

Gefäßchirurgie 2020 · 25:31–39  
<https://doi.org/10.1007/s00772-019-00585-4>  
 Online publiziert: 25. Oktober 2019  
 © Der/die Autor(en) 2019



C. Schubert<sup>1</sup> · A.-K. Vlácil<sup>2</sup> · T. Schmitz-Rixen<sup>3</sup> · K. Grote<sup>2</sup> · K. Troidl<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim, Deutschland

<sup>2</sup>Klinik für Kardiologie und Angiologie, Philipps-Universität, Marburg, Deutschland

<sup>3</sup>Klinik für Gefäß- und Endovascularchirurgie, Klinikum der Goethe-Universität, Frankfurt am Main, Deutschland

## Therapeutisches Kollateralwachstum

### Untersuchungen am experimentellen Modell der Femoralarterienligatur bei Mäusen

#### Einleitung

Um die Blutversorgung der Extremitäten bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit (PAVK) sicherzustellen, verfügt der Körper über einen endogenen Prozess der natürlichen Bildung von Bypassgefäßen, die sog. Arteriogenese. Dabei kommt es zum Wachstum bereits bestehender Kollateralgefäße, die jedoch unter Normalbedingungen wenig Einfluss auf die periphere Blutversorgung haben [18]. Wichtig ist die Abgrenzung der Arteriogenese (innerhalb der *Mm. adductores*) vom Prozess der Angiogenese (innerhalb der *Mm. gastrocnemii*), welche durch hypoxieinduzierte Faktoren (HiF) zur Bildung neuer Kapillaren in ischämischen Regionen führt [11]. Arteriogenese dagegen findet ausschließlich in normal perfundierten Regionen statt und wird durch hämodynamische Kräfte, die auf die Gefäßwand wirken, ausgelöst. Hauptsächlich daran beteiligt ist der *fluid shear stress* [2, 11]. Daher erscheint die Entwicklung neuer Therapieansätze zur Förderung des Kollateralwachstums als vielversprechendes Instrument, um das bisherige Repertoire an Therapiemöglichkeiten zu erweitern.

Arteriogenese wird – ähnlich der Arteriosklerose – durch einen entzündlichen Prozess und den Einfluss von Chemokinen, wie *CC-chemokine ligand* (CCL)2 und Adhäsionsmolekülen, wie *intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1 initiiert. Dabei kommt es zur Rekrutierung und Akkumulation von Makrophagen

im perivaskulären Gewebe sowie zur Proliferation von Endothel- und glatten Muskelzellen, was letztendlich zur Größenzunahme der Kollateralen führt [19].

Das makrophagenaktivierende Lipopeptid mit einer Molekülmasse von 2 kDa (MALP-2) ist ein 1990 erstmals von Peter Mühlradt et al. beschriebenes bakterielles Lipopeptid, das aus der Mykoplasmen-Spezies *M. fermentans* isoliert wurde und ursprünglich als starker Aktivator von Makrophagen beschrieben wurde [10, 20, 21]. MALP-2 stimuliert das Immunsystem über ein Heterodimer der Toll-like-Rezeptoren TLR2/6 [10, 21].

Neben der Regulation von inflammatorischen Prozessen sind für TLRs auch regenerative Aspekte beschrieben worden, z. B. bei der Gefäßneubildung und der Angiogenese [5, 6]. Für die Arteriogenese wurden diesbezüglich noch keinerlei Untersuchungen durchgeführt.

In den letzten Jahren haben wir bereits regenerative Effekte von MALP-2 speziell auf Endothelzellen untersucht. In diesem Zusammenhang konnte nachgewiesen werden, dass bereits eine einmalige Applikation von MALP-2 günstige Effekte auf die Angiogenese [4], die Reendothelialisierung nach Gefäßverletzung [7] sowie das vaskulär regenerative Potenzial von mesenchymalen Stammzellen hat [3].

Diese Erkenntnisse erscheinen uns auch im Hinblick auf die Stimulation der Arteriogenese sehr vielversprechend. Daher untersuchen wir diesen Ansatz im

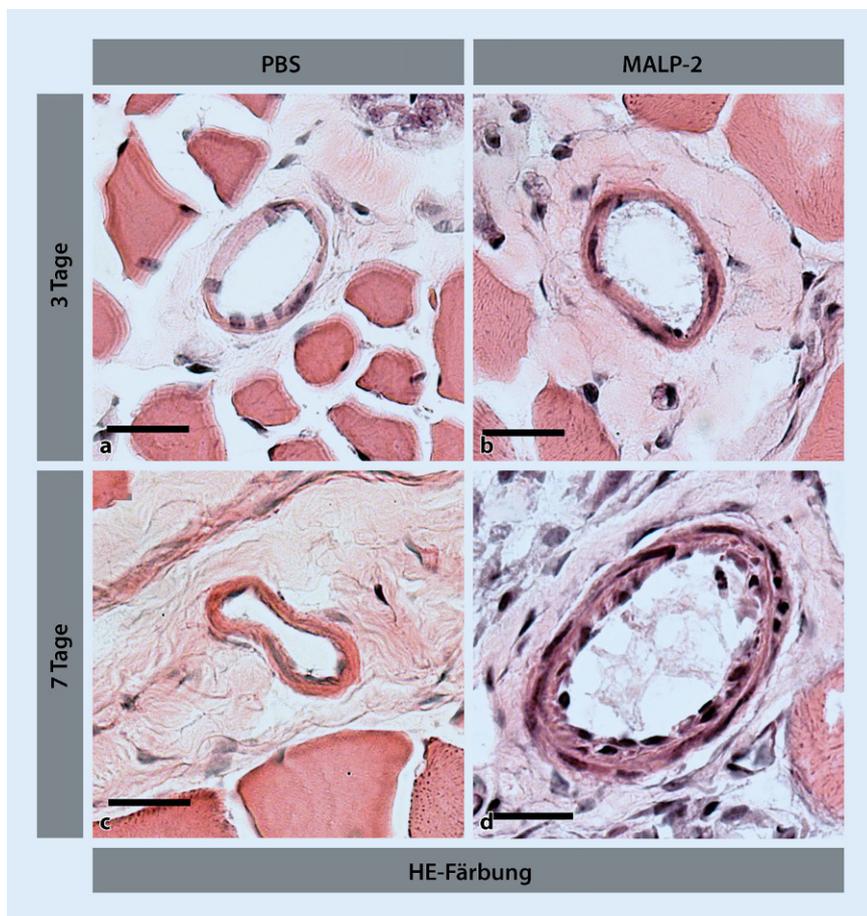
experimentellen Arteriogenesemodell in der Maus.

#### Material und Methoden

##### Tiermodell

Die durchgeführten Tierversuche stehen in Einklang mit den geltenden Gesetzen (TierSchG § 8 Abs. 1) und sind vom Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt (Nr. V54-19c20/15-B2/1152).

