

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

**Lokale Assoziation zwischen endothelialer Dysfunktion und Intimahyperplasie:
Relevanz bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit**

Dissertation

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

vorgelegt von

Kolja Benedens

2018

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

gez.:
Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker
Referent: Prof. Dr. med. Christian Heiß
Korreferent: PD Dr. med. Florian Simon

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Heinen Y, Stegemann E, Sansone R, Benedens K, Wagstaff R, Balzer J, Rassaf T, Lauer T, Kelm M, Heiss C. Local Association between Endothelial Dysfunction and Intimal Hyperplasia: Relevance in Peripheral Artery Disease. *J Am Heart Assoc* 2015; 4: 1-8

Zusammenfassung

Die atherosklerotisch bedingte periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) ist ein wesentliches Problem des Gesundheitswesens. Es betrifft mehr als 27 Millionen Menschen in Europa und Nordamerika, entsprechend 16% der über 55jährigen Bevölkerung.

In der Entwicklung und dem Fortschreiten von Atherosklerose spielt die endotheliale Dysfunktion eine zentrale Rolle.

Die Messung von flussvermittelter Dilatation (flow-mediated Dilatation) der Arteria brachialis (BA-FMD) gilt als der nicht invasive Goldstandard, um endotheliale Dysfunktion zu bestimmen. Patienten mit pAVK präsentieren sich jedoch mit einer Atherosklerose der unteren Extremität.

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit ist, dass bei Patienten mit pAVK eine segmentale oder lokale Assoziation zwischen endothelialer Dysfunktion und atherosklerotischen, strukturellen Veränderungen existiert.

Zunächst wurde untersucht, ob die lokale Endothelfunktion assoziiert ist mit der lokalen IMD an einem nicht für Atherosklerose anfälligem Gefäß, der BA, und an einem für Arteriosklerose anfälligem Gefäß, der proximalen AFS. Hierbei wurden pAVK-Patienten mit einer symptomatischen peripheren arteriellen Verschlusskrankheit der AFS (AFS-pAVK) und der der Arterien unterhalb des Knie (BTK-pAVK) verglichen mit nach dem Alter gematchten Kontrollen und jungen, gesunden Kontrollen.

Zusätzlich wurde bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit der Arteria femoralis superficialis (AFS-pAVK) die lokale Endothelfunktion, IMD/ Plaque Dicke und die Gefäßsteifheit proximal einer Fluss-limitierenden Stenose (prästenotisch), in der Stenose (intrastenotisch) und distal der Stenose (poststenotisch) gemessen. Zudem wurde das Ansprechen dieser Läsionen nach lokaler Ballonangioplastie untersucht.

PAVK Patienten wiesen eine endotheliale Dysfunktion der proximalen AFS auf (AFS pAVK FMD $3,9\pm 0,6\%$, BTK-pAVK FMD $3,7\pm 0,6\%$) verglichen mit den gesunden

Kontrollen (FMD $7,4 \pm 1,0\%$) und Patienten ohne pAVK (FMD $5,4 \pm 0,6\%$). Die Werte der FMD der A. brachialis bei pAVK Patienten unterschieden sich nicht von den Patienten ohne pAVK, aber sie waren signifikant niedriger als diejenigen der gesunden Kontrollen.

Endotheliale Dysfunktion korreliert mit einer vermehrten Intima-Media-Dicke oder Plaque Dicke an der Gefäßstelle, an der die FMD gemessen wird. Bei AFS-pAVK Patienten war die AFS FMD zudem innerhalb und distal der Stenose stärker eingeschränkt (prästenotisch $3.9 \pm 0.6\%$, intrastenotisch $2.3 \pm 0.7\%$, poststenotisch $2.5 \pm 0.6\%$) und erholte sich innerhalb von 24 Stunden nach AFS Ballonangioplastie auf prästenotische Werte, erreichte jedoch nicht die Werte der BA-oder AFS-FMD von Patienten ohne pAVK oder gesunden Kontrollen.

Die vorliegenden Daten demonstrieren eine enge Assoziation zwischen lokaler Endothelfunktion, athero- und arteriosklerotischer, struktureller Remodellierung. Dies suggeriert, dass bei pAVK systemische, segmentale und lokale Faktoren, die struktureller oder funktioneller Natur sein können, die Endothelfunktion der unteren Extremität beeinflussen. Die Daten suggerieren, dass segmentale endotheliale Dysfunktion der unteren Extremität eine Rolle in der Pathophysiologie von pAVK spielt. Zudem implizieren die Resultate, dass selbst eine interventionelle Behandlung von pAVK helfen kann, in das Fortschreiten von pAVK einzugreifen, indem Flussbehinderungen angezielt und eine verbesserte Endothelfunktion poststenotisch wiederhergestellt wird.

Summary

Atherosclerotic peripheral arterial disease (PAD) is a major problem in public health. It affects over 27 million people across Northern America and Europe. This is equivalent to 16% of the population aged over 55 years.

Endothelial dysfunction is one of the most important pathophysiological factors in the development and progression of atherosclerosis.

The assessment of brachial artery (BA) flow-mediated vasodilation (FMD) is the noninvasive gold standard to determine endothelial function. However patients with PAD present with lower limb atherosclerosis.

The hypothesis of the present study is, that in PAD, there is a segmental or local association between endothelial dysfunction and atherosclerotic structural changes.

It was examined whether local endothelial function is associated with local intima media thickness (IMT) at a non-atherosclerosis-prone vascular segment, the BA, and at an atherosclerosis-prone segment, the proximal superficial femoral artery (SFA). PAD patients with symptomatic SFA or below-the-knee (BTK) disease were compared with age-matched patients without PAD and young healthy controls.

Furthermore in patients with PAD of the SFA (SFA-PAD) local endothelial function, IMT or plaque thickness and vascular stiffness were investigated proximal to a flow-limiting stenosis (prestenosis), within stenosis (intrastenosis), and distal to stenosis (poststenosis). Moreover the response of these lesions after localized balloon angioplasty was examined.

PAD patients show endothelial dysfunction of the proximal SFA (SFA PAD FMD $3.9 \pm 0.6\%$, BTK PAD FMD $3.7 \pm 0.6\%$) compared with healthy controls ($7.4 \pm 1.0\%$) and patients without PAD ($5.4 \pm 0.6\%$). The values of brachial artery flow-mediated vasodilation were not different in PAD patients compared with patients without PAD. However they were significantly lower than those of healthy controls.

Endothelial dysfunction correlates with increased intima media thickness or plaque thickness at the site of flow-mediated vasodilation measurement. Furthermore in PAD

patients with SFA disease SFA flow-mediated vasodilation was further impaired within and distal to stenosis (prestenosis $3.9\pm 0.6\%$, intrastenosis $2.3\pm 0.7\%$, poststenosis $2.5\pm 0.6\%$). It recovered within 24 hours after SFA balloon angioplasty to prestenotic values but not to the brachial artery or SFA values in patients without PAD or controls.

The present data demonstrate a close association between local endothelial function and atherosclerotic structural remodeling. It suggests that in PAD systemic, segmental, and local factors that can be structural or functional in nature can influence endothelial function of the lower extremity. The data suggest that segmental lower extremity endothelial dysfunction may play a role in the pathophysiology of PAD. Moreover the results imply that an interventional treatment of PAD could help to disrupt PAD progression by targeting flow restrictions and re-establishing better endothelial function downstream.

Liste der Abkürzungen

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ABI	Ankle-brachial-index (Knöchel-Arm-Index)
ACE	Angiotensin converting enzym
AD	Averaged Deviation (Mittlere Abweichung vom Mittelwert)
ADA	American Diabetes Association
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
AHA	American Heart Association
AFS	Arteria femoralis superficialis
AFS-pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit der Arteria femoralis superficialis
ASS	Acetylsalicylsäure
BA	Brachialarterie (Arteria brachialis)
BA-FMD	Flussvermittelter Dilatation (flow-mediated Dilation) der Arteria brachialis
BTK-pAVK	pAVK unterhalb des Knies (below the knee)
FDC	Relative Diameteränderung (fractional diameter change)
FMD	Flussvermittelte Dilatation (flow-mediated Dilation)
GTN	Glyzeroltrinitrat
IMD	Intima-Media-Dicke
KHK	Koronare Herzkrankheit
MW	Mittelwert
NO	Stickstoffmonoxid *
No pAVK	Patienten ohne pAVK
NMD	Nitroglyzerin-vermittelter Vasodilatation (nitroglycerin-mediated dilation)
NOS	Stickstoffmonoxid Synthase
eNOS	Endotheliale Isoform der NO-Synthase
n.s.	nicht signifikant
O ₂ ⁻	Superoxidanion *
oxLDL	Oxidiertes LDL-Cholesterin
V	

pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PTA	Perkutane transluminale Angioplastie
PW-Doppler	Pulsed Wave-Doppler
RF	Risikofaktor
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
SE	Standard Error (Standardfehler)
Tab.	Tabelle
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)

(* Im folgenden Text ohne Kennzeichnung des freien Elektrons)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Periphere arterielle Verschlusskrankheit der unteren Extremität.....	1
1.2	Endotheliale Dysfunktion und Atherosklerose	3
1.3	Diagnostik der endothelialen Dysfunktion.....	5
2	Methoden.....	6
2.1	Studienpopulation.....	6
2.2	Studienprotokoll.....	7
2.3	Dopplersonographische Messung des arteriellen Verschlussdruckes der A. dorsalis pedis und Berechnung des Knöchel-Arm-Index (ABI).....	8
2.4	Bestimmung der schmerzfreien Gehstrecke mittels Laufband.....	8
2.5	Ultraschall Messungen der arteriellen Funktion, IMD und lokalen Steifheit.....	9
2.5.1	Duplexsonographische Bestimmung der endothelabhängigen Dilatation der Arteria brachialis	9
2.5.2	Duplexsonographische Bestimmung der endothelabhängigen Dilatation der Arteria femoralis superficialis	10
2.5.2	Untersuchungsprotokoll	11
2.5.3	Prinzip der sonographischen Bestimmung des arteriellen Durchmessers	13
2.5.4	Messung der Intima-Media-Dicke und Plaque Dicke	15
2.5.5	Bestimmung der relativen Diameteränderung (FDC) als Maß der Gefäßsteifheit	15
2.6	Ballonangioplastie.....	16
2.7	Statistische Analysen.....	16
3	Ergebnisse	18
3.1	Charakterisierung der Studienpopulationen	18
3.2	Endotheliale Dysfunktion in der unteren Extremität und Intimamediadicke bei pAVK ...	19
3.3	Lokal eingeschränkte Vasodilatation innerhalb von AFS Stenosen assoziiert mit lokaler Steifheit.....	22
3.4	Verbesserung der Endothelfunktion nach Ballonangioplastie.....	24
4	Diskussion.....	26
4.1	Methodenkritik	26
4.1.1	Quantifizierung der endothelabhängigen Dilatation mit Hilfe der FMD-Messung....	26

4.2 Endotheliale Dysfunktion bei pAVK Patienten.....	32
4.3 Segmentale endotheliale Dysfunktion bei pAVK Patienten.....	34
4.4 Schlussfolgerung	35
5 Literaturverzeichnis.....	37
6 Danksagung	42

1 Einleitung

Die atherosklerotisch bedingte periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) ist ein wesentliches Problem des Gesundheitswesens. Es betrifft mehr als 27 Millionen Menschen in Europa und Nordamerika, entsprechend 16% der über 55-jährigen Bevölkerung [1]. Patienten mit einer pAVK der unteren Extremität sind einem erhöhten Risiko ischämischer kardiovaskulärer Ereignisse ausgesetzt. Obwohl die Pathophysiologie von koronarer Herzerkrankung (KHK) und pAVK ähnlich sind, ist es nicht bekannt, warum einige KHK-Patienten eine pAVK entwickeln und einige nicht. Zudem entwickeln einige Menschen eine pAVK ohne vorliegende Atherosklerose der Koronarien [2-5].

In der Entwicklung und dem Fortschreiten von Atherosklerose spielt die endotheliale Dysfunktion eine zentrale Rolle [6]. Kardiovaskuläre Risikofaktoren, welche Rauchen, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie und Dyslipidämie beinhalten, verursachen eine Endothelschädigung. Dies ist abhängig von der unterschiedlichen Verletzlichkeit, sowie genetischen Faktoren und Umweltfaktoren. Dysfunktionales Endothel setzt eine sich selbst verstärkende Abwärtsspirale in Gang. Der Prozess beinhaltet hierbei Entzündung, eine Aktivierung von Thrombozyten und glatten Muskelzellen, welche zu degenerativen vaskulären Prozessen mit Gefäßwandverdickung und -versteifung führen.

Atherosklerose in den peripheren Arterien ist ein chronischer, langsam verlaufender Prozess, in dessen Rahmen es zu einer Annäherung der Gefäßwände kommt. In Abhängigkeit vom jeweiligen Grad der Annäherung können hierbei Symptome in unterschiedlichem Ausmaße auftreten.

1.1 Periphere arterielle Verschlusskrankheit der unteren Extremität

Es gibt zahlreiche Untersuchungen zur Epidemiologie der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit der unteren Extremität. Die Prävalenz in Deutschland liegt bei 6,4% der Männer und 5,1% der Frauen [7]. Die Frequenz des Auftretens ist hierbei stark altersabhängig. Während die Prävalenz der symptomatischen und

asymptomatischen pAVK bei den 45- bis 49-jährigen Männern 3,0% beträgt, steigt sie bei den 70- bis 75-Jährigen auf 18,2% an [7].

Bei den Risikofaktoren handelt es sich um die typischen Risikofaktoren atherosklerotischer Erkrankungen: Rauchen, Diabetes mellitus, Dyslipidämie und arterielle Hypertonie. Für Zigarettenrauchen konnte eine Dosisabhängigkeit gezeigt werden. Ebenso korreliert das Risikolevel mit der Erkrankungsdauer und dem Schweregrad von Diabetes mellitus [8, 9].

