transkriptionsfaktor ist in der Lage das Tumorwachstum durch Induktion von VEGF zu steigern. Durch eine Hemmung der Hif-Gene soll so die Tumorangiogenese unterdrückt werden[119-121].

Es konnten bereits einige Erfolge in der Forschung mit Monozyten zur Steigerung des Kollateralenwachstums bei ischämischen Gefäßerkrankungen erreicht werden. Dennoch bleiben noch viele Fragen offen, die vor einem klinischen Einsatz dieser vielversprechenden Therapiemethode geklärt werden müssen. Nichtsdestotrotz konnte mit dieser Arbeit ein Grundstein für die Verwendung von humanen Monozyten im klinischen Alltag gelegt werden.

7 Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen zählen vor allem in den Industrienationen zu den häufigsten Todesursachen. Trotz vielfältiger Möglichkeiten gibt es auch heute noch Patienten für die es oftmals aufgrund von Multimorbidität keine Therapiemöglichkeiten gibt. Die Zelltherapie stellt eine Alternative für diese Patienten dar. Eine Möglichkeit schlecht perfundierte Gebiete mit ausreichend Blut zu versorgen ist eine Förderung der Kollateralenbildung, der sogenannten Arteriogenese. Monozyten nehmen eine Schlüsselrolle im Prozess der Arteriogenese ein und konnten im Maus- und Kaninchenmodell bereits zu einer erheblichen Perfusionssteigerung beitragen.

In dieser Arbeit wurden zunächst humane Monozyten aus Leukozytenfiltern per Dichtezentrifugation isoliert. Anschließend erfolgte eine 24-stündige Kultivierung der Zellen unter $\text{IFN-}\gamma$ Stimulation. FACS-Analysen zeigten einen Monozytenanteil von $53,41 \% \pm 15,15 \%$ ($n=9$) nach Ende der Kultivierungsperiode. Viabilitätsanalysen zeigten eine sehr geringe Sterblichkeit von $3,79 \% \pm 0,008 \%$ ($n=5$). Durch eine Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem BSA konnte außerdem die Funktionsfähigkeit der Monozyten bestätigt werden. Für *in vivo* Versuche mit den Zellen wurde am Tag der Zellisolation BALB/c- Mäusen die *A. femoralis* einseitig ligiert. Der Erfolg der OP wurde per Laserdopplermessung überprüft. Am nächsten Tag erhielten die Mäuse jeweils 2,5 Millionen Monozyten über die Schwanzvene injiziert (HuMo). Die systemische Verfügbarkeit der Monozyten, sowie die Anreicherung an Orten der Arteriogenese konnten mithilfe herkömmlicher Histologie aber auch mit der Intravitalmikroskopie nachgewiesen werden. Die Kontrollgruppe (BALB/c- Ko) erhielt lediglich NaCl. Perfusionsänderungen im Zeitverlauf wurden nach 7, 14 und 21 Tagen überprüft. Hierfür wurde ein Perfusionsquotient gebildet, bei dem die Perfusionswerte der ligierten Seite durch die Werte der unligierten Seite geteilt wurden. Die Perfusion änderte sich von $0,99 \pm 0,09$ auf $0,19 \pm 0,04$ ($n=29$) unmittelbar nach der Ligatur. An Tag 7 zeigte sich in HuMo mit $0,39 \pm 0,10$ ($n=12$) im Vergleich zu $0,34 \pm 0,13$ ($n=17$, n.s.) in BALB/c- Ko ein leicht verbesserter Wert. Ähnlich verhielt es sich am Tag 14 mit $0,54 \pm 0,06$ ($n=12$) in HuMo und $0,45 \pm 0,13$ ($n=17$, $*p<0,05$) in BALB/c- Ko. Dieser Unterschied wurde am Tag 21 mit $0,63 \pm 0,12$ ($n=12$) in HuMo und $0,5 \pm 0,12$ ($n=17$, $**p<0,01$) in BALB/c- Ko noch deutlicher. Auch in der Histologie konnten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Dafür wurde die proximale Oberschenkelmuskulatur, genauer die *Mm. adductores*, auf Arteriogenese hin untersucht. Hier zeigten sich in BALB/c- Ko mit $6,33 \pm 1,5$ ($n=9$) signifikant weniger Kollateralen als in

HuMo mit $9,33 \pm 2,31$ ($n=12$, $**p<0,01$). Der *M. gastrocnemius* der ligierten Seite wurde auf Kapillardichte hin untersucht, ein Maß für die Angiogenese, die im Falle einer geringeren Arteriogenese im Oberschenkel stärker ausfällt. Hier zeigten sich wie erwartet in BALB/c- Ko mit $1001,22 \pm 304,78$ ($n=9$) signifikant mehr Kapillaren als in HuMo mit $652,17 \pm 121,21$ ($n=12$, $**p<0,01$). Um diese Unterschiede zwischen den Gruppen stärker zu verdeutlichen, haben wir einen Klinikscore entwickelt, der mithilfe verschiedener Kriterien den klinischen Zustand des Tieres bewertet. Je niedriger der Score war, desto besser war der Zustand des Tieres. Vor und nach Ligatur waren die Scores in beiden Gruppen erwartungsgemäß gleich. An Tag 7 kam es zu ersten Unterschieden mit einem Score von 3,2 in BALB/c- Ko und 2,17 in HuMo. An Tag 14 verschlechterte sich der Zustand der Kontrollgruppe sogar auf 4,0 während er sich in HuMo auf 1,25 verbesserte. An Tag 21 erreichten HuMo mit 0,33 fast den Normalzustand vor OP, während die Tiere der Kontrollgruppe mit 3,33 weiterhin beeinträchtigt waren.