Die Ligatur der linken *A. femoralis* erfolgte distal des Abgangs der linken *A. profunda femoris* nach dem Protokoll von Limbourg et al. [9]. 26 BALB/c-Mäuse (10–14 Wochen) wurden in zwei Gruppen (MALP-2/PBS) aufgeteilt. Die Anästhesie erfolgte mittels Ketamin (100 mg/kgKG) und Xylazin (3 mg/kgKG). Direkt vor der Operation erhielten die Tiere eine Analgesie mit Carprofen (5 mg/kgKG). Die Applikation von 125 µl MALP-2 (1 µg in PBS) oder PBS erfolgte direkt nach Ligatur i.v. in die Schwanzvene. Das verwendete MALP-2 stammt aus dem Labor von P. Mühlradt, wo auch die erstmalige Strukturaufklärung erfolgte [10]. Die Gewebe der *Mm. adductores* (zur Untersuchung der Arteriogenese) bzw. *Mm. gastrocnemii* (zur Untersuchung der Angiogenese) wurden an den Tagen 3 bzw. 7 nach operativer Ligatur entnommen. Die weitere Aufarbeitung der Gewebe geschah nach dem Protokoll von Limbourg et al. [9]. Anschließend wurden die Gewebe in Tissuetek (Sakura Finetek, Tokyo, Japan) kryokonserviert.



**Abb. 1** ▲ Morphometrie der Kollateralgefäße. Repräsentative Aufnahmen von Kollateralgefäßen im Querschnitt Hämatoxylin-Eosin(HE)-gefärbter Gewebeschnitte der *Mm. adductores* (a–d). Maßstab: 20 µm, Vergr. 40:1

Für die Auswertung wurden immer die drei größten Kollateralen pro Tier verwendet. Der Einfluss von MALP-2 wurde durch den Vergleich der jeweils operierten Seite (Ligaturmuskel) von MALP-2-Gruppe und PBS-Gruppe untersucht. Zum Nachweis des Einflusses der Operation auf das Wachstum der Kollateralen dienten die nicht operierten, kontralateralen Seiten der Versuchstiere (Kontrollmuskel) als Vergleich.

### Histologie

8 µm Kryoschnitte wurden Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Lichtmikroskop (Axio Scope.A1, Zeiss, Jena; HD-Ultra Farbkamera, euromex, Arnheim, Niederlande). Morphometrische Messungen zu Kollateralengröße und Dicke wurden

mit ImageJ Version 2.0.0-rc-43/1.51p (Open Source) durchgeführt.

### Immunhistochemie

Verwendete Antikörper: Anti-CD68 (Alexa Fluor® 488) (ab222914, Abcam, Camebridge, UK), Anti-Ki-67 (ab16667, Abcam, Camebridge, UK), Anti-CD31 (ab28364, Abcam, Cambridge, UK), Donkey-anti-rabbit (Alexa Fluor® 488) (A21206, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), Anti-α-SMA Cy3 (C6198, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) und DAPI (AB\_2629482, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). Die Analyse erfolgte mit einem konfokalen Mikroskop (Leica SP5, Leica, Wetzlar, Deutschland).

### Datenanalyse

Sämtliche Daten werden als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. Für die statistische Analyse verwendeten wir BiAS für Windows Version 11.06 (epsilon-Verlag, Hochheim Darmstadt). Die Normalverteilung der Daten wurde mit dem Kolmogorow-Smirnow-Lilliefors-Test überprüft. Der Student's t-Test wurde bei normalverteilten Stichproben, der Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test bei nicht normalverteilten Stichproben angewandt. Werte von  $p < 0,05$  werden als statistisch signifikant angesehen (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; n.s. nicht signifikant).

Die Grafiken wurden mit GraphPad Prism 5 for Mac OS X Version 5.0f (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) erstellt.

### Ergebnisse

#### MALP-2 fördert das Wachstum von Kollateralgefäßen

Als Maß für das Kollateralgefäßwachstum wurden die Gefäßlumina sowie die Wanddicke der Kollateralgefäße in den Adduktoren 3 und 7 Tage nach Operation in HE-gefärbten Gewebeschnitten verglichen (Abb. 1a–d).

Drei Tage nach Ligatur zeigte sich zwischen MALP-2 ( $605,7 \pm 177,4 \mu\text{m}^2$ ,  $n = 7$ ) und PBS-Gruppe ( $740,0 \pm 133,0 \mu\text{m}^2$ ,  $n = 8$ ) kein Unterschied ( $p = 0,2724$ ) in der Zunahme des Gefäßlumens (Abb. 1e) und der Gefäßwanddicke (MALP-2  $6,7 \pm 0,4 \mu\text{m}$ ,  $n = 7$ ; PBS  $6,4 \pm 0,4 \mu\text{m}$ ,  $n = 8$ ;  $p = 0,6571$ ) im Ligaturmuskel (Abb. 1g). Das Gefäßlumen in den Kollateralen des Kontrollmuskels hat sich weder in der MALP-2 noch in der PBS-Gruppe verändert. Es zeigte sich jedoch in beiden Gruppen eine signifikante Zunahme der Wanddicke der Kollateralen im Ligaturmuskel im Vergleich zum Kontrollmuskel (MALP-2:  $4,5 \pm 0,3 \mu\text{m}$ ,  $p < 0,0001$ ,  $n = 6$ ; PBS:  $4,5 \pm 0,4 \mu\text{m}$ ,  $p = 0,0004$ ,  $n = 8$ ).

Sieben Tage nach Ligatur sind unter MALP-Applikation sowohl das Gefäßlumen ( $1367,4 \pm 204,1 \mu\text{m}^2$ ,  $n = 7$ ) ( $p = 0,0305$ ) gegenüber der PBS-Gruppe ( $669,4 \pm 116,0 \mu\text{m}^2$ ,  $n = 4$ ) (Abb. 1f)

als auch die Wanddicke der Kollateralen im Ligaturmuskel erhöht (MALP-2  $6,2 \pm 0,3 \mu\text{m}$ ,  $n = 7$ ; PBS-Gruppe  $4,8 \pm 0,4 \mu\text{m}$ ,  $n = 4$ ;  $p = 0,0047$ ; **Abb. 1h**). Nur in der MALP-2-Gruppe gab es eine Zunahme von Gefäßlumen ( $691,1 \pm 86,0 \mu\text{m}^2$ ,  $p = 0,0278$ ,  $n = 5$ ) und Wanddicke ( $3,6 \pm 0,2 \mu\text{m}$ ,  $p < 0,0001$ ,  $n = 6$ ) zwischen Ligatur- und Kontrollmuskel.

### Verstärkte Akkumulation von Makrophagen im perivaskulären Gewebe der Kollateralen nach MALP-2-Applikation

Der Nachweis und die Quantifizierung von Makrophagen im perivaskulären Gewebe erfolgten mittels CD68-Färbung der Gewebeschnitte aus den Adduktoren an den Tagen 3 und 7 (**Abb. 2a–d**).

Drei Tage nach Ligatur zeigte sich zwischen MALP-2 ( $7,1 \pm 1,3$  Makrophagen,  $n = 7$ ) und PBS-Gruppe ( $5,0 \pm 0,8$  Makrophagen,  $n = 8$ ) kein Unterschied ( $p = 0,3370$ ) hinsichtlich der Akkumulation von Makrophagen im perivaskulären Gewebe des Ligaturmuskels. Jedoch zeigte sich jeweils im Ligaturmuskel eine signifikante Akkumulation von Makrophagen im Vergleich zum kontralateralen Kontrollmuskel (MALP-2:  $1,9 \pm 0,6$  Makrophagen,  $p = 0,0001$ ,  $n = 7$ ; PBS:  $1,3 \pm 0,4$  Makrophagen,  $p = 0,0001$ ,  $n = 8$ ; **Abb. 2e**).

