

Aus der
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Mitte
gemeinsame Einrichtung der
Humboldt-Universität zu Berlin und der
Freien Universität Berlin

Richard-Thoma-Laboratorien für Arteriogenese
Innere Medizin CC 11 Schwerpunkt Kardiologie
Center for Cardiovascular Research (CCR)

eingereicht über das
Institut für Veterinär-Physiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Auswirkungen der pharmakologischen Modulation der Bradykininrezeptoren auf die Arteriogenese im Tiermodell

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Nora Gatzke
Tierärztin
aus Lübben/Spreewald

Berlin 2011
Journal-Nr.: 3496

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Prof. Dr. Heike Tönhardt
Zweiter Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Ivo R. Buschmann
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Fink

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

rats, animal models, brain, kinins, receptors, vessels, monocytes, circulation,
cardiovascular diseases

Tag der Promotion: 24.11.2011

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-092-8

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2011

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written
authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2012

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Wer neue Heilmittel scheut, muss alte Übel dulden.

Francis Bacon

In Gedenken an meine Oma

Inhaltsverzeichnis

1.	<i>Aufgabenstellung</i>	1
2.	<i>Einleitung</i>	3
2.1.	<i>Pathophysiologie der Blutgefäße</i>	3
2.1.1.	<i>Kollateralkreisläufe</i>	3
2.1.1.1.	<i>Natürliche Kollateralkreisläufe im Gehirn</i>	3
2.1.1.2.	<i>Kollateralkreisläufe in der Peripherie</i>	4
2.1.2.	<i>Pathologie der Blutgefäße: Okklusive Gefäßkrankheiten</i>	5
2.1.2.1.	<i>Zerebrale Insuffizienz durch Stenose der Arteria carotis</i>	6
2.1.2.2.	<i>Periphere arterielle Verschlusskrankheit (PAVK)</i>	8
2.2.	<i>Arteriogenese</i>	11
2.2.1.	<i>Geschichtlicher Hintergrund und Definition</i>	11
2.2.2.	<i>Mechanismen der Arteriogenese</i>	12
2.2.3.	<i>Tierexperimentelle Studien</i>	14
2.2.3.1.	<i>Periphere Arteriogenese</i>	14
2.2.3.2.	<i>Zerebrale Arteriogenese</i>	15
2.3.	<i>Bradykinin</i>	17
2.3.1.	<i>Das Kallikrein-Kinin-System</i>	17
2.3.2.	<i>Bradykininrezeptoren und Antagonisten</i>	19
2.3.3.	<i>Wirkungen von Bradykinin</i>	21
2.3.4.	<i>Bradykinin und Gefäßwachstum</i>	23
3.	<i>Materialien und Methoden</i>	26
3.1.	<i>Materialien</i>	26
3.2.	<i>Versuchstiere</i>	26
3.2.1.	<i>Haltungsbedingungen</i>	26
3.2.2.	<i>Tierversuchsgenehmigung</i>	27
3.2.3.	<i>Randomisierung</i>	27
3.3.	<i>Methoden</i>	29
3.3.1.	<i>Zeitlicher Ablauf</i>	29
3.3.2.	<i>Medikamentöse Behandlung</i>	30
3.3.3.	<i>Narkose</i>	32
3.3.4.	<i>Analgesie</i>	33

3.3.5. <i>Untersuchung der peripheren Arteriogenese</i>	33
3.3.5.1. <i>Verschluss der Arteria femoralis</i>	33
3.3.5.2. <i>Bestimmung des Lahmheitsindex (LI)</i>	34
3.3.5.3. <i>Bestimmung des kollateralen Perfusionsindex (CPI)</i>	35
3.3.6. <i>Untersuchung der zerebralen Arteriogenese</i>	35
3.3.6.1. <i>Dreigefäßverschluss (3-VO)</i>	35
3.3.6.2. <i>Sham-Operation</i>	36
3.3.6.3. <i>Zerebrovaskuläre Reaktivität (CVR)</i>	37
3.3.6.4. <i>Postmortale Latexangiographie</i>	38
3.3.6.5. <i>Implantation der osmotischen Minipumpe</i>	39
3.3.7. <i>Monozytenmigrationsassay</i>	39
3.3.8. <i>Statistische Auswertung</i>	40
4. <i>Ergebnisse</i>	41
4.1. <i>Periphere Arteriogenese nach FAO</i>	41
4.1.1. <i>Effekte der BR-Inhibition nach FAO</i>	41
4.1.1.1. <i>Lahmheitsindex (LI)</i>	42
4.1.1.2. <i>Kollateraler Perfusionsindex (CPI)</i>	43
4.2. <i>Zerebrale Arteriogenese im 3-VO-Modell</i>	44
4.2.1. <i>3-VO erzeugt Hypoperfusion</i>	44
4.2.2. <i>Gewichtsverlauf</i>	45
4.2.2.1. <i>Einfluss von BR1 und BR2 auf den Gewichtsverlauf</i>	45
4.2.2.2. <i>Einfluss der BR1-Stimulation auf den Gewichtsverlauf</i>	47
4.2.3. <i>Untersuchung der adaptiven und therapeutischen Arteriogenese</i>	50
4.2.3.1. <i>Zerebrovaskuläre hämodynamische Reaktivität (CVR)</i>	50
4.2.3.1.1. <i>Adaptive Arteriogenese</i>	50
4.2.3.1.2. <i>Pharmakologische Inhibition von BR1 und BR2</i>	52
4.2.3.1.3. <i>Pharmakologische Stimulation von BR1</i>	54
4.2.3.2. <i>3-VO induziert zerebrales Kollateralwachstum</i>	55
4.2.3.2.1. <i>Adaptive Arteriogenese</i>	55
4.2.3.2.2. <i>Pharmakologische Inhibition von BR1 und BR2</i>	58
4.2.3.2.3. <i>Pharmakologische Stimulation von BR1</i>	61
4.3. <i>Monozytenmigrationsassay</i>	65

5. Diskussion	66
5.1. <i>Evaluierung der eingesetzten Methoden</i>	66
5.1.1. <i>Induktion der peripheren Arteriogenese nach FAO</i>	66
5.1.1.1. <i>FAO als Arteriogenesemodell</i>	66
5.1.1.2. <i>CPI als peripherer Arteriogenese-Nachweis</i>	68
5.1.2. <i>Induktion zerebraler Arteriogenese nach 3-VO</i>	69
5.1.2.1. <i>Zerebrale Hypoperfusion durch 3-VO</i>	69
5.1.2.2. <i>CVRC als zerebraler Arteriogenese-Nachweis</i>	69
5.1.2.3. <i>Bestimmung der Gefäßdiameter mittels Latexangiographie</i>	71
5.2. <i>Auslegung und Bewertung der ermittelten Ergebnisse</i>	72
5.2.1. <i>3-VO erzeugt adaptive Arteriogenese</i>	72
5.2.2. <i>Periphere Arteriogenese nach BR-Inhibition</i>	73
5.2.3. <i>Zerebrale Arteriogenese nach BR-Inhibition</i>	74
5.2.4. <i>Vasogenes Hirnödem und BR-Stimulation</i>	77
5.2.5. <i>Zerebrale Arteriogenese nach BRI-Stimulation</i>	78
5.2.6. <i>Bedeutung der Ergebnisse des Monozytenmigrationsassays</i>	78
5.3. <i>Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen</i>	79
5.4. <i>Konsequenzen für die Therapie bei arteriellen Verschlusskrankheiten</i>	80
6. Zusammenfassung	82
7. Summary	83
8. Zitierte Literatur	84
9. Abkürzungen	95
10. Abbildungen und Tabellen	97
10.1. <i>Abbildungen</i>	97
10.2. <i>Tabellen</i>	97
11. Anhang	98
11.1. <i>Detaillierte Materialienaufstellung</i>	98
11.2. <i>Detaillierte Methodenaufstellung</i>	107
11.2.1. <i>Femoral artery occlusion (FAO)</i>	107
11.2.2. <i>Kollateraler Perfusionsindex (CPI)</i>	107
11.2.3. <i>Dreigefäßverschluss (3-VO)</i>	108
11.2.4. <i>Zerebrovasculäre Reaktivität (CVR)</i>	109

11.2.5. Postmortale Latexangiographie	111
11.2.6. Implantation der osmotischen Minipumpe	111
12. Publikationsliste.....	113
13. Danksagung.....	115
14. Selbstständigkeitserklärung	116

1. Aufgabenstellung

Diese Dissertation beschäftigt sich mit dem Thema „*Auswirkungen der pharmakologischen Modulation der Bradykininrezeptoren auf die Arteriogenese im Tiermodell*“.

Arterielle Verschlusskrankheiten, wie die periphere arterielle Verschlusskrankheit, führen zu Herzinfarkt und Schlaganfall, den zwei häufigsten Todesursachen weltweit. Das Krankheitsbild Schlaganfall ist die häufigste Ursache für Behinderungen und vorzeitige Invalidität in Deutschland. Jährlich erleiden rund 200.000 Menschen einen Schlaganfall, die Tendenz ist steigend.

Der bei weitem effizienteste Mechanismus zur Aufrechterhaltung einer ausreichenden Gewebesperfusion nach arteriellen Gefäßverschlüssen ist die Arteriogenese, welche das adaptive Wachstum von präexistenten kollateralen Arterien zu funktionellen Konduktanzgefäßen bezeichnet. Kollaterale Arterien sind Umgehungskreisläufe, welche im Zuge der Arteriogenese aktiv im Lumendiameter anwachsen, wodurch effektiv ein Hypoperfusionsgebiet distal von einem Gefäßverschluss mit Blut versorgt werden kann (Prinzip eines biologischen Bypasses).

Bei sich schnell entwickelnden Stenosen oder Verschlüssen ist das adaptive (natürliche) Kollateralarterienwachstum jedoch nicht ausreichend, um das Perfusionsdefizit zu kompensieren. Aus diesem Grund ist es ein wichtiges klinisches Ziel, nach neuen Möglichkeiten zu suchen, das Wachstum von Kollateralarterien therapeutisch zu stimulieren und damit die Bildung eines natürlichen Bypasses zu optimieren. Zur Identifizierung von neuen Zielmolekülen für eine therapeutische Arteriogenese werden von Hillmeister *et al.* 2008 durch Genexpressionsanalysen molekulare Mechanismen der zerebralen Arteriogenese in der Ratte aufgezeigt. Es konnte eine deutliche Hochregulierung der Kininogen-Expression selektiv in wachsenden Kollateralarterien gezeigt werden. Kininogen ist ein Vorläuferprotein der Familie von vasoaktiven Bradykinin-Metaboliten, welche Ihre biologische Wirkung über den Bradykinin-Rezeptor 1 (BR1) und Bradykinin-Rezeptor 2 (BR2) vermitteln. Durch die Anwendung des Hinterlaufokklusionsmodells an BR1- und BR2-*knock out*-Mäusen gelang es in weiteren Vorarbeiten, die funktionelle Relevanz der Bradykininrezeptorwirkung für die Arteriogenese nachzuweisen. Dies führt zur Hypothese, dass die Bradykininrezeptorsignalwirkung vermutlich über seine proinflammatorischen Eigenschaften die Arteriogenese fördert. Daher wird erwartet, dass die pharmakologische Modulation des

Bradykininrezeptorsignalweges zu einer Hemmung bzw. Stimulation des Kollateralwachstums führt (therapeutische Arteriogenese).

Um den proarteriogenen Effekt von Bradykinin und dessen Metaboliten in der klinischen Anwendung therapeutisch nutzen zu können, soll nun im Rahmen dieser Dissertation erstmals geklärt werden, ob sich die Arteriogenese auch durch pharmakologische Rezeptoragonisierung bzw. -antagonisierung beeinflussen lässt.

Diese Arbeit teilt sich in zwei Abschnitte, der pharmakologischen Inhibition sowie der pharmakologischen Stimulation des Bradykinin-Signalweges.

Im ersten Teilprojekt soll zunächst im Hinterlaufmodell (Okklusion der Arteria femoralis, FAO) der Maus untersucht werden, ob durch eine tägliche Applikation selektiver BR1- und BR2-Antagonisten die periphere Arteriogenese inhibiert werden kann. Dafür wird die Arteriogenese durch eine tägliche Lahmheitsdiagnostik und sieben Tage nach FAO durch eine Endpunktmessung des kollateralen Perfusionsindexes bestimmt.

Im zweiten Teilprojekt soll speziell die zerebrale Arteriogenese durch die Anwendung der Dreigeäßverschluss technik an der Ratte (3-VO: Okklusion beider Vertebralarterien und der linken Arteria carotis communis) zunächst bei therapeutischer Inhibierung untersucht werden. Dafür soll die Wirkung der Bradykinin-Rezeptor-Antagonisten direkt auf das Diameterwachstum von kollateralen Arterien ermittelt und anschließend über eine Blutflussmessung validiert werden. Weiterhin soll die Möglichkeit einer therapeutischen Induktion der zerebralen Arteriogenese über eine Stimulation der Bradykinin-Rezeptoren untersucht werden, da einer solchen pharmakologischen Intervention eine hohe klinische Relevanz zukommt. In der Tat konnte in Vorarbeiten gezeigt werden, dass ein experimentell induzierter Schlaganfall in der Ratte zu wesentlich geringeren Infarktarealen führt, wenn vorher mit proarteriogenen Molekülen wie dem Granulozyten-Makrophagen Koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF) das kollaterale Arterienwachstum präventiv stimuliert wurde (Buschmann et al., 2003). Aus diesem Grund wird im zweiten Teilprojekt der Einfluss auf die zerebrale Arteriogenese nach Agonisierung der Bradykinin-Rezeptoren im 3-VO-Modell untersucht.

In vitro Analysen zur Migration von Monozyten sollen nach Gabe von Bradykinin-Antagonisten bzw. -Agonisten zur Bestätigung der *in vivo* Daten führen.

2. Einleitung

2.1. Pathophysiologie der Blutgefäße

2.1.1. Kollateralkreisläufe

Die Kollateralversorgung von Gefäßgebieten beschreibt die Ausprägung von alternativen Gefäßzuflüssen in das Versorgungsgebiet einer Hauptarterie. Diese ermöglicht auch unter Umgehung des Hauptgefäßes bei Okklusion oder Stenose die Blutversorgung des minderdurchbluteten Areals.

Die Rekrutierung und das Wachstum bereits existierender Kollateralen sind demnach ein potenter Kompensationsmechanismus für Durchblutungsstörungen, da nach dem Gesetz für laminare Strömungen von Hagen-Poiseuille der Widerstand eines Blutgefäßes mit der vierten Potenz seines Gefäßdurchmessers abnimmt.

Hagen-Poiseuillesches Gesetz für laminare Strömungen in Rohren:

$$I = \frac{r^4 \pi \Delta P}{8 \eta l} \left[\frac{m^3}{s} \right]$$

I: Volumenstromstärke, r: Radius des Gefäßes, ΔP Druckdifferenz, l: Länge des Rohres, η : Blutviskosität

2.1.1.1. Natürliche Kollateralkreisläufe im Gehirn

Im Jahre 1664 veröffentlichte erstmals der praktizierende Arzt Thomas Willis (1621-1675) in London seine Untersuchungsergebnisse zur vaskulären Anatomie des Gehirns. Er erkannte gemeinsam mit Richard Lower (1631-1691), dass das Gehirn nach der Okklusion proximaler Hauptgefäßzuflüsse über das anastomosierende Gefäßnetzwerk des Circulus arteriosus cerebri noch mit Blut versorgt werden kann. Aus diesem Grund wurde der ringförmige Arterienkreis

Circulus arteriosus Willisi genannt. In den Willis-Kreislauf speisen zwei Arterienpaare: die Arteriae carotis internae (ICA) und die Arteriae vertebrales. Die beiden Arterienpaare vereinigen sich an der Hirnbasis zum Circulus arteriosus Willisi. Vom Willis-Kreis gehen paarweise die drei großen Hirnarterien, die Arteriae cerebri anteriores (ACA), die Arteriae cerebri mediae (MCA) und die Arteriae cerebri posteriores (PCA) ab. Die paarige Arteria communicantis posteriores (PComA) bildet die Verbindung zwischen der ICA und der PCA. Die Endäste der ACA, MCA und PCA stehen epizerebral über ein Netzwerk aus subarachnoidalen Arteriolen, den Heubner'schen leptomenigealen Anastomosen in Verbindung (Heubner, 1872).

2.1.1.2. Kollateralkreisläufe in der Peripherie

Luigi Porta wies bereits im Jahre 1845 in über 200 Tierversuchen die Bedeutung der Kollateralblutversorgung u.a. in der Peripherie nach. Er erzeugte experimentell die Entstehung der Kollateralblutversorgung durch eine Ligatur der Arteria femoralis (*Femoral artery*) in einem Schwein und fasste seine Ergebnisse in seinem Werk „*Delle alterazioni patologiche delle arterie per la ligatura e la torsione*“ zusammen. Er beschrieb neu entstandene, korkenzieherartig geformte Gefäße, welche den Bereich der Ligatur umgeben (Abbildung 1). Porta konnte beweisen, dass die Blutversorgung durch Unterbindung der Arteria femoralis durch die ausgebildeten Kollateralen kompensiert werden kann und es deshalb nicht zu Nekrosen der distalen Extremität kommt (Donati, 1961; Zanobio, 1973). Von Eckstein wurden im Jahre 1940 experimentelle Ligaturen der Arteria femoralis bei Hunden durchgeführt und der Blutfluss distal der Ligatur gemessen. Er zeigte, dass es direkt nach einem arteriellen Verschluss zu einer kompensatorischen Rekonstitution des Blutflusses kommt (Eckstein et al., 1946).

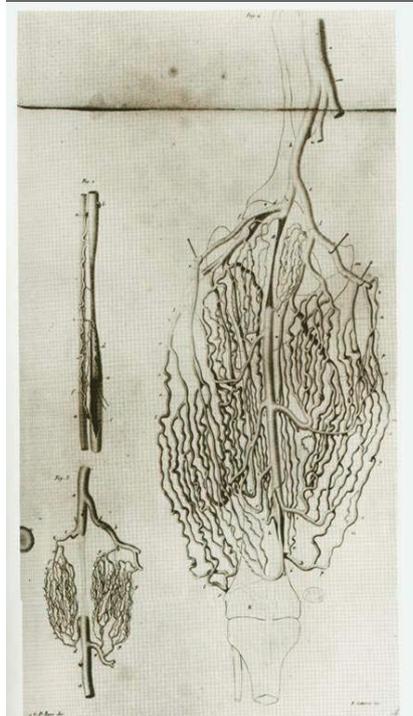


Abbildung 1: Canines Kollateralsystem der Arteria femoralis

Darstellung arterieller Kollateralen acht Monate nach Ligatur der Arteria femoralis eines Hundes (aus „Of the pathological Alterations of the Arteries due to Ligature and Torsion – Experiments and Observations“. G. Bernardoni Ed., Milan, 1845).

2.1.2. Pathologie der Blutgefäße: Okklusive Gefäßkrankheiten

Nach wie vor zählen kardiovaskuläre Erkrankungen zu den häufigsten Todesursachen in den industrialisierten Ländern der westlichen Welt (Kramer et al., 2008). In Deutschland wurde 2006 nahezu bei jedem zweiten Verstorbenen der Tod durch eine Erkrankung des Herz-Kreislauf-Systems festgestellt (Statistisches Bundesamt). Neben den oft einschneidend lebensverändernden Konsequenzen für Betroffene und Angehörige ist diese Erkrankung aufgrund lebenslanger Behinderung von enormer sozioökonomischer Bedeutung (Klever-Deichert et al., 1999).

2.1.2.1. Zerebrale Insuffizienz durch Stenose der Arteria carotis

Das Krankheitsbild Schlaganfall steht weltweit an zweiter Stelle der Todesursachen und ist der häufigste Grund für Behinderungen und vorzeitiger Invalidität in Deutschland. Bei steigender Tendenz erleiden jährlich rund 200.000 Menschen einen Schlaganfall. Anhand einer Interstroke-Studie konnte gezeigt werden, dass fünf gut beeinflussbare Risikofaktoren 90% des Schlaganfallrisiko ausmachen: Bluthochdruck, Rauchen, Übergewicht, schlechte Ernährung und mangelnde Bewegung (Hankey, 2011). Der überwiegende Anteil aller Schlaganfälle ist ischämisch bedingt. Nur bei ca. 15% handelt es sich um intrakranielle Blutungen. Schlaganfälle ischämischer Genese treten in Folge einer hämodynamischen Perfusionsminderung aufgrund intra- oder extrakranieller Gefäßokklusion auf. Insbesondere die chronisch verlaufende arteriosklerotische Verschlusskrankheit der Arteria carotis mit extra- oder intrakranieller Verschlusslokalisation ist mit der erhöhten Gefahr nachfolgender Schlaganfälle assoziiert (Marzewski et al., 1982).

Hämodynamisch relevante Stenosen der hirnversorgenden Kopf-Hals-Gefäße verursachen im Stromgebiet distal der Stenose einen Perfusionsdruckabfall. Abhängig ist die Perfusionsminderung vom Grad der Stenose, der Dauer der Flussbehinderung und der Kapazität der Kollateralversorgung (Mendelow et al., 1987; Ringelstein et al., 1983). Bei unzureichender Ausprägung der Kollateralgefäße begünstigen die Abnahme des Perfusionsdruckes und der Anstieg von Stoffwechselmetaboliten eine Dilatation der lokalen Widerstandsgefäße und damit eine Ausschöpfung der zerebrovaskulären Reservekapazität (CVRC). Die Möglichkeit zur Kollateralgefäßrekrutierung spielt daher eine bedeutende Rolle (Hossmann, 1993; Steiner et al., 2000). Klinische Studien demonstrieren die Wichtigkeit einer adäquaten hämodynamischen Kompensation über den Circulus arteriosus Willisii in Patienten mit hochgradiger intrakranieller Stenose der Arteria carotis (Hendrikse et al., 2001; Schierling et al., 2009).

Etwa 25% aller ischämischen Schlaganfälle werden durch arteriosklerotische Veränderungen extrakranieller hirnversorgender Arterien verursacht (Grau et al., 2001). Erkrankungen der Karotisbifurkation stehen dabei im Vordergrund, sie führen in den meisten Fällen durch arterioarterielle Embolien, seltener durch hämodynamische Insuffizienz, zur zerebralen Ischämie. Die langsame Entwicklung einer Stenose der Arteria carotis interna kann symptomlos bleiben (Stadium I). Das Risiko, einen Schlaganfall zu erleiden, liegt bei 5% jährlich, unter

maximaler konservativer Therapie bei 2% (ACAS-Studie, 2005). Eine symptomatische Karotisstenose (Stadium II) äußert sich in vorübergehenden Ausfallserscheinungen, wie zum Beispiel einer kurzzeitigen Lähmung eines Armes und/oder Beines oder einer Sehstörung (Gesichtsfeldausfälle). Dauert diese Symptomatik nur Minuten oder Stunden an, wird sie als TIA (transitorische ischämische Attacke) (Poeck and Hacke, 2006) und bei verlangsamer Rückbildung innerhalb einiger Tage bis maximal drei Wochen als PRIND (prolongiertes ischämisches neurologisches Defizit) bezeichnet (Delenk, 2006). Symptomatische Stenosen, die zu einer transitorischen ischämischen Attacke oder zu einem ischämischen Insult geführt haben, erhöhen das Schlaganfallrisiko deutlich (Giles and Rothwell, 2006). Das Rezidivrisiko beträgt im ersten Monat ca. 10%, 15% im folgenden sowie 5% im zweiten Jahr. In den folgenden Jahren liegt es bei circa 2%, also etwa im Bereich einer asymptomatischen Stenose (Rothwell et al., 2000). Das Stadium III beinhaltet den manifesten Insult mit entweder zu- oder abnehmender neurologischer Symptomatik. Als Stadium IV bezeichnet man den abgelaufenen Insult mit persistierender Symptomatik.

Die Diagnostik der Karotisstenose erfolgt zumeist durch farbkodierte Duplexsonographie (FKDS), kontrastmittelgestützte Magnetresonanztomographie (MRA) und/oder computertomographischer Angiographie (CTA). Die transkranielle Dopplersonographie (TCD) kann zusätzliche Informationen über die größeren intrakraniellen Arterien liefern. Sie ermöglicht die Beurteilung der intrakraniellen Durchblutungsverhältnisse, insbesondere der seitenübergreifenden Kollateralversorgung. Der "Goldstandard" in der Diagnostik ist bis heute die intraarterielle digitale Subtraktions-Angiographie. Bei speziellen Fragestellungen über die Erkrankung gibt die regionäre Hirndurchblutungsmessung zur Bestimmung der Reservekapazität weiteren Aufschluss, sie kann in schwierigen Fällen die Indikation zur Revaskularisierung untermauern.

In der Therapie kommt der Elimination und Behandlung der vaskulären Risikofaktoren entsprechend publizierter Empfehlungen eine zentrale Rolle zu (Smith et al., 2006), da die Karotisstenose häufig Teil der generalisierten Arteriosklerose ist und somit ein erhöhtes vaskuläres Risiko darstellt. Die symptomatische Therapie im akuten Fall erfolgt durch Thrombozytenaggregationshemmung mittels Acetylsalicylsäure (ASS), Clopidogrel oder ASS plus Dipyridamol bei Patienten mit einer Arteriosklerose der hirnversorgenden Gefäße. Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass Clopidogrel und ASS/Dipyridamol in der Sekundärprophylaxe zerebrovaskulärer Ereignisse gleich wirksam und sicher waren (Diener

et al., 2008). Jedoch hemmt ASS im Gegensatz zu Clopidogrel das zerebrale Kollateralgefäßwachstum (Dülsner, 2009). Bei schweren Ablagerungen in der Halsschlagader sind chirurgische Eingriffe notwendig. Es stehen zwei Therapiemöglichkeiten zur Auswahl. Beim klassischen Operationsverfahren wird die Arteria carotis operativ eröffnet und Kalkablagerungen entfernt (Endarteriektomie). In den 1980er Jahren wurden erste Erfahrungen mit der perkutanen, transluminalen Angioplastie, bei der die verengte Karotisarterie mit einem Ballon aufgedehnt und eine Gefäßstütze (Stent) eingebracht wird, beschrieben (Deutsche Gesellschaft für Neurologie/Deutsche Schlaganfallgesellschaft, Stent vs. Operation, 2010). Seither wurde diese Technik weiterentwickelt, wird zunehmend häufiger angewandt und ist als Alternative zur operativen Behandlung etabliert (Ringleb and Hacke, 2007).

Dennoch können die Ergebnisse der symptomatischen Therapie nicht darüber hinwegtäuschen, dass derzeit keine zufriedenstellende prophylaktische Behandlungsstrategie existiert. Die therapeutische Stimulation der adaptiven Arteriogenese soll zukünftig als aussichtsreicher Therapiezweig ausgebaut werden, um bereits präventiv ein klinisches Ereignis wie den Schlaganfall zu verhindern.

2.1.2.2. Periphere arterielle Verschlusskrankheit (PAVK)

Definiert ist die periphere arterielle Verschlusskrankheit als Einschränkung der Durchblutung der Extremitäten versorgenden Arterien durch Stenosen oder Verschlüsse (Huppert et al., 2010). In den meisten Fällen ist die untere Extremität betroffen. Die Ursache einer chronischen PAVK ist in den meisten Fällen eine fortgeschrittene Arteriosklerose und muss deshalb stets als generalisierter Krankheitsprozess betrachtet werden. Neben dem Alter sind der Diabetes mellitus und das Rauchen die wichtigsten kardiovaskulären Risikofaktoren. Die PAVK wird nach dem Schweregrad der Symptome in verschiedene Stadien eingeteilt (S3-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (PAVK) (Stand 2009)):

Stadium I: asymptomatische PAVK

Stadium II: Belastungsschmerz (sog. Claudatio intermittens) –

Beschwerden bei Gehstrecke ab 200m (Stadium IIa)

Beschwerden bei Gehstrecke unter 200m (Stadium IIb)

Stadium III: Ruheschmerz

Stadium IV: Nekrose, Gangrän

Bei der Diagnosestellung stehen neben der Anamnese mit Fokus auf den klinischen Symptomen und Risikofaktoren am Beginn der Untersuchung eine Inspektion, seitenvergleichende Palpation und Auskultation der Extremitätenarterien im Vordergrund. Dabei lassen Strömungsgeräusche über der Aorta abdominalis, den Beckenarterien sowie der Arteria femoralis im gesamten Verlauf Stenosen vermuten. Die Bestimmung des Ankle Brachial Indexes (ABI = Blutdruck Knöchel/Arm) mittels nichtinvasiver Messung des Dopplerverschlussdruckes eignet sich zur einfachen und kostengünstigen Basisdiagnostik. In verschiedenen Untersuchungen konnte belegt werden, dass die kardiovaskuläre Prognose mit dem Ankle Brachial Index korreliert. Wichtige zusätzliche Möglichkeiten zum Nachweis einer PAVK bei speziellen Fragestellungen sind die Oszillographie, Lichtreflexrheographie und Zehendruckmessung (Huppert et al., 2010). Die transkutane Sauerstoffpartialdruckmessung (tcPO₂-Messung) zur Beurteilung der Sauerstoffversorgung des Gewebes ist ein weiteres diagnostisches Verfahren (Norgren et al., 2007). Die farbkodierte Duplexsonographie ist die diagnostische Methode der ersten Wahl zur Abklärung der Aorta und ihrer Äste sowie der Becken- und Beinarterie, sie ermöglicht die Beurteilung von Gefäßwand, Gefäßlumen und perivaskulärer Umgebung. Bei unklarem Befund oder manchmal auch zur genaueren Therapieplanung ist eine zusätzliche radiologische Bildgebung sinnvoll (Huppert et al., 2010). Auch hier ist die intraarterielle Angiographie in digitaler Subtraktionstechnik (DSA) der „Goldstandard“ zur Darstellung der Beinstrombahn, doch auch die computertomographische Angiographie (CTA) und die magnetresonanztomographische Angiographie (MRA) sind geeignete Alternativen zur Bildgebung.

Zur objektiven Quantifizierung der schmerzfreien und maximalen Wegstrecke eignen sich Belastungsuntersuchungen, insbesondere zur Demaskierung einer in Ruhe gut kompensierten PAVK und zur Unterscheidung zwischen Claudicatio bzw. Pseudoclaudicatio. Dabei wird eine Laufbandergometrie unter standardisierten Bedingungen so lange durchgeführt, bis der

Patient über Schmerzen in den Beinen klagt. Vor und nach der Laufbandergometrie wird der ABI gemessen. Ein Abfall des ABI um 20% gilt als Beweis für eine PAVK.

Therapeutisch kommt der körperlichen Aktivität für alle Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen eine besondere Bedeutung zu. Bei einer Claudicatio intermittens ist Gehtraining die Therapie der Wahl, immer in Ergänzung zur medikamentösen Sekundärprävention (Deutsche Gesellschaft für Angiologie). Hier steht die Thrombozytenfunktionshemmung zur Reduktion peripherer vaskulärer Ereignisse an erster Stelle. In einer zusammenfassenden Bewertung unter Einbeziehung sämtlicher Thrombozytenfunktionshemmer (Acetylsalicylsäure (ASS), Clopidogrel, Ticlopidin, Dipyridamol, Picotamid) konnte bei allen Patienten mit PAVK eine Risikoreduktion ischämischer Ereignisse um 23% nachgewiesen werden (Clagett et al., 2004). Vasoaktive Substanzen sind nur dann einzusetzen, wenn die Gehstrecke unter 200 m liegt und ein Gehtraining nicht oder nur eingeschränkt durchgeführt werden kann. Eine Steigerung der Gehstrecke ist nur für die Vasoaktiva Cilostazol nach einer Therapie von sechs Monaten (Regensteiner et al., 2002) und Naftidofuryl bei einer Behandlung bis zwölf Monaten (De Backer et al., 2008) nachgewiesen. Kommt es zum ischämischen Ruheschmerz (Stadium III nach Fontaine) oder gar zum Ulkus und/oder Gangrän (Stadium IV nach Fontaine) an der betroffenen Gliedmaße, sind Prostaglandine indiziert (Loosemore et al., 1994). Dadurch erzielte Wirkungen sind weniger Amputationen, eine Reduktion des ischämischen Schmerzes und eine verkürzte Abheilung von adäquat versorgten Ulzerationen. Ähnlich wie bei der Behandlung der Karotisstenose hat in den letzten Jahren die katheterinterventionelle Behandlung (Ballonangioplastie, Stents) zunehmend an Bedeutung gewonnen, während die Anzahl gefäßchirurgischer Eingriffe zurückging. Therapeutische Revaskularisationsstrategien wie diese kommen aber für circa ein Fünftel der Patienten mit stenosierenden Gefäßerkrankungen aufgrund von Komorbiditäten oder der Komplexität des Gefäßbefundes nicht in Betracht (Seiler, 2003). Gerade diese Patientengruppen würden von einer Stimulation des Gefäßwachstums als alternative Behandlungsstrategie profitieren, denn die Stimulation des Kollateralwachstums gilt als vielversprechende therapeutische Alternative zur Wiederherstellung des Blutflusses (Schirmer and van Royen, 2004).

2.2. Arteriogenese

2.2.1. Geschichtlicher Hintergrund und Definition

Bereits 1669 beschrieb der englische Anatom Richard Lower erstmals kollaterale Verbindungen und erkannte die Existenz von arteriolären Anastomosen, die verschiedene Arterien miteinander verbinden. Im Folgenden stellte er die Hypothese auf, dass im Falle eines Durchblutungsdefizits die kollateralen Anastomosen als alternative Perfusionswege dienen (Tubbs et al., 2009).

Im Jahre 1893 beschrieb der Pathologe Richard Andreas Thoma in seiner Publikation „Untersuchungen über die Histogenese und Histomechanik des Gefäßsystems“ den Zusammenhang zwischen dem Durchmesser einer Arterie und der Blutflussgeschwindigkeit innerhalb des Gefäßes. Er stellte die Hypothese auf, dass eine Veränderung dieses Verhältnisses zu Wachstum oder Regression des Gefäßwachstums führt. Er erkannte also bereits vor über 100 Jahren, dass die Schubspannung an der Regulation von Gefäßwachstum beteiligt ist und legte damit den Grundstein zum Prinzip des Kollateralwachstums (Thoma, 1893).

Murray war der Meinung, dass das vaskuläre System optimal „konfiguriert“ ist, dass die Menge an mechanischer und metabolischer Arbeit so klein wie möglich gehalten wird, um einen adäquaten Blutfluss zu gewährleisten. Er behauptete, dass die Schubspannung innerhalb des gesamten Gefäßsystems konstant ist und dass der Blutfluss in jedem einzelnen Gefäß proportional zu seinem Gefäßdurchmesser ist (Murray, 1926).

Wolfgang Schaper zeigte 1971 die flussinduzierte Proliferation endothelialer und muskulärer Gefäßzellen in aktivierten Kollateralen. Er prägte 1996 zusammen mit Werner Risau und Ramon Munoz-Chapuli den Begriff Arteriogenese (Arras et al., 1998; Schaper and Scholz, 2003). Der Begriff Arteriogenese wurde definiert, um den Prozess des Kollateralgefäßwachstums von der Angiogenese differenzieren zu können (Buschmann and Schaper, 2000; Schaper and Buschmann, 1999; Schaper and Scholz, 2003).

Angiogenese beschreibt die durch Hypoxie induzierte Aussprossung neuer Kapillaren aus bestehenden Gefäßen. Die Arteriogenese hingegen findet abseits der Gewebehypoxie im nicht-ischämischen Bereich statt (Buschmann and Schaper, 1999). Sie bezeichnet den Umbau

(positives “outward remodeling“) präexistent angelegter kollateraler Arteriolen zu Konduktanzgefäßen (Buschmann and Schaper, 2000). Diese präexistenten Verbindungen, die als Kollateralarterien bzw. Kollateralen bezeichnet werden, haben das Potential, ihren Durchmesser in einem aktiven Umbauprozess drastisch zu vergrößern (Buschmann and Schaper, 1999). Dadurch kann der Verschluss einer größeren Arterie kompensiert werden; es bildet sich ein natürlicher Bypass um eine Okklusionstelle.

In tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass es nach Ligatur der Arteria femoralis im distalen Hinterlauf zur Ischämie und dadurch induzierten Angiogenese kommt. Gleichzeitig findet die Arteriogenese auf Höhe der Okklusion statt, wo keine Anzeichen einer Ischämie gefunden werden (Buschmann and Schaper, 1999).