Zur Untersuchung des Mechanismus der hier zugrunde liegenden xenogenen Zelltransplantation wurden den Versuchstieren Serumproben zu festgelegte Zeitpunkten entnommen. In diesen wurde dann mithilfe eines Zytokinassays die Serumkonzentration 23 verschiedener Zytokine untersucht. Hier zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede, die erste Hinweise über die hier ablaufenden immunologischen Vorgänge liefern.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die humanen Monozyten nach der Isolation aus Leukozytenfiltern und einer anschließenden Stimulation mit IFN- γ vital und funktionstüchtig sind. Weiterhin sind sie dazu in der Lage *in vivo* eine Steigerung der Arteriogenese hervorzurufen und an Orte der Entzündung zu wandern. Diese wichtigen Erkenntnisse sind die Grundlage für weitere Versuche mit humanen Monozyten, die für eine spätere Übersetzung in die klinische Anwendung vonnöten sein werden.

8 Literaturverzeichnis

1. Wang, H. *et al.* Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015. A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet* **388**, 1459–1544 (2016).
2. McDermott, M. M. *et al.* Asymptomatic peripheral arterial disease is associated with more adverse lower extremity characteristics than intermittent claudication. *Circulation* **117**, 2484–2491 (2008).
3. O'Donnell, M. E. *et al.* The effects of cilostazol on exercise-induced ischaemia-reperfusion injury in patients with peripheral arterial disease. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* **37**, 326–335 (2009).
4. Adam, D. J. *et al.* Bypass versus angioplasty in severe ischaemia of the leg (BASIL): multicentre, randomised controlled trial. *Lancet (London, England)* **366**, 1925–1934 (2005).
5. Dake, M. D. *et al.* Paclitaxel-eluting stents show superiority to balloon angioplasty and bare metal stents in femoropopliteal disease: twelve-month Zilver PTX randomized study results. *Circulation. Cardiovascular interventions* **4**, 495–504 (2011).
6. Schillinger, M. *et al.* Sustained benefit at 2 years of primary femoropopliteal stenting compared with balloon angioplasty with optional stenting. *Circulation* **115**, 2745–2749 (2007).
7. Singh, S., Evans, L., Datta, D., Gaines, P. & Beard, J. D. The costs of managing lower limb-threatening ischaemia. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* **12**, 359–362 (1996).
8. Hershey, J. C. *et al.* Vascular endothelial growth factor stimulates angiogenesis without improving collateral blood flow following hindlimb ischemia in rabbits. *Heart and vessels* **18**, 142–149 (2003).
9. Brenes, R. A. *et al.* Toward a mouse model of hind limb ischemia to test therapeutic angiogenesis. *Journal of vascular surgery* **56**, 1669-79; discussion 1679 (2012).
10. Tateishi-Yuyama, E. *et al.* Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *The Lancet* **360**, 427–435 (2002).
11. Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature medicine* **6**, 389–395 (2000).
12. Abaci, A., Kahraman, S., Eryol, N. K., Arinc, H. & Ergin, A. Effect of Diabetes Mellitus on Formation of Coronary Collateral Vessels. *Circulation* **99**, 2239–2242 (1999).
13. Helisch, A. *et al.* Impact of mouse strain differences in innate hindlimb collateral vasculature. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **26**, 520–526 (2006).

14. Arras, M. *et al.* Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *The Journal of clinical investigation* **101**, 40–50 (1998).
15. Sampath, R., Kukielka, G. L., Smith, C. W., Eskin, S. G. & McIntire, L. V. Shear stress-mediated changes in the expression of leukocyte adhesion receptors on human umbilical vein endothelial cells in vitro. *Annals of biomedical engineering* **23**, 247–256 (1995).
16. Wahlberg, E. Angiogenesis and arteriogenesis in limb ischemia. *Journal of vascular surgery* **38**, 198–203 (2003).
17. Borgers, M., Schaper, J. & Schaper, W. Acute vascular lesions in developing coronary collaterals. *Virchows Archiv. A, Pathology. Pathologische Anatomie* **351**, 1–11 (1970).
18. Hellingman, A. A. *et al.* T-cell-pre-stimulated monocytes promote neovascularisation in a murine hind limb ischaemia model. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* **41**, 418–428 (2011).
19. Coussens, L. M. *et al.* Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes & development* **13**, 1382–1397 (1999).
20. Heil, M. *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates monocyte migration through endothelial monolayers via increased integrin expression. *European journal of cell biology* **79**, 850–857 (2000).
21. Schaper, W. & Ito, W. D. Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circulation research* **79**, 911–919 (1996).
22. Sunderkötter, C., Steinbrink, K., Goebeler, M., Bhardwaj, R. & Sorg, C. Macrophages and angiogenesis. *Journal of leukocyte biology* **55**, 410–422 (1994).
23. Schaper, W. Collateral circulation: past and present. *Basic Res. Cardiol.* **104**, 5–21 (2009).
24. Scholz, D. *et al.* Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis). *Virchows Archiv : an international journal of pathology* **436**, 257–270 (2000).
25. Benjamin, L. E., Hemo, I. & Keshet, E. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development (Cambridge, England)* **125**, 1591–1598 (1998).
26. Scholz, D. *et al.* Contribution of Arteriogenesis and Angiogenesis to Postocclusive Hindlimb Perfusion in Mice. *Journal of molecular and cellular cardiology* **34**, 775–787 (2002).
27. Schaper, W. Arteriogenesis, the good and bad of it. *Cardiovascular Research* **43**, 835–837 (1999).
28. Asahara, T. *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science (New York, N.Y.)* **275**, 964–967 (1997).