Sieben Tage nach Ligatur kam es unter MALP-2-Applikation ( $10,0 \pm 1,5$  Makrophagen,  $n = 7$ ) zu einer gesteigerten Akkumulation von Makrophagen im perivaskulären Gewebe des Ligaturmuskels ( $p = 0,0041$ ) gegenüber der PBS-Gruppe ( $3,3 \pm 1,2$  Makrophagen,  $n = 4$ ). In der MALP-2-Gruppe zeigte sich ebenfalls ein Unterschied zwischen Ligatur- und Kontrollmuskel ( $1,2 \pm 0,4$  Makrophagen,  $p < 0,0001$ ,  $n = 6$ ). Dies konnte in der PBS-Gruppe nicht nachgewiesen werden ( $1,6 \pm 0,6$  Makrophagen,  $p = 0,5899$ ,  $n = 4$ ) (**Abb. 2f**).

### Nachweis von proliferierenden Zellen innerhalb der Kollateralarterien

Zur Untersuchung des Wachstums der Kollateralen durch Zellteilung wurde mittels des Proliferationsmarkers Ki-67

Gefäßchirurgie 2020 · 25:31–39 <https://doi.org/10.1007/s00772-019-00585-4>  
© Der/die Autor(en) 2019

C. Schubert · A.-K. Vlácil · T. Schmitz-Rixen · K. Grote · K. Troidl

## Therapeutisches Kollateralwachstum. Untersuchungen am experimentellen Modell der Femoralarterienligatur bei Mäusen

### Zusammenfassung

**Hintergrund und Fragestellung.** Toll-like-Rezeptoren (TLRs) sind neben ihrer zentralen Rolle der Pathogenerkennung und Aktivierung des Immunsystems auch an zahlreichen physiologischen sowie pathologischen vaskulären Prozessen beteiligt. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des TLR2/6-Liganden *macrophage-activating protein of 2-kDa* (MALP-2) auf die Reperfusion durch das Wachstum von Kollateralen nach experimenteller Ligatur der Femoralarterie in Mäusen zu untersuchen.

**Material und Methoden.** Für die operative Ligatur der linken *A. femoralis* verwendeten wir 10–14 Wochen alte BALB/c-Mäuse. Zeitgleich erfolgte die intravenöse Applikation von MALP-2 ( $1 \mu\text{g}$ ). 3 bzw. 7 Tage nach Operation erfolgte die Entnahme der Muskeln (*Mm. adductores* und *Mm. gastrocnemii*) für histologische und morphometrische Untersuchungen.

**Ergebnisse.** Der Gefäßdurchmesser und die Wanddicke der Kollateralen innerhalb der *Mm. adductores* nahmen in der MALP-2-Gruppe zu. Begleitet wurde dies durch die Proliferation von Endothelzellen und die Akkumulation von Makrophagen im perivaskulären Gewebe. Zeitgleich führte der Einsatz von MALP-2 zu einer verstärkten Kapillardichte innerhalb der Waden (*Mm. gastrocnemii*).

**Diskussion.** Die Applikation von MALP-2 in unserem experimentellen Tiermodell zeigte vielversprechende Ergebnisse für den therapeutischen Einsatz dieses TLR2/6-Liganden zur Reperfusion der Extremitäten durch das Wachstum von Kollateralen.

### Schlüsselwörter

TLR2/6 · PAVK · MALP-2 · Kollateralwachstum · Arteriogenese

## Therapeutic collateral growth. Investigations in an experimental model of femoral artery ligation in mice

### Abstract

**Background and objective.** Apart from their crucial role in pathogen recognition and initiation of the immune defense system, Toll-like receptors (TLRs) are known to be involved in various physiological and pathological vascular processes. The aim of this study was to investigate the potential of the lipopeptide and TLR2/6 ligand *macrophage-activating lipoprotein of 2 kDa* (MALP-2) to promote blood flow recovery by collateral growth after experimental ligation of the femoral artery in mice.

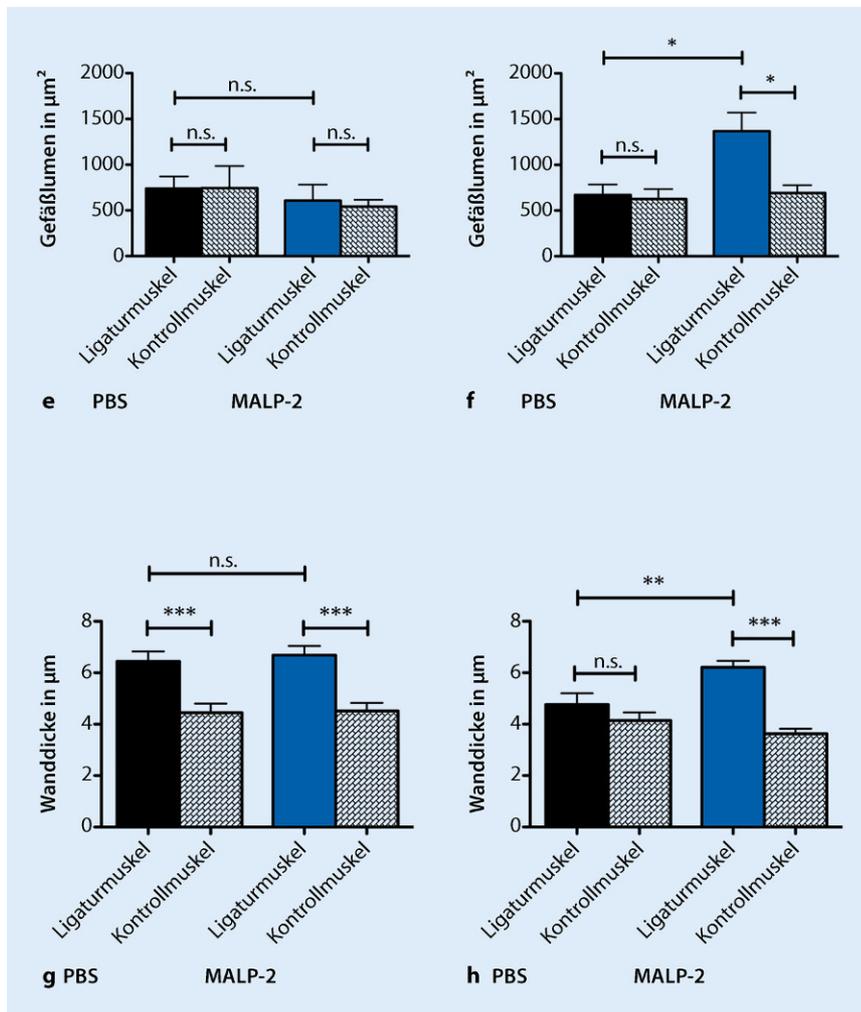
**Materials and methods.** In this study BALB/c mice 10–14 weeks old were subjected to experimental microsurgical ligation of the left femoral artery with simultaneous intravenous application of MALP-2 ( $1 \mu\text{g}$ ). Muscles (adductor muscles and gastrocnemius muscles) were harvested 3 and 7 days after surgery for subsequent histological and morphometric analyses.

