

Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. Malte Kelm

Die Rolle der eNOS im Prozess des flussabhängigen  
Kollateralenwachstums im Alter

Dissertation

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

vorgelegt von

Christopher Nicolaus

2022

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. med. Amin Polzin

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Rotem Lanzmann

**Für meine Eltern**

# Auflistung eigener Publikationen

1. Schuler, D., Sansone, R., Nicolaus, C., Kelm, M., Heiss, C., (2018). "Repetitive remote occlusion (RRO) stimulates eNOS-dependent blood flow and collateral expansion in hindlimb ischemia." *Free Radic Biol Med* 129: 520-531.

# Zusammenfassung

**Fragestellung:** Kardiovaskuläre Erkrankungen bedingt durch Atherosklerose stellen die häufigste Todesursache in den westlichen Industrieländern dar und zeigen weltweit eine steigende Inzidenz. Teil dieses Erkrankungskreises ist die periphere arterielle Verschlusskrankheit. Entscheidendes therapeutisches Ziel in der Behandlung stellt die Aufrechterhaltung der Extremitätenperfusion dar, wobei die Ausbildung von Kollateralen durch Arteriogenese hierbei von zentraler Bedeutung ist. Den Stimulus der Arteriogenese stellt die Erhöhung der Wandscherspannung durch eine Steigerung des Blutflusses dar. Dies kann beispielsweise über ein Gehstreckentraining erreicht werden. Ziel dieser Arbeit war es unter experimentellen Bedingungen eine Intervention zur Steigerung der Arteriogenese zu entwickeln, die Relevanz der zugrundeliegenden Enzymkaskaden zu erörtern und die Effekte im Alter zu erforschen.

**Methodik:** Zur Überprüfung der Fragestellungen erfolgte im Mausmodell eine Hinterlaufischämie-Induktion über die operative Ligatur arterieller Zielgefäße. Die Versuchstiere wurden anschließend entweder einer *sham*-Intervention oder einer *repetitiv remote occlusion* über eine Stauungsmanschette am kontralateralen nicht-ischämischen Hinterlauf zugeführt. Perfusionsparameter wurden mittels *laser doppler imaging*, *in vivo* Blutflussdaten mittels farbkodierter Duplexsonographie und die endotheliale Funktion durch die flussabhängige Vasodilatation Messungen erhoben. Weiter wurde die Lumenexpansion der Kollateralgefäße am ischämischen Hinterlauf über ein Microfil *vascular cast* dargestellt und quantifiziert. Es erfolgte die Applikation von L-NAME, ODQ und Cinaciguat zur Betrachtung der Relevanz der beteiligten Enzymkaskaden. Verwendet wurden Mäuse vom C57/B6 Hintergrund im Alter von 8-12 Wochen, sowie im Alter von 24 Monaten (Methusalem Mäuse). Gruppendifferenzen wurden mittels univariater Frequenzanalyse und Post-hoc-Tests herausgestellt und auf ihr Signifikanzniveau untersucht. Beim alleinigen Vergleich zweier Gruppen wurden t-Tests verwendet. Als signifikant wurden p-Werte < 0.05 gewertet.

**Ergebnisse:** Unter der *repetitiv remote occlusion* zeigte sich eine signifikante Zunahme der Lumenexpansion der Kollateralgefäße und Verbesserung der FMD-Kapazität, sowie der Perfusion des ischämischen Hinterlaufes im Vergleich zu Kontrollgruppen ohne Beeinflussung der zentralen Hämodynamik. Unter Hemmung der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthese (eNOS) durch L-NAME oder Ausschaltung in NOS3<sup>-/-</sup> Linien zeigte sich dieser Effekt signifikant reduziert, ebenfalls unter Hemmung der löslichen Guanylatzyklase (sGC) durch ODQ. Eine Aktivierung der sGC durch Cinaciguat zeigte ebenfalls eine signifikante Zunahme der Kollateralgröße. In gealterten Mäusen zeigten sich die Ergebnisse gleichermaßen. Im Unterschied zu Jungmäusen, zeigte sich allerdings unter der Kombination aus *repetitiv remote occlusion* und Cinaciguat eine signifikante Steigerung der Lumenexpansion.

**Diskussion:** Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die *repetitiv remote occlusion* die Lumenexpansion von Kollateralgefäßen durch Stimulation der Arteriogenese nach Induktion einer Hinterlaufischämie signifikant steigern kann. Dieser Prozess zeigt sich abhängig von der funktionellen Integrität der eNOS und sGC. Eine gezielte Aktivitätssteigerung der sGC durch die Applikation von Cinaciguat steigert diesen Prozess ebenfalls. Die signifikanten Effekte sind auch in Versuchsgruppen fortgeschrittenen Alters darzustellen. Hierbei scheint die Kombination aus *repetitiv remote occlusion* und Cinaciguat eine signifikant stärkere Stimulation der Arteriogenese zu bewirken. Somit scheint die *repetitiv remote occlusion* das Potential einer neuartigen therapeutischen Option zur Behandlung der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit zu haben.

# Summary

**Background:** Cardiovascular diseases caused by atherosclerosis are the most common cause of death in western industrialised countries and show an increasing incidence worldwide. Peripheral arterial occlusive disease is part of this disease group. The decisive therapeutic goal in treatment is to maintain the perfusion of the extremities, whereby the formation of collaterals through arteriogenesis is of central importance. The stimulus for arteriogenesis is the increase in wall shear stress through an increase in blood flow. This can be achieved, for example, through walk training. The aim of this work was to develop an intervention to increase arteriogenesis under experimental conditions, to discuss the relevance of the underlying enzyme cascades and to investigate the effects in old age.

**Methods:** To test the questions, hindlimb ischaemia was induced in the mouse model via surgical ligation of arterial target vessels. The experimental animals were then subjected to either *sham intervention* or *repetitive remote occlusion* via a tourniquet cuff on the contralateral non-ischaemic hindlimb. Perfusion parameters were assessed by *laser Doppler imaging*, *in vivo* blood flow data by colour-coded duplex sonography and endothelial function by *flow mediated dilation* measurements. Furthermore, the lumen expansion of the collateral vessels in the ischaemic hindlimb was visualised and quantified using a microfil *vascular cast*. L-NAME, ODQ and cinaciguat were applied to examine the relevance of the enzyme cascades involved. Mice from the C57/B6 background were used at 8-12 weeks of age and at 24 months of age (Methusalem mice). Group differences were highlighted using univariate frequency analysis and post-hoc tests and examined for their level of significance. When comparing two groups alone, t-tests were used. P-values < 0.05 were evaluated as significant.

**Results:** Under *repetitive remote occlusion*, there was a significant increase in collateral vessel lumen expansion and improvement in FMD capacity, as well as perfusion of the ischaemic hindlimb compared to control groups with no effect on central haemodynamics. Inhibition of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) by L-NAME or silencing in NOS3<sup>-/-</sup> lines significantly reduced this effect, as did inhibition of soluble guanylate cyclase (sGC) by ODQ. Activation of sGC by cinaciguat also showed a significant increase in collateral size. The results were the same in aged mice. However, in contrast to young mice, the combination of *repetitive remote occlusion* and cinaciguat showed a significant increase in lumen expansion.

**Discussion:** The results suggest that *repetitive remote occlusion* can significantly increase lumen expansion of collateral vessels by stimulating arteriogenesis after induction of hindlimb ischaemia. This process is shown to be dependent on the functional integrity of eNOS and sGC. Targeted enhancement of sGC activity by cinaciguat application also increases this process. The significant effects can also be seen in experimental groups of advanced age. Here, the combination of *repetitive remote occlusion* and cinaciguat seems to cause a significantly stronger stimulation of arteriogenesis. Thus, *repetitive remote occlusion* seems to have the potential of a novel therapeutic option for the treatment of peripheral arterial occlusive disease.

# Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ABI</b>	<i>ankle brachial index</i>
<b>ACE</b>	<i>angiotensin converting enzym</i>
<b>AFC</b>	Arteria femoralis communis
<b>AFS</b>	Arteria femoralis superficialis
<b>AIC</b>	Arteria iliaca communis
<b>AII</b>	Arteria iliaca interna
<b>Ang-1/-2</b>	Angiotensin 1/2
<b>ASS</b>	Acetylsalicylsäure
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BAY 58-2667</b>	Cinaciguat Hydrochlorid
<b>bFGF</b>	<i>basic fibroblast growth factor</i>
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Calciumchlorid
<b>CCL-2</b>	<i>CC-chemokine ligand 2</i>
<b>CFA</b>	Caudale Femoralarterie
<b>cGMP</b>	Cyclisches Guanosinmonophosphat
<b>cm</b>	Zentimeter
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>CTA</b>	Computertomographische Angiographie
<b>CTEPH</b>	Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DSA</b>	Digitale Subtraktionsangiographie
<b>EDHF</b>	<i>endothelium derived hyperpolarizing factor</i>
<b>EDP</b>	<i>enddiastolic pressure</i>
<b>EDV</b>	enddiastolisches Volumen
<b>EF</b>	Ejektionsfraktion

<b>eNOS</b>	<i>endothelial nitric oxid synthase</i>
<b>ESL-1</b>	<i>e-selectin ligand 1</i>
<b>ESP</b>	<i>endsystolic pressure</i>
<b>ESV</b>	endsystolisches Volumen
<b>FKDS</b>	Farbkodierte Duplexsonographie
<b>FMD</b>	Flussvermittelte Vasodilatation
<b>FS</b>	<i>fractional shortening</i>
<b>GA</b>	Arteria gracilis
<b>GM-CSF</b>	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>HDL</b>	<i>high density lipoprotein</i>
<b>HIF-1</b>	<i>hypoxia inducible factor 1</i>
<b>HLI</b>	<i>hindlimb ischaemia</i>
<b>HZV</b>	Herzzeitvolumen
<b>IA</b>	<i>intussusceptiv angiogenesis</i>
<b>ICAM-1/-2</b>	<i>intercellular adhesion molecule 1/2</i>
<b>IL-1</b>	Interleukin 1
<b>iNOS</b>	<i>inducible nitric oxid synthase</i>
<b>kg</b>	Kilogramm
<b>LANUV</b>	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
<b>LDI/LDPI</b>	<i>laser doppler imaging/laser doppler perfusion imaging</i>
<b>LDL</b>	<i>low density lipoprotein</i>
<b>L-NAME</b>	<i>N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester</i>
<b>MAP</b>	<i>mean arterial pressure</i>
<b>MCP-1</b>	<i>monocyte chemoattractant protein 1</i>
<b>min</b>	Minute
<b>Mg</b>	Magnesium
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnesiumchlorid
<b>ml</b>	Milliliter

<b>MLCP</b>	<i>myosin light chain phosphatase</i>
<b>MRA</b>	Magnetresonanzangiographie
<b>nNOS</b>	<i>neuronal nitric oxid synthase</i>
<b>NO</b>	<i>nitric oxid</i>
<b>ODQ</b>	<i>1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one</i>
<b>ONOO</b>	Peroxinitrit Anion
<b>PAF</b>	<i>platelet activating factor</i>
<b>PAVK</b>	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
<b>PDE</b>	Phosphodiesterase
<b>PDGF</b>	<i>platelet derived growth factor</i>
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostacyclin
<b>PKG</b>	Proteinkinase G
<b>PPSB</b>	Prothrombinkonzentrat
<b>PSGL-1</b>	<i>p selektin glykoprotein ligand 1</i>
<b>RIPC</b>	<i>remote ischaemic preconditioning</i>
<b>ROI</b>	<i>region of interest</i>
<b>RRO</b>	<i>repetitiv remote occusion</i>
<b>SA</b>	<i>sprouting angiogenesis</i>
<b>SDF-1</b>	<i>stromal cell derived factor 1</i>
<b>sek</b>	Sekunde
<b>SV</b>	Schlagvolumen
<b>sGC</b>	<i>soluble guanylyl cyclase</i>
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TBI</b>	<i>toe brachial index</i>
<b>tcPO<sub>2</sub></b>	Transkutaner Sauerstoffpartialdruck
<b>TEA</b>	Thrombendarteriektomie
<b>TGF-β</b>	<i>transforming growth factor beta</i>
<b>TNF-α</b>	Tumornekrosefaktor α
<b>tPA</b>	<i>tissue plasminogen activator</i>
<b>TPAI</b>	<i>tissue factor activator inhibitor</i>
<b>TPR</b>	totaler peripherer Widerstand

<b>TRPV4</b>	<i>transient receptor potential cation channel subfamily V member 4</i>
<b>VCAM</b>	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
<b>VLDL</b>	<i>very low density lipoprotein</i>
<b>vWF</b>	Von Willebrand Faktor
<b>WSS</b>	Wandscherspannung
<b>WT</b>	Wildtyp
<b>YC-1</b>	<i>3-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl indazole</i>
<b>ZETT</b>	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Kardiovaskuläre Erkrankungen</b>	<b>1</b>
1.2	<b>Grundlagen des vaskulären Systems</b>	<b>3</b>
1.2.1	Die Adventitia	3
1.2.2	Die Media	4
1.2.3	Das Endothel	5
1.3	<b>Die Atherosklerose</b>	<b>9</b>
1.3.1	Pathogenese der Atherosklerose	9
1.4	<b>Die periphere arterielle Verschlusskrankheit</b>	<b>11</b>
1.4.1	Epidemiologie der PAVK	11
1.4.2	Risikofaktoren der PAVK	12
1.4.3	Einteilung der PAVK	14
1.4.4	Diagnostik der PAVK	15
1.4.5	Therapie der PAVK	19
1.5	<b>Grundlagen des Kollateralenwachstums</b>	<b>22</b>
1.5.1	Neovaskularisierende Prozesse	22
1.5.2	Die Angiogenese	22
1.5.3	Die Arteriogenese	24
1.6	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>30</b>

<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>31</b>
2.1	<b>Materialliste</b>	<b>31</b>
2.1.1	Medikamente	31
2.1.2	Chemikalien	31
2.1.3	Versuchsmaterialien	32
2.1.4	Instrumente	32
2.1.5	Nahtmaterial	32
2.1.6	Geräte	32
2.1.7	Software	33
2.2	<b>Übersicht</b>	<b>34</b>
2.3	<b>Versuchstiere</b>	<b>35</b>
2.4	<b>Induktion der Hinterlaufischämie</b>	<b>35</b>
2.5	<b>Laser-Doppler-Imaging</b>	<b>37</b>
2.6	<b>Vaskuläre Fluss- und Durchmesserbestimmung mittels FKDS</b>	<b>39</b>
2.7	<b>Die flussvermittelte Vasodilatation</b>	<b>41</b>
2.8	<b>Echokardiographie</b>	<b>42</b>
2.9	<b>Zentrale Druck-Volumen-Messung</b>	<b>44</b>
2.10	<b>Repetitive Stimulation durch Flussbeschleunigung</b>	<b>46</b>
2.11	<b>Gefäßdarstellung mittels Gefäßausguss</b>	<b>47</b>
2.12	<b>Organentnahme</b>	<b>50</b>
2.13	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>50</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>51</b>
3.1	<b>Akute hämodynamische Veränderungen der <i>repetitiv remote occlusion</i></b>	<b>51</b>
3.2	<b>Chronische Effekte der <i>repetitiv remote occlusion</i></b>	<b>51</b>
3.3	<b>Chronische Effekte der <i>repetitiv remote occlusion</i> bei alten Mäusen</b>	<b>69</b>

<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>77</b>
4.1	Beantwortung der Fragestellung	77
4.2	Interpretation der Ergebnisse	78
4.3	Limitationen	85
4.4	Zusammenfassung und Ausblick	89
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>90</b>
<b>6</b>	<b>Danksagung</b>	<b>100</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Seit über 15 Jahren stehen kardiovaskuläre Erkrankungen an der Spitze der weltweiten Todesursachen und gelten zurzeit als häufigster Auslöser für Todesfälle [1]. Die koronare Herzkrankheit und der Schlaganfall führten 2016 zu insgesamt 15,2 Millionen Todesfällen weltweit. Beides sind unterschiedliche Manifestationsformen des gleichen Krankheitsprozesses, welcher das arterielle Gefäßstromgebiet betrifft – die Atherosklerose. Bereits 1865 formulierte Rudolf Virchow erste Hypothesen zur Entstehung der Atherosklerose [2], die heute zu den häufigsten Erkrankungen weltweit zählt [3].

Die Atherosklerose stellt eine generalisierende Grunderkrankung dar, die alle arteriellen Gefäßregionen befallen kann und in obstruktiver Form je nach Lokalisation als koronare Herzkrankheit, zervikale oder periphere arterielle Verschlusskrankheit bezeichnet wird [4].

Die periphere arterielle Verschlusskrankheit (PAVK) wird charakterisiert durch eine Einschränkung der Durchblutung der Extremitäten versorgenden arteriellen Gefäßregion und seltener der Aorta [5]. Die Durchblutungseinschränkung kann hierbei stufenweise als Stenose oder vollständig in Form einer Okklusion auftreten, zu über 95% entsteht sie auf dem Boden einer chronisch obliterierenden Atherosklerose. Neben der chronischen Verlaufsform können auch akute arterielle Verschlüsse auf dem Boden einer atherosklerotischen Gefäßläsion im Sinne einer atherothrombotischen Okklusion auftreten. Nichtatherosklerotische Ursachen wie Vaskulitiden, fibromuskuläre Dysplasien, die zystische Adventitiadegeneration oder mit traumatischem Hintergrund kommen deutlich seltener vor [5-8].

Häufigster Manifestationsort der PAVK sind die unteren Extremitäten [8], denen bei maximaler Ausprägung der Durchblutungseinschränkung mit Gewebsuntergang im Sinne eines Beininfarktes eine Amputation drohen kann [5]. Leitsymptom der Erkrankung ist der unter Belastung reproduzierbare ischämische Muskelschmerz, welcher aus einer durch die Durchblutungseinschränkung bedingten Diskrepanz zwischen Sauerstoffbedarf und –angebot resultiert und sich distal der Verengung projiziert. Da der Schmerz in Ruhe abklingt, sind Betroffene dazu gezwungen, ihre Gehstrecke zu unterbrechen. Diese Symptomatik wird als Claudicatio intermittens (caudere = verschließen, intermittens = dazwischentretend) bezeichnet oder umgangssprachlich “Schaufensterkrankheit” genannt. An der Schwere der Claudicatio orientiert sich auch die Klassifikation der PAVK. Die klinische Einteilung erfolgt hierzulande nach Fontaine-Ratschow, international und wissenschaftlich gebräuchlich ist die Rutherford-Klassifikation.

Die erkrankungsbedingte Einschränkung der Gehstrecke zieht eine Reihe klinischer Folgen nach sich. So leiden Patienten mit symptomatischer PAVK unter einer deutlichen Verminderung der Lebensqualität [9] und haben eine erhöhte Prävalenz an einer PAVK-assoziierten Depression zu erkranken [10]. Das Ausmaß der Gehfähigkeit gibt darüber hinaus direkten Aufschluss über die Lebenserwartung der Patienten. Eine Gehzeit von unter 6 Minuten etwa ist mit einer höheren Mortalität assoziiert im Vergleich zu längeren Gehzeiten [11].

Somit gilt jeder Zugewinn an Gehstrecke auch als Zugewinn an Lebensqualität und Gesundheit. Die Behandlung der PAVK umfasst neben Kontrollen der Risikofaktoren und nichtinvasiven Optionen wie Bewegungstraining und Pharmakotherapie auch chirurgische oder endovaskuläre Maßnahmen. Dem strukturierten Gehtraining kommt eine besondere Bedeutung zu, da es die wichtigste nichtpharmakologische Therapieoption in Ergänzung zur konsequenten Behandlung der kardiovaskulären Risikofaktoren darstellt [5]. In Bezug auf funktionelle Langzeitergebnisse konnte keine Überlegenheit von alleinigen Gefäßinterventionen gegenüber dem Gehstreckentraining bei Patienten mit Claudicatio intermittens nachgewiesen werden [12, 13].

Ursächlich für den Therapieerfolg der Lauftrainings ist die positive Beeinflussung des mitochondrialen Stoffwechsels in der ischämisch veränderten Muskelregion [14], die Reduktion der myopathischen Veränderungen [15] und eine Ökonomisierung des Gangbildes [16]. Darüber hinaus können periphere Kollateralkreisläufe die ischämisch bedingten Funktionseinschränkungen verbessern [17]. Als Kollateralen werden Ersatzstromgebiete bezeichnet, welche bei Stenosen von Hauptgefäßen die Versorgungsfunktion im Sinne eines Umgehungskreislaufes teilweise übernehmen können.

Folglich erscheint die Induktion zur Ausbildung solcher Kollateralgefäße als vielversprechende Methode zur Verbesserung der Gehstrecke bei Patienten mit PAVK. Im menschlichen Organismus existieren postnatal drei Mechanismen zur Neubildung bzw. Anpassung von Blutgefäßen: Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese. Als Vaskulogenese wird die Gefäßneubildung aus endothelialen Präkursoren bezeichnet, während bei der Angiogenese neue Strombahnen aus bestehenden Gefäßen entstehen. Bei der Arteriogenese hingegen werden vorhandene Gefäße bedarfsangepasst umgebaut.

Auch wenn kontrollierte Studien eine Gehstreckensteigerung um circa 200 Prozent durch Lauftraining nachweisen konnten [18], kommt diese Therapieoption oftmals an die Grenzen ihrer Durchführbarkeit. Eine Vielzahl an Patienten ist, bedingt durch Komorbiditäten oder orthopädische Erkrankungen, nicht in der Lage an einem strukturierten Gefäßsport teilzunehmen. Nicht selten scheitert der Erfolg allerdings auch an mangelnder Adhärenz oder mangelnder Verfügbarkeit von Gefäßsportgruppen. Deshalb ist es wichtig die Hintergründe und Mechanismen des Kollateralwachstums zu beleuchten, damit auch Patienten von Maßnahmen zur Bildung von Umgehungskreisläufen profitieren, die aus unterschiedlichen Gründen nicht an einem Gehstreckentraining teilnehmen können.

## 1.2 Grundlagen des vaskulären Systems

Das Blutgefäßsystem des Menschen wird in Gefäße der Makrozirkulation wie Arterien und Venen, und Gefäße der Mikrozirkulation (Arteriolen, Kapillaren, Venulen) unterteilt. Allen Blutgefäßen gemeinsam ist die Auskleidung durch ein einschichtiges Plattenepithel, dem Gefäßendothel. Zusammen mit einer variabel ausgebildeten Bindegewebsschicht (Stratum subendotheliale, Membrana elastica interna) bildet das Gefäßendothel die Tunica interna, auch Intima genannt, der Blutgefäße. Weiter folgt die stabilisierende Gefäßwand aus glatten Muskelzellen, Tunica media (Media), welche nach außen durch die Membrana elastica externa begrenzt wird. Der Media außen aufgelagert liegt die Tunica externa (Adventitia), welche als Bindegewebsschicht das Blutgefäß verankert und versorgende Nerven und Gefäße enthält (Nervi und Vasa vasorum) [19].

Dieser dreischichtige Aufbau ist in allen Teilen des vaskulären Systems wiederzufinden. Im Folgenden soll seine Bedeutung im Hinblick auf das arterielle System genauer beleuchtet werden.

Die arterielle Wandstruktur untergliedert sich in drei Segmente:

1. Tunica interna (Intima)
  - a. Endothel
  - b. Subendothel
  - c. Membrana elastica interna
2. Tunica media (Media)
3. Tunica externa (Adventitia)

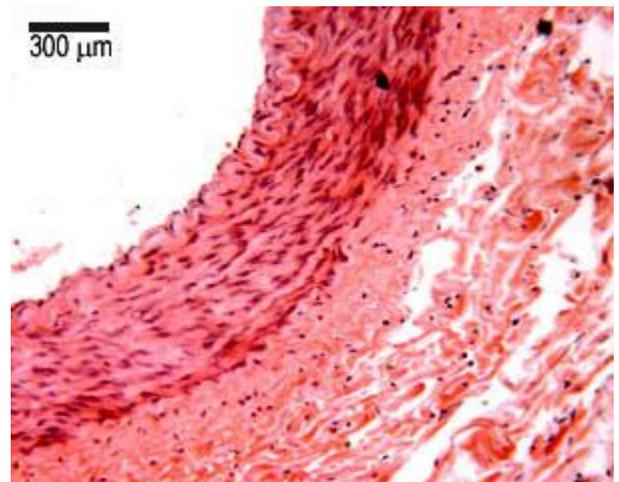


Abb. 1: Arterieller Querschnitt [20]

Bedingt durch Unterschiede in der strukturellen Ausprägung der Media können Arterien weiterhin unterteilt werden in:

1. Arteriae elastotypicae (elastischer Typ)
2. Arteriae myotypicae (muskulärer Typ)

Übergangsformen werden als Arteriae mixotypicae (Mischtypen) bezeichnet.

## 1.2.1 Die Adventitia

Die äußere Schicht der arteriellen Gefäßwand dient der Stabilisierung gegen Längsdehnung und besteht aus diesem Grund größtenteils aus faserreichem Bindegewebe. Dieses bildet sich aus scherringitterartig angeordneten Kollagenfasern vom Typ I und III und längs angeordneten elastischen Fasern. Darüber hinaus enthält die Adventitia ab einem Gefäßdurchmesser von  $> 2$  mm ein versorgendes Gefäßgeflecht, welches sich zur Media als Kapillarnetz verdichtet und so die äußere Mediaschicht über Diffusion versorgt. Die innere Mediaschicht wird über Diffusion aus dem Gefäßlumen versorgt. Weiter führt die Adventitia innervierende Nervenbahnen, besonders im Bereich der Arteriolen [21].

## 1.2.2 Die Media

Die Abgrenzung der äußeren Mediaschicht zur Adventitia erfolgt über die Membrana elastica interna. Die Media selbst bildet den muskulären Wandanteil des arteriellen Gefäßes und ist damit meist der stärkste Wandabschnitt. Die Aufgabe der Media liegt in der Stabilisierung des Gefäßes gegen Dehnungskräfte des Blutdrucks und der Anpassung des pulsierenden Blutstroms. Elastische Anteile der Media wirken über Rückstellkräfte in der diastolischen Phase der Herzaktion als Triebkraft für den Blutfluss und reduzieren darüber den Effekt diskontinuierlicher Perfusion.

Dies wird auch als "Windkesselfunktion" bezeichnet. Um dieser Funktion ausreichend nachzukommen enthalten herznahe Arterien mit großer pulsatorischer Volumenbelastung einen erhöhten Anteil an elastischen Fasern in der Media. Aus diesem Grund werden sie auch als Arterien vom elastischen Typ klassifiziert. In herzfernen Gefäßen überwiegt die Aufgabe der Blutdruckregulation durch Veränderung des peripheren Widerstandes. Über muskuläre Kontraktion und Relaxation können diese die Lumengröße verändern und damit den systemischen Blutdruck und die Endorganperfusion regulieren. In diesen Arterien treten die elastischen Fasern zugunsten der muskulären Anteile in den Hintergrund und werden deshalb auch als Arterien von muskulärem Typ bezeichnet.

Den Übergang zur Intima bildet die Membrana elastica interna. Das membranähnliche Geflecht elastische Fasern wird von den glatten Muskelzellen der Media gebildet, zählt aber formal zur Intima [21].

### 1.2.3 Das Endothel

Die wichtigste Zelle des kardiovaskulären Systems, die Endothelzelle, hat vielfältige Funktion im Physiologischen als auch im Rahmen von Pathologien wie beispielsweise der Atherosklerose. Das Endothel bildet die Grenzfläche zwischen zirkulierendem Blut und vaskulären Gewebe und spielt damit unter anderem eine entscheidende Rolle bezogen auf den selektiven Zugang von Molekülen und Zellen in das Gewebe.

Die Endothelzelle erfüllt im Wesentlichen drei Hauptaufgaben [22]:

- selektive Barriere zwischen Blut und Interstitium
- antithrombogene Oberfläche
- Kontrolle des Gefäßtonus durch Regulation der vaskulären Muskulatur über die Freisetzung von Vasokinen

Darüber hinaus erfüllt das Endothel verschiedene metabolische Funktionen, beispielsweise im Fettstoffwechsel durch die Umwandlung von VLDL in LDL mit Hilfe der endothelialen Lipoproteinlipase und in der Aktivierung von Hormonen, wie die Generierung von Angiotensin-II durch das endothelständige *angiotensin converting enzym*.

Im Rahmen von pathophysiologischen Zuständen präsentiert das Endothel Haftmoleküle zur Extravasation von Leukozyten, verliert seine antithrombotische Oberfläche und nimmt eher prothrombotische Eigenschaften an und reduziert die selektiven Barriereeigenschaften im Rahmen einer inflammatorischen Permeabilitätssteigerung. Eine genauere Übersicht bietet die folgende Auflistung [23]:

#### Regulation der Gefäßpermeabilität

- a. Außerhalb des zentralen Nervensystems erfolgt der endotheliale Austausch von Ionen und Nährstoffen primär passiv, parazellulär ohne die Zuhilfenahme von Transportern
- b. Im Bereich der Blut-Hirn-Schranke sind transzelluläre Transporter aufgrund der erhöhten Dichte an endothelialen Okkludenskontakten (über Occludin, Claudin-5 u.-3) vonnöten.
- c. Inflammatorische Stimuli wie beispielsweise Histamin, Bradykinin oder Substanz-P können über eine Öffnung der endothelialen Interzellularspalten die Gefäßpermeabilität immens steigern

#### Bereitstellung von Rezeptoren zur leukozytären Extravasation

- a. E- und P-Selectin ermöglichen endothelständig die Adhäsion von leukozytären Glykokalyx-Komponenten (ESL-1 und PSGL-1)
- b. Interzelluläre und vaskuläre Endothelzellmoleküle (ICAM-1, -2 und VCAM-1) erlauben eine leukozytäre Bindung zur anschließenden Diapedese und Leukozytenmigration

## Einleitung

### Neovaskularisation

- a. Vaskuläre Wachstumsprozesse spielen eine entscheidende Rolle im Rahmen von pathologischen Veränderungen wie Gefäßverschlüssen oder der Wundheilung. Die genauen Mechanismen der Neovaskularisation werden in späteren Kapiteln detailliert beschrieben

### Regulation des Gefäßtonus

- a. Synthese von vasodilatatorischen Vasokinen: Stickstoffmonoxid (NO), Angiotensinase, EDHF (endothelialer Hyperpolarisationsfaktor)
- b. Synthese von vasokonstriktorisches Vasokinen: Endothelin, Angiotensin-II, Plättchenaktivierungsfaktor (PAF)

### Hemmung der Blutgerinnung

- a. Zur Inaktivierung von Thrombin synthetisiert und exponiert die Endothelzelle Heparansulfatproteoglykan
- b. Synthese von TPAI (tissue factor activator inhibitor) und tPA (Gewebe-Plasminogenaktivator)
- c. Abgabe von NO und PGI<sub>2</sub> (Prostazyklin 2) als aktive Thrombozyteninhibitoren

### Aktivierung der Blutgerinnung (u.a. bei Gefäßverletzungen oder Rahmen inflammatorischer Prozesse)

- a. Synthese und Speicherung der Gerinnungsfaktoren V und IX
- b. Synthese des vWF (von Willebrand Faktor), Abgabe des vWF an die subendotheliale Basalmembran
- c. Bindung und Aktivierung der Gerinnungsfaktoren IX, IXa, X, Xa, XII und Fibrin

### Abbau von Blutfetten

- a. Die endotheliale Lipoproteinlipase spaltet Triglyceride von Chylomikronen und VLDL (very low density lipoprotein)
- b. Endozytose, Abbau und Transytose von LDL über den endothelialen LDL-Rezeptor
- c. Freisetzung von gewonnenen Fettsäuren an umliegende Gewebezellen zur Energiegewinnung oder Speicherung durch Fettzellen

## Einleitung

Morphologisch strukturiert sich das arterielle Endothel aus im Bereich des Zellkerns zwischen 2-4  $\mu\text{m}$  und in peripheren Ausläufen 0,2-1  $\mu\text{m}$  dicken Endothelzellen. Über Adhäsionsmoleküle wie Cadherin sind die einzelnen Zellen mechanisch miteinander verbunden und verfügen über zahlreiche Nexus, welche über Connexin 40 und 37 ausgebildet werden. Die Interzellularspalten werden mittels Claudin-5 als Okkludenskontakt verschlossen [21]. Arterielle Endothelzellen sind elongiert und entsprechend des eintreffenden Blutstroms ausgerichtet. Das Ausmaß an Elongierung der Zellen wird durch den wandparallelen laminaren Blutstrom bewirkt, dessen Scherspannungen die Ausrichtung der Endothelzelle bewirken. So unterscheiden sich die Grade an Ausrichtung und Elongation der Endothelzellen in den verschiedenen Bereichen des arteriellen Systems. Beispielsweise in der Aorta mit ihren überwiegend turbulenten Blutströmen sind die Zellen gering elongiert und besitzen teilweise polygonale Zellformen. Diese Anpassungsmöglichkeit an hydrodynamische Scherkräfte wird durch einen hohen Anteil an kontraktilen Actinfilament-Stressfasern ermöglicht [24]. Diese befestigen die Endothelzelle über fokale Kontakte der Plasmamembran mit der Basalmembran und strahlen weiter in die Interzellularkontakte und die luminal Plasmamembran ein. Darüber hinaus besitzt die Endothelzelle ein ausgeprägtes Intermediärfilament- und Mikrotubulussystem und ein spectrin- und actinfilamentreiches Membranzytoskelett. Diese dienen auch primär der mechanischen Stabilisierung der Endothelzelle [25].

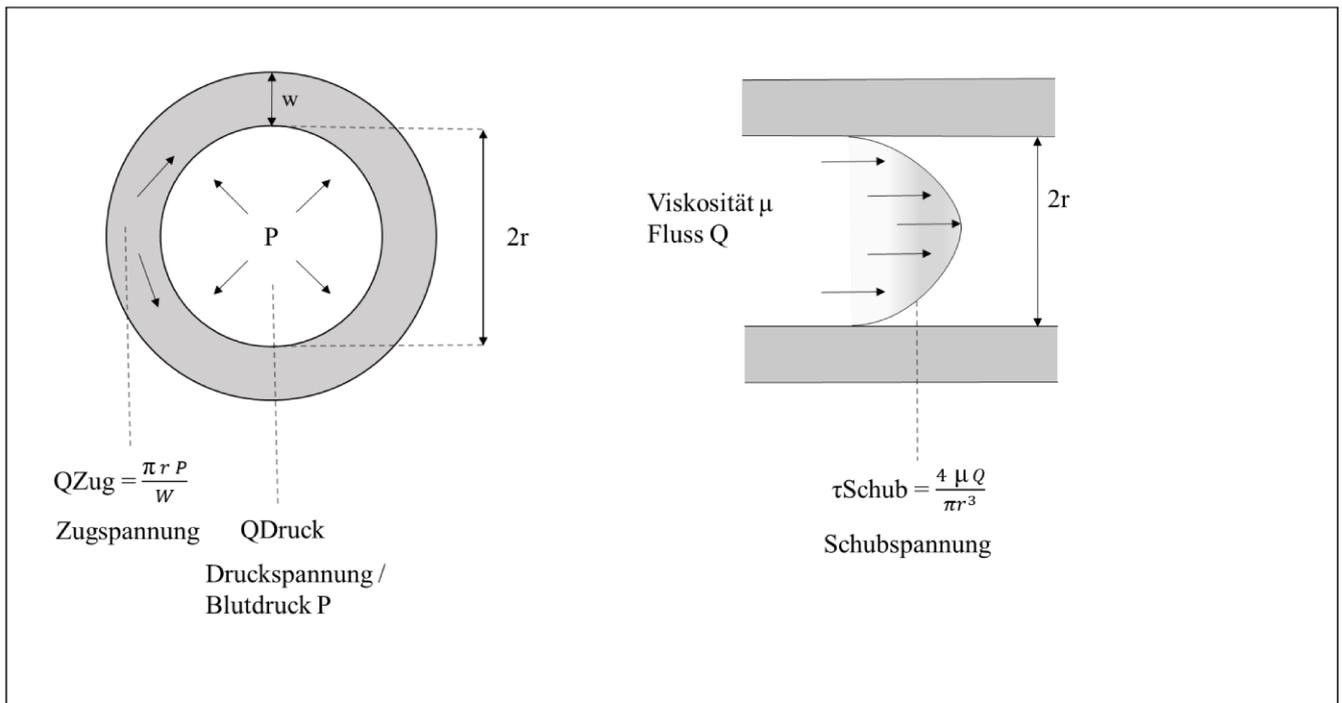


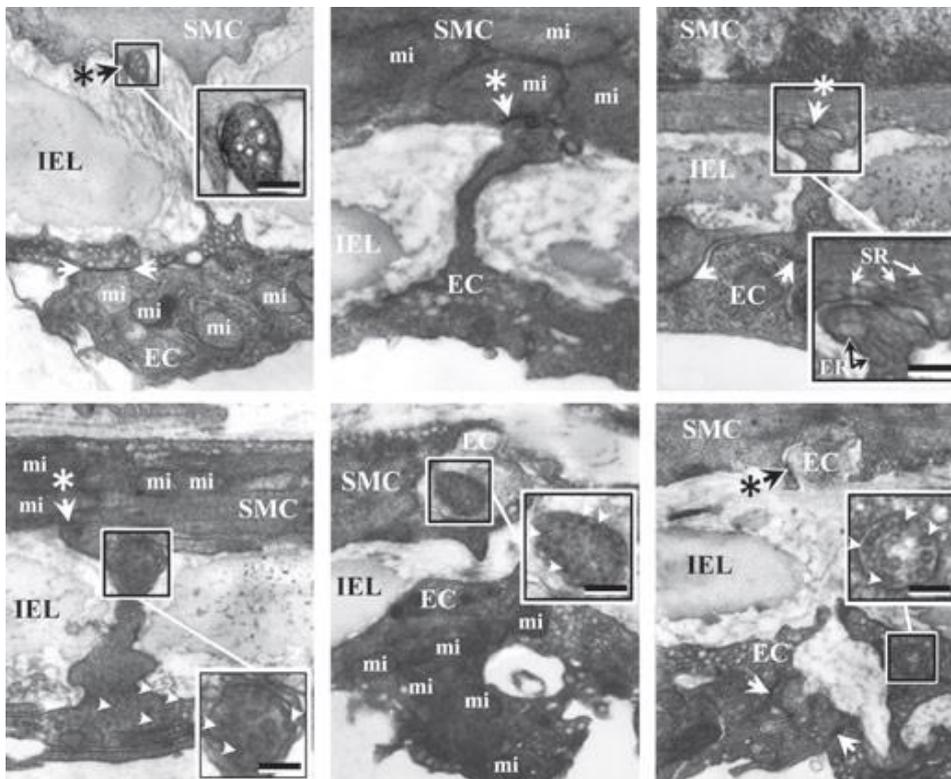
Abb. 2: Physikalische Grundlagen der Wandscherspannung

## Einleitung

Endothelzellen des arteriellen Widerstandssystems besitzen basale Zellausläufer, welche direkten Kontakt zu den vaskulären glatten Muskelzellen der Media herstellen [26]. Auf diese Weise werden essentielle myoepitheliale Wechselwirkungen ermöglicht. Hierdurch beeinflussen Endothelzellen den Tonus der Gefäßmuskulatur durch Synthese und Freisetzung von Vasokinen [27]. Zu den vasokonstriktorisches Vasokinen zählt unter anderem das Peptid Endothelin-21, welches besonders im Rahmen pathologischer Zustände wie Schock, Herzinfarkt oder Gefäßverletzungen freigesetzt wird und über den ET-A-Rezeptor der glatten Gefäßmuskulatur eine Gefäßverengung bewirkt. Ein weiteres vasokonstriktorisches Vasokin bildet der Plättchenaktivierungsfaktor (PAF), welcher besonders im Rahmen von inflammatorischen Zuständen gebildet wird [28].

Zu den vasodilatatorischen Vasokinen zählen unter anderem die Prostaglandine, Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>), EDHF und Stickstoffmonoxid (NO). Hervorzuheben ist hierbei NO, welches als gasförmiger Ligand nicht auf myoepitheliale Zellkontakte angewiesen ist, da es die Membrana elastica interna frei passieren kann [29]. Die endotheliale Synthese gefäßerweiternden Substanzen wird primär stimuliert durch die Scherkräfte des Blutflusses und durch Gefäßwanddehnung. Auf diese Weise werden kontinuierlich endotheliale Signale an die glatte Gefäßmuskulatur zur Relaxation und Vasodilatation vermittelt, um die auf das Endothel wirkenden Strömungskräfte herabzusetzen [30].

Folglich ist die physiologische Funktionsweise des Endothels immens wichtig für die Integrität des vaskulären Systems. Erkrankungen des Gefäßsystems wie beispielsweise die Atherosklerose nehmen ihren Beginn auch aus diesem Grund meist in einer Einschränkung der endothelialen Funktion, auch endotheliale Dysfunktion genannt [31].



**Abb. 3: Myoepitheliale Zellausläufer** [26] (EC) endothelial cell, (ER) endoplasmic reticulum, (IEL) internal elastic lamina, (mi) Mitochondrien, (SMC) smooth muscle cells, (SR) sarcoplasmic reticulum, Myoepitheliale gap junctions mit Pfeilen markiert.

