

**Aus dem  
Lehrstuhl für Angiologie am Universitätsklinikum Brandenburg  
Hochschulklinik für Angiologie  
Medizinische Hochschule Brandenburg Theodor Fontane**

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

**Untersuchung des Einflusses von Angiotensin-  
Rezeptor-Neprilysin-Inhibitoren (ARNI)  
auf das kollaterale Arterienwachstum im koronaren  
Arteriogenesemodell in der Ratte**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von  
Victoria Asta Luise Kratzmann, geb. von Hertell  
Tierärztin aus Minden**

**Berlin 2023  
Journal-Nr.: 4401**







Aus dem  
Lehrstuhl für Angiologie am Universitätsklinikum Brandenburg  
Hochschulklinik für Angiologie  
Medizinische Hochschule Brandenburg Theodor Fontane

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

**Untersuchung des Einflusses von Angiotensin-Rezeptor-Neprilysin-Inhibitoren (ARNI)  
auf das kollaterale Arterienwachstum im koronaren Arteriogenesemodell in der Ratte**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Victoria Asta Luise Kratzmann, geb. von Hertell**  
Tierärztin aus Minden

Berlin 2023  
Journal-Nr.:4401

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Ivo R. Buschmann  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Ralf Einspanier

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*  
rats, animal models, arteries, aorta, angiotensin, angiogenesis

Tag der Promotion: 19.07.2023

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: 978-3-96729-222-0

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2023**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D188**

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 2023 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin  
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	III
Tabellen.....	VI
Abbildungen .....	VII
Abkürzungen .....	X
1. Einleitung .....	1
2. Literatur .....	3
2.1. Koronare Herzkrankheit.....	3
2.1.1. Definition der koronaren Herzkrankheit .....	3
2.1.2. Epidemiologie .....	5
2.1.3. Bisherige Therapien.....	7
2.2. Formen des Gefäßwachstums.....	9
2.2.1. Vaskulogenese .....	9
2.2.2. Angiogenese .....	10
2.2.3. Arteriogenese .....	10
2.2.4. Der biologische Bypass im Herzen .....	16
2.3. Tiermodelle in der Arteriogeneseforschung .....	16
2.3.1. Das koronare Arteriogenesemodell .....	18
2.4. Molekulare Prozesse der Arteriogenese .....	20
2.4.1. Grundlagen .....	20
2.4.2. Bradykinin, seine Rezeptoren und Funktionen .....	22
2.4.3. Bradykinin und die Arteriogenese .....	23
2.5. Zusammenhang zwischen dem Kallikrein-Kinin-System und dem Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAAS) .....	24
2.6. Medikamentöse Beeinflussung des RAAS .....	25
2.6.1. Angiotensinrezeptorblocker .....	25
2.6.2. Medikament Entresto®: Angiotensin-Rezeptor-Nepriylsin-Inhibitor.....	27
2.7. Auswertungsmethode: Mikrosphärenperfusionsmessung .....	29

2.8.	Hypothese und Ziel der Arbeit .....	30
3.	Tiere, Material und Methoden .....	31
3.1.	Tierversuchsgenehmigung.....	31
3.2.	Versuchsdesign .....	31
3.3.	Versuchstiere und deren Haltung .....	33
3.4.	Experimentelle Methode: Induktion der Arteriogenese am Herzen .....	34
3.4.1.	Narkose .....	34
3.4.2.	Initialoperation .....	34
3.4.3.	Repetitives okkludierendes Protokoll (ROP).....	36
3.4.4.	Finaloperation .....	37
3.5.	Behandlung.....	38
3.5.1.	Zeitlicher Ablauf .....	38
3.5.2.	Euthanasierung vor Versuchsende.....	39
3.6.	Auswertmethodik .....	39
3.6.1.	Mikrosphären .....	39
3.7.	Instrumente, Geräte und Reagenzien .....	41
3.7.1.	Operationsbesteck.....	41
3.7.2.	Verbrauchsmittel.....	42
3.7.3.	Pharmazeutika.....	43
3.7.4.	Geräte .....	44
3.7.5.	Chemikalien, Lösungen, Gase.....	44
3.8.	Statistische Auswertung.....	45
3.8.1.	Bestimmung des kollateralen Flusses .....	45
4.	Ergebnisse .....	47
4.1.	Deskriptive Analyse .....	47
4.1.1.	Perfusion des Gewebes bei der Initialoperation (Tag 0).....	47
4.1.2.	Vergleich der Gruppe Rop versus Sham bei der Finaloperation (Tag 7).....	49
4.1.3.	Perfusion des Gewebes bei Finaloperation (Tag 7) .....	50
4.1.3.1.	Übersicht der Rop Gruppen bei der Finaloperation (Tag 7) .....	53

5. Diskussion.....	55
5.1. Bewertung der Methode.....	56
5.1.1. Das repetitiv okkludierende Programm.....	56
5.1.2. Auswertmethodik .....	59
5.1.3. Kollaterale Perfusion zum Zeitpunkt der Initialoperation .....	60
5.1.4. Evaluierung des repetitiv okkludierenden Programms .....	61
5.1.5. Evaluierung der Wirkung der Medikamente.....	61
5.1.5.1. ARNI .....	61
5.1.5.2. Valsartan .....	63
5.2. Klinische Relevanz und therapeutischer Ausblick .....	65
6. Zusammenfassung.....	69
6.1. Summary.....	71
7. Literaturverzeichnis .....	73
Publikationen.....	XCV
Danksagung .....	XCVI
Finanzierungsquellen - Funding Sources.....	XCVII
Interessenskonflikt - Conflict of Interest .....	XCVII
Selbstständigkeitserklärung .....	XCVIII

## Tabellen

Tabelle 1. Übersicht der Gruppen zur Endpunktmessung. ....	41
Tabelle 2. Operationsbesteck.....	41
Tabelle 3. Verbrauchsmittel.....	42
Tabelle 4. Pharmazeutika.....	43
Tabelle 5. Geräte.....	44
Tabelle 6. Chemikalien, Lösungen, Gase. ....	44

## Abbildungen

Abbildung 1. Modifizierte schematische Darstellung nach Knuuti, Wijns et al. (2020) in den aktuellen Leitlinien der European Society of Cardiology zur Diagnose und dem Management des chronisch koronaren Syndroms von Knuuti und Kollegen über den zeitlichen Verlauf der koronaren Herzkrankheit und ihrer möglichen Einflussfaktoren (Knuuti, Wijns et al. 2020).....4

Abbildung 2. Überblick über die Todesursachen nach Krankheitsarten im Jahr 2020 (Destatis Statistisches Bundesamt 2021).....5

Abbildung 3. Die häufigsten Todesursachen unter den Herzkreislauferkrankungen im Jahr 2020 (Destatis Statistisches Bundesamt 2022).....6

Abbildung 4. Gesetz von Hagen Poiseuille:  $\Delta p$ =Druckdifferenz zwischen den beiden Enden des betrachteten Rohrabschnittes;  $r$ = Innenradius des Rohres;  $V$ = Volumenstromstärke;  $l$ = Länge;  $\eta$ =Viskosität..... 11

Abbildung 5. Modifiziert nach Schirmer, van Royen et al. 2009. In der Ausgangssituation [A] finden sich präexistente kollateralarterielle Anastomosen. Diese sind klein und mit geringem Blutfluss. Nach Stenose einer größeren Arterie kommt es zum Anstieg des Druckgradienten über die Kollateralarteriolen [B]. Die entstehende erhöhte Schubspannung aktiviert das kollateralarterielle Endothel über membranständige Rezeptoren, das endotheliale Zytoskelett sowie die Glykokalyx. Es folgt eine gesteigerte Chemokin-Expression zur Attraktion von Monozyten, die über das Adhäsionsmolekül Mac-1 an ICAM-1 der Endothelzelle adhären. Monozyten transmigrieren in den perivaskulären Raum und sezernieren Wachstumsfaktoren und Metalloproteinasen [C]. Proliferation und Größenwachstum der Kollateralarterien stellen schließlich Perfusionsdruck und Sauerstoffsättigung im distalen Gewebe wieder her. .... 13

Abbildung 6. Postmortale Angiographie (Kontrastmittelgabe und Röntgen) der Hintergliedmaße einer Sprague-Dawely Ratte. Die Studie von Herzog, Sager et al. (2002) zeigt die Hintergliedmaße mit den prä-existenten arteriellen Anastomosen, die die Arteria iliaca interna mit der Arteria poplitea verbinden (Abbildung A). Die untere Abbildung zeigt die signifikant vergrößerten arteriellen Anastomosen nach dem siebentägigen Verschluss der Arteria femoralis. Die Anastomosen haben das charakteristisch korkenzieherartige Aussehen einer kollateralen Arterie (schwarze Pfeile) (Abbildung B) (Herzog, Sager et al. 2002)..... 15

Abbildung 7. Modifizierte Übersicht nach Vardeny, Tacheny et al. (2013) über den pharmakologischen Aktivierungsweg und Mechanismus von dem ARNI Entresto® (LCZ696) (Vardeny, Tacheny et al. 2013).....28

Abbildung 8. Modifizierte schematische Darstellung eines adaptierten pneumatischen Miniokkluder nach Toyota, Kawaguchi et al. (2007). Oben: Befestigter Okkluder (Ballonkatheter) im „entspannten“ Zustand ohne Okklusion des Gefäßes. Unten: Pneumatische Inflation des befestigten Okkluders führt zur Kompression der left anterior descending artery (LAD). Die Kerbe dient der Befestigung des Nahtmaterials am Okkluder. Die flexible Hülle ermöglicht die Inflation.....35

Abbildung 9. Schematische Darstellung des verwendeten Zeitprotokolls des repetitiv-okkludierenden Programms. Ein Okklusionszyklus entspricht der druckkontrollierten Inflation des Ballonkatheters mit Luft alle 20 Minuten für 40 Sekunden und anschließender sofortiger Deflation (Ruhephase) für 19 Minuten und 20 Sekunden. ....36

Abbildung 10. Herz mit befestigtem Ballonkatheter kurz nach der Entnahme nach der Finaloperation. Hierbei handelt es sich um einen Bildausschnitt. ....38

Abbildung 11. Modifizierte schematische Darstellung nach Kissel et al. (2019) des Herzens, der Lage des Okkluder und des Ramus interventricularis anterior (=left anterior descending artery: LAD) der linken Koronararterie, sowie die Lokalisation der Normalzone (NZ) und kollateralen Abhängigkeitszone (CZ) (Kissel, Gabus et al. 2019).....40

Abbildung 12. Die kollaterale Perfusion aller Gruppen am Initialoperationstag, Tag 0. Sham= Kontrollgruppe, Rop = repetitiv-okkludierendes Programm Gruppe; Rop\_ARNI = repetitiv-okkludierendes Programm mit Entresto® Gruppe, Rop\_ARB = repetitiv-okkludierendes Programm in Kombination mit Valsartan Gruppe.....48

Abbildung 13. Vergleich der kollateralen Perfusion im Gewebe der Sham und Rop-Gruppe nach der Finaloperation, am Tag 7. Sham= Kontrollgruppe, Rop = repetitiv-okkludierendes Programm Gruppe.....49

Abbildung 14. Die kollaterale Perfusion im Gewebe an Tag 7. Sham= Kontrollgruppe, Rop = repetitiv-okkludierendes Programm Gruppe; Rop\_ARNI = repetitiv-okkludierendes Programm mit Entresto® Gruppe, Rop\_ARB = repetitiv-okkludierendes Programm in Kombination mit Valsartan Gruppe. ....51

---

Abbildung 15. Übersicht der Ergebnisse am Tag 7 nach Finaloperation. SD = Standardabweichung, CI = Konfidenzintervall; Sham= Kontrollgruppe, Rop = repetitiv-okkludierendes Programm Gruppe; Rop\_ARNI = repetitiv-okkludierendes Programm mit Entresto® Gruppe, Rop\_ARB = repetitiv-okkludierendes Programm in Kombination mit Valsartan Gruppe. ....52

Abbildung 16. Vergleich aller ROP-Gruppen mit oder ohne Medikation. Rop = repetitiv-okkludierendes Programm Gruppe; Rop\_ARNI = repetitiv-okkludierendes Programm mit Entresto® Gruppe, Rop\_ARB = repetitiv-okkludierendes Programm in Kombination mit Valsartan Gruppe. ....53

## Abkürzungen

3 R	<i>Replace, Reduce, Refine (animal experiment)</i>
3-VO	<i>Three Vessel Occlusion, Dreifäßverschluss</i>
ACE	<i>Angiotensin-converting-Enzym</i>
ACEI	<i>Angiotensin-converting-Enzym-Inhibitor/ Hemmer</i>
ACS	<i>Acute coronary syndrom, Akutes koronares Syndrom</i>
ANP	<i>Atrial natriuretic peptide</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ARB	Angiotensin-Rezeptor-Blocker
ARNI	Angiotensin-Rezeptor-Nepriysin-Inhibitor
ASS	Acetylsalicylsäure
AT1R	Angiotensin-1-Rezeptor
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
BKB1R	Bradykinin -Rezeptor-Typ-1
BKB2R	Bradykinin-Rezeptor-Typ-2
BNP	<i>Brain natriuretic peptide</i>
CCS	<i>Chronic coronary syndrom / Chronisches koronares Syndrom</i>
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CZ	<i>Collateral zone / kollaterale Zone</i>
ESC	<i>European Society of Cardiology</i>
EECP	<i>Enhanced External Counter Pulsation</i>
eNos	<i>endothelial nitric oxide synthases, Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase</i>
FGF-2	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2
Gm-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
HIF-1	Hypoxie -induzierbarer Faktor-1
HMWK	Hochmolekulares Kniogen
ICAM-1	<i>Intracellular adhesion molecule 1, Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1</i>

---

ISRT	<i>Individual-Shear-Rate-Therapy</i>
KHK	Koronare Herzkrankheit
KKS	Kallikrein-Kinin-System
LAD	<i>Left anterior descending artery</i>
LMWK	Niedermolekulares Kiniogen
M	Mittelwert
MCP-1	<i>Monocyte-chemoattractant-protein-1</i>
Mme	Membran-Metallo-Endopeptidase/ Gen MME
NEP	Neutrale Endopeptidase Neprilysin
NEP2	Neprilysin-2
NO	<i>Nitric-Oxide</i> , Stickstoffmonoxid
NZ	Normal zone
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RIVA	<i>Ramus interventricularis anterior</i>
ROP	Repetitiv-okkludierendes Programm
Rop	Repetitiv-okkludierendes Programm-Gruppe
SD	<i>Standard Deviation</i>
Sham	Kontrollgruppe
TGFbeta	<i>Transforming growth factor beta</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazolium
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>



# 1. Einleitung

Folgen einer koronaren Herzkrankheit (KHK), wie Herzinsuffizienz und Myokardinfarkt, gehören weltweit zu den führenden Todesursachen des Menschen. Aufgrund dieser Tatsache ist die Therapie, insbesondere die präventive Therapie, für die Humanmedizin von hoher Relevanz. Zahlreiche Therapieoptionen, die die Morbidität und Mortalität deutlich reduzieren konnten, sind bereits vorhanden. Trotzdem gibt es weiterhin Bestrebungen zusätzliche präventive Therapiemodelle zu etablieren (Knuuti, Wijns et al. 2020). Die neuere Präventionsforschung nutzt den Prozess der myokardialen Arteriogenese als Therapieansatz (Carrao, Chilian et al. 2009, Gatzke, Hillmeister et al. 2018). Dabei ist die Arteriogenese einer der wichtigsten endogenen Protektionsmechanismen gegen einen Herzinfarkt. Sie bezeichnet das Auswachsen prä-existenter kollateraler Arterien in funktionelle Konduktanzarterien durch Gefäßumbau und Zellproliferation. Durch kollaterale Arterien kann ein ischämischer Gewebeschaden vermindert werden (Buschmann und Schaper 1999).

Diese Dissertation beschäftigt sich mit dem Einfluss von Angiotensin-Rezeptor-Nepriylsin-Inhibitoren (ARNI) auf das kollaterale Arterienwachstum im koronaren Arteriogenesemodell in der Ratte. Dazu wird, mit Hilfe des repetitiv-okkludierenden Programms, die myokardiale Arteriogenese im Herzen der Ratte induziert und untersucht, ob es zu einer Verbesserung der Perfusion über kollaterale Arterien, bei gleichzeitiger täglicher Anwendung von ARNI, kommt.

ARNI ist eine Wirkstoffkombination aus einem Nepriylsin-Inhibitor und einem Angiotensin-Rezeptor-Blocker (ARB). Seit kurzem wird ARNI, als neues Kombinationsmedikament aus dem Nepriylsin-Inhibitor Sacubitril und dem ARB Valsartan unter dem Namen Entresto® zur Behandlung der Herzinsuffizienz eingesetzt. Die Mechanismen, durch welche Entresto® das Herz schützt, sind weitgehend unbekannt. Die in dieser Dissertationsarbeit untersuchte Hypothese ist, dass der Nepriylsin-Inhibitor Sacubitril in Entresto® durch die Anreicherung von Bradykinin die protektive myokardiale Arteriogenese therapeutisch stimuliert. Eine therapeutische Stimulation der Arteriogenese über eine Modulation der Bradykinin Rezeptoren konnte in der Forschergruppe um Prof. Dr. Ivo Buschmann in Vorarbeiten nachgewiesen werden. Weiterer Bestandteil der Hypothese dieser Studie ist, dass die ARB-Komponente von Entresto® keine modulatorische Wirkung auf die Arteriogenese ausübt. Eine modulatorische Wirkung von ARB konnte bereits in Vorarbeiten an einem zerebralen Arteriogenese Modell nicht nachgewiesen werden (Hillmeister, Nagorka et al. 2021).

Sollte sich eine modulatorische Wirkung von ARNI auf die myokardiale Arteriogenese zeigen, ergäbe sich dadurch ein neuer Mechanismus, mit welchem ARNI eine Herzinsuffizienz verhindern könnte. Die Herzinsuffizienz ist seit fast 50 Jahren als kritischer Faktor für eine

ungünstige Prognose nach einem Myokardinfarkt bekannt. Der Nachweis einer protektiven Wirkung von ARNI auf das Myokard könnte zukünftig einen hohen Stellenwert in der präventiv-medikamentösen Behandlung der koronaren Herzkrankheit einnehmen.

## 2. Literatur

### 2.1. Koronare Herzkrankheit

#### 2.1.1. Definition der koronaren Herzkrankheit

Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist definiert als die klinische Manifestation atherosklerotischer Umbauprozesse an den Koronararterien des Herzens (Knuuti, Wijns et al. 2020). Bekannt ist, dass die KHK aus einem komplexen Wechselspiel zwischen Risikofaktoren, den Zellen der Arterienwände, dem Blut und molekularen Signalen entsteht. Ausgehend von der Intima der Gefäße kommt es zu Anlagerungen von Lipiden und diffusen Kollagenfasern (Ross 1999). Durch diese Vorgänge verkleinert sich der lumenale Durchmesser, was einen geringeren Blutdurchfluss ermöglicht (Buschmann und Schaper 2000). Als Folge können Herzrhythmusstörungen, Myokardinfarkte und ein plötzlicher Herztod eintreten. Begleitet wird der Prozess der Atherogenese von dem Symptom der Entzündung, das in allen Stadien eine wichtige Rolle spielt (Libby und Theroux 2005). Nachweislich wachsen atherosklerotische Läsionen einen Großteil ihrer Entwicklungszeit eher abluminal, nach außen, als nach luminal, ins Innere des Gefäßes (Glagov, Weisenberg et al. 1987). Dies erklärt, dass erhebliche Belastungen durch Atherosklerose für den Körper entstehen, ohne dass es zunächst zu einer Stenose des arteriellen Innenbereiches kommt (Arnett, Isner et al. 1979, Schoenhagen, Ziada et al. 2000).

Bis 2013 wurde in den Leitlinien der *European Society of Cardiology (ESC)* das akute Koronarsyndrom von der stabilen KHK unterschieden. Mit Veröffentlichung der neuen Leitlinien „*ESC Guidelines for diagnosis and management of chronic coronary syndromes*“ im Jahr 2019 wurde die koronare Herzkrankheit neu definiert (Knuuti, Wijns et al. 2020). Die neue Unterteilung der koronaren Herzkrankheit wurde auf Basis aktueller Wissens Erkenntnisse zu Pathogenese, Klinik und Behandlungsmöglichkeiten vorgenommen. Die aktuelle Leitlinie unterscheidet zwischen dem akuten Koronarsyndrom (ACS) sowie dem chronisch koronaren Syndrom (CCS). Aufgrund der großen Vielfalt der Symptome und klinischer Manifestation unterscheidet man sechs klinische Szenarien innerhalb des CCS. Diese Szenarien sind wie folgt: (1) Patienten mit Verdacht auf eine KHK mit den Symptomen einer stabilen Angina pectoris und /oder Kurzatmigkeit, (2) Patienten mit neu diagnostizierter Herzinsuffizienz oder linksventrikulärer Fehlfunktion und Verdacht auf KHK, (3) Patienten mit oder ohne Symptomen unter einem Jahr nach einem ACS oder eines kürzlichen Revaskularisationseingriffes, (4) Patienten über einem Jahr nach Erstdiagnose oder Revaskularisation, (5) Patienten mit Verdacht auf eine mikrovaskuläre oder vasospastische Erkrankung mit Symptomen der

*Angina pectoris* und (6) Patienten, die asymptomatisch und nachweislich an einer KHK erkrankt sind (Knuuti, Wijns et al. 2020).

Das CCS kann sich sowohl zu einem akuten Koronarsyndrom entwickeln als auch nach einem akuten Koronarsyndrom auftreten. Pathophysiologisch weist das CCS dynamische Merkmale auf und kann auch subklinisch fortschreiten, weshalb es als schwerwiegend anzusehen ist, selbst dann, wenn es nicht klinisch manifest ist (Silber 2019).

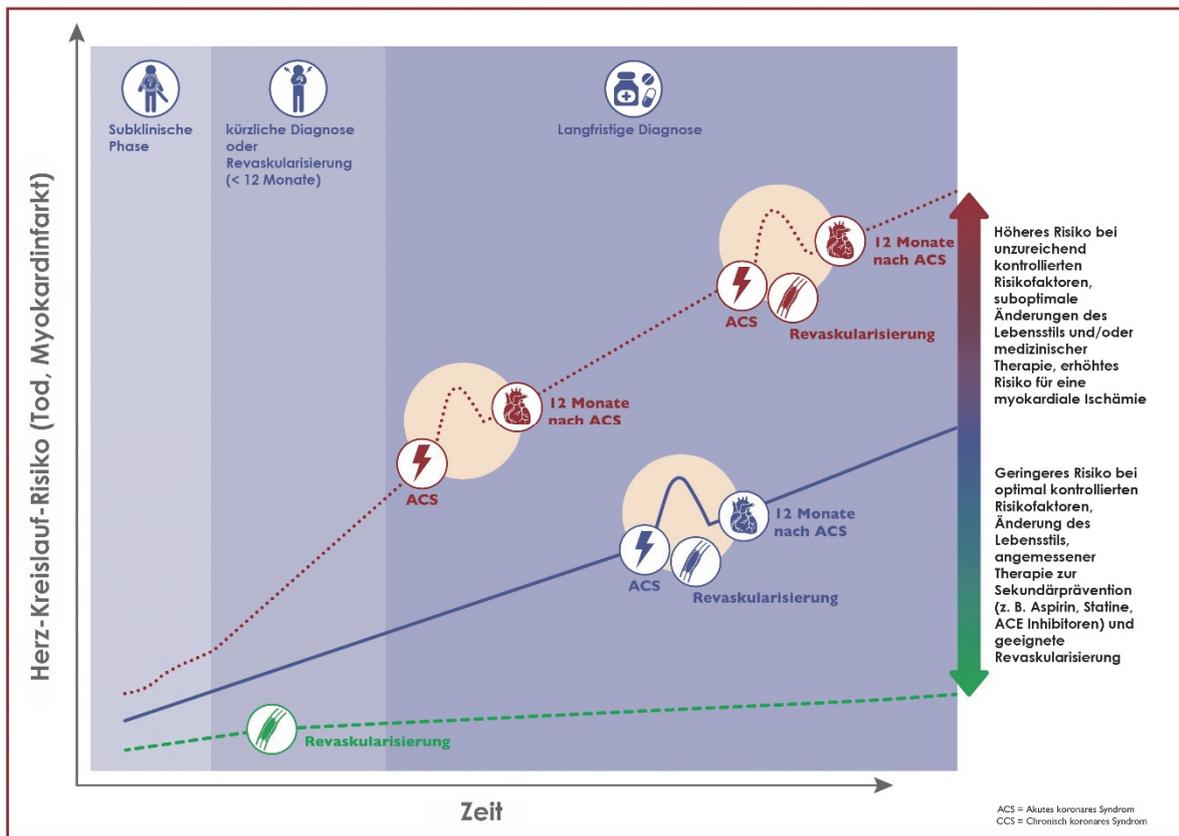


Abbildung 1. Modifizierte schematische Darstellung nach Knuuti, Wijns et al. (2020) in den aktuellen Leitlinien der European Society of Cardiology zur Diagnose und dem Management des chronisch koronaren Syndroms von Knuuti und Kollegen über den zeitlichen Verlauf der koronaren Herzkrankheit und ihrer möglichen Einflussfaktoren (Knuuti, Wijns et al. 2020).

Das charakteristische Symptom, das im Zusammenhang mit einer KHK genannt wird, ist die *Angina pectoris*, die sogenannte Brustenge. Patienten beschreiben oft drückende sternale und/oder präkordiale Schmerzen, welche in den linken Arm ausstrahlen (Kelemen 2006). Frauen berichten nicht selten von atypischen Symptomen wie Oberbauchbeschwerden, ein Ziehen zwischen den Schulterblättern oder Zahnschmerzen (Wenger 2010). Die Beschwerden treten oftmals mit Kurzatmigkeit auf und werden in Zusammenhang mit körperlicher Belastung gebracht (Knuuti, Wijns et al. 2020). Ein typisches Symptom des CCS ist die sogenannte „walk through-Angina“ (Williams, Manou-Stathopoulou et al. 2014) oder „warm-up-Angina“, wobei

die Beschwerden nach anfänglicher körperlicher Belastung auftreten, im Verlauf aber wieder verschwinden (Knuuti, Wijns et al. 2020). Bereits 1772 wurde dieses Phänomen von dem englischen Mediziner William Herberden beobachtet, dessen Patient beim täglichen Holzsägen eine nachlassende Brustenge bemerkte (Seiler 2003).

### 2.1.2. Epidemiologie

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen im Jahr 2020 mit 34,3% nach wie vor die häufigsten Todesursachen in Deutschland dar. Damit liegen kardiovaskuläre Erkrankungen in Deutschland zahlenmäßig deutlich vor allen anderen Todesursachen (siehe Abbildung 2 und 3) (Destatis Statistisches Bundesamt 2021).

#### Todesursachen nach Krankheitsarten 2020

in %

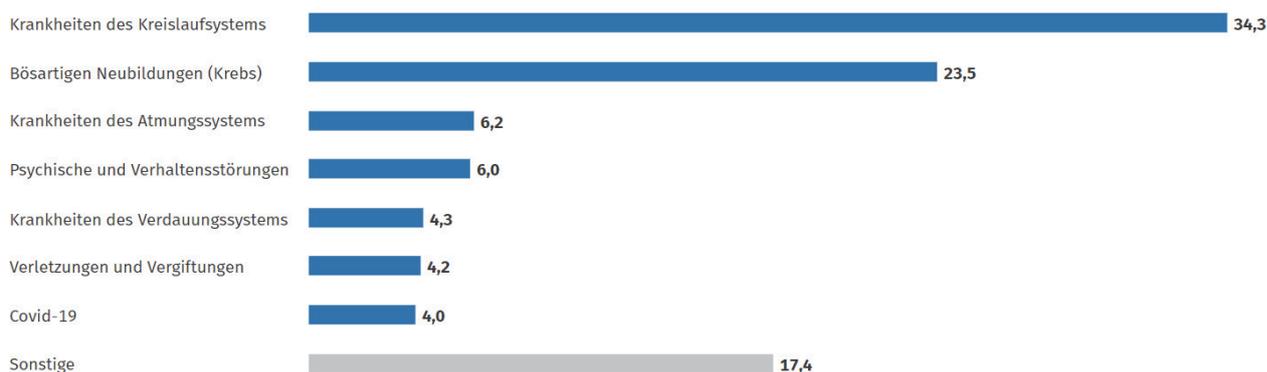


Abbildung 2. Überblick über die Todesursachen nach Krankheitsarten im Jahr 2020 (Destatis Statistisches Bundesamt 2021).

## Sterbefälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen insgesamt 2020

ICD-10 Positionsnummer	Todesursache	Gestorbene <sup>1</sup>	Anteil in %
I25	Chronische ischämische Herzkrankheit	75 482	22,3
I21	Akuter Myokardinfarkt (Herzinfarkt)	44 529	13,2
I50	Herzinsuffizienz	34 855	10,3
I11	Hypertensive Herzkrankheit	23 549	7,0
I48	Vorhofflattern und Vorhofflimmern	21 070	6,2
I63	Hirnininfarkt	14 879	4,4
I69	Folgen einer zerebrovaskulären Krankheit	12 650	3,7
I64	Schlaganfall, nicht als Blutung oder Infarkt bezeichnet	10 918	3,2
I35	Nichtrheumatische Aortenklappenkrankheiten	10 390	3,1
I10	Essentielle (primäre) Hypertonie	10 119	3,0

1: Ohne Totgeborene und ohne gerichtliche Todeserklärungen.

Die Tabelle zum Thema "[Sterbefälle insgesamt nach den 10 häufigsten Todesursachen der ICD-10](#)" mit weiteren Informationen findet sich auch im Informationssystem der [Gesundheitsberichterstattung](#).

Abbildung 3. Die häufigsten Todesursachen unter den Herz-Kreislauf-Erkrankungen im Jahr 2020 (Destatis Statistisches Bundesamt 2022).

Innerhalb der Herz-Kreislauf-Erkrankungen führt die chronische ischämische Herzkrankheit mit 22,3% die Statistik der Sterbefälle an, gefolgt vom akuten Myokardinfarkt, welcher für 13,2% aller Sterbefälle verantwortlich ist.

Diese Statistik ist nicht nur für Deutschland bedeutend. So berichtet die Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organisation, WHO*) im Jahre 2019 über den höchsten weltweiten Anstieg von Todesfällen seit 2000 bedingt durch ischämische Herzkrankheit - von mehr als zwei Millionen auf insgesamt 8,9 Millionen Todesfälle. Damit ist 2019 die ischämische Herzkrankheit für 16% aller Todesfälle weltweit verantwortlich gewesen (*World Health Organization 2020*).

Die intensive wissenschaftliche Auseinandersetzung mit der koronaren Herzkrankheit hat sowohl in Hinblick auf Mortalität, Morbidität als auch auf sozioökonomische Umstände größte

Relevanz. Trotz bemerkenswerter Fortschritte in der Behandlung bleiben kardiale Erkrankungen eine große Belastung für die Gesellschaft (Jenča, Melenovský et al. 2021).

### 2.1.3. Bisherige Therapien

Die Therapiemöglichkeiten der koronaren Herzkrankheit lassen sich in (A) präventive Maßnahmen, (B) medikamentöse (konservative) Maßnahmen, (C) invasive (interventionelle) Maßnahmen sowohl (D) neuere Maßnahmen zur Revaskularisierung unterscheiden.

Zu den präventiven Maßnahmen zählen insbesondere die Erfassung und Behandlung von Risikofaktoren. Neben unveränderlichen Risikofaktoren wie Alter, Geschlecht und Familienanamnese gibt es beeinflussbare Risikofaktoren wie Adipositas, arterielle Hypertonie, Bewegungsmangel, Diabetes mellitus, Dyslipidämie und Nikotinkonsum (Slater und Rill 2003). Studienergebnisse haben gezeigt, dass sich durch die Modifizierung der beeinflussbaren Risikofaktoren präventiv das Risiko für die Entwicklung einer kardiovaskulären Erkrankung deutlich verringern lässt (Piepoli, Hoes et al. 2016).

Im Falle einer manifesten Erkrankung wird in den aktuellen Leitlinien eine medikamentöse Therapie mit Betablockern, Kalziumkanalblockern, lang wirksamen Nitraten und Ranolazin (einem Piperazinderivat) empfohlen. Weiterhin wird eine antithrombotische Therapie durch die Gabe von Acetylsalicylsäure (ASS) und/oder Clopidogrel empfohlen. Zudem stellt das CCS eine Indikation zur lipidsenkenden Therapie mit Statinen dar (Jurisch und Laufs 2021). Bei Patienten mit vaskulären Vorerkrankungen wie Diabetes mellitus oder arterieller Hypertension wird eine Therapie mit *Angiotensin-Converting-Enzym (ACE)*-Hemmern empfohlen, da diese die Gefahr minimieren, einen Myokardinfarkt zu erleiden und an einer Herzinsuffizienz zu erkranken (Dagenais, Pogue et al. 2006). Bei Unverträglichkeit wird ein Angiotensinrezeptorblocker empfohlen. Darüber hinaus kann der Angiotensin-Rezeptor-Nepriylsin-Inhibitor (ARNI) LCZ696 (Entresto®), das bisher einzige Medikament dieser Klasse, zum Einsatz kommen (Knuuti, Wijns et al. 2020, Jurisch und Laufs 2021).

Die invasive Therapiemaßnahme der Wahl bei der koronaren Herzkrankheit ist die Revaskularisation des Herzens entweder interventionell mittels perkutaner transluminaler Angioplastie (Meier, Schirmer et al. 2013) oder operative mittels Bypassoperation. Doch auch diese Behandlungsmöglichkeiten haben ihre Limitierungen und sind nicht bei jedem Patienten erfolgreich. Begründen lässt sich dies durch Begleiterkrankungen und/oder vielseitige pathologische Befunden innerhalb des Gefäßsystems sowie wiederkehrende Re-Stenosen der Gefäße, die diese wieder verschließen (Buschmann und Schaper 2000, Seiler 2003).