Der wichtigste nicht-invasive Test zur Diagnostik der pAVK ist die Bestimmung des Knöchel-Arm-Index (Ankle-brachial index, ABI; siehe Kapitel 2.3) bei dem der am Knöchel gemessene Blutdruck in Relation zu dem Blutdruck der Arme gesetzt wird. Gesunde Personen weisen hierbei je nach Definition einen ABI von 1,0-1,2 auf. Eine pAVK wird durch einen $ABI < 0,90$ definiert. Ein ergänzendes wichtiges Instrument ist der Laufband Test, welcher insbesondere zur Objektivierung der funktionellen Einschränkung geeignet ist und ein weiterer Abfall des ABI nach Belastung zusätzliche wichtige Informationen liefern kann [3].

Es gibt zahlreiche klinische Erscheinungsbilder der pAVK, die nach der Fontaine oder Rutherford Klassifikation kategorisiert werden. Ein Großteil der Patienten ist hierbei asymptomatisch (Fontaine Stadium I), wobei betont werden muss, dass auch diese Patienten einem erhöhten Risiko kardiovaskulärer Ereignisse ausgesetzt sind [10]. Das klassische Leitsymptom der pAVK ist die Claudicatio intermittens, charakterisiert durch einen belastungsabhängigen ischämischen Beinschmerz, der nach körperlicher Ruhe wieder verschwindet und dessen Lokalisation von der Höhe der arteriellen Obstruktion abhängig ist (Fontaine Stadium II). Schwerere Fälle sind durch einen Ruheschmerz gekennzeichnet (Fontaine Stadium III). Ulzerationen und Gangrän indizieren schwere Ischämien (Fontaine Stadium IV). Stadium III und IV werden als *kritische Extremitätenischämie* zusammengefasst. Abbildung 1 fasst die klinische Klassifikation nach Fontaine und Rutherford zusammen.

Fontaine		Rutherford		
Stadium	Klinische Erscheinung	Grad	Kategorie	Klinische Erscheinung
I	Asymptomatisch	0	0	asymptomatisch
IIa	Gehstrecke > 200m	I	1	Leichte Claudicatio intermittens
IIb	Gehstrecke < 200m	I	2	Mäßige Claudicatio intermittens
		I	3	Schwere Claudicatio intermittens
III	Ischämie bedingter Ruheschmerz	II	4	Ischämie bedingter Ruheschmerz
IV	Ulkus, Gangrän	III	5	Kleinflächige Nekrose
		III	6	Großflächige Nekrose

Abbildung 1: Stadieneinteilung der pAVK nach Fontaine und Rutherford

1.2 Endotheliale Dysfunktion und Atherosklerose

Bei der Entwicklung der Arteriosklerose kommt der Beeinträchtigung der endothelialen Funktion und somit der Integrität der Gefäßwand eine zentrale Rolle zu [11]. Es handelt sich bei der Atherosklerose um eine chronisch fortschreitende Erkrankung, die alle Arterien betrifft. Aus pathologischer Sicht ist sie als entzündliche Reaktion mit Infiltration der Intima durch Makrophagen und Lymphozyten gekennzeichnet [11]. Vereinzelt Ansammlungen von Makrophagen mit intrazellulären Fettablagerungen im Bereich der Intima können bereits im Kindesalter beobachtet werden [12]. Im Verlauf kommt es durch Fettablagerungen im Bereich der extrazellulären Matrix und regressive Prozesse zu einem bindegewebigem Umbau mit Verkalkungen. Es entstehen fortgeschrittene Läsionen oder Plaques [13]. Durch Protrusion in das Gefäßlumen kann es zu einer hämodynamisch relevanten Obstruktion kommen. Zudem kann es nach

vorausgegangener Plaqueruptur zu einem appositionellem Thrombuswachstum mit akuten ischämischen Ereignissen kommen [14, 15].

Das Konzept der kardiovaskulären Risikofaktoren im Kontext der Ätiologie der Atherosklerose wurde 1961 mit den Resultaten der Framingham Studie etabliert [16]. Hiernach schienen auf der Basis empirisch erhobener Daten Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Rauchen und Hyperlipidämie eine entscheidende Rolle in der Ätiologie der koronaren Herzerkrankung, des Myokardinfarktes und eines Schlaganfalls zu spielen [17]. Zahlreiche Untersuchungen implizieren, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren eine endotheliale Dysfunktion induzieren und hierüber die Entstehung und das Fortschreiten der Atherosklerose vorantreiben [11, 14, 15]. Hierbei beschreibt der Begriff der endothelialen Dysfunktion die Störung aller essentiellen Endothelfunktionen, vor allem der endothelabhängigen Vasorelaxation. Diese scheint im Bereich der peripheren Zirkulation im Wesentlichen durch eine verminderte Stickstoffmonoxid (NO)-Bioverfügbarkeit bedingt zu sein [18].

Ursachen einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit können ein beschleunigter Abbau von NO, eine reduzierte Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS), ein Mangel an Substraten und Kofaktoren der eNOS und eine verminderte eNOS-Aktivierung sein [18]. Zuvor beschriebene kardiovaskuläre Risikofaktoren können zu einer verstärkten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, zum Beispiel Superoxidanionen (O_2^-) führen [19]. Diese können NO frühzeitig zu vasoinaktiven Metaboliten, wie Nitrat abbauen. Zusätzlich wird vermehrt oxidiertes LDL-Cholesterin (oxLDL) in der Gefäßwand gebildet. Endotheltoxisches Peroxynitrit wird bei der Reaktion von NO mit O_2^- gebildet [20-22]. Dieses entkoppelt die eNOS und führt somit zu einer verminderten NO-Synthese und einer vermehrten Bildung von O_2^- [23]. Makrophagen nehmen das oxLDL auf, wodurch es zu einer Bildung von Schaumzellen kommt und chemotaktische Entzündungsfaktoren ausgeschüttet werden. Durch die verminderte NO-Bioverfügbarkeit wird in der Gefäßwand die Proliferation von glatten Muskelzellen sowie die Adhäsion von Thrombozyten begünstigt. Der Beitrag der kardiovaskulären Risikofaktoren in der Ätiologie der Arteriosklerose erklärt sich somit zum Teil durch eine chronische Reduktion der Bioverfügbarkeit von NO durch vermehrten oxidativen Stress [24].

1.3 Diagnostik der endothelialen Dysfunktion

Die Messung von flussvermittelter Dilatation (flow-mediated Dilation) der Arteria brachialis (BA-FMD) gilt als der nicht invasive Goldstandard, um endotheliale Dysfunktion zu bestimmen. Zudem ist es ein prospektiv validierter Parameter um das Fortschreiten und den Ausgang kardiovaskulärer Erkrankungen vorauszusagen [25].

Die vasodilatatorische Funktion der Arteria brachialis kann als ein *in vivo* System zur Detektion der Anwesenheit systemischer pathophysiologischer Faktoren angesehen werden, die die individuelle vaskuläre Gesundheit beeinflussen.

Konzeptionell mögen lokale Faktoren existieren, die zu Atherosklerose isolierter vaskulärer Segmente, zum Beispiel der Karotiden, Koronarien oder der Gefäße der unteren Extremität führen.

Die räumliche Assoziation von Endothelfunktion hinsichtlich der Lokalisation von Intimahyperplasie und Plaque Entwicklung ist nicht gut untersucht.

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Verbindung zwischen Endothelfunktion und Intima-Media-Dicke (IMD) untersucht, wenn sie an derselben arteriellen Lokalisation, zum Beispiel der Arteria brachialis (BA) oder der Arteria femoralis superficialis (AFS) gemessen werden.

Die Hypothese ist hierbei, dass bei Patienten mit pAVK eine segmentale oder lokale Assoziation zwischen endothelialer Dysfunktion und atherosklerotischen, strukturellen Veränderungen existiert.

2 Methoden

Zunächst wurde untersucht, ob die lokale Endothelfunktion assoziiert ist mit der lokalen IMD an einem nicht für Atherosklerose anfälligem Gefäß, der BA, und an einem für Arteriosklerose anfälligem Gefäß, der proximalen AFS.

Zusätzlich wurde bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit der Arteria femoralis superficialis (AFS-pAVK) die lokale Endothelfunktion, IMD/ Plaque Dicke und die Gefäßsteifheit proximal einer Fluss-limitierenden Stenose (prästenotisch), in der Stenose (intrastenotisch) und distal der Stenose (poststenotisch) gemessen. Zudem wurde das Ansprechen dieser Läsionen nach lokaler Ballonangioplastie untersucht.

2.1 Studienpopulation

Es wurden vier Gruppen von Studienobjekten rekrutiert:

(A) Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit der Arteria femoralis superficialis (AFS-pAVK) mit isolierten, weniger als 5 cm langen, hämodynamisch relevanten AFS Stenosen. Einschlusskriterien waren hierbei Claudicatio mit einer schmerzfreien Gehstrecke von weniger als 200 Metern, ein ABI von weniger als 0,9, und isolierte hämodynamisch relevante Stenosen von mehr als 70% der AFS, gemessen als intrastenotische Flußbeschleunigung mit PVR (Peak systolic velocity ratio) von >3.4 und einem charakteristischem post-stenotischem Doppler Spektrum ohne Dip.

(B) Patienten mit klinisch relevanter pAVK unterhalb des Knies (BTK-pAVK) ohne relevante Stenosen der iliakalen, femoralen oder poplitealen Segmente.

(C) dem Alter nach adaptierte Patienten ohne pAVK und

(D) junge, gesunde Probanden ohne pAVK, jeweils definiert durch die Abwesenheit von Claudicatio und einem normalen ABI von größer 0,9.

BTK-pAVK Patienten wiesen signifikante Stenosen der Arteria fibularis, tibialis anterior oder tibialis posterior auf, jeweils bestimmt als mehr als 70 prozentige Stenosen mit einer intrastenotischen Flußbeschleunigung mit PVR >3.4 oder einem

charakteristischem post-stenotischem Doppler Spektrum ohne Dip ohne hämodynamisch relevante Stenosen der Aorta, iliakalen, femoralen oder poplitealen Arterien.

Da sowohl nicht-pAVK-Patienten, als auch pAVK Patienten die Diagnose einer stabilen koronaren Herzerkrankung (KHK) hatten, standen beide Gruppen unter einer optimalen medikamentösen Standardtherapie, welche ein Statin, Betablocker, ACE-Hemmer/Angiotensin-Rezeptor Blocker, ASS oder Clopidogrel beinhaltet.

Ausschlusskriterien waren signifikante Stenosen der iliakalen Arterien oder der Aorta, Dyspnoe (NYHA III-IV), maligne Erkrankungen, terminale Niereninsuffizienz, schwere Herzrhythmusstörungen und akute Entzündungen (CRP >0.5 mg/dl).

Das Studienprotokoll wurde durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt (Studiennummer 4731R). Alle Studienteilnehmer haben schriftlich ihr Einverständnis gegeben.

2.2 Studienprotokoll

Es wurde die Beziehung zwischen der lokalen Endothelfunktion und IMD an der nicht für Atherosklerose anfälligen BA und der für Atherosklerose anfälligen AFS bei Patienten mit und ohne pAVK sowie jungen, gesunden Kontrollen untersucht.

Vaskuläre Ultraschalluntersuchungen beinhalteten die Messung von FMD, Nitroglyzerin-vermittelter Vasodilatation (NMD), und die Messung der Intima-Media-Dicke (IMD) der proximalen AFS in Arealen ohne sichtbare Plaques (definiert als lokale intimale Protrusionen mit einer Dicke von mehr als 150% der angrenzenden IMD) verglichen mit der nicht erkrankten Arteria brachialis (intra-individuell) und der nicht erkrankten AFS von Kontrollprobanden (inter-individuell).

Bei Patienten mit AFS-pAVK wurden die Gefäßeigenschaften prä-, intra- und poststenotisch (mit Hinblick auf hämodynamisch relevante AFS Stenosen) gemessen. Die Messungen wurden 6 Stunden und 24 Stunden nach Ballonangioplastie des stenosierten Segments wiederholt, wobei keine Stentimplantation vorgenommen wurde (n=6).

2.3 Dopplersonographische Messung des arteriellen Verschlussdruckes der A. dorsalis pedis und Berechnung des Knöchel-Arm-Index (ABI)

Die Doppler-sonographische Messung des arteriellen Verschlussdruckes der A. dorsalis pedis zur Bestimmung des Knöchel-Arm-Index (ABI) stellt die wesentliche funktionelle Basisuntersuchungen in der pAVK Diagnostik dar.

Nach einer zehnmütigen Ruhephase in liegender Position wurde der systolische Blutdruck der Arteria brachialis beider Arme nicht-invasiv automatisch nach Riva-Rocci gemessen (Dinamap Vital Signs Monitor). Zur Bestimmung der systolischen Druckwerte der Ae. dorsales pedes beider Beine wurde eine 12 cm große Blutdruckmanschette jeweils am Unterschenkel oberhalb des Knöchels platziert. Für die Messung wurde ein unidirektionales Taschendopplergerät (Schabert Instrumente Röttenbach, Germany) mit einer Stiftsonde (8 MHz) verwendet.

Der ABI wurde für beide Beine separat berechnet. Er ergibt sich als Quotient aus dem arteriellen Verschlussdruck der A. dorsalis pedis bzw. der A. tibialis posterior des jeweiligen Beines und dem Mittelwert der systolischen Drücke beider Ae. brachiales. Eine Ausnahme bildet hierbei eine Druckdifferenz ≥ 10 mmHg zwischen beiden Armen, wobei hier der höhere Druck verwendet wurde.

Einschränkungen mit Hinblick auf die Aussagekraft des ABI ergeben sich bei Diabetikern, da hier aufgrund einer Mediasklerose mit verminderter Komprimierbarkeit der Gefäßwand falsch hohe Druckwerte gemessen werden können. Hinweisend ist hierbei ein ABI-Wert $>1,3$.

2.4 Bestimmung der schmerzfreien Gehstrecke mittels Laufband

Die schmerzfreie Gehstrecke wurde bei allen Probanden mit reduziertem ABI bestimmt. Die schmerzfreie Gehstrecke wurde hierbei mit einem standardisiertem Protokoll (Steigung 12%, Geschwindigkeit 3,2 km/h) auf einem Laufband bestimmt. Die Untersuchung wurde beendet, wenn Patienten aufgrund eines ischämischen Beinschmerzes nicht mehr in der Lage waren weiter zu laufen, oder bei einer Strecke von 200 m.