Die Arteriogenese ist bei Weitem der effizienteste adaptive Mechanismus für die Aufrechterhaltung einer ausreichenden Gewebepfusion nach arteriellem Gefäßverschluss, da nach dem adaptiven Wachsen der Kollateralen relativ große Blutmengen pro Zeit transportiert werden können. Ein Anstieg der Anzahl von Kapillaren, welches das Resultat einer stimulierten Angiogenese darstellt, ist dazu nicht in der Lage. Somit spielt die Arteriogenese gegenüber der Angiogenese zur Überwindung einer arteriellen Obstruktion eine übergeordnete Rolle (Buschmann and Schaper, 1999).

2.2.2. Mechanismen der Arteriogenese

Kommt es zum Verschluss eines arteriellen Gefäßes, fällt der Blutdruck distal der Stenose stark ab, wodurch eine Änderung des Druckgradienten entlang der Kollateralen entsteht. Das Blut wird durch präexistente Kollateralen geleitet. Dadurch erhöht sich die Flussgeschwindigkeit in den Kollateralen, wodurch es zu erhöhter Schubspannung (englisch: shear stress) entlang der Endothelzellschicht kommt (Schaper and Ito, 1996). Diese wird nach den Prinzipien von Richard Thoma kompensiert, d.h. es kommt zu arteriogener Proliferation und Zunahme des Gefäßdurchmessers mit daraus folgender Abnahme der Blutflussgeschwindigkeit.

Das Kollateralgefäßwachstum erfolgt in zwei Phasen. Die erste Phase ist durch eine starke Gefäßzellproliferation innerhalb der ersten drei Tage charakterisiert, die zweite Phase durch

einen intensiven Umbau der Arterienwand. Diese Phasen sind zeitlich aber nur bedingt voneinander abgrenzbar und verlaufen zum Teil parallel (Arras et al., 1998).

Die erhöhte Schubspannung führt zu einer Aktivierung der Endothelzellen, welche eine verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und ICAM-2 (InterCellular Adhesion Molecule-1 und -2) sowie VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) (Scholz et al., 2000) und proinflammatorischen Zytokinen wie MCP-1 (Monocyte chemoattractant proteine-1), Transforming Growth Factor (TGF)- β und GM-CSF bewirken (Buschmann et al., 2001; Scholz et al., 2001; Shyy et al., 1995). Dies führt zu einer gesteigerten Chemoattraktion von mononukleären Zellen. Sie adhären zunächst an die Gefäßwand, transmigrieren anschließend durch die Gefäßwand, so dass sie in den perivaskulären Raum eintreten können (Heil and Deindl, 2004; Hofer et al., 2004). Dies verdeutlicht auch die bedeutend reduzierte Arteriogenese beim Fehlen von Monozyten in einem Monocyte-colony-stimulating-factor (M-CSF)-knockout-Modell (Bergmann et al., 2006). Die eingewanderten Monozyten differenzieren zu Makrophagen und sezernieren verschiedene Zytokine wie FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2) und TNF- α (Tumor-Nekrosefaktor alpha), die die Proliferation der glatten Muskelzellen stimulieren (Arras et al., 1998) und erneut die Einwanderung von weiteren Monozyten fördern (Buschmann et al., 2001; Scholz et al., 2001). Diese bilden dann Matrix-Metalloproteinasen (MMPs, z. B. MMP-2 und MMP-9), welche den notwendigen Raum für die wachsenden Kollateralarterien bilden, indem sie Wandkomponenten wie die Basalmembran und die Extrazellulärmatrix verdauen (Cai et al., 2000). Diese Auflockerung der Wandstruktur verschafft den glatten Muskelzellen mehr Spielraum in ihrer Beweglichkeit. Sie migrieren in die Intima und proliferieren an Ort und Stelle (Wolf et al., 1998).

Weiterhin induziert die erhöhte Schubspannung am Endothel eine Phosphorylierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS). eNOS wird in den Endothelzellen aktiviert und stimuliert iNOS (inducible nitric oxide synthases) in den adhärenen Monozyten, welche dann verstärkt Stickstoffmonoxid NO produzieren (Dimmeler et al., 1999; Troidl et al., 2010). Das NO wird an die darunter gelegenen, glatten Muskelzellschichten weitergeben. Es spielt eine bedeutende Rolle bei Endothelzellproliferation, -migration und Differenzierung glatter Muskelzellen (Amano et al., 2003; Cai et al., 2004; Rudic et al., 1998). Mittels NO-Synthase-Hemmer L-NAME (L-Nitro-Arginin-Methylester) konnte durch Schubspannung induziertes Kollateralwachstum gehemmt werden (Eitenmüller et al., 2006).

Mit einer Steigerung des ursprünglichen Diameters um den Faktor 25 und einer Gewebezunahme der Gewebemasse um den Faktor 50 ist die Arteriogenese das beeindruckendste Beispiel für vaskuläres “*Remodeling*“ (Cai et al., 2000).

Eine durch Arteriogenese entstandene Konduktanzarterie zeigt auf Grund des ebenfalls deutlichen Längenwachstums eine korkenzieherartige Morphologie. Wenn sich der Druckgradient über dem Kollateralgefäß infolge des zunehmenden Durchmessers normalisiert, die Flussgeschwindigkeit abnimmt und die Schubspannung als treibende Kraft zurückgeht, nimmt die arteriogene Proliferation wieder ab. Während die Perfusion nach der Okklusion stark eingeschränkt ist, kann tierexperimentell das Wachstum der Kollateralarterien bis zu einer 60%-igen Wiederherstellung der Ausgangsperfusion führen.

Der zeitliche Ablauf der Arteriogenese ist beim einzelnen Individuum ein variabel ablaufender Prozess. So ist es möglich, dass langsam fortschreitende vollständige Stenosen großer Arterien eines Patienten komplett kompensiert werden können und asymptotisch bleiben, während andere Patienten nur unzureichende Kollateralen ausbilden (Bondke et al., 2007).

2.2.3. Tierexperimentelle Studien

In vielen Fällen ist die Rekrutierung der arteriellen Kollateralgefäße zu langsam, um eine Mangelversorgung und die daraus resultierenden Zellschädigungen vollständig abzuwenden. Eine medikamentöse Behandlung zur Förderung der Kollateralgefäßbildung ist daher ein viel versprechendes Prinzip, die schädigenden Auswirkungen eines arteriellen Gefäßverschlusses zu mildern oder sogar komplett zu verhindern. Abgeleitet von der Symptomatik arterieller Verschlusskrankheiten wurden Tiermodelle entwickelt, welche die zerebrale, die koronare und die periphere Verschlusskrankheit simulieren.

2.2.3.1. Periphere Arteriogenese

Das Standardmodell der peripheren Arteriogenese ist die Ligatur der Arteria femoralis, welches in Schwein, Kaninchen, Ratte und Maus angewendet wird. Das von der

Arbeitsgruppe um Wolfgang Schaper entwickelte Hinterlauf-Ischämie-Modell in der Maus ermöglicht neben der Verwendung transgener und gendefizienter Mäuse auch das Testen von Substanzen im Tierversuch. Es konnte sowohl in Maus, Kaninchen und Schwein gezeigt werden, dass das proarteriogene Zytokin MCP-1 auf Grund der bedeutenden Rolle der monozytären Zellen eine der stärksten positiven Wirkungen auf das Kollateralwachstum besitzt (Ito et al., 1997a; Schirmer et al., 2004; van Royen et al., 2003b). Weiterhin wurden GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor) (Grundmann et al., 2006), TGF- β 1 (Transforming Growth Factor- β 1) (van Royen et al., 2003a) und FGF-2 (Kinnaird et al., 2004) als proarteriogene Substanzen identifiziert. Die für ihre proangiogenen Eigenschaften bekannten VEGF (Vascular endothelial growth factor) und PlGF (VEGF-„homolog placental growth factor“) zeigen ebenfalls einen positiven Effekt auf die periphere Arteriogenese, in dem sie unter anderem die Monozytenmigration beeinflussen (Heil et al., 2000; Pipp et al., 2003).

Für den routinemäßig eingesetzten Thrombozytenaggregationshemmer Acetylsalicylsäure (ASS) wurden antiarteriogene (Dülsner, 2009; Hofer et al., 2005) und für Dipyridamol proarteriogene Effekte beschrieben (Venkatesh et al., 2010).

Eitenmüller et al. ist es in einem femoralen arteriovenösen Shunt-Modell gelungen, die Steigerung der Schubspannung als initialen Auslöser des Kollateralwachstums nachzuweisen (Eitenmüller et al., 2006). Auch körperliches Training mit einer anschließenden Erhöhung der Scherkräfte in den Arteriolen zeigt proarteriogene Effekte (Yang et al., 2000).

Die wesentlichen Mechanismen der Arteriogenese laufen an den unterschiedlichen Prädispositionsstellen der okklusiven Gefäßerkrankungen gleichermaßen ab. Jedoch sind die Daten zur experimentellen therapeutischen Arteriogenese in der Peripherie oder auch am Herzen auf Grund der unterschiedlichen anatomischen Gegebenheiten nur eingeschränkt auf die zerebrale Situation übertragbar.

2.2.3.2. Zerebrale Arteriogenese

1990 wurde ein zerebrales Tiermodell beschrieben, bei dem nach einseitigem Verschluss der Arteria carotis communis (CCAO, Common Carotid Artery Occlusion) eine signifikante

Zunahme von Anastomosen im Bereich der Arteria cerebri posterior zu beobachten ist, was zu einer besseren Versorgung der nachgeschalteten Gewebe führt (Coyle and Panzenbeck, 1990). *Busch et al.* etablierten einige Jahre später das Dreigefäßverschlussmodell (3-VO) in der Sprague Dawley-Ratte, welches im Gegensatz zur CCAO den Vorteil einer stabilen Schubspannungserhöhung hat und sich damit besser zur Untersuchung des zerebralen Kollateralgefäßwachstums eignet (Busch et al., 2003). Hierbei werden drei der vier hirnversorgenden Gefäße (beide Vertebralarterien sowie die linke Arteria carotis communis) verschlossen. Die Messung des zerebralen Blutflusses (CBF) nach 3-VO ergibt auf der Seite der Karotis-Okklusion (ipsilateral) eine durchschnittliche Reduktion von 40-50%, die CO₂-Reaktivität als Indikator der zerebrovaskulären hämodynamischen Reservekapazität (CVRC) ist unmittelbar nach 3-VO bis hin zu sieben Tagen danach fast vollkommen aufgehoben.

3-VO simuliert den Zustand in Patienten mit Stenosen der hirnversorgenden Gefäße, welches das Risiko ischämischer Insulte deutlich erhöht. Es treten dabei keine ischämisch-nekrotische Schädigungen im Gehirn auf. Durch Blutflussänderungen im Circulus arteriosus Willisi kommt es zur Proliferation, besonders der Arteria cerebri posterior. Innerhalb einer Woche vergrößert sich ihr Durchmesser um 39%, nach drei Wochen um 72%. Die CVRC ist ausgehend von der präoperativen Situation nach drei Wochen um 50% verbessert (Busch et al., 2003).

Durch GM-CSF-Behandlung konnte die CVRC bereits sieben Tage nach 3-VO-Operation wieder vollkommen hergestellt werden (Buschmann et al., 2003). Das hemisphärische Volumen eines experimentell erzeugten hämodynamischen Schlaganfalls wird sieben Tage nach 3-VO signifikant gesenkt (Schneeloch et al., 2004). Auch im 2-VO-Modell in der Ratte, wo beide Arteriae carotides communes ligiert werden, wurden die proarteriogenen Eigenschaften von GM-CSF bestätigt (Schneider et al., 2007). Nach unilateraler CCAO (*Common Carotid Artery Occlusion*) und anschließender GM-CSF-Behandlung wird das Kollateralwachstum der Heubnerschen Anastomosen und des Circulus willisi beschleunigt und vermindert dadurch das Infarktvolumen nach zusätzlich durchgeführter MCAO (*Middle Cerebral Artery Occlusion*) gegenüber den Kontrollen (Todo et al., 2008).

Neben GM-CSF stimuliert auch der Granulozyten Kolonie-Stimulierende Faktor (G-CSF) die zerebrale Arteriogenese, während dessen Wirkung durch den Thrombozytenaggregationshemmer ASS gehemmt wird (Dülsner, 2009). Ebenfalls im 3-VO-Modell hemmt

der in der Diabetes-Therapie routinemäßig eingesetzte Insulin-Sensitizer Pioglitazon das zerebrale Kollateralwachstum (Glaser, 2009).

2.3. Bradykinin

2.3.1. Das Kallikrein-Kinin-System

Aufgrund der Beobachtung des Chirurgen Emil Karl Frey und des Physiologen Heinrich Kraut im Jahre 1928, dass die intravenöse Gabe von humanem Urin in die Zirkulation von anästhesierten Hunden eine Blutdrucksenkung bewirkt, wurde erstmals die Existenz des Kallikrein-Kinin-Systems beschrieben (Kraut et al., 1928).

Wegen ihrer hypotensiven Eigenschaft ordneten sie diese sich im Urin befindene Substanz den Kreislaufhormonen zu und isolierten sie anschließend auch aus Speichel, Plasma und zahlreichen anderen Organsystemen. Auffällig dabei war dessen besonders hohe Konzentration im Pankreas, weshalb man es nach dem griechischen Wort „kallikréas“ als Kallikrein bezeichnete. 1937 entdeckten Werle, Götze und Keppler, dass die Wirkung des Kallikreins abhängig ist von einem inaktiven Zwischenstoff (Werle et al., 1937). 1948 wurde die aktive Substanz, ein Polypeptid abgespalten aus einer inaktiven Form (Kininogen), von Werle und Berek als Kallidin bezeichnet (Werle and Berek, 1948). Im Jahre 1949 beobachteten Rocha *et al.*, dass eine aus Trypsin und Globulin freigesetzte Substanz im Blutplasma eine blutdrucksenkende Wirkung hat und eine langsam fortschreitende Kontraktion an der glatten Darmmuskulatur verursacht. Sie bezeichneten sie daraufhin als Bradykinin (griechisch: bradys = langsam, kinein = Bewegung) (Rocha et al., 1949).

Erstmals isoliert wurde Bradykinin im Jahre 1960 (Elliott et al., 1961). Nach anschließender Synthetisierung wurde kurz darauf auch die genaue chemische Struktur des Kallidin, ein Bradykinin Derivat mit einem zusätzlichen Lysinrest, beschrieben (Boissonnas et al., 1960).

Regoli und Barabé entdeckten 1980 zwei unterschiedliche Kininrezeptoren, die Bradykinin-Rezeptoren 1 (BR1) und 2 (BR2) (Regoli and Barabe, 1980), woraufhin in den folgenden Jahren zahlreiche Rezeptorantagonisten entwickelt wurden.

Die aktiven Peptide des Bradykinins, dessen Abbauprodukte des-Arg⁹-Bradykinin und Kallidin, sind die bei Mensch und Tier am häufigsten vorkommenden Vertreter des Kallikrein-Kinin-Systems (Abbildung 2). Sie werden jeweils aus unterschiedlichen Peptidvorstufen, den in der Leber synthetisierten Kininogenen, gebildet. Man unterscheidet das hochmolekulare Kininogen (high molecular weight kininogen, HMWK) und das niedermolekulare Kininogen (low molecular weight kininogen, LMWK). Bradykinin ist hauptsächlich im Blutplasma vorzufinden und wird enzymatisch durch die Protease Plasma-Kallikrein von seiner Vorstufe, dem hochmolekularem Kininogen (HMWK) gespalten, während Kallidin durch das Tissue-Kallikrein von seiner Vorstufe, dem niedermolekularen Kininogen (LMWK) enzymatisch freigesetzt wird (Proud et al., 1985).

Plasma- und Tissue-Kallikrein werden durch sogenannte Kallikreinasen aktiviert. Die wichtigste Kallikreinasase im Blut ist der aktive Hageman-Faktor (Faktor XIIa). Durch die Aktivierung von Kallikrein wird ein positiver Feedbackmechanismus ausgelöst, denn Kallikrein fördert die Bildung von aktiviertem Hageman-Faktor (Cochrane and Revak, 1980).

1983 machten Okamoto und Greenbaum die Beobachtung, dass im Blut der Ratte bei der Inkubation mit Kallikrein kein Bradykinin gebildet wird, in Gegenwart von Trypsin aber doch. Es folgten zahlreiche Experimente, bei denen Trypsin mit dem Blut verschiedener Tierarten inkubiert wurde. Dies führte zu der Entdeckung, dass es bei der Ratte eine zweite Kininogen-Variante (T-Kininogen) gibt, welches als Substrat für die Bildung des daraus abgeleiteten T-Kinin (Ile-Ser-Bradykinin) dient (Bhoola et al., 1992).

Für die physiologischen Effekte des Kallikrein-Kinin-Systems sind die verschiedenen Bradykinin-Derivate verantwortlich. Kallidin kann durch eine Aminopeptidase in Bradykinin umgewandelt werden, benötigt diesen Schritt allerdings nicht, um seine Wirkung zu entfalten.

Die Carboxypeptidase (Kinase I) bewirkt eine Spaltung des C-terminalen Arginins der beiden Kinine, was zur Entstehung des des-Arg⁹-Bradykinin und des-Arg⁹-Kallidin führt (Bhoola et al., 1992). Der Abbau der Kinine wird durch das Enzym Angiotensin-Converting-Enzym (ACE), das auch als Kininase II bezeichnet wird, katalysiert. Die Halbwertszeit von Kininen im Plasma liegt bei circa 15 Sekunden, im Zentralnervensystem ebenfalls unter 30 Sekunden (Kariya et al., 1982).

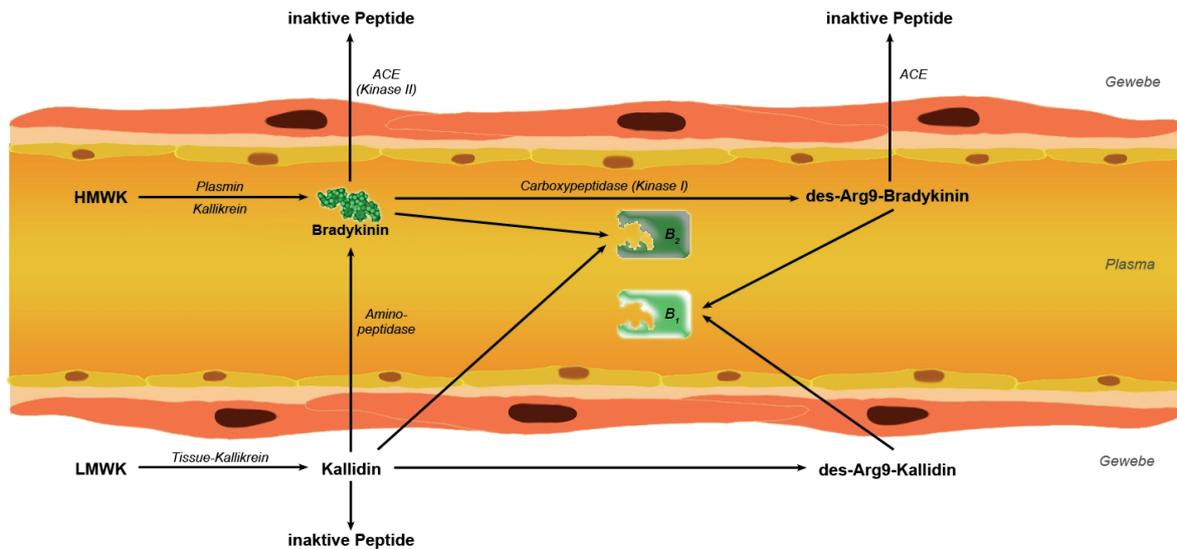


Abbildung 2: Kinin-Bradykinin-Pathway

Das im Plasma vorzufindene Bradykinin sowie das im Gewebe gebildete Kallidin werden aus unterschiedlichen Kininogenen, dem hochmolekularen Kininogen (high molecular weight kininogen, HMWK) bzw. dem niedermolekularen Kininogen (low molecular weight kininogen, LMWK) enzymatisch durch die Proteasen Plasma- bzw. Tissue-Kallikrein gespalten. Kallidin kann durch eine Aminopeptidase in Bradykinin umgewandelt werden.

2.3.2. Bradykininrezeptoren und Antagonisten

Die Wirkungen der Kinine werden über zwei verschiedene Rezeptoren vermittelt. B₂-Rezeptoren sind für den Großteil der physiologischen Effekte verantwortlich, sie sind konstitutiv vorhanden und induzieren akute Wirkungen des Kallikrein-Kinin-Systems (Regoli et al., 1998). B₁-Rezeptoren werden nicht unter physiologischen, sondern erst unter inflammatorischen Bedingungen durch eine vorausgehende B₂-Rezeptorüberaktivierung exprimiert (Couture et al., 2001; Regoli et al., 1981). Bradykinin und Kallidin wirken vorwiegend am B₂-Rezeptor, während des-Arg9-Bradykinin und des-Arg9-Kallidin als Hauptagonisten am B₁-Rezeptor wirken. Beide Rezeptoren gehören zu der Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR), bestehend aus sieben Transmembran-Domänen (Regoli and Barabe, 1980). Kommt es zur Bildung eines Agonist-Rezeptor-Komplexes, wird die Phospholipase C (PLC) aktiviert. PLC katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat (PIP₂) zu Inositol-(1,4,5)-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG).

Daraufhin bindet IP_3 an IP_3 -Rezeptoren von Ca^{2+} -Kanälen, wodurch es zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kommt. Diacylglycerin (DAG) stimuliert die Proteinkinase C (PKC), die wiederum Phospholipase A_2 (PLA_2) phosphoryliert und aktiviert.

Anschließend setzt PLA_2 Arachidonsäure frei, aus der durch Spaltung mit Hilfe des Enzyms Cyclooxygenase die Entzündungsmediatoren Prostaglandine (PG) und durch das Enzym Lipoxygenase Leukotriene gebildet werden (Abbildung 3).

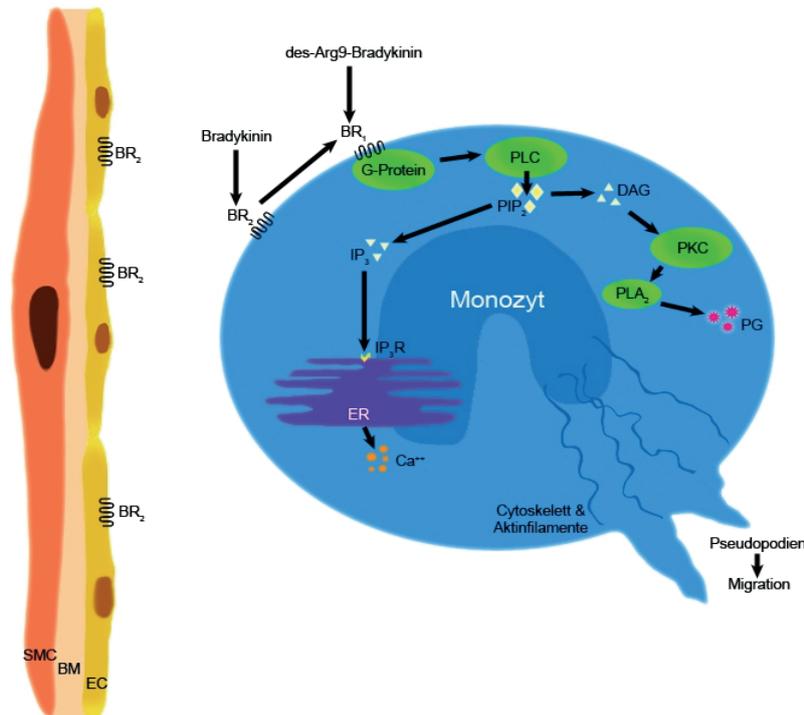


Abbildung 3: Bradykinin-Rezeptor-Signaltransduktionskaskade

Bradykinin bindet an den BR2, einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, wodurch die BR1-Expression induziert wird. Bindet daraufhin des-Arg9-Bradykinin an den BR1, folgt die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und es kommt zur Bildung von Diacylglycerin (DAG). DAG stimuliert die Proteinkinase C (PKC). Die damit verbundene Freisetzung der Arachidonsäure führt zur Aktivierung der Prostaglandin-Synthese.

Im Gegensatz zum B2-Rezeptor hat der B1-Rezeptor bei mehrmaliger Applikation der Agonisten ein gleichbleibendes Aktivitätsschema. Er unterliegt keiner Desensibilisierung oder Internalisierung (Levesque et al., 1995; Regoli and Gobeil, 1995). Beim B2-Rezeptor dagegen

lässt sich die schnelle Reversibilität seiner biologischen Wirkung vermutlich auf die veränderte C-terminale Schleife zurückführen, welche Tyrosin und Serin-Anteile aufweist (Lohse, 1993). Es kommt durch die Bindung mit seinen Agonisten zur Desensitisierung und anschließend zur Internalisierung.

Mit der genaueren Erforschung des Kallikrein-Kinin-Systems wurde es möglich, spezifische Bradykinin-Rezeptor-Antagonisten zu entwickeln, welche man heute in Antagonisten der ersten, zweiten und dritten Generation unterteilt. Retrospektiv betrachtet besitzen die BR2-Antagonisten der ersten Generation (D-Arg[Hyp³,D-Phe⁷,Leu⁸]-BK) alle auch partiell agonistische Aktivität. Dies führte anfänglich zu der irrtümlichen Hypothese der Existenz eines B3-Rezeptors (Farmer et al., 1989), die aber nie validiert werden konnte (Regoli et al., 1993).

Bereits 1977, etwa zehn Jahre vor der Entwicklung der BR2-Antagonisten, wurde von Regoli durch das Ersetzen des C-terminalen Phenylalaninrests durch Leucin der erste BR1-Antagonist entwickelt. Dabei bleibt die Affinität zum Rezeptor nahezu unverändert, während die biologische Aktivität des Komplexes aufgehoben wird (Regoli et al., 1978).

2.3.3. Wirkungen von Bradykinin

Kinine spielen eine wichtige Rolle in der Entzündungskaskade und sind eine der wichtigsten Mediatoren im Rahmen der Entstehung und Aufrechterhaltung des vasogenen Hirnödems (Kamiya et al., 1993; Regoli and Barabe, 1980). Alle Bestandteile des Kallikrein-Kinin-Systems eingeschlossen Kallikreine, Kinine und Kininasen wurden im Gehirn nachgewiesen (Camargo et al., 1973; Kariya et al., 1981; Simson et al., 1986). Durch die Einflüsse auf das Endothel und die glatte Muskulatur fördern Kinine die Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität und gehören zu den stärksten Vasodilatoren. Über die BR1- und BR2-Aktivierung kommt es unmittelbar in den Endothelzellen von Arteriolen zur Stimulation und Bildung von Prostaglandinen, welche zur Relaxation glatter Muskelzellen führt (Regoli et al., 1996; Wachtfogel et al., 1993). Die Aktivierung der Bradykininrezeptoren in postkapillaren Venolen hingegen führt zu einer Tonuserhöhung der glatten Gefäßmuskulatur und löst so eine Vasokonstriktion der Venolen aus (Gaudreau et al., 1981). Dieses unterstützt nach Entstehung

eines Blut-Hirn-Schranken-Schadens die weitere Ausbreitung des perifokalen vasogenen Hirnödemes (Bhoola et al., 1992).

Bradykinin stimuliert an sympathischen, parasympathischen und nozizeptiven Nervenenden die Bildung hochpotenter Schmerzmediatoren wie Substanz P und Neurokinin A (Regoli et al., 1994). Es vermittelt die Freisetzung dieser Substanzen durch die Aktivierung von BR2 (Geppetti, 1993). Die wichtige Rolle der Kinine als Schmerzmediatoren wird dadurch bestätigt, dass sowohl BR1- als auch BR2-Antagonisten Zymosan-induzierte Schmerzen im Tiermodell signifikant reduzieren bzw. rückgängig machen können (Burgess et al., 2000).

Bei chronischen Entzündungsprozessen wird vermehrt BR1 exprimiert, welches die Bildung von Interleukin-1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) fördert (Couture et al., 2001). Weiterhin erhöht die Bildung der Kinine die Migration von Zellen vom dem Blut in das Gewebe. Die Folge ist die Aktivierung immunkompetenter Zellen wie Mastzellen, Fibroblasten und Makrophagen (Bhoola et al., 1992).

Im Entzündungsgeschehen kommt der Aktivierung von Leukozyten eine sehr wichtige Rolle zu. Lehmborg *et al.* zeigten, dass bei Behandlung mit selektiven BR1 und BR2-Antagonisten sowie einem nicht selektiven Bradykinin-Rezeptor-Antagonisten nach zerebraler Ischämie und Reperfusion (I/R) die Leukozytenaktivierung signifikant verringert ist (Lehmborg et al., 2000).

Bradykinin besitzt eine starke chemotaktische Wirkung auf verschiedene zirkulierende angiogene Progenitorzellen (*Circulating progenitor cells*, CPCs), auf welchen sich physiologischerweise BR2 nachweisen lassen. In ischämischen Situationen kommt es zur Rekrutierung dieser zirkulierenden angiogenen Progenitorzellen sowie anderen vom Knochenmark abstammenden zirkulierenden Zellen. Diese werden oft als endotheliale Progenitorzellen bezeichnet, und spielen eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der endothelialen Funktion und dem postnatalen Gefäßwachstum. Die Bradykinin-Sensitivität ist sehr häufig bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen eingeschränkt, was die oft reduzierte Neovaskularisierung nach ischämischen Komplikationen erklären könnte (Krankel et al., 2008). Es ist umstritten, ob diesen Zellen bei der vaskulären Regeneration eine strukturelle Rolle zukommt oder ob sie wie Entzündungszellen, Mediatoren bereitstellen.

In einem intestinalen Okklusionsmodell in der Maus wurde die Interaktion zwischen BR1 und BR2 untersucht. Nach Behandlung mit dem BR2-Antagonisten Icatibant sind nach Verschluss der Mesenterialarterie mit anschließender Reperfusion die entzündlichen Gewebeschäden durch Senkung der Gefäßpermeabilität, der Neutrophilen-Rekrutierung, der intestinalen Hämorrhagien sowie der Bildung von MCP-1 reduziert. Die nach Reperfusion erhöhte Expression von BR1-RNA wird durch Icatibant signifikant gehemmt. Bei Verwendung von BR1-Knockout-Mäusen sind nach Okklusion und Reperfusion keine entzündlichen Gewebeschäden vorzufinden. Behandelt man diese Tiere mit Icatibant, sind dahingegen antiprotektive entzündliche Effekte erkennbar. Aus diesen Beobachtungen kann geschlussfolgert werden, dass der BR1 entzündliche Gewebeschäden induziert. Der BR2 hingegen hat zwei hauptsächliche Effekte: Auf der einen Seite führt er zur Aktivierung und Expression des BR1 und gleichzeitig über Autoregulation zu seiner eigenen Desensibilisierung. Auf der anderen Seite vermittelt er protektive Effekte über Vasodilatation und erhöhte Gewebedurchblutung, die der durch BR1 induzierten Entzündung entgegenwirkt (Souza et al., 2004).

Da einige Entzündungsmediatoren und -vorgänge - wie die Attraktion, Adhäsion und Invasion von Monozyten/Makrophagen - für die Freisetzung von Zytokinen und Gewebeumbauprozessen auch in der Arteriogenese eine ähnlich wichtige Rolle spielen, muss davon ausgegangen werden, dass pro- oder antiinflammatorische Effekte auch pro- oder antiarteriogene Wirkungen haben können (Schaper and Schaper, 2004a).

2.3.4. Bradykinin und Gefäßwachstum

Neben der bedeutenden Rolle im Entzündungsgeschehen sowie bei der Regulierung des kardiovaskulären Systems besitzt Bradykinin einen sehr großen Einfluss auf Gefäßwachstumsprozesse. Im speziellen wurde dies bisher vorrangig für die Angiogenese beschrieben.

Morbidelli *et al.* zeigten, dass Bradykinin das Wachstum von koronaren Endothelzellen fördert. Dabei scheint nur der BR1 für die durch Bradykinin induzierte Proliferation verantwortlich zu sein, was darauf hinweist, dass speziell diesem Rezeptor eine besondere Bedeutung für die Angiogenese zukommt (Morbidelli et al., 1998). Auch Parenti *et al.*

bestätigten, dass Bradykinin ein sehr starker Stimulus der Angiogenese ist. Der proangiogene Effekt an der Kornea beim Kaninchen wird über den BR1 vermittelt, der durch Aktivierung des eNOS-Signalwegs zu einer Hochregulierung von FGF-2 führt. Im Gegensatz zur Stimulation durch einen BR2-Agonisten, induzierte der BR1-Agonist (Lys-des-Arg9-BK) hier eine starke angiogene Antwort, ohne dabei Entzündungsreaktionen hervorzurufen. Der BR2-Agonist (Kallidin) hingegen fördert die Rekrutierung von Entzündungszellen, benötigt höhere Bradykinin-Spiegel, involviert keine Endothelzellen und löst bei Aktivierung vorwiegend die PLC-Signalkaskade aus (Parenti et al., 2001).

Die periphere Angiogenese wird durch Blockade des BR1 (H1960) gehemmt, was im BR1^{-/-}-Hinterlauf-Ischämie-Modell gezeigt werden konnte. Verdeutlicht wurde dies durch Abnahme der Kapillardichte und des Kapillar-Muskelfaser-Verhältnisses. Die BR1^{-/-}-Mäuse besaßen außerdem eine hohe Inzidenz zur Hinterhandnekrose bis hin zu spontanen Autoamputationen. Nach Injektion eines langwirkenden BR1-Agonisten allerdings zeigte sich ein deutlich erhöhtes Kollateralwachstum, d.h. die Stimulation könnte bei der Behandlung von ischämisch-vaskulären Erkrankungen geeignet sein (Emanueli et al., 2002).

Es wurde bereits für die periphere Arteriogenese publiziert, dass im Hinterlauf nach Verschluss der Arteria femoralis in der Ratte durch eine indirekte Erhöhung von Bradykinin mit Hilfe eines ACE-Hemmers der Blutfluss sowie die Neovaskularisierung (Angiogenese) gesteigert werden kann (Ren et al., 2008). Der ACE-Hemmer verhindert neben seinen Wirkungen im Renin-Angiotensin-System den Abbau des Bradykinins. Es kommt nach Behandlung mit einem ACE-Hemmer zum Angiogenese-typischen Bild der erhöhten Gefäßanzahl und -dichte und zur verbesserten Durchblutung. Im Gegensatz dazu sind keine angiogenen Effekte in der BR2-Knockout Maus (BR2^{-/-}) nach Behandlung mit einem ACE-Hemmer zu erkennen (Silvestre et al., 2001).

Gegenüber der Angiogenese gibt es über die Wirkungen des Bradykinin-Systems in der Arteriogenese bisher kaum Publikationen. Im 3-VO-Modell zeigte die Untersuchung der Arteria cerebri posterior mittels Genexpressionsanalyse 24 Stunden nach 3-VO erstmals, dass t-Kininogen, welches signifikant hochreguliert war, eine Bedeutung für die Arteriogenese haben muss (Hillmeister et al., 2008). Daraufhin wurde in Knockout-Tieren (BR1^{-/-}, BR2^{-/-}, BR1^{-/-}/BR2^{-/-}) nach Verschluss der rechten Femoralarterie gezeigt, dass die kollaterale Konduktanz gegenüber der Wildtyp-Maus signifikant verringert ist. Die stärkste Hemmung

der Konduktanz konnte für die BR1^{-/-}-Maus gezeigt werden, welche zwischen der der BR1-KO- und BR2-KO-Tiere lag. Somit scheint auch für die Arteriogenese, ebenso wie für die Angiogenese, dem BR1 eine stärkere Rolle zuzukommen (Hillmeister, 2010).

Es soll daher anhand der vorliegenden Studie erstmals die Bedeutung des Bradykinin-Systems in der zerebralen und peripheren adaptiven Arteriogenese unter dem Gesichtspunkt der pharmakologischen Inhibition und Stimulation seiner Rezeptoren untersucht und beschrieben werden.

3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien

Es wurden die im Institut vorhandenen bzw. neugekauften Geräte, chirurgischen Instrumente, Medikamente, Compounds, Chemikalien, Lösungen, Gase, Zelllinien, Medien und Verbrauchsmittel der Richard-Thoma-Laboratorien für Arteriogenese eingesetzt, welche im Anhang tabellarisch aufgelistet sind.

3.2. Versuchstiere

Für die Versuche im (zerebralen) 3-VO-Modell wurden männliche Sprague Dawley-Ratten verwendet. Bei Versuchsbeginn wogen die Tiere 320-350 Gramm und waren 10 bis 12 Wochen alt. Alle Ratten wurden inklusive Gesundheitszeugnis von Harlan-Winkelmann GmbH, Borchon (Deutschland) bezogen.