Eine neuere Maßnahme zur Revaskularisierung als Behandlungsoption des chronischen koronaren Syndroms ist beispielsweise die pulssynchrone externe Gegenpulsation (*Enhanced External Counter Pulsation*, EECP). Bekannt ist, dass sich durch diese optionale Behandlungsmethode vor allem bei Patienten, bei denen keine Koronarintervention in Frage kommt, die *Angina pectoris* Schmerzen verringern (Lawson, Kennard et al. 2003) und die Lebensqualität (Michaels, Linnemeier et al. 2004) verbessert wird. Dabei wird während der Diastole das Blut von distal nach proximal, durch an den Beinen angelegte Druckmanschetten, von der Peripherie zum Herzen gepumpt. Der Prozess wird aus diesem Grund durch EKG-Messungen kontrolliert, um systolische Blutvolumenverschiebungen zu vermeiden, welche sonst zusätzliche Arbeit gegen das schlagende Herz bedeuten würden (May und Khair 2013). Es wird angenommen, dass sich folglich die intraarterielle Schubspannung und die Scherkräfte auf die Endothelzellen in den Koronararterien erhöhen (Cassar, Holmes et al. 2009) und es zu einer Verbesserung der Hämodynamik und des koronaren Kollateralblutflusses kommt (Feldman 2002, Manchanda und Soran 2007). Die Studienergebnisse über die Wirkmechanismen von der EECP auf eine nachhaltige Senkung des Blutdruckes der Patienten nach der EECP-Behandlung gehen allerdings auseinander. May und Khair konnten keine Wirkung der EECP weder auf den systolischen noch diastolischen Blutdruck der Patienten feststellen (May und Khair 2013). Hingegen berichten Campell et al. über eine systolische, aber nicht diastolische Blutdrucksenkung (Campbell, Satran et al. 2008). Auf Grundlage der externen Gegenpulsationstherapie wurde, als Modifikation und Erweiterung, in einer Studie von 2016 der Studiengruppe um Prof. Dr. Ivo Buschmann die *Individual-Shear-Rate-Therapy* (ISRT) entwickelt und erforscht (Buschmann, Brix et al. 2016). Die ISRT nutzt dabei einen deutlich geringeren Druck in den Manschetten, welcher individuell für den Patienten bestimmt worden ist. Ergebnisse der Studie zeigen eine Senkung des Blutdrucks, eine signifikante Steigerung der kardialen Fitness und Verbesserung der arteriellen Gefäßsteifigkeit (Picard, Panagiotidou et al. 2018). Da externe Pulsationstherapien die Arteriogenese durch Flussbeschleunigungen ähnlich wie bei aktivem Sport steigern, wird dieses Verfahren auch als biomimetische Therapie eines „passiven“ Trainings betrachtet (Brix, Buschmann et al. 2017). Da die Patientenkohorte vergleichsweise klein war, werden mehr aussagekräftige Daten benötigt.

Eine neues Forschungsfeld konzentriert sich nun auf solche Revaskularisierungsstrategien als Behandlungsmethode, welche auf eine therapeutische Modulation des körpereigenen Kollateralkreislaufs abzielen. Der Kollateralkreislauf gewährleistet, dass Blut in Gewebe transportiert wird, welches aufgrund eines arteriellen Verschlusses unterversorgt ist (Seiler 2003). Klinische Forschung hat sich auf Konzepte zur Stimulation dieses natürlichen Prozesses der Bildung sogenannter biologischer Bypässe konzentriert (Van Royen, Piek et al.

2001). Dabei wurde in der Vergangenheit festgestellt, dass bei Auftreten eines Myokardinfarktes die Infarktgröße durch eine ausgeprägte Kollateralisierung reduziert ist. Dies bewies, dass die Begrenzung der Infarktgröße (Habib, Heibig et al. 1991) als auch das *Remodelling* nach dem Infarkt positiv durch Koronarkollateralen beeinflusst wird (Kodama, Kusuoka et al. 1996). Allerdings scheint die Geschwindigkeit, in der diese Prozesse unter natürlichen Bedingungen ablaufen, nicht effizient genug. Es stellt sich die Frage, ob eine pharmakologische Stimulation der Arteriogenese eine nicht invasive Möglichkeit darstellt, die Prognose bei einer koronaren Herzkrankheit signifikant zu verbessern (Buschmann, Utz et al. 2009). Um die Arteriogenese gezielt zu aktivieren, ist es sehr wichtig, die verschiedenen Formen des Gefäßwachstums genau zu verstehen, um so gezielt die klinisch relevanten molekularen Prozesse therapeutisch zu stimulieren.

## 2.2. Formen des Gefäßwachstums

Der Organismus besitzt die Fähigkeit, durch die Bildung eines funktionstüchtigen Gefäßnetzwerkes, Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen.

Es werden hierbei drei verschiedene Prozesse des Gefäßumbaus bzw. der Neubildung unterschieden. Aufgrund ihrer Steuerung sowie morphologischen und zeitlichen Kriterien werden diese unterteilt in die Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese (Buschmann und Schaper 1999).

### 2.2.1. Vaskulogenese

Der Beginn der Gefäßentwicklung im frühen Embryo wird als Vaskulogenese bezeichnet. Hier differenzieren sich primitive mesodermale Zellen zu Endothelzellen, welche als Angioblasten bezeichnet werden. Die frühesten erkennbaren Gefäßstrukturen sind sogenannte Blutinseln, die auch Hämangioblasten genannt werden und ein primitives Gefäßnetz bilden. Das erste funktionelle Organsystem, das sich im Wirbeltierembryo entwickelt, ist das Herz-Kreislauf-System (Risau und Flamme 1995). Auch im postnatalen Leben kann die Vaskulogenese eine physiologische Rolle spielen, wie beispielweise bei Gefäßerkrankungen (Springer, Chen et al. 1998, Maniotis, Folberg et al. 1999).

### 2.2.2. Angiogenese

In der Angiogenese entstehen, nach der Bildung des primären Gefäßgeflechts, durch unterschiedliche Prozesse neue Kapillaren. Dabei kommt es entweder zur Aussprossung von Endothelzellen aus ihren Urgefäßen, zur Teilung eines Gefäßes oder zur Bildung neuer Kapillaren durch Invagination. Der Prozess, bei dem neue kapillare Blutgefäße aus bereits vorhandenen Blutgefäßen aussprossen, wird als Angiogenese bezeichnet. Die Bildung von Gefäßgeflechten, die Gewebe versorgen, findet sowohl in der embryonalen Entwicklung als auch *post partum* statt (Risau 1997, Buschmann und Schaper 1999). Die Angiogenese spielt auch bei Prozessen wie Entzündung, Wundheilung und Tumorerkrankungen eine wichtige Rolle. Als treibende Kraft der Angiogenese gilt die Ischämie, die z.B. aufgrund einer Okklusion eines oder mehrerer arterieller Gefäße entsteht. Durch ischämische Vorgänge wird der *Hypoxia-inducible Factor -1* (HIF-1) und *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), der auch die Aussprossung neuer Kapillaren induziert, freigesetzt (Risau 1997, Van Royen, Piek et al. 2001). Es kommt zu Wechselwirkungen zwischen Gefäßkomponenten wie den glatten Muskelzellen, Endothelzellen, Wachstumsfaktoren und der extrazellulären Matrix. Wichtige Zytokine und Stimulatoren der Angiogenese sind weiterhin *Platelet-derived growth factor* (PDGF), *Transforming Growth Factors* (TGFs) und der *Fibroblast-Growth Factor-2* (FGF-2). Weitere Regulatoren sind endogene Peptide wie Erythropoietin (EPO), Interleukine und der *Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor* (GM-CSF) (Rizzi, Benagiano et al. 2017). Durch das Zusammenspiel dieser und weiterer Faktoren bilden sich bei der Angiogenese neue kleinste Gefäße.

### 2.2.3. Arteriogenese

Als Arteriogenese wird die Umgestaltung bereits präexistenter kollateraler Arterien in größere und funktionelle arterielle Leitungsgefäße bezeichnet. Dieser Prozess wird durch die Erhöhung der Schubspannung in kollateralen Arterien in Folge eines arteriellen Verschlusses in einer Hauptarterie angestoßen (Schaper und Buschmann 1999).

Bereits der englische Anatom Richard Lower (1631-1691) erwähnte Kollateralarterien und deren Fähigkeit, als Anastomosen zu kommunizieren und im Falle einer Strömungsänderung einen alternativen Blutfluss darzustellen (Franklin 1931, Lower 1932). Der Embryologe Richard Thoma erfasste erstmals den Zusammenhang zwischen Blutfluss und Gefäßdiameter (Thoma 1893). Dies lässt sich wie folgt einfach zusammenfassen: Wenn viel Blut fließt, wird eine Arterie groß. Wenn wenig Blut fließt, wird eine Arterie klein.

Schaper et al. zeigten 1971, dass es sich bei dem Wachstum der kollateralen Gefäße nicht nur um eine Verbreiterung durch Vasodilatation handelt, sondern dass im Ruhezustand liegende Kollaterale in einen Zustand der aktiven Zellproliferation wechseln und sich so zu größeren Konduktanzgefäßen umbilden zu können (Schaper, De Brabander et al. 1971). So formt sich das Gefäß in Schleifen und Windungen (Schaper und Buschmann 1999). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde Ende der neunziger Jahre der Begriff Arteriogenese definiert und von dem Begriff der Angiogenese abgegrenzt (Ito, Arras et al. 1997, Arras, Ito et al. 1998, Buschmann und Schaper 1999). Mit der Arteriogenese existiert also eine von der Angiogenese unterschiedliche Form des Gefäßwachstums (Abaci, Oğuzhan et al. 1999). Die Arteriogenese ist im Gegensatz zur Angiogenese unabhängig von Ischämie. Die treibende Kraft bei der Arteriogenese ist die Erhöhung des Druckgradienten im Gefäßsystem, welche einen höheren Blutfluss in die bereits vorhandenen Kollateralen bedingt. Es kommt zu einem Umbau des Gefäßes durch aktive Zellproliferation. Der Durchmesser einer Arterie vergrößert sich als Reaktion auf die Zunahme der Wandschubspannung innerhalb des Gefäßes. Eine Arterie kann sich dabei auf das bis zu 20-fache ihres anfänglichen Diameters vergrößern. Diese Umgestaltung ist durch eine Aktivierung des Endothels und zirkulierender Zellen, vor allem Monozyten, charakterisiert (Hillmeister, Lehmann et al. 2008). Diese Zellen produzieren unter anderem Wachstumsfaktoren, die pro-arterogen wirken (Kamiya und Togawa 1980, Buschmann und Schaper 1999, Buschmann und Schaper 2000).

Die physiologische Bedeutung der Arteriogenese wird bei der Betrachtung des Gesetzes von Hagen-Poiseuille deutlich (Hirshfeld und Nathan 2020). Auf physikalischer Ebene beschreibt das Gesetz von Hagen-Poiseuille, welche Faktoren den Fluss des Blutes beeinflussen und unter anderem wie, auf den Blutkreislauf übertragen, sich der Druckgradient je nach Schubspannung in einer Arteriole verändert (Wheeler und Brenner 1995).

$$v = \frac{\Delta p \cdot \pi r^4}{\eta \cdot 8 l}$$

Abbildung 4. Gesetz von Hagen Poiseuille:  $\Delta p$ =Druckdifferenz zwischen den beiden Enden des betrachteten Rohrabschnittes;  $r$ = Innenradius des Rohres;  $V$ = Volumenstromstärke;  $l$ = Länge;  $\eta$ =Viskosität.

Bei einem konstanten Durchströmungsdruck steigt der Volumenstrom ( $V$ ) mit der vierten Potenz des Gefäßradius. Das bedeutet, dass die kleinste Änderungen im Gefäßradius durch die aktiven Umbauprozesse der Arteriogenese zu großen Blutflussveränderungen führen

können, wodurch das umgebende Gewebe versorgt werden kann (Wheeler und Brenner 1995).

Zu Beginn der Arteriogenese aktiviert der Anstieg der Schubspannung (*shear stress*) die sonst ruhenden Endothelzellen (Buschmann und Schaper 1999, Buschmann und Schaper 2000). In einem zweiten Schritt werden über eine erhöhte Chemokin-Ausschüttung im wachsenden Gefäß Monozyten rekrutiert, die sich über das Adhäsionsmolekül Mac-1 (*Macrophage-1 Antigen*) an das ICAM-1 (*Intracellular Adhesion Molecule 1*) der Endothelzellen anhaften (Heil und Schaper 2004, Hofer, van Royen et al. 2006). Durch eine MCP-1 (*Monocyte-Chemoattractant Protein-1*) vermittelte Signalwirkung wandern die Monozyten dann in den perivaskulären Bereich der wachsenden kollateralen Arterie und entwickeln sich in Makrophagen. So gelangen Makrophagen zum Ort des vaskulären *Remodelling*, wo sie als Zytokinproduzenten den Umbauprozess steuern. Chemokine wie GM-CSF unterstützen hierbei die Lebenslänge und Funktion der Makrophagen. Arteriogenese wird also durch einen lokalen inflammatorischen Prozess gesteuert (Shyy, Hsieh et al. 1994, Arras, Ito et al. 1998). Dies zeigten Scholz und Ito auch präklinisch am Hinterlauf Ligatur Modell am Kaninchen (Scholz, Ito et al. 2000). Diese Studie bewies, dass die experimentelle Gabe von MCP-1 oder GM-CSF das Wachstum der Kollateralen stimuliert. Durch die Ausschüttung des Wachstumsfaktors *Transforming growth factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) 12 wandern weitere Monozyten in den perivaskulären Raum ein. Weiterhin wird der *Basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) (Ohno, Cooke et al. 1995), *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*  (TNF $\alpha$ ) und auch Metalloproteinasen vermehrt im wachsenden Gefäß exprimiert. Somit kommt es nach der Okklusion eines großen Gefäßes zu einer schnellen Zellwandproliferation in den kollateralen Arterien und dieser Prozess der Arteriogenese vermittelt einen verbesserten Blutfluss im minderperfundierten Bereich distal der Okklusion (biologischer Bypass) (Arras, Ito et al. 1998, Buschmann, Busch et al. 2003). Die Arteriogenese gilt daher als der endogen wichtigste Kompensationsmechanismus im Falle einer arteriellen Stenose. Zudem wird endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) vermehrt exprimiert, welches eine direkte pro-arteriogene Wirkung auf die Umbauprozesse ausübt (Troidl, Tribulova et al. 2010). Ebenso hat die Stickstoffmonoxid Synthese auch zur Folge, dass durch die anhaltende Schubspannung die Kollateralen dilatieren, einen Vorgang den man, wie bei allen anderen Arterien, als „*flow mediated*“ Vasodilatation bezeichnet. Durch den erhöhten Blutfluss im Gewebe, kommt es zu einer Gefäßausdehnung (Dai und Faber 2010).

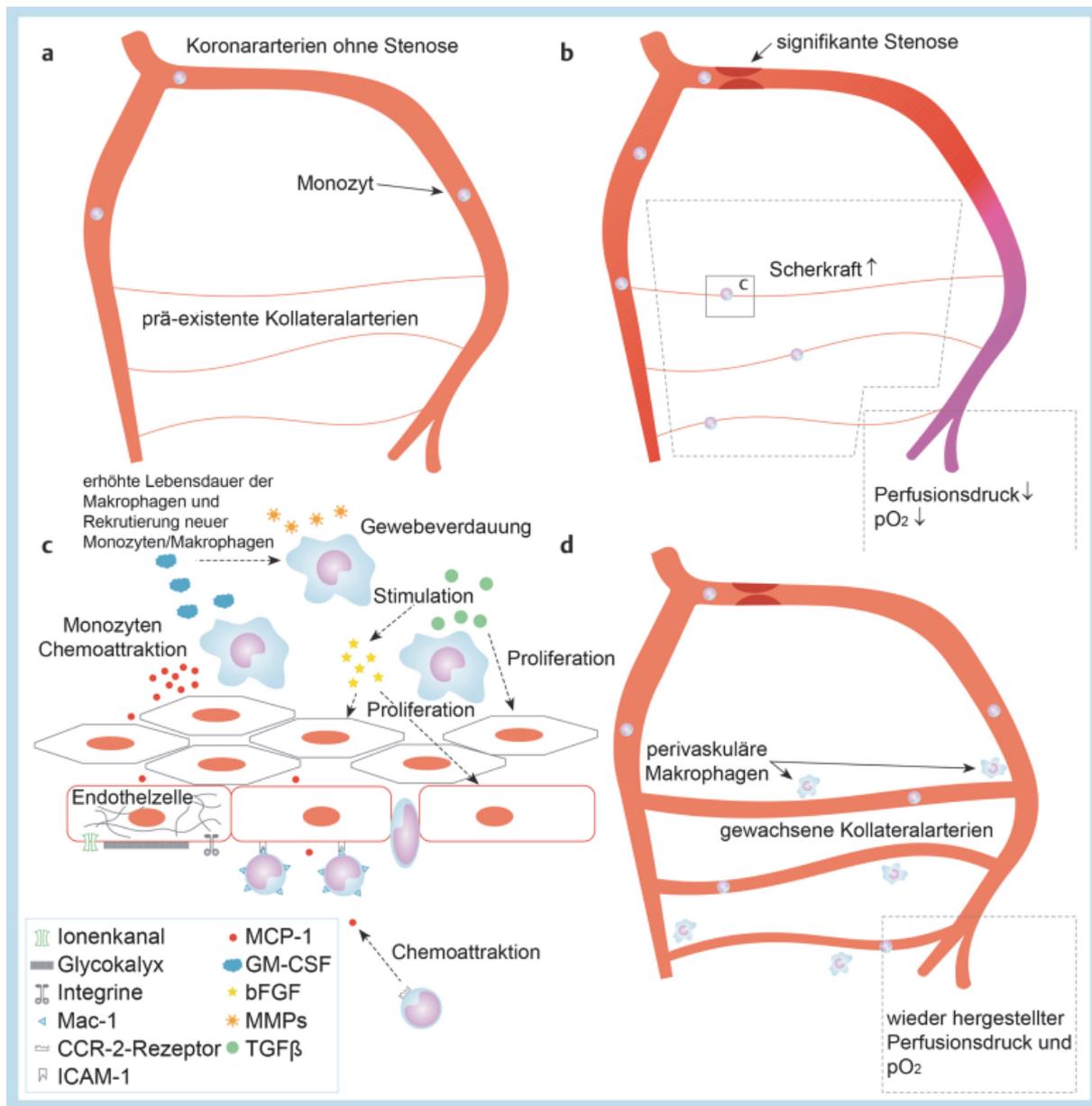


Abbildung 5. Modifiziert nach Schirmer, van Royen et al. 2009. In der Ausgangssituation [A] finden sich präexistente kollateralarterielle Anastomosen. Diese sind klein und mit geringem Blutfluss. Nach Stenose einer größeren Arterie kommt es zum Anstieg des Druckgradienten über die Kollateralarteriolen [B]. Die entstehende erhöhte Schubspannung aktiviert das kollateralarterielle Endothel über membranständige Rezeptoren, das endotheliale Zytoskelett sowie die Glykokalyx. Es folgt eine gesteigerte Chemokin-Expression zur Attraktion von Monozyten, die über das Adhäsionsmolekül Mac-1 an ICAM-1 der Endothelzelle adhären. Monozyten transmigrieren in den perivaskulären Raum und sezernieren Wachstumsfaktoren und Metalloproteinasen [C]. Proliferation und Größenwachstum der Kollateralarterien stellen schließlich Perfusionsdruck und Sauerstoffsättigung im distalen Gewebe wieder her.

Der Kardiologe Wolfgang Schaper gilt als einer der Begründer der Arteriogenese-Forschung. Er beschreibt das kollaterale *Remodelling* und teilt es in verschiedenen Stadien ein. Das Geschehen wird eingeleitet durch eine relativ „stille“ Ruhephase von bis zu zwei Tagen nach der Okklusion/Stenose, in der es zur Aktivierung von Endothelzellen sowie Adhäsion und Transmigration von Leukozyten in die kollateralen Arterien kommt. Dann beginnt das erste

Stadium, das durch phänotypische Endothelzell- und glatte Muskelzellveränderung gekennzeichnet ist, die zur Erhöhung der Blutgefäßdurchlässigkeit führt. Anschließend wird durch die Verdauung des extrazellulären Gefäßgerüst der gezielte Umbau des Kollateralgefäßes durch aktive Zellproliferation induziert. Es kommt hier zu einem Anstieg der mitotischen Aktivität von Endothelzellen und einen Tag später von glatten Muskelzellen. Es kommt dann zu einer Verbindung zwischen den Zellen durch den kreisförmigen Gerüstbau der glatten Muskelzellen, wobei Kollagen und Elastin gebildet werden. In dieser sogenannten Reifungsphase entsteht das größere Gefäß. Im letzten Stadium werden im Wettstreit um den besseren Blutfluss die kleineren Gefäße durch extreme Intimaproliferation geschlossen und danach abgebaut (*Pruning*). Die vergrößerten Kollateralen bleiben bestehen (Schaper 2009).

Herzog et al. demonstrierten in einer tierexperimentellen Studie an Ratten den Mechanismus der Arteriogenese. Es wurden hier mittels Gefäßabdrücken und postmortaler Angiographien die Oberschenkelarterie und die kollateralen Gefäße vor und nach Okklusion der A. femoralis untersucht. Es bildeten sich keine neuen Gefäße, stattdessen kam es zu einem deutlichen Gefäßwachstum der kollateralen Arterie durch Arteriogenese (Herzog, Sager et al. 2002).

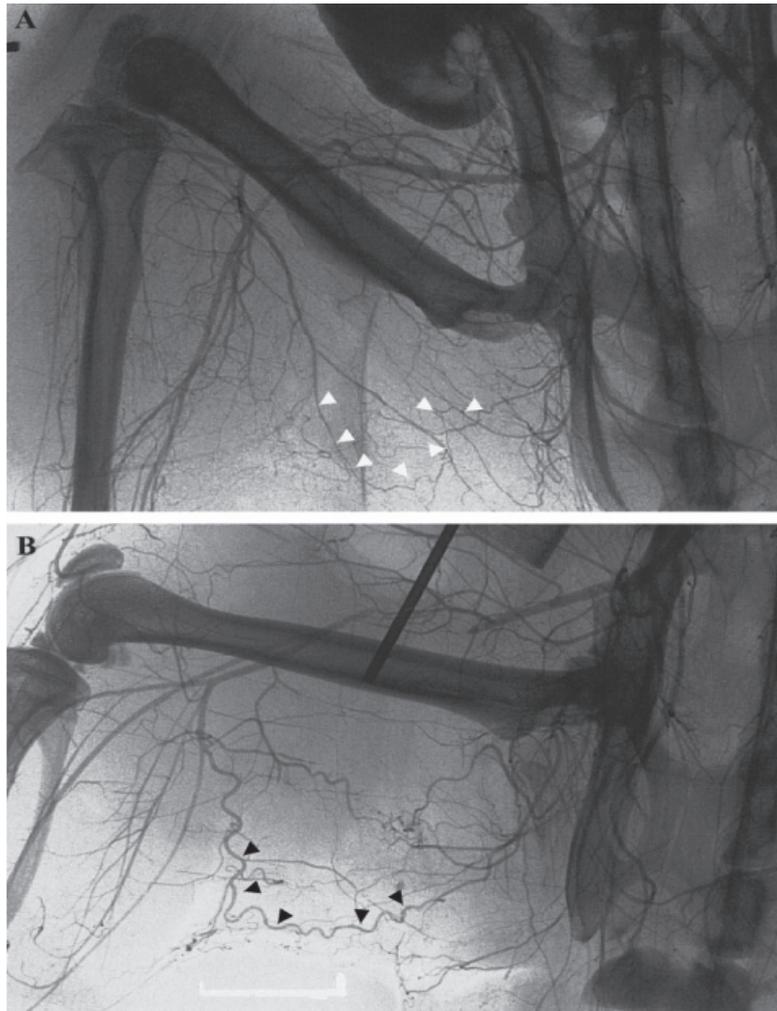


Abbildung 6. Postmortale Angiographie (Kontrastmittelgabe und Röntgen) der Hintergliedmaße einer Sprague-Dawley Ratte. Die Studie von Herzog, Sager et al. (2002) zeigt die Hintergliedmaße mit den prä-existenten arteriellen Anastomosen, die die Arteria iliaca interna mit der Arteria poplitea verbinden (Abbildung A). Die untere Abbildung zeigt die signifikant vergrößerten arteriellen Anastomosen nach dem siebentägigen Verschluss der Arteria femoralis. Die Anastomosen haben das charakteristisch korkenzieherartige Aussehen einer kollateralen Arterie (schwarze Pfeile) (Abbildung B) (Herzog, Sager et al. 2002).

Trotz allen bisherigen Erkenntnissen zu den zellulären und molekularen Abläufen der Arteriogenese sind alle Prozesse noch nicht im Detail verstanden. 2011 konnte durch Hillmeister et al. gezeigt werden (Hillmeister, Gatzke et al. 2011), dass die Arteriogenese auch durch Bradykinin-Rezeptor-Signalkwirkung maßgeblich gesteuert wird (siehe Punkt 2.4).

#### 2.2.4. Der biologische Bypass im Herzen

Anhand pathologisch-anatomischer Untersuchungen beobachteten Mitte des 20. Jahrhunderts erstmals Fulton, dass sich im Herzen zahlreiche Kollateralgefäße befinden, auch ohne dass diese im Zusammenhang mit einer Verschlusskrankheit stehen (Fulton 1964). Weitere Untersuchungen am Herzen zeigten, dass ein arterioläres Gefäßgeflecht im menschlichen Herzen zu finden ist, das aus kollateralen Gefäßen besteht, die keine Endarterien darstellen (Baroldi und Scmazzone 1967). Habib et al. untersuchten in ihrer Studie von 1991 am Menschen die Größe des Myokardinfarktes in Abhängigkeit vom Vorhandensein von Kollateralen. War ein kollaterales Gefäßgerüst gut ausgeprägt, war das Infarktgeschehen kleiner und die Funktion des Herzes nach diesem Infarkt deutlich verbessert (Habib, Heibig et al. 1991).

Mittels Studien am Hundeherz wurde nach mehrfachen Okklusionen des Ramus circumflexus der Arteria coronaria sinistra gezeigt, dass Hunde mit einem natürlich angeborenem und gut ausgeprägten koronaren Kollateralsystem ein beschleunigtes Wachstum der Gefäße aufwiesen, als jene ohne ein gut ausgebildetes koronares Kollateralsystem (Fujita, Yamanishi et al. 1994). Ein gut entwickeltes kollaterales Gefäßsystem kann daher bei Menschen mit einem chronischen Koronarsyndrom entscheidend für den weiteren Verlauf der Erkrankung sein. Die kardiale Sterblichkeit minimierte sich mit einem gut ausgebildeten Kollateralsystem bei einem kurzzeitigen Koronarverschluss um ein Viertel im Vergleich zu den Patienten, die wenig oder keine Kollateralen aufwiesen (Meier, Gloekler et al. 2007).

### 2.3. Tiermodelle in der Arteriogeneseforschung

Es wurden verschiedene Tiermodelle entwickelt, um die Verschlusskrankheiten in der Peripherie, im Gehirn und im Herzen zu simulieren und zu erforschen (Ito, Arras et al. 1997, Toyota, Kawaguchi et al. 2007). Seit mehr als 40 Jahren leisten diese tierexperimentellen Modelle einen großen Beitrag bei der Erforschung der interventionellen Kardiologie und der daraus folgenden Behandlung der Patienten, um die Morbidität und Mortalität zu senken (Allahwala, Weaver et al. 2019). Beispielsweise wurden so medikamentenbeschichtete Stents (Suzuki, Kopia et al. 2001) und auch die ersten Transkatheter-Herzklappen am Tiermodell erforscht (Cribier 2012).

Um den Prozess der Arteriogenese in einem prä-klinischen Modell zu untersuchen, ist es ausschlaggebend, eine fortschreitende Okklusion einer versorgenden Hauptarterie zu erzeugen. Dabei wird zunächst die Durchblutung des umliegenden Gewebes verringert, um

so die Möglichkeit des *Remodelling* der kollateralen Gefäße zu bewirken. Dabei ist, wie oben beschrieben, die Erhöhung des Blutflusses, und daraus resultierend die Schubspannung, der entscheidende Initiator der Arteriogenese (Schaper und Pasyk 1976, Nagel, Resnick et al. 1994, Sampath, Kukielka et al. 1995).

Bei Untersuchungen zur therapeutischen zerebralen Arteriogenese wurde von Busch et al. ein Drei-Gefäß-Verschluss (3-VO) an der Ratte etabliert, wobei drei von vier zum Gehirn führende Arterien verschlossen werden. Durch die resultierende zerebrale Minderperfusion kommt es zu einer Umleitung des Blutflusses über die kollateralen Anastomosen des *Circulus arteriosus Willisii*, welche das Hypoperfusionsareal mit Blut versorgen. In Folge kommt es zu einem kompensatorischen Wachstum dieser Kollateralgefäße im Gehirn (Busch, Buschmann et al. 2003). Mit demselben Modell konnte gezeigt werden, dass diese Form der adaptiven Arteriogenese pharmakologisch moduliert werden kann. So zeigte sich zum Beispiel, dass der Wirkstoff Acetylsalicylsäure (ASS) die zerebrale Arteriogenese im Gehirn der Ratte hemmt, Clopidogrel dies aber nicht tut. Beides sind Wirkstoffe, die oftmals zur sekundären Prävention von Gefäßverschlüssen eingesetzt werden (Duelsner, Gatzke et al. 2012). Das Wissen über die pharmakologische Modulation der Arteriogenese hat also klinische Relevanz.

Im peripheren Kreislauf wurden verschiedene Modelle zur Induktion der Arteriogenese etabliert. Wichtig ist hier das Hinterlauf-Ligaturmodell bei Maus, Kaninchen und Schwein, wo durch den experimentellen Verschluss der *A. femoralis* das Wachstum der Kollateralgefäße untersucht werden kann. Vorteile der Nutzung der Spezies Schwein und Hund liegen in ihren dem Menschen ähnlichen anatomischen Charakteristika wie beispielsweise Größe des Herzens und das ausgeprägte Kollateralsystem im Herzen. Allerdings sind als Nachteile besonders ethische Gründe zu nennen. In Studien am Schwein zeigte sich zudem, dass die Größe der Tiere in Bezug auf das *handling* bei der Arzneimittelgabe, aber auch wegen der großen Menge der zu verabreichenden Pharmazeutika, nachteilig ist und den Ablauf der Experimente erschweren. Daher werden primär Nagetiere wie Mäuse und Ratten in der Forschung genutzt. Diese Tiere bieten den Vorteil eines weniger komplizierten *handling* und schneller Reproduktion. Durch das Züchten von transgenen Stämmen können gezielt molekulare Untersuchungen durchgeführt werden, in denen einzelne Moleküle durch das Tier nicht mehr oder auch vermehrt gebildet werden können. So lassen sich Mechanismen in *loss-of-function* oder *gain-of-function* Modellen gezielt untersuchen und vergleichen. Neben der Maus und Ratte ist noch das Kaninchen als ein weiteres intensiv untersuchtes Tier in der Arteriogeneseforschung zu nennen (Schaper und Schaper 2004).

Unabhängig von jedem genutzten Tiermodell ist zu bedenken, dass kein Tiermodell den Organismus des Menschen perfekt spiegelt - weder in seiner Physiologie noch hinsichtlich der

Pathophysiologie (Sorop, van de Wouw et al. 2020). Auch wenn stetig im Sinne der 3 R (*siehe vorne*) nach Alternativmethoden gesucht wird (Rusche 2003, Petetta und Ciccocioppo 2021), ist die Erforschung der Arteriogenese im Herzen dennoch bisher nur am Tiermodell zu bewerkstelligen.

### 2.3.1. Das koronare Arteriogenesemodell

In den letzten 50 Jahren wurden an einer Reihe von Tieren koronare Arteriogenesemodelle entwickelt. Die anatomischen Gegebenheiten unterscheiden sich je nach Spezies. Größere Tiere wie Schwein und Hund wurden in den letzten Jahrzehnten oftmals in Studien zu ischämischen Herzkrankheiten genutzt. Anatomische Unterschiede sind beispielsweise im Verlauf der Koronararterien zu beachten. Auch wenn sich alle Herzkranzgefäße auf der epikardialen Seite des Herzens befinden, so verläuft das Koronargefäßsystem beim Schwein rechts-, beim Hund links-dominant (James und Burch 1958, Crick, Sheppard et al. 1998). In der Koronaranatomie der Nagetiere liegen die Arterien tiefer im Herzmuskel mit einer dünneren Schicht an glatten Muskelzellen. Das Herz der Maus und Ratte wird von einer linken und einer rechten Koronararterie versorgt (Roder, Hiller et al. 1997, Kumar, Hacker et al. 2005). Die Kapazität des koronaren Blutflusses ist bei Ratten und Mäusen allerdings geringer als bei Großtieren (Maxwell, Hearse et al. 1987). Wenn man wiederum den Vergleich zwischen Menschen und Ratte zieht, so ist das Koronargefäßsystem beim Menschen, anders als bei der Ratte, meist rechtsdominant. Die rechte Koronararterie versorgt sowohl die rechte Herzkammer als auch die Hinterwand des linken Ventrikels mit Blut. Die Versorgung der vorderen und seitlichen Wand des linken Ventrikels geschieht durch den *Ramus interventricularis anterior* und den *Ramus circumflexus* der linken Koronararterie (James und Burch 1958). In der Human- und Tiermedizin weichen die Bezeichnungen für manche Gefäße voneinander ab. So ist der *Ramus interventricularis anterior* (RIVA) der *Arteria coronaria sinistra* die gebräuchlichste Bezeichnung für das Gefäß in der Humanmedizin, wohingegen die Tiermedizin dieses Gefäß als *Ramus interventricularis paraconalis* im gleichnamigen *Sulcus* benennt (WAVA 2017). Im Folgenden wird die Abkürzung RIVA / LAD genutzt, um die Vergleichbarkeit mit dem Menschen deutlich zu machen.

Um die koronare Arteriogenese zu simulieren, kommen unterschiedliche Techniken zur Anwendung. Zum einen machte man sich die Ameroid-Technik zu Nutze. Ameroid-Konstriktoren bestehen aus einem Ring aus Kunststoff, Edelstahl oder Titan, die im Inneren ein Kaseinmaterial umschließen (Klocke, Tian et al. 2007, Keeran, Jeffries et al. 2017). Der Ameroid-Konstriktor wird von außen an der Koronararterie befestigt, um Flüssigkeit zu absorbieren und das Gefäß luminal zu verkleinern. Auf diese Weise wird ein

Koronarverschluss provoziert (Elzinga 1969, Schaper, Flameng et al. 1976, Radke, Heini-Green et al. 2006). Die Ameroid-Technik lässt sich allerdings aufgrund der anatomischen Größenverhältnisse nicht auf die Maus oder Ratte übertragen, was aus tierschutzrechtlichen Aspekten und ethischen Fragen notwendig ist. Es musste ein anderes Modell gefunden werden, um das koronare kollaterale Gefäßsystem in Maus und Ratte weiter zu erforschen (Schaper 2009).

Das in der vorliegenden Studie genutzte Modell wurde von Toyota et al. 2007 etabliert. Ziel von Toyota und Kollegen war es, eine ischämische Kardiomyopathie durch wiederkehrende Ischämie und Reperfusion zu provozieren. In diesem Versuchsaufbau wird eine Koronarstenose imitiert, die mit interstitieller Fibrose, Matrixumbau und Entzündungsreaktionen einhergeht (Toyota, Kawaguchi et al. 2007). Andere Forschungsgruppen nutzten das Modell von Toyota et al. und entwickelten es weiter, um die koronare kollaterale Gefäßbildung zu induzieren und die Mechanismen auf molekularer Ebene zu erforschen (Weihrauch, Tessmer et al. 1998, Gu, Weihrauch et al. 2003). In dem hier so genannten repetitiven okkludierenden Modell (ROP) nach Toyota et al., wird den Tieren unter Narkose ein Ballonokkluder auf die linke Koronararterie (LAD) implantiert. Dieser Ballonkatheter wird mit Hilfe eines computergesteuerten vollautomatischen Programms mit Luft inflatiert. Dieser repetitive Verschluss geschieht bei erhaltenem Herzkreislaufsystem und vollem Bewusstsein, ohne scheinbare weitere Beeinträchtigung des Gesundheitszustandes des Tieres (Toyota, Wartier et al. 2005, Toyota, Kawaguchi et al. 2007). Wie zuvor beschrieben, ist bei einem Tier ohne relevante Vorerkrankungen nachgewiesen, dass es durch den wiederholten Verschluss der Koronararterie zum Umbau von kleinen Arteriolen zu größeren Konduktanzarterien kommt, die in der Lage sind, das Gewebe distal des Verschlusses zu versorgen (Matsunaga, Wartier et al. 2000, Seiler 2003, Reed, Kolz et al. 2008). In Studien an Ratten zeigte das repetitive Okklusionsmodell erfolgreich, dass die Kollateralentwicklung im Herzen durch den wiederholten Verschluss der linken Koronararterie stimuliert werden konnte (Carrao, Chilian et al. 2009, Hutcheson, Terry et al. 2013, Gatzke, Hillmeister et al. 2018).

