

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie am Campus Virchow Klinikum und dem Center for Cardiovascular Research der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung klinischer und molekularer Parameter der Endothelfunktion nach *Individual Shear Rate* Gegenpulsationstherapie bei Patienten mit einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Michèle Brix

aus Potsdam

Datum der Promotion:

08.12.2017

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung.....	1
2.	Abstract	2
3.	Einführung.....	3
4.	Methodik	5
5.	Ergebnisse	11
6.	Diskussion	16
7.	Literaturverzeichnis.....	19
8.	Eidesstattliche Versicherung.....	21
9.	Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen.....	22
10.	Druckexemplare der ausgewählten Publikationen	24
10.1	Publikation 1.....	24
10.2	Publikation 2.....	34
10.3	Publikation 3.....	43
11.	Lebenslauf	56
12.	Komplette Publikationsliste	57
13.	Danksagung.....	58

1. Zusammenfassung

Einleitung: Die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) ist eine progressive und lebenslimitierende Erkrankung. Die *Individual Shear Rate Therapy* (ISRT) ist ein neuer nicht-invasiver Therapieansatz zur Behandlung der pAVK und basiert auf den Grundlagen der externen Gegenpulsationstherapie. In dieser Arbeit entwickelten wir ISRT und untersuchten die klinischen und molekularen Effekte der Therapie auf die Endothelfunktion in zwei Studien (ISRT-1 und ISRT-2 Studie).

Methoden: In der ISRT-1 Studie untersuchten wir Kurzzeiteffekte von der ISRT im Vergleich zu dem Laufbandtraining in einem *cross-over* Studiendesign an 26 gesunden Probanden. In der ISRT-2 Studie analysierten wir Kurz- und Langzeiteffekte nach 30 Stunden ISRT an 14 pAVK Patienten mit einer stabilen intermittierenden Claudicatio (Fontaine Stadium IIb). Zur Entwicklung von der ISRT wurde die Gegenpulsationstherapie durch individualisierte Manschettendrücke an eine optimale Steigerung der peripheren Perfusion angepasst. Als molekulare Messparameter wurden in den ISRT-1 und ISRT-2 Studien die Plasma-Nitritkonzentration, sowie die mRNA Marker-Genexpression in peripheren mononuklearen Zellen (PBMCs) von NOS2, dem Kallikrein-Kinin System (KKS) und den Shelterin-Komponenten (TRF-1 und TRF-2) analysiert. Als klinische Parameter der ISRT-2 Studie (pAVK Patienten) dienten die flussvermittelte Gefäßerweiterung (FMD, in Englisch flow-mediated dilation) in der Arteria brachialis (AB) und der Arteria femoralis communis, der Knöchel-Arm-Index, sowie die schmerzfreie und absolute Gehstrecke (ICD und ACD, in Englisch initial und absolute claudication distance).

Ergebnisse: Die ISRT-1 Studie diente als Pilotphase für die ISRT-2 Studie. In der ISRT-2 Studie zeigte sich eine Verdopplung der systolischen Blutflussgeschwindigkeit in der Unterschenkelarterie unter ISRT bei pAVK Patienten. Die Endothelfunktionsparameter FMD in der AB und die Plasma-Nitritkonzentration erhöhten sich signifikant unter ISRT. Die ICD und ACD verbesserten sich bei allen pAVK Patienten nach 30 Stunden ISRT. Weiterhin zeigte sich eine Verringerung von B2R und Kininogen sowie eine Erhöhung der TRF-2 mRNA Genexpression im Langzeitversuch bei pAVK Patienten.

Zusammenfassung: Mit der Hilfe von ISRT haben wir einen neuen Therapieansatz für pAVK Patienten entwickelt. Durch ISRT konnte eine Verbesserung der 1) Endothelfunktion, 2) der peripheren Perfusion und 3) der initialen und absoluten Gehstrecke nachgewiesen werden.

2. Abstract

Background: Peripheral Artery Disease (PAD) is a progressive and life-limiting disease. The individual shear rate therapy (ISRT) is a novel non-invasive treatment concept for PAD patients and was developed by an adaptation of external counterpulsation therapy. This thesis introduces the ISRT concept and investigates molecular and clinical effects of ISRT on endothelial function in two studies (ISRT-1 and ISRT-2 study).