## 1.3 Die Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine multifaktorielle chronische Systemerkrankung der arteriellen Gefäße, welche sich diskontinuierlich, schubweise über Jahre bis Jahrzehnte entwickelt und über die mechanische Flusslimitation durch Gefäßlumenverengung im Versorgungsgebiet des jeweiligen Endorgans wie Herz, Hirn, Niere oder Skelettmuskel klinisch manifest wird [4].

Obwohl die Atherosklerose Thema unzähliger wissenschaftlicher Arbeiten ist und heute mehr denn je führende Ursache für kardiovaskuläre Erkrankungen der industrialisierten Gesellschaft ist, bleiben fundamentale Charakteristika der Erkrankung nicht ausreichend verstanden [1].

### 1.3.1 Pathogenese der Atherosklerose

Die Bedeutsamkeit, welche dem Endothel in der Aufrechterhaltung der physiologischen Integrität des vaskulären Systems und damit der Endorganversorgung zukommt, besitzt es ebenfalls im dysfunktionalen Zustand bei der lokalen und systemischen Manifestation der Atherosklerose [27]. Auf dem Boden einer endothelialen Dysfunktion im Bereich arterieller Prä-dilektionsstellen entstehen lange vor klinischer Präsentation die initialen Veränderungen einer atherosklerotischen Läsion - die lokale Akkumulation und Veränderung von Lipoproteinpartikeln im subendothelialen Raum. Diese auch als *fatty streaks* bekannten Läsionen bilden den lokalen Ausgangspunkt einer atherosklerotischen Veränderung [32]. Neben den Einflüssen zahlreicher toxischer Substanzen wie beispielsweise Nikotin, nehmen Blutstromveränderungen eine wichtige Rolle in der Entstehung der endothelialen Dysfunktion ein [28].

So ist die bereits 1950 erhobene Beobachtung, dass sich *fatty streaks* entlang anatomischer Prädilektionsstellen des arteriellen Systems ausbreiten, auf die veränderte Bluthämodynamik in diesen Regionen zurückzuführen [33]. Vornehmlich betroffene Bereiche (bspw. Gefäßaufzweigungen) weisen im Gegensatz zu den laminaren Strömen des restlichen arteriellen Systems vermehrt turbulente, oszillierende Flussprofile auf, welche in einer geringeren Scherkraft pro Zeit resultieren, die auf das Endothel einwirkt [34-36]. Durch Verminderung der Scherkraft kommt es unter anderem zu einer reduzierten Expression und Synthese von Enzymkomplexen über Scherkraft-abhängige Promoterregionen der endothelialen Genregionen, deren Aktivität essentiell für die Aufrechterhaltung physiologischer Zustände ist [36, 37]. In Zusammenspiel mit zugeführten endotheltoxischen Substanzen erhöhen sich so maßgeblich unter anderem die endotheliale Seneszenz, der oxidative Stress und die Organisation und zytoskelettale Ausrichtung der Endothelzelle und der verbundenen interzellulären Junktionalkontakte.

Auf diese Weise wird der dysfunktionale Zustand des Endothels und damit der Funktionsverlust zur Aufrechterhaltung einer physiologischen Vaskulastruktur konsolidiert und folglich die Entstehung einer Atherosklerose begünstigt. Darüber hinaus nimmt das Endothel durch veränderte Expressionsmuster einen eher proinflammatorisch, prothrombotisch und prokoagulativen Zustand ein. Dieser Zustand wird auch als endotheliale Dysfunktion bezeichnet [38].

Im Verlauf einer atherosklerotischen Läsion erfolgt auch die Akkumulation von Lipoproteinen vom Typ LDL im subendothelialen Raum. Nach oxidativer Modifikation des nativen LDLs wirken die so entstandenen oxidierten Phospholipide proinflammatorisch und initiieren die Rekrutierung mononukleärer Leukozyten aus dem Blutstrom über die Ausbildung von

## Einleitung

Adhäsionsmolekülen [39]. Diese differenzieren sich nach erfolgter zellulärer Rekrutierung in Makrophagen und beginnen Lipoproteinpartikel über rezeptorvermittelte Endozytose zu phagozytieren [40]. Auf diese Weise kommt es zur Entstehung von sogenannten Schaumzellen mit einem hohen intrazellulären Anteil von Cholesterin als *lipid droplets*. Physiologischerweise können diese lipidreichen Makrophagen die Gefäßwand verlassen und so Lipoproteine entziehen. Wenn die Menge an eindringenden Lipoproteinen die Menge der durch Makrophagen oder andere Mechanismen (*HDL-Clearing*) herauszutransportieren übersteigt, beginnt die Akkumulation und damit die Umwandlung einer *fatty streak* hin zu einem Atherom [34, 39].

Einige der lipidreichen Schaumzellen geht in der expandierenden Intimaläsion zugrunde und führen so im atherosklerotischen Plaque zur Entstehung des sogenannten nekrotischen Kerns. Das Zusammenspiel aus inflammatorischer Reaktion, Apoptose und Lipoproteinakkumulation stimuliert über die Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie IL-1, TNF- $\alpha$  und PDGF das Einsprossen glatter Muskelzellen aus der Tunica media und die Bildung extrazellulärer Matrix [4, 41-43]. Die so stimulierten glatten Muskelzellen synthetisieren zytokinvermittelt interstitielle Kollagenformen, welche Teil der sich bildenden fibrotischen Kappe sind [44]. Diese ist Merkmal einer fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsion, gleichzeitig beginnt dadurch die Größenzunahme, welche initial mit einer Progression des Gesamtdurchmessers einhergeht. Plaques mit einem ausgeprägten Besatz durch eine fibrotische Kappe werden auch als stabile Plaques bezeichnet. Wenn keine weitere Größenzunahme mehr durch die restriktiven Eigenschaften der Tunica adventitia ermöglicht werden kann, beginnt die Läsion lumenwärts zu expandieren und den Blutstrom einzuengen [45, 46].

Auf diese Weise können Atherome blutflusslimitierende Stenose hervorrufen, wenn die extraluminale kompensatorische Vergrößerung erschöpft ist. Diese atherosklerotischen Plaques verursachen zumeist stabile klinische Syndrome wie eine belastungsabhängige Angina pectoris oder eine Claudicatio intermittens im Rahmen einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit. Atherome, deren Fibrinkappe weniger stark ausgeprägt ist, können zu akuten oder instabilen atherosklerotischen Syndromen führen. Eine offene Ruptur oder Fissur der fibrösen Plaquehülle ermöglicht den Kontakt von blutständigen Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren mit den hochthrombogenen Strukturen im lipidreichen Kern der Läsion. So entstehende okklusive Thromben können sich klinisch abhängig vom betroffenen Gefäßbereich hochakut beispielsweise als Myokardinfarkt oder akute Extremitätenischämie manifestieren. Nicht alle Atherome neigen gleichermaßen zur Ruptur, charakteristische Merkmale für instabile Plaques sind eine dünne Fibrinkappe, ein großer Lipidkern und eine hohe Konzentration von Makrophagen [47, 48].

Sowohl instabile wie auch stabile atherosklerotische Plaques bilden die pathophysiologische Grundlage für die Manifestation klinischer Symptome im Rahmen einer PAVK.

## 1.4 Die periphere arterielle Verschlusskrankheit (PAVK)

Die periphere arterielle Verschlusskrankheit umschließt arterielle Verengungen exklusive der koronaren und zerebralen Gefäße. In den meisten Fällen wird die PAVK mit arteriellen Obstruktionen atherosklerotischen Hintergrunds der unteren Extremitäten in Verbindung gebracht.

### 1.4.1 Epidemiologie der PAVK

Beruhend auf epidemiologischen Studien liegt die Prävalenz der PAVK bei 202 Millionen Betroffenen weltweit [3]. Dies entspricht einer Gesamtprävalenz von 3-10% in der Allgemeinbevölkerung. Betrachtet man die Altersklasse >70 Jahre, so steigt die Prävalenz auf 15-20% an[49]. Global wächst die Bedeutung der PAVK als Erkrankung mit Zuwächsen in der Prävalenz zwischen 13-29% [7] je nach Land und ein Anstieg von 155% in der Mortalität auf schätzungsweise 40.000 Tode in Jahre 2013 mit dem Hintergrund einer PAVK verglichen zu 1990 [3]. Hierbei ist zu beachten, dass die erhobenen Statistiken den Einfluss der PAVK häufig unterschätzen, da Mortalitätsraten selten in direkter Folge zur Erkrankung stehen. Stattdessen versterben 55% der Patienten in Folge kardialer und 10% in Folge zerebrovaskulärer Ereignisse atherosklerotischen Ursprungs. 25% der Mortalität von PAVK-Patienten ist auf nicht-vaskuläre Ursachen zurückzuführen [4]. Die Inzidenz der klinisch auffälligen PAVK pro 10.000 Personen beläuft sich auf sechs männlich und drei weibliche Individuen zwischen 30 und 44 Lebensjahren und steigt auf 61 bzw. 54 in Alter zwischen 65 und 74 Jahren an [50]. Nach Daten der Framingham Studie liegt die Gesamtinzidenz pro 1000 Personen bei 3 für männliche und 2 für weibliche Individuen im Alter von 35 bis 64 Jahre, die auf acht bzw. fünf im Alter von 65-94 Jahre ansteigt [51]. Die deutsche getABI Studie zeigte anhand von 6880 Patienten, dass jeder fünfte (21%) in der Altersklasse über 65 Jahre Veränderungen im Sinn einer PAVK aufweist [52].

Darüber hinaus ist die PAVK häufig mit der koronaren Herzkrankheit und zerebrovaskulären Erkrankungen vergesellschaftet, Hiatt et al. konnten zeigen, dass der Progressionsgrad der PAVK als starker Prädiktor für Tode durch vaskuläre Ereignisse dient [53]. Dennoch bleibt die periphere arterielle Verschlusskrankheit bis heute unterdiagnostiziert und unterbehandelt [54].

## 1.4.2 Risikofaktoren der PAVK

Ganzheitlich betrachtet, gleichen die Risikofaktoren der PAVK denen, welche für das Entstehen einer atherosklerotischen Manifestationsform in den unterschiedlichen Gefäßsystemen prädisponieren. Zu den klassischen Risikofaktoren zählen: Alter, Geschlecht, familiärer Hintergrund, Nikotinkonsum, Hypertonie, Diabetes und Dyslipidämie. Die vollständige Auflistung aller Risikofaktoren ist Tabelle 1 zu entnehmen.

Alter	Nikotinkonsum	Homocystein
Geschlecht	Hypertension	Inflammation
Heredität	Diabetes mellitus	Infektion
Ethnie	Dyslipidämie	Tuberkulose
Genotyp	Übergewicht	HIV
	Armut	Malaria
	Industrialisierung	Parodontose

**Tabelle 1: Risikofaktoren der PAVK**

### Nikotinkonsum

Der Nikotinkonsum, insbesondere durch Tabakverbrennung, bildet den wichtigsten Risikofaktor zur Entstehung einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit. Im Vergleich zu Nichtrauchern ist das Risiko verdoppelt, darüber hinaus steigen Risiko und Manifestationsgrad der PAVK in Abhängigkeit zur konsumierten Menge an Nikotin [7]. Nikotinabstinenz ist assoziiert mit einer Reduktion der Wahrscheinlichkeit zur Entstehung einer PAVK, um das Risiko auf das Niveau von Nichtrauchern zu senken, sind Abstinenzzeiten von lediglich ca. >20 Jahren notwendig [55].

## Einleitung

### Diabetes mellitus

Neben der klassischen symptomatischen und asymptomatischen PAVK, sind auch Manifestationsformen mit atypischen Symptomen mit einem Diabetes mellitus assoziiert. Das Risiko einer PAVK-Entstehung steigt bei Patienten mit Diabetes mellitus in Abhängigkeit zur Schwere der Erkrankung. So erhöht sich das Risiko für eine PAVK um 26% je 1% Erhöhung des Hämoglobin A1c Levels, darüber hinaus erhöhen die Dauer der Erkrankung und die Anwendung von Insulin das PAVK-Risiko [56, 57]. Diabetiker sind im Vergleich zu Nichtdiabetikern insgesamt doppelt so häufig von einer Claudicatio intermittens betroffen und haben darüber hinaus im Vergleich zu Nichtdiabetikern mit PAVK ein deutlich erhöhtes relatives Risiko für das Auftreten einer kritischen Extremitätenischämie mit einhergehender fünffach erhöhter Majoramputationsrate [7]. Ursächlich hierfür sind neben der diabetischen peripheren Neuropathie und Mikroangiopathie auch die Manifestation der PAVK bei Patienten mit Diabetes in weiter distal gelegenen Gefäßregionen, die seltener revaskularisiert werden können.

### Dyslipidämie

Obwohl es bis heute schwierig bleibt, den relevantesten Faktor der unterschiedlichen Lipidfraktionen in Bezug auf die PAVK zu erfassen, zeigen sich das Gesamtcholesterin und der Grad der HDL-Erniedrigung in unterschiedlichen Studien am stärksten assoziiert zur PAVK. Der gebildete Quotient aus Gesamt- zu HDL-Cholesterin scheint zurzeit der wirksamste Prädiktor zu sein, mit vierfach erhöhtem Risiko für Claudicatio intermittens Beschwerden bei Patienten im oberen Quantil [58]. Darüber hinaus wurden die Höhe der Serumspiegel von Lipoprotein (a) und Apolipoprotein B als unabhängige Risikofaktoren für die Entstehung einer PAVK identifiziert [59, 60].

### Hypertonus

Gegeben durch seine verhältnismäßig hohe Prävalenz, besonders in älteren Populationsgruppen, stellt der Hypertonus ebenfalls einen relevanten Risikofaktor nicht nur für periphere Gefäßerkrankungen dar. In Bezug auf die PAVK geht eine hypertone Grunderkrankung mit einem erhöhten Manifestationsrisiko einher, obgleich die Assoziation schwächer ist in Bezug auf Nikotinkonsum und Diabetes mellitus. Der diastolische Blutdruckwert ist hierbei in verschiedenen epidemiologischen Studien nicht mit einem erhöhten Risiko assoziiert, relevant erscheint nur die Höhe des systolischen Wertes [7].

### 1.4.3 Einteilungen der PAVK

Die Stadieneinteilung der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit erfolgt anhand des klinischen Erscheinungsbildes. Im deutschen Raum wird hierzu die Klassifikation nach Fontaine-Ratschow verwendet, international gebräuchlich ist die Einteilung nach Rutherford. Darüber hinaus werden die klinischen Stadien auch als Claudicatio intermittens oder später kritische Extremitätenischämie bezeichnet. In Tabelle 2 sind die klinischen Stadien nach den Klassifikationen Fontaine-Ratschow und Rutherford aufgeführt.

<b>Rutherford</b>			<b>Fontaine-Ratschow</b>		
<b>Klinisches Bild</b>	<b>Grad</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Klinisches Bild</b>	<b>Stadium</b>	
<b>Asymptomatisch</b>	0	0	Asymptomatisch	I	
<b>Leichte Claudicatio intermittens</b>	I	1	Gehstrecke >200 Meter	IIa	II
<b>Mäßige Claudicatio intermittens</b>	I	2	Gehstrecke <200 Meter	IIb	
<b>Schwere Claudicatio intermittens</b>	I	3			
<b>Ischämischer Ruheschmerz</b>	II	4	Ischämischer Ruheschmerz	III	
<b>Kleinflächige Nekrose</b>	III	5	Nekrose, Ulkus, Gangrän	IV	
<b>Großflächige Nekrose</b>	III	6			

Tabelle 2: Klinische Einteilung der PAVK

## 1.4.4 Diagnostik der PAVK

### Die klinische Untersuchung

Die klinische Untersuchung kann stadien- und patientenorientiert wichtige Informationen zutage fördern. Zu Beginn können anamnestisch typische Symptomkomplexe der PAVK oder differentialdiagnostische Symptome aus bestehenden neurologischen oder orthopädischen Erkrankungen abgeklärt werden. Inspektorisch sind Veränderungen in Hautfarbe und –temperatur, trophische Störungen sowie Nekrosen in Seitenvergleich zu dokumentieren. Bestehende arterielle Engstellen können je nach Grad der Lumeneinengung entweder über Pulspalpation (Lumeneinengung > 90 %) oder Auskultation (Lumeneinengung > 60 – 70 %) erfasst werden.

### Der Knöchel-Arm-Index (Ankle-Brachial-Index, ABI)

Die systolische Dopplerverschlussdruckmessung gilt heute als wichtigste apparative Screening- und Diagnostikmethode zur Erfassung einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit. Hierbei erfolgen Blutdruckmessungen an beiden Oberarmen und distalen Unterschenkeln mit anschließender Bildung eines Quotienten beider Werte.

Da der systolische Knöchelarteriendruck normalerweise etwa 10 mmHg höher als der Oberarmdruck ist, liegt der gebildete Knöchel-Arm-Index bei gesunden Individuen bei 0,9 - 1,2. Werte < 0,9 gelten als beweisend für das Vorliegen einer relevanten PAVK. Je niedriger der

Wert, desto ausgeprägter ist die Durchblutungsstörung der unteren Extremitäten. Bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 können falsch zu hohe Werte (> 1,3) aufgrund einer eingeschränkten arteriellen Kompressibilität durch die Mönckeberg-Mediasklerose gemessen werden. Die Sensitivität beziehungsweise Spezifität der Untersuchung zur Erfassung einer PAVK liegen bei 79% und 96% [61].

<b>Schweregrad der PAVK</b>	<b>Knöchel-Arm-Index</b>
<b>Normalbefund</b>	0,9 – 1,2
<b>Leichte PAVK</b>	0,75 – 0,9
<b>Mittelschwere PAVK</b>	0,5 – 0,75
<b>Kritische Ischämie</b>	< 0,5

**Tabelle 3: Schweregradeinteilung der PAVK nach ABI**

## Einleitung

### Bestimmung des Dopplerfrequenzspektrums

Das durch die Dopplersonde abgeleitete Frequenzgemisch der Fließgeschwindigkeiten im untersuchten Blutgefäß kann als Spektrumkurve visualisiert werden. Hierbei wird zwischen tri-, bi- und monophasischen Dopplerfrequenzkurven unterschieden, wobei letztere als Kriterium für eine relevante PAVK gilt. Bei bekanntem Untersuchungswinkel können ebenfalls über die Blutfließgeschwindigkeit quantitative Aussagen über den Stenosegrad getroffen werden.

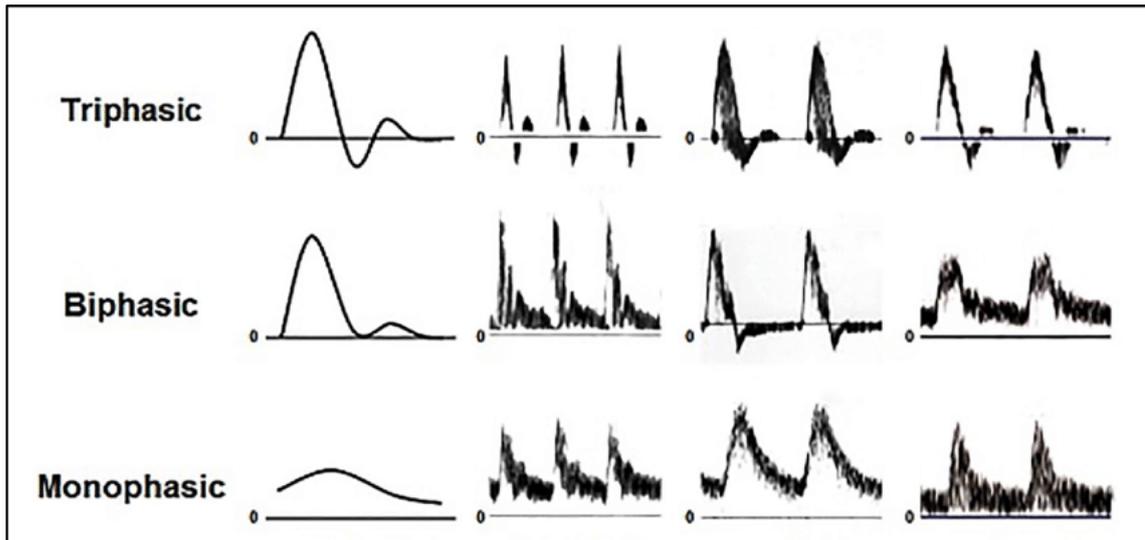


Abb. 4: Flussprofile Dopplerspektrum [62] Dargestellt sind die unterschiedlichen Flussprofile der Dopplerkurve je nach Stenosegrad.

### Die Oszillographie

Eine weitere nichtinvasive Methode zur Quantifizierung der arteriellen Durchblutungssituation der unteren Extremitäten ist die Oszillographie. Hierbei werden luftgefüllte Manschetten zirkulär an den Extremitäten auf Höhe der verschiedenen Gefäßetagen angebracht und anschließend die Beinumfangsveränderungen bedingt durch die arterielle Pulsquelle aufgezeichnet. Anhand der abgeleiteten Kurvenausschläge kann neben der Durchblutungssituation auch ein Rückschluss auf die Lokalisation etwaiger Verschlüsse gezogen werden. Besonders bei Mediasklerose und akralen Durchblutungsstörungen gilt die Oszillographie als hilfreich zur Bestimmung einer PAVK.

## Einleitung

### Die transkutane Sauerstoffmessung

Die transkutane Oximetrie ermöglicht die Messung des lokalen O<sub>2</sub>-Gehalts, welcher Rückschlüsse auf den nutritiven Blutfluss und damit eine Quantifizierung des Gades von peripheren Gefäßerkrankungen erlaubt. Am liegenden Patienten gemessen, gelten Werte von < 30 mmHg tcPO<sub>2</sub> als Prädiktor für eine kritische Extremitätenischämie, Werte zwischen 20 – 30 mmHg tcPO<sub>2</sub> markieren davon unabhängig potentielle Wundheilungsstörungen. Da die Methode von unterschiedlichen nichtvaskulären Faktoren abhängig ist (Sauerstofftransport des Blutes, Sauerstoffaufnahme der Atemwege, Anämie), empfiehlt es sich sie in Kombination mit anderen Verfahren zu benutzen.

### Belastungsuntersuchungen zur Gehstreckenbestimmung

Zur Bestimmung der Gehfähigkeit werden Gehstreckenmessungen mittels Metronom oder die Laufbandergometrie verwendet. Diese Untersuchungen dienen der objektiven Einteilung der klinischen Symptome sowie der Behandlungskontrolle. Nach erfolgter ABI-Messung in Ruhe werden die Parameter schmerzfreie und maximale Gehstrecke, Gehzeit und der ABI-Wert nach Belastung erhoben. Ein Abfallen des ABI-Wertes nach erfolgter Belastungsuntersuchung um > 20 % gilt als wegweisend für die Diagnosestellung einer PAVK.

### Die Farbkodierte Duplexsonographie (FKDS)

Im gefäßmedizinischen Bereich nimmt die Farbduplexsonographie eine Schlüsselrolle unter den nichtinvasiven bildgebenden diagnostischen Verfahren ein. Sie gilt als Goldstandart zur Stenoselokalisierung und findet darüber hinaus Anwendung in der Stufendiagnostik der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit und deren invasiver Therapieplanung. Als Kombination aus üblicher Ultraschalldarstellung des Gewebes und dem farbkodierten Dopplersignal wird eine Erfassung von Strömungsrichtung und –geschwindigkeit des Blutes in unterschiedlichen Gefäßen ermöglicht. Darüber hinaus lassen sich Rückschlüsse über die Morphologie der dargestellten Gefäßwände und des perivaskulären Gewebes ziehen. Die Qualität der erhobenen Befunde ist hierbei abhängig von den technischen Voraussetzungen, der Untersucherexpertise und den Gegebenheiten des untersuchten Patienten.

## Einleitung

### Die Computertomographische Angiographie (CTA)

Die Computertomographische Angiographie erlaubt unter der Verwendung von Mehrzeiler-Computertomographen eine hochauflösende diagnostische Bildgebung. Die Sensitivität und Spezifität zur Erfassung >50 prozentiger Stenosen liegt im aortoiliakalen Strömungsgebiet bei 96 % und 98%, in der femoropoplitealen Region bei 97 % beziehungsweise 94 % und für Stenosen unterhalb der Kniearterien bei 95 % und 91 %. Die CTA gilt entsprechend als untersucherunabhängige und valide Bildgebungsmethode, die ebenfalls die Darstellung von Kalzifizierungen, Stents und Bypässen in ganzheitlicher Darstellung ermöglicht. Nachteile der Methode sind die Strahlenexposition, die Verwendung jodhaltiger Kontrastmittel und die Überschätzung von Stenosegrade in dünnlumigen Gefäßen.

### Die Magnetresonanztomographie (MRA)

Ähnlich der CTA ermöglicht die Magnetresonanztomographie eine qualitativ hochwertige Gefäßdarstellung, welche unter Verwendung von gadoliniumhaltigem Kontrastmittel die Auflösung von invasiven Angiographien erreicht. Einschränkungen der Untersuchungsmethode beinhalten die Kontraindikation bei Metallimplantaten und Schrittmachern, die Nichtdurchführbarkeit bei Klaustrophobie oder Bewegungsunruhe und die fehlende Darstellung von arteriellen Kalzifizierungen.

### Die Intraarterielle digitale Subtraktionsangiographie (DSA)

Die invasive Gefäßdarstellung mittels Katheterisierung ist nach wie vor der Goldstandard hinsichtlich der Genauigkeit der vaskulären Bildgebung und erlaubt weiter eine ganzheitliche Darstellung der arteriellen Strombahn. In Bezug auf die rein diagnostische Anwendung, gerät die DSA aufgrund der möglichen Komplikationen bedingt durch die invasive Natur der Methode und der hohen Sensitivität und Spezifität der nichtinvasiven Verfahren zunehmend in den Hintergrund. Sie wird dementsprechend hauptsächlich in geplanten endovaskulären Prozeduren angewandt. Bei bestehenden Kontraindikationen für die Anwendung des nephrotoxischen Kontrastmittels, steht für niereninsuffiziente Patienten die CO<sub>2</sub>-Angiographie als Alternative zu Verfügung.

## 1.4.5 Therapie der PAVK

### Therapeutische Ziele

- Reduktion vaskulärer Gesamtereignisse
- Progressminderung der PAVK
- Verbesserung von Symptomen, Gehstrecke und Lebensqualität
- Reduktion von Schmerzen
- Reduktion von Gewebsdefekten

Adaptiert an die Stadieneinteilung nach Fontaine-Ratschow, liegt das Behandlungsziel in Stadium II in der Verbesserung der maximalen und schmerzfreien Gehstrecke, dagegen im Stadium III bis IV in der Schmerzreduktion und dem Extremitätenerhalt. Stadienübergreifend ist eine Reduktion des vaskulären Risikoprofils anzustreben.

### Konservative Therapieoptionen

#### Risikofaktorenmanagement

Zur Reduktion des atherosklerotischen Risikoprofils für kardiovaskuläre Erkrankungen werden Lebensstilinterventionen empfohlen. Hierzu zählen eine Nikotinkarenz als wichtigster Risikofaktor für die PAVK, eine Steigerung der körperlichen Betätigung bei Bewegungsmangel, eine Gewichtsnormalisierung und eine optimale therapeutische Einstellung bei begleitendem Diabetes mellitus, Hypertonus und Dyslipidämien [55].

#### Thrombozytenfunktionshemmung

Eine effektive Hemmung der Thrombozytenfunktion ist bei Patienten mit PAVK zur Sekundärprävention kardialer und zerebrovaskulärer Ereignisse indiziert. Für die Thrombozytenfunktionshemmer Acetylsalicylsäure, Clopidogrel, Ticlopidin, Dipyridamol und Picotamid konnte zusammengefasst eine Risikoreduktion für ischämische Ereignisse von 23 % nachgewiesen werden [18]. In der COMPASS-Studie zeigte sich eine Risikoreduktion für PAVK Patienten bezogen auf kardiovaskuläre Endpunkte wie Herzinfarkt und Schlaganfall unter der Anwendung von Rivaroxaban (2,5 mg zweimal täglich) in Kombination mit ASS (100 mg einmal

## Einleitung

täglich) im Vergleich zur alleinigen ASS-Therapie. Darüber hinaus reduzierten sich hierunter die Anzahl an schweren Durchblutungsstörungen der Extremitäten und Amputationen [63]. Die Datenlage zur Primärprävention vaskulärer Ereignisse, für die Verzögerung einer PAVK-Manifestation und die Progresshemmung der Atherothrombose in peripheren Gefäßregionen unter Thrombozytenfunktionshemmung, ist unzureichend für eine entsprechende Empfehlung.

## Physikalische Therapie der Claudicatio intermittens

Das strukturierte Gehstreckentraining bei Patienten mit PAVK stellt die wichtigste Form der konservativen Therapie neben der Verminderung der kardiovaskulären Risikofaktoren dar. Mindestens dreimal wöchentliche über 60 Minuten andauernde Trainingseinheiten bis zur Belastungsgrenze führen unter strukturierter Anleitung zu Steigerungen der Gehleistung, Reduktion der Claudicatio-Beschwerden und einem daraus bedingten Anstieg an Lebensqualität. Hierdurch können wie bereits beschrieben Gehstreckensteigerungen von bis zu 200 % nach 12 Wochen erreicht werden [64]. Ursächlich für den Therapieerfolg ist neben muskulären Umbauprozessen die Ausbildung und Anpassung von Kollateralkreisläufen, die eine Verbesserung der arteriellen Versorgung der betroffenen Extremitäten durch Umgehung stenosierter Gefäßareale gewährleisten [17]. Falls aus verschiedenen Gründen kein Gehstreckentraining wahrgenommen werden kann, können alternativ andere Trainingsformen wie zum Beispiel ein Armergometer Anwendung finden. Auch diese beeinflussen die Durchblutung der unteren Extremitäten und daraus bedingt die Gehstrecke positiv [65]. Limitationen der Therapieanwendung sind häufig bedingt durch orthopädische oder neurologische Komorbiditäten. Ebenfalls können kardiale und pulmonale Begleiterkrankungen die erreichte Trainingsintensität vermindern und damit den Therapieerfolg reduzieren. Bei Patienten mit ausgeprägten Gewebsdefekten in Stadium IV wird das Gehstreckentraining nicht empfohlen.

## Pharmakologische Therapie der Claudicatio intermittens

Die Behandlung der symptomatischen PAVK mittels medikamentöser Therapie zur Verbesserung der Gehstrecke wird unterschiedlich bewertet. Während die American Heart Association in ihrer Leitlinie von 2016 eine Empfehlung Klasse I A für die Verwendung von Cilostazol zur Behandlung von Claudicatio-Beschwerden ausspricht [6], wird die Behandlung mit Cilostazol und Naftidrofuryl in der Leitlinie von 2017 der European Society of Cardiology und der korrespondierenden S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Angiologie lediglich eingeschränkt zur Verbesserung der Gehstrecke empfohlen [66]. Alternative pharmakologische Ansätze mit Prostanoiden, Pentoxifyllin, Buflomedil und L-Arginin werden aufgrund fehlender Evidenz nicht empfohlen.

### Endovaskuläre Verfahren zur Therapie der kritischen Extremitätenischämie

Bei Patienten mit einer kritischen Extremitätenischämie stehen Katheterverfahren zur Revaskularisierung bestehender Gefäßstenosen zu Verfügung. Die perkutane transluminale Angioplastie und Stent-Therapie zählt hierbei zu den Standardmethoden. Mittels Seldinger-Technik werden Ballonkatheter minimalinvasiv und unter radiologischer Kontrolle in dem stenosierten arteriellen Gefäßabschnitt platziert und anschließend dilatiert, um die bestehende Stenose auszuschalten. Bei unzureichender Erweiterung können darüber hinaus röhrenförmige Spiraldrahtprothesen (Stents) zur dauerhaften mechanischen Gefäßerweiterung eingebracht werden. Die Anwendung alternativer Kathetermethoden wie die Laser-Angioplastie oder die Rotationsthrombektomie können je nach Gefäßbefund individuell erwogen werden. Limitierende Faktoren für endovaskuläre Verfahren sind lange Läsionen > 10cm, schwere Verkalkungen oder multifokale Stenosen.

### Die operative Therapie der kritischen Extremitätenischämie

Offene chirurgische Revaskularisationen stehen ebenfalls zur Behandlung angiomorphologischen Befundkonstellationen, bei denen durch endovaskuläre Verfahren geringe Erfolgschancen zu erwarten sind, zur Verfügung. Zu den operativen Verfahren zählen die Thrombendarteriektomie (TEA) und die Bypass-Operation. Bei der TEA wird das verengte Gefäßlumen durch Desobliteration inklusive der innersten Gefäßschicht erweitert. Anschließend wird die Eröffnungsstelle je nach Konstellation mit oder ohne die Einbringung einer Patchplastik verschlossen. Die Bypass-Operation zielt auf eine Umleitung des nutritiven Blutflusses an der Stenose vorbei ab. Hierbei werden autologe Venen oder körperfremdes Material als Gefäßersatz verwendet und zur Überbrückung von Stenosen im Strombahngebiet eingebracht. In der BASIL (Bypass versus Angioplasty in Severe Ischaemia of the Leg) Studie zeigte sich bei Patienten mit kritischer Beinischämie eine Überlegenheit der Bypass-Operation gegenüber der endovaskulären Therapie hinsichtlich des Gesamtüberlebens und der Amputationsfreiheit bei Patienten > 2 Jahre nach dem Eingriff [67]. Die Ergebnisse zum Vergleich neuerer endovaskulärer Verfahren mit der Bypass-Operation in den randomisierten Kontrollstudien BASIL-2 und BEST-CLI (Best Endovascular vs. Best Surgical Therapy in Patients with Critical Limb Ischaemia) sind aktuell noch ausstehend.

## 1.5 Grundlagen des Kollateralenwachstums

Die Ausbildung neuer beziehungsweise die Anpassung bestehender alternativer Versorgungsbahnen im arteriellen Gefäßsystem spielt im Rahmen der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit eine bedeutende Rolle und wird beim strukturierten Gehstreckentraining therapeutisch angewendet. Folgend werden die unterschiedlichen involvierten Prozesse der Gefäßbildung genauer beleuchtet.

### 1.5.1 Neovaskularisierende Prozesse

Allgemein werden gefäßbildende Mechanismen zu den neovaskulären Prozessen zusammengefasst. Hierzu zählen per Definition die Vaskulogenese, die Angiogenese, die Arteriogenese und die Lymphangiogenese, die in ihrer Gesamtheit entscheidend für die Ausbildung und adäquate Funktion von Organen und Geweben sowohl im embryonalen wie auch im postnatalen Entwicklungszustand sind. Gefäßneubildungen dienen sowohl in physiologischen als auch in Krankheitsprozessen als Mittel zur Anpassung an den funktionellen nutritiven Bedarf des Gewebes. Bezogen auf die PAVK finden hauptsächlich die Arteriogenese und Angiogenese Anwendung. Inwieweit die Vaskulogenese postnatal über zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen die Gefäßstruktur in ischämischen Gewebsabschnitten modulieren kann, bedarf genauerer wissenschaftlicher Untersuchungen [68-70].

### 1.5.2 Die Angiogenese

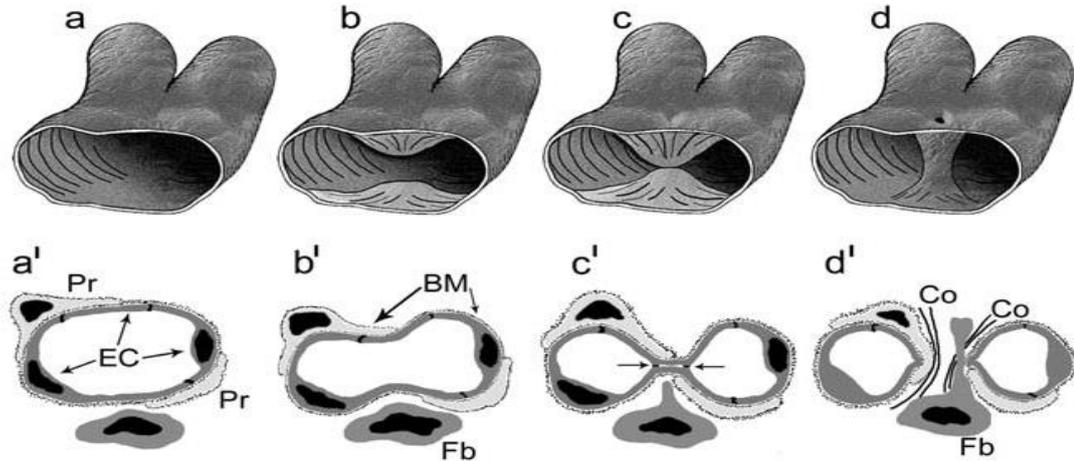
Als Angiogenese werden Prozesse beschrieben, die zur Gefäßneubildung aus vorexistierenden Blutgefäßen führen. Sie kommt sowohl in physiologischen als auch unter pathologischen Konditionen vor, hauptsächlich in zwei unterschiedlichen Formen: der Aussprossung und der Invagination.

Die sogenannte *sprouting* Angiogenese (SA) umfasst die Kapillarneubildung in Reaktion auf proangiogenetische Faktoren und beinhaltet die Proliferation von Endothelzellen, welche neue Ursprungsäste unter Lumenbildung formen und durch die Rekrutierung von Perizyten und der Ausbildung einer neuen Basalmembran stabilisiert werden. Dieser Mechanismus wird durch auftretende Gewebschämie ausgelöst und findet Anwendung in der embryonalen Gefäßentwicklung, in Wundheilungsprozessen und der Bildung von Kollateralkreisläufen bei Gewebsminderperfusion beispielsweise im Rahmen einer PAVK. Darüber hinaus ist die SA relevant unter pathologischen Konditionen wie der Neovaskularisierung von soliden Tumoren, der Entstehung ophthalmologischer Erkrankungen und inflammatorischen Störungen wie der rheumatoiden Arthritis und Psoriasis [71-73].

Dem gegenüber steht die *intussusceptiv* Angiogenese (IA), welche durch die repetitive Insertion von neuen transkapillären Gewebssäulen und deren Größenwachstum zu einer Zunahme des kapillaren Netzwerks führt. Bereits 1990 wurde die Bedeutung der IA für das Wachstum

## Einleitung

mikrovaskulärer pulmonaler Strukturen dargelegt [74]. Hierbei wird die Kapillarwand lumenwärts durch die Gewebesäulen vergrößert, um aus einem singulären Gefäß im Anschluss zwei neue Gefäße entstehen zu lassen.



**Abb. 5: Invaginierende Angiogenese** [75]: Drei- und zweidimensionale Darstellung der invaginierenden Angiogenese. (EC) Endothelzelle, (BM) Basalmembran, (Fb) Fibroblast, (Pr) Perizyten

Diese Form der Angiogenese ist im Vergleich zur SA effizienter, da durch die lumenale Kontaktzone ausschließlich eine Reorganisation der vorhandenen endothelialen Zellen und keine Migration oder Proliferation neuer Zellen notwendig ist.

Die Regulation angiogenetischer Prozesse erfolgt über eine Reihe an Stimulatoren und Inhibitoren, welche unter physiologischen Konditionen einen Gleichgewichtszustand der endothelialen Zellproliferationsrate aufrechterhalten. Treten jedoch pathologische Gewebszustände wie Hypoxie, Azidose, Hypoglykämie oder mechanischer Stress auf, so wirken diese als Auslöser für die vermehrte Produktion von proangiogenetischen Faktoren, welche zu einer erhöhten Proliferations- und migrationsrate der Endothelzellen führen. Dies wird auch als angiogenetischer Schalter (*angiogenic switch*) bezeichnet [76, 77]. Zu den involvierten Hauptfaktoren in diesem Prozess gehört das VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und das HIF-1 (*hypoxia inducible factor 1*), die ausschlaggebend für die vaskuläre Homöostase sind und die vaskuläre Permeabilität, Migration und Proliferation von Endothelzellen stimulieren [78]. Dem gegenüber spielen Angiopoetin 1 und 2 (Ang-1 und Ang-2) als antagonisierende Faktoren eine entscheidende Rolle in der Begrenzung des vaskulären Wachstums [79]. Weiter nehmen Integrine in der Migration der Endothelzellen und PDGF (*platelet derived growth factor*) in der Blutgefäßreifung eine entscheidende Funktion ein [80, 81].

Bedingt durch eine zunehmende arterielle Minderversorgung des muskulären Gewebes vor dem Hintergrund einer progredienten Gefäßstenose durch atherosklerotische Ablagerungen kommt es bei der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit zu einer ischämiebedingten lokalen Stimulation der Angiogenese. Die daraus resultierende Vergrößerung des kapillaren Netzwerks zielt auf eine Verbindungsbildung zu normal perfundierten Blutgefäßen ab, um die eingeschränkte Gewebeversorgung zu verbessern. Diese Adaptation ist alleinig nicht ausreichend, um die Minderversorgung im Rahmen einer PAVK zu beseitigen, darüber hinaus führt die Zunahme an kapillaren Gefäßen zu einem Nettozuwachs an totalem Gefäßwiderstand, was die lokale Perfusion zusätzlich erschwert.

Daraus schlussfolgernd sind die angiogenetischen Mechanismen bei der Bildung von Kollateralgefäßen im Rahmen einer PAVK involviert, allerdings von geringem Nutzen [29].