## 2.4. Molekulare Prozesse der Arteriogenese

Neben den bereits aufgeführten Mechanismen zum kollateralen Remodelling hat auf molekularer Ebene das Kallikrein-Kinin-System (KKS) eine wichtige regulatorische Wirkung auf das vaskuläre System im Allgemeinen sowie auf die Arteriogenese im Speziellen (Hillmeister, Gatzke et al. 2011).

### 2.4.1. Grundlagen

Anfang des 20. Jahrhunderts zeigten Abelous und Bardier erstmals die hypotensive Eigenschaft menschlichen Urins auf, nachdem sie diesen intravenös in das Blutgefäßsystem von Hunden appliziert hatten. Diese Eigenschaft führten sie auf den hohen Kiningehalt im menschlichen Urin zurück (Abelous 1909, Abelous und Bardier 1909). Bis dato waren die vielschichtigen Funktionen des KKS nicht bekannt. Frey et al. fanden die im Urin enthaltende Substanz auch in Blut, Pankreas und den Speicheldrüsen (Frey, Kraut et al. 1932). Sie benannten die Substanz daraufhin Kallikrein, abgeleitet von dem griechischen Wort „*kallikréas*“ für Pankreas, wo sie den Ursprung vermuteten (Kraut, Frey et al. 1930, Kraut, Frey et al. 1934). Aufgrund seiner Einflüsse im Blutdrucksystem und seiner hypotensiven Eigenschaften ordneten die Forscher Schmidt und Fritz 1989 das Kallikrein den Kreislaufhormonen zu und wiesen erstmalig auf die Verknüpfung zum Renin-Angiotensin System hin (Schmidt und Fritz 1989).

Das komplexe KKS greift mit seinen bioaktiven Peptiden in viele physiologische wie auch pathologische Prozesse ein. Beispiele hierfür sind die Regulation des Blutdrucks, die Natriumhomöostase sowie Entzündungsprozesse. Das Enzym Kallikrein definiert sich zum einen als Gewebekallikrein und zum anderen als Plasmakallikrein (Rhaleb, Yang et al. 2011). Plasmakallikrein liegt in seiner zymogenen Form im Plasma vor. Es ist an physiologischen Prozessen wie der Fibrolyse, der Gerinnung und der Aktivierung des Komplementsystems beteiligt (Colman 1980, Scicli, Mindroiu et al. 1982, Kaplan und Silverberg 1987). Das Gewebekallikrein hingegen kommt in vielen verschiedenen Geweben wie Arterien (Nolly, Scicli et al. 1985), Nebennieren (Scicli, Nolly et al. 1989) und Herz (Nolly, Carbini et al. 1994) vor. Plasma- und Gewebekallikrein vermitteln die enzymatische Umwandlung von Kininogen in die vasoaktiven Kinine, genannt Bradykinin und Kallidin. Gewebekallikrein setzt bei Nagetieren Bradykinin frei, beim Menschen hingegen wird Kallidin freigesetzt (Alhenc-Gelas, Marchetti et al. 1981, Mindroiu, Scicli et al. 1986). Kinine gehören zu den instabilen Oligopeptiden und werden als hauptsächlich lokal wirksame Hormone definiert (Erdös 1979).

Das Wort „Bradykinin“ wurde von Rocha et al. festgelegt und stammt auch aus dem Griechischen von *brady* = *langsam* und *kinin* = *Bewegung*. Sie beobachteten, dass eine Substanz aus Globulin und Trypsin freigesetzt wird, die sowohl eine blutdrucksenkende Wirkung als auch eine langsam fortlaufende Darmwandkontraktion im Meerschweinchen hervorrief (Rocha, Beraldo et al. 1949).

Kininogene werden in der Leber synthetisiert und sind die Vorläufer der Kinine. Nach ihrem molekularen Gewicht unterscheiden sie sich in hochmolekulares Kininogen (HMWK) und in niedermolekulares Kininogen (LMWK). Durch die proteolytische Spaltung von HMWK durch Kallikrein entsteht im Plasma Bradykinin (BK 1-9). Im Gewebe wird aus hochmolekularem und niedermolekularem Kininogen durch Kallikrein das Kallidin (Lys-Br-1-9) abgespaltet (Proud, MacGlashan et al. 1985). Im KKS wird die biologische Wirkung von Bradykinin, Kallidin oder anderen Kininen letztlich durch zwei Bradykinin-Rezeptoren vermittelt (Bradykinin-Typ-1-Rezeptor, Bradykinin-Typ-2-Rezeptor, siehe 2.4.2). Bradykinin kann ebenfalls aus der Aminopeptidase-vermittelten Spaltung von Kallidinpeptiden gebildet werden. Charakteristisch für diese Peptide ist, dass sie eine stärkere Wirksamkeit am Bradykinin-Typ-2-Rezeptor aufweisen (Regoli, Rhaleb et al. 1989). Dabei wird unterschieden in hydrolysierte und nicht hydrolysierte Kinine, die eine ähnliche biologische Aktivität besitzen (Regoli, Rhaleb et al. 1989, Kato und Enjyoji 1992).

Das KKS muss in seiner Wirkung genau reguliert werden. Dabei spielen die Kininasen eine entscheidende Rolle, da sie für die Degradierung der Kinine verantwortlich sind. Kininasen werden den Peptidasen zugeordnet und hydrolysieren Kinine und andere Peptide (Erdös 1979). Sie kommen sowohl im Blut als auch im Gewebe vor. Eine der bekanntesten Kininasen ist das *Angiotensin-Converting-Enzym* (ACE) oder auch Kininase II genannt, die sowohl Kinine inaktiviert als auch Angiotensin I zu Angiotensin II umwandelt. Neprilysin, auch als neutrale Endopeptidase 24.11. (NEP) bekannt, gilt als eine weitere wichtige Kininase. Diese inaktiviert nicht nur Kinine, sondern auch Endothelin, *brain natriuretic peptide* (BNP) und *atrial natriuretic peptide* (ANP) (Skidgel, Schulz et al. 1987, Skidgel und Erdos 2004). ACE und Neprilysin haben also eine wichtige regulatorische Funktion für die Bradykinin Rezeptor Signalwirkung. Charakteristisch für die Kininase I (Carboxypeptidase) ist Spaltung des C-terminalen Arginins der beiden Kinine. Dadurch entsteht des-Arg9-Bradykinin und des Arg9-Kallidin (Skidgel, Davis et al. 1984, Tan, Jackman et al. 1989), die eine hohe Wirksamkeit auf den Bradykinin-1-Rezeptor haben (Campbell 2000).

#### 2.4.2. Bradykinin, seine Rezeptoren und Funktionen

Mitte des 20. Jahrhunderts stellten Holton et al. eine bemerkenswerte Erkenntnis über Bradykinin vor. Nach subkutaner Injektion von Bradykinin traten die wichtigsten Symptome einer akuten Entzündung wie Gefäßerweiterung, erhöhte Gefäßpermeabilität und Schmerz auf (Holton und Holton 1952, Lewis 1964, Kellett 1965). In den darauffolgenden 70 Jahren wurden viele weitere Erkenntnisse über die Kinine erlangt.

Kinine entfalten ihre vaskulären Wirkmechanismen über zwei G-Protein-gekoppelte Rezeptortypen mit sieben Transmembran-Domänen, den Bradykinin Typ 1 Rezeptor (BKB1R) und den Bradykinin Typ 2 Rezeptor (BKB2R). Beide Rezeptoren lassen sich auf vielen verschiedenen Zelltypen wie glatten Muskelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, Epithelzellen, Lymphozyten, Monozyten, dendritischen Zellen, Osteoblasten und verschiedenen Tumorzellen finden (Walker, Perkins et al. 1995, Böckmann und Paegelow 2000, Qadri und Bader 2018). Unter physiologischen Bedingungen vermittelt Bradykinin seine Wirkungen durch den BKB2R Rezeptor (Regoli und Barabe 1980). Die BKB1R sind unter physiologischen Bedingungen oft nicht exprimiert bzw. nur in niedrigen Mengen vorhanden, während es zu einer gesteigerten Expression im Rahmen pathophysiologischer Vorgänge wie Entzündungen oder Ischämien kommt. Bradykinin hat die Fähigkeit, die vaskuläre Permeabilität zu steigern und eine Vasodilatation der Gefäße in verschiedenen Geweben zu bewirken (Regoli, Marceau et al. 1981, deBlois, Bouthillier et al. 1991). Mechanistisch kommt es dabei zu einer kininvermittelten Aktivierung der beiden Bradykininrezeptoren und in Folge zu einer Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO). Über den BKB2R kommt es zu einem Anstieg des intrazellulären Calciums ( $Ca^{2+}$ ), welche das Enzym eNOS aktiviert und somit die Produktion von NO fördert (Linz, Wohlfart et al. 1999, Heitsch 2003, Madeddu, Emanuelli et al. 2007). Die Aktivierung von BKB1R führt hingegen zur Produktion des Botenstoff cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP). Dieser ermöglicht das Eindringen von NO in die glatte Gefäßmuskelzelle, woraufhin diese dilatiert (Kuhr, Lowry et al. 2010). Zudem können Kinine über den BKB2R regulatorisch auf das Wachstum und die Proliferation von Kardiomyozyten sowie das Wachstum glatter Muskelzellen Einfluss nehmen. Macht man sich diesen Mechanismus zu Nutze und inhibiert ihn, können negative Effekte, die bei erhöhtem Blutdruck auftreten, wie die Verdickung der arteriellen Wände, reduziert werden (Emanuelli, Maestri et al. 1999, Madeddu, Emanuelli et al. 2000, Maestri, Milia et al. 2003). Kinine triggern auch die Transmigration von Blutzellen ins Gewebe. Zudem fördern sie die Prostaglandin- und Zytokinsynthese durch Akkumulation von Leukozyten in entzündetem Gewebe und wirken auf diesem Wege entzündungsfördernd (Regoli, Marceau et al. 1981, Couture und Girolami 2004). An sensorischen Nervenenden wirken sie durch ihre Rezeptoren schmerzverursachend (Dray und Perkins 1993).

Campbell et al. konnten nachweisen, dass zum Zeitpunkt eines Myokardinfarktes und bis zu drei Tage nach dem akuten Geschehen vermehrt Kininpeptide im Herzen nachweisbar sind. Dies ließ vermuten, dass Bradykinin kardioprotektiv ist und es folglich zur Eindämmung der Infarktgröße kommen kann (Duncan, Burrell et al. 1997, Campbell 2000). Weitere Studien an Ratte und Hund zeigten, dass es zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße nach intrakoronaren Bradykinin-Infusionen kam. Zudem wurde von weniger ventrikulären Arrhythmien berichtet, die Herzleistung verbesserte sich und es kam zu einer Normalisierung des Myokardstoffwechsel (Linz, Martorana et al. 1990, Martorana, Kettenbach et al. 1990, Linz, Wiemer et al. 1992).

### 2.4.3. Bradykinin und die Arteriogenese

In Vorarbeiten der Forschungsgruppe um Prof. Buschmann wurde vor ca. 20 Jahren unter Nutzung des Dreigefäßverschlusses (3-VO) im Rattenhirn das Wachstum der Kollateralgefäße untersucht (siehe 2.3). Der bereits oben erwähnte Dreigefäßverschluss erbrachte den funktionellen Nachweis zur kompensatorischen Wirkung der adaptiven Arteriogenese und einer Reduktion einer zerebralen Ischämie bei zusätzlicher Stimulation des kollateralen Remodelling (Busch, Buschmann et al. 2003). Um die molekularen Prozesse der adaptiven Arteriogenese weiter zu untersuchen, erforschten Hillmeister et al. mithilfe des 3-VO Modells die Genexpression in der frühen Phase der Arteriogenese in wachsenden Kollateralarterien (Hillmeister, Lehmann et al. 2008). Dabei konnte gezeigt werden, dass 91 Gene hochreguliert und 73 Gene herunterreguliert wurden. Hier gehörte Kininogen zu den signifikant hochregulierten Genen. Nach diesen Erkenntnissen geht man davon aus, dass Kininogene zu den potenziellen Biomarkern der Arteriogenese zählen und dass Kininogen in den wachsenden Kollateralgefäßen gebildet wird, sowie einen Anteil am Umbau der extrazellulären Matrix und des Gefäßes hat (Hillmeister, Lehmann et al. 2008). Eine weitere Studie befasste sich mit der Rolle der Kinin-Signalübertragung auf das periphere kollaterale Gefäßwachstum (Femoralis-Ligatur Modell), wobei *knock-out* Mäuse, welche keinen funktionellen Bradykinin-Rezeptor exprimieren konnten, genutzt wurden (Hillmeister, Gatzke et al. 2011). In dieser Studie wurde weiterhin untersucht, ob die Arteriogenese durch Bradykinin-Rezeptor-Antagonisten und -Agonisten moduliert werden kann. Dabei wurde ebenfalls das 3-VO Arteriogenesemodell in der Ratte genutzt. Die Ergebnisse geben Hinweis darauf, dass der Bradykinin-Rezeptor-Signalweg als molekularer Link zwischen der flussinduzierten Erhöhung der Schubspannung nach einem Arterienverschluss und der Freisetzung der Entzündungsmediatoren fungiert. In dieser Studie konnte eine besondere Rolle des BKB1R gegenüber dem BKB2R für die Arteriogenese ermittelt werden. Sowohl bei BKB1R-*knock-out*

Mäusen als auch im zerebralen Arteriogenesemodell in der Ratte, unter Nutzung eines BKB1R Antagonisten, konnte eine signifikante Reduktion der Arteriogenese aufgezeigt werden. Weiterhin konnte die zerebrale Arteriogenese in der Ratte mit BKB1R Agonisten signifikant therapeutisch stimuliert werden. Das beweist eindrucksvoll, dass die Arteriogenese durch pharmakologische Modulation des Bradykinin-Rezeptor-Signalweges inhibiert oder stimuliert werden kann, und eröffnet neue klinische Perspektiven. Der BKB2R wurde in der hier beschriebenen Studie ebenfalls untersucht, zeigte aber hier die gleichen Eigenschaften wie der BKB1R, jedoch mit deutlich geringerer Beteiligung am kollateralen *Remodelling* (Hillmeister, Gatzke et al. 2011).

## 2.5. Zusammenhang zwischen dem Kallikrein-Kinin-System und dem Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAAS)

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) wird als eine Hormonkaskade beschrieben, die in den Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushalt des Herz-Kreislaufsystems, der Nieren und Nebennieren eingreift und zur maßgeblichen Steuerung des Blutdrucks beiträgt (Carey und Siragy 2003). Durch die Freisetzung von Renin aus den juxtaglomerulären Zellen der renalen Glomeruli ins Blut wird Angiotensinogen zu Angiotensin I katalysiert. Dieses Peptid kann von ACE gespalten werden und wird zu Angiotensin II (Skeggs, Kahn et al. 1956, Ng und Vane 1968). Angiotensin II ist ein starker Vasokonstriktor und wirkt blutdrucksteigernd. Es entfaltet unter anderem seine Wirkung auf das kardiovaskuläre, adrenale und renale System durch Bindung an den Angiotensin-1-Rezeptor (AT1R), der G-Protein gekoppelt ist und in vielen Geweben vorkommt (de Gasparo, Catt et al. 2000). Zum anderen gibt es den Angiotensin-2-Rezeptor (AT2R), dessen Rolle aktuell in der Forschung noch vielseitig diskutiert wird (Ranjit, Khajehpour et al. 2021). Eine übermäßige Produktion von Angiotensin II führt zur Vasokonstriktion und folglich zu einer Blutdruckerhöhung, die negative Folgen auf das Herzkreislaufsystem haben kann (Regoli, Park et al. 1974, de Gasparo, Catt et al. 2000). Myozytenhypertrophie, Myokardumbau und Fibrose, oxidativer Stress und eine erhöhte Aktivität des Sympathikus sind Folge dessen und steigern die Morbidität und Mortalität (Weber und Janicki 1989, Oskarsson und Heistad 1997). Ebenso kommt es zum pathologischen *Remodelling* ausgelöst durch den erhöhten Blutdruck, der die arteriellen Gefäßwände verdickt, ohne das Lumen zu vergrößern (Hansson, Lindholm et al. 1999).

Die auf mehreren Ebenen stattfindende Interaktion zwischen dem KKS und RAAS ist hinreichend bekannt. Dabei erkannten Yang und Kollegen erstmals, dass es sich bei ACE und

der Kininase II um die identische Kininase handelt und diese eine Doppelwirkung haben. Zum einen wird, wie in Kapitel 2.4.1 erläutert, durch ACE Angiotensin umgewandelt und zum anderen Bradykinin degradiert (Yang, Erdös et al. 1970, Igic, Erdös et al. 1972).

Zusammenfassend sind KKS und RAAS zwei starke regulatorische Systeme der Gefäßmedizin, die sowohl in physiologische als auch pathologische Prozesse eingreifen und sich gegenseitig beeinflussen. Nach Mordi et al. stellt das KKS den wichtigsten Hauptmechanismus in der negativen Regulation des RAAS dar (Mordi, Mordi et al. 2016).

## 2.6. Medikamentöse Beeinflussung des RAAS

### 2.6.1. Angiotensinrezeptorblocker

Umfangreiche Forschungsarbeiten haben gezeigt, dass das RAAS an Endorganschäden beteiligt ist, wenn es im Rahmen verschiedener Herz-Kreislauf-erkrankungen wie Herzinsuffizienz, Hypertonie, Myokardinfarkt und Diabetes mellitus zu einer Überaktivierung des RAAS kommt. Studien weisen auf eine Verbesserung von Mortalität und Morbidität bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen durch eine medikamentöse Blockierung des RAAS hin (Franzosi 1998, Pfeffer, McMurray et al. 2003). Diese Hemmung ist zum einen über die ACE-Inhibitoren (ACEI), zum anderen über die Angiotensin-1-Rezeptorblocker (ARB) möglich. Wird ein ACEI eingesetzt, kommt es zur Reduktion von Angiotensin II und dadurch zur Senkung des Blutdrucks (Neal, MacMahon et al. 2000). Ein anderer Effekt ist die Erhöhung des Bradykininspiegels durch Verlängerung der Halbwertszeit von Bradykinin (Linz, Wiemer et al. 1995, Nussberger, Cugno et al. 1998). Eine bekannte Nebenwirkung der ACE-Inhibitoren wird der Bradykininerhöhung zugeschrieben und besteht in einem trockenen therapierefraktären Husten, seltener kommt es zur Entwicklung eines Angioödems (Coulter und Edwards 1987, Nishio, Kashiki et al. 2011). Aus diesem Grund wurden in den 90ziger Jahren als Therapiealternative die ARB auf den Markt gebracht. Diese führen zur Hemmung des AT1-Rezeptors und damit haben sie zudem eine unmittelbar hemmende Wirkung auf das lokal gebildete Angiotensin II (Goodfriend, Elliott et al. 1996, McMurray, Östergren et al. 2003). Es kommt aber nicht zu einer Blockierung der Bindung von Angiotensin II an den AT2-R und es wurde kein Einfluss auf den Bradykininmetabolismus festgestellt (Hillmeister, Nagorka et al. 2021, Li, Zemmrich et al. 2021).

Im Rahmen groß angelegter Medikamentenstudien zur Herzinsuffizienz wurde die positive Rolle von sowohl ACEI als auch ARBs im Menschen bestätigt (Pitt, Poole-Wilson et al. 2000,

Yusuf, Pfeffer et al. 2003, Majani, Giardini et al. 2005). In der CHARM-Studie erfuhren Patienten mit Herzinsuffizienz durch die Behandlung mit dem ARB Candesartan in Kombination mit einem ACEI eine Verbesserung ihres Gesundheitszustandes (Yusuf, Pfeffer et al. 2003). In der VALIANT Studie wurde als ARB Valsartan verwendet; es konnte zunächst keine Reduktion der Gesamtsterblichkeit beobachtet werden. Diskutiert wurden die Diskrepanzen im Behandlungsschema. Post-hoc-Analysen wiesen dann eine signifikante Reduktion der Krankenhauseinweisungen wegen eines erneuten Myokardinfarktes auf. Zu beachten waren arzneimittelbedingte Nebenwirkungen wie Hypotonie und renale Nebenwirkungen (Pfeffer, McMurray et al. 2003). Azizi und Ménard schlussfolgerten aus den beiden Studien, die sich im Hinblick auf die kardiovaskuläre Mortalität unterschieden, dass neben individuellen Prognosefaktoren der Patienten das absolute kardiovaskuläre Erkrankungsrisiko und die basalen Wirkungen des RAAS in die Dosisberechnung, das Verabreichungsintervall und die Beachtung des Therapieschemas einzuberechnen sind (Azizi und Ménard 2004).

Heute gehören ACEI und ARB zur Standardbehandlung von Patienten mit Herzinsuffizienz, Myokardischämie, Diabetes mellitus und Nephropathien und werden in der Prävention der koronaren Herzkrankheit eingesetzt (Knuuti, Wijns et al. 2020). Es ist allerdings weiterhin klärungsbedürftig, welche Medikamentenkombination am besten geeignet ist, um einen optimalen Schutz der Zielorgane zu gewährleisten (Stojiljkovic und Behnia 2007).

In Vorarbeiten zur vorliegenden Dissertationsarbeit wurde der ARB Candesartan auch im gleichen Arteriogenesemodell, unter Anwendung des repetitiv okkludierenden Programms, am Herzen der Ratte untersucht, um einen möglichen Effekt auf die Arteriogenese aufzuzeigen. Dabei wurde anhand von EKG-Auswertungen und Messungen der Infarktgröße durch eine Färbung mit 2,3,5-Triphenyltetrazolium (TTC) nachgewiesen, dass Candesartan allein keine Auswirkung auf die Arteriogenese hat und so keine protektiven Eigenschaften auf myokardiale Ischämien durch eine Stimulation des vaskulären Remodelling ausübt (Gatzke, Hillmeister et al. 2018). In einer weiteren kürzlich veröffentlichten Studie wurde ebenso eine mögliche Stimulation (oder auch Inhibierung) von ARB auf die zerebralen Arteriogenese im 3-VO Modell an der Ratte analysiert. Es konnten hier ebenso weder eine stimulierende noch eine hemmende Wirkung des ARB Candesartan auf die Arteriogenese im Gehirn der Ratte festgestellt werden (Hillmeister, Nagorka et al. 2021).

## 2.6.2. Medikament Entresto®: Angiotensin-Rezeptor-Neprilysin-Inhibitor

Das Medikament Entresto® besteht aus der festen Medikamentenkombination von Sacubitril und Valsartan und wird der Gruppe der Angiotensin-Rezeptor-Neprilysin-Inhibitoren (ARNI) zugeordnet. Der Wirkstoff Sacubitril ist dabei ein Neprilysin-Inhibitor, während Valsartan ein ARB ist. Die Wirkung von ARB wurde im Abschnitt zuvor beschrieben und hier soll nun die Wirkung des Neprilysin-Inhibitors erläutert werden.

Die neutrale Endopeptidase Neprilysin (NEP) gehört zur Familie der Metallopeptidasen. Dazu gehören unter anderem auch das *Endothelin-Converting-Enzyme* 1 und 2 (Turner, Brown et al. 2000). NEP verantwortet den Abbau von gefäßerweiternden Peptiden, wie dem atrialen natriuretischen Peptid, Brain-type natriuretisches Peptid, Substanz P, Bradykinin und auch Angiotensin II (Gu, Noe et al. 2010). Die Medikamentenklasse der Neprilysin-Inhibitoren nutzen die klinisch betrachteten positiven Wirkungen des endogenen natriuretischen Peptidsystems, indem sie den Abbau der oben genannten Peptide verhindern.

Im Ischämie-Reperusionsmodell am Kaninchenherzen konnten Schriefer et al. nachweisen, dass es durch Hemmung von Neprilysin zu einem verminderten Abbau von Bradykinin kommt (Schriefer, Broudy et al. 1996). Ende der neunziger Jahre durchgeführte experimentelle Studien bewiesen die Bedeutung einer gesteigerten Bradykinin-Konzentration und deren kardioprotektive Wirkungen nach einer Hemmung von Neprilysin (Wiemer, Schölkens et al. 1991, Schriefer, Broudy et al. 1996, Heusch, Rose et al. 1997). Zu diesem Zeitpunkt war die zugrunde liegende Pathophysiologie noch nicht hinreichend erforscht.

Weiteren Studien an transgenen Mäusen ohne das Neprilysin-Gen (Mme) oder unter Nutzung von Neprilysin-Hemmern, haben aber in den letzten Jahren auch von möglichen Gefahren berichtet, die eine unkontrollierte Erhöhung von Bradykinin zur Folge haben könnte (Lu, Figini et al. 1997). Wird Neprilysin gehemmt, steigt das Risiko für Angioödem (Nussberger, Cugno et al. 1998), Bronchokonstriktion (Crimi, Palermo et al. 1994) oder entzündliche Prozesse (Fischer, Zernig et al. 2002). Weiterhin wird Neprilysin auch mit der Entwicklung von Alzheimer (Vodovar, Paquet et al. 2015), der zerebralen Amyloid-Angiopathie und der altersbedingten Makuladegeneration in Verbindung gebracht (Feldman, Haller et al. 2016). Menschen mit einem Funktionsverlust oder einer Mutation im Mme weisen eine Prädisposition für eine axonale Polyneuropathie auf (Auer-Grumbach, Toegel et al. 2016, Higuchi, Hashiguchi et al. 2016).

In dieser Dissertationsarbeit wurde zum ersten Mal die Wirkung von ARNI auf die koronare Arteriogenese im ROP-Modell an der Ratte untersucht. Präziser gesagt wird die Wirkung von Neprilysin-Inhibitoren in Kombination mit ARB auf die Arteriogenese untersucht. Die Kombination der beiden Wirkstoffe kann hier eine besondere Rolle für das vaskuläre

*Remodelling* einnehmen, weil zum einen über Neprilysin das Bradykinin angereichert wird und zum anderen durch die Nutzung des ARB die negativen Folgen einer überschießenden Entzündungsreaktion, ausgelöst durch den Einsatz des Neprilysin-Inhibitors, kontrolliert werden könnte. Die Hypothese dazu wird unter 2.7. beschrieben.

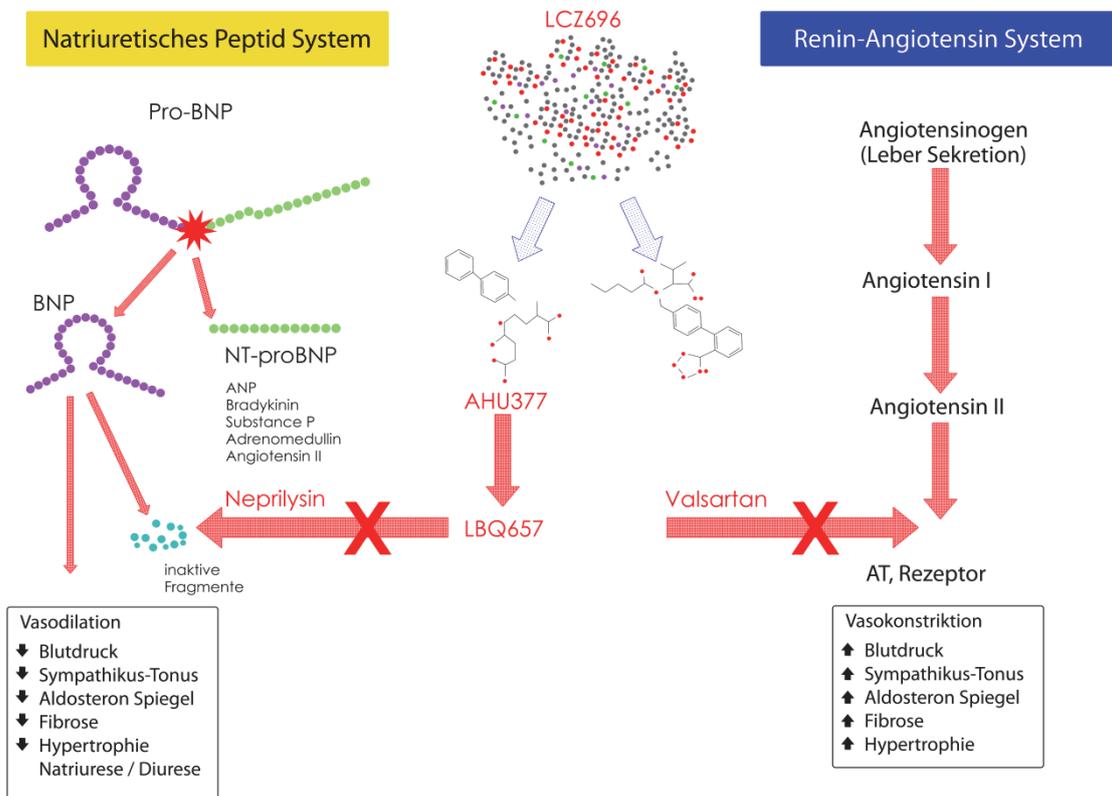


Abbildung 7. Modifizierte Übersicht nach Vardeny, Tacheny et al. (2013) über den pharmakologischen Aktivierungsweg und Mechanismus von dem ARNI Entresto® (LCZ696) (Vardeny, Tacheny et al. 2013).

Seit Jahrzehnten wurden vorrangig ACEI in der Behandlung der Herzinsuffizienz eingesetzt (Swedberg K. 1987). Im Jahr 2014 wurde die PARAGIM- HF Studie von MC Murray et al. veröffentlicht, welche 8842 Patienten mit Herzinsuffizienz und einer verminderten Auswurfraction untersuchte. Therapeutisch wurde Entresto® mit dem ACEI Enalapril verglichen. Die Ergebnisse belegen einen signifikanten Vorteil durch die Behandlung mit Entresto® im Gegensatz zu Enalapril, in Hinblick auf das relative Risiko für einen Krankenhausaufenthalt, kardiovaskulären Tod und die Senkung der Gesamtmortalität (McMurray, Packer et al. 2014, McMurray, Packer et al. 2014). Daraufhin wurde das Medikament Entresto® von der *US-Food and Drug Administration* (FDA) im Juli 2015 zur Behandlung von Patienten mit einer Herzinsuffizienz nach der *New York Heart Association*

Klasse II bis IV und einer zeitgleich verminderten Ejektionsfraktion zugelassen (Feldman, Haller et al. 2016).

Vorherige Forschungsergebnisse zeigten, dass Omapatrilat, ein Neprilysin-Hemmer und ACEI, gegenüber Enalapril, einem ACEI, in den untersuchten Endpunkten keine Verbesserung aufwies (Packer, Califf et al. 2002). Zudem traten als Nebenwirkung mehrfach schwere Angioödeme auf (Hegde, Yu et al. 2011). Solomon et al. erforschten in der PARAMOUNT Studie die Gabe von Entresto® im Vergleich zu Valsartan am Menschen. Primäre Endpunkte waren hier die Veränderung des NT-proBNP-Spiegels, ein Indikator für die ventrikuläre Wandbelastung und den Schweregrad der Herzinsuffizienz, der zu Beginn der Studie und nach 12 Wochen gemessen wurde. Entresto® war Valsartan signifikant überlegen - sowohl bei der Senkung der ventrikulären Wandspannung als auch des Blutdrucks (Solomon, Zile et al. 2012). Eine weitere Studie lieferte neue Erkenntnisse über die Wirksamkeit des ARNI Entresto®. Im Jahr 2017 begann die PARADISE-MI (*Prospective ARNI versus ACE Inhibitor Trial to Determine Superiority in Reducing Heart Failure Events after MI*) Studie. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass Patienten mit einem akuten Herzinfarkt (innerhalb von 0,5-7 Tagen nach Auftreten) sowie einer linksventrikulären Auswurfraction von  $\leq 40\%$  oder einer vorübergehenden pulmonalen Stauung keinen signifikanten Unterschied beziehungsweise Vorteil in der Behandlung mit dem ACE Hemmer Ramipril im Vergleich zu dem ARNI Entresto® hatten (Jering, Claggett et al. 2021, Pfeffer, Claggett et al. 2022). Die Indikation über den Einsatz des ARNI Entresto® nach dem Event eines Myokardinfarktes wurde so aktuell erforscht. Allerdings bedarf es hier weiterhin einer Klärung der genauen Wirkungsweise des ARNI. Dies wird in der Hypothese dieser Arbeit im folgenden Kapitel 2.7 aufgegriffen.

## 2.7. Auswertungsmethode: Mikrosphärenperfusionsmessung

Die Mikrosphärenperfusionsmessung ermöglicht einen direkten Nachweis für den Prozess der Arteriogenese. In den regionalen Blutfluss verabreichte Mikrosphären (Mikrokugeln) ermöglichen eine Aussage über die lokale Perfusion, welche in dem zu untersuchenden Gewebe herrscht (Heymann, Payne et al. 1977). Dabei gilt, dass die Anzahl der sich in der Region befindlichen Mikrosphären im Gewebe proportional zur Anzahl derer in der Blutbahn ist (Buckberg, Luck et al. 1971). Es gibt drei verschiedene Messmethoden, welche unterschiedliche Mikrosphärenarten nutzen, nämlich die radioaktiven Mikrosphären, die fluoreszierenden Mikrosphären sowie die mit stabilen Isotopen markierten Mikrosphären, die

durch Neutronenaktivierungsanalyse gemessen werden. In dieser experimentellen Arbeit wurde die Markierung von Mikrosphären mit stabilen Isotopen gewählt, welche aktiviert werden können und durch emittierte Strahlung mit einer hochauflösenden Detektionstechnik gemessen werden (Reinhardt, Dalhberg et al. 2001, Kingma, Simard et al. 2005). Diese Methode wird sowohl im peripheren Blutkreislauf als auch im Herzen von verschiedenen Tierarten wie dem Schwein (Halkos, Zhao et al. 2008), Hund (Zhang, Bissing et al. 2001), Kaninchen (Grinberg, Hou et al. 2004), Ratte (Fukuda, Kaga et al. 2004, Hutcheson, Terry et al. 2015) und Pferd (Manohar und Goetz 2005) genutzt.