Methods: The ISRT-1 study compares short-term effects of ISRT and treadmill training in 26 healthy volunteers in a cross-over study design. The ISRT-2 study analyzes short-term effects (after the first ISRT session) and long-term effects of 30 hours of ISRT in 14 PAD patients suffering from a stable intermittent claudication (Fontaine stage IIb). External counterpulsation therapy was adapted by an application of individualized cuff treatment pressure. Therefore, individualized treatment pressures were evaluated in order to provide an optimal increase in peripheral perfusion. Molecular parameters were analyzed in the ISRT-1 and ISRT-2 trials as follows: nitrite plasma levels, as well as marker gene mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of NOS2, kallikrein-kinin system (KKS) molecules and components of the shelterin complex (TRF-1 und TRF-2). Clinical parameters in the ISRT-2 were as follows: flow-mediated dilation (FMD) in the brachial artery (BA) and common femoral artery, ankle brachial index and initial and absolute claudication distance (ICD and ACD).

Results: The ISRT-1 trial served as a pilot trial for the ISRT-2 approach. Initially assessed peripheral perfusion in the lower limb artery revealed that systolic blood flow velocity doubled during ISRT in PAD patients. Endothelial parameters such as FMD in BA and plasma nitrite concentration increased significantly under ISRT. Furthermore, all patients showed improved ICD and ACD after 30 hours of ISRT. The ISRT-2 study revealed that B2R and kininogen mRNA expression significantly decreased and TRF-2 mRNA expression increased in PAD patients after long-term ISRT.

Conclusions: With the help of ISRT, we developed a novel therapeutic approach for PAD patients. Here we demonstrate for the first time a significant enhancement of 1) endothelial function, 2) peripheral perfusion and 3) walking distance after long-term ISRT.

3. Einführung

Die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) ist eine progressive und lebenslimitierende Erkrankung. Rund 16 % der Bevölkerung in Europa und Nordamerika über 55 Jahren leiden an einer pAVK. Patienten mit einer pAVK haben ein höheres Risiko ein kardiovaskuläres Ereignis zu erleiden, als Patienten mit einer koronarer Herzkrankheit (KHK) oder zerebrovaskulären Erkrankung^{1,2}. Aktuelle nicht-invasive Therapieansätze einer pAVK beinhalten ein strukturiertes Gehtraining und eine medikamentöse Therapie. Strukturiertes überwachtetes Gehtraining stellt eine gute Möglichkeit dar, das Kollateralwachstum um stenosierte Gefäßareale zu fördern und eine verlängerte Gehstrecke zu erreichen. Dennoch sind die Möglichkeiten, solche Trainingsprotokolle zu erfüllen, aufgrund von ausgeprägten Claudicatio-Beschwerden, oftmals limitiert. Neue, nicht-invasive Therapieverfahren, welche pAVK Patienten zu einer Gehstreckenverbesserung verhelfen und dadurch ein weiteres Gehtraining erst wieder ermöglichen, sind notwendig. Ein Therapieansatz, der für KHK Patient bereits etabliert wurde, ist die sogenannte externe Gegenpulsationstherapie. Es werden hier mit Luft befüllbare Manschetten um das Gesäß und paarweise um beide Beine (Oberschenkel und Unterschenkel) gewickelt und EKG-gesteuert be- und entlüftet. Während der Kompression der Manschetten innerhalb der Diastole erhöht sich der intra-arterielle Blutfluss, sodass Schubspannung an den Endothelwänden erhöht wird. Eine erhöhte Schubspannung bewirkt die Bildung hämodynamisch relevanter Umgehungskreisläufe über ein adaptives Wachstum von prä-existenten Kollateralgefäßen (Arteriogenese)³. Durch die Umgehungskreisläufe können höhergradige Stenosen oder Verschlüsse kompensiert werden. Die Gegenpulsationstherapie wird bisher bei KHK Patienten verwendet und konnte hier eine Verbesserung der Endothelfunktion, der myokardialen Kollateralisation und Lebensqualität zeigen^{3,4}. Die Gegenpulsationstherapie arbeitet mit hohen Manschettendrücken zwischen 250-300 mmHg und ist daher auch als gesteigerte Gegenpulsationstherapie bekannt. In einer Studie von Werner *et al.* zeigte sich unter der gesteigerten Gegenpulsationsherapie bei KHK Patienten eine Verringerung des durchschnittlichen Blutflussvolumens in der *Arteria tibialis posterior*⁵. Eine Anwendung der gesteigerten Gegenpulsationstherapie bei pAVK Patienten ist daher nicht vertretbar. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Blutflussgeschwindigkeit, im Gegensatz zum Blutdruck, entscheidend für die Arteriogenese ist⁶. Ein individuelles Beschleunigungssignal, welches das Wachstum von Kollateralgefäßen definiert, wurde mit Hilfe des *relative pulse slope index* (RPSI) ermittelt⁷. Im Rahmen meiner Dissertation haben wir auf dem physiologischen Konzept von RPSI ein neues Therapieverfahren für pAVK Patienten mit dem Namen *Individual Shear Rate Therapy*