**Results.** The use of MALP-2 significantly improved the diameter and wall thickness of collateral vessels in the adductor muscles. This was accompanied by proliferation of intimal endothelial cells and accumulation of macrophages in perivascular tissue. In addition, injection of MALP-2 promoted angiogenesis through an increased capillary density in lower hindlimbs (gastrocnemius muscle).

**Conclusion.** The application of MALP-2 in this experimental animal model showed promising results for the therapeutic use of the TLR2/6 ligand to promote reperfusion of the extremities by the growth of collateral blood vessels.

### Keywords

TLR2/6 · PAD · MALP-2 · Collateral growth · Arteriogenesis



**Abb. 1** ▲ (Fortsetzung) Die Größenzunahme der Kollaterallumen wurde an den Tagen 3 (e) und 7 (f) untersucht. Ebenfalls dargestellt sind die Veränderungen der Wanddicken an den Tagen 3 (g) und 7 (h). (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; n.s. nicht signifikant)

in Gewebeschnitten der *Mm. adductores* 3 bzw. 7 Tage nach Ligatur die Proliferation von Endothelzellen (Abb. 3a–d) und glatten Muskelzellen (Abb. 4a–d) untersucht.

Drei Tage nach Ligatur zeigt sich zwischen MALP-2 ( $1,5 \pm 0,4$  Ki67<sup>+</sup> EC,  $n = 7$ ) und PBS-Gruppe ( $0,3 \pm 0,1$  Ki67<sup>+</sup> EC,  $n = 8$ ) ein Unterschied ( $p = 0,0386$ ) in der endothelialen Proliferationsrate im Ligaturmuskel (Abb. 3c). Ein Vergleich von Ligatur- und Kontrollmuskel zeigte nur unter MALP-2 ( $0,0 \pm 0,0$  Ki67<sup>+</sup> EC,  $p = 0,0046$ ,  $n = 6$ ) einen Unterschied, unter PBS ( $0,0 \pm 0,0$  Ki67<sup>+</sup> EC,  $p = 0,2373$ ,  $n = 4$ ) konnte dieser nicht belegt werden.

Sieben Tage nach Ligatur zeigte sich nach MALP-2-Applikation ( $0,7 \pm 0,2$  Ki67<sup>+</sup> EC,  $n = 7$ ) kein Unterschied

( $p = 0,0888$ ) mehr in der Proliferation von Endothelzellen auf der ligierten Seite gegenüber der PBS-Gruppe ( $0,1 \pm 0,1$  Ki67<sup>+</sup> EC,  $n = 4$ ). Ausschließlich im Vergleich von Ligatur- und Kontrollmuskel der MALP-2-Gruppe konnte eine gesteigerte Proliferation (MALP-2:  $0,1 \pm 0,1$  Ki67<sup>+</sup> EC,  $p = 0,0401$ ,  $n = 6$ ; PBS:  $0,0 \pm 0,0$  Ki67<sup>+</sup> EC,  $p = 0,7553$ ,  $n = 4$ ) belegt werden (Abb. 3f).

Drei Tage nach Ligatur konnte keine Zunahme der Proliferation glatter Muskelzellen festgestellt werden (MALP-2  $0,1 \pm 0,1$  Ki67<sup>+</sup> SMC,  $n = 21$ ; PBS  $0,3 \pm 0,0$  Ki67<sup>+</sup> SMC,  $n = 24$ ;  $p = 0,4230$ ) (Abb. 4e).

Sieben Tage nach Ligatur kam es im Ligaturmuskel zu einer gesteigerten Proliferation glatter Muskelzellen durch die

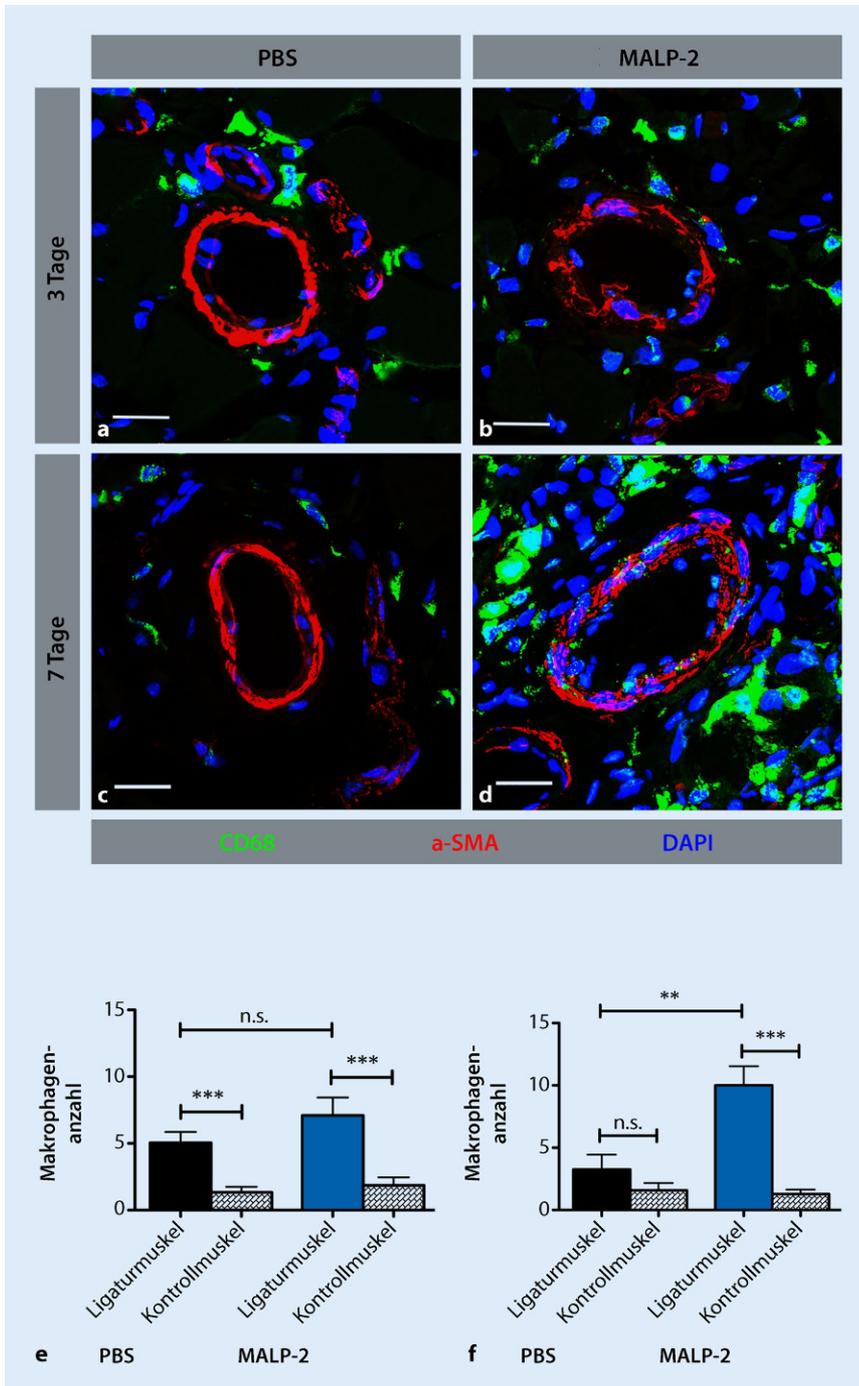
Applikation von MALP-2 gegenüber der PBS-Gruppe (MALP-2  $0,4 \pm 0,1$  Ki67<sup>+</sup> SMC,  $n = 21$ ; PBS  $0,1 \pm 0,0$  Ki67<sup>+</sup> SMC,  $n = 12$ ;  $p = 0,0441$ ). Auch im Vergleich von operierter zu unoperierter Seite zeigte sich ein Unterschied in der Interventionsgruppe ( $0,0 \pm 0,0$  Ki67<sup>+</sup> SMC,  $p = 0,0221$ ,  $n = 6$ ), die Kontrollgruppe ließ keinerlei Unterschiede erkennen ( $0,0 \pm 0,0$  Ki67<sup>+</sup> SMC,  $p = 1,0000$ ,  $n = 4$ ) (Abb. 4f).

