

**Aus dem Institut für Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité -
Universitätsmedizin zu Berlin**

DISSERTATION

**Der Einfluss von Stickstoffmonoxid (NO) auf die Wandschubspannung im kapillären
Gefäßnetzwerk des Skelettmuskels: Eine intravitalmikroskopische Studie am Mausmodell**

**zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)**

**Vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité -
Universitätsmedizin zu Berlin**

**von
Şafak Gül
aus Berlin**

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. A. R. Pries
 2. Prof. Dr. med. B. Vollmar
 3. Prof. Dr. med. V. Djonov

Datum der Promotion: 24.02.2012

Inhalt

1 Einleitung	6
1.1 Intravitalmikroskopie - Geschichtliche Entwicklung	6
1.2 Vaskuläre Dynamik	8
1.2.1 Gefäßneubildung: Vaskulogenese versus Angiogenese	9
1.2.2 Angioadaptation: „Vaskuläres Remodelling“ – „Pruning“ - Arteriogenese	12
1.2.3 Zielsetzung der Arbeit	14
2 Material und Methoden	16
2.1 Versuchsaufbau	16
2.1.1 Intravitalmikroskop und optisches System	16
2.1.2 Photodiodensystem und Videoregistrierung	18
2.2 Versuchsvorbereitung	18
2.2.1 Haltung der Versuchstiere	18
2.2.2 Verbrauchsmaterialien	19
2.2.3 Narkose und Präparation des Versuchstieres	19
2.3 Versuchsdurchführung	21
2.3.1 Allgemeine Versuchsdurchführung	21
2.3.2 Intravitalmikroskopie am Skelettmuskel.....	22
2.3.3 Histochemische Untersuchungen am Muskel.....	23
2.4 Versuchsauswertung	23
2.4.1 Bestimmung der Gefäßdurchmesser.....	24
2.4.2 Bestimmung der Erythrozytenflussgeschwindigkeit	21
2.5 Statistik	27
2.6 Histochemische Kapillarquantifizierung	26
3 Ergebnisse	28
3.1 Arterieller Blutdruck	28
3.2 Kapillardurchmesser	29
3.3 Erythrozytenströmungsgeschwindigkeit	30
3.4 Wandschubspannung	33
3.5 Histochemische Darstellung des Kapillarsystems vor und nach Prazosin	35
4 Diskussion	36
4.1 Methodendiskussion	36
4.2 Die Wandschubspannung - ein Faktor für die Angioadaptation	38
4.3 NO - Einfluss und Auswirkungen auf das kapilläre Gefäßbett	40
4.4 Angiogenesemechanismen unter Prazosinbehandlung	44
5 Zusammenfassung	47
6 Referenzen	49

7	Abkürzungsverzeichnis.....	49
8	Tabellen und Abbildungsverzeichnis	54
9	Danksagung.....	56
10	Erklärung an Eides statt.....	57
11	Lebenslauf	58

Meiner Mutter

1 Einleitung

1.1 Intravitalmikroskopie - Geschichtliche Entwicklung

Die Intravitalmikroskopie erlaubt es Organsysteme in vivo zu untersuchen und einen Einblick in die physiologischen Gegebenheiten und Abläufe zu erhalten. Auf diese Art und Weise kann im Lebenden die Wirkung von Veränderungen im physiologischen Milieu in Abhängigkeit von bestimmten Reizen oder Chemikalien untersucht und studiert werden.

Der folgende Überblick über verschiedene Forschungsgebiete zeigt Fortschritte, die Dank der Intravitalmikroskopie insbesondere auf dem Gebiet der Mikrozirkulation, Vasomotorik und Angiogenese seit dem 19. Jahrhundert gewonnen wurden:

Erste intravitalmikroskopische Studien sind 1839 von Rudolf Wagner beschrieben worden. Julius Friedrich Cohnheim, herausragend bei der intravitalmikroskopischen Erforschung von zellulären Mechanismen der Entzündungspathologie beteiligt, beschrieb in seiner Veröffentlichung „Neue Untersuchungen über die Entzündung“ (1867) die Leukozytenmigration durch Gefäßwände. Sonina et al. (1976) untersuchten an denervierten submaxillaren Muskeln des Frosches die arterioläre Dilatation unter dem Einfluss von sichtbarem Licht [1]. Sie fanden heraus, dass die Gefäße unter diesen Bedingungen eine arterioläre Dilatation erfuhren und nach Abdunkelung in den initialen Zustand zurückkehrten. Sie stellten außerdem eine Abhängigkeit der Gefäßreagibilität vom Durchmesser der Gefäßwand fest, wobei die dickwandigeren Gefäße als die Reagibelsten imponierten. Ihr Durchmesser nahm um das 2 – 3 fache unter dem Einfluss von sichtbarem Licht zu. Sonina et al. (1976) beschrieben, dass sichtbares Licht sowie der Temperaturhaushalt der Maus und die Mikrozirkulation die Wandschubspannung beeinflussen können. Dieses konnten sie an Bypassversuchen belegen, welche unter normothermen und unter hypothermen Bedingungen durchgeführt wurden. Sie verwendeten die Intravitalmikroskopie zur direkten Visualisierung der systemischen Mikrozirkulation und konnten proinflammatorische und ischämische als auch mikrovaskuläre Alterationen in normothermen und hypothermen kardiopulmonalen Bypässen in neugeborenen Schweinen klassifizieren. Am mikrovaskulären Netzwerk im Omentum majus und im subkutanen Fettgewebe von neugeborenen Schweinen beschrieben sie eine Abnahme des arteriolären Durchmessers unter hypothermen Bedingungen. Das Muster der mikrovaskulären Perfusion zeigte in beiden Bypass-Modellen Anzeichen einer ischämischen Schädigung, welche sich in einer Abnahme der funktionellen kapillären Dichte präsentierte. Die Auswertung der Daten zeigte deutlich erhöhte Zahlen an aktivierten adhären

Leukozyten, eine Reduzierung der Kapillardichte sowie einen erhöhten Laktatspiegel im normothermen Modell [1-2].



Abbildung 1: Intravitalmikroskop zur Beobachtung der Mikrozirkulation im Fisch

Die Abbildung stellt ein von John Marshall (1663 - 1725) hergestelltes Doppelmikroskop dar [3].

Witte et al. untersuchten 1979 die optische Dichte von Plasmaproteinen mittels ultramikrophotospektrometrischer Untersuchungen. Dabei fanden sie heraus, dass Plasmaproteine in den mikrozirkulatorischen Gefäßen des Rattenmesenteriums sich hinsichtlich ihrer Permeation durch die Gefäßwand und ihrer Bewegung im perivaskulären interstitiellen Gewebe unterscheiden. Verbessert wurden die Untersuchungsmöglichkeiten durch einen motorbetriebenen Objektträger mit einem Messsystem, dessen Scanlinien transversal zum Gewebe ausgerichtet waren. Durch eine computergestützte Auswertung war es Witte möglich, kontinuierlich quantitative Informationen über die Dynamik der Proteinpermeabilität zu erheben [4].

Kurze Zeit später beschrieben Veit et al. (1980) Veränderungen der vasomotorischen Reaktionen und den Blutfluss von Gefäßen im Mesenterium und im M. spinotrapezius nach Stimulation der hypothalamischen Kerne durch bipolare Elektroden an anästhesierten Ratten. Es stellte sich eine Verlangsamung bis hin zum Sistieren des Blutflusses in den Arteriolen ein. Die mesenterischen Mikrogefäße (10 – 70 µm) zeigten zwar keine Durchmesseränderung, aber eine Konstriktion von kleinen Arterien (90 – 125 µm) konnte aufgezeigt werden [5].

1982 untersuchten Lipowsky et al. intravitalmikroskopisch das Verhalten von Erythrozyten am Kremastermuskel von Ratten und Mäusen. Mit simultanen Messungen des intravaskulären Druckes, des Druckabfalls, der Geschwindigkeit der Erythrozyten sowie des Hämatokrits gelang es ihnen, letztlich eine Aussage über den regionalen arteriovenösen Widerstand von Arteriolen und Venolen zu treffen [6].

Die Bildanalyse zur Untersuchung des kapillären Gefäßnetzwerkes erwogen Datsenko et al. (1986) als eine Möglichkeit zur effizienten morphometrischen Analyse des Kapillarnetzes sowie Untersuchung pathologisch struktureller Veränderungen der Mikrozirkulation [7].

Stuehmer et al. (2009) konnten belegen, dass die mikrovaskuläre Perfusion essentiell und unabdingbar für das Wachstum und die Remodulation der Knochenmembran, insbesondere nach schädigenden Einflüssen durch Traumata ist. Ein neues Modell unter Einsatz eines Glasfensters diente dazu, wiederholte in vivo Untersuchungen an der Mikrozirkulation des Periosts durchzuführen [8].

Über weitere Entwicklungen in Richtung einer quantitativen und automatischen Untersuchung der Mikrozirkulation berichteten Lee et al. (2009): Der Durchmesser der Arteriolen als Parameter diente dazu, die Wirkungen verschiedener Stimuli zu quantifizieren. Die Veränderung des Gefäßdurchmessers wurde bestimmt, indem eine während der Intravitalmikroskopie gefilmte Videosequenz unter Verwendung einer elektronischen Bildgebung ausgewertet wurde. Schließlich konnte eine automatische Messung von Gefäßdurchmessern aus intravitalmikroskopisch aufgenommenen Bildsequenzen präsentiert werden. Diese Methode verfolgt den Durchmesser eines Gefäßes über die gesamte Bildsequenz, sobald der Durchmesser in dem ersten Bild markiert wird [9].

Dieser exemplarische Abriss angefangen von der Forschung der letzten Jahrzehnte bis zum aktuellen Forschungsstand heute zeigt, dass die Intravitalmikroskopie - das in situ Studium am lebenden Objekt - hochaktuell ist und einen wesentlichen und elementaren Bestandteil der Forschung an der Mikrozirkulation bildet.

1.2 Vaskuläre Dynamik

1.2.1 Gefäßneubildung: Vaskulogenese versus Angiogenese

Die Vaskulogenese ist die de-novo-Entstehung von Blutgefäßen aus zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen aus dem Knochenmark. Sie umfasst die dynamische und fortwährende Anpassung des Gefäßsystems an verschiedene Anforderungen, welche an die Blutgefäße des gesamten Netzwerks gestellt werden. Diese werden während der Embryonalentwicklung durch bestimmte Mechanismen diktiert, so dass die Lokalisation für die primären Führungsleitungen, die Gefäßvorläufer, festgelegt sind. Aus ihnen entwickeln sich später die hauptsächlichsten Arterien und Venen. Diese Entwicklung des Gefäßsystems beginnt im Embryo. Sie ist der erste Abschnitt einer Entwicklungskaskade, in welcher Gefäße und ihr Inhalt aus bipotenten Vorläuferzellen, den Hämangioblasten, rekrutiert werden. Dieser induziert die weitere Differenzierung zu Angioblasten und Endothelzellen. Die so entstandenen Endothelzellen exprimieren den VEGF Rezeptor 1, welcher die Generierung von tubulären Strukturen steuert und zur Entstehung eines primären Gefäßplexus führt. Dieser Vorgang ist zwar bei der Embryogenese von zentraler Bedeutung, allerdings können auch im Erwachsenenalter bis zu 25% der Endothelzellen, die an der Neubildung von Kollateralgefäßen beteiligt sind, aus endothelialen Progenitorzellen stammen.

Die Entstehung und Neubildung von Kapillaren in einem bestehendem Gefäßnetzwerk in vivo wird allgemein als Angiogenese zusammengefasst. Die Kenntnisse, welche aus diesen theoretischen Abläufen in der Physiologie gewonnen werden, helfen dabei pathologische Veränderungen im klinischen Alltag besser zu verstehen und hieraus gegebenenfalls therapeutische Ansätze zu entwickeln. Der Prozess der Angiogenese spielt in der Klinik insbesondere im Bereich der Hämatologie/ Onkologie, der Chirurgie und zum Beispiel auch bei der Behandlung der diabetischen Retinopathie eine relevante Rolle.

Die Angiogenese als die Neubildung von Gefäßen und die Vaskulogenese als die Bildung eines primären vaskulären Plexus sind voneinander abzugrenzen. Die Entstehung neuer Kapillaren während der Angiogenese basiert im Wesentlichen auf zwei Mechanismen: Es handelt sich dabei zum einen um das Aussprossen („Sprouting“) von Endothelzellen aus einem bestehenden Kapillarnetzwerk und zum anderen um die Gefäßteilung eines Ursprungsgefäßes (Intussuszeption, „Non-Sprouting“).

Die Aussprossung von Endothelzellen aus einem bestehenden Gefäßnetzwerk führt zu einer Zunahme von Kapillaren im Gefäßsystem. Dieser Vorgang wird durch vielfältige Prozesse wie zytokingesteuerte Aktivierung, Migration, Proliferation von Endothelzellen gesteuert. Beim Prozess der Kapillarsprossung („Sprouting“) wird zunächst durch Matrixmetalloproteinasen (MMP) die Basalmembran an Kapillaren proteolysiert. Aktivierte Endothelzellen wachsen mittels chemotaktischer Migration und Proliferation aus vorbestehenden Kapillaren in den extrazellulären Raum und bilden knospenartige Fortsätze aus. Es formiert sich ein Lumen, welches durch die Rekrutierung von glatten Muskelzellen, Fibroblasten sowie Perizyten verstärkt wird. So kommt es zu einer funktionellen Reifung des Endothels. Der Vorgang des Sprossens endet mit dem Anschluss der Endothelstücke an existierende Kapillaren.

Die Intussuszeption ist ein Teilungsprozess, der sich an bestehenden Kapillaren durch die Ausbildung transkapillärer Pfeiler im Sinne einer longitudinalen Teilung oder durch Pfosten, die sich in der extrazellulären Matrix entwickeln, vollzieht [10]. Im Besonderen kommt es hierbei zu einer Invagination der Kapillarwände, in welche interstitielle Zellen und Bestandteile der extrazellulären Matrix einwachsen.

Welche Form der Angiogenese in einem Gewebe überwiegend zum Tragen kommt, könnte von der Anzahl der vorbestehenden Kapillaren zum Zeitpunkt des Wachstums abhängen. Angiogenetische Prozesse in der Lunge vollziehen sich vornehmlich über die Intussuszeption, nachdem sich hier das Kapillarnetzwerk ausgebildet hat [11].

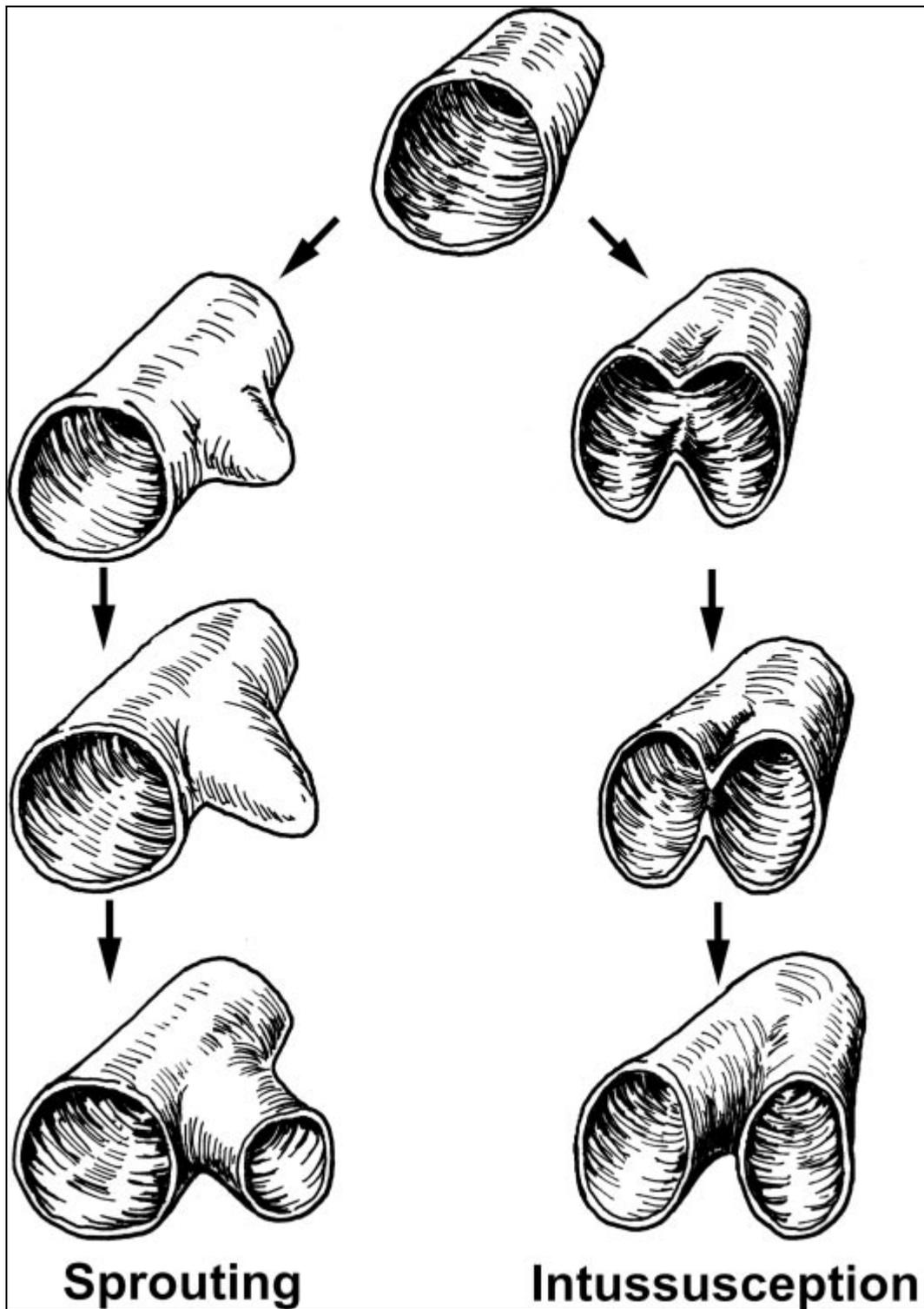


Abbildung 2: Schematische Übersicht über die beiden Angiogenesemechanismen. Sie vollzieht sich durch Intussuszeption und Sprouting [12].