### 1.5.3 Die Arteriogenese

Unter dem Begriff der Arteriogenese wird die Ausbildung von Kollateralarterien bezeichnet, die einen Zuwachs an Blutstrom ermöglichen, was sie zu einem entscheidenden Kompensationsmechanismus zur Aufrechterhaltung der arteriellen Perfusion macht, wenn vaskuläre Hauptversorgungsbahnen verengt oder verschlossen sind. Im adulten Organismus kommt die Arteriogenese primär in Reaktion auf Veränderungen der hämodynamischen Kräfte wie Schubspannungssteigerungen und Wandspannungssteigerungen zu tragen [82]. Sie bilden den wichtigsten Auslöser für den Beginn arteriogenetischer Reaktionen. Folglich spielt die Arteriogenese eine essentielle Rolle unter pathologischen Konditionen, in denen es zu einer Minderversorgung des Gewebes aufgrund einer ungenügenden arteriellen Perfusion kommt [82, 83].

Der Arteriogenese-Prozess unterteilt sich ebenfalls in zwei unterschiedliche Mechanismen, der *de novo* Formation und der Umformung präexistierender Kollateralarterien. Erstgenannter Mechanismus beinhaltet die Ausbildung und Entwicklung neuer Gefäße aus einem bestehenden arteriellen Netzwerks in unmittelbarer Nähe zur stenosierten Arterie. Die neu ausgebildeten arteriellen Gefäße überbrücken den Engpass durch Anbindung an distale Gefäßabschnitte und schaffen so eine neue Versorgungsbahn [84]. Der zweite Mechanismus führt über einen zellulären Umbauprozess zur Lumenexpansion bestehender arterieller Kollateralgefäße, um die eingeschränkte Gewebsversorgung durch eine Erhöhung des Blutvolumenflusses zu revidieren [85].

Im Laufe der Embryonalentwicklung findet die *de novo* Arteriogenese in der Differenzierung und Ausreifung von primären Gefäßplexus Anwendung. Der ausschlaggebende Reiz ist hierbei eine systemische Blutdruckerhöhung. Die daraus resultierende erhöhte Schubspannung im Kapillarnetzwerk führt zu einer lokalen Rekrutierung glatter Muskelzellen und Proliferation von Endothelzellen, was die Ausbildung eines ausgereiften Gefäßabschnittes hervorbringt [86].

Inwiefern diese Form der Arteriogenese auch im adulten Menschen Anwendung findet, ist zurzeit nicht abschließend geklärt [87]. In adulten Mäusen konnte die Anwesenheit neu ausgebildeter Kollateralarterien nach arterieller Okklusion in Herz und Gehirn nachgewiesen werden [84, 88].

Während die Rolle der *de novo* Arteriogenese im adulten Stadium kontrovers bleibt, zeigt sich, dass die dominierende Form der postnatalen Arteriogenese auf dem Mechanismus der Umformung bestehender arterieller Gefäße beruht [89]. Die Umformung arterielle Kollateralgefäße lässt sich in drei Phasen einteilen: Initiation, Wachstum und Ausreifung des Gefäßes. Kommt es zum Verschluss eines Hauptgefäßes, wird das Versorgungsgebiet durch den Blutfluss, welcher automatisch den Druckgefällen alternativer Bahnen folgt, meist über bestehende arterielle Gefäße kleineren Lumens erreicht.

Das besagte physiologische Druckgefälle wird weiter durch die stenosebedingte periphere Minderversorgung verstärkt. Die entstandene Hypoxie der Peripherie führt zur Vasodilatation, das Druckgefälle steigt. Folglich erhöht sich das Flussvolumen in den Umgehungskreisläufen. Mit der Steigerung des Flussvolumens in besagten Arterien geht ebenfalls eine Erhöhung der

## Einleitung

auf die Gefäßwand einwirkenden Schubspannung (*shear stress*) einher. Die Schubspannungserhöhung gilt daher als wichtigster Reiz zur Initiation der Arteriogenese [29].

Die erhöhte Scherspannung aktiviert die endothelialen Zellen der Kollateralarterien. Diese stimulieren die Rekrutierung von inflammatorischen Zellen aus dem Knochenmark und der Umgebung, durch die Expression von Chemokinen wie TNF (Tumor Nekrose Faktor), VEGF und CCL-2/MCP-1 (*CC-chemokine ligand 2, monocyte chemoattractant protein 1*) und Adhäsionsmolekülen wie Selektine, ICAM-1 (*intercellular adhesions molecule 1*) und VCAM-1 (*vascular adhesion molecule 1*) [90]. Bei den initial rekrutierten Entzündungszellen handelt es sich um Neutrophile, welche die extrazelluläre Matrix auflösen, um eine Gefäßexpansion zu ermöglichen [91]. Die Expression des Chemokins CCL-2/MCP-1 dient der Rekrutierung von zirkulierenden Monozyten im Zielbereich [92].

Im Wachstumsstadium spielen rekrutierte Makrophagen eine entscheidende parakrine Rolle, indem sie durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren wie SDF-1 (*stromal derived factor 1*) die Differenzierung der glatten Muskelzellen modulieren und die Proliferation endothelialer Zellen anregen. Dadurch ändern die glatten Muskelzellen ihren kontraktilen Phänotyp hin zu einer synthetischen Differenzierung und unterstützen durch die Sekretion von Fibronectin [93] den Aufbau einer Übergangsmatrix. Die Proliferation der glatten Muskelzellen und Endothelzellen führt letztlich zu einer Lumenvergrößerung und Verlängerung der Kollateralarterie. Durch die Vergrößerung des luminalen Durchmessers wird die distale Perfusion gewährleistet und einhergehend sinken der Strömungswiderstand und die Schubspannung.

Mit Abfall der Schubspannung geht die Umformung in die dritte Phase: die Ausreifung. Hierbei normalisiert sich die Endothelfunktion der Kollateralarterie und die inflammatorischen Reaktionen nehmen ab. Darüber hinaus differenzieren sich die glatten Muskelzellen zurück zum kontraktilen Phänotyp. Ab diesem Punkt stellt das Kollateralgefäß mit dem niedrigsten Strömungswiderstand den größten Anteil des umgeleiteten Blutflusses zur Verfügung und entwickelt sich so zum dominanten Kollateralgefäß, während Kollateralen mit geringerem Lumendurchmesser keinen ausreichenden hämodynamischen Stimulus aufrechterhalten können und sich durch neointimale Hyperplasie zurückentwickeln [94].

Für die Ausbildung suffizienter Kollateralkreisläufe ist es von essentieller Bedeutung, dass die Induktion durch mechanisch wirksame Kräfte wie Schub- und Wandspannung kontinuierlich aufrechterhalten wird.

Andernfalls können nur unzureichende Kollateralen ausgebildet werden, welche die durch das atherosklerotisch verschossene Hauptgefäß entstandene periphere Minderversorgung nicht adäquat terminieren.

### Molekulare Mechanismen der Arteriogenese

Die Endothelzelle nimmt im Prozess des Kollateralenwachstums eine entscheidende Rolle ein. Der mechanische Stimulus der erhöhten Wandschubspannung, bedingt durch eine Blutflusssteigerung, muss über die Endothelzelle in ein molekulares Signal umgewandelt werden, das in der Lage ist die glatten Muskelzellen der Gefäßwand zu erreichen.

Zwischen den Zellverbänden besteht keine direkte Verbindung, sie werden durch die Basalmembran und die Membrana elastica interna getrennt. Demensprechend kommt ein Molekül zum Einsatz, dessen Diffusionsfähigkeit die Überwindung dieser Barriere und damit die Signaltransduktion ermöglicht: Das Stickstoffmonoxid (NO). Unter Verwendung der Aminosäure L-Arginin katalysiert die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) die Bildung von NO, nach vorhergehender Phosphorylierung und Aktivierung durch Calcium<sup>2+</sup> [29].

Das Verbindungselement zwischen Wandschubspannung und Calcium<sup>2+</sup>-Erhöhung ist zurzeit nicht zweifelsfrei detektiert. Neben mechanosensitiven Ionenkanälen wie TRPV4 (*transient receptor potential cation channel subfamily V member 4*), wurde die Beteiligung von G-Proteinen, Integrinen, Intermediärefilamenten und der Glykokalyx postuliert [95]. Die Freisetzung von NO wirkt über unterschiedliche Signalkaskaden unter anderem auf die endotheliale Permeabilität und Apoptoserate, inflammatorische Reaktionen, die Thrombozytenfunktion [96] und bewirkt über die lösliche Guanylatcyclyase (sGC) eine Relaxation des glatten Muskelzellen, was eine Gefäßdilataion zur Folge hat.

Darüber hinaus wird über NO die Genexpression von MCP-1 in den glatten Muskelzellen bei graduell erhöhter Wandschubspannung stimuliert [28]. Die Sekretion von MCP-1 erfolgt sowohl in Richtung des Gefäßlumens, als auch in Richtung der Gefäßadventitia. Luminal werden zirkulierende Monozyten rekrutiert, an der Gefäßadventitia kumulieren Monozyten aus den nächstgelegenen venösen Gefäßen. Die rekrutierten Monozyten aktivieren daraufhin gewebständige Makrophagen, welche, wie oben beschrieben, die Sekretion von Wachstumsfaktoren aufnehmen und die Differenzierung und Proliferation glatter Muskelzellen und Endothelzellen einleiten. Dies stellt einen entscheidenden Mechanismus zur Größen- und Längenzunahme der Kollateralarterie dar.

Auf diesem Wege führt der Anstieg der Wandschubspannung über die Aktivierung der eNOS und der resultierenden Freisetzung von NO zur Einleitung der Arteriogenese.

### Der NO-sGC-cGMP-Signalweg

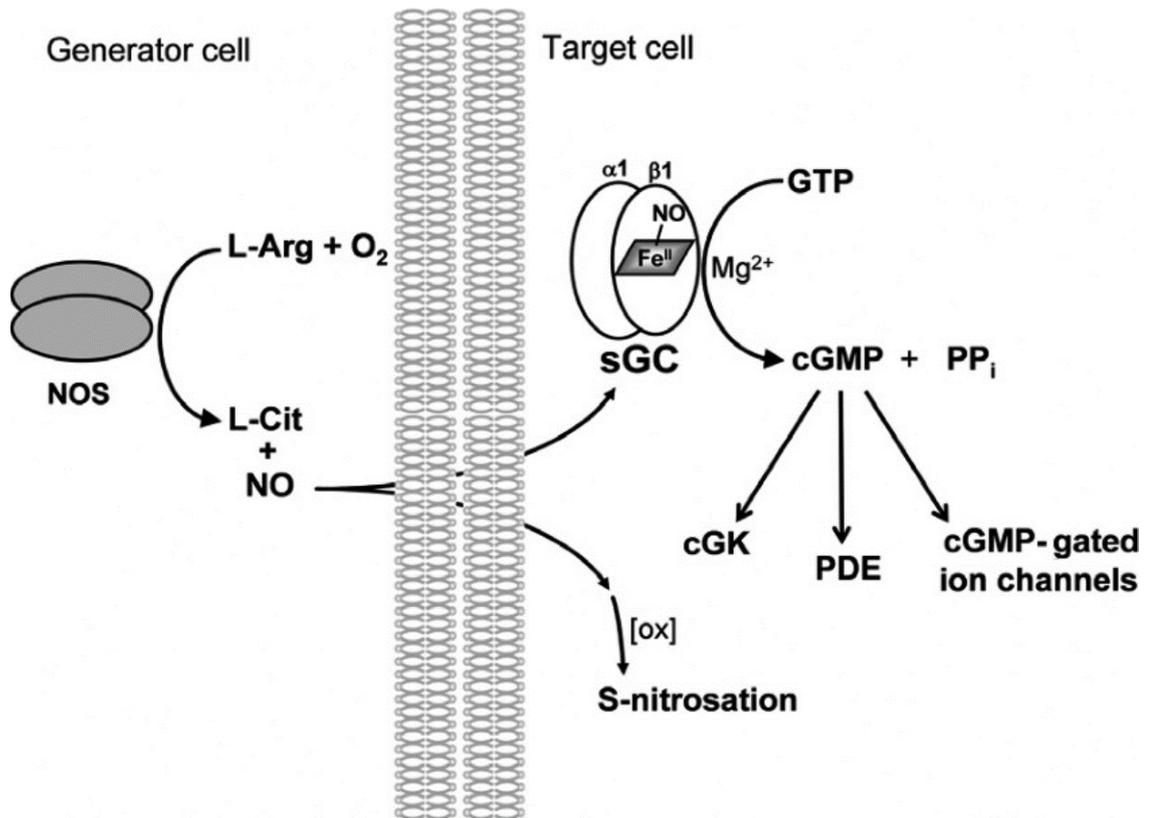
Seit ihrer Entdeckung im Jahre 1989 durch Robert Palmer und Salvador Moncada [97] ist die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase Bestandteil unzähliger wissenschaftlicher Arbeiten. Sie gehört zur Familie der Stickstoffmonoxid-Synthasen, welche mit drei Isoformen im menschlichen Organismus vertreten sind. Neben der in Epithelzellen ansässigen eNOS katalysieren die neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) und die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) die Bildung von NO aus L-Arginin in unterschiedlichen Geweben. Sowohl eNOS als auch nNOS werden kontinuierlich exprimiert, die Expression von iNOS kann durch inflammatorische Signale stimuliert werden.

Die in Signaltransduktionsmechanismen involvierten kontinuierlichen Isoformen katalysieren die Produktion von NO im nanomolekularen Bereich und werden durch die Bindung von Calcium<sup>2+</sup> und dem Protein Calmodulin reguliert. Trotz seiner kurzen Halbwertszeit von sechs Sekunden ist es dem entstandenen NO möglich über Zellgrenzen hinweg die lösliche Guanylatcyclase im Zielbereich zu aktivieren. Die sGC gehört zur Enzymklasse der Guanylatcyclasen, welche das Nucleosidtriphosphat Guanosintriphosphat zu zyklischem Guanosin-Monophosphat lysieren.

Sie liegt typischerweise als Heterodimer, bestehend aus einer Alpha-Untereinheit und einer Häm-abhängigen Beta-Untereinheit, vor und bildet im Gegensatz zu membranständigen Guanylatcyclasen, an denen beispielsweise natriuretische Peptide binden können, einen Rezeptor für gasförmige Liganden wie NO oder Kohlenstoffmonoxid.

Das gebildete cGMP fungiert als zellulärer Botenstoff (*second messenger*) im Rahmen der Signaltransduktion verschiedener Gewebstypen. Die intrazellulären Effektoren des cGMP lassen sich in drei Kategorien einteilen: die cGMP-abhängigen Proteinkinasen I und II, cGMP-gesteuerte Ionenkanäle und cGMP-regulierte Phosphodiesterasen (PDE). Der Abbau von cGMP erfolgt ebenfalls über PDEs unterschiedlicher Familien (PDE 1-3, 5, 6, 9-11).

Im Gefäßsystem bindet NO nach Erreichen der glatten Muskelzellen an die hämabhängige  $\beta_1$ -Untereinheit des Enzyms unter der Voraussetzung, dass das Eisenmolekül der prosthetischen Hämgruppe im reduzierten Fe<sup>2+</sup> Zustand vorliegt. Über Interaktion mit den axialen Liganden Histidin-105 des Enzyms wird die Syntheserate von cGMP nach NO-Bildung um das 100-fache gesteigert [98]. Das freigesetzte cGMP löst eine Reduktion der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration über die Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase (PKG) aus, welche verschiedene zelluläre Zielproteine phosphoryliert.



**Abb. 6: NO-Signaltransduktion** [98] (cGK) cGMP-dependent protein kinase, (L-Arg) L-Arginin, (L-Cit) L-Citrullin, (PDE) Phosphodiesterase, (ox) oxidiert.

Darüber hinaus bewirkt cGMP eine Desensibilisierung des kontraktiven Apparates der glatten Muskelzellen für Ca<sup>2+</sup>. Die aktivierte PKG reduziert die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup> Konzentration durch Inhibition des Ca<sup>2+</sup> Influx über L-Type Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, Aktivierung des Calciumeffluxes über Stimulation der zellulären Ca<sup>2+</sup> ATPase und des Natrium/Calcium-Austauschers. Weiter wird die Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP) cGMP-abhängig durch die PKG aktiviert, was zur Dephosphorylierung der regulatorischen leichten Kette des Myosins der glatten Muskelzelle führt. Die resultierende Hemmung des kontraktiven Apparates hat eine Relaxation der vaskulären glatten Muskelzellen und damit einhergehend eine Vasodilatation zur Folge [99].

Auf diese Weise bedingt der initiale mechanische Reiz einer erhöhten Wandschubspannung, über die Bildung von NO durch die endotheliale Stickstoff-Monoxid-Synthase, die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase durch NO und die resultierende cGMP Freisetzung eine Dilatation des Gefäßlumens.

Der NO-sGC-cGMP- Signalweg spielt somit eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der physiologischen Hämostase. Darüber hinaus regulieren die intrazellulären Effektoren des cGMPs weitere physiologische Funktionen wie die Thrombozytenaggregation [100], die zelluläre Proliferationsrate und Differenzierung [101]. Im Rahmen pathologischer Konditionen kommt es zu funktionellen Störungen dieser Signalkaskade. Hierzu zählt unter anderem die endotheliale Dysfunktion, welcher eine große Bedeutung im Entstehungsprozess der Atherosklerose und damit der PAVK zukommt.

## Inhibition und Aktivoren/Stimulation der sGC

Bezogen auf die molekulare Struktur der löslichen Guanylatcyclase ist der Redoxzustand der prothetischen Hämgruppe von ausschlaggebender Bedeutung. Sie kann sowohl im reduzierten NO-sensitiven  $\text{Fe}^{2+}$  Zustand, als auch in oxidierter  $\text{Fe}^{3+}$  Konfiguration vorliegen. Die Oxidation der Hämgruppe führt zu einem Nichtansprechen der sGC auf NO, da keine Bindung des Gasliganden an das Enzym aufgebaut werden kann. So kann die sGC durch Oxidation über Inhibitoren wie ODC, NS2028 und Methylenblau in ihrer Funktion gehemmt werden. Endogene Veränderungen im Redoxstatus des Enzyms können darüber hinaus durch die Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies wie Superoxid ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) oder Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) ausgelöst werden. Diese werden vermehrt unter pathologischen Konditionen wie der endothelialen Dysfunktion [102] oder im vaskulären Alterungsprozess gebildet [103].

Dem gegenüber stehen Verbindungen, welche die Aktivität der sGC unabhängig von der Aktivierung durch NO steigern können. Dazu gehören die Häm-abhängigen Stimulatoren wie beispielsweise YC-1 und die Häm-unabhängigen Aktivoren wie BAY 58-2667 (Cinaciguat) [104].

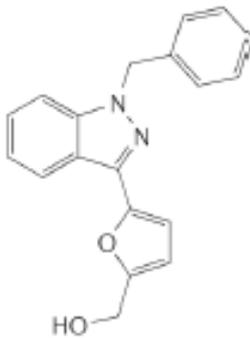


Abb. 7: Strukturformel YC-1 [101]

### sGC-Stimulator YC-1

- Aktivität vom Redoxstatus der Hämgruppe abhängig
- Oxidation der Hämgruppe hemmt die Stimulation
- Steigert die maximale katalytische Aktivität
- Wirkung synergistisch mit NO

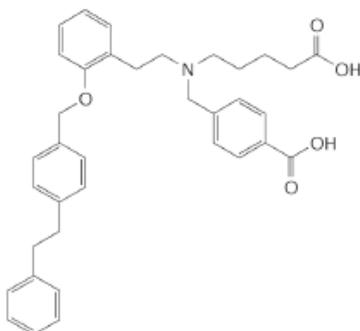


Abb. 8: Strukturformel BAY 58-2667 [101]

### sGC-Aktivator BAY 58-2667

- Aktivität unabhängig vom Vorhandensein einer Hämgruppe
- Aktiviert verstärkt die oxidierte/hämfreie sGC
- Steigert die maximale katalytische Aktivität (200fache Synthesesteigerung)
- $\text{EC}_{50} \sim 10\text{nM}$ ,  $\text{K}_d \sim 1\text{nM}$

Die Möglichkeit der NO-unabhängigen Beeinflussung der sGC durch die Verbindungsgruppen der sGC-Stimulatoren und Aktivoren, macht sie zu vielversprechenden pharmakologischen Substanzen. Der sGC-Stimulator Riociguat findet bereits klinische Anwendung in der Behandlung der chronisch thromboembolischen pulmonalen Hypertonie (CTEPH) [105].

## 1.6 Ziele der Arbeit

Vor dem Hintergrund der beschriebenen Daten bleibt unklar, in welchem Umfang die flussabhängige Steigerung des Kollateralwachstums durch Arteriogenese in ischämischen Extremitäten durch therapeutische Interventionen abseits des Gehstreckentrainings gesteigert werden kann. Weiterhin ist die Rolle der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase und assoziierter Reaktionsketten in diesem Prozess nicht vollständig bekannt.

Vor dem Hintergrund der steigenden Häufigkeit der PAVK im Alter ist zum jetzigen Zeitpunkt unbekannt, inwiefern sich experimentelle Erkenntnisse auf die klinische Situation der Patienten übertragen werden können. Es bedarf hierzu eines geeigneten Modells, welches in experimenteller Simulation den Gegebenheiten des fortgeschrittenen Alters gerecht wird und damit zu weiterem Erkenntnisgewinn beiträgt.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit folgenden Fragestellungen:

1. Inwiefern lässt sich nach experimenteller Induktion einer Extremitätenischämie das flussabhängige Kollateralenwachstum durch Arteriogenese unter der Verwendung einer *repetitive remote occlusion* an der kontralateralen Extremität steigern?
2. Welche Rolle trägt in diesem Prozess die eNOS-sGC-cGMP Signalkaskade?
3. Welchen Einfluss hat das Alter auf das flussabhängige Kollateralenwachstum durch Arteriogenese nach Induktion einer Extremitätenischämie?
4. Gibt es pharmakologische Optionen zur Verbesserung des Kollateralwachstums über die eNOS-sGC-cGMP Signalkaskade?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialliste

#### 2.1.1 Medikamente

Handelsname	Firma
Isofluran-Piramal®	Piramal healthcare
Ketanest® S	Pfizer
Rompun® (Xylazin), 2%	Bayer
Temgesic®	Indivior UK
Isoton. NaCl Lösung 0,9%	Boehringer Ingelheim
Heparin-Natrium 25.000 I.E.	Braun
Adrekar®	Sanofi

#### 2.1.2 Chemikalien

Handelsname	Firma
4-[(4-Carboxybutyl)amino)methyl]benzoic acid hydrochloride (Cinaciguat Hydrochlorid)	Sigma Alderich
N5-[imino(nitroamino)methyl]-L-ornithine, methyl ester, monohydrochloride (LNAME)	Sigma Alderich
1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ)	Sigma Alderich
Kolliphor ® EL	Sigma Alderich
Ethanol absolute	VWR
Methyl 2-hydroxybenzoate	Sigma Alderich
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline without CaCl <sub>2</sub> /MgCl <sub>2</sub>	Sigma Alderich
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma Alderich
Aqua dest.	Millipor
Bacillol ®	Bode
Sterilium ®	Bode
Veet Haarentfernungs-Creme	Reckitt Benckiser
Elektroden-Creme	Gello
Stickstoff flüssig	Linde
Microfil MV-122 Yellow	Flow Tech
Microfil MV Diluent	Flow Tech
Microfil Curing Agent	Flow Tech

## Material und Methoden

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
25G x 5/8, 0,05mm – 16mm Eclipse	BD
Einwegskalpell No.11	Feather R
Wattestäbchen	Nobamed
Zelletten ® Zellstofftupfer	Lohmann & Rauscher
Injekt ® 2, 5, 10, 20 ml	B.Braun
Microtube PTFE	Fisher Scientific
Vasofix® Safety 20G	Braun

### 2.1.4 Instrumente

Instrument	Firma
Hautschere	FST
Feinschere	FST
Mikroschere	FST
Splitterpinzette	FST
Dumont Pinzette 45	FST
Feinpinzette	FST
Nadelhalter	FST
Mikronadelhalter	FST
Wundhaken schmal	FST
Gefäßklemme	FST

### 2.1.5 Nahtmaterial

4/0 Perma-Hand™ Seide	Ethicon
5/0 Prolene™	Ethicon

### 2.1.6 Geräte

Anwendungsgebiet	Gerätebezeichnung	Firma
Farbkodierte Dopplersonographie Echokardiographie	Vevo2100-Sonographiegerät	VisualSonics, FUJIFILM
	MS-400 Linear-Schallkopf	
Elektrokardiographie	ECG Amplifier Type 689	Hugo Sachs
Druck-Volumen-Messung	Mikro-Tip® Katheter Modell SPR-1000	Millar Instruments
	Transducer	
	Micro Ventilator MBVC-03	UNO
Operation Hinterlaufischämie	Beheizbarer Operationstisch für Kleintiere	Harvard Apparatus
	Lichtmikroskop MZ9.5	Leica Microsystems
	KL 1500 LCD Lichtquelle	Leica
	UNO Vaporizer Sigma Delta	UNO BV
	Kleintier-Rasiergerät Type 1556	Moser
Rotlichtquelle	Beurer	

## Material und Methoden

Gefäßausguss	Thermomixer 5436	Eppendorf
	Wasserbad E100	Lauda
	Rollerpumpe	Isma Tec
	Pipetten Reference	Eppendorf
Aufnahmen	Leica DFC450 C	Leica
Laserdoppler	PeriCam PSI System	Perimed
	ThinkPad E15 Gen 2	Lenovo
RRO – Intervention	Vascular Occluder 8mm	Harvard Apparatus
	Druckkalibriergerät KAL 84	Halstrup Walcher
Sonstiges	Zentrifuge 5810 R	Eppendorf
	Mikrowaage	Sartorius
	Feinwaage	Sartorius
	Narkosebox für Labortiere	Eickemeyer

### 2.1.7 Software

<b>Programm</b>	<b>Firma</b>
VevoLab 2.2.0	VisualSonics
ImageJ	Wayne Rasband
LASX	Leica
Diskus View	Hilgers - Technisches Büro
Adobe Photoshop	Adobe Inc.
LDPIwin3	Perimed
Iox2	EMKA

## 2.2 Übersicht

Zur Überprüfung der angelegten Hypothesen wurden drei Versuchsreihen mit insgesamt 18 experimentellen Gruppen durchgeführt. Der standartmäßige Ablauf von Messungen und Interventionen innerhalb der Gruppen ist Abb. 9 zu entnehmen.

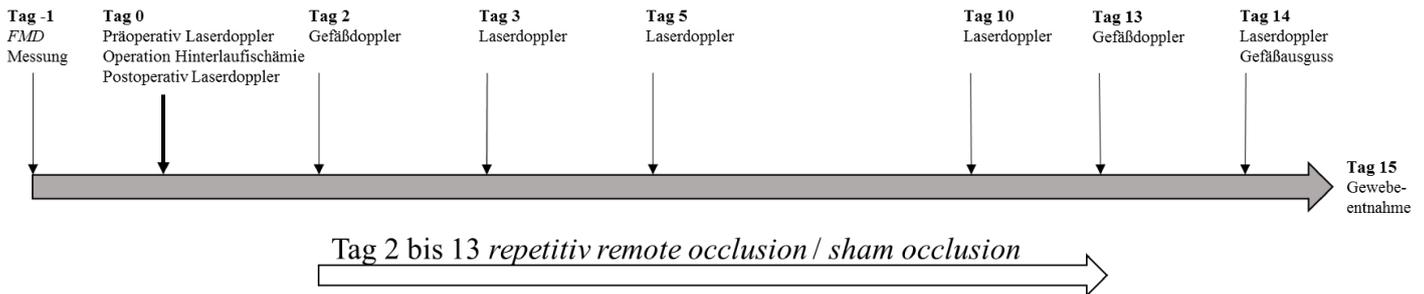


Abb. 9: Übersicht der Versuchsabfolge.

1. Versuchsreihe: *Akute hämodynamische Veränderungen während repetitive remote occlusion am gesunden kontralateralen Hinterlauf im Modell der Hinterlaufischämie bei Mäusen*
  - a. C57BL/6J (10-14 Wochen) Intervention + Kontrolle
  
2. Versuchsreihe: *Chronischer Effekt der repetitive remote occlusion auf das Kollateralwachstum im Modell der Hinterlaufischämie bei Mäusen*
  - a. C57BL/6J (10-14 Wochen) Intervention + Kontrolle
  - b. C57BL/6J (10-14 Wochen) Intervention + Kontrolle + LNAME
  - c. NOS3<sup>-/-</sup> (10-14 Wochen) Intervention + Kontrolle
  - d. C57BL/6J (10-14 Wochen) Intervention + Kontrolle + ODQ
  - e. C57BL/6J (10-14 Wochen) Intervention + Kontrolle + BAY 58-2667
  
3. Versuchsreihe: *Chronischer Effekt der repetitive remote occlusion auf das Kollateralwachstum im Modell der Hinterlaufischämie bei alten Mäusen*
  - a. C57BL/6J (12-24 Monate) Intervention + Kontrolle
  - b. C57BL/6J (12-24 Monate) Intervention + Kontrolle + BAY 58-2667
  - c. C57BL/6J (12-24 Monate) Intervention + Kontrolle + LNAME

## 2.3 Versuchstiere

Das zur Überprüfung der Fragestellung angewandte Tierversuchsmodell und alle hierfür durchgeführten Versuche wurden von der zuständigen Landesbehörde Landesamt für Natur, Umwelt- und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen unter dem Titel „Die Rolle von eNOS im Rahmen des reduzierten Fluss-abhängigen Kollateralwachstums im Alter“ mit dem Aktenzeichen „84-02.04.2015.A241“ am 15.08.2016 genehmigt.

Bei den Versuchstieren handelte es sich um männliche Mäuse mit C57BL/6J-Hintergrund im Alter von 10 bis 14 Wochen mit einem Körpergewicht zwischen 24 und 30g und im Alter von mindestens 24 Monaten (Methusalem Mäuse) mit einem Körpergewicht zwischen 30 und 50g. Die Tiere wurden entsprechend der gesetzlichen Vorschriften in einer Gruppengröße von 5 Tieren in Käfigen bei einer Raumtemperatur von  $22 \pm 2$  °C und  $50 \pm 10$  % relative Luftfeuchtigkeit gehalten. Futter in Form von Pellets (Standardfuttermittel für Mäuse der Firma Ssniff) und Wasser standen ad libitum zur Verfügung.

Die Unterbringung und Pflege der Tiere erfolgte durch Fachpersonal in den Räumlichkeiten der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, sowie bis zu 48 Stunden in den Laboren der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie Düsseldorf.

Darüber hinaus wurden NO-Knockout (NOS3<sup>-/-</sup>) Mäuse mit C57BL/6 Hintergrund verwendet.

## 2.4 Induktion der Hinterlaufischämie

Die chirurgische Induktion der Hinterlaufischämie bei Mäusen ist ein international anerkanntes und vielfach angewandtes Verfahren zur experimentellen Erforschung arterieller Pathophysiologien und Erkrankungen. Die Expertise für die Untersuchung des Kollateralenwachstums durch Arteriogenese ist in diesem Modell am höchsten.

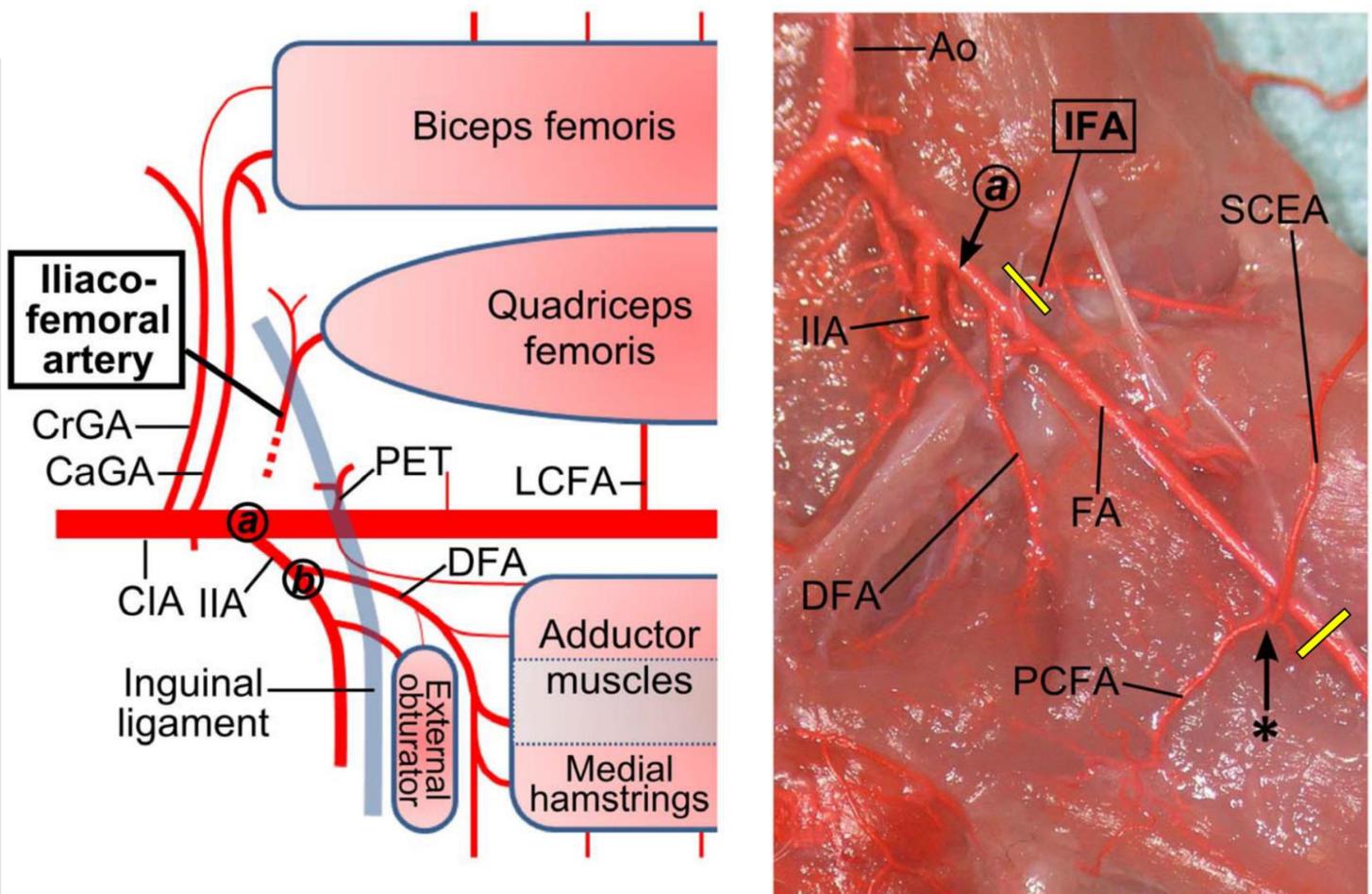
Der Hinterlauf der Maus wird arteriell über die Arteria femoralis communis perfundiert, welche nach Passage des Inguinalbandes Ursprung für einen tiefen Zweig, die Arteria femoralis profunda, gibt. Dieser verzweigt sich unter anderem weiter in Gefäßbäume, welche den Musculus semimembranosus und semitendinosus des proximalen Hinterlaufs versorgen und weiter distal im Bereich des Knies erneut Anschluss an die Arteria femoralis finden. Das Modell der Hinterlaufischämie bedient sich dieser anatomischen Gegebenheit, um arterielle Umbauprozesse zu untersuchen. Permanente Ligatur der Arteria femoralis distal des Ursprungs der tiefen Abgänge, führt zu einem signifikanten Anstieg des Blutflusses in diesen Gefäßen und damit verbundenen vaskulären Umbauprozessen.

Die chirurgische Induktion der Hinterlaufischämie erfolgt unter Berücksichtigung aseptischer Arbeitstechniken. Die Versuchstiere werden durch intraperitoneale Applikation einer Kombinationsanästhesie aus Ketamin/Rompun (100mg/kg / 10mg/kg) narkotisiert. Bei ausreichender Narkosetiefe werden die Versuchstiere auf einer 37 °C warmen elektrischen Heizplatte mittels Klebeband fixiert. Anschließend wird der Operationsbereich, sowie die kontralaterale Seite rasiert und mittels Enthaarungscreme vollständig von Haaren entfernt. Überschüssige Creme wird entfernt und das Operationsgebiet mit Betaisodonalösung desinfiziert. Folgend wird eine circa 5mm lange Inzision von inguinal entlang des durch die Haut sichtbaren femoralen Gefäßbündels nach distal angebracht. Die Haut wird gelöst und zur

Seite geklappt. Nach erfolgter Identifikation der anatomischen Landmarke des neurovaskulären Bündels aus femoralem Nerv, femoraler Vene und Arterie, werden femorale Vene und Arterie freipräpariert und voneinander gelöst. Unter vorsichtiger Präparation wird die Arterie zirkulär sondiert, ohne die Vene zu verletzen. Folgend werden zwei 0,5 mm dicke Nähseiden proximal der Femoralisgabelung zur späteren Ligatur vorgelegt. Anschließend wird die Femoralarterie in Richtung inguinal verfolgt. Im Dreieck zwischen Nervus femoralis, Ligamentum inguinale und Arteria femoralis, befindet sich der Abgang der Arteria circumflexa femoralis lateralis.

Nach erfolgreicher Identifikation wird diese ebenfalls unter Schonung der umliegenden Strukturen freipräpariert und Nähseide vorgelegt. Zum Abschluss der Gefäßligaturen werden die vorgelegten Nähseiden in loco verknotet und so der arterielle Blutfluss unterbunden. Anschließend werden die Gefäße jeweils zwischen der proximalen und der distalen Ligatur mittels Inzision durchtrennt.

Abschließend wird der Operationssitus auf verbliebene Fremdmaterialien und etwaige Blutungsquellen untersucht. Die Operationswunde wird durch Einzelknopfnähten mit 5/0 Prolene verschlossen und steril verbunden. Das Versuchstier bis zum Wiedererlangen des Bewusstseins unter Beobachtung geschützt warmgehalten. Die postoperative Beobachtung der Tiere erfolgt über 3 Tage; alle 12 Stunden wird Buprenorphin (0.05 – 0.1mg/kg, s.c.) zur Schmerzstillung gegeben.



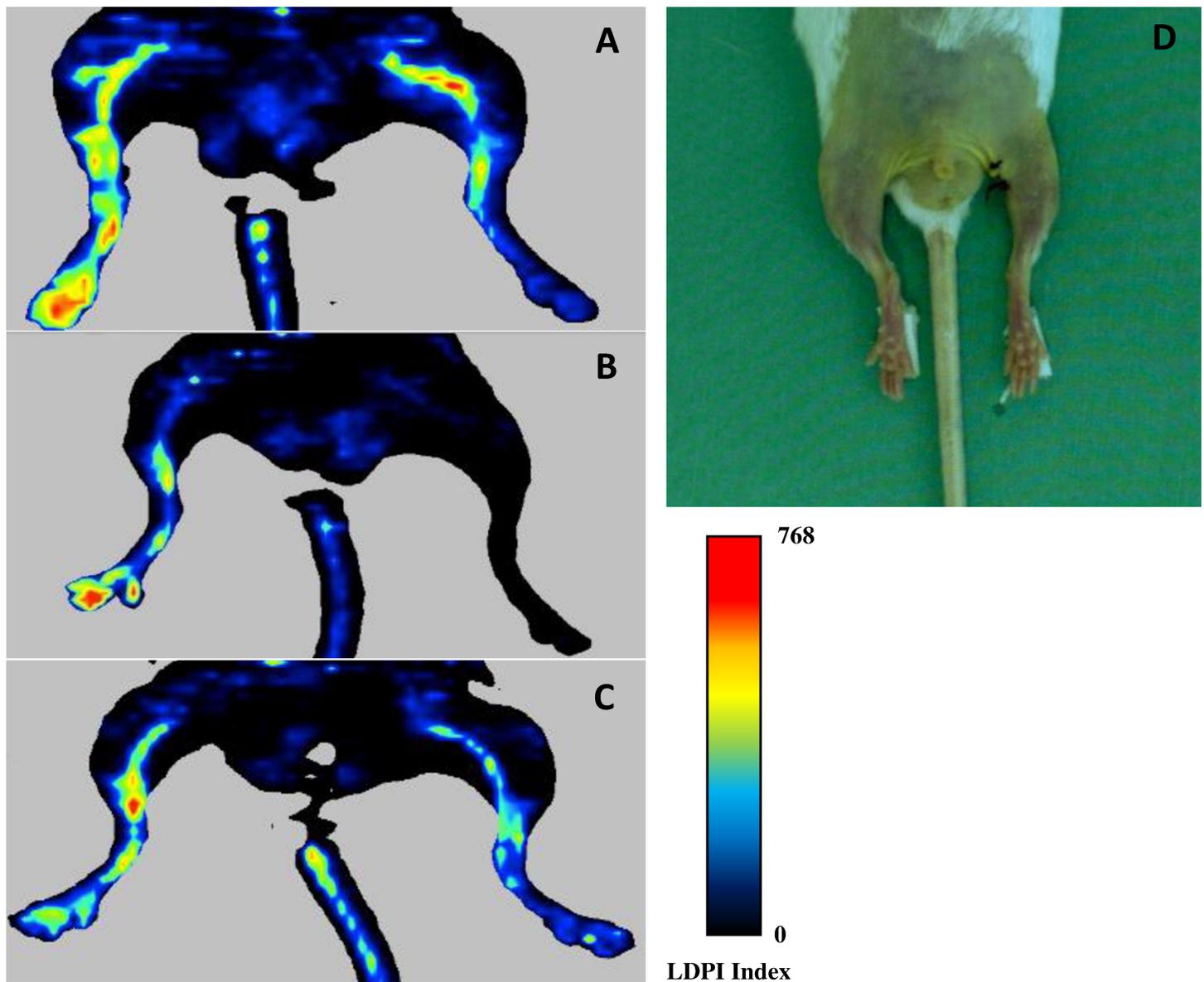
**Abb. 10: Situs schematisch (links) und intraoperativ (rechts)** [106]. Die Ligaturen erfolgen an den markierten Stellen (gelbe Balken). (Ao) Aorta, (CaGA) caudal gluteal artery, (CrGA) cranial gluteal artery, (CIA) common iliac artery, (DFA) deep femoral artery, (FA) femoral artery, (IFA) iliocofemoral artery, (IIA) internal iliac artery, (LCFA) lateral circumflex femoral artery, (PCFA) proximal circumflex artery, (PET) pudendoepigastric trunk, (SCEA) superficial caudal epigastric artery.

