

Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Malte Kelm

**Geweberegeneration nach Hinterlaufischämie im Mausmodell:
Analyse und Methodenetablierung**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Michael Nießen

2016

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr.med Joachim Windolf

Referent: Univ.-Prof. Dr.med.Tienush Rassaf

Korreferent:Prof. Dr.med. Ralf Kubitz

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Hendgen-Cotta U, Luedike P, Totzeck M, Kropp M, Schicho A, Stock P, Rammos C, Niessen M, Heiss C, Lundberg JO, Weitzber E, Kelm M, Rassaf T.

Dietary nitrate supplementation improves revascularization in chronic ischemia.

Circulation. 2012; 126:1983-1993.

Abkürzungsverzeichnis

ABI/ABPI	ankle brachial index/ankle brachial pressure index
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
AP	alkalische Phosphotase (E.C: 3.1.3.1)
ATP	Adenosintriphosphat
BALB/c	BALB/c-Mäusestamm
C57BL/6C	57 black 6-Mäusestamm
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CLD	Chemilumineszenzdetektor
COX-2	Cyclooxygenase 2 (E.C: 1.14.99.1)
cPTIO	carboxy 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl 3-oxid
CT	Computertomographie
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DSA	digitale Subtraktionsangiographie
EC	endotheliale Zelle (<i>endothelial cell</i>)
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
eNOS	endotheliale NO-Synthase (E.C: 1.14.13.39)
ECFC	<i>endothelial cells with colony-forming cell ability</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPC	endotheliale Vorläuferzelle (<i>endothelial progenitor cell</i>)
EPO	Erythropoetin
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
FasL	Fas-Ligand
FGF-2	<i>fibroblast growth factor-2</i>
FKS	fetales Kälberserum
FSC	<i>forward scatter</i>
FSS	<i>fluid shear stress</i>
G6PDH	<i>glucose-6-phosphate dehydrogenase</i> (E.C: 1.1.1.49)
g	Erdbeschleunigung (9,80665 m/s ²)
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GOX	Glucoseoxidase (E.C: 1.1.3.4)
HIF-1	<i>hypoxia-inducible factor 1</i>
HRP	Meerrettichperoxidase (E.C: 1.11.1.7)
HS	<i>horse serum</i>
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
ICAM-2	<i>intercellular adhesion molecule 2</i>
IGF-1	<i>insulin-like growth factor 1</i>
iNOS	<i>inducible NO synthase</i> (E.C: 1.14.13.39)
i.p.	intraperitoneal
LDPI	<i>laser doppler perfusion imaging</i>
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>

MAC-1	<i>macrophage-1 antigen</i>
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein-1</i>
mFasL	membranständiger Fas-Ligand
MMP	Matrix-Metallo-Proteinasen
MRT	Magnetresonanztomographie
NADPH	<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NEM	N-Ethylmaleimide
NMRI-Stamm	Naval Medical Research Institute-Stamm
nNOS	<i>neuronal NO synthase (E.C: 1.14.13.39)</i>
NO	<i>nitric oxide</i>
NO ₂ ⁻	Nitritanion
NO ₃ ⁻	Nitratanion
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
p.i.	<i>per inhalationem</i>
PU	<i>perfusion unit</i>
ppb	<i>parts per billion</i>
s.c.	subcutan
RNNO	<i>nitroso species like N-nitrosamines</i>
ROI	<i>region of interest</i>
RT	Raumtemperatur
RXNO	<i>plasma nitrosylated species</i>
sFasL	<i>soluble Fas-ligand</i>
SSC	<i>side scatter</i>
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGF-A	<i>vascular endothelial growth factor A</i>
VGEFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
vWF	von Willebrand-Faktor
WST-8	2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
°C	Grad Celsius

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK).....	1
1.1.1 Definition der pAVK.....	1
1.2 Das Hinterlaufmodell in der Maus	1
1.3 Stickstoffmonoxid und Nitrat	4
1.3.1 Stickstoffmonoxid.....	4
1.3.2 Metabolismus des Stickstoffmonoxids.....	5
1.3.3 Nitrat.....	7
1.3.4 Zytoprotektivität von Stickstoffmonoxid.....	9
1.4 Skelettmuskulatur.....	10
1.5 Apoptose und Fas/Fas-Ligand (FasL).....	11
1.5.1 Apoptose durch den Fas/Fas-Ligand-Signalweg.....	11
1.5.2 Apoptosehemmung durch den löslichen Fas-Liganden	13
1.6 Vaskularisierung.....	14
1.7 Ziele der Arbeit.....	15
2 Methoden.....	16
2.1 Tierexperimentelle Methoden.....	16
2.1.1 Tiermodell und Gabe von Nitrat.....	16
2.1.1.1 Versuchstiere.....	16
2.1.1.2 Operationstechnik.....	16
2.1.1.3 Supplementierung von Nitrat zum Trinkwasser.....	18
2.1.2 Laserdopplerflussmessung (<i>laser doppler perfusion imaging</i>)....	19
2.1.2.1 Etablierung der Laserdopplerflussmessung.....	19
2.1.2.2 Messprinzip.....	20
2.2 <i>in vitro</i> -Versuchsansätze.....	21
2.2.1 Isolation von Myoblasten	21
2.2.1.1 Protokolloptimierung der Myoblastenisolation.....	22
2.2.1.2 Isolation der Myoblasten aus dem Hinterlauf	23
2.2.1.3 Zellzahlbestimmung mittels Zählkammer.....	24
2.2.1.4 Charakterisierung der Myoblasten	25
2.2.2 Zytologische Assays.....	28
2.2.2.1 Apoptoseassay: TUNEL-Assay.....	28
2.2.2.2 Vitalitätsassay: WST-8-Assay.....	29
2.2.3 Immunologische Assays: sFasL in plättchenarmem Plasma	30
2.2.4 Chemilumineszenzanalyse von Nitrit und Nitrat	32
2.2.4.1 Probenaufbereitung.....	33
2.2.4.2 Bestimmung von Nitrat und Nitrit mittels Chemilumineszenzanalyse.....	34
2.2.4.3 Bestimmung von NO-Häm, Nitrat und Nitrit aus Gewebehomogenat der Hinterlaufmuskulatur.....	35
2.3 Statistik.....	35
2.4 Materialien.....	36
3 Ergebnisse.....	39
3.1 Hinterlaufmodell und Laserdopplerflussmessung	39
3.1.1 Etablierung des Hinterlaufmodells.....	39
3.1.2 Perfusion des Hinterlaufs, präoperativ und im postoperativen Verlauf.....	49

3.2 Isolation von Myoblasten.....	51
3.2.1 Etablierung der Myoblastenisolation.....	51
3.2.2 Charakterisierung der isolierten Myoblasten	53
3.3 Apoptose und Vitalitätsassays.....	56
3.3.1 Apoptoserate der Myoblasten im Hinterlauf.....	56
3.3.2 Vitalität der Myoblasten aus dem Hinterlauf.....	59
3.4 sFasL-Bestimmung.....	60
3.4.1 sFasL in plättchenarmem Plasma	60
3.5 Nitrat und Nitrit im Gewebe des Hinterlaufs	61
4 Diskussion.....	63
4.1 Etablierung des Hinterlaufmodells.....	64
4.1.1 Operation und Laserdopplerflussmessung.....	64
4.1.2 Isolation der Myoblasten.....	65
4.2 Einfluss von Nitrat auf die Regeneration der Perfusion bei chronischer Ischämie.....	66
4.3 Analyse von Apoptose und Vitalität in Myoblasten nach Gabe von Nitrat	69
4.4 Analyse des sFas-Liganden bei chronischer Ischämie nach Gabe von Nitrat.....	71
5 Zusammenfassung.....	73
6 Literaturverzeichnis.....	75
7 Danksagung.....	85
8 Lebenslauf	86
9 Eidesstattliche Versicherung.....	88

1 Einleitung

1.1 Periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK)

1.1.1 Definition der pAVK

Bei der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) handelt es sich um eine Verengung (Stenose) bzw. einen Verschluss (Okklusion) vor allem der Arterien der Extremitäten oder der Aorta mit konsekutiver Minderperfusion. Häufig sind hiervon insbesondere die unteren Extremitäten betroffen. Mit einer Gesamtprävalenz von zwischen 3-10 % in den Industrieländern stellt sie eine vergleichsweise häufige Erkrankung dar, die vor allem in höherem Lebensalter auftritt. Bei isolierter Betrachtung der über 70-Jährigen ist daher sogar eine Prävalenz von 15-20 %¹ festzustellen. Daraus ergibt sich nicht nur eine hohe Anzahl an Erkrankten, sondern auch an durch Komplikationen im Krankheitsverlauf hervorgerufenen Behinderungen (z. B. Wundheilungsstörungen, Amputationen). Die ökonomischen Folgen dieser Erkrankung wie z. B. Arbeitsausfall, Pflegekosten oder Behandlungskosten der Komplikationen stellen insofern ein gesellschaftliches Problem dar.

1.2 Das Hinterlaufmodell in der Maus

Das Hinterlaufmodell von Couffinhals et al.² wurde 1998 zur Analyse von Extremitätenischämie und Gefäßneubildung beschrieben. In dieser Form stellt es eine Weiterentwicklung vorheriger Ischämie Modelle (wie z. B. das Modell nach Unthank³) dar. Bei Couffinhals Modell erfolgt die Induktion der Ischämie durch Resektion eines Teils der Arteria femoralis im Hinterlauf einer Maus sowie durch eine Messung der Perfusion des Beines vor und nach der OP mittels der Laserdopplerflussmessung. Die Resektion der Arteria femoralis wurde bereits bei vorherigen Tiermodellen beschrieben, allerdings erfolgte die Messung der Perfusion dabei unter Anwendung anderer Verfahren wie der seriellen Angiographie anstelle der in Couffinhals Modell angewandten Laserdopplerflussmessung. In alternativen Modellen wurde die Induktion der Ischämie z. B. durch reine Ligatur der Arteria femoralis oder durch Ballonokklusion

des Gefäßes durchgeführt. Die vollständige Resektion eines Teil der Arteria femoralis stellt sicher, dass die Regeneration nicht durch Rekanalisation des Gefäßes oder durch kurzstreckige Kollateralen erfolgen kann. Neben Mäusen wurden auch andere Spezies als Versuchsmodelle für pAVK-Modell verwendet, darunter z. B. Kaninchen oder Ratten^{4 5}. Die Vorteile des (auch im Modell Couffinhals vorgesehenen) Einsatzes der Maus als Versuchstier liegen in der geringen Größe derselben (niedrige Haltungskosten) und der guten sowie kostengünstigen Verfügbarkeit auch von transgenen Tieren. Bei Entscheidung für Mäuse als Versuchstiere wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen auch die Möglichkeit, Knockout-Tiere zu verwenden, genutzt^{4 6 7}.

Beim Hinterlaufmodell erfolgt der Ausfall der Perfusion durch die Resektion akut und nicht wie bei der Mehrheit (ca. 95 %) ¹ der klinischen Fälle der pAVK durch Arteriosklerose.

Trotz dieser Einschränkung erlaubt das Hinterlaufmodell die Untersuchung verschiedener Einflussfaktoren auf das Ausmaß der Schädigung durch Ischämie und auf die Regeneration durch entsprechende Anpassung des Versuchs. Zudem besteht die Möglichkeit, mithilfe dieses Modells therapeutische Optionen zu testen.

Das Hinterlaufmodell weist mehrere Probleme auf, die bei der Etablierung der Methode berücksichtigt werden müssen. So wurde es ursprünglich mit C57BL/6-Mäusen etabliert. Später wurde das Verfahren auf andere Mausstämmen übertragen, wie z. B. auf den Stamm Balb/C⁸. Zwischen den verschiedenen Mausstämmen sind deutliche Unterschiede in Bezug auf den Verlauf der Regeneration der Perfusion⁹ festzustellen. So ist z. B. die Regeneration der Perfusion bei C57BL/6 besser als bei Balb/C (siehe Abbildung 1). Genauso beeinflusst das Alter der Tiere die Regenerationsfähigkeit¹⁰ der Perfusion, wobei bei jüngeren Tieren eine bessere Regeneration festgestellt werden kann.

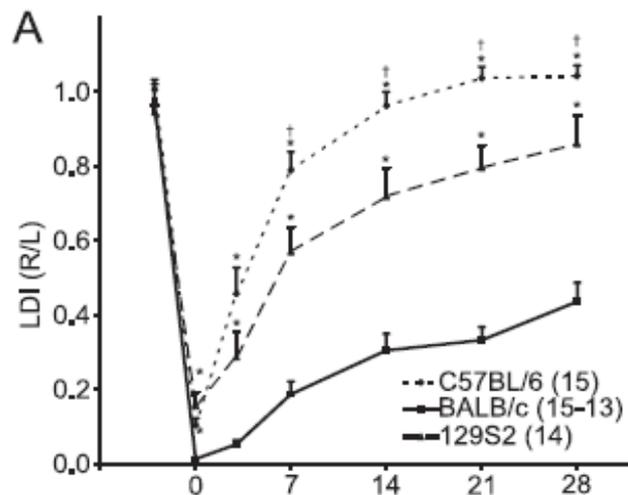


Abb. 1: Unterschiede in der Regeneration der Perfusion abhängig vom Mausstamm⁹

Dargestellt wird das Verhältnis der Perfusion zwischen dem ischämischen und dem nicht ischämischen Bein (y-Achse: Quotient in der Laserdopplermessung), sowohl unmittelbar postoperativ als auch im Verlauf (x-Achse: Tage nach der Operation). Bei ansonsten gleicher Behandlung erweist sich der jeweilige Mausstamm der Versuchstiere hierbei als ein wichtiger Einflussfaktor. Vor allem im Verlauf zeigt sich z. B. ein deutlicher Unterschied zwischen C57BL/6- und BALB/c-Stämmen (aus Helisch et al.⁹).

Neben der Auswahl der Versuchstiere führen auch unterschiedliche Formen der Positionierung und Fixierung der Tiere (z. B. ein Abknicken der Beine) während der Messung zu abweichenden Messwerten. Ebenso scheinen die Raumtemperatur, die Dauer der Messung, die Auswahl des Messbereichs und die individuelle Behaarung der Maus die Ergebnisse zu beeinflussen. Das Verfahren ist zudem stark vom Untersucher abhängig, worin ebenfalls mögliche Störfaktoren begründet liegen.

Alle hier genannten Faktoren erschweren die Verwendung des Modells ohne vorherige gründliche Etablierung. Deswegen ist eine solche vor der Verwendung dieses Modells unumgänglich, da sonst der Effekt der jeweiligen Versuchsbedingungen nicht eindeutig von Messfehlern unterschieden werden kann. Zudem ist eine Reproduzierbarkeit der Versuche ansonsten nicht gewährleistet.

1.3 Stickstoffmonoxid und Nitrat

1.3.1 Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein wichtiger Botenstoff, insbesondere im vaskulären System (beschrieben als *endothelium-derived relaxing factor* durch Ignarro et al.¹¹ und Furchgott et al.¹²). Es führt zu einer Relaxation der glatten Muskulatur der Gefäßwand¹³. Hierdurch wird eine Vasodilatation bewirkt. Diese Wirkung erfolgt über die Beeinflussung der Guanylat-Cyclase¹⁴ und der daraus folgenden Umwandlung von Guanosintrisphosphat zu cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) in den Leiomyozyten der Gefäßwand^{15 16}. NO-Donoren (z. B. Nitroglyzerin) werden in der Klinik schon lange wegen ihrer gefäßerweiternden Wirkung verwendet. Ein alternativer Ansatz zur Beeinflussung dieses Mechanismus ist die Hemmung des Abbaus von cGMP, z. B. durch Hemmung der Phosphodiesterase 5 durch Sildenafil. Die Sekretion von NO aus dem Gefäßendothel ist abhängig von funktionsfähigen Endothelzellen, sodass die Sekretion von NO als Marker für den Zustand des Endothels verwendet wird^{17 18}. Das Endothel hat eine Vielzahl von Funktionen. Zu diesen gehört u.a. die Hemmung der Thrombozytenaggregation, der Antioxidation, der Entzündungshemmung, der Proliferation und der Migration von Leiomyozyten¹⁷. Bei atherosklerotisch veränderten Gefäßen spielt die Störung mehrerer dieser Funktionen eine wichtige Rolle. Der akute Verschluss eines solchen Gefäßes z. B. durch Thromben wird durch die endotheliale Dysfunktion gefördert¹⁶. Die Reparatur und die Neubildung von Gefäßen scheinen von NO ebenfalls positiv beeinflusst zu werden^{19 4}. Scherstress fördert die NO-Produktion durch Aktivierung der eNOS^{16 20}.

Über die Beeinflussung der Gefäßmuskulatur spielt NO eine wichtige Rolle bei der Regulation des Blutdrucks. Neben seiner Wirkung im Gefäßsystem zeigt Stickstoffmonoxid noch weitere endokrine und parakrine Effekte, etwa als Neurotransmitter oder als Teil der Immunabwehr²¹. Allerdings wird NO in Reaktionen mit Hämoglobin, Myoglobin und freien Radikalen sehr schnell metabolisiert, sodass es selbst nur eine sehr kurze Halbwertszeit hat²². Genauso ist der Transport von NO in nicht gebundener Form im Gefäßsystem aus diesem

Grund stark eingeschränkt. Somit spielt der lokale Metabolismus von NO eine besondere Rolle für diese Prozesse.

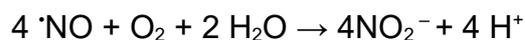
1.3.2 Metabolismus des Stickstoffmonoxids

Für Stickstoffmonoxid sind verschiedene Synthesewege bekannt. Der klassische Syntheseweg erfolgt enzymatisch unter aeroben Bedingungen: Aus L-Arginin wird durch die verschiedenen Isoformen der NO-Synthase (endotheliale konstitutive NOS, neuronale konstitutive NOS und induzierbare NOS) NO synthetisiert. Als Nebenprodukt entsteht dabei L-Citrullin²³. Das L-Arginin für diese Reaktion entstammt entweder der körpereigenen Produktion (Harnstoffzyklus) oder ist alimentären Ursprungs. Der klassische Syntheseweg (L-Arginin zu L-Citrullin) ist von Kofaktoren (vor allem molekularem Sauerstoff) abhängig¹³.

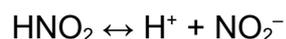
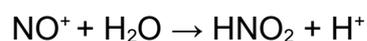
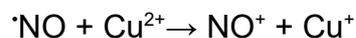
Das oxidative Abbauprodukt von NO ist Nitrit, weswegen Nitrit lange nur als inertes Endprodukt gesehen wurde^{13 24}. Als Katalysator dieser Reaktion dient Ceruloplasmin im Plasma¹³. Ein Mangel an Ceruloplasmin führt damit auch zu einem verminderten Nitritspiegel im Blut¹³. Auch eNOS-defiziente Mäuse weisen reduzierte Nitritspiegel im Blut auf¹³.

Die Bildung von Nitrit erfolgt hierbei über folgende Reaktionen:

Autoxidation von NO¹³:



mit Ceruloplasmin als Kofaktor¹³:



NO kann nicht nur zu Nitrit oxidiert, sondern außerdem auch weiter zu einem Nitrosylanion (NO⁻) reduziert oder zu einem Nitrosoniumion (NO⁺) oxidiert werden. Im Gefäßsystem kann es überdies zu stabilen Verbindungen mit Thiolgruppen (z. B. Albumin), zu S-Nitrosothiolen (RSNO) oder mit Amingruppen zu Nitrosaminen

(RNNO) reagieren. Zumindest aus RSNO kann das NO unter bestimmten Umständen wieder freigesetzt werden²⁵. Die genaue Rolle sowohl der RSNOs als auch der RNNOs ist allerdings noch nicht vollständig geklärt und daher Gegenstand weiterer Forschung.

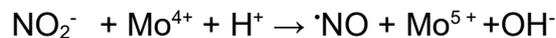
Neben der Synthese von NO spielen auch die Bindung von NO an Hämoglobin bei Normoxie und die Freisetzung bei Hypoxie eine Rolle für die Regulation des NO-Stoffwechsels^{26 27}.

Die Reaktion von NO mit Oxyhämoglobin führt zur Bildung von Nitrat und Methämoglobin¹³. Nitrit kann ebenfalls weiter zu Nitrat oxidieren.

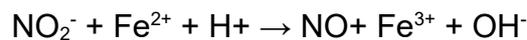
Die NOS-abhängige NO-Synthese benötigt molekularen Sauerstoff als Kofaktor, sodass dieser Reaktionsweg unter hypoxischen Bedingungen nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Unter hypoxischen Bedingungen erfolgt die NO-Synthese vermehrt aus Nitrit. Damit ist Nitrit nicht Endprodukt des NO-Metabolismus, sondern muss vielmehr als Reserveform gesehen werden^{28 29}. Die NO-Synthese aus Nitrit kann hier durch die Xanthin-Oxidoreduktase¹³ oder durch Deoxyhämoglobin/Myoglobin¹³ erfolgen. Die zugehörigen Mechanismen sind die folgenden:

NO-Synthese aus Nitrit durch die Xanthin-Oxidoreduktase¹³:

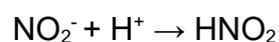


NO-Synthese aus Nitrit durch Deoxyhämoglobin/Myoglobin²⁸:



Diese Reaktionen können im Blut sowie im Gewebe auch unter hypoxischen Bedingungen erfolgen.

Ebenso ist auch eine NO-Synthese aus Nitrit im aziden Milieu, z. B. im Magen, durch folgenden Mechanismus möglich:



Bei dieser Reaktion entstehen allerdings neben NO auch andere Stickstoffoxide wie z. B. Stickstoffdioxid¹³. Die NO-Synthese unter aziden Bedingungen wird durch Vitamin C und Polyphenole gefördert¹³, während die Entstehung von Stickstoffdioxid gleichzeitig abnimmt.

1.3.3 Nitrat

Anorganisches Nitrat wurde lange als potentiell krebserregende Substanz negativ bewertet. Über die Zwischenstufe des Nitrits stellt es allerdings ebenfalls eine mögliche NO-Quelle dar. Hier ist gerade die Rolle oral aufgenommenen anorganischen Nitrats (im Gegensatz zu der bekannten Rolle von organischen Nitraten als Medikamente) beachtenswert, da es für den Organismus die Hauptquelle von Nitrat darstellt^{30 13}.

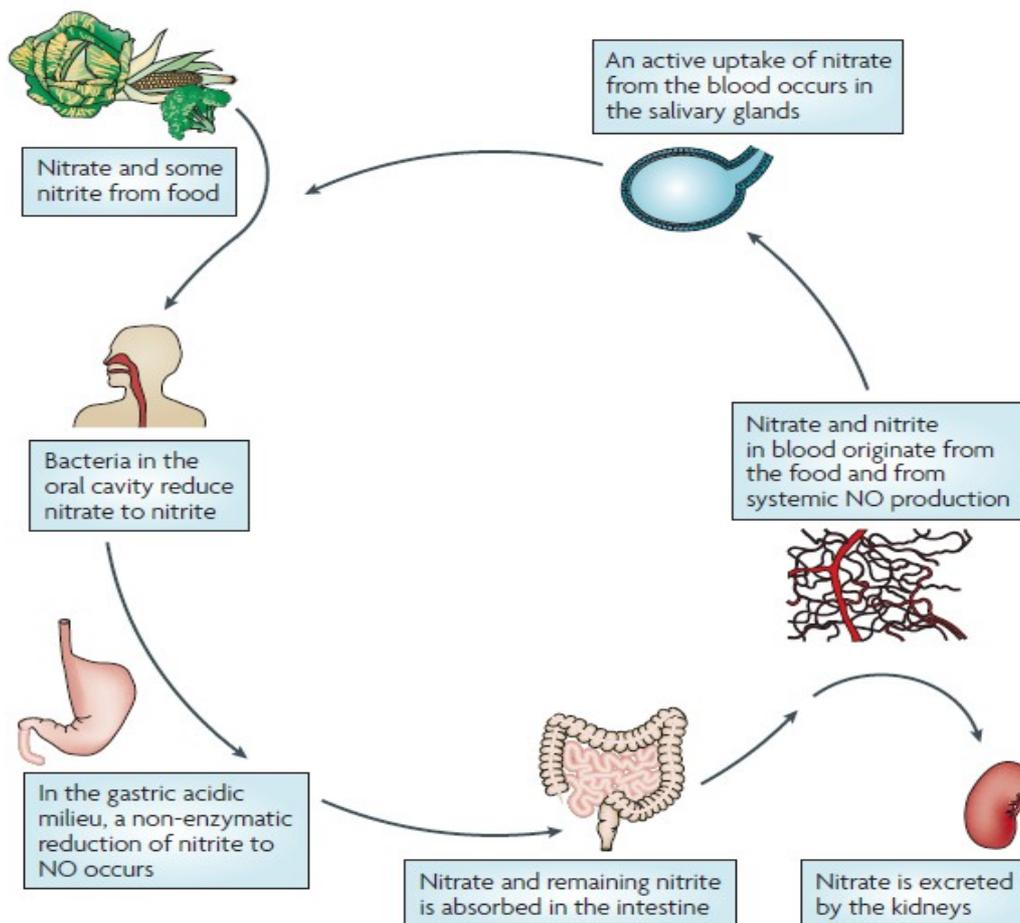
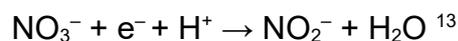


Abb. 2: Darstellung des Nitratmetabolismus (aus Lundberg¹³). Nach oraler Aufnahme anorganischen Nitrats erfolgen die Resorption im Darm und der Übergang in den Blutkreislauf. Nitrat wird teils über die Nieren ausgeschieden, teils aktiv über die Speicheldrüsen sekretiert. In der Mundhöhle erfolgt durch Bakterien die Reduktion zu Nitrit. Im aziden Milieu erfolgt die Reduktion zu NO.

Nach der oralen Aufnahme von Nitrat (z. B. über nitrathaltige Nahrung wie Spinat) erfolgt primär eine Resorption desselben aus dem Darm in den Blutkreislauf (siehe Abbildung 2). Dies führt zu einer schnellen und andauernden Erhöhung des Nitratspiegels im Blut¹³. Ein Teil des Nitrats wird über die Nieren wieder ausgeschieden. Über den Blutkreislauf erreicht sowohl das oral aufgenommene als auch das im Metabolismus produzierte Nitrat die Speicheldrüsen. Hier erfolgt eine konzentrierte Ausscheidung des Nitrats in den Speichel, der in die Mundhöhle abgegeben wird. Die hier residenten Bakterien verfügen über das Enzym Nitratreduktase, das die Umwandlung von Nitrat zu Nitrit katalysiert³⁰. Der zugehörige Mechanismus gestaltet sich wie folgt:



Somit besteht eine Abhängigkeit der Umwandlung von Nitrat zu Nitrit von den Bakterien der Mundflora. Das hier entstandene Nitrit kann entweder im aziden Milieu des Magens weiter zu NO reagieren oder als Nitrit in den Blutkreislauf aufgenommen werden. Hier steht dieses Nitrit dann wieder als Ausgangspunkt für die NO-Synthese über Xanthin-Oxidoreduktase bzw. Deoxyhaemoglobin/Myoglobin zur Verfügung (siehe Kapitel 1.3.2)¹³.

Ebenso ist eine Reaktion des Nitrits zurück zu Nitrat möglich, das dann wieder mit dem verbliebenen Nitrat in den oben beschriebenen Kreislauf zurückkehren kann. NO kann ebenfalls mit Oxyhaemoglobin zu Nitrat reagieren (siehe Kapitel 1.3.2). Zudem kann das Nitrat über die Niere sekretiert werden.

Nitrat stellt somit insbesondere unter ischämischen Bedingungen eine relevante Quelle für NO dar. Hierbei ist die Toxizität von Nitrat deutlich geringer als die von Nitrit, sodass die orale Gabe von Nitrat eine Möglichkeit ist³¹, die zur Verfügung stehende NO-Menge zu erhöhen. Damit das Nitrat seine Wirksamkeit entfalten

kann, wird allerdings auch eine höhere Dosis benötigt, da ein Großteil des Nitrats ungenutzt ausgeschieden wird³². Im Unterschied zu organischen Nitraten scheint das anorganische Nitrat nicht zu einer Toleranzentwicklung zu führen¹³. Da insbesondere grünes Gemüse wie z. B. Spinat einen erhöhten Nitratgehalt aufweist, ist es als große Ressource anzusehen.

Basierend auf Untersuchungen an Mäusen und Menschen wird in der Literatur³² teilweise auch die Existenz einer eigenen Nitratreduktase bei Säugetieren angenommen. In diesem Fall wäre die Bedeutung der Umwandlung von Nitrat zu Nitrit durch die Bakterien der Mundflora möglicherweise geringer.

1.3.4 Zytoprotektivität von Stickstoffmonoxid

Die protektiven Eigenschaften von NO und Nitrit in der myokardialen Ischämie/Reperfusion^{33 29 34 35 36} sowie auch in anderen Organsystemen wie Leber³⁴, Gehirn⁹⁸ und Niere⁹⁹ wurden vonseiten der Forschung bereits ausführlich untersucht.