### MALP-2 fördert die Kapillarisation der *Mm. gastrocnemii* nach Ligatur der *A. femoralis*

Aufgrund der unilateralen Ligatur der *A. femoralis* kam es im entsprechenden Muskel (*M. gastrocnemius*) distal der Ligatur zu einer Minderversorgung des (Muskel-)Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen. Diese Minderversorgung führte zu einer gesteigerten Angiogenese. Dazu wurden die Anzahl der Kapillaren mithilfe des Markers CD31 gezählt. Gleichzeitig erfolgte die Quantifizierung der benachbarten Muskelfasern (Abb. 4a–d). Das Verhältnis von Kapillaren zu Muskelfasern wurde als Zielgröße für die Bestimmung der Angiogenese verwendet. Die Gewebentnahme erfolgte 3 bzw. 7 Tage post OP.

Drei Tage nach Ligatur zeigte sich zwischen MALP-2- ( $0,9 \pm 0,0$  Kapillaren/Muskelfaser,  $n = 7$ ) und PBS-Gruppe ( $0,7 \pm 0,1$  Kapillaren/Muskelfaser,  $n = 8$ ) ein Unterschied ( $p = 0,0055$ ) im Wachstum der Kapillaren pro Muskelfaser auf der Ligaturseite. Ebenfalls zeigte sich in beiden Gruppen ein signifikanter Unterschied zwischen Ligatur- und Kontrollmuskel (MALP-2:  $0,6 \pm 0,0$ ,  $p = 0,0000$ ,  $n = 7$ ; PBS:  $0,6 \pm 0,0$  Kapillaren/Muskelfaser,  $p = 0,0139$ ,  $n = 8$ ) (Abb. 5e).

Sieben Tage nach Ligatur zeigte die Ligaturseite unter MALP-2-Therapie ( $0,9 \pm 0,0$  Kapillaren/Muskelfaser,  $n = 7$ ) einen deutlichen Unterschied ( $p = 0,0024$ ) gegenüber der PBS-Gruppe ( $0,7 \pm 0,1$  Kapillaren/Muskelfaser,  $n = 3$ ). Die jeweiligen Kontrollmuskel zeigten hingegen keine angiogenetischen Veränderungen (MALP-2:  $0,6 \pm 0,0$ ,  $p = 0,0000$ ,  $n = 5$ ; PBS:  $0,5 \pm 0,0$  Ka-



**Abb. 2** ▲ Akkumulation von Makrophagen im perivaskulären Gewebe nach 3 bzw. 7 Tagen. Die Makrophagen wurden mittels eines Antikörpers gegen CD68 (grün), die Gefäße mittels Aktin der glatten Gefäßmuskulatur (a-SMA, rot) und Zellkerne (blau) angefärbt und im konfokalen Mikroskop untersucht. Repräsentative Aufnahmen der Makrophagenakkumulation im Ligaturmuskel der *Mm. adductores* (a–d). Maßstab: 20 µm. Darstellung der Makrophagenanzahl an den Tagen 3 (e) und 7 (f). (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; n. s. nicht signifikant)

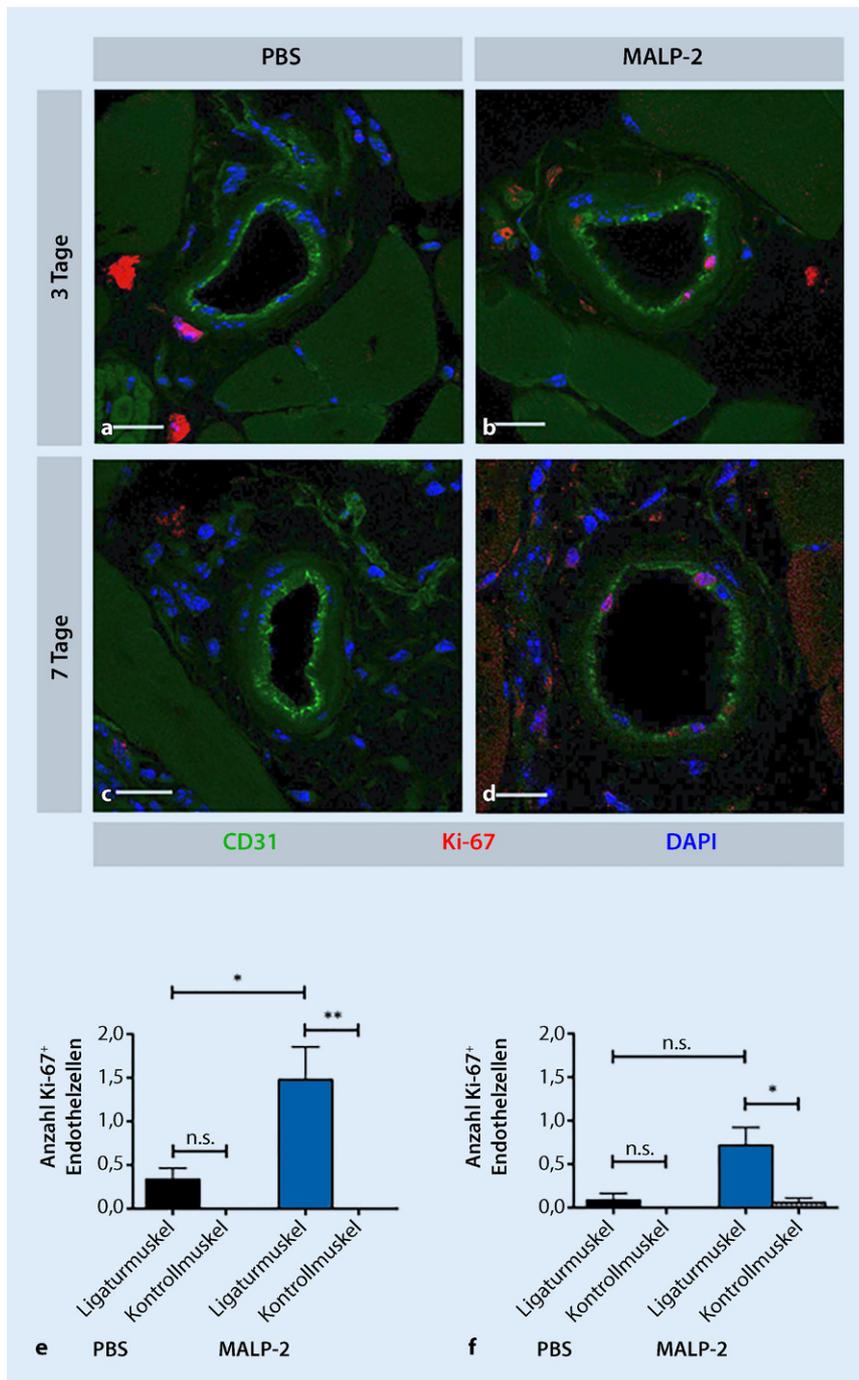
pillaren/Muskelfaser,  $p = 0,0076$ ,  $n = 3$ ) (■ Abb. 5f).