Für die Versuche im (peripheren) Hinterlaufmodell wurden C57/BL6-Mäuse verwendet. Diese wogen bei Versuchsbeginn 24-25 Gramm und waren 10 bis 12 Wochen alt. Die Mäuse wurden inklusive Gesundheitszeugnis von Charles River Laboratories, 97633 Sulzfeld (Deutschland) bezogen.

3.2.1. Haltungsbedingungen

Die Haltungsbedingungen entsprachen den Empfehlungen der Kommission vom 18. Juni 2007 mit Leitlinien für die Unterbringung und Pflege von Tieren, die für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendet werden (2007/526/EG).

Die Tiere wurden im Tierstall im Center for Cardiovascular Research (CCR) der Charité-Universitätsmedizin Berlin artgerecht in Makrolonkäfigen (Ratte: Typ IV, Maus: IVC Typ) in Gruppen von 2 oder 3 Tieren (Ratten) bzw. 3 bis 5 Tieren (Mäusen) gehalten. Die Käfige waren mit sterilisiertem, staubfreiem Weichholzgranulat eingestreut. Die Tiere erhielten Futter und Wasser ad libitum. Die Raumtemperatur betrug konstant 21,6 °C. Die

Luftfeuchtigkeit betrug 50–70%. Mittels künstlicher Beleuchtung wurde ein Hell-Dunkel-Zyklus von 12 Stunden je Phase erzeugt.

3.2.2. Tierversuchsgenehmigung

Die vorliegende Studie ist gemäß §8 des Tierschutzgesetzes in seiner Neufassung vom 18. Mai 2006 und seiner zum jeweiligen Zeitpunkt aktuellen Fassung unter dem Titel „*Untersuchung der funktionellen Bedeutung des neu identifizierten Arteriogenese-Markers Kininogen für das Wachstum von zerebralen Kollateralarterien* (Kurzbezeichnung: „*Kininogen and Arteriogenesis*“) am 21.08.2008 unter der Genehmigungsnummer G 0108/08 und seinem Folgeprojekt am 27.08.2010 unter der Genehmigungsnummer G 0164/10 vom Landesamt für Gesundheit und Soziales der Stadt Berlin genehmigt worden.

3.2.3. Randomisierung

Die Tiere wurden randomisiert und den im Folgenden dargestellten Gruppen zugeordnet.

Projektteil 1: Untersuchung der peripheren Arteriogenese

nach pharmakologischer Bradykinin-Rezeptor-Inhibition (BRi)

Tag 0: FAO in der Maus

Tag 0 bis 7: Behandlung

Tag 7: Bestimmung von CPI (kollateraler Proliferationsindex) und LI (Lahmheitsindex) (n=7)

7 Tage FAO Kontrolle“

Behandlung: täglich 0,25 ml NaCl s.c. (subkutan)

„7 Tage FAO BR1i“

Behandlung: 50 nmol/kg/Tag R715 (BR1i) per osmotischer Minipumpe

„7 Tage FAO BR2i“

Behandlung: täglich 1 mg/kg Icatibant s.c.

Projektteil 2: Untersuchung der zerebralen Arteriogenese

a. nach pharmakologischer Bradykinin-Rezeptor-Inhibition (BRi)

Tag 0: 3-VO bzw. Sham-OP in der Ratte

Tag 0 bis 21: Behandlung

Tag 21: Bestimmung von CVRC (zerebrovaskuläre Reservekapazität, n = 6) und Gefäßdurchmesser (Latexangiographie, n = 8)

„Unbehandelt“

ohne Operation und Behandlung

Tag 0: Bestimmung von CVRC und Gefäßdurchmesser

„21 Tage 3-VO Kontrolle“ / „21 Tage Sham Kontrolle“

Behandlung: 1 ml/Tag NaCl s.c.

“21 Tage 3-VO BR1i” / “21 Tage Sham BR1i”

Behandlung: 50 nmol/kg/Tag H1960 (BR1i) per osmotischer Minipumpe

“21 Tage 3-VO BR2i” / “21 Tage Sham BR2i”

Behandlung: täglich 0,5 mg/kg Icatibant (BR2i) s.c.

b. nach pharmakologischer Bradykinin-Rezeptor-1-Stimulation (BRs)

Tag 0: 3-VO bzw. Sham-OP in der Ratte

Tag 0 bis 7: Behandlung

Tag 7: Bestimmung von CVRC (n = 6) und Gefäßdurchmesser (n = 8)

„7 Tage 3-VO Kontrolle“ / „7 Tage Sham Kontrolle“

Behandlung: täglich 1ml NaCl s.c.

“21 Tage 3-VO BR1s” / “21 Tage Sham BR1s”

Behandlung: täglich 1mg/kg Sar[D-phe⁸]-des-Arg⁹-Bradykinin (BR1s) s.c.

3.3. Methoden

Alle Operationen, Behandlungen und weitergehenden Untersuchungen in dieser Studie an Ratten und Mäusen wurden in den Richard-Thoma-Laboratorien für Arteriogenese und den Operationsräumen im Center for Cardiovascular Research (CCR) der Charité-Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

3.3.1. Zeitlicher Ablauf

Das Körpergewicht wurde täglich ermittelt. Bei unzureichender Nahrungsaufnahme, einem Gewichtsverlust von mehr als 15%, artfremden Verhaltensauffälligkeiten, Apathie, sichtlichem Erleiden von Schmerzen oder Infektionskrankheiten wurden die Tiere unmittelbar

unter Vollnarkose mit intrakardialer Applikation von 1-2 ml T61® schmerzlos getötet. Dabei handelt es sich um ein Kombinationspräparat aus den Wirkstoffen Ebutramid, Tetracain, Mebezoniumjodid, das zur Euthanasie per intravenöser, intrakardialer und intrapulmonaler Injektion bei kleinen Labortieren zugelassen ist. Um sicher zu gehen, dass die Applikation direkt ins Herz erfolgt, wurde vor und nach der Applikation Blut über die Spritze aspiriert.

Bei den Mäusen wurde weiterhin täglich ein Lahmheitsindex (LI) bestimmt, um Durchblutungsstörungen und daraus folgende Lahmheiten festzustellen.

Entsprechend des Beobachtungszeitraumes erfolgte sieben bzw. 21 Tage nach Erstoperation die Zweitoperation, aus der die Tiere nicht wieder erwachten (Abbildungen 4, 5 und 6).

3.3.2. Medikamentöse Behandlung

Die Medikamente sowie die Kontrolllösung wurden täglich über eine Gesamtdauer von einer bzw. drei Wochen nach 3-VO-Operation verabreicht. Die Behandlungen wurden am Tag der Operation unmittelbar nach der Operation begonnen, wenn sich das Tier noch in Narkose befand. Die Dosierungen wurden anhand der Literatur aus der Angiogeneseforschung ermittelt und übernommen. Die Mäuse wurden täglich mit Kontrolllösung (0,25 ml NaCl s.c.), Icatibant (1 mg/kg) s.c oder R715 (50 nmol/kg s.c.) behandelt. Da der BR1-Blocker R715 eine sehr kurze Halbwertszeit besitzt, erfolgte die Applikation mittels Minipumpen, die subkutan platziert wurden.

Initialoperation	tägliche Behandlung über 7 Tage	Finaloperation
Kontrolllösung s.c.		
FAO	50 nmol/kg Bachem R715 (BR1i) Pumpe	CPI-Messung
1 mg/kg Icatibant (BR2i) s.c.		
Tag 0	Tag 0 bis 6	Tag 7

Abbildung 4: Projektdesign FAO

Im ersten Teilversuch erhielten die Mäuse am Tag 0 eine Femoralarterienokklusion (FAO). Es folgte bis zum Tag 6 eine Behandlung mit Kontrolllösung, 50nmol/kg Bachem R715 bzw. 1mg/kg Icatibant. Am Tag 7 wurde der kollaterale Perfusionsindex bestimmt.

Im 3-VO-Modell wurde Icatibant in der Dosierung von 0,5 mg/kg Körpergewicht jeden Tag subkutan appliziert. Es wurde mit NaCl so verdünnt, dass jedes Tier täglich 1 ml erhielt. Auch die Applikation von 50 nmol/kg/Tag des BR1-Blocker H1960 erfolgte analog zur Maus mittels subkutan platzierter osmotischer Minipumpen.

Initialoperation	tägliche Behandlung über 21 Tage	Finaloperation
	Kontrolllösung s.c.	Angiographie
3-VO / Sham	50 nmol/kg Bachem H1960 (BR1i) s.c. 0,5 mg/kg Icatibant (BR2i) s.c.	oder CVR
Tag 0	Tag 0 bis 20	Tag 21

Abbildung 5: Projektdesign 3-VO – Rezeptor-Inhibition

Beim zweiten Teilversuch wurde am Tag 0 wird eine 3-VO/Sham-Operation durchgeführt. Die Tiere wurden anschließend über 21 Tage mit Kontrolllösung, 50mg/kg Bachem H1960 bzw. 0,05mg/kg Icatibant behandelt. Nach 21 Tagen erfolgte die Bestimmung der CVRC bzw. es wurde eine Angiographie durchgeführt.

Des Weiteren erfolgte zur Untersuchung der pharmakologischen Rezeptor-Stimulation eine Behandlung von Kontrollratten mit 1 ml NaCl s.c. für nur eine Woche. R916 wurde in einer Dosierung von 1 mg/kg täglich subkutan appliziert.

Initialoperation	tägliche Behandlung über 7 Tage	Finaloperation
3-VO / Sham	Kontrolllösung s.c.	Angiographie
	1 mg/kg Tocris R916 (BR1s) s.c.	oder CVR
Tag 0	Tag 0 bis 6	Tag 7

Abbildung 6: Projektdesign 3-VO – Rezeptor-Stimulation

Im nächsten Projektteil erhielten die Tiere am Tag 0 eine 3-VO/Sham-Operation und bekamen wie an den folgenden sechs Tagen entweder Kontrolllösung oder 1mg/kg Tocris R916 appliziert. Am Tag 7 wurde eine CVRC-Bestimmung bzw. Angiographie durchgeführt.

3.3.3. Narkose

Die Mäuse wurden 15 Minuten vor Versuchsbeginn durch die intraperitoneale Gabe von Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (10 mg/kg) narkotisiert. Im Allgemeinen hielt die Narkose 30-45 Minuten an, was für die verschiedenen Untersuchungen und Operationen ausreichte. Gegebenenfalls konnte die Narkose problemlos durch erneute Gabe einer geringeren Dosis verlängert werden.

Die Narkoseeinleitung erfolgte bei 3-VO in Ratten etwa 20 Minuten vor der Operation als Injektionsnarkose mit 50 mg/kg Ketamin und 4 mg/kg Xylazin. Die Narkoseaufrechterhaltung wurde mittels Inhalationsnarkose je nach Bedarf mit 1-2,5 Vol.-% Isofluran und 100% Sauerstoff über eine Atemmaske durchgeführt, wobei die Spontanatmung erhalten blieb und dadurch eine Intubation nicht notwendig war. Zur Latexangiographie sowie zur Messung der zerebrovaskulären Reservekapazität erfolgte die Narkoseeinleitung in einer speziellen Narkosekammer, in die ein Gemisch aus 30% Sauerstoff, 70% Distickoxid (Lachgas) und 4 Vol.-% Isofluran eingeleitet wurde. Zum Erhalt der Narkose während der Operation wurden je nach Bedarf 1,5–3 Vol.-% Isofluran in 30% Sauerstoff und 70% Distickoxid verwendet.

3.3.4. Analgesie

Der Einsatz nicht-steroidaler Antiphlogistika (NSAIDs) ist im Zusammenhang mit der Untersuchung arteriogener Prozesse aufgrund der entzündungshemmenden Wirkung kontraindiziert, da inflammatorische Vorgänge ein zentrales Ereignis beim Kollateralwachstum darstellen. Ebenso ist nicht auszuschließen, dass Opioide das Gefäßwachstum durch ihre antiinflammatorische Teilwirkung negativ beeinflussen. Zudem zeigten in vorhergehenden Versuchen verwendete Ratten nach Einsatz von Buprenorphin das Pica-Syndrom, was zu erhöhten Todesfällen führte (Dülsner, 2009). Neben der analgetischen Wirkung des Ketamins wurden die Inzisionsbereiche zusätzlich intra- und postoperativ mit dem Lokalanästhetikum Ropivacain (insgesamt 3 mg/kg) umspritzt. Ropivacain weist eine lange Wirkungsdauer auf, so dass eine post-operative Analgesie gewährleistet werden konnte.

Die Maus wurde mittels Ketamin/Xylazin (100 mg/kg / 10 mg/kg) narkotisiert, wobei die analgetische Komponente des Ketamins genutzt wurde. Es ist bekannt, dass diese analgetische Wirkung auch nach abgeschlossener Operation anhält. Die Inzisionsbereiche wurden nach der OP zusätzlich mit Xylocain-Gel versehen.

3.3.5. Untersuchung der peripheren Arteriogenese

3.3.5.1. Verschluss der Arteria femoralis

Angewendet wurde hier das Modell der Femoralarterienokklusion (*Femoral Artery Occlusion*, FAO), modifiziert nach Hofer *et al.* (Hofer *et al.*, 2002), wobei die Arteria femoralis distal und proximal des Abganges der Arteria caudalis femoris lateralis (*Lateral Caudal Femoral Artery*, LCFA) durch zwei Ligaturen okkludiert wurde (Abbildung 7; detaillierte Methodenbeschreibung im Anhang).

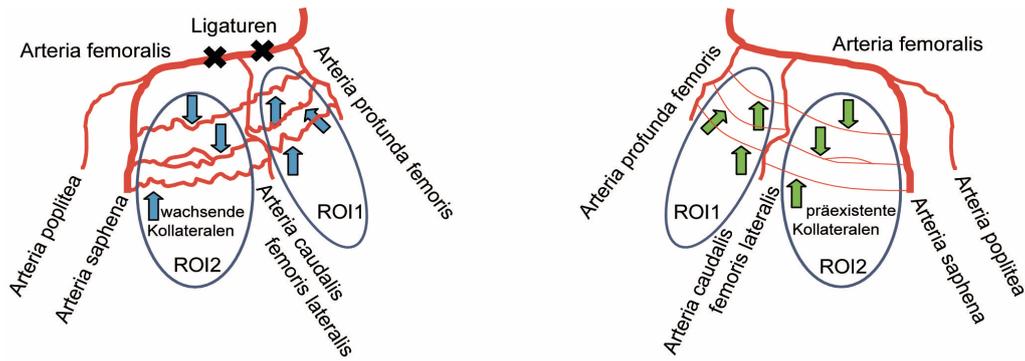


Abbildung 7: Femoralisligaturmodell (FAO)

Im FAO-Modell, modifiziert nach Hoefler et al., wird die Arteria femoralis distal und lateral der Arteria caudalis femoris lateralis (LCFA) ligiert. Die Folge ist die Diameterzunahme der Kollateralen im Bereich der Arteria profunda femoris, LCFA und Arteria saphena.

3.3.5.2. Bestimmung des Lahmheitsindexes (LI)

Bei allen operierten Mäusen wurde täglich der Lahmheitsindex ermittelt. Dieser wurde folgendermaßen definiert:

0 = keine Lahmheit erkennbar

1 = geringgradige Lahmheit, Fuß wird vollständig belastet

2 = mittelgradige Lahmheit mit geringgradiger Parese, Fuß wird nachgezogen

3 = hochgradige Lahmheit mit Nekrosen

3.3.5.3. Bestimmung des kollateralen Perfusionsindex (CPI)

Untersucht wurde die Arteriogenese durch die Messung der kollateralen Perfusion mittels fluoreszierender Mikrosphären. Von allen funktionellen Messungen gilt die Perfusionsmessung als Goldstandard zur Evaluierung der Arteriogenese (Schaper, 2004).

Die Mikrosphären werden in die Aorta descendens injiziert und verteilen sich dann entsprechend der Durchblutung im Gewebe. Anhand der Verteilung der Mikrosphären im Gewebe lässt sich der Blutfluss definieren. Durch Auszählung der Mikrosphären im Gewebe wird der relative Flussunterschied zwischen den Hinterläufen bestimmt. Bedingt durch ihren Durchmesser (15 µm) bleiben die Mikrosphären in den Arteriolen stecken und lassen sich in einem Durchflusszytometer (FACS) auszählen. Verglichen wurde die unterschiedliche Verteilung der Mikrosphären in den Muskeln des gesamten Hinterlaufes zwischen der ligierten und der nicht-ligierten Seite (detaillierte Methodenbeschreibung unter im Anhang).

3.3.6. Untersuchung der zerebralen Arteriogenese

3.3.6.1. Dreigefäßverschluss (3-VO)

Das Dreigefäßverschlussmodell (3-VO), modifiziert nach Busch *et al.*, ist ein Hypoperfusionsmodell, bei welchem die beiden Vertebralarterien durch Elektrokoagulation und die linke Arteria carotis communis durch Ligatur verschlossen werden, ohne dass dabei eine Ischämie bzw. ein Infarkt im Gehirn erzeugt wird (Abbildung 8, detaillierte Methodenbeschreibung im Anhang). Mittels Laser-Doppler-Flowmetrie (LDF: PeriFlux System 5000) wird der Blutfluss bestimmt. Das Funktionsprinzip basiert auf dem Dopplereffekt, welcher eine scheinbare Frequenz- bzw. Wellenlängenänderung einer Welle bei einer Relativbewegung von Quelle und Empfänger bezeichnet. Ausgehend vom Laser-Doppler-Flowmetrie-Gerät wird ein monochromatischer Laserstrahl über ein Glasfaserkabel durch den Sondenkopf in die Hirnareale geleitet. Durch die dort zirkulierenden Blutkörperchen (vorwiegend Erythrozyten) wird er unter Frequenzverschiebung reflektiert, vom Sondenkopf registriert und über das Glasfaserkabel zurückgeleitet. Aus dem Frequenzspektrum und der Signalstärke wird ein Wert bezogen, welcher zum Blutfluss direkt proportional ist. Da der Blutfluss an jeder Stelle des Schädels bei demselben Tier und gegenüber anderen Tieren nie

gleich ist, können zum Vergleich der Messergebnisse mehrerer Tiere nicht die absoluten, sondern nur die relativen (prozentualen) Änderungen in Bezug auf den Ausgangswert herangezogen werden (Fabricius and Lauritzen, 1996). Nach Ligatur der linken Arteria carotis communis waren drei der vier arteriellen Hauptzuflüsse zum Gehirn verschlossen. Bei erfolgreicher Operation sank der Blutfluss auf mindestens 60% des zuvor gemessenen Ausgangswertes ab (Abbildung 9). Dieser niedrige Wert musste für mindestens zehn Minuten erhalten bleiben bzw. durfte nicht auf mehr als 65% wieder ansteigen, damit die 3-VO als erfolgreich eingestuft werden konnte. Dabei wird ein Zustand eines progressiven Verschlusses mit steigender zerebraler Hypoperfusion erzeugt, der bei stenotischen Gefäßveränderungen auftritt und dessen Folge ein akuter Schlaganfall sein kann.

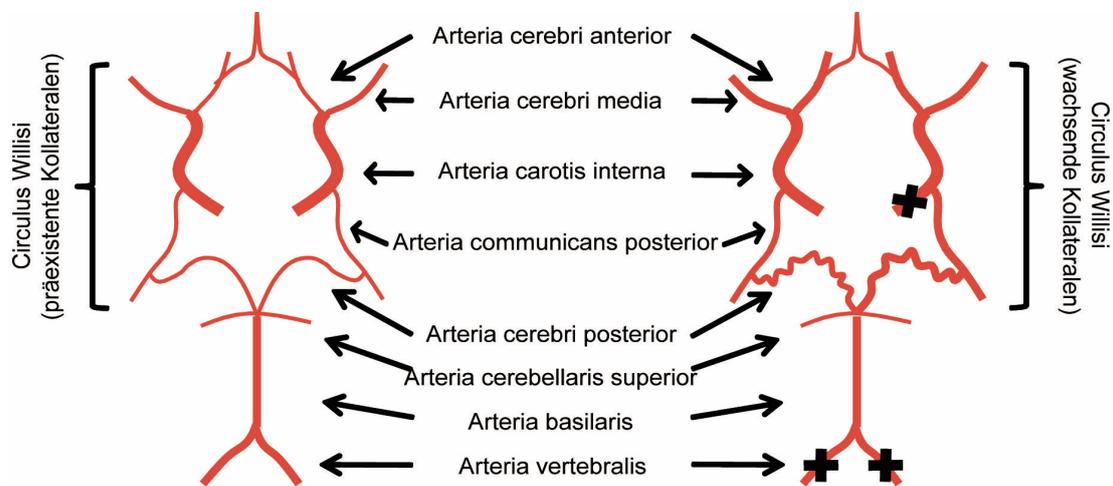


Abbildung 8: Dreigefäßverschlussmodell (3-VO)

Beim 3-Gefäßverschlussmodell in der Sprague Dawley-Ratte werden drei der vier hauptversorgenden Gefäßen des Gehirns verschlossen.

3.3.6.2. Sham-Operation

Bei der Sham-Operation (Sham, engl. Imitation) wurde ebenso vorgegangen wie bei der 3-VO-Operation, jedoch mit dem wesentlichen Unterschied, dass die Gefäße nicht durch Elektrokoagulation bzw. Ligation verschlossen wurden. Die Arteriae vertebrales und die Arteria carotis communis wurden nur bis zu ihrer Sicht ohne jegliche Berührung freipräpariert und auch die somit unnötige Laser-Doppler-Flowmetrie-Messung wurde hier nicht

durchgeführt. Die Sham-Operation ist ein Nachweis, dass die durch 3-VO auftretenden Veränderungen tatsächlich Folge der Gefäßverschlüsse sind und sich nicht aufgrund von operativer Beeinflussung des umgebenden Gewebes ergeben haben.

3.3.6.3. Zerebrovaskuläre Reaktivität (CVR)

Die zerebrovaskuläre Reaktivität (CVR) ist eine Methode, mit der die zerebrovaskuläre hämodynamischen Reservekapazität (CVRC) bestimmt wird. Unter CVRC versteht man die Perfusionsreserve des Gehirns. Diese quantifiziert das Ausmaß einer möglichen Widerstandsverminderung zerebraler Arteriolen und ist damit bei reduziertem Blutzufuss ein Kompensationsmechanismus zur Aufrechterhaltung eines adäquaten zerebralen Blutflusses (CBF) (Hecht, 2008). Die sich daraus ergebende Verbesserung der Reservekapazität ist eine aussichtsreiche Verfahrensweise für die Prävention von zerebrovaskulären Ereignissen (Coyle and Jokelainen, 1982).

Zur Bestimmung der Reservekapazität bedient man sich der klinischen Methode des Acetazolamid-Testes. Nach Injektion von Diamox® (Wirkstoff: Acetazolamid, ACZ) kann eine Senkung des pH-Wertes und eine Steigerung des pCO₂ beobachtet werden. Bekannt ist über den molekularen Wirkmechanismus, dass durch Hemmung der physiologischen Carboanhydrase in den Erythrozyten nach ACZ-Stimulation eine schnelle Sättigung des Blutes mit physikalisch gelöstem CO₂ erfolgt, wodurch es zum intrazerebralen, extrazellulären Anstieg der CO₂-Konzentration und reaktiver zerebraler Vasodilatation kommt (Kuroda et al., 1993; Sorteberg et al., 1989; Vorstrup et al., 1984). Währenddessen wird kontinuierlich der zerebrale Blutfluss aufgezeichnet (detaillierte Methodenbeschreibung im Anhang).

Die CVRC wurde mit „PeriSoft for Windows“ kalkuliert. Da es nicht möglich ist, die Werte des CBFs durch das Laser-Doppler-Gerät direkt miteinander zu vergleichen, erfolgt diese in Perfusions-Einheiten (PU). Deshalb wurde zuerst eine „baseline area“ (BA) festgelegt. Dann wurde ACZ appliziert und eine weitere Zone („measurement area“, MA), beginnend eine Minute nach Applikation bis 8 Minuten nach Applikation, definiert. Anschließend wurde der Mittelwert (meanBA bzw. mean MA) des CBF innerhalb beider Zonen bestimmt und der meanBA wurde einem CBF von 100% gleichgesetzt. Der meanMaA wurde nun ebenfalls in

Prozent im Verhältnis zum meanBA berechnet ($\text{meanMA} / \text{meanBA} * 100\%$). Die Differenz der beiden Prozentualwerte ($\text{meanMA in\%} - \text{meanBA in\%}$) wurde als zerebrovaskuläre Reservekapazität (CVRC) bezeichnet.

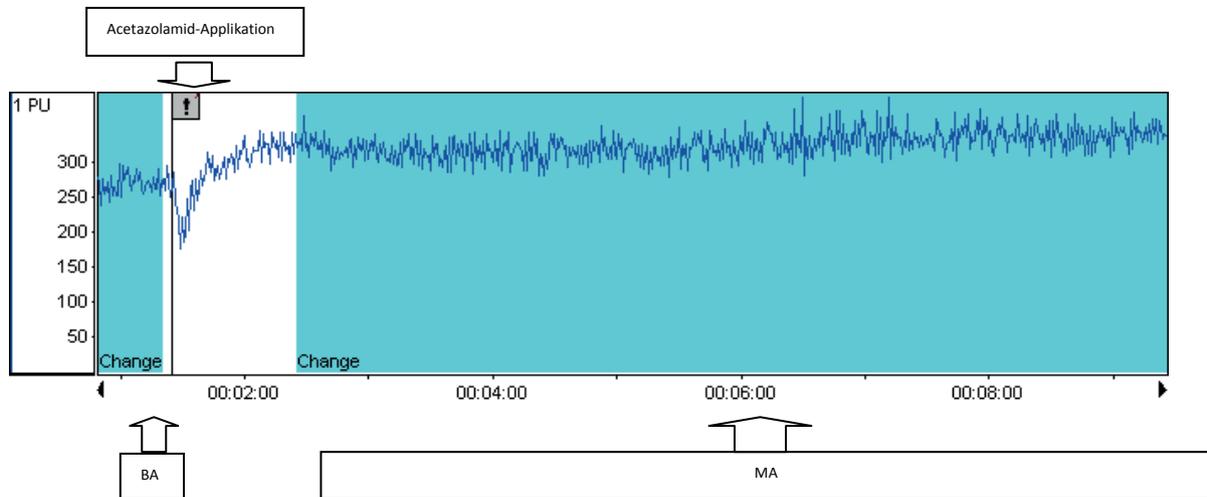


Abbildung 9: Zerebrovaskuläre Reaktivität (CVR)

Nach Injektion von Acetazolamid kommt es durch eine Senkung des pH-Wertes und einem intrazerebralen, extrazellulären Anstieg der CO_2 -Konzentration zur Vasodilatation, wodurch ein Anstieg des zerebralen Blutfluss beobachtet werden kann.

3.3.6.4. Postmortale Latexangiographie

Zur Darstellung der Gefäße wurde eine Methode verwendet, die erstmals von Coyle *et al.* (Coyle and Jokelainen, 1982) in Wistar-Ratten durchgeführt wurde und später von Busch *et al.* (Busch *et al.*, 2003) für die Anwendung an Sprague Dawley-Ratten modifiziert worden ist. Die Gefäße wurden dabei mittels gefärbter Latexmilch perfundiert (detaillierte Methodenbeschreibung im Anhang). Anschließend wurden die Gehirne unter einem Lichtmikroskop mit integriertem und geeichtem Objektmikrometer fotografiert und die Diameter der Gefäße des Circulus arteriosus (Willisii) bestimmt. Dazu wurden jeweils ipsi- und kontralateral je vier Messungen an verschiedenen definierten Stellen des Gefäßes durchgeführt, aus denen dann der durchschnittliche Gefäßdiameter berechnet wurde. Folgende Gefäße wurden gemessen: Arteria cerebri posterior (PCA), Arteria cerebri communicans

posterior (PComA), Arteria carotis interna (ICA), Arteria cerebri media (MCA), Arteria cerebri anterior (ACA).

3.3.6.5. Implantation der osmotischen Minipumpe

Da die zu verabreichenden Compounds H-1960 und R715 im Organismus eine sehr geringe Halbwertszeit besitzen, wurde hier die Applikation mittels osmotischer Minipumpe gewählt. Dies ermöglicht die kontinuierliche Applikation einer Substanz in einer konstanten Konzentration über einen definierten Zeitraum. Die bei der Ratte verwendeten osmotischen Minipumpen (ALZET®, Modell 2004) haben ein Fassungsvermögen von 200 µl, welches über einen Zeitraum von 28 Tagen (Pumpleistung: 0,25 µl/h) gefördert wird. Bei der Maus wurde das Modell 1007D (Füllungsvolumen 100µl, Pumpdauer 7 Tage, Pumpleistung 0,5 µl/h) verwendet. Durch osmotische Quellung des Hüllkörpers bei Aufnahme von interstitieller Flüssigkeit im Organismus wird das Pumpenlumen komprimiert und der Inhalt freigesetzt (detaillierte Methodenbeschreibung im Anhang).

3.3.7. Monozytenmigrationsassay

Für die Migrationsassays wurden Filter einer Porengröße von 8 µm auf einer 24-Well-Platte über Nacht bei 4°C mit 0,2% Vitronectin beschichtet und anschließend eine Stunde mit 1% bovinem Serumalbumin bei 37 °C geblockt. Pro Filter wurden 500.000 humane monozytäre THP-1-Zellen in serumfreiem Medium eingesetzt. Nach dreistündiger Migrationszeit bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Filter mit kaltem kalzium- und magnesiumhaltigem PBS gespült, mit Wattestäbchen innen gereinigt und anschließend in 100% Methanol bei -20°C für 30 Minuten fixiert.

Die Zellen wurden 30 min vor der Migration mit 1 ng/ml IL-1β mit oder ohne 10 nM BR1-Antagonist R715 bei 37 °C vorstimuliert und gegen einen Gradienten von 10 ng/ml MCP-1 bzw. 10 nM des BR1-Agonist R916 (Sar-[D-Phe⁸]-des-Arg⁹Bradykinin) gerichtet. Zur Auswertung wurden die Filter/Zellen mit filtrierter Hämalaunlösung gefärbt und je drei Gesichtsfelder pro Filter unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Experimente wurden stets im Doppelansatz (zwei Filter) durchgeführt und insgesamt mindestens dreimal wiederholt.

3.3.8. Statistische Auswertung

Alle Daten sind angegeben als Mittelwerte (Mean) \pm Standardabweichung (Standard Deviation, SD). Balken- und Liniendiagramme wurden mithilfe der Mittelwerte (Mean) \pm Standard Error of Mean (SEM) dargestellt.

Die Gruppen-Unterschiede aller Parameter wurden mit der Software PASW (SPSS 18) über den ANOVA-Gruppentest auf ihre statistische Signifikanz untersucht. Die P-Werte wurden mithilfe der False discovery rate procedure korrigiert, um eine experimentdeckende Signifikanz von 0.05 zu erhalten.

4. Ergebnisse

4.1. Periphere Arteriogenese nach FAO

4.1.1. Effekte der BR-Inhibition nach FAO

Um die Wirkung der Bradykinin-Antagonisten auf die Arteriogenese zu untersuchen, wurden zunächst C57Bl/6-Mäuse einer FAO unterzogen und täglich mit dem BR1-Antagonist R715 oder dem BR2-Antagonist Icatibant behandelt. Anschließend wurde täglich der Lahmheitsindex bestimmt und sieben Tage nach FAO folgte die Mikrosphärenperfusion zur Bestimmung des Kollateralen Perfusionsindex (*Collateral Perfusion Index, CPI*).

4.1.1.1. Lahmheitsindex (LI)

Die Tiere der BR1i-Gruppe (n = 7) zeigen im Mittel direkt nach der FAO eine mittelgradige Lahmheit mit geringgradiger Parese (L2), während die Kontrollgruppe (n = 7) nur eine geringgradige Lahmheit erkennen lässt (L1). Bei der BR2i-Gruppe (n = 7) sind am Folgetag nach der Ligatur geringgradige bis mittelgradige Lahmheiten erkennbar (L1-L2). Nach sieben Tagen haben sich in allen drei Gruppen die Lahmheiten gebessert, die Tiere der BR1i- und BR2i-Gruppen zeigen keine bis geringgradige Lahmheiten (L0-1), bei der Kontrollgruppe kann keine Lahmheit beobachtet werden (L0) (Abbildung 10).

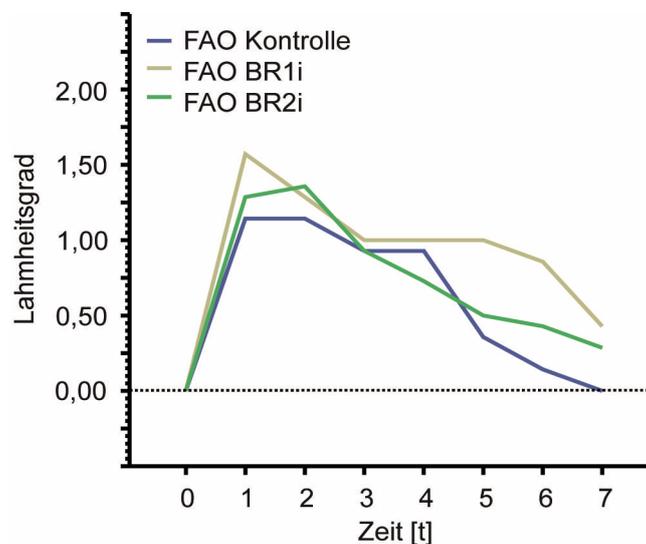


Abbildung 10: LI nach BR-Inhibition

Alle Tiere zeigen einen Tag nach OP die stärksten Einschränkungen im Bewegungsablauf (BR1i: L2, BR2i: L1-2; Kontrolle: L1), welche sich bei allen drei Gruppen im weiteren Verlauf kontinuierlich verbessern und nach 7 Tagen nur noch minimal erkennbar sind (BR1i: L0-L1; BR2i: L0; Kontrolle: L0).

4.1.1.2. Kollateraler Perfusionsindex (CPI)

Bei der Bestimmung des CPI mittels Mikrosphärenperfusion konnte bei der Kontrollgruppe ein Perfusionsindex von $62 \pm 13\%$ ($n = 7$) ermittelt werden. Die BR1i- und die BR2i-Gruppen zeigen signifikant geringere kollaterale Perfusionsindizes (BR1i: $41 \pm 10\%$; BR2i: $46 \pm 15\%$) (Abbildung 11).

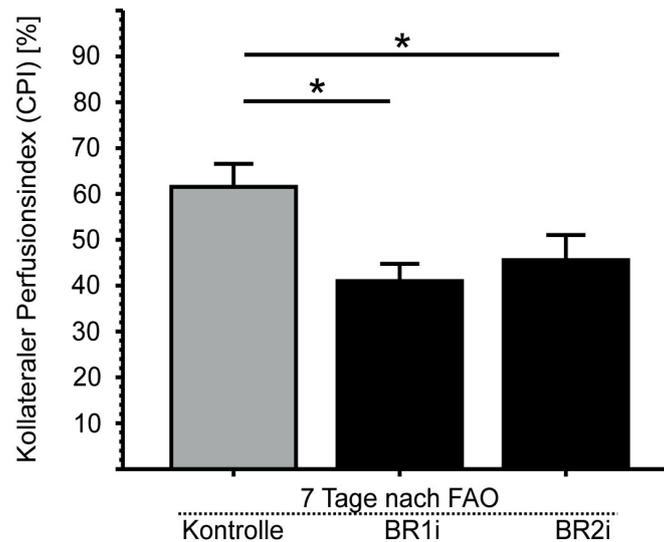


Abbildung 11: CPI nach BR-Inhibition

*Der CPI ist sieben Tage nach FAO in der der BR1i- sowie BR2i-Gruppe signifikant kleiner als in der Kontrollgruppe. (*nominaler p-Wert <0.033)*

4.2. Zerebrale Arteriogenese im 3-VO-Modell

4.2.1. 3-VO erzeugt Hypoperfusion

In der Sprague Dawley-Ratte führt die Okklusion von drei der vier hirnersorgenden Hauptarterien zur zerebralen Minderperfusion, wobei der ipsilaterale Blutfluss (*Cerebral blood flow, CBF*) direkt nach dem Verschluss der linken Arteria carotis communis auf $49 \pm 12\%$ absinkt und in diesem Bereich persistiert (CBF 5 Minuten nach 3-VO: $53 \pm 9\%$; CBF 10 Minuten nach 3-VO: $54 \pm 6\%$) (Abbildung 12).