In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Applikation exogenen Nitrits bei intaktem Myoglobin zu einer Verkleinerung des Infarktareals führt^{29 23 37}³³. Die Zytoprotektion stellt hierbei eine Kombination verschiedener Faktoren dar. Myoglobin fungiert hier als Nitritreduktase sowie als Regulator der Zellatmung²⁹. Die Reduktion von Nitrit zu NO hemmt die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies sowie die Inaktivierung von mitochondrialen Enzymen²⁹.

Da die Funktion der eNOS bei einer Hypoxie gestört ist, spielt dieser Syntheseweg von NO im Fall der Ischämie nur eine untergeordnete Rolle (siehe Kapitel 1.3.2). Vielmehr stellt Nitrit unter diesen Bedingungen eine wichtige NO-Quelle dar. Da die NO-Synthese aus Nitrit auch unter hypoxischen Bedingungen²⁴ möglich ist, läuft dieser Syntheseweg vermehrt in ischämischen Geweben ab²⁴. Gleichzeitig ist die Umwandlung von NO aus Nitrit in saurem Milieu erleichtert (siehe Kapitel 1.3.2)³³.

Neben der Wirkung von NO im Rahmen einer akuten Ischämie/Reperfusion wird ihm auch eine antiarteriosklerotische Wirkung zugeschrieben. Hierbei spielt eine Hemmung der Migration von Leukozyten in der Gefäßwand sowie der Proliferation von Leiomyozyten in der Gefäßwand eine wichtige Rolle^{38 39 40}.

Im Skelettmuskel scheint die NO-abhängige Blockade der COX-2 die Regeneration von Schäden nach Ischämie zu unterstützen⁴¹.

1.4 Skelettmuskulatur- Rolle der Myoblasten in der Regeneration

Die Schädigung der Skelettmuskulatur ist eine Konsequenz der chronischen Ischämie im Hinterlaufmodell. Da die adulten Myozyten zu den Muskelfasern fusioniert sind und nicht mehr proliferieren können, ist die Regeneration der Muskulatur in der postnatalen Phase von den Satellitenzellen abhängig. Die Satellitenzellen werden anhand ihrer Oberflächenmoleküle (CD34, alpha7-Integrin) identifiziert⁴². Unklar ist aber immer noch ihre Herkunft. Diskutiert wird, ob es sich um Reste der Muskelvorläuferzellen aus der Embryonalentwicklung^{43 44} oder um undifferenzierte Zellen endothelialer Herkunft handelt⁴⁵. Fest steht aber, dass zu der heterogenen Population der Satellitenzellen auch die Myoblasten gehören⁴⁶. Die Fähigkeit zur Regeneration hängt vom Alter des Organismus sowie vom Ausmaß und von der Dauer der Schädigung ab. Bei traumatischer Schädigung des Muskels von >20 % ist in vielen Fällen nicht mit einer adäquaten Regeneration, sondern mit einem Funktionsverlust zu rechnen⁴⁷. Chronische Prozesse (z. B. Muskeldystrophien) können die Reparaturmöglichkeit ebenfalls erschöpfen⁴⁸. Im Rahmen der Regeneration ist auch die Interaktion der Muskelzellen mit den an der Revaskularisierung beteiligten Zellen (z. B. endothelialen Progenitorzellen) von Bedeutung.

Auffällig ist, dass während eines Regenerationsprozesses mehr an der Reparatur beteiligte Zellen beobachtet werden als vorher an residenten Satellitenzellen im Gewebe zu finden waren. Diese Beobachtung führte zu verschiedenen Erklärungsansätzen: 1. Migration von Satellitenzellen aus Nachbarfasern, 2. Umdifferenzierung von Nicht-Myoblasten (z. B. Fibroblasten), 3. Einwanderung von undifferenzierten Zellen und 4. Proliferation von Myoblasten als echte Stammzellen⁴⁹. Gerade bezüglich der dritten Erklärungsmöglichkeit finden sich in der Forschung Hinweise⁴⁸. Hier wurde gezeigt, dass Zellen aus dem Knochenmark in den geschädigten Muskel migrieren und an der Reparatur beteiligt sind. Förderlich für die Regeneration sind z. B. VEGF als Wachstumsfaktor⁵¹ oder NO über eine Hemmung von COX2⁴¹.

1.5 Apoptose und Fas/Fas-Ligand (FasL)

Eine Ischämie zieht in vielen Fällen eine Schädigung des Gewebes nach sich. Das Absterben der Zellen kann dabei entweder durch Nekrose (unkontrolliert) oder durch Apoptose (kontrolliert) erfolgen. Gerade die Apoptose und ihre Beeinflussbarkeit durch Botenstoffe kann eine relevante Größe im ischämischen Gewebe im Hinterlaufmodell darstellen. Als einer der Wege der Apoptoseinduktion verdient der Fas/Fas-Ligand-Signalweg besondere Beachtung. Bei diesem handelt es sich um eine Variante des extrinsischen Wegs⁵² der Apoptose. Von den meisten Zellen wird der Fas-Rezeptor exprimiert⁵². Die genetische Information für den Rezeptor findet sich auf dem Chromosom 10⁵³. Vor allem von Zellen des Immunsystems (z. B. T-Lymphozyten) wird der Fas-Ligand auf der Zellmembran präsentiert (die zugehörige DNS findet sich auf Chromosom 1). Der Fas/FasL-Signalweg ist hochkonserviert und findet sich bei den meisten Säugetieren⁵³. In der Regulation des Immunsystems sowie bei der Interaktion zwischen Tumorzellen und Zellen des Immunsystems spielt die Apoptose durch FasR/FasL-Interaktion eine wichtige Rolle⁵³.

1.5.1 Apoptose durch den Fas/Fas-Ligand-Signalweg

Der Untergang einer Zelle kann entweder kontrolliert (Apoptose) oder unkontrolliert (Nekrose) erfolgen. Der kontrollierte Zelltod ist ein aktiver Prozess, der die Aufwendung von Energie erfordert⁵⁴. Im Gegensatz zur Nekrose erfolgt die Apoptose ohne begleitende Entzündungsreaktion. Die Zelle zerfällt in apoptotische Körper (*apoptotic bodies*), die phagozytiert werden. Die Induktion der Apoptose kann auf verschiedene Weisen erfolgen. So kann sie etwa innerhalb der Zellen ihren Ursprung nehmen (intrinsischer Weg), z. B. nach irreparablen Schäden der DNS. Sie kann jedoch ebenso durch äußerliche Faktoren erfolgen (extrinsischer Weg), etwa im Rahmen von Immunreaktionen. Beiden Wegen kommen sowohl in der Embryonalentwicklung (z. B. in der Formung der Extremitäten) als auch im adulten Organismus (z. B. beim Abbau von autoaggressiven Immunzellen)⁵⁴ wichtige Funktionen zu. Klassische Aktivatoren

des extrinsischen Weges sind der Fas/Fas-Ligand-Signalweg oder der Tumor-Nekrose-Faktor-alpha/Tumor-Nekrose-Faktor-alpha-Rezeptor-Signalweg⁵⁴.

Der Fas-Rezeptor bindet den Fas-Liganden (FasL) und bildet mit zwei weiteren ebenfalls beladenen Fas-Rezeptoren ein Trimer. Dieses Trimer aktiviert hierbei den sogenannten *death inducing signaling complex* (DISC)⁵⁵. Der DISC besteht aus dem Rezeptortrimer, FADD sowie der Caspase 8. Die Caspase 8 wiederum aktiviert die Caspase 3, was zu einer Kondensation des Chromatins und einer Fragmentierung der DNS führt. Die systematische Fragmentierung der DNS stellt ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal zwischen Apoptose und Nekrose dar⁵³.

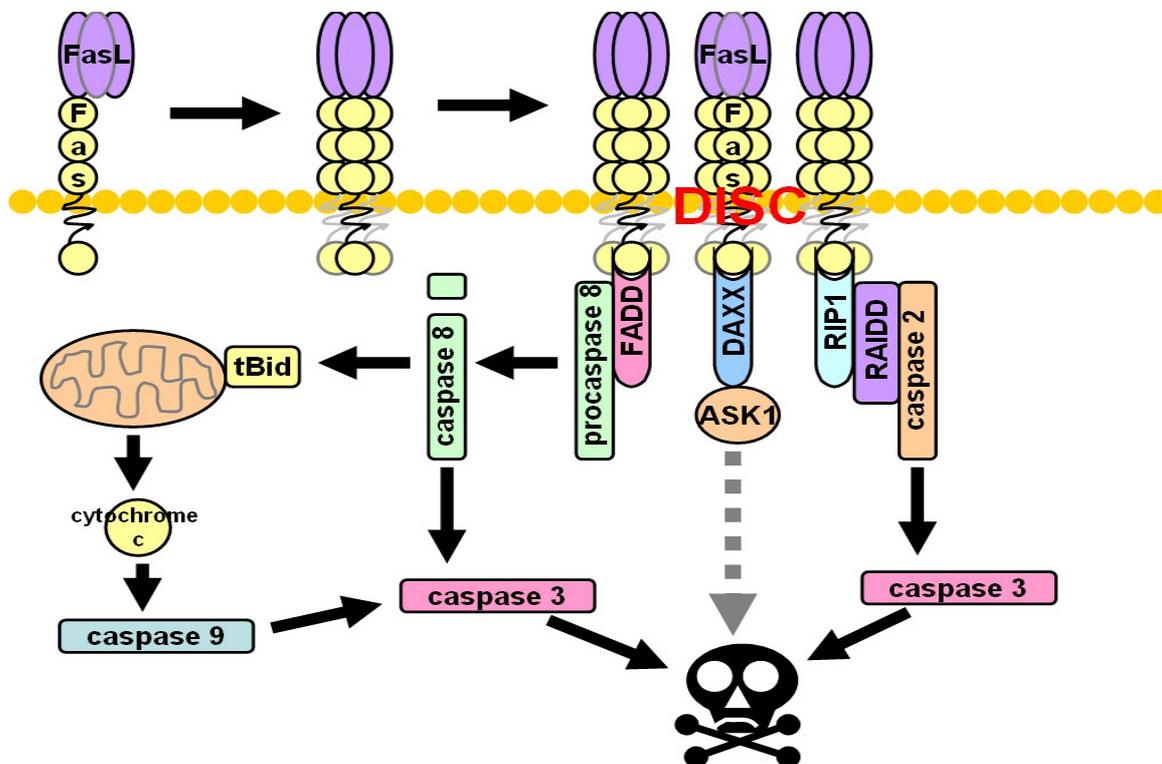


Abb. 3: Darstellung des Fas/FasL-Signalweges⁵⁷. Nach der Bindung des FasL an den Fas-Rezeptor kommt es zu einer Trimerisierung des Ligand-Rezeptor-Komplexes. Dieses Trimer bindet den DISC, der wiederum Caspase 8 aktiviert. Caspase 8 aktiviert Caspase 3, die ihrerseits zur Kondensation und Fragmentation der DNS führt.

Der Fas-Ligand (FasL) kann in zwei unterschiedlichen Formen vorkommen. Als proapoptische Form liegt er in einer membranständigen Form vor (mFasL).

Alternativ kann er auch in einer löslichen Form (sFasL) auftreten, die sich in ihrer Wirkung deutlich vom membranständigen FasL (mFasL) unterscheidet⁵².

1.5.2 Apoptosehemmung durch den löslichen Fas-Liganden

Der lösliche Fas-Ligand (*soluble Fas ligand*, sFasL) kann durch Abspaltung des membranständigen FasL durch Metalloproteasen (vor allem MMP 3 oder 7) oder durch alternatives Splicing von FasL entstehen⁵³. Im Unterschied zur klar proapoptotischen Funktion des membranständigen Fas-Liganden (mFasL) ist die Funktion des löslichen Fas-Liganden (sFasL) vielschichtiger. sFasL kann ebenfalls proapoptotisch wirken, allerdings mit einer abgeschwächten Wirkung im Vergleich zum mFasL (membranständiger mFas-Ligand). Neben dieser proapoptotischen Funktion von sFasL werden in der Literatur allerdings auch eine antiapoptotische und eine zytoprotektive Funktion desselben beschrieben^{58 51}. Dabei bleibt noch unklar, ob diese antiapoptotische Wirkung ein eigenständiger Effekt ist oder nur eine Umwandlung von mFasL zu sFasL durch eine MMP mit darauf folgender Abschwächung des Effekts von FasL darstellt. Die Regulation der Apoptose durch Fas/FasL gerade durch seine sowohl proapoptotische als auch antiapoptotische Funktion wirft interessante Fragestellungen für ein Ischämiemodell wie das Hinterlaufmodell auf. Gerade bezüglich einer Beeinflussung der Ischämie und Reperfusion durch die Gabe von NO-Quellen wie Nitrat wurde die Rolle des Fas/FasL bislang noch unzureichend untersucht.

1.6 Vaskularisierung

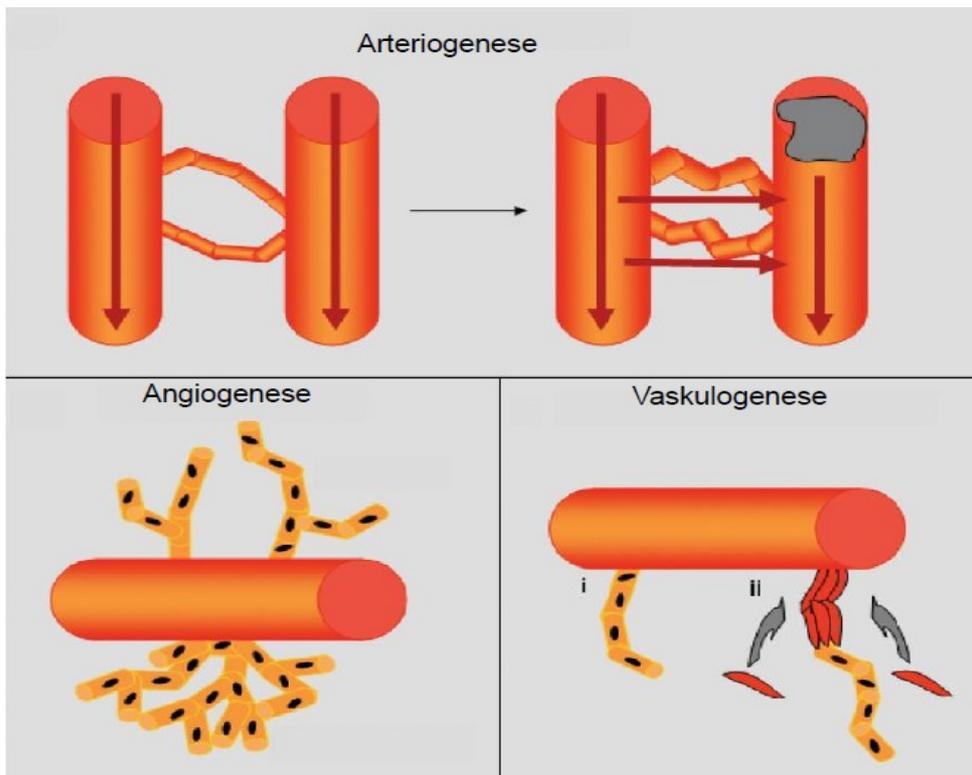


Abb. 4: Darstellung der verschiedenen Formen der Vaskularisierung (übersetzt aus Heil et al.⁶⁰). Neue Gefäße entstehen entweder *de novo* (Vaskulogenese), aus Kapillaren (Angiogenese) oder aus Kollateralen (Arteriogenese).

Die Vaskulogenese (siehe Abbildung 4 rechts unten) bezeichnet die *de novo*-Entstehung von Kapillaren⁶⁰. Bei dieser werden die neuen Gefäße durch einwandernde Angioblasten (Embryonalentwicklung) bzw. endotheliale Progenitorzellen (EPC) (vor allem postnatal) gebildet¹⁹. Die Migration dieser Zellen ist abhängig von der VEGF/VEGFR-Achse⁶¹.

Im Gegensatz zur Vaskulogenese kommt es bei der Angiogenese (siehe Abbildung 4 links) nicht zu einer *de novo*-Bildung von Kapillaren, sondern zu einem Aussprossen von Kapillaren aus bestehenden Gefäßen. Diese Kapillaren entstehen durch Proliferation und Migration der Endothelzellen (EC), im Gegensatz zu den EPC, die das neue Gefäß bei der Vaskulogenese bilden. Obwohl diskutiert wird, ob die EPC bei der Angiogenese zu EC differenzieren und direkt neue Gefäße bilden, scheinen sie über die Sekretion von Cytokinen und

Wachstumsfaktoren wie z. B. VEGF oder IGF-1 den Prozess der Angiogenese zu fördern^{62 60}. Parallel dazu zeigt die Wirkung von VEGF auf die Angiogenese die Abhängigkeit von einer funktionierenden eNOS⁴. Der initiale Reiz, der die Angiogenese auslösen kann, ist die Hypoxie⁶³.

Im Kontrast zur Angiogenese und zur Vaskulogenese wird die Arteriogenese (siehe Abbildung 4 Mitte oben) durch physikalische Kräfte ausgelöst. Durch eine Zunahme des *fluid shear stress* (FSS) erweitern sich bestehende Kollateralen zwischen Arterien (vergleichbar mit einem natürlicheren arterio-arteriellen Bypass⁶⁰) und erhöhen so durch Umgestaltung bestehender Gefäße die Perfusion.

1.7 Ziele der Arbeit

Vorherige Untersuchungen konnten die Bedeutung von NO als wichtiger Botenstoff für die Gefäßregulation bereits nachweisen. Ebenso ist bekannt, dass Nitrat als mögliche NO-Quelle dienen kann. Noch zu beantworten ist dagegen die Frage, ob diätetisches Nitrat über NO die Gefäßregeneration beeinflusst.

Um diese Frage jedoch zu beantworten, musste das Hinterlaufmodell etabliert werden. Hierbei wurden folgende Ziele bearbeitet:

- (1) Etablierung eines *in vivo*-Hinterlaufmodells in der Maus unter Berücksichtigung der Lagerung, der Temperatur, der Untersucherabhängigkeit und der Messmethode.
- (2) Erste Untersuchung zum Einfluss von mit anorganischem Nitrat angereichertem Trinkwasser auf die Perfusion gemessen mittels Laserdopplerflussmessung (*laser doppler perfusion imaging*, LDPI).
- (3) Untersuchung des Einflusses von mit anorganischem Nitrat angereichertem Trinkwasser auf Apoptose und Vitalität der Myoblasten im Hinterlauf nach Ischämie.
- (4) Untersuchung des Einflusses von mit anorganischem Nitrat angereichertem Trinkwasser auf den Fas/FasL-Signalweg.

2 Methoden

2.1 Tierexperimentelle Methoden

2.1.1 Tiermodell und Gabe von Nitrat

2.1.1.1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es um Mäuse des NMRI-Stamms. Die Tiere waren zwischen 2 und 3 Monate alt. Alle Versuchstiere waren männlich. Das Gewicht der Tiere lag zwischen 25 g und 35 g. Die Tiere wurden in der Tierversuchsanstalt (TVA) des Klinikums der RWTH Aachen gezüchtet. Die Nummer des zugehörigen genehmigten Tierversuchsantrags lautet 8.87-50.10.35.08.086 (Einfluss von Nitrit und Myoglobin auf die Revaskularisierung unter Berücksichtigung der Rolle endothelialer Progenitorzellen (EPC)).

2.1.1.2 Operationstechnik

Das Hinterlaufmodell wurde von Couffinhal et al.² als Modell von Extremitätenischämie und Gefäßneubildung vorgestellt. Grundprinzip des Modells sind die Ligatur und die Exzision der Arteria femoralis im Hinterlauf (*hindlimb*) einer Maus (siehe Kapitel 1.2.2) sowie die anschließende Messung der Perfusion mittels der Laserdopplerflussmessung (LDPI). Die Operation der Tiere in dieser Arbeit wurde von Frau Dipl.-Biol. Martina Kropp durchgeführt.

Für die Untersuchung der Versuchstiere (NMRI-Stamm) war eine Narkose notwendig. Diese erfolgte mit Ketamin 45 mg/kg KG und 10 mg/kg KG Rompun intraperitoneal (i.p). Bei Bedarf erfolgte eine Vertiefung der Narkose mit Isoflurane *per inhalationem* (p.i.). Für die Messung der Perfusion mussten die Haare an den Beinen der Mäuse entfernt werden, da diese andernfalls zu Messartefakten geführt hätten. Hierfür wurden die Beine der Mäuse mit Enthaarungscreme behandelt und nach der Einwirkzeit mit Wasser und Tupfern gereinigt. Der erste Messzeitpunkt für die LDPI-Messung lag vor Beginn der Operation (siehe Kapitel 2.1.1.2). Im Anschluss erfolgte vor der Hautinzision die Desinfektion des Beins der Maus mit Betaisodonnalösung. An der Innenseite des Oberschenkels wurde eine ca. 1 cm lange Hautinzision gesetzt, die mittels eines Retraktorsystems für

Kleintiere erweitert und offen gehalten wurde. Nach Mobilisierung der Haut konnten die Leitungsbahnen freigelegt werden. Die Präparation von Arteria und Vena femoralis sowie des Nervus femoralis inklusive ihrer Ursprünge erfolgte als Nächstes. Nach vorsichtiger Separation der Arterie von Vene und Nerv konnte die Ligatur mit 0,5 mm Nähseide proximal des Ursprungs der Arteria femoralis und am distalen Ende der Arteria saphena (siehe Abbildung 5) durchgeführt werden.

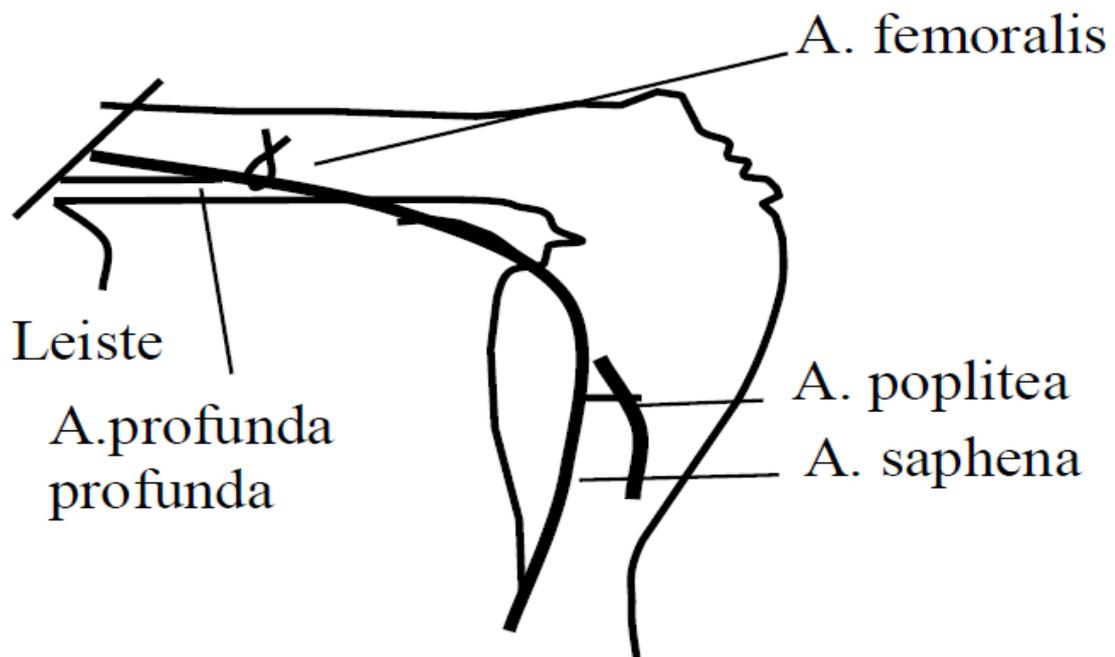


Abb. 5: Position der Ligaturen, modifiziert ⁶³. Die beiden Ligaturen (proximal und distal) wurden mit 0,5 mm Nähseide durchgeführt. Die Positionen der Ligaturen bestimmen den Umfang der folgenden Resektion.

Nach den Ligaturen wurde die Arteria femoralis inklusive der Arteria femoris profunda reseziert (siehe Abbildung 6).

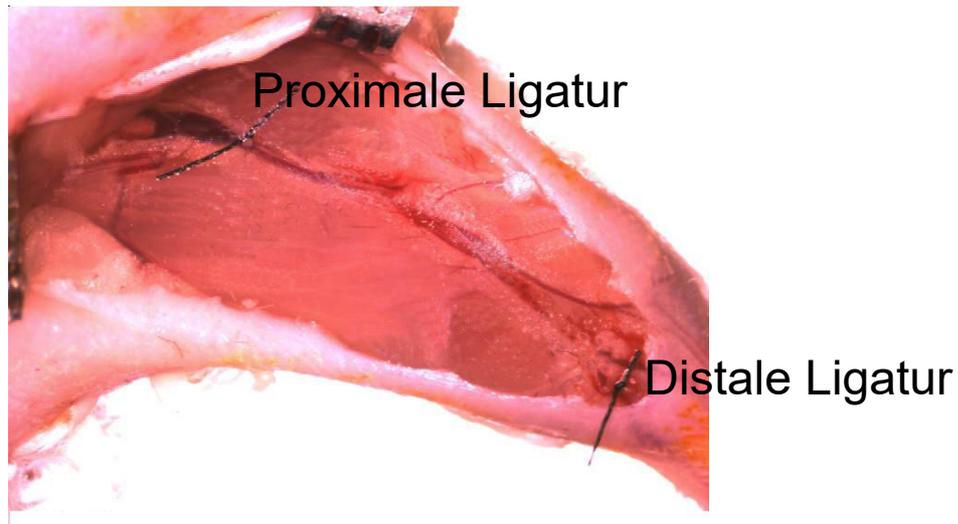


Abb. 6: Operationssitus nach Ligatur und Resektion der Arteria femoralis. Die proximale und die distale Ligatur sind erkennbar. Das leere Gefäßbett der Arteria femoralis ist zwischen den beiden Ligaturen erkennbar.

Anschließend wurde die Wunde mit einer fortlaufenden Naht aus 0,4 mm Nähseide verschlossen. Nach der Operation erfolgte die Lagerung der Tiere unter einer Infrarotlampe, bis die Narkose ausgeklungen war. Dies verhinderte ein Auskühlen der Tiere nach der Operation. Zur Analgesie erhielten die Tiere postoperativ für drei bis vier Tage (individuelle Entscheidung nach Zustand der Tiere) zweimal täglich Buprenorphin (Temgesic, 0,05-0,1 mg/kg subkutan (s.c.)).

2.1.1.3 Supplementierung von Nitrat zum Trinkwasser

Das Trinkwasser der Tiere wurde bei den entsprechenden Kollektiven vor der Operation mit Nitrat (1 g/L) versetzt. Die Tiere erhielten dieses Wasser eine Woche vor sowie eine Woche nach der Operation. Zusätzlich erhielten alle Tiere die gleichen Futterpellets (Fa Ssniff). Eine weitere Gruppe erhielt zusätzlich zum Nitrat (oral, ad libitum) den NO-scavenger carboxy 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl 3-oxid (cPTIO) i.p. in einer Dosis von 1 µl/g KG in einer Trägerlösung von 200 µl PBS. Die Stocklösung wies eine Konzentration von 1 mg/ml cPTIO auf (Trägerlösung: PBS).

2.1.2 Laserdopplerflussmessung (*laser doppler perfusion imaging*)

Die Messung der Durchblutung der Extremitäten erfolgte mittels der Laserdopplerperfusionsmessung (*laser doppler perfusion imaging*, LDPI)² (siehe Abbildung 7). Diese Methode wurde von Wardell et al.⁶⁵ und in ihrer Anwendung für die Hinterläufe von Kleintieren von Linden et al.⁶⁶ beschrieben.

2.1.2.1 Etablierung der Laserdopplerflussmessung

Für die Messung wurde das LDPI-Messgerät Perimed PeriScan PIM 3 System (siehe Abbildung 7) und zur Auswertung der Messwerte das Programm LDPI Win 3.1 verwendet.

Bevor die Versuche bezüglich der Wirkung von Nitrat durchgeführt werden konnten, mussten in einem ersten Schritt verschiedene Einflussgrößen der Methode erfasst und minimiert werden. Ohne diese Etablierung wären die gewonnenen Ergebnisse nicht verwertbar gewesen.



Abb. 7: Foto des Messgeräts (Perimed PeriScan PIM 3 System). Sowohl Laser als auch Detektor sind im Kopf des Geräts eingebaut. Mit dem Gelenkarm kann der Laserkopf beliebig positioniert werden (Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Herstellerfirma verwendet).

2.1.2.2 Messprinzip

Bei der Laserdopplerflussmessung handelt es sich um eine semiquantitative Analyse der Perfusion der Haut und der oberflächlichen Gefäße. Die Perfusion ist dabei definiert als Konzentration der bewegten Blutzellen multipliziert mit der durchschnittlichen Geschwindigkeit der Blutzellen. Das Verfahren basiert auf dem Dopplereffekt. Dieser beschreibt die Verschiebung der Frequenz (und damit auch der Länge) von Wellen, wenn sich die Quelle derselben und ihr Beobachter relativ zueinander bewegen⁶⁵.