## 2.5 Laser-Doppler-Perfusions-Imaging (LDI)

Die Laserdoppler-Perfusionsdarstellung stellt eine zuverlässige Methode zur Darstellung der lokalen mikrozirkulatorischen Durchblutung dar. Technische Grundlage bildet die fortlaufende Emission von Laserstrahler durch die verbaute faseroptische Sonde. Innerhalb des manuell ausgewählten Messbereichs (ROI, *region of interest*) tastet der Laserstrahl in Einzelmessungen die Durchblutung des Gewebes ab. Der Laserstrahl wird teilweise vom Gewebe absorbiert und kehrt teilweise an die Gewebeoberfläche zurück, wo das zerstreute Licht vom Fotodetektor registriert wird. Gemäß des Laser-Doppler-Prinzips ändert sich bei Licht, welches auf bewegte Kompartimente wie Blutzellen trifft, die Wellenlänge. Die lokale Durchblutung wird über Ausmaß und Frequenz dieser Wellenlängenänderung berechnet.

Diese nichtinvasive Methodik findet Verwendung in der Messung und Beurteilung der Hinterlaufperfusion des Mausmodells. Präoperativ wird eine Ausgangsaufnahme der beiden Hinterläufe angefertigt. Unmittelbar postoperativ wird die Qualität der Perfusionsminderung durch die Ligatur im Vergleich zum nicht-operierten Hinterlauf kontrolliert. Anschließend wird die graduelle Erholung der lokalen Durchblutung des operierten Hinterlaufs über Messungen an den Tagen 3, 5, 10, 14 postoperativ verfolgt. Um störungsfreie Messungen zu gewährleisten, wurden die Fußsohlen und distalen Bereiche der Hinterläufe als Messregion ausgewählt. Hierbei wurde unter fotooptischer Kontrolle der Messabstand gleichbleibend eingestellt, die Emissionsintensität auf 7 Volt justiert und die Beleuchtungssituation des Messortes konstant gehalten.

Zur Messung werden die Versuchstiere in einer Inhalations-Narkosekammer mit sauerstoffangereicherter Luft (O<sub>2</sub> 40%) und 2,5% Vol. Isofluran als Inhalationsanästhesie stressfrei in Narkose gelegt. Nach Einstellung einer ausreichenden Narkosetiefe, wird die Untersuchung mit einer Erhaltungsdosis von 1,5% Vol. Isofluran fortgeführt. Die Maus wird in Rückenlage auf dem vorgeheizten Untersuchungstisch platziert und die Hinterläufe in reproduzierbarer Stellung fixiert. Weiter erfolgt eine Fixierung an Schwanz und Vorderläufen. Pro Messung werden insgesamt drei Scans beider Hinterläufe vorgenommen und mittels der geräteigenen Software ausgewertet. Die Perfusion des ischämischen und des nicht-ischämischen Hinterlaufs werden auf Basis von farbkodierten Histogrammpixeln dargestellt. Perfusionsänderungen werden aus der Differenz der Hinterläufe zueinander und in Bezug auf die Ausgangswerte errechnet.



**Abb. 11: Perfusionsmessung mittels LDI.**

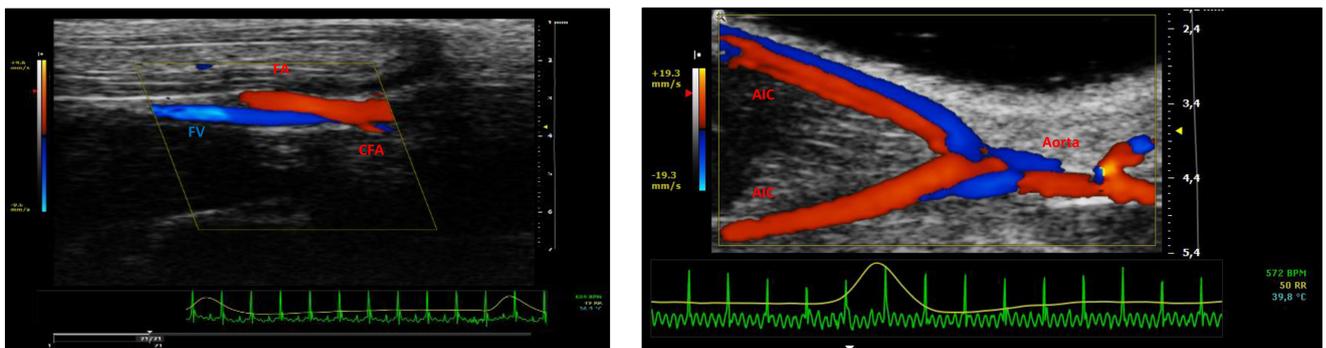
Darstellung der *in vivo* Perfusion an ischämischen (rechts) und kontralateralen (links) Hinterlauf zu den Zeitpunkten: Präoperativ (A), unmittelbar postoperativ (B) und 14 Tage nach operativer Induktion der Hinterlaufischämie. Eindrücklich zu sehen ist der direkte Effekt des operativen Verfahrens, die Perfusionswerte in Farbe zeigen sich nahezu komplett reduziert. Am Tag 14 nach Operation zeigt sich eine deutliche Erholung der Perfusion am Hinterlauf. Die Messung der Perfusionswerte erfolgt über eine manuelle Auswahl des distalen Hinterlaufs als *region of interest*. Zur Messung wird das Versuchstier narkotisiert, mit ausreichender Latenz vor Messung enthaart und anschließend auf dem beheizten Untersuchungstisch mit vorgeschriebenem Messhintergrund fixiert (D).

## 2.6 Vaskuläre Fluss- und Durchmesserbestimmung mittels farbkodierter Dopplersonographie

Zur nichtinvasiven *in vivo* Darstellung der Hinterlaufgefäße hinsichtlich Blutfluss und Gefäßdurchmesser wurde die farbkodierte Dopplersonographie verwendet. Diese erlaubt eine Echtzeitdarstellung der vaskulären Umbauprozesse in Ergänzung zu den erhobenen Laserdoppler-Messungen. Zur Anwendung kam ein Hochfrequenzultraschallgerät der Firma VisualSonic mit der Betriebssoftware Vevo 2100, speziell ausgelegt auf die Untersuchung von Mäusen. Als Schallkopf diente ein 30-70 MHz Linearschallkopf, welcher über eine Arretiervorrichtung manuell zu den darzustellenden Gefäßen ausgerichtet werden konnte. Die Messungen erfolgten am zweiten und am dreizehnten postoperativen Tag.

Zu Beginn der Untersuchung wird die Maus in einer Inhalations-Narkosekammer mit sauerstoffangereicherter Luft und Isofluran 2,5-3,5% narkotisiert. Nachdem eine ausreichende Narkosetiefe erreicht ist, wird Isofluran auf 1,5% Beimischung zur Erhaltung reduziert. Die narkotisierte Maus wird auf einem beheizbaren Untersuchungstisch fixiert, durch welchen die Körperkerntemperatur konstant bei  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  gehalten wird. Die Temperaturkontrolle erfolgt über eine rektale Sonde. Zur Überwachung von Herz- und Atemfrequenz wird die Maus über EKG-Elektroden an das Überwachungssystem angeschlossen. Anschließend wird das Fell im Bereich der Hinterläufe entfernt und vorgewärmtes Ultraschallgel appliziert.

Blutfluss und Gefäßdurchmesser wurden nacheinander von proximal nach distal in folgenden Gefäßen erhoben: Arteria iliaca communis (CIA), Arteria femoralis communis (AFC), caudale Arteria femoralis (CFA). Im Anschluss wird eine FMD Messung durchgeführt. Nach erfolgreicher Untersuchung wird die Maus bis zum Wiedererlangen des Bewusstseins in beheizter Umgebung separiert beobachtet.



**Abb. 12: Flussmessung mittels FKDS.** Links Darstellung des Abgangs der kaudalen Femoralarterie aus der A. femoralis communis mit begleitender Vena femoralis, rechts Bifurkation der Aorta abdominalis in linke und rechte Arteria iliaca communis.

## Material und Methoden

Die Auswertung der aufgezeichneten Bildzyklen erfolgte offline. Die Messungen der Gefäßdurchmesser erfolgt EKG-kontrolliert enddiastolisch, um den Einfluss potentieller Unterschiede in der Gefäßcompliance zu minimieren. Anschließend wurde der Gefäßquerschnitt  $A$  berechnet als:  $A = \pi (d/2)^2$ . Die Erhebung der Flussgeschwindigkeit erfolgt über den winkelkorrigierten Pulswellendoppler, mit angepasster Messfenstergröße auf  $2/3$  des Gefäßdurchmessers. Die Scherspannung wurde berechnet als:  $8 \cdot \mu \cdot$  durchschnittliche Flussgeschwindigkeit ( $V$ ) / durchschnittlicher Durchmesser aus jeweils drei Messungen. Zugrunde liegt hierbei die Annahme, dass die Blutviskosität konstant bei  $0.035 \text{ dyn / sec} \cdot \text{cm}^2$  liegt. Der Blutfluss  $Q$  wurde berechnet als  $Q = A \cdot FV$ , wobei die durchschnittliche Blutflussgeschwindigkeit  $FV$  automatisch über drei Herzzyklen bestimmt wird.



**Abb. 13: Lagerung zur FKDS Messung.** Der beheizbare Untersuchungstisch bietet eine EKG-Ableitung über die silbernen Elektrodenfelder und einen Anschluss zur volatilen Narkose.

## 2.7 Die flussvermittelte Vasodilatation (FMD)

Zur experimentellen Darstellung der endothelialen Funktion und der vaskulären Struktur, wurde die flussabhängige Vasodilatation (*flow mediated vasodilation*/FMD) erhoben. Die Relevanz des an Humanmessungen angelehnten Protokolls zur Messung an Mäusen, wurde bereits hinreichend belegt [107]. Durch die mittels Druckmanschette erfolgte Okklusion des Gefäßes im proximalen Abschnitt wird distal eine Hyperämie induziert. Nach Entlastung der Druckmanschette führt der hyperämisch bedingte Druckgradient zu einer Beschleunigung des Blutfluss, welche eine Steigerung der Wandscherspannung zur Folge hat. Die Zunahme der Wandscherspannung ist der Trigger zur NO-vermittelten Vasodilatation.

Die Messungen erfolgen präoperativ und im Anschluss an die farbkodierte Duplexsonographie am 13ten postoperativen Tag. Die Vorbereitungen erfolgen wie zu den sonographischen Messungen. Nach Narkotisierung und Vorbereitung der Maus, wird mit dem Linearschallkopf die Femoralarterie identifiziert und über ihren pulsatilen Fluss von der begleitenden Vene abgegrenzt. Anschließend wird ein Gefäßokkluder distal der Messposition im Bereich des Unterlaufs angebracht. Die Evaluation dieser Messposition erfolgte bereits in früheren Arbeiten.

Als Grundlage für die ausgehenden Vergleichsmessungen werden Gefäßdurchmesser und Blutflussgeschwindigkeit vor Gefäßokklusion bestimmt. Folgend wird der Gefäßokkluder für fünf Minuten kontrolliert inflatiert bis auf 200 mmHg. Eine ausreichende Okklusion wird über Veränderungen des arteriellen Blutflusses im Duplex Modus bestätigt. Im Anschluss wird der Okklusionsdruck abgelassen und über einen Zeitraum von drei Minuten kontinuierlich in dreißigsekündigen Intervallen der femoralarterielle Durchmesser und die Flussgeschwindigkeit erhoben. Die Auswertung der Messdaten erfolgt manuell über die Bildsoftware des Sonogerätes.

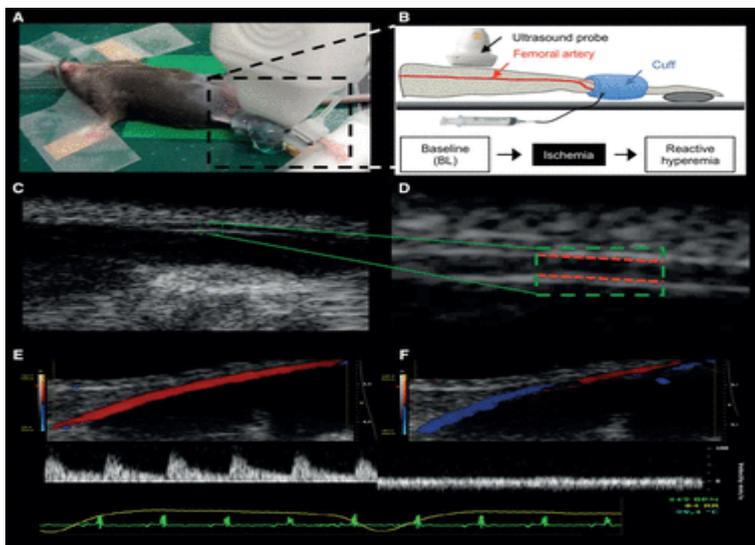


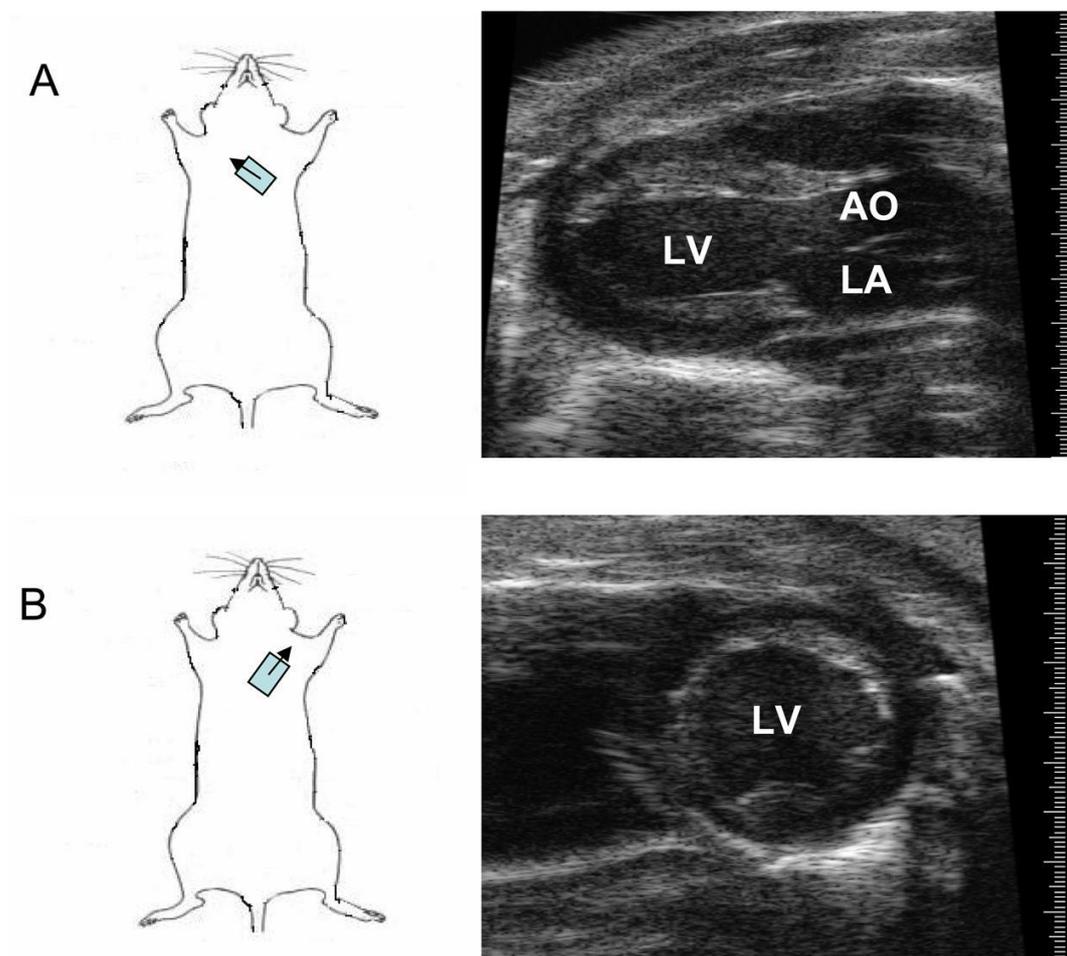
Abb. 14: FMD Messung [107]

## 2.8 Echokardiographie

Zur Darstellung zentraler hämodynamischer Parameter wurden echokardiographische Aufnahmen der Versuchstiere erhoben.

Zu Beginn erfolgte eine volatile Anästhesie der Mäuse mittels 1,5 Vol.-% Isofluran und 40 % Sauerstoffzumischung in Raumluft über eine Narkosekammer. Nach dem Eintreten einer ausreichenden Narkosetiefe erfolgte die Umlagerung und Fixierung auf dem vorbeheizten Untersuchungstisch. Anschließend wurde der ventrale Thoraxbereich mittels Rasur vom Fell befreit.

Die Aufnahmenakquise erfolgte gemäß eines *in domo* etablierten Schemas. Es wurden Standardschnitte des Herzens in parasternal langer und kurzer Achse in B- und M-Mode, sowie Flussprofile oberhalb der Mitralklappen und oberhalb der Aortenklappen aufgenommen [108].



**Abb. 15: Standardübersicht murine Echokardiographie.** A: Position und Ausrichtung des Schallkopfes (oben links) zur Übersicht der LV langen Achse (oben rechts). B: Position und Ausrichtung des Schallkopfes (unten links) zur Übersicht der LV kurzen Achse (unten rechts). LA = left atrium, AO = Aorta [109]

## Material und Methoden

Die Auswertung erfolgte basierend auf dem 2.2.0 VevoLab-Programm. Die endo- und epikardialen Begrenzungen wurden hierbei manuell eingezeichnet.

Die Berechnung und Messung des Schlagvolumen (SV) in  $\mu\text{l}$ , des Herzzeitvolumen (HZV) in  $\text{ml}/\text{min}$ , sowie die durchschnittliche Verkürzung (*fractional shortening/FS*) und die Ejektionsfraktion (EF) in Prozent, sowie das endsystolische und enddiastolische Volumen (ESV und EDV) des linken Ventrikels erfolgte anschließend automatisch. Die zugrundeliegenden Formeln der Berechnungen sind folgend aufgeführt:

**Formel 1:** Berechnung des Schlagvolumens:

$$SV (\mu\text{l}) = EDV (\mu\text{l}) - ESV (\mu\text{l})$$

**Formel 2:** Berechnung des Herzzeitvolumens:

$$HZV \left( \frac{\text{ml}}{\text{min}} \right) = \text{Herzfrequenz} \left( \frac{1}{\text{min}} \right) * SV (\mu\text{l}) * 0.001$$

**Formel 3:** Berechnung der fraktionellen Verkürzung:

$$FS (\%) = \frac{EDV (\mu\text{l}) - ESV (\mu\text{l})}{EDV (\mu\text{l})} * 100$$

**Formel 4:** Berechnung der Ejektionsfraktion:

$$EF (\%) = \frac{SV (\mu\text{l})}{EDV (\mu\text{l})} * 100$$

Die Analyse der myokardialen Verformung erfolgte softwarebasiert in parasternaler Längsachse nach *speckle tracking* Methodik. Hierbei werden myokardiale Muster anhand des zeitlichen Verlaufs erfasst. Die Auswertung der hierbei entstehenden Verformungskurven (Strainkurven) kann longitudinal, zirkumferentiell und radial erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurde sich auf den longitudinalen *strain* beschränkt.

Weiter wurde der globale longitudinale Strain des Herzens zur Bestimmung der systolischen Funktion ausgewertet. Hierbei entspricht konventionsgemäß der pessimale Wert der Strainkurve der maximalen Segmentverkürzung. Weiter stellt der Mittelwert aller Herzsegmente hierbei den globalen longitudinalen Strain dar. Die Bestimmung der diastolischen Funktion erfolgte über die ersten Ableitungen der Strainkurven (*strain rate*). Der erste Anstieg der *strain rate* stellt hierbei die frühen diastolischen passiven Rückstellkräfte dar (E-Welle) und wird allgemein als Maß für die diastolische Verformung angenommen [110].

## 2.9 Zentrale Druck-Volumen-Messung

Zum Monitoring der zentralen hämodynamischen Parameter in Aorta und Herzen während der *repetitiv remote occlusion* wurde ein *in domo* etabliertes Verfahren verwendet. Hierbei erfolgte mittels Mikro-Tip® Katheter und entsprechendem Druck- und Volumen Transducer die Messung der hämodynamischen Parameter über die rechte A. carotis communis.



**Abb. 16: Übersicht Druck-Volumen-Messung**

Zunächst erfolgte eine gewichtsadaptierte, subkutane Analgesie des Versuchstieres mit Buprenorphin (0,05 mg/kg). Anschließend erfolgte eine volatile Anästhesie mittels 3 Vol.-% Isofluran und folgend die Intubation mit einem Venenverweilkatheter. Zur Beatmung diente ein muriner Respirator, als Beatmungsparameter wurde eine Atemfrequenz von 140/min und ein Tidalvolumen von 250  $\mu$ l festgelegt. Nach Fixierung auf dem beheizten Operationstisch, erfolgte eine rechtsseitige Hautinzision. Nach Darstellung und Präparation des Zielgefäßes werden Gefäßklemmen an kranialer und kaudaler Position platziert. Anschließend erfolgt die Inzision der Gefäßwand im ausgeschalteten Gefäßabschnitt und der Druck-Volumenkatheter wird eingeführt.

## Material und Methoden

Nach Öffnung der unteren Gefäßklemme wird der Katheter bis zur Erfassung der entsprechenden Blutdrucksignale der Aorta vorgeschoben. Aufgezeichnet wird der systolische ( $P_{sys}$ ), der diastolische ( $P_{dias}$ ) und der mittlere arterielle Druck (MAP).

Die Berechnungen des mittleren arteriellen Drucks (MAP) und des totalen peripheren Widerstands (TPR) wurden nach den unten genannten Formeln durchgeführt (*Formel 5 und Formel 6*).

Nach Abschluss der Aufzeichnung erfolgt die Positionierung des Katheters über die Aortenklappe im linken Ventrikel. Hier erfolgte die Aufzeichnung der Ventrikel-Druckkurven unter Erfassung des endsystolischen (ESP) und enddiastolischen Druckes (EDP).

**Formel 5:** Berechnung des mittleren arteriellen Drucks (MAP)

$$MAP (mmHg) = P_{diastolisch}(mmHg) + \frac{1}{3} [P_{systolisch}(mmHg) - P_{diastolisch}(mmHg)]$$

**Formel 6:** Berechnung des totalen peripheren Widerstands

$$TRP \left( \frac{mmHg}{ml/min} \right) = \frac{MAP (mmHg)}{HVZ \left( \frac{ml}{min} \right)}$$

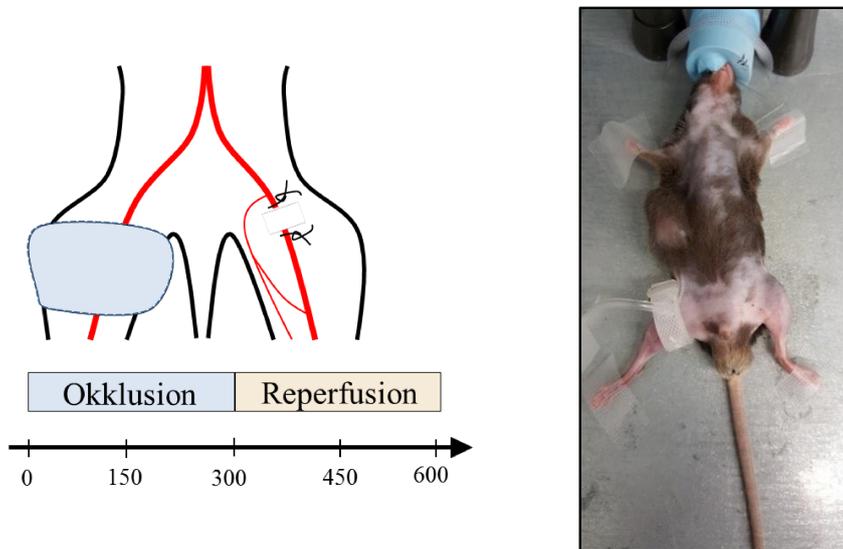
## 2.10 Repetitive Stimulation durch Flussbeschleunigung (*repetitiv remote occlusion/RRO*)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Verfahren entwickelt, um das Wachstum von Kollateralkreisläufen bei Versuchstieren mit Hinterlaufischämie zu stimulieren. Die Tiere erhielten die Intervention täglich ab dem zweiten postoperativen Tag. Hierbei wurden die Versuchstiere mittels Inhalationsanästhesie narkotisiert und anschließend auf einer vorgewärmten Heizplatte fixiert.

Es erfolgt die Anlage einer Druckmanschette am rechten nicht-operierten Hinterlauf. Diese wird anschließend kontrolliert auf 200 mmHg inflatiert, um die Durchblutung des Hinterlaufes zu negieren. Die Ischämie erfolgt über eine Periode von fünf Minuten, gefolgt von einer fünfminütigen Erholungsphase bei erschlaffter Manschette.

Insgesamt erfolgt dieser Zyklus acht Mal hintereinander pro Interventionstag. Während der Anwendung wird die Inhalationsnarkose mit 1,5% Vol. Isofluran aufrechterhalten. Im Anschluss an die Intervention werden die Versuchstiere kontrolliert in beheiztem Umfeld bis zum Wiedererlangen des Bewusstseins beobachtet.

Operierte Kontrolltiere wurden in identischen Zeiträumen narkotisiert ohne Intervention. [111]



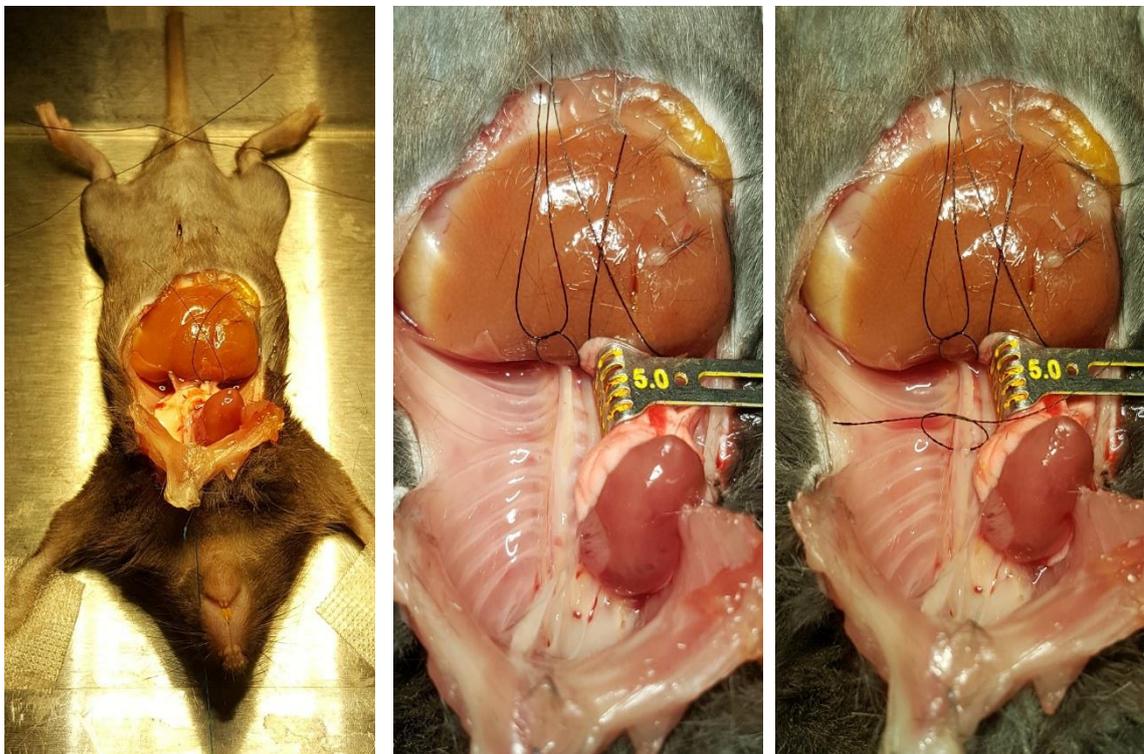
**Abb. 17: RRO-Intervention.** Links schematisch [111], rechts in Anwendung.

## 2.11 Gefäßdarstellung mittels Gefäßausguss

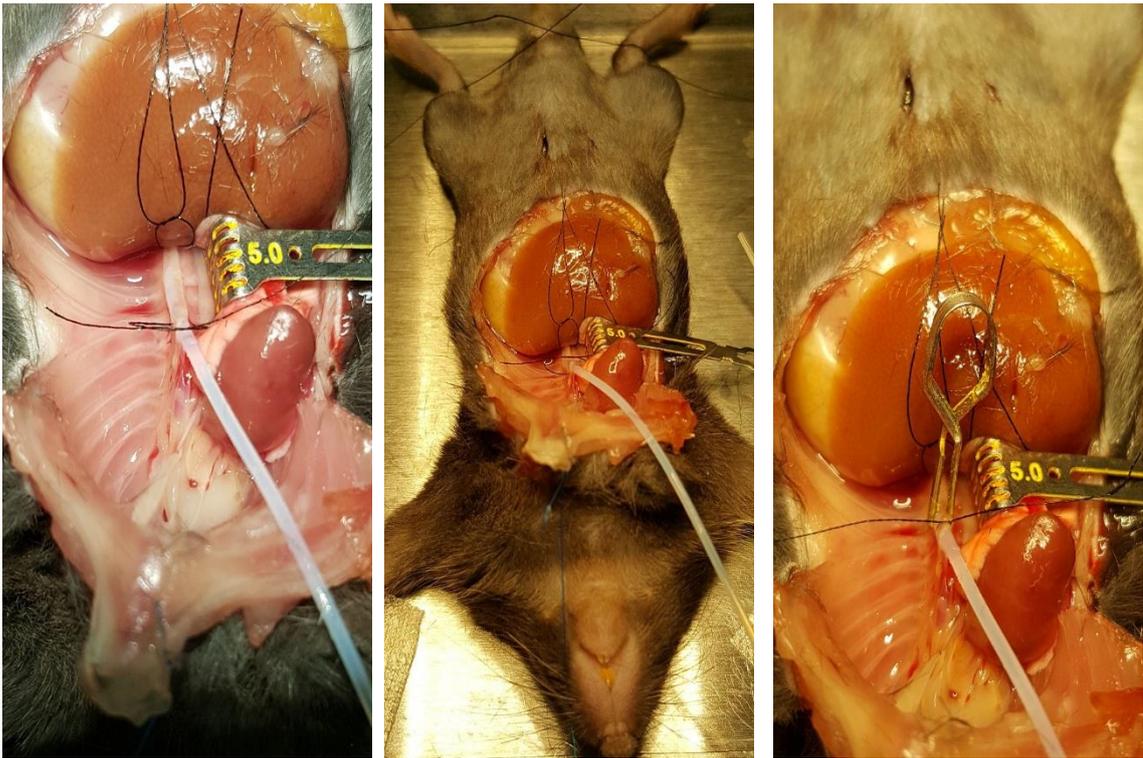
Am 14. postoperativen Tag erfolgt die permanente Gefäßdarstellung mittels Gefäßausguss. Hierzu werden die Versuchstiere mittels intraperitonealer Injektion von 100 mg/kg Ketamine und 10 mg/kg Xylazine in tiefe Narkose versetzt. Außerdem werden sie zur Antikoagulation heparinisiert, um eine effektive Entfernung des Blutvolumens zu gewährleisten.

Nach dem Eintreten einer ausreichenden Narkosetiefe erfolgt die Platzierung auf dem Operationstisch. Durch transthorakale intrakardiale Punktion erfolgt eine Aspiration des Blutvolumens von 1 ml. Dieses wird für weitere Untersuchungen in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend bei -80 Grad asserviert. Anschließend wird der Thorax eröffnet. Zur Entfernung des übrigen Blutvolumens wird die rechte Herzkammer mittels Inzision eröffnet und die linke Herzkammer kanüliert. Es erfolgt die kontinuierliche Perfusion mittels auf Körpertemperatur vorgewärmter Lösung aus PPSB und Adenosin über eine Rollerpumpe. Die Elimination restlicher Blutbestandteile durch die Perfusion ist essentiell für die anschließende Gefäßdarstellung. Eine erfolgreiche Perfusion ist gekennzeichnet durch die sich einstellende Blässe der Organe und Extremitäten.

Folgend wird die thorakale Aorta präpariert und nach distal kanüliert. Es erfolgt die Injektion von 1ml eines nach Herstellerangaben aufbereiteten Microfil-Gemisches in die aortale Kanüle mit 150mmHg zur optimalen Darstellung arterieller Gefäße. Um ausreichend Druck während der Aushärtung aufrecht zu erhalten, werden drainierende Gefäße legiert. Eine ausreichende Auffüllung kann über eine transkutane Gefäßdarstellung der Hinterläufe in Mixturfarben kontrolliert werden.



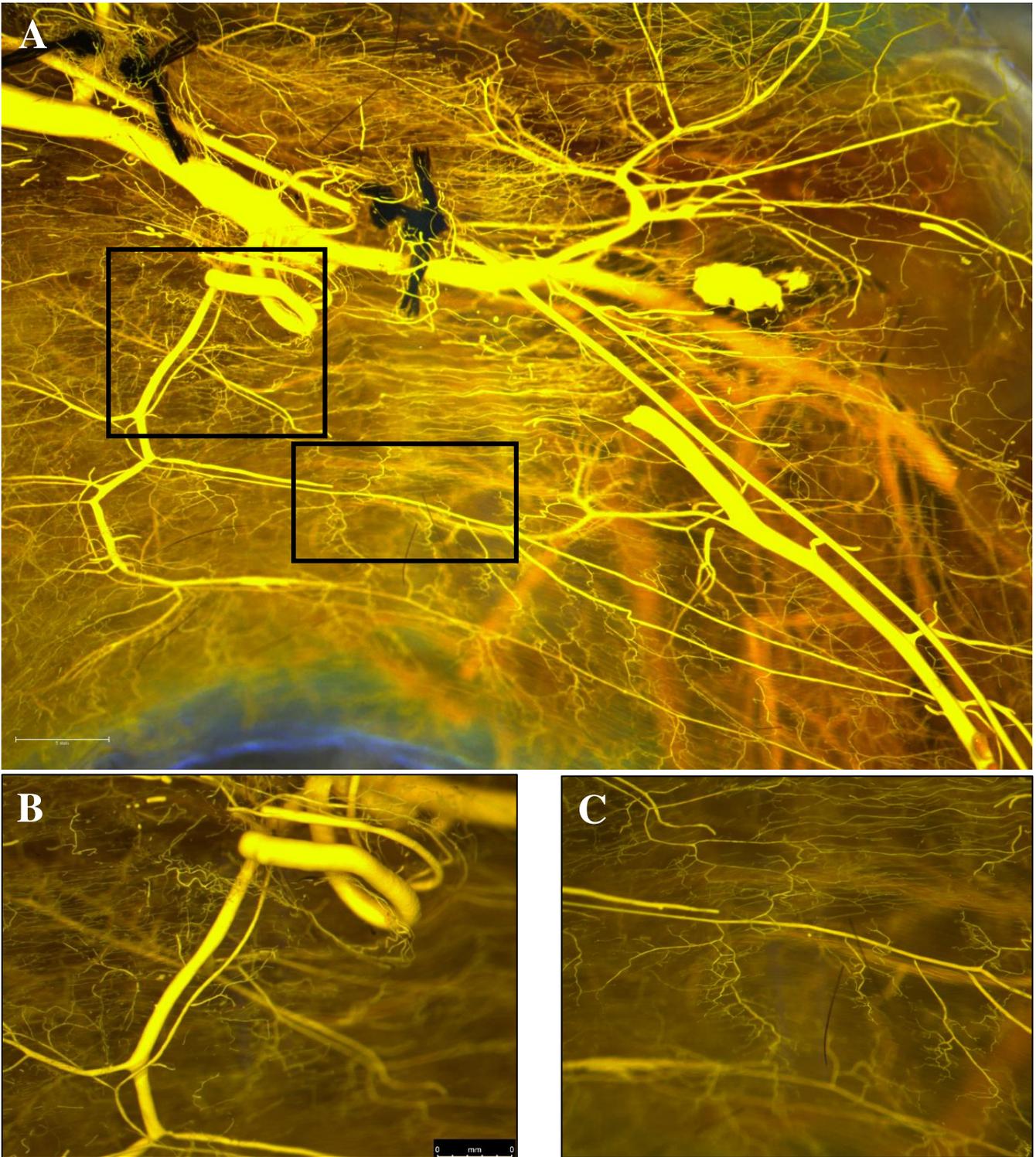
**Abb. 18: Gefäßausguss.** Situs nach erfolgter kardialer Punktion und vaskulärer Spülung. Anschließend Präparation der Aorta.



**Abb. 19: Gefäßausguss.** Kanulierung der Aorta zur Applikation von Microfil.

Um eine suffiziente Polymerisation des Ausgussmaterials zu gewährleisten, werden die Versuchstiere für 24 Stunden bei 4 °C gekühlt. Anschließend wird die Haut der Hinterläufe entfernt und die Hinterläufe nach Entnahme in einer Mischung aus 25% Ethanol (99,98%) und 75% Milipore eingelegt. Es erfolgt sukzessive in 24 stündigen Intervallen die Erhöhung des Ethanolanteils auf 50%, 75%, 95% und 100% zur Dehydrierung der Proben. Abschließend werden die Proben mit Methylsalicylat behandelt, wonach sich die Hinterläufe nach sieben Tagen durchsichtig darstellen.

Die wie beschrieben behandelten Hinterläufe können nun abschließend mikroskopisch untersucht und die Ausbildung von Kollateralgefäßen im Gefäßbett der Arteria gracilis (GA) dreidimensional dargestellt und vermessen wird. Zur Bildaufnahme wurde die Software Diskus benutzt, vermessen wurden die Gefäßausgüsse mittels Adobe Photoshop.



**Abb. 20: Mikroskopische Darstellung der Kollateralgefäße nach Microfil Ausguss. Übersicht des Gefäßbettes am ischämischen Hinterlauf (A), Vergrößerung kaudale Femoralarterie (B) und Darstellung der A. gracilis (C)**

## 2.12 Organentnahme

Die Organentnahme der Versuchstiere erfolgt in tiefer Narkose Ketamin (100mg/kg KG, intraperitoneal) und Rompun (10mg/kg KG, intraperitoneal). Nach Eintritt der Analgosedierung erfolgt die Initiierung eines hypovolämischen Kreislaufversagens durch maximalen Entzug des Blutvolumens mittels intrakardialer Punktion. Im Anschluss werden die Muskelköpfe der oberen Hinterlaufmuskulatur zügig freipräpariert. Es erfolgen Muskelentnahmen im Bereich der Adduktorenmuskulatur des Hinterlaufes zum Erhalt von RNA und zur histologischen Aufbereitung und Auswertung.

Tiere bei denen die Abbruchkriterien zutreffen, werden durch zervikale Dislokation getötet.

## 2.13 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der Versuchsdaten erfolgt über Prism 6.0 (GraphPad Software Inc.) für MAC OS X. Gruppendifferenzen wurden mittels univariater Frequenzanalyse und Post-hoc-Tests herausgestellt und auf ihr Signifikanzniveau untersucht. Beim alleinigen Vergleich zweier Gruppen wurden t-Tests verwendet. Als signifikant wurden p-Werte  $< 0.05$  gewertet.

## 3 Ergebnisse

Für die vorliegenden Ergebnisse wurden insgesamt 170 Mäuse operiert.  
Die postoperative Überlebensrate nach Hinterlaufischämie-Induktion betrug 98%.  
Die erforderliche Perfusionsreduktion von < 10% des präoperativen Wertes in der LDI Messung nach Hinterlaufischämie-Induktion wurde zu 100% erreicht.