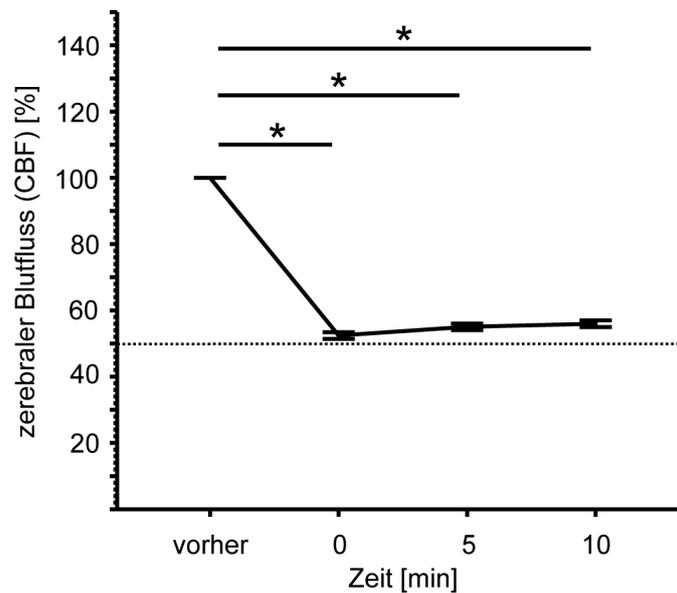


Abbildung 12: zerebraler Blutfluss im 3-VO-Modell

Unmittelbar nach dem Verschluss der Arteria carotis communis sinistra fällt der zerebrale Blutfluss auf etwa 50% ab und persistiert in diesem Bereich.

4.2.2. Gewichtsverlauf

Durch die tägliche Gewichtskontrolle kann ein kontinuierlicher Gewichtsverlauf dargestellt werden. Der Gewichtsverlauf der behandelten Ratten wurde über einen Zeitraum von 21 Tagen (Antagonisten) bzw. sieben Tagen (Rezeptoragonist) ermittelt.

4.2.2.1. Einfluss von BR1 und BR2 auf den Gewichtsverlauf

Hier zeigt sich, dass durchschnittlich alle Gruppen bis zum 2.Tag nach der OP an Gewicht verlieren, während dieses dann wieder kontinuierlich ansteigt. Die Kontrolltiere, die einer 3-VO-Operation unterzogen wurden, verlieren maximal bis $5,7 \pm 3,1\%$ des Ausgangsgewichtes, welches dann acht Tage nach der Operation wieder überschritten wird. Am 21. Tag nach der Operation wird ein maximaler Wert von $114,1 \pm 6,1\%$ erreicht. Bei den Sham-Tieren dagegen beträgt der Gewichtsverlust maximal $1,2 \pm 1,0\%$ und die Tiere erreichen bereits am Tag 4 wieder ihr Ausgangsgewicht und bis zum 21. Tag $113,6 \pm 3,4\%$.

Die mit dem BR1-Inhibitor behandelten Ratten verlieren $5,1 \pm 2,6\%$ (3-VO) bzw. $1,6 \pm 3,0\%$ (Sham) vom Ausgangsgewicht, erreichen dieses aber wieder am 8.Tag (3-VO) bzw. am 4.Tag (Sham) nach Operation. Maximale Gewichte liegen bei $112,9 \pm 5,3\%$ (3-VO) bzw. $116,0 \pm 3,1\%$ (Sham).

Tiere, die mit dem BR2-Inhibitor behandelt wurden, haben einen Gewichtsverlust von bis zu $4,9 \pm 2,1\%$, wenn sie einer 3-VO-Operation bzw. bis zu $3,9 \pm 2,7\%$, wenn sie einer Sham-Operation unterzogen wurden. Das Ausgangsgewicht erreichen die 3-VO-operierten Tiere am 6. Tag, die Sham-operierten Tiere am 5. Tag nach Initialoperation. Die maximalen Gewichte betragen am 21.Tag $115,8 \pm 6,8\%$ bei den 3-VO-Tieren bzw. $123,3 \pm 4,9\%$ bei den Sham-Tieren (Abbildung 13A und B).

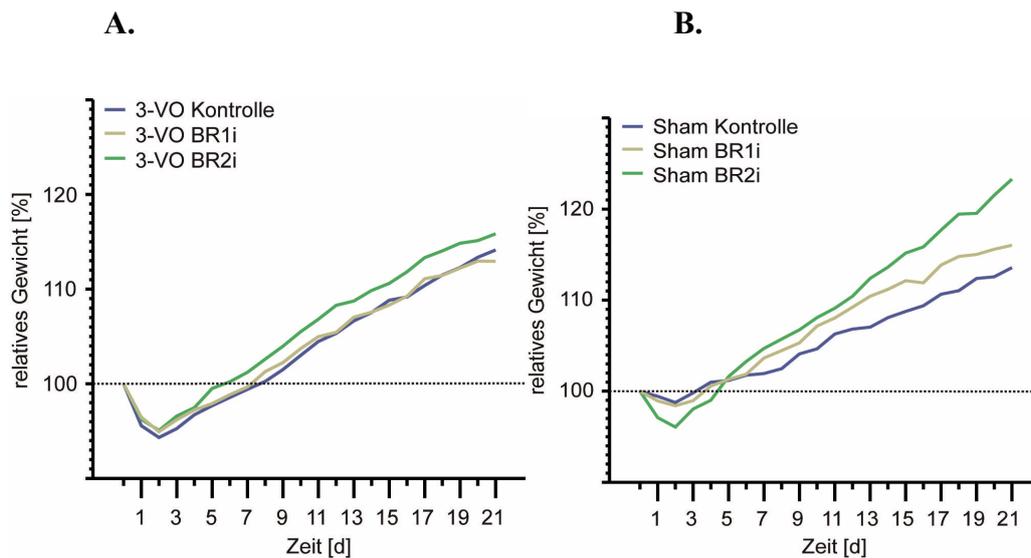


Abbildung 13: Gewichtsverläufe bei BR-Inhibition

Alle Tiere verlieren bis zum zweiten Tag an Gewicht, welches im weiteren Verlauf wieder kontinuierlich ansteigt. (A) 3-VO operierte Tiere erreichen zwischen dem 6. (BR2i) und 8. Tag (BR1i, Kontrolle) ihr Ausgangsgewicht und am Tag 21 zwischen 112% und 115%. (B) Sham-operierte Tiere erreichen zwischen dem 4. (BR1i, Kontrolle) und 5. Tag (BR2i) wieder 100% und am 21. Tag 114% (Kontrolle), 116% (BR1i) bzw. 121% (BR2i) des Ausgangsgewichts.

Um einen eventuellen Einfluss der eingesetzten Medikamente auf das Gewicht besser beurteilen zu können, wurden die Mittelwerte der Gruppen über die jeweiligen gesamten Beobachtungszeiträume bestimmt.

Über den Beobachtungszeitraum von 21 Tagen zeigt sich eine größere, jedoch nicht signifikante Gewichtszunahme bei der mit dem BR2-Inhibitor behandelten 3-VO-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe (Kontrolle: $4,2 \pm 4,7\%$; BR2i: $6,1 \pm 3,8\%$), während die BR1-Inhibitor-Gruppe keinen wesentlichen Unterschied zur Kontrolle zeigt (BR1i: $4,5 \pm 3,4\%$).

Die Sham-Gruppe der Kontrolle weist innerhalb des gesamten Beobachtungszeitraumes keinen signifikanten Unterschied zu der Sham-Gruppe mit dem BR1-Antagonisten auf (Kontrolle: $5,8 \pm 2,1\%$; BR1i: $7,5 \pm 2,1\%$), während die BR2-Sham-Gruppe signifikant größere Zunahmen zur Kontrolle zeigt (BR2: $9,5 \pm 3,3\%$) (Abbildung 14A und B).

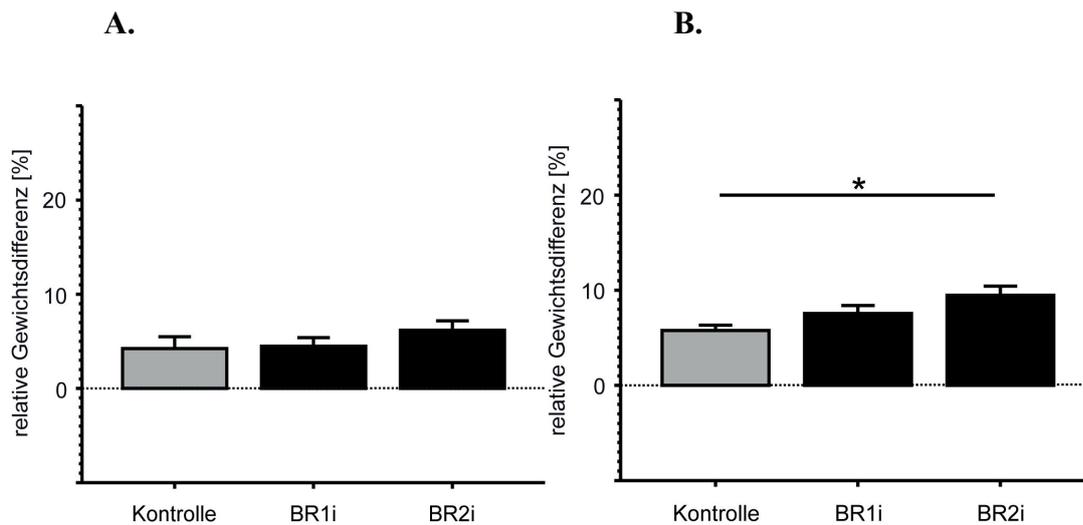


Abbildung 14: Gewichtsunterschiede bei BR-Inhibition

(A) Bei 3-VO-operierten Tieren sind keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle, der BR1i- bzw. BR2i-Gruppe erkennbar. (B) Bei Sham-operierten Tieren zeigt die mit dem BR2-Antagonisten behandelte Gruppe signifikant größere Gewichtszunahmen. (*nominaler p -Wert < 0.017)

4.2.2.2. Einfluss der BR1-Stimulation auf den Gewichtsverlauf

Auch hier kann man erkennen, dass die maximalen Gewichtsverluste bei der BR1s-3-VO-Gruppe im Mittel auf den 2. Tag post operationem (p.o.) fallen ($5,9 \pm 1,9\%$), wobei die Tiere der BR1s-Sham-Gruppe nur bis Tag 1 ($3,3 \pm 3,2\%$) nach Operation einen Gewichtsverlust aufzeigen. Die Tiere der Kontrollgruppe verlieren bis zum 3. Tag (3-VO) bzw. 2. Tag (Sham) maximal an Gewicht, die 3-VO-Gruppe bis $7,3 \pm 2,7\%$ vom Ausgangsgewicht, die dazugehörige Sham-Gruppe dagegen nur $4,4 \pm 3,5\%$. Die Ratten nehmen dann wieder kontinuierlich bis zum Tag 7 an Gewicht zu. Am 7. Tag nach 3-VO erreichen die Tiere aller Gruppen wieder etwa 100% des Ausgangsgewichtes (3-VO Kontrolle: $97,6 \pm 3,2\%$; Sham-Kontrolle: $102,7 \pm 3,1\%$, 3-VO BR1s: $100,1 \pm 1,3\%$; Sham-BR1s: $103,2 \pm 7,6\%$) (Abbildung 15A und B).

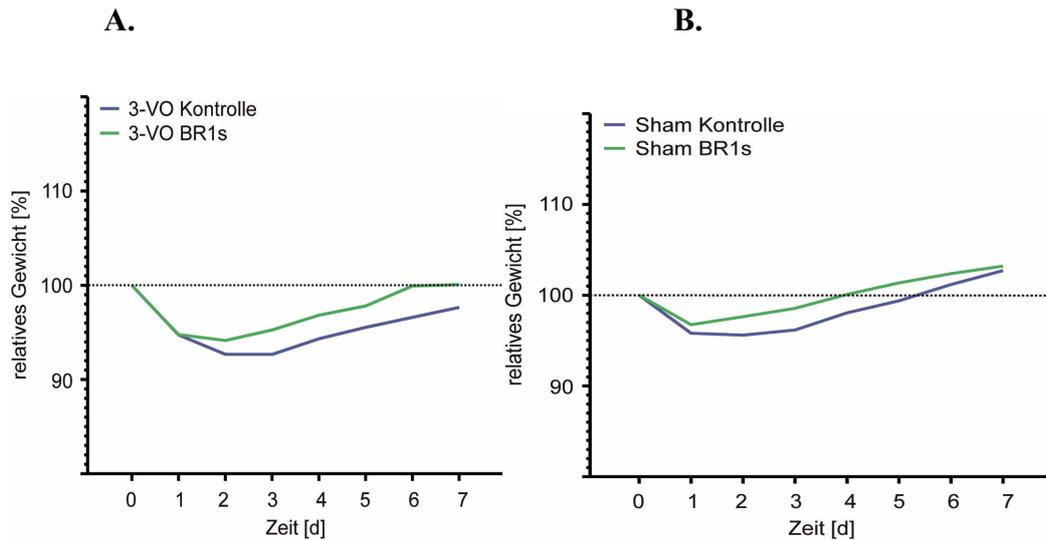


Abbildung 15: Gewichtsverläufe bei BR1-Stimulation

Alle Tiere verlieren maximal bis zum 3. Tag nach der Operation an Gewicht, welches dann kontinuierlich wieder ansteigt und bis Tag 7 sowohl bei (A) 3-VO operierten Tieren als auch (B) Sham-Tieren wieder etwa 100% erreicht bzw. überschritten hat.

Über den Beobachtungszeitraum von sieben Tagen werden bei den mit dem BR1-Agonisten behandelten Tieren größere durchschnittlichere Gewichtszunahmen beobachtet als bei den Kontrolltieren der 3-VO-Gruppe (Kontrolle: $-4,5 \pm 2,5\%$; BR1s: $-2,7 \pm 0,4\%$), sowie der Sham-Gruppe (Kontrolle: $-1,4 \pm 3,0\%$; BR1s: $0,0 \pm 4,7\%$) (Abbildung 16 A und B).

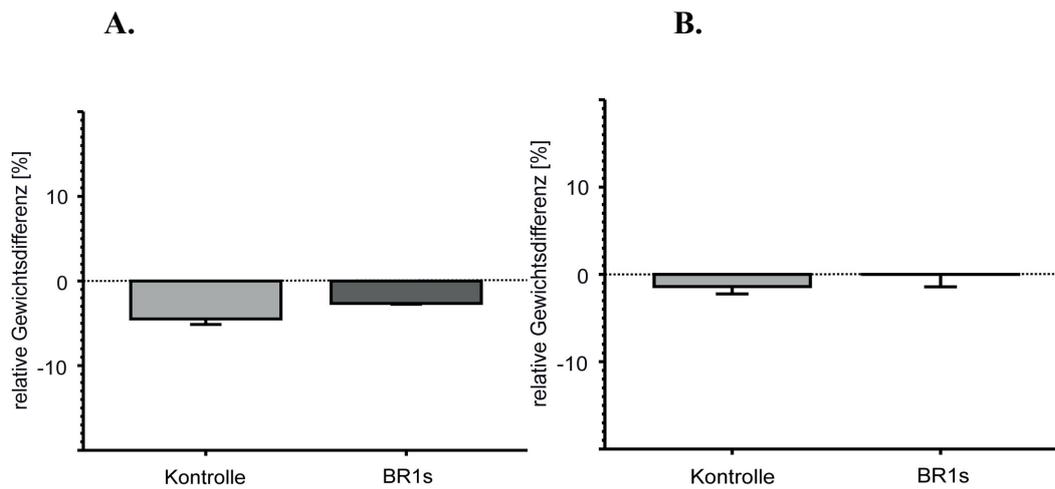


Abbildung 16: Gewichtsunterschiede bei BR-Stimulation

Bei der BR1s-Gruppe werden nach sieben Tagen im Vergleich zur Kontrollgruppe bei den (A) 3-VO-operierten Tieren sowie (B) Sham-operierten Tieren größere durchschnittliche Gewichtszunahmen beobachtet.

4.2.3. Untersuchung der adaptiven und therapeutischen Arteriogenese

4.2.3.1. Zerebrovaskuläre hämodynamische Reaktivität (CVR)

4.2.3.1.1. Adaptive Arteriogenese

Um die zerebrovaskuläre Reservekapazität (CVRC) darzustellen, wurde die CVR mittels Acetazolamid-Test bestimmt. Dazu wurde Acetazolamid (ACZ) intravenös injiziert, was in allen Gruppen zu einer signifikanten Erhöhung des $p\text{CO}_2$ (vorher: 49 ± 6 mmHg; nachher: 64 ± 13 mmHg) und zur signifikanten Senkung des pH-Wertes (vorher: $7,386 \pm 0,046$; nachher: $7,290 \pm 0,071$) führte (Tabelle 1; Abbildung 17A und B).

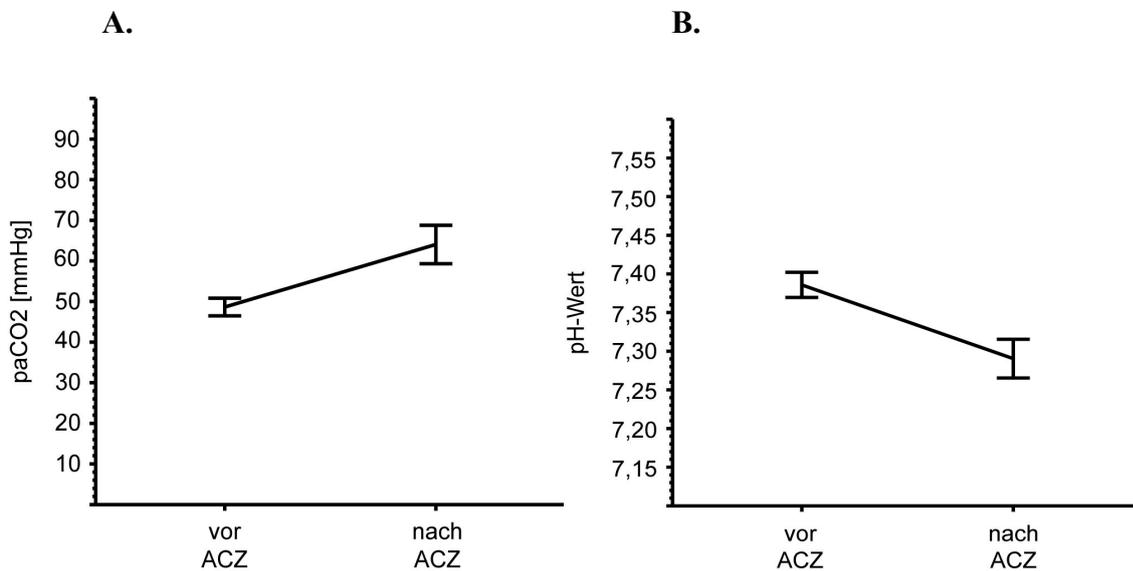


Abbildung 17: $p\text{CO}_2$ (A) und pH-Wert (B) -Änderungen während CVR-Messung

Bei intravenöser Injektion von Acetazolamid kommt es zur signifikanten Erhöhung des $p\text{CO}_2$ und zur signifikanten Hemmung des pH-Wertes.

Ergebnisse

	Reserve- kapazität	paCO ₂	paO ₂	pH	K ⁺	Na ⁺	Glu	Hct
	[%]	[mmHg]	[mmHg]		[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[%]
vor ACZ	0	49 ± 6	144 ± 23	7,386 ± 0,046	4,3 ± 0,6	134,5 ± 0,8	21,0 ± 2,5	39,5 ± 2,7
nach ACZ	20 ± 12 *	64 ± 13 *	139 ± 17	7,290 ± 0,071 *	4,3 ± 0,5	136,1 ± 1,4 *	20,3 ± 1,2	39,7 ± 3,8

Werte sind Mittelwerte ± SD; für alle Gruppen: n = 8; * p ≤ 0.05 nach ACZ gegenüber vor ACZ

Tabelle 1: Zerebrovaskuläre Reservekapazität (CVRC)

Durch die daraufhin ausgelöste Vasodilatation lässt sich die CVR bestimmen. Bei den „Unbehandelten“ (nichtoperierte, unbehandelte Tiere) steigt der zerebrale Blutfluss dabei in den ersten zwei Minuten stark an und erreicht dann ein Plateau zwischen der zweiten und achten Minute, welches einen geringen Anstieg zeigt (CBF: 120 ± 12%).

Der relative Ausgangswert des CBF wird mit 100% vorausgesetzt und dann die Blutflussdifferenz nach ACZ-Applikation als zerebrovaskuläre hämodynamische Reservekapazität bezeichnet (CVRC). Die CVRC liegt in der unbehandelten Gruppe bei 20 ± 12% über dem Ausgangswert. Bei der direkt nach 3-VO durchgeführten CVR ist die CVRC vollständig aufgehoben. Die CVRC liegt bei -5 ± 14%. Innerhalb der nächsten Woche beginnt sie sich zu erholen, so dass sie nach einer Woche bei 1 ± 9% liegt. Nach drei Wochen beträgt sie bereits 10 ± 8%. Der Wert der bei „unbehandelten“ Tieren gemessenen Reservekapazität wird in dieser Zeit aber noch nicht erreicht. Die CVRC beträgt bei der 7 Tage-Sham-Gruppe 11 ± 4% und bei der 21 Tage-Sham-Gruppe 12 ± 6% (Abbildung 18 A und B).

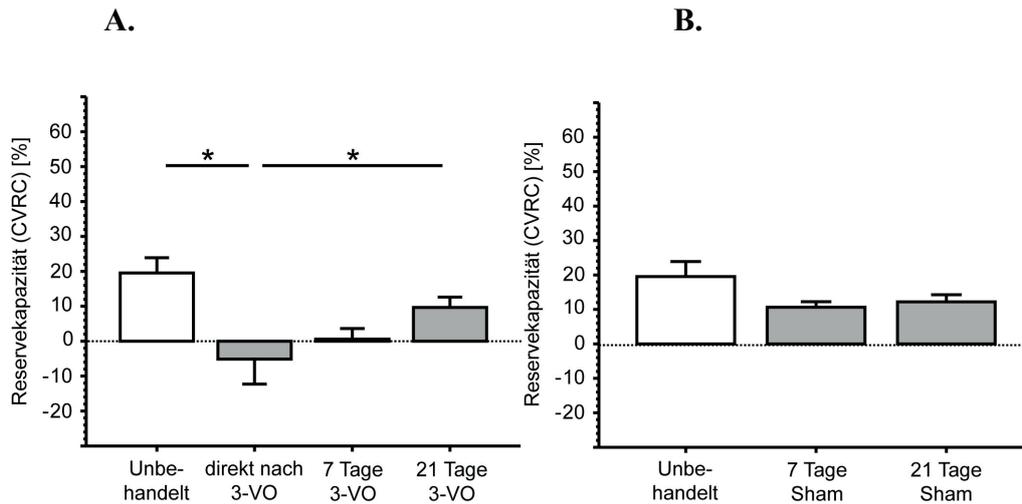


Abbildung 18: adaptive Arteriogenese – CVRC

Die CVRC beträgt bei unoperierten, unbehandelten Tieren $20 \pm 12\%$. (A) Bei 3-VO operierten Tieren ist die CVRC direkt nach Operation vollständig aufgehoben ($-5 \pm 14\%$), beträgt nach einer Woche $1 \pm 9\%$ und nach 21 Tagen $10 \pm 8\%$. (*nominaler p-Wert < 0.025) (B) In Sham-Gruppen beträgt die CVRC nach sieben Tagen $11 \pm 4\%$ und 21 Tagen $12 \pm 6\%$.

4.2.3.1.2. Pharmakologische Inhibition von BR1 und BR2

In der mit dem BR1-Antagonisten behandelten Gruppe zeigt sich nach 21 Tagen eine signifikant eingeschränkte CVRC mit einem Wert von $-4\% \pm 8\%$ im Vergleich zu der Kontrollgruppe ($10 \pm 8\%$). Hier ist also die CVRC wie bei einem Kontrolltier direkt nach 3-VO komplett aufgehoben.

Durch die Behandlung mit dem BR2-Antagonisten ist die CVRC gegenüber der 3-VO-Kontrolle nach 21 Tagen ebenfalls signifikant verringert und erreicht mit $0 \pm 12\%$ nur in etwa den Wert von Kontrolltieren nach 7 Tagen ($1 \pm 9\%$).

Innerhalb der Sham-Gruppen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zu den „unbehandelten“ Tieren (Abbildung 19A und B).

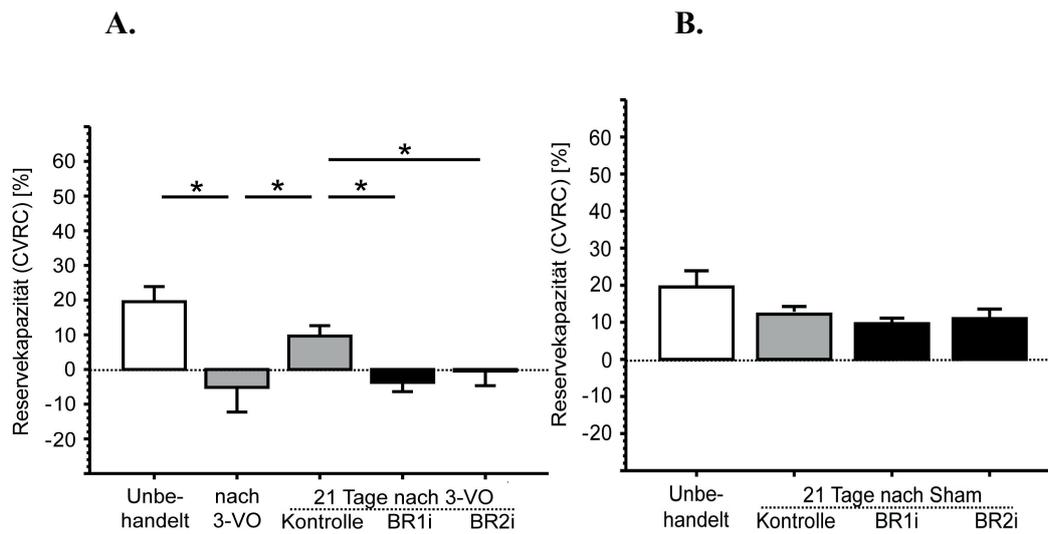


Abbildung 19: CVRC bei BR-Inhibition

Die CVRC ist (A) bei 3-VO operierten Tieren nach 21 Tagen gegenüber der Kontrollgruppe ($10 \pm 8\%$) signifikant geringer bei BR1i ($-4 \pm 8\%$) und BR2i ($0 \pm 12\%$). (*nominaler p-Wert 0.040) (B) Bei den Sham-Gruppen gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen der BR1i-, der BR2i- und Kontrollgruppe.

4.2.3.1.3. Pharmakologische Stimulation von BR1

Bei der pharmakologischen Stimulation durch den selektiven B1-Rezeptor-Agonisten (BR1s) wird die CVRC in 3-VO-Gruppen bereits nach 7 Tagen im Vergleich zur Kontrolle signifikant gesteigert (Kontrolle: $1 \pm 9\%$; BR1s: $13 \pm 14\%$) (Abbildung 20A und B).

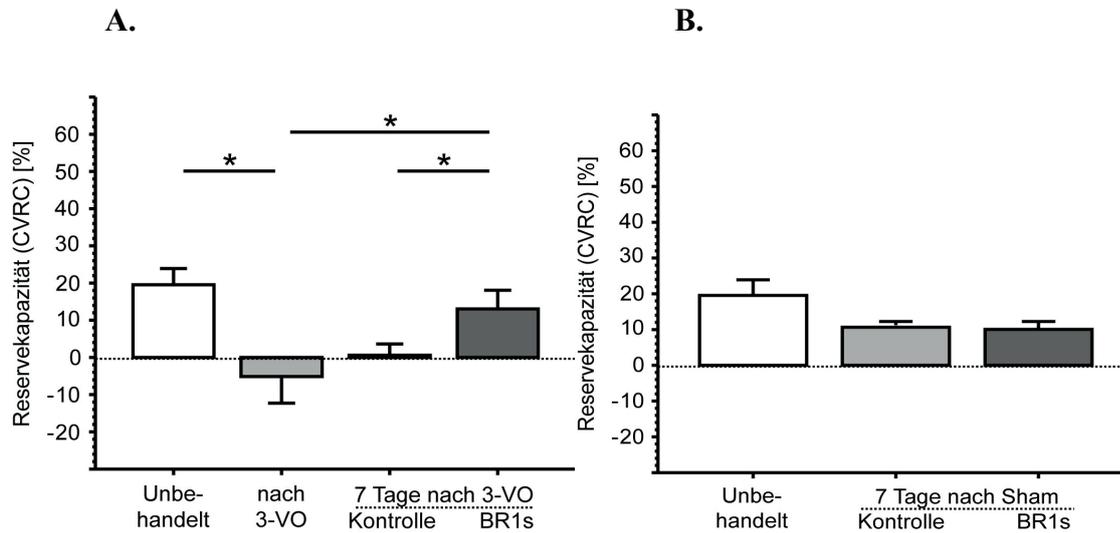


Abbildung 20: CVR bei BR1-Stimulation

Bei BR1-Stimulation beträgt die CVRC bei (A) 3-VO operierten Tieren $13 \pm 14\%$ und ist signifikant größer als in der Kontrollgruppe ($1 \pm 9\%$). (*nominaler p -Wert < 0.038) (B) Die Sham-Gruppen zeigen keine signifikanten Unterschiede. (*nominaler p -Wert < 0.050)

4.2.3.2. 3-VO induziert zerebrales Kollateralwachstum

4.2.3.2.1. Adaptive Arteriogenese

Die Latexangiographie mit anschließender Diametermessung wurde durchgeführt, um festzustellen, ob die funktionellen Veränderungen in der hämodynamischen Reservekapazität mit den morphologischen Veränderungen des eingeleiteten aktiven Gefäßumbaus korrelieren.

Die Messung zeigt, dass 7 Tage nach 3-VO-Operation die ipsi- sowie kontralaterale PCA signifikant vergrößert ist gegenüber den „unbehandelten“ Tieren (ipsilateral: unbehandelt: $148 \pm 18 \mu\text{m}$; 7 Tage 3-VO Kontrolle: $213 \pm 10 \mu\text{m}$; kontralateral: unbehandelt: $156 \pm 19 \mu\text{m}$; 7 Tage 3-VO Kontrolle: $201 \pm 17 \mu\text{m}$). Bei den anderen Arterien des Circulus Willisi können nach 7 Tagen keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden.

Drei Wochen nach 3-VO sind gegenüber „unbehandelten“ Tieren und einer Woche nach 3-VO neben den PCA-Diametern (ipsilateral: $249 \pm 26 \mu\text{m}$; kontralateral: $236 \pm 23 \mu\text{m}$) auch die der ipsilateralen PComA (Unbehandelt: $185 \pm 29 \mu\text{m}$; 21 Tage 3-VO: $263 \pm 67 \mu\text{m}$), der ipsilateralen ICA (Unbehandelt: $241 \pm 30 \mu\text{m}$; 21 Tage nach 3-VO: $312 \pm 76 \mu\text{m}$), der ipsilateralen MCA (unbehandelt: $206 \pm 16 \mu\text{m}$; 21 Tage 3-VO: $247 \pm 55 \mu\text{m}$) sowie die Diameter der ipsilateralen ACA (Unbehandelt: $169 \pm 24 \mu\text{m}$; 21 Tage 3-VO: $249 \pm 55 \mu\text{m}$) signifikant vergrößert.

Die Diameter der ipsi- sowie kontralateralen PCAs der Sham-Gruppen zeigen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den „unbehandelten“ Tieren (Abbildung 21 A, B, C, und D; Tabelle 2).

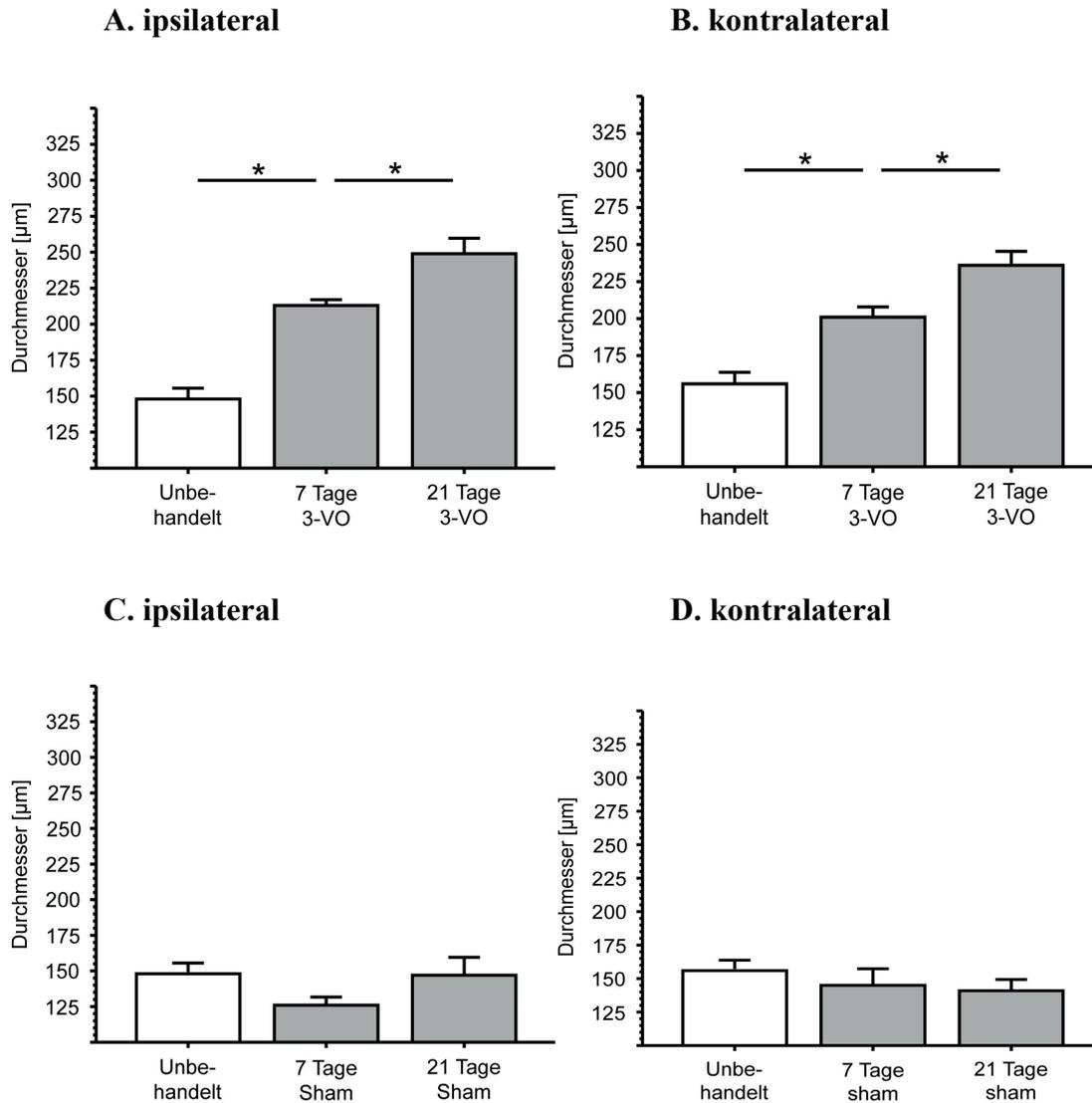


Abbildung 21: adaptive Arteriogenese – Diameter der PCA

Die Diameter der PCA sind bei 3-VO operierten Tieren ipsi- (A, *nominaler p -Wert < 0.050) sowie kontralateral (B, *nominaler p -Wert < 0.050) nach sieben sowie 21 Tagen signifikant vergrößert (ipsilateral: unbehandelt: $148 \pm 18 \mu\text{m}$, 7 Tage 3-VO: $213 \pm 10 \mu\text{m}$, 21 Tage 3-VO: $249 \pm 26 \mu\text{m}$; kontralateral: unbehandelt: $156 \pm 19 \mu\text{m}$, 7 Tage 3-VO: $201 \pm 17 \mu\text{m}$, 21 Tage 3-VO: $236 \pm 23 \mu\text{m}$). Bei Sham-operierten Tieren zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in den Diametern (C) ipsi- sowie (D) kontralateral.