Das Gewebe wird mit einem Niedrigenergielaser (*low power*-Laser) bestrahlt und das reflektierte Licht von einem Detektor im Kopf des Geräts gemessen. Die Strahlen, die auf sich bewegende Blutzellen treffen, werden in ihrer Wellenlänge verschoben (siehe Abbildung 8). Von einem Detektor im Kopf des LDPI-Geräts werden die reflektierten Laserstrahlen aufgenommen. Anhand der Verschiebung der Wellenlänge werden dann Konzentration und Geschwindigkeit der bewegten Blutzellen berechnet.

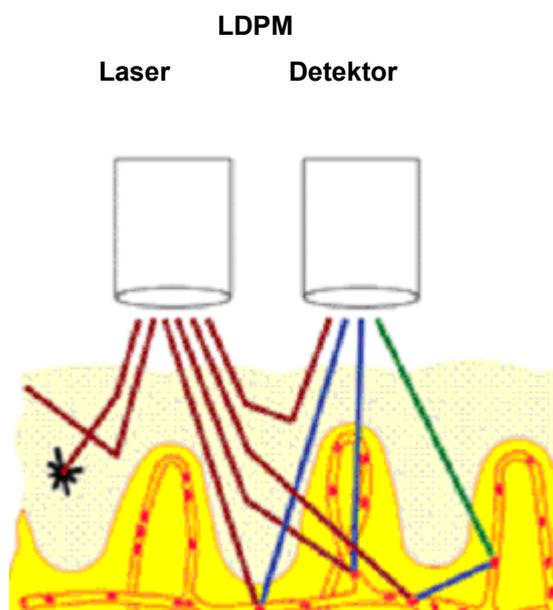


Abb. 8: Illustration des Messprinzips . Die Strahlen des Senders treffen auf die Blutzellen und werden mit einer verkürzten Wellenlänge reflektiert und von der empfangenden Faser aufgefangen (übernommen aus <http://www.perimed-instruments.com/products/pim3-imaging-principle>, mit freundlicher Genehmigung verwendet).

Aus diesen Informationen berechnet die Software LDPI Win 3.1 das Ausmaß der Perfusion. Diese wird in arbiträren Einheiten angegeben (PU).

Das Perimed PeriScan PIM 3 System (siehe Abbildung 7) tastet ein vom Experimentator festgelegtes Areal ab, das beide Beine der Maus inklusive des Unterbauchs umfasst. Um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, muss eine nicht reflektierende Unterlage verwendet werden. Das Programm LDPI Win 3.1 kann diese aus der Berechnung der Perfusion entfernen. Bei der Messung wird die vorher bestimmte Fläche Zeile für Zeile abgetastet.

Aus den PU berechnet das Programm LDPI Win 3.1 die durchschnittliche Perfusion einer zuvor vom Experimentator manuell markierten Fläche (Auswertungsbereich; *region of interest*, ROI).

Diese Methode ermöglicht zwar eine quantitative Bestimmung der Perfusion, allerdings nur in den schon erwähnten arbiträren Einheiten und nicht in Absolutwerten.

Zum Ausgleich von Schwankungen der Perfusion wird grundsätzlich das Verhältnis zwischen den beiden Beinen der Maus bestimmt, da beide Beine den gleichen Bedingungen unterworfen sind.

2.2 *in vitro*-Versuchsansätze

2.2.1 Isolation von Myoblasten

Zur Charakterisierung des Einflusses der Ischämie auf die Skelettmuskulatur erfolgte die Isolation von Myoblasten aus den unteren Extremitäten. Die Schädigung sowie die folgende Regeneration des Muskels wurden bestimmt durch Berechnung der Apoptoserate und der Proliferationsrate der Muskelzellen (siehe Kapitel 2.2.2.1 und 2.2.2.2) jeweils im Vergleich zum nicht ischämischen Bein. Erstmals wurde die Isolation von Myoblasten 1964 von Yaffe et al. beschrieben⁶⁷ und weiterentwickelt^{68 69}. Das grundsätzliche Protokoll, an dem sich auch hier orientiert wurde, ist bis heute Standard und wurde in seinen

Grundzügen nur geringfügig modifiziert^{68 69}. Trotzdem ist eine genaue Etablierung der Isolation für die konkrete Fragestellung nötig, um mögliche Verzerrungen der Messergebnisse auszuschließen.

2.2.1.1 Protokolloptimierung der Myoblastenisolation

Bevor das weiter unten beschriebene Protokoll zur Myoblastenisolation verwendet werden konnte, war eine Optimierung notwendig, um die Methode an die konkreten Gegebenheiten des hiesigen Versuchs anzupassen. Dabei wurden sowohl der Verdau des Gewebes und die Beschichtung der Kulturschalen als auch die Aussaatdichte variiert, um die dadurch hervorgerufenen Effekte auf die Isolation zu beobachten. Das Ziel der Optimierung war es, eine möglichst hohe Anzahl lebensfähiger Myoblasten zu isolieren, um diese durch Kultur oder FACS (*fluorescence activated cell sorting*) charakterisieren zu können. Für die Bestimmung der Apoptoseraten und Vitalitätsraten wurde ebenfalls eine möglichst hohe Anzahl an Zellen benötigt.

Als Verdau für das Muskelgewebe wurden Pronase (0,1 % oder 1 %) oder Collagenase D erprobt. Diese Enzyme wurden auch in der Literatur verwendet, um die Myoblasten aus dem Gewebe zu lösen^{67 68 69}. Der 0,1%ige Pronaseverdau wurde in zwei verschiedenen Inkubationszeiten getestet: 30 min und 60 min. Nach dem Verdau wurde im Rahmen der Isolation die Anzahl der isolierten Zellen bestimmt. Hier stellte sich die 1%ige Pronase mit einer Inkubationszeit von 60 min als überlegen dar, da bei diesem Ansatz die meisten Zellen isoliert werden konnten. Für die weiteren Versuche war eine möglichst hohe Anzahl an isolierten Zellen notwendig.

Für die Kultivierung der Myoblasten wurden die Platten mit Kollagen, Laminin oder Gelatine beschichtet und in Bezug auf die Anzahl adhärenter Zellen untersucht. Diese Beschichtung ist notwendig, da Myoblasten auf unbehandelten Platten nicht anwachsen. Hier stellte sich Kollagen als zur Beschichtung geeignet heraus. Es wurden 10 ng/100 µl/cm² Kollagen in die Wells gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Noch vorhandene Flüssigkeit wurde am Folgetag bei Raumtemperatur (RT) getrocknet.

Für die Aussaatdichte wurden Konzentrationen von 10.000, 15.000, 20.000, 50.000 und 400.000 Zellen/cm² erprobt. Hierbei stellte sich die höchste Aussaatdichte als die heraus, die zur Kultivierung der Myoblasten zur weiteren Charakterisierung am besten geeignet war.

Anhand dieser Optimierungsschritte wurde dann das folgende Protokoll festgelegt.

2.2.1.2 Isolation der Myoblasten aus dem Hinterlauf

Für die Isolation der Myoblasten aus dem Hinterlauf wurde ein Protokoll verwendet, das auf den Arbeiten von Yaffe et al.⁶⁷, Rando et al.⁶⁹ und Jansen et al.⁷⁰ basiert. Deren Protokolle wurden hierzu den lokalen Bedingungen entsprechend kombiniert und modifiziert.

Zur Gewinnung des Muskelgewebes des Hinterlaufs wurde den Versuchstieren eine letale Urethandosis (NMRI-Stamm: 1200 mg/kg KG) i.p. verabreicht. Der Unterleib der Mäuse wurde mit Desinfektionsspray behandelt, um eine Kontamination der Primärzellen zu vermeiden. Danach wurde im unteren Bereich des Rückens der Tiere mit einer Schere ein ca. 0,5 mm langer Hautschnitt vorgenommen. Dieser wurde im Folgenden vergrößert, sodass die unteren Extremitäten der Maus gehäutet werden konnten. Anschließend wurden die Beine auf Höhe der Leiste mit einer Schere abgetrennt. Das Muskelgewebe wurde mit einer Schere vorsichtig vom Knochen gelöst und mit wenigen Milliliter PBS in einer Petrischale auf Eis gelagert. Die Muskulaturen jeweils beider Beine der Mäuse wurden voneinander getrennt weiterverarbeitet, um später das ischämische mit dem nicht ischämischen Bein vergleichen zu können. Das Fettgewebe wurde vor der weiteren Verarbeitung entfernt. Dann wurde das Muskelgewebe in der Reinraumwerkbank mit Pinzette und Schere weiter zerkleinert. Danach wurde es mit dem sterilen Stempel einer 5 ml-Spritze weiter zerstoßen. Im Anschluss an diese mechanische Zerkleinerung wurde das Gewebe in einer Lösung bestehend aus 39 ml DMEM, 0,1 % Pronaseendkonzentration (40 mg/ml) und 25 mM Hepes enzymatisch verdaut. Der Verdau wurde für 1 Stunde bei 37°C unter leichter Bewegung durchgeführt. Um dabei nicht gelöste Reste aus der Lösung zu entfernen, wurde diese im Weiteren erst mit einem 100 µm-Filter und dann mit einem 40 µm-Filter filtriert. Das Filtrat wurde mit PBS bis auf 50 ml

aufgefüllt und für 10 min bei 350 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Dies war der erste von mehreren Waschschritten, die dazu dienten, Detritus und Fett zu entfernen. Nach diesem Waschschrift wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert. Um die anschließende Zählung zu erleichtern, wurde die Suspension danach der jeweiligen Pelletgröße entsprechend auf 2-5 ml verdünnt. Von dieser Zellsuspension wurden 10 µl entnommen und mit 10 µl Trypanblau vermischt. 10 µl der angefärbten Zellsuspension wurden mithilfe einer Neubauerkammer ausgezählt. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschrift. Für diesen Schritt des *enrichments* (Anreicherung) ist die Bestimmung der Zellzahl notwendig. Das *enrichment* dient dazu, Myoblasten in der Primärkultur zu konzentrieren und andere Zellpopulationen zu entfernen. Die Zellen wurden nach dem Waschschrift in einem speziellen Medium für Myozyten (500 ml Ham's 10 mit einem Supplement von 100 ml FKS, 50 ml *horse serum* (HS) und 1 ml Penicillin/Streptomycin) resuspendiert und in einer Konzentration von 5-10 Mio. Zellen/75 cm² auf unbeschichteten Petrischalen ausgesät. Auf solchen unbeschichteten Schalen adhären Myoblasten nur sehr schlecht, während Fibroblasten auch an diesen haften⁶⁷. Die Petrischalen wurden für 60 min bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert. Abschließend wurde der Überstand mit den noch flottierenden Myoblasten abpipetiert und erneut gewaschen. Die Petrischalen wurden verworfen. Nach dem Waschschrift wurde die Zellzahl erneut bestimmt. Dann wurden die Zellen in einer errechneten Menge Medium oder PBS resuspendiert, je nachdem, ob die Zellen ausplattiert wurden oder direkt ein Assay erfolgte.

2.2.1.3 Zellzahlbestimmung mittels Zählkammer

Für die Bestimmung der Zellanzahl wurde eine Neubauerzählkammer verwendet. Um die Vitalität der Zellen zu prüfen, wurde parallel eine Vitalfärbung mit Trypanblau durchgeführt. 10 µl der Zellsuspension wurden mit 10 µl Trypanblau verdünnt. Von dieser Lösung wurden 10 µl auf die Neubauerkammer getropft und betrachtet. Die Zellen wurden dann unter dem Mikroskop (10x Objektiv) ausgezählt. Die Konzentration der Zellen wurde wie folgt berechnet:

$$(\text{Zellen}/4) \times 10^4 \times 2 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Zellzahl/ml.}$$

2.2.1.4 Charakterisierung der Myoblasten

Um sicherzustellen, dass in den folgenden Assays tatsächlich Myoblasten analysiert wurden, erfolgte parallel zur Proliferations- und Apoptosebestimmung eine Charakterisierung der Zellen über Durchflusszytometrie. Hierbei wurden die Zellen mittels eines Antikörpers (gegen $\alpha 7$ -Integrin), der für Myoblasten spezifisch ist, angefärbt. Außerdem wurden Zellen für eine spätere immunzytochemische Phänotypisierung kultiviert.

Für die Immunzytochemie wurden die Zellen auf kollagenbeschichteten^{68 69} 6-Wellplatten ausgesät. Die Konzentration des Kollagens betrug dabei 10 ng/100 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$. Dafür wurde die 0,1%ige Kollagenlösung im Verhältnis 1:10 in sterilem Wasser verdünnt. Von dieser Lösung wurde 1 ml in jedes Well der 6-Well-Platten gefüllt (entspricht 100 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$). Die Platten wurden für 24 h bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde überschüssige Flüssigkeit abgesaugt und die Platten unter der Reinraumwerkbank getrocknet. Auf diesen Platten wurden dann die isolierten Zellen in einer Konzentration von 400.000 Zellen/ cm^2 ausgesät. Pro Well wurden 2 ml Myozyten-Medium (500 ml Ham's 10 mit einem Supplement von 100 ml FKS, 50 ml HS und 1 ml Penicillin/Streptomycin) zugegeben. Danach erfolgte alle 4 Tage ein Wechsel des Mediums. Beim Wechsel wurde das alte Medium unter der Reinraumwerkbank abgesaugt. Außerdem wurden die Wells mit PBS gewaschen (Zugabe von 2 ml PBS, welches ebenfalls abgesaugt wurde). Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 ml frischem Medium. Die Zellen wurden regelmäßig mikroskopisch untersucht, um die Dichte des Bewuchses, die Adhärenz und die Differenzierung der Zellen zu kontrollieren. In der Literatur wird die zu beobachtende Differenzierung der Zellen als Charakteristikum der Myoblasten beschrieben, während Dichte des Bewuchses und Adhärenz der Zellen Hinweise auf ihre Vitalität liefern.

Dieses Verfahren wurde von Blanco-Bose et al.⁷¹ beschrieben. Für die durchflusszytometrischen Messungen wurden die Zellen nach der Isolation und drei Waschschritten (1x mit PBS, 2x mit Waschpuffer, 350g, RT, 1 min) mit einem Antikörper gegen $\alpha 7$ -Integrin inkubiert. Dafür wurde das Pellet in 1 ml PBS

resuspendiert und auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt. Diese Suspension wurde wiederum zentrifugiert (500 g, 1 min, RT) und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 10 µl-Blockierungspuffer aufgenommen und 10 min inkubiert. Der Blockierungspuffer war zusammengesetzt aus Ziegen Serum mit 1 mg/ml IgG und 0,1 % NaN₃. Anschließend wurden 20 µl des Antikörpers dazugegeben und 30 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Lösung zentrifugiert (500 g, 1 min, RT) und in 500 µl PBS resuspendiert.

Die Zellsuspension wurde dann mittels eines FACS-Geräts (*FACS canto flow cytometer*) ausgezählt, um den Anteil der Myoblasten an der Zellsuspension zu bestimmen. Das FACS-Gerät analysiert die Zellen nach der Lichtstreuung, die die unterschiedlichen Zellen verursachen, und den verwendeten Fluorochromen. Die Streuung wird unterschieden in *forward scatter* (bestimmt die Größe der Zellen) und *side scatter* (bestimmt die Granularität der Zellen). Für diese Messungen wurde am FACS Canto (Fa BD) durch eine entsprechende Platzierung des Auswertungsfensters (siehe Abbildung 7) die Zellpopulation (P1 in Abbildung 9) getrennt von Zelltrümmern betrachtet. Im nächsten Schritt wurde bestimmt, welcher Prozentsatz im Auswertungsfenster durch den Antikörper markiert worden war (siehe Abbildung 10).

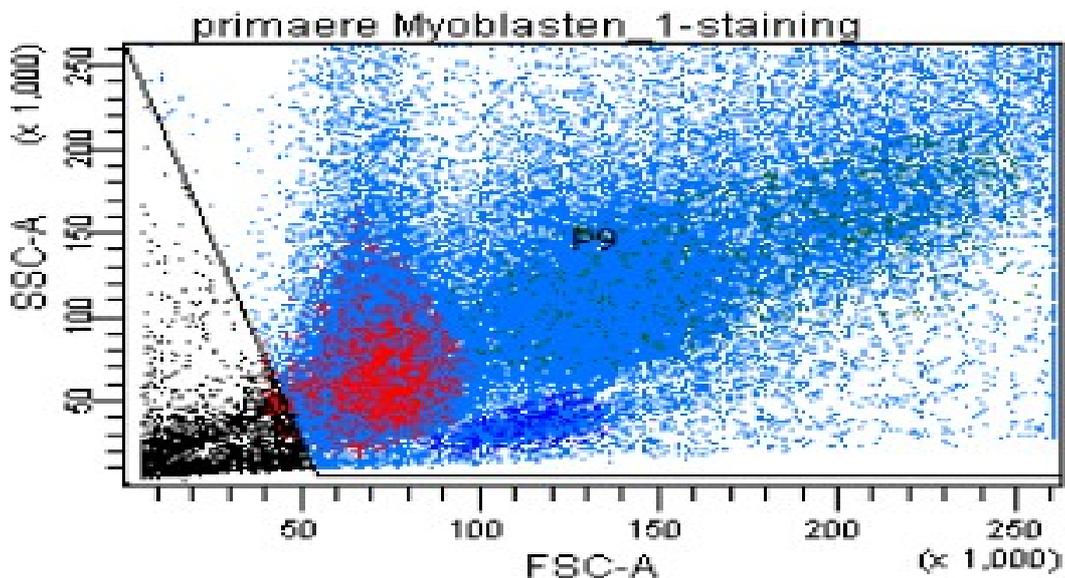


Abb. 9: Positionierung des Auswertungsfensters. Zunächst wurden alle aufgezeichneten Ereignisse bis auf den Detritus auf ihre Fluoreszenz hin analysiert. In der FACS-Messung wurden die Zellen nach Volumen (FSC-A) und ihrer Anfärbung/Granularität (SSC-A) sortiert. Dabei wurden verschiedene Zellpopulationen unterscheidbar. Hierdurch konnte das Auswertungsfenster bei den

folgenden Messungen so platziert werden, dass nur die Zellen und nicht der Detritus ausgewertet wurden.

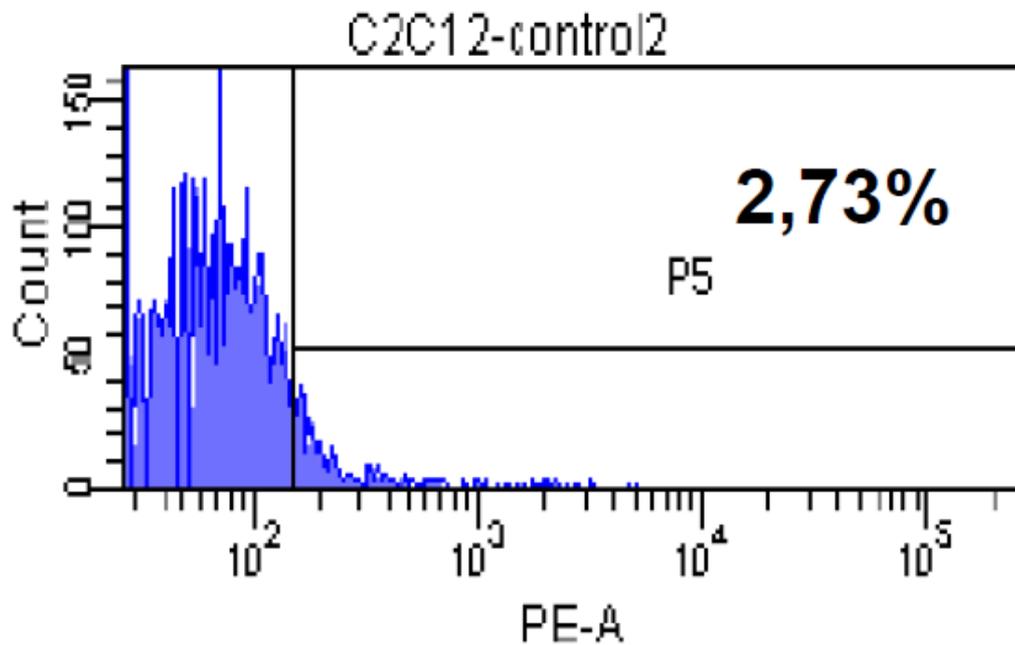


Abb. 10: Die C2C12-Zelllinie ungefärbt als Kontrolle. Ungefärbt wurden 2,73 % der Zellen als positiv detektiert. Diese ca. 3 % wurden als "Rauschen" von der Positivkontrolle abgezogen.

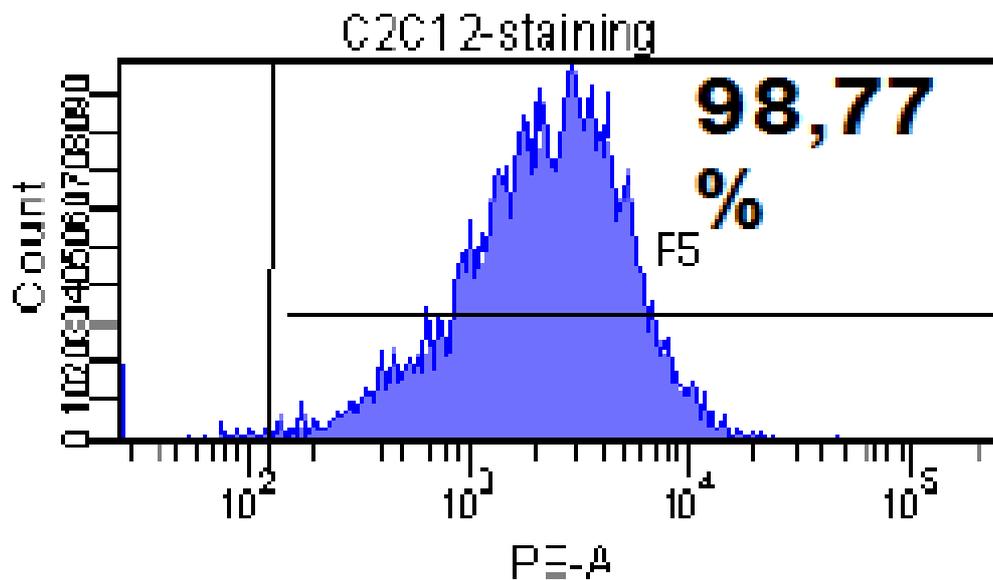


Abb. 11: Die C2C12-Zelllinie gefärbt als Positivkontrolle. Zellen der C2C12-Linie, einer etablierten Myoblastenzelllinie, wurden als Positivkontrolle verwendet. Die erfolgreiche Anfärbung

der Zellen durch den Antikörper zeigt, dass eine Charakterisierung der isolierten Zellen mit diesem möglich ist.

Die durchflusszytometrische Methode stellte sich im Verlauf als überlegen heraus und wurde dann bevorzugt verwendet. Als Positivkontrolle (siehe Abbildungen 10 und 11) wurde bei diesen Versuchen eine zugekaufte Myoblastenzelllinie (C2C12; Fa ATCC) und als Negativkontrolle eine zugekaufte Fibroblastenlinie (Mouse Embryonic Fibroblasts; Fa Gibco) verwendet.

2.2.2 Zytologische Assays

Die primären Myoblasten wurden im Anschluss auf ihre Vitalität und Apoptoserate hin untersucht. Die Vitalitätsbestimmung dient als Hinweis auf die Proliferationsfähigkeit der Myoblasten. Für die Bestimmung der Vitalität und der Apoptoserate wurden zwei zytologische Assays verwendet, die im Folgenden beschrieben werden.

2.2.2.1 Apoptoseassay: TUNEL-Assay

Um die Apoptoserate zu bestimmen, wurde ein TUNEL (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*)-Assay verwendet^{72 73 74}. Dieser Assay wurde erstmalig von Gavrieli et al. beschrieben⁷⁵ und von Negoescu weiterentwickelt^{76 77}. Bei ihm werden Strangbrüche (*nicks*) der DNA, die während der Apoptose entstehen, durch die Desoxyribonukleotidyltransferase mit fluoresceinmarkierten dUTPs versehen. Für die Untersuchung wurde das *In situ Cell Death Detection kit* von Roche verwendet.

Vor der Färbung mussten die Zellen gereinigt werden. Um den Status quo zu erhalten, mussten sie außerdem fixiert werden. Zudem wurden sie permeabilisiert, um ein Eindringen des Farbstoffs in den Kern zu erlauben. Zu Beginn erfolgten drei Waschschrte mit PBS (Zentrifugation für 5 min, 300 g bei Raumtemperatur). Im nächsten Schritt wurden dann 100 µl Fixationslösung (4 % Paraformaldehyd) zu 100 µl der Zelllösung hinzugefügt und dann für 1 h unter kontinuierlicher Bewegung inkubiert. Nach der Fixation erfolgte ein weiterer Waschschrte. Die

Zellen wurden dann für 2 min mit der Permeabilisierungslösung (10 µl TritonX-100 in 10 ml 0,1 % Natrium-Citratlösung) auf Eis inkubiert.

Bevor mit der Färbung begonnen werden konnte, erfolgten zwei weitere Waschschriffe. Die dann hinzugegebene Reaktionslösung mit dem Farbstoff wurde frisch hergestellt, da dieser bei Lichtexposition schnell inaktiv wird. Hierzu wurden 50 µl Enzymlösung, welche das für die Reaktion notwendige Enzym Terminal-Deoxynucleotidyl-Transferase enthielt, zu 450 µl Labellösung (fluoresceingekoppelte Nukleotide) gegeben. Die Zellen wurden in 50 µl der TUNEL-Reaktionslösung resuspendiert und für 1 h im Brutschrank inkubiert. Für die Negativkontrolle wurden die Zellen in Labellösung ohne Enzymlösung resuspendiert. Für die Positivkontrolle wurde die Lösung vor der Färbung mit 50 µl DNase (*DNase1 recombinant*, Roche) versetzt und 10 min inkubiert, um DNA-Strangbrüche zu induzieren. Die DNase wurde mit zugehörigem Puffer in der Konzentration 3000 u/ml angesetzt. Im Anschluss erfolgten wieder zwei Waschschriffe. Die Zellen wurden dann mit 300 µl Höchstlösung (Verdünnung 1:5000) resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, um eine Kernfärbung zur Zellverifizierung zu ermöglichen. Hiernach folgten erneut drei Waschschriffe. 250 µl der gefärbten Zellen wurden dann in einen Well einer 96-Well-Platte gegeben und mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Excitationswellenlänge: 450-500 nm, Detektionswellenlänge: 515-565 nm) ausgezählt. Pro Well wurden drei Bilder gemacht und ausgezählt. Die positiven Zellen auf den Bildern der Fluoreszenzkamera und die Gesamtzellzahl der Höchstfärbung wurden ausgezählt und der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen an der Gesamtzellzahl (Apoptoserate) bestimmt. Aus den Apoptoseraten des operierten sowie des nicht operierten Beins wurde ein Ratio gebildet.

2.2.2.2 Vitalitätsassay: WST-8-Assay

Neben der Apoptoserate wurde auch die Vitalität der Myoblasten bestimmt. Indirekt lässt diese wiederum Rückschlüsse auf die Proliferation der Zellen zu. Diese Folgerung ist möglich, da die Vitalität der Zellen die Voraussetzung für die Proliferation darstellt. Hierfür wurde ein Assay auf Basis von Tetrazoliumsalzen (*Promokine Colorimetric Cell Viability Kit I*) verwendet. Dieser Assay wurde

gewählt, da er als Standard für diese Fragestellung angesehen werden kann^{76 77}, einfach in seiner Durchführung ist (vor allem parallel zu TUNEL- und FACS-Analyse) und nur wenige Zellen benötigt. Der Assay basiert auf der Reduktion des Tetrazoliums Salzes WST-8 zum orange gefärbten Formazan durch zelluläre Dehydrogenasen. Somit kommt es nur in vitalen Zellen durch die enzymatische Reaktion zum Farbumschlag. Für diesen Versuch wurden pro Ansatz 100.000 der isolierten Zellen verwendet. Diese wurden jeweils in 100 µl Myozytenmedium suspendiert und in die Wells einer 96-Well-Platte gefüllt. Jede Probe wurde im Dreifachansatz gemessen. Um Artefakte und Hintergrundstrahlung ausschließen zu können, dienten drei Wells, nur mit Myozytenmedium gefüllt, als Negativkontrollen. Zu den Proben wurden 10 µl der Reaktionslösung, die das Tetrazoliumsalz enthielt, hinzugegeben. Die Zellen inkubierten für 4 Stunden im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂). Nach der Inkubation wurde die Absorption des Farbstoffs mittels eines Photometers (iEMS) bei 450 nm gemessen. Die gemessene optische Dichte korreliert direkt mit der Anzahl vitaler Zellen.