Die Intussuszeption läuft in vier Phasen ab: zu Beginn entsteht eine Kontaktzone zwischen zwei gegenüberliegenden Kapillarwänden. In der zweiten Phase werden diese Endothelzellverbindungen der einander anliegenden Endotheldoppelschicht reorganisiert und die Kontaktzone zentral perforiert. Die dritte Phase dient der Einwanderung von Myofibroblasten und Perizyten in den gebildeten transluminalen „Tunnel“ und der Kollagensynthese, sodass es zur Ausbildung eines stabilen Pfeilers kommt. Abschließend nimmt der Pfeilerumfang zu und es kommt zur Längsspaltung des Kapillarlumens. Van Groningen et al. (1991) beschrieben die Intussuszeption erstmals im Myokard [13], Egginton et al. (2001) im Skelettmuskel [14]. Letztlich resultiert dieser Prozess in einer kompletten Teilung des Kapillarlumens. In vivo kann diese Form der Angiogenese durch die Proliferation der Endothelzellen in einem Gefäß hervorgerufen werden, so dass ein weites Lumen erzeugt wird, welches durch transkapilläre Pfeiler durchbrochen wird.

Hämodynamische Kräfte, welche durch die Blutströmung auf die Endothelzellen der Gefäße wirken, sind für die Koordination adaptiver Prozesse im mikrovaskulären Gefäßnetzwerk von großer Bedeutung [15-18]. Die Endothelzellen nehmen hierbei als Vermittler zwischen der dynamischen Blutströmung und der statischen Gefäßwand eine besondere Position ein.

Die Adaptation des Gefäßnetzwerkes und die hieraus resultierende Aktualität und Bedeutung kommt in der Kardiologie sowie in der Therapie von peripheren Durchblutungsstörungen zum Tragen. Neue Ansätze zur Steigerung der Angiogenese und der Vaskulogenese beruhen auf Forschungsfortschritten auf diesen Gebieten. Die Applikation von rekombinanten angiogenetischen Wachstumsfaktoren, die Gentherapie zur Steigerung der Expression von VEGF und FGF und die lokale Verabreichung von endothelialen Progenitorzellen sind dabei nur einige Beispiele. Der klinische Stellenwert dieser sog. therapeutischen Angiogenese lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abschließend beurteilen.

1.2.2 Angioadaptation: „Vaskuläres Remodelling“ – „Pruning“ - Arteriogenese

Die Adaptation des Gefäßnetzwerkes durch „Vaskuläres Remodelling“, „Pruning“ und Arteriogenese beschreiben die strukturellen Änderungen des Gefäßnetzwerkes in der postnatalen Entwicklung und bei ausgereiften Individuen: Der Gefäßplexus, der sich durch die Angiogenese ausgebildet hat, wird schnell weiter remodelliert. Es bildet sich ein reifes System aus, das einen Komplex aus größeren und kleineren Gefäßen bildet. Getragen wird dieser Vorgang durch den

Prozess des Prunings (Beschneidung), da die entstehenden Gebilde verknüpften Baumstrukturen ähneln. Im Prozess des „Prunings“ werden redundante Segmente strukturell eliminiert.

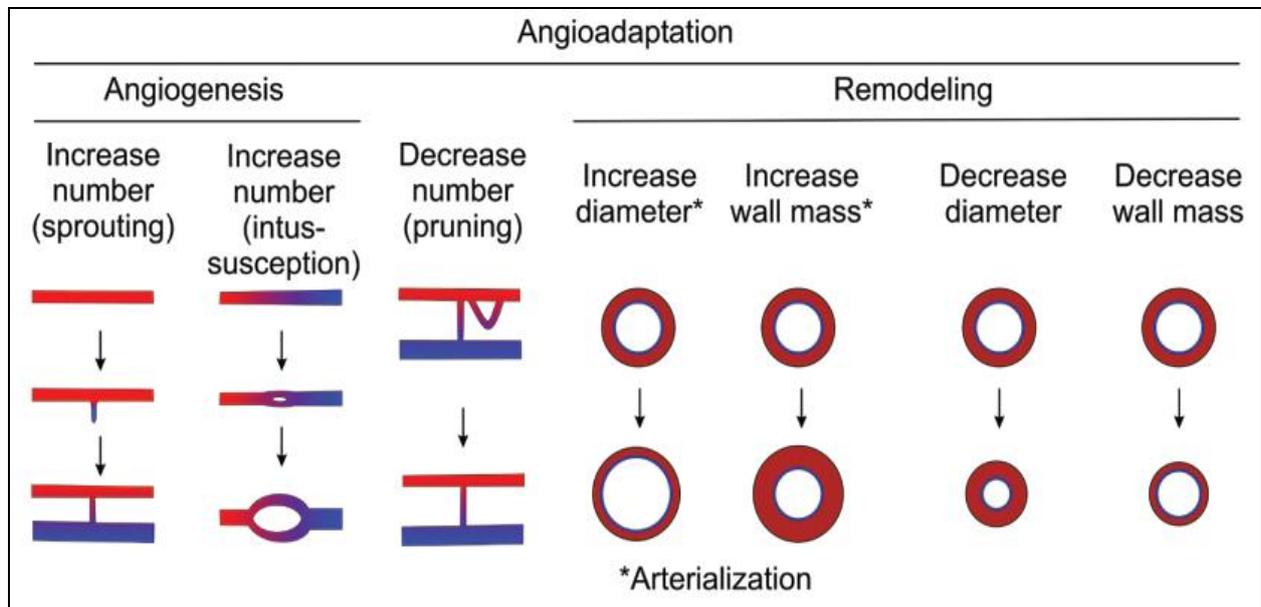


Abbildung 3: Schematische Übersicht zur Angioadaptation. Vergleich des vaskulären Remodellings zur Angiogenese. [16].

Die Arteriogenese ist im Vergleich dazu ein primär modellierender Prozess. Er führt zu einer Verdickung des Endothels, einer Vermehrung des Bindegewebes sowie der glatten Muskelzellen und bedingt folgend eine Verstärkung der Gefäßwand. Das vermehrte Längenwachstum führt unter anderem zu der korkenzieherähnlich geschlängelten Morphologie der Kollateralgefäße. Die Arteriogenese wird somit durch das Wachstum vorgebildeter Kollateralen definiert.

Die Entwicklung von Kollateralgefäßen bei akuten und chronischen Gefäßverschlüssen nimmt bei den Therapieoptionen in der Klinik eine bedeutende Rolle ein. Ein akuter Arterienverschluss kann den arteriellen Mitteldruck auf etwa ein Drittel bis ein Viertel des Ausgangswertes vermindern. Der Durchfluss jenseits der Obliteration nimmt quantitativ etwas weniger ab als der arterielle Mitteldruck, so dass es zu einer passiven Erweiterung der Kollateralgefäße kommt. Bei experimentellen Arterienverschlüssen kommt es kurz nach der Verschlussituation zu einer Zunahme des Drucks und der Durchblutung, um später wieder ein konstantes Niveau zu

erreichen. Hämodynamisch ist ein bestehender kollateraler Druckgradient zwischen dem proximal und distal der Obliteration liegenden Arteriensegment für die Strömungsumkehr in den distalen Seitenästen verantwortlich. Der kollaterale Widerstand hingegen ist eher hoch. Die Umwandlung der bereits passiv erweiterten proximalen und distalen Anastomosen in den eigentlichen Kollateralgefäßen beginnt auf diese Art und Weise allmählich. Der arteriovenöse oder distale Druckgradient, der die Perfusion der Kapillaren bestimmt, sowie die periphere Resistenz sind bereits unter Ruhebedingungen praktisch maximal erniedrigt. Der kollaterale Druckgradient induziert eine Strömungsbeschleunigung und damit eine Zunahme der Scherspannung am Gefäßendothel. Die Zunahme der Scherspannung resultiert in einer grundlegenden funktionellen Veränderung der Endothelzellen und zur Produktion vieler Chemokine und letztlich zu einem Umbau der Gefäße zu Kollateralen im Sinne der Arteriogenese. Pathophysiologisch ist dieses eindeutig von der Angiogenese und der Vaskulogenese zu differenzieren. Diese Fähigkeit der Blutgefäße, sich ändernden Konditionen anzupassen, lässt sich bei unterschiedlichen physiologischen Prozessen beobachten, so z.B. beim Wachstumsprozess, bei trainingsbegleitenden funktionellen Änderungen, beim menstrualen Zyklus, bei Entzündung, bei Wundheilung, bei Tumolvaskularisation und bei der Retinopathie. Hier können die Mechanismen der Angiogenese schnell und dramatisch verlaufen. Dieser dynamische Prozess, welcher auf die Blutgefäße einwirkt, führt zu Änderungen der Struktur, des Durchmessers sowie zu einer Zunahme oder einem Verlust an Segmenten. Die Ganzheit dieser oben beschriebenen Prozesse lässt sich unter dem Begriff Angioadaptation zusammenfassen. Der mechanische Stress, die sogenannte Schubspannung ist unter den bereits erläuterten Stimuli primärer Gegenstand und Interesse dieser Arbeit. Er wirkt als tangentielle Kraft fortwährend auf die Endothelzellen ein. Die Endothelzellen wiederum besitzen Ionenkanäle, die auf schnelle Änderungen der Wandschubspannung reagieren und in die Modulation der Permeabilität, Proliferation und Angiogenese involviert sind.

1.2.3 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit soll analysiert werden, welche Auswirkung die mikrovaskuläre Hämodynamik, insbesondere die Wandschubspannung in der Interaktion und in Abhängigkeit vom NO-System auf die Gestaltung der Mikrozirkulation im Skelettmuskel bei veränderten Umgebungsbedingungen - unter gesteigertem und erniedrigtem Blutfluss - spielt.

Der Gegenstand der vorliegenden Arbeit auf diesem Hintergrund ist:

1. Die Entwicklung und Etablierung eines intravitalmikroskopischen Verfahrens zur Darstellung und empirischen Untersuchung des Kapillarsystems im Musculus extensor digitorum longus (EDL) der Maus.
2. Videomonitoring zur Dynamik der Mikrozirkulation in drei Mausgruppen (WT, nNOS-KO, eNOS-KO) mit und ohne Angiogeneseinduktion (Prazosinbehandlung), um zu beurteilen, in welcher Art und Weise es zu Veränderungen der Wandschubspannung kommt und welchen Einfluss insbesondere die neuronale- (nNOS) und endotheliale NO-Synthase (eNOS) dabei ausüben. Hierzu sollen intravitalmikroskopische Aufnahmen ausgewertet werden, um die Wandschubspannung aus der Erythrozytenströmungsgeschwindigkeit und dem Kapillardurchmesser zu bestimmen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

2.1.1 Intravitalmikroskop und optisches System

Die Analyse des kapillären Gefäßnetzwerks im M. extensor digitorum longus (EDL) der Maus erfolgte mit einem modifizierten Intravitalmikroskop (Leitz, Wetzlar). Dieses war ausgestattet mit einem Salzwasser-Immersionsobjektiv (SW 25/0.60; Leitz, Wetzlar). Ein teleskopisches Darstellungssystem mit Umlenkprismen ermöglichte die Erfassung des *in vivo* Zustandes. Hierzu konnten die Momentaufnahmen in ein lichtdicht abgeschlossenes Gehäuse mit Photodiodenpaaren oder zu einer Videokamera gelenkt werden. Eine Xenon-Bogenlampe (450 Watt; Osram, Berlin) diente als Lichtquelle. Die kontinuierliche Emissionsleistung der Xenon-Bogenlampe wurde mit einem Konstanter (Heinzinger TNX 450) gesichert.

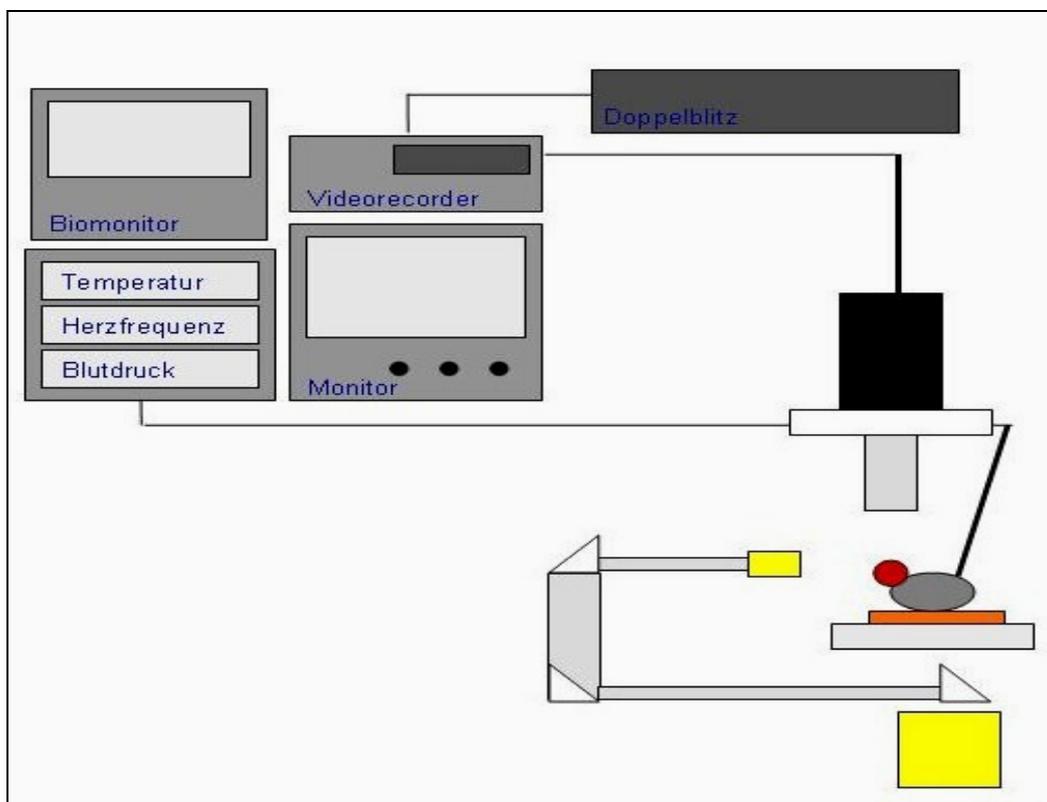


Abbildung 4: Intravitalmikroskop mit Versuchsanordnung und Doppelblitzbelichtung. Dargestellt ist eine Skizze des Versuchsaufbaues: Die Maus (grau) mit dem zuvor präparierten EDL befindet sich unter dem Objektiv des Intravitalmikroskopes und kann sowohl von unten (direkt) als auch von lateral (indirekt) mit Licht (gelb) beleuchtet werden.

Der Präparationstisch wurde auf die Arbeitsfläche montiert, welche in der horizontalen Ebene beweglich ist. Somit bestand die Möglichkeit, dass der Muskel in seiner Ganzheit sowohl der Länge nach von kranial nach kaudal als auch in der Breite von lateral nach medial aufgenommen werden konnte. Die Aufnahmen in unterschiedlichen Tiefenebenen des Muskels wurden durch eine Prismaumlenkapparatur ermöglicht, welches in der vertikalen Ebene verstellbar ist. Zusätzlich konnte das direkt am Muskel anliegende Stück ebenfalls in der horizontalen Ebene verstellt werden, um eine optimale Fokussierung des Lichtes auf den Muskel zu erreichen. An dem Intravitalmikroskop wurde ein Wasserimmersions-Objektiv angebracht. Über dieses Objektiv wurde über den ganzen Versuch hin weiter Tyrode-Lösung auf den Muskel geleitet. Die sich auf dem Präparationstisch sammelnden Tropfen wurden fortwährend durch einen angebrachten Absaugschlauch aufgefangen. Das Mikroskop war insgesamt nur eine Säule eines komplexen Beobachtungs- und Messplatzes, welches über ein Kamera-Video-System, verschiedene Beleuchtungssysteme, eine Doppelblitzkamera und hochsensible Restlichtkamera verfügte. Parallel zu den Aufnahmen wurde kontinuierlich das Herz-Kreislauf-Monitoring über einen Computer verfolgt und aufgenommen. Die während des Versuches aufgezeichneten Videoaufnahmen wurden im Anschluss ausgewertet.

Die Prismaumlenkapparatur besteht aus einer C-förmigen Vorrichtung mehrerer hintereinandergeschalteter Prismen. Über diese wurde das Licht aus der Lampe des Mikroskops auf den Muskel gelenkt. Drei eingebaute Prismen lenkten das Licht um den Präparationstisch herum direkt waagrecht auf den Muskel. Zur gleichen Zeit konnte über das Objektiv, welches während den ganzen Versuches über einen angepassten, außen aufsitzenden Ring Tyrode-Lösung auf den Muskel leitete, und den angeschlossenen Monitor eine präzise Einstellung mit scharfer Auflösung eingestellt werden. Der Strahlengang lief senkrecht durch das Objektiv nach oben zu einem schwenkbaren Spiegel, über den das Bild der Restlichtkamera zugeführt werden konnte. Zu Beginn wurde das Intravitalmikroskop zur genauen Einstellung des Muskelpräparates über Durchlicht mit einer Xenon-Bogenlampe beleuchtet. Hierzu bedurfte es mehrerer Filter, im speziellen eines Blaufilters und einer Feinjustierung des Doppelblitzgerätes. Bei optimaler Einstellung wurde die Lichtquelle auf das Doppelblitzgerät umgelenkt. Diese Umlenkung ersetzte nun im Strahlengang die Xenon-Durchlichtlampe durch zwei elektronisch gesteuerte Hochfrequenz-Blitzlampen. Ein angeschlossener Videorecorder ermöglichte die Aufnahme auf Band zur späteren Aufzeichnung. In den kurzen Sequenzen ohne Versuchsaufzeichnung wurden die Lichtquellen vom Muskelpräparat genommen.