29. Takahashi, T. *et al.* Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nature medicine* **5**, 434–438 (1999).
30. Stabile, E. *et al.* Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in CD4-knockout mice. *Circulation* **108**, 205–210 (2003).
31. Hofer, I. E. *et al.* Leukocyte subpopulations and arteriogenesis. Specific role of monocytes, lymphocytes and granulocytes. *Atherosclerosis* **181**, 285–293 (2005).
32. Karsan, A. *et al.* Fibroblast growth factor-2 inhibits endothelial cell apoptosis by Bcl-2-dependent and independent mechanisms. *The American journal of pathology* **151**, 1775–1784 (1997).
33. Bird, I. N. *et al.* Homophilic PECAM-1(CD31) interactions prevent endothelial cell apoptosis but do not support cell spreading or migration. *Journal of cell science* **112 (Pt 12)**, 1989–1997 (1999).
34. Sato, T. N. *et al.* Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* **376**, 70–74 (1995).
35. Suri, C. *et al.* Requisite Role of Angiopoietin-1, a Ligand for the TIE2 Receptor, during Embryonic Angiogenesis. *Cell* **87**, 1171–1180 (1996).
36. Chavakis, E. Regulation of Endothelial Cell Survival and Apoptosis During Angiogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **22**, 887–893 (2002).
37. O'Reilly, M. Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a lewis lung carcinoma. *Cell* **79**, 315–328 (1994).
38. O'Reilly, M. S. *et al.* Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* **88**, 277–285 (1997).
39. Good, D. J. *et al.* A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 6624–6628 (1990).
40. Baumgartner, I. *et al.* Constitutive Expression of phVEGF165 After Intramuscular Gene Transfer Promotes Collateral Vessel Development in Patients With Critical Limb Ischemia. *Circulation* **97**, 1114–1123 (1998).
41. Isner, J. M. *et al.* Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *The Lancet* **348**, 370–374 (1996).
42. Losordo, D. W. *et al.* Gene Therapy for Myocardial Angiogenesis. Initial Clinical Results With Direct Myocardial Injection of phVEGF165 as Sole Therapy for Myocardial Ischemia. *Circulation* **98**, 2800–2804 (1998).
43. Symes, J. F. *et al.* Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease. *The Annals of Thoracic Surgery* **68**, 830–836 (1999).

44. Mohler III, E. R. *et al.* Adenoviral-mediated gene transfer of vascular endothelial growth factor in critical limb ischemia. Safety results from a phase I trial. *vasc med* **8**, 9–13 (2003).
45. Rajagopalan, S. *et al.* Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication. *Circulation* **108**, 1933–1938 (2003).
46. Comerota, A. J. *et al.* Naked plasmid DNA encoding fibroblast growth factor type 1 for the treatment of end-stage unreconstructible lower extremity ischemia. Preliminary results of a phase I trial. *Journal of vascular surgery* **35**, 930–936 (2002).
47. Lederman, R. J. *et al.* Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study). A randomised trial. *The Lancet* **359**, 2053–2058 (2002).
48. Nikol, S. *et al.* Therapeutic angiogenesis with intramuscular NV1FGF improves amputation-free survival in patients with critical limb ischemia. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **16**, 972–978 (2008).
49. Belch, J. *et al.* Effect of fibroblast growth factor NV1FGF on amputation and death. A randomised placebo-controlled trial of gene therapy in critical limb ischaemia. *The Lancet* **377**, 1929–1937 (2011).
50. Creager, M. A. *et al.* Effect of hypoxia-inducible factor-1alpha gene therapy on walking performance in patients with intermittent claudication. *Circulation* **124**, 1765–1773 (2011).
51. van Royen, N. *et al.* START Trial: a pilot study on STimulation of ARTeriogenesis using subcutaneous application of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as a new treatment for peripheral vascular disease. *Circulation* **112**, 1040–1046 (2005).
52. Ouma, G. O., Zafir, B., Mohler, E. R. & Flugelman, M. Y. Therapeutic angiogenesis in critical limb ischemia. *Angiology* **64**, 466–480 (2013).
53. Amann, B. *et al.* Design and rationale of a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study for autologous bone marrow cell transplantation in critical limb ischemia: the BONE Marrow Outcomes Trial in Critical Limb Ischemia (BONMOT-CLI). *VASA. Zeitschrift für Gefässkrankheiten* **37**, 319–325 (2008).
54. Amann, B., Luedemann, C., Ratei, R. & Schmidt-Lucke, J. A. Autologous Bone Marrow Cell Transplantation Increases Leg Perfusion and Reduces Amputations in Patients With Advanced Critical Limb Ischemia Due to Peripheral Artery Disease. *cell transplant* **18**, 371–380 (2009).
55. Fadini, G. P., Agostini, C. & Avogaro, A. Autologous stem cell therapy for peripheral arterial disease meta-analysis and systematic review of the literature. *Atherosclerosis* **209**, 10–17 (2010).
56. Teraa, M. *et al.* Autologous bone marrow-derived cell therapy in patients with critical limb ischemia: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Annals of surgery* **258**, 922–929 (2013).