2.2.3 Immunologische Assays: sFasL in plättchenarmem Plasma

Angenommen wurde, dass die Applikation von Nitrat die Apoptose- und Proliferationsraten beeinflusst. Einen möglichen Faktor, über den die Apoptoserate beeinflusst werden kann, stellt der Fas/FasL-Signalweg dar. Um die Rolle dieses Signalweges genauer zu untersuchen, erfolgte die Bestimmung des sFasL-Spiegels im plättchenarmen Plasma der Tiere. Hierfür wurde den Mäusen, die im Rahmen der Myoblastenisolation geopfert wurden, per kardialer Punktion mittels heparinierter Spritze Blut entnommen, das dann für 1 min bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert wurde. So erhielt man plättchenreiches Plasma ohne zelluläre Bestandteile. Dieses wurde bis zur Messung bei -20°C eingefroren. Am Messtag wurde das Plasma ein weiteres Mal zentrifugiert (13.000 g, 5 min, RT), um plättchenarmes Plasma zu erhalten.

Für die Bestimmung des sFasL-Spiegels wurde der *Quantikine Mouse Fas Ligand Immunoassay* verwendet. Dabei handelt es sich um einen quantitativen Sandwich-ELISA. Es werden zwei Antikörper verwendet, die beide spezifisch an

das nachzuweisende Antigen binden. Hierbei ist es wichtig, dass beide Antikörper an unterschiedlichen Stellen an das Antigen binden, da sie sich sonst gegenseitig behindern würden. Der erste Antikörper (*coating*-Antikörper) wird an eine feste Phase, eine spezielle 96-Well-Mikrotiterplatte, gebunden. Die Probe mit dem nachzuweisenden Antigen wird dann in die Wells gegeben und 1-2 h inkubiert. Während dieser Zeit bindet der an die Platte gebundene Antikörper das in der Probe vorhandene Antigen. Nach Ablauf der Inkubationsphase wird die Platte gewaschen. Die ungebundenen Bestandteile der Probe werden dadurch entfernt und zurück bleibt nur das am (*coating*-)Antikörper gebundene Antigen. Im nächsten Schritt wird ein Detektions- (*detection*-)Antikörper zugegeben, der ein anderes Epitop als der *capture*-Antikörper erkennt und an dessen Ende ein Enzym – meistens Meerrettichperoxidase (HRP, von engl. *horseradish*), alkalische Phosphatase (AP) oder seltener Glucoseoxidase (GOX) – gebunden ist. Dieser zweite Antikörper bindet ebenfalls an das Antigen und es entsteht der Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex, dem der Assay seinen Namen verdankt. Nach Vorbereitung der Lösungen des Kits und Erstellung der Standardkonzentrationen für eine Eichreihe nach Vorgaben des Kits wurden in den Wells der zum Kit gehörenden Platte (mit dem *coating*-Antikörper) jeweils 50 µl des *Assay Diluent*, einer gepufferten Proteinlösung, vorgelegt. Dann wurden 50 µl der Probe bzw. Kontrolle oder Standard hinzugefügt und für 2 h inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte ein Waschschrift: Die Flüssigkeit in den Wells wurde dabei verworfen und die Wells wurden fünfmal gründlich mit dem Waschpuffer ausgespült. Dann wurden pro Well 100 µl Konjugatlösung, die den mit Peroxidase gekoppelten Antikörper gegen FasL enthielt, hinzugegeben. Nach 2 h Inkubationszeit folgte ein zweiter Waschschrift. Nach Zugabe von 100 µl Substratlösung, die das Substrat für die Peroxidase, das zu einem Farbstoff umgesetzt wird, enthielt, folgte eine weitere 30-minütige Inkubationszeit. Die Reaktion wurde dann mit 100 µl Stopplösung, welche verdünnte Chlorige Säure enthielt, beendet. Die Absorption des Farbstoffs in den einzelnen Wells der Platte wurde nun innerhalb von 20 min gemessen (Wellenlänge 450 nm, Korrektur mit 540 nm). Mittels der Eichreihe konnte dann die Konzentration von FasL in den Proben bestimmt werden. Bei der Erstellung einer Eichreihe werden bekannte Konzentrationen gegen ihren zugehörigen Absorbtionswert aufgetragen und die Steigung berechnet. Mithilfe

dieser Steigung kann dann die Konzentration unbekannter Proben berechnet werden.

2.2.4 Chemilumineszenzanalyse von Nitrit und Nitrat

Zur Bestimmung der Konzentration von Nitrat und Nitrit im Futter der Mäuse wurde eine Messung mittels der Gasphasenchemilumineszenz durchgeführt (*chemiluminescence detector*, CLD) (siehe Abbildung 12). Bei dieser Methode reagiert NO spezifisch mit Ozon zu Stickstoffdioxid ($\text{NO} + \text{O}_3 \rightarrow \text{NO}_2^* + \text{O}_2$), das in einem angeregten Zustand vorliegt. Während der folgenden Relaxation wird Licht einer spezifischen Wellenlänge (1100 nm) emittiert, das detektiert wird. Da mit dieser Reaktion nur NO nachgewiesen werden kann, müssen die Metaboliten von NO (Nitrat und Nitrit) zuerst zu diesem reduziert werden, bevor eine Messung möglich ist. Für die Messung von Nitrat muss dieses zuerst mittels einer bakteriellen Reduktase zu Nitrit reduziert werden. Nitrit kann dann mittels einer Reduktionslösung weiter zu NO reduziert werden.

Für die Freisetzung von NO aus seinen Metaboliten wurde eine Reduktionslösung angesetzt (1,62 g Kaliumjodid, 0,57 g Iod, 15 ml entionisiertes Wasser, 200 ml Essigsäure). Diese Lösung diente zur Reduktion von Nitrit zu NO. In dem sauren Milieu, das die Essigsäure erzeugt, wird aus Nitrit ein Nitrosoniumion freigesetzt ($\text{NO}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NO}^+ + \text{H}_2\text{O}$). Dieses reagiert weiter mit dem Iodidion zu Nitrosyliodid ($\text{NO}^+ + \text{I}^- \rightarrow \text{ONI}$). Das Nitrosyliodid stellt nur einen Intermediärzustand dar und reagiert weiter zu NO ($2\text{ONI} \rightarrow 2\text{NO} + \text{I}_2$). Die Reaktionsprodukte werden vom Trägergas (Helium) durch eine Natronlauge (NaOH)-Falle zum Detektor transportiert. Die NaOH-Falle dient dazu, andere Stickstoffverbindungen zu entfernen, damit diese nicht zu einer Verfälschung der Messung führen^{79 80}.

Im Gegensatz zur reduktiven CLD kann mit der oxidativen CLD die Konzentration von NO-Häm bestimmt werden. Hier wird das NO durch eine Oxidation freigesetzt. Bei der oxidativen CLD wurde anstelle eines Reduktionsmittels (z. B. Trijodidlösung) ein Oxidationsmittel, nämlich Ferrocyanidlösung, verwendet. Außerdem wurden 100 µl eines Entschäumers (*Antifoam*) hinzugegeben. Die

Reaktion lief hier bei 37°C ab. Durch das Oxidationsmittel wurde das NO vom Myoglobin gelöst und so in der CLD messbar^{80 81 82}.

Das auf diese Weise freigewordene NO kann mittels des NO-Analysators gemessen werden. Die Aufzeichnung und Auswertung der Messung erfolgte mit dem Programm Chromstar 32. In diesem Programm wird die Freisetzung des NO im Verlauf der Zeit als Kurve dargestellt. Aus dem Integral dieser Kurve kann unter Zuhilfenahme einer Eichgeraden die Konzentration der Probe bestimmt werden (siehe Kapitel 2.2.4.2).

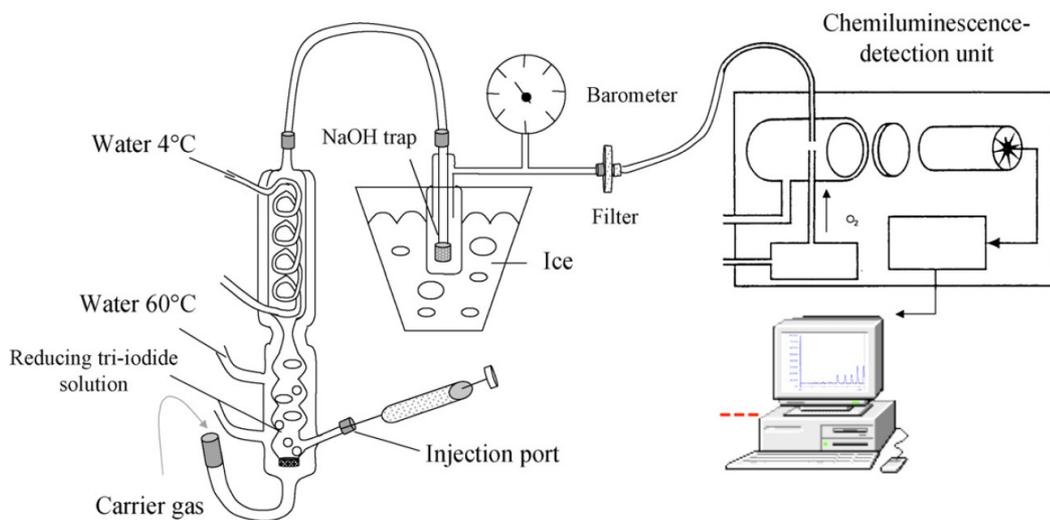


Abb. 12: Darstellung der Messanordnung der CLD⁸³. Das Trägergas (Helium) wird in den unteren Bereich des Reaktionsgefäßes eingeleitet, das mit der Reduktionslösung gefüllt ist. Über den Injektionsport wird die Probe zugegeben. Die Reaktionsprodukte werden vom Trägergas zur NaOH-Falle und von dort zum Detektor transportiert. Abbildung aus Grau et al.⁸⁴

2.2.4.1 Probenaufbereitung

Für die Bestimmung des Nitratgehalts aus dem Gewebe der Hinterläufe wurden die Proben für eine Stunde mit Nitratreduktaselösung bei Raumtemperatur inkubiert. Für diese Lösung wurden 680 µl Nitratreduktasestammlösung in 1320 µl Wasser verdünnt. Die Stammlösung wurde im Vorfeld aus 2 ml Nitratreduktase, 7 ml Tris, 4 ml G6P und 600 µl G6PDH angesetzt, aliquotiert und eingefroren, sodass bei Bedarf einzelne Aliquots verwendet werden konnten. Diese Mischung

wurde im Verhältnis 4:1 mit NADPH (1600 µl Nitratreduktase und 400 µmol NADPHI) gemischt. Nach der Inkubation der Proben wurden diese auf Eis gelagert, um ein weiteres Fortschreiten der Reaktion zu verhindern.

2.2.4.2 Bestimmung von Nitrat und Nitrit mittels Chemilumineszenzanalyse

Für die Messung des Nitratgehalts aus dem Gewebe der Hinterläufe wurde eine wässrige Eichreihe (0 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM) erstellt, die exakt wie die Proben vorbereitet wurde. Diese Eichreihe ist notwendig, um aus den folgenden Messungen der Proben die Konzentration des Nitrits bzw. des Nitrats bestimmen zu können. Bei der Eichreihe kann jedem Messwert eine klar definierte Konzentration zugeordnet werden. Durch Bestimmung der Steigerungsgrade durch die Messwerte der Eichreihe können entsprechend auch die eigentlichen Messwerte der Proben in eine Konzentration umgerechnet werden. Für jede Probe und jede Konzentration der Eichreihe erfolgte eine Dreifachbestimmung. Die Messbreite des Geräts wurde auf 500 ppb eingestellt, da in diesem Bereich die Messergebnisse für Nitrat erwartet werden. Mit einer Präzisionspritze wurden pro Messung 30 µl der Probe in das Reaktionsgefäß injiziert. Nach etwa einer Minute, also der Zeitspanne, bis das freigewordene NO den Detektor erreicht hat, steigt die gemessene NO-Konzentration steil an und fällt im Verlauf ebenso steil wieder ab – ein Ausschlag, der als *peak* bezeichnet wird. Nachdem sich die Nulllinie (*baseline*) wieder eingestellt hat, erfolgt die nächste Injektion. Aus dem Integral dieses Peaks konnte mithilfe der Eichreihe die Konzentration der Probe berechnet werden, da die Menge des entstandenen NO mit der zu Beginn der Aufbereitung vorhandenen Menge an Nitrat korreliert. Die Bestimmung des Integrals erfolgte mittels der Chromstar 32-Software. Bei der Auswertung wird aus den Messwerten der Eichreihe eine Eichgerade erstellt. Deren Steigung ermöglicht die Umrechnung der Messwerte in molare Konzentrationen.

Für die Messung des Nitritgehalts wurde ebenfalls eine wässrige Eichreihe (0 nM, 50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM) erstellt. Der prinzipielle Ablauf der Messung ist identisch zum Vorgehen bei der Nitratmessung. Abweichungen bestehen lediglich

bei der Menge der injizierten Probenmenge (hier 100µl) sowie bei der Einstellung der Messbreite (30 ppb).

2.2.4.3 Bestimmung von NO-Häm, Nitrat und Nitrit aus Gewebehomogenat der Hinterlaufmuskulatur

Für die Messung des Nitrats bzw. Nitrits wurden folgende Lösungen angesetzt: Pufferlösung (0,625 g NEM, 2,5 ml 0,5 M EDTA, 50 ml 0,9 % NaCl-Lösung), Ferricyanidlösung (1,646 g 0,05 M Potassium Hexacyanoferrat, 100 ml PBS, pH mit NaOH auf 7,5 eingestellt), 5 % Sulfanilamidlösung (0,5 g Sulfanilamid, 1,3 ml 25 % HCL, 8,7 ml Wasser) und Quecksilberchloridlösung (0,1 g 0,2 % HgCl₂, 5 ml 0,9 % NaCl-Lösung). Die letzten beiden Lösungen wurden lichtgeschützt gelagert. Für die Untersuchung wurden Muskelgewebe des ischämischen Beins und des Kontrollbeins wie oben beschrieben (siehe Kapitel 2.2.4.3) abpräpariert und gewogen. Das Gewebe wurde im Verhältnis 1:4 mit der Pufferlösung vermischt und homogenisiert.

Ohne weitere Vorbereitung erfolgte die Nitritmessung nach der oben beschriebenen Methode.

Für die Messung von NO-Häm mittels der oxidativen CLD wurde den Proben 100 µl Sulfanilamid zugesetzt. Abgesehen davon erfolgte die Messung analog zur Messung von Nitrat (siehe Kapitel 2.2.4.2). Für die Nitratmessung aus dem Muskelgewebe wurde die Probe entsprechend dem üblichen Vorgehen (siehe Kapitel 2.2.4.1) vorbereitet.

2.3 Statistik

Die Ergebnisse der Versuche wurden dem D`Agostino-Pearson-Test auf Normalverteilung unterzogen. Bei Normalverteilung wurde die Signifikanz der Ergebnisse mit dem t-Test oder der ANOVA bestimmt. Bei nonparametrisch verteilten Daten wurde der Mann-Whitney- bzw. der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Arithmetischer Mittelwert und Standardabweichung sind angegeben. Für die Berechnungen wurden die Programme Excel (Microsoft, Office XP) und GraphPadPrism (GraphPad Software, Version 5) verwendet. Die Graphiken

wurden mit Origin (Origine Lab,Version 7) oder GraphPadPrism (GraphPad Software, Version 5) erstellt.

2.4 Materialien

Tabelle 1: Auflistung verwendeter Materialien

Name	Firma	Ort	Land
Chemikalien			
Potassium hexacyanoferrat	Sigma	St.Louis , MO	USA
Sulfanilamid	Sigma	St.Louis , MO	USA
Dulbeccos Phosphate bufferd saline	PAA	Pasching	BRD
Isotonische NaCl	Delta select	München	BRD
HeparinNatrium	Ratiopharm	Ulm	BRD
Antifoam SE-15	Sigma	St.Louis , MO	USA
Quecksilberchlorid	Fluka	Buchs	BRD
Xylazin 2 %	Medistar	Holzwickide	BRD
Ketanest S	Pfizer	Berlin	BRD
Betaisodonna-Lösung	Mundipharma	Limburg/Lahn	BRD
2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide	Cayman Biochemicals	Ann Arbor,MI	USA
Urethan 99 %	Sigma	St.Louis ,MO	USA
Forene (Isoflurane)	Abbot	Wiesbaden	BRD
Dulbecco's Modified Eagle Medium	PAA	Pasching	BRD
Ham's Nutrient Mixture 10	PAA	Pasching	BRD
Temgesic	Essex-Pharma	München	BRD
Prolene 4.0	Ethicon	Norderstedt	BRD
Modified Eagle Medium	PAA	Pasching	BRD
Pronase	Calbiochem	San Diego,CA	USA
Hepespuffer (1M)	Sigma	St.Louis ,MO	USA
Seraflex 7.0	Serag-Wiessner	Naila	BRD
Perma-Hand-Silk	Ethicon	Norderstedt	BRD
Horse Serum	Gibco	Carlsbad,CA	USA
Fetal Calf Serum	Lonza	Basel	CH
L-Glutamin	Life Technologies	Carlsbad,CA	USA
Trypsin	PAA	Pasching	BRD
Trypanblau	Gibco	San Diego ,CA	USA
Dimethylsulfoxid	Merck	Darmstadt	BRD
Kollagen	Sigma	St.Louis , MO	USA

Penicillin/Streptomycin	PAA	Pasching	BRD
DNase 1 recombinant	Roche Diagnostics	Mannheim	BRD
In situ Cell Death Detection Kit	Roche Diagnostics	Mannheim	BRD
Promokine Colorimetric Cell Viability Kit I (WST-8)	PromoCell	Heidelberg	BRD
Quantikine Mouse FasL Immunoassay	R&D Systems	Minneapolis,MN	USA
Natriumnitrit	Merck	Darmstadt	BRD
Natriumnitrat	Merck	Darmstadt	BRD
Kaliumiodid	Merck	Darmstadt	BRD
Joidid 99,8 %	Sigma	St.Louis , MO	USA
Essigsäure 100 %	Roth	Karlsruhe	BRD
Nitratreduktase	Roche	Mannheim	BRD
Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat	Sigma	St.Louis , MO	USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid	Roth	Karlsruhe	BRD
Glucose-6-Phosphatase	Roche	Mannheim	BRD
Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase	Roche	Mannheim	BRD
Ethanol, vergällt	Fischar	Saarbrücken	BRD
Myocyten Primär Ak alpha7-Integrin	antikörper-online	Aachen	BRD
Myocyten Sek AK: anti-mouse IgG1	BD	Franklin Lakes, NJ	USA
GIBCO® Mouse Embryonic Fibroblasts (Irradiated)	Gibco	Carlsbad, CA	USA
PE Labeled Anti-Mouse Integrin α7	MBL	Woburn, MA	USA
Geräte und Instrumente			
Mikro 20 Zentrifuge	HettichLab	Tuttlingen	BRD
Rotina 35 R	HettichLab	Tuttlingen	BRD
Spritzen	BD	Franklin Lakes, NJ	USA
IK MS 1 Mikroshaker	IKA	Staufen	BRD
Chirurgische Instrumente	FST	Bad Oeynhausen	BRD
Chirurgische Instrumente	Äskulap	Tuttlingen	BRD
Beatmung Penton	Sigma	St.Louis , MO	USA
Pipetten	Eppendorf	Hamburg	BRD
Skalpell	Feather	Osaka	JP
Finnpipetten	Thermo Scientific	Waltham, MA	USA
Reaktionsgefäße	Greiner	Kremsmünster	BRD
Op Mikroskop MZ95	Leica	Wetzlar	BRD
CLD Modell CLD 88 NO e	Eco Physics	Schweiz	CH

Objektträger Super-frost Plus	Menzel-Gläser	Braunschweig	BRD
iEMS Reader MF	Labsystems	Helsinki	FIN
Wasserbad	GFL	Burgwedel	BRD
Mikroskop 090135-001	Leica	Wetzlar	BRD
Flowbench Herasafe	Thermo Scientific	Waltham, MA	USA
Hera cell 240	Thermo Scientific	Waltham, MA	USA
Falcon Cell Strainer	BD	Franklin Lakes, NJ	USA
Cellstar Culture Flask	Greiner	Kremsmünster	BRD
Petri-Schalen	BD	Franklin Lakes	USA
Op Mikroskop MS5	Leica	Wetzlar	BRD
PeriScan PIM 3 System	Perimed	Stockholm	S
Tesa-Klebestreifen	Tesa	Hamburg	BRD
Durapore	3M	Neuss	BRD
FACSCanto™ flow cytometer	BD	Franklin Lakes, NJ	USA
6-Well-Platte	Greiner	Kremsmünster	BRD
96-Well-Platte	Greiner	Kremsmünster	BRD
CRL-1772™ C2C12	ATCC	Manassas, VA	USA
DMI 4000B Mikroskop	Leica	Wetzlar	BRD
DM RX Mikroskop	Leica	Wetzlar	BRD
PS-Styrol FACS Röhrchen	BD	Franklin Lakes, NJ	USA
Software			
LPDIWin 3.1	Perimed	Stockholm	S
Origin 7	Origin Labs	Northampton, MA	USA
Office XP	Microsoft	Washington	USA
GraphPadPrism 5	GraphPad Software	La Jolla	USA
Chromstar 32	SES GmbH	Bechenheim	BRD

3 Ergebnisse

3.1 Hinterlaufmodell und Laserdopplerflussmessung

3.1.1 Etablierung des Hinterlaufmodells

Die Etablierung des Modells umfasste die Auswahl der Versuchstiere, die OP-Technik, die Messung der Perfusion, die Myoblastenisolation, Untersuchungen der isolierten Myoblasten und die Bestimmung von löslichen FasL.

Insbesondere die Perfusionsmessung mittels Laserdopplerflussmessung bedurfte im Rahmen der Etablierung aufgrund der Vielzahl möglicher Störfaktoren besonderer Aufmerksamkeit. Dabei wurden folgende Parameter analysiert:

- (1) Positionierung: Beide Beine der Maus müssen so fixiert werden, dass die vollständige Darstellung der Perfusion des kompletten Beins möglich ist. Die Messung muss reproduzierbar und für das linke und rechte Bein vergleichbar sein.
- (2) Effekt einer Wärmeplatte: Es muss evaluiert werden, ob eine Änderung der Oberflächentemperatur des Tieres messbare Auswirkungen auf die Perfusion hat.
- (3) Position der *region of interest* (ROI, Auswertungsbereich): Das optimale Areal für eine reproduzierbare Messung muss etabliert werden.
- (4) Auflösung: Es muss der optimale Kompromiss zwischen Dauer und Detailreichtum (Auflösung) der Messung bestimmt werden, da eine höhere Auflösung eine längere Messdauer bedingt. Eine Verlängerung der Messdauer wiederum kann eine Verfälschung der Messung (z. B. durch Auskühlen) nach sich ziehen.
- (5) Varianz durch Versuchstiere und Experimentator: Um die methodische Varianz von der biologischen unterscheiden zu können, müssen a) sowohl die Varianz zwischen den Mäusen (inter-) als auch die Varianz zwischen den Messungen der gleichen Maus (intra-) bestimmt werden. Genauso müssen b) die Interobserver- und die Intraobservervarianz verschiedener Experimentatoren errechnet werden.

Um die Fragen nach diesen Parametern zu beantworten, wurden zwei Messreihen durchgeführt. Aufgrund relativ hoher Variation wurden bei jeder Einzelmessung drei Bilder angefertigt, damit der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet werden konnten.

Die erste Messreihe umfasste drei Mäuse. Die Messungen wurden über drei Tagen verteilt. Hierbei wurden die Fragestellungen 1-5a (Positionierung, Effekt der Wärmeplatte, Position des Auswertungsbereichs, Auflösung, Varianz durch Versuchstiere) bearbeitet. Alle Untersuchungen wurden vom gleichen Untersucher durchgeführt. Tabelle 2 listet die Verteilungen der einzelnen Messungen auf die Versuchstiere sowie auf die Untersuchungszeitpunkte auf. Jede Messung setzt sich aus 3 Einzelbildern zusammen.

Tabelle 2: Übersicht der Messzeitpunkte der ersten Messreihe

Versuchstier	Anzahl der Messungen		
	1.Tag	2.Tag	3.Tag
Maus I	6	3	1
Maus II	3	6	1
Maus III	2	keine Messung	1

Die Messungen am ersten Versuchstag dienten vor allem der Etablierung der Parameter 1-4 (Positionierung, Effekt der Wärmeplatte, Position des Auswertungsbereichs, Auflösung). Die Verteilung der weiteren Messung auf verschiedene Tage ist notwendig, um die Schwankungen zwischen verschiedenen Zeitpunkten beim gleichen Versuchstier unterscheiden zu können. Die Verwendung von drei Versuchstieren ermöglichte den Vergleich zwischen den einzelnen Tieren (zu Parameter 5a [Varianz durch Versuchstiere]).

Die zweite Messreihe (Parameter 5b [Varianz durch Experimentator]) umfasste 18 Einzelmessungen, bei denen zwei Experimentatoren die Messung der Perfusion an drei Mäusen an drei Tagen durchführten. Für die Parameter 1-5a (Positionierung, Effekt der Wärmeplatte, Position des Auswertungsbereichs, Auflösung, Varianz durch Versuchstiere) wurde bereits die in der ersten

Messreihe etablierte Vorgehensweise verwendet. Beide Experimentatoren führten nacheinander die gleichen Messungen durch.

Tabelle 3: Übersicht der Messzeitpunkte der zweiten Messreihe

Experimentator	Versuchstier	Versuchszeitpunkt		
		Tag 1	Tag 2	Tag 3
Experimentator 1	Maus 1	1	1	1
	Maus 2	1	1	1
	Maus 3	1	1	1
Experimentator 2	Maus 1	1	1	1
	Maus 2	1	1	1
	Maus 3	1	1	1

Zur Bestimmung der optimalen Lagerung der Mäuse wurde die Position der Mäusebeine variiert. Ziel dieses Versuchsteils war es, ein reproduzierbares Vorgehen zur Lagerung der Mäuse und ihrer Fixierung zu finden, bei der möglichst wenige Messartefakte auftreten. Untersucht wurden die Unterschiede zwischen unfixierten gestreckten und angewinkelten Beinen in Bezug auf ihre Anfälligkeit für Artefakte. Ebenso mussten die verschiedenen Fixierungstechniken in Bezug auf Reproduzierbarkeit, Reduktion der Messartefakte etc. evaluiert werden. Für die Fixierung der Mäuse waren bestimmte Materialien (Klebestreifen) notwendig, die ebenfalls verglichen werden mussten. Verglichen wurden hier die Materialien Tesa-Klebestreifen und DuraPore M3. Die Klebestreifen für die Pfote wurden zu Rollen geformt, sodass die Klebestreifen sowohl an der Pfote als auch an der Unterlage festklebten. DuraPore M3 wies hier die besten Klebeeigenschaften auf. Der Grad der Abwinklung der Beine variierte mit Zwischenstufen zwischen komplett gestreckt und komplett gebeugt. Die locker gestreckte Position stellte sich hier als am besten geeignet dar, weil die Beine hier gut dargestellt werden konnten und eine optimale Reproduzierbarkeit gegeben war. Ein Abknicken der Beine führte zu Artefakten im Bereich der Gelenke.

Als zweiter Parameter erfolgte die Evaluation der Verwendung einer Wärmeplatte. Hier zeigte sich zwar eine Zunahme der Perfusion um 8 % nach Behandlung mit der Wärmeplatte, allerdings liegt diese Zunahme im Rahmen der zuvor

beschriebenen Varianz der Methode. Somit bestand kein relevanter Unterschied zwischen der Verwendung der Platte und dem Verzicht auf eine Wärmeplatte.

Als dritter Parameter wurde die Platzierung des Auswertungsbereichs (*region of interest*, ROI) untersucht. Bei der Festlegung der ROI erfolgte die Auswertung derselben Messung mit verschiedenen ROI. Dabei entsprach die ROI entweder dem kompletten Bein oder nur den Füßen (und zugehörigen Verhältnissen zwischen beiden Extremitäten). Für die späteren Versuche wurde nur die ROI für das komplette Bein verwendet, da die Varianz bei der größeren, mehr proximal gelegenen ROI deutlich kleiner ist. Die Messung der isolierten Füße zeigte durchgehend eine größere Abweichung (im Vergleich ca. 30 % erhöht) als die Messung der kompletten Beine. Die ROI wurden so gewählt, dass auch die Perfusion im Bereich der Iliacagefäße mit erfasst wurde.