2.1.2 Photodiodensystem und Videoregistrierung

Die Erythrozytenflussgeschwindigkeit in den gefilmten Ausschnitten des kapillären Gefäßnetzwerks wurde auf eine besondere Art und Weise bestimmt. Die Dual-Slit-Methode zur Geschwindigkeitsmessung wurde hierzu verwendet [19]. Ihre Anfänge nahm diese Möglichkeit der Geschwindigkeitsmessung durch Wayland und Johnson [20].

Auf der Projektionsfläche am Intravitalmikroskop waren drei Photodiodenpaare montiert. Diese konnten in ihrer Position und Ausrichtung in der Projektionsebene verändert werden. Hierdurch war gewährleistet, dass die Photodiodenpaare in Abhängigkeit von der Morphologie der Gefäßaufzweigung positioniert werden konnten. Das resultierende Bild vom projizierten Netzwerkausschnitt wurde über ein Prisma zu einer Videokamera gelenkt und über angeschlossene Monitore visualisiert. Zudem war ein Videorecorder angeschlossen, sodass eine zeitgleiche Aufzeichnung des darstellbaren und einsehbaren Gefäßnetzwerkes dokumentiert werden konnte.

Ein Videotimer ermöglichte die Einblendung der Uhrzeit und des aktuellen Datums. Der Erythrozytenfluss in den Kapillaren erzeugt ein Hell-Dunkel-Muster, welches das elektrische Signal der Photodioden darstellt. Mit einem speziell hierfür am Institut für Physiologie der Freien Universität entwickelten Datenaufzeichnungssystem konnte dieses Signal verstärkt und digitalisiert werden. Die Speicherung der Messergebnisse auf der Festplatte eines angeschlossenen Computers war die Voraussetzung für die folgenden Auswertungen.

2.2 Versuchsvorbereitung

2.2.1 Haltung der Versuchstiere

Die verwendeten männlichen Mäuse wurden aus eigener Zucht bezogen. Hierbei handelte es sich um 3 – 4 Monate alte männliche C57/B16-Mäuse, eNOS- und nNOS-defiziente Mäuse. Es wurden C57/B16-Mäuse von Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA) sowie eNOS- und nNOS-defiziente Mäuse von den Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) bezogen. Das so gewährleistete Gewicht von mindestens 22 g war Ausgangspunkt und Basis einer erfolgreichen Präparation der Maus. Die Mäuse wurden bei einer Raumtemperatur von 22 ± 20 C°, 40 - 60 % Luftfeuchtigkeit gehalten und erhielten "Altromin"- Haltungsfutter (Altromin, Lage) sowie Leitungswasser ad libitum.

Während die Mäuse aus den Kontrollgruppen nur Wasser tranken, erhielten die entsprechenden Mausgruppen zur Induktion der Angiogenese einen Zusatz von Prazosin in ihrem Trinkwasser. Der Gehalt an Prazosin belief sich auf etwa 50 mg/l. Bei einer Trinkmenge von etwa 3 ml/Tag/Tier ergibt sich eine Tagesdosis von etwa 50 µg/Tag/Tier.

2.2.2 Verbrauchsmaterialien

Allgemeine Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) in analytischer Qualität bezogen. Die Hersteller spezieller Chemikalien werden bei der Beschreibung der jeweiligen Methoden gesondert erwähnt.

2.2.3 Narkose und Präparation des Versuchstieres

Die Mäuse wurden initial transkutan-intraperitoneal mit Atropin und Urethan (0,11 ml Urethan, 0,11 ml Atropin in 10 ml NaCl) prämediziert. Nach 15 Minuten folgte eine intramuskuläre Injektion von Ketavet (0,1 ml Ketamin; 100 mg/kg KG i.m.) in die rechte Extremität der Maus. Die Maus wurde auf dem Rücken fixiert, indem die obere Extremität und der Kopf in überstreckter Position mit Klebestreifen gehalten wurden. Zunächst war die Präparation des Halses erforderlich. Die Halspräparation diente der kontinuierlichen, sicheren Beatmung der Maus über einen Trachealtubus sowie der Katheterisierung der A. carotis und der V. jugularis, um das für den Versuch existentielle Herz-Kreislauf-Monitoring zu erfassen.

Nach Rasur des Halsfells wurde der Hals durch einen medianen Schnitt eröffnet und die Trachea sorgfältig durch die Muskelschichten freipräpariert. Anschließend wurde rasch tracheotomiert und intubiert. Die Tiere atmeten spontan über dieses Tracheostoma, welches durch einen eingeführten Kunststofftubus offen gehalten wurde.

Im Verlauf erfolgte die Präparation zur Darstellung der A. carotis communis und der V. jugularis interna. Beide Gefäße wurden kranial ligiert und kaudal über eine kurze Inzision mit Polyäthylenschläuchen (Portex fine bore, Durchmesser innen: 0,28 mm, außen: 0,61 mm) katheterisiert. Hierbei war der erstmalige Erfolg jeweils an einem der beiden Halsgefäße für ein Weiterführen des Versuches ausschlaggebend. Über den arteriellen Katheter wurde vor Beginn der Aufzeichnungen ein Heparinbolus injiziert. Bei einer misslungenen Katheterisierung,

insbesondere der A. carotis war keine ausreichende zerebrale Blutversorgung der Maus gewährleistet, sodass es zu einem raschen Tod kam. Die kontinuierliche Erfassung des systemischen mittleren arteriellen Blutdruckes (Druckanzeiger: BMT-Medizintechnik) und der Herzfrequenz (Pulsfrequenzmessgerät: Mino PFM 2 Hugo Sachs Elektronik, March) erfolgte durch Anschluss der A. carotis an einen Transducer (PDCR 75, Natec Schultheiss, Garching) sowie der Aufzeichnung mit einem Schreiber (Gould 220 Recorder; Gould, Cleveland, USA).

Im Anschluss wurde die V. jugularis externa auf der kontralateralen Seite katheterisiert. Über den venösen Anschluss wurde eine ständige Flüssigkeitssubstitution mit 0,9 % Kochsalz gesichert. Die Körpertemperatur der Mäuse wurde über eine Rektalsonde gemessen. Eine thermogesteuerten thermosensiblen Heizmatte (Kleintierheizgerät G-21; Harvard Apparatus, Kent, England) hielt die Ganzkörpertemperatur für den Zeitraum des Versuches konstant.

Nach Beendigung der Halspräparation wurde das eigentliche Untersuchungsobjekt, der M. extensor digitorum longus (EDL), präpariert. Hierzu wurde die Maus auf einem Arbeitstisch positioniert, der mit Beginn der Aufnahmen unter dem Intravitalmikroskop fixiert wurde. Die Muskelpräparation wurde auf einem Plexiglas-Tisch durchgeführt, indem die auf dem Rücken liegende Maus mit dem Oberkörper leicht hochgelagert und bis zur Bauchdecke mit Klebestreifen fixiert wurde. Die frei bewegliche untere Körperhälfte wurde insgesamt leicht nach links gelagert, so dass die rechte Extremität der weiteren Präparation gut zugänglich war. Das rechte Bein wurde zunächst sorgfältig desinfiziert und das Fell grob mit einem Skalpell gekürzt. Am unteren Fußgelenk beginnend wurde das Fell durch Zirkumzision eröffnet und von hier aus medial über der ventralen Seite der Extremität nach kranial bis in die Leistenbeuge das Fell mit einer Schere aufgeschnitten. Im Anschluss wurde das Fell mit einer Pinzette dorsal der Eröffnungsstelle gefasst und unter konsequenter mikroskopischer Beobachtung das Fell bis in die Leistenbeuge komplett abgezogen. Von ausschlaggebender Bedeutung für das Gelingen des weiteren Versuches waren die an der lateralen Außenseite am Fußgelenk laufenden großen, versorgenden Gefäße. Eine kleine Läsion in diesem Bereich wirkte sich auf den ganzheitlichen Fluss im Gefäßnetzwerk derart aus, dass dieser enorm reduziert bis kaum vorhanden war.

Umgehend wurde der vom Fell befreite Muskel mit Tyrode superfundiert (NaCl 131,6 mM; KCl 4,7 mM; CaCl₂ 2,0 mM; MgSO₄ 1,2 mM; NaHCO₃ mM). Damit der für den blanken Muskel wichtige physiologische pH-Wert geschaffen werden konnte, wurde die Lösung mit einem Gasgemisch aus 5% CO₂ und 95% N₂ äquilibriert. Unter der kontinuierlichen Benetzung des Muskels mit ca. 36°C warmer Tyrode-Lösung wurde nun mit größter Sorgfalt und feinsten

Handgriffen das auf dem EDL haftende Bindegewebe bis auf die dünnsten Faszien-schichten abgetragen. Zur optimalen Darstellung des Muskels zwecks exakter Präparation, vergewisserten wir uns durch Zug an der Sehne am Fußgelenk, dass es sich auch um den EDL handelt. So wurde eine optische Durchlässigkeit auf verschiedenen Muskelfaserebenen und den in ihnen enthaltenen Gefäßen möglich.

Nach fertiger Präparation wurde der Muskel samt der Maus so in Position gebracht, dass das Objektiv direkten Blickwinkel auf den nun von den Faszien-schichten freipräparierten EDL zuließ. Zum Abschluss wurde nun der Präparationstisch auf eine unter dem Intravitalmikroskop befindliche Arbeitsfläche montiert.

2.3 Versuchsdurchführung

2.3.1 Allgemeine Versuchsdurchführung

Die Tierexperimente sind im Tierversuchsvorhaben G 0239/02 vom Landesamts für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin (LaGetSi) genehmigt und unter Einhaltung der Tierschutzrichtlinien durchgeführt worden.

Alle Versuche wurden nach einem einheitlichen Standardprotokoll durchgeführt. Nach Präparation der narkotisierten Tiere wurde die intravitalmikroskopische Aufnahme nach der Dual-Slit-Methode begonnen. Das Prinzip der Aufnahmen bestand darin, den EDL in seiner Ganzheit von kaudal nach kranial und in allen erfassbaren Tiefenschichten abfahrend zu erfassen. Das Prozedere wurde in drei Sequenzen wiederholt.

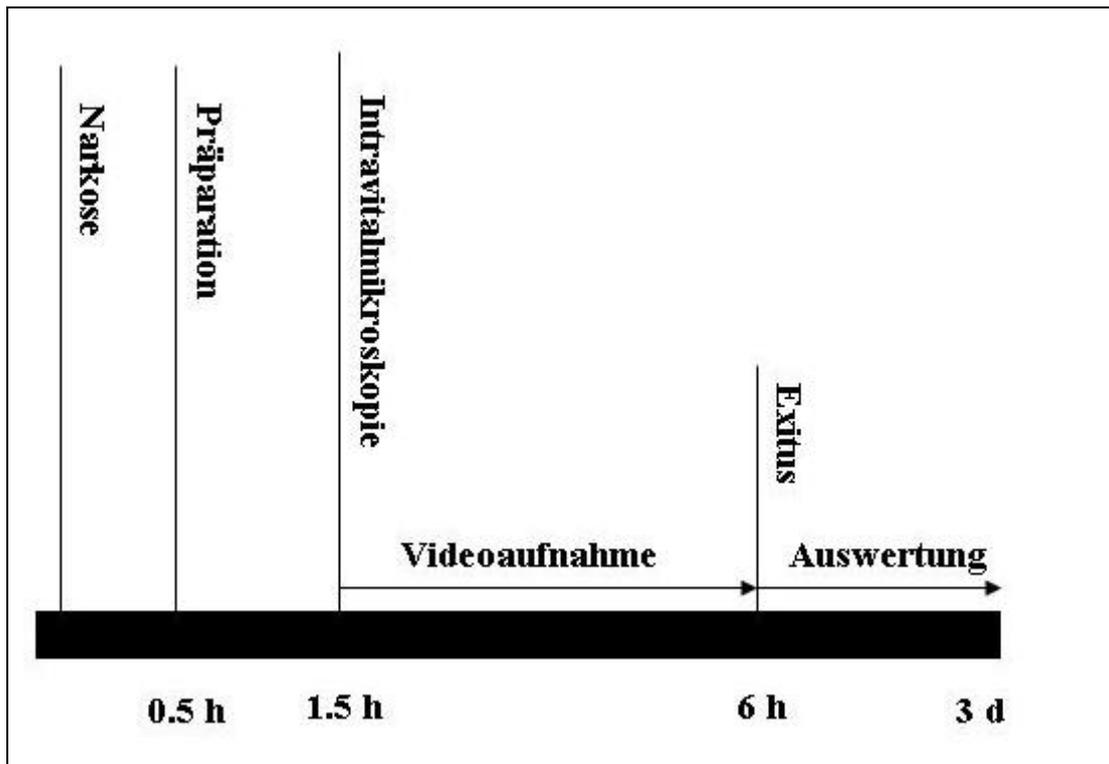


Abbildung 5: Versuchsablauf. Dargestellt wird hier in einer schematischen Ansicht ein Versuchsablauf in seiner Ganzheit. Die oben bereits ausführlich beschriebenen Narkose und nachfolgende Präparation der Tiere sowie die sich anschließende Intravitalmikroskopie unter gleichzeitiger Aufzeichnung. Abschließend erfolgte die Auswertung der Videobandaufnahmen.

2.3.2 Intravitalmikroskopie am Skelettmuskel

Nach der vorangegangenen Präparation wurde das kapilläre Gefäßnetzwerk im Skelettmuskel aufgenommen. Im Anschluss erfolgte eine Dokumentation des kapillaren Gefäßnetzwerkes im Skelettmuskel zur Kontrolle der Gefäßreaktivität.

Die Maus wurde samt dem Präparationstisch unter dem Intravitalmikroskop montiert, das dann grob eingestellt wurde, um mit hoher Auflösungsstärke und Tiefenschärfe eine optimale Beleuchtung zu gewährleisten. Hierzu wurde vor den Aufnahmen die Kamera mit einem speziellen Computerprogramm eingestellt. Dieses diente als Grundlage für sensible Eichung des Doppelblitzgerätes. Die Videoaufzeichnungen setzten sich aus drei aufeinanderfolgenden Sequenzen von jeweils einer Stunde zusammen. Die erste Aufzeichnung fand im unbehandelten Zustand des Muskels statt. Die zweite Aufnahme unter Vasokonstriktion der Gefäße nach 20

Minuten Latenzphase, in welcher die Applikation von L-NNA stattfand. Die dritte Aufnahme der Vasodilatation erfolgte 5 Minuten nach Applikation von Adenosin, Natrium-Nitroprussid und Papaverin. Die letzten beiden Aufnahmen dienten in erster Linie der Kontrolle der Funktionsfähigkeit des Endothels. Die Versuchsdauer nach Beendigung der Präparation belief sich auf vier bis fünf Stunden.

Die Einstellung für die Aufnahmen begann am Fußgelenk. Über den Versuch wurde das Intravitalmikroskop nach jeder Aufnahmesequenz eines Gefäßabschnittes jeweils von laterokaudal nach medial verschoben, so dass und über die Tiefeneinstellung des Umlenkprismas in verschiedenen Tiefenebenen einer Einstellungssequenz gesucht werden konnte. Die Aufnahme an einer Einstellungssequenz bestand darin, alle in diesem Bild gut sichtbaren Gefäße scharf dargestellt aufzunehmen. Die Verweildauer auf einem scharf gestellten Gefäßabschnitt betrug ca. 30-60 Sekunden.

2.3.3 Histochemische Untersuchungen am Muskel

Nach Beendigung der Intravitalmikroskopie wurde der EDL entnommen. Zur Herstellung von Kryoschnitten wurden die Muskeln mit TissueTek OCT (Plano W. Plannet, Wetzlar, Deutschland) senkrecht zur Schnittrichtung auf Korkplättchen montiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und in luftdichten Plastikbeuteln bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Hierzu wurden sie für spätere Transversalschnitte am Ursprung und an der Endsehne vorsichtig getrennt.

Die $10\ \mu\text{m}$ dicken Schnittpräparate aus dem mittleren Drittel des Muskelbauches des EDL wurden mit dem Kryostaten hergestellt. Zur Enzymhistochemie wurden sie auf zimmerwarme, Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger montiert. Zur Qualitätskontrolle wurden HE-gefärbte Schnitte nach Baum et al. angefertigt [21].