57. Peeters Weem, S M O, Teraa, M., Borst, G. J. de, Verhaar, M. C. & Moll, F. L. Bone Marrow derived Cell Therapy in Critical Limb Ischemia: A Meta-analysis of Randomized Placebo Controlled Trials. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* **50**, 775–783 (2015).
58. Gremmels, H. *et al.* Neovascularization capacity of mesenchymal stromal cells from critical limb ischemia patients is equivalent to healthy controls. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **22**, 1960–1970 (2014).
59. Teraa, M. *et al.* Bone marrow alterations and lower endothelial progenitor cell numbers in critical limb ischemia patients. *PloS one* **8**, e55592 (2013).
60. Erbs, S. *et al.* Restoration of microvascular function in the infarct-related artery by intracoronary transplantation of bone marrow progenitor cells in patients with acute myocardial infarction: the Doppler Substudy of the Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction (REPAIR-AMI) trial. *Circulation* **116**, 366–374 (2007).
61. Schächinger, V. *et al.* Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *The New England journal of medicine* **355**, 1210–1221 (2006).
62. Wollert, K. C. *et al.* Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction. The BOOST randomised controlled clinical trial. *The Lancet* **364**, 141–148 (2004).
63. Meyer, G. P. *et al.* Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation* **113**, 1287–1294 (2006).
64. Abdel-Latif, A. *et al.* Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Archives of internal medicine* **167**, 989–997 (2007).
65. van Oostrom, M. C., van Oostrom, O., Quax, P. H. A., Verhaar, M. C. & Hoefler, I. E. Insights into mechanisms behind arteriogenesis: what does the future hold? *Journal of leukocyte biology* **84**, 1379–1391 (2008).
66. Herold, J. *et al.* Transplantation of monocytes: a novel strategy for in vivo augmentation of collateral vessel growth. *Human gene therapy* **15**, 1–12 (2004).
67. Francke, A., Weinert, S., Strasser, R. H., Braun-Dullaeus, R. C. & Herold, J. Transplantation of bone marrow derived monocytes: a novel approach for augmentation of arteriogenesis in a murine model of femoral artery ligation. *American journal of translational research* **5**, 155–169 (2013).
68. Herold, J. *et al.* Tetanus toxoid-pulsed monocyte vaccination for augmentation of collateral vessel growth. *Journal of the American Heart Association* **3**, e000611 (2014).
69. Helisch, A. & Schaper, W. Angiogenesis and arteriogenesis--not yet for prescription. *Zeitschrift für Kardiologie* **89**, 239–244 (2000).

70. Moulton, K. S. *et al.* Angiogenesis Inhibitors Endostatin or TNP-470 Reduce Intimal Neovascularization and Plaque Growth in Apolipoprotein E Deficient Mice. *Circulation* **99**, 1726–1732 (1999).
71. Imhof, B. A. & Aurrand-Lions, M. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nature reviews. Immunology* **4**, 432–444 (2004).
72. Meuret, G. Monozytopoese und Kinetik der Blutmonozyten beim Menschen. *Blut* **24**, 337–345 (1972).
73. van Furth, R. & Cohn, Z. A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *The Journal of experimental medicine* **128**, 415–435 (1968).
74. Whitelaw, D. M. The intravascular lifespan of monocytes. *Blood* **28**, 455–464 (1966).
75. Schlitt, A. *et al.* CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF- α levels. *Thromb Haemost* (2004).
76. Skinner, N. A., MacIsaac, C. M., Hamilton, J. A. & Visvanathan, K. Regulation of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 on CD14dimCD16+ monocytes in response to sepsis-related antigens. *Clin Exp Immunol* **141**, 270–278 (2005).
77. Anghelina, M., Krishnan, P., Moldovan, L. & Moldovan, N. I. Monocytes/macrophages cooperate with progenitor cells during neovascularization and tissue repair: conversion of cell columns into fibrovascular bundles. *The American journal of pathology* **168**, 529–541 (2006).
78. Arnold, L. *et al.* Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *The Journal of experimental medicine* **204**, 1057–1069 (2007).
79. Cavaillon, J. M. Cytokines and macrophages. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacothérapie* **48**, 445–453 (1994).
80. Yrlid, U., Jenkins, C. D. & MacPherson, G. G. Relationships between Distinct Blood Monocyte Subsets and Migrating Intestinal Lymph Dendritic Cells In Vivo under Steady-State Conditions. *The Journal of Immunology* **176**, 4155–4162 (2006).
81. Randolph, G. J., Inaba, K., Robbiani, D. F., Steinman, R. M. & Muller, W. A. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* **11**, 753–761 (1999).
82. Strauss-Ayali, D., Conrad, S. M. & Mosser, D. M. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *Journal of leukocyte biology* **82**, 244–252 (2007).
83. Mukherjee, R. *et al.* Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Scientific reports* **5**, 13886 (2015).
84. Ziegler-Heitbrock, L. *et al.* Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* **116**, e74-e80 (2010).