Der vierte Parameter war die Auflösung und Dauer der Messung. Hier wurden die verschiedenen möglichen Auflösungen (*low*, *medium*, *high* und *very high*) in Bezug auf die Dauer und Auswertbarkeit der Messung der Bilder verglichen. Hierbei benötigte eine höhere Auflösung eine deutlich längere Zeitspanne pro Bild. Da pro Einzelmessung drei Bilder aufgezeichnet werden, um den Mittelwert bestimmen zu können, stellt die damit nötige Verlängerung der Narkose bei höherer Auflösung einen relevanten Faktor dar. Bei sehr niedrigen Auflösungen war die Dauer pro Bild zwar kürzer, die entstandenen Bilder waren dafür allerdings schwieriger auszuwerten. Als Ergänzung musste die Entfernung zwischen Objekt und Messkopf evaluiert werden, da eine Erhöhung des Abstands auch die Größe des im Bild erfassten Bereiches vergrößerte. Die Auflösung *high* stellt einen akzeptablen Kompromiss zwischen Dauer der Messung (ca. 2 min) und Qualität des Messbilds dar. Für den Abstand stellte sich die Höhe von 20 cm als Optimum heraus.

Für den fünften Parameter, die Varianz durch Versuchstiere und Experimentator, musste bestimmt werden, wie stark sich die Ergebnisse zwischen einzelnen Mäusen, verschiedenen Experimentatoren und verschiedenen Messzeitpunkten unterschieden. Bei den Messungen zur Etablierung der Perfusionsmessung per LDPI wurden folgende, in Tabelle 4 aufgeführte Variationskoeffizienten bestimmt: Zur Beantwortung besagter Fragestellung erfolgte die Messung der Perfusion in den Hinterläufen der Versuchstiere sowohl im Vergleich zwischen den

Versuchstieren als auch im Vergleich zwischen Messungen am gleichen Tag, Messungen des gleichen Tieres an verschiedenen Tagen und unterschiedlichen Experimentatoren. Betrachtet wurden die Varianzen zwischen den Versuchstieren (Intermaus), innerhalb der Messungen eines Versuchstiers (Intramaus), zwischen den Messungen von 2 unterschiedlichen Experimentatoren (Interexperimentator) sowie innerhalb der Messungen eines Experimentators (Intraexperimentator 1 und 2) und zwischen verschiedenen Messungen am gleichen Tag (Intratag) bzw. zwischen denen verschiedener Tage (Intertag). Aus den Perfusionsmessungen konnten das arithmetische Mittel sowie die zugehörige Standardabweichung der jeweiligen Messreihe bestimmt werden. Aus diesen wurde dann die Varianz berechnet (siehe Tabelle 4). Dies ermöglicht die Abschätzung, ob Messwerte der späteren Versuche auf die Intervention zurückgehen oder nur im Bereich der normalen Messabweichungen liegen.

Tabelle 4. Variationskoeffizienten der LDPI.

Intramaus	Beine	7,50 %
	Füße	10,5 %
Intermaus	Beine	7,0 %
	Füße	10,0 %
Intratag	Beine	7,5 %
	Füße	10,0 %
Intertag	Beine	8,5 %
	Füße	11,0 %
Intraexperimentator (1)	Beine	15,0 %
	Füße	21,0 %
Intraexperimentator (2)	Beine	8,0 %
	Füße	13,0 %
Interexperimentator	Beine	12,0 %
	Füße	18,0 %

Die Bestimmung der Variationskoeffizienten zwischen den einzelnen Messungen derselben Maus (Intramaus) lag bei 7,5 % (Beine) bzw. 10,5 % (Füße). Dies bedeutet, dass bei der wiederholten Messung des gleichen Versuchstiers auch ohne weitere Interventionen eine Varianz von 7,5 % zu erwarten ist. Analog ergaben sich im Vergleich zwischen den Versuchstieren (Intermaus) Variationskoeffizienten von 7,0 % (Beine) bzw. 10,0 % (Füße). Im Vergleich der Messungen am gleichen Tag (Intratag) ergaben sich Koeffizienten von 7,5 %

(Beine) bzw. 10,0 % (Füße). Zwischen den Tagen (Intertag) wurden Variationskoeffizienten von 8,5 % (Beine) bzw. 11,0 % (Füße) ermittelt.

Da es sich bei der Laserdopplerflussmessung um eine stark untersucherabhängige Methode handelt, war es notwendig, auch die Varianzen der Experimentatoren sowie die Abweichung zwischen den Experimentatoren zu bestimmen. Beim ersten Experimentator ergaben sich Koeffizienten von 15,0 % (Beine) bzw. 21,0 % (Füße), beim zweiten Experimentator von 8,0 % (Beine) bzw. 13,0 % (Füße). Zwischen den Experimentatoren (Interexperimentator) wurde ein Variationskoeffizient von 12,0 % (Beine) bzw. 18,0 % (Füße) bestimmt. Deshalb wurden im Folgenden die Messungen von einem Experimentator durchgeführt und ausgewertet, wobei immer die Perfusion des ganzen Beins aufgezeichnet wurde.

Aus den obigen Versuchen wurde das folgende Protokoll erstellt, mit dem die Beine der Maus reproduzierbar untersucht wurden und die Varianz minimiert werden konnte:

Die Versuchstiere wurden für die Messung mit 45 mg/kg Ketamin und 10 mg/kg Xylazin i.p. narkotisiert. Die Fortführung und Vertiefung der Narkose erfolgte mit Isoflurane p.i.

Nach der Enthaarung der Beine und des Unterleibs der Mäuse wurden die Mäuse mit abgespreizten Beinen auf einer nicht reflektierenden Unterlage fixiert. Als nicht reflektierende Unterlage diente entweder die dem Periscan PIM 3-System zugehörige Kunststoffmatte oder ein mit grünem Operationstuch überzogenes Stück Karton. Diese Maßnahmen führten zu einer Reduktion von Messfehlern und Artefakten in der Messung, da andere Unterlagen vom Messgerät teilweise fälschlicherweise als perfundierte Areale detektiert wurden.

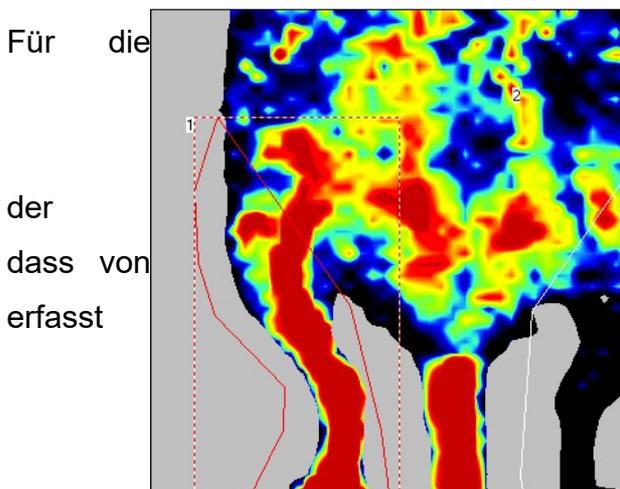
Die Pfoten der Hinterläufe sowie der Schwanz wurden mittels kleiner Klebestreifenrollen aus DuraM3 fixiert (siehe Abbildung 13). Durch diese Positionierung der Beine konnte auch die Perfusion im Bereich der Gelenkbeugen gemessen werden (siehe Abbildung 14). Die Klebestreifenrollen tauchten durch die Positionierung nicht als Artefakte in der Messung auf.



Abb. 13: Aufzeichnung des Messareals und der Fixierung der Versuchstiere. Der Laser tastet ein Areal ab, das großzügig Hinterläufe und Unterbauch der Maus einschließt. Das Areal wird durch die weißen Ecken und das Kreuz im Zentrum markiert. Die Beine, die Leisten und der Unterbauch der Maus wurden chemisch enthaart. Die Füße wurden mit dem Spann zur Unterlage weisend möglichst unsichtbar mit Klebestreifen befestigt.

Für die Messung wurden das LPDI-Gerät sowie der zugehörige Computer eingeschaltet und der Kopf des Messgeräts auf 20 cm Entfernung zu der zu messenden Fläche eingestellt. Die Messfläche betrug 50x60 mm. Dann erfolgte die Aufnahme von 3 Bildern in der Auflösung *high*. Die Intensität wurde auf 0,30 (arbiträre Einheit des Messgeräts) eingestellt. Bei diesen Einstellungen konnten sowohl beide Beine im Messbereich platziert als auch die Messzeit auf eine möglichst kurze Zeit begrenzt werden. Zu lange Messzeiten führten über ein zunehmendes Auskühlen der Mäuse zu Abweichungen in der Messung.

Um ein solches Auskühlen der Maus zu verhindern, wurde das Tier zum Aufwachen nach der Narkose vor ein Infrarotlicht gesetzt.



Auswertung wurden die gespeicherten Messungen mit dem Programm LDPIWin 3.1 geöffnet und Auswertungsbereich so gewählt, beiden Beinen der gleiche Bereich wurde.

Abb. 14: Graphische Darstellung der Perfusion in Falschfarben. Die Graphik zeigt das gesamte vom Scanner erfasste Areal. Das Beispiel stammt von einer Messung direkt nach der Operation. Rote Areale zeigen Bereiche hoher Perfusion an, blaue bis schwarze Areale bedeuten niedrige bis keine Perfusion. So ist das operierte Bein (rechte Seite des Bildes) klar vom Kontrollbein (linke Seite des Bildes) zu unterscheiden. Die weiße bzw. rote Linie um die Beine definiert den jeweiligen Auswertungsbereich (*region of interest, ROI*), der rechts und links gleich groß sein sollte.

Aus den 3 Bildern wurde das arithmetische Mittel der Perfusion berechnet und dann das Verhältnis zwischen den beiden Beinen bestimmt². Nach der präoperativen Messung erfolgte die operative Ligatur der Arteria femoralis (siehe Kapitel 2.1.1.2).

Nach der Ligatur des Gefäßes erfolgte eine Wiederholung der Messungen im postoperativen Verlauf bis zum 7. Tag (unmittelbar postoperativ, 1. Tag postoperativ, 3. Tag postoperativ, 7. Tag postoperativ unmittelbar vor Tötung des Versuchstiers zur Materialgewinnung). Diese Versuchsdauer reichte aus, um eine Rückkehr der Perfusion beobachten zu können. Eine weitere Verlängerung der Nachbeobachtungszeit brachte keinen Vorteil.

Im postoperativen Verlauf traten Nekrosen im Bereich des operierten Beins sowie eine konsekutive Verkürzung desselben auf. In diesem Fall musste die ermittelte Perfusion mit einem Korrekturfaktor versehen werden. Da die Software die durchschnittliche Perfusion berechnete, wurde postoperativ für das operierte Bein

nur der gut durchblutete Stumpf in die Berechnung eingezogen (siehe Abbildung 15), nicht aber die Tatsache, dass ganze Teile fehlten. Das durch die Ischämie abgestorbene Bein verkümmerte oder wurde vom Messgerät nicht mehr erfasst („grau“ in der Abbildung 15). Die Software erlaubte die Darstellung der Messwerte für jeden einzelnen Messpunkt. Diese wurden für das Kontrollbein und das operierte Bein dargestellt. Die Differenz an Punkten zwischen Kontrollbein und operiertem Bein wurden dann dem operierten Bein zur Normierung mit einem Perfusionswert „null“ hinzugefügt. Nun wurde die durchschnittliche Perfusion wieder aus dem gleich großen Auswertungsbereich berechnet.

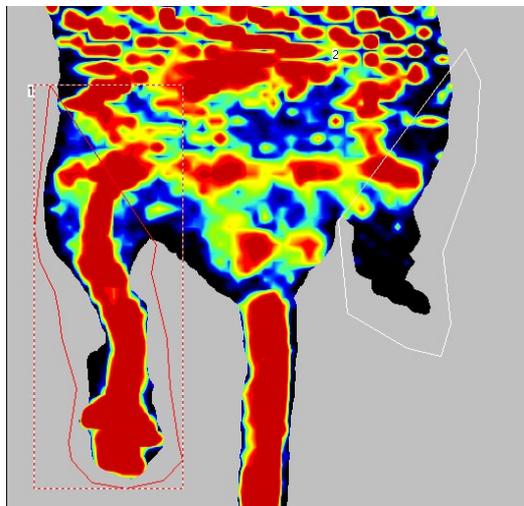


Abb. 15: Bild einer Messung 14 Tage postoperativ. In den Tagen nach der Operation kam es zum unterschiedlich ausgeprägten Verlust des operierten Beins. Die nekrotischen Anteile konnten entsprechend nicht mehr in die Berechnung mit eingehen. Eine mathematische Korrektur erlaubte trotzdem eine sinnvolle Ratioberechnung.

Korrektur der Perfusion bezüglich der Nekrosen (Beispielrechnung)

Bei der postoperativen Perfusionsmessung ergeben sich ein Wert von 0,9 im Kontrollbein und ein Wert von 0,5 im OP-Bein. Aus diesen Werten kann die zugehörige Ratio (Perfusion im OP-Bein / Perfusion im Kontrollbein) berechnet werden:

Schritt 1

$$0,5/0,9 = 0,56 \text{ oder als Prozentwert } 56 \%$$

Korrektur bei Nekrosen

Zum Ausgleich der Nekrosen im OP-Bein ist die Bestimmung der Anzahl der Bildpunkte von OP-Bein und Kontrollbein notwendig. Die Differenz zwischen der Anzahl der Bildpunkte zwischen den beiden Beinen entspricht dem nekrotischen Teil des OP-Beins.

Schritt 2:

Kontrollbein: 60 Bildpunkte mit einer Perfusion von 0,9

OP-Bein: 40 Bildpunkte mit einer Perfusion von 0,5

→ durch die Nekrose sind 20 Bildpunkte weniger vorhanden
(entsprechen dem postoperativ fehlenden Anteil des Beines)

Diese Differenz muss für die weitere Berechnung berücksichtigt werden, indem jedem der "fehlenden" Bildpunkte eine Perfusion von 0 zu geordnet werden muss. Ohne diese Korrektur gehen "fehlende" Bildpunkte nicht in die Berechnung ein, was zu einer falsch hohen Perfusion führt.

Schritt 3

OP-Bein: $(40 \times 0,5 + 20 \times 0) / (60 \times 0,9) = 0,370$

Durch diese Berechnung ergibt sich als Ratio zwischen OP-Bein und dem Kontrollbein eine korrigierte Perfusion:

korrigierte Perfusion: $0,37/0,9 = 0,411$ oder als Prozentwert 41,1 %

3.1.2 Perfusion des Hinterlaufs, präoperativ und im postoperativen Verlauf

Nach Etablierung des unter 3.1.1 beschriebenen Protokolls wurde der Einfluss einer Gabe von Nitrat auf die Perfusion im Hinterlaufmodell untersucht.

Die Versuchstiere (NMRI-Stamm, 2-3 Monate, männlich) erhielten entweder mit Nitrat (1 g/L) angereichertes Trinkwasser 1 Woche vor der Operation sowie für 1 Woche nach der OP oder im Fall der Kontrollgruppe Trinkwasser ohne diesen

Zusatz. Als Zusatzversuch erhielt eine Gruppe von Tieren Nitrat + cPTIO (siehe Kapitel 2.1.1.3).

Präoperativ wurde eine Perfusion von durchschnittlich $99\pm 9\%$ (Ratio zwischen der Perfusion in beiden Beinen der Maus) gemessen. Postoperativ wurde bei allen operierten Tieren eine deutliche Verminderung der Perfusion beobachtet. Diese fiel auf durchschnittlich $12\pm 3\%$ ($n=20$). Wenn es nach der Operation nicht zu einem Abfall der Perfusion (dargestellt als Ratio zwischen OP-Bein und Kontrollbein) auf unter 20% kam, wurde die Operation als Fehlschlag gewertet und das betreffende Versuchstier nicht in die weiteren Untersuchungen eingeschlossen. Der Unterschied zwischen der präoperativen und der postoperativen Perfusion ist signifikant (Abfall von $99\pm 9\%$ auf $12\pm 3\%$ $***$, $p<0,0001$, $n=20$). Im Verlauf von sieben Tagen konnte bei allen Gruppen eine Verbesserung der Perfusion, in unterschiedlicher Höhe abhängig von der Gruppenzugehörigkeit, beobachtet werden (siehe Abbildung 16). Die Qualität der Regeneration nach sieben Tagen war abhängig von der Gabe von Nitrat (siehe Abbildung 17 A). Die Nitratgruppe zeigte von den operierten Gruppen mit $78\pm 17\%$ die höchsten Werte auf, gefolgt von der cPTIO-Gruppe mit $71\pm 8\%$. Die niedrigsten Werte wurden in der Gruppe der unbehandelten Tiere mit $56\pm 18\%$ gemessen. Ein ANOVA-Test mit anschließendem Bonferroni-Post-Test wies einen signifikanten Unterschied zwischen der Nitratgruppe und der Kontrollgruppe nach (siehe Abbildung 17 B) ($**p<0,001$).

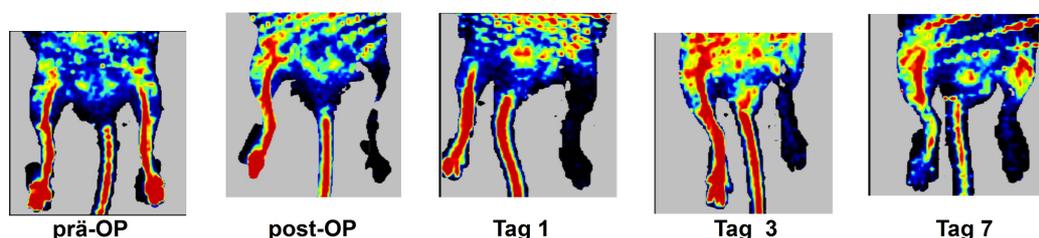


Abb. 16: Perfusion muriner Hinterläufe im Verlauf einer Woche nach der Hinterlaufoperation. Auf den Abbildungen sind sowohl der Ausgangszustand als auch die Perfusion unmittelbar nach der Operation sowie die Rückkehr der Perfusion im Verlauf erkennbar, die das präoperative Niveau allerdings nicht wieder erreichte. Exemplarisch dargestellt ist ein Tier der Nitratgruppe. Die Stärke der Perfusion ist in Falschfarben dargestellt (rot: hohe Perfusion;

schwarz: keine Perfusion). Diese ist proximal ausgeprägter als distal. Die Regeneration der Perfusion im Hinterlauf beginnt proximal. (Vgl. auch ¹⁰⁰)

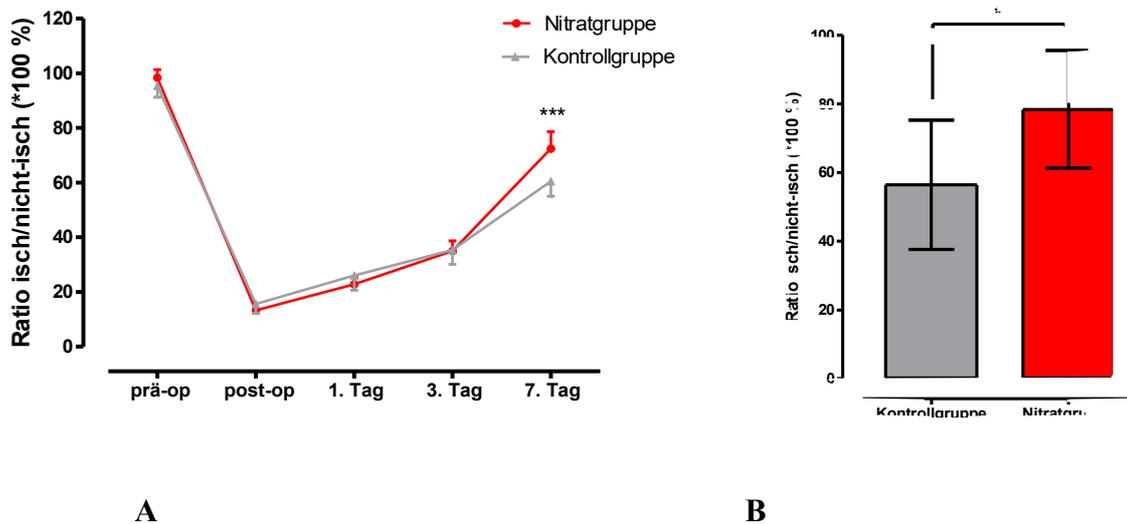


Abb. 17: Einfluss der Nitratgabe auf die Perfusion im ischämischen Hinterlauf. Dargestellt wird das Verhältnis der Perfusion zwischen dem ischämischen und dem nicht ischämischen Bein (als Prozentangabe). Verglichen wurde die Perfusion im Verlauf bis zum 7. postoperativen Tag zwischen den verschiedenen Gruppen (A). Bei allen Gruppen wurde ein Abfall der Perfusion auf 12 ± 3 % beobachtet. Im Verlauf stieg die Perfusion aller Gruppen wieder an.

In B wird die Perfusion nach sieben Tagen dargestellt. Die Regeneration der Perfusion in der Nitratgruppe war um 22 % höher als die in der Kontrollgruppe. Ein t-Test zeigte einen signifikanten Unterschied ($p=0,03$) zwischen der Nitratgruppe (78 ± 17 %) und der Kontrollgruppe (56 ± 18 %) auf. (Vgl. auch ¹⁰⁰)

3.2 Isolation von Myoblasten

3.2.1 Etablierung der Myoblastenisolation

Bevor die Myoblasten aus dem Hinterlauf untersucht werden konnten, bedurfte es zuerst einer Etablierung der Isolationstechnik, um sicherzustellen, dass eine ausreichende Anzahl vitaler Myoblasten isoliert werden konnte. Bei der Etablierung der Myoblastenisolation aus murinen Hinterläufen wurden fünf Parameter getestet:

- (1) Inkubationsdauer des Proteaseverdau (30 min und 60 min).
- (2) Art der Protease für den Verdau (Pronase, Kollagenase, Dispase).
- (3) Konzentration der Protease (0,01 % bzw. 0,1 % Endkonzentration).
- (4) Zahl der ausgesäten Zellen bei der Anreicherung (1,5 oder 10 Mio. Zellen).
- (5) Dauer der Anreicherung (60 min und 120 min).

Als Ergebnis konnte folgendes Protokoll etabliert werden: 0,1 % Pronase als Protease für einen 60-minütigen Verdau, als Dauer der Anreicherung 60 min und eine Aussaatdichte von 10 Mio. Zellen/75 cm² (75 cm² entsprechen der Fläche einer Petrischale mit einem Durchmesser von 10 cm) (siehe Abbildung 18). Nur mit Pronase als Verdau löste sich eine ausreichende Anzahl vitaler Zellen. Die Qualität der Zellen wurde morphologisch in der Kultur und über eine spezifische Färbung und durchflusszytometrische (FACS) Messung sichergestellt (siehe Kapitel 3.4).

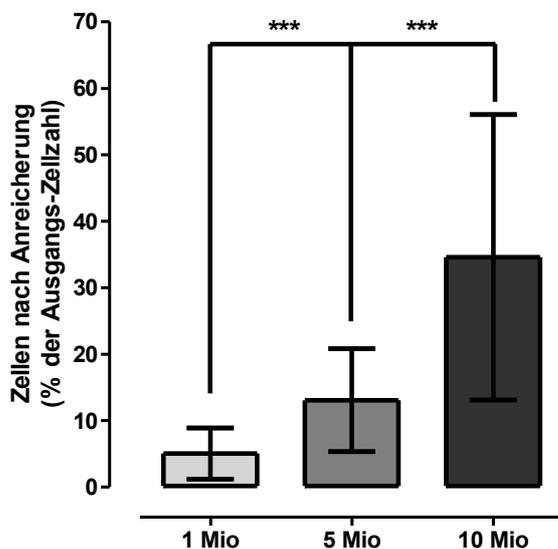


Abb. 18: Anzahl der isolierten Myoblasten in Abhängigkeit von der Aussaatdichte bei der Anreicherung. Bei einer Aussaatdichte von 1 Mio. Zellen/Petrischale konnten 5±4 % der Zellen erfolgreich isoliert werden. Wurden 5 Mio. Zellen ausgesät, stieg der Anteil vitaler Myoblasten nach der Anreicherung auf 13±8 %. Bei 10 Mio. ausgesäten Zellen stieg die Ausbeute (***) im Vergleich zu den niedrigeren Aussaatdichten signifikant auf 34±21 % an. (siehe auch^{85 86 100})

Bei der Etablierung der Methode und den Basaltieren (nicht operierte Tiere) wurden immer beide Beine der Maus gemeinsam verarbeitet. Bei den operierten Tieren wurden die Beine separat untersucht.

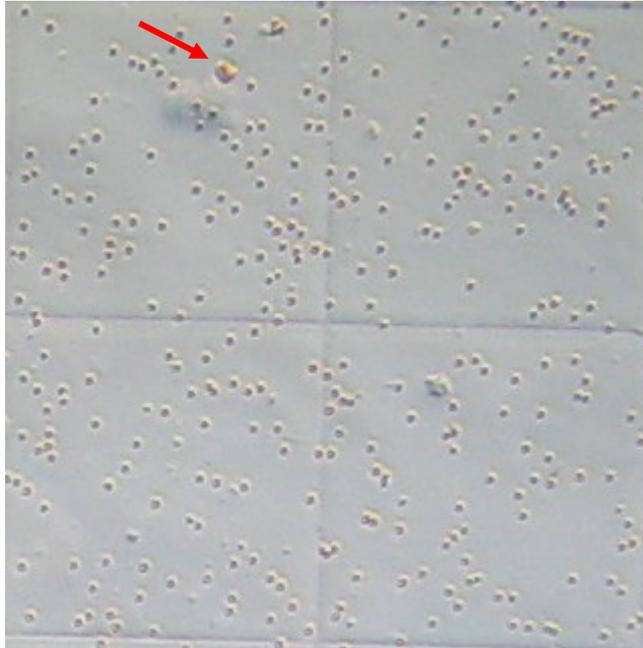


Abb. 19: Vitalfärbung von frisch isolierten Myoblasten (40x Vergrößerung). Mit Trypanblau wurde standardmäßig eine Vitalfärbung durchgeführt. Zudem wurden die Zellen mithilfe einer Neubauerkammer gezählt. Das Bild zeigt keine blau gefärbten Zellen auf, was bedeutet, dass alle Zellen vital sind. Außerdem sind nur vereinzelt Erythrozyten zu erkennen (roter Pfeil), was zeigt, dass die isolierte Population rein ist.

Sowohl die Trypanblaufärbung vor wie auch die nach der Anreicherung wiesen nach, dass die isolierten Zellen vital sind (siehe Abbildung 19) (vgl. auch^{85 86 100}).

3.2.2 Charakterisierung der isolierten Myoblasten

Zur Charakterisierung der Zellen wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet: einerseits die morphologische Differenzierung der Zellen während der Kultivierung und andererseits eine durchflusszytometrische Messung. Für Ersteres wurde eine vitale Myoblastenkultur etabliert. Hierfür wurden mindestens 100.000 Zellen/cm² ausgesät. Anhand der Wachstumseigenschaften und der morphologischen Differenzierung der Zellen in der Kultur (siehe Abbildungen 20 und 21) konnten diese als Myoblasten identifiziert werden.

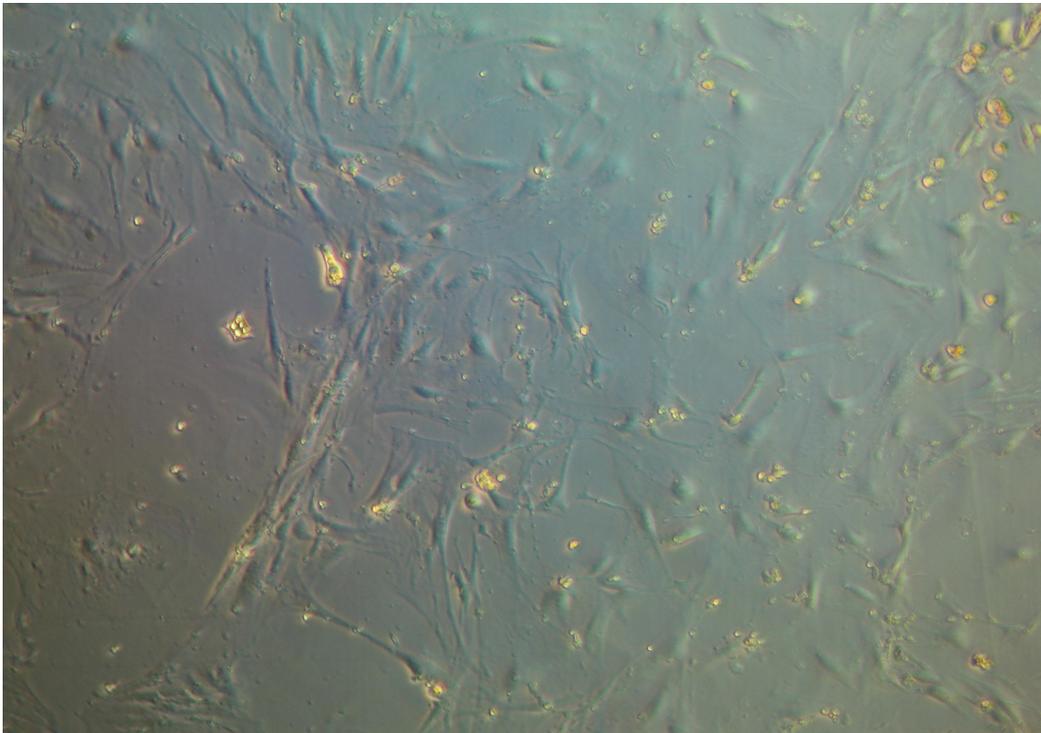


Abb. 20: Primäre Myoblasten nach 11 Tagen in Kultur (40x Vergrößerung). Die Zellen beginnen zu differenzieren. Sie nehmen eine spindelförmige Gestalt an und beginnen, Ausläufer zu bilden.