(ISRT) etabliert. Dieses Therapiekonzept basiert auf dem Gegenpulsations-Verfahren, wobei ausschließlich niedrige und individuelle Therapiedrücke verwendet werden. Des Weiteren wird auf eine zusätzliche Unterschenkelmanschette verzichtet, um den Blutfluss der unteren Extremitäten bei pAVK Patienten nicht zu behindern. Um individuelle Therapiedrücke anzuwenden, beinhaltet die Eingangsuntersuchung bei ISRT eine Evaluation der peripheren Perfusion unter verschiedenen Druckstufen. So kann eine optimale Therapiestufe für pAVK Patienten ermittelt werden.

Ziel meiner Dissertation ist es, den Effekt von ISRT auf die Endothelfunktion bei pAVK Patienten anhand molekularer und klinischer Parameter zu untersuchen. Für dieses Vorhaben wurde ein Studiendesign verwendet, welches auf einer Studie von Braith *et al.* basierte. Bei Braith *et al.* konnte bei 28 KHK Patienten eine deutlich verbesserte Endothelfunktion nach 35 Stunden Gegenpulsationstherapie gezeigt werden. Für den klinischen Endothelfunktionsparameter wurde die flussvermittelte Gefäßerweiterung (FMD, in Englisch flow-mediated dilation) in der Arteria brachialis (AB) und der Arteria femoralis communis (AFC) ermittelt⁴. Um die Auswirkungen von ISRT auf die Endothelfunktion auf molekularer Ebene zu evaluieren, wurde die Nitritkonzentration im Plasma und die Genexpressionen von relevanten Zielgenen in peripheren mononukleären Zellen (PBMCs, in Englisch peripheral blood mononuclear cells) untersucht. Als relevante Zielgene für den NO Metabolismus wurden NOS2 (in Englisch nitric oxide synthase 2) und Gene des Kallikrein-Kinin Systems (KKS) gewählt. Zusätzlich wurden die Expression der Shelterin Komponente TRF-1 und TRF-2 (in Englisch telomeric repeat-binding factor-1 und -2) und DNA Reparatur Komponenten Ku70 und Ku80 untersucht (Marker des vaskulären Alters).

Diese Zusammenfassung beinhaltet die Ergebnisse und Erkenntnisse aus zwei klinischen Studien, welche in drei Veröffentlichungen publiziert wurden. Diese Publikationen zeigen den Effekt von ISRT im Vergleich zum Laufbandtraining bei gesunden Probanden und den Langzeiteffekt von ISRT bei pAVK Patienten. Besonderes Augenmerk wird auf die Verbesserung der Endothelfunktion bei pAVK Patienten anhand klinischer und molekularer Ergebnisse gelegt.

4. Methodik

ISRT-1 Studie

In der ISRT-1 Studie wurden 26 gesunde Probanden (Männer=13 und Frauen=13) in einem Cross-Over Design eingeschlossen und einer Trainingseinheit per Zufallsprinzip zugeordnet. Die eine Gruppe wurde zuerst dem Laufbandtraining und die andere Gruppe der ISRT zugeteilt. Nach einer Ruhezeit von einer Woche wurde dann zur anderen Trainingseinheit gewechselt. Einschlusskriterien waren: Nichtraucher, ein Alter zwischen 18-35, keine kardiovaskulären, metabolischen und hormonellen Erkrankungen, keine aktuelle Therapie einer akuten oder chronischen Krankheit und keine Schwangerschaft (Tabelle 1). Das Laufbandtraining (H/p/cosmos, Nussdorf-Traunstein, Deutschland) wurde in einem Zielherzfrequenzbereich von 120-130 Schlägen pro Minute über 30 Minuten bei variabler Laufgeschwindigkeit durchgeführt⁸. Sobald die Zielherzfrequenz erreicht wurde, wurden die 30 Minuten Laufbandtraining erfasst. Die ISRT Einheit beinhaltete eine Eingewöhnungszeit von 12-16 Minuten bis Drücke zwischen 160-200 mmHg (Cardiomedics Inc, USA) erreicht wurden. Die Trainingsdauer belief sich dann auf 45 Minuten.