## Diskussion

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Applikation von MALP-2 das Wachstum der Kollateralgefäße – sichtbar durch ein vergrößertes Gefäßlumen und die Zunahme der Wanddicke – fördert. Dabei konnten wir zeigen, dass MALP-2 den Arteriogeneseprozess zusätzlich zur natürlichen Antwort auf den erhöhten *shear stress* hinaus begünstigt und es zu einer signifikanten Verbesserung der natürlichen Bypassbildung kommt.

Es zeigte sich eine verstärkte Akkumulation von Makrophagen nach MALP-2-Applikation im perivaskulären Gewebe mit einem Maximum am 7. Tag während der Beobachtungszeit. Eine wichtige Rolle von Makrophagen an der Arteriogenese wurde bereits beschrieben [1, 14]. Die von diesen freigesetzten Wachstumsfaktoren und Zytokine – vor allem *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) und CCL2 – könnten dabei maßgeblich an dem verstärkten Kollateralwachstum nach Applikation von MALP-2 beteiligt sein.

Zu den essenziellen Voraussetzungen für das Wachstum von Gefäßen gehört die Proliferation von Endothel- und glatten Muskelzellen [13]. In unseren Experimenten zeigte sich bereits am dritten Tag eine verstärkte Proliferation von Endothelzellen unter dem Einfluss von MALP-2. Am siebten Tag konnte eine erhöhte Mitoseaktivität in den glatten Muskelzellen der Kollateralen beobachtet werden. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass durch MALP-2 aus Endothelzellen freigesetzte Wachstumsfaktoren wie GM-CSF für eine Kapillarneubildung (Angiogenese) verantwortlich sind. Die GM-CSF Freisetzung wird dabei redox-sensitiv reguliert [16]. GM-CSF ist neben seiner Funktion als Regulator der Hämatopoese und Differenzierung von myeloiden Vorläuferzellen zu Granulozyten/Makrophagen bereits als ein Faktor identifiziert worden, der das Kollateralwachstum in Patienten mit koronarer Herzkrankheit günstig beeinflusst [17]. Interessanterweise stellt



**Abb. 3** ▲ Nachweis Ki-67<sup>+</sup>-Zellen nach 3 bzw. 7 Tagen. Die proliferative Aktivität wurde mittels eines Antikörpers gegen Ki-67 (rot), das Endothel gegen CD31 (grün) und Zellkerne (blau) angefärbt und im konfokalen Mikroskop untersucht. Repräsentative Aufnahmen der Endothelproliferation in Ligaturmuskeln der *Mm. Adductores* (a–d). Maßstab: 20 µm. Quantifizierung der proliferierenden Endothelzellen an den Tagen 3 (e) und 7 (f). (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; n. s. nicht signifikant)

speziell das vaskuläre Endothel eine der hauptsächlichen Quellen der GM-CSF-Produktion dar [12].

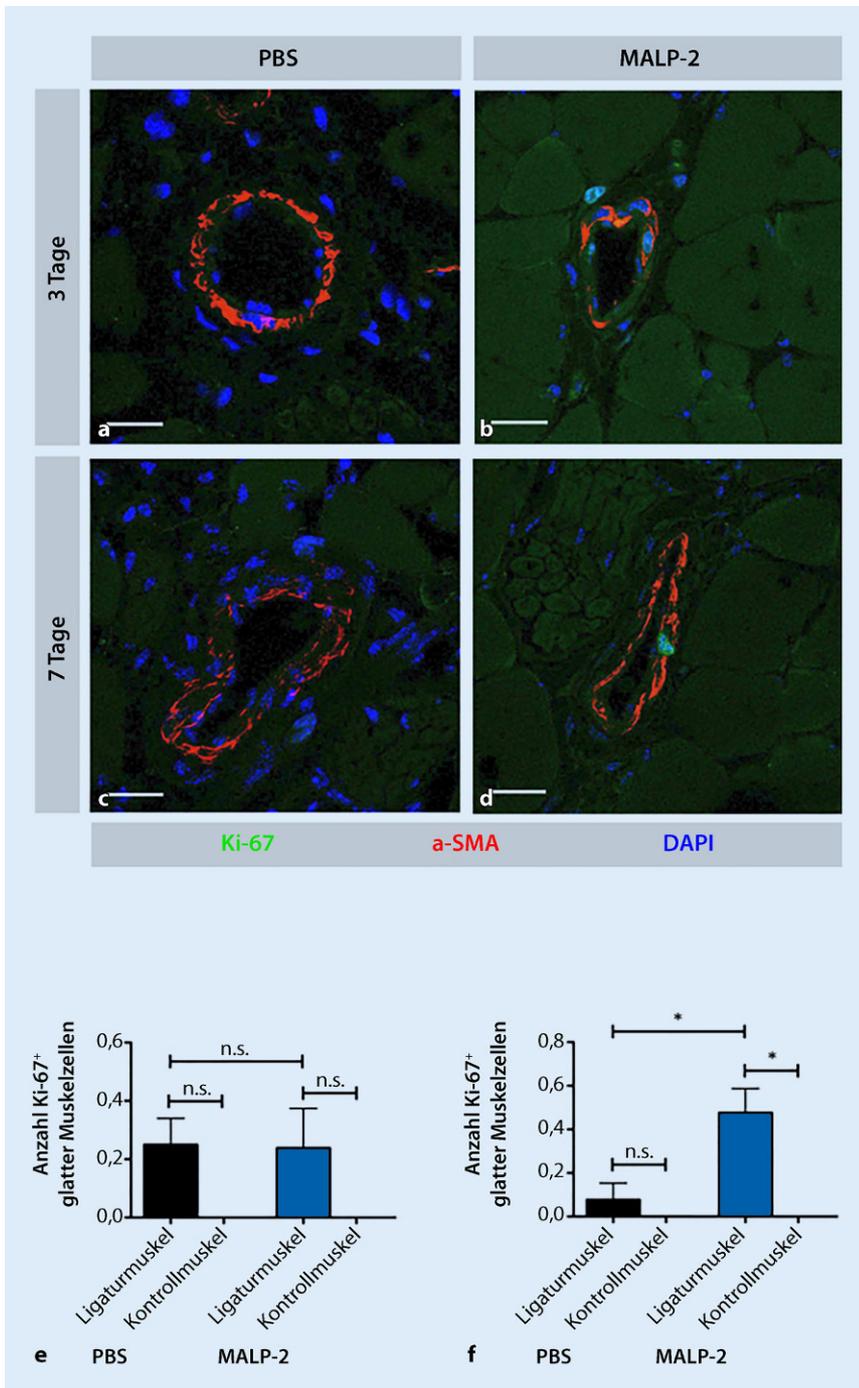
In den ischämischen Arealen der *Mm. gastrocnemii* hat MALP-2 ebenfalls einen verstärkten regenerativen Einfluss. Gegenüber der Kontrollgruppe zeigte sich eine signifikante Zunahme der Kapillarisation. Auch hier konnten wir die bereits dokumentierten positiven Einflüsse von MALP-2 auf die Angiogenese bestätigen [4].