2.5 Ultraschall Messungen der arteriellen Funktion, IMD und lokalen Steifheit

2.5.1 Duplexsonographische Bestimmung der endothelabhängigen Dilatation der Arteria brachialis

Im Rahmen der angiologischen Untersuchungen wurde die endothelabhängige Dilatation sowohl der Arteria brachialis, als auch der Arteria femoralis superficialis mittels funktionellem, hochauflösendem Ultraschall untersucht.

Hierbei wird die prozentuale Diameterzunahme der Arteria brachialis bzw. Arteria femoralis superficialis im Anschluss an eine physiologische Stimulation der endothelialen NO-Synthese untersucht, wobei letztere aus einem gesteigerten Blutvolumenfluss und daraus resultierender Schubspannung resultiert [26]. Dieses Verfahren wird als flussvermittelte endothelabhängige Dilatation (FMD, flow-mediated Dilatation) bezeichnet.

Im Rahmen dieses Verfahrens wurde der Diameter der A. brachialis 2 cm proximal des Ellenbogens nicht invasiv mittels hochauflösendem Ultraschall bestimmt. Messungen erfolgten hierbei unter Ruhebedingungen sowie im Anschluss an eine reaktive Hyperämie des distalen Versorgungsgebietes der Brachialarterie. Zur Messung wurde ein 12 MHz Schallkopf verwendet (Vivid I, GE). Die Standardabweichungen der Mittelwerte zwischen wiederholten Messungen waren geringer als 1%.

Um einen Flussstimulus in der Leitarterie zu erzeugen, wurde eine Blutdruckmanschette unmittelbar unterhalb der Ellenbeuge platziert. Arterielle Okklusion wurde erzielt, indem der Manschettendruck für 5 Minuten auf einen suprasystolischen Druck von 250 mmHg aufgepumpt wurde. Dies verursacht eine Ischämie und daraus resultierend über autoregulatorische Mechanismen eine Dilatation der Widerstandsgefäße im Endstromgebiet der Leitungsarterie. Die nachfolgende Deflation der Manschette induziert kurzzeitig einen gesteigerten Blutvolumenfluss im Leitungsgefäß (reaktive Hyperämie). Es resultiert eine gesteigerte Schubspannung am Gefäßendothel. Diese stimuliert die endotheliale NOS und NO

dilatiert die glatten Muskelzellen der Gefäßwand via Guanylatcyclase, so dass es zu einer Zunahme des Gefäßdurchmessers kommt.

Der Durchmesser der Leitungsarterie wurde dabei nach Ablassen des Manschettendrucks jeweils in einem zeitlichen Abstand von 20 Sekunden gemessen, wobei die FMD ihr Maximum etwa 60 Sekunden nach Beendigung der Ischämie erreicht. Die Dilatation ist unter den geschilderten Bedingungen fast vollständig NO-vermittelt [27].

Als mögliche Ursachen einer eingeschränkten FMD kommen eine reduzierte endotheliale NO-Synthese, ein vermehrter NO-Abbau sowie ein vermindertes glattmuskuläres Ansprechen auf NO in Betracht. Daher wurde am Ende der Untersuchung die endothel-unabhängige Vasodilatation nach sublingualer Gabe von 400µg Glyzeroltrinitrat (GTN; Nitrolingual, Pohl, Deutschland) als positiv-Kontrolle bestimmt. Hierbei wurden vor sowie 4 Minuten nach GTN Gabe sowohl der Durchmesser der Arteria brachialis als auch der Arteria femoralis superficialis gemessen.

Die Angabe der endothelabhängigen sowie der endothelunabhängige Vasodilatation erfolgte jeweils als prozentuale Zunahme des Diameters in Relation zum Ruhediameter.

2.5.2 Duplexsonographische Bestimmung der endothelabhängigen Dilatation der Arteria femoralis superficialis

Eine wachsende Anzahl an Studien adaptieren die typische FMD Methodologie zur Untersuchung der endothelialen Funktion in anderen Leitungsarterien, wie der A. tibialis posterior [28, 29], der A. poplitea [30-33], der A. femoralis superficialis [34-37] und A. femoralis profunda [38]. Hierbei konnte jedoch, mit Hinblick auf die Arterien der unteren Extremität, nur für die FMD der Arteria femoralis superficialis gezeigt werden, dass diese NO-vermittelt verläuft [39]. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die endothelabhängige Dilatation der Arteria femoralis superficialis untersucht.

Hierbei wurde der Diameter der A. femoralis superficialis 2 bis 4 cm distal der femoralen Bifurkation nichtinvasiv mittels hochauflösendem Ultraschall bestimmt. Zur Messung wurde ein 12 MHz Schallkopf verwendet (Vivid I, GE).

Zur Erzeugung einer Flusstimulation in der Leitarterie wurde eine Blutdruckmanschette am distalen Oberschenkel platziert. Messungen erfolgten zunächst unter Ruhebedingungen sowie im Anschluss an eine reaktive Hyperämie des distalen Versorgungsgebietes der Femoralarterie. Auch hier wurde arterielle Okklusion dadurch erzeugt, indem der Manschettendruck für 5 Minuten auf einen suprasystolischen Druck von 250 mmHg aufgepumpt wurde.

Messungen erfolgten nach Ablassen des Manschettendrucks jeweils in einem zeitlichen Abstand von 20 Sekunden.

Am Ende der Untersuchung wurde die endothel-unabhängige Vasodilatation nach sublingualer Gabe von 400µg Glyzeroltrinitrat (GTN; Nitrolingual, Pohl, Deutschland) als positiv-Kontrolle bestimmt. Hierbei wurde vor sowie 4 Minuten nach GTN Gabe der Durchmesser der Arteria femoralis superficialis gemessen.

2.5.2 Untersuchungsprotokoll

Die Untersuchungen wurden in einem klimatisierten Raum bei 23°C zwischen 7:00 und 9:00 Uhr morgens durchgeführt.

Zunächst wurde unter Ruhebedingungen die Arteria brachialis duplexsonographisch im Bereich der Ellenbeuge aufgesucht. Anschließend wurde das Gefäß im B-Mode längs dargestellt, wobei die Eindringtiefe des Ultraschalls auf 3 cm festgelegt wurde. Es wurde ein Segment mit deutlichen anterioren und posterioren intimalen Grenzflächen zwischen dem Lumen und der Gefäßwand ausgewählt, so dass der Durchmesser deutlich identifiziert werden konnte.

Mit Hilfe der Zoomfunktion wurde der Bereich unmittelbar um das Gefäß vergrößert. Eine Optimierung des Kontrastes zwischen Arterienlumen und Arterienwand konnte durch Veränderung der Verstärkungs- und Kompressionseinstellungen erzielt werden.

Schließlich wurde die Schallkopfposition am Arm markiert. In allen folgenden Untersuchungsschritten wurden weder der Schallkopf noch die Geräteeinstellungen verändert.

Es schloss sich eine zehnmütige Ruhephase in liegender Position an. Hieran anschließend wurden der arterielle Blutdruck (nicht-invasiv nach Riva-Rocci) sowie der Ruhedurchmesser bestimmt. Die Messung der Fließgeschwindigkeit unter Ruhebedingungen erfolgte parallel hierzu mittels PW-Doppler.

Die am proximalen Unterarm, unmittelbar unterhalb der Ellenbeuge lokalisierte Blutdruckmanschette wurde anschließend für 5 min auf einen suprasystolischen Wert von 250 mmHg aufgepumpt. Unmittelbar nach Ablassen des Manschettendrucks wurde maximale Fließgeschwindigkeit während der reaktiven Hyperämie gemessen. Die Bestimmung des Gefäßdurchmessers (FMD) erfolgte jeweils nach 20 s, 40 s, 60 s und 80 s. Parallel hierzu wurde die Fließgeschwindigkeit registriert.

Im Rahmen der sonographischen Untersuchungen der Arteria femoralis superficialis, wurde die Arteria femoralis communis unterhalb des Lig. inguinale aufgesucht und bis zur Aufzweigung in die Arteria femoralis superficialis und profunda verfolgt. Anschließend wurde der Durchmesser der Arteria femoralis superficialis im Längsschnitt bestimmt. Die Blutdruckmanschette wurde oberhalb der Kniekehle im Bereich des Oberschenkels platziert. Alle weiteren Schritte erfolgten analog zu der Messung an der Arteria brachialis.

Nach einer weiteren Ruhephase von 10 min wurde die endothelunabhängige Dilatation untersucht. Hierzu wurden 400µg Glyceroltrinitrat (Nitrolingual, Pohl, Deutschland) als Zerbeißkapsel sublingual appliziert. Nach vier Minuten wurden der Durchmesser und die Fließgeschwindigkeit zunächst in der BA und sofort anschließend in der AFS bestimmt.

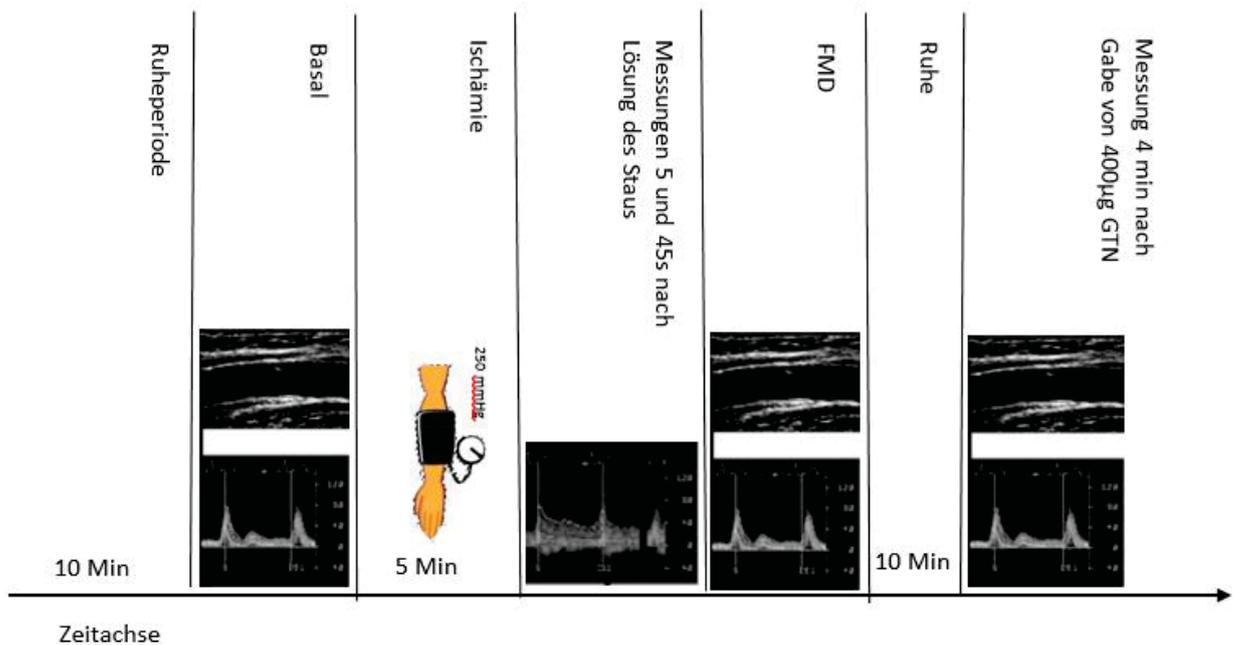


Abbildung 2

Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Untersuchungen. Hierbei sind von links nach rechts dargestellt: Bestimmung der Fließgeschwindigkeit und des Durchmessers in Ruhe, nach 5 Minuten Ischämie sowie schließlich Messung der endothelunabhängigen Dilatation nach einer Ruhephase. Im unteren Teil sind zu den entsprechenden Messzeitpunkten exemplarische Originalaufnahmen eingefügt (Oben: Längsschnitt der A. brachialis; unten: Flussprofil)

2.5.3 Prinzip der sonographischen Bestimmung des arteriellen Durchmessers

Die Durchmesser der Arteria brachialis in der Ellenbeuge sowie der Arteria femoralis superficialis unterhalb des Leistenbandes wurden anhand von Längsschnitten bestimmt, die mit Hilfe eines hochauflösenden 12 MHz Schallkopfes (Vivid I, GE) aufgezeichnet wurden. Es wurden hierbei jeweils mindestens drei Herzzyklen aufgezeichnet. Da der Gefäßdurchmesser im Rahmen des Herzzyklus pulsatilem Schwankungen unterliegt, wurde das kontinuierlich mitlaufende EKG mit aufgezeichnet, um eine R-Zacken synchrone Bestimmung des Durchmessers zu ermöglichen. Der Arteriendurchmesser wurde schließlich computergestützt mittels einer speziell hierfür entwickelten Software (Brachial Analyzer, Medical Imaging Applications, Iowa City, IO, USA) bestimmt. Dies erfolgte EKG gesteuert am Ende der

Diastole (R-Zacke). Als Leitstruktur der Vermessung wurde die M-Linie heran gezogen, die als echoarme Linie den anatomischen Übergang zwischen Adventitia und Media darstellt. Hierbei bestimmte man die Distanz zwischen der schallkopfnahen M-Linie bis zur schallkopffernen M-Linie im rechten Winkel zur Gefäßachse [40, 41].

Der Durchmesser wurde schließlich R-Zacken getriggert durch Mittelung von 150 bis 300 einzelnen Messpunkten im definierten Messabschnitt bestimmt.

Im Rahmen dieser Messmethode kann mindestens eine Tag-zu-Tag-Variabilität von $1,3 \pm 0,9\%$, eine Intra-Observer-Differenz von $0,8 \pm 0,6\%$ und eine Inter-Observer-Differenz von $0,8 \pm 0,4\%$ erreicht werden [42].