ISRT-2 Studie

In der ISRT-2 Studie wurden 14 Patienten (Männer=12 und Frauen=2) mit einer pAVK in einem Pretest und Posttest Design eingeschlossen. Die Patienten wurden in einem Kurzzeit- (45 Minuten) und Langzeitprotokoll (30 Stunden) untersucht. ISRT erfolgte über 5 Wochen (5 Tage/Woche). Einschlusskriterien waren: Ein Alter zwischen 50-85, eine stabile Claudicatio intermittens (Fontane Stadium IIb), Nichtraucher und femoral-popliteale Verschlusskrankung (Tabelle 1).

Tabelle 1. Die Daten werden als Durchschnittswert \pm SEM dargestellt. BMI: body mass index, Fontaine Stadium IIb: schmerzfreie Gehstrecke <200 Meter. ICD: initial claudication distance, schmerzfreie Gehstrecke. ACD: absolute claudication distance, maximale Gehstrecke. ABI: ankle brachial index, Knöchel-Arm Index. Modifiziert nach Brix *et al.*⁹.

ISRT-1	(n=26)
Alter, y	23.37 \pm 0.36
Männer <i>n</i>	13
Frauen <i>n</i>	13
BMI, kg/m ²	22.22 \pm 0.44
ISRT-2	(n=14)
Alter, y	60.46 \pm 2.34
Männer <i>n</i>	12
Frauen <i>n</i>	2
BMI, kg/m ²	28.95 \pm 0.87
Fontaine Stadium IIb <i>n</i>	14
ICD, m	92.57 \pm 8.21
ACD, m	167.82 \pm 18.04
ABI	0.58 \pm 0.03

Klinische Datenerhebung

Doppler-Parameter

In einer Eingangsuntersuchung wurden die Dopplerflussparameter erhoben: Mittlere Beschleunigung und die maximale systolische Blutflussgeschwindigkeit. Die Dopplerflussparameter wurden in der Unterschenkelarterie in Ruhe und unter der Therapie mittels eines high-definition Ultraschallgerätes (Philips, HDX 11, Deutschland) gemessen. Die Messungen erfolgten in Ruhe und bei 40, 80, 120, 160 und 200 mmHg. In Abhängigkeit der Dopplerflussparameter wurden die Therapiedrücke evaluiert. Die somit festgelegten Therapiedrücke lagen zwischen 120-160 mmHg (Cardiomedics Inc, USA).

FMD und NMD Messung

Um die Aussagekraft der ISRT auf die systemische Endothelfunktion bei pAVK Patienten beurteilen zu können, wurde die FMD der AB und AFC vor Beginn der ISRT und nach 30 Stunden ISRT ermittelt. Die FMD Messung der AB erfolgte mittels eines high-definition Ultraschallgerätes (Philips, HDX 11, Deutschland) vor und nach 30 ISRT Stunden. FMD

Messungen wurden nach bekanntem Protokoll durchgeführt⁴. Die Auswertung von FMD und Nitro-vermittelte Gefäßerweiterung (NMD, in Englisch nitro-mediated dilation) erfolgte über Videosequenzanalysen mit Hilfe des FMD Vascular Research Tools (Medical Imaging Applications LLC, USA). Es wurden dabei die Intima Grenzen festgelegt und dann der durchschnittliche Gefäßdurchmesser bestimmt (Abbildung 1).