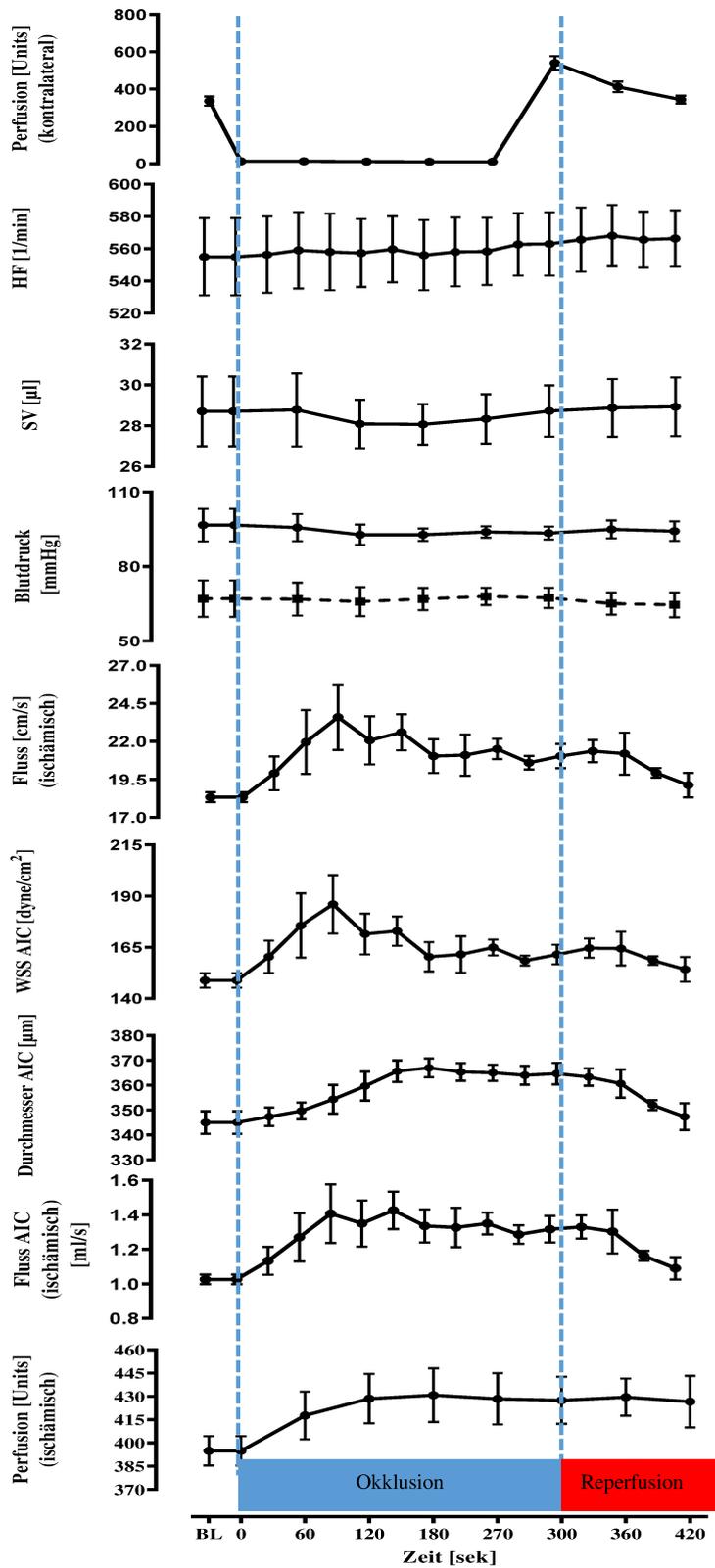
### 3.1 Akute hämodynamische Veränderungen der *repetitiv remote occlusion*

Die Inflation der Stauungsmanschette über fünf Minuten führte zu einer sofortigen Negierung des Blutflusses auf der Seite des nicht-ischämischen kontralateralen Hinterlaufes.

Während der Okklusion zeigten sich eine gesteigerte Blutflussgeschwindigkeit und eine gesteigerte Wandscherspannung in der Arteria iliaca communis der kontralateralen operierten Seite nach 60 Sekunden. Es folgte eine Vergrößerung des Gefäßdurchmessers der AIC und eine erhöhte Blutflussgeschwindigkeit im Hinterlauf selbst. Folgend resultierte dies in einer erhöhten Gewebepfusion im Bereich der Adduktorenmuskulatur mit Höchstwert um 120 Sekunden und anschließender Plateauphase.

Parallel dazu wurden die Effekte der *repetitiv remote occlusion* auf die zentrale Hämodynamik untersucht. Während der Okklusionszeit zeigten sich keine Veränderungen bezogen auf die Herzfrequenz, das Herzzeitvolumen und den zentralen aortalen Blutdruck.

Nach Abschluss der Okklusion und Reperfusion des Hinterlaufes zeigte sich die Perfusion des operierten Hinterlaufes über einen Zeitraum von 2 Minuten weiterhin erhöht.



**Abb. 21: Akute hämodynamische Veränderungen während induzierter Gefäßokklusion am Hinterlauf bei Wildtyp (WT) Mäusen.** Es wurden verschiedene Subgruppen von Mäusen auf hämodynamische Änderungen während induzierter Gefäßokklusion nach Hinterlaufischämie-Induktion untersucht. Das Aufblasen der Manschette am kontralateralen Hinterlauf führte zu einer kompletten Perfusionsnegierung am unbehandelten Hinterlauf, parallel zu einer Zunahme des Blutflussgeschwindigkeit und des WSS in der AIC am operierten Hinterlauf. [111]

### 3.2 Chronische Effekte der *repetitiv remote occlusion*

#### Perfusionsmessung mittels LDI

In den durchgeführten LDI Messungen zeigte sich nach der initialen Perfusionsverminderung nach Hinterlaufischämie-Induktion eine geringgradige Verbesserung der Perfusion am operierten Hinterlauf in allen Gruppen am dritten Tag postoperativ.

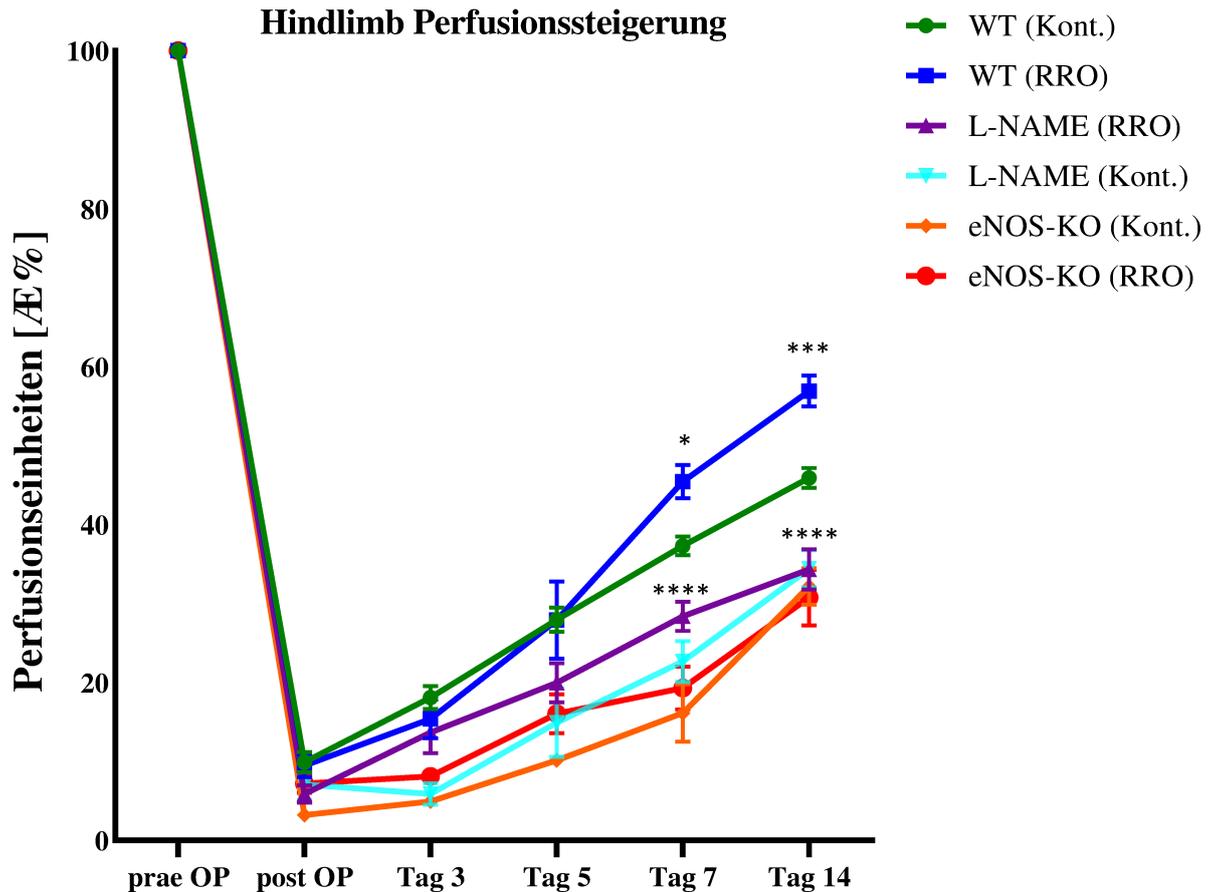
Der *repetitiv remote occlusion* zugeführte Mäuse zeigten im Verlauf eine nachhaltigere Verbesserung der Perfusion im Vergleich zu Mäusen der Kontrollgruppe. Am Abschluss der vierzehntägigen Messreihe imponierte eine signifikant erhöhte Perfusion im operierten Hinterlauf der RRO-Mäuse vergleichend zu Kontrollmäusen. ( $58 \pm 14\%$  Mäuse mit RRO-Intervention vs.  $47 \pm 8\%$  Kontrollgruppe;  $p < 0.0001$ ).

Die Perfusionsverbesserung im Beobachtungszeitraum bei Mäusen unter L-NAME Applikation, sowie eNOS3<sup>-/-</sup> Mäusen zeigte sich deutlich vermindert und resultierte in einer signifikant niedrigeren Perfusion an Tag 14 postoperativ im Vergleich zur Kontrollgruppe. (L-NAME:  $34 \pm 6\%$ ,  $p < 0.001$ ; eNOS3<sup>-/-</sup>:  $32 \pm 2\%$ ,  $p < 0.001$ ).

Weder bei Mäusen unter L-NAME Applikation noch bei eNOS3<sup>-/-</sup> Mäusen führte die *repetitiv remote occlusion* zu einer signifikanten Verbesserung der Perfusionsverhältnisse an Tag 14 postoperativ. (L-NAME+RRO:  $34 \pm 2\%$ ,  $p < 0.0001$ ; eNOS3<sup>-/-</sup> + RRO;  $31 \pm 4\%$ ,  $p < 0.0001$ ).

Weiterhin wurden LDI-Messungen zur Bestimmung der Relevanz der NO-sGC-Achse an Mausgruppen unter ODQ und Cinaciguat Applikation erhoben.

Die Messergebnisse für die ODQ Gruppe zeigen, dass die Applikation zu einer langsameren Perfuserholung und einer Verminderung des Endperfusionslevels führt (ODQ  $27 \pm 6\%$ , [vs Kontrolle]  $p < 0.001$ ), ähnlich der Gruppe unter L-NAME Applikation ( $p$  [ODQ vs L-NAME]  $> 0.05$ ) und eNOS3<sup>-/-</sup> Mäusen ( $p$  [ODQ vs NOS3<sup>-/-</sup>]  $> 0.05$ ). [111]



**Abb. 22: Perfusionsänderung nach Hinterlaufischämie.**

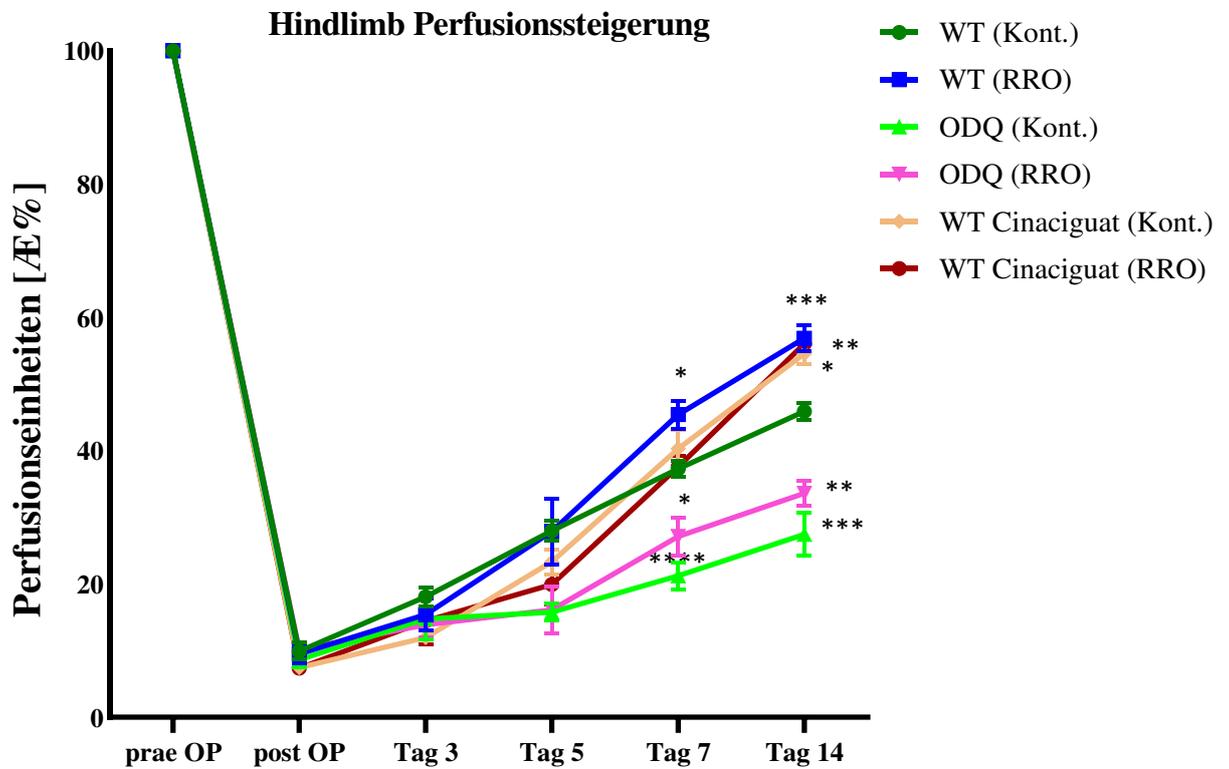
Zur Messung der vaskulären Regeneration wurde vor und im Anschluss an die Hinterlaufischämie-Induktion die Perfusion beider Hinterläufe mittels Laser Doppler Imaging bestimmt.

Hier vergleichen aufgeführt: Mäuse im Alter von 8-12 Wochen mit Scheinokklusion (WT, grün), oder RRO-Intervention (WR + RRO, blau), unter L-NAME-Applikation (türkis), L-NAME + RRO-Intervention (lila), sowie eNOS KO (orange) und eNOS KO + RRO-Intervention (rot). Die abgebildeten Messwerte beziehen sich vergleichend auf die präoperativ erhobenen Werte. n = 8 pro Gruppe; \*p ≤ 0.05, \*\*\*p ≤ 0.001, \*\*\*\*p ≤ 0.0001 [111]

Die zusätzliche Anwendung der *repetitiv remote occlusion* in der ODQ Gruppe ( $34 \pm 4\%$  p [vs Kontrolle] ≤ 0.001) zeigte eine deutliche Verminderung der erzielten Perfusionssteigerung durch die *repetitiv remote occlusion* im Vergleich zur Interventionsgruppe ohne ODQ Applikation. Es zeigte sich keine signifikante Verbesserung der Perfusion durch die Intervention im Vergleich zur ODQ-Kontrollgruppe (p [ODQ + RRO vs ODQ] > 0.05).

Folgend wurden Perfusionsdaten für Mäuse unter Cinaciguat Applikation mit und ohne Anwendung der *repetitiv remote occlusion* erhoben. Die Ergebnisse zeigen, dass die Perfuserholung und das Level der Endperfusion signifikant erhöht war unter Cinaciguat Applikation ( $53 \pm 3\%$ ), in ähnlicher Weise wie unter *repetitiv remote occlusion* ohne Applikationen (p [Cinaciguat vs WT+ RRO] > 0.05).

Die zusätzliche Anwendung der *repetitiv remote occlusion* in der Cinaciguat Gruppe führte zu keiner signifikanten zusätzlichen Steigerung (p [Cinaciguat Kont. vs Cinaciguat + RRO] > 0.05) [111].



**Abb. 23: Perfusionsänderung nach Hinterlaufischämie.**

Zur Messung der vaskulären Regeneration wurde vor und im Anschluss an die Hinterlaufischämie-Induktion die Perfusion beider Hinterläufe mittels Laser Doppler Imaging bestimmt. Hier vergleichen aufgeführt: Mäuse im Alter von 8-12 Wochen mit Scheinokklusion (WT, grün), oder RRO-Intervention (WR + RRO, blau), unter ODQ Applikation (hellgrün), ODQ + RRO-Intervention (pink), sowie unter Cinaciguat Applikation (beige) beziehungsweise Cinaciguat + RRO-Intervention (braun). Die abgebildeten Messwerte beziehen sich vergleichend auf die präoperativ erhobenen Werte. n = 8 pro Gruppe; \*p ≤ 0.05, \*\*\*p ≤ 0.001, \*\*\*\*p ≤ 0.0001 [111]

## Einfluss von RRO auf die Blutflussgeschwindigkeit

An Tag 14 nach Hinterlaufischämie-Induktion zeigte sich in den Wildtyp (WT) Gruppen eine signifikante Zunahme des Blutflusses in allen drei Gefäßabschnitten des operierten Hinterlaufs im Vergleich zur Messung vom zweiten postoperativen Tag ( $\Delta$  Zunahme AIC  $14 \pm 4\%$ ,  $p < 0.0001$ ). Damit einhergehend zeigte sich eine Abnahme des Blutflusses in kontralateralen Hinterlauf ( $\Delta$  Abnahme AIC  $-10 \pm 5.8\%$ ,  $p < 0.05$ ).

Weiterhin war der Blutflusszuwachs am operierten Hinterlauf signifikant höher bei Mäusen, welche die *repetitiv remote occlusion* erhalten hatten (AIC  $27 \pm 5\%$ ,  $p < 0.0001$ ). Keine signifikanten Veränderungen konnten bei Mäusen unter L-NAME Applikation beobachtet werden. Auch in Kombination mit der *repetitiv remote occlusion* konnte kein positiver Effekt auf den Blutflusszuwachs verzeichnet werden.

Mäuse der eNOS3<sup>-/-</sup> Linie zeigten zwar einen signifikanten Blutflusszuwachs im operierten Hinterlauf am Tag 14 postoperativ, allerdings lagen die Werte deutlich unter denen der Vergleichsgruppen. Auch die zusätzliche Verwendung der *repetitiv remote occlusion* konnte hierbei keinen Zuwachs an Blutfluss erreichen.

In Bezug auf den Blutfluss über den Kollateralkreislauf zeigte sich, dass die Gruppe unter *repetitiv remote occlusion* den am stärksten ausgeprägten Blutvolumenzuwachs über die Kollateralen verzeichnen konnte ( $\Delta$  Blutfluss: AIC  $199 \pm 41 \mu\text{l}/\text{min}$  vs. CFA  $60 \pm 11 \mu\text{l}/\text{min}$ ; Kontrolle: AIC  $89 \pm 6 \mu\text{l}/\text{min}$  vs. CFA  $26 \pm 7 \mu\text{l}/\text{min}$ ).

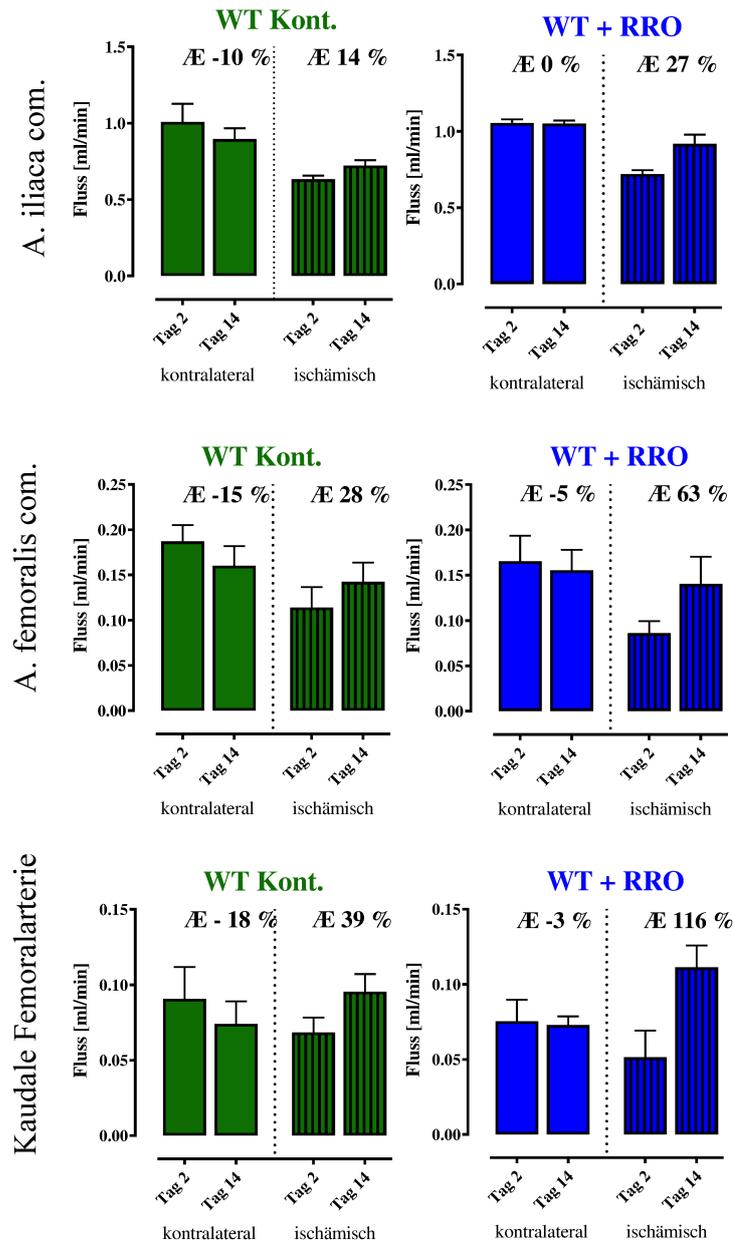
Abseits davon wies die Gruppe unter *repetitiv remote occlusion* eine signifikant niedrigere Blutflussabnahme im kontralateralen Hinterlauf im Vergleich zur Kontrollgruppe auf ( $\Delta$  Blutflussabnahme AIC  $0 \pm 6\%$ ;  $p < 0.01$ ). Dies zeigt sich allerdings nicht in Mäusen unter L-NAME Applikation oder eNOS3<sup>-/-</sup> Mäusen mit *repetitiv remote occlusion*. [111]

## Ergebnisse

		Kontralateral			Ischämisch		
Gruppe		Δ Fluss (%)	p-Wert	p-Wert (vs WT Kont.)	Δ Fluss (%)	p-Wert	p-Wert (vs WT Kont.)
<b>A. iliaca communis</b>	WT (Kont.)	-10 ± 6	<0.0001		14 ± 4	<0.0001	
	WT (RRO)	0 ± 6	0.5	<0.01	27 ± 5	<0.0001	<0.0001
	L-NAME (Kont.)	-14 ± 5	<0.0001	0.08	6 ± 2	<0.01	<0.05
	L-NAME (RRO)	-13 ± 5	<0.0001	0.1	8 ± 3	<0.01	<0.05
	eNOS-KO (Kont.)	-12 ± 5	<0.0001	0.06	10 ± 2	<0.0001	0.07
	eNOS-KO (RRO)	-9 ± 2	<0.001	0.08	12 ± 2	<0.0001	0.09
<b>A. femoralis communis</b>	WT (Kont.)	-15 ± 3	<0.0001		28 ± 7	<0.0001	
	WT (RRO)	-5 ± 3	0.34	≤0.01	63 ± 12	<0.0001	<0.0001
	L-NAME (Kont.)	-13 ± 7	<0.001	0.25	12 ± 9	<0.0001	<0.01
	L-NAME (RRO)	-15 ± 5	<0.001	0.08	9 ± 6	<0.01	<0.05
	eNOS-KO (Kont.)	-15 ± 6	<0.0001	0.2	14 ± 3	<0.0001	<0.05
	eNOS-KO (RRO)	-18 ± 4	<0.0001	0.34	12 ± 3	<0.0001	<0.01
<b>A. femoralis caudalis</b>	WT (Kont.)	-18 ± 4	<0.0001		39 ± 5	<0.0001	
	WT (RRO)	-3 ± 12	0.7	≤0.01	116 ± 9	<0.0001	<0.01
	L-NAME (Kont.)	-9 ± 4	<0.0001	0.08	15 ± 4	<0.0001	<0.05
	L-NAME (RRO)	-13 ± 4	<0.0001	0.1	16 ± 4	<0.0001	<0.01
	eNOS-KO (Kont.)	-18 ± 6	<0.0001	0.12	18 ± 5	<0.0001	<0.05
	eNOS-KO (RRO)	-19 ± 5	<0.0001	0.7	22 ± 6	<0.0001	<0.01

**Tabelle 4: Blutflussänderungen.**

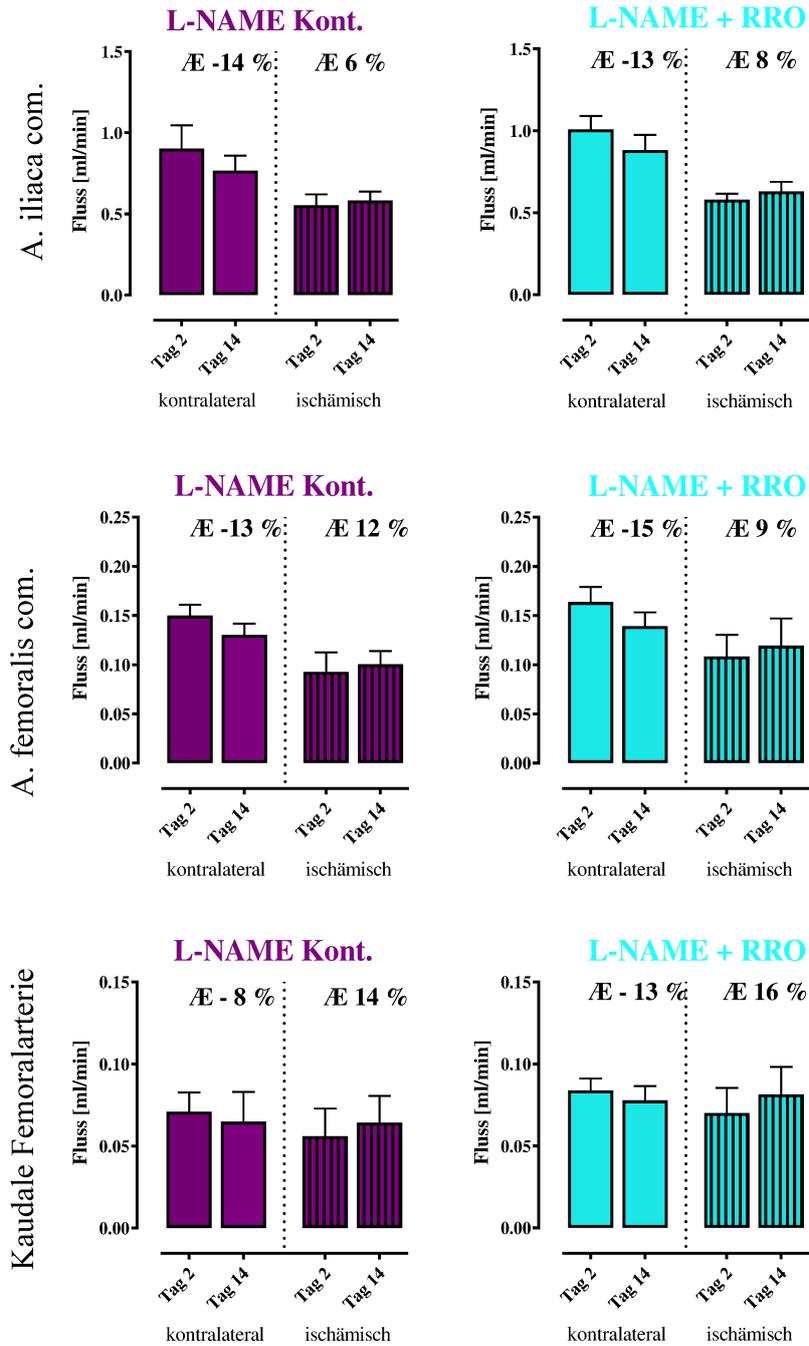
Aufgezeigt sind die Änderungen des Blutflusses (%) im Gefäßsystem beider Hinterläufe (A. iliaca communis, A. femoralis communis, A. femoralis caudalis) an Tag 14 nach Hinterlaufischämie-Induktion. Die Werte stehen im Vergleich zu den Messungen am zweiten postoperativen Tag. n = 4 pro Gruppe [111]



**Abb. 24: Flussgeschwindigkeit.**

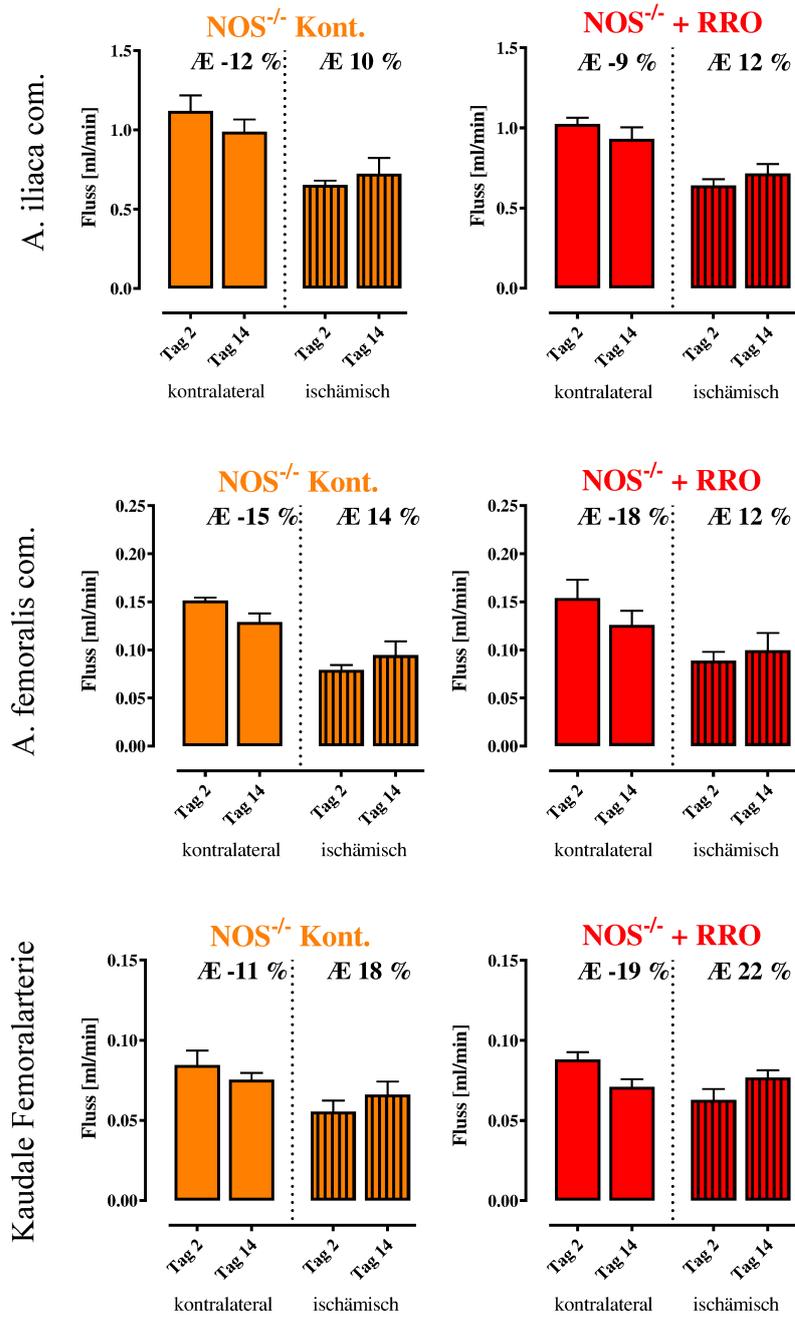
Messung des Gefäßdurchmessers und der durchschnittlichen Flussgeschwindigkeit zur Bestimmung des Flussvolumens. Aufgeführt sind die Flussvolumina der A. iliaca communis (erste Reihe), der A. femoralis communis (zweite Reihe) und der kaudalen Femoralarterie (dritte Reihe) beider Hinterläufe (unifarben = unbehandelter Hinterlauf, schraffiert = operierter Hinterlauf) an Tag 2 und 14 postoperativ.

WT Kontrolle (grün), WT unter *repetitiv remote occlusion* (blau). [111]



**Abb. 25: Flussgeschwindigkeit.**

Messung des Gefäßdurchmessers und der durchschnittlichen Flussgeschwindigkeit zur Bestimmung des Flussvolumens. Aufgeführt sind die Flussvolumina der A. iliaca communis (erste Reihe), der A. femoralis communis (zweite Reihe) und der kaudalen Femoralarterie (dritte Reihe) beider Hinterläufe (unifarben = unbehandelter Hinterlauf, schraffiert = operierter Hinterlauf) an Tag 2 und 14 postoperativ. L-NAME Applikation (lila), L-NAME + *repetitiv remote occlusion* (türkis). [111]



**Abb. 26: Flussgeschwindigkeit.**

Messung des Gefäßdurchmessers und der durchschnittlichen Flussgeschwindigkeit zur Bestimmung des Flussvolumens. Aufgeführt sind die Flussvolumina der A. iliaca communis (erste Reihe), der A. femoralis communis (zweite Reihe) und der kaudalen Femoralarterie (dritte Reihe) beider Hinterläufe (unifarben = unbehandelter Hinterlauf, schraffiert = operierter Hinterlauf) an Tag 2 und 14 postoperativ. Hier eNOS KO (orange) und eNOS KO + *repetitiv remote occlusion* (rot). [111]

## Ergebnisse

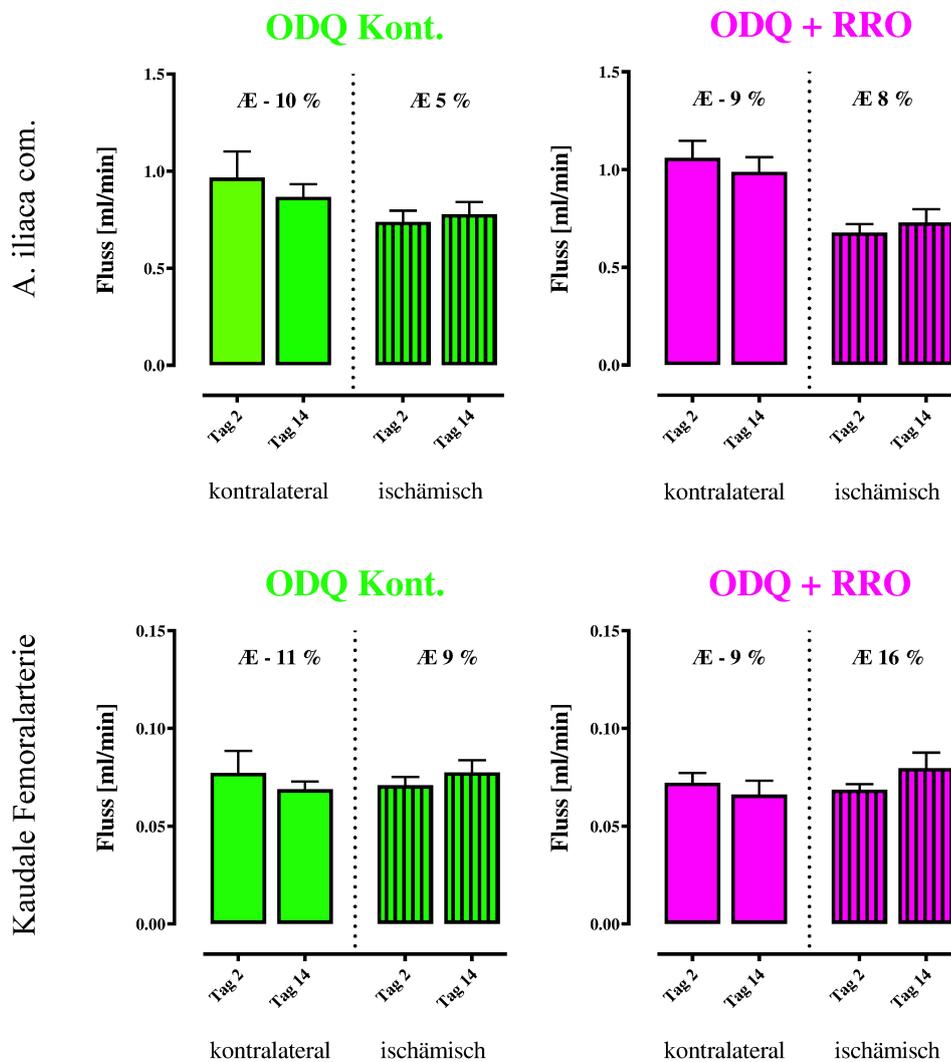
Die Gruppen zur Untersuchung des NO-sGC-Signalweges wurden ebenfalls der sonographischen Darstellung unterzogen.

Hier zeigte sich für die Gruppe unter ODQ-Applikation eine tendenziell ähnliche Entwicklung der Blutflusswerte der Hinterläufe in Bezug auf die WT Gruppen (Zunahme AIC  $5\% \pm 2$ , CFA  $9\% \pm 3$  p[vs WT Kont.] $<0.9$ ).

Unter Kombination mit der *repetitiv remote occlusion* konnte keine signifikante Steigerung des Blutflusses erreicht werden. (Zunahme [ODQ + RRO] AIC  $8\% \pm 3$ , CFA  $16\% \pm 6$ )

Unter Cinaciguat Applikation stellte sich ebenfalls eine signifikante Verbesserung des Blutvolumens über dem Kollateralkreislaufes der der Hinterlaufischämie-Induktion unterzogenen Seite ein. Weiter zeigte sich eine Blutflussabnahme am kontralateralen Hinterlauf, ähnlich der Ergebnisse der WT Gruppen. (Abnahme AIC  $-6\% \pm 2$ )

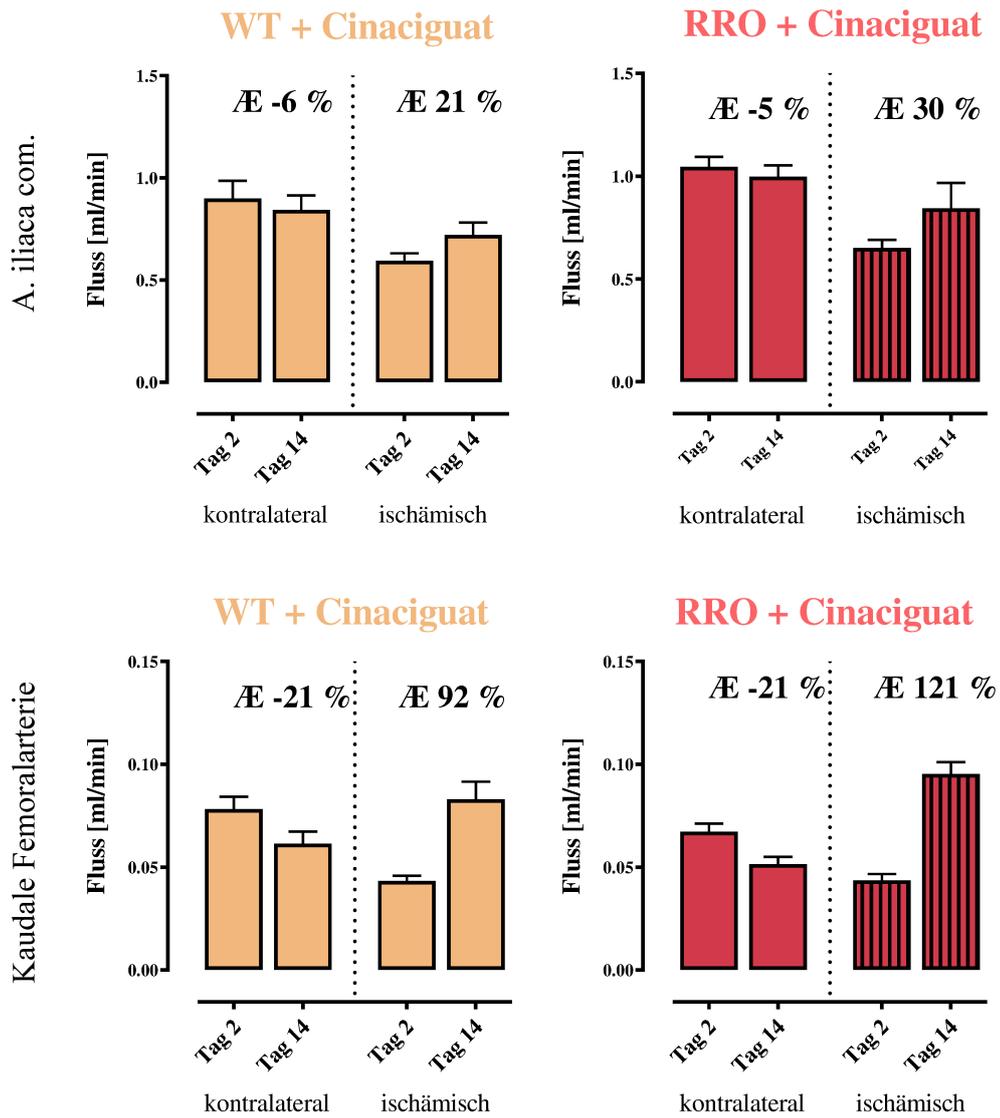
Eine Kombination aus Cinaciguat Applikation und *repetitiv remote occlusion* brachte keine weitere signifikante Steigerung des Blutflusses (Zunahme Blutfluss [WT Cinaciguat + RRO] AIC  $30\% \pm 6$ , CFA  $121\% \pm 4$ , p[vs WT RRO] $>0.05$ ) [111]



**Abb. 27: Flussgeschwindigkeit.**

Messung des Gefäßdurchmessers und der durchschnittlichen Flussgeschwindigkeit zur Bestimmung des Flussvolumens. Aufgeführt sind die Flussvolumina der A. iliaca communis (erste Reihe) und der kaudalen Femoralarterie (zweite Reihe) beider Hinterläufe (unifarben = unbehandelter Hinterlauf, schraffiert = operierter Hinterlauf) an Tag 2 und 14 postoperativ.