### 2.8. Hypothese und Ziel der Arbeit

Die koronare Arteriogenese ist der wichtigste kompensatorische Mechanismus bei einer myokardialen arteriellen Stenose. Das KKS wurde in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe um Prof. Buschmann als einer der stärksten Modulatoren des kollateralen *Remodelling* identifiziert und über eine Anreicherung von Bradykinin zur Aktivierung der Bradykinin Rezeptoren kann die Arteriogenese therapeutisch stark stimuliert werden. Zahlreiche Studien zeigten zudem eine starke kardioprotektive Wirkung von Bradykinin, was als große Chance gesehen werden kann. Ausschlaggebend in der medikamentösen Therapie ist, die durch den erhöhten Bradykinin-Spiegel auftretenden positiven renalen und kardiovaskulären Effekte zu erzielen und die negativen Auswirkungen zu kontrollieren (Campbell 2018). ARNI erhöhten einerseits über Neprilysininhibitoren das Bradykinin und andererseits kommt es zur Reduktion, der von Bradykinin initiierten überschüssigen inflammatorischen Prozesse, welche durch den ARB vermittelt wird. Auch wenn ARNI in verschiedenen groß angelegten Studien im Kontext der Herzinsuffizienz erforscht wurde, sind die zugrundeliegenden Mechanismen weitgehend unverstanden (Solomon, Zile et al. 2012, Jering, Claggett et al. 2021, Pfeffer, Claggett et al. 2022).

Die Arbeitshypothese dieser Studie besagt, dass die koronare Arteriogenese therapeutisch durch ARNI stimuliert werden kann und somit den natürlichen Zeitverlauf der Arteriogenese beschleunigt. Eine therapeutische Stimulation der koronaren Arteriogenese wirkt protektiv auf myokardiale Ischämien und verhindert so das Voranschreiten einer Herzinsuffizienz. Die formulierte Hypothese begründet eine pro-arteriogene Wirkung von ARNI hauptsächlich durch eine Anreicherung von Bradykinin durch den Neprilysininhibitor sowie eine therapeutische Steigerung der Arteriogenese über den Bradykinin-Rezeptor-Signalweg. In dieser Dissertationsarbeit soll daher untersucht werden, ob ARNI die koronare Arteriogenese therapeutisch steigert.

### 3. Tiere, Material und Methoden

#### 3.1. Tierversuchsgenehmigung

Die Tierversuche dieser Dissertationsarbeit wurden nach dem in den USA gültigen Tierschutzgesetz, AWA (*Animal Welfare Act*) und dem PHS (*Policy on Human Care and Use of Laboratory Animals*) in Valhalla, New York, USA ausgeführt. Das IACUC (*Institutional Animal Care and Use Committee*) des New York Medical College, Valhalla, USA, genehmigte diesen Versuch unter der Genehmigungsnummer 80-1-1217 am 20.12.2018. Die Tierversuche wurden im Zuge einer Kooperation zwischen Prof. Dr. Ivo Buschmann / Dr. rer. nat. Philipp Hillmeister (Universität Brandenburg, MHB, Dtl.) und PHD Petra Rocic (New York Medical College, USA) durchgeführt. Die Leitung des Versuchsvorhaben vor Ort hatte Frau PHD Petra Rocic, Stellvertreter/in in Deutschland waren Frau Dr. Nora Gatzke (Universität Brandenburg, MHB) und Herr Prof. Dr. Michael Bader (MDC, Berlin). Der Tierversuchsantrag in Deutschland lief unter der Genehmigungsnummer (G0326/17).

#### 3.2. Versuchsdesign

Insgesamt wurden 32 Ratten für die Studie hinzugezogen. Diese wurden randomisiert auf vier Gruppen aufgeteilt, sodass jede Gruppe  $n = 8$  Tieren umfasste.

1. **Rop-Gruppe:** Tiere erhielten die Initial- und Finaloperation und das Computer-gesteuerte repetitiv okkludierende Programm (ROP)
2. **Sham-Gruppe:** Tiere erhielten die Initial- und Finaloperation, wurden aber nicht an das ROP angeschlossen
3. **Rop\_ARNI-Gruppe:** Tiere erhielten die Initial- und Finaloperation sowie ROP und das Medikament ARNI
4. **Rop\_ARB-Gruppe:** Tiere erhielten die Initial- und Finaloperation sowie das ROP und das Medikament ARB

Gruppe 1 und 2 sind die Kontrollgruppen.

Gruppe 3 und 4 sind die Wirkstoffgruppen.

Diese Studie zielt auf die Untersuchung der Wirkung von ARNI auf die myokardiale Arteriogenese. Ziel war es auch eine mögliche Wirkung der ARNI Einzelmedikation Sacubitril und ARB zu untersuchen. Es wurde eine ARB Medikations-Gruppe untersucht, aber von einer reinen Sacubitril Medikations-Gruppe aufgrund der zu erwartenden Nebenwirkungen einer reinen Nephilysinhemmung und den bereits bekannten signifikanten Nebenwirkungen, wie durch die kombinierte ACE-Nephilysin-Hemmung, abgesehen (Hegde, Yu et al. 2011, Ayalasomayajula, Langenickel et al. 2017).

- Wirkstoffgruppe Rop\_ARNI  
ARNI (LCZ696ABA, Entresto® (Sacubitril und Valsartan))

7 Tage ROP à 8 Tiere

1xtgl 68mg/kg LCZ696-ABA in 0,5ml  
Wasser *per os*

- Wirkstoffgruppe Rop\_ARB  
ARB (Valsartan)

7 Tage ROP à 8 Tiere

1xtgl 33mg/kg Valsartan in 0,5ml Wasser  
*per os*

Bei den beschriebenen Medikamentengaben wurden die Dosierungen auf Grund der „*Guidance to investigators for formulating and administering LCZ696-ABA and Valsartan to rats*“ verabreicht.

### 3.3. Versuchstiere und deren Haltung

In dieser Forschungsarbeit wurden männliche Sprague-Dawley Ratten genutzt. Als Versuchstiere wurden Ratten ausgewählt, da für diesen Organismus wichtige Modelle der peripheren, koronaren und zerebralen Arteriogenese etabliert und standardisiert wurden. Die Handhabung von Ratten ist einfacher und günstiger als bei Großtieren und liefert die Perspektive für eine spätere weitere Untersuchung der Arteriogenese mit transgenen Ratten. Für diese Arbeit wurde das repetitiv-okkludierende Protokoll am Herzen genutzt. Die Ratten stammten aus der Zucht der Charles River Laboratories, Wilmington, MA.

Die zehn bis zwölf Wochen alten Ratten hatten während des Versuches ein Gewicht von 300 – 350g. Nach ihrer Ankunft im New York Medicial College, USA, verblieben die Tiere mindestens 48 Stunden in ihren Käfigen, um sich an die neue Umgebung zu gewöhnen. Während des Versuches wurden Makrolonkäfige genutzt, welche mit sterilisiertem Weichholzgranulat (New York Medicial College Animal Facility, USA) eingestreut wurden. Futter und Wasser (New York Medicial College Animal Facility, USA) standen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Zur Beschäftigung gab es ein Stück Holz und als Unterschlupfmöglichkeit hatten die Ratten Papier als Baumaterial zur Verfügung. In den extra angefertigten Deckeln für die Käfige befand sich mittig ein Loch. Durch dieses wurde eine Metallfeder geführt und befestigt, welche am Nacken des jeweiligen Tieres festgenäht war, um den Ballonkatheter außerhalb des Tierkörpers zu schützen (siehe Versuchsaufbau 3.3.2). Die Metallfeder erlaubte den Tieren sich frei innerhalb des Käfigs zu bewegen, ihrer Art entsprechend Futter und Wasser aufzunehmen und ihre normale Körperhaltung, beispielsweise im Schlafen, einzunehmen. Die Tiere wurden jeweils während des Versuches einzeln, aber in Sicht- sowie olfaktorischem und akustischem Kontakt zu ihren Artgenossen gehalten. Der Hell-Dunkel Rhythmus im Beleuchtungssystem betrug während des gesamten Versuches zwölf Stunden.

### 3.4. Experimentelle Methode: Induktion der Arteriogenese am Herzen

#### 3.4.1. Narkose

Die Einleitungsnarkose wurde in Form einer intraperitonealen Injektion (25 GA Kanüle) aus Ketamin 75mg/kg und Xylazin 5 mg/kg verabreicht. Sobald das Tier in das Narkosestadium verfiel, sichtlich an dem Erschlaffen des Muskeltonus und der fehlenden Reaktion auf den Lid- und Zwischenzehenreflex, wurde es im Brust- und Nackenbereich geschoren. Es wurde auf die OP-Fläche mit elektrischer Heizmatte gelegt, welche die physiologische Körpertemperatur während des Eingriffes aufrechterhielt. Jedes Auge wurde mit Augensalbe zum Befeuchten der Netzhaut während der Dauer der Operation versorgt. Dann wurde die Ratte an allen vier Gliedmaßen mit kleinen Plastikschläuchen in Rückenlage fixiert. Nochmals wurde durch Reflextestung an Augen und Füßen die Narkosetiefe kontrolliert und dann das Tier oral intubiert. Die orale Intubation erfolgte mit Hilfe eines Kleintierotoskops, so dass die Sicht auf den Kehledeckel frei war. Als Tubus wurde ein Kleintierkatheter (16 GA 48mm BD Angiocath) genutzt. Daraufhin wurde die Beatmungsanlage (Anesthesia Workstation Hallowell mit einer *respiratory rate*: 65/min; *tidal volume*: 8ml/kg) an den Tubus angeschlossen und die Inhalationsnarkose mit einem Gemisch aus Sevofluran (1.0 - 2.0 % Sevofluran) und Sauerstoff (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) eingeleitet. Der Tubus wurde mittels eines Fadens (3-0 Silk) um die Nase und Vorderzähne des Tieres fixiert.

Danach wurde das Operationsfeld mit Jod und Alkohol desinfiziert.

#### 3.4.2. Initialoperation

Der Operateur trug sterile Handschuhe und Kittel. Alle chirurgischen Abläufe fanden in einer reinen Umgebung mit sterilen chirurgischen Instrumenten statt. Die linksseitige Thorakotomie begann mit einem Hautschnitt auf dem Sternum von ca. zwei cm. Daraufhin wurde der dritte bis vierte Interkostalraum aufgesucht und die Muskulatur mit Hilfe des Elektrokauters eröffnet. Das Tier wurde auf die Seite umgelagert, so dass der linke Ventrikel sichtbar wurde. Auf das rhythmisch schlagende Herz wurde nach Eröffnung des Perikards der Ballonkatheter (Okkluder) auf die LAD (*left anterior descending artery*) im linken Ventrikel genäht. Dazu wurde der Katheter bei den ersten zwei Knoten kurzzeitig (< 40 sec) durch eine Spritze manuell mit 0,6ml Luft aufgeblasen. Bei den restlichen fünf Knoten wurde die Luft wieder abgelassen, so dass der Ballonkatheter weiter im entspannten Zustand ohne Druck auf das Herz genäht wurde. Der richtige Sitz des Ballonkatheters wurde durch das visuell sichtbare Erblässen der linken Ventrikelwand während der manuellen Inflation des Katheters überprüft und anhand der reaktiven Hyperämie, nachdem der Okkluder wieder entlüftet wurde, kontrolliert.

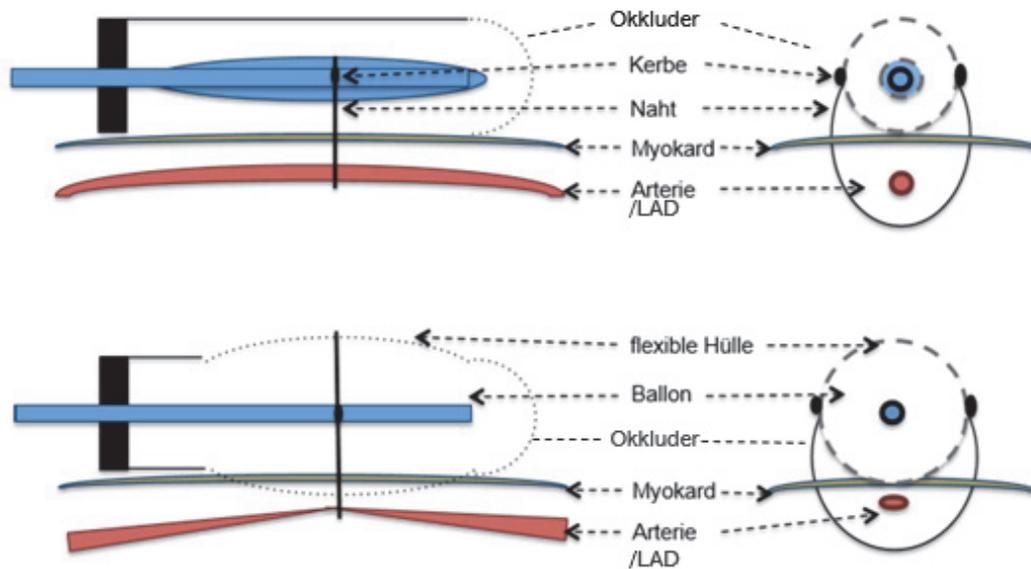


Abbildung 8. Modifizierte schematische Darstellung eines adaptierten pneumatischen Miniokkluder nach Toyota, Kawaguchi et al. (2007). Oben: Befestigter Okkluder (Ballonkatheter) im „entspannten“ Zustand ohne Okklusion des Gefäßes. Unten: Pneumatische Inflation des befestigten Okkluders führt zur Kompression der left anterior descending artery (LAD). Die Kerbe dient der Befestigung des Nahtmaterials am Okkluder. Die flexible Hülle ermöglicht die Inflation.

Danach wurde das Tier wieder auf den Rücken umgelagert und der Thorax mit einem 3.0 Silk Faden verschlossen (drei bis vier Stiche auf jeder Seite der Rippen die angrenzend an die Öffnung waren). Der Brustkorb wurde unter negativem expiratorischem Druck mit einem Katheter (22 GA Angiocath) in Verbindung mit einer 3ml Spritze Luft-evakuiert.

Der Ballonkatheter wurde subkutan zwischen den Schulterblättern hindurchgeführt und in eine Edelstahlfeder zum Schutz nach außen gezogen. Dieser wurde in der Nackenmuskulatur an dem sich am Ende befindenden Ring festgenäht (Vicryl, 8-0). Die Edelstahlfeder wurde an einem flexibel rotierenden System befestigt und stellte sicher, dass sich die Ratte frei im Käfig bewegen konnte und der Ballonkatheter innerhalb des Käfigs vor der Ratte dennoch geschützt war.

Nachdem die Haut mit Klammern an Brust und zuletzt im Nacken verschlossen wurde, wurde der Wundbereich mit Jod desinfiziert. Anschließend wurde das Tier extubiert als der Lidreflex und Schluckreflex wieder einsetzten und für mindestens zwei weitere Stunden beobachtet.

Nach einer Erholungsphase von 24 Stunden wurde das Protokoll der repetitiven Okklusion gestartet.

### 3.4.3. Repetitives okkludierendes Protokoll (ROP)

Das System der repetitiven Okklusion wurde genutzt, um eine wiederholbare Ischämie des Herzmuskels im Bereich des linken Ventrikels zu produzieren.

Der dazu genutzte Ballonkatheter wurde auf die vordere linke absteigende Koronararterie genäht, so dass beim Aufblasen des Katheters mit 0,6 ml Luft die Arterie kurzzeitig verschlossen wurde. Die Inflation des Okkluders und der daraus resultierende Verschluss der LAD wurde durch eine Software an einem externen Computer gesteuert und ermöglichte eine genaue Wiederholung des festgelegten Programmablaufes aus Inflation- und Ruhephasen.

Dieses Protokollablauf (siehe Abbildung 9) bestand aus einem acht Stunden Zyklus, der sich innerhalb von 24 Stunden drei Mal wiederholt. Innerhalb dieser acht Stunden gab es eine Deflationsphase von fünf Stunden und 40 Minuten, in der der Ballonkatheter nicht aufgeblasen wurde und eine Inflationsphase von zwei Stunden und 20 Minuten. Die Inflationsphase war hier in sich noch einmal in 20-Minuten Phasen unterteilt, welche wie folgt reguliert wurden: jede 20-minütige Phase war unterteilt in die Inflationsphase, in welcher der Katheter für 40 Sekunden mit Luft aufgeblasen wurde und eine Deflationsphase von 19 Minuten und 20 Sekunden, in welcher der Katheter sich wieder im Deflationszustand befand.

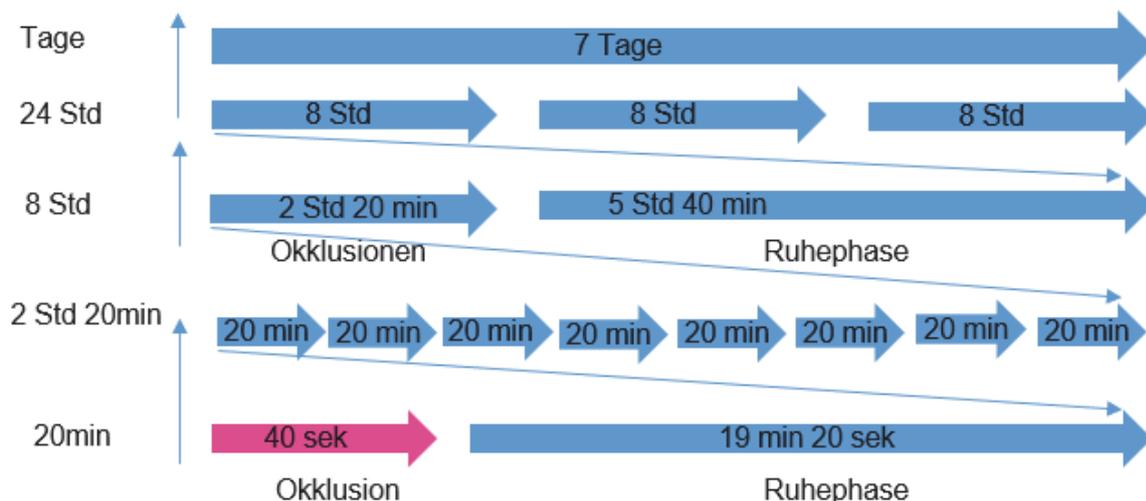
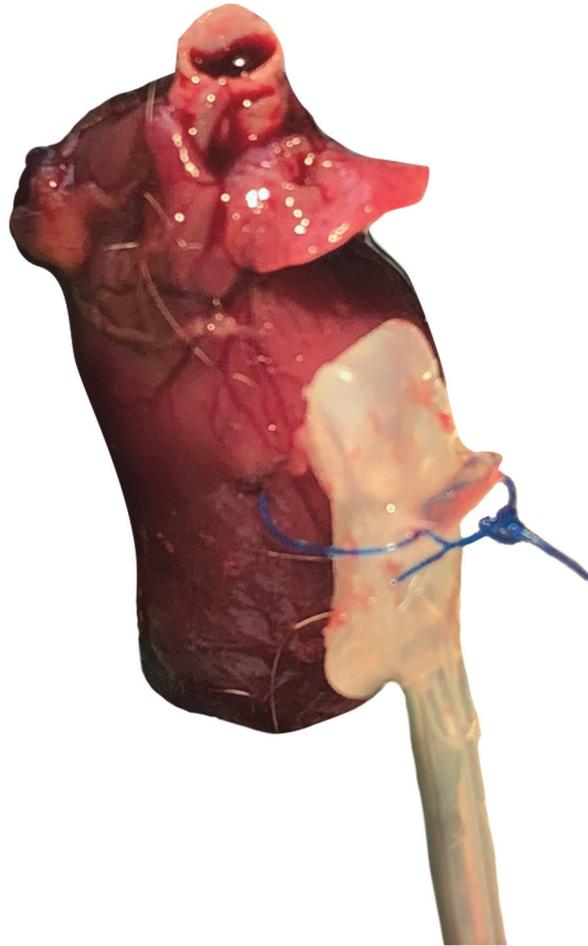


Abbildung 9. Schematische Darstellung des verwendeten Zeitprotokolls des repetitiv-okkludierenden Programms. Ein Okklusionszyklus entspricht der druckkontrollierten Inflation des Ballonkatheters mit Luft alle 20 Minuten für 40 Sekunden und anschließender sofortiger Deflation (Ruhephase) für 19 Minuten und 20 Sekunden.

Bei allen Tieren aller Gruppen wurde der Ballonkatheter implantiert. Allerdings erhielten lediglich die Rop-Gruppen das festgelegte Protokoll von Inflation und Deflation. Die Kontrollgruppe, hier genannt Sham-Gruppe, erhielt den Okkluder implantiert, aber kein Protokoll von Inflation und Deflation. Die Sham-Gruppe wurden also nicht an den externen Computer angeschlossen (siehe Versuchsdesign, Kapitel 3.2.).

#### 3.4.4. Finaloperation

Nach Beendigung des Protokolls an Tag sieben wurden die Tiere wie zur Initialoperation in Narkose gebracht und oral intubiert. Nachdem das Tier an das Beatmungsgerät angeschlossen war, wurden zunächst die Klammern im Nacken und anschließend die Fäden, die den Ring der Edelstahlfeder hielten – samt Feder - entfernt. Daraufhin wurde der Okkluder mit 0,2 ml Wasser aufgeblasen und eine Klemme am Ende des Okkluders befestigt, so dass das Wasser nicht entweichen konnte. Die Dauer dieser Inflation betrug 30 Minuten und diente als experimentelle Infarktsetzung, da es hier zu einer unumkehrbaren permanenten LAD Okklusion kam. Dem schloss sich eine 20-minütige Reperfusionphase an, da es auch nach der ischämischen Phase in der Reperfusionphase zu einer zusätzlichen Gewebeschädigung des Herzens kommt, welches die Kollateralbildung beeinflusst und am Funktionsverlust des Endorgans, hier dem Herzen, beteiligt ist (Simon, Oberhuber et al. 2018). Danach wurde das Herz mittels der medialen Thorakotomie entnommen.



*Abbildung 10. Herz mit befestigtem Ballonkatheter kurz nach der Entnahme nach der Finaloperation. Hierbei handelt es sich um einen Bildausschnitt.*

### 3.5. Behandlung

#### 3.5.1. Zeitlicher Ablauf

Nach der Ankunft im New York Medicial College (USA) wurden die Tiere in den hauseigenen Stall verbracht und dort für eine Eingewöhnungszeit von mindestens zwei Tage vor Versuchsbeginn gehalten.

Von Tag 0 (Operationstag) bis Tag 7 (Finaloperation) saßen die Tiere in Einzelkäfigen in Sichtkontakt zu ihren Artgenossen.

Die Tiere erhielten eine tägliche Gesundheitskontrolle sowie Gewichtskontrollen im gesamten Versuchsablauf.

Am Ende der Operation sowie einmalig nach 12 Stunden wurde allen Tieren Buprenorphin (Buprenex 0.05mg/kg) subkutan als Schmerzmittel verabreicht. Sollte in den folgenden Gesundheitskontrollen Zeichen von Unwohlsein, Apathie, Schmerzäußerungen oder sonstiges Schmerzverhalten auftreten, wurde nach Bedarf weiteres Buprenorphin verabreicht.

Je nach ihrer Gruppeneinteilung erhielten die Ratten einmal täglich die Medikation über eine Gavage oral verabreicht, wie folgt:

- Rop: nur H<sub>2</sub>O
- Sham: nur H<sub>2</sub>O
- Rop\_ARNI: ARNI (Entresto®) in H<sub>2</sub>O gelöst
- Rop\_ARB: ARB (Valsartan) in H<sub>2</sub>O gelöst

### 3.5.2. Euthanasierung vor Versuchsende

Bei einem Gewichtsverlust von über 20 %, anhaltender Apathie, untypischem Verhalten wie vernachlässigen des Putzens oder sonstigen Schmerzäußerungen vom Tier ausgehend, wurde dieses umgehend schmerzlos getötet. Dabei wurde das Tier mit einer doppelten Dosis Ketamin / Xylazin (2x (75mg/kg + 5mg/kg)) in Narkose gelegt und bekam darauffolgend eine Überdosis O<sub>2</sub> und Sevofluran (6,0 %) durch eine Narkosemaske verabreicht. In diesem Stadium wurde das Tier für 15 Minuten belassen, bevor das Herz durch eine mediale Thorakotomie entnommen wurde.

## 3.6. Auswertmethodik

### 3.6.1. Mikrosphären

Isotop markierte Mikrosphären ( $5 \times 10^5$ , 5  $\mu$ M) der Firma BioPAL Inc. (Worcester, USA) wurden in das Lumen des linken Ventrikels sowohl bei Initial- als auch Finaloperation injiziert, um die koronare Kollateralperfusion zu beurteilen. Dazu wurden zwei mit unterschiedlichen Isotopen markierte Mikrosphären genutzt, hier Gold und Samarium, um die Zeitpunkte der Injektion in der Auswertung unterscheiden zu können. Die in den Blutfluss injizierten Mikrosphären lagern sich in der Region ab, die von der entsprechenden Arterie versorgt wird. Die Konzentration der abgelagerten Mikrosphären ist proportional zum Blutfluss.

Die Injektion der Mikrosphären geschah in diesem Modell stets während der Okklusion der LAD und somit während Inflation des Ballonkatheters zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Zuerst

wurden am Tag der Initialoperation die Samarium-Mikrosphären injiziert. Am Tag der Finaloperation wurden die Gold-Mikrosphären verwendet, um die Auswertung der Mikrosphären zu verschiedenen Applikationszeitpunkten zu ermöglichen. Dabei ist es nicht von Bedeutung, welche Mikrosphären zuerst verwendet wurden. Die Mikrosphären wurden zuvor mittels eines Vortexshakers für eine Minute vermischt und dann mittels einer Insulinspritze 150µl der Mikrosphären je Injektion unter Sichtkontrolle in gleichmäßiger Geschwindigkeit über einen Zeitraum von 20 Sekunden in den linken Ventrikel appliziert. Die Mikrosphären werden dabei bei gleichzeitiger Okklusion der LAD injiziert und gelangen so durch die Blutversorgung in die Herzerarterien. Dabei bezeichnete man das LAD-Perfusionsgebiet als „kollaterale Abhängigkeitszone“ (CZ), da dieser Bereich, während die LAD durch den Ballon verschlossen war, ausschließlich von der koronaren, kollateralen Perfusion abhängig war. Die „Normalzone“ (NZ) ist das weitere Herzgewebe, welches sich räumlich deutlich von der distal der LAD Okklusion gelegenen CZ unterscheidet. Die NZ wird ohne Kollateralbildung versorgt. Die CZ wurde durch die geringe Anzahl an mit Isotopen markierten Mikrokugeln identifiziert.

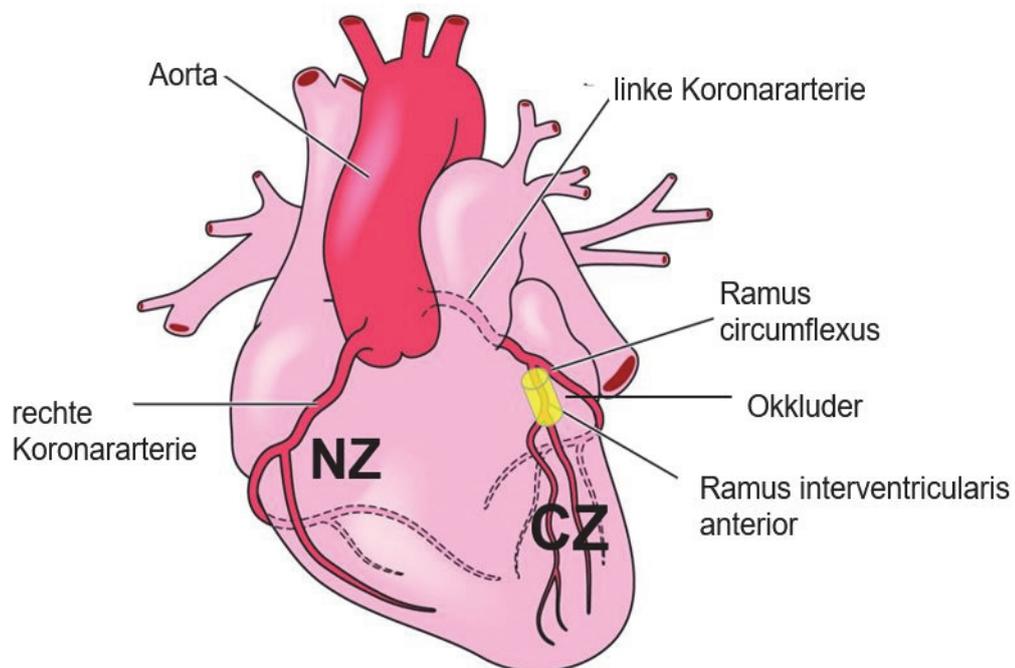


Abbildung 11. Modifizierte schematische Darstellung nach Kissel et al. (2019) des Herzens, der Lage des Okkluder und des Ramus interventricularis anterior (=left anterior descending artery: LAD) der linken Koronararterie, sowie die Lokalisation der Normalzone (NZ) und kollateralen Abhängigkeitszone (CZ) (Kissel, Gabus et al. 2019).

Nach Euthanasie des Tieres wurde das Herz mittels einer medialen Thorakotomie entnommen und 100 mg von der NZ und der CZ mittels Präzisionswaage zur Analyse an das BioPhysics Assay Laboratory, Inc. (BioPAL, Worchester, USA) zur Auswertung gesendet. Die ermittelten Ergebnisse werden als Mikrosphären-basierte myokardiale Perfusion (in Zerfall pro Minute pro Gramm, dpm/g) in dem Gewebe der CZ an Tag null (Initialoperation) und Tag sieben (Finaloperation) und ebenso in der NZ an Tag null und Tag sieben angegeben. Das relative kollateralabhängige Myokardperfuionsverhältnis (CZ/NZ) wurde mithilfe dieser Formel berechnet:  $CZ/NZ \times 100\%$ .

Dabei erfolgte die Endpunktmessung jeweils bei den allen vier Gruppen (siehe Tabelle 1).

*Tabelle 1. Übersicht der Gruppen zur Endpunktmessung.*

<b>Gruppe</b>	<b>Behandlung</b>
Rop	Anwendung des repetitiv-okkludierenden Programms (ROP)
Sham	Kontrollgruppe
Rop_ARNI	Anwendung ROP und medikamentöse Therapie mit dem ARNI (Sacubitril und Valsartan)
Rop_ARB	Anwendung ROP und medikamentöse Therapie mit dem ARB Valsartan

### 3.7. Instrumente, Geräte und Reagenzien

#### 3.7.1. Operationsbesteck

*Tabelle 2. Operationsbesteck.*

Chirurgische Schere	FST, USA
Fadenschere	FST, USA
Gefäßklemme	FST, USA
Metallstab zum Untertunneln der Haut	FST, USA
Metzenbaumschere (gerade/gebogen)	FineScienceTools (FST), USA
Mosquitoklemmen	FST, USA
Pinzette (anatomische/chirurgische)	FST, USA
Selbstgebaute Wundspreizer mit Gummi	FST, USA Gummi selbstmontiert

## 3.7.2. Verbrauchsmittel

Tabelle 3. Verbrauchsmittel.

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
1 ml Einmalspritzen 1ml Syringe Tuberculin Slip Tip	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Ballonkatheter DocXS™ Silicone Vascular Occluder, VO-1.5F, Flat, 4,5mm × 8mm, 15mm cuff thickness, single tube eyelet	DOXS Biomedical Products and Accessories, CA USA
Handschuhe Microflex, Powder- Free Nitrile Examination Gloves	Anell
Hautklammern Item ID: INS750346, Item Description: Reflex Clips 9mm 100/Box SS Non-Sterile	Kent Scientific Corporation
Insulin Einmalspritze ½ cc U-100 InsulinSyringe 28G ½ Micro Fine®IV	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Kanülen BD PrecicionGlide "Needle 25Gx5/8(0,5mmx16mm) Sterile	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes,NJ, USA
Katheter Angiocath i.v.Catheter 14 GA 1,88IN 21x48mm	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes,NJ, USA
Makrolonkäfige	New York Medicial College, Valhalla, USA
Nahtmaterial 5-0 (1.0 metric) 30"(75cm) RB-2 13mm ½ c Taper Prolene Suture Blue Monofilament 3-0 PS-1 24mm 3/8c Reserve Cutting Perma Hand™ Silk 8-0 12" (30cm) TG140-8 6,5mm 2/8c Spature Coated Vicrly Surtutre Violet Braided	Ethicon® Puerto Rico, USA
Sterile Handschuhe Powered Latex Surgical Gloves	Fisher Safety, Pittsburgh, USA
Tupfer Non-Woven Gauze 2x2 Nonsterile Cat No: 22028559	Fisher Scinentific Fisherbrand®, Pittsburgh, USA
Zellstoffunterlagen	New York Medical College, Valhalla, USA

## 3.7.3. Pharmazeutika

Tabelle 4. Pharmazeutika.

Augensalbe Puralube® Vet Ointment	Dechra Kansas, USA
Buprenorphin Buprenex Injection (buprenorphine hydrochloride) 0,3mg/ml	Reckitt Benckiser healthcare (Uk) Ltd., Hull, England
Entresto® LCZ696ABA	Novartis Germany
Ketamin Ketaced® (ketamine hydrochloride injection) 100mg/ml	Vedco, Inc., St.Joseph, MO, USA
Sauerstoff Compressed Gas, oxidizing N.O.S. UN 3156	Airgas Healthcare LLC, PA, USA
Sevofluran SevoThesia™ sevoflurane Nonflammable, nonexplosive Inhalation Anaesthetic	Henry Schein Animal Health Dublin OH, USA
Valsartan	Novartis Germany
Xylazin AnaSed®Injection Xylazine 100mg per ml	LLOYD laboratories Iowa, USA
Yohimbine	Wedgewood Pharmacy; Yohimbine (as HCl) 2mg/ml in AQ Vehicle Injection Solution

### 3.7.4. Geräte

Tabelle 5. Geräte.

Beatmungsgerät Anaesthesia Workstation Station Model: AWS Serial No. 0377	Hallowell EMC Pittsfield, USA
Heizmatte	Sunbeam®, USA
Koagulator High Temperature Cautery Fine Tip Ref: AA01	Bovie Medical Corporation, Clearwater, USA
Magnetrührer mit integrierter Wärmeplatte Isotemp® Serial No: C1892130947264	Fisher Scientific, Pittsburgh, USA
Präzisionswaage Type: New Classic MF Model: MS1602S/03	Mettler Toledo, Switzerland
Schermaschine Golden A5 Animal Grooming Clippers	Oster®, USA
Otoskop Modell 20200 Otoskop	Welch Allyn®, IL, USA
PC	
ROP System	Speziell entwickelte Software "Ratinfator 2000" von PHD Petra Rocic
Rüttler "Vortexer59" Vortex Mixer S0100 SN:71022068	Labnet International, Inc. Woodbridge, NJ, USA

### 3.7.5. Chemikalien, Lösungen, Gase

Tabelle 6. Chemikalien, Lösungen, Gase.

Airgas Compressed Gas, oxidizing N.O.S. (95% Oxygen USP 5% Carbon Dioxide USP) UN3156	Airgas® Healthcare, PA, USA
Ethanol Ethanol Anhydrous	Fisher Chemicals, Fisher Scientific, Fairn Lawn, NJ, USA
Mikrosphären Samatrium/Gold	BioPAL, Inc. Worchester, USA

### 3.8. Statistische Auswertung

Die statistische Analyse sowie die Erstellung der Grafiken wurde mit IBM SPSS *Statistics for Windows*, Version 23.0 durchgeführt. Deskriptive Daten wurden anhand der Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt und die Varianzgleichheit der Stichprobe mit Hilfe des Levene-Tests überprüft.