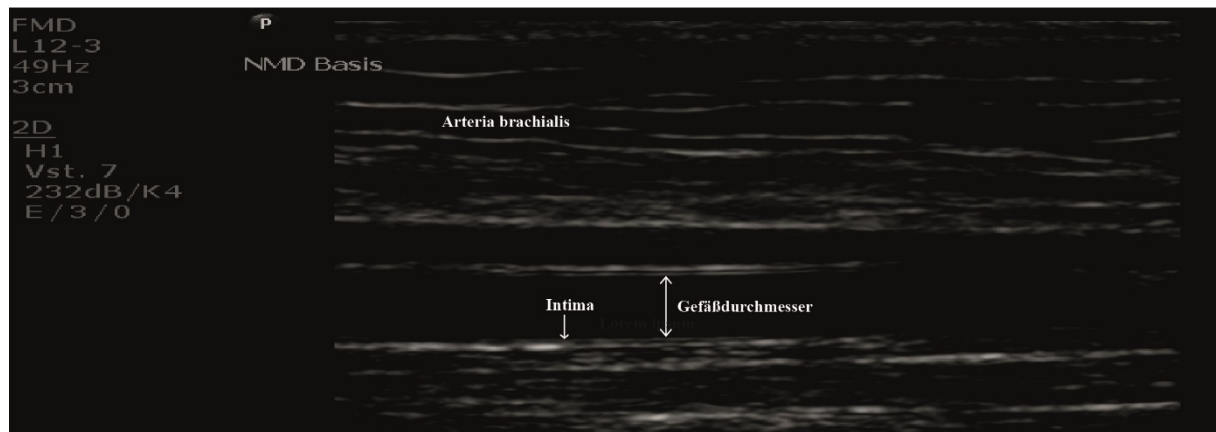


Abbildung 1. Ultraschalldarstellung der Arteria brachialis eines pAVK Patienten. Abgebildet werden die anatomischen Landmarken zur Berechnung des Ausgangswertes der Nitro-vermittelten Gefäßerweiterung (NMD, in Englisch nitro-mediated dilation).

Die FMD Messung der AFC erfolgte am dominanten Bein der Claudicatio-Beschwerden. Die FMD Messung konnte nicht durchgeführt werden, falls Intimagrenzen durch atherosklerotische Veränderungen nicht genau detektiert werden konnten. Die NMD wurde in der AB nach einer Ruhezeit von 15 Minuten in liegender Position nach Gabe von 0.8mg Nitro-Spray sublingual gemessen.

Messung der Gehstrecke und des Knöchel-Arm-Index

Die schmerzfreie und absolute Gehstrecke (ICD und ACD, in Englisch initial und absolute claudication distance) wurde vor der Therapie und nach 10, 20 und 30 Stunden ISRT bestimmt. Die Laufbanduntersuchung fand bei einer Steigung von 12° und einer Geschwindigkeit von 3.5 km/h statt. Die ICD ist definiert durch die Distanz, bei der das erste Mal Claudicatio-Beschwerden auftreten. Die ACD ist definiert durch die Distanz, welche maximal trotz Claudicatio-Beschwerden zurückgelegt werden kann. Der Knöchel-Arm-Index (ABI, in Englisch ankle brachial index) wurde vor dem Gehstreckentest und Beginn der Therapie und nach 30 Stunden ISRT ermittelt. Der ABI wurde nach einer Ruhezeit von 10 Minuten in liegender Position gemessen. Der Index ist definiert durch den Quotienten aus dem niedrigsten systolischen Blutdruck der Knöchelarterien und durch den Mittelwert des

systolischen Blutdrucks der Oberarmarterien. Bei Druckdifferenzen von 10 mmHg wurde der höhere systolische Blutdruck in die ABI Berechnung miteinbezogen^{10, 11}.

Molekulare Datenerhebung

Blutentnahme für molekulare Untersuchungen

Die Blutentnahme erfolgte in der Armvene. Die Zeitpunkte der Blutentnahme waren wie folgt: (1) In der ISRT-1 Studie vor und nach dem Laufbandtraining und vor und nach der ISRT. (2) In der ISRT-2 Studie vor und nach der ersten ISRT Einheit und nach 30 Stunden ISRT. Die Blutentnahme nach dem Lauftraining oder der ISRT erfolgte nach einer Ruhepause von 10 Minuten. Es wurden hierzu jeweils 30 ml Vollblut entnommen und in EDTA beschichteten Falcon-tubes überführt. Von den 30 ml Vollblut dienten 10 ml der Plasma-Isolierung und die weiteren 20 ml der PBMC-Isolierung. Zur Plasma-Isolierung wurde das Vollblut sofort bei 4000 rpm und 4 °C über 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand in Röhrcchen gefüllt, auf Trockeneis eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