Ergebnisse

	Arteria cerebri posterior (PCA)		Arteria communicans posterior (PCoA)		Arteria carotis interna (ICA)		Arteria cerebri media (MCA)		Arteria cerebri anterior (ACA)		Reservekapazität [%]
	ipsi [µm]	kontra [µm]	ipsi [µm]	kontra [µm]	ipsi [µm]	kontra [µm]	ipsi [µm]	kontra [µm]	ipsi [µm]	kontra [µm]	
Unbehandelt	148 ± 18 (n = 6)	156 ± 19 (n = 6)	185 ± 29 (n = 6)	187 ± 13 (n = 6)	241 ± 30 (n = 6)	233 ± 24 (n = 6)	206 ± 16 (n = 6)	203 ± 18 (n = 6)	169 ± 24 (n = 6)	180 ± 23 (n = 6)	20 ± 12 (n = 8)
direkt nach 3-VO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-5 ± 14 * (n = 4)
7 Tage nach 3-VO	213 ± 10 * (n = 6)	201 ± 17 * (n = 6)	201 ± 38 (n = 6)	193 ± 20 (n = 6)	240 ± 19 (n = 6)	218 ± 16 (n = 6)	203 ± 31 (n = 6)	177 ± 17 (n = 6)	197 ± 18 (n = 6)	176 ± 18 (n = 6)	1 ± 9 * (n = 8)
21 Tage nach 3-VO	249 ± 26 *‡ (n = 6)	236 ± 23 *‡ (n = 6)	263 ± 67 *‡ (n = 6)	210 ± 11 (n = 6)	312 ± 76 *‡ (n = 6)	230 ± 24 (n = 6)	247 ± 55 *‡ (n = 6)	222 ± 41 ‡ (n = 6)	249 ± 55 *‡ (n = 6)	195 ± 25 (n = 6)	10 ± 8 *† (n = 8)
7 Tage nach Sham	126 ± 14 § (n = 6)	145 ± 30 § (n = 6)	193 ± 10 (n = 6)	197 ± 24 (n = 6)	245 ± 23 (n = 6)	242 ± 15 (n = 6)	196 ± 20 (n = 6)	192 ± 8 (n = 6)	185 ± 20 (n = 6)	188 ± 23 (n = 6)	11 ± 4 (n = 6)
21 Tage nach Sham	147 ± 31 § (n = 6)	141 ± 20 § (n = 6)	181 ± 13 § (n = 6)	187 ± 35 (n = 6)	218 ± 25 § (n = 6)	223 ± 26 (n = 6)	171 ± 14 § (n = 6)	187 ± 20 § (n = 6)	151 ± 18 § (n = 6)	151 ± 20 *‡§ (n = 6)	12 ± 6 (n = 8)

Werte sind Mittelwerte ± SD;

* p ≤ 0.05 (Angio alle Gruppen; CVRC: „direkt nach 3-VO“) gegenüber Unbehandelt; † p ≤ 0.05 3-VO gegenüber „direkt nach 3-VO“

‡ p ≤ 0.05 21 Tage gegenüber 7 Tage; § p ≤ 0.05 Sham gegenüber 3-VO

Tabelle 2: Adaptive Arteriogenese

4.2.3.2.2. Pharmakologische Inhibition von BR1 und BR2

Bei der Gruppe, die mit H1960 behandelt wurde, sind signifikant kleinere Durchmesser gegenüber „21 Tagen nach 3-VO“ bei beiden PCAs (ipsilateral: $194 \pm 12 \mu\text{m}$; kontralateral: $203 \pm 24 \mu\text{m}$), der ipsilateralen PComA ($199 \pm 31 \mu\text{m}$) sowie der ipsilateralen ACA ($180 \pm 44 \mu\text{m}$) zu beobachten.

Die Behandlung mit Icatibant zeigt, dass die Durchmesser der ipsilateralen PCA signifikant kleiner gegenüber denen der Tiere der „21 Tage 3-VO“-Gruppe waren (ipsilateral: $209 \pm 25 \mu\text{m}$) (Abbildung 22A und B; Tabelle 3).

Die jeweiligen Sham-Gruppen zeigen keine signifikanten Veränderungen gegenüber den „unbehandelten“ Tieren.

Die 3-VO-Kontroll-Gruppe unterscheidet sich in beiden PCAs sowie allen ipsilateralen Gefäßen signifikant von der Sham-Kontroll-Gruppe. Dagegen unterscheidet sich die BR1i-3-VO-Gruppe nur in beiden PCAs und der kontralateralen ACA und die BR2i-3-VO-Gruppe in beiden PCAs und beiden ACAs signifikant von den dazugehörigen Sham-Gruppen (Abbildung 22 C und D; Tabelle 3).

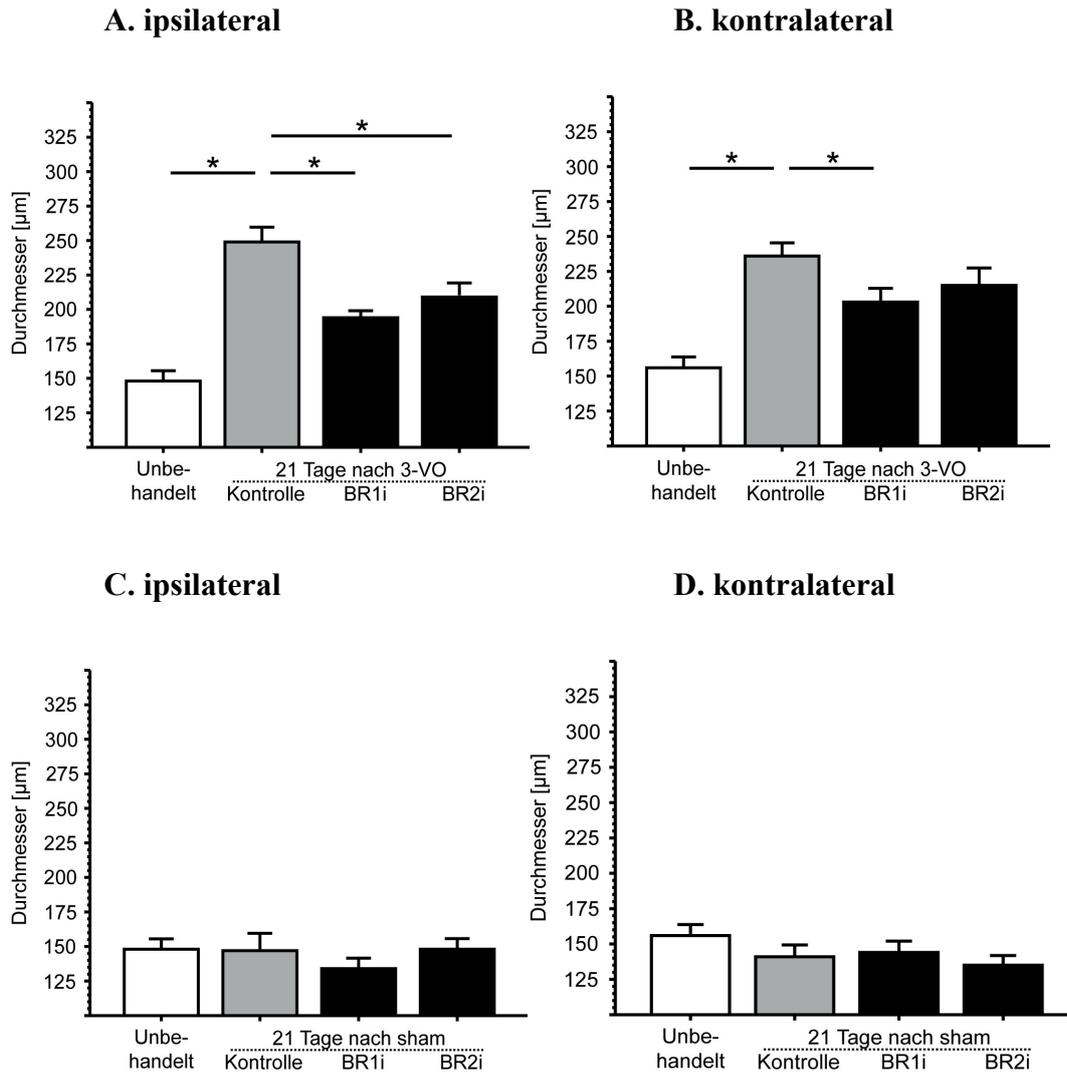


Abbildung 22: Diameter der PCA bei BR-Inhibition

Die Diameter der PCA sind bei 3-VO operierten Tieren (A, *nominaler p -Wert < 0.042) ipsilateral bei der BR1i- sowie BR2i-Gruppe und (B, *nominaler p -Wert < 0.033) kontralateral bei der BR1i-Gruppe signifikant kleiner gegenüber Kontrollen (ipsilateral: 3-VO-Kontrolle: $249 \pm 26 \mu\text{m}$, 3-VO-BR1i: $194 \pm 12 \mu\text{m}$, 3-VO-BR2i: $209 \pm 25 \mu\text{m}$; kontralateral: 3-VO-Kontrolle: $236 \pm 23 \mu\text{m}$, BR1i: $203 \pm 24 \mu\text{m}$). Bei Sham-operierten Tieren zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in den Diametern (C) ipsi- sowie (D) kontralateral.

Ergebnisse

	Arteria cerebri posterior (PCA)		Arteria communicans posterior (PCoA)		Arteria carotis interna (ICA)		Arteria cerebri media (MCA)		Arteria cerebri anterior (ACA)		Reservekapazität [%]
	ipsi [µm]	kontra [µm]	ipsi [µm]	kontra [µm]	ipsi [µm]	kontra [µm]	ipsi [µm]	kontra [µm]	ipsi [µm]	kontra [µm]	
Unbehandelt	148 ± 18 (n = 6)	156 ± 19 (n = 6)	185 ± 29 (n = 6)	187 ± 13 (n = 6)	241 ± 30 (n = 6)	233 ± 24 (n = 6)	206 ± 16 (n = 6)	203 ± 18 (n = 6)	169 ± 24 (n = 6)	180 ± 23 (n = 6)	20 ± 12 (n = 8)
direkt nach 3-VO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-5 ± 14 * (n = 4)
21T 3-VO Kontrolle	249 ± 26 * (n = 6)	236 ± 23 * (n = 6)	263 ± 67 * (n = 6)	210 ± 11 (n = 6)	312 ± 76 * (n = 6)	230 ± 24 (n = 6)	247 ± 55 (n = 6)	222 ± 41 (n = 6)	249 ± 55 * (n = 6)	195 ± 25 (n = 6)	10 ± 8 † (n = 8)
21T 3-VO BR1i	194 ± 12 *‡ (n = 6)	203 ± 24 *‡ (n = 6)	199 ± 31 ‡ (n = 6)	186 ± 35 (n = 6)	260 ± 59 (n = 6)	240 ± 14 (n = 6)	213 ± 44 (n = 6)	192 ± 38 (n = 6)	180 ± 44 ‡ (n = 6)	182 ± 30 (n = 6)	-4 ± 8 ‡ (n = 8)
21T 3-VO BR2i	209 ± 25 *‡ (n = 6)	215 ± 30 * (n = 6)	246 ± 76 * (n = 6)	219 ± 46 (n = 6)	320 ± 62 * (n = 6)	264 ± 20 ‡ (n = 6)	252 ± 70 (n = 6)	232 ± 41 (n = 6)	265 ± 55 * (n = 6)	246 ± 39 *‡ (n = 6)	0 ± 12 ‡ (n = 8)
21T Sham Kontrolle	147 ± 31 § (n = 6)	141 ± 20 § (n = 6)	181 ± 13 § (n = 6)	187 ± 35 (n = 6)	218 ± 25 § (n = 6)	223 ± 26 (n = 6)	171 ± 14 § (n = 6)	187 ± 20 (n = 6)	151 ± 18 § (n = 6)	151 ± 20 § (n = 6)	12 ± 6 (n = 8)
21T Sham BR1i	134 ± 18 § (n = 6)	144 ± 20 § (n = 6)	188 ± 31 (n = 6)	195 ± 22 (n = 6)	223 ± 35 (n = 6)	210 ± 12 (n = 6)	182 ± 27 (n = 6)	214 ± 21 (n = 6)	161 ± 33 § (n = 6)	149 ± 14 § (n = 6)	10 ± 3 (n = 4)
21T Sham BR2i	148 ± 19 § (n = 6)	135 ± 17 § (n = 6)	212 ± 26 (n = 6)	207 ± 30 (n = 6)	276 ± 20 (n = 6)	240 ± 30 (n = 6)	214 ± 17 (n = 6)	222 ± 29 (n = 6)	207 ± 14 ‡ (n = 6)	200 ± 19 § (n = 6)	11 ± 6 (n = 6)

Werte sind Mittelwerte ± SD;
 * p ≤ 0.05 (Angio alle Gruppen; CVRC: „direkt nach 3-VO“) gegenüber Unbehandelt; † p ≤ 0.05 3-VO Kontrolle gegenüber „direkt nach 3-VO“;
 ‡ p ≤ 0.05 Behandlung gegenüber Kontrolle; § p ≤ 0.05 Sham gegenüber 3-VO

Tabelle 3: Pharmakologische BR-Inhibition

4.2.3.2.3. Pharmakologische Stimulation von BR1

Nach der Stimulation durch den B1-Agonisten R916 (BR1s) zeigt sich nach sieben Tagen, dass die Diameter der ipsilateralen PCA gegenüber denen der „Unbehandelten“ und der „7 Tage 3-VO-Kontrolle“ signifikant vergrößert sind (7 Tage-3-VO-Kontrolle: $213 \pm 10 \mu\text{m}$; 7 Tage 3-VO-BR1s: $253 \pm 33 \mu\text{m}$). Die Diameter der kontralateralen PCA zeigen keine signifikanten Veränderungen gegenüber den Kontrollen (7 Tage-3-VO-Kontrolle: $201 \pm 17 \mu\text{m}$, 3-VO-BR1s: $225 \pm 18 \mu\text{m}$). (Abbildung 23A und B; Tabelle 4).

Die BR1s-Sham-Gruppe (PCA ipsilateral: $145 \pm 28 \mu\text{m}$; PCA kontralateral: $152 \pm 31\%$) zeigt keine signifikanten Veränderungen in den Gefäßdurchmessern des Circulus Willisii im Vergleich mit den „unbehandelten“ Tieren (Abbildung 23C und D; Tabelle 4).

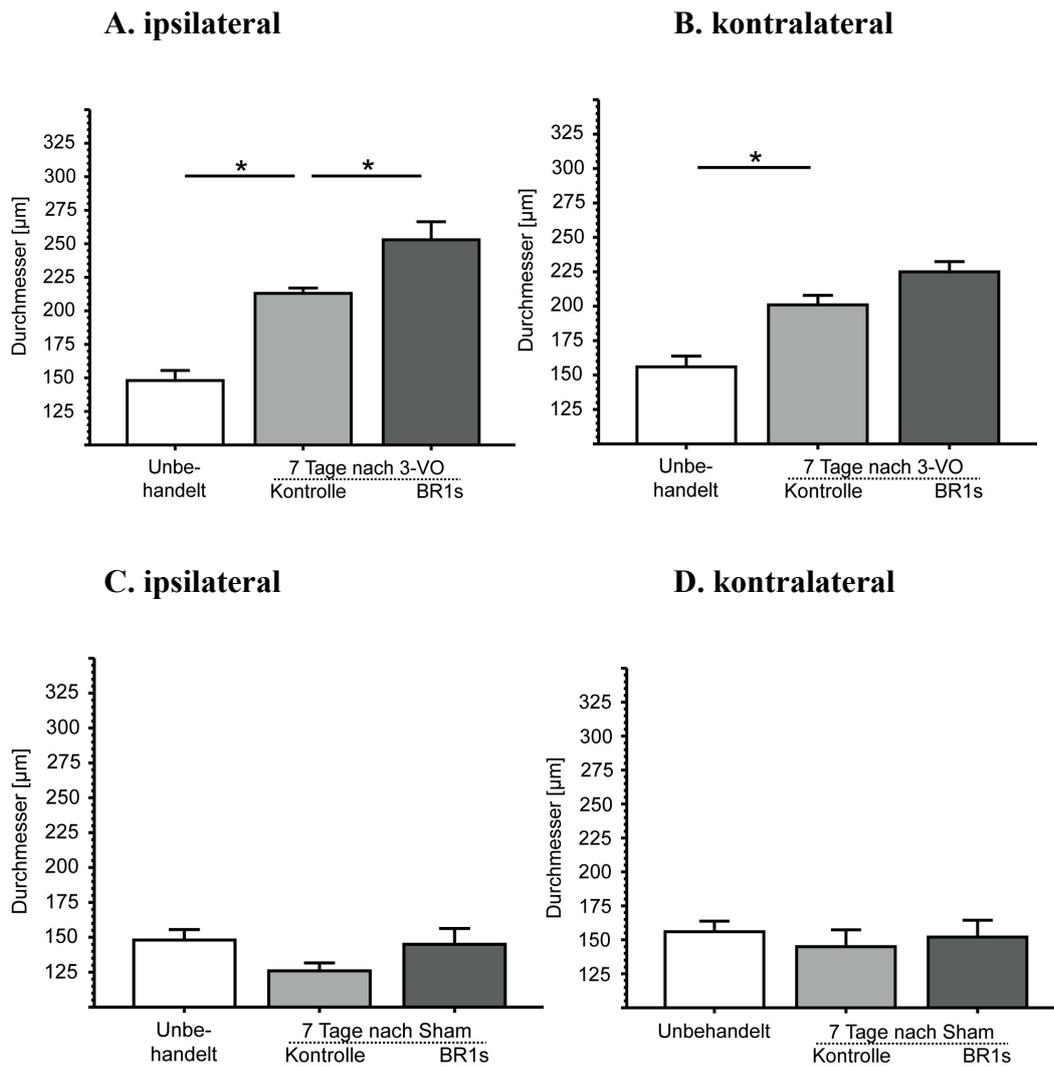


Abbildung 23: Durchmesser der PCA bei BR-Stimulation

Bei BR1-Stimulation sind die Durchmesser der PCA bei 3-VO operierten Tieren (A, *nominaler p -Wert < 0.050) ipsilateral signifikant größer als bei den Kontrollen (3-VO-Kontrolle: $213 \pm 10 \mu\text{m}$, 3-VO-BR1s: $253 \pm 33 \mu\text{m}$). (B, *nominaler p -Wert < 0.033) Kontralateral und (C) ipsi- sowie (D) kontralateral bei Sham-operierten Tieren zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in den Durchmessern.

Ergebnisse

	Arteria cerebri posterior (PCA)		Arteria communicans posterior (PCoA)		Arteria carotis interna (ICA)		Arteria cerebri media (MCA)		Arteria cerebri anterior (ACA)		Reservekapazität [%]
	ipsi [µm]	kontra [µm]	ipsi [µm]	kontra [µm]	ipsi [µm]	kontra [µm]	ipsi [µm]	kontra [µm]	ipsi [µm]	kontra [µm]	
Unbehandelt	148 ± 18 (n = 6)	156 ± 19 (n = 6)	185 ± 29 (n = 6)	187 ± 13 (n = 6)	241 ± 30 (n = 6)	233 ± 24 (n = 6)	206 ± 16 (n = 6)	203 ± 18 (n = 6)	169 ± 24 (n = 6)	180 ± 23 (n = 6)	20 ± 12 (n = 8)
direkt nach 3-VO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-5 ± 14 * (n = 4)
7T 3-VO Kontrolle	213 ± 10 * (n = 6)	201 ± 17 * (n = 6)	201 ± 38 (n = 6)	193 ± 20 (n = 6)	240 ± 19 (n = 6)	218 ± 16 (n = 6)	203 ± 31 (n = 6)	177 ± 17 * (n = 6)	197 ± 18 (n = 6)	176 ± 18 (n = 6)	1 ± 9 (n = 8)
7T 3-VO BR1s	253 ± 33 *‡ (n = 6)	225 ± 18 * (n = 6)	229 ± 27 * (n = 6)	198 ± 24 (n = 6)	280 ± 37 (n = 6)	248 ± 26 (n = 6)	216 ± 19 (n = 6)	205 ± 21 ‡ (n = 6)	240 ± 61 * (n = 6)	203 ± 22 (n = 6)	13 ± 14 †‡ (n = 8)
7T Sham Kontrolle	126 ± 14 § (n = 6)	145 ± 30 § (n = 6)	193 ± 10 (n = 6)	197 ± 24 (n = 6)	245 ± 23 (n = 6)	242 ± 15 (n = 6)	196 ± 20 (n = 6)	192 ± 8 (n = 6)	185 ± 20 (n = 6)	188 ± 23 (n = 6)	11 ± 4 (n = 6)
7T Sham BR1s	145 ± 28 § (n = 6)	152 ± 31 § (n = 6)	195 ± 32 (n = 6)	202 ± 26 (n = 6)	259 ± 42 (n = 6)	262 ± 28 (n = 6)	194 ± 20 (n = 6)	210 ± 10 (n = 6)	197 ± 24 (n = 6)	183 ± 22 (n = 6)	10 ± 5 (n = 5)

Werte sind Mittelwerte ± SD;

* p ≤ 0.05 (Angio alle Gruppen; CVRC: „direkt nach 3-VO“) gegenüber Unbehandelt; † p ≤ 0.05 3-VO Kontrolle gegenüber „direkt nach 3-VO“;

‡ p ≤ 0.05 Behandlung gegenüber Kontrolle; § p ≤ 0.05 Sham gegenüber 3-VO

Tabelle 4: Pharmakologische BR1-Stimulation

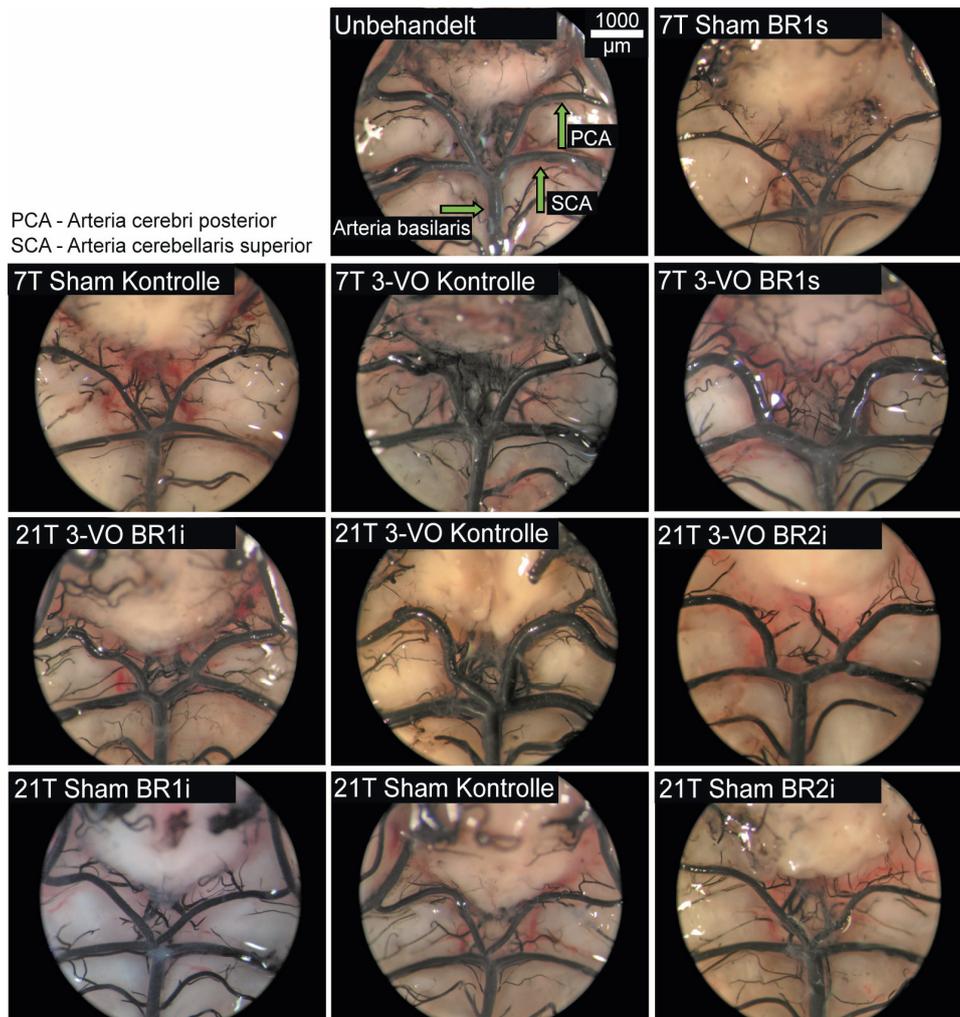


Abbildung 24: Postmortale Latexangiographie

Darstellung der PCA mittels Latexperfusion. Die Diameter der ipsi- sowie kontralateralen PCA sind signifikant vergrößert nach sieben bzw. 21 Tagen. Bei BR1-sowie BR2-Inhibition sind die Diameter signifikant kleiner, bei BR1-Stimulation signifikant größer gegenüber Kontrollen. Die Diameter der PCA bei den Sham-Gruppen zeigen keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle.

4.3. Monozytenmigrationsassay

Im Monozytenmigrationassay wird untersucht, ob Bradykinin-Agonisten die Migration von Monozyten (MZ) fördern. Als Positiv-Kontrolle wird zuerst die Migration gegen MCP-1 gezeigt, diese beträgt 72 ± 6 MZ/Gesichtsfeld (High Power Field, HPF), dagegen beträgt die Migration ohne Agenz (gegen 0%) 30 ± 3 MZ/HPF.

Bei Vorstimulation der humanen THP-1 Zellen mit Interleukin-1 wird ohne Agenz eine Migration von 34 ± 4 MZ/HPF ermittelt, gegen MCP-1, sowie der BR1-Agonist (R916) zeigen sich dagegen signifikant verstärkte Migrationen (MCP-1: 65 ± 9 MZ/HPF, R916: 74 ± 3 MZ/HPF). Diese sind bei zusätzlicher Vorbehandlung mit dem BR1-Antagonisten R715 jedoch wieder aufgehoben (41 ± 2 MZ/HPF) (Abbildung 25).

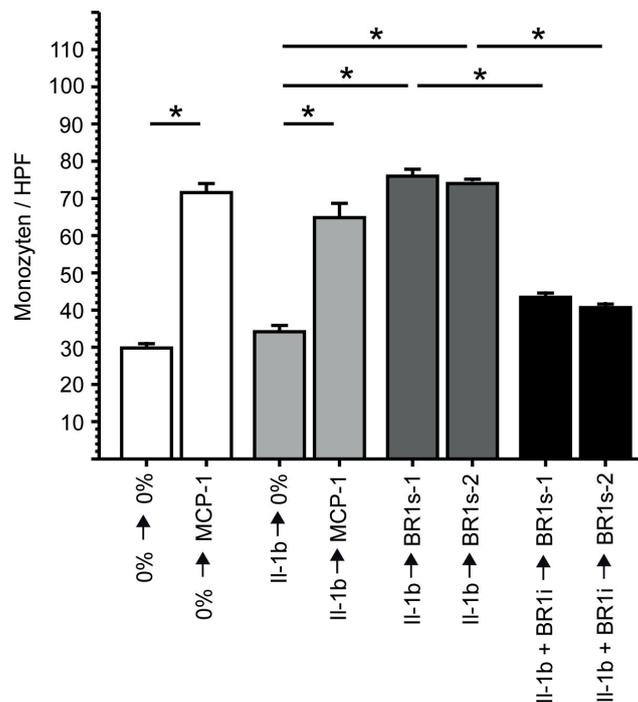


Abbildung 25: Monozytenmigrationsassay

Die Migration von Monozyten ohne Agenz (gegen 0%) beträgt 30 ± 3 MZ/HPF, mit MCP-1 (Positivkontrolle) 72 ± 6 MZ/HPF. Bei Vorstimulation mit Interleukin-1 wird eine Migration von 34 ± 4 MZ/HPF ermittelt, welche gegen MCP-1 und BR1-Agonisten (R916) signifikant gesteigert wird (MCP-1: 65 ± 9 MZ/HPF, R916: 74 ± 3 MZ/HPF). Bei zusätzlicher Vorbehandlung mit dem BR1-Antagonisten R715 ist diese Steigerung wieder aufgehoben (41 ± 2 MZ/HPF).

5. Diskussion

Ausgehend von Vorarbeiten, in denen Hillmeister *et al.* bei der Untersuchung der frühen zerebralen Arteriogenese mittels Genexpressionanalyse unter anderem die signifikante Positivregulierung der Kininogen-Expression entdeckten (Hillmeister *et al.*, 2008), zeigt diese Arbeit erstmals die Rolle der Bradykinin-Rezeptoren während des Kollateralwachstums im zerebralen und peripheren Gefäßverschlussmodell nach deren pharmakologischer Hemmung bzw. Stimulation.

5.1. Evaluierung der eingesetzten Methoden

5.1.1. Induktion der peripheren Arteriogenese nach FAO

Mit der Erforschung des adaptiven Gefäßwachstums wurden zahlreiche verschiedene Tiermodelle entwickelt. Dabei konnte man große Unterschiede hinsichtlich der anatomischen Voraussetzungen bei den unterschiedlichen Spezies erkennen. Aber auch die Wahl des untersuchten arteriellen Versorgungsgebietes (koronar, zerebral oder peripher) prägt das methodische Vorgehen. Mit der Abgrenzung von Angiogenese und Arteriogenese ist es außerdem wichtig geworden, Modelle zu entwickeln, um Prozesse der Arteriogenese selektiv betrachten zu können.

5.1.1.1. FAO als Arteriogenesemodell

In dieser Studie wird das Modell nach Hoefler *et al.* (Hoefler *et al.*, 2002) angewendet, wobei die Arteria femoralis im Bereich distal des Abgangs der Arteria profunda femoris und proximal des Abgangs der Arteria poplitea durch zwei Ligaturen okkludiert wird. Diese werden bei allen Tieren exakt an der gleichen Stelle gesetzt, unmittelbar proximal und distal der Abgänge der Arteria caudalis femoris lateralis (*Lateral Caudal Femoral Artery*, LCFA) sowie der Arteria circumflexa femoris laeralis (LFCA). Durch die Doppelligatur kann die Kollateralen-Ausbildung der Vasa vasorum verhindert werden, wodurch die Ausprägung der präexistenten arteriolären Anastomosen zwischen der Arteria profunda femoris, der Arteria caudalis femoris lateralis und der Arteria saphena nicht beeinträchtigt wird (Hoefler *et al.*,

2001). Mit dem Verzicht auf eine invasive Totalresektion der Arteria femoralis und der Entscheidung für die relativ atraumatische doppelte Ligatur wird ein Gefäßwachstum im Rahmen von Wundheilung oder Gewebsnekrose ausgeschlossen. Es wurde bereits beschrieben, dass das adaptive Wachstum dieser Kollateralgefäße zu keinem Zeitpunkt mit einer Ischämie des umgebenden Gewebes assoziiert ist (Deindl et al., 2001). Ischämie-abhängige Metabolite wie Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP), Adenosinmonophosphat (AMP), Adenosine, Inosine und Hypoxanthine im Musculus quadriceps femoris und der Adduktorenmuskulatur unterscheiden sich nicht von den Messwerten zwischen ligierten und nicht-ligierten Hinterläufen. Auch die Expression von Hypoxie-abhängigen Genen wie HIF-1 α und Laktat-Dehydrogenase (LDH) A nimmt nach Femoralarterienligatur im Oberschenkel nicht zu (Deindl et al., 2001). Da es zu keiner Veränderung der Kapillardichte kommt, kann davon ausgegangen werden, dass hier keine Angiogenese stattfindet. Im Gegensatz dazu findet sie im Unterschenkel statt (Ito et al., 1997b). Angiogenese und Arteriogenese verlaufen dementsprechend räumlich getrennt und können durch dieses Modell räumlich getrennt voneinander untersucht werden.

Nach der Ligatur der rechten Arteria femoralis kommt es zu einem transienten Erblassen der Extremität. Auch die Funktion des Fußes ist nach dem Erwachen aus der Narkose im Sinne einer geringgradigen Parese eingeschränkt. Diese Parese ist auf die Durchblutungsstörung distal der Ligatur zurückzuführen. Die präexistenten Kollateralen werden direkt nach FAO vasodilatiert und übernehmen anteilig den Blutfluss. Dieser reicht dennoch nicht aus, um die Peripherie ausreichend zu versorgen. Durch Ausbildung der kollateralen Anastomosen kann dies, wie unten beschrieben, nach einigen Tagen kompensiert werden.

Abgesehen vom motorischen Defizit zeigen die Tiere nach dem Erwachen keine Anzeichen von Schmerzen oder Änderungen im Nahrungs- und Sozialverhalten. Trotz der anfänglichen distalen Ischämie kam es während des gesamten Beobachtungszeitraumes nicht zur Bildung von Nekrosen oder Auto-Amputationen der Extremitäten, da Arteriogenese bereits direkt nach Gefäßverschluss beginnt, was molekular nachgewiesen wurde. Morphologisch ist das Kollateralwachstum schon nach wenigen Tagen nachweisbar (Hillmeister et al., 2008) und kann somit die distale Blutzufuhr recht schnell wieder gewährleisten. In eigenen früheren Studien wurde bereits mittels hochauflösenden postmortalen Angiographien durch Mikro-Computer-Tomographie gezeigt, dass die Kollateralen im Bereich des Adduktorenmuskels schon nach sieben Tagen signifikant in ihrem Durchmesser vergrößert sind und eine deutliche

korkenzieherartige Form annehmen (Buschmann et al., 2010). Die Femoralarterienligatur nach Hoefler *et al.* ist somit hervorragend für die Untersuchung des peripheren Kollateralwachstums in der Maus geeignet.

5.1.1.2. CPI als peripherer Arteriogenese-Nachweis

Das im Femoralarterienokklusionsmodell zu beobachtende Remodeling von präexistenten Kollateralarterien in große kollaterale Konduktanzgefäße lässt sich durch die Bestimmung des kollateralen Perfusionsindex deutlich von der Angiogenese abgrenzen. Diese Methode wurde entwickelt, um das Kollateralwachstum nach Femoralisokklusion quantitativ bestimmen zu können. Da fluoreszierende Mikrosphären aufgrund ihrer Größe von 15 μm nach ihrer Passage von der Aorta ausgehend bereits in Arteriolen hängen bleiben, erreichen sie keine Kapillaren mit einer Größe von unter 7 μm . Die Passage dieser Mikrosphären in den distalen Oberschenkel benötigt Konduktanzgefäße, die größer als 30 μm sind.

Die im Unterschenkel okklusionsbedingte hypoxische Ischämie, welche die Aussprossungen neuer Kapillaren induziert, wird durch die Mikrosphärenperfusion nicht erfasst. Vielmehr sammeln sich Mikrosphären aufgrund der aktiven Diameterzunahmen der Kollateralgefäße vermehrt in diesen an, sowie in den ihnen nachgeschalteten Arteriolen. Somit ist die Mikrosphärenperfusion ein eindeutiger Nachweis der Arteriogenese.

Da die Arteriolen direkt nach Ligatur weniger durchflutet werden als nach aktiver Diameterzunahme, lässt sich hierdurch eine Verbesserung der Perfusionsrate nachweisen. Ausgehend von der Perfusionsrate im nicht-ligierten Bein, welche auf 100% gesetzt wird, kann über die Perfusionsrate auf der ligierten Seite eine Aussage über das Maß der Kollateralisierung getroffen werden. Bei Tieren ohne Ligatur ist der kollaterale Perfusionsindex 100%. Die erhöhte Schubspannung in den Anastomosen induziert das arteriogene Wachstum und ermöglicht somit eine Verbesserung der Blut- und entsprechend auch der Mikrosphärenperfusion um etwa 60%. Die Mikrosphärenperfusion über einen Aortenkatheter nach FAO ist somit eine geeignete funktionale Methode, um die Blutperfusion, welche unabhängig von kapillarer Aussprossung nur durch Kollateralwachstum verbessert wird, zu untersuchen (Hershey et al., 2001; Hoefler et al., 2002).

5.1.2. Induktion zerebraler Arteriogenese nach 3-VO

5.1.2.1. Zerebrale Hypoperfusion durch 3-VO

Wie in Kapitel 3.2 ausführlich dargelegt, konnte in der Sprague Dawley-Ratte durch den Verschluss der beiden Arteriae vertebrales (VA) und der linken Arteria carotis communis eine dauerhafte Hypoperfusion des Gehirns gewährleistet werden. Es kommt zu Blutflussänderungen im Circulus Willisii, die den Umbau bestimmter Arterien, besonders der Arteriae cerebri posteriores, induzieren. Im Gegensatz dazu kommt es beim alleinigen (CCAO) sowie beim bilateralen Verschluss der Arteriae carotides communes (*Bilateral Common Carotid Artery Occlusion, BCCAO*) zwar auch zum Abfall des Blutflusses, dieser steigt jedoch durch kompensatorische Vasodilatation innerhalb weniger Minuten wieder an. Es kann daher in der Sprague Dawley-Ratte weder mit der CCAO noch mit der BCCAO das Wachstum der zerebralen Kollateralgefäße sicher induziert werden (Schneeloch et al., 2004).