Um die Gruppenmittelwerte hinsichtlich des mittleren kollateralen Flusses an der Finaloperation auf signifikante Unterschiede zu untersuchen, wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) hinzugezogen. Mit Hilfe eines Post-Hoc Tests (Tukey HSD) wurden anschließend die einzelnen Gruppen miteinander verglichen. Dabei wurde ein Wert von  $p < .05$  als statistisch signifikant angesehen.

Die statistische Auswertung dieser Dissertationsarbeit wurde von der Statistischen Beratungseinheit des Institutes für Veterinär-Epidemiologie und Biometrie, Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin überprüft.

#### 3.8.1. Bestimmung des kollateralen Flusses

Zur Bestimmung der kollateralen Perfusion im Gewebe wurden die Ergebnisse in dpm/g (*disintegration per minute per gram*) aus der *Collateral Zone* durch die Ergebnisse der *Normal Zone* (CZ/NZ end) in dpm/g geteilt, um das Verhältnis zu bestimmen. Dabei wird der durchschnittliche Fluss im Gewebe im Folgenden als kollaterale Perfusion dargestellt, im prozentualen Verhältnis von CZ im Vergleich zur NZ, als  $CZ/NZ \times 100$ .



## 4. Ergebnisse

### 4.1. Deskriptive Analyse

#### 4.1.1. Perfusion des Gewebes bei der Initialoperation (Tag 0)

Bei allen 32 Tieren wurde die Initialoperation (Tag 0) mit Implantation des Ballonkatheters durchgeführt. Anschließend wurden die Tiere randomisiert den vier Gruppen Sham ( $n=8$ ), Rop ( $n = 8$ ), Rop\_ARNI ( $n = 8$ ) und Rop\_ARB ( $n = 8$ ) zugeordnet, siehe 3.2.

Zunächst wurde überprüft, ob ein Unterschied zwischen den Tieren der einzelnen Gruppen hinsichtlich der durchschnittlichen kollateralen relativen Perfusion des Gewebes bei Versuchsbeginn vorlag. Dafür wurde in einem ersten Schritt mit Hilfe des Levene-Tests die Varianzhomogenität überprüft. Varianzhomogenität besteht dann, wenn eine ungefähre Gleichheit der Varianzen, also die Verteilung von Werten um einen Mittelwert, in den Gruppen besteht. Sie stellt eine Voraussetzung für die nachfolgende einfaktorielle ANOVA dar. Die Überprüfung der Varianzhomogenität ergab in der vorliegenden Stichprobe eine Gleichheit der Varianzen ( $p = .126$ ).

Die anschließend durchgeführte ANOVA zeigte, dass ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen vorlag,  $F(3,28)=68.75, p<.001$ . Post Hoc Tests (Tukey HSD) verdeutlichten, dass die SHAM Gruppe ( $M = 0.18, SD = 0.01$ ) eine signifikant niedrigere Perfusion im Gewebe als die Rop ( $M = 0.25, SD = 0.02, p < .001$ ), die Rop\_ARB ( $M = 0.26, SD = 0.02, p < .001$ ) sowie die Rop\_ARNI ( $M = 0.27, SD = 0.01, p < .001$ ) aufwies. Zwischen der Rop, Rop\_ARB und Rop\_ARNI Gruppe lag kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Perfusion des Gewebes am Tag null vor (alle  $p>.05$ ).

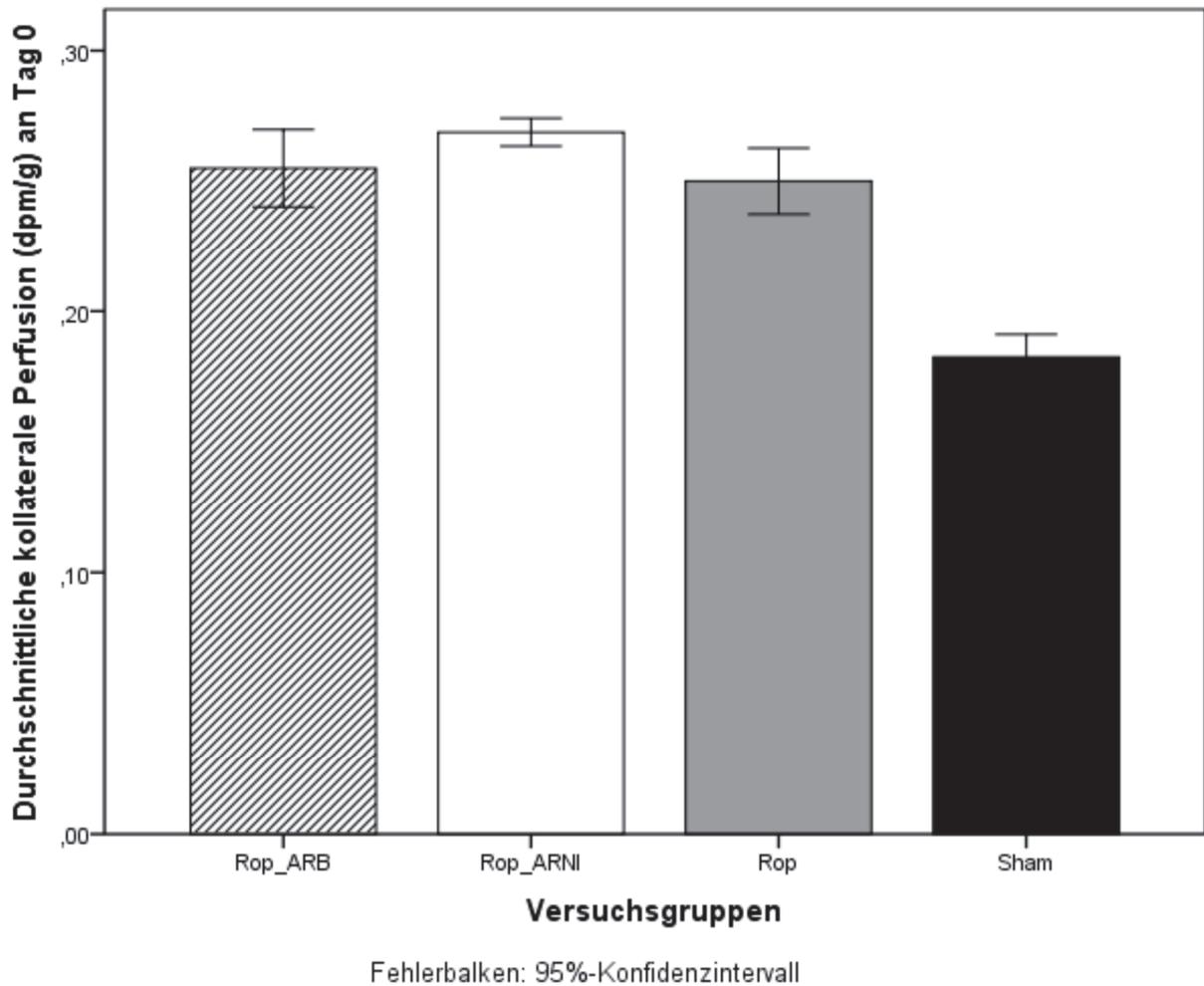


Abbildung 12. Die kollaterale Perfusion aller Gruppen am Initialoperationstag, Tag 0. Sham= Kontrollgruppe, Rop = repetitiv-okkludierendes Programm Gruppe; Rop\_ARNI = repetitiv-okkludierendes Programm mit Entresto® Gruppe, Rop\_ARB = repetitiv-okkludierendes Programm in Kombination mit Valsartan Gruppe.

#### 4.1.2. Vergleich der Gruppe Rop versus Sham bei der Finaloperation (Tag 7)

Die Tiere, welche die Initialoperation erhielten und an das ROP angeschlossen wurden, zeigten eine signifikant bessere durchschnittliche Perfusion bei der Finaloperation (Tag 7) als die Tiere der Sham-Kontrollgruppe am Tag sieben.

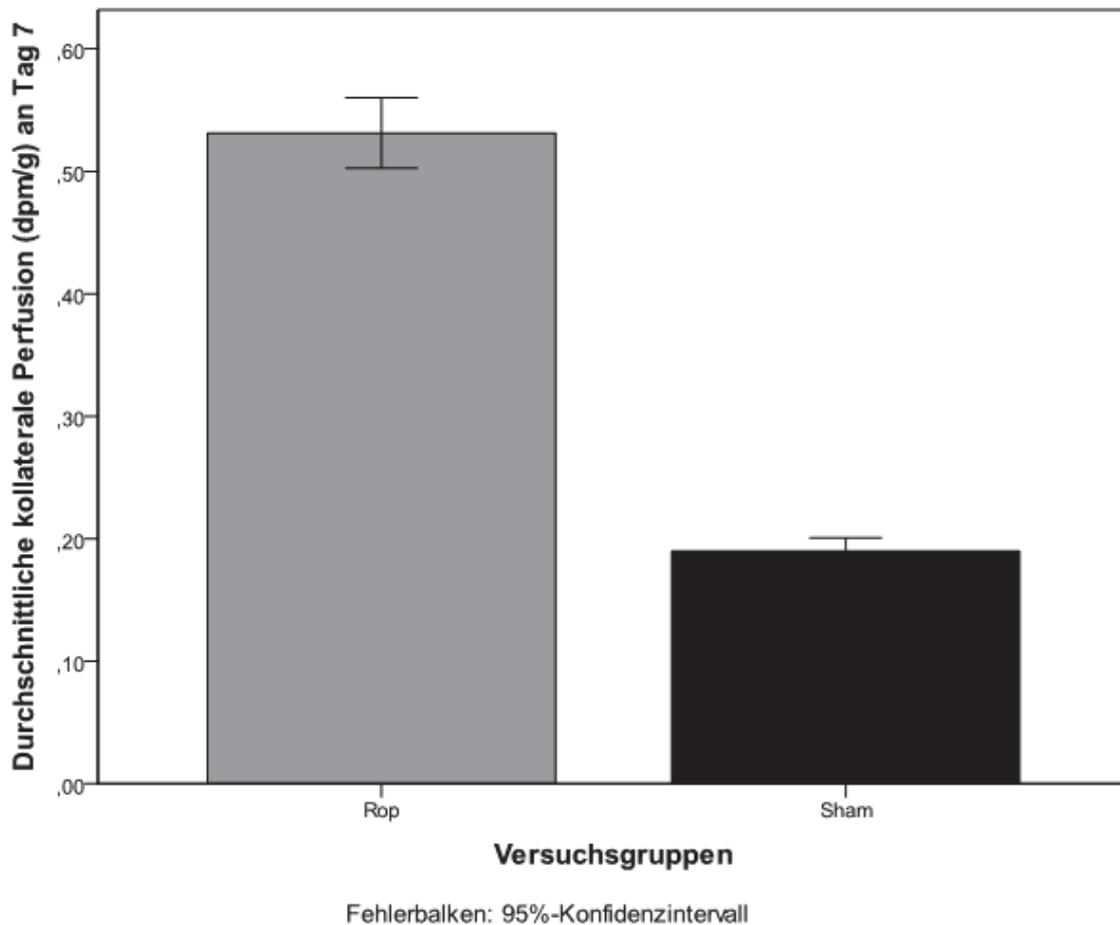


Abbildung 13. Vergleich der kollateralen Perfusion im Gewebe der Sham und Rop-Gruppe nach der Finaloperation, am Tag 7. Sham= Kontrollgruppe, Rop = repetitiv-okkludierendes Programm Gruppe.

Dabei lag die kollaterale Perfusion bei den ROP-Tieren bei  $M= 0.53$ ,  $SD= +0,03$ ). Hingegen wiesen die Tiere, die zu der SHAM-Gruppe zählten, einen durchschnittlichen relativen Fluss im Gewebe von  $M= 0.19$ ,  $SD= 0.01$  auf. Dies bedeutet, dass die kollaterale Perfusion der CZ zur NZ in der Rop-Gruppe bei 53% lag und bei der Sham-Gruppe bei 19%.

### 4.1.3. Perfusion des Gewebes bei Finaloperation (Tag 7)

An Tag 7 nach der Initialoperation wurde erneut die kollaterale Perfusion bei den Tieren aller Gruppen gemessen. Die hier erhaltenen Werte wurden zunächst auf Varianzhomogenität überprüft. Der dafür herangezogene Levene-Test ergab eine Gleichheit der Varianzen ( $p=.387$ ). Entsprechend lagen gleiche Varianzen in der Stichprobe vor, womit die Voraussetzung für die nachfolgende einfaktorielle ANOVA geschaffen war.

Die im Anschluss an die Überprüfung der Varianzhomogenität durchgeführte, einfaktorielle ANOVA ergab, dass ein signifikanter Unterschied zwischen allen vier Gruppen hinsichtlich der durchschnittlichen kollateralen Perfusion an Tag sieben vorlag,  $F(3,28)=810.00$ ,  $p<.001$ . Wie der nachfolgend durchgeführte Post Hoc Test (Tukey HSD) zeigte, wies die SHAM-Gruppe ( $M = 0.19$ ,  $SD = 0.01$ ) dabei eine signifikant niedrigere kollaterale Perfusion im Gewebe auf als die Rop-Gruppe ( $M = 0.53$ ,  $SD = 0.03$ ,  $p < .001$ ), die Rop\_ARB-Gruppe ( $M = 0.55$ ,  $SD = 0.01$ ,  $p < .001$ ), sowie die Rop\_ARNI-Gruppe ( $M = 0.71$ ,  $SD = 0.02$ ,  $p < .001$ ). Zusätzlich zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ROP und Rop\_ARNI ( $p < .001$ ), sowie zwischen Rop\_ARB und Rop\_ARNI ( $p < .001$ ). Demzufolge war die kollaterale Perfusion in der Gruppe Rop\_ARNI (71%) größer im Vergleich zu allen anderen Gruppen, wohingegen die Gruppe Sham die niedrigste kollaterale Perfusion im Vergleich zu allen anderen Gruppen aufwies (19%). Die Rop-Gruppe und die Rop\_ARB-Gruppe erschien nicht unterschiedlich ( $p = .703$ ).

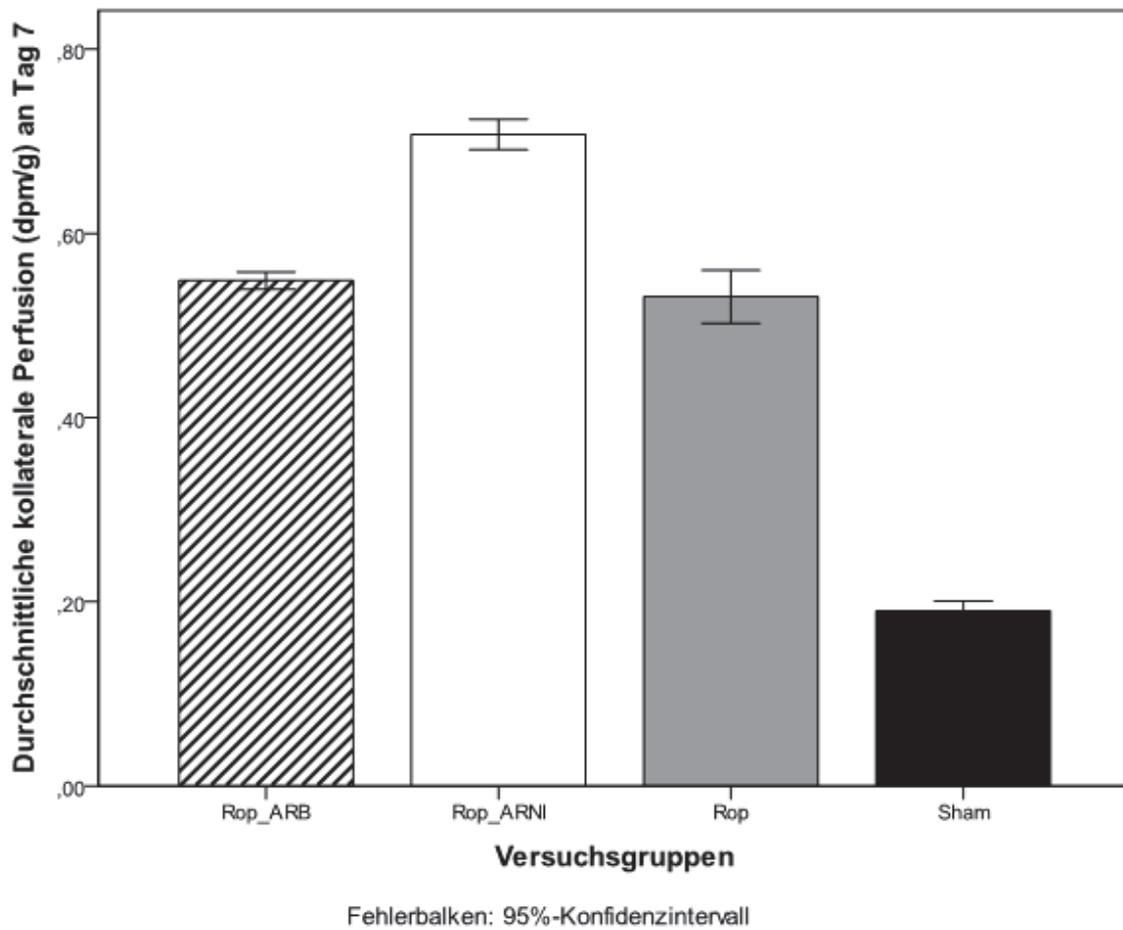


Abbildung 14. Die kollaterale Perfusion im Gewebe an Tag 7. Sham= Kontrollgruppe, Rop = repetitiv-okkludierendes Programm Gruppe; Rop\_ARNI = repetitiv-okkludierendes Programm mit Entresto® Gruppe, Rop\_ARB = repetitiv-okkludierendes Programm in Kombination mit Valsartan Gruppe.

	Sham n = 8	Rop n = 8	Rop_ARNI n = 8	Rop_ARB n = 8
Mittelwert ±SD	0.190 ± 0.013	0.531 ± 0.034	0.708 ±0.019	0.549 ± 0.112
95 % CI	[.18, .20]	[.50, .56]	[.69, .72]	[.54, .56]
P Wert (vs. ROP)	.000	-	.000	.368
P Wert (vs. Sham)	-	.000	.000	.000

Abbildung 15. Übersicht der Ergebnisse am Tag 7 nach Finaloperation. SD = Standardabweichung, CI = Konfidenzintervall; Sham= Kontrollgruppe, Rop = repetitiv-okkludierendes Programm Gruppe; Rop\_ARNI = repetitiv-okkludierendes Programm mit Entresto® Gruppe, Rop\_ARB = repetitiv-okkludierendes Programm in Kombination mit Valsartan Gruppe.

## 4.1.3.1. Übersicht der Rop Gruppen bei der Finaloperation (Tag 7)

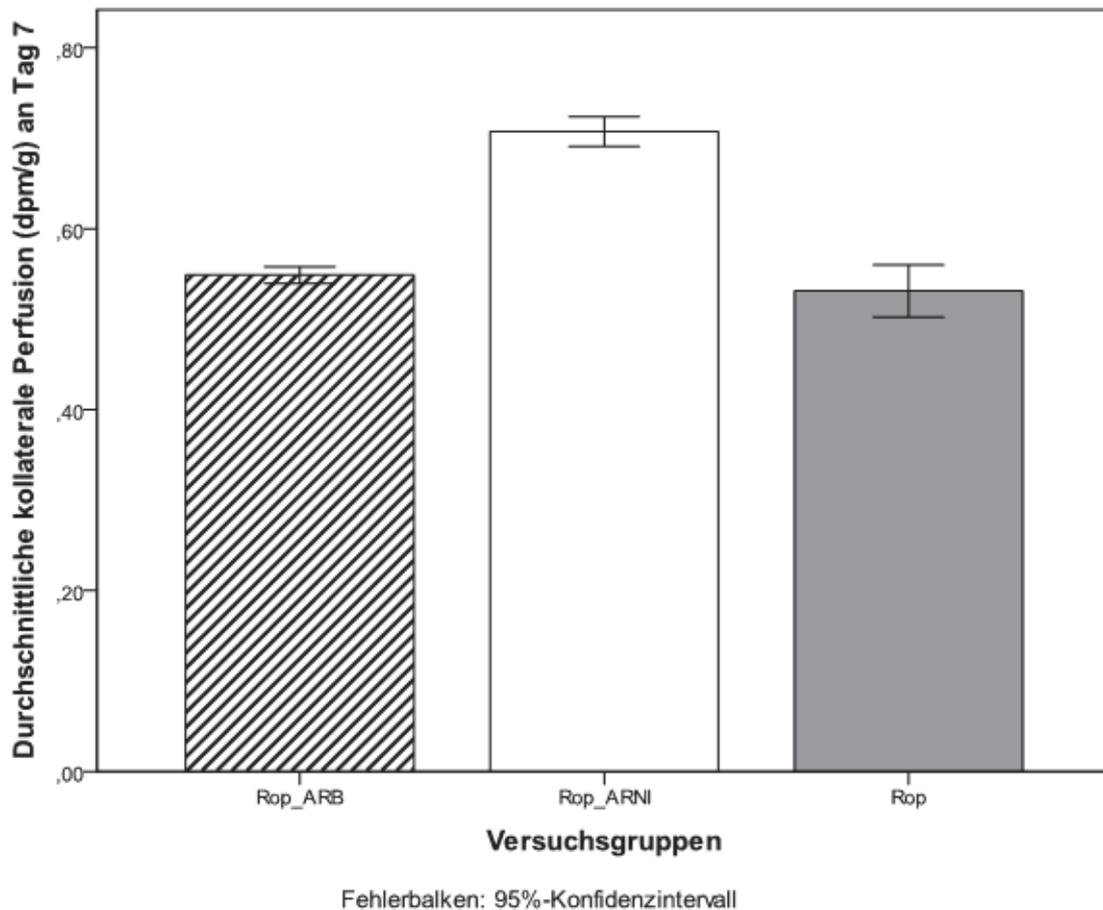


Abbildung 16. Vergleich aller ROP-Gruppen mit oder ohne Medikation. Rop = repetitiv-okkludierendes Programm Gruppe; Rop\_ARNI = repetitiv-okkludierendes Programm mit Entresto® Gruppe, Rop\_ARB = repetitiv-okkludierendes Programm in Kombination mit Valsartan Gruppe.

In dieser Abbildung wird der Effekt, der auch in Abbildung 15 zu sehen ist, nochmals verdeutlicht dargestellt. Bei der Untersuchung aller Tiere, welche an das repetitive okkludierende Programm angeschlossen wurden, zeigen die Ergebnisse aus der ARNI\_Gruppe (Tiere, die zusätzlich das Medikament Entresto® erhielten) eine signifikante Erhöhung der kollateralen Perfusion im Gewebe im Vergleich zu allen anderen Tier-Gruppen.



## 5. Diskussion

In der vorliegenden Studie wird der Einfluss des ARNI Entresto® auf das koronare Kollateralwachstum in der Ratte untersucht. Unter Nutzung des repetitiven okkludierenden Programms zeigt diese Arbeit erstmalig den Effekt von ARNI auf die Stimulation der koronaren Arteriogenese.

Für die Untersuchung von ARNI und ARB auf die koronare Arteriogenese musste das ROP-Modell zunächst etabliert werden. Im ersten Teil dieser Arbeit konnte das ROP-Modell nach Toyota et al. (2005) erfolgreich reproduziert werden. Es wurde hierbei demonstriert, dass der natürliche Prozess der adaptiven koronaren Arteriogenese durch eine repetitive Okklusion der linken Koronararterie mit einem inflatableren Okkluder ausgelöst wird. Des Weiteren wurde die Wirkung von ARNI hinsichtlich der positiven Modulation auf das kollaterale Wachstum im Herzen untersucht. Es zeigte sich in dieser experimentellen Studie, dass es sieben Tage nach ROP, bei gleichzeitiger Stimulation mit ARNI, zu einer therapeutisch signifikant gesteigerten kollateralen Perfusion kommt. Die kollaterale Perfusion sieben Tage nach ROP war in der ARNI Gruppe höher als in allen anderen Gruppen. Betrachtet man ARNI als Kombinationspräparat aus dem Neprilysininhibitor Sacubitril und dem ARB Valsartan scheint nach dieser Untersuchung eine Wirkung des Neprilysin Inhibitor Wirkstoffes und nicht des ARB-Wirkstoffes ausschlaggebend für den beobachteten Effekt. Die ARNI-Gruppe (ARB + Neprilysin-Inhibitor) zeigte sieben Tage nach ROP eine deutlich gesteigerte koronare Arteriogenese im Vergleich zur ARB-Gruppe sieben Tagen nach ROP. Weiterhin zeigt sich die koronare kollaterale Perfusion in den Ratten nach Behandlung mit ARB gegenüber der ROP-Kontrollgruppe nach sieben Tagen unverändert, verblieb also auf dem Niveau einer adaptiven koronaren Arteriogenese ohne zusätzliche Medikation. Die deutliche pro-arteriogene stimulatorische Wirkung von ARNI kann nach diesem Befund dem Neprilysininhibitor Wirkstoff zugeschrieben werden. Dennoch übernimmt ARB eine wichtige Funktion durch seine kardioprotektiven Wirkungen wie die Vasodilatation, die Senkung des Blutdruckes und die Verstärkung der hypotensiven Wirkung von Bradykinin (Campbell, Krum et al. 2005, Messadi-Laribi, Griol-Charhbili et al. 2007) und macht so die Gabe eines Neprilysin Inhibitor Wirkstoffs grundsätzlich für den Organismus verträglich. In dieser Arbeit wurde daher die Arbeitshypothese bestätigt und eine pro-arteriogene therapeutische Wirkung von ARNI nachgewiesen. Zudem deutet die besondere Wirkung des Neprilysin Inhibitor auf eine mögliche Aktivierung der Bradykinin Rezeptoren hin.

Untersuchungsergebnisse anderer Studien wiesen bereits auf den Einfluss von Bradykinin auf das kollaterale Wachstum in der Peripherie und im Gehirn hin (Hillmeister, Gatzke et al. 2011). Dabei wurde zum einen durch ein Bradykinin-Rezeptor-Defizit die Rolle der Kinin-

Signalübertragung im Wachstum der Kollateralgefäße untersucht und zum anderen die mögliche Beeinflussung über die Stimulation des Bradykinin-Rezeptors durch Agonisten bzw. Antagonisten bei Ratten und Mäusen erforscht. Aufgrund der Ergebnisse von Hillmeister et. al lässt sich auf eine positive Modulation der Arteriogenese, vorwiegend durch Stimulation des BKB1R, schließen. Allerdings wurden hier Arteriogenesemodelle am Hinterlauf und im Gehirn genutzt, nicht aber im myokardialen Setting. Welche möglichen experimentellen, molekularen und zellulären Zusammenhänge diesem Befund zu Grund liegen können und welche Perspektive dieser Befund für die Klinik bedeutet, soll im Folgenden diskutiert werden.

### 5.1. Bewertung der Methode

#### 5.1.1. Das repetitiv okkludierende Programm

Durch den wiederholten Verschluss der LAD mittels eines Druckokkluders kommt es zur Aktivierung und Vergrößerung von koronaren Kollateralen. Ein Vorteil des computergesteuerten repetitiven okkludierenden Programms ist die anwenderunabhängige Replizierbarkeit. Diese gewährleistet ein standardisiertes Vorgehen hinsichtlich Druck, Häufigkeit und Intensität der Okklusion (DeFily und Chilian 1992). Nachteilig zu betrachten ist die eingeschränkte Vergleichbarkeit eines am chronisch koronaren Syndrom erkrankten Menschen, der oftmals zur älteren und auch multimorbiden Patientenpopulation gehört (Riehle und Bauersachs 2019). Die Versuche wurden in dieser Dissertationsarbeit hingegen bei gesunden 10 -12 Monate alten Sprague-Dawley Ratten durchgeführt. Das unterschiedliche Alter der menschlichen Patienten wie auch der Gesundheitszustand im Allgemeinen scheinen im Vergleich zu den Versuchstieren von Bedeutung zu sein. So zeigten neonatale Mäuse bei einer durch eine LAD-Ligatur hervorgerufene Ischämie, eine Regenerationszeit von drei Wochen. Es wurde nachgewiesen, dass das Regenerationspotenzial mit steigendem Alter der Mäuse sich reduzierte (van den Borne, van de Schans et al. 2009). Das Alter des Lebenswesens muss also bei der Nutzung und Übertragbarkeit der Ergebnisse aus diesem Modell Beachtung finden. Zudem können beispielsweise weder die Gefäßpathologie noch die Gefahr der Ruptur eines atherosklerotischen Plaques im Herzinsuffizienzmodell an der Ratte im Vergleich zu der Krankheitsgenese beim Menschen 100 % repliziert werden. Dennoch sind bislang äußere Kompressionsmodelle in dem hier gewählten Setting für die Präklinik eine etablierte und bewährte Methode, um Verschlusskrankheiten im Hinblick auf die Pathogenese und mögliche Therapieoptionen für die Klinik weiter zu untersuchen. Übliche Kompressionsmodelle führen zur experimentellen Verengung des Gefäßlumens, mit dem Ziel, einen progressiven Verschluss des Gefäßes zu erzeugen. Allerdings ist dies, wie der Name

besagt, ein von außen gesteuerter Prozess, der nicht zu den gleichen lokalen vasomotorischen Veränderungen führt, die bei einer endothelialen Dysfunktion, wie beim chronisch koronaren Syndrom entstehen (Allahwala, Weaver et al. 2019).

Das in dieser Dissertationsarbeit genutzte Modell basiert auf der Methode von Toyota und Kollegen (Toyota, Wartier et al. 2005). Dieses Modell nutzt zum ersten Mal eine sich wiederholende Okklusion am Herzen bei Ratten, die währenddessen bei Bewusstsein sind. Es handelt sich hierbei nicht um ein klassisches Ischämie-Reperfuionsmodell, welches Reperfuionssschäden simulieren soll, da hier die Phasen der Okklusion sehr kurz sind und in ausreichend Ruhephasen eingebettet sind. Das hier genutzte Modell dient der Aktivierung des kollateralen Gefäßwachstums. Allerdings gab es unterschiedliche Veröffentlichungen zur Dauer und Abfolge der Okklusionen und Ruhephasen (Toyota, Wartier et al. 2005, Toyota, Kawaguchi et al. 2007). Es etablierte sich das in der Studie von 2005 veröffentlichte Protokoll (Toyota, Wartier et al. 2005), welches seither erfolgreich verwendet wird (Rocic, Kolz et al. 2007, Carrao, Chilian et al. 2009, Gatzke, Hillmeister et al. 2018). Die zeitlichen Abläufe basierten auf einem repetitiven Ischämie-Protokoll, welches zuvor am Hundeherzen genutzt worden ist (Fujita, Yamanishi et al. 1994, Matsunaga, Wartier et al. 2000). Unter Einbeziehung der physiologischen Prinzipien der Beziehung zwischen Körpergewicht und Stoffwechselrate wurde das hier genutzte Protokoll entwickelt und erfolgreich genutzt. Eine weitere wichtige Erkenntnis war, dass die Rattenherzen auf repetitive Okklusionen mit der Entwicklung von Koronarkollateralen reagierten. Es wurde nachgewiesen, dass es im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne repetitive Okklusionen zu einem sechsfachen Zuwachs des Kollateralenblutflusses und zu einem dreifachen Zuwachs der arterio-arteriellen Anastomosen im Herzen der Ratten kam (Toyota, Wartier et al. 2005). Es wurde also erfolgreich nachgewiesen, dass mit dem ROP-Modell in der Ratte die adaptive koronare Arteriogenese stimuliert wurde. Genau dieser Befund wurde in dieser Dissertationsarbeit reproduziert und es wurde gezeigt, dass die Rop-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe ebenso eine signifikant bessere kollaterale Perfusion aufweist. In dieser Arbeit wurde die adaptive koronare Arteriogenese erfolgreich induziert.

Gegensätzlich zu meinem Befund, der ein unterschiedliches koronares Kollateralwachstum zwischen der Versuchsgruppe, die das repetitive okkludierenden Programm erhielt und der Kontrollgruppe zeigt, sind die Ergebnisse von Cohen et al. aus dem Jahr 1994, die auf einem ähnlichen Versuchsdesign basieren. Dabei wurde im Kaninchenherz eine oberflächliche Abzweigung der LAD durch wiederholte Füllung eines Ballons okkludiert, um eine Ischämie im Myokard herzurufen. Die Operationsmethode war erfolgreich, allerdings konnte kein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe, an der die Okklusion durchgeführt wurde, festgestellt werden (Cohen, Yang et al. 1994). Dies lässt zum einen vermuten, dass die Spezies Kaninchen möglicherweise nicht zur Untersuchung der Arteriogenese am Herzen

geeignet ist, zum anderen muss beachtet werden, dass die erfolgreiche Umsetzung der Operationsmethode abhängig von den manuellen Fertigkeiten des Operateurs ist. Besonders im Kleintiermodell ist die relative Größe der Koronararterien ein limitierender Faktor.

Des Weiteren gehört zur erfolgreichen Nutzung des ROP die Probenentnahme. Zur Probengewinnung muss das Herz bei Finaloperation entnommen werden. Folglich kann das Überleben des Tieres nicht gewährleistet werden, wodurch ein moralischer Konflikt entsteht. Alternative Auswertmethoden, die die Untersuchung auf das Wachstum der Kollateralgefäße am lebenden Tier ermöglichen und somit die Euthanasie verzichtbar machen würden, müssten hinsichtlich der Lebensqualität des Tieres aufgrund des eingebrachten Fremdkörpers ebenfalls kritisch hinterfragt werden.

Inwieweit eine generelle Gültigkeit der Erkenntnisse aus der Tierforschung auf den Menschen übertragbar ist, muss bei jedem Tierversuch diskutiert werden (Touma, Ramsay et al. 2015). Insbesondere die häufig geringe Versuchsgruppengröße, Abweichungen der genutzten Technik und Dauer der Verlaufskontrollen ergeben Grund zur kritischen Auseinandersetzung (Pound, Ebrahim et al. 2004, Bracken 2009). Dennoch ist neben diesen kritischen Punkten in der Auseinandersetzung nicht außer Acht zu lassen, welchen immensen medizinischen Fortschritt hinsichtlich des pathophysiologischen Erkrankungshintergrundes und der Wirksamkeit untersuchter Therapeutika, Tierversuche ermöglicht haben (Waksman und Saito 2009).

Vor Beginn eines Forschungsvorhabens mit Tierversuch sollte sichergestellt werden, dass das Prinzip „*Replacement, Reduction, Refinement (3 R) of animal experiments*“ systematisch überprüft wurde (Pound, Ebrahim et al. 2004) und ob Antworten auf die Fragestellung auch mithilfe anderer Versuchsmodelle gewährleistet werden können. Im Sinne der 3 R wäre in Bezug auf dieses Modell bzw. die Arteriogeneseforschung die Frage nach dem *Replacement* hervorzuheben. In Zukunft künstliche Arterien herzustellen, die die Fähigkeit besitzen, das kollaterale Wachstum, wie es im Prozess der Arteriogenese stattfindet, zu imitieren, wäre von großer Bedeutung. So käme es zu einer Verringerung der Versuchsvorhaben am Tier beziehungsweise es könnten möglichst viele Vorversuche von Studien am künstlich hergestellten Material durchgeführt werden.