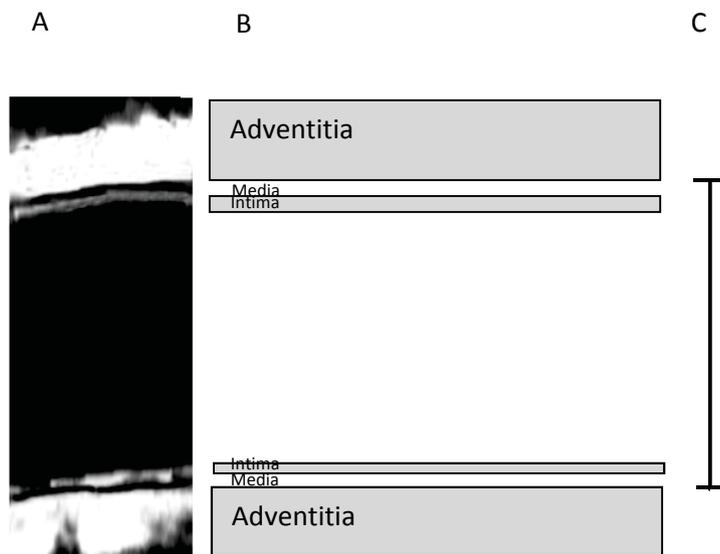


Abbildung 3

Das Ultraschallecho der A. brachialis wird dem anatomischen Korrelat der wandbildenden Strukturen gegenübergestellt.

A Sonographisches Bild der A. brachialis. Hierbei stellt sich die M-Linie echoarm dar.

B Anatomisches Korrelat der wandbildenden Strukturen

C Diametermessung von der schallkopfnahen zur schallkopffernen M-Linie

2.5.4 Messung der Intima-Media-Dicke und Plaque Dicke

Die Intima-Media-Dicke (IMD) wurde mit einer automatischen, Kontur erkennenden Software zwischen der Intima und der Adventitia gemessen (Vivid i, GE). Die IMD wurde an identischen Stellen gemessen, die für die Messungen der FMD der BA und AFS verwendet wurden. Innerhalb von AFS Stenosen wurde die maximale Plaque Dicke an der Schallkopf-nahen und -fernen Wand bestimmt. Um eine bessere Vergleichbarkeit mit den IMD-Messungen zu erreichen, die nur die Schallkopf-ferne IMD berücksichtigte, und aufgrund der Asymmetrie der Plaques mit Hinblick auf die Schallkopf-nahe und -ferne Gefäßwand, wurde sowohl die maximale als auch die mittlere Plaque Dicke bestimmt sowie die prä- und poststenotische IMD. Die Plaque Dicke wurde hierbei folgendermaßen berechnet:

(maximale Plaque Dicke an der Schallkopf-nahen Wand + maximale Plaque Dicke an der Schallkopf-fernen Wand)/2

2.5.5 Bestimmung der relativen Diameteränderung (FDC) als Maß der Gefäßsteifheit

Die lokale arterielle Steifheit wurde ebenfalls an denselben Stellen bestimmt, die für die FMD und IMD Messungen verwendet wurden. Als Maß für die Gefäßsteifheit wurde die relative Diameteränderung (fractional diameter change [FDC]) verwendet. Dieser Parameter beschreibt die systolisch-diastolische Gefäßdiameteränderung im Laufe des Herzzyklus. Hierzu wurde über fünf Herzzyklen der Diameter der BA und AFS kontinuierlich aufgezeichnet. Die FDC errechnet sich als relativer Wert bezogen auf den diastolischen Durchmesser:

$$\text{FDC} = \frac{\text{systolischer Diameter} - \text{diastolischer Diameter}}{\text{diastolischer Diameter}}$$

2.6. Ballonangioplastie

Um den Einfluss von lokalisierter Ballonangioplastie auf die lokale arterielle Funktion zu beurteilen, wurde die FMD und FDC bei AFS-pAVK Patienten 6 Stunden und 24 Stunden nach einer Ballonangioplastie des betreffenden Segments untersucht.

AFS-pAVK Patienten erhielten hierbei eine arterielle Schleuse (Terumo Destination 6F) in der kontralateralen Arteria femoralis communis, wobei eine standardisierte Seldinger Punktionstechnik verwendet wurde. Es wurde ein IMA Katheter und ein hydrophiler 0,035 inch Draht (Terumo Advantage) für das Cross-over-Manöver verwendet. Die Spitze der Schleuse wurde in die Arteria femoralis communis proximal der AFS Stenose vorgeführt und ein Bolus von 5000 IE Heparin appliziert.

Nach Erstellung eines diagnostischen Angiogramms mittels digitaler Subtraktionsangiographie (Philips Alura) wurde der Draht über die Stenose geführt, ein 20-40 mm Ballon (Biotronic Paseo 35) platziert, für zwei Minuten aufgepumpt und schließlich ein Angiogramm erstellt. Es wurden keine fluss-limitierenden Dissektionen und kein Recoil-Effekt beobachtet.

2.7. Statistische Analysen

Die statistischen Daten werden in der vorliegenden Arbeit als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Lineare Zusammenhänge zwischen Variablen wurden als Pearsons Korrelationskoeffizient r angegeben. Statistische Signifikanz wurde bei $p \leq 0.05$ angenommen. Die basalen Gruppencharakteristika wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und konsekutivem post-hoc Test (Tukey) analysiert. Die basalen Gefäßmessungen in der BA und AFS, einschließlich basaler Durchmesser, FMD, NMD und IMD wurden mit zweifaktorieller Varianzanalyse mit Messwiederholung analysiert mit dem Zwischensubjektfaktor „Gruppe“ (Kontrolle, nicht-pAVK, AFS-pAVK, BTK-pAVK) und dem Innersubjektfaktor „BA vs AFS“ mit konsekutivem Tukeys Test für Mehrfachvergleiche.

Gefäßmessungen im Bereich von Stenosen vor und nach PTA wurden mit einfaktorieller Varianzanalyse mit Messwiederholung und konsekutivem Tukeys Test untersucht. Die Analysen erfolgten mit Prism 6 für Mac OS X V6.0a (GraphPad Software Inc.).

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Studienpopulationen

Die gesunde Kontrollgruppe (gesunde Kontrollen) und die Patienten ohne pAVK (No pAVK) sind durch das Fehlen einer Claudicatio Symptomatik und einen normalen ABI gekennzeichnet (*gesunde Kontrollen*: 1.1 ± 0.1 und *No pAVK*: 1.0 ± 0.1). Alle Patienten hatten als Nebendiagnose eine koronare Herzerkrankung. Der ABI war kleiner als 0,9 bei AFS-pAVK Patienten (0.6 ± 0.1) und BTK-pAVK Patienten (0.6 ± 0.1). Die mittlere schmerzfreie Gehstrecke bei den pAVK Patienten betrug 130 ± 60 m (AFS-pAVK) und 150 ± 50 m (BTK- pAVK; $p=0.29$ vs AFS-pAVK, t-test). Zwischen den Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede im Blutdruck, Cholesterinwert und Plasmaglukosespiegel.

Tabelle 1 zeigt die Grundcharakteristika der Studienpopulationen.

Tabelle 1: Klinische Charakteristika der Studienpopulationen (*p* Werte beziehen sich auf 1-Weg ANOVA; * $p < 0.05$ vs gesunde Kontrollen, # $p < 0.05$ vs No pAVK)

	<i>Gesunde Kontrollen</i>	<i>No pAVK</i>	<i>AFS-pAVK</i>	<i>BTK-pAVK</i>	<i>p Wert</i>
N (f/m)	10 (4/6)	10 (5/5)	10 (3/7)	10 (5/5)	
Schmerzfreie Gehstrecke (m)	Nicht limitiert	Nicht limitiert	130 ± 60	150 ± 50	0.29, (t-test)
ABI	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.2	$0.7 \pm 0.1^{* \#}$	$0.6 \pm 0.1^{* \#}$	0.04
KHK (n)	0	10	10	10	
Alter (Jahre)	48 ± 18	$68 \pm 6^{*}$	$68 \pm 9^{*}$	$71 \pm 13^{*}$	0.01
Syst. Blutdruck (mmHg)	120 ± 8	131 ± 9	139 ± 6	129 ± 7	0.06
Diast. Blutdruck (mmHg)	80 ± 4	73 ± 4	99 ± 3	90 ± 7	0.09
Raucher (n)	2	5	6	4	
Arterielle Hypertonie (n)	2	10	10	9	
Diabetes mellitus (n)	0	2	6	6	
Creatinin (mg/dl)	0.8 ± 0.1	1.2 ± 0.5	1.3 ± 0.6	1.3 ± 0.6	0.61
Triglyzeride (mg/dl)	88 ± 46	$129 \pm 61^{* \#}$	$136 \pm 62^{* \#}$	$123 \pm 54^{* \#}$	0.03
Cholesterin (mg/dl)	195 ± 23	171 ± 32	164 ± 40	164 ± 23	0.23
CRP (mg/dl)	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.12
Plasmaglukose (mg/dl)	107 ± 29	110 ± 28	120 ± 31	118 ± 32	0.66
Hb _{A1c} (%)	5.4 ± 0.2	5.8 ± 0.1	6.1 ± 0.1	6.2 ± 0.1	0.12

3.2 Endotheliale Dysfunktion in der unteren Extremität und Intimamediadicke bei pAVK

Die Ergebnisse der Gefäßmessungen mit statistischen Analysen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Zusammenfassung der basalen Gefäßmessungen (*p* Werte beziehen sich auf 2 Weg rm ANOVA Interaktion zwischen 'BA vs AFS' und 'Gruppe'; Symbole beziehen sich auf Tukey's Test: * *p*<0.05 vs gesunde Kontrollen, # *p*<0.05 vs No pAVK, \$ *p*<0.05 vs AFS-pAVK, § *p*<0.05 vs Wert gemessen in BA)

	Gesunde Kontrollen	No pAVK	AFS-pAVK	BTK-pAVK	p-Wert
BA Diameter (mm)	4.5±0.5	4.4±0.5	4.3±0.5	4.3±0.4	0.2945
AFS Diameter (mm)	6.7±0.6 §	7.0±1.4 §	6.4±0.8 §	6.8±0.7 §	
BA-FMD (%)	7.4±1.2	5.9±0.7 *	5.8±1.1 *	5.3±0.4*	0.0016
AFS-FMD (%)	7.1±1.1	5.4±0.6 *	3.7±0.6 *#§	3.9±0.5 *#§	
BA-NMD (%)	11.1±0.6	11.0±1.0	9.8±0.9 *#	9.7±0.7 *#	0.0448
AFS-NMD (%)	10.7±0.6	10.4±0.5 §	9.9±0.8	9.8±0.9 *	
BA-FMD/NMD-Ratio	0.67±0.11	0.54±0.06 *	0.59±0.10	0.55±0.8 *	0.0001
AFS-FMD/NMD-Ratio	0.66±0.12	0.53±0.06 *#	0.38±0.07 *#§	0.40±0.07 *#§	
BA-IMD (mm)	0.27±0.04	0.31±0.03	0.31±0.04	0.33±0.4	0.0001
AFS-IMD/Plaque Dicke (mm)	0.66±0.04 §	0.80±0.09 *#§	1.44±0.20 *#§	1.56±0.15 *#§§	

In der gesunden Kontrollgruppe (*gesunde Kontrollen*) unterschied sich die endothelabhängige Vasodilatation (BA-FMD: 7.4±1.2% vs AFS-FMD: 7.1±1.1%) und die endothelunabhängige Vasodilatation (BA-NMD: 11.1±0.6% vs AFS-NMD: 10.7±0.6%) nicht zwischen der AFS und der BA. Ähnlich zeigten Messungen bei Patienten ohne pAVK, dass die BA- und AFS-FMD vergleichbar waren (BA-FMD: 5.9±0.7%, AFS-FMD: 5.4±0.6%; BA-NMD: 11.0±1.0%, AFS-NMD: 10.4±0.5%). Dennoch waren die BA-FMD und AFS-FMD im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant eingeschränkt. Dies kann als Indikator einer systemischen endothelialen Dysfunktion bei nicht-pAVK Patienten in nicht erkrankten peripheren Arterien angesehen werden und könnte durch die vorexistierende KHK bei diesen Patienten erklärt werden.

In allen Gruppen war die AFS-IMD signifikant größer als die BA-IMD. Einhergehend mit der reduzierten FMD war die IMD bei Patienten ohne pAVK erhöht (AFS-IMD 0.80±0.09

mm) verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe. Dies indiziert die systemische Anwesenheit früher struktureller, atherosklerotischer Veränderungen der arteriellen Gefäßwand in Bereichen mit endothelialer Dysfunktion, angezeigt durch die eingeschränkte FMD.

Ähnlich zu nicht-pAVK Patienten wurde bei Patienten mit pAVK eine eingeschränkte BA-FMD beobachtet (*No pAVK*: $5.9 \pm 0.7\%$, *AFS-pAVK*: $5.8 \pm 1.1\%$, *BTK-pAVK*: $5.8 \pm 0.9\%$) verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe ($7.4 \pm 1.2\%$). Dennoch gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen mit und ohne pAVK. Im Gegensatz hierzu war die AFS-FMD bei Patienten mit AFS-pAVK und BTK-pAVK signifikant niedriger verglichen mit nicht-pAVK Patienten (*No pAVK*: $5.4 \pm 0.6\%$, *AFS-pAVK*: $3.7 \pm 0.6\%$, *BTK-pAVK*: $3.9 \pm 0.5\%$) und der gesunden Kontrollgruppe ($7.1 \pm 1.1\%$). Dies indiziert eine ausgeprägte endotheliale Dysfunktion in arteriellen Segmenten, die von einer klinisch manifesten Arteriosklerose betroffen sind.

Ähnlicher Weise war die endothelunabhängige Vasodilatation der BA zwischen pAVK und nicht-pAVK Patienten nicht signifikant unterschiedlich (*No pAVK*: $11.0 \pm 1.0\%$, *AFS-pAVK*: $9.8 \pm 0.9\%$, *BTK-pAVK*: $9.7 \pm 0.7\%$). Bedeutsam ist, dass der AFS-FMD/NMD-Quotient bei pAVK Patienten im Vergleich zu nicht-pAVK Patienten eingeschränkt war, was eine ausgeprägte endotheliale Dysfunktion indiziert (*No pAVK*: 0.53 ± 0.06 , *AFS-pAVK*: 0.38 ± 0.07 , *BTK-pAVK*: 0.40 ± 0.07). Die basalen Durchmesser der BA und AFS waren in allen Gruppen vergleichbar. Der basale Fluss unterschied sich ebenfalls nicht signifikant zwischen den Gruppen.

Die IMD, ein Parameter, der frühe atherosklerotische strukturelle Veränderungen anzeigt, war in der AFS bei Patienten mit AFS-pAVK und BTK-pAVK erhöht, verglichen mit nicht-pAVK Patienten (*No pAVK*: 0.8 ± 0.09 mm, *AFS-pAVK*: 1.44 ± 0.20 mm, *BTK-pAVK*: 1.56 ± 0.15 mm).