2.4 Versuchsauswertung

Die Auswertung der Versuche erfolgte nach Abschluss des intravitalmikroskopischen Experiments anhand der Videoaufnahmen mit einem computergestützten Bildanalyseverfahren [19]. Die Messung der Blutströmungsgeschwindigkeit [22] gestaltete sich durch den digitalen Vergleich von zwei Video-Halbbildern, die in einem Abstand von 6 ms mit der

Doppelblitzbeleuchtung aufgenommen worden sind. Auf dem Monitor wurde hierzu ein scharf abgebildeter Gefäßabschnitt einer im Versuch eingestellten Aufnahmesequenz eingefroren. In die Darstellung des Gefäßabschnittes im Querschnitt, welches die Erythrozyten auf Grund der Prisma-Umlenkapparatur dreidimensional darstellte, wurde mit manueller Steuerung über die Maus eine Messlinie von 7 - 12 cm in Strömungsrichtung der Erythrozyten gelegt. Hierdurch wurde dieser markierte Abschnitt nach Beginn der Messung durch den kontrastreichen Fluss der Erythrozyten digital untersucht. Das Prinzip beruht darauf, dass die bei dem ersten einfallenden Halbbild gemessene Abfolge an eindimensionalen Hell-Dunkel-Kontrasten mit dem 6 ms später einfallenden Halbbild und dieser Hell-Dunkel-Abfolge verglichen wurde. Die Blutströmungsgeschwindigkeit wurde aus der Wegeverschiebung errechnet, bei der die beiden digitalisierten Hell-Dunkel-Abfolgen die höchste Korrelation zeigten.

2.4.1 Bestimmung der Gefäßdurchmesser

Mit einer Längenreferenz unter dem Mikroskop wurde die Vergrößerung des optischen Systems auf dem Videobild bestimmt. An den digitalisierten Videoaufzeichnungen wurden die jeweils korrespondierenden Gefäßränder manuell mit einem Cursor markiert. Der Abstand zwischen beiden markierten Punkten wurde durch Fällung des Lotes bestimmt. Gleichzeitig konnte der Gefäßdurchmesser unter Berücksichtigung des ermittelten Vergrößerungsfaktors ermittelt werden [19].

2.4.2 Bestimmung der Erythrozytenflussgeschwindigkeit

Durch die Doppelblitzbeleuchtung wurde die Erythrozytenflussgeschwindigkeit bestimmt [19]. Hierbei wurden zwei in einem Abstand von 2 ms aufgenommene Video-Halbbilder digital miteinander abgeglichen. Durch das Videobild der strömenden Blutsäule wurde manuell in Strömungsrichtung eine Meßlinie von 3 - 7 cm Länge gelegt. Auf diese Art und Weise wurde die Blutsäule hinsichtlich ihrer Hell-Dunkel-Strukturierung, welche durch die einzelnen Erythrozyten hervorgerufen wird, digital abgetastet. Die bei dem ersten Halbbild aufgenommene eindimensionale Hell-Dunkel-Abfolge wurde mit derjenigen aus dem 2 ms später einfallenden zweiten Halbbild verglichen. Über diejenige Wegeverschiebung, bei der die beiden digitalisierten Hell-Dunkel-Abfolgen mit der höchsten Korrelation übereinstimmen, wurden die Erythrozytenflussgeschwindigkeiten errechnet. Dieser Rechenvorgang erfolgte 10mal pro

Sekunde mit nachfolgender Speicherung der Werte und ergab eine nahezu kontinuierliche Messung und Aufzeichnung der Erythrozytenflussgeschwindigkeiten.



Abbildung 6: Bestimmung der Erythrozytenflussgeschwindigkeit. Dargestellt ist exemplarisch ein Beispiel für die Auswertung und Bestimmung der Erythrozytenflussgeschwindigkeit. Nach manueller Messung über dem Video ermittelte das Computerprogramm für den bestimmten Zeitraum die Messwerte. Unten links wird die ermittelte durchschnittliche Erythrozytenströmungsgeschwindigkeit angegeben und wie wahrscheinlich der berechnete Wert ist.

Möglich wird dieser Vorgang dadurch, dass durch die oben beschriebene Diodenanordnung die Messung der Erythrozytenflussgeschwindigkeit in den Kapillaren nach der Dual-Slit-Methode erfolgt. Das Hell-Dunkelmuster der strömenden Erythrozyten erzeugt an den einzelnen Photodioden elektrische Signale. Diese werden mit einer Frequenz von 10 Hz gesammelt, verstärkt und in digitalisierter Form auf einem angeschlossenen Personalcomputer gespeichert. Im Anschluss wurden sich überlappende Segmente der Signalspuren eines Diodenpaares computergestützt mit dem Algorithmus der Fast-Fourier-Transformation miteinander korreliert (modifiziert nach [19]). Die zeitliche Verschiebung von der ersten zur zweiten Diode, jeweils auf den Abstand der beiden Dioden bezogen, ergibt die sogenannte „center-line“-Strömungsgeschwindigkeit der Blutzellen. Diese „center-line“-Strömungsgeschwindigkeit ist nicht mit der maximalen oder mittleren Geschwindigkeit der Erythrozyten in der Gefäßachse

gleichzusetzen. Das aufgezeichnete Lichtsignal wird nicht nur von den Zellen aus den am schnellsten fließenden Strömungsbereichen gebildet. Die Einführung eines Korrekturfaktors zur Bestimmung der realen mittleren Geschwindigkeit war nicht notwendig, da er das relative Verhältnis der Strömungsgeschwindigkeiten zueinander nicht wesentlich verändert.

2.5 Histochemische Kapillarquantifizierung

Zur Kapillarquantifizierung wurden 10 µm dicke HE-Kryostatschnitte vom M. tibialis anterior (TA) der untersuchten Versuchsgruppen (C57/B16-, eNOS^{-/-}, nNOS^{-/-}-Mäuse) angefertigt. Die Anzahl der Muskelfasern oder deren Durchmesser änderte sich unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht [23].

Untersucht wurden die Muskel-Querschnitte mit einem Axiophot-Lichtmikroskop mit 20-facher Objektvergrößerung. Die Bilder wurden mit einer F10 DCC-Kamera, die über eine Digitizer Card mit PAL Input und 8 Bit Graustufentiefe (miroVideo, Pinnacle Systems, Braunschweig) mit einem Power Macintosh G3 verbunden war, aufgenommen und für die spätere Auswertung auf Festplatte gespeichert. Die Bildanalyse erfolgte mit der Object Image 1.62p2 Software (N. Fischer, Universität von Amsterdam, Niederlande).

Die Enzymhistochemie zum Nachweis der unspezifischen alkalischen Phosphatase (aP, EC) erfolgte an Kryoschnitten des Muskels mit der Tetrazoliumsalzmethode [21].

Tabelle 1: AP-Medium

5-Br-4-Cl-3-Indoxyl-Phosphat (Bachem, Heidelberg)	0,3 mg
Dimethylformamid (DMF; Serva, Heidelberg)	50 µl
Nitroblautetrazoliumsalz (NBT; Serva, Heidelberg)	1 mg
in 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 9,4)	1 ml

Die Schnitte wurden für 5 min in Chloroform-Aceton (1:1) bei 4°C fixiert. Nun wurden diese für 60 min in einer feuchten Kammer bei 37°C mit dem aP-Medium inkubiert. In Folge wurden sie erst mit Leitungswasser, dann mit entionisiertem Wasser gespült und mit Glycerol-Gelatine eingedeckt. Die Auswertung erfolgte mit einem Axiophot-Lichtmikroskop.

2.6 Statistik

Für die statistische Analyse und Darstellung der Ergebnisse wurden die Statistikpakete SigmaStat/SigmaPlot und SPSS (SPSS, Chicago, Illinois, USA) benutzt. Es wurde eine deskriptive Statistik erstellt (Mittelwert, Standardabweichung). Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ angesetzt. In den Diagrammen sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen dargestellt. Die Standardabweichungen sind angegeben, wenn die Verteilung der Einzelmesswerte von Bedeutung ist. Das „n“ gibt im Regelfall die Anzahl der untersuchten Versuchstiere pro Versuchsgruppe bzw. in den nachfolgenden Histogrammen die Gesamtanzahl aller untersuchten Kapillaren an. Dieses ist ausdrücklich vermerkt. Zur statistischen Analyse wurden die Mittelwerte in einer Einweg-Analyse der Varianz (ANOVA) mit Tukey-B Korrektur für post hoc multiple Vergleiche unterzogen. Die statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ postuliert.

3 Ergebnisse

Es wurden insgesamt sechs Mausgruppen ausgewertet. Wir verwendeten insgesamt drei Mausstämme (C57/B16-, nNOS- und eNOS-Knockout-Mäuse), welche jeweils unbehandelt bzw. nach Behandlung mit Prazosin (36 h Zusatz im Trinkwasser) untersucht wurden.

3.1 Arterieller Blutdruck

Der mittlere arterielle Blutdruck sämtlicher Versuchstiere ohne Prazosinbehandlung blieb während der Versuchsphasen nahezu konstant. Die gemessenen Mitteldrücke lagen zwischen 90 bis 110 mmHg. Der Blutdruck war unmittelbar nach der Prämedikation zunächst etwas erniedrigt und stieg nach einer länger dauernden Versuchsphase mit Nachlassen der Wirkung des Narkotikums an. In den drei Versuchsgruppen war nach Behandlung mit Prazosin ein erniedrigter systemischer arterieller Blutdruck auf 80 – 100mmHg messbar.

Die Abbildung 7 gibt den während eines Versuches kontinuierlich erfassten systemischen arteriellen Blutdruck für die sechs Mausgruppen wieder. Die Messung wurde mit Beendigung der Halspräparation (Katheterisierung A. carotis) begonnen. Die Messwerte geben entsprechend den Mittelwert des mittleren arteriellen Blutdruckes für jede der Versuchsgruppen über den Zeitraum eines Versuches wieder. Dieses ermöglicht, Vergleiche zwischen den einzelnen Versuchsgruppen anzustellen sowie entsprechend den hämodynamischen Verlauf der Versuchsgruppen mit und ohne Prazosinbehandlung einander gegenüberzustellen. Vergleicht man unter diesem Aspekt die unbehandelten Versuchsgruppen, weisen die eNOS-defizienten Mäuse das höchste Blutdruckniveau (105 – 110mmHg) auf. Die C57/B16-Mäuse wiesen einen systemischen arteriellen Blutdruck von etwa die 90 mmHg auf. Die nNOS-defiziente-Versuchsgruppe war mit 90 – 95 mmHg nur leicht erhöht im Vergleich zu den C57/B16-Mäusen. Bei den 36 Stunden mit Prazosin behandelten Mäusen war der Blutdruck im Vergleich zur Kontrollgruppe niedriger, im Sinne einer signifikant hypotoneren Ausgangssituation. Die C57/B16-Kontrollmäuse und die nNOS-defizienten Mäuse hatten einen Blutdruck von etwa 80mmHg. Die eNOS-defizienten-Mäuse hingegen zeigten einen Abfall um 5mmHg, so dass der Blutdruck bei 100mmHg gemessen wurde. Die Prazosingabe führte somit in den C57/B16-Kontrollmäusen und den nNOS-defizienten-Mäusen zu einem Blutdruckabfall von 10 %. Die eNOS-defizienten-Mäuse hingegen zeigten einen wesentlich geringeren Blutdruckabfall um nur 5 %.

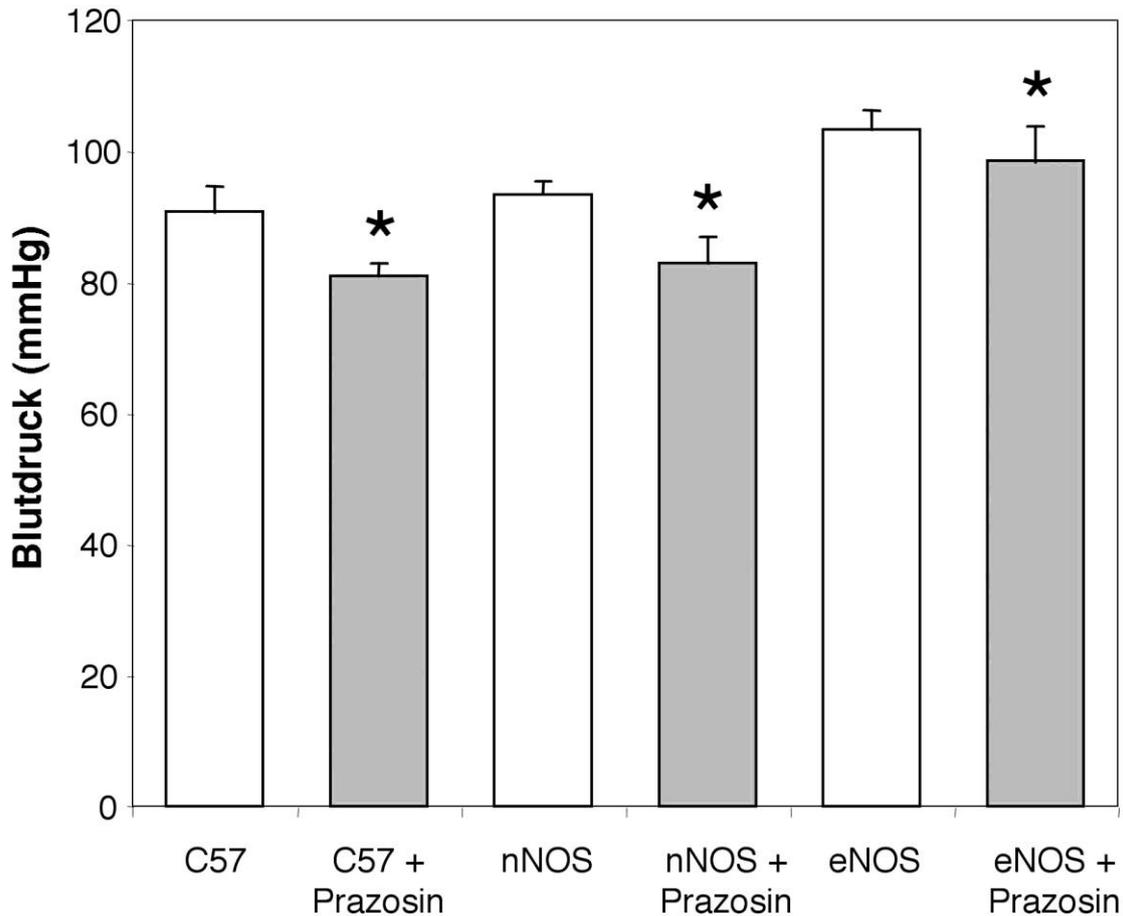


Abbildung 7: Mittlerer arterieller Blutdruck in C57- (C57), nNOS-defizienten- (nNOS) und eNOS-defizienten-Mäusen (eNOS) ohne sowie nach 36 Stunden Prazosinbehandlung. Gemessen über den Zeitraum eines Versuches (ca. 8 Stunden). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen während der Intravitalmikroskopie. Gruppengröße jeweils $n=5$. * $p \leq 0.05$ signifikant verändert gegenüber unbehandelten Mäusen desselben Stammes.

3.2 Kapillardurchmesser

Die Kapillardurchmesser-Bestimmung ist ein essentieller Bestandteil zur Berechnung der Wandschubspannung. Die in Abbildung 8 dargestellten Werte stellen die Durchschnitte der Kapillardurchmesser der verschiedenen Versuchsgruppen dar. Hierzu wurden zuvor die 66 bis 122 Messungen vom Kapillardurchmesser jedes Versuchstieres gemittelt. Der durchschnittliche Wert liegt zwischen $6 \pm 1 \mu\text{m}$ bei allen untersuchten Mausgruppen. Es waren keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der einzelnen Gruppen feststellbar.

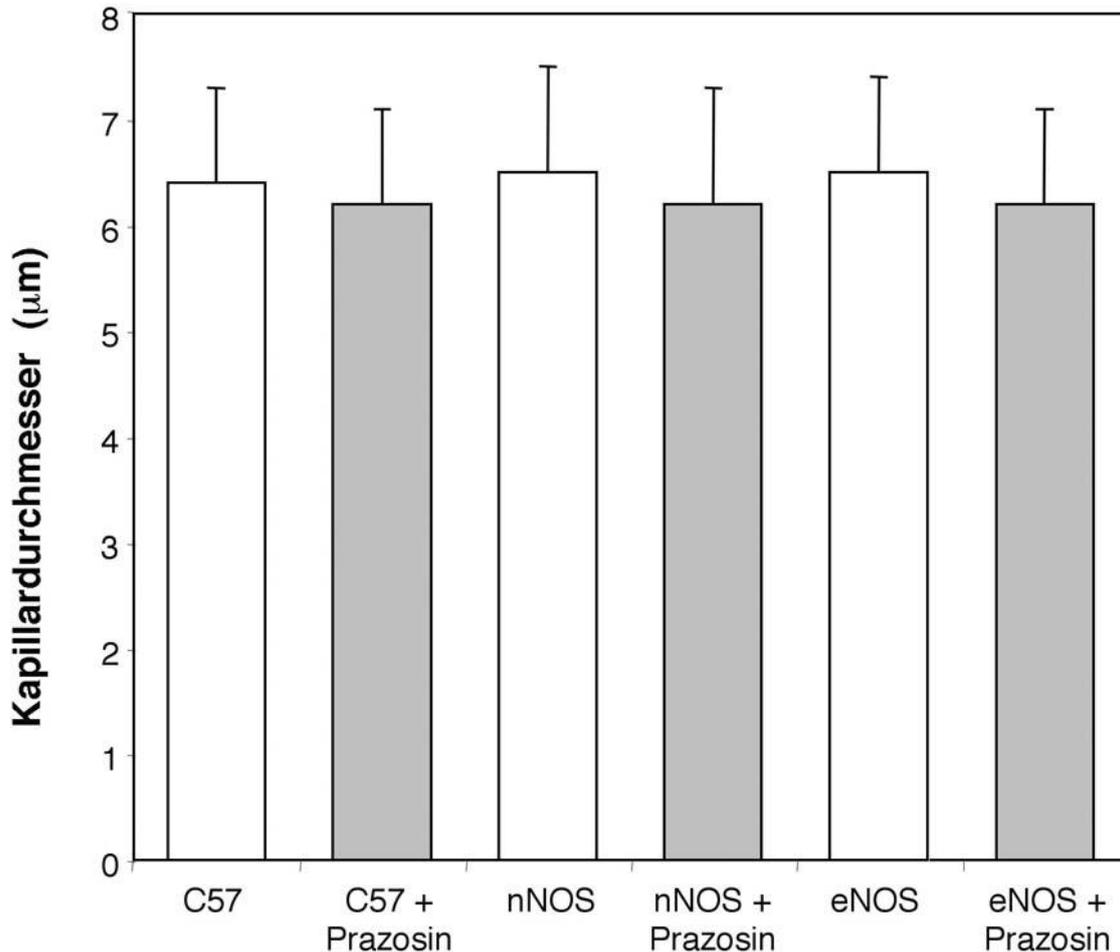


Abbildung 8: Kapillardurchmesser im EDL von C57-Wildtyp-, nNOS-defizienten- und eNOS-defizienten-Mäusen ohne sowie nach 36 Stunden Prazosinbehandlung.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. Gruppengröße jeweils $n=5$.