Ratten und Mäuse erweisen sich aufgrund der niedrigen Haltungs- und Fütterungskosten, der Möglichkeit einer schnellen Anzucht sowie dem einfachen Umgang mit den Tieren nach vorangegangener Gewöhnung, als vorteilhaft (Hoefler, van Royen et al. 2006).

In Vorarbeiten im Forschungsgebiet der Arteriogenese wird ebenfalls oftmals die Spezies Ratte als Versuchstier genutzt (Rocic, Kolz et al. 2007, Toyota, Kawaguchi et al. 2007, Hillmeister, Gatzke et al. 2011), so auch in dieser Dissertationsarbeit. Unter anderem werden in der Forschung spezielle Züchtungen verwendet, mit denen durch Genveränderungen hervorgerufene chronische Erkrankungen wie zum Beispiel das metabolische Syndrom

ausgelöst werden. Diese Züchtungen schaffen die Möglichkeit den Einfluss von Grunderkrankungen und kardiovaskulären Risikofaktoren auf das Wachstum der koronaren kollateralen Gefäße in einem Arteriogenesemodell einzubeziehen. Die Wahl der kardiovaskulären Risikofaktoren und deren experimentelle Umsetzung lässt sich im Sinne der Reduktion von Tierversuchen kritisch hinterfragen. Die Erforschung der physiologischen Grundmechanismen erscheint in diesem Zusammenhang am gesunden Tier wieder sinnvoll. Dennoch bleibt unbestritten, dass Vorerkrankungen für Patienten ein erhöhtes Risiko bedeuten, einen schwereren Verlauf einer Herzinsuffizienz zu erleiden. Koexistente Erkrankungen können endotheliale Dysfunktion, erhöhten oxidativen Stress und weitere negative Faktoren für den Verlauf einer Herzinsuffizienz zur Folge haben (Hattan, Chilian et al. 2007, Reed, Kolz et al. 2008).

Neuere Studienergebnisse zeigen, dass sich nicht nur die Ratte, sondern auch Mäuse als Versuchstiere zur Anwendung des hier genutzten ROP Modells eignen (Wan, Chinchilla et al. 2017). Die Autoren verweisen auf die Vorteile der Tierart mit ihrer großen genetischen Varianz an verschiedenen *Knock-out* / transgenen Stämmen. Als nachteilig erweist sich die deutlich schwierigere chirurgische Durchführung und komplexe Differenzierbarkeit hinsichtlich der Ausbildung beziehungsweise Sichtbarkeit der Kollateralen aufgrund der geringen Körpergröße der Maus (Wan, Chinchilla et al. 2017). Dennoch zeigen aktuelle Studienergebnisse die erfolgreiche Anwendung des ROP-Modells in der Maus. Dies verspricht neue Möglichkeiten und somit eine weitere Perspektive für die zukünftig Forschung an genetisch veränderten Mäusen im Modell der repetitiven Okklusion der LAD (Jamaiyar, Juguilon et al. 2022).

### 5.1.2. Auswertmethodik

In Vorarbeiten der Forschungsgruppe um Prof. Buschmann wurden unter Nutzung des ROP Versuchsgruppen untersucht, bei denen als Auswertmethode zur Bestimmung der Infarktgröße die Triphenyltetrazolium-Chloride-Färbung (TTC) genutzt wurde (Gatzke, Hillmeister et al. 2018). TTC bildet in Gegenwart eines physiologischen Dehydrogenase-Enzymmetabolismus farbige Niederschläge. Nekrotische Probenbereiche lassen sich nicht anfärben (Klein, Puschmann et al. 1981). Diese Methode gilt als schnell, kostengünstig und kann makroskopisch ausgewertet werden. Sie ist ein indirekter Nachweis für den Prozess der Arteriogenese, da angenommen wird, dass eine Gewebeischämie sich proportional zur koronaren Kollateralisierung entwickelt. In der Vergangenheit wurde die TTC-Färbung daher regelmäßig zur Beurteilung von Myokardinfarktgrößen genutzt (Hale und Kloner 1987, Holmbom, Näslund et al. 1993). Die Größe des Infarktes im Herzen wird als prozentualer Anteil in Verhältnis zur Fläche des linken Ventrikels angegeben (Gatzke, Hillmeister et al. 2018). Fraglich ist die Genauigkeit der Färbung, da besonders in der Randzone vitale farbige

Myozyten von nekrotischem Material verdeckt werden können und dies ungenaue Messergebnisse ergeben kann (Fishbein, Meerbaum et al. 1981, Holmbom, Näslund et al. 1993). Im ursprünglichen Studienprotokoll meines Forschungsvorhabens sollte die TTC-Methode zur Anwendung kommen. Im Verlauf der Umsetzung der Studie wurde jedoch entschieden, die Mikrosphärenperfusionsmessung anzuwenden, welche als der Goldstandard der myokardialen Arteriogenesemessung angesehen wird und als direkter Nachweis gilt (Kingma, Simard et al. 2005). Vorteile der Nutzung von mit stabilen Isotopen markierten Mikrosphären sind im Vergleich zu radioaktiven Mikrosphären, dass diese keine Radioaktivität verursachen und die Strahlenbelastung am Arbeitsplatz sowie der anfallende schwach radioaktiven Abfall reduziert ist. Ein Vorteil gegenüber fluoreszierenden Mikrokugeln ist, dass letztere nach einiger Zeit ihre Fluoreszenz verlieren. Dies geschieht bei der Neutronenaktivierung nicht, diese Mikrosphären haben eine längere Halbwertszeit, das heißt, die Messungen lassen sich zu einem späteren Zeitpunkt wiederholen (Reinhardt, Dalhberg et al. 2001). Wirtschaftlich gesehen, birgt die Methode der mit stabilen Isotopen markierten Mikrosphären ebenfalls positive Aspekte, da die Untersuchung im zentralen Verarbeitungslabor deutlich günstiger ist als bei den optisch markierten Mikrokugeln (Hale, Alker et al. 1988, Reinhardt, Dalhberg et al. 2001). Nicht nur in ihrer schnellen und unkomplizierten Handhabung während des Experimentes, sondern auch in einer unkomplizierten Zusendung und dem Erhalt von Ergebnissen durch das Labor der Firma Biopal (Worcester, USA) war die Nutzung dieser Mikrosphären in dieser Dissertationsarbeit sehr vorteilhaft. Ein kritischer Aspekt jeglicher Mikrosphärentechnik ist, dass zum Erhalt der Untersuchungsergebnisse die Entnahme des Herzens und somit Tötung der Tiere unabdingbar ist (Allahwala, Weaver et al. 2019).

### 5.1.3. Kollaterale Perfusion zum Zeitpunkt der Initialoperation

Am Tag der Initialoperation wurde bei allen Tieren aus allen Versuchsgruppen der mittlere Fluss im Gewebe, die kollaterale Perfusion, untersucht. Die Zuordnung der Tiere in die jeweilige Gruppe erfolgte nach dem Zufallsprinzip. Bemerkenswert ist hier, dass die Versuchstiere der Sham-Gruppe (Tiere, bei denen ausschließlich ein Ballonkatheter implantiert wurde) im Vergleich zu den anderen Tieren der Versuchsgruppen (Medikamenten- und Rop-Gruppen) schon vor Versuchsbeginn die geringste kollaterale Perfusion aufzeigten. Dies wird als Zufallsbefund bei einer kleinen Versuchskohorte gewertet. In vorherigen Studien wurde keine Ungleichverteilung des mittleren Flusses zwischen den Versuchskohorten zum Zeitpunkt der Initialoperation beschrieben (Toyota, Kawaguchi et al. 2007, Leavesley, Ledkins et al. 2014). Da es sich hierbei um die Messung zu Beginn des Versuchs handelt, wird nicht davon ausgegangen, dass dieser Befund die Ergebnisse am Ende des Versuchs signifikant

beeinflusste. Der Unterschied der kollateralen Perfusion in der Sham-Gruppe war erneut deutlich niedriger am Tag 7 im Vergleich zu allen anderen Rop-Versuchsgruppen (siehe nächsten Abschnitt).

#### 5.1.4. Evaluierung des repetitiv okkludierenden Programms

Die Kohorte, bei der das repetitiv-okkludierende Programm (ROP) für sieben Tage angewendet wurde, weist eine signifikante Verbesserung des Mikrosphären-Perfusionsverhältnisses im Vergleich zur Sham-Gruppe auf. Damit kann die Erhöhung des kollateralen Blutflusses im Myokard und somit die Aktivierung der koronaren Arteriogenese nachgewiesen werden. Die Arteriogenese wurde von Carrao et al. als ein Mechanismus beschrieben, welcher das Herzgewebe distal von einem Verschluss durch kollaterales Gefäßwachstum versorgt (Carrao, Chilian et al. 2009). Jedoch konnte Carrao et al. in ihrer Arbeit die koronare Arteriogenese im ROP-Modell nicht direkt nachweisen. Sie untersuchten die Größe von Infarktarealen im Myokard, um so indirekt auf ein gesteigertes kollaterales Remodelling rückzuschließen. Dieses Modell wird mittlerweile erfolgreich in verschiedenen Studien genutzt (Hattan, Chilian et al. 2007, Hutcheson, Terry et al. 2013).

#### 5.1.5. Evaluierung der Wirkung der Medikamente

Hauptanliegen dieser Studie war die Untersuchung der Wirkung des ARNI Entresto® sowie des ARB Valsartan in einem koronaren Arteriogenesemodell in der Ratte. Dazu erhielten die zwei mit Medikamenten behandelten Gruppen die Initialoperation und wurden darauffolgend an das ROP angeschlossen und mit dem jeweiligen Medikament behandelt, bevor die Finaloperation und Probenentnahme folgten.

##### 5.1.5.1. ARNI

In dieser experimentellen Studie wird zum ersten Mal gezeigt, dass das kollaterale Gefäßwachstum im Herzen durch medikamentöse Nutzung eines ARNI therapeutisch stimuliert wird. Der ARNI Entresto® besteht aus der festen Medikamentenkombination von Sacubitril und Valsartan. In der Kohorte, die sowohl das ROP als auch den ARNI erhielten, kam es im Vergleich zu der Kohorte mit ROP aber ohne Medikamentensubstitution zu einer signifikanten Steigerung des mittleren Perfusionsverhältnisses. Damit wird die Hypothese, dass die Induktion der Arteriogenese pharmakologisch durch ARNI beschleunigt werden kann, bestätigt.

Durch die Nutzung des ARNI Entresto® kommt es zur Hemmung des Enzyms Nephylisin, welches unter anderem für den Abbau von Bradykinin verantwortlich ist. Bradykinin und seine Rezeptoren haben Anteil an der Regulation von vielen physiologischen wie auch pathophysiologischen Prozessen und sind damit hervorragende Ziele für eine medikamentöse Beeinflussung. Die Hypothese dieser Studie besagt, dass die Hemmung von Nephylisin zu einer Erhöhung von Bradykinin führt. Vorherige Untersuchungen zur Bedeutung des KKS und RAAS hatten gezeigt, dass die Erhöhung des Bradykininspiegels zu den positiven Eigenschaften der ARNI-Wirkung zählt (Bayes-Genis, Barallat et al. 2016). In der PARADIGM-HF-Studie, in der der ARNI Entresto® am menschlichen Patienten mit Herzinsuffizienz untersucht worden ist, wiesen die Ergebnisse auf eine hohe Wirksamkeit des ARNI hin (McMurray, Packer et al. 2014). Mehrere Ursachen sind dafür denkbar, nämlich die Blutdruckregulation und, in dieser Studie von besonderem Interesse, die Funktion von Bradykinin und anderen Kininen, die nachweislich im Schutzmechanismus des kardiovaskulären Systems eine wichtige Rolle spielen (Jhund, Fu et al. 2015). In Versuchen an Mäusen und Ratten konnte das kollaterale Gefäßwachstum durch Nutzung eines BKB1R Agonisten bzw. Antagonisten stimuliert oder gehemmt werden (Hillmeister, Gatzke et al. 2011). Vielversprechende Hinweise aus weiteren Arbeiten weisen auf die steigernde Funktion von NO im Prozess der Arteriogenese, sowie die Verbindung zwischen dem Bradykinin Rezeptorsignalweg und der Induktion der NO-Produktion in Endothelzellen und zirkulierenden Immunzellen hin (Kuhr, Lowry et al. 2010). Klinische Studien zur therapeutischen Induktion der Arteriogenese in Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit mittels eines neuen Medizinproduktes, der externen Pulsationstherapie, beschreiben einen molekularen Zusammenhang zwischen einer vermehrten NO-Produktion und der Aktivierung von Bradykinin Rezeptoren auf zirkulierenden Leukozyten (Brix, Hillmeister, VASA 2017). Kinin-Vorläufer und Kininrezeptoren sind somit wichtige Modulatoren der Arteriogenese und könnten als neues Konzept zur therapeutischen Stimulation der Arteriogenese verwendet werden. In weiteren Vorarbeiten dieser Studie wurde der Einfluss der Bradykinin Rezeptoren sowie die Wirkung von NO in Bezug auf die therapeutische Stimulation des kollateralen Wachstums in verschiedenen Arteriogenese-Modellen in Maus und Ratte erforscht (Gatzke, Hillmeister et al. 2018). Dabei wurden kurz-wirksame und lang-wirksame NO-Donatoren unter Nutzung des ROP-Modells in der Ratte untersucht. Hier zeigte sich, dass kurz-wirksames NO einen pro-arteriogenen Effekt ausübt und die koronare Arteriogenese signifikant steigert. Dies wurde, wie in der Arbeit von Carrao et al. (2009), indirekt über eine Reduktion der Infarktgröße im Myokard nachgewiesen, welche nur über den kompensatorischen Mechanismus von kollateralen Anastomosen als biologische Bypässe zu erklären war (Carrao, Chilian et al. 2009). Die Infarktgröße wurde hier durch TTC-Staining bestimmt. Bekannt ist, dass NO gefäßerweiternd wirkt und auch ein sekundärer Botenstoff bei der Bradykinin

Rezeptorsignalwirkung fungiert (Hillmeister und Bondke Persson 2020). Ein wichtiger Befund in der Arbeit von Gatzke et al. (2018) am ROP-Modell war der Nachweis, dass NO auch aktiv das vaskuläre Remodelling der koronaren Arteriogenese steigert und nicht nur als Vasodilator fungiert (Gatzke, Hillmeister et al. 2018). Zuvor bekannt war die angiogene Wirkung von NO. Hinweise auf die pro-arteriogene Wirkung wurde 2010 von Troidl et al. in verschiedenen Modellen an Maus, Ratte und Kaninchen vorgestellt. In der Maus kam es zur gänzlichen Blockierung der Arteriogenese durch die kombinierte Elimination der beiden Isoformen der NO-Synthase, dem endothelialen NOS (eNOS) und dem induzierbaren NOS (iNOS) (Troidl, Tribulova et al. 2010), wodurch Stickstoffmonoxid eine neue Bedeutung hinsichtlich einer direkten stimulatorischen Wirkung der Arteriogenese erhält.

Aufgrund der hier erzielten Ergebnisse zur Steigerung der Arteriogenese durch den ARNI Entresto® wäre es von Interesse, weitere Studien durchzuführen, die den genauen Wirkungsweg des ARNI auf das kollaterale Wachstum durch molekulare Untersuchungen klären. Die Vermutung ist, dass die positive therapeutische Modulation über den BKB1R-Signalweg abläuft. Dieser, hauptsächlich im entzündlichen Gewebe exprimierte Rezeptor, wurde in der Vergangenheit vielversprechend therapeutisch moduliert (Duchene und Ahluwalia 2009, Qadri und Bader 2018). Im Folgenden wäre die Anwendung eines Arteriogenesemodells in Kombination mit einer pharmakologischen Inhibition, genetischen Eliminierung oder auch Stimulation der Bradykinin Rezeptoren (BKB1R oder BKB2R) denkbar. Eine pharmakologische Stimulation oder Inhibierung von BKB1R und BKB2R im ROP-Modell der Ratte bei gleichzeitiger Stimulation mit ARNI wäre ein nächster denkbarer Schritt, um weitere mechanistische Zusammenhänge zwischen der Wirkung von Neprilysin Inhibitoren und Bradykinin in diesem Setting aufzuzeigen. Um die Anzahl der Tierexperimente zu reduzieren, wäre es gut, zunächst Zellkulturversuche durchzuführen, um die Wirkung von Neprilysin Inhibitor Sacubitril im Vergleich zu Valsartan auf die Monozytenmigration oder Endothelzellmigration/-proliferation zu untersuchen. Die Monozytenmigration und Endothelzellaktivierung sind, wie zuvor beschrieben, ein wichtiger Phänotyp der Arteriogenese.

#### 5.1.5.2. Valsartan

Eine der Versuchsgruppen erhielt das repetitiv-okkludierende Programm und bekam eine medikamentöse Monotherapie mit Valsartan. Dadurch sollte geprüft werden, ob der Angiotensin-Rezeptor-Blocker (ARB) Valsartan die koronare Arteriogenese beeinflusst. Die Ergebnisse zeigten, dass es zu keiner gesteigerten Perfusion im Myokard gekommen ist. Die Arteriogenese wurde somit nicht durch die alleinige Gabe von Valsartan beeinflusst.

Zuvor wurde in einer Studie von Campbell et al. nachgewiesen, dass es durch den ARB Lorsartan bei Ratten nicht zu einer Erhöhung des Bradykinin-Spiegels im Blut kommt (Campbell, Kladis et al. 1995). In einer Folgestudie am Menschen aus dem Jahr 2005 konnten Campbell et al. bei Patienten mit essenzieller Hypertonie nachweisen, dass Lorsartan den Bradykininspiegel im Blut erhöht. Als Ursachen für einen reduzierten Stoffwechsel von ACE und Nephilysin, welche Bradykinin abbauen, werden Dosen und Anwendungsdauer der Medikamentensubstitution und weitere zugrundeliegende Krankheitsbilder diskutiert (Campbell, Krum et al. 2005).

Der Einfluss des AT1R auf das kollaterale Wachstum wurde bisher wenig erforscht. Bekannt ist aber, dass ARB pathologische Umbauprozessen, wie entzündliche Intima-Media-Verdickungen verhindern können (Mörtzell, Malmqvist et al. 2007). Der ARB Valsartan wurde daher genutzt, um entzündliche Prozesse, die bei der Hemmung von Nephilysin entstehen, zu reduzieren, nicht jedoch die Arteriogenese zu modulieren.

Es ist bewiesen, dass es bei Patienten mit Herz-Kreislaufkrankung unter Verwendung von ARB durch die Inhibition des RAS zur Reduktion von Entzündungen und oxidativem Stress kommt (Ichiki, Labosky et al. 1995, Strawn und Ferrario 2002). Besonders die Symptome einer Entzündung sind wichtige Parameter im Prozess der Arteriogenese. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass es zur Reduktion der Zellproliferation kommt, wenn AT1R gehemmt wird. Der AT1R ist verantwortlich für die Expression von verschiedenen Wachstumsfaktoren, wie dem *fibroblast-growth-factor* und *platelet-derived growth factor* (Ruiz-Ortega, Lorenzo et al. 2000, Behrendt und Ganz 2002, Zahradka, Werner et al. 2002). Sowohl im zerebralen Arteriogenese Modell als auch unter Nutzung des ROP, wurde der ARB Candesartan untersucht. In beiden Studien konnte die Hypothese, dass die Verabreichung eines ARB zu einer Blockade des AT1R führt, welche eine Inhibition des kollateralen Gefäßwachstums auslöst, nicht bestätigt werden. Für die zerebrale wie auch kardiale Arteriogenese wurde aber ebenfalls kein positiver therapeutischer Effekt bei der Medikamentensubstitution von Candesartan beobachtet (Gatzke, Hillmeister et al. 2018, Hillmeister, Nagorka et al. 2021). Mit der Arbeit von Hillmeister et al (2021) konnte dann noch einmal im zerebralen 3-VO Arteriogenesemodell bestätigt werden, dass ARB keine modulatorische Wirkungen (Inhibierung oder Stimulierung) der Arteriogenese aufweisen (Hillmeister, Nagorka et al. 2021).

Bisher gibt es keine Studienergebnisse zum ARB Valsartan im koronaren Arteriogenesemodell. Die Monotherapie mit Valsartan wird als Negativkontrolle in dieser Dissertationsarbeit untersucht, um hervorzuheben, dass Sacubitril der ausschlaggebende Wirkstoff für die koronare Arteriogenese ist. Candesartan und Valsartan gehören zur Gruppe der kompetitiven / nicht kompetitiven Antagonisten, welche die Dosiswirkungskurve von Angiotensin II bei niedrigen Dosierungen parallel nach rechts verschieben und bei höheren bis

zur maximalen Dosis die Wirkung von Angiotensin unterdrücken können (Inoue, Nakamura et al. 1997). Unterschiede der Sartane Candesartan und Valsartan, bestehen in ihren pharmakokinetischen Eigenschaften wie der Dissoziationshalbwertszeit, dem Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration, der Bioverfügbarkeit, der Plasmaeiweißbindung, der Wirkdauer, der Tagesdosis, den Verteilungsvolumen und der renalen Elimination (Ojima, Inada et al. 1997, Dominiak 1999, Abrahamsson, Karp et al. 2000). Aufgrund der beschriebenen Unterschiede der einzelnen Wirkstoffe war es unerlässlich, auch Valsartan als Monotherapie in dieser Dissertation zu untersuchen.

## 5.2. Klinische Relevanz und therapeutischer Ausblick

Anhand dieser experimentellen Studie wurde erstmals die Wirkung eines ARNI auf die Arteriogenese und insbesondere auf die koronare Arteriogenese, gezeigt. Dabei weisen die Ergebnisse zum einen auf die Tatsache hin, über ARNI die koronare Arteriogenese pharmakologisch beeinflussen zu können und zum anderen bestärkt es die Annahme, dass hier eine Modulation durch Anreicherung von Kininen und eine damit verbundene Aktivierung der Bradykinin Rezeptoren erfolgt. Die genauen molekularen Mechanismen und mögliche Signalübertragungen müssten hier noch im Detail untersucht werden.

Es ergeben sich aus dieser Arbeit also nun weitere interessante Forschungsfragen. Der zugrundeliegende pharmakologische Mechanismus könnte z. B. in genetischen *gain-of-function* und *loss-of-function* (z. B. *knock-out*) Modellen an der Maus unter Anwendung von ARNI weiter untersucht werden. So kann man genetische Veränderungen, die zu klinisch relevanten Ausprägungen führen, auf molekularer und zellulärer Ebene untersuchen (Gomes, Falcão-Pires et al. 2013). Für einen solchen Forschungsansatz wäre es am praktikabelsten, wenn man ein geeignetes Arteriogenesemodell an der Maus verwenden würde, da es in der Ratte bisher nur wenige genetische Modelle gibt. Um den Bradykinin-Rezeptorsignal-Weg zu identifizieren, sind Untersuchungen mit Bradykinin Rezeptor Agonisten und Antagonisten erforderlich. Hierbei könnte der selektive Bradykinin-2-Rezeptorantagonist, HOE-140, sowie der selektive Bradykinin-1-Rezeptorantagonist, H1950, genutzt werden, um die Versuchstiere pharmakologisch zu beeinflussen. Diese Antagonisten wurden 2011 vorab erfolgreich von der Forschungsgruppe um Prof. Buschmann im zerebralen Arteriogenesemodell genutzt. Dabei wurde eine signifikante Reduktion der Arteriogenese bei der Nutzung des H1950 nachgewiesen und eine eingeschränkte Arteriogenese durch den HOE-140. Auch die Nutzung des selektiven Agonisten Sar-(D-Phe<sup>8</sup>-desArg<sup>8</sup>-Bradykinin konnte die zerebrale Arteriogenese signifikant erhöhen (Hillmeister, Gatzke et al. 2011). Für die vorgeschlagene

experimentelle Studie wäre es hilfreich, durch die Anwendung von selektiven Bradykinin-Rezeptor-Antagonisten nachzuweisen, dass die Stimulation und Beschleunigung der Arteriogenese über die Aktivierung der Bradykinin-Rezeptoren durch ARNI erfolgten.

Auch von Interesse wäre es, transgene Rattenzüchtungen in dem hier genutzten koronaren Arteriogenesemodell einzusetzen. Dabei könnte die Wahl auf die Tie2B1R transgene Ratte fallen, die eine Überexpression des BDK1R aufweist, sowie die VECDH-B2R transgene Ratte, die eine Überexpression des BDK2R zeigt (Rodrigues, Silva et al. 2013, Levy, Serra et al. 2017, Veronez, Maghsodi et al. 2019). Diese transgenen Züchtungen wurden von Prof. Dr. Michael Bader (Max Delbrück Centrum für Molekulare Medizin, Berlin Buch) und Kollegen entwickelt, allerdings gibt es bisher wenige Studien, die über die Nutzung dieser transgenen Tiere berichten. Würden diese Tiere im ROP-Modell untersucht, könnte man sie in direkten Vergleich zu denen mit den hier behandelten Rop\_ARNI Tieren setzen. Dies würde die Option für weitere spezifische Untersuchungen des Gefäßwachstums durch Immunhistologie und Visualisierung durch die mikro-CT Technik ermöglichen. Generell lassen aktuelle Forschungsfortschritte auf weitere vielfältige transgene Kleintiermodelle hoffen, die den Weg der Prüfung für neue Behandlungsstrategien bei Herzinsuffizienzpatienten erleichtern werden.

In meiner Dissertationsarbeit konnten bisher Komorbiditäten, die möglicherweise bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz auftreten, nicht beachtet werden. Von Interesse ist der Einfluss der Komorbiditäten auf den Prozess der Arteriogenese, den Bradykinin Rezeptor-Signalweg und den daraus folgenden Behandlungseffekt von ARNI. Zu den Komorbiditätsfaktoren zählen unter anderem das Alter der Patienten, Fettleibigkeit, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus oder auch eine renale Dysfunktion (Riehle und Bauersachs 2019). Diese Faktoren können die Entwicklung einer Herzinsuffizienz negativ beeinflussen. Daher wäre es von großem Interesse, das in dieser Studie genutzte Modell, bei anderen zur KHK koexistenten Krankheitsbildern mit Gefäßpathologien zu nutzen, um dort den Effekt eines ARNI zu untersuchen.

So könnte eine weitere Studie an diabetischen Zucker-Fettratten, die nicht funktionale Leptinrezeptoren exprimieren und einen hohen Serumglukosespiegel aufweisen, stattfinden (Clark, Palmer et al. 1983). Rocic, Chilian und Kollegen nutzten prädiabetische fettleibige Zuckerratten in der Vergangenheit um, unter Anwendung des ROP, die Auswirkungen des metabolischen Syndroms, das unter anderem durch Fettleibigkeit, endotheliale Dysfunktion und oxidativen Stress charakterisiert ist, auf das koronare kollaterale Wachstum zu untersuchen (Hattan, Chilian et al. 2007, Pung, Rocic et al. 2012). Weitere Optionen zum Auslösen von koexistenten Erkrankungen könnte ein diätetisches Behandlungsschema mit einem Futter mit hohem Gesamtfettgehalt von bis zu 60 % genutzt werden, um eine Insulinresistenz und einen Diabetes-Typ 2 auszulösen (Hintze, Benninghoff et al. 2018). Weitere vielfältige Möglichkeiten gibt beispielsweise auch die Nutzung der durch Inzucht der

Sprague-Dawley entstandene Dahl-Ratte. Diese wurde bisher häufig in Herzinsuffizienzmodellen verwendet, um durch eine salzreiche Diät eine diastolische Dysfunktion, Hypertonie und Herzinsuffizienz mit reduzierter Auswurfraction zu stimulieren (Inoko, Kihara et al. 1994). Die Optionen sind mittlerweile weitreichend und müssen je nach Fragestellung mit Bedacht auf die 3 R gewählt werden.

### 5.3. Limitierungen

Patienten leiden häufig an koexistenten Erkrankungen, die in diesem Arteriogenesemodell nicht berücksichtigt werden konnten. Das ist ein Limitierungsfaktor, der bei der Betrachtung und Einordnung der Ergebnisse berücksichtigt werden muss. Da mögliche Vorerkrankungen auch den Prozess der Arteriogenese beeinflussen können, bedarf es weiterer Untersuchungen, um genaue Aussagen treffen zu können.

Ein weiterer zu bedenkender Faktor ist die Gruppengröße von je acht Tieren pro Gruppe, welche nach bestem Wissen im Sinne der 3R gewählt wurde, dennoch als kleine Probandengruppe gewertet werden muss.

Des Weiteren wäre von Nutzen, den hier erhobenen Befund, dass die koronare Arteriogenese von ARNI signifikant erhöht wird, durch vergleichende Bildgebung darzustellen. Zur Visualisierung der standgefundenen Umbauprozesse wäre eine angiographische Darstellung des koronaren Mikrogefäßsystems der kollateralen Arterien durchzuführen. Hillmeister und Kollegen führten dies bereits zuvor erfolgreich in Studien am zerebralen Arteriogenesemodell durch (Hillmeister, Gatzke et al. 2011, Duelsner, Gatzke et al. 2012).

Das genutzte ROP-Modell stellt einen hohen Anspruch an die Umsetzung, besonders wenn es um eine mikrochirurgische Übertragung auf eine noch kleinere Spezies wie die Maus geht. Erste Berichte von Kollegen hinsichtlich der Nutzung eines ROP Mausmodell existieren, allerdings ist die Umsetzung weiterhin problematisch (Wan, Chinchilla et al. 2017). Wünschenswert wäre die Etablierung im Mausmodell, um den Vorteil von Züchtungen mit einem genetischen Bradykinin Rezeptorverlust bzw. -gewinn nutzen zu können. Zudem gilt die Spezies Maus neben der Ratte als vorherrschende Nutzungsart in der experimentellen Erforschung von Gefäßerkrankungen aufgrund ihrer schnellen Reproduktionsrate, verhältnismäßig erfolgreichen genetischen Manipulation und dem akzeptablen Zeitrahmen, in welchen etwa Prozesse der Artherogenese stattfinden können (Emini Veseli, Perrotta et al. 2017).

Auch bieten die hier präsentierten Befunde keine Auskunft über Erkenntnisse auf molekularer Ebene. Die modulierende Wirkung von ARNI auf das KKS soll durch umfangreiche mRNA-Analysen durch andere Mitglieder der Forschungsgruppe durchgeführt werden. Weiterführend sind Studien auf Proteinebene sinnvoll. Dazu werden funktionelle Antikörper gegen Zielmoleküle wie die Bradykinin Rezeptoren (BKB1R, BKB2R) benötigt, welche zu diesem Zeitpunkt nicht kommerziell verfügbar sind.

## 6. Zusammenfassung

Herzinsuffizienzen, ausgelöst durch myokardiale Ischämien, gehören weltweit zu den führenden Todesursachen des Menschen. Präventive Maßnahmen, um die Genese einer Herzinsuffizienz nach einem Myokardinfarkt und schlussendlich das Ereignis eines myokardialen Herztodes zu umgehen, werden laufend erforscht. Studien zeigten, dass Patienten mit hochgradigen Verschlüssen großer koronarer Hauptarterien, die ein ausgeprägtes koronares kollaterales Gefäßnetz besitzen, eine bessere Prognose aufweisen einen Myokardinfarkt zu überleben. Kollateralarterien können hierbei den Blutfluss im Falle eines Myokardinfarktes in dem ischämischen Areal wiederherstellen.

Arteriogenese beschreibt das Wachstum von kleinen kollateralen Gefäßen zu größeren Leitungsgefäßen. Ziel aktueller Forschung ist die therapeutische Stimulation der natürlichen Arteriogenese. Die therapeutische Arteriogenese dient durch das Wachstum von biologischen Bypässen hierbei als wichtiger kompensatorischer Mechanismus zur Prävention von vaskulären Ischämien. Vorherige Studien zeigten, dass die Erhöhung der Bradykininkonzentration und die Reduktion des Abbaus von Kininen die Arteriogenese in der Peripherie und im Gehirn positiv stimulieren. Ziel der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, ob der Angiotensin-Rezeptor-Nepriylisin-Inhibitor Entresto<sup>®</sup>, bestehend aus dem pharmakologischen Kombinationspräparat Sacubitril und Valsartan, in einem Arteriogenesemodell am Rattenherz, durch die Anreicherung von Bradykinin die protektive myokardiale Arteriogenese therapeutisch stimuliert.

Zu Beginn der Studie wurde das repetitiv-okkludierende Programm (ROP) etabliert, um das koronare Kollateralwachstum im Herzen der Sprague-Dawley Ratte zu stimulieren. Dabei wurde in der Initialoperation ein Ballonkatheter auf den *Ramus interventricularis paraconalis* der *Arteria coronaria sinistra* implantiert. An den folgenden sieben Tagen löste die Inflation des Katheters mit Luft, nach einem streng kontrollierten Programm, wiederholt eine kurzfristige Okklusion der Arterie aus. Die Steuerung erfolgte mittels eines standardisierten Computerprogramms. Nach sieben Tagen wurde in der Finaloperation durch permanente Inflation des Okkluders ein Herzinfarkt ausgelöst, daraufhin erfolgte die Entnahme des Herzens. Die Studie umfasste vier Versuchsgruppen. Alle Gruppen erhielten die Initialoperation. Eine Gruppe (Rop) wurde danach an das repetitiv-okkludierende Programm angeschlossen. Eine Gruppe diente als Kontrollgruppe und wurde nicht an das ROP angeschlossen. Bei den anderen zwei Versuchsgruppen kam ebenfalls das ROP zur Anwendung, zusätzlich erhielten die Gruppen eine unterschiedliche medikamentöse Therapie. Eine dieser Versuchsgruppen wurde mit dem kombinierten Angiotensin-Rezeptor-Nepriylisin-

Inhibitor Entresto®, die andere Gruppe mit dem Angiotensin-Rezeptor-Blocker Valsartan behandelt. Die primäre Endpunktmessung erfolgte durch die Ermittlung der kollateralen Perfusion mittels Isotop-markierter Mikrosphären, die bei Initialoperation wie auch Finaloperation injiziert wurden.

Nach siebentägiger Anwendung des repetitiv-okkludierenden Programms wurde festgestellt, dass die mittlere kollaterale Perfusion in der Rop-Gruppe signifikant höher war, als in der Kontrollgruppe. In der mit Valsartan behandelten Versuchsgruppe konnte, gegenüber der ausschließlich mit ROP behandelten Gruppe, keine zusätzliche Verbesserung der koronaren Arteriogenese nachweisen werden. Die zusätzlich mit dem Angiotensin-Rezeptor-Nepriylsin-Inhibitor Entresto® therapierte Gruppe zeigte, im Vergleich zu allen anderen Versuchsgruppen, eine signifikant verbesserte kollaterale Perfusion.