Für unsere Versuche verwendeten wir das etablierte Ligaturmodell der *A. femoralis* von Limbourg et al. [9], um den Verschluss einer großen Arterie zu simulieren. Dabei kommt es zum akuten Verschluss der *A. femoralis* mit plötzlich auftretender Zunahme des *fluid shear stress* in den Kollateralen. Diese Versuchsanordnung unterscheidet sich damit allerdings von den Gegebenheiten, wie sie bei Patienten mit PAVK vorliegen. Bei diesen kommt es zu einem langsamen, progredienten Verschluss der Arterien und damit einhergehend auch nur zu einer langsamen Veränderung der Strömungsverhältnisse in den Kollateralen.

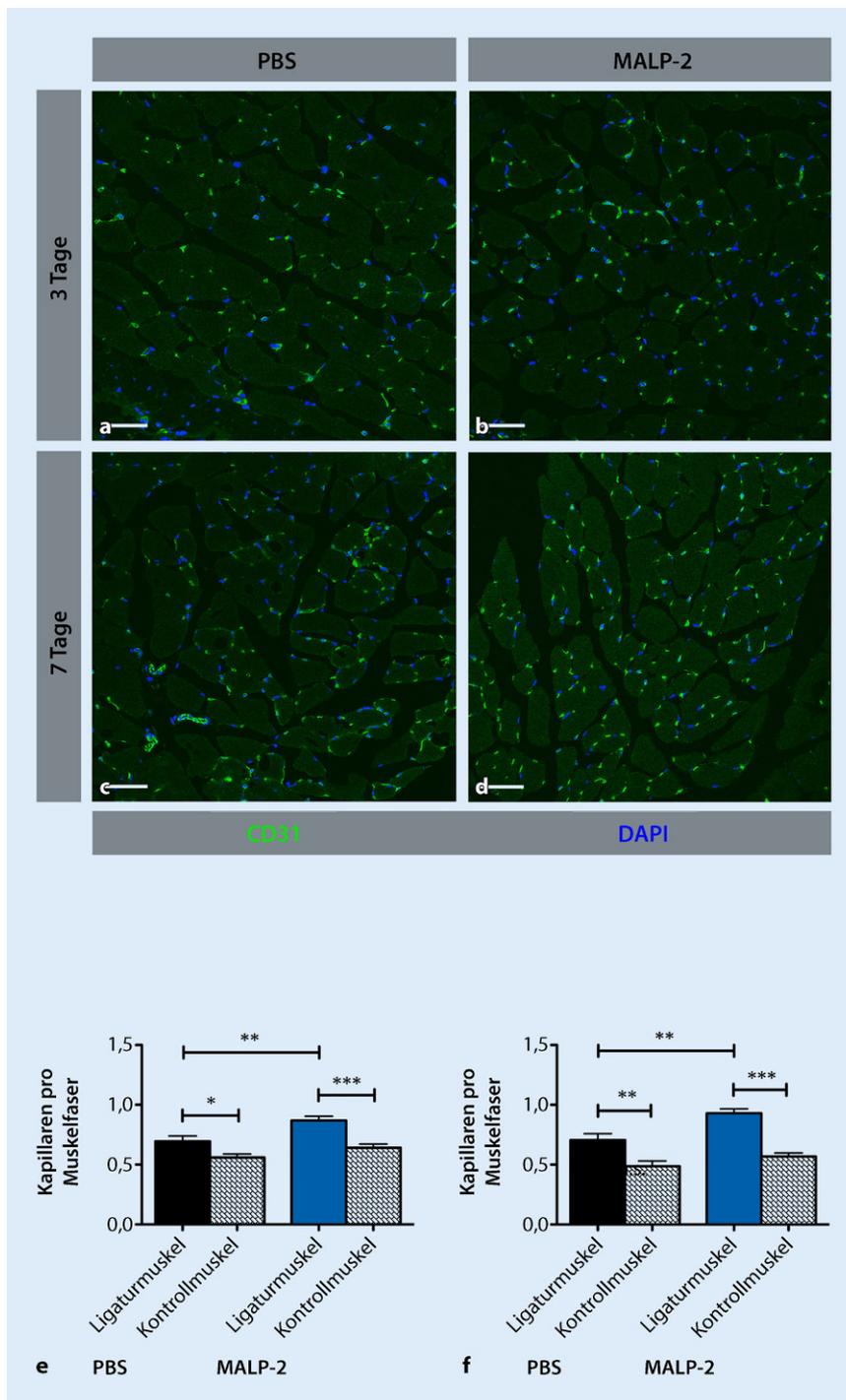
Zur Überprüfung der Validität unserer Methoden haben wir auch die entsprechenden Muskeln der kontralateralen, unoperierten Seite als Kontrollmuskel untersucht. Im Vergleich von operierter zu unoperierter Seite lassen sich signifikante Veränderungen feststellen, die belegen, dass unser Versuchsaufbau zu einer prinzipiellen Arteriogeneseinduktion führt.

Aktuell verwendeten wir Mäuse des Stammes BALB/c, da diese gegenüber anderen Tierstämmen eine schlechtere Regeneration bzw. Ausbildung von Kollateralen aufweisen [8, 15]. Um die Verhältnisse der meist metabolisch und vaskulär vorbelasteten Patienten in weiteren Versuchen besser abbilden zu können, erscheint die Verwendung von einem hypercholesterinämischen Tiermodell (z. B. ApoE-KO-Tiere nach einer High-Fat-Diät) sinnvoll.

Insgesamt betrachtet erscheint der TLR2/6-Ligand MALP-2 ein vielversprechender Ansatz für weitere Untersuchungen im Bereich der Arteriogeneseforschung zur Verbesserung arteriosklerotischer Stenosen zu sein.



**Abb. 4** ▲ Nachweis von Ki-67<sup>+</sup>-Zellen nach 3 bzw. 7 Tagen. Die proliferative Aktivität wurde mittels eines Antikörpers gegen Ki-67 (*grün*), die Gefäße mittels Aktin der glatten Gefäßmuskulatur (*a-SMA, rot*) und Zellkerne (*blau*) angefärbt und im konfokalen Mikroskop untersucht. Repräsentative Aufnahmen der Proliferation glatter Muskelzellen in Ligaturmuskeln der *Mm. adductores* (a–d). Maßstab: 20 µm  
Quantifizierung der proliferierenden Muskelzellen an den Tagen 3 (e) und 7 (f). (\**p* < 0,05; n. s. nicht signifikant)



**Abb. 5** ▲ Angiogenese der *Mm. gastrocnemii* nach Ligatur der *A. femoralis*. Die Kapillaren wurden mittels eines Antikörpers gegen den Endothelmarker CD31 (grün) und die Zellkerne mittels DAPI (blau) angefärbt und im konfokalen Mikroskop untersucht. Repräsentative Aufnahmen der Angiogenese im Ligaturmuskel (a–d). Maßstab: 50 µm. Dargestellt ist die Anzahl der Kapillaren im Verhältnis zu den Muskelfasern der *Mm. gastrocnemii* an den Tagen 3 (e) und 7 (f). (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ )

## Fazit für die Praxis

- Im experimentellen Modell in Mäusen fördert die Applikation von MALP-2 das Wachstum der Kollaterale Gefäße.
- Es steigert die Proliferation von Endothel- und glatten Muskelzellen und begünstigt die Migration von Makrophagen in das perivaskuläre Gewebe.
- MALP-2 erscheint als neue, vielversprechende Substanz für die Arteriogenese.