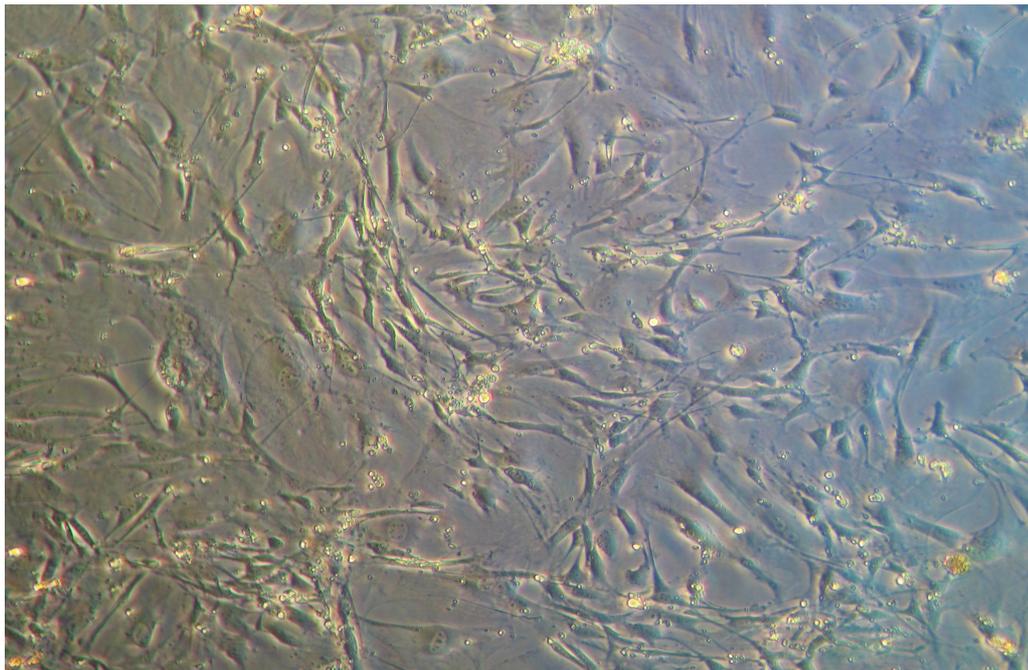
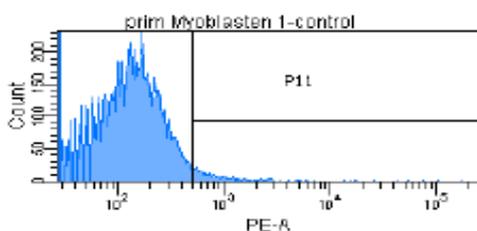


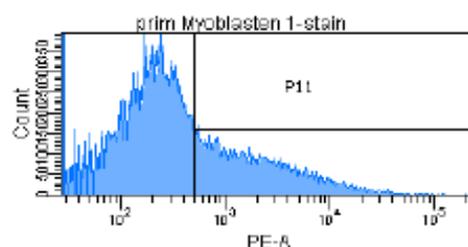
Abb. 21: Primäre Myoblasten Kultur nach 16 Tagen (40x Vergrößerung). Die Zeichen der Differenzierung werden deutlicher und die Fusion von Einzelzellen zu mehrkernigen Fasern beginnt.

Als zweite Methode zur Charakterisierung der Myoblasten wurden die isolierten Zellen mit einem für Myoblasten spezifischen Antikörper ($\alpha 7$ -Integrin), der mit dem Farbstoff PE konjugiert war, angefärbt und mittels einer FACS-Messung quantifiziert (siehe Abbildung 22). Die isolierten Zellen waren im Mittel zu 97 ± 1 % für den myoblastenspezifischen Antikörper gegen $\alpha 7$ -Integrin positiv. Bei der Kontrolle mit ungefärbten Zellen waren im Mittel nur 3 ± 0 % der Zellen positiv. Der in der FACS-Messung nachgewiesene Unterschied zwischen den gefärbten und den ungefärbten Zellen ist signifikant (*; $p=0.0012$) (siehe Abbildung 23). Bei der Positivkontrolle mit einer C2C12-Linie wurden 98 % der Zellen angefärbt. Als Negativkontrolle diente die immortalisierte Fibroblastenzelllinie L929, die nach der Färbung zu nur 4 % positiv war (vgl. auch ^{85 86 100}).

Primäre Myoblastenkontrolle

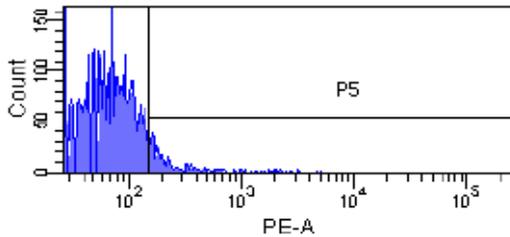


Primäre Myoblastenfärbung

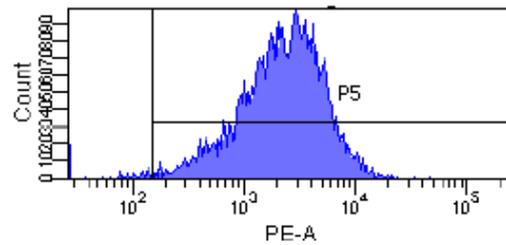


Positivkontrolle:

C2C12-Kontrolle

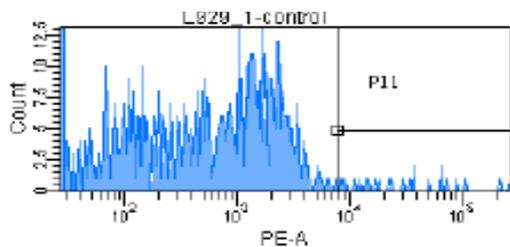


C2C12-Färbung



Negativkontrolle:

L929-Kontrolle



L929-Färbung

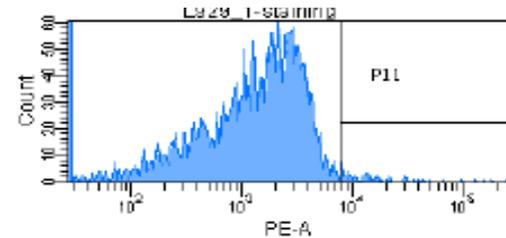


Abb. 22: Durchflusszytometrische Charakterisierung primär isolierter Myoblasten. Die C2C12-Myoblastenzelllinie diente als Positivkontrolle, eine Fibroblastenzelllinie (L929) als Negativkontrolle. Bei der Positivkontrolle wurden 99 % der Zellen angefärbt, bei der Negativkontrolle 4 %. Die primär isolierten Zellen waren zu 97 % positiv für $\alpha 7$ -Integrin, sodass von einer sauberen Myoblastenisolation ausgegangen werden konnte.

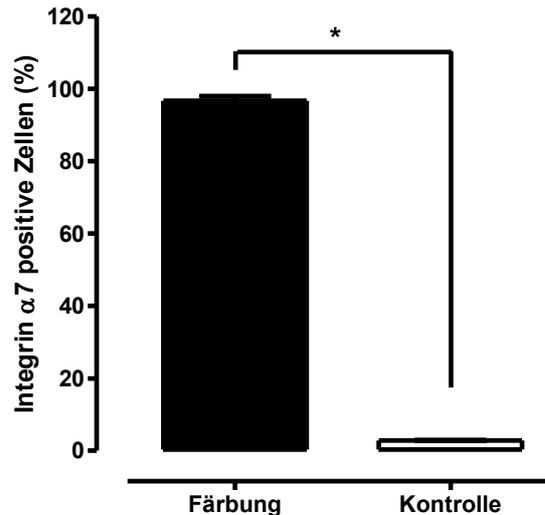


Abb. 23: Durchflusszytometrische Charakterisierung primär isolierter Myoblasten. Die Eigenfluoreszenz der isolierten Zellen betrug nur 3 %. Nach der Färbung mit PE-konjugiertem α7-Integrin stieg dieser Anteil auf 97±1 % (*; p<0,05; n=3;). (siehe auch ^{85 86 100})

3.3 Apoptose und Vitalitätsassays

3.3.1 Apoptoserate der Myoblasten im Hinterlauf

Bei der Bestimmung der Apoptoserate wurde das Verhältnis zwischen der Anzahl der apoptotischen Zellen des ischämischen und des nicht ischämischen Beins gebildet. Dieses Verhältnis wurde dann in eine prozentuale Angabe umgerechnet. Bei der Gruppe der nicht operierten Basaltiere betrug das Verhältnis der Apoptoseraten der beiden Hinterläufe nahezu 100 % (102±15 %), wobei eine leicht erhöhte Apoptoserate in einem Bein auch zu einem Verhältnis von >100 % führen kann.

Im Vergleich zur Basalgruppe war das Verhältnis bei der Kontrollgruppe (n=12) mit einem Wert von 229±157 % durch eine im ischämischen Bein erkennbar höhere Apoptoserate als im nicht ischämischen Bein deutlich erhöht. Bei der Nitratgruppe (n=13) sank dieser Wert auf 68±50 %, das heißt die Apoptoserate war im ischämischen Bein geringer als im nicht ischämischen Bein. Die Gabe des NO-Scavenger cPTIO (n=8) führte zu höheren Apoptoseraten im ischämischen Bein und einem Verhältnis zwischen dem ischämischen und nicht ischämischen von 384±232 %. Dieses Verhältnis war höher als das in der Kontrollgruppe. Die

Apoptoseeate in der Nitratgruppe unterschied sich signifikant von den Raten in den anderen Gruppen (Nitratgruppe vs. cPTIO: ***; $p < 0,0001$; Nitratgruppe vs. Kontrollgruppe *; $p < 0,05$, $n=33$) (siehe Abbildungen 24 sowie 25).

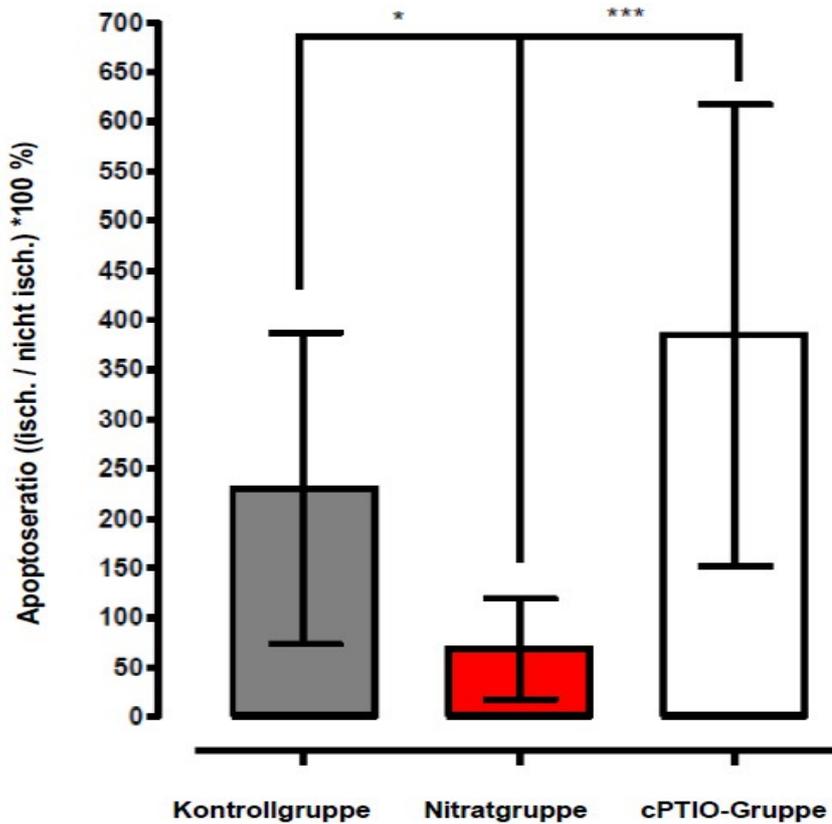


Abb. 24: Apoptoseraten in ischämischen Hinterläufen. Die Kontrollgruppe und die cPTIO-Gruppe zeigen hohe Apoptoseraten von zwischen 229±157 % bzw. 384±232 %. In der Nitratgruppe ist die Apoptoserate signifikant auf 68±50 % reduziert. (Nitratgruppe vs. cPTIO-Gruppe: ***; $p < 0,0001$; Nitratgruppe vs. Kontrollgruppe *; $p < 0,05$, $n=33$).

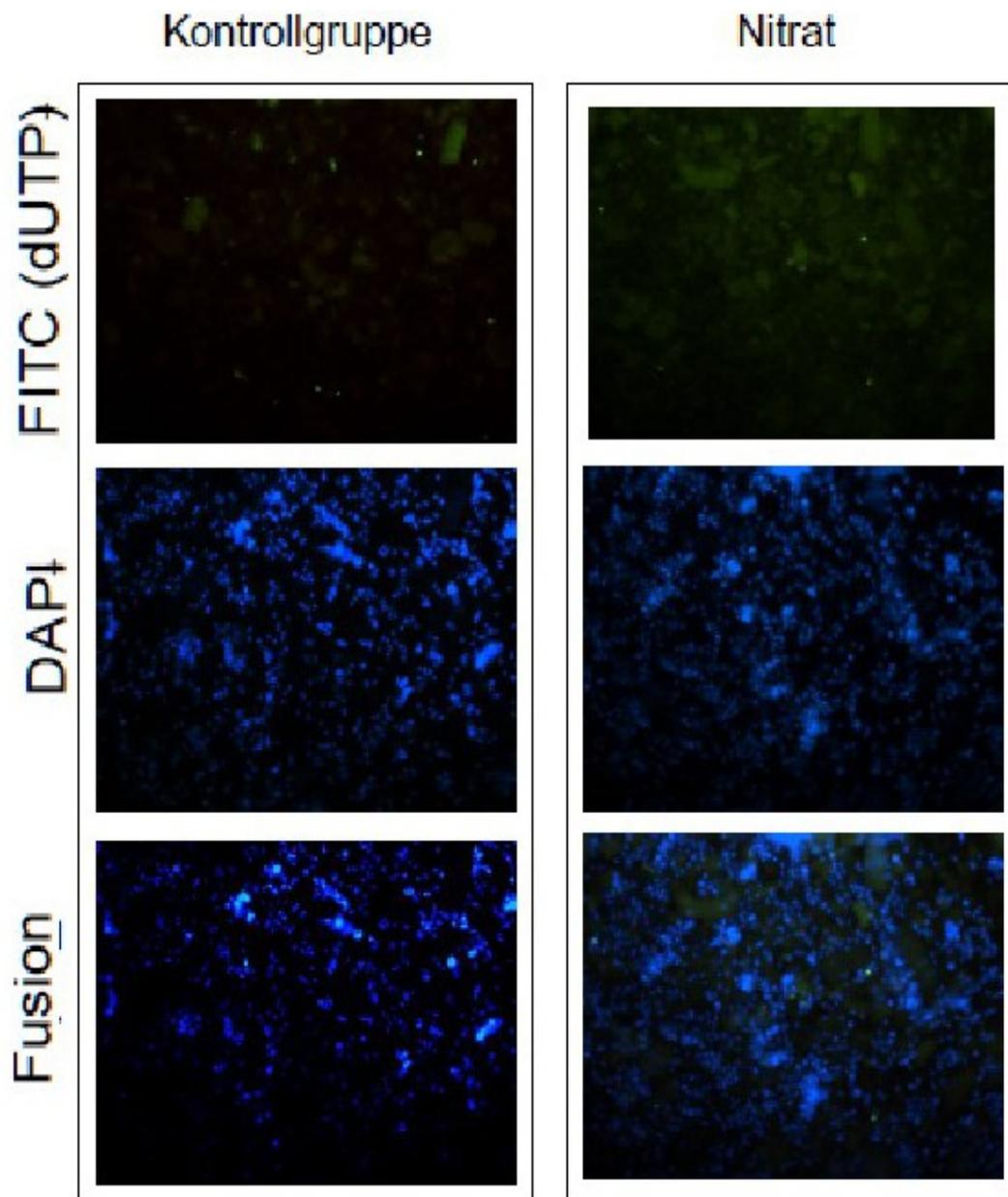


Abb. 25: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach TUNEL-Färbung (100x Vergrößerung)^{84 85}. Dargestellt werden sowohl die TUNEL-Färbung (FITC) als auch die Kernfärbung (Hoechst) bei der Kontrollgruppe und bei der Nitratgruppe. Apoptotische Zellen stellen sich als grün leuchtend dar und können so ausgezählt werden. Die Kernfärbung färbt Zellkerne blau ein. Beim Fusionsbild werden dann beide Färbungen kombiniert, um doppelpositive (grün⁺/blau⁺) Zellen von Artefakten (nur grün⁺) unterscheiden zu können. In der Fusionsabbildung (untere Abbildungsreihe) zeigen sich bei der Kontrollgruppe mehr apoptotische Zellen als bei der Nitratgruppe.

3.3.2 Vitalität der Myoblasten aus dem Hinterlauf

Bei der Messung der Vitalitätsraten wurden die vitalen Zellen aus dem ischämischen und dem nicht ischämischen Bein jeweils ausgezählt und das Verhältnis zwischen beiden Werten gebildet. Wie bei den Apoptoseraten erfolgte die Angabe als Prozentwert. Die höchsten Werte zeigten sich bei der Basalgruppe (124 ± 53 %) ($n=11$). Dieser Wert war sogar höher als der der Nitratgruppe (118 ± 90 %) ($n=12$). Der Wert der Nitratgruppe unterschied sich allerdings nicht signifikant von anderen Gruppen ($p=0,14$). Bei der Kontrollgruppe ($n=13$) und der cPTIO-Gruppe ($n=19$) waren weniger vitale Zellen nachweisbar als bei den anderen Gruppen (65 ± 40 % bzw. 88 ± 55 %). (siehe Abbildung 26).

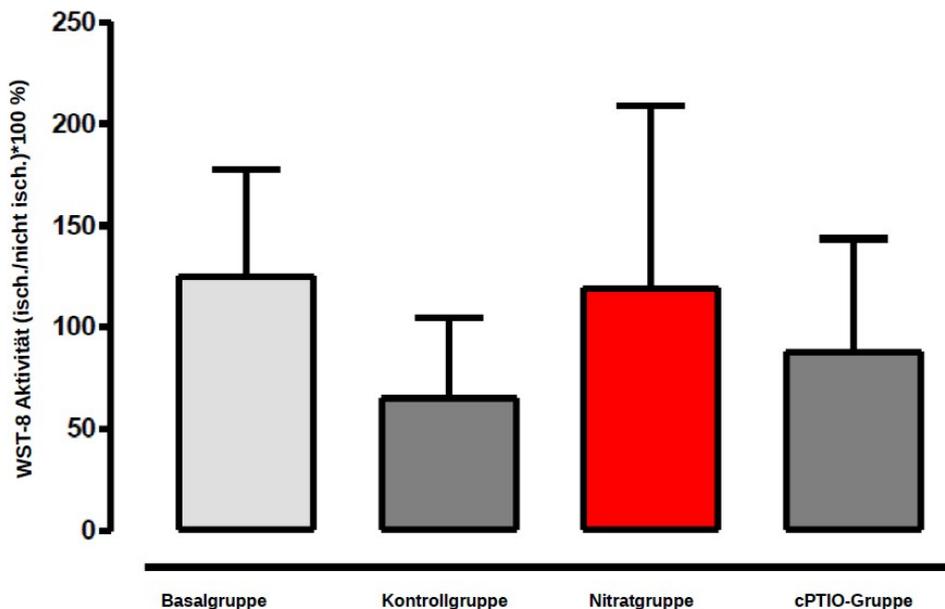


Abb. 26: Vitalität von Myoblasten nach Hinterlaufoperation. Während die Nitratgruppe einen deutlichen Trend zu gesteigerter Vitalität (118 ± 90 %) aufweist, zeigt sich in den Myoblasten der Kontrollgruppe (65 ± 40 %) und bei den mit cPTIO behandelten Tieren (88 ± 55 %) eine geschwächte Vitalität. Die Unterschiede sind nicht signifikant ($p=0,14$, $n=55$), unterstützen mit ihrem deutlichen Trend jedoch die Ergebnisse des Apoptoseassays. Die höchsten Werte zeigten sich in der Basalgruppe.

3.4 sFasL-Bestimmung

3.4.1 sFasL in plättchenarmem Plasma

Da sFasL aufgrund seiner antiapoptotischen Wirkung einen möglichen Mechanismus für die Wirkung von Nitrat darstellt, wurde seine Konzentration im Blut der Mäuse bestimmt. Bei der Messung derselben im plättchenarmen Plasma ischämischer Mäuse wurden im Vergleich zu den Werten der Kontrollgruppe (126 ± 126 pg/ml) ($n=20$) erhöhte Werte im Blut der Nitratgruppe (157 ± 114 pg/ml) ($n=17$) nachgewiesen. Dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant ($p=0,4721$). Beide Gruppen zeigten erhöhte Werte im Vergleich zur Basalgruppe (52 ± 45 pg/ml) ($n=30$) (siehe Abbildung 27).

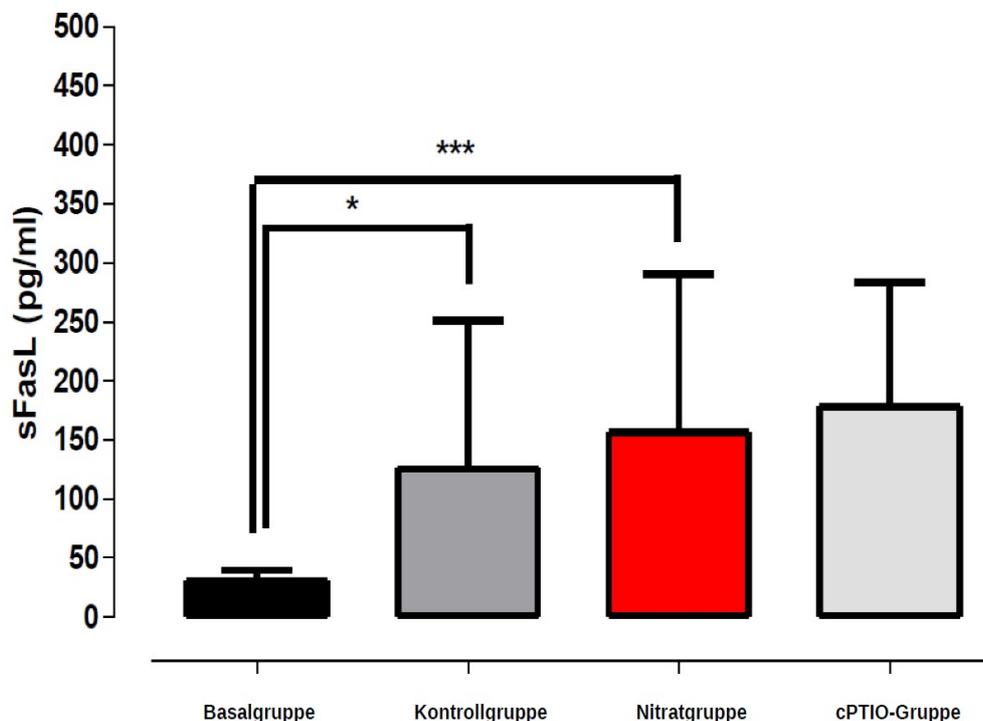


Abb. 27: sFasL-Konzentration in plättchenarmem Plasma. Nach Induktion einer Ischämie kommt es bei den Mäusen zu einem signifikanten Anstieg des sFasL-Spiegels im Blut (Basalgruppe vs. Nitratgruppe:***($p<0,0001$); Basalgruppe vs. Kontrollgruppe: *($p=0,0003$)). Der Anstieg in der Nitratgruppe ist tendenziell erhöht, allerdings nicht signifikant höher als der in der Kontrollgruppe.

3.5 Nitrat und Nitrit im Gewebe des Hinterlaufs

Um bestimmen zu können, welchen Einfluss die Gabe von Nitrat auf NO-Verbindungen im Gewebe nimmt, wurden die Mengen von Nitrat, Nitrit und NO-Häm im Gewebe der Mäusebeine bestimmt. Zudem erfolgte auch ein Vergleich der Werte des operierten (ischämischen, i.) und des nicht operierten (nicht ischämischen, n.i.) Beins.

Die höchste Konzentration von Nitrat fand sich in den ischämischen Hinterläufen (ischämisch 456 ± 210 $\mu\text{mol/mg}$; nicht ischämisch 365 ± 297 $\mu\text{mol/mg}$) der Nitratgruppe (n=4). Die Kontrollgruppe (n=5) zeigte hier niedrigere Werte (nicht ischämisch 278 ± 196 $\mu\text{mol/mg}$; ischämisch 275 ± 223 $\mu\text{mol/mg}$). Bei der Kontrollgruppe zeigten sich auch nur geringe Unterschiede zwischen den ischämischen und den nicht ischämischen Beinen (siehe Abbildung 28a).

Zudem erfolgte die Bestimmung der Nitritkonzentration (n=13). Hier zeigten sich die höchsten Werte in den ischämischen Beinen bei denen der Nitratgruppe (n=4) (nicht ischämisch $1,2 \pm 0,1$ $\mu\text{mol/mg}$; ischämisch $2,7 \pm 1,9$ $\mu\text{mol/mg}$). Analog zur Nitratmessung lagen auch hier bei der Kontrollgruppe die niedrigsten Werte vor (n=5) (nicht ischämisch $1,1 \pm 0,2$ $\mu\text{mol/mg}$; ischämisch $1,6 \pm 0,6$ $\mu\text{mol/mg}$).

Eine abweichende Verteilung (siehe Abbildung 28b) der Werte konnte bei der NO-Häm-Messung (n=13) im Gewebe beobachtet werden. Während auch bei dieser Messung die höchsten Werte in der Nitratgruppe (n=4) im ischämischen Bein (nicht ischämisch $0,7 \pm 0,2$ nmol/mg ; ischämisch $25,9 \pm 30,95$ nmol/mg) nachzuweisen waren, traten die niedrigsten Werte dabei nicht in der Kontrollgruppe, sondern in der cPTIO-Gruppe (n=4) (nicht ischämisch $1,8 \pm 1,2$ nmol/mg ; ischämisch $11,7 \pm 4,8$ nmol/mg) auf (siehe Abbildung 29).

Sowohl bei Nitrat und Nitrit als auch bei NO-Häm zeigten sich die höchsten Werte in der Nitratgruppe. Der Unterschied zur Kontrollgruppe ist signifikant.

Zusammenfassend betrachtet ergaben sich die höchsten Werte in allen Messungen bei der Nitratgruppe. Im Vergleich zur Kontrollgruppe liegt ein signifikanter Unterschied vor ($p=0,04$ bzw. $p=0,008$). Bei den Messungen von Nitrit und NO-Häm zeigte sich ebenfalls ein Unterschied zwischen dem ischämischen und dem nicht ischämischen Bein. Die cPTIO-Gruppe zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls tendenziell erhöhte Werte.