PBMC Isolation

Für die PBMC Isolation wurde das Vollblut mit Mg²⁺ und Ca²⁺-freies PBS verdünnt und im Verhältnis 4:3 seitlich auf Ficoll gegeben, 35 Minuten bei 400 G bei Raumtemperatur zentrifugiert und so in verschiedene Phasen getrennt. Die PBMC Schichtung wurde selektiv entnommen und mit 40 ml PBS bei 200 G gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 6 ml PBS gelöst. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt, die Zelllösung aliquotiert und bei 200 G und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet auf Trockeneis eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

Plasma-Nitrit-Konzentration

Für die Bestimmung des vasoaktiven Plasma Metaboliten Nitrit wurde das Griess-Reagent Roche Kit (Promega, Deutschland) verwendet. Zuerst wurden die Plasma-Proben von -80 °C auf Eis aufgetaut. Die Probe wurde dann bei 14.000 G über 8 Minuten mit Amicon Ultra-0.5 mL Centrifugal Filter Devices (Merck Millipore, Deutschland) filtriert. Anschließend wurde ein Nitritstandard mit 1 µl Nitritstandardlösung und 999 µl Assay Buffer erstellt und zusammen mit den Plasma-Proben zwei Reaktionsschritte durchgeführt. In dem ersten Reaktionsschritt wurden 50 µl Sulfanylamid zugegeben und 5-10 Minuten in einer Dunkelkammer inkubiert. In dem zweiten Reaktionsschritt wurden 50 µl NED zugegeben und

anschließend wieder 5-10 Minuten in einer Dunkelkammer inkubiert. Danach erfolgte die Ermittlung der Nitritkonzentration in μMol nach einer Messung der Absorption bei 540 nm.

Genexpressionsanalyse und Primer

PBMC-Proben wurden auf Eis aufgetaut und die RNA mit dem Zymo Research Duet DNA/RNA MiniPrep Kit (Zymo Research, Kalifornien, USA) isoliert. Die Quantität und Reinheit der RNA wurde mit Hilfe des NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer gemessen. Die cDNA-Synthese erfolgte mit 1 μg RNA zusammen mit RNase Inhibitor gemäß dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit Protokoll (Life Technologies, Deutschland). Die folgenden selbstständig entworfenen Primer (Life Technologies, Deutschland) wurden für die quantitative RT-PCR verwendet: KLF2, B1R, B2R, Kallikrein, Kininogen, TRF2, Ku80. Bereits veröffentlichte Primer wurden für NOS2¹², RPLPO (in Englisch ribosomal protein lateral stalk subunit P0)¹³ und TRF1, Ku70 von Laye *et al.* verwendet¹⁴ (Tabelle 2).

Tabelle 2. Primersequenzen von 5'-3'. For: forward, Vorwärtsprimer. Rev: reverse, Rückwärtsprimer.

Primer	Sequenzen 5'-3'
KLF2	for CTTTCGCCAGCCCGTGCCGCG rev AAGTCCAGCACGCTGTTGAGG
NOS2 ¹²	for CGGTGCTGTATTCCTTACGAGGCGAAGAAGG rev GGTGCTGCTTGTTAGGAGGTCAAGTAAAGGGC
RPLPO ¹³	for ACGGGTACAAACGAGTCCTG rev AGCCACAAAGGCAGATGGAT
B1R	for ATTCTCCCACCTCAGCCTCT rev CTCTGGTTGGAGGATTGGAG
B2R	for CTTCATGGCCTACAGCAACA rev GCACACTCCCTGGTACACCT
Kallikrein	for GCCAAGCAGACGAGGACTAC rev AACTCCACGACCTTCACAGC
Kininogen	for GTGGTGGCTGGATTGAACTT rev CACCATTCCAAAGGGACTTG
TRF1 ¹⁴	for CGAGTGCCAGGTGCAGGTGG rev ATAATAGCCTCTGCGCTGTTGCGG
TRF2	for GTCTGTGCGCGATTGAAGA rev ACTGGATTCGACCACTGCTT
Ku 70 ¹⁴	for GCGCCAAAGTGAGCAGTAGCCA rev CTGCTTCTTCATCGCCCTCGGT
Ku 80	for GGTGAAGATGGGTTGGATGA rev ATTGGAGCCAATGGTCAGTC