3.3 Erythrozytenströmungsgeschwindigkeit

Der zweite Schritt zur Berechnung der Wandschubspannung war die Bestimmung der Erythrozytenflussgeschwindigkeiten. Analog zu Auswertung des Kapillardurchmessers geschah dieses durch die Analyse der Videobandaufnahmen und hier an denselben Kapillarabschnitten. Die durchschnittliche Erythrozytenflussgeschwindigkeit der Kapillaren der Kontrollgruppen im unbehandelten Zustand betrug 70 und 100 $\mu\text{m}/\text{sec}$. Die nNOS-defizienten Mäuse wiesen hier mit einer Erythrozytenflussgeschwindigkeit um 90 $\mu\text{m}/\text{sec}$ gegenüber den eNOS-defizienten Mäusen mit Geschwindigkeiten um 80 $\mu\text{m}/\text{sec}$ und den C57/B16-Mäuse mit 70 $\mu\text{m}/\text{sec}$ die höchsten Werte auf (siehe Abb. 9).

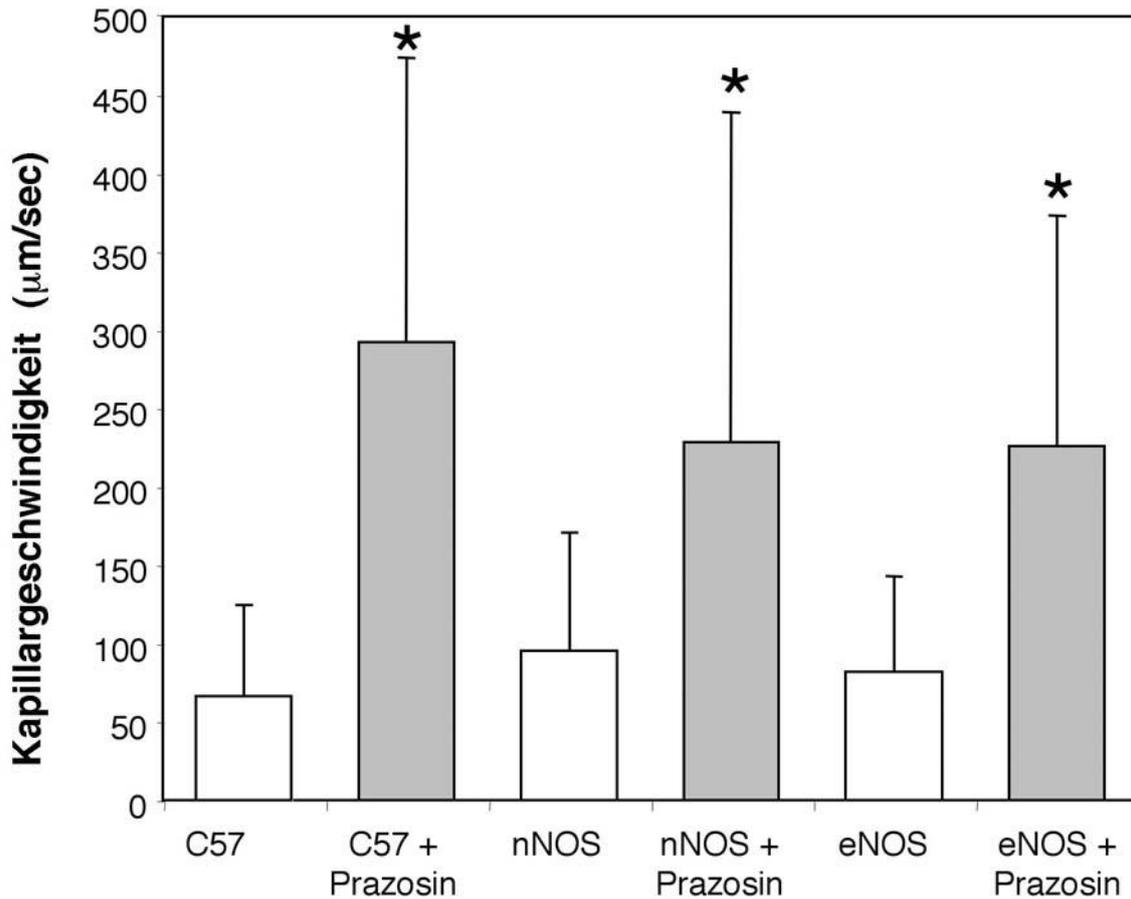


Abbildung 9: Erythrozytenströmungsgeschwindigkeit in Kapillaren des EDL von C57-Wildtyp-, nNOS-defizienten- und eNOS-defizienten-Mäusen ohne sowie nach 36 Stunden Prazosinbehandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. Gruppengröße jeweils $n=5$. * $p \leq 0.05$ signifikant verändert gegenüber unbehandelten Mäusen desselben Stammes.

Eine signifikante Änderung war bei den mit Prazosin behandelten Mäusen festzustellen. Nach 36 Stunden Prazosinfütterung ließen sich durchschnittliche Messwerte zwischen 200 – 300 $\mu\text{m}/\text{sec}$ ableiten. Die Erythrozytenflussgeschwindigkeiten im EDL von C57/B16-Mäusen waren auf bis zu 300 $\mu\text{m}/\text{sec}$ signifikant verändert und somit im Vergleich zum unbehandelten Zustand vervierfacht. Die eNOS- und nNOS-defizienten Mäuse zeigten ebenfalls eine signifikante Veränderung der Erythrozytenflussgeschwindigkeit im Sinne einer Geschwindigkeitssteigerung um das 2- bis 3-fache, der signifikant unterschiedlich war.

In der Abbildung 10 sind die Verteilungen der Erythrozytenflussgeschwindigkeiten für alle drei Mausgruppen jeweils mit und ohne Prazosinfütterung dargestellt. Vergleicht man die drei

Mausgruppen im unbehandelten Zustand, fällt auf, dass die Mausgruppen ein Maximum der relativen Häufigkeit von Erythrozytenströmungsgeschwindigkeiten von 40 bis 120 $\mu\text{m}/\text{sec}$ aufweisen. Deutlich wird auch, dass es in allen drei Mausgruppen einen Grenzbereich für Höchstgeschwindigkeiten von ca. 300 $\mu\text{m}/\text{sec}$ gibt. Ein Vergleich mit den entsprechenden Mausgruppen nach Prazosinfütterung macht deutlich, dass sich die relative Häufigkeit der Erythrozytenflussgeschwindigkeit viel ungleichmässiger verteilt und heterogener ist.

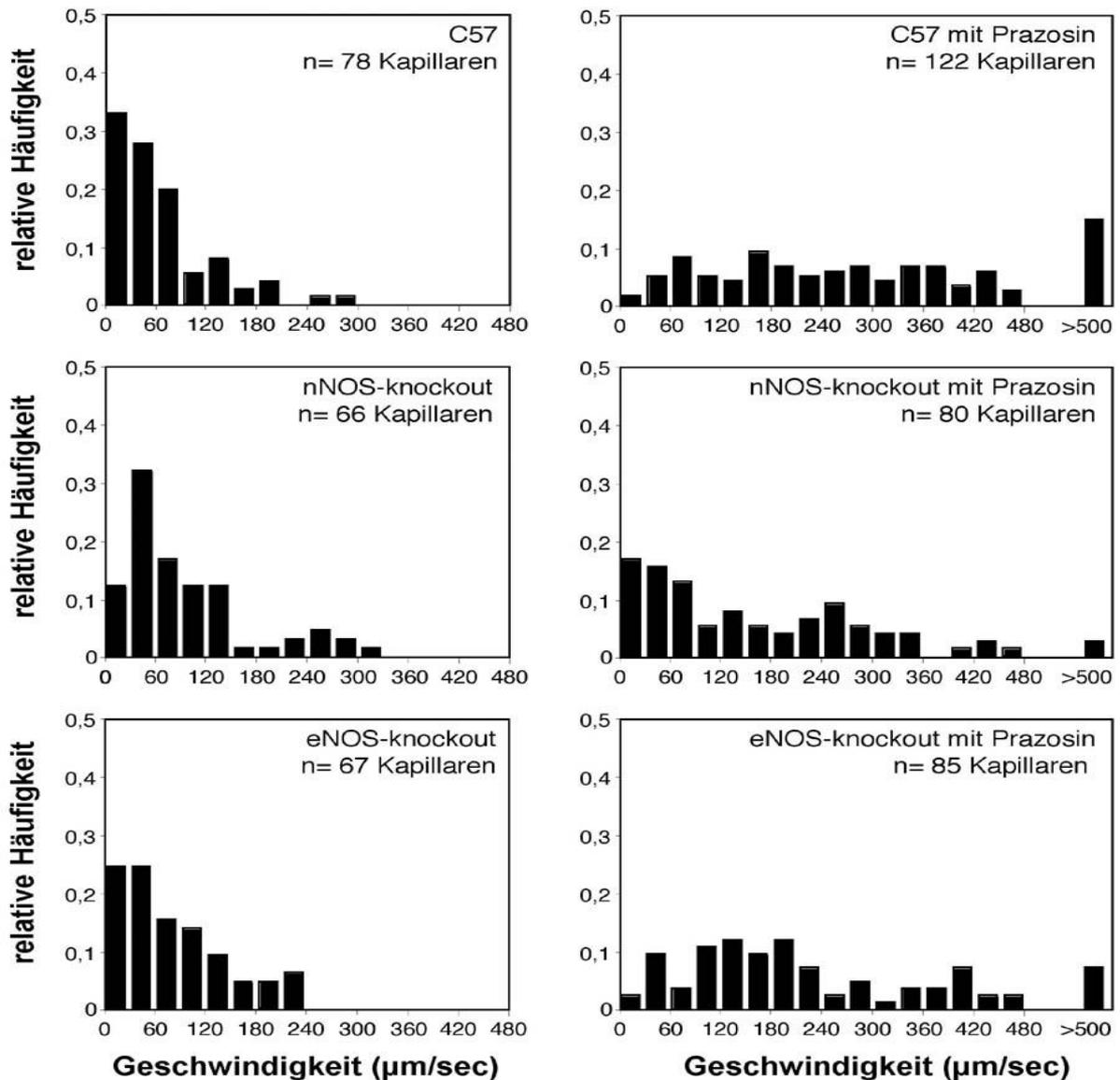


Abbildung 10: Histogramm der Verteilung der Erythrozytenströmungsgeschwindigkeit in Kapillaren des EDL von C57-57/B16-Mäuse, nNOS-defizienten- und eNOS-defizienten-Mäusen ohne sowie nach 36 Stunden Prazosinbehandlung.

3.4 Wandschubspannung

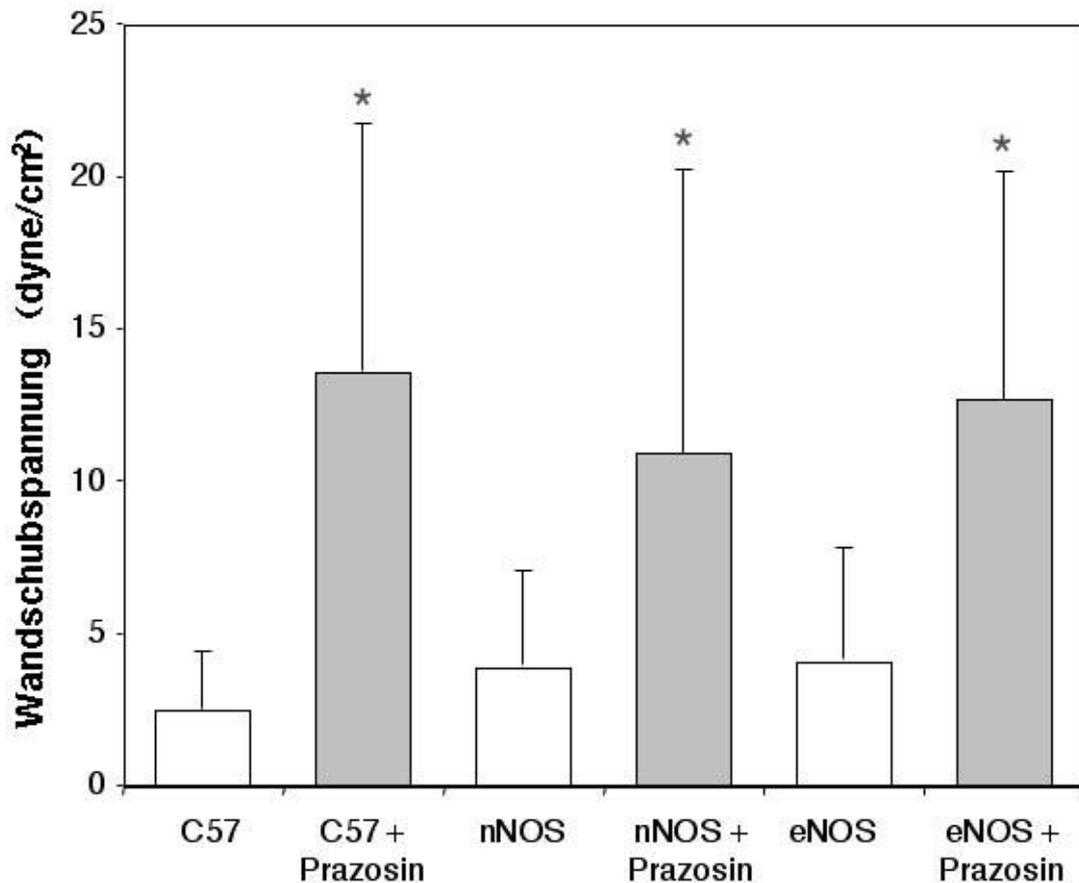


Abbildung 11: Wandschubspannung in Kapillaren des EDL von C57-Wildtyp-, nNOS-defizienten- und eNOS-defizienten-Mäusen ohne sowie nach 36 Stunden Prazosinbehandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. Gruppengröße jeweils $n=5$. * $p \leq 0.05$ signifikant verändert gegenüber unbehandelten Mäusen desselben Stammes.

Die Berechnung der Wandschubspannung in Kapillaren des EDL zeigte in allen drei Mausgruppen eine signifikante Erhöhung nach Prazosinbehandlung. Die Werte für die Wandschubspannung im EDL lagen in den drei unbehandelten Versuchsgruppen zwischen 2 – 4 dyne/cm². In den drei Versuchsgruppen kam es nach Prazosinbehandlung zu einer signifikanten Steigerung der Wandschubspannung in Kapillaren des EDL auf 11 – 14 dyne/cm². Am deutlichsten zeigte sich diese Steigerung der Wandschubspannung bei den behandelten C57/B16-Wildtypmäusen. Die eNOS-Versuchsgruppe hatte mit ca. 13 dyne/cm² eine höhere Wandschubspannung als die nNOS-Versuchsgruppe mit 11 dyne/cm².

Die Darstellung der Wandschubspannung als Histogramm belegt eine deutliche Umverteilung der Wandschubspannung im EDL auf höhere Werte gegenüber den unbehandelten Versuchsgruppen.