85. Ancuta, P., Weiss, L. & Haeffner-Cavaillon, N. CD14+CD16++ cells derived in vitro from peripheral blood monocytes exhibit phenotypic and functional dendritic cell-like characteristics. *European journal of immunology* **30**, 1872–1883 (2000).
86. Weber, C. *et al.* Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *Journal of leukocyte biology* **67**, 699–704 (2000).
87. Ziegler-Heitbrock, H. W. Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14+ CD16+ subpopulation. *Immunology today* **17**, 424–428 (1996).
88. Ancuta, P. *et al.* Fractalkine Preferentially Mediates Arrest and Migration of CD16 + Monocytes. *J Exp Med* **197**, 1701–1707 (2003).
89. Belge, K.-U. *et al.* The Proinflammatory CD14+CD16+DR++ Monocytes Are a Major Source of TNF. *The Journal of Immunology* **168**, 3536–3542 (2002).
90. Frankenberger, M., Sternsdorf, T., Pechumer, H., Pforte, A. & Ziegler-Heitbrock, H. W. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood* **87**, 373–377 (1996).
91. Mizuno, K. *et al.* Selective expansion of CD16^{high}CCR2⁻ subpopulation of circulating monocytes with preferential production of haem oxygenase (HO)-1 in response to acute inflammation. *Clin Exp Immunol* **0**, 050911055050003 (2005).
92. Cahalan, M. D., Parker, I., Wei, S. H. & Miller, M. J. Two-photon tissue imaging. Seeing the immune system in a fresh light. *Nat Rev Immunol* **2**, 872–880 (2002).
93. Wagner, M. *et al.* Intravital Microscopy of Monocyte Homing and Tumor-Related Angiogenesis in a Murine Model of Peripheral Arterial Disease. *Journal of visualized experiments : JoVE* (2017).
94. Wagner, M. *et al.* Isolation and intravenous injection of murine bone marrow derived monocytes. *Journal of visualized experiments : JoVE* (2014).
95. Abaci, A. *et al.* Effect of diabetes mellitus on formation of coronary collateral vessels. *Circulation* **99**, 2239–2242 (1999).
96. Nakae, I. *et al.* Age-dependent impairment of coronary collateral development in humans. *Heart and vessels* **15**, 176–180 (2000).
97. Waltenberger, J., Lange, J. & Kranz, A. Vascular Endothelial Growth Factor-A-Induced Chemotaxis of Monocytes Is Attenuated in Patients With Diabetes Mellitus. A Potential Predictor for the Individual Capacity to Develop Collaterals. *Circulation* **102**, 185–190 (2000).
98. Westvik, T. S. *et al.* Limb ischemia after iliac ligation in aged mice stimulates angiogenesis without arteriogenesis. *Journal of vascular surgery* **49**, 464–473 (2009).
99. Chalothorn, D., Clayton, J. A., Zhang, H., Pomp, D. & Faber, J. E. Collateral density, remodeling, and VEGF-A expression differ widely between mouse strains. *Physiological genomics* **30**, 179–191 (2007).