Die vorliegende Studie beweist somit erstmalig, dass die Behandlung mit dem Angiotensin-Rezeptor-Nepriylsin-Inhibitor Entresto® durch eine beschleunigte Stimulation des kollateralen Gefäßwachstums zu einer deutlichen Verbesserung der kollateralen Perfusion führt. Ausschlaggebend für die Wirkung von Entresto® könnte die Erhöhung bzw. Stabilisierung des Bradykininspiegels sein. Diese geschieht aufgrund der Inhibition von Nepriylsin, dem Enzym, das für den Bradykininabbau verantwortlich ist. Gleichzeitig dient Valsartan als Modulator der Blutdruckregulation, um möglichen überschießenden Effekten eines Nepriylsin-Inhibitors entgegenzuwirken. Es wird deutlich, dass der aufgezeigte pharmakologische Mechanismus, welcher durch die Behandlung mit Entresto® ausgelöst wird, als präventiv-medikamentöse Behandlungsoption einen hohen klinischen Nutzen bei Herzinsuffizienz und Myokardinfarkt haben kann.

## 6.1. Summary

### **Investigation of the effect of angiotensin receptor neprilysin inhibitors (ARNI) on collateral artery growth in the coronary arteriogenesis model of the rat.**

Heart failure triggered by myocardial ischemia is one of the leading causes of human death worldwide. Research into preventive measures to avoid the development of heart failure after myocardial infarction and ultimately the event of sudden cardiac death has been ongoing for many years. Studies have shown that patients with high-grade occlusions of large coronary arteries with a distinct coronary collateral vascular network have a better prognosis to survive myocardial infarction, since collateral arteries can restore blood flow in the ischemic area in the case of myocardial infarction.

Arteriogenesis describes the growth of small collateral blood vessels into larger conducting blood vessels. Current research aims to stimulate natural arteriogenesis by various therapeutic measures. Therapeutic arteriogenesis serves as an important compensatory mechanism for the prevention of vascular ischemia through the growth of biological bypasses. Previous studies showed that increasing bradykinin concentration and reducing kinin degradation positively stimulate arteriogenesis in the periphery and brain. The aim of the dissertation at hand was to investigate whether the angiotensin receptor/ neprilysin inhibitor Entresto®, consisting of the pharmacological combination preparation sacubitril and valsartan, therapeutically stimulates protective myocardial arteriogenesis in a rat heart arteriogenesis model by enhancing bradykinin.

At the start of the study, the repetitive-occluding program (ROP) was established to stimulate coronary collateral growth in the heart of the Sprague-Dawley rat. To achieve this, a balloon catheter was surgically implanted on the ramus interventricularis paraconalis of the coronary sinistra artery. Over the next seven days, the catheter was repeatedly inflated with air following a tightly controlled schedule, each time triggering the short-term occlusion of the artery. This procedure was monitored by a standardized computer program. After seven days, myocardial infarction was triggered by the permanent inflation of the occluder during the final surgery, which was followed by the removal of the heart. The study included four experimental groups. All groups received the initial operation. One group (Rop) was then connected to the repetitive-occluding program. One group served as a control group and was not connected to the ROP. The other two experimental groups also used the ROP, and in addition, the groups received different drug therapies. One of these experimental groups was treated with the combined angiotensin receptor-neprilysin inhibitor Entresto®, whereas the other group was treated with the angiotensin receptor blocker valsartan. The primary end-point measurement was performed by determining the collateral perfusion using isotope-labeled microspheres injected during both the initial and final surgery.

After using the repetitive-occluding program for seven days, the mean collateral perfusion was found to be significantly higher in the ROP group than in the control group. In the experimental group treated with valsartan, no additional improvement in coronary arteriogenesis could be detected compared with the group treated with ROP alone. The group additionally treated with the angiotensin receptor/neprilysin inhibitor Entresto® showed a significantly improved collateral perfusion compared with the other experimental groups.

Thus, the study at hand proves for the first time that treatment with the angiotensin receptor/neprilysin inhibitor Entresto® leads to a marked improvement in collateral perfusion by accelerating the stimulation of collateral vessel growth. Crucial to the effect of Entresto® may be the increase or stabilization of bradykinin levels. This occurs due to the inhibition of neprilysin, the enzyme responsible for bradykinin degradation. At the same time, valsartan serves as a modulator of blood pressure regulation to counteract possible exaggerated effects of a neprilysin inhibitor. The demonstrated pharmacological mechanism triggered by Entresto® treatment may have a high clinical benefit as a preventive drug treatment option in heart failure and myocardial infarction.

## 7. Literaturverzeichnis

Abaci, A., A. Oğuzhan, S. Kahraman, N. K. Eryol, S. Unal, H. Arinç und A. Ergin (1999). "Effect of diabetes mellitus on formation of coronary collateral vessels." Circulation **99**(17): 2239-2242.

Abelous, J. (1909). "Les substances hypotensives de l'urine humaine normale." CR Soc Biol. **66**: 511-512.

Abelous, J. und E. Bardier (1909). "L'urohypotensine." J Physiol Pathol Gener **11**: 777-786.

Abrahamsson, T., L. Karp, U. Brandt-Eliasson, P. Morsing, L. Renberg und P. O. Sjöquist (2000). "Candesartan Causes Long-lasting Antagonism of the Angiotensin II Receptor-mediated Contractile Effects in Isolated Vascular Preparations: a Comparison with Irbesartan, Losartan and its Active Metabolite (EXP-3174)." Blood Press **9**(sup1): 52.

Alhenc-Gelas, F., J. Marchetti, J. Allegrini, P. Corvol und J. Menard (1981). "Measurement of urinary kallikrein activity. Species differences in kinin production." Biochim Biophys Acta **677**(3-4): 477-488.

Allahwala, U. K., J. Weaver und R. Bhindi (2019). "Animal chronic total occlusion models: A review of the current literature and future goals." Thromb Res **177**: 83-90.

Arnett, E. N., J. M. Isner, D. R. Redwood, K. M. Kent, W. P. Baker, H. Ackerstein und W. C. Roberts (1979). "Coronary artery narrowing in coronary heart disease: comparison of cineangiographic and necropsy findings." Ann Intern Med **91**(3): 350-356.

Arras, M., W. D. Ito, D. Scholz, B. Winkler, J. Schaper und W. Schaper (1998). "Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb." J Clin Invest **101**(1): 40-50.

Auer-Grumbach, M., S. Toegel, M. Schabhüttl, D. Weinmann, C. Chiari, D. L. H. Bennett, C. Beetz, D. Klein, P. M. Andersen, I. Böhme, R. Fink-Puches, M. Gonzalez, M. B. Harms, W. Motley, M. M. Reilly, W. Renner, S. Rudnik-Schöneborn, B. Schlotter-Weigel, A. C. Themistocleous, J. H. Weishaupt, A. C. Ludolph, T. Wieland, F. Tao, L. Abreu, R. Windhager, M. Zitzelsberger, T. M. Strom, T. Walther, S. S. Scherer, S. Züchner, R. Martini und J. Senderek (2016). "Rare Variants in MME, Encoding Metalloprotease Nephilysin, Are Linked to Late-Onset Autosomal-Dominant Axonal Polyneuropathies." Am J Hum Genet **99**(3): 607-623.

Ayalasomayajula, S., T. Langenickel, P. Pal, S. Boggarapu und G. Sunkara (2017). "Clinical Pharmacokinetics of Sacubitril/Valsartan (LCZ696): A Novel Angiotensin Receptor-Nephilysin Inhibitor." Clin Pharmacokinet **56**(12): 1461-1478.

Azizi, M. und J. Ménard (2004). "Combined blockade of the renin-angiotensin system with angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists." Circulation **109**(21): 2492-2499.

Baroldi, G. und G. Scomazzoni (1967). Coronary circulation in the normal and the pathologic heart. Wahington, D.C., USA, Office of the Surgeon General.

Bayes-Genis, A., J. Barallat und A. M. Richards (2016). "A Test in Context: Nephilysin: Function, Inhibition, and Biomarker." J Am Coll Cardiol **68**(6): 639-653.

Behrendt, D. und P. Ganz (2002). "Endothelial function. From vascular biology to clinical applications." Am J Cardiol **90**(10c): 40I-48I.

Böckmann, S. und I. Paegelow (2000). "Kinins and kinin receptors: importance for the activation of leukocytes." J Leukoc Biol **68**(5): 587-592.

Bracken, M. B. (2009). "Why animal studies are often poor predictors of human reactions to exposure." J R Soc Med **102**(3): 120-122.

Brix, M., E. E. Buschmann, A. Zietzer, J. A. Jaurigue, L. Li, C. Jungk, I. Buschmann, D. Janke und P. Hillmeister (2017). "Long-term individual shear rate therapy counterpulsation enhances plasma nitrite release in patients with PAD." Vasa **46**(1): 37-45.

Buckberg, G. D., J. C. Luck, D. B. Payne, J. I. Hoffman, J. P. Archie und D. E. Fixler (1971). "Some sources of error in measuring regional blood flow with radioactive microspheres." J Appl Physiol **31**(4): 598-604.

Busch, H. J., I. R. Buschmann, G. Mies, C. Bode und K. A. Hossmann (2003). "Arteriogenesis in hypoperfused rat brain." J Cereb Blood Flow Metab **23**(5): 621-628.

Buschmann, E. E., M. Brix, L. Li, J. Doreen, A. Zietzer, M. Li, I. Buschmann und P. Hillmeister (2016). "Adaptation of external counterpulsation based on individual shear rate therapy improves endothelial function and claudication distance in peripheral artery disease." Vasa **45**(4): 317-324.

Buschmann, E. E., W. Utz, N. Pagonas, J. Schulz-Menger, A. Busjahn, J. Monti, W. Maerz, F. le Noble, L. Thierfelder, R. Dietz, V. Klauss, M. Gross, I. R. Buschmann und A. Network (2009). "Improvement of fractional flow reserve and collateral flow by treatment with external counterpulsation (Art.Net.-2 Trial)." Eur. J. Clin. Invest. **39**(10): 866-875.

Buschmann, I. und W. Schaper (1999). "Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth." News Physiol Sci **14**: 121-125.

Buschmann, I. und W. Schaper (2000). "The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis)." J Pathol **190**(3): 338-342.

Buschmann, I. R., H. J. Busch, G. Mies und K. A. Hossmann (2003). "Therapeutic induction of arteriogenesis in hypoperfused rat brain via granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." Circulation **108**(5): 610-615.

- Campbell, A. R., D. Satran, A. G. Zenovich, K. M. Campbell, J. C. Espel, T. L. Arndt, A. K. Poulouse, C. R. Boisjolie, K. Juusola, B. A. Bart und T. D. Henry (2008). "Enhanced external counterpulsation improves systolic blood pressure in patients with refractory angina." Am Heart J **156**(6): 1217-1222.
- Campbell, D. J. (2000). "Towards understanding the kallikrein-kinin system: insights from measurement of kinin peptides." Braz J Med Biol Res **33**(6): 665-677.
- Campbell, D. J. (2018). "Nepilysin Inhibitors and Bradykinin." Front Med (Lausanne) **5**: 257.
- Campbell, D. J., A. Kladis und A. J. Valentijn (1995). "Effects of losartan on angiotensin and bradykinin peptides and angiotensin-converting enzyme." J. Cardiovasc. Pharmacol. **26**(2): 233-240.
- Campbell, D. J., H. Krum und M. D. Esler (2005). "Losartan increases bradykinin levels in hypertensive humans." Circulation **111**(3): 315-320.
- Carey, R. M. und H. M. Siragy (2003). "Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation." Endocr Rev **24**(3): 261-271.
- Carrao, A. C., W. M. Chilian, J. Yun, C. Kolz, P. Rocic, K. Lehmann, J. P. van den Wijngaard, P. van Horssen, J. A. Spaan, V. Ohanyan, Y. F. Pung und I. Buschmann (2009). "Stimulation of coronary collateral growth by granulocyte stimulating factor: role of reactive oxygen species." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(11): 1817-1822.
- Cassar, A., D. R. Holmes, Jr., C. S. Rihal und B. J. Gersh (2009). "Chronic coronary artery disease: diagnosis and management." Mayo Clin Proc **84**(12): 1130-1146.
- Clark, J. B., C. J. Palmer und W. N. Shaw (1983). "The diabetic Zucker fatty rat." Proc Soc Exp Biol Med **173**(1): 68-75.
- Cohen, M. V., X. M. Yang, Y. Liu, K. S. Snell und J. M. Downey (1994). "A new animal model of controlled coronary artery occlusion in conscious rabbits." Cardiovasc Res **28**(1): 61-65.
- Colman, R. W. (1980). "Patho-physiology of kallikrein system." Ann Clin Lab Sci **10**(3): 220-226.
- Coulter, D. und I. Edwards (1987). "Cough associated with captopril and enalapril." Br Med J (Clin Res Ed) **294**(6586): 1521-1523.
- Couture, R. und J. P. Girolami (2004). "Putative roles of kinin receptors in the therapeutic effects of angiotensin 1-converting enzyme inhibitors in diabetes mellitus." Eur J Pharmacol **500**(1-3): 467-485.
- Cribier, A. (2012). "Development of transcatheter aortic valve implantation (TAVI): A 20-year odyssey." Arch. Cardiovasc. Dis. **105**(3): 146-152.

Crick, S. J., M. N. Sheppard, S. Y. Ho, L. Gebstein und R. H. Anderson (1998). "Anatomy of the pig heart: comparisons with normal human cardiac structure." Journal of anatomy **193 ( Pt 1)**(Pt 1): 105-119.

Crimi, N., F. Palermo, R. Oliveri, R. Polosa, S. MAORÌ und A. Mistretta (1994). "Inhibition of neutral endopeptidase potentiates bronchoconstriction induced by neurokinin A in asthmatic patients." Clinical & Experimental Allergy **24**(2): 115-120.

Dagenais, G. R., J. Pogue, K. Fox, M. L. Simoons und S. Yusuf (2006). "Angiotensin-converting-enzyme inhibitors in stable vascular disease without left ventricular systolic dysfunction or heart failure: a combined analysis of three trials." Lancet **368**(9535): 581-588.

Dai, X. und J. E. Faber (2010). "Endothelial nitric oxide synthase deficiency causes collateral vessel rarefaction and impairs activation of a cell cycle gene network during arteriogenesis." Circ Res **106**(12): 1870-1881.

de Gasparo, M., K. J. Catt, T. Inagami, J. W. Wright und T. Unger (2000). "International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors." Pharmacol Rev **52**(3): 415-472.

deBlois, D., J. Bouthillier und F. Marceau (1991). "Pulse exposure to protein synthesis inhibitors enhances vascular responses to des-Arg9-bradykinin: possible role of interleukin-1." Br. J. Pharmacol. **103**(1): 1057-1066.

DeFily, D. V. und W. M. Chilian (1992). Methods for assessing coronary collateral growth: insights into mechanisms responsible for collateral development. Collateral Circulation. Boston, MA, USA Springer: 29-40.

Destatis Statistisches Bundesamt. (2021). "Die 10 häufigsten Todesursachen durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen." Retrieved 07.01.2022, from [https:// www. destatis.de/DE/Themen /Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html](https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html).

Dominiak, P. (1999). "AT1-Rezeptorantagonisten: gibt es Unterschiede." J Kardiol **6**: 488-494.

Dray, A. und M. Perkins (1993). "Bradykinin and inflammatory pain." Trends Neurosci **16**(3): 99-104.

Duchene, J. und A. Ahluwalia (2009). "The kinin B(1) receptor and inflammation: new therapeutic target for cardiovascular disease." Curr Opin Pharmacol **9**(2): 125-131.

Duelsner, A., N. Gatzke, J. Glaser, P. Hillmeister, M. Li, E. J. Lee, K. Lehmann, D. Urban, H. Meyborg, P. Stawowy, A. Busjahn, S. Nagorka, A. B. Persson und I. R. Buschmann (2012). "Acetylsalicylic acid, but not clopidogrel, inhibits therapeutically induced cerebral arteriogenesis in the hypoperfused rat brain." J Cereb Blood Flow Metab **32**(1): 105-114.

Duncan, A. M., L. M. Burrell, A. Kladis und D. J. Campbell (1997). "Angiotensin and bradykinin peptides in rats with myocardial infarction." J Card Fail **3**(1): 41-52.

- Elzinga, W. E. (1969). "Ameroid constrictor: uniform closure rates and a calibration procedure." J Appl Physiol **27**(3): 419-421.
- Emanuelli, C., R. Maestri, D. Corradi, R. Marchione, A. Minasi, M. G. Tozzi, M. B. Salis, S. Straino, M. C. Capogrossi, G. Olivetti und P. Madeddu (1999). "Dilated and failing cardiomyopathy in bradykinin B(2) receptor knockout mice." Circulation **100**(23): 2359-2365.
- Emini Veseli, B., P. Perrotta, G. R. A. De Meyer, L. Roth, C. Van der Donckt, W. Martinet und G. R. Y. De Meyer (2017). "Animal models of atherosclerosis." Eur J Pharmacol **816**: 3-13.
- Erdös, E. (1979). Bradykinin, kallidin and kallikrein Handbook of Experimental Pharmacology. a. I. M. Departments of Pharmacology, The University of Texas, Southwestern Medical School,. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag 427-487.
- Feldman, A. M. (2002). "Enhanced external counterpulsation: mechanism of action." Clin Cardiol **25**(12 Suppl 2): li11-15.
- Feldman, A. M., J. A. Haller und S. T. DeKosky (2016). "Valsartan/Sacubitril for Heart Failure: Reconciling Disparities Between Preclinical and Clinical Investigations." Jama **315**(1): 25-26.
- Fischer, H. S., G. Zernig, K. F. Hauser, C. Gerard, L. B. Hersh und A. Saria (2002). "Neutral endopeptidase knockout induces hyperalgesia in a model of visceral pain, an effect related to bradykinin and nitric oxide." Journal of Molecular Neuroscience **18**: 129-134.
- Fishbein, M. C., S. Meerbaum, J. Rit, U. Lando, K. Kanmatsuse, J. C. Mercier, E. Corday und W. Ganz (1981). "Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique." Am Heart J **101**(5): 593-600.
- Franklin, K. J. (1931). "The Work of Richard Lower (1631-1691)." Proc R Soc Med **25**(2): 113-118.
- Franzosi, M. G. (1998). "Indications for ACE inhibitors in the early treatment of acute myocardial infarction: systematic overview of individual data from 100 000 patients in randomized trials." Circulation **97**(22): 2202-2212.
- Frey, E. K., H. Kraut und E. Werle (1932). "Über die Blutzuckersenkende Wirkung des Kallikreins (Padutins)." Klinische Wochenschrift **11**(20): 846-849.
- Fujita, M., K. Yamanishi, E. Araie, S. Sasayama, D. P. McKown und D. Franklin (1994). "Determinants of collateral development in a canine model with repeated coronary occlusion." Heart Vessels **9**(6): 292-299.
- Fukuda, S., S. Kaga, H. Sasaki, L. Zhan, L. Zhu, H. Otani, R. Kalfin, D. K. Das und N. Maulik (2004). "Angiogenic signal triggered by ischemic stress induces myocardial repair in rat during chronic infarction." J Mol Cell Cardiol **36**(4): 547-559.
- Fulton, W. F. (1964). "Anastomotic enlargement and ischaemic myocardial damage." Br Heart J **26**: 1-15.

Gatzke, N., P. Hillmeister, A. Dulsner, N. Guc, R. Dawid, K. H. Smith, N. Pagonas, P. Bramlage, M. Gorath und I. R. Buschmann (2018). "Nitroglycerin application and coronary arteriogenesis." PLoS One **13**(8): e0201597.

Gatzke, N., P. Hillmeister, A. Dulsner, N. Guc, R. Dawid, K. H. Smith, N. Pagonas, P. Bramlage, M. Gorath und I. R. Buschmann (2018). "Nitroglycerin application and coronary arteriogenesis." PLoS One **13**(8): e0201597.

Glagov, S., E. Weisenberg, C. K. Zarins, R. Stankunavicius und G. J. Kolettis (1987). "Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries." N. Engl. J. Med. **316**(22): 1371-1375.

Gomes, A. C., I. Falcão-Pires, A. L. Pires, C. Brás-Silva und A. F. Leite-Moreira (2013). "Rodent models of heart failure: an updated review." Heart Fail Rev **18**(2): 219-249.

Goodfriend, T. L., M. E. Elliott und K. J. Catt (1996). "Angiotensin receptors and their antagonists." N Engl J Med **334**(25): 1649-1654.

Grinberg, O. Y., H. Hou, S. A. Grinberg, K. L. Moodie, E. Demidenko, B. J. Friedman, M. J. Post und H. M. Swartz (2004). "pO<sub>2</sub> and regional blood flow in a rabbit model of limb ischemia." Physiol Meas **25**(3): 659-670.

Gu, J., A. Noe, P. Chandra, S. Al-Fayoumi, M. Ligueros-Saylan, R. Sarangapani, S. Maahs, G. Ksander, D. F. Rigel und A. Y. Jeng (2010). "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of LCZ696, a novel dual-acting angiotensin receptor—neprilysin inhibitor (ARNi)." J. Clin. Pharmacol. **50**(4): 401-414.

Gu, W., D. Weihrauch, K. Tanaka, J. P. Tessmer, P. S. Pagel, J. R. Kersten, W. M. Chilian und D. C. Warltier (2003). "Reactive oxygen species are critical mediators of coronary collateral development in a canine model." Am J Physiol Heart Circ Physiol **285**(4): H1582-1589.

Habib, G. B., J. Heibig, S. A. Forman, B. G. Brown, R. Roberts, M. L. Terrin und R. Bolli (1991). "Influence of coronary collateral vessels on myocardial infarct size in humans. Results of phase I thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) trial. The TIMI Investigators." Circulation **83**(3): 739-746.

Hale, S. L., K. J. Alker und R. A. Kloner (1988). "Evaluation of nonradioactive, colored microspheres for measurement of regional myocardial blood flow in dogs." Circulation **78**(2): 428-434.

Hale, S. L. und R. A. Kloner (1987). "Effect of early coronary artery reperfusion on infarct development in a model of low collateral flow." Cardiovasc Res **21**(9): 668-673.

Halkos, M. E., Z. Q. Zhao, F. Kerendi, N. P. Wang, R. Jiang, L. S. Schmarkey, B. J. Martin, A. A. Quyyumi, W. L. Few, H. Kin, R. A. Guyton und J. Vinten-Johansen (2008). "Intravenous infusion of mesenchymal stem cells enhances regional perfusion and improves ventricular function in a porcine model of myocardial infarction." Basic Res Cardiol **103**(6): 525-536.

Hansson, L., L. H. Lindholm, L. Niskanen, J. Lanke, T. Hedner, A. Niklason, K. Luomanmäki, B. Dahlöf, U. de Faire, C. Mörlin, B. E. Karlberg, P. O. Wester und J. E. Björck (1999). "Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: the Captopril Prevention Project (CAPPP) randomised trial." Lancet **353**(9153): 611-616.

Hattan, N., W. M. Chilian, F. Park und P. Rocic (2007). "Restoration of coronary collateral growth in the Zucker obese rat: impact of VEGF and ecSOD." Basic Res Cardiol **102**(3): 217-223.

Hegde, L. G., C. Yu, T. Renner, H. Thibodeaux, S. R. Armstrong, T. Park, M. Cheruvu, R. Olsufka, E. R. Sandvik, C. E. Lane, J. Budman, C. M. Hill, U. Klein und S. S. Hegde (2011). "Concomitant angiotensin AT1 receptor antagonism and neprilysin inhibition produces omapatrilat-like antihypertensive effects without promoting tracheal plasma extravasation in the rat." J Cardiovasc Pharmacol **57**(4): 495-504.

Heil, M. und W. Schaper (2004). "Pathophysiology of collateral development." Coron Artery Dis **15**(7): 373-378.

Heitsch, H. (2003). "The therapeutic potential of bradykinin B2 receptor agonists in the treatment of cardiovascular disease." Expert Opin. Investig. Drugs **12**(5): 759-770.

Herzog, S., H. Sager, E. Khmelevski, A. Deylig und W. D. Ito (2002). "Collateral arteries grow from preexisting anastomoses in the rat hindlimb." Am J Physiol Heart Circ Physiol **283**(5): H2012-2020.

Heusch, G., J. Rose und T. Ehring (1997). "Cardioprotection by ACE inhibitors in myocardial ischaemia/reperfusion. The importance of bradykinin." Drugs **54 Suppl 5**: 31-41.

Heymann, M. A., B. D. Payne, J. I. Hoffman und A. M. Rudolph (1977). "Blood flow measurements with radionuclide-labeled particles." Prog Cardiovasc Dis **20**(1): 55-79.

Higuchi, Y., A. Hashiguchi, J. Yuan, A. Yoshimura, J. Mitsui, H. Ishiura, M. Tanaka, S. Ishihara, H. Tanabe, S. Nozuma, Y. Okamoto, E. Matsuura, R. Ohkubo, S. Inamizu, W. Shiraishi, R. Yamasaki, Y. Ohyagi, J. Kira, Y. Oya, H. Yabe, N. Nishikawa, S. Tobisawa, N. Matsuda, M. Masuda, C. Kugimoto, K. Fukushima, S. Yano, J. Yoshimura, K. Doi, M. Nakagawa, S. Morishita, S. Tsuji und H. Takashima (2016). "Mutations in MME cause an autosomal-recessive Charcot-Marie-Tooth disease type 2." Ann Neurol **79**(4): 659-672.

Hillmeister, P. und A. Bondke Persson (2020). "Bradykinin-from snake poison to therapeutic options." Acta Physiol (Oxf) **228**(3): e13445.

Hillmeister, P., N. Gatzke, A. Dulsner, M. Bader, I. Schadock, I. Hoefler, I. Hamann, C. Infante-Duarte, G. Jung, K. Troidl, D. Urban, P. Stawowy, M. Frentsch, M. Li, S. Nagorka, H. Wang, Y. Shi, F. le Noble und I. Buschmann (2011). "Arteriogenesis is modulated by bradykinin receptor signaling." Circ Res **109**(5): 524-533.

Hillmeister, P., K. E. Lehmann, A. Bondke, H. Witt, A. Duelsner, C. Gruber, H. J. Busch, J. Jankowski, P. Ruiz-Noppinger, K. A. Hossmann und I. R. Buschmann (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**(11): 1811-1823.

Hillmeister, P., S. Nagorka, N. Gatzke, A. Dülsner, K. Li, M. Dai, A. Bondke Persson, M. A. Lauxmann, J. Jaurigue, O. Ritter, P. Bramlage, E. Buschmann und I. Buschmann (2021). "Angiotensin-converting enzyme inhibitors stimulate cerebral arteriogenesis." Acta Physiol (Oxf): e13732.

Hintze, K. J., A. D. Benninghoff, C. E. Cho und R. E. Ward (2018). "Modeling the Western Diet for Preclinical Investigations." Adv Nutr **9**(3): 263-271.

Hirshfeld, J. W., Jr. und A. S. Nathan (2020). "Deriving Function From Structure: Applying Hagen-Poiseuille to Coronary Arteries." JACC Cardiovasc Interv **13**(4): 498-501.

Hoefer, I. E., N. van Royen und M. M. Jost (2006). "Experimental models of arteriogenesis: differences and implications." Lab Anim (NY) **35**(2): 36-44.

Holmbom, B., U. Näslund, A. Eriksson, I. Virtanen und L. E. Thornell (1993). "Comparison of triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining versus detection of fibronectin in experimental myocardial infarction." Histochem. Cell Biol. **99**(4): 265-275.

Holton, F. und P. Holton (1952). "The vasodilator activity of spinal roots." J. Physiol. **118**(3): 310.

Hutcheson, R., R. Terry, J. Chaplin, E. Smith, A. Musiyenko, J. C. Russell, T. Lincoln und P. Rocic (2013). "MicroRNA-145 restores contractile vascular smooth muscle phenotype and coronary collateral growth in the metabolic syndrome." Arterioscl. Throm. Vas. **33**(4): 727-736.

Hutcheson, R., R. Terry, B. Hutcheson, R. Jadhav, J. Chaplin, E. Smith, R. Barrington, S. D. Proctor und P. Rocic (2015). "miR-21-mediated decreased neutrophil apoptosis is a determinant of impaired coronary collateral growth in metabolic syndrome." Am J Physiol Heart Circ Physiol **308**(11): H1323-1335.

Ichiki, T., P. A. Labosky, C. Shiota, S. Okuyama, Y. Imagawa, A. Fogo, F. Niimura, I. Ichikawa, B. L. Hogan und T. Inagami (1995). "Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor." Nature **377**(6551): 748-750.

Igic, R., E. G. Erdös, H. S. Yeh, K. Sorrells und T. Nakajima (1972). "Angiotensin I converting enzyme of the lung." Circ Res **31**(9): Suppl 2:51-61.

Inoko, M., Y. Kihara, I. Morii, H. Fujiwara und S. Sasayama (1994). "Transition from compensatory hypertrophy to dilated, failing left ventricles in Dahl salt-sensitive rats." Am J Physiol **267**(6 Pt 2): H2471-2482.

Inoue, Y., N. Nakamura und T. Inagami (1997). "A review of mutagenesis studies of angiotensin II type 1 receptor, the three-dimensional receptor model in search of the agonist and antagonist binding site and the hypothesis of a receptor activation mechanism." J Hypertens **15**(7): 703-714.

Ito, W. D., M. Arras, D. Scholz, B. Winkler, P. Htun und W. Schaper (1997). "Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion." Am J Physiol **273**(3 Pt 2): H1255-1265.

Jamaiyar, A., C. Juguilon, W. Wan, D. Richardson, S. Chinchilla, J. Gadd, M. Enrick, T. Wang, C. McCabe, Y. Wang, C. Kolz, A. Clark, S. Thodeti, V. Ohanyan, F. Dong, B. Zhou, W. Chilian und L. Yin (2022). "The essential role for endothelial cell sprouting in coronary collateral growth." J Mol Cell Cardiol **165**: 158-171.

James, T. N. und G. E. Burch (1958). "Blood supply of the human interventricular septum." Circulation **17**(3): 391-396.

Jenča, D., V. Melenovský, J. Stehlik, V. Staněk, J. Kettner, J. Kautzner, V. Adámková und P. Wohlfahrt (2021). "Heart failure after myocardial infarction: incidence and predictors." ESC heart failure **8**(1): 222-237.

Jering, K. S., B. Claggett, M. A. Pfeffer, C. Granger, L. Køber, E. F. Lewis, A. P. Maggioni, D. Mann, J. J. V. McMurray, J. L. Rouleau, S. D. Solomon, P. G. Steg, P. van der Meer, M. Wernsing, K. Carter, W. Guo, Y. Zhou, M. Lefkowitz, J. Gong, Y. Wang, B. Merkely, S. M. Macin, U. Shah, J. C. Nicolau und E. Braunwald (2021). "Prospective ARNI vs. ACE inhibitor trial to Determine Superiority in reducing heart failure Events after Myocardial Infarction (PARADISE-MI): design and baseline characteristics." Eur J Heart Fail **23**(6): 1040-1048.

Jhund, P. S., M. Fu, E. Bayram, C. H. Chen, M. Negrusz-Kawecka, A. Rosenthal, A. S. Desai, M. P. Lefkowitz, A. R. Rizkala, J. L. Rouleau, V. C. Shi, S. D. Solomon, K. Swedberg, M. R. Zile, J. J. McMurray, M. Packer, P.-H. Investigators und Committees (2015). "Efficacy and safety of LCZ696 (sacubitril-valsartan) according to age: insights from PARADIGM-HF." Eur Heart J **36**(38): 2576-2584.

Jurisch, D. und U. Laufs (2021). "Chronisches Koronarsyndrom." Der Internist **62**(1): 47-57.

Kamiya, A. und T. Togawa (1980). "Adaptive regulation of wall shear stress to flow change in the canine carotid artery." Am J Physiol **239**(1): H14-21.

Kaplan, A. P. und M. Silverberg (1987). "The coagulation-kinin pathway of human plasma." Blood **70**(1): 1-15.

Kato, H. und K. Enyoji (1992). "Hydroxylated kininogens and kinins." Agents Actions Suppl **38** ( Pt 1): 217-224.

Keeran, K. J., K. R. Jeffries, A. D. Zetts, J. Taylor, S. Kozlov und T. J. Hunt (2017). "A Chronic Cardiac Ischemia Model in Swine Using an Ameroid Constrictor." JoVE(128): 56190.

Kelemen, M. D. (2006). "Angina pectoris: evaluation in the office." Med Clin North Am **90**(3): 391-416.

Kellett, D. (1965). "On the anti-inflammatory activity of protamine sulphate and of hexadimethrine bromide, inhibitors of plasma kinin formation." Br. J. Pharmacol. **24**(3): 705.

Kingma, J. G., Jr., D. Simard und J. R. Rouleau (2005). "Comparison of neutron activated and radiolabeled microsphere methods for measurement of transmural myocardial blood flow in dogs." J Thromb Thrombolysis **19**(3): 201-208.

Kissel, C., V. Gabus und A. Baggish (2019). "The effects of long-term vigorous endurance exercise on the coronary arteries." Swiss Sports Exerc. Med. **67**(2): 43-49.

Klein, H., S. Puschmann, J. Schaper und W. Schaper (1981). "The mechanism of the tetrazolium reaction in identifying experimental myocardial infarction." Virchows Arch. **393**(3): 287-297.

Klocke, R., W. Tian, M. T. Kuhlmann und S. Nikol (2007). "Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease." Cardiovasc Res **74**(1): 29-38.

Knuuti, J., W. Wijns, A. Saraste, D. Capodanno, E. Barbato, C. Funck-Brentano, E. Prescott, R. F. Storey, C. Deaton, T. Cuisset, S. Agewall, K. Dickstein, T. Edvardsen, J. Escaned, B. J. Gersh, P. Svitil, M. Gilard, D. Hasdai, R. Hatala, F. Mahfoud, J. Masip, C. Muneretto, M. Valgimigli, S. Achenbach und J. J. Bax (2020). "2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes." Eur Heart J **41**(3): 407-477.

Kodama, K., H. Kusuoka, A. Sakai, T. Adachi, S. Hasegawa, Y. Ueda, M. Mishima, M. Hori, T. Kamada, M. Inoue und A. Hirayama (1996). "Collateral channels that develop after an acute myocardial infarction prevent subsequent left ventricular dilation." J Am Coll Cardiol **27**(5): 1133-1139.

Kraut, H., E. K. Frey und E. Werle (1930). "Der Nachweis eines Kreislaufhormons in der Pankreasdrüse. (IV. Mitteilung über dieses Kreislaufhormon.)." **189**(3-4): 97-106.

Kraut, H., E. K. Frey, E. Werle und F. Schultz (1934). "Nachweis und Vorkommen des Kallikreins im Harn. IX. Mitteilung über Kallikrein." **230**(1-6): 259-277.

Kuhr, F., J. Lowry, Y. Zhang, V. Brovkovich und R. A. Skidgel (2010). "Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors." Neuropeptides **44**(2): 145-154.

Kumar, D., T. A. Hacker, J. Buck, L. F. Whitesell, E. H. Kaji, P. S. Douglas und T. J. Kamp (2005). "Distinct mouse coronary anatomy and myocardial infarction consequent to ligation." Coron Artery Dis **16**(1): 41-44.