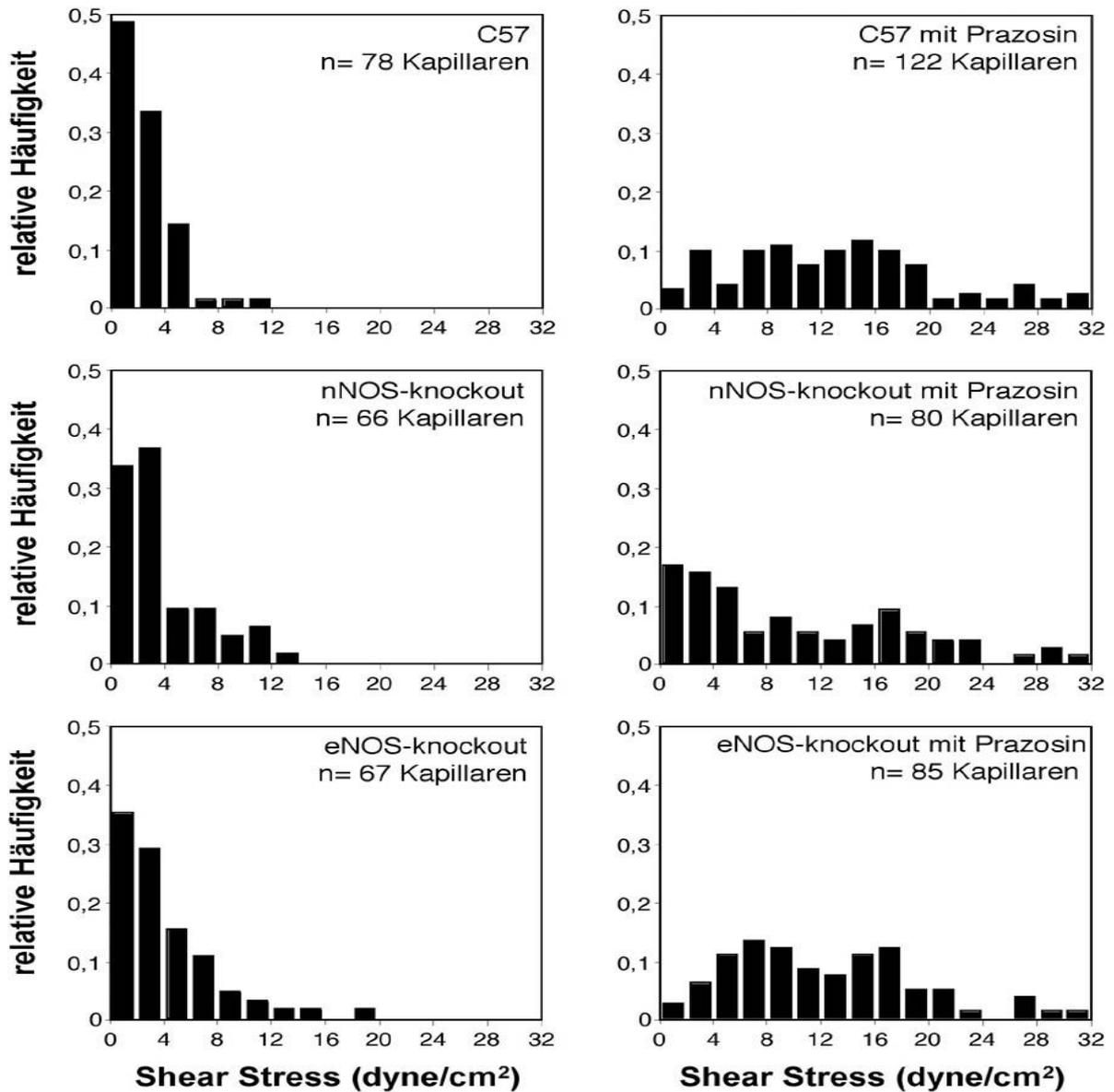


Abbildung 12: Histogramm der Verteilung der Wandschubspannung in Kapillaren des EDL von C57-Wildtyp-, nNOS-defizienten- und eNOS-defizienten-Mäusen ohne sowie nach 36 Stunden mit Prazosinbehandlung.

3.5 Histochemische Darstellung des Kapillarsystems vor und nach Prazosin-Gabe

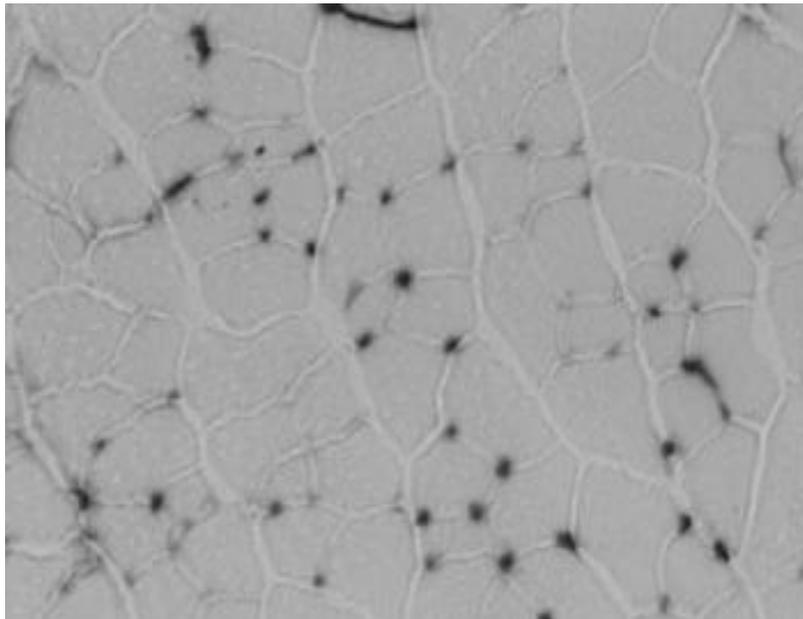


Abbildung 13: Alkalische Phosphatase-Histochemie zur Darstellung des Kapillarsystems im Skelettmuskel der Maus vor Prazosin-Gabe. In der mikroskopischen Aufnahme eines TA-Gefrierschnittes von einer C57/B16-Maus im Ist-Zustand vor zeigen sich die Kapillaren als dunkel angefärbte Punkte im Bindegewebe, welche die Skelettmuskelfasern umgeben.

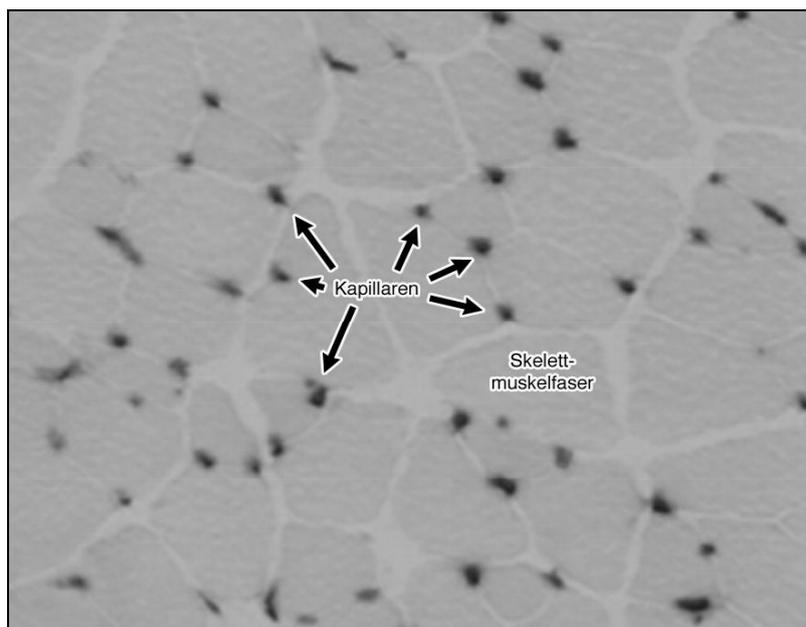


Abbildung 14: Alkalische Phosphatase-Histochemie zur Darstellung des Kapillarsystems im TA der C57/B16-Maus 36 Stunden nach Prazosin-Gabe als Ausdruck einer initial gesteigerten Angiogenese.

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des NO-Systems, insbesondere der nNOS und eNOS auf die Wandschubspannung im kapillären System des Skelettmuskels und damit auf einen möglichen lokalen Angiogenesemechanismus im Skelettmuskel zu untersuchen. In drei Versuchsgruppen á fünf Versuchstieren wurden bei eNOS-, nNOS-Knockout- und C57BL/16-Wildtypmäusen mittels intravitalmikroskopischen Videomonitorings der Gefäßdurchmesser und die Erythrozytenflussgeschwindigkeit in Kapillaren mit und ohne Gabe des alpha-1-antagonistischen Prazosin aufgezeichnet, um mit diesen Werten die Wandschubspannung zu berechnen.

In allen drei Versuchsgruppen war als Beleg der alpha-1-antagonistischen Wirkung von Prazosin ein systemischer Blutdruckabfall von jeweils zehn Prozent im Vergleich zu den unbehandelten Versuchstieren feststellbar.

Weiterhin hatte die Prazosin-Gabe in den drei Versuchsgruppen einen signifikanten Anstieg der kapillären Wandschubspannung zur Folge, welcher am deutlichsten bei den C57/B16-Wildtypmäusen war. Der Anstieg der Wandschubspannung in der eNOS-Versuchsgruppe lag 36 Stunden nach alpha-1-antagonistischer Stimulation um 2 dyne/cm² höher als in der nNOS-Versuchsgruppe (13 dyne/cm² vs. 11 dyne/cm²). Dieser Unterschied war aber nicht signifikant.

4.1 Methodendiskussion

Die in dieser Arbeit durchgeführten in vivo Studien erfolgten mittels intravitalmikroskopischer Untersuchung. Als elementar für einen erfolgreichen Versuch erwies sich die exakte Einhaltung des Versuchsaufbaus bzw. der Versuchsbedingungen.

Ein früher Endpunkt konnte schon während der Prämedikation durch Fehlpunktion der Maus eintreten. Die erste intraperitoneale Gabe des Narkotikums konnte im Fall einer intravasalen Injektion (A. iliaca, Aorta abdominalis) oder einer Verletzung der Abdominalorgane durch die Kanüle den Versuchsablauf verfälschen oder durch Tod des Versuchstieres zu einem vorzeitigen Versuchsabbruch führen. Die intramuskuläre Fehlinjektion löste in einzelnen Fällen eine halbseitige Lähmung des Versuchstieres aus. Intravitalmikroskopisch zeigte sich in diesen Fällen

unter anderem ein Sistieren der Erythrozytenströmungsgeschwindigkeit. Eine zu hohe Sedierung der Versuchstiere verlangsamte ebenfalls die Mikrozirkulation im kapillären Gefäßnetzwerk.

Die Hals- und die Muskelpräparationen waren bei entsprechender praktischer Expertise standardisiert innerhalb von einer Stunde durchzuführen. Voraussetzung für die Muskelpräparation war die Verwendung von feinem mikrochirurgischen Operationsbesteck. Dabei erfolgte eine Kathetersierung der V. jugularis externa zur Volumensubstitution sowie zur Aufrechterhaltung der Sedierung. Essentiell war die Kanülierung der A. carotis externa. Es galt dabei, hohen Blutverlust zu vermeiden und die Kanülierung ohne Luftembolie durchzuführen. Anschließend wurde das kontinuierliche Herz-Kreislauf-Monitoring begonnen. Um den Flüssigkeitsverlust zu begrenzen, wurde der Hals nach abgeschlossener Operation für den Zeitraum des Versuches mit einem feuchten Tuch bedeckt.

Eine sorgfältige, atraumatische Freilegung des EDL von den Muskelfaszien war entscheidend für einen erfolgreichen Versuchsablauf. Hierzu wurde zunächst eine spezielle Pufferlösung angefertigt, mit welcher der Muskel fortwährend benetzt wurde, um das physiologische Milieu des Muskels aufrechtzuerhalten. Nach abgeschlossener Präparation erfolgte unter intravitalmikroskopischer Kontrolle eine erste Inspektion des EDL. Die intravitalmikroskopische Inspektion war ein entscheidender Kontrollpunkt vor Fortführung des weiteren Versuchsablaufs. Unter der Präparation entstandene Schäden am Muskel bzw. an Muskelfasern beeinträchtigten den kapillären Blutfluss unter Umständen derart, dass der Versuch vorzeitig abgebrochen werden musste. Je präziser die Muskelpräparation verlief und je sorgfältiger bzw. atraumatischer die Entfernung der Faszien gelang, desto mehr Ebenen des Gefäßsystems ließen sich mit dem Intravitalmikroskop untersuchen. Folglich war der Einblick in das mikrovaskuläre Gefäßnetzwerk größer, und es konnten mehr Kapillaren intravitalmikroskopisch untersucht und ausgewertet werden.

Weiterhin wichtig war die richtige Lagerung und Positionierung der zu untersuchenden unteren rechten Extremität vor Beginn der Videoaufnahme, um die Blutströmung nicht zu behindern oder zu drosseln.

Ein weiterer limitierender Aspekt im Versuchsablauf war eine erhöhte Atemfrequenz der Versuchstiere während des Videomonitorings, durch die eine objektive Ergebniserhebung nur bedingt möglich war. Ursächlich dafür mag ein zu flaches Sedierungsniveau oder eine allgemein

eingeschränkte körperliche Belastbarkeit der Versuchstiere mit zu hoher Belastung der Herz-Kreislauf-Situation gewesen sein.

4.2 Die Wandschubspannung - ein Faktor für die Angioadaptation

Hudlicka et al beschrieben [24], dass unter chronischer elektrischer Stimulation über einen Zeitraum von zwei Tage, der induzierte Anstieg der Wandschubspannung entweder auf eine Reduktion des vaskulären Widerstandes im proximal gelegenen arteriellen Stromgebiet oder im Bereich der zuführenden Arterien zurückzuführen ist. In ihrem Versuch änderten sich weder der kapilläre Durchmesser noch die Anzahl an Mikrogefäßen, sodass es zu einer stärkeren Perfusion der einzelnen Kapillaren kam. Es wurde jedoch eine Vergrößerung der präkapillären Lumina in den ersten zwei Tagen unter chronisch elektrischer Stimulation beschrieben [24-27].

NO erhält den basalen Gefäßtonus und den Durchmesser der Arteriolen im Skelettmuskel der Ratte aufrecht [25]. Während akuter Muskelkontraktion ist NO auch an der Dilatation von kleinen Arteriolen beteiligt. Unter Prazosinbehandlung lässt die Veränderung der Erythrozytenströmungsgeschwindigkeit und der nachfolgende Anstieg der Wandschubspannung bei gleichem Kapillardurchmesser eine Remodellierung des präkapillären arteriolären Gefäßbettes vermuten [24]. Ähnlich berichteten Milkiewicz [28] sowie Reiser [29], dass eine Reduktion des basalen arteriolären Tonus unter Dilatation auf eine gesteigerte NO Produktion durch eine erhöhte eNOS Expression zurückzuführen ist. Weiterhin ist belegt, dass sowohl die Expression und die Aktivität der nNOS unter chronischer elektrischer Stimulation ansteigt und zudem der Anteil bzw. Gehalt an eNOS in trainierten Rattenmuskeln wesentlich erhöht wird [30].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Expression von angiogenetischen Faktoren durch bestimmte Anforderungen des Gewebes und des Perfusionsstatus des kapillären Netzwerkes induziert und koordiniert werden kann [31-32]. Diese proangiogenetischen Faktoren umfassen z.B. die Ischämie des Gewebes und die Alteration der hämodynamischen Kräfte, insbesondere der Wandschubspannung.

Baum et al. [21] zeigten, dass eine Fütterung mit Prazosin in C57/B16 Wildtyp Mäusen und in nNOS-defizienten Mäusen zur Angiogenese nach 14 Tagen führt. Auffallend war, dass sich bei eNOS-defizienten Mäusen in diesem Zeitraum keine signifikante Angiogenese vollzogen hat.

Verschiedene Autoren wie Dawson [31], Egginton [14] und zuletzt Hudlicka [24] hatten für die Ratte in diesem Zusammenhang eine Zunahme der Wandschubspannung in den ersten zwei Tagen nach Prazosinbehandlung belegen können.

Die Tabelle 2 vergleicht diese Angaben aus den hier aufgeführten Daten mit den in dieser vorgelegten Arbeit erhobenen neuen Daten.

Tabelle 2: Zusammenfassung der experimentellen Daten zur Prazosin-induzierbaren Angiogenese im EDL der Ratte und verschiedener Mausstämme.

	Ratte	C57-Maus	nNOS-knockout-Maus	eNOS-knockout-Maus
Shear stress erhöht nach 1,5 d	+	+ (*)	+ (*)	+ (*)
Angiogenese nach 14 d	+	+	++	-
Referenz	Egginton et al. 2001 [14] Dawson et al. 1989 [31]	Da Silva-Azevedo et al., 2002 [32] Baum et al., 2004 [2] Eigene Daten (*)		

4.3 NO - Einfluss und Auswirkungen auf das kapilläre Gefäßbett

Verschiedene Studien untersuchten den Stellenwert der Wandschubspannung für die Angioadaptation, wobei in vivo- und in vitro-Beobachtungen belegen, dass zelluläre NO-Systeme und angiogenetische Prozesse miteinander wechselwirken, ohne dass der Einfluss der eNOS oder nNOS bislang endgültig bestimmt werden konnte.

Bekannt ist, dass die Wundheilung, die Kapillarsprossung [33] und die Angiogenese [34] im ischämischen Muskel der eNOS-defizienten Maus im Vergleich zur Wildtyp-Maus deutlich eingeschränkt ist. Die hier wirkenden Mechanismen, insbesondere die Interaktionen zwischen den Angiogenesefaktoren, ihren Signalkaskaden und dem NO-System sind jedoch nur zum Teil untersucht worden.

In diesem Zusammenhang belegen verschiedene Arbeiten, dass die Aktivität der eNOS in Endothelzellen durch Angiogenesefaktoren beeinflusst werden kann. In HUVECs (human umbilical vein endothelial cells) und in der isolierten Rattenaorta steigert VEGF die Konzentration der eNOS-mRNA- sowie des eNOS-Proteins [35-36]. In kultivierten postkapillären Endothelzellen kann NO durch Aktivierung des sGC/cGMP-Systems die VEGF-abhängige, nicht jedoch die FGF-2-abhängige Aktivierung von MAP-Kinasen erhöhen [37-38]. Fukumura et al. zeigten, dass die durch VEGF induzierte Angiogenese, Permeabilitätssteigerung und Zunahme des Blutflusses in vivo durch NO vermittelt wird [39]. Des Weiteren kommt es zu einer Expressionssteigerung der eNOS, indem TGF β eine Promoterbindung vor der kodierenden DNA-Sequenz induziert [40].

NO wiederum beeinflusst die Expression dieser Angiogenesefaktoren: Kimura et al. wiesen nach, dass durch die Bindung von NO an ein Hypoxie-Responsive Element (HRE) innerhalb der Promotersequenz VEGF in Hepatomzellen hochreguliert wird [41]. Einen weiteren Aspekt des NO beschrieb die Arbeitsgruppe um Tsurumi et al. bei der experimentellen Ballonangioplastie in glatten Muskelzellen [42]. Sie konnten nachweisen, dass durch eine erhöhte Transkription von VEGF NO antagonisiert wird.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass die Prazosinbehandlung zu einem signifikanten Anstieg der Wandschubspannung führt. Die unten folgende schematische Darstellung skizziert die Rolle des NO und die darüber hinaus reichenden Interaktionen.