ODQ Applikation (hellgrün), ODQ + *repetitiv remote occlusion* (lila).[111]



**Abb. 28: Flussgeschwindigkeit.**

Messung des Gefäßdurchmessers und der durchschnittlichen Flussgeschwindigkeit zur Bestimmung des Flussvolumens. Aufgeführt sind die Flussvolumina der A. iliaca communis (erste Reihe) und der kaudalen Femoralarterie (zweite Reihe) beider Hinterläufe (unifarben = unbehandelter Hinterlauf, schraffiert = operierter Hinterlauf) an Tag 2 und 14 postoperativ. Cinaciguat Applikation (beige) und Cinaciguat + *repetitiv remote occlusion* (rot).[111]

## Quantifizierung der Lumenexpansion mittels Gefäßausguss

In der WT Kontrollgruppe konnte eine signifikante Zunahme der Gefäßdurchmesser am operierten Hinterlauf sowohl der CFA, als auch der GA in Bezug auf die Durchmesser ebendieser Gefäße am kontralateralen Hinterlauf verzeichnet werden [Zunahme CFA  $24 \pm 3.3\%$  ( $p=0.0004$ ) und GA  $61 \pm 5.6\%$  ( $p < 0.0001$ )].

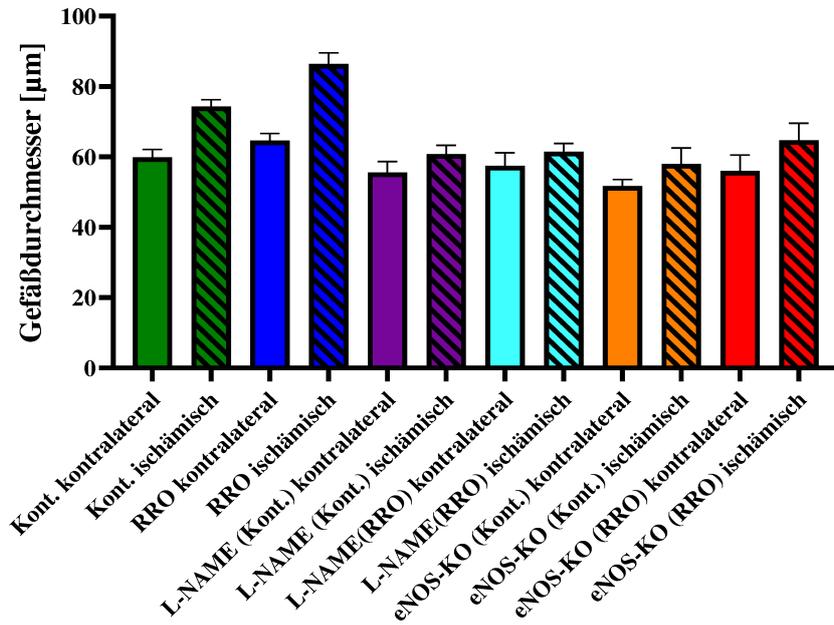
Unter *repetitiv remote occlusion* zeigte sich eine signifikant stärkere Zunahme der Gefäßdurchmesser in CFA [ $34 \pm 3.9\%$  ( $p < 0.0001$ )] und GA [ $101 \pm 6\%$  ( $p < 0.0001$ )].

In den Gruppen unter L-NAME Applikation und mit Mäusen der eNOS3-/- Linie war der Zuwachs des Gefäßdurchmessers der Kollateralen weitestgehend aufgehoben, ebenso in Kombination der Effekt der *repetitiv remote occlusion* auf die Gefäßexpansion stark reduziert. [111]

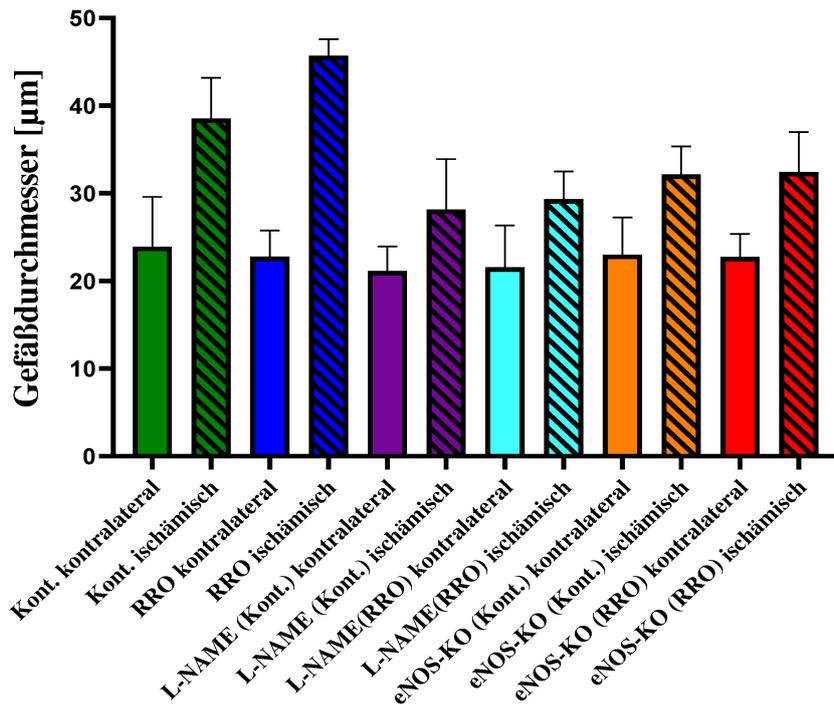
	Gruppe	Kontralateraler Hinterlauf	Ischämischer Hinterlauf	$\Delta$ Dilatation (%)	p-Wert	p-Wert (vs. WT Kont.)
<b>Kaudale Femoralarterie</b>	WT (Kont.)	$60 \pm 2$	$74 \pm 2$	$24 \pm 3$	0.0004	
	WT (RRO)	$65 \pm 2$	$86 \pm 3$	$34 \pm 4$	<0.0001	<0.05
	L-NAME (Kont.)	$56 \pm 3$	$61 \pm 2$	$9 \pm 3$	0.22	<0.01
	L-NAME (RRO)	$57 \pm 3$	$61 \pm 2$	$7 \pm 4$	0.38	<0.05
	eNOS-KO (Kont.)	$52 \pm 2$	$58 \pm 4$	$12 \pm 3$	0.3	<0.05
	eNOS-KO (RRO)	$56 \pm 4$	$65 \pm 5$	$15 \pm 2$	0.22	<0.05
<b>A. gracilis</b>	WT (Kont.)	$24 \pm 2$	$39 \pm 5$	$61 \pm 6$	<0.0001	
	WT (RRO)	$23 \pm 2$	$46 \pm 1$	$101 \pm 6$	<0.0001	<0.01
	L-NAME (Kont.)	$21 \pm 2$	$28 \pm 1$	$33 \pm 6$	0.01	<0.0001
	L-NAME (RRO)	$22 \pm 2$	$29 \pm 1$	$36 \pm 6$	0.0012	<0.001
	eNOS-KO (Kont.)	$23 \pm 1$	$32 \pm 2$	$40 \pm 6$	<0.0048	<0.05
	eNOS-KO (RRO)	$23 \pm 1$	$32 \pm 1$	$42 \pm 6$	<0.0001	<0.05

**Tabelle 5: Übersicht der Gefäßdurchmesser nach Microfil-Ausguss in CFA und GA für WT, eNOS, L-NAME.**  
n = 4 pro Gruppe [111]

**Gefäßdurchmesser kaudale Femoralarterie**



**Gefäßdurchmesser A. gracilis**

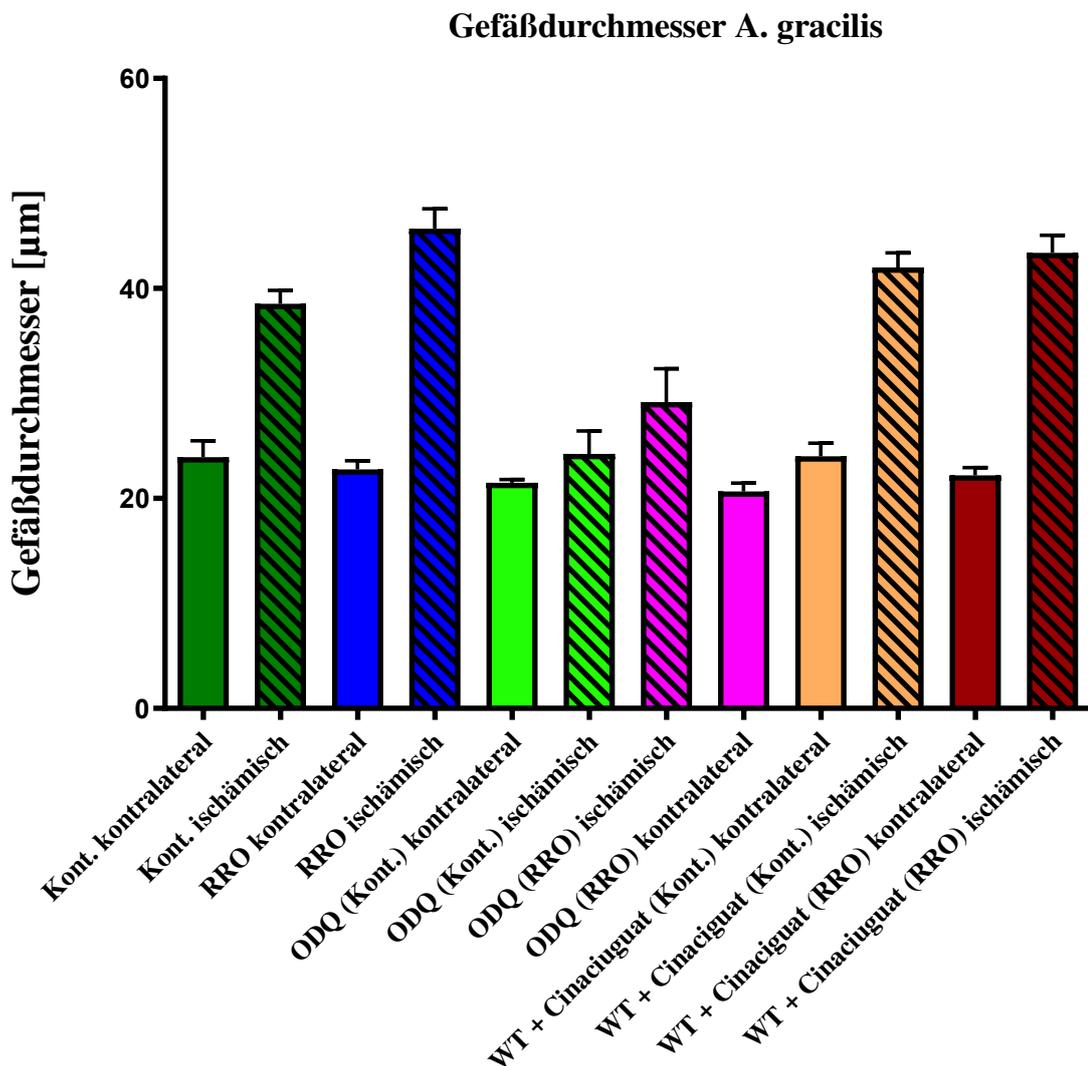


**Abb. 29: Vaskuläre Morphologie.**

Mikroskopische Analyse des Gefäßdurchmessers nach Mikrofil-Ausguss der kaudalen Femoralarterie und Arteria gracilis beider Hinterläufe. Neben der Kontrollgruppe (grün), erhielten Mäuse *repetitiv remote occlusion* (blau), L-NAME Applikation (lila), oder L-NAME-Applikation und *repetitiv remote occlusion* (türkis). NOS3<sup>-/-</sup> (orange) und NOS3<sup>-/-</sup> + *repetitiv remote occlusion* (rot). Aufgezeichnet sind die Gefäßdurchmesser beider Hinterläufe (Kontrolle = unbehandelt, Ischämie = Hinterlauf nach operativer Ischämie-Induktion, gestreift) [111]

Unter ODQ Applikation zeigt sich ein deutlich verminderter Zuwachs des Gefäßdurchmessers der Kollateralen im Vergleich zum kontralateralen Hinterlauf. Ebenso bleibt der Zuwachs stark hinter den Werten der WT Kontrolle zurück. In Kombination mit der *repetitiv remote occlusion* ist eine tendenzielle Steigerung des Gefäßdurchmessers zu beobachten, allerdings bleibt eine signifikante Verminderung vergleichend zur WT Kontrollgruppe bestehen.

Durch Cinaciguat Applikation kann der Durchmesserzuwachs der Kollateralgefäße annähernd auf Niveau der WT + RRO Gruppe signifikant gesteigert werden. Eine zusätzliche Kombination mit der *repetitiv remote occlusion* zeigt keine weitere Zunahme des Kollateraldurchmessers.[111]



**Abb. 30: Vaskuläre Morphologie.**

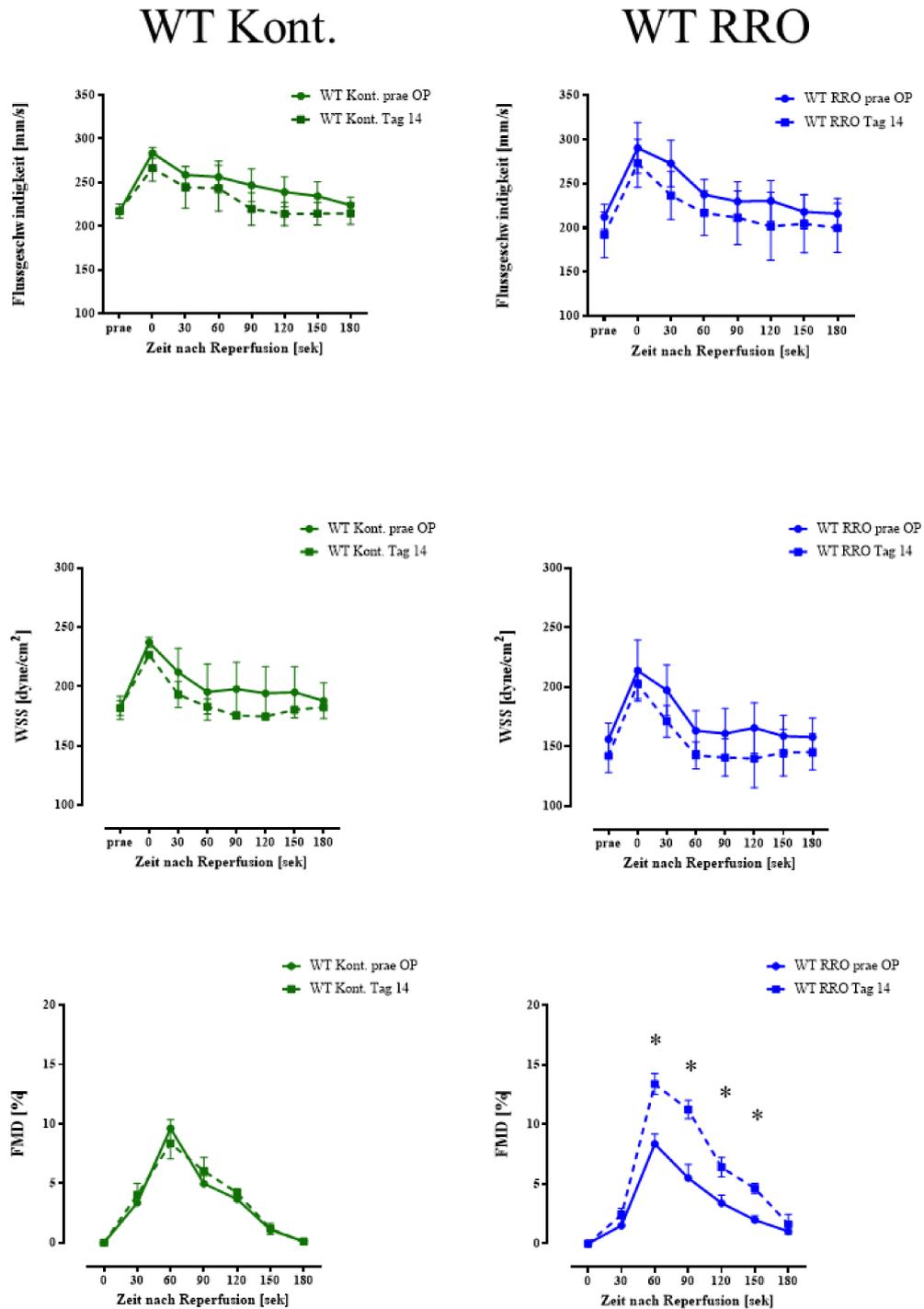
Mikroskopische Analyse des Gefäßdurchmessers nach Mikrofil-Ausguss der Arteria gracilis beider Hinterläufe. Neben der Kontrollgruppe (grün), erhielten Mäuse *repetitiv remote occlusion* (blau), ODQ-Applikation (hellgrün), ODQ Applikation + *repetitiv remote occlusion* (lila), Cinaciguat-Applikation (sandfarben) und Cinaciguat Applikation + *repetitiv remote occlusion* (rotbraun). Aufgezeichnet sind die Gefäßdurchmesser beider Hinterläufe (Kontrolle = unbehandelt, Ischämie = Hinterlauf nach operativer Ischämie-Induktion, gestreift) [111]

## Ergebnisse

### Messung der flussabhängigen Dilatation

Die Ergebnisse der FMD-Messungen zeigen, dass die flussabhängige Dilatation in der A. femoralis im Vergleich von präoperativ zu Tag 14 postoperativ in der Gruppe der WT Mäuse mit *repetitiv remote occlusion* prozentual gesteigert ist. Diese Steigerung ist signifikant erhöht vergleichend zur Kontrollgruppe.

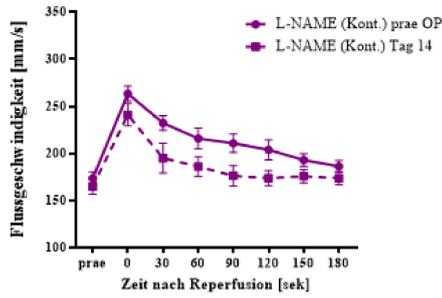
Dieser Effekt ist in der Gruppe unter L-NAME Applikation nicht nachzuvollziehen. Hier zeigte sich weder eine Steigerung der FMD-Kapazität durch die *repetitiv remote occlusion* von prä- zu postoperativ, noch ein Unterschied zur Kontrollgruppe mit L-NAME Applikation. Insgesamt ist die FMD-Kapazität der L-NAME Gruppen deutlich geringer, vergleichend zur WT Kontrolle.



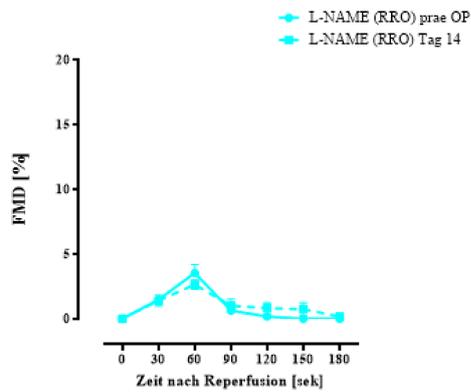
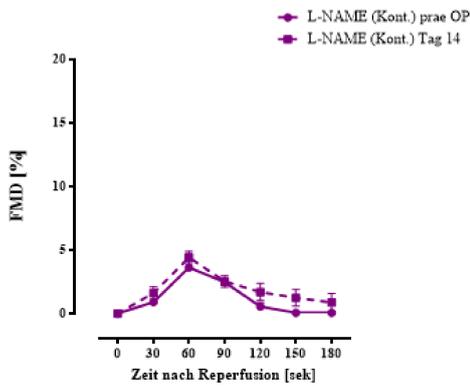
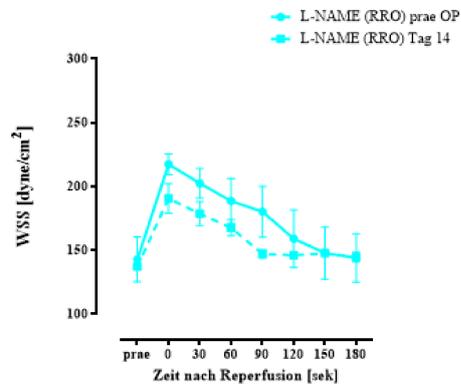
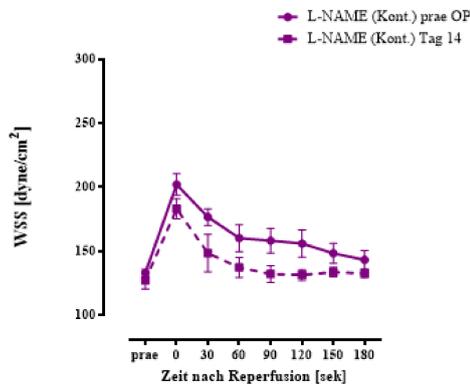
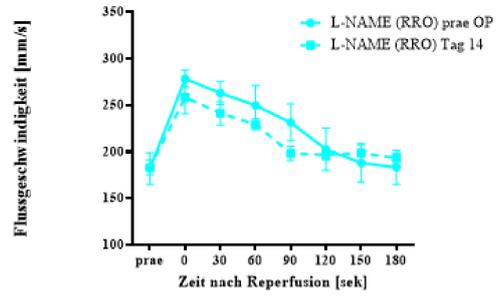
**Abb. 31: FMD Kapazität.**

FMD-Messungen wurden vor und an Tag 14 nach Hinterlaufischämie-Induktion erhoben. Hier aufgeführt die Flussgeschwindigkeit (erste Reihe, in mm/s), die Wandscherspannung (zweite Reihe, in  $\text{dyne/cm}^2$ ) und die errechnete FMD (dritte Reihe, in %) über 3 Minuten für WT mit Scheinintervention (grün), WT + *repetitiv remote occlusion* (blau).

## L-NAME



## L-NAME + RRO



**Abb. 32: FMD Kapazität.**

FMD-Messungen wurden vor und an Tag 14 nach Hinterlaufschämie-Induktion erhoben. Hier aufgeführt die Flussgeschwindigkeit (erste Reihe, in mm/s), die Wandscherspannung (zweite Reihe, in  $\text{dyne/cm}^2$ ) und die errechnete FMD (dritte Reihe, in %) über 3 Minuten für WT unter L-NAME Applikation (lila) und L-NAME + *repetitiv remote occlusion* (türkis).

### 3.3 Chronische Effekte der *repetitiv remote occlusion* bei alten Mäusen

Der aufgeführten Versuchsreihe wurden weiter sogenannte Methusalem-Mäuse unterzogen. Hierbei handelt es sich um Mäuse der Linie C57BL/6J Reihe, deren Alter bei mindestens 24 Monaten liegt. Gerechnet in menschlichen Lebensjahren liegt das Alter dieser Mäuse bei ungefähr 80 Jahren [112]. Die hieraus gewonnenen Daten sollen einen besseren Rückschluss auf die Effekte der *repetitiv remote occlusion* im Alter geben.

#### Perfusionsmessung mittels LDI

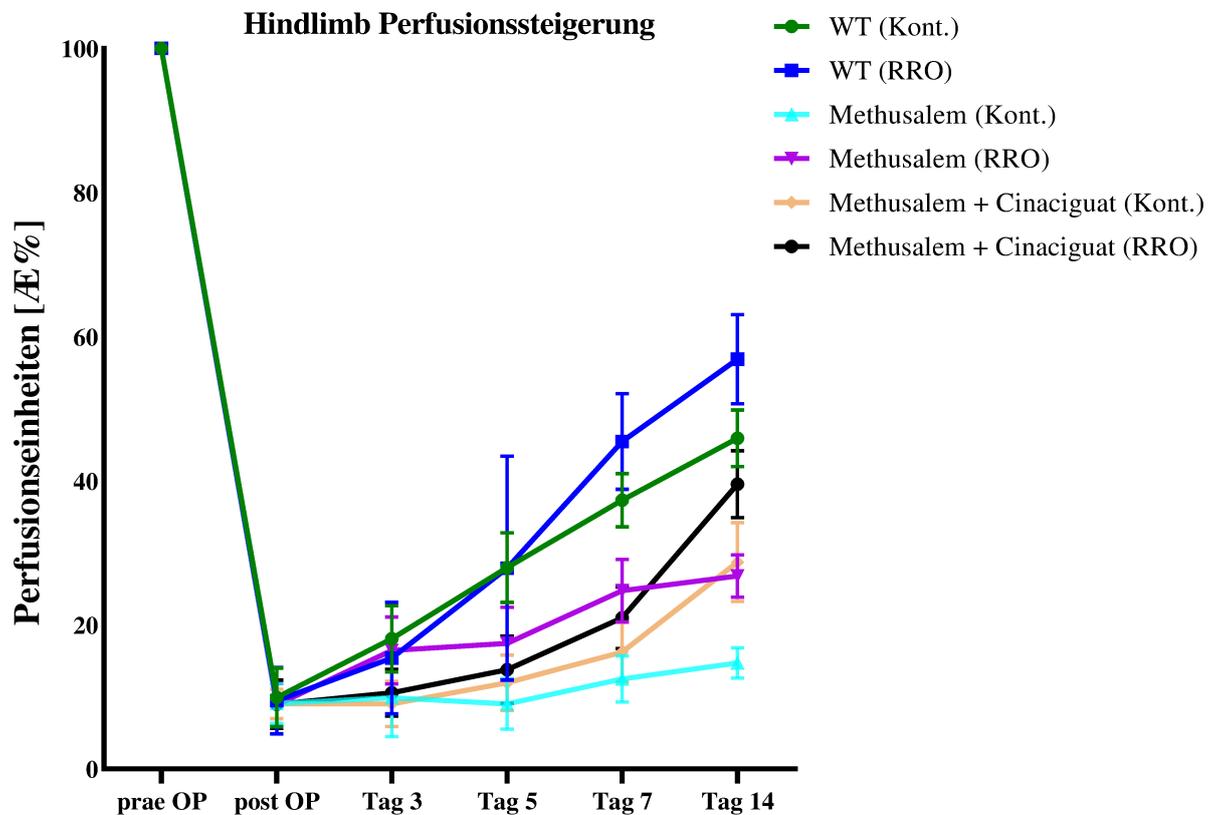
In den durchgeführten Messungen zeigte sich eine deutlich verminderte Erholung der Perfusion am operierten Hinterlauf der Methusalem Mäuse. Die Perfusion am Tag 14 postoperativ war signifikant erniedrigt gegenüber Mäusen der WT Reihe ohne *repetitiv remote occlusion* ( $15 \pm 2\%$  Methusalem Kont.,  $p$  [Methusalem Kont. vs WT Kont.] $<0.0001$ )

Für Methusalem Mäuse unter *repetitiv remote occlusion* konnte eine signifikante Steigerung der Perfusionserholung und der Perfusion an Tag 14 postoperativ am operierten Hinterlauf gezeigt werden ( $27 \pm 3\%$  Methusalem + RRO vs.  $15 \pm 2\%$  Methusalem Kont.,  $p <0.0001$ ).

Die Applikation von Cinaciguat bei Methusalem Mäusen führte ebenfalls zu einer signifikant erhöhten Perfusion an Tag 14 postoperativ, wobei die Endmessungen denen der Mäuse unter *repetitiv remote occlusion* gleichkamen ( $29 \pm 5\%$  Methusalem + Cinaciguat,  $p$ [Methusalem + Cinaciguat vs Methusalem Kont.] $<0.0001$ ).

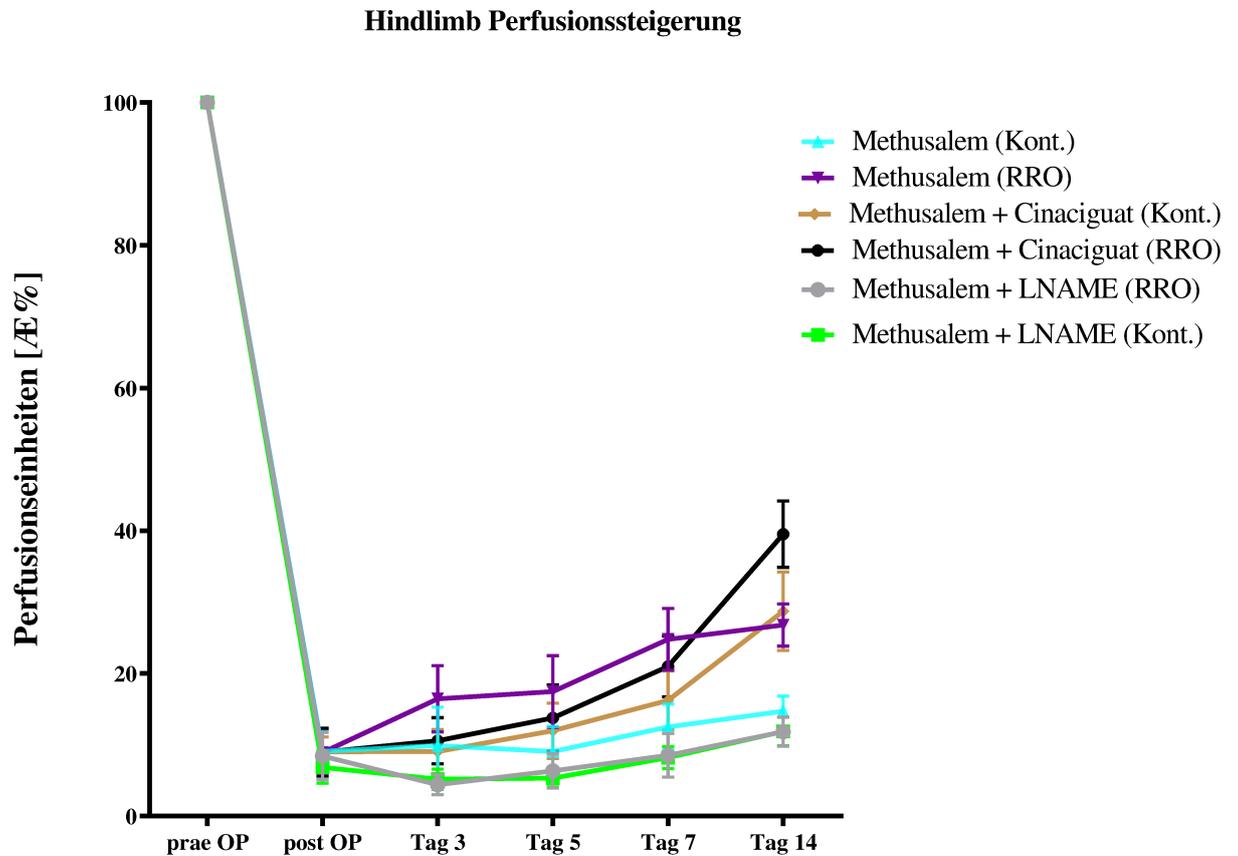
Die Kombination aus RRO-Intervention und Cinaciguat Applikation erzielte für die Methusalem Gruppe die höchsten Perfusionswerte an Tag 14 postoperativ ( $40 \pm 5\%$  Methusalem + Cinaciguat + RRO). Besagte Werte erreichten annähernd das Niveau von jungen WT Kontrollgruppen. Eine Kombination bei Methusalem Mäusen zeigte sich signifikant überlegen gegenüber eine Monoanwendung von Cinaciguat beziehungsweise *repetitiv remote occlusion* ( $40 \pm 5\%$  vs  $29 \pm 5\%$  vs  $27 \pm 3\%$ ,  $p$ [Methusalem + Cinaciguat + RRO vs Methusalem + Cinaciguat Kont. vs Methusalem + RRO] $<0.0001$ ).

Unter L-NAME Applikation zeigte sich für die Methusalem Mäuse eine verminderte Perfusionserholung ( $15 \pm 2\%$  Methusalem Kont. vs.  $12 \pm 2\%$  Methusalem LNAME Kont.,  $p <0.01$ ). Die Anwendung der *repetitiv remote occlusion* konnte auch bei Methusalem Mäusen unter LNAME Applikation keine Steigerung der Perfusion erzielen ( $12 \pm 2\%$  Methusalem LNAME Kont vs  $12 \pm 2\%$  Methusalem LNAME + RRO,  $p > 0.9$ )



**Abb. 33: Perfusionsänderung nach Hinterlaufischämie.**

Zur Messung der vaskulären Regeneration wurde vor und im Anschluss an die Hinterlaufischämie-Induktion die Perfusion beider Hinterläufe mittels Laser Doppler Imaging bestimmt. Hier vergleichen aufgeführt: Mäuse im Alter von 8-12 Wochen mit Scheinokklusion (WT, grün), oder *repetitiv remote occlusion* (WR + RRO, blau), sowie Methusalem Mäuse mit Scheinokklusion (türkis) und *repetitiv remote occlusion* (lila). Weiter abgebildet Methusalem Mäuse unter Cinaciguat-Applikation und Scheinokklusion (hellbraun) und unter Cinaciguat + *repetitiv remote occlusion* (schwarz). Die abgebildeten Messwerte beziehen sich vergleichend auf die präoperativ erhobenen Werte.



**Abb. 34: Perfusionsänderung nach Hinterlaufischämie.**

Zur Messung der vaskulären Regeneration wurde vor und im Anschluss an die Hinterlaufischämie-Induktion die Perfusion beider Hinterläufe mittels Laser Doppler Imaging bestimmt. Hier vergleichen aufgeführt: Methusalem Mäuse mit Scheinokklusion (türkis) und *repetitiv remote occlusion* (lila). Weiter abgebildet Methusalem Mäuse unter Cinaciguat-Applikation und Scheinokklusion (hellbraun) und unter Cinaciguat + *repetitiv remote occlusion* (schwarz), sowie LNAME Applikation (hellgrün) bzw. LNAME Applikation und *repetitiv remote occlusion* (grau) Die abgebildeten Messwerte beziehen sich vergleichend auf die präoperativ erhobenen Werte.

### Sonographische Messung der Blutflussgeschwindigkeit

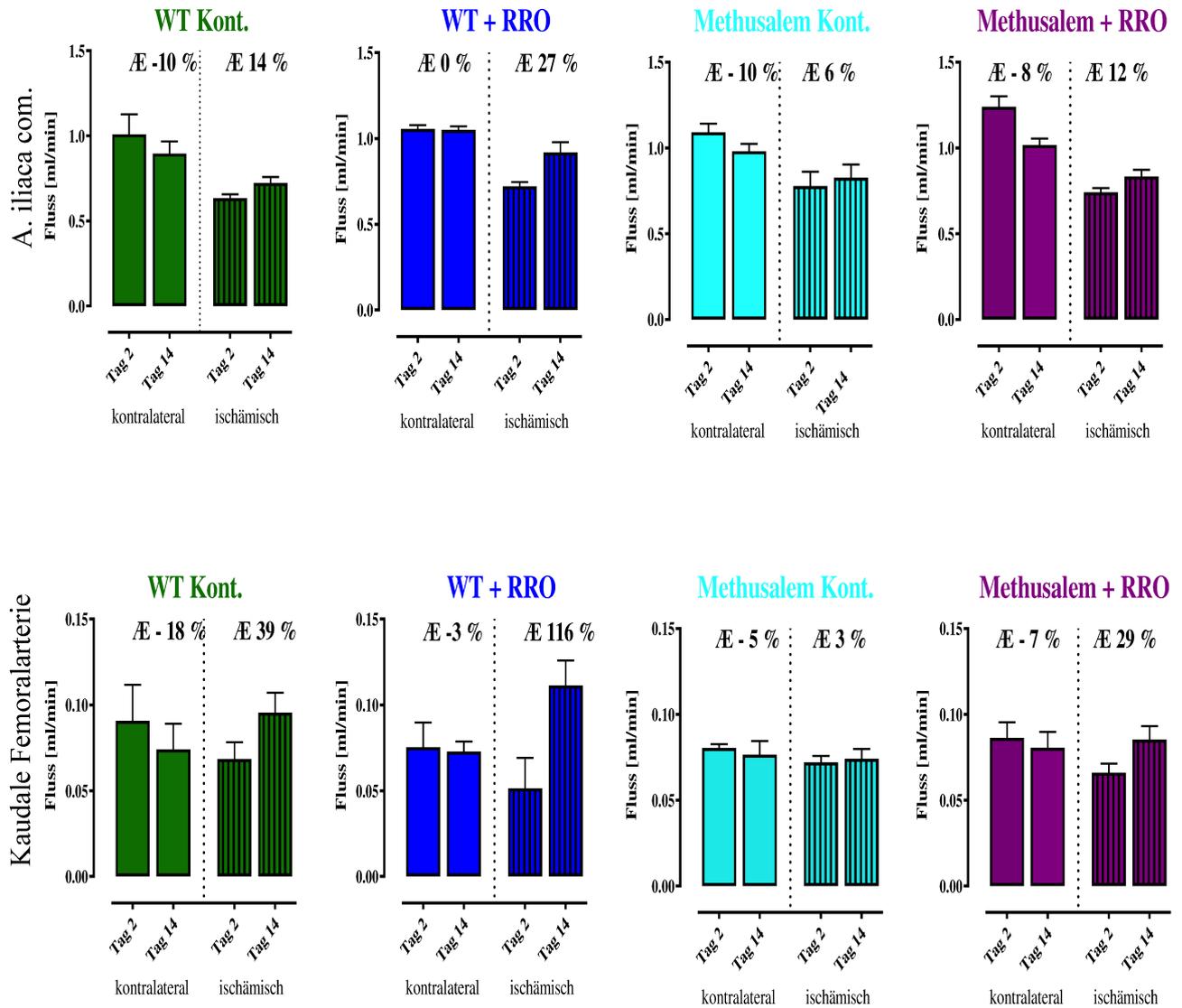
An Tag 14 nach Hinterlaufischämie-Induktion zeigte sich in der Gruppe der Methusalem Mäuse eine tendenziell geringgradige Erhöhung des Blutflusses im operierten Hinterlauf vergleichend zum zweiten postoperativen Tag (Zunahme [Methusalem Kont]. AIC 6% ± 3, CFA 3% ± 1). Einhergehend zeigte sich ebenfalls eine Reduktion des Blutflusses am kontralateralen Hinterlauf. Die Blutflussänderungen zeigten sich deutlich vermindert im Vergleich zu den Ergebnissen der WT Kontrollgruppen.

Unter *repetitiv remote occlusion* wurde eine Erhöhung der Blutflussparameter für den operierten Hinterlauf der Methusalem Gruppe (AIC 12% ± 1) und insbesondere dem Kollateralstromgebiet verzeichnet (CFA 29% ± 3).

Eine signifikante Erhöhung des Blutflusses im operierten Hinterlauf an Tag 14 postoperativ gegenüber den Methusalem Kontrollgruppen konnte ebenso für die Gruppe Methusalem + Cinaciguat verzeichnet werden. Hierbei zeigte sich keine signifikante Steigerung gegenüber der Gruppe Methusalem + RRO-Intervention (Zunahme [Methusalem + Cinaciguat] AIC 16% ± 4, [Methusalem + RRO] 12% ± 1,  $p > 0.05$ ).

Für die Gruppen unter Kombination von *repetitiv remote occlusion* und Cinaciguat Applikation zeigte sich eine signifikante Steigerung des Blutflusses im Zielstromgebiet am Tag 14 postoperativ vergleichend zum zweiten postoperativen Tag und im Vergleich zu allen anderen Methusalem Gruppen (Zunahme [Methusalem + Cinaciguat + RRO] AIC 21% ± 2, CFA 52% ± 4,  $p$ [vs Methusalem Kont.] $<0.05$ ).