Trotz der Tatsache, dass in den untersuchten Segmenten keine lokalen Protrusionen über 50% der umgebenden IMD festgestellt wurden, war die absolute Dicke in der AFS der pAVK Patienten überproportional größer als die der BA und in manchen Fällen sogar über der 1,5 mm Schwelle, die entsprechend den Mannheim Kriterien einen Plaque definiert [43].

Mit Hinblick auf die BA-IMD wurden zwischen den Gruppen keine Unterschiede beobachtet. In allen Gruppen wurden hochsignifikante lineare inverse Korrelationen zwischen der IMD/ Plaque Dicke und den FMD Messungen an der identischen Stelle der BA ($r=-0.69$, $p<0.001$, Abbildung 1a) und der AFS ($r=-0.74$, $p<0.001$, Abbildung 1b) beobachtet. Aufgrund der geringen Gruppengröße von $n=10$ erfolgten keine inter-Gruppen Korrelationen.

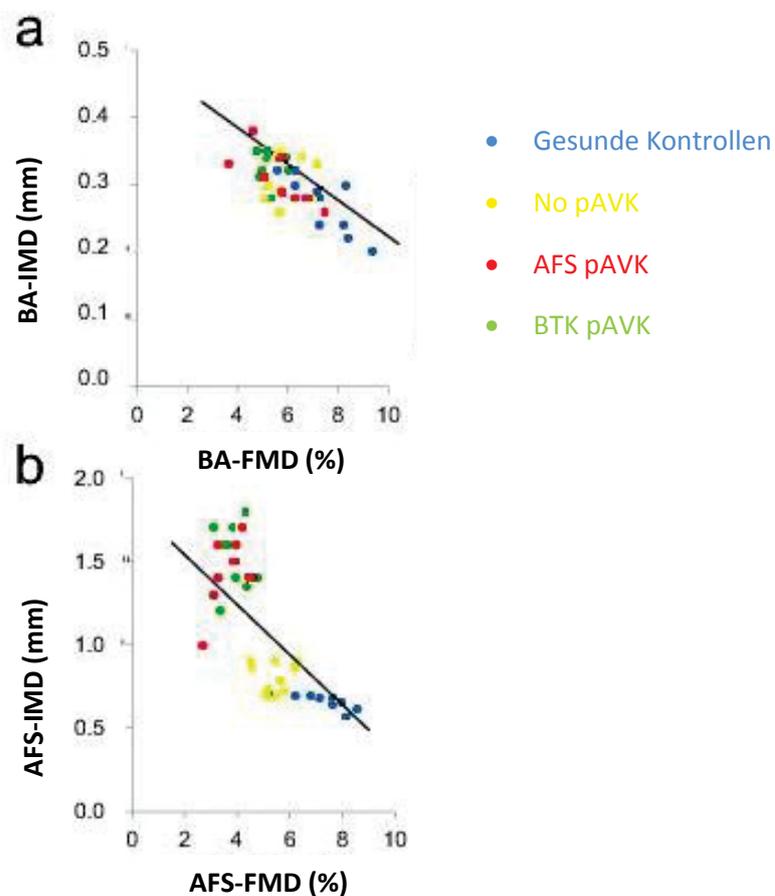


Abbildung 4: Korrelation von FMD und IMD/Plaque Dicke in (A) der BA ($r=-0.69$, $P<0.001$) und (B) der AFS ($r=-0.74$, $P<0.001$).

Es zeigt sich eine hochsignifikante lineare inverse Korrelationen zwischen der IMD/ Plaque Dicke und den FMD Messungen an der identischen Stelle der BA und der AFS

3.3 Lokal eingeschränkte Vasodilatation innerhalb von AFS Stenosen assoziiert mit lokaler Steifheit

In einer Subgruppe von Patienten mit AFS-pAVK, die eine isolierte PTA des untersuchten Segments erhielten (n=6), wurde die FMD vor, innerhalb und nach einer hämodynamisch signifikanten AFS Stenose durch einen atherosklerotischen Plaque untersucht (Abbildung 5). Alle Stenosen zeigten einen Anstieg des Doppler Signals innerhalb der arteriosklerotischen Läsion ($V_{\max} > 350$ cm/s), was eine hämodynamisch relevante Stenose anzeigt.

Die IMD/ Plaque Dicke war nicht nur innerhalb der Stenose signifikant erhöht (intra-: 4.1 ± 0.7 mm), sondern auch poststenotisch (post-: 2.2 ± 0.3 mm), verglichen mit dem prästenotischen Segment (prä-: 1.5 ± 0.1 mm). Dies ging einher mit einer signifikanten Verringerung des Gefäßdurchmessers sowohl intra- als auch poststenotisch, verglichen mit dem proximalen Referenzsegment. Es wurde eine weitere lokale Reduktion der FMD innerhalb und nach der Stenose (intra-stenotisch $1.7 \pm 0.7\%$, post-stenotisch $2.2 \pm 0.6\%$) verglichen mit der prästenotischen FMD ($4.1 \pm 0.3\%$) beobachtet. Die endothelunabhängige Vasodilatation (NMD) war nur innerhalb der Stenose eingeschränkt (prä- $8.8 \pm 0.8\%$, intra- $4.6 \pm 0.9\%$, post-stenotisch $8.0 \pm 0.8\%$)

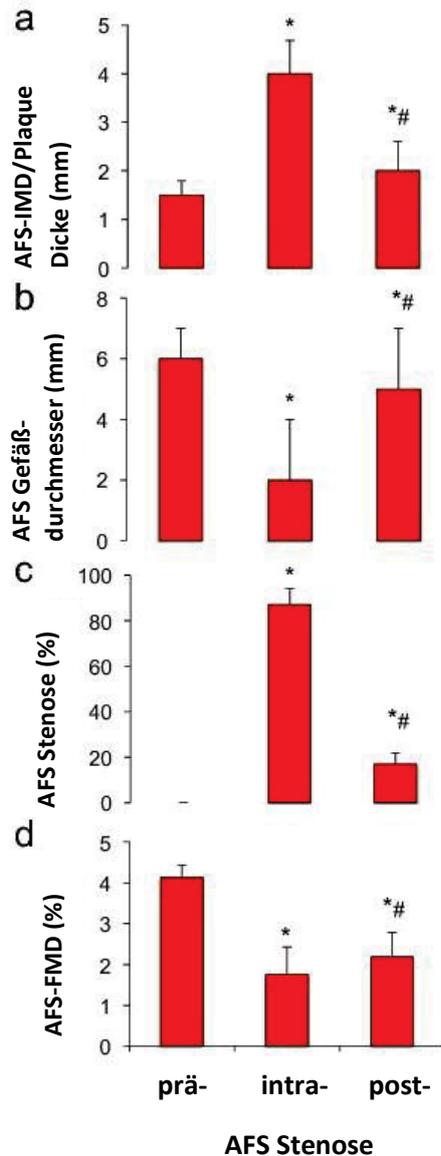


Abbildung 5: IMD oder Plaque Dicke (A), Gefäßdurchmesser (B), Stenosegrad (C), und FMD (D) proximal der AFS Stenose (prästenotisch), innerhalb der AFS Stenose (intra-stenotisch) und distal der AFS Stenose (poststenotisch)

* $P < 0.05$ vs prästenotisch, # $P < 0.05$ vs intra-stenotisch (einfaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung).

A Signifikant erhöhte IMD intra- und poststenotisch.

B Dies geht einher mit einer signifikanten Verringerung des Gefäßdurchmessers sowohl intra- als auch poststenotisch, verglichen mit dem proximalen Referenzsegment

D lokale Reduktion der FMD innerhalb und nach der Stenose verglichen mit der prästenotischen FMD

3.4 Verbesserung der Endothelfunktion nach Ballonangioplastie

Die zuvor beschriebenen AFS-Patienten erhielten eine Ballonangioplastie der AFS Stenose. Es erfolgten Messungen der FMD und der lokalen arteriellen Steifheit nach 6 und 24 Stunden. Sowohl für die FMD, als auch die FDC Messungen war der Behandlungseffekt in der einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung hochsignifikant (jeweils $p < 0.0001$).

Wie in Abbildung 6 dargestellt, war die FMD 6 Stunden nach der PTA verglichen mit den prä-PTA Werten im prästenotischen Segment (baseline: $4.1 \pm 0.3\%$ 6 h: $1.5 \pm 0.7\%$) und im intrastenotischen Segment (baseline: $1.7 \pm 0.7\%$, 6 h: $0.3 \pm 0.3\%$) signifikant reduziert. Dies beruht am ehesten auf einer temporären, Angioplastie-assoziierten Endothelabtragung [44]. Interessanterweise war die poststenotische FMD, gemessen am selben poststenotischen Segment, 6 Stunden nach der PTA verglichen mit den Basalwerten signifikant erhöht (baseline: $2.2 \pm 0.6\%$, 6 h: $4.1 \pm 0.3\%$), einhergehend mit dem wiederhergestellten Blutfluss und keiner signifikanten Endothelabtragung. Nach 24 Stunden ist die prä- und intrastenotische FMD auf Werte angestiegen, die vor der PTA beobachtet wurden (prä-: $4.1 \pm 0.5\%$, intra-: $4.2 \pm 0.4\%$, post-stenotisch: $4.1 \pm 0.4\%$) und es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Dennoch stiegen die AFS-FMD Werte nicht auf Werte an, die in der BA oder der AFS-FMD von nicht-pAVK Patienten ($5.4 \pm 0.6\%$) oder der gesunden Kontrollgruppe ($7.1 \pm 1.1\%$) beobachtet wurden.

Bedeutender Weise wurde eine signifikant erhöhte lokale Steifheit, gemessen durch eine signifikant verminderte FDC, intrastenotisch (0.02 ± 0.01) verglichen mit den prä- und poststenotischen Werten (prä- 0.04 ± 0.01 ; post-stenotisch 0.04 ± 0.01) beobachtet. 6 Stunden nach der PTA stieg die intrastenotische FDC auf prä- und poststenotische Werte an (prä-: 0.04 ± 0.01 , intra-: 0.04 ± 0.01 , post-: 0.04 ± 0.01). Die BA-FMD Werte wurden durch die Interventionen nicht beeinflusst, wodurch systemische Effekte ausgeschlossen werden konnten (baseline: $6.2 \pm 0.6\%$, 6 h $6.2 \pm 0.6\%$, 24 h $6.1 \pm 0.3\%$). Dies suggeriert, dass eine strukturelle Einschränkung innerhalb der Stenose physikalisch die Vasodilatation innerhalb der Stenose als Antwort auf Vasodilatoren limitiert, so dass die endothelabhängige Vasodilatation eingeschränkt ist. Mit Hinblick

auf die erhaltene endothelunabhängige Vasodilatation im poststenotischen Segment und ähnliche Werte der lokalen Gefäßwandsteifheit verglichen mit dem prästenotischen Segment, scheint die funktionelle Einschränkung des poststenotischen Segments eher auf eine endotheliale funktionelle Einschränkung zurückzuführen zu sein.

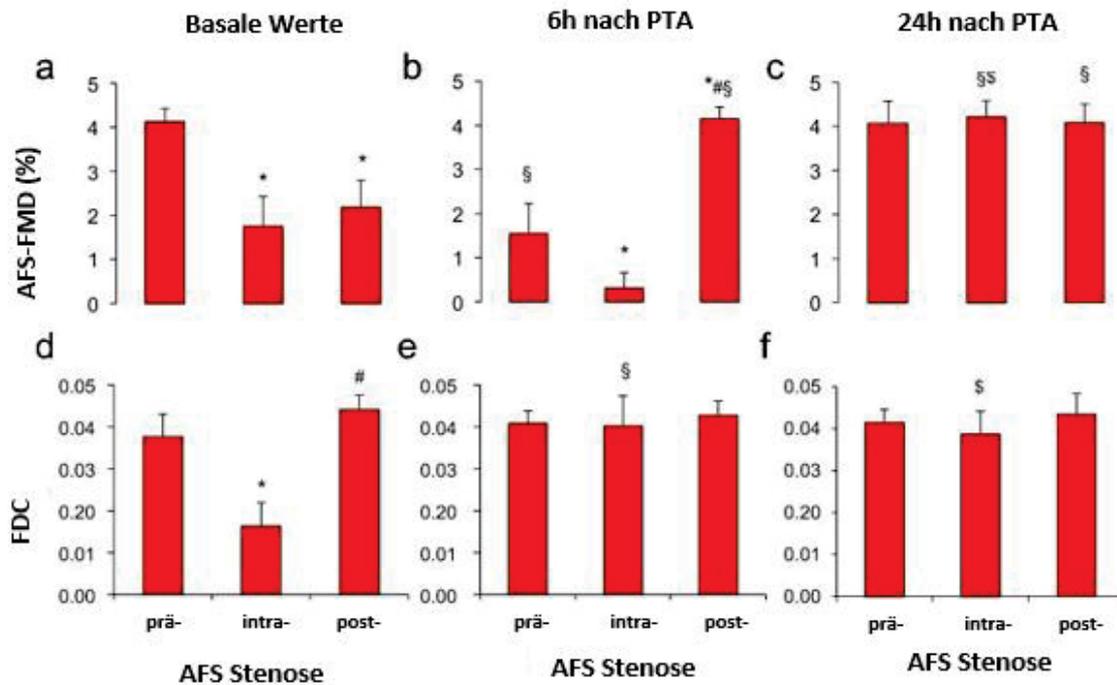


Abbildung 6: FMD (A–C) und FDC (D–F) der AFS prä-, intra- und poststenotisch. Basale Werte vor PTA (A, D), 6 Stunden nach PTA (B, E), und 24 Stunden nach PTA (C, F)

*P<0.05 vs prästenotisch zum selben Zeitpunkt,

#P<0.05 vs intrastenotisch zum selben Zeitpunkt,

§P<0.05 vs basale Werte an derselben Lokalisation,

§P<0.05 vs 6 Stunden nach PTA an derselben Lokalisation

B Die FMD war 6 Stunden nach der PTA verglichen mit den prä-PTA Werten im prästenotischen Segment und im intrastenotischen Segment signifikant reduziert. Die poststenotische FMD war verglichen mit den Basalwerten signifikant erhöht

C Nach 24 Stunden ist die prä- und intrastenotische FMD auf Werte angestiegen, die vor der PTA beobachtet wurden

D Signifikant erhöhte lokale Steifheit, gemessen durch eine signifikant verminderte FDC, intrastenotisch verglichen mit den prä- und poststenotischen Werten

E 6 Stunden nach der PTA stieg die intrastenotische FDC auf prä- und poststenotische Werte an

4 Diskussion

Die Hauptegebnisse der vorliegenden Studie sind, dass in der AFS von pAVK Patienten eine segmentale und lokale endotheliale Dysfunktion existiert. Insgesamt zeigten lokale FMD Antworten eine signifikante Korrelation mit der lokalen IMD/ Plaque Dicke. Eine weitere lokale Einschränkung der FMD wurde innerhalb und nach AFS Stenosen registriert, die sich nach Ballonangioplastie der AFS erholten und strukturellen und funktionellen Einschränkungen zugeschrieben werden könnten.