Lawson, W. E., E. D. Kennard, J. C. Hui, R. Holubkov und S. F. Kelsey (2003). "Analysis of baseline factors associated with reduction in chest pain in patients with angina pectoris treated by enhanced external counterpulsation." Am J Cardiol **92**(4): 439-443.

- Leavesley, S. J., W. Ledkins und P. Rocic (2014). "A device for performing automated balloon catheter inflation ischemia studies." PLoS One **9**(4): e95823.
- Levy, R. F., A. J. Serra, E. L. Antonio, L. Dos Santos, D. S. Bocalini, J. B. Pesquero, M. Bader, V. F. Merino, H. A. de Oliveira, E. C. de Arruda Veiga, J. A. Silva, Jr. und P. J. Tucci (2017). "Cardiac morphofunctional characteristics of transgenic rats with overexpression of the bradykinin B1 receptor in the endothelium." Physiol Res **66**(6): 925-932.
- Lewis, G. P. (1964). "Plasma kinins and inflammation." Metabolism **13**(10, Part 2): 1256-1263.
- Li, K., C. Zemmrich, P. Bramlage, A. B. Persson, M. Sacirovic, O. Ritter, E. Buschmann, I. Buschmann und P. Hillmeister (2021). "Effect of ACEI and ARB treatment on nitric oxide-dependent endothelial function." Vasa **50**(6): 413-422.
- Libby, P. und P. Theroux (2005). "Pathophysiology of coronary artery disease." Circulation **111**(25): 3481-3488.
- Linz, W., P. A. Martorana und B. A. Schölkens (1990). "Local inhibition of bradykinin degradation in ischemic hearts." J. Cardiovasc. Pharmacol. **15 Suppl 6**: S99-109.
- Linz, W., G. Wiemer, P. Gohlke, T. Unger und B. A. Schölkens (1995). "Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors." Pharmacol Rev **47**(1): 25-49.
- Linz, W., G. Wiemer und B. A. Schölkens (1992). "ACE-inhibition induces NO-formation in cultured bovine endothelial cells and protects isolated ischemic rat hearts." J. Mol. Cell. Cardiol. **24**(8): 909-919.
- Linz, W., P. Wohlfart, B. A. Schölkens, T. Malinski und G. Wiemer (1999). "Interactions among ACE, kinins and NO." Cardiovasc Res **43**(3): 549-561.
- Lower, R. (1932). Early science in Oxford: De corde, 1669 Latin and English, Oxford University Press.
- Lu, B., M. Figini, C. Emanuelli, P. Geppetti, E. F. Grady, N. P. Gerard, J. Ansell, D. G. Payan, C. Gerard und N. Bunnett (1997). "The control of microvascular permeability and blood pressure by neutral endopeptidase." Nat. Med. **3**(8): 904-907.
- Madeddu, P., C. Emanuelli und S. El-Dahr (2007). "Mechanisms of disease: the tissue kallikrein-kinin system in hypertension and vascular remodeling." Nat Clin Pract Nephrol **3**(4): 208-221.
- Madeddu, P., C. Emanuelli, R. Maestri, M. B. Salis, A. Minasi, M. C. Capogrossi und G. Olivetti (2000). "Angiotensin II type 1 receptor blockade prevents cardiac remodeling in bradykinin B(2) receptor knockout mice." J. Hypertens. **35**(1 Pt 2): 391-396.

Maestri, R., A. F. Milia, M. B. Salis, G. Graiani, C. Lagrasta, M. Monica, D. Corradi, C. Emanuelli und P. Madeddu (2003). "Cardiac hypertrophy and microvascular deficit in kinin B2 receptor knockout mice." J. Hypertens. **41**(5): 1151-1155.

Majani, G., A. Giardini, C. Opasich, R. Glazer, A. Hester, G. Tognoni, J. N. Cohn und L. Tavazzi (2005). "Effect of valsartan on quality of life when added to usual therapy for heart failure: results from the Valsartan Heart Failure Trial." J Card Fail **11**(4): 253-259.

Manchanda, A. und O. Soran (2007). "Enhanced external counterpulsation and future directions: step beyond medical management for patients with angina and heart failure." J Am Coll Cardiol **50**(16): 1523-1531.

Maniotis, A. J., R. Folberg, A. Hess, E. A. Seftor, L. M. Gardner, J. Pe'er, J. M. Trent, P. S. Meltzer und M. J. Hendrix (1999). "Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry." Am. J. Pathol. **155**(3): 739-752.

Manohar, M. und T. E. Goetz (2005). "Intrapulmonary arteriovenous shunts of >15 microm in diameter probably do not contribute to arterial hypoxemia in maximally exercising Thoroughbred horses." J Appl Physiol (1985) **99**(1): 224-229.

Martorana, P. A., B. Kettenbach, G. Breipohl, W. Linz und B. A. Schölkens (1990). "Reduction of infarct size by local angiotensin-converting enzyme inhibition is abolished by a bradykinin antagonist." Eur J Pharmacol **182**(2): 395-396.

Matsunaga, T., D. C. Wartier, D. W. Weihrauch, M. Moniz, J. Tessmer und W. M. Chilian (2000). "Ischemia-induced coronary collateral growth is dependent on vascular endothelial growth factor and nitric oxide." Circulation **102**(25): 3098-3103.

Maxwell, M. P., D. J. Hearse und D. M. Yellon (1987). "Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischaemia: a critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction." Cardiovasc Res **21**(10): 737-746.

May, O. und W. A. Khair (2013). "Enhanced external counterpulsation has no lasting effect on ambulatory blood pressure." Clin Cardiol **36**(1): 21-24.

McMurray, J. J., J. Östergren, K. Swedberg, C. B. Granger, P. Held, E. L. Michelson, B. Olofsson, S. Yusuf und M. A. Pfeffer (2003). "Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function taking angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Added trial." Lancet **362**(9386): 767-771.

McMurray, J. J., M. Packer, A. S. Desai, J. Gong, M. Lefkowitz, A. R. Rizkala, J. L. Rouleau, V. C. Shi, S. D. Solomon, K. Swedberg, M. R. Zile und P.-H. C. Investigators (2014). "Baseline characteristics and treatment of patients in prospective comparison of ARNI with ACEI to determine impact on global mortality and morbidity in heart failure trial (PARADIGM-HF)." Eur J Heart Fail **16**(7): 817-825.

McMurray, J. J., M. Packer, A. S. Desai, J. Gong, M. P. Lefkowitz, A. R. Rizkala, J. L. Rouleau, V. C. Shi, S. D. Solomon, K. Swedberg und M. R. Zile (2014). "Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure." N Engl J Med **371**(11): 993-1004.

- Meier, P., S. Gloekler, R. Zbinden, S. Beckh, S. F. de Marchi, S. Zbinden, K. Wustmann, M. Billinger, R. Vogel, S. Cook, P. Wenaweser, M. Togni, S. Windecker, B. Meier und C. Seiler (2007). "Beneficial effect of recruitable collaterals: a 10-year follow-up study in patients with stable coronary artery disease undergoing quantitative collateral measurements." Circulation **116**(9): 975-983.
- Meier, P., S. H. Schirmer, A. J. Lansky, A. Timmis, B. Pitt und C. Seiler (2013). "The collateral circulation of the heart." BMC Med **11**: 143.
- Messadi-Laribi, E., V. Griol-Charhbili, A. Pizard, M. P. Vincent, D. Heudes, P. Meneton, F. Alhenc-Gelas und C. Richer (2007). "Tissue kallikrein is involved in the cardioprotective effect of AT1-receptor blockade in acute myocardial ischemia." J Pharmacol Exp Ther **323**(1): 210-216.
- Michaels, A. D., G. Linnemeier, O. Soran, S. F. Kelsey und E. D. Kennard (2004). "Two-year outcomes after enhanced external counterpulsation for stable angina pectoris (from the International EECF Patient Registry [IEPR])." Am J Cardiol **93**(4): 461-464.
- Mindroui, T., G. Scicli, F. Perini, O. A. Carretero und A. G. Scicli (1986). "Identification of a new kinin in human urine." J Biol Chem **261**(16): 7407-7411.
- Mordi, I., N. Mordi, C. Delles und N. Tzemos (2016). "Endothelial dysfunction in human essential hypertension." J Hypertens **34**(8): 1464-1472.
- Mörtsell, D., K. Malmqvist, C. Held und T. Kahan (2007). "Irbesartan reduces common carotid artery intima-media thickness in hypertensive patients when compared with atenolol: the Swedish Irbesartan Left Ventricular Hypertrophy Investigation versus Atenolol (SILVHIA) study." J Intern Med **261**(5): 472-479.
- Nagel, T., N. Resnick, W. J. Atkinson, C. F. Dewey, Jr. und M. A. Gimbrone, Jr. (1994). "Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells." J Clin Invest **94**(2): 885-891.
- Neal, B., S. MacMahon und N. Chapman (2000). "Effects of ACE inhibitors, calcium antagonists, and other blood-pressure-lowering drugs: results of prospectively designed overviews of randomised trials. Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration." Lancet **356**(9246): 1955-1964.
- Ng, K. K. und J. R. Vane (1968). "Fate of angiotensin I in the circulation." Nature **218**(5137): 144-150.
- Nishio, K., S. Kashiki, H. Tachibana und Y. Kobayashi (2011). "Angiotensin-converting enzyme and bradykinin gene polymorphisms and cough: A meta-analysis." World J Cardiol **3**(10): 329-336.
- Nolly, H., L. A. Carbini, G. Scicli, O. A. Carretero und A. G. Scicli (1994). "A local kallikrein-kinin system is present in rat hearts." Hypertension **23**(6 Pt 2): 919-923.

Nolly, H., A. G. Scicli, G. Scicli und O. A. Carretero (1985). "Characterization of a kininogenase from rat vascular tissue resembling tissue kallikrein." Circ Res **56**(6): 816-821.

Nussberger, J., M. Cugno, C. Amstutz, M. Cicardi, A. Pellacani und A. Agostoni (1998). "Plasma bradykinin in angio-oedema." Lancet **351**(9117): 1693-1697.

Ohno, M., J. P. Cooke, V. J. Dzau und G. H. Gibbons (1995). "Fluid shear stress induces endothelial transforming growth factor beta-1 transcription and production. Modulation by potassium channel blockade." J. Clin. Invest. **95**(3): 1363-1369.

Ojima, M., Y. Inada, Y. Shibouta, T. Wada, T. Sanada, K. Kubo und K. Nishikawa (1997). "Candesartan (CV-11974) dissociates slowly from the angiotensin AT1 receptor." Eur J Pharmacol **319**(1): 137-146.

Oskarsson, H. J. und D. D. Heistad (1997). "Oxidative stress produced by angiotensin too. Implications for hypertension and vascular injury." Circulation **95**(3): 557-559.

Packer, M., R. M. Califf, M. A. Konstam, H. Krum, J. J. McMurray, J. L. Rouleau und K. Swedberg (2002). "Comparison of omapatrilat and enalapril in patients with chronic heart failure: the Omapatrilat Versus Enalapril Randomized Trial of Utility in Reducing Events (OVERTURE)." Circulation **106**(8): 920-926.

Petetta, F. und R. Ciccocioppo (2021). "Public perception of laboratory animal testing: Historical, philosophical, and ethical view." Addict Biol **26**(6): e12991.

Pfeffer, M. A., B. Claggett, E. F. Lewis, C. B. Granger, L. Køber, A. P. Maggioni, D. L. Mann, J. J. V. McMurray, J. L. Rouleau, S. D. Solomon, P. G. Steg, O. Berwanger, M. Cikes, C. G. De Pasquale, A. Fernandez, G. Filippatos, K. Jering, U. Landmesser, V. Menon, B. Merkely, M. C. Petrie, I. Petrov, M. Schou, M. Senni, D. Sim, P. van der Meer, M. Lefkowitz, Y. Zhou, Y. Wang und E. Braunwald (2022). "Impact of Sacubitril/Valsartan Versus Ramipril on Total Heart Failure Events in the PARADISE-MI Trial." Circulation **145**(1): 87-89.

Pfeffer, M. A., J. J. McMurray, E. J. Velazquez, J. L. Rouleau, L. Køber, A. P. Maggioni, S. D. Solomon, K. Swedberg, F. Van de Werf, H. White, J. D. Leimberger, M. Henis, S. Edwards, S. Zelenkofske, M. A. Sellers und R. M. Califf (2003). "Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both." N Engl J Med **349**(20): 1893-1906.

Picard, F., P. Panagiotidou, A. Wolf-Pütz, I. Buschmann, E. Buschmann, M. Steffen und R. M. Klein (2018). "Usefulness of individual shear rate therapy, new treatment option for patients with symptomatic coronary artery disease." Am. J. Cardiol. **121**(4): 416-422.

Piepoli, M. F., A. W. Hoes, S. Agewall, C. Albus, C. Brotons, A. L. Catapano, M.-T. Cooney, U. Corrà, B. Cosyns, C. Deaton, I. Graham, M. S. Hall, F. D. R. Hobbs, M.-L. Løchen, H. Löllgen, P. Marques-Vidal, J. Perk, E. Prescott, J. Redon, D. J. Richter, N. Sattar, Y. Smulders, M. Tiberi, H. B. van der Worp, I. van Dis, W. M. M. Verschuren, S. Binno und E. S. C. S. D. Group (2016). "2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts). Developed with the special contribution of the European

Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR)." Eur. Heart J. **37**(29): 2315-2381.

Pitt, B., P. A. Poole-Wilson, R. Segal, F. A. Martinez, K. Dickstein, A. J. Camm, M. A. Konstam, G. Riegger, G. H. Klinger, J. Neaton, D. Sharma und B. Thiyagarajan (2000). "Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: randomised trial--the Losartan Heart Failure Survival Study ELITE II." Lancet **355**(9215): 1582-1587.

Pound, P., S. Ebrahim, P. Sandercock, M. B. Bracken und I. Roberts (2004). "Where is the evidence that animal research benefits humans?" The BMJ **328**(7438): 514-517.

Proud, D., D. W. MacGlashan, Jr., H. H. Newball, E. S. Schulman und L. M. Lichtenstein (1985). "Immunoglobulin E-mediated release of a kininogenase from purified human lung mast cells." Am Rev Respir Dis **132**(2): 405-408.

Pung, Y. F., P. Rocic, M. P. Murphy, R. A. Smith, J. Hafemeister, V. Ohanyan, G. Guarini, L. Yin und W. M. Chilian (2012). "Resolution of mitochondrial oxidative stress rescues coronary collateral growth in Zucker obese fatty rats." Arterioscler Thromb Vasc Biol **32**(2): 325-334.

Qadri, F. und M. Bader (2018). "Kinin B1 receptors as a therapeutic target for inflammation." Expert Opin Ther Targets **22**(1): 31-44.

Radke, P. W., A. Heini-Green, O. M. Frass, M. J. Post, K. Sato, D. M. Geddes und E. W. Alton (2006). "Evaluation of the porcine ameroid constrictor model of myocardial ischemia for therapeutic angiogenesis studies." Endothelium **13**(1): 25-33.

Ranjit, A., S. Khajepour und A. Aghazadeh-Habashi (2021). "Update on Angiotensin II Subtype 2 Receptor: Focus on Peptide and Nonpeptide Agonists." Mol Pharmacol **99**(6): 469-487.

Reed, R., C. Kolz, B. Potter und P. Rocic (2008). "The mechanistic basis for the disparate effects of angiotensin II on coronary collateral growth." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(1): 61-67.

Regoli, D. und J. Barabe (1980). "Pharmacology of bradykinin and related kinins." Pharmacol Rev **32**(1): 1-46.

Regoli, D., W. K. Park und F. Rioux (1974). "Pharmacology of angiotensin." Pharmacol Rev **26**(2): 69-123.

Regoli, D., N. E. Rhaleb, G. Drapeau, S. Dion, C. Tousignant, P. D'Orléans-Juste und P. Devillier (1989). "Basic pharmacology of kinins: pharmacologic receptors and other mechanisms." Adv Exp Med Biol **247a**: 399-407.

Regoli, D. C., F. Marceau und J. Lavigne (1981). "Induction of B1-receptors for kinins in the rabbit by a bacterial lipopolysaccharide." Eur J Pharmacol **71**(1): 105-115.

Regoli, D. C., F. Marceau und J. Lavigne (1981). "Induction of beta 1-receptors for kinins in the rabbit by a bacterial lipopolysaccharide." Eur J Pharmacol **71**(1): 105-115.

Reinhardt, C. P., S. Dalhberg, M. A. Tries, R. Marcel und J. A. Leppo (2001). "Stable labeled microspheres to measure perfusion: validation of a neutron activation assay technique." Am J Physiol Heart Circ Physiol **280**(1): H108-116.

Rhaleb, N. E., X. P. Yang und O. A. Carretero (2011). "The kallikrein-kinin system as a regulator of cardiovascular and renal function." Compr Physiol **1**(2): 971-993.

Riehle, C. und J. Bauersachs (2019). "Small animal models of heart failure." Cardiovasc Res **115**(13): 1838-1849.

Risau, W. (1997). "Mechanisms of angiogenesis." Nature **386**(6626): 671-674.

Risau, W. und I. Flamme (1995). "Vasculogenesis." Annu Rev Cell Dev Biol **11**: 73-91.

Rizzi, A., V. Benaglio und D. Ribatti (2017). "Angiogenesis versus arteriogenesis." Rom J Morphol Embryol **58**(1): 15-19.

Rocha, E. S. M., W. T. Beraldo und G. Rosenfeld (1949). "Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin." Am J Physiol **156**(2): 261-273.

Rocic, P., C. Kolz, R. Reed, B. Potter und W. M. Chilian (2007). "Optimal reactive oxygen species concentration and p38 MAP kinase are required for coronary collateral growth." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(6): H2729-2736.

Roder, F., K. H. Hiller, P. Henz, M. von Kienlin, W. R. Bauer, G. Ertl und A. Haase (1997). "Three-dimensional coronary angiography of the perfused rat heart." J Magn Reson Imaging **7**(2): 316-320.

Rodrigues, E. S., R. F. Silva, R. P. Martin, S. M. Oliveira, C. R. Nakaie, R. A. Sabatini, V. F. Merino, J. B. Pesquero, M. Bader und S. I. Shimuta (2013). "Evidence that kinin B2 receptor expression is upregulated by endothelial overexpression of B1 receptors." Peptides **42**: 1-7.

Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." N Engl J Med **340**(2): 115-126.

Ruiz-Ortega, M., O. Lorenzo, M. Rupérez, S. König, B. Wittig und J. Egido (2000). "Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms." Circ Res **86**(12): 1266-1272.

Rusche, B. (2003). "The 3Rs and animal welfare-conflict or the way forward?" ALTEX **20**(Supp1): 63-76.

- Sampath, R., G. L. Kukielka, C. W. Smith, S. G. Eskin und L. V. McIntire (1995). "Shear stress-mediated changes in the expression of leukocyte adhesion receptors on human umbilical vein endothelial cells in vitro." Ann. Biomed. Eng. **23**(3): 247-256.
- Schaper, W. (2009). "Collateral circulation: past and present." Basic Res Cardiol **104**(1): 5-21.
- Schaper, W. und I. Buschmann (1999). "Arteriogenesis, the good and bad of it." Eur Heart J **20**(18): 1297-1299.
- Schaper, W. und I. Buschmann (1999). "Collateral circulation and diabetes." Circulation **99**(17): 2224-2226.
- Schaper, W., M. De Brabander und P. Lewi (1971). "DNA synthesis and mitoses in coronary collateral vessels of the dog." Circ Res **28**(6): 671-679.
- Schaper, W., W. Flameng, B. Winkler, B. Wüsten, W. Türschmann, G. Neugebauer, M. Carl und S. Pasyk (1976). "Quantification of collateral resistance in acute and chronic experimental coronary occlusion in the dog." Circ Res **39**(3): 371-377.
- Schaper, W. und S. Pasyk (1976). "Influence of collateral flow on the ischemic tolerance of the heart following acute and subacute coronary occlusion." Circulation **53**(3 Suppl): 157-62.
- Schaper, W. und J. Schaper (2004). Arteriogenesis. Boston Kluwer Academic Publishers.
- Schmidt, I. und H. Fritz (1989). "Emil K. Frey (1888–1977) and Eugen Werle (1902–1975). Their research activities and their importance." The Kallikrein-Kinin system in health and disease. Limbach, Braunschweig: 23-31.
- Schoenhagen, P., K. M. Ziada, S. R. Kapadia, T. D. Crowe, S. E. Nissen und E. M. Tuzcu (2000). "Extent and direction of arterial remodeling in stable versus unstable coronary syndromes: an intravascular ultrasound study." Circulation **101**(6): 598-603.
- Scholz, D., W. Ito, I. Fleming, E. Deindl, A. Sauer, M. Wiesnet, R. Busse, J. Schaper und W. Schaper (2000). "Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis)." Virchows Arch. **436**(3): 257-270.
- Schriefer, J. A., E. P. Broudy und A. H. Hassen (1996). "Endopeptidase inhibitors decrease myocardial ischemia/reperfusion injury in an in vivo rabbit model." J Pharmacol Exp Ther **278**(3): 1034-1039.
- Scicli, A. G., T. Mindroiu, G. Scicli und O. A. Carretero (1982). "Blood kinins, their concentration in normal subjects and in patients with congenital deficiency in plasma prekallikrein and kininogen." J Lab Clin Med **100**(1): 81-93.
- Scicli, G., H. Nolly, O. A. Carretero und A. G. Scicli (1989). "Glandular kallikrein-like enzyme in adrenal glands." Adv Exp Med Biol **247b**: 217-222.

Seiler, C. (2003). "The human coronary collateral circulation." Heart **89**(11): 1352-1357.

Shyy, Y. J., H. J. Hsieh, S. Usami und S. Chien (1994). "Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemotactic protein 1 gene expression in vascular endothelium." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(11): 4678-4682.

Silber, S. (2019). "ESC-Leitlinie 2019 zum chronischen Koronarsyndrom (CCS, vormals „stabile KHK“)." Herz **44**(8): 676-683.

Simon, F., A. Oberhuber, N. Floros, A. Busch, M. U. Wagenhäuser, H. Schelzig und M. Duran (2018). "Acute Limb Ischemia-Much More Than Just a Lack of Oxygen." Int. J. Mol. Sci. **19**(2): 374.

Skeggs, L. T., Jr., J. R. Kahn und N. P. Shumway (1956). "The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme." J Exp Med **103**(3): 295-299.

Skidgel, R. A., R. M. Davis und E. G. Erdös (1984). "Purification of a human urinary carboxypeptidase (kininase) distinct from carboxypeptidases A, B, or N." Anal Biochem **140**(2): 520-531.

Skidgel, R. A. und E. G. Erdos (2004). "Angiotensin converting enzyme (ACE) and neprilysin hydrolyze neuropeptides: a brief history, the beginning and follow-ups to early studies." Peptides **25**(3): 521-525.

Skidgel, R. A., W. W. Schulz, L. T. Tam und E. G. Erdos (1987). "Human renal angiotensin I converting enzyme and neutral endopeptidase." Kidney Int Suppl **20**: S45-48.

Slater, J. und V. Rill (2003). "Coronary artery disease: new insights into the pathophysiology, prevalence and early detection of a monster menace." Semin Ultrasound CT MR **24**(2): 114-122.

Solomon, S. D., M. Zile, B. Pieske, A. Voors, A. Shah, E. Kraigher-Krainer, V. Shi, T. Bransford, M. Takeuchi, J. Gong, M. Lefkowitz, M. Packer und J. J. McMurray (2012). "The angiotensin receptor neprilysin inhibitor LCZ696 in heart failure with preserved ejection fraction: a phase 2 double-blind randomised controlled trial." Lancet **380**(9851): 1387-1395.

Solomon, S. D., M. Zile, B. Pieske, A. Voors, A. Shah, E. Kraigher-Krainer, V. Shi, T. Bransford, M. Takeuchi, J. Gong, M. Lefkowitz, M. Packer und J. J. V. McMurray (2012). "The angiotensin receptor neprilysin inhibitor LCZ696 in heart failure with preserved ejection fraction: a phase 2 double-blind randomised controlled trial." Lancet **380**(9851): 1387-1395.

Sorop, O., J. van de Wouw, S. Chandler, V. Ohanyan, J. D. Tune, W. M. Chilian, D. Merkus, S. B. Bender und D. J. Duncker (2020). "Experimental animal models of coronary microvascular dysfunction." Cardiovasc Res **116**(4): 756-770.

Springer, M. L., A. S. Chen, P. E. Kraft, M. Bednarski und H. M. Blau (1998). "VEGF gene delivery to muscle: potential role for vasculogenesis in adults." Molecular cell **2**(5): 549-558.

Stojiljkovic, L. und R. Behnia (2007). "Role of renin angiotensin system inhibitors in cardiovascular and renal protection: a lesson from clinical trials." Curr Pharm Des **13**(13): 1335-1345.

Strawn, W. B. und C. M. Ferrario (2002). "Mechanisms linking angiotensin II and atherogenesis." Curr Opin Lipidol **13**(5): 505-512.

Suzuki, T., G. Kopia, S. Hayashi, L. R. Bailey, G. Llanos, R. Wilensky, B. D. Klugherz, G. Papandreou, P. Narayan, M. B. Leon, A. C. Yeung, F. Tio, P. S. Tsao, R. Falotico und A. J. Carter (2001). "Stent-based delivery of sirolimus reduces neointimal formation in a porcine coronary model." Circulation **104**(10): 1188-1193.

Swedberg K., K. J., Consensus trial study group (1987). "Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS)." N Engl J Med **316**(23): 1429-1435.

Tan, F., H. Jackman, R. A. Skidgel, E. K. Zsigmond und E. G. Erdös (1989). "Protamine inhibits plasma carboxypeptidase N, the inactivator of anaphylatoxins and kinins." Anesthesiology **70**(2): 267-275.

Thoma, R. (1893). Histogenese und Histomechanik des Gefäßsystems. Stuttgart, Verlag von Ferdinand Enke.

Touma, G., D. Ramsay und J. Weaver (2015). "Chronic total occlusions - Current techniques and future directions." Int J Cardiol Heart Vasc **7**: 28-39.

Toyota, E., Y. Kawaguchi, Y. Ogasawara, N. Watanabe, Y. Neishi, T. Kawamoto, H. Okura und K. Yoshida (2007). "Novel rat model of ischemic cardiomyopathy induced by repetitive myocardial ischemia/reperfusion injury while conscious." Circ J **71**(5): 788-795.

Toyota, E., D. C. Warltier, T. Brock, E. Ritman, C. Kolz, P. O'Malley, P. Rocic, M. Focardi und W. M. Chilian (2005). "Vascular endothelial growth factor is required for coronary collateral growth in the rat." Circulation **112**(14): 2108-2113.

Troidl, K., S. Tribulova, W. J. Cai, I. Rüdinger, H. Apfelbeck, W. Schierling, C. Troidl, T. Schmitz-Rixen und W. Schaper (2010). "Effects of endogenous nitric oxide and of DETA NONOate in arteriogenesis." J Cardiovasc Pharmacol **55**(2): 153-160.

Turner, A. J., C. D. Brown, J. A. Carson und K. Barnes (2000). "The neprilysin family in health and disease." Adv Exp Med Biol **477**: 229-240.

van den Borne, S. W., V. A. van de Schans, A. E. Strzelecka, H. T. Vervoort-Peters, P. M. Lijnen, J. P. Cleutjens, J. F. Smits, M. J. Daemen, B. J. Janssen und W. M. Blankesteyn (2009). "Mouse strain determines the outcome of wound healing after myocardial infarction." Cardiovasc Res **84**(2): 273-282.

Van Royen, N., J. J. Piek, W. Schaper, C. Bode und I. Buschmann (2001). "Arteriogenesis: mechanisms and modulation of collateral artery development." J Nucl Cardiol **8**(6): 687-693.

Veronez, C. L., S. Maghsodi, M. Todiras, E. Popova, A. F. Rodrigues, F. Qadri, J. B. Pesquero und M. Bader (2019). "Endothelial B2-receptor overexpression as an alternative animal model for hereditary angioedema." Allergy **74**(10): 1998-2002.

Vodovar, N., C. Paquet, A. Mebazaa, J. M. Launay, J. Hugon und A. Cohen-Solal (2015). "Neprilysin, cardiovascular, and Alzheimer's diseases: the therapeutic split?" Eur Heart J **36**(15): 902-905.

Waksman, R. und S. Saito (2009). Chronic total occlusions: a guide to recanalization. West-Sussex, UK, Wiley-Blackwell.

Walker, K., M. Perkins und A. Dray (1995). "Kinins and kinin receptors in the nervous system." Neurochem Int **26**(1): 1-16.

Wan, W., S. Chinchilla, C. Zhang, A. Jamaiyar, M. Enrick, Z. Nikolov, C. Kolz, V. Ohanyan, W. Chilian und L. Yin (2017). "A mouse model for coronary collateral growth validated via micro-CT and echo-contrast." Circulation **136**(suppl\_1): A19191-A19191.

WAVA, World Association of Veterinary Anatomists (2017). "Nomina anatomica veterinaria, Sixth edition." Retrieved 16.01.2023, from [https:// www .wava-amav.org/wava-documents.html](https://www.wava-amav.org/wava-documents.html).

Weber, K. T. und J. S. Janicki (1989). "Angiotensin and the remodelling of the myocardium." Br J Clin Pharmacol **28 Suppl 2**(Suppl 2): 141S-149S.

Weihrauch, D., J. Tessmer, D. C. Warltier und W. M. Chilian (1998). "Repetitive coronary artery occlusions induce release of growth factors into the myocardial interstitium." Am J Physiol **275**(3): H969-976.

Wenger, N. K. (2010). "Angina in women." Curr Cardiol Rep **12**(4): 307-314.

Wheeler, E. C. und Z. R. Brenner (1995). "Peripheral vascular anatomy, physiology, and pathophysiology." AACN Clin Issues **6**(4): 505-514.

Wiemer, G., B. A. Schölkens, R. H. Becker und R. Busse (1991). "Ramiprilat enhances endothelial autacoid formation by inhibiting breakdown of endothelium-derived bradykinin." Hypertension **18**(4): 558-563.

Williams, R. P., V. Manou-Stathopoulou, S. R. Redwood und M. S. Marber (2014). "'Warm-up Angina': harnessing the benefits of exercise and myocardial ischaemia." Heart **100**(2): 106-114.

World Health Organization. (2020). "The top 10 causes of death." Retrieved 10.1.2022, from [https:// www. who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death).

Yang, H. Y., E. G. Erdös und Y. Levin (1970). "A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin." Biochim Biophys Acta **214**(2): 374-376.

Yusuf, S., M. A. Pfeffer, K. Swedberg, C. B. Granger, P. Held, J. J. McMurray, E. L. Michelson, B. Olofsson und J. Ostergren (2003). "Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and preserved left-ventricular ejection fraction: the CHARM-Preserved Trial." Lancet **362**(9386): 777-781.

Zahradka, P., J. P. Werner, S. Buhay, B. Litchie, G. Helwer und S. Thomas (2002). "NF-kappaB activation is essential for angiotensin II-dependent proliferation and migration of vascular smooth muscle cells." J Mol Cell Cardiol **34**(12): 1609-1621.

Zhang, Y., J. W. Bissing, L. Xu, A. J. Ryan, S. M. Martin, F. J. Miller, Jr., K. C. Kregel, G. R. Buettner und R. E. Kerber (2001). "Nitric oxide synthase inhibitors decrease coronary sinus-free radical concentration and ameliorate myocardial stunning in an ischemia-reperfusion model." J Am Coll Cardiol **38**(2): 546-554.



## Publikationen

1. **v. Hertell, V.**, Gatzke, N., Hillmeister, P., Plendl, J. (2018) Analyzing the role of bradykinin system modulators Sacubitril and Ramipril on collateral growth in a model of coronary arteriogenesis in rats. 11. Doktorandensymposium & DRS Präsentationsseminar "Biomedical Sciences" – 21.9.2018. Berlin. Germany. In: Doktorandensymposium & DRS Präsentationsseminar "Biomedical Sciences". ISBN: 978-3-86387-929-7
2. Li K., **Kratzmann V.**, Dai M., Gatzke N., Rocic P., Bramlage P., Grisk O., Lubomirov LT., Hoffmeister M., Lauxmann MA., Ritter O., Buschmann E., Bader M., Persson AB., Buschmann I., Hillmeister P. (2023) Angiotensin receptor-neprilysin inhibitor improves coronary collateral perfusion. *Front Cardiovasc Med.*;9:981333.

## Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl für ihre außerordentliche Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit. Vielen Dank für die aktiven Anregungen bei der Bearbeitung von Problemstellungen sowie für den motivierenden Austausch, der maßgeblichen Einfluss auf die Erstellung dieser Arbeit hatte.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Ivo Buschmann danke ich sehr für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Möglichkeit an dieser interessanten Aufgabenstellung arbeiten zu können: Diese Arbeit hat mir ermöglicht wertvolle Erfahrungen als Tierärztin im Arbeitsbereich der experimentellen Forschung, auch außerhalb von Deutschland, zu sammeln.

Sehr dankbar bin ich PHD Petra Rocic für die Möglichkeit und die große Unterstützung, im New York Medical College; das ROP – Modell an der Ratte zu erlernen, durchzuführen sowie aufkommende Fragen zu klären.

Danken möchte ich allen Kollegen der Arbeitsgruppe Buschmann und insbesondere, meinem Betreuer, Herrn Dr. Philipp Hillmeister von ganzem Herzen für seine Unterstützung in jeder Phase dieser Promotionsarbeit. Dank seiner Mühe, kritischen Korrekturen und motivierender Worten konnte ich Problemstellungen bearbeiten und Kapitel für Kapitel dieser Arbeit beenden. Auch in schwierigen Situationen half er mir, einen kühlen Kopf zu bewahren und das Ziel nicht aus den Augen zu verlieren.

Zudem möchte ich sehr Herrn Prof. Dr. Michael Bader für die Möglichkeit danken am Max-Delbrück-Centrum in Berlin Buch zu arbeiten und seiner Arbeitsgruppe, speziell Reika Langanki, Jutta Meisel und Astrid Schiche für ihre Unterstützung im Laboralltag danken.

Von Herzen danke ich meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere Vivi, Karo, Lia und Pia, die mich zum einen immer wieder motiviert und zum anderen, jederzeit so gut sie konnten, unterstützt haben. Ich bin sehr dankbar, eine so große Herde, um mich zu wissen.

Besonders danke ich meinem Mann Henrik, der jeden Schritt dieses Weges mit mir gegangen ist, mich unterstützt und Rücksicht genommen und vor allem immer an mich geglaubt hat.

Meinen süßen Kindern, Cecilia und Franz, danke ich, dass es sie gibt. Sie gaben mir die Motivation diese Arbeit zu beenden.

## **Finanzierungsquellen - Funding Sources**

Die Arbeit wurde finanziell unterstützt durch die Medizinische Hochschule Brandenburg Theodor Fontane.

## **Interessenskonflikt - Conflict of Interest**

Im Rahmen dieser Arbeit bestehen keine Interessenskonflikte durch Zuwendungen Dritter.

## **Selbstständigkeitserklärung**

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

Lüneburg, den 19.07.2023

Victoria Kratzmann









9 783967 292220

**mbv**berlin mensch und buch verlag

59,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-222-0