Bei der durch den Drei-Gefäß-Verschluss hervorgerufenen Hypoperfusion des Gehirns kommt es zu keinen histologisch nachweisbaren Gewebeschäden, wie durch Busch *et al.* und Schneeloch *et al.* bereits gezeigt werden konnte (Busch et al., 2003; Schneeloch et al., 2004). Es entsteht also keine Hypoxie, die den Untergang von Nervenzellen zur Folge hätte, wie es bei einem Schlaganfall der Fall wäre. Daher kann man bei den Tieren auch keine neurologischen Ausfallserscheinungen (Ataxie, Kreisbewegungen) beobachten, was mit der vorliegenden Studie bestätigt wurde.

Das Drei-Gefäß-Verschluss-Modell ist somit geeignet, den Zustand vor einem Schlaganfall zu simulieren und, wie nachfolgend diskutiert, die Arteriogenese im Gehirn der Ratte zu induzieren.

5.1.2.2. CVRC als zerebraler Arteriogenese-Nachweis

Analog zu dem auch beim Menschen durchgeführten ACZ-Test wurde die Messung der zerebrovaskulären Reservekapazität durchgeführt (Stoll and Hamann, 2002).

Busch *et al.* verwendeten anders als in der vorliegenden Studie eine Beatmung mit CO₂, um eine zerebrale Vasodilatation herbeizuführen (Busch et al., 2003). Sie führten die Intubation

invasiv durch Öffnung der Trachea durch, wobei es jedoch zu Schwankungen des arteriellen Blutdrucks kommen kann. Es können dadurch Ungenauigkeiten in der Messung des zerebralen Blutflusses entstehen, zumal der CBF unmittelbar vom arteriellen Blutdruck abhängig ist. Deshalb wurde die CVR-Messung in dieser Studie modifiziert durchgeführt.

Die venöse Applikation von ACZ führt zu einem Anstieg des $p\text{CO}_2$ und einem Abfall des Blut-pH-Wertes. Dies hat eine Vasodilatation der zerebralen Gefäße und somit den Anstieg des CBFs zur Folge (Demolis et al., 2000). Ein Ausbleiben des CBF-Anstiegs deutet auf eine Perfusionsstörung hin.

Da direkt nach 3-VO die übrigen arteriellen Gefäße bereits zur Kompensation dilatiert sind, ist eine weitere Gefäßweitstellung durch ACZ nicht möglich, d.h. die Perfusionsreserve ist aufgehoben. Ausgehend davon, dass die Blutflussänderungen im Circulus Willisii eine erhöhte Schubspannung bewirken und dadurch Kollateralwachstum induzieren, ist nach aktiver Diameterzunahme wieder eine zusätzliche passive Vasodilatation möglich, d.h. die Perfusionsrate verbessert sich. Somit ist die CVR eine geeignete Methode zum funktionellen Nachweis zerebraler Arteriogenese.

Bei den Sham-Gruppen, die in der Regel keine Unterschiede zu den nichtoperierten Tieren aufweisen sollten, fällt auf, dass die Reservekapazität nach einer bzw. drei Wochen deutlich, jedoch nicht signifikant kleiner ist. Ausgehend von den bisherigen Daten, könnte die Ursache darin bestehen, dass die CVR eine sehr sensitive Methode ist. Die Sham-Tiere weisen unabhängig vom Behandlungsschema gegenüber den jeweiligen 3-VO-Gruppen eine relativ große Standardabweichung auf. Erfahrungsgemäß bildet aber letztlich der Gruppenmittelwert eine bestimmte Tendenz, die innerhalb verschiedener Gruppen verglichen werden kann. Die Tendenz bei 3-VO-Tieren besteht darin, dass die CVRC direkt nach 3-VO vollständig aufgehoben ist und damit gegenüber unbehandelten und Sham-operierten Tieren signifikant kleiner ist. Während die CVRC in den nächsten Tagen bei 3-VO-Tieren durch das Kollateralwachstum tendenziell wieder zunimmt, wird der Unterschied zu den jeweiligen Sham-Tieren entsprechend kleiner. Während die Unterschiede in 3-VO-Tieren, der genannten Tendenz folgen, scheinen die Unterschiede in den Sham-Gruppen von der biologischen Variabilität der Tiere verursacht zu sein (Busch et al., 2003; Dülsner, 2009; Hillmeister et al., 2008).

Zusammenfassend ist jedoch zu sagen, dass die CVR, die klinisch als „ACZ-Test“ bezeichnet wird, als funktionelle Nachweismethode für zerebrales Kollateralwachstum hervorragend geeignet ist.

5.1.2.3. Bestimmung der Gefäßdiameter mittels Latexangiographie

Zur Bestätigung der Hypothese, dass die funktionellen Änderungen, d.h. die Verbesserung der Perfusionsreserve, auf morphologische Änderungen, also dem aktiven Umbau der arteriellen Gefäßwand, zurückzuführen sind, wurde hier die Latexangiographie herangezogen.

Um die Diameter der Gefäße mittels Latexangiographie bestimmen zu können, ist es wichtig, die Arterien vor der Latexperfusion maximal zu dilatieren, da jedes Gefäß zu jedem Zeitpunkt gegenüber anderen Gefäßen einen anderen Kontraktionszustand aufweist. Durch die maximale Vasodilatation ist diese Fehlerquelle aufgehoben und dies gewährleistet eine Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen. Sie wurde hier durch intraarterielle Papaverin-Injektion erreicht. Danach müssen die Gefäße des Gehirns ausreichend mit heparinisierte Kochsalzlösung gespült werden, um die Blutgerinnung in den Arterien zu vermeiden. Um eine eventuelle Erhöhung des Gefäßwiderstandes mit kompensatorischer Vasokonstriktion zu verhindern, muss die Perfusion mit 37 °C warmer, gefärbter Latexmilch bei einem kontinuierlichen Druck, welcher den arteriellen Blutdruck nicht übersteigt, perfundiert werden.

Weiterhin ist darauf zu achten, dass ein ausreichend venöser und arterieller Abfluss gewährleistet wird, in dem sowohl die ligierte Arteria carotis communis als auch das rechte Herzohr eröffnet werden. Würde dies nicht Beachtung finden, wäre kein Durchfluss gewährleistet und die Gefäße würden nur „aufgepumpt“.

Bei allen Injektionen und Perfusionen ist es wichtig, dass die jeweiligen Lösungen immer der Körpertemperatur entsprechen. Lösungen mit sowohl niedrigerer oder höherer Temperatur würden wiederum die maximale Gefäßweitstellung negativ beeinflussen.

Die vorliegenden Daten, in denen für die PCA eine signifikante Vergrößerung im Durchmesser um 44% (ipsilateral) bzw. 29% (kontralateral) nach einer Woche und um 68% (ipsilateral) und 60% nach drei Wochen gegenüber nichtoperierten Tieren gefunden wurde,

bestätigen zum einen bisher publizierte Daten (Busch et al., 2003; Dülsner, 2009; Hillmeister et al., 2008) im 3-VO-Modell und zeigen zum anderen wiederholt, dass dieses Modell Kollateralwachstum induziert.

5.2. Auslegung und Bewertung der ermittelten Ergebnisse

5.2.1. 3-VO erzeugt adaptive Arteriogenese

Der Verschluss der beiden VA und einer Arteria carotis communis hat in der durchgeführten Studie zum Kollateralwachstum von Gefäßen des Circulus Willisii geführt.

Hierbei sind sieben Tage nach 3-VO-Operationen signifikante Vergrößerungen im Vergleich zu nichtoperierten Tieren an beiden PCAs zu erkennen. Dabei ist ein deutlicheres Wachstum an der ipsilateralen PCA zu erkennen.

Zwei Wochen darauf haben die Diameter beider PCA noch einmal signifikant an Größe zugenommen. Zusätzlich verändern sich die Durchmesser in allen weiteren Gefäßen des Circulus Willisii auf der ipsilateralen Seite sowie die kontralaterale MCA durch signifikante Größenzunahme.

Es lässt sich aus diesen Ergebnissen schlussfolgern, dass das Kollateralwachstum nach dem Dreigefäßverschluss, verursacht durch Blutflussveränderungen im Circulus Willisii, in einer bestimmten Reihenfolge abläuft. Beginnend in der ipsilateralen PCA, gefolgt von der kontralateralen PCA, vergrößern sich im weiteren Verlauf von zwei Wochen die ipsilateralen Gefäße des gesamten Circulus Willisii sowie die kontralaterale MCA. Alle anderen Gefäße zeigen keine deutliche Änderung ihrer Diameter. Bedingt dadurch, dass das Blut nur noch über die kontralaterale ICA zum Circulus Willisii gelangt, ändert sich die Durchblutung in diesem System derart, dass vor allem in den okkludierten Bereichen Gefäße zum erhöhten Bluttransport und somit zur Aufrechterhaltung der Blutversorgung der nachgeschalteten Gebiete gefordert werden. Es verwundert also nicht, dass besonders die ipsilateralen Gefäße auf der okkludierten Seite, verstärkt dem Kollateralwachstum unterliegen. Anhand der Sham-Tiere kann belegt werden, bei denen keinerlei Gefäßwachstum festgestellt wurde, dass dies tatsächlich als ein Effekt der 3-VO ist. Die Ergebnisse sind daher direkt mit denen bisheriger Projekte unserer Arbeitsgruppe vergleichbar (Dülsner, 2009; Glaser, 2009).

Alle Studien zur 3-VO-Operation zeigen eine signifikante Vergrößerung der ipsilateralen PCA nach sieben Tagen, was mit der bereits beschriebenen Perfusionsänderung im Circulus Willisii zusammenhängt. Man kann deshalb davon ausgehen, dass hauptsächlich das Wachstum der ipsilateralen PCA zu einer Wiederherstellung der funktionellen zerebralen Blutversorgung führt, was mit Hilfe der Messung der zerebrovaskulären Reservekapazität bestimmt wurde. Direkt nach 3-VO kann keine CVRC gemessen werden, da alle zerebralen Gefäße dilatiert sind, um die Hypoperfusion auszugleichen. Liegt der CBF unterhalb der 100%-Grenze, ist dafür das sogenannte Steal-Phänomen verantwortlich. Hier kommt es auf Grund einer Blutumverteilung im Bereich der okkludierten Gefäße zum retrograden Abzug des Blutes in die Bereiche maximaler Vasodilatation (Kuwabara et al., 1995). Dies führt dazu, dass während der CVR ein gegenüber dem Ausgangswert von 100% fälschlicherweise verringerter Blutfluss gemessen wird.

Innerhalb einer Woche liegt die gemessene Reservekapazität wieder im positiven Bereich und erreicht nach drei Wochen eine 50%-ige Wiederherstellung des Ausgangswertes. Diese Verbesserung bedeutet, dass die Gefäße neben der Aufrechterhaltung der Blutversorgung nun wieder in der Lage sind, durch zusätzliche Dilatation den CBF zu erhöhen.

Es lässt sich somit zusammenfassend feststellen, dass die Verbesserung der zerebralen Reservekapazität mit einer aktiven Proliferation der Gefäßdurchmesser korreliert.

5.2.2. Periphere Arteriogenese nach BR-Inhibition

Die periphere Arteriogenese kann durch Behandlung mit den selektiven Antagonisten der BR1 (R715) und BR2 (Icatibant) signifikant gehemmt werden. Dies zeigt sich im FAO-Modell der Maus in einem deutlich reduzierten Perfusionsindex im Vergleich zum Kontrolltier.

Die ermittelten Daten der Rezeptor-Inhibition im Arteria-Femoralis-Okklusionsmodell in der Maus deuten darauf hin, dass der B1-Rezeptor der relevantere bei der Beeinflussung der Arteriogenese ist. Dies konnte auch schon durch Daten von Hillmeister in BR1-, BR2-KO und BR1BR2-Doppel-KO-Mäusen gezeigt werden (Hillmeister, 2010).

Unabhängig von der Arteriogenese wird der BR1 auch im Entzündungsgeschehen die überlegene Bedeutung zugesprochen, denn erst unter inflammatorischen Bedingungen, induziert der durch Bradykinin stimulierte konstitutiv vorhandene BR2 die Expression des BR1 (Couture et al., 2001; Regoli et al., 1981).

Betrachtet man verschiedene Mechanismen der Arteriogenese genauer, wird deutlich, dass in wachsenden Kollateralarterien viele wichtige Entzündungsmediatoren und –vorgänge wie die Freisetzung von Zytokinen und Gewebeumbauprozesse eine große Rolle spielen (Schaper and Buschmann, 1999). Es werden verschiedene Gene, welche in das Entzündungsgeschehen involviert sind, unter anderem Kininogen, in der frühen Phase der zerebralen Arteriogenese hochreguliert (Hillmeister et al., 2008; Lee et al., 2004). So wird auch NF- κ B, einer der wichtigsten spezifischen Transkriptionsfaktoren im Entzündungsgeschehen, bei erhöhter Schubspannung aktiviert (Tzima et al., 2005). Interessanterweise induziert die NF- κ B-Aktivierung die BR1-Expression und scheint beteiligt zu sein an der Vermittlung der Stimulation des BR1 bei Applikation verschiedener selektiver Agonisten (Ghosh and Hayden, 2008). In verschiedenen Modellen wie nach Ligatur der Arteria femoralis in der Maus (Emanuelli et al., 2001) und nach dreistündiger Okklusion beider Arteriae carotides in der Ratte konnten ebenso stark erhöhte Bradykinin-Plasma- und Gewebekonzentrationen (Kamiya et al., 1993) und eine erhöhte BR1-Expression festgestellt werden.

Bestätigt anhand dieser Daten kann zusammenfassend festgestellt werden, dass durch eine erhöhte Schubspannung, die in den Kollateralen eines okkludierten Gefäßes vorherrscht, zunächst ein geeignetes inflammatorisches Milieu für Zellen erzeugt wird, welche den BR1 exprimieren, um dann durch erhöhte Bradykininkonzentrationen scheinbar vermehrt am BR1 seine Wirkung zu entfalten.

5.2.3. Zerebrale Arteriogenese nach BR-Inhibition

Bei der pharmakologischen Inhibition der zerebralen Arteriogenese im Drei-Gefäß-Verschluss-Modell sind signifikante Hemmungen des Kollateralwachstums bei der pharmakologischen Modulation des BR1 sowie des BR2 zu erkennen. Dies kann durch eine signifikante Verminderung der Diameter der ipsi- und kontralateralen PCA des Circulus Willisii 21 Tage nach 3-VO-Operation bei Behandlung mit dem BR1-Antagonisten H1960

(Bachem) gezeigt werden. Die Inhibition des BR2 zeigte signifikant kleinere Diameter nur auf der ipsilateralen Seite im Vergleich zu den Kontrollen, was den stärkeren Phänotyp des BR1 bestätigt.

Infolgedessen ergeben sich bei der Durchführung der CVR bei BR1- sowie BR2-Inhibition signifikante Einschränkungen der CVRC, die größere jedoch wiederum nach BR1-Inhibition.

Man findet den BR2 auf zahlreichen Zelltypen wie Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Leukozyten. Bei Stimulation kommt es in Endothelzellen über die Aktivierung der IP₃-Kaskade zu einer erhöhten intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, diese resultiert in der Aktivierung von eNOS und führt so zur Bildung von NO (Wachtfogel et al., 1993). Dadurch vermittelt der BR2 hauptsächlich die vasodilatatorischen Effekte am Gefäß (Bhoola et al., 1992; Madeddu et al., 2007). Durch BR2-Blockierung wird die Bildung von NO gehemmt.

Auch das Gefäßwachstum wird mit NO in Verbindung gebracht. Hierbei werden pro- sowie antiarteriogene Eigenschaften von NO beschrieben. Die Schubspannung, welche durch den Blutfluss am Endothel erzeugt wird, ist der wichtigste physiologische Stimulus für eine andauernde NO-Produktion. Diese Schubspannung induziert eine Phosphorylierung der endothelialen NO-Synthase in Endothelzellen und führt so zu einer erhöhten NO-Produktion (Dimmeler et al., 1999).

Man konnte zum einen eine Überexpression des Proteinniveaus von NO im Endothel wachsender Kollateralarterien nach chronischer Koronararterienokklusion zeigen (Cai and Scholz, 2004), andererseits wurde jedoch eine durch NO verringerte Proliferation und Migration von kultivierten Endothelzellen *in vitro* beschrieben (Dimmeler et al., 2000; Papapetropoulos et al., 1997). NO hemmt die Expression von MCP-1 (Tsao et al., 1997; Zeiher et al., 1995), VCAM-1 und ICAM-1 (Gauthier et al., 1995), welche wichtige Mediatorfunktionen bei der Arteriogenese übernehmen. Dabei wird die Adhäsion von Monozyten an das Endothel und die Migration durch die Gefäßwand gemindert. Weiterhin wirkt NO anti-mitogen und anti-proliferativ auf glatte Muskelzellen (Ignarro and Napoli, 2004; Jeremy et al., 1999), die Arteriogenese ist jedoch stark abhängig von der Proliferation von glatten Muskelzellen.

Noch widersprüchlicher erscheinen die Tatsachen, dass weder bei eNOS-KO-Mäusen eine Einschränkung der Arteriogenese noch bei eNOS-Überexpressionsmäusen eine Steigerung

des Kollateralarterienwachstums nach Femoralisligatur nachgewiesen wurde (Mees et al., 2007), wohingegen mittels NO-Synthase-Hemmer L-NAME (L-Nitro-Arginin-Methylester) durch Schubspannung induziertes kollaterales Wachstum gehemmt werden konnte (Eitenmuller et al., 2006).

Troidl *et al.* zeigten vor kurzem, dass die Arteriogenese deutlich durch die Abwesenheit bzw. Stimulation von NO beeinflusst wird (Troidl et al., 2010). Während eNOS allerdings keine und die induzierbare Form der NO-Synthase (iNOS) nur teilweise eine Hemmung der peripheren Arteriogenese aufzeigten, offenbarte die kombinierte Hemmung beider Isoformen mittels eNOS-KO-Mäusen behandelt mit einem iNOS-Inhibitor, eine komplette Einschränkung der Arteriogenese. Umgekehrt sind eNOS und iNOS in mittels Schubspannung stimulierten kollateralen Arterien hochreguliert, was wiederum die Hypothese bestätigt, dass NO das Kollateralwachstum beeinflusst. Weiterhin kann das kollaterale Wachstum über die Aktivierung perivaskulärer Monozyten mittels eines NO-Donors stimuliert werden. Troidl *et al.* schlussfolgerten daraufhin, dass durch Schubspannung zunächst eNOS aktiviert wird, wodurch es zur Bildung von NO kommt, welches dann iNOS adherierender Monozyten aktiviert, welche daraufhin wiederum die Hauptproduzenten für NO darstellen. Diese aktivierte NO-Kaskade führt letztlich aufgrund seiner proarteriogenen Eigenschaft zur Proliferation der glatten Muskelzellen der Media (Troidl et al., 2010).

Das wiederum heißt, dass die BR2-Blockade auch die nachgeschaltete Bildung von NO unterbindet. Es wurde die Hypothese abgeleitet, dass dies die Ursache für die in diesem Zusammenhang nachgewiesene Hemmung der Arteriogenese sein könnte.

Neben der Bildung von NO und dessen vasodilatorischem Effekt sowie der möglichen Stimulation der Arteriogenese aktiviert der BR2 im Entzündungsgeschehen die Expression des BR1. Es wurde gezeigt, dass beide Rezeptoren von der selben Zelle exprimiert werden (Bhoola et al., 1992). Der BR2 besitzt im Gegensatz zum BR1 eine schnelle Reversibilität, d.h. durch Bindung seines Agonisten kommt es zur Desensibilisierung und anschließend zur Internalisierung (Souza et al., 2004). Der BR1 hat bei mehrmaliger Applikation des Agonisten ein gleichbleibendes Aktivitätsschema und unterliegt keiner Desensibilisierung oder Internalisierung (Levesque et al., 1995; Regoli and Gobeil, 1995). Daher könnte es auch hier eine Rolle spielen, dass der BR1 eine viel längere Rezeptorantwort vermittelt, was sich bei

der pharmakologischen Inhibition auf die stärkere Ausprägung der durch BR1 vermittelten Effekte auswirkt.

5.2.4. Vasogenes Hirnödem und BR-Stimulation

Es ist bekannt, dass Bradykinin eines der wichtigsten Mediatoren im Rahmen der Entstehung und Aufrechterhaltung des vasogenen Hirnödems ist (Kamiya et al., 1993; Regoli and Barabe, 1980). Trotz der Präsenz beider BR im traumatisierten Gehirn, spielt der BR2 die Hauptrolle bei der Entwicklung des sekundären Hirnschadens. Dieser beruht hauptsächlich auf einer Schädigung der zerebralen Gefäße (Blut-Hirn-Schranke) durch Gewebeerletzung bei der Kontusion und bei persistierender Ischämie. Über die auf der abluminalen Membran der Endothelzellen lokalisierten B2-Rezeptoren bewirkt Bradykinin eine Dilatation der Arteriolen und Konstriktion der Venolen, was wiederum zu einer Erhöhung des Kapillardruckes und Steigerung der vaskulären Permeabilität führt. Dies unterstützt nach Entstehung eines Blut-Hirn-Schranken-Schadens die weitere Ausbreitung des perifokalen vasogenen Hirnödems (Bhoola et al., 1992). In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass die pharmakologische Blockade des BR2 mit hoch selektiven BR-Antagonisten die Ausbreitung des vasogenen bzw. zytotoxischen Hirnödems verhindert und somit nach fokaler zerebraler Ischämie das Infarktvolume reduziert (Klasner et al., 2006; Lumenta et al., 2006; Pruneau et al., 1999; Relton et al., 1997; Stover et al., 2000; Su et al., 2009). BR2-KO-Mäuse zeigen verminderte Schädigungen nach fokaler zerebraler Ischämie (Grogger et al., 2005; Hellal et al., 2003). Lehmborg *et al.* machten die Entdeckung, dass bei BR1-Antagonisierung nach zerebraler Ischämie keine Effekte auf die Vasoreagibilität erkennbar sind und dass sogar die Mortalität gesteigert wird (Lehmborg et al., 2003), was darauf hindeutet, dass die Aktivierung des BR1 bei der Entstehung des vasogenen Hirnödems keine Bedeutung zu haben scheint. Trotz einer vor Kurzem veröffentlichten Studie, in der behauptet wurde (Austinat et al., 2009), dass das exakte Gegenteil der Fall wäre, gibt es eine allgemeine Übereinstimmung, dass BR2 Gehirnschädigungen vermittelt, während BR1 dabei nur eine untergeordnete Rolle spielt (Trabold et al., 2010). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die BR2-Stimulation schon wegen der nachweislich ödemfördernden Effekte als klinisch kontraindiziert betrachtet werden muss. Dagegen scheint die BR1-Stimulation, da sie keinen

Einfluss auf die Entstehung des vasogenen Hirnödems zu haben scheint, zur positiven Modulation der Arteriogenese angezeigt.

5.2.5. Zerebrale Arteriogenese nach BR1-Stimulation

Aufgrund der geschilderten Kontraindikation einer BR2-Agonisierung wurde im Stimulationsteil ausschließlich die Untersuchung des BR1 durchgeführt. Die vorliegenden Daten sollen zum einen für die Grundlagenforschung demonstrieren, dass die Hemmung von BR1 und BR2 die Arteriogenese inhibiert, d.h. ein Einfluss beider Rezeptoren auf das Kollateralwachstum nachgewiesen werden konnte. Auf der anderen Seite soll mit Hilfe der Induktion der Arteriogenese über BR-Stimulation ein möglicher neuer therapeutischer Ansatz für die Klinik präsentiert werden. Anhand des zerebralen 3-VO-Modells ist die Stimulation der Arteriogenese deutlich zu erkennen, da die Diameter der ipsi- bzw. kontralateralen PCA bereits nach sieben Tagen nach 3-VO-Operation signifikant größer sind als die bei Kontrolltieren. Ebenso konnte die zerebrovaskuläre Reservekapazität durch Verabreichung des BR1-Agonisten R916 signifikant verbessert werden. Dementsprechend sollte in Betracht gezogen werden, dass eine Stimulation des BR1 wegen seiner proarteriogenen Effekte als mögliches neues Therapieprinzip in dieser Indikation zur Verhinderung zerebrovaskulärer Ereignisse geeignet wäre, vor allem, da diese Stimulation nicht zur Entstehung des vasogenen Hirnödems beizutragen scheint.

5.2.6. Bedeutung der Ergebnisse des Monozytenmigrationsassays

Um zu zeigen, dass die in dieser Studie gefundenen proarteriogenen Effekte mit der Förderung der Monozytenfunktion in Zusammenhang stehen, wurde ein Monozyten-Migrationsassay durchgeführt.

MCP-1 wurde als Positivkontrolle gewählt, da es aufgrund seiner chemotaktischen Wirkung auf Monozyten in der Arteriogenese als der potenteste Stimulator angesehen wird (Ito et al., 1997a; Schirmer et al., 2004; van Royen et al., 2003b). Auch hier zeigt sich die Migration auf MCP-1 mehr als doppelt so stark. Bei Vorstimulation der verwendeten humanen THP-1 Zellen mit IL-1, welches den endogenen Trigger für die Induktion von BR1 darstellt (deBlois

et al., 1991), zeigten sowohl MCP-1 sowie der BR1-Agonist (R916) eine signifikant erhöhte Migration. Bei zusätzlicher Vorbehandlung mit dem BR1-Antagonisten R715 wurde diese allerdings wieder aufgehoben. MCP-1 wird von Endothelzellen aktivierter kollateraler Arteriolen produziert und freigesetzt. Es bindet an CCR-2 Rezeptoren, welche ausschließlich von Monozyten und Makrophagen an der Zelloberfläche exprimiert werden und somit für die Chemotaxis verantwortlich sind. In CCR-2-Knockout-Mäusen zeigt sich eine hochgradig reduzierte Wiederherstellung der Perfusion nach FAO, was einen starken Indikator für das reduzierte kollaterale Wachstum darstellt (Heil et al., 2004). Wie der CCR-2 ist auch der Bradykininrezeptor ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor und induziert die gleiche Signalkaskade. Daher aktivieren beide Rezeptoren (CCR-2 und BR) zahlreich übereinstimmende intrazelluläre Signalwege, welche zur Aktivierung spezifischer Zellen und einer entsprechenden Migrationsroute führen (Schaper and Schaper, 2004b).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass anhand der Daten gezeigt werden konnte, dass sowohl die periphere als auch die zerebrale Arteriogenese durch Bradykinin über den Mechanismus der Monozytenmigration reguliert wird. Es wurde erstmals die pharmakologische Inhibition sowie Stimulation des Kollateralwachstums über die Bradykininrezeptoren nachgewiesen. Dabei zeigte sich, dass insbesondere der BR1 bei der peripheren sowie zerebralen Arteriogenese eine entscheidende Funktion spielt, was vermutlich auf die stärkere inflammatorische Komponente von BR1 zurückzuführen ist.

5.3. Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen

Progressive Stenosen in den hirnzuführenden Arterien, insbesondere Stenosen der Arteria carotis, sind meist atherosklerotischer Natur und führen zu steigender zerebraler Hypoperfusion. Reicht die Blutversorgung einmal nicht aus, könnte ein Schlaganfall ausgelöst werden. Dagegen könnte die Ausbildung von kollateralen Anastomosen zu funktionellen Konduktanzgefäßen solch einen Schlaganfall verhindern. Genau diese Situation wird im Drei-Gefäßverschlussmodell simuliert. Durch den Verschluss von drei der vier hirnversorgenden Gefäße wird eine nichtfatale zerebrale Hypoperfusion erzeugt. Allerdings erleiden die Tiere weder akut noch nach mehreren Wochen einen Schlaganfall. Im Gegenteil, das Kollateralwachstum im Circulus Willisi kompensiert die Störung der Blutversorgung, sodass diese zunehmend aufgehoben werden kann. Daher ist dieses Modell außerordentlich geeignet,

um den Zustand in Patienten mit zerebraler Hypoperfusion oder progressiver Stenosen zu simulieren.

5.4. Konsequenzen für die Therapie bei arteriellen Verschlusskrankheiten

Anhand dieser Dissertation wurde erstmals gezeigt, dass Bradykinin die periphere und die zerebrale Arteriogenese positiv reguliert.

Unter dem Aspekt, dass die pharmakologische Stimulation des BR1 das zerebrale Kollateralwachstum stimuliert, werden somit neue Therapieansätze zur präventiven Behandlung des Schlaganfalls geboten. Dies gilt am ehesten für die pharmakologische Therapie vor persistierenden ischämischen Zuständen, da die Effekte von Bradykinin nach dem Schlaganfall, vermittelt über den BR2, zur weiteren Ausbreitung des vasogenen Hirnödems führen. Auch wenn es sich hierbei ausschließlich um postischämische Zustände handelt, liegt es auf der Hand, dass Patienten infolge hämodynamischer Perfusionsminderungen aufgrund intra- oder extrakranieller Gefäßokklusionen, einem erhöhten Schlaganfallrisiko unterliegen (Marzewski et al., 1982). Die pharmakologische Stimulation des BR2 in Bezug auf seine klinische Relevanz ist deshalb als sehr kritisch zu betrachten, auch wenn in dieser Studie gezeigt werden konnte, dass das Kollateralwachstum ebenfalls durch selektive Inhibition des BR2 gehemmt werden kann und es sich dementsprechend wahrscheinlich auch durch den BR2-Agonisten stimulieren lässt.

Daher wurde jedoch in dieser Studie nur die Stimulation mit dem BR1-Agonisten gewählt. Die vorliegenden Daten offenbaren einen deutlich positiven Einfluss von Bradykinin, insbesondere über seinen BR1, auf die zerebrale Arteriogenese. Für die Klinik bedeutet dies, dass therapeutisch appliziertes Bradykinin durch Stimulation des zerebralen Kollateralwachstums einen vielversprechenden Ansatz bieten könnte, bei Patienten mit zerebrovaskulären Gefäßerkrankungen im Falle eines zerebralen Ereignisses, Folgeschäden zu reduzieren.

Zudem wurde auch eindeutig belegt, dass sich die periphere Arteriogenese über beide Bradykinin-Rezeptoren stimulieren lässt. Wie auch im Gehirn zeigt dabei der BR1 die stärkere Wirkung. Somit bietet auch deren Stimulation die Möglichkeit, in Patienten mit

peripherer arterieller Verschlusskrankheit das Remodeling präexistenter Kollateralen zu fördern und damit das Krankheitsbild abzumildern. Allerdings muss bedacht werden, dass Patienten mit PAVK atherosklerotischer Herkunft auch Gefäßschädigungen im Gehirn aufweisen können. Eine Behandlung der PAVK mit einem BR2-Agonisten könnte deshalb auch zum vasogenen Hirnödem führen, weshalb der generelle Einsatz von BR2-Agonisten in Patienten mit vaskulären Gefäßverschlusskrankheiten immer kritisch betrachtet werden muss, während der Einsatz von BR1-Agonisten als möglich erscheint.

Schlussfolgernd kann aufgeführt werden, dass beide Bradykinin-Rezeptoren bei Stimulation sowohl die periphere als auch die zerebrale Arteriogenese beschleunigen und somit von wichtiger Bedeutung für neue klinische Therapiestrategien bei zerebralen Ereignissen und PAVK sind. Daher kann anhand der vorliegenden Daten empfohlen werden, weitere präklinische Studien zu initiieren, um letztendlich auch im Menschen die proarteriogenen Effekte von Bradykinin nachzuweisen zu können. Aufgrund der negativen Wirkungen einer BR2-Stimulation auf das vasogene Hirnödem sollte jedoch der Vorzug auf der Stimulation von BR1 liegen.

6. Zusammenfassung

Auswirkungen der pharmakologischen Beeinflussung der Bradykininrezeptoren auf die Arteriogenese im Tiermodell

Hintergrund – In dieser Studie wurde der Einfluss der Bradykininrezeptoren auf die Arteriogenese untersucht, um neue Therapiestrategien in Patienten mit Gefäßverschlusskrankheiten entwickeln zu können.

Methoden – Im ersten Teil dieser Studie wurden C57/Bl6-Mäuse für sieben Tage nach Femoralarterienokklusion (FAO) und Sprague Dawley (SD)-Ratten für 21 Tage nach bilateralem Verschluss der Arteriae cerebrales und anschließender Ligatur der Arteria carotis communis (3-VO) mit Antagonisten der Bradykinin-Rezeptoren (BR) 1 (Bachem H1960) und 2 (Icatibant) behandelt. Im zweiten Teil erfolgte dagegen in Ratten für sieben Tage nach 3-VO die Behandlung mit einem BR1-Agonisten (Tocris R916). Die Validierung der Bradykinin-Effekte erfolgte anhand funktioneller Parameter wie der Bestimmung der zerebrovaskulären Reservekapazität (CVRC) nach 3-VO und des kollateralen Perfusionsindex (CPI) nach FAO sowie anhand morphologischer Parameter wie der angiographischen Darstellung und Bestimmung der Gefäßdurchmesser der Arteria cerebri posterior (PCA) nach 3-VO. Die Wirkung von Bradykinin auf die Monozytenfunktion wurde mittels Migration humaner THP-1-Zellen bestimmt.

Ergebnisse – Der Kollaterale Perfuisionsindex (CPI) ist nach sieben Tagen nach FAO bei Antagonisierung von BR1 ($41 \pm 10\%$) und BR2 ($46 \pm 15\%$) gegenüber Kontrollen signifikant geringer. Die CVRC (BR1i: $-4 \pm 8\%$; BR2i: $0 \pm 12\%$) und die PCA-Durchmesser (BR1i: ipsi: $194 \pm 12 \mu\text{m}$, kontra: $203 \pm 24 \mu\text{m}$; BR2i: ipsi: $209 \pm 25 \mu\text{m}$, PCA kontra: $215 \pm 30 \mu\text{m}$) 21 Tage nach 3-VO bestätigen diese Daten. Dagegen zeigt die BR1-Stimulation signifikante proarteriogene Effekte (CVRC: $13 \pm 14\%$, PCA ipsi: $253 \pm 33\%$, PCA kontra: $225 \pm 18\%$). *In vivo* zeigen Monozyten eine gehemmte bzw. gesteigerte Migration auf Bradykininantagonisten sowie -agonisten.

Schlussfolgerung – Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass Bradykinin während des Kollateralwachstums eine entscheidende Rolle spielt. Therapeutisch scheint der Vorteil bei der BR1-Stimulation zu liegen, da diese zum einen den biologischen Bypass stimuliert und zum anderen keinen Einfluss auf die Ausbreitung des vasogenen Hirnödems hat.

7. Summary

Effects of the pharmacological influence of bradykinin receptors on arteriogenesis in animal models

Background – With this study, effects of pharmacologic influences of bradykinin receptors on arteriogenesis were investigated in order to be able to develop new therapies for patients with arterial occlusive diseases.

Methods – In the first part of the study, femoral artery occlusion (FAO) was performed in C57Bl/6 mice. In addition, Sprague Dawley (SD) rats underwent a bilateral occlusion of the Arteriae cerebrales and a ligation of the Arteria carotis communis (3-VO). The mice were treated with a bradykinin receptor (BR) 1 (Bachem H1960) or BR2 antagonist (Icatibant) for seven days, whereas rats were treated likewise for 21 days. The second part of the study involved a treatment with a BR1 agonist (Tocris R916) for seven days after 3-VO in rats.

The validation of bradykinin's effects were ensued with the help of functional parameters like cerebrovascular reserve capacity (CVRC) after 3-VO and the collateral perfusion index (CPI) after FAO. Angiography and the measurement of diameters of the Arteria cerebri posterior (PCA) after 3-VO were used as morphological parameter. The induced effects of bradykinin on the function of monocytes was assessed through migration of human THP-1 cells.