Im Folgenden soll als erstes auf die Bestimmung der Endothelfunktion mittels Ultraschall eingegangen werden (Kapitel 4.1.1). Anschließend soll die Assoziation zwischen lokaler Endothelfunktion und athero- und arteriosklerotischem, strukturellem Remodeling bei pAVK-Patienten diskutiert werden.

4.1 Methodenkritik

4.1.1 Quantifizierung der endothelabhängigen Dilatation mit Hilfe der FMD-Messung

Ein wesentliches Prinzip zur Bestimmung der endothelialen Dysfunktion ist die Untersuchung der dilatatorischen Reaktion von Widerstands- und Leitungsarterien auf vasoaktive Substanzen und physikalische Stimulationen. Diese verursachen an Endothelzellen eine gesteigerte Ausschüttung von NO [45, 46]. Mithilfe angiographischer und sonographischer Methoden kann die Vasodilatation der Leitungsgefäße dargestellt werden. Pharmakologische Substanzen wie Acetylcholin und Bradykinin stimulieren die Synthese von NO. Die Signalkaskade verläuft hierbei über endotheliale Membranrezeptoren und intrazelluläre G-Protein vermittelte Prozesse. Es kommt zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration. In Abhängigkeit von Calmodulin wird die Aktivität der endothelialen NO-Synthase gesteigert [47, 48]. Änderungen der Schubspannung und andere physikalische Stimuli führen zu Konformitätsänderungen des endothelialen Zytoskeletts. Hierdurch wird die

26

Calciumsensitivität erhöht, wodurch die eNOS bereits bei subphysiologischen intrazellulären Calciumkonzentrationen eine maximale Aktivität erreicht [49].

Eine direkte Untersuchung der endothelialen NO-Bildung durch vasoaktive Substanzen, die intraarteriell appliziert werden ist routinemäßig nur sehr begrenzt möglich. In der vorliegenden Arbeit wurde die endothel-abhängige Dilatation nicht-invasiv durch einen physikalischen Stimulus induziert. Das Versorgungsgebiet der Arteria brachialis bzw. Arteria femoralis superficialis wurde hierbei durch Insufflation einer Blutdruckmanschette über die Dauer von fünf Minuten vom Blutfluss und somit von der Sauerstoffversorgung isoliert. Es kommt zu einer ischämischen Dilatation von Widerstandsgefäßen und somit nach Deflation der Manschette zu einem vermehrten Blutfluss im jeweiligen Versorgungsgebiet. Es kommt zu einer Verstärkung der Schubspannung, die auf die Endothelzellen einwirkt und somit zu einer gesteigerten Synthese von NO und zu einer Dilatation der Arteria brachialis, bzw. Arteria femoralis superficialis. Diese wird non-invasiv sonographisch quantifiziert.

Die Änderung der Schubspannung sowie pharmakologische Agonisten scheinen einen äquipotenten Reiz zur Ausschüttung von NO darzustellen [49]. In Untersuchungen konnte durch intraarterielle Applikation von L-NMMA, welcher kompetitiv die NO-Synthase hemmt, die FMD vollständig unterdrückt werden. Die Messung der FMD an peripheren Leitungsgefäßen kann somit als funktioneller Surrogatparameter für die Synthese und Freisetzung von NO angesehen werden [50].

Die Messung der FMD ist ein etabliertes Verfahren in der Diagnostik der endothelialen Dysfunktion. 1992 konnte Celermajer zum ersten Mal eine Verminderung der flussvermittelten Dilatation der Arteria femoralis und brachialis bei Kindern und Erwachsenen mit kardiovaskulären Risikofaktoren nachweisen [51]. So konnte bei Kindern mit familiärer Hypercholesterinämie im Vergleich zu gesunden Kindern eine signifikant reduzierte FMD gezeigt werden. Ebenso war die FMD bei erwachsenen Rauchern sowie Patienten mit einer KHK signifikant reduziert. Nahezu alle kardiovaskulären Risikofaktoren [17] und ihre Anzahl [34] gehen mit einer eingeschränkten FMD einher: Arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie [34], Zigarettenrauchen [51], Diabetes mellitus [52, 53], männliches Geschlecht [54, 55],

hohes Lebensalter [56], positive familiäre Disposition für KHK [34, 57] und eine bekannte KHK [51, 58, 59]. Hierbei kann beobachtet werden, dass bei Männern die Abnahme der FMD mit dem Alter früher einsetzt, als bei Frauen [60]. Eine inverse Korrelation der FMD mit dem Ausprägungsgrad der die jeweiligen Risikofaktoren definierenden Parameter ist vorbeschrieben [34, 53, 59, 61, 62]. Eine wesentliche Rolle im Pathomechanismus, über den kardiovaskuläre Risikofaktoren zu einer endothelialen Dysfunktion führen können, scheinen reaktive Sauerstoffspezies in der Gefäßwand zu spielen [63], wobei Superoxidanionen eine besondere Rolle zukommen. Diese deaktivieren NO unter Bildung von Peroxynitrit. Dieses kann die NO-Synthase hemmen und die NO-Bildung einschränken [23]. Ein weiterer Faktor in der endothelialen Dysfunktion scheint die endogene Substanz ADMA (asymmetrisches Dimethylarginin) zu sein, welches die NO-Synthese inhibiert [64, 65]. Zudem wird ein Mangel an L-Arginin als Substrat der NO-Synthese diskutiert [66]. Die FMD erlaubt es, eine Einschränkung der endothelialen Funktion nachzuweisen. Hierbei ist jedoch keine Differenzierung zwischen potentiellen Pathomechanismen möglich.

Es gibt eine Reihe biologischer Faktoren, die die Höhe der FMD beeinflussen können. Zwischen dem Ruhedurchmesser der BA und der FMD besteht eine inverse Korrelation [51, 67]. Zudem ist eine zirkadiane Rhythmik mit einem spätnachmittäglichen Maximum und eine Korrelation mit der Konzentration von Progesteron und Östrogen im Rahmen des Menstruationszyklus beschrieben [54]. Die FMD kann durch die Nahrungsaufnahme beeinflusst werden. Akute Hyperglykämie [53] und fettreiche Nahrung [68] führen zu einer signifikanten Einschränkung, ebenso akuter psychischer Stress [69] und akutes Zigarettenrauchen [70]. Um einen möglichst geringen, konstanten Einfluss dieser Faktoren auf die FMD zu gewährleisten, erfolgten die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit nach einem standardisiertem Protokoll, zu der gleichen Tageszeit (morgens zwischen 07:00 und 09:00 Uhr), in nüchternem Zustand, in einem klimatisiertem, ruhigen Raum nach zehninütiger körperlicher Ruhephase. Es gab keine signifikanten Unterschiede in Herzfrequenz und Blutdruck vor und nach der Untersuchung. Diese dienten als Parameter einer sympathoadrenergen Stimulation. Eine fehlende Zyklusanamnese sowie eine inhomogene

Geschlechtsverteilung können als limitierende Faktoren der Untersuchung angesehen werden.

Darüber hinaus gibt es eine Reihe weiterer Faktoren, die die methodische Variabilität der FMD beeinflussen:

- (1) Die Eckpunkte, die der Messung des Durchmessers zugrunde gelegt werden
- (2) Die Ischämiezeit
- (3) Die Größe des durch das jeweilige Leitungsgefäß versorgten Gebietes
- (4) Zeitpunkt der Messung nachdem die Ischämie beendet wurde
- (5) Variabilität innerhalb des Herzzyklus.

Auf die oben genannten Faktoren soll im Folgenden separat eingegangen werden.

(1) Wie auch bei der Mehrheit anderer Arbeiten [71-73], erfolgte die Messung des Diameters von der schallkopfnahen zur schallkopffernen m-Linie. Diese entspricht dem anatomischen Adventitia-Media-Übergang [74].

(2) Die jeweilige Höhe der FMD ist von der Ischämiezeit abhängig. Erst bei einer Ischämiezeit von 4,5 Minuten resultiert eine maximale Dilatation. Diese kann auch durch eine Verlängerung der Ischämiezeit nicht signifikant erhöht werden [75, 76]. Es wurde daher eine Dauer von fünf Minuten gewählt.

(3) Einige Untersuchungen, die die Größe des ischämischen Areals in Abhängigkeit von der Lokalisation der Blutdruckmanschette untersucht haben, haben eine größere FMD bei Anlage der Blutdruckmanschette proximal der Ellenbeuge gezeigt [77, 78]. Im Gegensatz hierzu war die FMD in anderen Untersuchungen bei Anlage der Manschette am Unterarm größer [58]. Es wurde diskutiert, welche Methode besser ist [76, 79]. Die Bestimmung der FMD bei Unterarmokklusion gilt aktuell als Standard und wird auch in der vorliegenden Arbeit verwendet. Hierdurch werden die möglichen Auswirkungen einer unmittelbaren Kompression und Ischämie auf den untersuchten Bereich der BA vermieden.

(4) Der Zeitpunkt, an dem eine maximale Dilatation erreicht wird, variiert bei Erwachsenen [73] und bei Kindern [73, 80] in erheblichem Maße. In der vorliegenden Arbeit erfolgten Messungen jeweils nach 20 s, 40 s, 60 s und 80 s.

(5) Der Durchmesser der Arteria brachialis unterliegt pulsatilen Veränderungen, dem Herzzyklus entsprechend. Daher erfolgten die Messungen EKG getriggert enddiastolisch.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Untersuchungsprotokoll entspricht somit den Standards, die in der aktuellen Leitlinie empfohlen werden [76].

Die Variabilität von Ultraschalluntersuchungen resultiert im Wesentlichen aus drei Faktoren:

1. Die technische Ausrüstung
2. Der Untersucher
3. Die Auswertung

Die Ausrüstung und die jeweilige Erfahrung des Untersuchers beeinflussen wesentlich die Genauigkeit von vaskulären Ultraschalluntersuchungen [81].

1. Als gegenwärtiger Standard in der non-invasiven Untersuchung der endothelialen Funktion gelten lineare Schallköpfe von 12 MHz und eine axiale Auflösung von 0,1 mm [41].
2. Änderungen des Durchmessers von 0,1 mm können nur von einem gut geschulten Untersucher erkannt werden [81]. Die technische Auflösung liegt dem zu untersuchendem biologischen Bereich sehr nahe. Die Qualität von vaskulärem Ultraschall ist somit sehr stark von der Erfahrung des Untersuchers abhängig. Bei der endothelabhängigen und der endothelunabhängigen Vasodilatation liegen die Änderungen des Diameters im Bereich von 0,1 bis 0,6 mm (2,7% bis 16,7% bezogen auf einen Ruhediameter von 3,8 mm). Die Genauigkeit von Ultraschalluntersuchungen wurde unter anderem von Sorensen et al. [71] auf der Basis von „Phantomarterien“ mit bekanntem Durchmesser untersucht. Hierbei wurde gezeigt, dass Änderungen des

Durchmessers in der Größenordnung von 0,1-0,2 mm korrekt bestimmt werden können.

3. Die Variabilität der Bestimmung des Gefäßdurchmessers ist überdies von der Art der Bilddatenanalyse abhängig. Man muss hierbei differenzieren zwischen vom jeweiligen Untersucher ausgehenden Unterschieden (Intra-Observer-Differenz), Unterschieden, die bei Auswertung durch zwei verschiedene Personen entstehen (Inter-Observer-Differenz) und Unterschieden, die bei Untersuchungen an verschiedenen Tagen entstehen (Tag-zu-Tag-Differenz). Hierbei ist zu beachten, dass die Tag-zu-Tag-Differenz auch von der biologischen Variation der Gefäßfunktion sowie der observerseitigen Variabilität abhängig ist. Der Variationskoeffizient für die FMD-Messung wird in den meisten veröffentlichten Studien [34, 61] zwischen 1% und 3% für die Intra- und Interobservervariabilität beziffert

FMD kann nur gemessen werden, wenn reaktive Hyperämie eine ausreichende Schubspannung induziert, um die eNOS in den Endothelzellen der Leitungsarterie zu aktivieren. Dies könnte durch die arteriosklerotische Flussbehinderung bei pAVK verhindert werden. Dies ist ein wesentlicher Kritikpunkt. Dennoch ist zu bedenken, dass es sich bei der FMD um eine zusammengesetzte Anzeige handelt, die auf mehreren Faktoren beruht. Diese beinhalten (a) den Stimulus, zum Beispiel Schub und Druck, (b) die Fähigkeit der Endothelzellen, den Stimulus wahrzunehmen und umzusetzen, beispielsweise durch eNOS Aktivierung und NO-Produktion, (c) die Verfügbarkeit von endothelialen Vermittlern, (d) die Ansprechbarkeit von glatten Muskelzellen auf Vasodilatoren, (e) die Anwesenheit von Vasokonstriktoren und (f) die elastischen Eigenschaften der arteriellen Gefäßwand, um Vasodilatation zuzulassen. In Abhängigkeit von der Pathophysiologie kann eine eingeschränkte FMD durch Faktoren verursacht werden, die eine oder mehrere dieser Komponenten beeinflussen: die Exposition von akutem Zigarettenrauch kann die eNOS Aktivität einschränken [82], Hämodialyse kann zu einer Verminderung von freiem NO durch die Freisetzung von Hämoglobin führen [83], Patienten mit arterieller Hypertonie können eingeschränkte FMD-Werte aufweisen aufgrund einer mikrovaskulären Dysfunktion und eingeschränkter Schubspannung [84], katheterinduzierte Verletzungen der

arteriellen Gefäßwand gehen mit einer reduzierten FMD einher [44] und ein nicht-pulsatiler Blutfluss, wie bei Patienten mit Herzschrittmachern kann die FMD beeinflussen [85].