100. Hellingman, A. A. *et al.* Variations in surgical procedures for hind limb ischaemia mouse models result in differences in collateral formation. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* **40**, 796–803 (2010).
101. Berthold, F. Isolation of human monocytes by ficoll density gradient centrifugation. *Blut* **43**, 367–371 (1981).
102. Seeger, F. H., Tonn, T., Krzossok, N., Zeiher, A. M. & Dimmeler, S. Cell isolation procedures matter: a comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction. *European heart journal* **28**, 766–772 (2007).
103. Miltenyi, S., Müller, W., Weichel, W. & Radbruch, A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* **11**, 231–238 (1990).
104. Keskinen, P., Ronni, T., Matikainen, S., Lehtonen, A. & Julkunen, I. Regulation of HLA class I and II expression by interferons and influenza A virus in human peripheral blood mononuclear cells. *Immunology* **91**, 421–429 (1997).
105. Francke, A., Herold, J., Weinert, S., Strasser, R. H. & Braun-Dullaeus, R. C. Generation of mature murine monocytes from heterogeneous bone marrow and description of their properties. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **59**, 813–825 (2011).
106. Lutz, M. B. *et al.* An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of Immunological Methods* **223**, 77–92 (1999).
107. Hendrixx, G. *et al.* Comparison of LDPI to SPECT perfusion imaging using (99m)Tc-sestamibi and (99m)Tc-pyrophosphate in a murine ischemic hind limb model of neovascularization. *EJNMMI research* **6**, 44 (2016).
108. Wuestenfeld, J. C. *et al.* Indocyanine green angiography: a new method to quantify collateral flow in mice. *Journal of vascular surgery* **48**, 1315–1321 (2008).
109. Swijnenburg, R.-J. *et al.* Immunosuppressive therapy mitigates immunological rejection of human embryonic stem cell xenografts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 12991–12996 (2008).
110. Wynyard, S., Nathu, D., Garkavenko, O., Denner, J. & Elliott, R. Microbiological safety of the first clinical pig islet xenotransplantation trial in New Zealand. *Xenotransplantation* **21**, 309–323 (2014).
111. Fishman, J. A., Scobie, L. & Takeuchi, Y. Xenotransplantation-associated infectious risk: a WHO consultation. *Xenotransplantation* **19**, 72–81 (2012).
112. Olivares, R., Ducimetiere, P. & Claude, J. R. Monocyte count: a risk factor for coronary heart disease? *American journal of epidemiology* **137**, 49–53 (1993).
113. Prentice, R. L. *et al.* Leukocyte counts and coronary heart disease in a Japanese cohort. *American journal of epidemiology* **116**, 496–509 (1982).

114. Ancuta, P., Moses, A. & Gabuzda, D. Transendothelial migration of CD16+ monocytes in response to fractalkine under constitutive and inflammatory conditions. *Immunobiology* **209**, 11–20 (2004).
115. Albert, C. M. Prospective Study of C-Reactive Protein, Homocysteine, and Plasma Lipid Levels as Predictors of Sudden Cardiac Death. *Circulation* **105**, 2595–2599 (2002).
116. Johnson, J. L. *et al.* Suppression of atherosclerotic plaque progression and instability by tissue inhibitor of metalloproteinase-2: involvement of macrophage migration and apoptosis. *Circulation* **113**, 2435–2444 (2006).
117. Newby, A. C. Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **28**, 2108–2114 (2008).
118. Albini, A. *et al.* Matrigel promotes retinoblastoma cell growth in vitro and in vivo. *International journal of cancer* **52**, 234–240 (1992).
119. Ferrara, N. & Davis-Smyth, T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine reviews* **18**, 4–25 (1997).
120. Forsythe, J. A. *et al.* Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4604–4613 (1996).
121. Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D. & Keshet, E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* **359**, 843–845 (1992).

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hagen-Poiseuille-Gesetz.

Abbildung 2: Schematischer Mechanismus der Arteriogenese.

Abbildung 3: Schematischer Ablauf der Angiogenese.

Abbildung 4: Darstellung der zwei größten Monozytensubpopulationen.

Abbildung 5: Formel zur Zellzahlberechnung.

Abbildung 6: Schematische Übersicht der Durchflusszytometrie.

Abbildung 7: Formel zur Berechnung des zu injizierenden Narkotikavolumens.

Abbildung 8: Laser-Doppler-Perfusionsmessung.

Abbildung 9: Übersicht über den Ablauf der Operation.

Abbildung 10: Schematische Darstellung der Laser- Doppler- Perfusionsmessung.

Abbildung 11: Übersicht über den Laborarbeitsplatz während einer Laser-Doppler-Messung.

Abbildung 12: Vergleich zwischen konfokaler- und Zweiphotenfluoreszenzmikroskopie.

Abbildung 13: Bein zwischen Stempeln mit Objektträger über dem zu untersuchenden Areal.

Abbildung 14: Ausgangsposition für die Schwanzveneninjektion.

Abbildung 15: Übersicht über die verschiedenen immunhistochemischen Gefäßfärbungen.

Abbildung 16: Darstellung der analysierten Zellsuspension im Forwardscatter(FSC), der gegenüber dem Sidewardscatter(SSC) aufgetragen wurde.

Abbildung 17: Darstellung der analysierten Zellsuspension im FSC (Area-Fläche), der gegenüber dem FSC (Height-Höhe) aufgetragen wurde.

Abbildung 18: Darstellung der analysierten Zellsuspension in der CD45-FITC-Färbung, die gegenüber der CD86-PE-Färbung aufgetragen wurde.

Abbildung 19: Darstellung der analysierten Zellsuspension in der CD16-APC-Färbung, die gegenüber der CD14-PerCP-Färbung aufgetragen wurde.

Abbildung 20: Repräsentative Einzelaufnahme, 10- fach vergrößert.

Abbildung 21: Fluoreszenzmikroskopie zweier Monozyten in 60- facher Vergrößerung.

Abbildung 22: Vorversuch zur Bestimmung des Mausstammes.

Abbildung 23: Darstellung der Laser-Doppler-Perfusions-Messdaten von BALB/c- Mäusen nach intravenöser Applikation humaner Monozyten vs. Kontrollgruppe im Zeitverlauf.

Abbildung 24: Klinikscore im Zeitverlauf über 21 Tage.