## Korrespondenzadresse



### Dr. K. Troidl

Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung  
Ludwigstr. 43, 61231 Bad Nauheim, Deutschland  
kerstin.troidl@mpi-bn.mpg.de

**Förderung.** Diese Studie wurde durch die Anna-Maria und Uwe Karsten Kühl-Stiftung gefördert (T188/30462/2017).

**Funding.** Open access funding provided by Max Planck Society.

## Einhaltung ethischer Richtlinien

**Interessenkonflikt.** C. Schubert, A.-K. Vlacil, T. Schmitz-Rixen, K. Grote und K. Troidl geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Die durchgeführten Tierversuche stehen in Einklang mit den geltenden Gesetzen (TierSchG § 8 Abs. 1) und sind vom Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt (Nr. V54-19c20/15-B2/1152). Für die aufgeführten Studien gelten die jeweils dort angegebenen ethischen Richtlinien.

**Open Access** Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>) veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden.

## Literatur

1. Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J et al (1998) Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest* 101(1):40–50
2. Eitenmüller I, Volger O, Kluge A, Troidl K, Barancik M et al (2006) The range of adaptation by collateral

- vessels after femoral artery occlusion. *Circ Res* 99(6):656–662
3. Grote K, Petri M, Liu C, Jehn P, Spalthoff S et al (2013) Toll-like receptor 2/6-dependent stimulation of mesenchymal stem cells promotes angiogenesis by paracrine factors. *Eur Cell Mater* 26:66–79
  4. Grote K, Schuett H, Salguero G, Grothusen C, Jagielska J et al (2010) Toll-like receptor 2/6 stimulation promotes angiogenesis via GM-CSF as a potential strategy for immune defense and tissue regeneration. *Blood* 115(12):2543–2552
  5. Grote K, Schütt H, Schieffer B (2013) Toll-like receptor-linked signal transduction in angiogenesis. In: Mehta JL, Dhalla NS (Hrsg) *Biochemical basis and therapeutic implications of angiogenesis*. Springer, New York, NY, S 139–157
  6. Grote K, Schütt H, Schieffer B (2011) Toll-like receptors in angiogenesis. *ScientificWorldJournal* 11:981–991
  7. Grote K, Sonnenschein K, Kapopara PR, Hillmer A, Grothusen C et al (2013) Toll-like receptor 2/6 agonist macrophage-activating lipopeptide-2 promotes reendothelialization and inhibits neointima formation after vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33(9):2097–2104
  8. Helisch A, Wagner S, Khan N, Drinane M, Wolfram S et al (2006) Impact of mouse strain differences in innate hindlimb collateral vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(3):520–526
  9. Limbourg A, Korff T, Napp LC, Schaper W, Drexler H et al (2009) Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia. *Nat Protoc* 4(12):1737–1746
  10. Mühlradt PF, Kiess M, Meyer H, Süßmuth R, Jung G (1997) Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from *Mycoplasma fermentans* acting at picomolar concentration. *J Exp Med* 185(11):1951–1958
  11. Pipp F, Boehm S, Cai W-J, Adili F, Ziegler B et al (2004) Elevated fluid shear stress enhances postocclusive collateral artery growth and gene expression in the pig hind limb. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(9):1664–1668
  12. Quesenberry PJ, Gimbrone MA (1980) Vascular endothelium as a regulator of granulopoiesis. Production of colony-stimulating activity by cultured human endothelial cells. *Blood* 56(6):1060–1067
  13. van Royen N, Piek JJ, Buschmann I, Hoefler I, Voskuil M et al (2001) Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. *Cardiovasc Res* 49(3):543–553
  14. Schaper J, König R, Franz D, Schaper W (1976) The endothelial surface of growing coronary collateral arteries. Intimal margination and diapedesis of monocytes. A combined SEM and TEM study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 370(3):193–205
  15. Scholz D, Ziegelhoeffer T, Helisch A, Wagner S, Friedrich C et al (2002) Contribution of arteriogenesis and angiogenesis to postocclusive hindlimb perfusion in mice. *J Mol Cell Cardiol* 34(7):775–787
  16. Schuett J, Schuett H, Oberoi R, Koch A-K, Pretzer S et al (2017) NADPH oxidase NOX2 mediates TLR2/6-dependent release of GM-CSF from endothelial cells. *FASEB J* 31(6):2612–2624
  17. Seiler C, Pohl T, Wustmann K, Hutter D, Nicolet PA et al (2001) Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease. A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Circulation* 104(17):2012–2017
  18. Seiler C, Stoller M, Pitt B, Meier P (2013) The human coronary collateral circulation. Development and clinical importance. *Eur Heart J* 34(34):2674–2682
  19. Shireman PK (2007) The chemokine system in arteriogenesis and hind limb ischemia. *J Vasc Surg* 45(A):A48–56
  20. Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K, Kawai T, Hoshino K et al (2000) Cutting edge. Preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasma lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol* 164(2):554–557
  21. Takeuchi O, Kawai T, Mühlradt PF, Morr M, Radolf JD et al (2001) Discrimination of bacterial lipoproteins by toll-like receptor 6. *Int Immunol* 13(7):933–940

## Intrathorakale Fisteln



Fisteln können auf der Basis von akuten oder chronischen Entzündungen oder durch mechanische Einwirkung entstehen. In vie-

len Fällen ist sowohl bei akuten als auch bei chronischen Fisteln eine Intervention oder Operation unumgänglich, um deren endgültigen Verschluss herbeizuführen. Thorakale Fisteln sind fast ausschließlich innere Fisteln, also eine pathologische Verbindung zwischen zwei thorakalen Hohlorganen, wie z.B. Trachea/Bronchien, Lunge, Pleura, Oesophagus oder auch dem Gefäßsystem. Das Leitthema in *Der Chirurg* 09/2019 spiegelt die exzellente Expertise der Autoren in Diagnostik und Behandlung dieser Krankheitsbilder und bietet Ihnen einen Einblick in die teilweise schwierige und individualisierte Therapie.

- Interventionelle Versorgung tracheo-/bronchopleuraler Fisteln
- Chirurgische Versorgung tracheo-/bronchopleuraler Fisteln nach bronchoplastischer Resektion
- Interventionelle Versorgung tracheo-/bronchoösophagealer Fisteln
- Chirurgische Versorgung von ösophagotrachealer und -bronchialer Fisteln
- Chirurgische Versorgung tracheoarterieller Fisteln

### Suchen Sie noch mehr zum Thema?

Mit e.Med – den maßgeschneiderten Fortbildungsabos von Springer Medizin – haben Sie Zugriff auf alle Inhalte von SpringerMedizin.de. Sie können schnell und komfortabel in den für Sie relevanten Zeitschriften recherchieren und auf alle Inhalte im Volltext zugreifen.

**Weitere Infos zu e.Med finden Sie auf [springermedizin.de](http://springermedizin.de) unter „Abos“**