## Ergebnisse



**Abbildung 35: Flussgeschwindigkeit.**

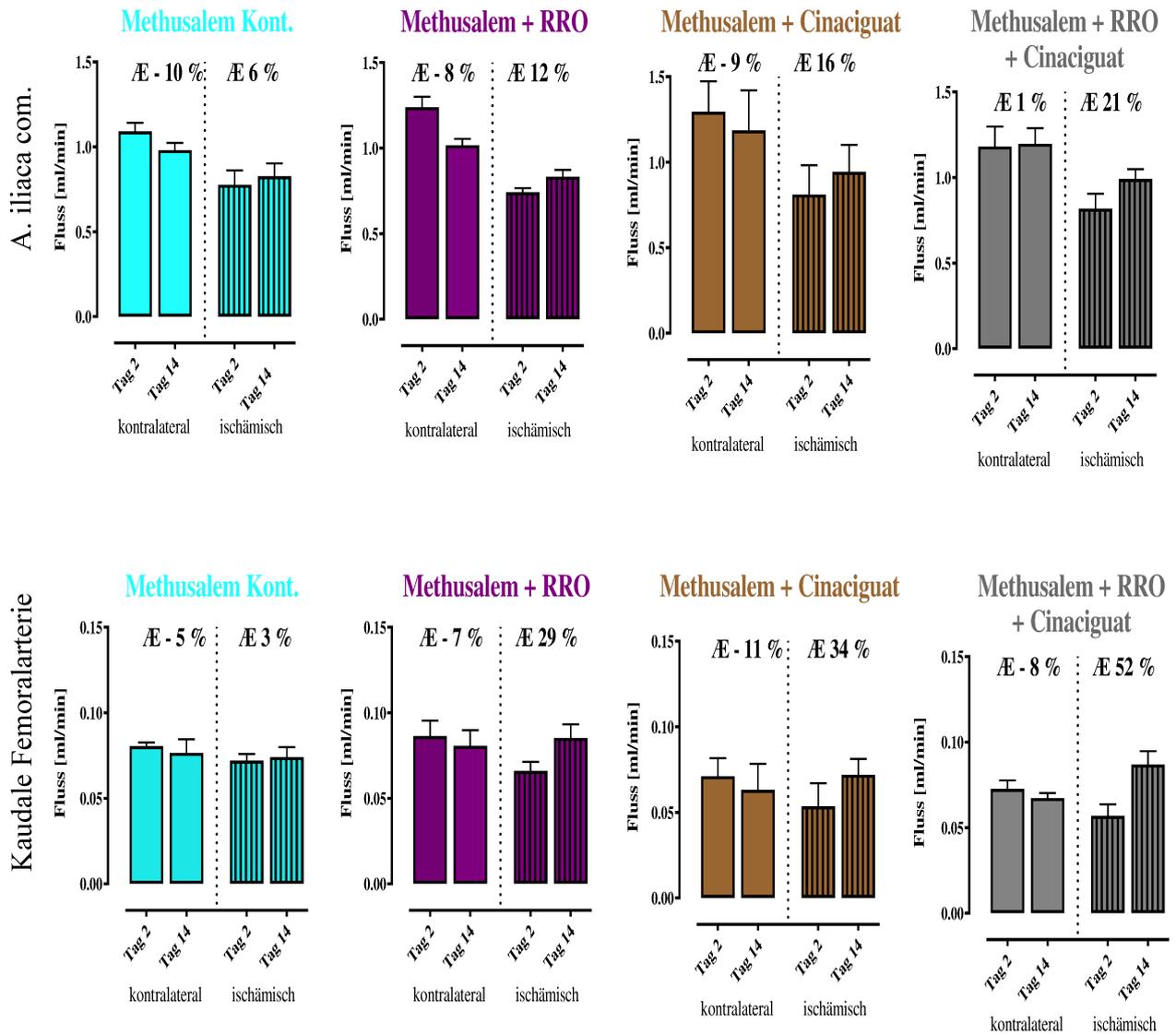
Messung des Gefäßdurchmessers und der durchschnittlichen Flussgeschwindigkeit zur Bestimmung des Flussvolumens.

Aufgeführt sind die Flussvolumina der A. iliaca interna (erste Reihe) und der kaudalen Femoralarterie (zweite Reihe)

beider Hinterläufe (unifarben = un behandelter Hinterlauf, schraffiert = operierter Hinterlauf) an Tag 2 und 14 postoperativ.

WT Kontrolle (grün), WT unter RRO-Intervention (blau), Methusalem Kontrolle (türkis), Methusalem unter RRO-Intervention (lila).

## Ergebnisse



**Abb. 36: Flussgeschwindigkeit.**

Messung des Gefäßdurchmessers und der durchschnittlichen Flussgeschwindigkeit zur Bestimmung des Flussvolumens.

Aufgeführt sind die Flussvolumina der A. iliaca communis (erste Reihe) und der kaudalen Femoralarterie (zweite Reihe) beider Hinterläufe (unifarben = un behandelter Hinterlauf, schraffiert = operierter Hinterlauf) an Tag 2 und 14 postoperativ.

Methusalem Kontrolle (türkis), Methusalem unter *repetitiv remote occlusion* (lila), Methusalem unter Cinaciguat Applikation (braun) und Methusalem + Cinaciguat + *repetitiv remote occlusion* (grau).

## Quantifizierung der Lumenexpansion mittels Gefäßausguss

In der durchgeführten Bestimmungen der Gefäßdurchmesser nach erfolgtem Microfil-Ausguss am Versuchsende zeigten sich für die Gruppe der Methusalem Mäuse eine signifikante Vergrößerung der Kollateralgefäße am operierten Hinterlauf vergleichend zum kontralateralen Hinterlauf [Zunahme CFA  $24\% \pm 3$  ( $p < 0.001$ ) und GA  $17\% \pm 2$  ( $p < 0.01$ )]. Die Differenz der Gefäßdurchmesser zwischen den Hinterläufen war allerdings deutlich erniedrigt gegenüber den Werten der WT Kontrollgruppen (GA  $61\% \pm 6$  [WT Kont.] vs.  $17\% \pm 2$  [Methusalem Kont.])  $p < 0.0001$ ).

Nebenbei auffällig war, dass die basalen Gefäßdurchmesser der Methusalem Mäuse gegenüber den WT Gruppen vergrößert waren. Dies ist am ehesten auf das weiter fortgeschrittene Alter der Methusalem Mäuse zurückzuführen.

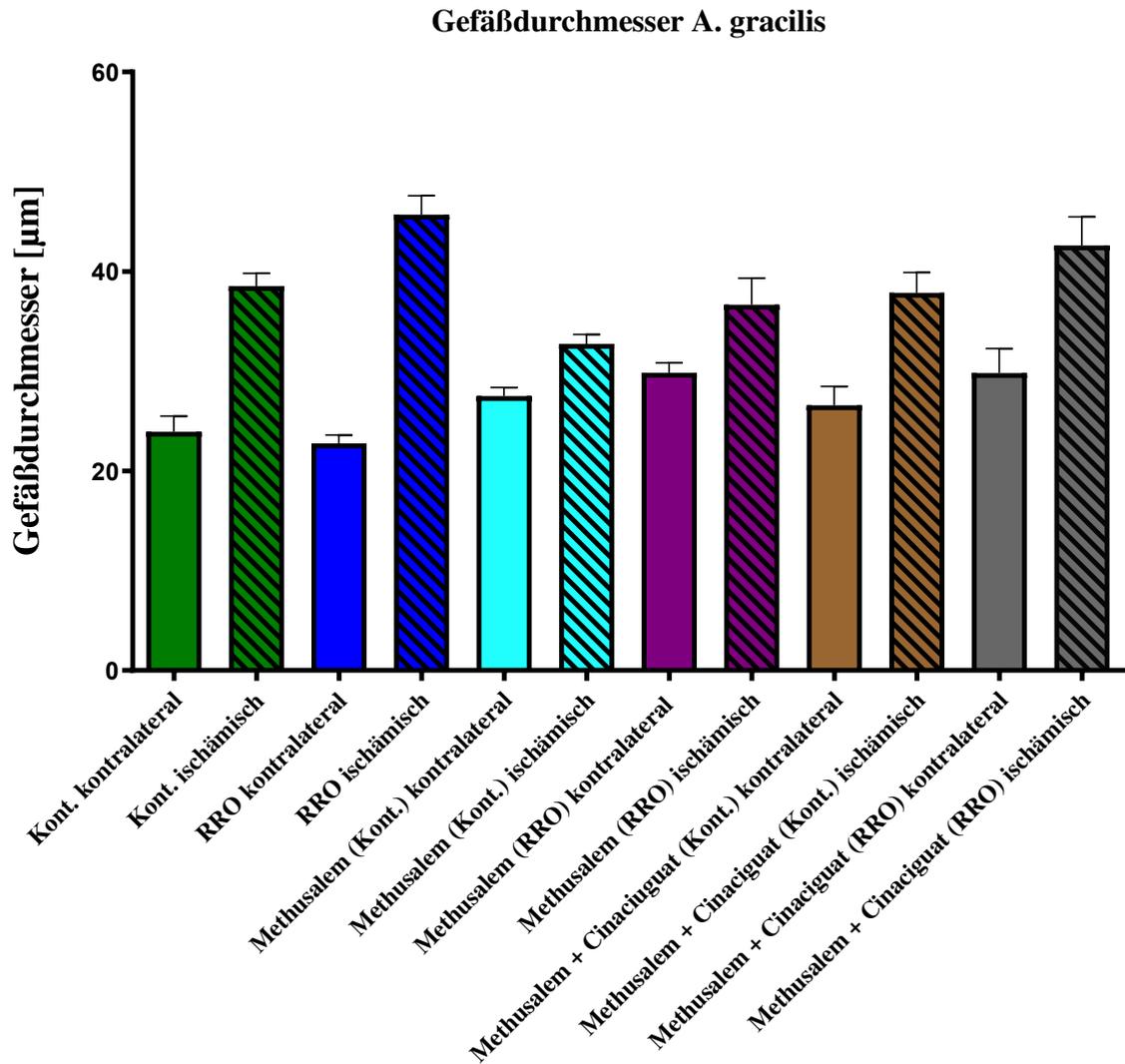
Durch die Anwendung der *repetitiv remote occlusion* konnte bei den Methusalem Mäusen eine signifikante Zunahme des Gefäßdurchmessers der Kollateralgefäße verzeichnet werden. Die Differenz vergleichend zum kontralateralen Hinterlauf war allerdings im Bezug zu WT Gruppen unter *repetitiv remote occlusion* vermindert [Zunahme GA  $24\% \pm 3$  (Methusalem RRO) vs.  $17\% \pm 1$  (Methusalem Kont.)  $p < 0.05$ ].

Unter Cinaciguat Applikation zeigte sich bei den Mäusen der Methusalem Reihe eine signifikante Vergrößerung der Kollateralgefäße am operierten Hinterlauf. Diese Durchmesserzunahme lag auf gleichem Niveau, wie unter *repetitiv remote occlusion*.

Die am stärksten ausgeprägt Zunahme des Gefäßdurchmessers des Kollateralstromgebietes in der Methusalem Gruppe zeigte sich unter Kombination von *repetitiv remote occlusion* und Cinaciguat Applikation [Zunahme CFA  $39\% \pm 3$  ( $p < 0.0001$ ), GA  $43\% \pm 4$  ( $p < 0.0001$ ) Methusalem + RRO + Cinaciguat].

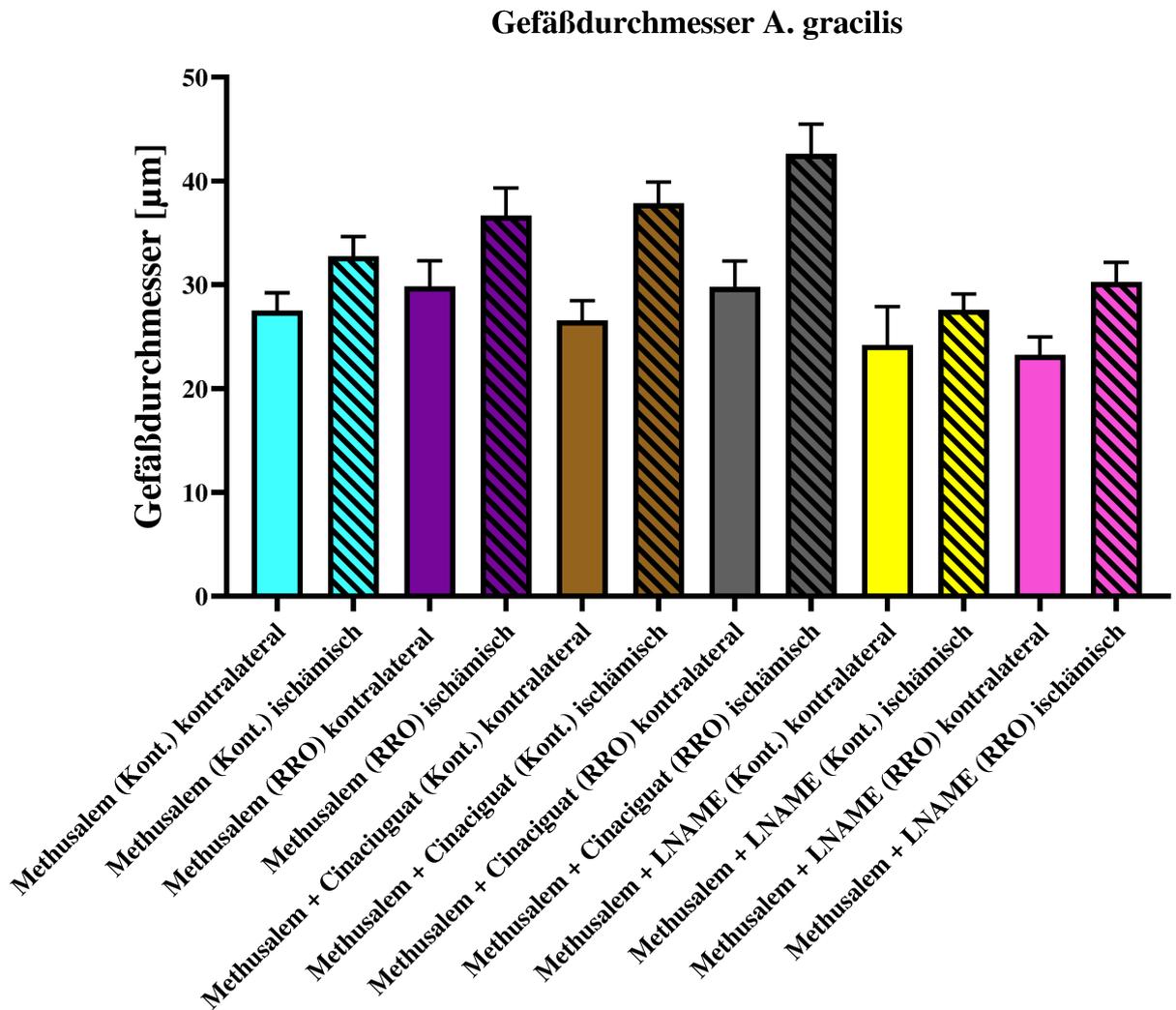
Unter Applikation von L-NAME zeigt sich für die Methusalem Mäuse, dass er zu keiner signifikanten Zunahme der Gefäßdurchmesser kommt [Zunahme GA  $12\% \pm 4$  ( $p > 0.05$ ) Methusalem L-NAME Kont.].

Eine Kombination aus L-NAME-Applikation und *repetitiv remote occlusion* erreichte bei den Methusalem Mäusen keine weitere Zunahme der Gefäßdurchmesser [Zunahme GA  $12\% \pm 4$  (Methusalem L-NAME Kont.) vs  $11\% \pm 5$  (Methusalem L-NAME + RRO),  $p > 0.05$ ].



**Abb. 37: Vaskuläre Morphologie.**

Mikroskopische Analyse des Gefäßdurchmessers nach Mikrofil-Ausguss der Arteria gracilis beider Hinterläufe. Neben der Kontrollgruppe (grün), erhielten Mäuse *repetitiv remote occlusion* (blau). Weiter aufgeführt Methusalem Kontrollen (türkis), Methusalem unter *repetitiv remote occlusion* (lila), Methusalem mit Cinaciguat-Applikation (hellbraun) und Methusalem + Cinaciguat Applikation und *repetitiv remote occlusion* (grau). Aufgezeichnet sind die Gefäßdurchmesser beider Hinterläufe (Kontrolle = unbehandelt, Ischämie = Hinterlauf nach operativer Ischämie-Induktion, gestreift)



**Abb. 38: Vaskuläre Morphologie.**

Mikroskopische Analyse des Gefäßdurchmessers nach Mikrofil-Ausguss der Arteria gracilis beider Hinterläufe. Methusalem Kontrollen (türkis), Methusalem unter *repetitiv remote occlusion* (lila), Methusalem mit Cinaciguat-Applikation (hellbraun) und Methusalem + Cinaciguat Applikation und *repetitiv remote occlusion* (grau), Methusalem mit L-NAME Applikation (gelb) und mit L-NAME Applikation und *repetitiv remote occlusion* (pink). Aufgezeichnet sind die Gefäßdurchmesser beider Hinterläufe (Kontrolle = unbehandelt, Ischämie = Hinterlauf nach operativer Ischämie-Induktion, gestreift)

## 4 Diskussion

### 4.1 Beantwortung der Fragestellung

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Rolle der eNOS im Prozess des flussabhängigen Kollateralenwachstums im Alter. Es wurden Vorversuchsreihen zur Etablierung einer *repetitiv remote occlusion* Intervention durchgeführt und die Relevanz der eNOS und folgender Enzymkaskaden in diesem Prozess an konventionellen Mauslinien dargestellt. Anschließend wurden die Effekte an gealterten Mäusen untersucht. Die Fragestellungen aus Kapitel 2 sind somit folgendermaßen zu beantworten:

1. Durch die Verwendung der *repetitiv remote occlusion* wird das flussabhängige Kollateralenwachstum durch Arteriogenese im Modell der Hinterlaufischämie signifikant gesteigert. Hierbei kommt es zu keiner Beeinflussung des zentralen Hämodynamik.
2. Das Kollateralenwachstum und der Effekt der *repetitiv remote occlusion* sind abhängig von der Funktionalität der endothelialen NO-Synthase. Unter Ausschaltung der eNOS kommt es zu einer Verminderung des Prozesses. Dieser ist ebenfalls von der Funktionalität der sGC abhängig. Eine Inaktivierung der sGC führt zu einer signifikanten Verminderung. Eine gezielte Aktivierung funktionell kompromittierter Anteile der sGC führt bei alten Mäusen zu einer signifikanten Steigerung des Kollateralwachstums.
3. In fortgeschrittenem Alter ist das flussabhängige Kollateralwachstum deutlich vermindert. Es zeigt sich signifikant erhöht unter der *repetitiv remote occlusion*, jedoch in reduzierter Ausprägung. Eine gezielte Aktivierung der sGC durch Cinaciguat im Alter steigert diesen Prozess ebenfalls signifikant. Anders als bei jungen Mäusen, zeigen beide Anwendungen zusammen eine weitere signifikante Zunahme des Kollateralwachstums bei gealterten Mäusen.
4. Eine gezielte Aktivierung der sGC zeigte sich als suffiziente Strategie, um das flussabhängige Kollateralwachstum zu steigern. Dieser Effekt scheint im Alter besonders ausgeprägt zu sein.

Zusammenfassend ist das zentrale Ergebnis dieser Arbeit, dass das flussabhängige Kollateralwachstum in einem eNOS und sGC abhängigen Prozess durch die Anwendung einer *repetitiv remote occlusion* signifikant gesteigert werden kann. Dies zeigt sich ebenfalls bei gealterten Versuchsindividuen und führt auch hier zu einer signifikanten Verbesserung der ischämischen Beeinträchtigung.

## 4.2 Interpretation der Ergebnisse

### Effekte der *repetitiv remote occlusion*

Zu den Kernergebnissen der vorliegenden Arbeit zählt die Erkenntnis, dass die *repetitiv remote occlusion* im Modell der Hinterlaufischämie bei Mäusen zu einer sofortigen Vasodilatation und Perfusionssteigerung des ischämischen Hinterlaufes schon während der Okklusion führt.

Weiter stimulierte die *repetitiv remote occlusion* die Lumenerweiterung und den erhöhten Blutfluss in den Arterien, die in die Kollateralen (CFA) einmünden, sowie in den sich entwickelnden Kollateralarterien (GA) selbst, was zu einer verbesserten Perfusion führte. Darüber hinaus hatte die *repetitiv remote occlusion* keinen Einfluss auf die zentrale Hämodynamik und der Effekt der Blutflusssteigerung blieb auch nach Reperfusion erhalten. Somit ist davon auszugehen, dass die Steigerung der Perfusion im Hinterlauf durch *repetitiv remote occlusion* getriggerte Vasodilatation und nicht durch Änderung der zentralen Hämodynamik erzielt wird. Die Effekte der *repetitiv remote occlusion* waren jedoch bei L-NAME Applikation und NOS3-/- Tieren weitgehend aufgehoben.

Zu Beginn war festzustellen, dass die Perfusion des ischämischen Hinterlaufs bereits während der Okklusion des kontralateralen nicht-ischämischen Hinterlaufs zunimmt. Dies war überraschend, da eine Vielzahl von Autoren der Meinung sind, dass eine Fernreaktion die Freisetzung eines löslichen Faktors, möglicherweise Nitrit, voraussetzen würde, der von der entfernten Stelle freigesetzt wird und seine schützende Wirkung nach Transport durch den Blutstrom zur ischämischen Stelle entfaltet [113]. Im Kontext der hier vorgestellten Daten erscheint dieser Mechanismus im Zusammenhang mit der *repetitiv remote occlusion* als nicht dominierend, da die kontralaterale Vasodilatation bereits früh während der *remote occlusion* auftrat und die Freisetzung eines Faktors aus einer vollständig okkludierten Gefäßstrombahn unwahrscheinlich erscheint.

Eine Art von neurogenem vasodilatatorischem Reflex der Mikrozirkulation als Ursache für den akuten kontralateralen Anstieg des Blutflusses ist nicht auszuschließen. Die stromaufwärts gerichtete Vasodilatation von AIC und CFA könnte durch eine flussabhängige Vasodilatation erklärt werden, da der zeitliche Verlauf mit einer kurzen Verzögerung den Änderungen der Flussgeschwindigkeit folgt, was mit einer erhöhten WSS einhergeht, ähnlich der FMD [114-116].

Verschiedene Mechanismen scheinen im Prozess der *repetitiv remote occlusion* involviert zu sein:

1. Die Okklusion des nicht-ischämischen Hinterlaufes könnte zu einer sofortigen Umverteilung von Blutvolumen zum Gefäßsystem des ischämischen Hinterlaufs führen.
2. Eine bisher unbekannt neurogene Vasodilatation der Mikrozirkulation des ischämischen Hinterlaufes in Antwort auf die *repetitiv remote occlusion* könnte Ursache für den sofortigen Anstieg von Wandscherspannung und Flussgeschwindigkeit in der AIC und CFA sein.
3. Die folgende Zunahme der Gefäßdurchmesser von AIC und CFA mit konsekutiver Steigerung des Blutflusses wird durch die lokale Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase in den versorgenden Leitungsarterien vermittelt.
4. Die anhaltende Reaktion der *repetitiv remote occlusion* nach Ablassen der Manschette, könnte durch zirkulierende Signalstoffe vermittelt werden.

Eine erhöhte Fließgeschwindigkeit, welche eine Steigerung der Wandscherspannung hervorruft, hat sich bei fast allen Spezies als initialer Stimulus für die Expansion von Kollateralen erwiesen [83, 117, 118]. Die hier vorgestellten Ergebnisse unterstützen dies und zeigen, dass eine wiederholte *remote occlusion* einen erhöhten Blutfluss in den Arterien, welche in die Kollateralen (CA) einmünden und in den sich entwickelnden Kollateralarterien (GA) selbst hervorruft, gefolgt von einer Lumenerweiterung mit daraus resultierend verbesserter Perfusion.

Bemerkenswert ist, dass bei Mäusen in Versuchsreihen unter *repetitiv remote occlusion* über die gesamte Beobachtungsdauer kein Verlust von Gliedmaßen zu beobachten war. Es ist anzunehmen, dass die beobachtete Kollateralerweiterung durch den wiederholten WSS-Stimulus ausgelöst werden kann, der wiederum NO freisetzt und zu einer akuten Vasodilatation führt, aber auch durch andere, nachhaltigere Zellsignale. Dies wird durch die Tatsache gestützt, dass die Effekte der *repetitiv remote occlusion* bei Mäusen unter L-NAME Applikation und bei NOS3<sup>-/-</sup> Tieren weitgehend aufgehoben waren. Beide Bedingungen negieren nahezu die flussvermittelte Dilatation der zuführenden Arterien der Hinterläufe, nicht aber die mikrovaskuläre Dilatation [107]. Nicht auszuschließen ist jedoch, dass die anhaltenden Reaktionen auch durch lösliche Faktoren vermittelt werden, welche nach der Reperfusion freigesetzt werden, insbesondere Nitrit. Eine NOS3<sup>-/-</sup>-oder Inhibition würde auch die Nitritfreisetzung nach der Reperfusion hemmen [113, 119].

Bemerkenswert ist, dass sich auch eine wahrscheinlich andere - eNOS-unabhängige - Komponente der Arteriogenese identifizieren lässt, welche auf die Arteriolen beschränkt ist. Dies könnte durch die Freisetzung von proarteriogenen Faktoren erklärt werden. In vielen Studien wurden Moleküle identifiziert, deren Freisetzung ebenfalls durch eine erhöhte Fließgeschwindigkeit vermittelt wird, wie z. B. transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [120], Granulozytenkolonie stimulierender Faktor (GM-CSF) [121] und basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) [122]. Die generelle arteriogene Eigenschaft dieser Substanzen wurde in experimentellen Studien bestätigt [123, 124], wobei meist eine Kombinationstherapie von zwei Substanzen notwendig war, um das gewünschte Ergebnis zu erzielen [125]. Placebokontrollierte klinische Studien zur Stimulation der Arteriogenese durch Anwendung arteriogener Faktoren

## Diskussion

hatten jedoch bisher enttäuschende Ergebnisse. Sie konnten die positiven Effekte, die in Tierstudien dokumentiert wurden, nicht reproduzieren [126-128]. Darüber hinaus wurde selbst in Tierstudien der positivste Effekt auf das koronare oder periphere Kollateralwachstum nur dann gesehen, wenn die proarteriogene Substanz kontinuierlich und intraarteriell in unmittelbarer Nähe des verschlossenen Gefäßes infundiert wurde [129].

Interessanterweise schien in einigen Modellen das arterielle Wachstum nur so lange fortzusetzen, bis sich die Wandscherspannung normalisiert hatte, was darauf hindeutet, dass die Wandscherspannung die Hauptantriebskraft für das arterielle Remodeling ist [130, 131]. Beobachtungen von Eitenmüller et al. bestätigten diese Annahme eindrücklich. Im Versuchsansatz der Arbeitsgruppe wurde die Arteria femoralis von Kaninchen verschlossen und distal des Verschlusses ein arteriovenöser Shunt angelegt. Der größte Teil des kollateralen Flusses wurde unter Beibehaltung einer hohen Wandscherspannung direkt in das venöse System abgeleitet und führte zu einer massiven kollateralen Expansion. Eine Woche nach Verschluss des Shunts wurden ähnliche Leitwerte wie bei der nicht verschlossenen kontralateralen Arterie erreicht [132].

Zusammenfassend erscheint die *repetitiv remote occlusion* eine potentiell geeignete Intervention zur nichtinvasiven Steigerung der Arteriogenese bei PAVK Patienten zu sein, welche nicht einer Revaskularisation zugeführt werden können, oder adjuvant zu jener.

## Bedeutung der eNOS

Die Wichtigkeit der NO-Synthasen, insbesondere der endothelialen NO-Synthase, im Prozess der Arteriogenese und der folgenden Ausbildung von suffizienten Kollateralgefäßen in ischämischen Gewebereichen, wurde bereits vielfach gezeigt [29].

So zeigt sich auch in der vorliegenden Arbeit, dass die endotheliale NO-Synthase und die nachgeschalteten Signalkaskaden Dreh- und Angelpunkt der Arteriogenese sind. Unter Hemmung der eNOS durch die Applikation von L-NAME, einem kompetitiven Hemmstoff mit Bindungsaffinität zum katalytischen Zentrum des Enzyms, war die Lumenexpansion der Kollateralgefäße deutlich reduziert. Ebenso bei Tieren mit homozygotem Verlust der genetischen Information zu Ausbildung der eNOS.

Die Anwendung der *repetitiv remote occlusion* zeigte in diesen Linien keinen positiven Effekt auf die Größe der Kollateralgefäße, was darauf zurückzuführen ist, dass es durch die funktionelle Beeinträchtigung der eNOS nicht zu einer adäquaten Translation des Stimulus der Arteriogenese, nämlich einer erhöhten Wandscherspannung durch einen gesteigerten Blutfluss unter Intervention, kommt. Das Fehlen von NO negiert somit die Wirksamkeit der *repetitiv remote occlusion*.

Eine gleichermaßen verminderte Wirksamkeit der Intervention ist ebenfalls unter selektiver Blockade der sGC durch die Applikation von ODQ zu beobachten. Die Bedeutsamkeit welche der sGC im Rahmen der Arteriogenese zukommt, zeigen die vorgestellten Daten auf.

Sowohl unter Hemmung der eNOS durch L-NAME und dem damit verbundenen Wegfall der Potenzierung der enzymatischen Aktivität der sGC durch NO, als auch unter direkter Hemmung der sGC durch ODQ, zeigt sich gleichermaßen eine Reduktion der Lumenexpansion der Kollateralgefäße mit und ohne Anwendung der *repetitiv remote occlusion*. Somit ist die Funktionalität der sGC ebenfalls ausschlaggebend für die Lumenexpansion der Kollateralgefäße und die Steigerung des Prozesses durch die *repetitiv remote occlusion*.

Untermauert wird diese Annahme weiter dadurch, dass die Anwendung eines Aktivators der sGC zu einer signifikanten Steigerung der Lumenexpansion der Kollateralgefäße führt. Hierbei erfolgt unter Applikation von Cinaciguat eine Entkopplung der NO-sGC-cGMP Achse, da das Enzym nach Bindung von Cinaciguat nicht mehr durch NO stimuliert werden kann. Die nunmehr losgelöste Produktion von cGMP durch die aktivierte sGC führt zur Lumenvergrößerung der Kollateralgefäße.

Die Kombination aus einer dauerhaften Aktivierung der sGC und einer Anwendung der *repetitiv remote occlusion* zeigte in jungen Mäusen keinen Vorteil gegenüber der alleinigen Anwendung der einzelnen Bestandteile. Dies kann einerseits auf die partielle Entkopplung der NO-sGC-cGMP Achse durch die Bindung von Cinaciguat und damit verminderten Translation der erhöhten Wandscherspannung der *repetitiv remote occlusion* zurückzuführen sein. Folgend kommt es zu einer verminderten cGMP Produktion vergleichend zur alleinigen Anwendung der Intervention.

## Diskussion

Andererseits scheint es vor dem Hintergrund, dass der sGC Aktivator Cinaciguat nahezu ausschließlich an die katalytische Hämgruppe der sGC im funktionell eingeschränkten oxidierten Zustand bindet, ebenfalls möglich, dass in jungen Mäuse nur ein geringer Anteil der sGC im funktionslosen Redoxstatus vorliegt. Anders verhält es sich in den gealterten Versuchsgruppen, was im Folgenden genauer beleuchtet wird.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der eNOS und dem nachgeschalteten NO-sGC-cGMP Signalweg eine bedeutende Funktion in Bezug auf die flussabhängige Ausbildung von Kollateralen zukommt.

## Effekte im Alter

Vaskuläre Alterungsprozesse starten bereits in jungen Jahren durch langsam progressive vaskuläre Transformation. Die morphologischen Veränderungen beinhalten Verdickungen der Intima-Media, vaskuläre Hypertrophie bzw. Hyperplasie und Restrukturierungen der extrazellulären Matrix [103]. Ebenso zeigt sich eine altersabhängige endotheliale Dysfunktion, welche auf die verminderte Bioverfügbarkeit von NO zurückzuführen ist [133].

Obwohl eine Vielzahl an Mechanismen und Auswirkungen des vaskulären Alterungsprozesses bekannt sind, existieren nach wie vor eine Vielzahl an Modellen und Theorie über den grundlegenden Faktor der vaskulären Alterung.

Die Theorie der vaskulären Seneszenz, hervorgerufen durch das Aufkommen und die Zunahme von oxidativem Stress im Alter, ist hierbei bezogen auf die kardiovaskuläre Alterung von größter Bedeutung. Diese bereits 1956 beschriebene Theorie legt die Beeinträchtigung von zellulären Funktionen durch das vermehrte Aufkommen von freien Radikalen und der damit verbundenen Veränderung von Enzymen durch Redoxreaktionen am katalytischen Zentrum oder anderen zellulären Makromolekülen als treibender Prozess der vaskulären Alterung dar [134]. Hierbei ist auch die oben beschriebene NO-sGC-cGMP-Kaskade über oxidative Beeinträchtigung der eNOS und sGC durch das vermehrte Aufkommen von freien Radikalen Angriffspunkt des Prozesses.

In vorhergegangenen Publikationen wurde bereits mehrfach gezeigt, dass die funktionelle Erholung gealterter Mäuse (18 Monate) im Modell der Hinterlaufischämie deutlich reduziert war in Bezug auf jüngere Mäuse (3 Monate). Grund hierfür ist die verminderte Kapazität der gealterten Mäuse Kollateralgefäße zur Revaskularisierung ischämischer Gewebereiche durch Arteriogenese umzubauen und zu vergrößern, da sowohl die Funktionalität der eNOS, als auch die Ausbildung jener beeinträchtigt ist und Endothel – und glatte Muskelzellen eine erhöhte Anfälligkeit zur Apoptose zeigen [135].

So resultiert aus der vaskulären Seneszenz, potentiell ausgelöst durch ein erhöhtes Aufkommen von freien Radikalen, mit Beeinträchtigung der eNOS abhängigen Arteriogenese eine verminderte Lumenexpansion von Kollateralgefäßen in gealterten Mäusen. Dies führt zu einer deutlichen Hemmung der Rekonvaleszenz nach Induktion einer Hinterlaufischämie.

Diese Beobachtungen können auch in den vorgestellten Daten nachvollzogen werden, zeigen doch Mäuse der Methusalem Reihe eine signifikant verminderte Lumenexpansion der Kollateralgefäße und funktionelle Perfusionssteigerung in den LDI Messungen.

## Diskussion

Die Anwendung der *repetitiv remote occlusion* führte in dieser Reihe zu einer signifikanten Verbesserung der Ergebnisse, allerdings zeigte sich der prozentuale Anstieg des Kollateralgefäßdurchmessers und der Perfusion in den LDI Messungen vermindert in Bezug zu Jungmäusen. Grund hierfür kann ein höherer Anteil an Beeinträchtigung der eNOS und damit der NO-sGC-cGMP Signalkaskade sein. Untermauert wird dies durch die Ergebnisse aus der Cinaciguat Applikation. Hierbei konnte eine Steigerung der Lumenexpansion der Kollateralgefäße und der Perfusion im chronisch ischämischen Hinterlauf in nahezu gleichem Ausmaß wie unter *repetitiv remote occlusion* verzeichnet werden. Das Vorhandensein einer größeren Anzahl von sGC im oxidierten und damit funktionell kompromittierten Zustand durch das erhöhte Aufkommen von freien Radikalen im Alter, bildet eine erhöhte Angriffsfläche für den sGC Aktivator Cinaciguat, welcher - wie bereits beschrieben - eine höhere Affinität zur sGC im Fe<sup>3+</sup> Zustand besitzt.

Unter L-NAME Applikation zeigt sich bei Methusalem Mäusen ebenfalls eine deutliche Reduktion der Kollateralbildung. Auch wenn der Anteil an funktionell kompromittierter sGC in alten Mäusen potentiell höher zu sein scheint, wird hieraus deutlich, dass die Funktion der eNOS ausschlaggebend für die Bildung der Kollateralgefäße ist. Die Anwendung der *repetitiv remote occlusion* in Kombination mit einer L-NAME Applikation brachte bei Methusalem Mäusen durch die Hemmung der eNOS und damit unterbrochenen Signalweiterleitung der Scherspannungssteigerung keine Steigerung der Kollateralausbildung.

Die Kombination aus *repetitiv remote occlusion* und Cinaciguat Applikation zeigt bei Methusalem Mäusen im Gegensatz zu Jungmäusen eine additive Wirkung auf die Lumenexpansion der Kollateralgefäße und darüber der funktionellen Perfusionserholung. Es scheint hierbei, dass über die *repetitiv remote occlusion* und der verbundenen Steigerung der Wandscherspannung auch in gealterten Mäusen ein Stimulus zur verstärkten Arteriogenese durch die funktionell unbeeinträchtigten eNOS und sGC gesetzt werden kann. Durch die zusätzliche Applikation von Cinaciguat kann hierbei weiter der Teil der Signalkaskade aktiviert werden, welcher aufgrund der vaskulären Seneszenz durch Redoxreaktionen in seiner Funktionalität beeinträchtigt ist. Hieraus kann sich der beobachtete additive Effekt aus *repetitiv remote occlusion* und Cinaciguat Applikation bei Methusalem Mäusen auf die Lumenexpansion der Kollateralgefäße erklären. Da in Jungmäusen ein potentiell deutlich geringerer Anteil an funktionsgehemmter Transduktionsenzyme vorliegt, ist dieser Effekt hier nicht zu beobachten.

Somit ist zusammenfassend festzuhalten, dass im Alter die Arteriogenese bei Kollateralgefäßen im Modell der Hinterlaufischämie sowohl durch Anwendung der *repetitiv remote occlusion*, als auch durch gezielte Aktivierung der sGC gesteigert werden kann. Die positiven Effekte auf die Lumenexpansion der Kollateralgefäße addieren sich darüber hinaus. Grund hierfür kann in einer höheren Anzahl an funktionell beeinträchtigter eNOS und sGC durch Redoxreaktionen mit freien Radikalen sein.

### Unterschiede zwischen *repetitiv remote occlusion* und ischämischer Fernpräkonditionierung

Przyklenk et al. entdeckten 1993 eine aus der Distanz vermittelte ischämische Präkonditionierung (RIPC) an Kardiomyozyten. Hierbei wurde der bereits bekannte Prozess der ischämischen Präkonditionierung, welche über vorhergegangene kurze Zyklen von Ischämie und Reperfusion die Größe des Organinfarktes durch die folgende Indexischämie verringern könnte, um den Aspekt erweitert, dass die Präkonditionierung auch organfern erfolgen kann .

Es ist nicht überraschend, dass sich augenscheinlich unsere Methode - die *repetitiv remote occlusion* - nicht von Methoden unterscheidet, die andere als RIPC bezeichnet haben. Eine Vielzahl an Studien konnte bereits den positiven Effekt einer kurzen Hinterlaufischämie zur Präkonditionierung der Kardiomyozyten zeigen. Dies führte in den verwendeten Tiermodellen zu einer verminderten Infarktgröße und einer reduzierten Freisetzung von Herzenzymen bei der folgenden Indexischämie. Die Anwendung dieses Verfahrens erfolgt am Menschen aktuell zumeist über das zyklische Auf- und Ablassen einer Blutdruckmanschette an der oberen Extremität.

Interessanterweise wurde auch gezeigt, dass die kontralaterale RIPC der Hintergliedmaße die Lappeninfarktgröße und die Muskelnekrose reduziert, sowie den Erythrozytenfluss in Tiermodellen verbessert [136-141]. Diese Studien zeigten, dass RIPC mit einer besseren Mikrozirkulation, einem verminderten Anhaften von Leukozyten am Endothel und einer Reduktion der endothelialen Dysfunktion sowie einem besseren kapillaren Blutfluss mit terminaler arteriolärer Dilatation assoziiert ist [142] . Es wird angenommen, dass die schützende Wirkung von RIPC entweder durch die Freisetzung von biochemischen Botenstoffen in der Zirkulation oder durch die Aktivierung von Nervenbahnen vermittelt wird, was zur Freisetzung von Botenstoffen führt, die eine schützende Wirkung haben. Adenosin, NO, PKC, Bradykinine, Katecholamine, Opioide, freie Radikale und Zytokine sind Kandidatenmechanismen, die Teil einer komplexen Kaskade sind, die an der Transduktion des Präkonditionierungseffekts beteiligt ist, wobei sich neurogene und humorale Wege überschneiden. Rassaf et al. konnten die Bedeutung von Änderungen der Wandscherspannung unter RIPC auf die Aktivität der eNOS zeigen [113]. Hierbei obliegt der protektive Effekt der RIPC ebenfalls der Freisetzung des Botenstoffes NO und dessen Zirkulation zum Zielorgan. Dem entgegengesetzt stellt die *repetitiv remote occlusion* ein lokoregionales Verfahren zur akuten Steigerung des Kollateralwachstums dar, welche potentiell nicht auf zirkulierende Botenstoffe aus der ischämischen Extremität unter Okklusion angewiesen ist. Stimulus ist die Erhöhung der Wandscherspannung durch eine Blutflusssteigerung im Gefäßbett der Zielextremität und folgender Steigerung der eNOS-abhängigen Arteriogenese. Somit stellt die *repetitiv remote occlusion* ein eigenständiges Verfahren im Vergleich zur RIPC dar, wenngleich nach aktuellem Stand der Wissenschaft ein positiver Effekt durch *remote ischemia* zusätzlich denkbar ist.

Weiter ist im Gegensatz zur *repetitiv remote occlusion* jedoch auch bekannt, dass RIPC entweder vor, während oder kurz nach dem ischämischen Ereignis appliziert werden kann, und dass seine positive Wirkung von einer erfolgreichen Revaskularisierung des verschlossenen Gefäßes abhängig ist.

Daher handelt es sich bei RIPC und *repetitiv remote occlusion* in Bezug auf den Wirkmechanismus um zwei voneinander unabhängige Prozesse.