Abbildung 25: Darstellung der Kollateralenanzahl in den Mm. adductores der ligierten Seite.

Abbildung 26: Untersuchung der Angiogenese im murinen Hinterlauf.

Abbildung 27: Homing markierter Monozyten in die Mm. adductores der ligierten Seite, einen Tag nach Schwanzveneninjektion.

Abbildung 28: Intravitalmikroskopie einer Kollaterale auf Höhe der Gefäßligatur, zwei Tage nach Verschluss der A. femoralis.

Abbildung 29: Monozyt im Gefäß.

Abbildung 30: Zytokinmessung im Serum der Versuchstiere im Zeitverlauf über 14 Tage.

10 Tabellenverzeichnis

***Tabelle 1:** Versuchstierverwendung*

***Tabelle 2:** 6.2 OP- Material und Allgemeine Utensilien*

***Tabelle 3:** 6.3 Anästhesie- und Injektionsmaterialien*

***Tabelle 4:** 6.4 Zellkultur, Monozytenisolation, Zellexperimente*

***Tabelle 5:** 6.5 Histologie*

***Tabelle 6:** 6.6 Antikörper/Marker*

***Tabelle 7:** 6.7 Durchflusszytometrie*

***Tabelle 8:** 6.8 Eigenansätze*

***Tabelle 9:** Zytokinassay, Blutentnahme*

***Tabelle 10:** 6.9 Software*

***Tabelle 11:** Klinikscore zur Einschätzung des körperlichen Zustandes der Versuchstiere.*

11 Danksagungen

Besonderer Dank gilt PD Dr. med. Jörg Herold für Vergabe des Themas und die engagierte Betreuung dieser Doktorarbeit. Ohne die ständige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft wäre diese Arbeit nicht entstanden.

Herrn Prof. Dr. med. Rüdiger C. Braun-Dullaeus, Direktor der Universitätsklinik für Kardiologie und Angiologie, Magdeburg danke ich für die fachliche Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei dem gesamten Team der experimentellen Kardiologie, allen voran bei Dr. rer. nat. Sönke Weinert bedanken. Die große Geduld bei der Lösung von kleinen und großen Problemen, sowie die freundliche Arbeitsatmosphäre haben die Arbeit sehr erleichtert.

Vielen Dank an Dr. med. Alexander Francke für die hilfreichen Tipps bei den experimentellen Arbeiten.

Ich bedanke mich außerdem bei dem Team der experimentellen Pädiatrie und Neonatologie für die Unterstützung bei der Durchflusszytometrie.

Großer Dank gilt Dr. Friedrich-Wilhelm Röhl für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung dieser Arbeit.

Ich danke meinen Freunden für die von Zeit zu Zeit notwendige Ablenkung und moralische Unterstützung.

Mein größter Dank gilt meiner Familie durch deren Unterstützung ich meinen Weg erst gehen konnte und die mir auch in schwierigen Zeiten immer den Rücken freigehalten hat.

12 Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

**Zelltransplantation zur Förderung der Kollateralenbildung
im murinen Modell der Hinterlauf-Ischämie**

in der Klinik für Kardiologie und Angiologie der Universitätsklinik Magdeburg mit Unterstützung durch

Herrn PD Dr. med. Jörg Herold

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den

Unterschrift
(Martin Wagner)

13 Bildungsweg

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

14 Publikationen, Kongressbeiträge, Stipendien, Preise

14.1 Publikationen

Eingereicht in *American Journal of Translational Research*: Clinical Improvement and enhanced collateral vessel growth after xenogenic monocyte transplantation in mice. **Wagner, M.**, Deindl, E., Deffge, C., Zuschratter, W., Riek-Burchardt, M., Kostin, S., Baer, C., Weinert, S., Braun-Dullaeus, R., Herold, J.

Intravital Microscopy of Monocyte Homing and Tumor-Related Angiogenesis in a Murine Model of Peripheral Arterial Disease. **Wagner, M.**, Zuschratter, W., Riek-Burchardt, M., Deffge, C., Weinert, S., Baer, C., et al. *J. Vis. Exp.* (126), doi:10.3791/56290 (2017).

Isolation and Intravenous Injection of Murine Bone Marrow Derived Monocytes. **Wagner, M.**, Koester, H., Deffge, C., Weinert, S., Lauf, J., Francke, A., et al. *J. Vis. Exp.* (94), doi:10.3791/52347 (2014).

14.2 Kongressbeiträge

Stimulation der Arteriogenese durch PAR1-1 Inhibition. C. Deffge, **M.Wagner**, S.Weinert, R. Braun-Dullaeus, J. Herold; 46. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Angiologie-Gesellschaft für Gefäßmedizin e.V.

Vergleich zwischen chirurgischem Zugangsweg und perkutanem Zugang bei transkutanem Aortenklappenersatz. C. Breyer¹, V. Herold-Vlanti¹, **M.Wagner**¹, Z. Halloul¹, M. Sherif², R. Braun-Dullaeus¹, J. Herold¹: ¹Magdeburg, ²Rostock; 46. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Angiologie- Gesellschaft für Gefäßmedizin e.V.