Unabhängig von der Pathophysiologie kann eine eingeschränkte BA-FMD die Prognose von kardiovaskulären Erkrankungen anzeigen [86]. Das Konzept dahinter ist, dass die Arteria brachialis ein leicht zugängliches, nicht für Arteriosklerose anfälliges Gefäß ist, das als eine Art „Detektor-Gefäß“ dient, welches auf Faktoren reagiert, die eine Plaquebildung oder ein Fortschreiten von Plaques in für Arteriosklerose anfälligen Gefäßen (z.B. Koronarien, Carotiden oder Arterien der unteren Extremität) verursachen, bzw. hiermit assoziiert sind

4.2 Endotheliale Dysfunktion bei pAVK Patienten

PAVK Patienten sind einem erhöhten Risiko kardiovaskulärer Ereignisse ausgesetzt, so dass die Diagnose und die Behandlung von pAVK eine wichtige Rolle im Gesundheitswesen einnehmen [3]. Es wurden zahlreiche Studien veröffentlicht, die eine systemische endotheliale Dysfunktion, gemessen durch eine eingeschränkte FMD der Arteria brachialis, einem nicht für Atherosklerose anfälligem Gefäß, bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen, inklusive KHK und pAVK demonstrieren und ein allgemeines kardiovaskuläres Risiko anzeigen [87-90]. Während einige Studien zeigen, dass die BA-FMD Werte bei Patienten mit pAVK und Patienten mit einer isolierten KHK nicht unterschiedlich sind [91], haben andere in einer großen Kohorte gezeigt, dass pAVK Patienten eine stärkere Einschränkung der vaskulären Funktion (gemessen als BA-FMD) aufweisen, als nach dem Alter gematchte Kontrollen und KHK Patienten ohne pAVK [92].

Dies unterstreicht eine der Hauptlimitierungen des BA-FMD-Ansatzes: nur einige Faktoren, die eine endotheliale Dysfunktion und konsekutiv eine beschleunigte Intimahyperplasie verursachen, könnten systemisch wirksam sein, während andere hauptsächlich auf ein Segment des arteriellen Systems (zum Beispiel die Karotiden,

Femoral-, oder Koronargefäße) Einfluss nehmen. Die BA-FMD korreliert nur in einem moderaten Rahmen mit der Endothelfunktion anderer Gefäßbette, einschließlich der Koronarien [62] und der Arterien der unteren Extremität [93].

In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass die BA-FMD-Werte bei (KHK-) Patienten mit und ohne pAVK nicht unterschiedlich waren. Dies könnte auf einen der wesentlichen limitierenden Faktoren der vorliegenden Studie zurückgeführt werden: der relative geringe n-Wert und ein relativ geringer Unterschied der systemischen Faktoren, die eine endotheliale Dysfunktion aufgrund einer pAVK auf dem Hintergrund einer präexistierenden KHK verursachen.

Generell ist die Teststärke ein Streitpunkt, wenn es keine signifikanten Unterschiede zwischen Gruppen gibt, vor allem, wenn keine signifikanten Änderungen der FMD nach einer Behandlung gesehen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde (a) eine signifikant eingeschränkte FMD in der AFS von pAVK Patienten verglichen mit der BA und verglichen mit der AFS von Patienten ohne pAVK und Gesunden gesehen. Es wurden jedoch (b) keine signifikanten Unterschiede der BA-FMD zwischen pAVK-Patienten und nicht-pAVK-Patienten gesehen. Trotz der geringen Gruppengröße erscheint (a) als ein starkes und wichtiges Ergebnis.

Mit Hinblick auf die Tag-zu-Tag Variationskoeffizienten wurde eine durchschnittliche Abweichung von 0,1% zwischen wiederholten AFS-FMD-Messungen beobachtet, mit einer Standardabweichung von 0,9%. Bei einem basalen FMD-Wert von 7,1% resultiert dies in einem Intra-Observer-Variationskoeffizienten von 13%. In einer Gruppe von 10 Subjekten können somit Behandlungseffekte von -1,2% bis 1,2% mit einem p-Wert von 0,05 und einer Teststärke (Power) von 0,8 detektiert werden. Dies ist sicherlich nur möglich, wenn Messungen durch geübte Untersucher, unter kontrollierten Bedingungen, inklusive nüchternem Zustand, kein Rauchen, ausreichende Ruhezeit und automatische Analysesoftware erfolgen [94]. Dennoch ist eine Größe von n=10 sicherlich klein und limitiert hierdurch die Generalisierbarkeit der Resultate. Mit Hinblick auf die Tatsache, dass keine signifikanten Unterschiede der BA-FMD zwischen pAVK und nicht-pAVK-Patienten gefunden wurden, ist es sicherlich möglich, dass in einer größeren Patientengruppe selbst kleine Unterschiede der BA-FMD-Werte

zwischen pAVK- und nicht-pAVK-Patienten signifikant werden können. Die klinische Relevanz von solchen geringen Unterschieden ist jedoch streitbar.

Zusammengefasst demonstriert die vorliegende Studie eindeutig eine räumliche Assoziation von Endothelfunktion hinsichtlich der Lokalisation von Intimahyperplasie und Plaque-Entwicklung, was zuvor noch nicht untersucht wurde.

4.3 Segmentale endotheliale Dysfunktion bei pAVK Patienten

Es gibt nur wenige Studien über die Endothelfunktion in den Arterien der unteren Extremität und AFS-FMD Messungen haben in einer unselektierten Population von gesunden Individuen nicht gut mit der BA-FMD korreliert [93]. Die vorliegende Studie ist die erste, die die FMD in der AFS von Patienten mit und ohne pAVK und bei pAVK Patienten lokal an einem AFS Plaque vor und nach PTA untersucht. Die AFS-FMD wurde mit ähnlichen Methoden gemessen, die von anderen Studiengruppen beschrieben wurden und die AFS-FMD-Werte in der Kontrollgruppe waren vergleichbar mit den von anderen Gruppen publizierten Ergebnissen [35, 95]. In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass eine zusätzliche Verringerung der Endothelfunktion in der AFS von pAVK Patienten vorliegt, verglichen mit der BA und gematchten Kontrollen. Zudem wurde eine Intima Verdickung, selbst an proximalen glatten AFS Bereichen bei pAVK Patienten gezeigt.

Nach den Mannheim Kriterien (fokale Struktur, die in das arterielle Lumen übergreift von mindestens 0,5 mm oder 50% der umgebenden IMD oder eine Dicke von mehr als 1,5mm aufweist, gemessen von der Media-Adventitia-Grenze bis zur Intima-Lumen-Grenze [43]), können die IMD Werte, die selbst an visuell glatten proximalen Segmenten der AFS gemessen wurden als Plaques qualifiziert werden, oder sind nahe an solchen (Plaque Dicke 1,5 mm).

Die vorliegenden Daten bieten einen korrelativen Beleg dafür, dass eine segmentale endotheliale Dysfunktion der unteren Extremität eine Rolle in der Pathophysiologie von pAVK spielen könnte. Dennoch können die Daten nicht die Frage beantworten, in

wieweit eine eingeschränkte FMD infolge der Anwesenheit von Arteriosklerose in der unteren Extremität auftritt, oder ob bestimmte Risikofaktoren für pAVK, wie Rauchen eine regionale endotheliale Dysfunktion induzieren und dadurch die Entwicklung und das Fortschreiten von pAVK prädisponieren [96].

Die Daten über die Reaktion der lokalen AFS-FMD auf eine PTA deuten an, dass innerhalb einer fokalen Stenose mechanische Faktoren zu einer Einschränkung der vasodilatatorischen Funktion führen, während poststenotisch endotheliale Dysfunktion eher funktionell bedingt ist. Es sind weitere Studien erforderlich um die molekularen Mechanismen zu identifizieren, die für die untere Extremität spezifisch sind und die erhöhte Anfälligkeit der peripheren Arterien mancher Patienten für die Entwicklung und das Fortschreiten einer pAVK erklären.

Die Messung der AFS-FMD ist nichtsdestotrotz eine vielversprechende Technik, die genutzt werden könnte, um Patienten zu identifizieren, die einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer pAVK ausgesetzt sind. Zudem könnte sie als therapeutischer Zielparameter in der Primär- und Sekundärprävention der pAVK genutzt werden. Dies müsste jedoch in größeren Longitudinalstudien gezeigt werden, die untersuchen, ob endotheliale Dysfunktion einer Plaque Entwicklung voraus geht.

4.4 Schlussfolgerung

Die vorliegenden Daten demonstrieren eine enge Assoziation zwischen lokaler Endothelfunktion, athero- und arteriosklerotischem, struktureller Remodellierung. Dies suggeriert, dass bei pAVK systemische, segmentale und lokale Faktoren, die struktureller oder funktioneller Natur sein können, die Endothelfunktion der unteren Extremität beeinflussen. Die Daten suggerieren, dass segmentale endotheliale Dysfunktion der unteren Extremität eine Rolle in der Pathophysiologie von pAVK spielt. Zudem implizieren die Resultate, dass selbst eine interventionelle Behandlung von pAVK helfen kann, in das Fortschreiten von pAVK einzugreifen, indem Flussbehinderungen angezielt und eine verbesserte Endothelfunktion poststenotisch wiederhergestellt wird. Zukünftige Studien sollten untersuchen, ob eine endotheliale

Heterogenität existiert, mit erhöhter Anfälligkeit des Endothels der Arterien der unteren Extremität auf bestimmte Umweltfaktoren wie Rauchen, Niereninsuffizienz oder Diabetes.

5 Literaturverzeichnis

1. Belch JJ, T.E., Agnelli G, *Prevention of Atherothrombotic Disease N. Critical issues in peripheral arterial disease detection and management: A call to action.* Arch Intern Med, 2003. **163**: p. 884-892.
2. Stehouwer CD, C.D., Davidson C, *Peripheral arterial disease: A growing problem for the internist.* European Journal of Internal Medicine, 2009. **20**: p. 132-138.
3. Tendera M, A.V., Bartelink ML, *Esc guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases: Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries: The task force on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases of the european society of cardiology (esc).* Eur Heart J, 2011. **32**: p. 2851-2906.
4. K, O., *Peripheral arterial disease.* Lancet, 2001. **358**: p. 1257-1264.
5. Yataco AR, C.M., Gardner AW, Womack CJ, Katzel LI, *Endothelial reactivity and cardiac risk factors in older patients with peripheral arterial disease.* Am J Cardiol, 1999. **83**: p. 754-758.
6. Heiss C, R.-M.A., Kelm M, *Central Role of eNOS in the Maintenance of Endothelial Homeostasis.* Antioxid Redox Signal, 2015. **22**: p. 1230-1242.
7. Kroger K, S.A., Kondratieva J, Moebus S, Beck E, *Prevalence of peripheral arterial disease - results of the Heinz Nixdorf recall study.* Eur J Epidemiol, 2006. **21**: p. 279-285.
8. M, C., *Peripheral arterial disease - epidemiological aspects.* Vasc Med, 2001. **6**: p. 3-7.
9. Fowkes FG, H.E., Riemersma RA, Macintyre CC, Cawood EH, Prescott RJ, *Smoking, lipids, glucose intolerance and blood pressure as risk factors for peripheral atherosclerosis compared with ischemic heart disease in the Edinburgh Artery Study.* Am J Epidemiol, 1992. **135**: p. 331-340.
10. Criqui M, L.R., Fronek A, *Mortality over a period of 10 years in patients with peripheral arterial disease.* N Eng J Med, 1992. **326**: p. 381-386.
11. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease.* N Engl J Med, 1999. **340**: p. 115-126.
12. Stary HC, C.A., Glagov S, *A Definition of Initial, Fatty Streak, and Intermediate Lesions of Atherosclerosis.* Circulation, 1994. **89**: p. 2462-2478.
13. Stary, H.C., et al., *A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association.* Circulation, 1995. **92**: p. 1355-1374.
14. Fuster, V., L. Badimon, and J.J. Badimon, *The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1).* N Engl J Med, 1992. **326**: p. 242-250.
15. Fuster, V., L. Badimon, and J.J. Badimon, *The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2).* N Engl J Med, 1992. **326**: p. 310-318.
16. Kannel WB, D.T., Kagan A, Revotskie N, Stokes III J, *Faktors of Risk in the Development of Coronary Heart Disease - Six-Year Follow-up Experience - The Framingham Study.* Ann Intern Med, 1961. **55**: p. 33-50.
17. Grundy S.M., B.G., Criqui MH, *Primary Prevention of Coronary Heart Disease: Guidance From Framingham.* Circulation, 1998. **97**: p. 1876-1887.
18. Cai, H. and D.G. Harrison, *Endotheliale Dysfunction in cardiovascular diseases ; the role of oxidant stress.* Circ Res, 2000. **87**: p. 840-844.
19. Sies, H., *Oxidative stress: from basic research to clinical application.* Am J Med, 1991. **91**: p. 31S-38S.