Williams et al. [43] verglichen den Effekt der Prazosinbehandlung mit dem der Muskelextirpation. Sie stellten fest, dass die Prazosinbehandlung keinen Einfluss auf den Blutdruck ausübt, während der Blutfluss im Muskel gesteigert wird und die anschließende Erhöhung der kapillären Wandschubspannung die Angiogenese erhöht. Verschiedene Studien am Rattenmuskel mit Prazosininduktion und folgender Erhöhung der Wandschubspannung oder Veränderungen der Sarkomerenlänge (z.B: Stretch-induzierte Überladung ohne Anstieg des Blutflusses) führten zu einem ähnlichen Anstieg der kapillären Versorgung, wenn auch mit unterschiedlichem Mechanismus [23-25].

Diese unterschiedlichen Wachstumsarten lassen sich bestimmten Mustern zuordnen: Die Angiogenese nach Prazosinbehandlung vollzieht sich durch intraluminale Spaltung der Gefäße. Die Dehnung („Stretching“) des Muskels hingegen ruft ein abluminales Sprouting hervor. Während des Sproutings induzieren die extravaskulären konzentrischen Dehnungskräfte einen Anstieg der Aktivität der Matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2) im Muskel. Zu diesem Zeitpunkt besteht bereits eine geringe Kapillarproliferation [25].

Bei Untersuchungen zur Hemmung der Angiogenese durch Antagonisierung der NOS im stimulierten Skelettmuskel wiesen Hudlicka et al. [25] nach, dass es gleichzeitig zu einer Änderung der kapillären Wandschubspannung kommt. Induziert wird dieser Prozess im Wesentlichen durch die mangelnde NO-Produktion.

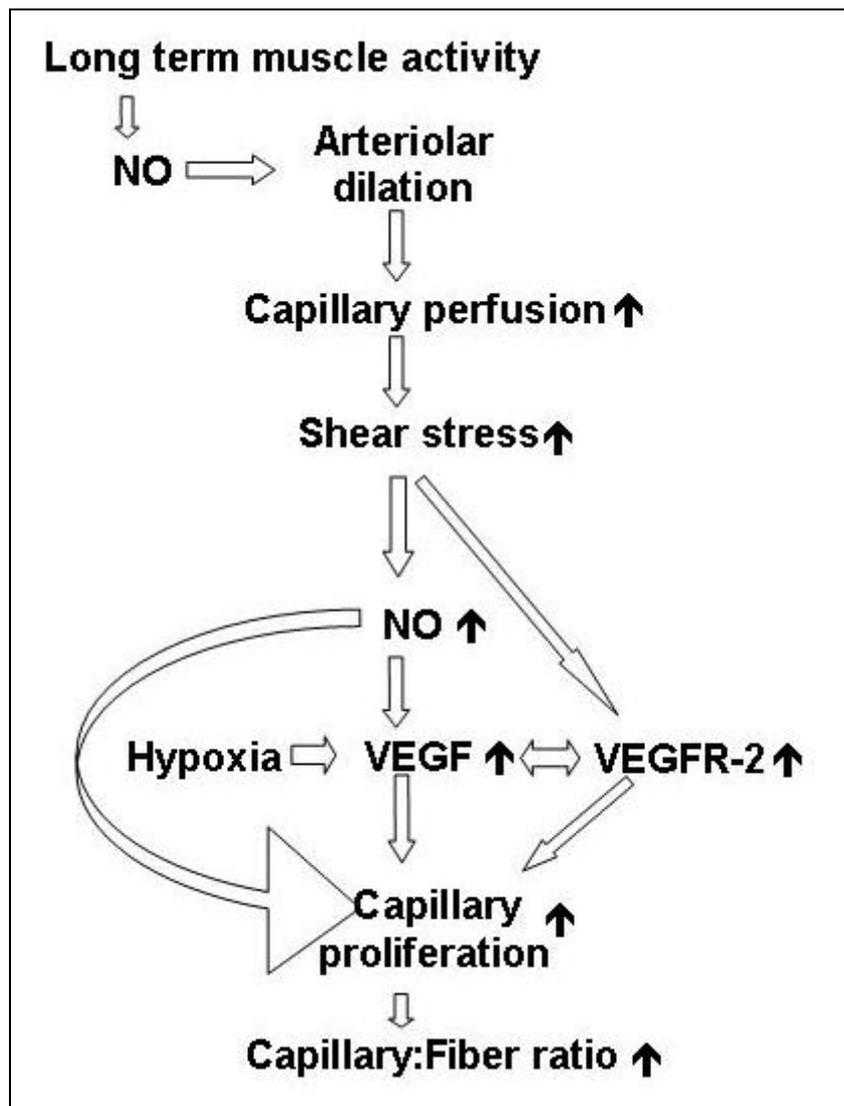


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Wirkung des NO bei der Angiogenese im Skelettmuskel. Adaptiert von Williams et al. (2006) [43].

Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass NO beim frühen Anstieg der kapillären Wandschubspannung als eigentlicher Initiator der Angiogenese im stimulierten Muskel eine entscheidende Rolle spielt, indem es den „upstream“ gelegenen vaskulären Widerstand moduliert [24]. Hieraus läßt sich auch erklären, warum im stimulierten Muskel nach Hemmung der NOS-Aktivität kein Kapillarwachstum mehr stattfindet.

Nicht nur im Skelettmuskel, sondern auch im stimulierten Herzmuskel konnte eine physiologische Angiogenese identifiziert werden [44]. Ursächlich hierfür ist der gesteigerte

Blutfluss. Daraus resultiert eine Erhöhung der Erythrozytenflussgeschwindigkeit, eine Vergrößerung des arteriölen Durchmessers, eine Erhöhung des Kapillardruckes und des kapillären Hämatokrits. Die erhöhte Erythrozytenflussgeschwindigkeit bewirkt reaktiv einen Anstieg der Wandschubspannung in den Kapillaren. Der folgende erhöhte Druck und die größeren Durchmesser wiederum steigern die Wandspannung. Es wäre vorstellbar, dass die so verursachte Veränderung des Endothels auch auf der luminalen Gefäßseite der Kapillaren zu angioadaptiven Veränderungen führt (beispielsweise durch Modifikation der kapillären Basalmembran oder der extrazellulären Matrix, induziert durch Zug und Entspannung). Weiterhin belegten Hudlicka et al. [25], dass die chronische elektrische Stimulation in einer vorübergehenden Erweiterung der Arteriolen resultierte. Folglich war der kapilläre Hämatokrit und die Erythrozytenflussgeschwindigkeit erhöht. Die daraus errechnete Wandschubspannung war im stimulierten Muskel höher als die Kontrollwerte im nichtstimulierten Muskel [25].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Prazosin-induzierte Erhöhung des Blutflusses eine Erhöhung der Erythrozytenflussgeschwindigkeit hervorruft, da die Kapillaren ihren Durchmesser nur bedingt variieren können. Hierdurch erhöht sich die Wandschubspannung, wodurch es zu einer Induktion der Angiogenese kommen könnte, indem eine Beschädigung der Endothelzellen bzw. der Basalmembran die Freisetzung von Wachstumshormonen, NO oder Prostaglandinen bewirkt. Auf diese Weise können Veränderungen in der Mikrozirkulation, die zu einer erhöhten Wandschubspannung führen, die Proliferation der Endothelzellen entweder direkt oder indirekt stimulieren.

Ein entscheidender humoraler Faktor für die Induktion von Angiogenese im Skelettmuskel könnte der VEGF sein. Es scheint insbesondere auf das Kapillarwachstum im Skelettmuskel, der sich in einem Zustand der gesteigerten Aktivität befindet, einen entscheidenden Einfluss zu nehmen. Williams et al. untersuchten [43], welche Elemente des angiogenetischen Prozesses unter physiologischen Bedingungen durch VEGF gesteuert werden [Abb. 16]. Sowohl das Prazosin-abhängige Angiogenesemodell als auch das des stimulierten Skelettmuskels erfordern VEGF.

Hudlicka et al. untersuchten die Interaktionen von eNOS mit dem VEGF- und VEGFR-2-System im EDL der Ratte: Bereits ab dem 2. Tag zeigte sich ein deutlicher Expressionsanstieg der oben genannten Proteine einhergehend mit einer Angiogenese-assoziierten Kapillarproliferation [25]. Nach 7 Tagen war der Kapillar-Faser-Quotient (K/F-Quotient) um 25 %. Eine Hemmung der

eNOS-Aktivität verhinderte den Anstieg der VEGFR-2 und VEGF Expression in den 2 und 4 Tage - nicht aber in den 7 Tage - stimulierten Skelettmuskeln.

Milkiewicz et al. folgerten aus diesen Daten ein NO-Modell: sowohl die über Muskelaktivität angeregte nNOS als auch die durch erhöhten Blutfluss und die erhöhte kapilläre Wandschubspannung angeregte eNOS induzieren über eine Hochregulierung von VEGFR-2 und VEGF die Kapillarproliferation [42]. In dieser Studie wurde weiterhin gezeigt, dass eine erhöhte Wandschubspannung nach Prazosinbehandlung die VEGF Expression in der frühen Phase der Behandlung hochregulieren kann [43]. Eine vermehrte Proliferation der Kapillaren geht einem höheren Verhältnis an VEGF-positiven Kapillaren voraus.

4.4 Angiogenesemechanismen unter Prazosinbehandlung

Prazosin, ein α -Adrenorezeptor-Antagonist, wurde in den frühen 70er Jahren therapeutisch zur Behandlung der arteriellen Hypertonie eingesetzt. Die durch Prazosin induzierte Hemmung der α_1 - und α_2 -adrenergen Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur in der Peripherie führt über eine Vasodilatation zu einem Blutdruckabfall [45].

Hudlicka et al. erforschten darüber hinaus, wie Prazosin die Angiogenese beeinflusst. Über die α_1 -adrenerge Wirkung an den Rezeptoren tritt eine Relaxation der kontrahierten Zellen ein, welche zur Vasodilatation und einem konsekutivem Anstieg und einer Steigerung des Blutflusses in den Arteriolen, den arteriellen Widerstandsgefäßen, führt. Im Weiteren bedingt die Erhöhung des Flusses in der Peripherie einen Anstieg des Hämatokrits. Die nachfolgenden Kapillaren können ihren Durchmesser nur bedingt variieren. Es kommt daher zu einem Anstieg der Strömungsgeschwindigkeit sowie zu einer Erhöhung der Wandschubspannung in diesen Gefäßen [31].

Der nachfolgende Umbau des Kapillarsystems wird durch viele verschiedene Interaktionen und Mechanismen gesteuert [16]. Die hämodynamischen Veränderungen beschädigen zunächst die endotheliale Glykokalix und verursachen in der Folge intraluminale Verwirbelungen, um so die Intussuszeption zu unterstützen. Hierdurch erfolgte die Bildung neuer Kapillaren „aus sich selbst“ heraus, d.h. eine Mutterkapillare teilt sich in zwei Tochterkapillaren.

Eine erhöhte Muskelbelastung und zeitgleiche Erhöhung des Blutvolumenstroms wie bei elektrischer Stimulation des Skelettmuskels und bei Ausdauertraining führt zu einer

Kombination aus Intussuszeption und Kapillarsprossung. Die Integration und Perfusion der neu entstandenen Kapillare an das bestehende Gefäßnetz ist ein etwa drei bis fünf Tage währender Prozess, der wesentlich langsamer als die Intussuszeption nach Prazosinbehandlung abläuft.

Zhou et al. [46-47] sowie Egginton et al. [14] charakterisierten die Intussuszeption im EDL von Ratten nach Prazosinbehandlung. In der Licht- und der Elektronenmikroskopie fanden sie fingerförmige luminale Fortsätze von Kapillarendothelien. Diese schoben sich ohne eine primäre Beteiligung der abluminalen extrazellulären Matrix in das Kapillarlumen hinein und fusionierten mit der gegenüberliegenden Gefäßwand. Es kam zu einer Gefäßneubildung durch Gefäßteilung, welche durch die Entstehung einer neuen Endothelbrücke hervorgerufen wurde. Nach der kompletten Trennung lagen zwei voneinander unabhängige Kapillaren vor [14].

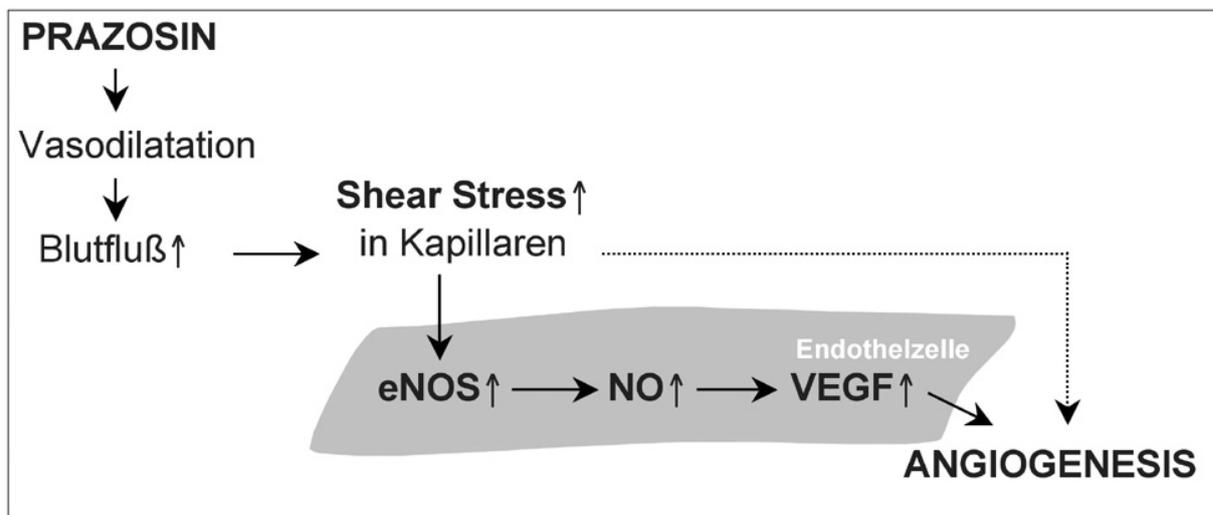


Abbildung 16: Schematische Übersicht über Mechanismen, der Prazosin induzierten Angiogenese im Skelettmuskel. Die unter Prazosin induzierte Vasodilatation führt zu einem Anstieg der Blutströmung, so dass die Wandschubspannung im kapillären Netzwerk des Skelettmuskels ansteigt. In Mäusen steigt die VEGF-Expression als Reaktion auf die erhöhte Wandschubspannung an, wodurch es zur Angiogenese kommt. eNOS, NO und VEGF sind wichtige Faktoren für die wandschubspannungsinduzierte Angiogenese.

Die Untersuchungsergebnisse von Baum et al. [21] demonstrieren, dass Mäuse ohne ein funktionierendes eNOS-/NO-System auf Prazosinapplikation nicht signifikant mit Angiogenese im EDL reagieren. Die Auswertung des K/F-Quotienten ergab eine stärkere Stimulation der Angiogenese in nNOS-defizienten Mäusen über das eNOS-System. Umgekehrt stellte sich bei

der eNOS-defizienten Maus bereits in der Ausgangssituation ohne Prazosinbehandlung eine höhere Kapillardichte dar. Die Prazosinapplikation selber veränderte die Kapillardichte in den eNOS-defizienten Mäusen nur geringfügig.

Ähnlich berichten Lee et al. [48], dass eNOS-defiziente-Mäuse eine verlangsamte Wundheilung und Kapillarsprossung aufweisen. Analog beschreiben Murohara et al. [49] eine verzögerte Angiogenese im ischämischen Skelettmuskel. Die Interaktion zwischen dem eNOS-System und der Angiogenese wird somit unterstrichen.

Eine Erklärung für den effektiveren angiogenetischen Prozess in nNOS-defizienten Mäusen als in den Wildtyp C57/Bl6-Mäusen, lässt eine anti-angiogenetische Wirkung des nNOS-/NO-Systems vermuten [50].

Versuchstiere mit Defizienz an dem eNOS- oder dem nNOS-System könnten Kompensationsmechanismen entwickelt haben [51]. Die starke Einschränkung der Angiogenese in den eNOS-defizienten Mäusen könnte das Resultat einer Mangelproduktion an NO durch fehlende eNOS sein. In der Reaktionskette durch die unter Prazosin bewirkte Erhöhung der Wandschubspannung ist NO als Signalgeber entscheidend. Unterstützt wird diese Annahme auch dadurch, dass bei den eNOS-defizienten Mäusen eine Änderung der cGMP-abhängigen Signaltransduktionskaskade in den glatten Muskelzellen bereits bekannt ist [52-54]. Segal kann belegen, dass Angiogenese von den bestehenden Kapillarendothelien, in denen das eNOS/NO-System lokalisiert ist, ausgeht [55]. Hingegen ist der Weg der Angiogenese für das NO, welches über die nNOS im Sarkolembereich der Skelettmuskelfasern des EDL gebildet wird erst möglich, wenn eine Diffusion durch die Endothelzellen erfolgt ist. Einen weiteren Erklärungsansatz für die geringere Angiogenese fügt Murad hinzu, denn bei der Diffusion könnten hohe Konzentrationen an NO, durch die kurze Halbwertszeit der Substanz bedingt, verloren gehen [56].