## 4.3 Limitationen

### Einfluss des vegetativen Nervensystems

Im Rahmen der vorliegenden Ergebnisse wurde die Rolle des vegetativen Nervensystems auf die beobachteten Ergebnisse nicht untersucht.

Die bloße Reduktion des Gesamtgefäßdurchmessers durch einen temporären Gefäßverschluss der kontralateralen Hintergliedmaße kann nicht vollständig die gleichzeitige Flusserrhöhung innerhalb des kollateralen Gefäßsystems, die zu einer flussvermittelten Dilatation und konsekutiver Arteriogenese führt, erklären. Die Flussgeschwindigkeit wird durch die Herzfrequenz und den Blutdruckgradienten zwischen dem proximalen Einstrom und dem distalen Ausstrom bestimmt. In der vorliegenden experimentellen Studie blieben Herzfrequenz und systemischer Blutdruck während der Manschettenokklusion konstant. Die Zunahme der Fließgeschwindigkeit kann nur durch eine periphere Vasodilatation der resistenten GefäÙe erklärt werden, die zu einem erhöhten arteriellen Abfluss führt und damit den Druckgradienten erhöht, ähnlich wie es als schnelle periphere Vasodilatation zu Beginn der Belastung beschrieben wird [143]. Der Mechanismus für die schnelle Vasodilatation ist nicht gut verstanden. Es wurden mehrere mögliche Mechanismen diskutiert: metabolisch, neural, mechanisch. Unter diesen scheint eine metabolisch induzierte Vasodilatation unwahrscheinlich zu sein, wenn man die Zeit bedenkt, die für die Diffusion vasoaktiver Substanzen vom Skelettmuskelfibrozyten an der Stelle der Manschettenokklusion zur entfernten vaskulären glatten Muskulatur der kontralateralen HintergliedmaÙe benötigt wird. Der periphere Gefäßtonus wird reziprok durch sympathische Vasokonstriktion und nitric oxide vasodilatatorische Nerven reguliert. Periphere nitric oxide Nerven sind weit verbreitet und bewirken eine Relaxation der glatten Muskulatur durch neurale NO-Synthase (nNOS) abhängige NO-Freisetzung [144].

Der Entzug des Sympathikustonus (Sympathektomie oder Behandlung mit Ganglienblockern) verhinderte die initiale Vasodilatation nicht [145, 146], was darauf hinweist, dass keine sympathische Komponente beteiligt ist. Die akute Erhöhung des extravaskulären Drucks durch mechanische Muskelkompression führt jedoch zu einer signifikanten Vasodilatation mit einem ähnlichen zeitlichen Verlauf wie der Anstieg des Blutflusses [143, 147] und regelt die nNOS-Expression systemisch im Skelettmuskel hoch [148]. Es ist daher denkbar, dass die frühe periphere Vasodilatation der HintergliedmaÙe während der Manschettenokklusion der kontralateralen HintergliedmaÙe über neurale Bahnen vermittelt wird.

### Stärken und Schwächen des Hinterlaufischämie Modells

Das Modell der Hinterlaufischämie beinhaltet die gezielte Unterbrechung der arteriellen Blutzufuhr und folglich die Induktion einer dauerhaften Ischämie abhängig vom verschlossenen Gefäß. Es ist bis heute das am meisten verwendete und am genauesten untersuchte präklinische in vivo Modell zur Erforschung der Arteriogenese. Die Hinterlaufischämie wurde zur Gewinnung detaillierter Informationen über die mechanischen und therapeutischen Aspekte der Revaskularisierung ischämischer Extremitäten verwendet [149, 150]. Die Rolle etwa einer Vielzahl von Zytokinen wie VEGF [151], einer virusbasierte Gentherapie [152], Zelltransduktionssystemen durch Nanopartikel [153], Mononukleär- und Stammzellen [154, 155] im Rahmen der Arteriogenese und Angiogenese wurden basierend auf dem Modell der Hinterlaufischämie untersucht.

Darüber hinaus wurde das Modell beispielsweise ebenfalls zur Darstellung der positiven Effekte von mechanischen Interventionen wie der extrakorporalen Stoßwellentherapie oder der gepulsten Magnetfeldtherapie auf ischämisches Gewebe angewendet [156, 157].

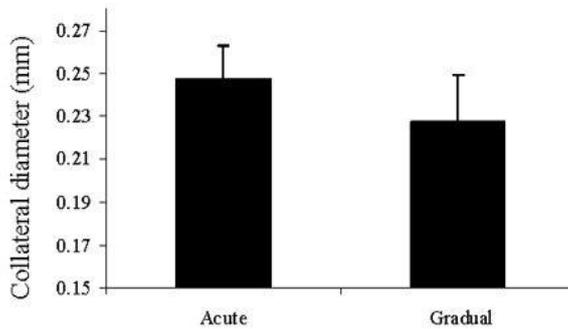
Obwohl das Modell auch bereits an größeren Säugetieren angewendet wurde, bleiben Nagetiere die am meisten verwendete Gruppe an Versuchstieren. Die Verwendung von Mäusen ermöglicht es, auf eine Vielzahl an genetischen Stämmen zurückzugreifen, wohingegen der Einsatz von beispielsweise Schweinen als Versuchstiere eine akkuratere Darstellung der menschlichen Strömungssituationen ermöglicht.

Die Hinterlaufischämie wird als das relevanteste Modell zur klinischen Übertragung der gewonnenen Ergebnisse auf die periphere arterielle Verschlusskrankheit angesehen, jedoch ist es nicht in der Lage, die komplexen pathophysiologischen Gegebenheiten im Menschen vollständig zu simulieren.

Die Induktion der Ischämie erfolgt über den akuten Verschluss des angezielten arteriellen Zugflussstromgebietes. Vorteil hierbei, ist dass der Grad der folgenden Ischämie und die Ausprägung der folgenden Kollateralkreisläufe kontrolliert über die Auswahl des zu verschließenden Gefäßes gesteuert werden kann. Im Menschen jedoch bildet sich die chronische Extremitätenischämie als Folge eines chronisch progredienten Prozesses, welcher mit der Ausbildung atherosklerotischer Plaques über Jahre bis Jahrzehnte assoziiert ist.

Hieraus bildet sich eine Limitation der erhobenen Daten in Bezug auf die Übertragbarkeit zur Pathophysiologie im Menschen. Jedoch ist aufzuführen, dass es im direkten Vergleich zu Modellen der Hinterlaufischämie, in welchen die Induktion der Ischämie progredient graduell und damit der PAVK sehr ähnlich erfolgt, zu keinem signifikanten Unterschied der Lumenexpansion der Kollateralgefäße kommt [158].

4F



**Abb. 39: Kollateraldurchmesser akute vs. graduelle HLI [158]**

Ein weiterer wichtiger Aspekt des Modells sind die Eigenschaften der verwendeten Mauslinien. Mäuse vom C57BL/6 Hintergrund zeigen eine schnellere Erholungsrate der Extremitätenperfusion nach Induktion einer Ischämie, durch eine höhere Kapazität an bereits vorhandenen Kollateralkreisläufen. Dies könnte den Blick auf die ausgewiesenen Ergebnisse zur Perfusionserholung beeinflussen, beziehungsweise den tatsächlichen Effekt der Anwendungen bezogen auf den Menschen abmildern. Es liegen jedoch die meisten Vergleichsdaten mit C57BL/6 Mäusen vor, die Verwendung von Mäusen der Linie BALB/c oder Swiss erscheint wenig sinnvoll, da diese eine deutlich stärker ausgeprägte inflammatorische und angiogenetische Reaktionen auf eine Ischämie zeigen und damit eher zur Beobachtung der Relevanz dieser Mechanismen dienen [159].

Der Vorteil des Vorhandenseins einer höheren Kollateralkapazität für die vorliegende Arbeit, liegt in der einfachen und sicher reproduzierbaren Ansteuerung eines bestimmten Kollateralgebietes abhängig vom Ort des operativ verschlossenen Stromgebietes.

Folglich ist zusammenfassend festzuhalten, dass das in dieser Arbeit verwendete Modell der Hinterlaufischämie der Simulation einer PAVK nach aktuellem Stand der Wissenschaft am gerechtesten wird. Es dient somit bestmöglich der Beantwortung der Fragestellungen, obgleich es doch die komplexen Gegebenheiten der pathophysiologischen Grundlagen im Menschen nicht vollständig widerspiegelt.

## Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse auf den klinischen Alltag

Kritikpunkt vorhergegangener Arbeiten zur Erforschung theoretische Grundlagen und therapeutischer Anwendungen der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit über präklinische in vivo Modelle ist die fehlende Übertragbarkeit in den klinischen Alltag. Kernpunkt hierbei ist der Hintergrund, dass die Modelle unter Verwendung von 8-12 Wochen alten Jungmäusen der klinischen Konstellation aus höherem Alter und Aufkommen der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit nicht ausreichend gerecht werden.

Da der Großteil der Patienten mit PAVK fortgeschrittenen Alters ist, muss der experimentelle Ansatz der verminderten regenerativen Kapazität und reduzierten dynamischen Antwort auf gesetzte Stimuli entsprechen.

Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit gezielt Mäuse der Methusalem Reihe verwendet, welche ein Mindestalter von 24 Monaten aufweisen. Je nach verwendetem Rechenmodell und biologischer Grundlage, liegt das vergleichende Alter einer 24 Monate alten Maus bei 60-80 Jahren im Menschen [160]. Diese aufwändige Anpassung an die Grundgegebenheiten der PAVK im Menschen, ermöglicht eine bessere Translation der gewonnenen Ergebnisse auf die tatsächliche klinische Praxis.

Wie bereits dargestellt zeigt sich der positive Effekt der *repetitiv remote occlusion* ebenfalls in den untersuchten älteren Mäusen, wenn auch insgesamt reduziert. Weiter lässt sich auch hier eine deutliche Abhängigkeit von der eNOS und folgender Enzymkaskaden nachvollziehen. Zusätzlich bringt die Aktivierung der sGC einen weiteren positiven Effekt für gealterte Versuchsreihen, welcher in Jungmäusen nicht zu beobachten ist.

Für die Translation auf den Menschen ergibt sich hieraus, dass sich zwei zusätzliche Angriffspunkte zur Therapie der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit durch die neuen Erkenntnisse der Arbeit dargestellt haben. Die Anwendung einer *repetitiv remote occlusion* am Menschen über eine Blutdruckmanschette stellt eine potentiell wirksame und gleichzeitig kostengünstige und einfach durchzuführende Intervention dar, welche die Arteriogenese an chronisch ischämischen Extremitäten stimulieren und die defizitäre Situation nachhaltig verbessern könnte.

Dieser bisher einzig dem strukturierten Gehstreckentraining vorbehaltender Effekt, kann eine sinnvolle therapeutische Ergänzung bei Patienten sein, welche aus unterschiedlichsten Gründe, wie beispielsweise orthopädischen Komorbiditäten, dieser nicht nachkommen können.

Weiterhin zeigte sich die Aktivierung der sGC durch Wirkstoffe wie Cinaciguat als potentiell effektive pharmakologische Therapie. Anders als die aktuelle begrenzte Auswahl an pharmakologischen Optionen bei der PAVK, erscheint der Ansatz der Wirkweise durch Stimulation der Arteriogenese teilweise kurative Aspekte zu haben.

## 4.4 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorgestellte Arbeit hat sich mit den Hintergründen des flussabhängigen Kollateralwachstums im experimentellen Modell der Hinterlaufischämie bei Mäusen beschäftigt. Hierbei wurde ein besonderes Augenmerk auf die Rolle der eNOS in diesem Prozess und die Auswirkungen des Alters gelegt. Dies diente zum Erkenntnisgewinn bezüglich grundlegender Mechanismen und potentieller therapeutischer Ansatzpunkte bei der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit.

Die Atherosklerose gehört als Grunderkrankung zu den weltweit häufigsten Auslösern für kardiovaskuläre Todesfälle. Die Manifestation der Atherosklerose in peripheren Gefäßabschnitten wird als periphere arterielle Verschlusskrankheit bezeichnet. Häufigster Manifestationsort ist hierbei die untere Extremität mit luminaler Verengung durch Plaquebildung und folgender Einschränkung der arteriellen Versorgung. Eine wichtige Rolle zur Aufrechterhaltung der Versorgung des ischämischen Gewebes stellt die Arteriogenese dar. Hierbei werden bestehende kleine Arterien durch den Reiz der Blutflusszunahme zu größeren Gefäßen umgebaut. Über jene erfolgt eine Umgehung der atherosklerotischen Verengung und die Gewebeversorgung wird aufrechterhalten. Wichtigste therapeutische Intervention ist hierbei für Patienten mit PAVK das strukturierte Gehstreckentraining zur Steigerung der Arteriogenese. Bedingt durch Komorbiditäten können allerdings bis zu einem Drittel der PAVK Patienten nicht am Gehstreckentraining teilnehmen.

Über eine operative Induktion einer einseitigen Hinterlaufischämie bei Mäusen wurde die PAVK im Modell simuliert. Es wurden verschiedene Anwendungen getestet und Perfusions- sowie morphologische Daten erhoben, um die Auswirkungen auf die Arteriogenese und die Abhängigkeit von der eNOS zu untersuchen.

Hierbei zeigte sich, dass die *repetitiv remote occlusion* über die Anwendung einer Stauungsmanschette am nicht-ischämischen kontralateralen Hinterlauf die Perfusion verbessern und die Lumenexpansion der Kollateralgefäße stimulieren kann. Dieser Effekt zeigte sich abhängig von der Funktionalität der eNOS und der sGC. Bei gealterten Mäusen zeigte sich dies ebenfalls, mit der Besonderheit, dass ein zusätzlicher positiver Effekt über die Aktivierung der sGC durch Cinaciguat erreicht werden konnte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bieten zahlreiche interessante Ansatzpunkte für weitere Forschung, sowohl klinischer als auch experimenteller Natur. Hierbei zu nennen wäre die Anwendung einer *repetitiv remote occlusion* am Menschen und der Evaluierung ihrer positiven Effekt auf die Perfusion bei Patienten mit PAVK. Weiterhin sind aktuell keine klinischen Studien zur Wirksamkeit von Cinaciguat bei Patienten mit PAVK bekannt. Experimentell wäre eine weitere interessante Fragestellung, welche molekulargenetischen Prozesse eine Rolle spielen unter Anwendung der *repetitiv remote occlusion*.

## 5 Literaturverzeichnis

1. *Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region*. 2018, World Health Organization: Geneva.
2. R., V., *Virchow IV. Thrombose und Embolie. In Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medizin*. 1856, Berlin: Meidinger Sohn.
3. O'Rourke, K., et al., *Cardiovascular Disease Worldwide, 1990-2013*. *Jama*, 2015. **314**(18).
4. Duvall, W.L. and D.A. Vorchheimer, *Multi-bed vascular disease and atherothrombosis: scope of the problem*. *J Thromb Thrombolysis*, 2004. **17**(1): p. 51-61.
5. H. Lawall, S.D., P. Huppert, I. Kopp, G. Rümenapf, J. Tacke, and K.L. Schulte, *S3-Leitlinie PAVK - Diagnostik, Therapie und Nachsorge der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit*. *Vasa*, 2016. **45**(Supplement 95): p. 1-96.
6. Gerhard-Herman, M.D., et al., *2016 AHA/ACC Guideline on the Management of Patients With Lower Extremity Peripheral Artery Disease: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines*. *Circulation*, 2017. **135**(12): p. e686-e725.
7. Fowkes, F.G., et al., *Peripheral artery disease: epidemiology and global perspectives*. *Nat Rev Cardiol*, 2017. **14**(3): p. 156-170.
8. Conte, S.M. and P.R. Vale, *Peripheral Arterial Disease*. *Heart Lung Circ*, 2018. **27**(4): p. 427-432.
9. Aboyans, V., et al., *The general prognosis of patients with peripheral arterial disease differs according to the disease localization*. *J Am Coll Cardiol*, 2010. **55**(9): p. 898-903.
10. Gardner, A.W., P.S. Montgomery, and D.E. Parker, *Physical activity is a predictor of all-cause mortality in patients with intermittent claudication*. *Journal of Vascular Surgery*, 2008. **47**(1): p. 117-122.
11. Garg, P.K., et al., *Physical activity during daily life and mortality in patients with peripheral arterial disease*. *Circulation*, 2006. **114**(3): p. 242-8.
12. Nordanstig, J., et al., *Walking performance and health-related quality of life after surgical or endovascular invasive versus non-invasive treatment for intermittent claudication--a prospective randomised trial*. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2011. **42**(2): p. 220-7.
13. Murphy, T.P., et al., *The Claudication: Exercise Vs. Endoluminal Revascularization (CLEVER) study: rationale and methods*. *J Vasc Surg*, 2008. **47**(6): p. 1356-63.

## Literaturverzeichnis

14. van Schaardenburgh, M., et al., *Exercise in claudicants increase or decrease walking ability and the response relates to mitochondrial function*. J Transl Med, 2017. **15**(1): p. 130.
15. Pipinos, II, et al., *Mitochondrial defects and oxidative damage in patients with peripheral arterial disease*. Free Radic Biol Med, 2006. **41**(2): p. 262-9.
16. McDermott, M.M., *Functional impairment in peripheral artery disease and how to improve it in 2013*. Curr Cardiol Rep, 2013. **15**(4): p. 347.
17. McDermott, M.M., et al., *Proximal superficial femoral artery occlusion, collateral vessels, and walking performance in peripheral artery disease*. JACC Cardiovasc Imaging, 2013. **6**(6): p. 687-94.
18. Clagett, G.P., et al., *Antithrombotic therapy in peripheral arterial occlusive disease: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy*. Chest, 2004. **126**(3 Suppl): p. 609S-626S.
19. Aumüller G, A.G., Engele J, et al, *Anatomie*. 2014, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
20. Faculty of Biological Sciences, U.o.L. *Histology Guide* © [cited 2021 22.03.]; Available from: <https://www.histology.leeds.ac.uk/circulatory/heart.php>.
21. U, W., *Lehrbuch Histologie, Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie: mit 823 Abbildungen und 21 Tabellen*. 2006, München: Elsevier Urban & Fischer.
22. Sary, H.C., et al., *A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. Circulation, 1992. **85**(1): p. 391-405.
23. Godo, S. and H. Shimokawa, *Endothelial Functions*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017. **37**(9): p. e108-e114.
24. Ye, M., et al., *Brain microvascular endothelial cells resist elongation due to curvature and shear stress*. Sci Rep, 2014. **4**: p. 4681.
25. Prasain, N. and T. Stevens, *The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes*. Microvasc Res, 2009. **77**(1): p. 53-63.
26. Sandow, S.L., et al., *Myoendothelial contacts, gap junctions, and microdomains: anatomical links to function?* Microcirculation, 2012. **19**(5): p. 403-15.
27. Davignon, J. and P. Ganz, *Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis*. Circulation, 2004. **109**(23 Suppl 1): p. III27-32.
28. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
29. Troidl, K. and W. Schaper, *Arteriogenesis versus angiogenesis in peripheral artery disease*. Diabetes Metab Res Rev, 2012. **28** Suppl 1: p. 27-9.
30. Tousoulis, D., et al., *The role of nitric oxide on endothelial function*. Curr Vasc Pharmacol, 2012. **10**(1): p. 4-18.

## Literaturverzeichnis

31. Gimbrone, M.A., Jr. and G. Garcia-Cardena, *Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis*. Cardiovasc Pathol, 2013. **22**(1): p. 9-15.
32. Li, H., S. Horke, and U. Forstermann, *Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2014. **237**(1): p. 208-19.
33. Enos, W.F., R.H. Holmes, and J. Beyer, *Coronary disease among United States soldiers killed in action in Korea; preliminary report*. J Am Med Assoc, 1953. **152**(12): p. 1090-3.
34. Strydom, H.C., et al., *A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. Circulation, 1994. **89**(5): p. 2462-78.
35. Caro, C.G., J.M. Fitz-Gerald, and R.C. Schroter, *Arterial wall shear and distribution of early atheroma in man*. Nature, 1969. **223**(5211): p. 1159-60.
36. Glagov, S., et al., *Hemodynamics and atherosclerosis. Insights and perspectives gained from studies of human arteries*. Arch Pathol Lab Med, 1988. **112**(10): p. 1018-31.
37. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 233-41.
38. Bonetti, P.O., L.O. Lerman, and A. Lerman, *Endothelial Dysfunction*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2003. **23**(2): p. 168-175.
39. Yuan, Y., P. Li, and J. Ye, *Lipid homeostasis and the formation of macrophage-derived foam cells in atherosclerosis*. Protein Cell, 2012. **3**(3): p. 173-81.
40. Siegel-Axel, D., et al., *Platelet lipoprotein interplay: trigger of foam cell formation and driver of atherosclerosis*. Cardiovasc Res, 2008. **78**(1): p. 8-17.
41. Galis, Z.S. and J.J. Khatri, *Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly*. Circ Res, 2002. **90**(3): p. 251-62.
42. Korshunov, V.A., S.M. Schwartz, and B.C. Berk, *Vascular remodeling: hemodynamic and biochemical mechanisms underlying Glagov's phenomenon*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(8): p. 1722-8.
43. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(9): p. 2045-51.
44. Doran, A.C., N. Meller, and C.A. McNamara, *Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(5): p. 812-9.
45. Tabas, I., *Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications*. J Clin Invest, 2002. **110**(7): p. 905-11.
46. Strydom, 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**(5): p. 1355-74.
47. Virmani, R., et al., *Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(5): p. 1262-75.

## Literaturverzeichnis

48. Corti, R., M.E. Farkouh, and J.J. Badimon, *The vulnerable plaque and acute coronary syndromes*. The American Journal of Medicine, 2002. **113**(8): p. 668-680.
49. Malyar, N., et al., *Recent trends in morbidity and in-hospital outcomes of in-patients with peripheral arterial disease: a nationwide population-based analysis*. Eur Heart J, 2013. **34**(34): p. 2706-14.
50. Criqui, M.H. and V. Aboyans, *Epidemiology of Peripheral Artery Disease*. Circulation Research, 2015. **116**(9): p. 1509-1526.
51. Thorn TJ, K.W., Silbershatz H, D'Agostino RB. , *Cardiovascular diseases in the United States and prevention approaches*, in *Hurst's the Heart 10. Edition*. 2001, McGraw-Hill: New York.
52. Diehm, C., et al., *Mortality and vascular morbidity in older adults with asymptomatic versus symptomatic peripheral artery disease*. Circulation, 2009. **120**(21): p. 2053-61.
53. Hiatt, W.R., S. Hoag, and R.F. Hamman, *Effect of diagnostic criteria on the prevalence of peripheral arterial disease. The San Luis Valley Diabetes Study*. Circulation, 1995. **91**(5): p. 1472-9.
54. Watson, K., B.D. Watson, and K.S. Pater, *Peripheral arterial disease: a review of disease awareness and management*. Am J Geriatr Pharmacother, 2006. **4**(4): p. 365-79.
55. Joosten, M.M., et al., *Associations between conventional cardiovascular risk factors and risk of peripheral artery disease in men*. JAMA, 2012. **308**(16): p. 1660-7.
56. Selvin, E., et al., *Meta-analysis: glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus*. Ann Intern Med, 2004. **141**(6): p. 421-31.
57. Kallio, M., et al., *Development of new peripheral arterial occlusive disease in patients with type 2 diabetes during a mean follow-up of 11 years*. Diabetes Care, 2003. **26**(4): p. 1241-5.
58. Ridker, P.M., M.J. Stampfer, and N. Rifai, *Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease*. JAMA, 2001. **285**(19): p. 2481-5.
59. Price, J., *Lipoprotein (a) and development of intermittent claudication and major cardiovascular events in men and women: The Edinburgh Artery Study*. Atherosclerosis, 2001. **157**(1): p. 241-249.
60. Gardner, A.W., et al., *Apolipoprotein profiles in subjects with and without peripheral artery disease*. Vasc Med, 2013. **18**(3): p. 129-35.
61. Lijmer, J.G., et al., *ROC analysis of noninvasive tests for peripheral arterial disease*. Ultrasound in Medicine & Biology, 1996. **22**(4): p. 391-398.
62. Heiss, H.W., *Investigation of vascular disorders: Edited by A. N. Nicolaidis and J. S. T. Yao Churchill Livingstone, New York (1981) 635 pages, many figures and tables ISBN: 0-44308-020-8*. Clinical Cardiology, 1983. **6**(4): p. 192-193.
63. Eikelboom, J.W., et al., *Rivaroxaban with or without Aspirin in Stable Cardiovascular Disease*. N Engl J Med, 2017. **377**(14): p. 1319-1330.

## Literaturverzeichnis

64. Katzel, L.I., et al., *Comorbidities and exercise capacity in older patients with intermittent claudication*. *Vasc Med*, 2001. **6**(3): p. 157-62.
65. Stewart, K.J., et al., *Exercise training for claudication*. *N Engl J Med*, 2002. **347**(24): p. 1941-51.
66. European Stroke, O., et al., *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**(22): p. 2851-906.
67. Bradbury, A.W., et al., *Bypass versus Angioplasty in Severe Ischaemia of the Leg (BASIL) trial: A survival prediction model to facilitate clinical decision making*. *J Vasc Surg*, 2010. **51**(5 Suppl): p. 52S-68S.
68. Massa, M., et al., *Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction*. *Blood*, 2005. **105**(1): p. 199-206.
69. Katagiri, S., et al., *Overexpressing IRS1 in Endothelial Cells Enhances Angioblast Differentiation and Wound Healing in Diabetes and Insulin Resistance*. *Diabetes*, 2016. **65**(9): p. 2760-71.
70. Silvestre, J.S., D.M. Smadja, and B.I. Levy, *Postischemic revascularization: from cellular and molecular mechanisms to clinical applications*. *Physiol Rev*, 2013. **93**(4): p. 1743-802.
71. Kerbel, R.S., *Tumor angiogenesis*. *N Engl J Med*, 2008. **358**(19): p. 2039-49.
72. Witmer, A., *Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease*. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2003. **22**(1): p. 1-29.
73. Elshabrawy, H.A., et al., *The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis*. *Angiogenesis*, 2015. **18**(4): p. 433-48.
74. Burri, P.H. and M.R. Tarek, *A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation*. *Anat Rec*, 1990. **228**(1): p. 35-45.
75. Burri, P.H., R. Hlushchuk, and V. Djonov, *Intussusceptive angiogenesis: Its emergence, its characteristics, and its significance*. *Developmental Dynamics*, 2004. **231**(3): p. 474-488.
76. Djonov, V. and A.N. Makanya, *New insights into intussusceptive angiogenesis*. *EXS*, 2005(94): p. 17-33.
77. Ronald F. Tuma, W.N.D., Klaus Ley, *Handbook of Physiology: Microcirculation*. 2008, Cambridge: Elsevier Science.
78. Zimna, A. and M. Kurpisz, *Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies*. *Biomed Res Int*, 2015. **2015**: p. 549412.
79. Maisonpierre, P.C., et al., *Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis*. *Science*, 1997. **277**(5322): p. 55-60.

## Literaturverzeichnis

80. Knudsen KA, F.C., Johnson KR, Wheelock MJ, *A role for cadherins in cellular signaling and differentiation*. J Cell Biochem Suppl., 1998.
81. Thurston, G., et al., *Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage*. Nat Med, 2000. **6**(4): p. 460-3.
82. Lloyd, P.G., H.T. Yang, and R.L. Terjung, *Arteriogenesis and angiogenesis in rat ischemic hindlimb: role of nitric oxide*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **281**(6): p. H2528-38.
83. Scholz, D., et al., *Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis)*. Virchows Arch, 2000. **436**(3): p. 257-70.
84. Zhang, H. and J.E. Faber, *De-novo collateral formation following acute myocardial infarction: Dependence on CCR2(+) bone marrow cells*. J Mol Cell Cardiol, 2015. **87**: p. 4-16.
85. Hakimzadeh, N., et al., *The future of collateral artery research*. Curr Cardiol Rev, 2014. **10**(1): p. 73-86.
86. Rizzi, A., V. Benaglio, and D. Ribatti, *Angiogenesis versus arteriogenesis*. Rom J Morphol Embryol, 2017. **58**(1): p. 15-19.
87. Mac Gabhann, F. and S.M. Peirce, *Collateral capillary arterialization following arteriolar ligation in murine skeletal muscle*. Microcirculation, 2010. **17**(5): p. 333-47.
88. Zhang, H., et al., *Wide genetic variation in the native pial collateral circulation is a major determinant of variation in severity of stroke*. J Cereb Blood Flow Metab, 2010. **30**(5): p. 923-34.
89. Schaper, W. and D. Scholz, *Factors regulating arteriogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(7): p. 1143-51.
90. Lee, C.W., et al., *Temporal patterns of gene expression after acute hindlimb ischemia in mice: insights into the genomic program for collateral vessel development*. J Am Coll Cardiol, 2004. **43**(3): p. 474-82.
91. Behm, C.Z., et al., *Molecular imaging of endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression and inflammatory cell recruitment during vasculogenesis and ischemia-mediated arteriogenesis*. Circulation, 2008. **117**(22): p. 2902-11.
92. Hofer, I.E., et al., *Arteriogenesis proceeds via ICAM-1/Mac-1-mediated mechanisms*. Circ Res, 2004. **94**(9): p. 1179-85.
93. Cai, W.J., et al., *Remodeling of the adventitia during coronary arteriogenesis*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(1): p. H31-40.
94. Hofer, I.E., et al., *Time course of arteriogenesis following femoral artery occlusion in the rabbit*. Cardiovascular Research, 2001. **49**(3): p. 609-617.
95. Zhang, Y., et al., *Shear stress regulates endothelial cell function through SRB1-eNOS signaling pathway*. Cardiovasc Ther, 2016. **34**(5): p. 308-13.
96. Pan, S., *Molecular mechanisms responsible for the atheroprotective effects of laminar shear stress*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(7): p. 1669-82.

## Literaturverzeichnis

97. Palmer, R.M.J. and S. Moncada, *A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1989. **158**(1): p. 348-352.
98. Derbyshire, E.R. and M.A. Marletta, *Biochemistry of soluble guanylate cyclase*. Handb Exp Pharmacol, 2009(191): p. 17-31.
99. Carvajal, J.A., et al., *Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation*. Journal of Cellular Physiology, 2000. **184**(3): p. 409-420.
100. Wen, L., et al., *A shear-dependent NO-cGMP-cGKI cascade in platelets acts as an auto-regulatory brake of thrombosis*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 4301.
101. Lehnert, M., et al., *cGMP Signaling and Vascular Smooth Muscle Cell Plasticity*. J Cardiovasc Dev Dis, 2018. **5**(2).
102. Hoffmann, L.S., et al., *Distinct molecular requirements for activation or stabilization of soluble guanylyl cyclase upon haem oxidation-induced degradation*. Br J Pharmacol, 2009. **157**(5): p. 781-95.
103. Bachschmid, M.M., et al., *Vascular aging: chronic oxidative stress and impairment of redox signaling-consequences for vascular homeostasis and disease*. Ann Med, 2013. **45**(1): p. 17-36.
104. Evgenov, O.V., et al., *NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(9): p. 755-68.
105. Galie, N., et al., *2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT)*. Eur Heart J, 2016. **37**(1): p. 67-119.
106. Kochi, T., et al., *Characterization of the arterial anatomy of the murine hindlimb: functional role in the design and understanding of ischemia models*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e84047.
107. Schuler, D., et al., *Measurement of endothelium-dependent vasodilation in mice--brief report*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014. **34**(12): p. 2651-7.
108. Erkens, R., et al., *Left ventricular diastolic dysfunction in Nrf2 knock out mice is associated with cardiac hypertrophy, decreased expression of SERCA2a, and preserved endothelial function*. (1873-4596 (Electronic)).
109. Gao, S., et al., *Echocardiography in Mice*. Current Protocols in Mouse Biology, 2011.
110. Nagueh, S.F., et al., *Recommendations for the Evaluation of Left Ventricular Diastolic Function by Echocardiography: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging*. (2047-2412 (Electronic)).
111. Schuler, D., et al., *Repetitive remote occlusion (RRO) stimulates eNOS-dependent blood flow and collateral expansion in hindlimb ischemia*. Free Radic Biol Med, 2018. **129**: p. 520-531.

## Literaturverzeichnis

112. Dutta, S. and P. Sengupta, *Men and mice: Relating their ages*. Life Sciences, 2016. **152**: p. 244-248.
113. Rassaf, T., et al., *Circulating nitrite contributes to cardioprotection by remote ischemic preconditioning*. Circ Res, 2014. **114**(10): p. 1601-10.
114. Heuslein, J.L., et al., *Mechanisms of Amplified Arteriogenesis in Collateral Artery Segments Exposed to Reversed Flow Direction*. (1524-4636 (Electronic)).
115. Ibrahim, J. and B.C. Berk, *Flow-mediated vascular remodeling in hypertension: relation to hemodynamics*. Stroke, 2009. **40**(2): p. 582-90.
116. Kubis, N., et al., *Adaptive common carotid arteries remodeling after unilateral internal carotid artery occlusion in adult patients*. (0008-6363 (Print)).
117. Troidl, K., et al., *Actin-binding rho activating protein (Abra) is essential for fluid shear stress-induced arteriogenesis*. (1524-4636 (Electronic)).
118. Schaper, W., et al., *Quantification of collateral resistance in acute and chronic experimental coronary occlusion in the dog*. Circ Res, 1976. **39**(3): p. 371-7.
119. Heiss, C., et al., *Dietary inorganic nitrate mobilizes circulating angiogenic cells*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(9): p. 1767-72.
120. Ohno, M., et al., *Fluid shear stress induces endothelial transforming growth factor beta-1 transcription and production. Modulation by potassium channel blockade*. (0021-9738 (Print)).
121. Kosaki, K., et al., *Fluid shear stress increases the production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by endothelial cells via mRNA stabilization*. (0009-7330 (Print)).
122. Malek, A.M., et al., *Fluid shear stress differentially modulates expression of genes encoding basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor B chain in vascular endothelium*. (0021-9738 (Print)).
123. Gudi, S.R., J.A. Clark Cb Fau - Frangos, and J.A. Frangos, *Fluid flow rapidly activates G proteins in human endothelial cells. Involvement of G proteins in mechanochemical signal transduction*. (0009-7330 (Print)).
124. Rizzo, V., et al., *Recruitment of endothelial caveolae into mechanotransduction pathways by flow conditioning in vitro*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2003. **285**(4): p. H1720-H1729.
125. Buschmann, I.R., et al., *GM-CSF: a strong arteriogenic factor acting by amplification of monocyte function*. Atherosclerosis, 2001. **159**(2): p. 343-56.
126. van Royen, N., et al., *START Trial: a pilot study on STimulation of ARTeriogenesis using subcutaneous application of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as a new treatment for peripheral vascular disease*. Circulation, 2005. **112**(7): p. 1040-6.
127. Schumacher, B., et al., *Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors: first clinical results of a new treatment of coronary heart disease*. (0009-7322 (Print)).

## Literaturverzeichnis

128. Henry, T.D., et al., *The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis*. (1524-4539 (Electronic)).
129. Yang, H.T., et al., *Basic fibroblast growth factor increases collateral blood flow in rats with femoral arterial ligation*. (0009-7330 (Print)).
130. Kamiya A Fau - Togawa, T. and T. Togawa, *Adaptive regulation of wall shear stress to flow change in the canine carotid artery*. (0002-9513 (Print)).
131. Unthank, J.L., et al., *Wall remodeling during luminal expansion of mesenteric arterial collaterals in the rat*. (0009-7330 (Print)).
132. Eitenmuller, I., et al., *The range of adaptation by collateral vessels after femoral artery occlusion*. *Circ Res*, 2006. **99**(6): p. 656-62.
133. Harvey, A., A.C. Montezano, and R.M. Touyz, *Vascular biology of ageing-Implications in hypertension*. *J Mol Cell Cardiol*, 2015. **83**: p. 112-21.
134. Harman, D., *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*. *J Gerontol*, 1956. **11**(3): p. 298-300.
135. Lotfi, S., et al., *Towards a more relevant hind limb model of muscle ischaemia*. *Atherosclerosis*, 2013. **227**(1): p. 1-8.
136. Vinten-Johansen, J., *Postconditioning: a mechanical maneuver that triggers biological and molecular cardioprotective responses to reperfusion*. *Heart Fail Rev*, 2007. **12**(3-4): p. 235-44.
137. Weinbrenner, C., et al., *Remote preconditioning by infrarenal occlusion of the aorta protects the heart from infarction: a newly identified non-neuronal but PKC-dependent pathway*. (0008-6363 (Print)).
138. Costa, A.D.T., et al., *The mechanism by which the mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel opening and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibit the mitochondrial permeability transition*. (0021-9258 (Print)).
139. Petrishchev, N.N., et al., *Does nitric oxide generation contribute to the mechanism of remote ischemic preconditioning?* (0928-4680 (Print)).
140. Tokuno, S., et al., *Spontaneous Ischemic Events in the Brain and Heart Adapt the Hearts of Severely Atherosclerotic Mice to Ischemia*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2002. **22**(6): p. 995-1001.
141. Hausenloy Dj Fau - Yellon, D.M. and D.M. Yellon, *The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion*. (0022-2828 (Print)).
142. Cheung, M.M., et al., *Randomized controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on children undergoing cardiac surgery: first clinical application in humans*. *J Am Coll Cardiol*, 2006. **47**(11): p. 2277-82.
143. Kirby, B.S., et al., *Mechanical influences on skeletal muscle vascular tone in humans: insight into contraction-induced rapid vasodilatation*. (0022-3751 (Print)).

## Literaturverzeichnis

144. Quillon, A., B. Fromy, and R. Debret, *Endothelium microenvironment sensing leading to nitric oxide mediated vasodilation: a review of nervous and biomechanical signals*. Nitric Oxide, 2015. **45**(1089-8611 (Electronic)): p. 20-6.
145. Buckwalter, J.B. and P.S. Clifford, *Autonomic control of skeletal muscle blood flow at the onset of exercise*. (0002-9513 (Print)).
146. Donald David, E., J. Rowlands Derek, and A. Ferguson David, *Similarity of Blood Flow in the Normal and the Sympathectomized Dog Hind Limb during Graded Exercise*. Circulation Research, 1970. **26**(2): p. 185-199.
147. Clifford, P.S., et al., *Mechanical compression elicits vasodilatation in rat skeletal muscle feed arteries*. J Physiol, 2006. **572**(Pt 2): p. 561-7.
148. Tan, X., et al., *Intermittent pneumatic compression regulates expression of nitric oxide synthases in skeletal muscles*. J Biomech, 2006. **39**(13): p. 2430-7.
149. Aranguren, X.L., et al., *Multipotent adult progenitor cells sustain function of ischemic limbs in mice*. J Clin Invest, 2008. **118**(2): p. 505-14.
150. O, H., *Mechanical factors involved in the growth of the heart and its blood vessels*. Cell Mol Biol Res, 1994.
151. Becit, N., et al., *The effect of vascular endothelial growth factor on angiogenesis: an experimental study*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2001. **22**(4): p. 310-6.
152. Yasumura, E.G., et al., *Treatment of mouse limb ischemia with an integrative hypoxia-responsive vector expressing the vascular endothelial growth factor gene*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33944.
153. Nagahama, R., et al., *Nanoparticle-mediated delivery of pioglitazone enhances therapeutic neovascularization in a murine model of hindlimb ischemia*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(10): p. 2427-34.
154. Bickert, T., et al., *Acceleration of collateral development by carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 expression on CD11b/(+)Gr-1(+) myeloid cells--brief report*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(11): p. 2566-8.
155. Iwase, T., et al., *Adrenomedullin enhances angiogenic potency of bone marrow transplantation in a rat model of hindlimb ischemia*. Circulation, 2005. **111**(3): p. 356-62.
156. Oi, K., et al., *Extracorporeal shock wave therapy ameliorates hindlimb ischemia in rabbits*. Tohoku J Exp Med, 2008. **214**(2): p. 151-8.
157. Pan, Y., et al., *Magnetic nanoparticles for the manipulation of proteins and cells*. Chem Soc Rev, 2012. **41**(7): p. 2912-42.
158. Yang, Y., et al., *Cellular and molecular mechanism regulating blood flow recovery in acute versus gradual femoral artery occlusion are distinct in the mouse*. J Vasc Surg, 2008. **48**(6): p. 1546-58.
159. Marques, S.M., et al., *Genetic background determines mouse strain differences in inflammatory angiogenesis*. Microvasc Res, 2011. **82**(3): p. 246-52.

## Literaturverzeichnis

160. Austad, S.N., *Comparative biology of aging*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2009. **64**(2): p. 199-201.

## 6 Danksagung

**Herrn Prof. Dr. med. Malte Kelm** für die Möglichkeit, die Promotionsarbeit in seinem Institut abhalten zu dürfen.

**Herrn PD Dr. med. Amin Polzin** und **Herrn Prof. Rotem Lanzmann** für die Betreuung und Begutachtung der Promotionsarbeit.

**Herrn Dr. med. Dominik Schuler** für das Überlassen des Themas, die wissenschaftliche Betreuung und Supervision zu jedem Zeitpunkt der Arbeit.

Weiter danke ich **Lilly, Aysel, Lukas, Emma** und allen anderen, die mich im täglichen Laborbetrieb und darüber hinaus unterstützt haben.

**Alexander** und **Susanne Nicolaus** für die uneingeschränkte Unterstützung meines gesamten Bildungsweges.