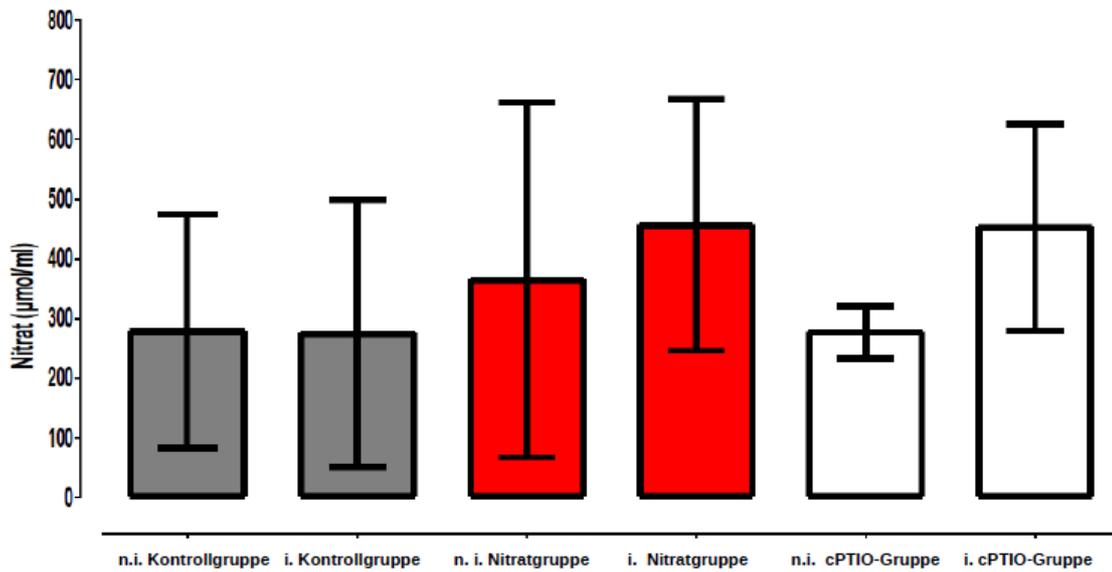
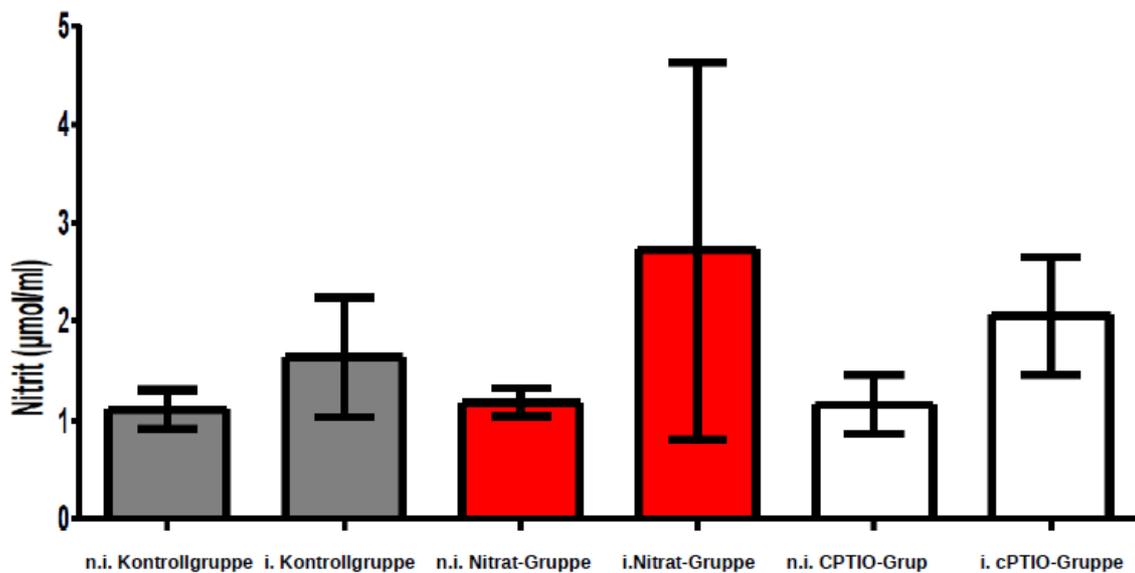
A**B**

Abb. 28: Nitrat (A) und Nitrit (B) im Gewebe des Hinterlaufs. Sowohl bei der Nitrat- als auch bei der Nitritmessung zeigten sich in der Nitratgruppe die höchsten Werte. Bei der Nitritmessung zeigten sich im ischämischen (i) Bein höhere Werte als im nicht ischämischen (n.i.). Die Konzentrationen in der Kontrollgruppe sind niedriger als die in der Nitratgruppe. Die Werte der cPTIO-Gruppe sind im Gegensatz dazu allerdings gestiegen und erreichen fast das Niveau der Nitratgruppe.

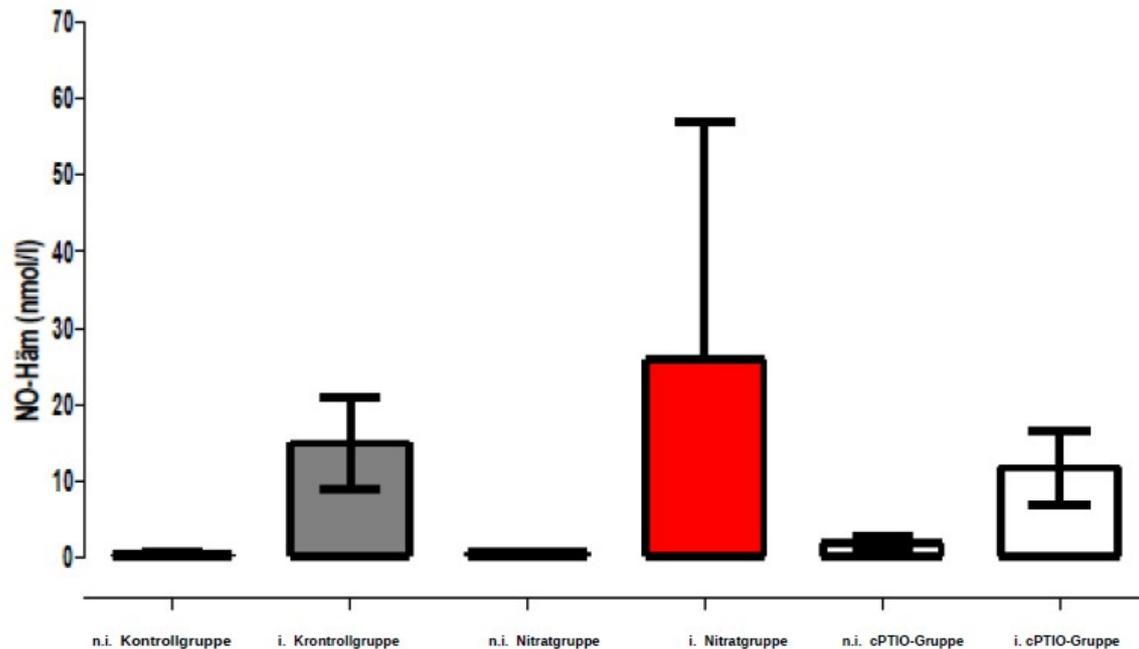


Abb. 29: NO-Häm im Gewebe des Hinterlaufs Die ischämischen (i) Beine zeigten bei den Messungen deutlich höhere Werte als die nicht ischämischen (n.i.) Beine. Die höchste Konzentration findet sich in den ischämischen Beinen der mit Nitrat behandelten Gruppe. Die NO-Häm-Konzentration innerhalb der Kontrollbeine ist nicht bei der mit Nitrat behandelten Gruppe, sondern bei der cPTIO-Gruppe am höchsten.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines *in vivo*-Hinterlaufmodells in der Maus inklusive Perfusionsmessung mittels Laserdopplerflusssmessung sowie Isolation der Myoblasten aus dem Hinterlauf. Diese Etablierung ermöglichte eine erste Analyse des Einflusses diätetischen Nitrats auf die Perfusion und auf zellulärer Ebene.

4.1 Etablierung des Hinterlaufmodells

4.1.1 Operation und Laserdopplerflussmessung

Das Modell nach Couffinhal² wurde als Vorlage verwendet, bedurfte allerdings vor der Verwendung einer ausführlichen Etablierung. Sowohl die Auswahl der Versuchstiere⁸ als auch deren Alter¹⁰ beeinflussen die Regeneration der Perfusion. Durch die Beschränkung auf Versuchstiere eines bestimmten Stammes, Geschlechts und Alters konnten diese Störfaktoren minimiert werden.

Das zentrale Problem des Modells besteht darin, dass verschiedene Parameter genau etabliert werden müssen, um valide und reproduzierbare Ergebnisse erzeugen zu können.

Die Induktion der Ischämie erfolgte durch Ligation und Resektion der Arteria femoralis. Mit dieser Intervention konnte die Ischämie im Hinterlauf der Maus zuverlässig verursacht werden. Durch Resektion anstelle von einer reinen Ligatur der Arterie können eine Rekanalisation des Gefäßes oder die Entstehung von kurzstreckigen Kollateralen als mögliche Mechanismen für die Rückkehr der Perfusion ausgeschlossen werden. Bei unzureichendem Abfall der Perfusion wurden die Tiere aus dem Versuch ausgeschlossen. Welcher Mechanismus der Vaskularisierung in diesem Tiermodell dominiert, kann allerdings in diesem Versuchsansatz nicht abschließend bestimmt werden. Dieses Vorgehen bei der Resektion entspricht dem Modell von Couffinhal² und konnte in den Experimenten dieser Arbeit umgesetzt werden.

Die Perfusionsmessung mittels Laserdopplerflussmessung wurde ausführlich etabliert. Hier konnten bei den Mäusen reproduzierbare Messwerte unter Verwendung des Protokolls (siehe Kapitel 3.1.1) erzielt werden. Bei Durchführung der Messungen durch einen Experimentator ließen sich Varianzen erreichen, die den in der Literatur beschriebenen Varianzkoeffizienten von 10 %² entsprachen. Um Störfaktoren zu minimieren, wurden nicht die Absolutwerte der Perfusionsmessung verwendet, sondern das Verhältnis zwischen den beiden Hinterläufen (ischämisches und nicht ischämisches Bein) der Mäuse. Dies entsprach der Annahme, dass Einflussfaktoren (z. B. die Temperatur) im gleichen Umfang auf beide Hinterläufe einwirkten. Somit stellt das nicht ischämische Bein

eine Kontrolle zum ischämischen Bein dar. Es wurde keine Wärmeplatte verwendet, da diese nur zu einer Erhöhung der Absolutwerte der Perfusionsmessung geführt hätte und somit bei der Bestimmung des Verhältnisses zwischen beiden Hinterläufen keine Relevanz hatte. Zur Kompensation einer Verzerrung der Verhältnisse durch Verkürzung des Beins durch Autoamputation erfolgte eine Ausgleichsrechnung (siehe Kapitel 3.1.1). Diese stellt eine Weiterentwicklung des Protokolls im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Varianten dar. Die Messungen wurden immer vom selben Experimentator durchgeführt, um das Risiko von Abweichungen weiter zu reduzieren.

4.1.2 Isolation der Myoblasten

Das Protokoll nach Yaffe et al.⁶⁷ beziehungsweise dessen Weiterentwicklung^{68 69} konnte erfolgreich für die Versuche etabliert und verwendet werden. Durch Verwendung von Pronase in einer höheren Konzentration sowie Verlängerung der Einwirkzeit des Verdaus konnten eine erhöhte Anzahl an Myoblasten aus den Hinterläufen gewonnen werden. Diese Anpassung war notwendig, um eine ausreichend hohe Anzahl an Zellen für die Apoptose- und Vitalitätsassays gewinnen zu können. Durch die getrennte Verarbeitung des ischämischen und nicht ischämischen Beins der Mäuse konnte der Effekt der Operation sowie der Gabe von Nitrat untersucht werden. Für kommende Versuche kann eine weitere Unterteilung der Beine in proximal und distal eine mögliche Erweiterung darstellen, und zwar unter der Annahme, dass die Ischämie distaler stärker ausgeprägt ist.

Durch die Kultivierung der gewonnenen Zellen sowie durch die Anfärbung der Zellen mit alpha7-Integrin in der FACS-Messung konnte die Identität der Zellen als Myoblasten bestätigt werden. Dadurch wurde es möglich, eine Verzerrung der Ergebnisse durch andere Zellen wie z. B. Fibroblasten zu minimieren. Dies stellte einen notwendigen Schritt dar, um verwertbare Ergebnisse bezüglich der Myoblasten zu erhalten.

4.2 Einfluss von Nitrat auf die Regeneration der Perfusion bei chronischer Ischämie

Nach Induktion der Ischämie in den unteren Extremitäten kam es unabhängig von der Vorbehandlung zu einem deutlichen Abfall der Perfusion (siehe LDPI-Messung). Dieser Effekt entspricht dem zu erwartenden Befund aus den Vorversuchen. Abhängig von der Behandlung der Tiere ergaben sich deutliche Unterschiede in der Wiederherstellung der Perfusion der unteren Extremität. Tiere der Nitratgruppe zeigten eine signifikant bessere Rückkehr der Perfusion als Tiere der Kontrollgruppe.

In Vorversuchen wurde ebenfalls die Gabe von oralem Nitrit getestet. Dieser Versuchsansatz wurde nicht weiter verfolgt, als erste Versuche keine positiven Ergebnisse erzielten (Daten nicht gezeigt). Hierbei konnte keine Verbesserung der Perfusion im Gegensatz zur Kontrollgruppe erreicht werden. Parallel dazu wurden bei diesen Tieren auch niedrigere Spiegel an NO-Verbindungen gemessen (Daten nicht gezeigt). Es wurde spekuliert, dass durch die orale Gabe von Nitrit nicht genug NO im Gewebe und in der Zirkulation reduziert und bioaktiviert werden konnte. Die Nitritmenge wiederum kann aber nicht ohne Weiteres erhöht werden, da Nitrit ab gewissen Mengen toxisch wirken kann³¹. Im Gegensatz dazu nimmt man für Nitrat keine Toxizität an³¹. Möglicherweise erreicht durch den zusätzlichen Reaktionsschritt, der zum Teil wahrscheinlich auch erst im Gewebe erfolgt³¹, mehr und damit ausreichend bioaktiviertes NO seine Wirkstätte. Der favorisierte Erklärungsansatz für die Verbesserung der Perfusion nach Gabe von Nitrat ist der, dass die Wirkung über NO hierfür verantwortlich ist. So wurden bei allen ischämischen Beinen erhöhte Werte für NO-Häm gefunden. Die höchsten Werte allerdings wurden bei der Nitratgruppe ermittelt, bei der gleichzeitig auch die höchste Rückkehr der Perfusion zu beobachten war. Diese Ergebnisse sind ein deutliches Indiz dafür, dass das oral zugeführte Nitrat zu NO reduziert und wiederum metabolisiert wurde. Um diesen Zusammenhang definitiv zu beweisen, wurden die Versuche mit dem NO-Scavenger cPTIO wiederholt. Diese Methode ist allgemein anerkannt zum Nachweis von NO-abhängigen Effekten und als Negativkontrolle, allerdings meist in Akutversuchen^{z.B. 99}. Die hier durchgeführten chronischen Versuche brachten keine auswertbaren, einheitlichen Ergebnisse, weshalb sie abgebrochen werden mussten. Zu erwarten gewesen

wäre in diesen Versuchen eine Verschlechterung der Regeneration. Hingegen muss die Reaktion von cPTIO mit NO mitbedacht werden. Bei dieser entsteht wiederum Nitrit, welches im Folgenden abermals zur Reduktion zur Verfügung steht. Diese zusätzliche Erhöhung des Nitritpools kommt speziell bei den vorliegenden chronischen Versuchen zum Tragen und ist in den Ergebnissen auch deutlich zu erkennen. Nichtsdestotrotz könnte es interessant sein, diese Versuche in großer n-Zahl mit entsprechenden Kontrollen und eventuell anderem Versuchsaufbau zu wiederholen, um so den Zusammenhang mit NO dennoch nachweisen zu können und auch den Aspekt der zusätzlichen Nitrit-NO-Bildung weiter zu untersuchen.

Eine andere Möglichkeit, die Reduktion und damit auch die Erhöhung der Verfügbarkeit diätetischen Nitrats zu prüfen, wäre die Inhibition der Reduktion im Mundraum. Dies könnte durch Abtöten der oralen Bakterien etwa mithilfe von Hexidin erreicht werden. Bei Verschlechterung der Regeneration könnte so die Reduktion des Nitrats bewiesen werden. Allerdings bliebe die Frage nach dem Endpunkt der Reaktion, also danach, ob das Nitrat über NO wirkt, weiterhin offen. In zukünftigen Versuchen sollten deswegen sowohl Start- als auch Endpunkt der Reaktion überprüft werden, um den gesamten Reaktionsweg und Mechanismus aufzudecken, was im Rahmen dieser Dissertation nicht möglich war.

Der Anstieg der Werte für NO-Häm zeigt, dass orales, diätetisches Nitrat aufgenommen und metabolisiert wird. Ein hierbei möglicher Mechanismus ist die Reduktion durch Bakterien mithilfe von Nitratreduktasen im Mundbereich von NO_3^- zu NO_2^- , gefolgt von einer Reduktion von NO_2^- zu NO entweder durch Enzyme (z. B. Dexoxyhaemoglobin im Blut, Xanthinoxidoreduktase in ischämischem Gewebe, Cytochrome p450 in Hepatozyten etc.⁸⁷) oder durch die Säure im Magen der Mäuse. Bei letzterem findet die Umwandlung im sauren Milieu über die Zwischenschritte Hydrogennitrit und Dinitrogenoxid über folgende Reaktion statt⁸⁷:



Als möglicher Mechanismus für die verbesserte Regeneration kann eine vermehrte Gefäßneubildung angenommen werden. Hierbei sind verschiedene Formen der Gefäßneubildung⁸⁸ zu unterscheiden. Zu diesen zählt zunächst die Arteriogenese, die Erweiterung bestehender Kollateralgefäße. Dieser Prozess läuft im Bereich der großen Gefäße des Oberschenkels der Maus ab. Neben der Arteriogenese werden durch die Ischämie auch die Angiogenese (Aussprossung aus bestehenden Kapillaren) und die Neovaskulogenese (*de novo*-Entstehung von Kapillaren) beobachtet.

Diese beiden treten insbesondere im Bereich der distalen Extremität auf. In der Literatur wird eine Ischämie (und als deren Konsequenz auch eine Hypoxie) als Auslöser der Gefäßneubildung beschrieben⁸⁹. In den hier betrachteten Versuchen wird die Ischämie im Gewebe durch die operative Unterbrechung der Perfusion erreicht (siehe postoperative LDPI-Bilder). Die Rückkehr der Perfusion in den distalen Bereichen der Extremität wird durch eine Bildung neuer Gefäße erklärt².

Die *de novo*-Entstehung neuer Kapillaren (Neovaskulogenese) wird in der Literatur als abhängig von EPC beschrieben⁸⁹. In anderen Versuchen der hiesigen Arbeitsgruppe⁹⁰ konnte eine erhöhte Proliferation der EPC im Hinterlaufmodell gezeigt werden. Dies ist gut vereinbar mit einer Auslösung der Vaskulogenese durch Ischämie. Die Wirkung der EPC wird durch NO gefördert^{89 91 92}. Im Hinterlauf der Mäuse mit der besten Regeneration wurden erhöhte Konzentrationen von NO-Verbindungen nachgewiesen. Diese Kombination aus erhöhter EPC-Proliferation, erhöhter NO-Konzentration und verbesserter Perfusion ist vereinbar mit einer vermehrt ablaufenden Neovaskulogenese. Die erhöhten Konzentrationen von NO-Verbindungen nach oraler Gabe von Nitrat sprechen für eine Metabolisierung des Nitrats zu NO. Somit kann diätetisches Nitrat protektiv wirken und zu einer verbesserten Regeneration beitragen. Neben der direkten Wirkung auf die Gefäßneubildung zeigen sich außerdem Hinweise auf eine parakrine Wirkung der EPC, die ebenfalls durch NO beeinflusst wird⁶¹.

Neben der Neovaskulogenese kommt es in den distalen Extremitäten auch zur vermehrten Angiogenese. Bei diesem Prozess entstehen Aussprossungen neuer Kapillaren aus bestehenden Gefäßen. Während bei diesem Prozess die lokalen Endothelzellen (EC) die neuen Gefäße bilden, wird den EPC eine Rolle als Förderer dieses Prozesses zugeschrieben⁶¹, die ihnen insbesondere über

parakrine Wirkung wie z. B. VEGF zukommt. Durch die Förderung dieses Prozesses durch EPC und die verbesserte Wirkung der EPC unter dem Einfluss von NO erscheint es plausibel, dass diätetisches Nitrat auch hier eine positive Wirkung entfalten kann.

Somit kann diätetisches Nitrat über die Reduktion zu NO und damit zur vermehrten Mobilisierung von EPC, die wiederum die Angiogenese und Neovaskulogenese fördern, protektiv wirken und die Regeneration im ischämischen Gewebe positiv beeinflussen.

4.3 Analyse von Apoptose und Vitalität in Myoblasten nach Gabe von Nitrat

Neben der verbesserten Perfusion und der damit vermutlich in Zusammenhang stehenden verbesserten Vaskulogenese ist auch der Schutz des Muskels nach einer Ischämie nicht zu vernachlässigen. Nur wenn noch ein regenerationsfähiger bzw. nicht irreparabel geschädigter Muskel vorhanden ist, ist auch die verbesserte Perfusion von Nutzen. Nach einem Trauma, wie beispielsweise einer Ischämie, sind es Myoblasten, die geschädigte Muskelfasern wieder ersetzen⁹³. Deshalb wurden die Isolation dieser Myoblasten aus dem murinen Hinterlauf etabliert und diese Stammzellen im Folgenden analysiert. Zur genaueren Charakterisierung wurden sowohl Untersuchungen zur Apoptose als auch solche zur Vitalität der Zellen durchgeführt. Es konnte nachgewiesen werden, dass diejenigen isolierten Myoblasten, die der Nitratgruppe entstammten, signifikant niedrigere Apoptoseraten und eine höhere Vitalitätsrate aufwiesen. Diese Zellen waren also besser gerüstet, einen geschädigten Muskel zu ersetzen, als die Myoblasten der Tiere der Kontrollgruppe. Damit konnte auch ein zytoprotektiver Effekt des diätetischen Nitrats aufgezeigt werden.

Während in der Basalgruppe in der Apoptoserate kein Unterschied zwischen den Beinen besteht, induziert die OP bei den anderen Gruppen im operierten Bein eine höhere Apoptoserate als im Kontrollbein. Dieses Ergebnis ist als normale Reaktion auf eine Ischämie zu werten. Durch den Sauerstoff- und Nährstoffmangel in der Ischämie kommt es zu Nekrose und Apoptose in den unterversorgten Gebieten. Unter Behandlung mit Nitrat kommt es zu einer

Angleichung der Apoptoserate zwischen den beiden Beinen, das heißt, auch im ischämischen Bein sterben weniger Myoblasten ab. Die Verschlechterung der Apoptoserate im operierten Bein nach NO-Scavenger-Gabe erlaubt zudem zwei Schlüsse. Erstens zeigt diese negative Wirkung nach zusätzlicher Behandlung, dass der zuvor positive Effekt tatsächlich auf das gegebene Nitrat zurückzuführen ist. Zweitens stellt sich bei oraler Gabe von Nitrat die Frage, wie das Nitrat genau wirkt: als Nitrat, Nitrit oder NO? Die Tatsache, dass ein NO-Scavenger hier negative Auswirkungen hat, ist ein starkes Indiz dafür, dass das Nitrat zunächst über Nitrit zu NO reduziert wird und als solches wirkt. Fraglich bleibt, warum der negative Effekt des cPTIO im Muskel gezeigt werden konnte, ein Ergebnis bei Analyse der Perfusion allerdings offenblieb (siehe Kapitel 3.1.2).

Analog zur Reduktion der Apoptoserate kann bei Tieren der Nitratgruppe eine höhere Vitalitätsrate beobachtet werden. Die mithilfe des WST-8-Assays bestimmte Vitalitätsrate kann als Surrogatparameter für die Proliferationsrate der Zellen betrachtet werden, sodass diese Werte als Hinweis auf eine gesteigerte Regenerationskapazität der Muskelzellen angesehen werden können. Passend zu diesen Befunden findet sich in der Literatur auch ein Versuch, in dem per Immunhistochemie (Ki67) eine erhöhte Proliferation von Myoblasten nachgewiesen werden konnte⁴².

Allerdings ist es aufgrund des Versuchsaufbaus nicht möglich, klar zu trennen, ob diese Wirkungen sich sekundär aus der besseren Perfusion der Extremität ergeben oder ob Nitrat einen eigenständigen Effekt auf die Muskelzellen ausübt. Es gibt jedoch Arbeiten, die die Rolle von NO bei der Reparatur von Muskelzellen bearbeiten und hier einen positiven Effekt sehen⁴², sodass ein additiver Effekt des NO (neben erhöhter Perfusion) plausibel erscheint. Zum einen wird hier eine Wirkung von NO durch Hemmung der COX-2 beschrieben⁴¹, wodurch die Proliferation der Myoblasten gefördert wird. Des Weiteren finden sich Hinweise auf eine proliferative Wirkung von VEGF auf Myoblasten⁵¹. Bei EPC wird eine Sekretion von VEGF beschrieben⁶¹, deren Proliferation ebenfalls durch NO gefördert wird. Die dieser Arbeit zugrunde liegende Hypothese beinhaltet ebenfalls einen zytoprotektiven Effekt der EPC. Die Progenitorzellen sekretieren

zytoprotektive Moleküle und können so parakrin zytoprotektiv auf den Muskel wirken.

4.4 Analyse des sFas-Liganden bei chronischer Ischämie nach Gabe von Nitrat

Bei der Analyse möglicher Kandidaten zur zytoprotektiven Wirkung der EPC wurden in der hiesigen Arbeit neue Wege eingeschlagen, anstatt dass die sonst oft zitierten proangiogenen Faktoren wie VEGF untersucht wurden⁶⁰.

Der Ansatz dabei fokussierte den Schutz und Wiederaufbau des ischämischen Muskels. Aus der Infarktforschung ist bekannt, dass es nach einer Ischämie nekrotische Gewebeareale gibt, die irreparabel geschädigt sind und zugrunde gehen. Daneben gibt es Bereiche, die ebenfalls nicht mehr zu retten sind, die aber der kontrollierten Form des Zelltodes, der Apoptose, unterliegen. Schließlich gibt es diejenigen Bereiche, die noch vital sind und zur besseren Regeneration oder eher noch zur Proliferation angeregt werden sollten⁹⁴. Wie der Weg der Zellen determiniert wird, ist aktuell noch unklar. Ein möglicher dem zugrunde liegender Mechanismus wäre eine Interaktion eines Botenstoffs mit einem Rezeptor auf den entsprechenden Zellen. Ein vielversprechender Kandidat hierfür ist der Fas-Ligand bzw. der Fas/FasL-Signalweg. Aufgrund dieses Kenntnisstands entstand die Hypothese, dass sFasL im Tiermodell der Hinterlaufischämie parakrin zytoprotektiv wirkt. Deshalb wurde in den Versuchen auch die Rolle von (s)FasL in den Proben genauer untersucht.

Andere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe⁹⁰ konnten zeigen, dass EPC mFasL exprimieren. Dieser Vorbefund weist auf eine parakrine Funktion der EPC über den Fas/FasL-Signalweg hin.

Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass nach Gabe von Nitrat die Expressionsrate von mFasL signifikant sinkt.

In der vorliegenden Arbeit konnte als dritter Hinweis auf diesen parakrinen Signalweg der Nachweis eines erhöhten sFasL-Spiegels im plättchenarmen Plasma nach Ischämie erbracht werden. Bei zusätzlicher Gabe von Nitrat war der sFasL-Spiegel tendenziell stärker erhöht, allerdings konnte in dieser Arbeit kein

signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe gezeigt werden. Hier wäre eine Wiederholung der Experimente mit einer höheren Anzahl an Versuchstieren ein sinnvoller Ansatz. Die zytoprotektive Wirkung von sFasL wurde bereits in der Literatur beschrieben^{58 95}.

Die Ergebnisse lassen die Assoziation zu, dass das membranständige FasL, wenn die EPC in das ischämische Gewebe migriert sind, als sFasL sekretiert wird und so seine zytoprotektive Wirkung entfaltet. Diese Hypothese muss allerdings noch intensiver untersucht werden, um alternative Erklärungen wie z. B. nitratabhängige sFasL einer anderen Zellpopulation auszuschließen.

In der Literatur wird FasL auch als Marker für die endotheliale Funktion beschrieben⁹⁶, sodass erhöhte Spiegel in diesem Zusammenhang auch als Hinweis auf eine Verbesserung der Gefäßfunktion im Hinterlauf interpretiert werden können. Hierbei wird eine vermehrte Expression von membranständigem FasL in Zusammenhang mit Inflammation und Gefäßläsion gebracht⁹⁶, während sFasL eher in gesundem Gewebe beobachtet wird. Auch wird ein sFasL-Anstieg bei Angiogenese in anderen Geweben beschrieben⁹⁷.