5 Zusammenfassung

Die Wandschubspannung ist ein zentraler Faktor der mikrovaskulären Hämodynamik. Ihre tangentielle Wirkung auf die Endothelzellen gewährleistet und etabliert die Aufrechterhaltung eines physiologischen Gleichgewichtes der Perfusion in vielen Geweben, so auch im Skelettmuskel. Wie die mikrovaskuläre Hämodynamik in dem jeweiligen Gewebe sich in einer Feedback-Reaktion adaptiert, ist jedoch weitgehend unbekannt. Allerdings scheint das Signalmolekül (NO), hergestellt durch NO-Synthasen (NOS) dabei eine wichtige Rolle einzunehmen. Im Skelettmuskel wird NO sowohl durch die im Endothelium verankerte eNOS als auch durch die sarkolemmal lokalisierte nNOS bereitgestellt.

Das Ziel in der vorliegenden Arbeit war es in vivo den Einfluss der eNOS und nNOS auf die Etablierung der Wandschubspannung in Kapillaren zu analysieren. Die Umsetzung dieser Fragestellung konnte nach Ausarbeitung und Etablierung eines intravitalmikroskopischen Verfahrens erfolgen. Auf diese Art konnte das mikrovaskuläre Kapillarsystem im Musculus extensor digitorum longus (EDL) der Maus durch kontinuierliches Videomonitoring dargestellt und offline analysiert werden. Im Rahmen der Auswertung erfolgte durch Bestimmung der Geschwindigkeit der Erythrozytenströmung und des Kapillardurchmessers eine Berechnung der apparenten Wandschubspannung in den Kapillaren. Diese Untersuchungen wurden an drei Mausstämmen (C57/B16-, nNOS- und eNOS-Knockout-Mäuse) sowohl im unbehandelten (basal) als auch nach Behandlung mit Prazosin (über 36 Stunden als Zusatz im Trinkwasser) durchgeführt.

Alle Versuchstiere der Kontrollgruppe ohne Prazosinbehandlung wiesen während der intravitalmikroskopischen Untersuchung einen nahezu konstanten mittleren arteriellen Blutdruck von 90 – 110 mmHg auf. Der Vergleich zu den Versuchsgruppen nach Prazosinbehandlung präsentierte dagegen eine deutliche Erniedrigung des mittleren arteriellen Blutdruckes auf 80 – 100 mmHg. In beiden Gruppen mit und ohne Prazosinbehandlung lag der durchschnittliche Kapillardurchmesser zwischen 6,0 +/- 0,5 µm. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der einzelnen Gruppen. Auffallend war die Veränderung der Erythrozytenflussgeschwindigkeiten in den einzelnen Versuchsgruppen. So hatten die nNOS-

defizienten Mäuse mit 90 $\mu\text{m}/\text{sec}$ im Vergleich zu den eNOS-defizienten Mäusen mit 80 $\mu\text{m}/\text{sec}$ und den C57/B16-Mäuse mit 70 $\mu\text{m}/\text{sec}$ die höchsten Werte. Eine signifikante Änderung im Sinne einer Geschwindigkeitssteigerung um das 2- bis 3-fache in den Kapillaren war nach der Behandlung mit Prazosin nachweisbar. Es ließen sich Messwerte zwischen 200 - 300 $\mu\text{m}/\text{sec}$ bei den eNOS- und nNOS-defizienten sowie den C57/B16-Mäusen ableiten. Die hieraus berechnete Wandschubspannung zeigte analog in allen drei Mausgruppen nach Prazosinbehandlung eine signifikante Erhöhung der Wandschubspannung. Die Werte für die Wandschubspannung lagen ohne Behandlung zwischen 2 – 4 dyne/cm^2 . Nach Prazosinbehandlung (high flow) steigerte sich die Wandschubspannung auf Werte zwischen 11 – 14 dyne/cm^2 .

Weder unter Basalbedingungen noch unter high flow Bedingungen nach Prazosinbehandlung führte die genetische Ablation von nNOS und eNOS zu einer veränderten Wandschubspannung. Diese Daten lassen vermuten, dass NO nicht bei der Erhöhung der Wandschubspannung nach arterieller Vasodilatation beteiligt ist.

6 Referenzen

1. Sonina RS. Dilatation of arterioles in the frog submaxillary muscle under the influence of visible light. *Biull Eksp Biol Med*, 1976;2:142-4.
2. Wagner PD, Mark O, Tang K et al. Muscle-targeted deletion of VEGF and exercise capacity in mice. *Respir Physiol Neurobiol*, 2006;28:159-66.
3. Harris J, Lexicon technicum, 1704. http://www.mikroskop-museum.de/geschichte_18jh.htm
4. Witte S. Microphotometric techniques in intravital microrcirculatory studies. *J Microsc*, 1979;116:373-84.
5. Veit VK, Chernukh AM. Microcirculatory changes in the mesentery and skeletal muscle of the rat in relation to systemic arterial pressure during stimulation of the hypothalamic nuclei. *Biull Eksp Biol Med*, 1980;90:139-42.
6. Lipowsky HH, Usami S, Chien S et al. Human SS red cell rheological behavior in the microcirculation of cremaster muscle. *Blood Cells*, 1982;8:113-26.
7. Datsenko AV, Shikhodyrov VV. Automatic image analysis in the study of the microcirculatory bed. *Arkh Pathol*, 1986;48:75-8.
8. Stuehmer C, Schumann P, Bormann KH et al. A new model for chronic in vivo analysis of the periosteal microcirculation. *Microvasc Res*, 2009;77:104-8
9. Lee J, Jirapatnakul AC, Reeves AP et al. Vessel diameter measurement from intravital microscopy. *Ann Biomed Eng*, 2009;37:913-26.
10. Djonov V, Baum O, Burri PH. Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell Tissue Res*, 2003;314:107-17.
11. Burri PH, Tarek MR. A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. *Anat Rec*, 1990;22:35-45.
12. Prior BM, Yang HT, Terjung RL. What makes vessels grow with exercise training? *J Appl Physiol*, 2004;97:1119-28.
13. van Groningen JP, Wenink AC, Testers LH. Myocardial capillaries: increase in number by splitting of existing vessels. *Anat Embryol (Berl)*, 1991;184: 65-70.
14. Egginton S, Zhou AL, Brown MD et al. Unorthodox angiogenesis in skeletal muscle. *Cardiovasc Res*, 2001;49:634-46.
15. Pries AR, Secomb TW. Rheology of the microcirculation. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2003;29:143-8.

16. Zakrzewicz A, Secomb TW, Pries AR. Angioadaptation: keeping the vascular system in shape. *News Physiol Sci*, 2002;17:197-201.
17. Skalak TC, Price RJ. The role of mechanical stresses in microvascular remodeling. *Microcirculation*, 1996;3:143-65.
18. Cowan DB, Langille BL. Cellular and molecular biology of vascular remodeling. *Curr Opin Lipidol*, 1996;7:94-100.
19. Pries AR. A versatile video image analysis system for microcirculatory research. *Int J Microcirc Clin Exp*, 1988;7:327-45.
20. Johnson PC, Wayland H. Regulation of blood flow in single capillaries. *Am J Physiol.*, 1967;212:1405-15.
21. Baum O, Da Silva-Azevedo L, Willerding G et al. Endothelial NOS is a main mediator for shear stress-dependent angiogenesis in skeletal muscle after prazosin administration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004;287:H2300-8.
22. Pries AR, Secomb TW, Gaethgens P, Gross JF. Blood flow in microvascular networks. Experiments and simulation. *Circ Res*, 1990;67:826-34.
23. Hudlicka O. Is physiological angiogenesis in skeletal muscle regulated by changes in microcirculation? *Microcirculation*, 1998;5:5-23.
24. Hudlicka O, Brown MD. Adaptation of skeletal muscle microvasculature to increased or decreased blood flow: role of shear stress, nitric oxide and vascular endothelial growth factor. *J Vasc Res*, 2009;46:504-12.
25. Hudlicka O, Brown MD. Changes in capillary shear stress in skeletal muscles exposed to long-term activity: Role of nitric oxide. *Microcirculation*, 2006;13:249-59.
26. Hudlicka O, Brown MD, Silgram H. Inhibition of capillary growth in chronically stimulated rat muscles by N(G)-nitro-l-arginine, nitric oxide synthase inhibitor. *Microvasc Res*, 2000;59:45-51.
27. Hudlicka O, Fronek K. Effect of long-term electrical stimulation of rabbit fast muscles on the reactivity of their supplying arteries. *J Vasc Res*, 1992;29:13-19.
28. Milkiewicz M, Hudlicka O, Brown MD et al. Nitric oxide, VEGF, and VEGFR-2: interactions in activity-induced angiogenesis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005;289:336-43.
29. Reiser PJ, Kline W, Vaghy PL. Induction of neuronal type nitric oxide synthase in skeletal muscle by chronic electrical stimulation in vivo. *J Appl Physiol*, 1997;82:1250-55.

30. McAllister RM, Jasperse JL, Laughlin MH. Nonuniform effects of endurance exercise training on vasodilatation in rat skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 2005;98:753-61.
31. Dawson JM, Hudlicka O. The effects of long term administration of prazosin on the microcirculation in skeletal muscles. *Cardiovasc Res*, 1989;23:913-920.
32. Da Silva-Azevedo L, Baum O, Zakrzewicz A et al. Vascular endothelial growth factor is expressed in endothelial cells isolated from skeletal muscles of nitric oxide synthase knockout mice during prazosin-induced angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002;297:1270-6.
33. Lee PC, Salyapongse AN, Bragdon GA et al. Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice. *Am J Physiol*, 1999;277:1600-8.
34. Murohara T, Asahara T. Nitric oxide and angiogenesis in cardiovascular disease. *Antioxid. Redox Signal*, 2002;4:825-31.
35. Hood JD, Meininger CJ, Ziche M et al. VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am J Physiol*, 1998;274:H1054-8.
36. Bouloumié A, Schini-Kerth VB, Busse R. Vascular endothelial growth factor up-regulates nitric oxide synthase expression in endothelial cells. *Cardiovasc Res*, 1999;41:773-80.
37. Ziche M, Jones J, Gullino PM. Role of prostaglandin E1 and copper in angiogenesis. *Natl Cancer Inst*, 1982;69:475-82.
38. Parenti A, Morbidelli L, Douglas JG et al. Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in postcapillary endothelium. *J Biol Chem*, 1998;273:4220-26.
39. Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A et al. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 2001;98:2604-09.
40. Inoue N, Venema RC, Sayegh HS. Molecular regulation of the bovine endothelial cell nitric oxide synthase by transforming growth factor-beta 1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995;15:1255-61.
41. Kimura H, Weisz A, Kurashima Y et al. Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood*, 2000;95:189-97.
42. Tsurumi Y, Murohara T, Krasinski K et al. Reciprocal relation between VEGF and NO in the regulation of endothelial integrity. *Nat Med*, 1997;3:879-86.

43. Williams JL, Cartland D, Rudge JS et al. VEGF trap abolishes shear stress- and overload-dependent angiogenesis in skeletal muscle. *Microcirculation*, 2006;13:499-509.
44. Hudlicka, O. Growth of capillaries in skeletal and cardiac muscle. *Circ Res*, 1982;50:451-61.
45. Zusman RM. The role of alpha 1-blockers in combination therapy for hypertension. *Int J Clin Pract*, 2000;54:36-40.
46. Zhou AL, Egginton S, Brown MD et al. Capillary growth in overloaded, hypertrophic adult rat skeletal muscle: an ultrastructural study. *Anat Rec*, 1998;252:49-63.
47. Zhou A, Egginton S, Hudlicka O et al. Internal division of capillaries in rat skeletal muscle in response to chronic vasodilator treatment with alpha1-antagonist prazosin. *Cell Tissue Res*, 1998;293:293-303.
48. Lee PC, Salyapongse AN, Bragdon GA et al. Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice. *Am J Physiol*, 1999;277:1600-8.
49. Murohara T, Asahara T, Silver M et al. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest*, 1998;101:2567-78.
50. Cherwek DH, Hopkins MB, Thompson MJ et al. Fiber type-specific differential expression of angiogenic factors in response to chronic hindlimb ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000;279:932-8.
51. Christopherson KS, Brecht DS. Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease. *J Clin Invest*, 1997;100:2424-9.
52. Lau KS, Grange RW, Isotani E et al. nNOS and eNOS modulate cGMP formation and vascular response in contracting fast-twitch skeletal muscle. *Physiol Genomics*, 2000;2:21-7.
53. Grange RW, Meeson A, Chin E et al. Functional and molecular adaptations in skeletal muscle of myoglobin-mutant mice. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;281:1487-94.
54. Grange RW, Isotani E, Lau KS et al. Nitric oxide contributes to vascular smooth muscle relaxation in contracting fast-twitch muscles. *Physiol Genomics*. 2001;5:35-44.
55. Segal SS, Brett SE, Sessa WC. Codistribution of NOS and caveolin throughout peripheral vasculature and skeletal muscle of hamsters. *Am J Physiol*. 1999;277:1167-77.
56. Murad F. Cellular signaling with nitric oxide and cyclic GMP. *Braz J Med Biol Res*. 1999;11:1317-27.

7 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
M.	Musculus
EDL	Extensor Digitorum Longus
eNOS	Endothel NO-Synthase
FGF	Fibroblast Growth Factor
MMP	Matrix Metalloproteinasen
nNOS	Neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
TA	Musculus Tibialis Anterior
V.	Vena
VEGF	Vascular endothelial growth factor

8 Tabellen und Abbildungsverzeichnis

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: AP-Medium

Tabelle 2: Zusammenfassung der experimentellen Daten zur Prazosin-induzierbaren Angiogenese im EDL der Ratte und verschiedener Mausstämmen.

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Intravitalmikroskop zur Beobachtung der Mikrozirkulation im Fisch

Abbildung 2: Schematische Übersicht über die beiden Angiogenesemechanismen: Intussuszeption und Sprouting.

Abbildung 3: Schematische Übersicht zum Ablauf des vaskulären Remodellings.

Abbildung 4: Intravitalmikroskop mit Versuchsanordnung und Doppelblitzbelichtung.

Abbildung 5: Versuchsablauf.

Abbildung 6: Bestimmung der Erythrozytenflussgeschwindigkeit.

Abbildung 7: Blutdruck in C57-, nNOS-defizienten- und eNOS-defizienten-Mäusen ohne sowie nach 36 Stunden Prazosinbehandlung. Gemessen über den Zeitraum eines Versuches (ca. 8 Stunden).

Abbildung 8: Kapillardurchmesser im EDL von C57-Wildtyp-, nNOS-defizienten- und eNOS-defizienten-Mäusen ohne sowie nach 36 Stunden Prazosinbehandlung.

Abbildung 9: Erythrozytenströmungsgeschwindigkeit der Kapillaren im EDL von C57-Wildtyp-, nNOS-defizienten- und eNOS-defizienten-Mäusen ohne sowie nach 36 Stunden Prazosinbehandlung.

Abbildung 10: Histogramm der Verteilung der Geschwindigkeit in Kapillaren im EDL von C57-57/Bl6-Mäuse, nNOS-defizienten- und eNOS-defizienten-Mäusen ohne sowie nach 36 Stunden Prazosinbehandlung.

Abbildung 11: Wandschubspannung in Kapillaren im EDL von C57-Wildtyp-, nNOS-defizienten- und eNOS-defizienten-Mäusen ohne sowie nach 36 Stunden Prazosinbehandlung.

Abbildung 12: Histogramm der Verteilung der Wandschubspannung in Kapillaren im EDL von C57-Wildtyp-, nNOS-defizienten- und eNOS-defizienten-Mäusen ohne sowie nach 36 Stunden mit Prazosinbehandlung.

Abbildung 13: Alkalische Phosphatase-Histochemie zur Darstellung des Kapillarsystems im Skelettmuskel der Maus vor Prazosin-Gabe.

Abbildung 14: Alkalische Phosphatase-Histochemie zur Darstellung des Kapillarsystems im TA der C57/B16-Maus 36 Stunden nach Prazosin-Gabe.

Abbildung 15: Schematische Darstellung der Wirkung des NO bei der Angiogenese im Skelettmuskel

Abbildung 16: Schematische Übersicht über den Mechanismus, über den Prazosin Angiogenese im Skelettmuskel induzieren soll.

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Axel R. Pries für die Überlassung dieses Promotionsthemas und besonders dafür, dass er mich jederzeit mit seinem Wissen, motivierenden Ratschlägen, Vorschlägen und konstruktiver Kritik unterstützt hat.

Ebenso von Herzen kommend möchte ich Herrn Privatdozent Dr. Oliver Baum für die große moralische Unterstützung, die telefonischen Konferenzen nach Bern, die Geduld und das hartnäckige und kritische Überarbeiten meiner Arbeit danken. Mit anhaltendem Optimismus und Engagement hat er maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin danke ich Frau Dipl.-Med. Bettina Reglin für die Einführung in die Bildanalyse und die Hilfe bei computertechnischen Problemen.

Frau Sabine Hahn für die Hilfestellung und Unterstützung bei den Versuchen und dem Hand in Hand Arbeiten bei den Auswertungen.

Danken möchte ich auch Herrn Professor R. Gossrau sowie Frau Heidrun Richter für die Unterstützung beim Anfertigen der Kryostatschnitte.

Ich möchte zudem und vor allem meiner Mutter danken, die mich immer unterstützt und immer wieder Kraft gegeben hat, in kritischen Phasen den Mut nicht zu verlieren und mit Kontinuität weiter zu arbeiten.

10 Erklärung an Eides statt

Ich, Safak Gül, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Der Einfluss von Stickstoffmonoxid (NO) auf die Wandschubspannung im kapillären Gefäßnetzwerk des Skelettmuskels: Eine intravitalmikroskopische Studie am Mausmodell“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

11 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.