Results – 7 days after FAO the collateral perfusion index (CPI) showed significant restrictions with BR1 ($41 \pm 10\%$) and BR2 ($46 \pm 15\%$) antagonization in contrast to control groups. The measurement of the CVRC (BR1i: $-4 \pm 8\%$; BR2i: $0 \pm 12\%$) and PCA diameters (BR1i: ipsi: $194 \pm 12 \mu\text{m}$, kontra: $203 \pm 24 \mu\text{m}$; BR2i: ipsi: $209 \pm 25 \mu\text{m}$, PCA kontra: $215 \pm 30 \mu\text{m}$) 21 days post-3-VO confirms this data. On the other hand the BR1-stimulation showed significant proarteriogenic effects (CVRC: $13 \pm 14\%$, PCA ipsi: $253 \pm 33 \mu\text{m}$, PCA kontra: $225 \pm 18 \mu\text{m}$). The analysis of monocyte migration confirms the anti- and pro-arteriogenic in vivo data.

Conclusion – The presented study revealed that bradykinin plays a crucial role in collateral growth. Therapeutically, stimulation of BR1 has an obvious benefit. On the one hand, it induces the biological bypass. On the other hand, it does not influence vasogenic cerebral edema.

8. Zitierte Literatur

- Amano K., Matsubara H., Iba O., Okigaki M., Fujiyama S., Imada T., Kojima H., Nozawa Y., Kawashima S., Yokoyama M., Iwasaka T. (2003) Enhancement of ischemia-induced angiogenesis by eNOS overexpression. *Hypertension* 41:156-62.
- Arras M., Ito W.D., Scholz D., Winkler B., Schaper J., Schaper W. (1998) Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest* 101:40-50.
- Austinat M., Braeuning S., Pesquero J.B., Brede M., Bader M., Stoll G., Renne T., Kleinschnitz C. (2009) Blockade of bradykinin receptor B1 but not bradykinin receptor B2 provides protection from cerebral infarction and brain edema. *Stroke* 40:285-93. DOI: STROKEAHA.108.526673 [pii]10.1161/STROKEAHA.108.526673.
- Bergmann C.E., Hoefler I.E., Meder B., Roth H., van Royen N., Breit S.M., Jost M.M., Aharinejad S., Hartmann S., Buschmann I.R. (2006) Arteriogenesis depends on circulating monocytes and macrophage accumulation and is severely depressed in op/op mice. *J Leukoc Biol* 80:59-65. DOI: jlb.0206087 [pii]10.1189/jlb.0206087.
- Bhoola K.D., Figueroa C.D., Worthy K. (1992) Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* 44:1-80.
- Boissonnas R.A., Guttmann S., Jaquenoud P.A., Konzett H., Stuermer E. (1960) Synthesis and biological activity of peptides related to bradykinin. *Experientia* 16:326.
- Bondke A., Buschmann I.R., Bode C., Buschmann E.E. (2007) [Inducing collaterals in due time. Arteriogenesis as a preventive principle]. *Hamostaseologie* 27:363-72. DOI: 07050363 [pii].
- Burgess G.M., Perkins M.N., Rang H.P., Campbell E.A., Brown M.C., McIntyre P., Urban L., Dziadulewicz E.K., Ritchie T.J., Hallett A., Snell C.R., Wrigglesworth R., Lee W., Davis C., Phagoo S.B., Davis A.J., Phillips E., Drake G.S., Hughes G.A., Dunstan A., Bloomfield G.C. (2000) Bradyzide, a potent non-peptide B(2) bradykinin receptor antagonist with long-lasting oral activity in animal models of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 129:77-86. DOI: 10.1038/sj.bjp.0703012.
- Busch H.J., Buschmann I.R., Mies G., Bode C., Hossmann K.A. (2003) Arteriogenesis in hypoperfused rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:621-8.
- Buschmann I., Schaper W. (1999) Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth. *News Physiol Sci* 14:121-125.
- Buschmann I., Schaper W. (2000) The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis). *J Pathol* 190:338-42.
- Buschmann I., Pries A., Styp-Rekowska B., Hillmeister P., Loufrani L., Henrion D., Shi Y., Duelsner A., Hoefler I., Gatzke N., Wang H., Lehmann K., Ulm L., Ritter Z., Hauff P., Hlushchuk R., Djonov V., van Veen T., le Noble F. (2010) Pulsatile shear and Gja5 modulate arterial identity and remodeling events during flow-driven arteriogenesis. *Development* 137:2187-96. DOI: 137/13/2187 [pii]10.1242/dev.045351.
- Buschmann I.R., Busch H.J., Mies G., Hossmann K.A. (2003) Therapeutic induction of arteriogenesis in hypoperfused rat brain via granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Circulation* 108:610-5.
- Buschmann I.R., Hoefler I.E., van Royen N., Katzer E., Braun-Dulleaus R., Heil M., Kostin S., Bode C., Schaper W. (2001) GM-CSF: a strong arteriogenic factor acting by amplification of monocyte function. *Atherosclerosis* 159:343-56. DOI: S0021915001006372 [pii].
- Cai W., Scholz D. (2004) Structural remodeling during growth of collateral vessels, in: W. a. S. Schaper, J. (Ed.), *Arteriogenesis*, Kluwer Academic Publishers, Bad Nauheim.
- Cai W., Vosschulte R., Afsah-Hedjri A., Koltai S., Kocsis E., Scholz D., Kostin S., Schaper W., Schaper J. (2000) Altered balance between extracellular proteolysis and

- antiproteolysis is associated with adaptive coronary arteriogenesis. *J Mol Cell Cardiol* 32:997-1011. DOI: S0022282800911374 [pii].
- Cai W.J., Kocsis E., Luo X., Schaper W., Schaper J. (2004) Expression of endothelial nitric oxide synthase in the vascular wall during arteriogenesis. *Mol Cell Biochem* 264:193-200.
- Camargo A.C., Shapanka R., Greene L.J. (1973) Preparation, assay, and partial characterization of a neutral endopeptidase from rabbit brain. *Biochemistry* 12:1838-44.
- Clagett G.P., Sobel M., Jackson M.R., Lip G.Y., Tangelder M., Verhaeghe R. (2004) Antithrombotic therapy in peripheral arterial occlusive disease: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 126:609S-626S. DOI: 10.1378/chest.126.3_suppl.609S 126/3_suppl/609S [pii].
- Cochrane C.G., Revak S.D. (1980) Dissemination of contact activation in plasma by plasma kallikrein. *J Exp Med* 152:608-19.
- Couture R., Harrisson M., Vianna R.M., Cloutier F. (2001) Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* 429:161-76.
- Coyle P., Jokelainen P.T. (1982) Dorsal cerebral arterial collaterals of the rat. *Anat Rec* 203:397-404. DOI: 10.1002/ar.1092030309.
- Coyle P., Panzenbeck M.J. (1990) Collateral development after carotid artery occlusion in Fischer 344 rats. *Stroke* 21:316-21.
- Dahl A., Russell D., Rootwelt K., Nyberg-Hansen R., Kerty E. (1995) Cerebral vasoreactivity assessed with transcranial Doppler and regional cerebral blood flow measurements. Dose, serum concentration, and time course of the response to acetazolamide. *Stroke* 26:2302-6.
- De Backer T.L., Vander Stichele R., Leheret P., Van Bortel L. (2008) Naftidrofuryl for intermittent claudication. *Cochrane Database Syst Rev*:CD001368. DOI: 10.1002/14651858.CD001368.pub3.
- deBlois D., Bouthillier J., Marceau F. (1991) Pulse exposure to protein synthesis inhibitors enhances vascular responses to des-Arg⁹-bradykinin: possible role of interleukin-1. *Br J Pharmacol* 103:1057-66.
- Deindl E., Buschmann I., Hoefer I.E., Podzuweit T., Boengler K., Vogel S., van Royen N., Fernandez B., Schaper W. (2001) Role of ischemia and of hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit. *Circ Res* 89:779-86.
- Delenk G. (2006) Neurologie
- Demolis P., Florence G., Thomas L., Tran Dinh Y.R., Giudicelli J.F., Seylaz J., Alkayed N.J. (2000) Is the acetazolamide test valid for quantitative assessment of maximal cerebral autoregulatory vasodilation? An experimental study. *Stroke* 31:508-15.
- Diener H.C., Sacco R.L., Yusuf S., Cotton D., Ounpuu S., Lawton W.A., Palesch Y., Martin R.H., Albers G.W., Bath P., Bornstein N., Chan B.P., Chen S.T., Cunha L., Dahlof B., De Keyser J., Donnan G.A., Estol C., Gorelick P., Gu V., Hermansson K., Hilbrich L., Kaste M., Lu C., Machnig T., Pais P., Roberts R., Skvortsova V., Teal P., Toni D., VanderMaelen C., Voigt T., Weber M., Yoon B.W. (2008) Effects of aspirin plus extended-release dipyridamole versus clopidogrel and telmisartan on disability and cognitive function after recurrent stroke in patients with ischaemic stroke in the Prevention Regimen for Effectively Avoiding Second Strokes (PRoFESS) trial: a double-blind, active and placebo-controlled study. *Lancet Neurol* 7:875-84. DOI: S1474-4422(08)70198-4 [pii] 10.1016/S1474-4422(08)70198-4.

- Dimmeler S., Dernbach E., Zeiher A.M. (2000) Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Lett* 477:258-62. DOI: S0014-5793(00)01657-4 [pii].
- Dimmeler S., Fleming I., Fisslthaler B., Hermann C., Busse R., Zeiher A.M. (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399:601-5. DOI: 10.1038/21224.
- Donati G.S. (1961) Luigi PORTA and his contribution to vascular surgery. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 2:243-51.
- Dülsner A. (2009) Auswirkungen von Acetylsalicylsäure und Clopidogrel auf das Kollateralgefäßwachstum im zerebralen Arteriogenesemodell der Ratte, Center for Cardiovascular Research, Charité - Universitätsmedizin Berlin, FU Berlin, Berlin.
- Eckstein R.W., Liebow I.M., Wiggers C.J. (1946) Limb blood flow and vascular resistance changes in dogs during hemorrhagic hypotension and shock. *Am J Physiol* 147:685-94.
- Eitenmüller I., Volger O., Kluge A., Troidl K., Barancik M., Cai W.J., Heil M., Pipp F., Fischer S., Horrevoets A.J., Schmitz-Rixen T., Schaper W. (2006) The range of adaptation by collateral vessels after femoral artery occlusion. *Circ Res* 99:656-62.
- Elliott D.F., Horton E.W., Lewis G.P. (1961) The isolation of bradykinin, a plasma kinin from ox blood. *Biochem J* 78:60-5.
- Emanuelli C., Bonaria Salis M., Stacca T., Pintus G., Kirchmair R., Isner J.M., Pinna A., Gaspa L., Regoli D., Cayla C., Pesquero J.B., Bader M., Madeddu P. (2002) Targeting kinin B(1) receptor for therapeutic neovascularization. *Circulation* 105:360-6.
- Emanuelli C., Minasi A., Zacheo A., Chao J., Chao L., Salis M.B., Straino S., Tozzi M.G., Smith R., Gaspa L., Bianchini G., Stillo F., Capogrossi M.C., Madeddu P. (2001) Local delivery of human tissue kallikrein gene accelerates spontaneous angiogenesis in mouse model of hindlimb ischemia. *Circulation* 103:125-32.
- Fabricius M., Lauritzen M. (1996) Laser-Doppler evaluation of rat brain microcirculation: comparison with the [¹⁴C]-iodoantipyrine method suggests discordance during cerebral blood flow increases. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:156-61. DOI: 10.1097/00004647-199601000-00018.
- Farmer S.G., Burch R.M., Meeker S.A., Wilkins D.E. (1989) Evidence for a pulmonary B3 bradykinin receptor. *Mol Pharmacol* 36:1-8.
- Gaudreau P., Barabe J., St-Pierre S., Regoli D. (1981) Pharmacological studies of kinins in venous smooth muscles. *Can J Physiol Pharmacol* 59:371-9.
- Gauthier T.W., Scalia R., Murohara T., Guo J.P., Lefer A.M. (1995) Nitric oxide protects against leukocyte-endothelium interactions in the early stages of hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:1652-9.
- Geppetti P. (1993) Sensory neuropeptide release by bradykinin: mechanisms and pathophysiological implications. *Regul Pept* 47:1-23.
- Ghosh S., Hayden M.S. (2008) New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol* 8:837-48. DOI: nri2423 [pii] 10.1038/nri2423.
- Giles M.F., Rothwell P.M. (2006) Prediction and prevention of stroke after transient ischemic attack in the short and long term. *Expert Rev Neurother* 6:381-95. DOI: 10.1586/14737175.6.3.381.
- Glaser J. (2009) Einfluss des oralen Antidiabetikums Pioglitazon auf die Arteriogenese im Gehirn der Ratte, Center for Cardiovascular Research, Charité - Universitätsmedizin Berlin, FU Berlin, Berlin.

- Grau A.J., Weimar C., Buggle F., Heinrich A., Goertler M., Neumaier S., Glahn J., Brandt T., Hacke W., Diener H.C. (2001) Risk factors, outcome, and treatment in subtypes of ischemic stroke: the German stroke data bank. *Stroke* 32:2559-66.
- Groger M., Lebesgue D., Pruneau D., Relton J., Kim S.W., Nussberger J., Plesnila N. (2005) Release of bradykinin and expression of kinin B2 receptors in the brain: role for cell death and brain edema formation after focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:978-89. DOI: 9600096 [pii] 10.1038/sj.jcbfm.9600096.
- Grundmann S., Hoefler I., Ulusans S., Bode C., Oesterle S., Tijssen J.G., Piek J.J., Buschmann I., van Royen N. (2006) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates arteriogenesis in a pig model of peripheral artery disease using clinically applicable infusion pumps. *J Vasc Surg* 43:1263-9.
- Hankey G.J. (2011) Stroke: fresh insights into causes, prevention, and treatment. *Lancet Neurol* 10:2-3. DOI: S1474-4422(10)70279-9 [pii]10.1016/S1474-4422(10)70279-9.
- Hecht N.N. (2008) Entwicklung eines Modells zur chronisch zerebralen Ischämie bei der C57/BL6 Maus, Medizinische Fakultät Charité, Universitätsmedizin Berlin, FU Berlin, Berlin.
- Heil M., Deindl E. (2004) Monocytes and Cytokines, in: W. Schaper and J. Schaper (Eds.), Kluwer Academic Publishers Group, Bad Nauheim. pp. 131-57.
- Heil M., Clauss M., Suzuki K., Buschmann I.R., Willuweit A., Fischer S., Schaper W. (2000) Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates monocyte migration through endothelial monolayers via increased integrin expression. *Eur J Cell Biol* 79:850-7.
- Heil M., Ziegelhoeffer T., Wagner S., Fernandez B., Helisch A., Martin S., Tribulova S., Kuziel W.A., Bachmann G., Schaper W. (2004) Collateral artery growth (arteriogenesis) after experimental arterial occlusion is impaired in mice lacking CC-chemokine receptor-2. *Circ Res* 94:671-7. DOI: 10.1161/01.RES.0000122041.73808.B5 01.RES.0000122041.73808.B5 [pii].
- Hellal F., Pruneau D., Palmier B., Faye P., Croci N., Plotkine M., Marchand-Verrecchia C. (2003) Detrimental role of bradykinin B2 receptor in a murine model of diffuse brain injury. *J Neurotrauma* 20:841-51. DOI: 10.1089/089771503322385773.
- Hendrikse J., Hartkamp M.J., Hillen B., Mali W.P., van der Grond J. (2001) Collateral ability of the circle of Willis in patients with unilateral internal carotid artery occlusion: border zone infarcts and clinical symptoms. *Stroke* 32:2768-73.
- Hershey J.C., Baskin E.P., Glass J.D., Hartman H.A., Gilberto D.B., Rogers I.T., Cook J.J. (2001) Revascularization in the rabbit hindlimb: dissociation between capillary sprouting and arteriogenesis. *Cardiovasc Res* 49:618-25. DOI: S0008636300002327 [pii].
- Heubner O. (1872) Topographie der Ernährungsgebiete der einzelnen Hirnarterien, *Zentralbl. Med. Wiss.* pp. 817-821.
- Hillmeister P. (2010) Charakterisierung der frühen adaptiven zerebralen Arteriogenese - Direkter Nachweis der Bradykinin Rezeptor Signalwirkung auf die Arteriogenese, Center for Cardiovascular Research, Charité Campus Mitte, FU Berlin, Berlin.
- Hillmeister P., Lehmann K.E., Bondke A., Witt H., Duelsner A., Gruber C., Busch H.J., Jankowski J., Ruiz-Noppinger P., Hossmann K.A., Buschmann I.R. (2008) Induction of cerebral arteriogenesis leads to early-phase expression of protease inhibitors in growing collaterals of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:1811-23. DOI: jcbfm200869 [pii]10.1038/jcbfm.2008.69.

- Hoefler I.E., van Royen N., Buschmann I.R., Piek J.J., Schaper W. (2001) Time course of arteriogenesis following femoral artery occlusion in the rabbit. *Cardiovasc Res* 49:609-17. DOI: S0008636300002431 [pii].
- Hoefler I.E., Grundmann S., Schirmer S., van Royen N., Meder B., Bode C., Piek J.J., Buschmann I.R. (2005) Aspirin, but not clopidogrel, reduces collateral conductance in a rabbit model of femoral artery occlusion. *J Am Coll Cardiol* 46:994-1001.
- Hoefler I.E., van Royen N., Rectenwald J.E., Bray E.J., Abouhamze Z., Moldawer L.L., Voskuil M., Piek J.J., Buschmann I.R., Ozaki C.K. (2002) Direct evidence for tumor necrosis factor-alpha signaling in arteriogenesis. *Circulation* 105:1639-41.
- Hoefler I.E., van Royen N., Rectenwald J.E., Deindl E., Hua J., Jost M., Grundmann S., Voskuil M., Ozaki C.K., Piek J.J., Buschmann I.R. (2004) Arteriogenesis proceeds via ICAM-1/Mac-1-mediated mechanisms. *Circ Res* 94:1179-85. DOI: 10.1161/01.RES.0000126922.18222.F0 01.RES.0000126922.18222.F0 [pii].
- Hossmann K.A. (1993) Disturbances of cerebral protein synthesis and ischemic cell death. *Prog Brain Res* 96:161-77.
- Huppert P., Tacke J., Lawall H. (2010) [S3 guidelines for diagnostics and treatment of peripheral arterial occlusive disease]. *Radiologe* 50:7-15. DOI: 10.1007/s00117-009-1911-2.
- Ignarro L.J., Napoli C. (2004) Novel features of nitric oxide, endothelial nitric oxide synthase, and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 6:281-7.
- Ito W.D., Arras M., Winkler B., Scholz D., Schaper J., Schaper W. (1997a) Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ Res* 80:829-37.
- Ito W.D., Arras M., Scholz D., Winkler B., Htun P., Schaper W. (1997b) Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion. *Am J Physiol* 273:H1255-65.
- Jeremy J.Y., Rowe D., Emsley A.M., Newby A.C. (1999) Nitric oxide and the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 43:580-94. DOI: S0008-6363(99)00171-6 [pii].
- Kamiya T., Katayama Y., Kashiwagi F., Terashi A. (1993) The role of bradykinin in mediating ischemic brain edema in rats. *Stroke* 24:571-5; discussion 575-6.
- Kariya K., Kawauchi R., Okamoto H. (1981) Regional distribution of kininase in rat brain. *J Neurochem* 36:2086-8.
- Kariya K., Yamauchi A., Hattori S., Tsuda Y., Okada Y. (1982) The disappearance rate of intraventricular bradykinin in the brain of the conscious rat. *Biochem Biophys Res Commun* 107:1461-6. DOI: S0006-291X(82)80163-0 [pii].
- Kinnaird T., Stabile E., Burnett M.S., Epstein S.E. (2004) Bone-marrow-derived cells for enhancing collateral development: mechanisms, animal data, and initial clinical experiences. *Circ Res* 95:354-63.
- Klasner B., Lumenta D.B., Pruneau D., Zausinger S., Plesnila N. (2006) Therapeutic window of bradykinin B2 receptor inhibition after focal cerebral ischemia in rats. *Neurochem Int* 49:442-7. DOI: S0197-0186(06)00125-2 [pii]10.1016/j.neuint.2006.02.010.
- Klever-Deichert G., Hinzpeter B., Hunsche E., Lauterbach K.W. (1999) [Costs of coronary heart diseases over the remaining life time in coronary heart disease cases--an analysis of the current status of coronary heart disease cases in Germany from the social perspective]. *Z Kardiol* 88:991-1000.
- Kramer H., Weckbach S., van Kaick G., Reiser M.F.u.S., S.O. (2008) Screening bei Herz- und Gefäßkrankheiten - Screening in cardiovascular diseases *Radiologe* 48, Nummer 1:52-62.

- Krankel N., Katare R.G., Siragusa M., Barcelos L.S., Campagnolo P., Mangialardi G., Fortunato O., Spinetti G., Tran N., Zacharowski K., Wojakowski W., Mroz I., Herman A., Manning Fox J.E., MacDonald P.E., Schanstra J.P., Bascands J.L., Ascione R., Angelini G., Emanuelli C., Madeddu P. (2008) Role of kinin B2 receptor signaling in the recruitment of circulating progenitor cells with neovascularization potential. *Circ Res* 103:1335-43. DOI: CIRCRESAHA.108.179952 [pii] 10.1161/CIRCRESAHA.108.179952.
- Kraut H., Frey E.K., Bauer E. (1928) Ueber ein neues Kreislaufhormon. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 175.
- Kuroda S., Kamiyama H., Abe H., Houkin K., Isobe M., Mitsumori K. (1993) Acetazolamide test in detecting reduced cerebral perfusion reserve and predicting long-term prognosis in patients with internal carotid artery occlusion. *Neurosurgery* 32:912-8; discussion 918-9.
- Kuwabara Y., Ichiya Y., Sasaki M., Yoshida T., Masuda K. (1995) Time dependency of the acetazolamide effect on cerebral hemodynamics in patients with chronic occlusive cerebral arteries. Early steal phenomenon demonstrated by [¹⁵O]H₂O positron emission tomography. *Stroke* 26:1825-9.
- Lee C.W., Stabile E., Kinnaird T., Shou M., Devaney J.M., Epstein S.E., Burnett M.S. (2004) Temporal patterns of gene expression after acute hindlimb ischemia in mice: insights into the genomic program for collateral vessel development. *J Am Coll Cardiol* 43:474-82. DOI: 10.1016/j.jacc.2003.09.033, S0735109703014748 [pii].
- Lehmberg J., Beck J., Baethmann A., Uhl E. (2000) Influence of the bradykinin B1/B2-receptor-antagonist B 9430 on the cerebral microcirculation and outcome of gerbils from global cerebral ischemia. *Acta Neurochir Suppl* 76:39-41.
- Lehmberg J., Beck J., Baethmann A., Uhl E. (2003) Bradykinin antagonists reduce leukocyte-endothelium interactions after global cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:441-8.
- Levesque L., Harvey N., Rioux F., Drapeau G., Marceau F. (1995) Development of a binding assay for the B1 receptors for kinins. *Immunopharmacology* 29:141-7. DOI: 016231099400053I [pii].
- Lohse M.J. (1993) Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochim Biophys Acta* 1179:171-88. DOI: 0167-4889(93)90139-G [pii].
- Loosemore T.M., Chalmers T.C., Dormandy J.A. (1994) A meta-analysis of randomized placebo control trials in Fontaine stages III and IV peripheral occlusive arterial disease. *Int Angiol* 13:133-42.
- Lumenta D.B., Plesnila N., Klasner B., Baethmann A., Pruneau D., Schmid-Elsaesser R., Zausinger S. (2006) Neuroprotective effects of a postischemic treatment with a bradykinin B2 receptor antagonist in a rat model of temporary focal cerebral ischemia. *Brain Res* 1069:227-34. DOI: S0006-8993(05)01628-8 [pii], 10.1016/j.brainres.2005.11.043.
- Madeddu P., Emanuelli C., El-Dahr S. (2007) Mechanisms of disease: the tissue kallikrein-kinin system in hypertension and vascular remodeling. *Nat Clin Pract Nephrol* 3:208-21. DOI: ncpneph0444 [pii], 10.1038/ncpneph0444.
- Marzewski D.J., Furlan A.J., St Louis P., Little J.R., Modic M.T., Williams G. (1982) Intracranial internal carotid artery stenosis: longterm prognosis. *Stroke* 13:821-4.
- Mees B., Wagner S., Ninci E., Tribulova S., Martin S., van Haperen R., Kostin S., Heil M., de Crom R., Schaper W. (2007) Endothelial nitric oxide synthase activity is essential for vasodilation during blood flow recovery but not for arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:1926-33. DOI: ATVBAHA.107.145375 [pii], 10.1161/ATVBAHA.107.145375.

- Mendelow A.D., Graham D.I., Tuor U.I., Fitch W. (1987) The hemodynamic effects of internal carotid artery stenosis and occlusion. *J Neurosurg* 66:755-63. DOI: 10.3171/jns.1987.66.5.0755.
- Morbidelli L., Parenti A., Giovannelli L., Granger H.J., Ledda F., Ziche M. (1998) B1 receptor involvement in the effect of bradykinin on venular endothelial cell proliferation and potentiation of FGF-2 effects. *Br J Pharmacol* 124:1286-92. DOI: 10.1038/sj.bjp.0701943.
- Murray C.D. (1926) The Physiological Principle of Minimum Work: I. The Vascular System and the Cost of Blood Volume. *Proc Natl Acad Sci U S A* 12:207-14.
- Norgren L., Hiatt W.R., Dormandy J.A., Nehler M.R., Harris K.A., Fowkes F.G., Bell K., Caporusso J., Durand-Zaleski I., Komori K., Lammer J., Liapis C., Novo S., Razavi M., Robbs J., Schaper N., Shigematsu H., Sapoval M., White C., White J., Clement D., Creager M., Jaff M., Mohler E., 3rd, Rutherford R.B., Sheehan P., Sillesen H., Rosenfield K. (2007) Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Eur J Vasc Endovasc Surg* 33 Suppl 1:S1-75. DOI: S1078-5884(06)00535-1 [pii], 10.1016/j.ejvs.2006.09.024.
- Papapetropoulos A., Garcia-Cardena G., Madri J.A., Sessa W.C. (1997) Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest* 100:3131-9. DOI: 10.1172/JCI119868.
- Parenti A., Morbidelli L., Ledda F., Granger H.J., Ziche M. (2001) The bradykinin/B1 receptor promotes angiogenesis by up-regulation of endogenous FGF-2 in endothelium via the nitric oxide synthase pathway. *FASEB J* 15:1487-9.
- Pipp F., Heil M., Issbrucker K., Ziegelhoeffer T., Martin S., van den Heuvel J., Weich H., Fernandez B., Golomb G., Carmeliet P., Schaper W., Clauss M. (2003) VEGFR-1-selective VEGF homologue PlGF is arteriogenic: evidence for a monocyte-mediated mechanism. *Circ Res* 92:378-85.
- Poeck H., Hacke W. (2006) *Neurologie*. Springer Medizin Verlag 12. Auflage.
- Proud D., MacGlashan D.W., Jr., Newball H.H., Schulman E.S., Lichtenstein L.M. (1985) Immunoglobulin E-mediated release of a kininogenase from purified human lung mast cells. *Am Rev Respir Dis* 132:405-8.
- Pruneau D., Chorny I., Benkovitz V., Artru A., Roitblat L., Shapira Y. (1999) Effect of LF 16-0687MS, a new nonpeptide bradykinin B2 receptor antagonist, in a rat model of closed head trauma. *J Neurotrauma* 16:1057-65.
- Regensteiner J.G., Ware J.E., Jr., McCarthy W.J., Zhang P., Forbes W.P., Heckman J., Hiatt W.R. (2002) Effect of cilostazol on treadmill walking, community-based walking ability, and health-related quality of life in patients with intermittent claudication due to peripheral arterial disease: meta-analysis of six randomized controlled trials. *J Am Geriatr Soc* 50:1939-46. DOI: jgs50604 [pii].
- Regoli D., Barabe J. (1980) Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev* 32:1-46.
- Regoli D., Gobeil F. (1995) Pharmacology of kinin receptors: recent developments. *Can J Physiol Pharmacol* 73:791-6.
- Regoli D., Marceau F., Barabe J. (1978) De novo formation of vascular receptors for bradykinin. *Can J Physiol Pharmacol* 56:674-7.
- Regoli D., Boudon A., Fauchere J.L. (1994) Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacol Rev* 46:551-99.
- Regoli D., D'Orleans-Juste P., Rouissi N., Rhaleb N.E. (1993) Vasoactive peptides and characterization of their receptors. *Regul Pept* 45:323-40.
- Regoli D., Nsa Allogho S., Rizzi A., Gobeil F.J. (1998) Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur J Pharmacol* 348:1-10.

- Regoli D., Pheng L.H., Allogho S.N., Nguyen-Le X.K., Gobeil F. (1996) Receptors for kinins: from classical pharmacology to molecular biology. *Immunopharmacology* 33:116-22.
- Regoli D.C., Marceau F., Lavigne J. (1981) Induction of beta 1-receptors for kinins in the rabbit by a bacterial lipopolysaccharide. *Eur J Pharmacol* 71:105-15.
- Relton J.K., Beckey V.E., Hanson W.L., Whalley E.T. (1997) CP-0597, a selective bradykinin B2 receptor antagonist, inhibits brain injury in a rat model of reversible middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 28:1430-6.
- Ren J., Li H., Prior B.M., Yang H.T. (2008) Angiotensin converting enzyme inhibition enhances collateral artery remodeling in rats with femoral artery occlusion. *Am J Med Sci* 335:177-87. DOI: 10.1097/MAJ.0b013e318142b978, 00000441-200803000-00002 [pii].
- Ringelstein E.B., Zeumer H., Angelou D. (1983) The pathogenesis of strokes from internal carotid artery occlusion. Diagnostic and therapeutical implications. *Stroke* 14:867-75.
- Ringleb P.A., Hacke W. (2007) [Carotid artery stenosis]. *Chirurg* 78:593-4, 596-9. DOI: 10.1007/s00104-007-1360-2.
- Rocha E.S.M., Beraldo W.T., Rosenfeld G. (1949) Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am J Physiol* 156:261-73.
- Rothwell P.M., Gibson R., Warlow C.P. (2000) Interrelation between plaque surface morphology and degree of stenosis on carotid angiograms and the risk of ischemic stroke in patients with symptomatic carotid stenosis. On behalf of the European Carotid Surgery Trialists' Collaborative Group. *Stroke* 31:615-21.
- Rudic R.D., Shesely E.G., Maeda N., Smithies O., Segal S.S., Sessa W.C. (1998) Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest* 101:731-6. DOI: 10.1172/JCI1699.
- Schaper W. (2004) Theory of Arteriogenesis, in: S. J. Schaper W (Ed.), *Arteriogenesis*, Kluwer Academic Publisher pp 253-255, Boston.
- Schaper W., Ito W.D. (1996) Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circ Res* 79:911-9.
- Schaper W., Buschmann I. (1999) Arteriogenesis, the good and bad of it. *Eur Heart J* 20:1297-9. DOI: 10.1053/euhj.1999.1686, S0195668X9991686X [pii].
- Schaper W., Scholz D. (2003) Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1143-51. DOI: 10.1161/01.ATV.0000069625.11230.96, 01.ATV.0000069625.11230.96 [pii].
- Schaper W., Schaper J. (2004a) *Arteriogenesis by Schaper & Schaper*. Kluwer Academic Publishers Group.
- Schaper W., Schaper J. (2004b) *Arteriogenesis* Kluwer Academic Publishers Group, Bad Nauheim.
- Schierling W., Troidl K., Mueller C., Troidl C., Wustrack H., Bachmann G., Kasprzak P.M., Schaper W., Schmitz-Rixen T. (2009) Increased intravascular flow rate triggers cerebral arteriogenesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 29:726-37.
- Schirmer S.H., van Royen N. (2004) Stimulation of collateral artery growth: a potential treatment for peripheral artery disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2:581-8. DOI: ERC020414 [pii], 10.1586/14779072.2.4.581.
- Schirmer S.H., Buschmann I.R., Jost M.M., Hoefler I.E., Grundmann S., Andert J.P., Ulusans S., Bode C., Piek J.J., van Royen N. (2004) Differential effects of MCP-1 and leptin on collateral flow and arteriogenesis. *Cardiovasc Res* 64:356-64.

- Schneeloch E., Mies G., Busch H.J., Buschmann I.R., Hossmann K.A. (2004) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced arteriogenesis reduces energy failure in hemodynamic stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:12730-5.
- Schneider U.C., Schilling L., Schroeck H., Nebe C.T., Vajkoczy P., Woitzik J. (2007) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced vessel growth restores cerebral blood supply after bilateral carotid artery occlusion. *Stroke* 38:1320-8.
- Scholz D., Cai W.J., Schaper W. (2001) Arteriogenesis, a new concept of vascular adaptation in occlusive disease. *Angiogenesis* 4:247-57.
- Scholz D., Ito W., Fleming I., Deindl E., Sauer A., Wiesnet M., Busse R., Schaper J., Schaper W. (2000) Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis). *Virchows Arch* 436:257-70.
- Seiler C. (2003) The human coronary collateral circulation. *Heart* 89:1352-7.
- Shyy J.Y., Lin M.C., Han J., Lu Y., Petrim M., Chien S. (1995) The cis-acting phorbol ester "12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate"-responsive element is involved in shear stress-induced monocyte chemotactic protein 1 gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8069-73.
- Silvestre J.S., Bergaya S., Tamarat R., Duriez M., Boulanger C.M., Levy B.I. (2001) Proangiogenic effect of angiotensin-converting enzyme inhibition is mediated by the bradykinin B(2) receptor pathway. *Circ Res* 89:678-83.
- Simson J.A., Chao J., Dom R., Chao L., Margolius H.S. (1986) Kallikrein localization in rat brain by immunohistochemistry. *Adv Exp Med Biol* 198 Pt B:129-33.
- Smith S.C., Jr., Allen J., Blair S.N., Bonow R.O., Brass L.M., Fonarow G.C., Grundy S.M., Hiratzka L., Jones D., Krumholz H.M., Mosca L., Pasternak R.C., Pearson T., Pfeffer M.A., Taubert K.A. (2006) AHA/ACC guidelines for secondary prevention for patients with coronary and other atherosclerotic vascular disease: 2006 update: endorsed by the National Heart, Lung, and Blood Institute. *Circulation* 113:2363-72. DOI: 113/19/2363 [pii], 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.174516.
- Sorteberg W., Lindegaard K.F., Rootwelt K., Dahl A., Nyberg-Hansen R., Russell D., Nornes H. (1989) Effect of acetazolamide on cerebral artery blood velocity and regional cerebral blood flow in normal subjects. *Acta Neurochir (Wien)* 97:139-45.
- Souza D.G., Lomez E.S., Pinho V., Pesquero J.B., Bader M., Pesquero J.L., Teixeira M.M. (2004) Role of bradykinin B2 and B1 receptors in the local, remote, and systemic inflammatory responses that follow intestinal ischemia and reperfusion injury. *J Immunol* 172:2542-8.
- Steiner T., Hennes H.J., Kretz R., Hacke W. (2000) [Treatment of acute clinical stroke]. *Anaesthesist* 49:2-8. DOI: 00490002.101 [pii].
- Stoll M., Hamann G.F. (2002) [Cerebrovascular reserve capacity]. *Nervenarzt* 73:711-8.
- Stover J.F., Dohse N.K., Unterberg A.W. (2000) Significant reduction in brain swelling by administration of nonpeptide kinin B2 receptor antagonist LF 16-0687Ms after controlled cortical impact injury in rats. *J Neurosurg* 92:853-9. DOI: 10.3171/jns.2000.92.5.0853.
- Su J., Cui M., Tang Y., Zhou H., Liu L., Dong Q. (2009) Blockade of bradykinin B2 receptor more effectively reduces postischemic blood-brain barrier disruption and cytokines release than B1 receptor inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 388:205-11. DOI: S0006-291X(09)01506-X [pii], 10.1016/j.bbrc.2009.07.135.
- Thoma R. (1893) Untersuchungen über die Histogenese und Histomechanik des Gefäßsystems.
- Todo K., Kitagawa K., Sasaki T., Omura-Matsuoka E., Terasaki Y., Oyama N., Yagita Y., Hori M. (2008) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances

- leptomeningeal collateral growth induced by common carotid artery occlusion. *Stroke* 39:1875-82.
- Trabold R., Eros C., Zweckberger K., Relton J., Beck H., Nussberger J., Muller-Esterl W., Bader M., Whalley E., Plesnila N. (2010) The role of bradykinin B(1) and B(2) receptors for secondary brain damage after traumatic brain injury in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 30:130-9. DOI: jcbfm2009196 [pii], 10.1038/jcbfm.2009.196.
- Troidl K., Tribulova S., Cai W.J., Ruding I., Apfelbeck H., Schierling W., Troidl C., Schmitz-Rixen T., Schaper W. (2010) Effects of endogenous nitric oxide and of DETA NONOate in arteriogenesis. *J Cardiovasc Pharmacol* 55:153-60. DOI: 10.1097/FJC.0b013e3181c9556f, 00005344-201002000-00006 [pii].
- Tsao P.S., Wang B., Buitrago R., Shyy J.Y., Cooke J.P. (1997) Nitric oxide regulates monocyte chemotactic protein-1. *Circulation* 96:934-40.
- Tubbs R.S., Loukas M., Hill M., Shoja M.M., Cohen-Gadol A.A. (2009) Richard Lower (1631-1691): acknowledging his notable contributions to the exploration of the nervous system. Historical vignette. *J Neurosurg* 111:1096-101.
- Tzima E., Irani-Tehrani M., Kiosses W.B., Dejana E., Schultz D.A., Engelhardt B., Cao G., DeLisser H., Schwartz M.A. (2005) A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature* 437:426-31. DOI: nature03952 [pii], 10.1038/nature03952.
- van Royen N., Hoefler I., Buschmann I., Kostin S., Voskuil M., Bode C., Schaper W., Piek J.J. (2003a) Effects of local MCP-1 protein therapy on the development of the collateral circulation and atherosclerosis in Watanabe hyperlipidemic rabbits. *Cardiovasc Res* 57:178-85.
- van Royen N., Hoefler I., Bottinger M., Hua J., Grundmann S., Voskuil M., Bode C., Schaper W., Buschmann I., Piek J.J. (2003b) Local monocyte chemoattractant protein-1 therapy increases collateral artery formation in apolipoprotein E-deficient mice but induces systemic monocytic CD11b expression, neointimal formation, and plaque progression. *Circ Res* 92:218-25.
- Venkatesh P.K., Pattillo C.B., Branch B., Hood J., Thoma S., Illum S., Pardue S., Teng X., Patel R.P., Kevil C.G. (2010) Dipyridamole enhances ischaemia-induced arteriogenesis through an endocrine nitrite/nitric oxide-dependent pathway. *Cardiovasc Res* 85:661-70.
- Vorstrup S., Henriksen L., Paulson O.B. (1984) Effect of acetazolamide on cerebral blood flow and cerebral metabolic rate for oxygen. *J Clin Invest* 74:1634-9. DOI: 10.1172/JCI111579.
- Wachtfogel Y.T., DeLa Cadena R.A., Colman R.W. (1993) Structural biology, cellular interactions and pathophysiology of the contact system. *Thromb Res* 72:1-21. DOI: 0049-3848(93)90168-N [pii].
- Werle E., Berek U. (1948) Zur Kenntnis des Kallikreins. *Angew. Chem.* 60A:53.
- Werle E., Götze W., Keppler A. (1937) Über die Wirkung des Kallikreins auf den isolierten Darm und über eine neue darmkontrahierende Substanz. *Biochem. Z.* 289:217-233.
- Wolf C., Cai W.J., Vosschulte R., Koltai S., Mousavipour D., Scholz D., Afsah-Hedjri A., Schaper W., Schaper J. (1998) Vascular remodeling and altered protein expression during growth of coronary collateral arteries. *J Mol Cell Cardiol* 30:2291-305. DOI: S0022-2828(98)90790-8 [pii], 10.1006/jmcc.1998.0790.
- Yang H.T., Laughlin M.H., Terjung R.L. (2000) Prior exercise training increases collateral-dependent blood flow in rats after acute femoral artery occlusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279:H1890-7.
- Zanobio B. (1973) The research of Luigi Porta on morbid changes of the arteries induced by ligation and torsion. *Clio Med* 8:305-13.