Ob eine kausale Beziehung zwischen dem tendenziell erhöhten sFasL und dem antiapoptotischen Effekt des Nitrats besteht, kann diese Studie nicht abschließend nachweisen. Da aber neben den hier vorgestellten Ergebnissen auch der Blick in die Forschung einen positiven Effekt des Nitrats über sFasL und eine Förderung der Angiogenese nicht unplausibel erscheinen lässt, sollte dieser Aspekt weiter untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Die periphere arterielle Verschlusskrankheit ist eine häufige Erkrankung, die zur Schädigung von Gewebe durch Ischämie führen kann. Als Modell für weitere

Untersuchungen der Erkrankung wurde ein murines *in vivo*-Hinterlaufmodell für Ischämie in Anlehnung an das Hinterlaufmodell nach Couffinhal etabliert. Die ausführliche Etablierung ermöglichte eine ausreichende Reproduzierbarkeit der Versuche, ohne die keine validen Ergebnisse hätten erzielt werden können. Dies umfasste hier sowohl die Auswahl des Tiermodells (Mäusestamm, Alter, Geschlecht) und der Operationstechnik (vor allem die Lokalisation der Ligatur der A. femoralis) als auch die Laserdopplerperfusionsmessung (bezüglich der Abweichungen durch Untersucher, Versuchstiere, Versuchsdauer). Im nächsten Schritt erfolgten die Etablierung der Isolation von Myoblasten und deren Charakterisierung mittels Kultur und FACS-Messung aus dem Hinterlauf. Zudem wurde die Bestimmung der Apoptose (mittels TUNEL-Assay) und der Vitalität (mittels WST-8-Assay) der isolierten Myoblasten vorgenommen. Diese Bestimmungen wiesen ebenfalls Probleme bezüglich ihrer Reproduzierbarkeit auf und mussten optimiert werden. Bei der Isolation der Myoblasten konnte durch Anpassung des Proteinverdauers und der Aussaatkonzentration sowie des verwendeten Mediums bessere Ergebnisse erzielt werden. Als Ergänzung erfolgten die Bestimmung des NO-Häms aus dem Gewebe des Hinterlaufs der Tiere sowie die Bestimmung von sFasL zur besseren Charakterisierung des zugrundeliegenden Mechanismus. Im Verlauf konnte das so etablierte Modell zu weiteren Versuchen verwendet werden. Es wurden Gruppen von Mäusen mit Nitrat, mit Nitrat und CPTIO oder als Kontrolle nur mit Wasser behandelt. Hier zeigte sich eine stärkere Rückkehr der Perfusion in der Nitratgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im ischämischen Hinterlauf wurde ein größerer Anteil der Extremität erhalten als in der Kontrollgruppe. In der Untersuchung der Nitratspiegel konnten erhöhte Spiegel in den ischämischen Beinen der Tiere der Nitratgruppe nachgewiesen werden. Die Myoblasten aus den Hinterläufen der Tiere der Nitratgruppe wiesen eine signifikant reduzierte Apoptose- und eine erhöhte Vitalitätsrate auf. Die Bestimmung des löslichen Fas-Liganden im Serum der Tiere erbrachte keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontroll- und der Nitratgruppe. Zusammenfassend legen die Ergebnisse eine positive Wirkung der Gabe von Nitrat nahe. Bezüglich des zugehörigen Mechanismus müssen noch genauere Untersuchungen erfolgen.

6 Literaturverzeichnis

- (1) Lawall H, Diehm C, Pittrow D, Balzer K, Gail D, Heidrich H, Huppert P, Lindhoff-Last E, Löllgen H, Ott N, Rümenapf G, Schmidt-Trucksäss A, Schmidt W, Schulte K-L, Stiegler H, Tacke J, Trampisch H-J. Leitlinien

zur Diagnostik und Therapie der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (PAVK), *AWMF*. 2009; 065/003:1-121.

- (2) Couffinhal T, Silver M, Zheng LP, Kearney M, Witzenbichler B, Isner JM. Mouse Model of Angiogenesis, *Am J Pathol*. 1998; 152:1667-79.
- (3) Unthank JL, Nixon J, Lash JM. Early adaptations in collateral and microvascular resistances after ligation of the rat femoral artery, *J. Appl. Physiol*. 1995; 79:73-82.
- (4) Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Symes JF, Fishman MC, Huang PL, Isner JM. Nitric Oxide Synthase Modulates Angiogenesis in Response to Tissue Ischemia. *J Clin Invest*. 1998; 101:2567-78.
- (5) Fadini GP, Sartore S, Schiavon M, Albiero M, Baesso I, Cabrelle A, Agostini C, Avogaro A. Diabetes impairs progenitor cell mobilisation after hindlimb ischaemia-reperfusion injury in rats. *Diabetologia*. 2006; 49:3075-84.
- (6) Tojo T, Ushio-Fukai M, Yamaoka-Tojo M, Ikeda S, Patrushev N, Alexander RW. Role of gp91phox[nox2]-containing nadphoxidase in angiogenesis inresponse to hindlimb ischemia. *Circulation*. 2005; 111:2347-55.
- (7) Voskuil M, Hoefer I, van Royen N, Hua J, de Graaf S, Bode C, Buschmann IR, Piek JJ. Abnormal monocyte recruitment and collateral artery formation in monocyte chemoattractant protein-1 deficient mice. *Vasc Med*. 2004; 9:287-92.
- (8) Scholz D, Thomas S, Sass S, Podzuweit T. Angiogenesis and myogenesis as two facets of post-ischemic tissue regeneration. *Mol Cell Biochem*. 2003; 246:57-67.
- (9) Helisch A, Wagner S, Khan N, Drinane M, Wolfram S, Heil M, Ziegelhoeffer T, Brandt U, Pearlman JD, Swartz HM, Schaper W. Impact of Mouse Strain Differences in Innate Hindlimb Collateral Vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26:520-6.
- (10) Goukassian D, Qin G, Dolan C, Murayama T, Silver M, Curry C, Eaton E, Luedemann C, Ma H, Asahara T, Zak V, Mehta S, Burg A, Thorne T, Kishore R, Losordo DW. Tumor Necrosis Factor-Receptor p75 Is

Required in Ischemia-Induced Neovascularization. *Circulation*. 2007; 115:752-62.

- (11) Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 84(24):9265-9.
- (12) Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J*. 1989; 3:2007-18.
- (13) Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2008; 7:156-67.
- (14) Ignarro LJ. Endothelium-derived nitric oxide: pharmacology and relationship to the actions of organic nitrate esters. *Pharm Res*. 1989; 6:651-9.
- (15) Ignarro L. Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension*. 1990; 16:477-483.
- (16) Jin RC, Loscalzo J, Vascular Nitric Oxide: Formation and Function. *J Blood Med*. 2010; 1:147-162.
- (17) Dias RG, Negrao CE, Krieger MH. Nitric Oxide and the Cardiovascular System: Cell Activation, Vascular Reactivity and Genetic Variant. *Arq Bras Cardiol*. 2009; 96:68-75.
- (18) Forstermann U. Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal. *Bio.Chem*. 2006; 387: 1521-1533.
- (19) Schmidt A, Brixius K, Bloch W. Endothelial Precursor Cell Migration During Vasculogenesis. *Circ Res*. 2007; 101:125-36.
- (20) Kadl A, Leitinger N. The Role of Endothelial Cells in the Resolution of Acute Inflammation. *Antioxidants & redox signaling*. 2005; 7:1744-1754.
- (21) Weitzberg E., Hezel M, Lundberg JO. Nitrate-Nitrite-Nitric Oxide Pathway Implications for Anesthesiology and Intensive Care. *Anesthesiology*. 2010; 113:1460-1475.
- (22) Ignarro, LJ. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ Res*. 1989; 65:1-25.

- (23) Bryan NS, Calvert JW, Elrod JW, Gundewar S, Ji SY, Lefer DJ. Dietary nitrite supplementation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 27;104:19144-9.
- (24) van Faassen EE, Bahrami S, Feelisch M, Hogg N, Kelm M, Kim-Shapiro DB, Kozlov AV, Li H, Lundberg JO, Mason R, Nohl H, Rassaf T, Samouilov A, Slama-Schwok A, Shiva S, Vanin AF Weitzberg E, Zweier J, Gladwin MT. Nitrite as regulator of hypoxic signaling in mammalian physiology. *Med Res Rev*. 2009; 5:683-741.
- (25) Rassaf T, Preik M, Kleinbongard P, Lauer T, Heiss C, Strauer BE, Feelisch M. Evidence for in vivo transport of bioactive nitric oxide in human plasma. *J Clin Invest*. 2002; 109:1241-1248.
- (26) Gladwin MT. Role of the red blood cell in nitric oxide homeostasis and hypoxic vasodilation. *Adv Exp Med Bio*. 2006; 588:189-205.
- (27) Gladwin MT. Hemoglobin as a nitrite reductase regulating red cell-dependent hypoxic vasodilatation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005; 32:363-6.
- (28) Rassaf T, Flögel U, Drexhage C, Hendgen-Cotta U, Kelm M, Schrader J. Nitrite reductase function of deoxymyoglobin: oxygen sensor and regulator of cardiac energetics and function. *Circ Res*. 2007; 100:1749-54.
- (29) Hendgen-Cotta U, Merx MW, Shiva S Schmitz J, Becher S, Klare JP, Steinhoff HJ, Goedecke A, Schrader J, Gladwin MT, Kelm M, Rassaf T. Nitrite reductase activity of myoglobin regulates respiration and cellular viability in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105:10256-61.
- (30) Bryan NS, Calvert JW, Gundewar S, Lefer DJ. Dietary nitrite restores NO homeostasis and is cardioprotective in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Free Radic Biol Med*. 2008; 45:468-74.
- (31) McKnight GM, Duncan CW, Leifert C, Golden M. Dietary nitrate in man: friend or foe? *Brit J Nutr*. 1999; 81:349-358.
- (32) Jansson EA, Huang L, Malkey R, Govoni M, Nihlén C, Olsson A, Stensdotter M, Petersson J, Holm L, Weitzberg E, Lundberg JO. A

mammalian functional nitrate reductase that regulates nitrite and nitric oxide homeostasis. *Nat. Chem. Biol.* 2008; 4:411-417.

- (33) Lefer DJ. Emerging Role of Nitrite in Myocardial Protection. *Arch Pharm Res.* 2009; 32:1127-1138.
- (34) Duranski MR, Greer JJM, Dejam A, Jaganmohan S, Hogg N, Langston W, Patel RP, Yet SF, Wang X, Kevil CG, Gladwin MT, Lefer DJ. Cytoprotective effects of nitrite during in vivo ischemia-reperfusion of the heart and liver J. *Clin. Invest.* 2005; 115:1232-40.
- (35) Webb A, Bond R, McLean P, Uppal R, Benjamin N, Ahluwalia A. Reduction of nitrite to nitric oxide during ischemia protects against myocardial ischemia-reperfusion damage. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101:13683-8.
- (36) Baker JE, Su J, Fu X, Hsu A, Gross GJ, Tweddell JS, Hogg N. Nitrite confers protection against myocardial infarction: role of xanthine oxidoreductase, NADPH oxidase and K(ATP) channels. *J Mol Cell Cardiol.* 2007; 43:437-44.
- (37) Tripatara P, Patel NS, Webb A, Rathod K, Lecomte FM, Mazzon E, Cuzzocrea S, Yaqoob MM, Ahluwalia A, Thiemermann C. Nitrite-derived nitric oxide protects the rat kidney against ischemia/reperfusion injury in vivo role for xanthine oxidoreductase. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18(2):570-80.
- (38) Lefer DJ. Nitrite therapy for protection against ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006; 290:F777-F778.
- (39) Moncada S, Higgs EA. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J.* 1995; 9:1319-30.
- (40) Bernal-Mizrachi C, Gates AC, Weng S, Imamura T, Knutsen RH, DeSantis P, Coleman T, Townsend RR, Muglia LJ, Semenkovich CF. Vascular respiratory uncoupling increases blood pressure and atherosclerosis. *Nature.* 2005; 435:502-6.
- (41) Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney jr JF. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med.* 1997; 337:408-16.
- (42) Quinlyn A Soltow, Vitor A Lira, Jenna L Betters, Long JH, Sellman JE, Zeanah EH, Criswell DS. Nitric oxide regulates stretch-induced

proliferation in C2C12 myoblasts. *J Muscle Res Cell Motil.* 2010; 31,:215-233.

- (43)Sacco A, Doyonnas R, Kraft P, Vitorovic S, Blau HM. Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells. *Nature.* 2009; 456:502-6.
- (44)Lüllmann-Rauch R. Lehrbuch Histologie Stuttgart Thieme. 2003.
- (45)Buckingham M. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J. Anat.* 2003; 202:59-68.
- (46)De Angelis L, Cusella De Angelis MG, Berghella L Lattanzi L, Zanchi M, Cusella-De Angelis MG, Ponzetto C, Cossu G. Skeletal Myogenic Progenitors Originating from Embryonic Dorsal Aorta Coexpress Endothelial and Myogenic Markers and Contribute to Postnatal Muscle Growth and Regeneration. *J. Cell Biol.* 1999; 147:869-877.
- (47)Sacco A, Doyonnas R, Kraft P, Vitorovic S, Blau HM. Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells. *Nature.* 2009; 456:502-6.
- (48)Turner N, Badylak S. Regeneration of skeletal muscle. *Cell Tissue Res.* 2011; 347(3):759-74.
- (49)Ferrari G, Cusella De Angelis MG, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle Regeneration by Bone Marrow–Derived Myogenic Progenitors. *Science.* 1998; 279:1528-1530.
- (50)Cousins JC, Woodward KJ, Gross JG, Partridge TA, Morgan JE. Regeneration of skeletal muscle from transplanted immortalised myoblasts is oligoclonal. *J. Cell Sci.* 2004; 117:3259-3269.
- (51)Germani A, Di Carlo A, Mangoni A et al. Vascular Endothelial Growth Factor Modulates Skeletal Myoblast Function. *Am J Pathol.* 2003; 163:1417-28.
- (52) Orlinick JR, Vaishnav AK, Elkon KB. Structure and Funktion of Fas/Fas Ligand Intern Rev. *Immunol.*1999; 18:293-308.
- (53)Voss M, Lettau M, Paulsen M, Janssen O. Posttranslational regulation of Fas ligand function. *Cell Commun Signal.* 2008; 6:1-30.
- (54)Linkermann A, Qian J, Lettau M, Kabelitz D, Janssen O. Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a

death-inducing signaling complex. *Expert Opin Ther Targets*. 2005; 9:119-134.

- (55) Gewies, A. Introduction to Apoptosis. *ApoReview*. 2003; 1.26.
abgerufen von der Seite
<http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/aporev.htm> am 20.07.2014.
- (56) Siegel RM, Chan FK, Chun JH, Lenardo MJ. The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nat Immunol*. 2000; 1:469-74.
- (57) http://en.wikipedia.org/wiki/File:Fas_signaling.jpg, abgerufen am 15.07.2014.
- (58) Kischkel F, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter M. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)- associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO Journal*. 1995; 14(22):5579-88.
- (59) Yaffe D, Feldman M. The Formation of Hybrid Multinucleate Muscle Fibers from Myoblasts of different genetic origin. *Dev Biol*. 1965; 11:300-17.
- (60) Heil M, Eitenmüller I, Schmitz-Rixen T, Schaper W. Arteriogenesis versus angiogenesis - similarities and differences. *J Cell Mol Med*. 2006; 10:45-55.
- (61) Schmidt A, Brixius K, Bloch W. Endothelial Precursor Cell Migration During Vasculogenesis. *Circ Res*. 2007; 101:125-36.
- (62) Asahara T, Kawamoto A, Masuda H. Concise Review: Circulating Endothelial Progenitor Cells for Vascular Medicine. *Stem Cells*. 2011; 19:1650-1655.
- (63) Perry BN, Arbiser, JL. The Duality of Angiogenesis - implications for Therapy of Human Disease. *J Invest. Dermatol*. 2006; 126:2160-2166.
- (64) Lee CW, Stabile Eugenio, Kinnaird T, Shou M, Devaney JM, Epstein SE, Burnett MS. Temporal Patterns of Gene Expression After Acute Hindlimb Ischemia in Mice. *J Am Coll Cardiol*. 2004; 43:474-82.
- (65) Wardell K, Jakobsson A, Nilsson GE. Laser doppler perfusion imaging by dynamic light scattering. *IEEE Trans Biomed Eng*. 1993; 40:309-16.

- (66)Linden M, Sirsjo A, Lindbom L, Nilsson G, Gidlof A. Laser Doppler perfusion imaging of microvascular blood flow in rabbit tenuissimus muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1995; 269:1496-500.
- (67)Yaffe D, Feldman M. The Effect of Actinomycin D on Heart and Thigh Muscle Cells Grown in Vitro. *Dev Biol.* 1964; 9:347-66.
- (68)Richler C, Yaffe D. The in Vitro Cultivation and Differentiation Capacities of Myogenic Cell Lines. *Dev Biol.* 1970;23:1-22.
- (69)Rando TA, Blau HM. Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy. *J Cell Biol.* 1994; 125:1275-87.
- (70)Jansem KM, Pavlath GK. Mannose receptor regulates myoblast motility and muscle growth. *J Cell Biol.* 2006; 174:403-13.
- (71)Blanco-Bose WE, Yao CC, Kramer RH, Blau HM. Purification of Mouse Primary Myoblasts Based on $\alpha 7$ Integrin Expression. *Exp Cell Res.* 2001; 265:212-20.
- (72)Adhihetty PJ, O'leary MFN, Chabi B, Wicks KL, Hood DA. Effect of denervation on mitochondrially mediated apoptosis in skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 2006; 102:1143-51.
- (73)Agusti AGN, Sauleda J, Miralles C, Gomez C, Togores B, Sala E, Batle S, Busquets X. Skeletal Muscle Apoptosis and Weight Loss in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 166:486-9.
- (74)Gosker HR, Kubat B, Schaart G, Van der Vusse GJ, Wouter EFM, Schols AM. Myopathological features in skeletal muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 2003; 22:280-5.
- (75)Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson S. Identification of Programmed Cell Death in Situ via specific Labeling of Nuclear DNA Fragmentation. *J Cell Biol.* 1992; 119:493-501.
- (76)Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C, Brambilla C, Brambilla E. In Situ Apoptotic Cell Labeling by the TUNEL Method: Improvement and Evaluation on Cell Preparations. *J. Histochem. Cytochem.* 1996; 44:959-68.

- (77) Negoescu A, Guillermet C, Lorimier P, Brambilla E, Labat-Mole F. Importance of DNA Fragmentation in Apoptosis with regard to TUNEL specificity. *Biomed & Pharmacother.* 1998; 52:252-8.
- (78) Choi J, Lee SJ, Christ GJ, Atala A, Yoo JJ. The influence of electrospun aligned poly(3-caprolactone)/collagen nanofiber meshes on the formation of self-aligned skeletal muscle myotubes. *Biomaterials.* 2008; 29:2899-906.
- (79) Rassaf T, Bryan NS, Kelm M, Feelisch M. Concomitant presence of N-nitroso and S-nitroso proteins in human plasm. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33:1590-1596.
- (80) Feelisch M, Rassaf T, Mnaimneh S, Singh N, Bryan NS, Jourd'heuil D, Kelm M. Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo *FASB J.* 2002; 16:1775-85.
- (81) Rassaf T, Kleinbongard P, Preik M, Dejam A, Gharini P, Lauer T, Erckenbrecht J, Duschin A, Schulz R, Heusch G, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrosothiols contribute to the systemic vasodilator effects of intravenously applied NO: experimental and clinical study on the fate of NO in human blood. *CIRC Res.* 2002; 91(6):470-7.
- (82) Rassaf T, Preik M, Kleinbongard P, Lauer T, Heiß C, Strauer BE, Feelisch M, Kelm M. Evidence for in vivo transport of bioactive nitric oxide in human plasma. *J Clin Invest.* 2002; 109:1241-8.
- (83) Greenwald RA. Handbook of methods for oxygen radical research. *Boca Raton CRC Press.* 1985.
- (84) Grau M, Hendgen-Cotta U, Brouzos P, Drexhage C, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Kelm M, Kleinbongard P. Recent methodological advances in the analysis of nitrite in the human circulation: Nitrite as a biochemical parameter of the L-arginine/NO pathway. *J. Chromatogr. B.* 2007; 851:106-23.
- (85) Kropp, M. Impact of inorganic Nitrate in Cardiovascular Ischemic Disease. *Doctoral Thesis, RWTH Aachen.* 2014; 1-152.
- (86) Schicho, A. Diätetisches Nitrat verbessert die Regeneration nach Ischämie im murinen Hinterlaufmodell über Modulation des mTOR –

Signalweges. *Doctoral Thesis*. 2014, Aktuell laufende Promotion an der Universität Düsseldorf.

- (87)Lundberg JO, Weitzberg E, Cole JA, Benjamin N. Nitrate, bacteria and human health. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2:593-602.
- (88)Emanuelli C, Salis MB, Pinna A, Graiani G, Manni L, Madeddu P. Nerve Growth Factor Promotes Angiogenesis and Arteriogenesis in Ischemic Hindlimbs. *Circulation*. 2002; 106:2257-62.
- (89)Velaquez OC. Angiogenesis and vasculogenesis: Inducing the growth of new blood vessels and wound healing by stimulation of bone marrow-derived progenitor cell mobilization and homing. *J Vasc Surg*. 2007; 45:39-47.
- (90)Dandan, L. Emerging Role of Nitrite in Proliferation and Differentiation of Endothelial Progenitor Cells. *Masterthesis*. 2009, RWTH Aachen.
- (91)Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, Zeiher AM, Dimmeler S. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med*. 2003; 9:1370-6.
- (92)Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. Mobilizing endothelial progenitor cells. *Hypertension*. 2005; 45:321-5.
- (93)Sacco A, Doyonnas R, Kraft P, Vitorovic S, Blau HM. Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells. *Nature*. 2009; 456:502-6.
- (94)Harman JW, Gwinn R. The recovery of skeletal muscle fibers from acute ischemia as determined by histologic and chemical methods. *Am. J. Pathol*. 1948; 25:741-755.
- (95)Nishigaki K, Minatoguchi S, Seishima M, Asano K, Noda T, Yasuda N, Sano H, Kumada H, Takemura M, Noma A, Tanaka T, Watanabe S, Fujiwara_H. Plasma Fas Ligand, an Inducer of Apoptosis, and Plasma Soluble Fas, an Inhibitor of Apoptosis, in Patients With Chronic Congestive Heart Failure. *J Am Coll Cardiol*. 1997; 29:1214-20.
- (96)Blanco-Colio LM, Martín-Ventura JL, Tuñón J, García-Camarero T, Berrazueta JR, Egido J. Soluble Fas ligand plasma levels are associated with forearm reactive hyperemia in subjects with coronary

artery disease. A novel biomarker of endothelial function?

Atherosclerosis. 2008; 201(2): 407-412.

- (97) Ferguson TA, Apte R. Angiogenesis in eye disease: immunity gained or immunity lost? *Semin Immunopathol*. 2008; 30:111-119.
- (98) Jung KH, Chu K, Ko SY, Lee ST, Sinn DI, Park DK, Kim JM, Song EC, Kim M, Roh JK. Early intravenous infusion of sodium nitrite protects brain against in vivo ischemia-reperfusion injury. *Stroke*. 2006; 37:2744-50.
- (99) Tripatara P, Patel NS, Webb A, Rathod K, Lecomte FM, Mazzon E, Cuzzocrea S, Yaqoob MM, Ahluwalia A, Thiemermann C. Nitrite-derived nitric oxide protects the rat kidney against ischemia/reperfusion injury in vivo role for xanthine oxidoreductase. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18(2):570-80.
- (100) Hendgen-Cotta U., Luedike P, Totzeck M, Kropp M, Schicho A, Stock P, Rammos C, Niessen M, Heiss C, Lundberg JO, Weitzber E, Kelm M, Rassaf T. Dietary Nitrate Supplementation Improves Revascularization in Chronic Ischemia. *Circulation*. 2012; 126:1983-1993.

Danksagung

Für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, eine große Methodenvielfalt in ihrem Labor kennenzulernen, möchte ich mich bei Univ. Prof. Dr. Kelm und Univ. Prof. Dr. Rassaf bedanken.

Insbesondere Univ. Prof. Dr. Rassaf gilt mein Dank dafür, dass er seine Begeisterung für die Forschung schon in meiner Famulatur in der Kardiologie mit mir geteilt hat.

Mein besonderer Dank gilt Fr. Dipl.-Biol. Martina Kropp für die Heranführung an die Laborarbeit sowie an die gewissenhafte und genaue wissenschaftliche Arbeitsweise. Ohne die gute Zusammenarbeit wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Die gemeinsame Arbeit wird mir sehr positiv in Erinnerung bleiben.

Ebenso möchte ich mich bei Dominik Semmler, Anna Dobias, Dandan Lou, Anita Kossak, Larissa Thevissen und den anderen Mitgliedern der damaligen Arbeitsgruppe bedanken.

Auch bei meinen Freunden Felix Schneider, Ariane Römer und Wibke Schulte möchte ich mich für ihre Unterstützung und Ermunterung bedanken.

Sowohl für ihre Unterstützung während der Doktorarbeit als auch während meines gesamten Studiums möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Was ich erreicht habe, verdanke ich ihnen.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Geboren am 02.07.1984

In Aachen

Berufliche Tätigkeit/Studium/Schulbildung

April 2012 bis März 2013	>	Assistenzarzt in der Klinik für Allgemeine Neurochirurgie , Uniklinikum Freiburg
seit April 2013	>	Assistenzarzt in der Klinik für Neurologie, Uniklinik Bonn
seit WiSe 05/06 bis WiSe 11/12	> >	Humanmedizin (Modellstudiengang) an der RWTH Aachen 2.Staatsexamen Oktober 2011 <ul style="list-style-type: none"> • schriftliches Examen 4.-6.10.11, Note: 1 • mündliches Examen 18.-19.10.11, Note: 1 • Gesamtnote: 1,0
seit WiSe 07/08	> > > > > > >	Doktorand in der Medizinischen Klinik I (Kardiologie/Angiologie/Pulmologie) AG Rassaf/Kelm (erst Aachen, seit SoSe 09 Uniklinikum Düsseldorf) Thema: > "Geweberegeneration nach Hinterlaufischämie im Mausmodell:Analyse und Methodenetablierung" Publikation > "Dietary Nitrate Supplementation Improves Revascularization in Chronic Ischemia" > Hendgen-Cotta UB, Luedike P, Totzeck M, Kropp M, Schicho A, Stock P, Rammos C, <u>Niessen M</u> , Heiss C, Lundberg JO, Weitzberg E, Kelm M, Rassaf T. > <i>Circulation</i> . 2012;126:1983-1992
September 2008	> >	Ärztliche Basisprüfung Note: sehr gut
August 1995 - Juni 2004	> > >	Gymnasium Zitadelle Jülich Abschluss: Abitur Abschlussnote: 1,2
August 1991 - Juli 1995	>	Kath. Grundschule Jülich

Praktika und Famulaturen

2.05.05- 2.08.05	>	Pflegepraktikum Intensivstation am St.Josef Krankenhaus Linnich
3.08.05-26.08.05	>	freiwilliges Praktikum Anästhesie am St.Josef Krankenhaus Linnich
5.03.07-14.03.07	>	freiwilliges Praktikum Neuropathologie am Universitätsklinikum Aachen
16.07.07-30.07.07	>	Famulatur Pathologie am Universitätsklinikum Aachen
6.08.07-6.09.07	>	Famulatur Kardiologie am Universitätsklinikum Aachen
10.09.07-9.10.07	>	Famulatur Neurologie am Universitätsklinikum Aachen
4.03.08-4.04.08	>	Famulatur Neurochirurgie am Universitätsklinikum Köln

20.12.08-3.01.09	> Famulatur Kardiologische Ambulanz am Universitätsklinikum Aachen
8.07.09-22.07.09	> Famulatur Strahlentherapie am Universitätsklinikum Aachen
28.07.09-9.08.09	> Famulatur Radiologie (ambulant) in der radiolog. Praxis Prof. Wein
17.08.09-31.08.09	> Famulatur Stereotaxie am Universitätsklinikum Köln
1.09.09-15.09.09	> Famulatur Herzchirurgie am Universitätsklinikum Aachen
16.09.09-30.09.09	> Famulatur Rechtsmedizin am Universitätsklinikum Köln
16.08.10-5.12.10	> Praktisches Jahr: Chirurgie-Tertial am Universitätsklinikum Aachen
5.12.10-27.03.11	> Praktisches Jahr: Wahl-Tertial (Neurochirurgie) am Universitätsklinikum Aachen
28.03.11-17.07.11	> Praktisches Jahr: Innere Medizin-Tertial am Universitätsklinikum Aachen

Zivildienst

Juli 2004-April 2005	> Malteser Hilfsdienst Jülich im Krankentransport > für den Einsatz im Krankentransport Ausbildung zum Rettungssanitäter
2004	> Rettungssanitäter-Ausbildung > Note „Gut“

Extracurriculares Engagement

23.03.07-24.03.07	> Teilnahme am "Joint Meeting Belgian-Dutch Neuromuscular Study Club and German Reference Center for Neuromuscular Disease of the DGNN" > Kasteel Bloemendal, Vaals
WiSe 08/09	> Qualifikationsprofil "Zellbiologie"
WiSe 08/09	> Chirurgischer Skillkurs: „Topo-Skill-Kurs“
SoS2 09	> Qualifikationsprofil "Klinische Neurowissenschaften"
SoSe 09	> Unfallchirurgischer Skillkurs: „Gelenkseminar“
SoSe 10	> Qualifikationsprofil "Unfallchirurgie"
SoSe 10	> Chirurgischer Skillkurs: „Advanced Skill Kurs“

Zusatzqualifikation

Fremdsprachen	> Englisch fließend > großes Latein
Computerkenntnisse	> Grundkenntnisse im Umgang mit Office-Anwendungen

Ehrenamtliches Engagement

Seit 2005	> Erste-Hilfe-Ausbilder > Malteser Hilfsdienst > Gliederung Jülich
-----------	--

Hobbys

Sport	> Langstreckenlauf (Jungfrau-Marathon 2003)
-------	---

9 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Datum, Michael Nießen
Unterschrift