Ist eine konservative Therapie eines thrombosierten Angiosealsystems ratsam? C. Deffge, **M. Wagner**, V. Herold-Vlanti, Z. Halloul, R. Moritz-Tugral, R. Braun-Dullaeus, J. Haybäck, J.Herold; 46. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Angiologie- Gesellschaft für Gefäßmedizin e.V.

Verbessertes Outcome nach Transplantation xenogener Monozyten im Modell der murinen Hinterlauf Ischämie. **M.Wagner**, C. Deffge, S. Weinert, R. Braun-Dullaeus und J. Herold; im Rahmen der 17. Dreiländertagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Angiologie in wissenschaftlicher Kooperation mit der 58. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Phlebologie vom 7.-10.09.2016

Clinical improvement and enhanced collateral vessel growth after monocyte transplantation in mice. **M. Wagner**, C. Deffge, S. Weinert, R. Braun-Dullaeus, J. Herold; *Frontiers in Cardiovascular Biology 2016 der European Society of Cardiology vom 08.07.2016-10.07.2016 in Florenz*

Altered vascular remodeling in the mouse hind limb ischemia model in Factor VII activating protease (FSAP) deficiency. J. Herold, C. Deffge, S. Nowak, **M. Wagner**, R.C. Braun-Dullaeus, S. Kostin, JM. Daniel, A. Francke, S. Subramaniam, SM. Kanse; *Frontiers in*

Cardiovascular Biology 2016 der European Society of Cardiology vom 08.07.2016-10.07.2016 in Florenz

Effect of PAR-1 inhibition on collateral vessel growth in the murine hind limb model. C. Deffge, **M. Wagner**, S. Weinert, B. Isermann, J. Lee, RC. Braun-Dullaeus, J. Herold; *Frontiers in Cardiovascular Biology 2016 der European Society of Cardiology vom 08.07.2016-10.07.2016 in Florenz*

Intravital microscopy (IVM), a new method for in vivo imaging of monocyte homing in a mouse hind limb arteriogenesis model. C. Baer, W. Zuschratter, M. Riek-Burchardt, **M. Wagner**, C. Deffge, S. Weinert, R. Braun-Dullaeus, J. Herold; *Frontiers in Cardiovascular Biology 2016 der European Society of Cardiology vom 08.07.2016-10.07.2016 in Florenz*

Einfluss von PAR-1-Inhibitor auf die Arteriogenese im murinen Hinterlauf-Ischämie-Modell. C. Deffge, **M. Wagner**, S. Weinert, J. Lauf, B. Isermann, R. Braun-Dullaeus, J. Herold; 82. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie vom 30.03.2016-02.04.2016 in Mannheim*

Intravital microscopy (IVM) a new method for in vivo imaging of monocyte homing in a mouse hind limb arteriogenesis model. C. Baer, W. Zuschratter, M. Riek-Burchardt, C. Deffge, **M. Wagner**, S. Weinert, R. Braun-Dullaeus, J. Herold; 82. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie vom 30.03.2016-02.04.2016 in Mannheim*

Transplantation xenogener Monozyten zur Förderung des Kollateralenwachstums im ischämischen Hinterlauf. **M. Wagner**, C. Deffge, S. Weinert, J. Lauf, B. Isermann, R. Braun-Dullaeus und J. Herold; 44. *Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Angiologie vom 26.09.2015-29.09.2015 in Freiburg*

Der Einfluss von aktiviertem Protein C auf die Gefäßneubildung im murinen Hinterlauf-Ischämie-Modell. C. Deffge, **M. Wagner**, S. Weinert, J. Lauf, B. Isermann, R. Braun-Dullaeus und J. Herold; 44. *Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Angiologie vom 26.09.2015-29.09.2015 in Freiburg*

Inhibition of collateral formation by activated protein c in murin hindlimb ischemia model. C. Deffge, **M. Wagner**, S. Weinert, J. Lauf, B. Isermann, R. Braun-Dullaeus und J. Herold; *Kongress der European Society of Cardiology vom 29.08.2015-02.09.2015 in London*

Hemmung des Kollateralenwachstums durch aktiviertes Protein C im murinen Hinterlauf Ischämie-Modell. C. Deffge, **M. Wagner**, S. Weinert, J. Lauf, B. Isermann, R. Braun-Dullaeus und J. Herold; 81. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie vom 08.04.2015-11.4.2015 in Mannheim*

14.3 Preise und Stipendien

Posterpreis in der Sektion Vaskuläre Biologie: Verbessertes Outcome nach Transplantation xenogener Monozyten im Modell der murinen Hinterlauf Ischämie. **M.Wagner**, C. Deffge, S. Weinert, R. Braun-Dullaeus und J. Herold; *im Rahmen der 17. Dreiländertagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Angiologie in wissenschaftlicher Kooperation mit der 58. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Phlebologie vom 7.-10.09.2016*

Promotionsstipendium im Rahmen der leistungsorientierten Mittelvergabe der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg; 01.01.2016- 30.06.2016

Reisekostenstipendium für die 44.Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Angiologie vom 26.09.2015-29.09.2015 in Freiburg