20. Beckman JS, K.W., *Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly*. Am J Physiol Cell Physiol, 1996. **271**: p. C1424-C1437.
21. Arteel GE, S.P., Sies H, *Reactions of peroxynitrite with cocoa procyanidin oligomers*. J Nutr, 2000. **130**: p. 2100S-2104S.
22. Suschek CV, B.K., Bruch-Gerharz D, Sies H, Kroncke KD, Kolb-Bachofen V, *Even after UVA-exposure will nitric oxide protect cells from reactive oxygen intermediate-mediated apoptosis and necrosis*. Cell Death Differ, 2001. **8**: p. 515-527.
23. Laursen JB, S.M., Kurz S, *Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin*. Circulation, 2001. **337**: p. 408-416.
24. Diaz, M.N., et al., *Antioxidants and atherosclerotic heart disease*. N Engl J Med, 1997. **337**: p. 408-416.
25. Diaz MN, F.B., Vita JA, Keaney jr JF, *Antioxidants and atherosclerotic heart disease*. N Engl J Med, 1997. **337**: p. 408-416.
26. Coretti, M.C., et al., *Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery*. J Am Coll Cardiol, 2002. **39**: p. 257-265.
27. Kelm, M., *Flow-mediated dilatation in human circulation: diagnostic and therapeutic aspects*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **282**: p. H1-H5.
28. Kobayashi N, T.Y., Iwasawa T, Ikeda N, Hashimoto s, Yasu T, Ueba H, *Exercise training in patients with chronic heart failure improves endothelial function predominantly in the trained extremities*. Circ J, 2003. **67**: p. 505-510.
29. Stoner L, S.M., Mahoney ET, Dudley GA, McCully KK, *Electrical stimulation-evoked resistance exercise therapy improves arterial health after chronic spinal cord injury*. Spinal Cord, 2007. **45**: p. 49-56.
30. Black MA, C.N., Thijssen DH, Green DJ, *Importance of measuring the time course of flow-mediated dilation in humans*. Hypertension, 2008. **51**: p. 203-210.
31. Padilla J, S.R., Sitar DM, Newcomer SC, *Impact of acute exposure to increased hydrostatic pressure and reduced shear rate on conduit artery endothelial function: a limb-specific response*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **297**: p. H1103-H1108.
32. Parker BA, R.S., Proctor DN, *Age and flow-mediated dilation: a comparison of dilatory responsiveness in the brachial and popliteal arteries*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**: p. H3043-H3049.
33. Tinken TM, T.D., Black MA, Cable NT, Green DJ, *Time course of change in vasodilator function and capacity in response to exercise training in humans*. J Physiol, 2008. **586**: p. 5003-5012.
34. Celermajer, D.S., et al., *Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction*. J Am Coll Cardiol, 1994. **24**: p. 1468-1474.
35. De Groot PC, P.F., Kooijman M, Hopman MT, *Preserved flow-mediated dilation in the inactive legs of spinal cord-injured individuals*. American journal of physiology Heart and circulatory physiology, 2004. **287**: p. 374-380.
36. Thijssen DH, d.G.P., Smits P, Hopman MT, *Vascular adaptations to 8-week cycling training in older men*. Acta Physiol (Oxf), 2007. **190**: p. 221-228.
37. Wray DW, U.A., Lawrenson L, Richardson RS, *Evidence of preserved endothelial function and vascular plasticity with age*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **2006**: p. H1271-H1277.
38. Thijssen DH, D.E., Black MA, Hopman MT, Cable NT, *Heterogeneity in conduit artery function in humans: impact of arterial size*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **295**: p. H1927-H1934.

39. Kooijman M, T.D., De Groot PCE, *Flow-mediated dilation in the superficial femoral artery is nitric oxide mediated in humans*. J Physiol, 2008. **586**(4): p. 1137-1145.
40. Preik M, L.T., Heiß C, Tabery S, Strauer BE, Kelm M, *Automated ultrasonic measurement of human arteries for the determination of endothelial function*. Ultraschall Medizin, 2000. **21**: p. 195-198.
41. DS, C., *Testing Endothelial Function Using Ultrasound*. J Cardiovasc Pharmacol, 1998. **32 (Suppl. 3)**: p. 29-32.
42. Preik, M., et al., *Automated ultrasonic measurement of human arteries for the determination of endothelial function*. Ultraschall Medizin, 2000. **21**: p. 195-198.
43. Touboul PJ, H.M., Meairs S, *Mannheim carotid intima-media thickness and plaque consensus (2004-2006-2011). An update on behalf of the advisory board of the 3rd, 4th and 5th watching the risk symposia, at the 13th, 15th and 20th european stroke conferences, mannheim, germany, 2004, brussels, belgium, 2006, and hamburg, germany, 2011*. Cerebrovasc Dis, 2012. **34**: p. 290-296.
44. C, H., et al., *Vascular dysfunction of brachial artery after transradial access for coronary catheterization: impact of smoking and catheter changes*. JACC Cardiovasc Interv, 2009. **2**: p. 1067-1073.
45. Raitakari, O.T. and D.S. Celermajer, *Testing for endothelial dysfunction*. Ann Med, 2000. **32**: p. 293-304.
46. Perticone, F., et al., *Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients*. Circulation, 2001. **104**: p. 191-196.
47. Busse R., F.A., Heckler M, *Signal transduction in endothelium-dependent vasodilatation*. Eur Heart J, 1993. **14**: p. 12-19.
48. Bredt DS, S.S., *Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**: p. 682-685.
49. Dimmeler, S., et al., *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation*. Nature, 1999. **399**: p. 601-605.
50. Joannides, R., et al., *Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo*. Circulation, 1995. **91**: p. 1314-1319.
51. Celermajer, D.S., et al., *Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis*. Lancet, 1992. **340**: p. 1111-1115.
52. Arcaro, G., et al., *Insulin causes endothelial dysfunction in humans*. Circulation, 2002. **105**: p. 576-582.
53. Kawano, H., et al., *Hyperglycemia rapidly suppresses flow-mediated endothelium-dependent vasodilation of brachial artery*. J Am Coll Cardiol, 1999. **34**: p. 146-154.
54. Hashimoto M, A.M., Eto M, *Modulation of endothelium-dependent flow-mediated dilation of the brachial artery by sex and menstrual cycle*. Circulation, 1995. **92**: p. 3431-3435.
55. Celermajer DS, S.K., Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Deanfield JE, *Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women*. J Am Coll Cardiol, 1994. **24**: p. 471-476.
56. Corretti MC, P.G., Vogel RA, *The Effects of Age and Gender on Brachial Artery Endothelium-Dependent Vasoactivity Are Stimulus-Dependent*. Clin Cardiol, 2000. **18**: p. 471-476.
57. Clarkson, P., et al., *Endothelium-dependent dilatation is impaired in young healthy subjects with a family history of premature coronary disease*. Circulation, 1997. **96**: p. 3378-3383.
58. Corretti, M.C., G.D. Plotnick, and R.A. Vogel, *Technical aspects of evaluating brachial artery vasodilatation using high-frequency ultrasound*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 1995. **268**: p. H1397-H1404.

59. Neunteufl, T., et al., *Systemic endothelial dysfunction is related to the extent and severity of coronary artery disease*. *Atherosclerosis*, 1997. **129**: p. 111-118.
60. Celermajer, D.S., et al., *Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women*. *Journal of the American College of Cardiology*, 1994. **24**: p. 471-476.
61. Celermajer, D.S., et al., *Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults*. *Circulation*, 1993. **88**: p. 2149-2155.
62. Anderson, T.J., et al., *Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations*. *J Am Coll Cardiol*, 1995. **26**: p. 1235-1241.
63. Landmesser U, H.D., *Oxidant stress as a marker for cardiovascular events: Ox marks the spot*. *Circulation*, 2001. **104**: p. 2638-2640.
64. Miyazaki, H., et al., *Endogenous nitric oxide synthase inhibitor. A novel marker of atherosclerosis*. *Circulation*, 1999. **99**: p. 1141-1146.
65. Böger, R.H., et al., *Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction. Its role in hypercholesterolemia*. *Circulation*, 1998. **98**: p. 1842-1847.
66. Wang, B.-Y., et al., *Regression of atherosclerosis. Role of nitric oxide and apoptosis*. *Circulation*, 1999. **99**: p. 1236-1241.
67. Adams, M.R., et al., *Smooth muscle dysfunction occurs independently of impaired endothelium-dependent dilation in adults at risk of atherosclerosis*. *J Am Coll Cardiol*, 1998. **32**: p. 123-127.
68. Vogel, R.A., M.C. Corretti, and G.D. Plotnick, *Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects*. *Am J Cardiol*, 1997. **79**: p. 350-354.
69. Ghiadoni, L., et al., *Mental stress induces transient endothelial dysfunction in humans*. *Circulation*, 2000. **102**: p. 2473-2478.
70. Lekakis, J., et al., *Effect of acute cigarette smoking on endothelium-dependent brachial artery dilatation in healthy individuals*. *Am J Cardiol*, 1997. **79**: p. 529-531.
71. Sorensen, K.E., et al., *Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses accuracy and reproducibility*. *Br Heart Journal*, 1995. **74**: p. 247-253.
72. Corretti MC, A.T., Benjamin EJ, *Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force*. *J Am Coll Cardiol*, 2002. **39**: p. 257-265.
73. Bressler B, C.S., Mancini GB, *Temporal response of brachial artery dilation after occlusion and nitroglycerin*. *Am J Cardiol*, 2000. **85**: p. 396-400.
74. Wendelhag I, G.T., Suurkula M., Berglund G, Wikstrand J, *Ultrasound measurement of wallthickness in the carotid artery: fundamental principles and description of a computerized analysing system*. *Clin Physiol*, 1991. **11**: p. 565-577.
75. Leeson, P., et al., *Non-invasive measurement of endothelial function: effect on brachial artery dilatation of graded endothelial dependent and independent stimuli*. *Heart*, 1997. **78**: p. 22-27.
76. Corretti, M.C., et al., *Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force*. *JACC*, 2002. **39**: p. 257-265.
77. Vogel R.A., C.M., Plotnick GD, *A Comparison of Brachia Artery Flow-Mediated Vasodilation Using Upper and Lower Arm Arterial Occlusion in Subjects with and without Coronary Risk Factors*. *Clin Cardiol*, 2000. **23**: p. 571-575.
78. Berry KL, S.-J.R., Meredith IT, *Occlusion cuff position is an important determinant of the time course and magnitude of human brachial artery flow-mediated dilation*. *Clin Sci (Lond)*, 2000. **99**: p. 261-267.

79. KL, B., S.-J. RA, and M. IT, *Occlusion cuff position is an important determinant of the time course and magnitude of human brachial artery flow-mediated dilation*. Clin Sci (Lond), 2000. **99**: p. 261-267.
80. Järvisalo, M.J., et al., *Brachial artery dilatation responses in healthy children and adolescents*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **282**: p. H87-H92.
81. Balletshofer B, G.S., Rittig K, *Influence of experience on intra- and interindividual variability in assessing peripheral endothelial dysfunction with high resolution ultrasound*. Ultraschall Med, 2001. **22**: p. 231-235.
82. Heiss, C., et al., *Brief secondhand smoke exposure depresses endothelial progenitor cells activity and endothelial function*. JACC, 2008. **51**: p. 1760-1771.
83. C, M., et al., *Hemodialysis-induced release of hemoglobin limits nitric oxide bioavailability and impairs vascular function*. J Am Coll Cardiol, 2010. **55**: p. 454-459.
84. Lauer, T., et al., *Reduction of peripheral flow reserve impairs endothelial function in conduit arteries of patients with essential hypertension*. J Hypertens, 2004. **23**: p. 563-569.
85. Sansone R., S.B., Keymel S, Schuler D., Heiss C, *Macrovascular and microvascular function after implantation of left ventricular assist devices in end-stage heart failure: Role of microparticles*. J Heart Lung Transplant, 2015. **34**: p. 921-932.
86. Ras RT, S.M., Draijer R, Zock PL, *Flow-mediated dilation and cardiovascular risk prediction: A systematic review with meta-analysis*. Int J Cardiol, 2013. **168**: p. 344-351.
87. Pellegrino, T., et al., *Relationship between brachial artery flow-mediated dilation and coronary flow reserve in patients with peripheral artery disease*. J Nucl Med, 2005. **46**: p. 1997-2002.
88. Perrone-Filardi P, C.A., Brevetti G, *Relation of brachial artery flow-mediated vasodilation to significant coronary artery disease in patients with peripheral arterial disease*. Am J Cardiol, 2005. **96**: p. 1337-1341.
89. Gokce, N., et al., *Predictive Value of Noninvasively Determined Endothelial Dysfunction for Long-Term Cardiovascular Events in Patients With Peripheral Vascular Disease*. JACC, 2003. **41**: p. 1769-1775.
90. Silvestro A, S.F., Ruocco NA, *Inflammatory status and endothelial function in asymptomatic and symptomatic peripheral arterial disease*. Vasc Med, 2003. **8**: p. 225-232.
91. Maldonado FJ, M.H., Aguilar EM, Gonzalez AF, Garcia JR, *Relationship between noninvasively measured endothelial function and peripheral arterial disease*. Angiology, 2009. **60**: p. 725-731.
92. Kiani S, A.J., Holbrook M, *Peripheral artery disease is associated with severe impairment of vascular function*. Vasc Med, 2013. **18**: p. 72-78.
93. Thijssen DH, R.N., Padilla J, *Relationship between upper and lower limb conduit artery vasodilator function in humans*. J Appl Physiol, 2011. **111**: p. 244-250.
94. De Roos NM, B.M., Schouten EG, Katan MB, *Within-subject variability of flow-mediated vasodilation of the brachial artery in healthy men and women: implications for experimental studies*. Ultrasound Med Biol, 2003. **29**: p. 401-406.
95. Gaenzer H, N.G., Marschang P, Sturm W, Kirchmair R., Patsch JR, *Flow-mediated vasodilation of the femoral and brachial artery induced by exercise in healthy nonsmoking and smoking men*. J Am Coll Cardiol, 2001. **38**: p. 1313-1319.
96. Yataco AR, G.A., *Acute reduction in ankle/brachial index following smoking in chronic smokers with peripheral arterial occlusive disease*. Angiology, 1999. **50**: p. 355-360.

6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Christian Heiß für die Überlassung des Themas und sein Vertrauen in meine Fähigkeiten bedanken. Ihm gebührt mein besonderer Dank für die hervorragende und verlässliche Betreuung.

Frau Dr. med. Yvonne Heinen möchte ich für ihr außergewöhnliches Engagement, die exzellente Betreuung und die unschätzbare Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit danken.

Ebenfalls möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des kardiologischen Labors bedanken, die mich stets mit unschätzbbarer Geduld und ihrem Fachwissen begleitet haben, allen voran Frau Prof. Dr. Dr. Miriam Cortese-Krott sowie Frau Anita Meißner.

Zudem möchte ich allen Probanden für ihre freiwillige Teilnahme an der Studie und den damit verbundenen Unannehmlichkeiten danken.

Mein größter Dank gebührt meiner Mutter, die Geduld, Mitgefühl und Humor in Person ist und mich während meines gesamten Lebens unterstützt hat.