Zeiber A.M., Fisslthaler B., Schray-Utz B., Busse R. (1995) Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res* 76:980-6.

9. Abkürzungen

3-VO – *Three Vessel Occlusion*, Drei-Gefäß-Verschluss

ABI – *Ankle Brachial Index*, Blutdruck Knöchel/Arm

ACA – *Anterior Cerebral Artery*, Arteria cerebri anterior

ACE – *Angiotensin-Converting-Enzym*

ACZ – Acetazolamid

ASS – Acetylsalicylsäure

BA – *baseline area*

BR – Bradykininrezeptor

BRi – Bradykininrezeptor-Inhibitor

BRs – Bradykininrezeptor-Stimulation

CBF – *Cerebral Blood Flow*, zerebraler Blutfluss

CCAO – *Common Carotid Artery Occlusion*, Arteria carotis communis-Okklusion

CO₂– Kohlenstoffdioxid

CPI – *Collateral Perfusion Index*, Kollateraler Perfusionsindex

CVR – *Cerebrovascular Reactivity*, Zerebrovaskuläre Reaktivität

CVRC – *Cerebrovascular Reserve Capacity*, zerebrovaskuläre Reservekapazität

eNOS – endotheliale NO-Synthase

FAO – *Femoral Artery Occlusion*, Arteria femoralis-Okklusion

FGF-2 – *Fibroblast Growth Factor-2*

GM-CSF – *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*

HPF – *High Power Field*, Gesichtsfeld

ICA – *Internal Cerebral Artery*, Arteria carotis interna

ICAM – *Intercellular Adhesion Molecule*

IL-1 – Interleukin-1

iNOS – *inducible nitric oxide synthases*, induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase

IP₃– Inositol-(1,4,5)-triphosphat

KO – *Knock-Out*

LI – *Lameness Index*, Lahmheitsindex

MA – *measurement area*

MCA – *Media Cerebral Artery*, Arteria cerebri media

MCP-1 – *Monocyte Chemoattractant Protein-1*

MZ – Monozyt

NaCl – 0,9%ige Isotonische Kochsalzlösung

NO – *Nitric Oxide*, Stickstoffmonoxid

PAVK – periphere arterielle Verschlusskrankheit

PBS – *phosphate buffered saline*, phosphatgepufferte Salzlösung

PCA – *Posterior Cerebral Artery*, Arteria cerebri posterior

pCO₂ – Kohlenstoffdioxidpartialdruck

PComA – *Posterior Communicating Artery*, Arteria communicans posterior

PLA₂– Phospholipase A₂

PLC – Phospholipase C

pO₂ – Sauerstoffpartialdruck

s.c. – *subcutaneously*, subkutan

VA – *Vertebral Artery*, Arteria vertebralis

VCAM – *Vascular Cell Adhesion Molecule*

10. Abbildungen und Tabellen

10.1. Abbildungen

Abbildung 1: Canines Kollateralsystem der Arteria femoralis	5
Abbildung 2: Kinin-Bradykinin-Pathway	19
Abbildung 3: Bradykinin-Rezeptor-Signaltransduktionskaskade	20
Abbildung 4: Projektdesign FAO	31
Abbildung 5: Projektdesign 3-VO – Rezeptor-Inhibition	31
Abbildung 6: Projektdesign 3-VO – Rezeptor-Stimulation	32
Abbildung 7: Femoralisligaturmodell (FAO)	34
Abbildung 8: Dreigefäßverschlussmodell (3-VO)	36
Abbildung 9: Zerebrovaskuläre Reaktivität (CVR)	38
Abbildung 10: LI nach BR-Inhibition	42
Abbildung 11: CPI nach BR-Inhibition	43
Abbildung 12: zerebraler Blutfluss im 3-VO-Modell	44
Abbildung 13: Gewichtsverläufe bei BR-Inhibition	46
Abbildung 14: Gewichtsdifferenzen bei BR-Inhibition	47
Abbildung 15: Gewichtsverläufe bei BR1-Stimulation	48
Abbildung 16: Gewichtsdifferenzen bei BR-Stimulation	49
Abbildung 17: pCO ₂ (A) und pH-Wert (B) -Änderungen während CVR-Messung	50
Abbildung 18: adaptive Arteriogenese – CVRC	52
Abbildung 19: CVRC bei BR-Inhibition	53
Abbildung 20: CVR bei BR1-Stimulation	54
Abbildung 21: adaptive Arteriogenese – Diameter der PCA	56
Abbildung 22: Diameter der PCA bei BR-Inhibition	59
Abbildung 23: Diameter der PCA bei BR-Stimulation	62
Abbildung 24: Postmortale Latexangiographie	64
Abbildung 25: Monozytenmigrationsassay	65

10.2. Tabellen

Tabelle 1: Zerebrovaskuläre Reservekapazität (CVRC)	51
Tabelle 2: Adaptive Arteriogenese	57
Tabelle 3: Pharmakologische BR-Inhibition	60
Tabelle 4: Pharmakologische BR1-Stimulation	63
Tabelle 5: Anhang Materialien	98

11. Anhang

11.1. Detaillierte Materialienaufstellung

Tabelle 5: Anhang Materialien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Tierhaltung:	
Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse (V1534-300)	sniff Spezialdiäten GmbH, Soest (Deutschland)
Makrolonkäfige Typ IV für Ratte (Innenbodenfläche: 1800 cm ² , Höhe: 19 cm) und IVC Typ II lang für Maus (Innenbodenfläche: 360 cm ² , Höhe: 14 cm)	Ehret Labor- und Pharmatechnik GmbH & Co. KG, Emmendingen (Deutschland)

Geräte:	
Blutdruckmessgerät	Medtronic GmbH, Düsseldorf (Deutschland)
Haarschneidegerät, PHILIPS QC 5000/00	Philips Deutschland GmbH, Hamburg (Deutschland)
ICC 50	Erbe Elektromedizin, Tübingen (Deutschland)
Infusionspumpe, Modell: Fusion 100	KR Analytical Ltd., Cheshire (Vereinigtes Königreich)
Magnetplatte, KMO 2 elektronik	Janke&Kunkel GMBH & CO KG, IKA-Labor Technik, Staufen i. Br. (Deutschland)
Objektmikrometer für Mikroskop	Leica Microsystems Ltd., Heerbrugg (Schweiz)
Operationsmikroskop OPMI 1FC und Bodenstativ S21	Carl Zeiss AG, Göttingen (Deutschland)
Perfusor segura	B. Braun AG, Melsungen (Deutschland)
Periflux System 5000	Perimed AG, Järfälla (Schweden)
PowerShot S70 Digitalcamera	Canon Deutschland GmbH, Krefeld (Deutschland)
Radiometer Copenhagen	Radiometer Medical ApS, Brønshøj (Dänemark)
Stereomikroskop Leica MZ6 mit Kaltlichtquelle KL 1500 LCD	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (Deutschland)
Stereotaktisches Instrument	FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim/Ober-Beebach (Deutschland)
Vapor 2000 Isofluran	Dräger Medical AG & Co. KG, Lübeck (Deutschland)
Waage	Sartorius AG, Göttingen (Deutschland)
Wärmeplatte	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen (Deutschland)

Chirurgische Instrumente:	
anatomische und chirurgische Pinzetten	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen (Deutschland)
Inzisionsschere geknöpft	
Klein-Set-Container	
Knochenschere	
Metzenbaumscheren gerade und gebogen	
Mikrofederscheren	
Mikroskopierpinzetten gerade und abgewinkelt	
Nadelhalter nach Mathieu	
Splitterpinzetten gerade und abgewinkelt	
Wundspreizer nach Logan modif.Reill	

Medikamente und Compounds:	
Adrekar® N2 6mg/2ml (Wirkstoff: Adenosin)	Sanofi Aventis Deutschland GmbH, 65926 Frankfurt am Main (Deutschland)
Ampuwa® (Aqua ad injectabilia - Wasser für Injektionszwecke)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg (Deutschland)
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe (Wirkstoff: Dexpanthenol)	Bayer Vital, D-51368 Leverkusen (Deutschland)
Braunol® , 7,5% Lösung zur Anwendung auf der Haut (Wirkstoff: Povidon-Iod)	B. Braun AG, Melsungen (Deutschland)
Diamox® parenteral Trockensubstanz (Wirkstoff: Acetazolamid-Natrium)	Goldshield Pharmaceuticals Ltd., Surrey (England)
Firazyr® 30mg (Wirkstoff: Icatibant)	Jerini AG, Berlin (Deutschland)
Forene® (Wirkstoff: Isofluran)	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden (Deutschland)
Heparin-Natrium-25000-ratiopharm® (Wirkstoff: Heparin-Natrium)	Ratiopharm GmbH, Ulm (Deutschland)
H-1960 ((des-Arg9, Leu8)-Bradykinin)	Bachem Distribution Services GmbH, Weil am Rhein (Deutschland)
Isotonische Kochsalzlösung (Wirkstoff: Natriumchlorid)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg (Deutschland)
Ketavet® 100mg/ml Injektionslösung (Wirkstoff: Ketaminhydrochlorid)	Pfizer Pharmacia GmbH, Berlin (Deutschland)
Liquemin® N 25 000 (Wirkstoff: Heparin-Natrium)	Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen (Deutschland)
Naropin® (Wirkstoff: Ropivacainhydrochlorid)	AstraZeneca AB, Södertälje (Schweden)
Paveron® N (Wirkstoff: Papaverinhydrochlorid)	Weimer Pharma GmbH, Rastatt (Deutschland)
Rompun® 2% Injektionslösung (Wirkstoff: Xylazin)	Bayer Vital GmbH, Leverkusen (Deutschland)
Interleukin-1 β	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (Deutschland)
MCP-1	Chemicon International, Temecula, CA (USA)

R715 (Ac-Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-DBN al-Ile)	TOCRIS bioscience, 5B IO Centre, Cabot Park Bristol, BS11 0QL (Vereinigtes Königreich)
Sar[D-phe8]-des-Arg9-Bradykinin	TOCRIS bioscience, 5B IO Centre, Cabot Park Bristol, BS11 0QL (Vereinigtes Königreich)
Softasept® N (Wirkstoff: Ethanol)	B. Braun AG, Melsungen (Deutschland)
T61® (Wirkstoffe: Embutramid, Tetracain, Mebezoniumjodid)	Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim (Deutschland)
Vitronectin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (Deutschland)
Xylocain® Gel 2% (Wirkstoff: Lidocainhydrochlorid 1H2O)	Astra Zeneca GmbH, Wedel (Deutschland)

Chemikalien und Lösungen:	
Ambion's RNAlater solution	Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH, Darmstadt (Deutschland)
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Riedstraße 2, 89555 Steinheim (Deutschland)
CellWash	Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ (USA)
Chicago Latex, Industrial Latex Product No. 563	Spartan Adhesives & Coatings Co., Crystal Lake, IL (USA)
FluoroSpheres, 15µm Durchmesser, in den Farben blue (365/415), red (580/605), orange (540/560) und yellow-green (495/505), Polysteren	MoBiTec, Goettingen (Deutschland)
GIBCO®, PBS pH 7,2	Invitrogen TM, Auckland (Neuseeland)
Indian Link (Chinesische Tusche schwarz)	Royal Talens, Apeldoorn (Niederlande)

Lysepuffer zur Mikrosphärenfreisetzung:	
SDS-Stammlösung: 1% SDS, 0,5% Natrium-Azid, 0,8% Tween-80 in 50mM pH8.0 Tris-Puffer, 1mg/ml Proteinase K in SDS-Stammlösung	
Natrium-Azid	<i>Sigma, St.Louis, Missouri (USA)</i>
Medizinische Gase Sauerstoff (O ₂) / Distickoxid (N ₂ O, Lachgas)	<i>Linde AG, Unterschleißheim (Deutschland)</i>
Proteinase K	<i>Roche, Basel (Schweiz)</i>
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	<i>Sigma, St.Louis, Missouri (USA)</i>
Tween®20 und Tween®80	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (Deutschland)</i>

Zelllinien und Medien:	
Humane THP-1 Zellen	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Deutschland)
Medium zur Kultivierung der humanen THP-1 Zellen:	
RPMI 1640: 10% FCS (Fetales Kälberserum), 2 mmol/L L-Glutamin, 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (Deutschland)

Verbrauchsmaterialien:	
EcoLab-Polyethylen-Mikroschlauch 0,58*0,96 mm sowie 0,40*0,80 mm	SMITHS Portex Ltd. (Vereinigtes Königreich)
Einmalspritzen für 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, Perfusorspritzen 50 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)
Falcontube 15ml, 50ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht (Deutschland)
Kanülen BD Microlance™ 3; 23 G * 1“ – Nr. 16; 0,6 mm * 25 mm	Necton Dickinson GmbH, Heidelberg (Deutschland)
Leukoplast®; stark klebendes Fixierpflaster; 1,25cm*9,2m; 24 St.	BSN medical GmbH&Co KG, Hamburg (Deutschland)
Multiwell Platten, 24-Well	Greiner Bio-One GmbH (Deutschland)
Nahtmaterial Polyester, nicht resorbierbar, geflochten, 5/0 USP, 1 metric, 75 cm	Ethicon, Norderstedt (Deutschland)
Rotilabo®-Spritzenfilter, CME, Porengröße 0,8 µm	Carl Roth GmbH + Co. KG, 76185 Karlsruhe (Deutschland)
Wattestäbchen	Rauscher-Lößnitztal GmbH&Co KG , Oederm (Deutschland)
Zellstofftupfer; 4*5cm; 1Rolle	Beese medical, Karl Beese (GmbH&Co.), Barsbüttel (Deutschland)
Alzet Osmotische Pumpen , Modell 2004 und 1007D	DURECT Corporation,Cupertino, CA (USA)

11.2. Detaillierte Methodenaufstellung

11.2.1. Femoral artery occlusion (FAO)

Nach Eintritt der Anästhesie wurde das Tier auf eine Wärmeplatte gelegt und in Rückenlage fixiert. Die Augen wurden zum Schutz vor Austrocknung mit Augen- und Nasensalbe versehen. Medial am rechten Hinterlauf wurde das Operationsfeld mittels Enthaarungscreme vom Fell befreit und anschließend desinfiziert. Die Haut wurde am rechten Oberschenkel parallel zum Verlauf der Arteria femoralis etwa 1 cm lang inzidiert. Weiter wurde das Binde- und Fettgewebe zur Seite geschoben und die Gefäße dargestellt. Die Arteria femoralis wurde dann vorsichtig von Nerv und Vene im zu ligierenden Bereich getrennt. Für die Ligaturen wurde ein nicht resorbierbarer Seidenfaden (USP 5-0) verwendet. Anschließend wurde die Wunde durch eine Hautnaht (USP 5-0) verschlossen und mit Xylocain-Gel versehen. Nach Überprüfung der Beweglichkeit des Hinterbeines wurde das Tier während der Aufwachphase in den Käfig unter eine Rotlichtlampe gelegt.

11.2.2. Kollateraler Perfusionsindex (CPI)

Das Tier wurde hierfür sieben Tage nach Ligatur der Femoralarterie nach Einleitung der Narkose auf eine Wärmeplatte gelegt. Es wurden 1.000 I.E. Heparin intramuskulär injiziert, um ein Verstopfen der Kapillaren durch Thromben zu verhindern. Die Bauchdecke wurde eröffnet und die Aorta abdominalis durch Verlagerung des Darms aus dem Bauchraum aufgesucht. Die Arterie wurde zusammen mit der Vena cava und dem umliegenden Bindegewebe vorgelagert und proximal ligiert (USP 5-0). Danach wurde die Aorta abdominalis isoliert freigelegt und aufgespannt. Ein Faden wurde zum Ligieren distal vorgelegt. Das Gefäß wurde inzidiert und mit einem Polyethylenkatheter (ecoLab-PE-Mikroschlauch, Innendurchmesser 0,40 * OD 0,80 mm) distal kanüliert. Der vorgelegte Faden wurde geknotet und der Katheter so fixiert. Durch die Perfusion von 10 ml physiologischer Kochsalzlösung und Adenosin (0,03 mg/ml) bei einer Perfusionsgeschwindigkeit von 2 ml/min wurde das periphere Kollateralsystem maximal dilatiert. Anschließend wurden nacheinander jeweils 10 ml von drei verschiedenen Mikrosphären (red, orange, yellow-green) bei verschiedenen Perfusionsgeschwindigkeiten (2 ml/min, 3 ml/min und 4 ml/min) in aufsteigender Reihenfolge perfundiert. Diese befanden

sich in einer 0,05%-igen Tween-Lösung und wurden in einer Konzentration von 10.000/ml in PBS mit 0,1% Tween 20 und Adenosin (0,03 mg/ml) verdünnt.

Nach der Perfusion wurde die Muskulatur beider Hinterläufe freipräpariert, vom Knochen gelöst und anschließend in 15 ml Falcon-Tubes überführt. Zur Freisetzung der Mikrosphären wurden zu jeder Probe 3 ml der Proteinase/SDS-Lösung zugefügt. Blau fluoreszierende Mikrosphären (100.000/Probe, 15 µm Durchmesser) wurden als interner Standard der Lösung beigegeben. Alle Proben wurden im Wasserbad bei 50° Celsius für fünf Tage lysiert und täglich gevortext. Die Proben wurden dann am sechsten Tag zentrifugiert (30 min bei 1000 g), der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1 ml CellWash resuspendiert.

Bei der flusszytometrischen Analyse (fluoreszenzaktivierte Zellanalyse) werden die Mikrosphären in der Flusskammer durch eine umfließende Hüllflüssigkeit einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Die Ablenkung des monochromatischen Lichts lässt Rückschlüsse auf die in verschiedenen Frequenzbereichen fluoreszierenden Kunststoffkugeln zu. Die Inkubation der Zellen mit fluorochrommarkierten Antikörpern erlaubt die Quantifizierung anhand des emittierten Lichtspektrums.

Zur Bestimmung des kollateralen Perfusionsindexes wurde dann zunächst jeweils der Quotient der Anzahl perfundierter Mikrosphären und der Anzahl blauer Referenzmikrosphären bestimmt. Die Werte der nicht-ligierten Seite wurden anschließend zur jeweiligen ligierten Seite ins Verhältnis gesetzt, wobei der Wert der nicht-ligierten Seite gleich 100% gesetzt wurde.

11.2.3. Dreifäßverschluss (3-VO)

Nach Einleitung der Narkose wurden die zu eröffnenden Operationsstellen mit dem Lokalanästhetikum Ropivacain unterspritzt. Ein ca. 2 mal 2 cm großes Operationsfeld vom Nacken bis zur Höhe der Ohren wurde mittels einer Schermaschine freigeschoren, gereinigt und desinfiziert. Danach wurde die Ratte in Rückenlage auf eine rückgekoppelte Wärmeplatte gelegt. Zum Schutz vor Verbrennung beim Koagulieren wurden die beiden Vorderpfoten mit Pflaster umklebt. Dann wurde an der linken Schädelseite temporal 3 mm caudomedial des Ohrgrundes die Haut eröffnet und stumpf bis auf den Schädelknochen freipräpariert, um einen

Zugang für die spätere Laserdopplermessung zu erhalten. Anschließend wurde das Tier in ein stereotaktisches Gerät eingespannt. Dieses fixiert den Schädel durch zwei jeweils in den Meatus acusticus externus eingeführte Metallstäbe. Danach wurde die Haut caudal des Os occipitale auf einer Länge von ca. 1 cm eröffnet. Nachdem die Musculi semispinalis capites et longissimus capites median durch stumpfe Präparation getrennt und mittels eines Wundspreizers aufgespreizt wurden, erfolgte die Durchtrennung der Musculi rectis capites dorsales majores et minores zur beidseitigen Freilegung der Foraminae alare. Nun wurde auf jeder Seite mit einer Koagulationssonde von 0,45 mm Durchmesser am Foramen alare eingegangen und die Arteria vertebralis durch unipolare Elektrokoagulation verschlossen. Die Wunden wurden mittels Muskel- und anschließender Hautnaht verschlossen.

Das Tier wurde nun aus dem stereotaktischen Gerät herausgenommen und auf die rückgekoppelte Wärmeplatte in Rückenlage zurückgelagert. Die Haut wurde im ventralen Halsbereich etwa 1-2 mm links paramedian durch einen ca. 1 cm langen Schnitt eröffnet. Die Arteria carotis communis wurde durch stumpfe Präparation freigelegt, indem sie vom Truncus vagosympathicus und vom umliegenden Bindegewebe gelöst wurde. Ein Faden (USB 5-0, metric 1,0) wurde dann um das Gefäß vorgelegt, aber noch nicht angezogen. Im Anschluss wurde durch Anlegen einer Sonde an die zuvor freipräparierte Stelle links temporal am Schädel der zerebrale Blutfluss bestimmt. Der Blutfluss wurde mittels spezieller Software (Perisoft, Perimed) aufgezeichnet. Nach etwa einer Minute wurde die Schlinge um die Arteria carotis communis zugezogen, so dass das Gefäß vollständig ligiert war. Der Blutfluss wurde dabei für weitere zehn Minuten aufgezeichnet und kontrolliert. Anschließend wurden die Wunden verschlossen. Zum Erwachen aus der Narkose wurde das Tier in eine getrennte Box gesetzt und mit Rotlicht bestrahlt, um ein Auskühlen zu verhindern. Erst wenn das Tier aus der Narkose erwacht war und keine Orientierungsschwierigkeiten mehr zeigte, wurde es in den Käfig zurückgesetzt. So konnte beobachtet werden, ob durch die Operation neurologische Schäden entstanden sind.

11.2.4. Zerebrovasculäre Reaktivität (CVR)

Zum Bestimmen der CVRC wurde das Tier zunächst auf den Bauch auf eine rückgekoppelte Wärmeplatte gelegt. Links temporal am Kopf wurde der Schädelknochen freipräpariert, um eine Anschlussstelle für die Laserdopplersonde zu schaffen. Dann wurde die Ratte auf den

Rücken umgelagert und beide Hinterbeine fixiert. Die Haut wurde im linken Oberschenkelspalt auf einer Länge von etwa 2 cm eröffnet und die Arteria und Vena femoralis wurden aufgesucht. Beide Gefäße wurden freipräpariert. Dann wurde die Arterie aufgespannt und weit distal ligiert. Proximal wurde ein Knoten (USP 5-0) vorgelegt, aber noch nicht angezogen. Mit einer Mikroschere wurde nun in etwa der Mitte des aufgespannten Gefäßabschnittes eingeschnitten und ein Katheter (ecoLab-PE-Mikroschlauch 0,58*0,96 mm) in proximaler Richtung eingeführt. Der vorgelegte Knoten wurde dann zum Fixieren des Katheters festgezogen. Anschließend wurde der Katheter mit einer geringen Menge Heparin-Lösung (5.000 I.E. in 100 ml Kochsalzlösung) gespült, um zu verhindern, dass das Blut im Katheter gerinnt. In der gleichen Verfahrensweise wurde anschließend ein Katheter in die Vena femoralis gelegt. Aus der Arteria femoralis wurde nun eine Blutprobe entnommen und mittels Blutgasanalysegerät (ABL Radiometer Copenhagen) die arteriellen Blutgase (pCO₂, pO₂) und der pH-Wert des Blutes vor Beginn der Messung bestimmt. Anschließend wurde ein Blutdruckmessgerät an den arteriellen Katheter angeschlossen, damit der mittlere arterielle Blutdruck gemessen werden konnte.

Danach wurde die Laserdopplersonde am Schädel platziert. Der zerebrale Blutfluss wurde nun kontinuierlich aufgezeichnet. In die linke Vena femoralis wurden nun 0,1 ml ACZ (30 mg/kg) appliziert. Durch die Erhöhung des pCO₂ und die Senkung des pH-Wertes entsteht eine metabolische Azidose. Dies führt dazu, dass es zur Dilatation von Widerstandsgefäßen und damit zur Erhöhung des Blutflusses im Gehirn kommt (Dahl et al., 1995). Des Weiteren wird dadurch die Bildung von CO₂ angeregt, welches dann abgeatmet werden kann und somit der induzierten metabolischen Azidose entgegenwirkt. Da Acetazolamid eine lange Wirkdauer hat und die Messung in einem kurzen Zeitraum vorgenommen wird, kann der Ausgleich durch Abatmung vernachlässigt werden.

Die Messung des Blutflusses wurde nach acht Minuten beendet. Aus der Arteria femoralis wurde erneut eine Blutprobe für eine zweite Blutgasanalyse zum Nachweis des durch die Applikation von ACZ erhöhten pCO₂ und gesunkenen pH-Wertes entnommen.

11.2.5. Postmortale Latexangiographie

Dazu wurde das Tier nach Einleitung der Narkose in Rückenlage auf eine rückgekoppelte Wärmeplatte gelegt und an die Atemmaske angeschlossen. Nach Desinfektion des Halsbereiches wurde die Haut ein bis zwei Millimeter rechts der Medianen auf einer Länge von 1,5 cm eröffnet. Die rechte Arteria carotis communis wurde aufgesucht, vorgelagert und aufgespannt. Nun wurde die Arterie proximal ligiert und distal ein Knoten vorgelegt. Mit einer Mikroschere wurde distal der Ligatur das Gefäß eröffnet, ein Katheter (ecoLab-PE-Mikroschlauch, Innendurchmesser 0,58 * Außendurchmesser 0,96 mm) eingeführt und mittels vorgelegtem Knoten um die Gefäßwand fixiert. Der Katheter wurde mit einer geringen Menge Heparin-Lösung (5.000 I.E. in 100 ml Kochsalzlösung) gespült, um zu verhindern, dass das Blut im Katheter gerinnt. Dann wurde nach Eröffnung des Brustkorbes das rechte Herzohr eingeschnitten, wodurch für die bevorstehende Perfusion ein Überdruck in den zerebralen Gefäßen verhindert wurde. Zusätzlich wurde bei 3-VO operierten Tieren die ligierte linke Arteria carotis communis aufgesucht und oberhalb der Ligatur durchtrennt. Im Anschluss wurden die Gefäße mit ca. 2 ml heparinierter Kochsalzlösung über den arteriellen Katheter gespült und unmittelbar daraufhin 40 bis 50 mg/kg Papaverinhydrochlorid appliziert. Dadurch wurde die maximale Dilatation der Gefäße erreicht und gleichzeitig das Tier aufgrund der eintretenden Hypotonie getötet. Dann wurde eine mit schwarzer Tinte (Indian ink) gefärbte, etwa 37 °Celsius warme Latexmilch (Chicago Latex Products No. 563) mit Hilfe eines Perfusors bei kontinuierlichem Druck von 150 mmHg perfundiert. Nachdem etwa 2 ml der Flüssigkeit perfundiert waren, wurde das Tier für mindestens 10 min auf Eis gelegt, um das Aushärten des Latex zu beschleunigen. Der Kopf wurde mittels Guillotine abgetrennt, das Gehirn entnommen und in RNAlater-Lösung konserviert.

11.2.6. Implantation der osmotischen Minipumpe

Die osmotischen Minipumpen wurden zwölf Stunden vor der Implantation in sterile Kochsalzlösung gelegt, damit sich die osmotisch aktive Substanz aufladen kann. Anschließend wurden sie mit der zu applizierenden Substanz gefüllt.

Bei der Ratte erfolgte das Implantieren der Pumpe während der 3-VO-Operation nach Koagulation der beiden Vertebralarterien im Nackenbereich. In den eröffneten Hautspalt

wurde vom kaudalen Wundrand die Haut mittels einer anatomischen Pinzette in Richtung distal stumpf vom Untergrund abgehoben, so dass sich ein kleiner Kanal etwa 1 cm lateral der Wirbelsäule bis zur Kreuzbahnregion bildete. Die befüllte Pumpe wurde darin so weit wie möglich vorgeschoben, anschließend die Haut verschlossen und die 3-VO-Operation fortgeführt.

Bei der Maus wurden die Pumpen analog unmittelbar nach Ligatur der Arteria femoralis implantiert, als sich das Tier noch in Narkose befand.

12. Publikationsliste

- Hillmeister P, **Gatzke N**, Dulsner A, Bader M, Schadock I, Hoefler I, Hamann I, Infante-Duarte C, Jung G, Troidl K, Urban D, Stawowy P, Frentsch M, Li M, Nagorka S, Wang H, Shi Y, le Noble F, Buschmann I (2011) Arteriogenesis is modulated by bradykinin receptor signaling. *Circ Res* 109:524-33.
- Duelsner A, **Gatzke N**, Glaser J, Hillmeister P, Li M, Lee EJ, Lehmann K, Urban D, Meyborg H, Stawowy P, Busjahn A, Nagorka S, Persson AB, Buschmann IR (2011) Acetylsalicylic acid, but not clopidogrel, inhibits therapeutically induced cerebral arteriogenesis in the hypoperfused rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*.
- Duelsner, A and **Gatzke, N**, Glaser, J, Hillmeister, P, Li, M, Lee, EJ, Lehmann, K, Urban, D, Meyborg, H, Stawowy, P, Busjahn, A, Nagorka, S, Bondke Persson, A, Buschmann, IR (2011). "Granulocyte-Colony Stimulating Factor Improves Cerebrovascular Reserve Capacity by Collateral Growth in the Circle of Willis." *Cerebrovascular Diseases*.
- Dülsner, A., Glaser, J., **Gatzke, N.**, Pfitzner, J., Furundzija, V., Meyborg, H., Stawowy, P., Lehmann, K., Langhoff, R., Schulte, K. L., Buschmann, I. (2010). "Pioglitazon hemmt den biologischen Bypass: Müssen wir die Indikation bei nicht revasculierbaren Patienten überdenken?" Hauptprogramm: 15. Dreiländertagung der Schweizerischen, Deutschen und Österreichischen Gesellschaften für Angiologie gemeinsam mit der 11. Jahrestagung der Union Schweizerischer Gesellschaften für Gefäßkrankheiten: 55, Best Poster, Erster Platz
- Gatzke, N.**, Dülsner, A., Langhoff, R., Schulte, K. L., Buschmann, I. (2010). "Ein neues Tiermodell in der Maus: Induktion biologischer Bypässe im anterioren Stromgebiet des Circulus Willisii." Hauptprogramm: 15. Dreiländertagung der Schweizerischen, Deutschen und Österreichischen Gesellschaften für Angiologie gemeinsam mit der 11. Jahrestagung der Union Schweizerischer Gesellschaften für Gefäßkrankheiten: 56, Best Poster, Dritter Platz

Buschmann I, Pries A, Styp-Rekowska B, Hillmeister P, Loufrani L, Henrion D, Shi Y, Duelsner A, Hoefler I, **Gatzke N**, Wang H, Lehmann K, Ulm L, Ritter Z, Hauff P, Hlushchuk R, Djonov V, van Veen T, le Noble F (2010) Pulsatile shear and Gja5 modulate arterial identity and remodeling events during flow-driven arteriogenesis. *Development* 137:2187-96

13. Danksagung

Ich danke sehr Herrn Priv.-Doz. Dr. Ivo Buschmann für die umfassende wissenschaftliche und persönliche Förderung meiner Doktorarbeit und insbesondere für die Gelegenheit, diese am „Center for Cardiovascular Research“ in den „Richard-Thoma-Laboratorien für Arteriogenese“ absolvieren zu können, sowie seinen vielen Anregungen bei deren Durchführung.

Mein herzlichster Dank gilt Frau Univ.-Prof. Dr. Heike Tönhardt für die Übernahme des Erstgutachtens und dafür, dass sie mir somit die Möglichkeit gab, meine Promotionsarbeit durchzuführen.

Im besonderen Maße danke ich dem Betreuer meiner Doktorarbeit, Herrn Dr. André Dülsner, der mir über die gesamte Zeit mit seiner veterinärmedizinischen Fachkompetenz bei der Projektdurchführung und bei Fragen des Tierschutzes sowie bei der Auswertung der Daten immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ich danke allen meinen Kolleginnen und Kollegen der „Richard-Thoma-Laboratorien für Arteriogenese“, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben. Frau Dr. Johanna Glaser bin ich zu großem Dank verpflichtet für die Mühe und Geduld beim Erlernen der Methoden sowie Frau Doreen Janke für die Unterstützung jeglicher Art. Herrn Dr. Philipp Hillmeister danke ich für die Zusammenarbeit und Hilfe während der gesamten Projektdurchführung.

Bei Frau Stephanie Nagorka möchte ich mich herzlich für die Unterstützung mittels ihrer graphischen und fremdsprachlichen Talente bedanken.

Ich danke meinen engsten Vertrauten, allen meinen Freunden sowie meinen Geschwistern, die mich während meiner Doktorandenzeit begleitet haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund, der mir stets die Kraft gegeben hat und für mich da war, mich motiviert und immer an mich geglaubt hat.

Abschließend möchte ich meinen Eltern Barbara und Eckehard Gatzke für ihre moralische und finanzielle Unterstützung danken, ihnen gilt mein ganz besonderer Dank. Ohne sie hätte ich diesen Weg nicht gehen können.

14. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Nora Gatzke