Quantitative Echtzeit-PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR wurde mit einem finalen Volumen von 30 µl auf einer 96-Wellenschale durchgeführt. Davon 5 µl verdünnte cDNA (1:100), 15 µl 2x SYBR-Green Mastermix (Applied Biosystems, Deutschland), 3.4 µl RNase/DNase-freies Wasser, (GIBCO, Deutschland) und 3.3 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer (10 µM). Folgendes Wärmeprotokoll wurde verwendet: 10 Minuten bei 95 °C; 40 Zyklen für 15 Sekunden bei 95 °C, 15 Sekunden bei 60 °C, 30 Sekunden bei 72 °C; 1 Minute bei 50 °C und 15 Sekunden bei 95 °C; eine anschließende Dissoziationskurve bei 60 °C für 20 Sekunden und 95 °C für 30 Sekunden; danach 10 °C⁹. Die quantitative Echtzeit-PCR wurde in Triplikaten pipetiert und mittels eines Mx3000PTM Real-Time PCR Systems (Stratagene, La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Die Auswertung der Genexpression erfolgte durch die Normalisierung gegen das Haushaltsgen RPLPO und wurde in relativen $\Delta\Delta CT$ Werten angegeben.

Klinische Studienregistrierung, Ethikkommission und statistische Auswertung

Die vorliegenden Studienprotokolle wurden von der Ethikkommission der Charité Campus Virchow Berlin genehmigt (Referenznummer EA2/108/13 und EA2/140/13) und wurden im International Standard Randomised Controlled Trial Nummer (ISRCTN) Registry (ISRCTN88693704 und ISRCTN19661956) registriert. Alle Studienteilnehmer haben ihre schriftliche Einverständniserklärung gegeben. Für die statistische Auswertung wurden die Gruppen zuerst auf eine Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk Test analysiert und die statistischen Ausreißer über Box-plot Analysen ermittelt und für die Auswertung entfernt. Für die Analyse der klinischen Parameter und qRT-PCR Analysen der PBMCs und Nitrit-Plasmakonzentration wurde der nicht-parametrische gepaarte Wilcoxon Rangsummen Test verwendet. Die Analysen erfolgten mit Hilfe der SPSS Software, Version 18.0 (PASW Statistics 18, Hong Kong, China) für die klinischen Ergebnisse und der SPSS Software, Version 22 (IBM, Armonk, NY, USA) und Version 23.0 (IBM SPSS Statistics 23, USA) für die Genexpressionsanalysen. Ein p-Wert von $p \leq 0.05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben, mit Ausnahme der RNA Expressionsdaten von TRF1, TRF2, Ku70, Ku80, welche als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt wurden.

5. Ergebnisse

Molekulare Daten

ISRT-1 Studie

In der ISRT-1 Studie wurden 26 gesunde Probanden vor und nach dem Laufbandtraining sowie vor und nach ISRT untersucht (Abbildung 2). Es wurde hierbei die Plasmakonzentration von Nitrit und die für den NO Metabolismus relevanten Gene des KKS und NOS2 analysiert. Die Plasmanitrit-Konzentration änderte sich weder nach einer Sitzung ISRT (1.24 ± 0.13) noch nach dem Laufbandtraining (1.06 ± 0.10) (Abbildung 3A). Die NOS2 mRNA Expression reduzierte sich nach ISRT (0.46 ± 0.11), aber nicht nach dem Laufbandtraining (0.82 ± 0.18) (Abbildung 3B). Weiterhin wurden die Gene der Bradykinin Rezeptoren B1R und B2R in PBMCs untersucht. Beide Gene spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation von NOS2 Expression und schubspannungsinduziertem vaskulären Remodelling. Die Expression von B1R erhöhte sich nach ISRT (2.17 ± 0.44) und verringerte sich nach dem Laufbandtraining (0.57 ± 0.10) (Abbildung 3C). Die B2R Expression verringerte sich nach ISRT (0.58 ± 0.14), aber nicht nach dem Laufbandtraining (1.32 ± 0.31) (Abbildung 3D). Die Kallikrein und Kininogen Expression änderten sich nicht nach ISRT (0.74 ± 0.13 und 1.12 ± 0.25) und dem Laufbandtraining (0.77 ± 0.14 und 1.13 ± 0.28).

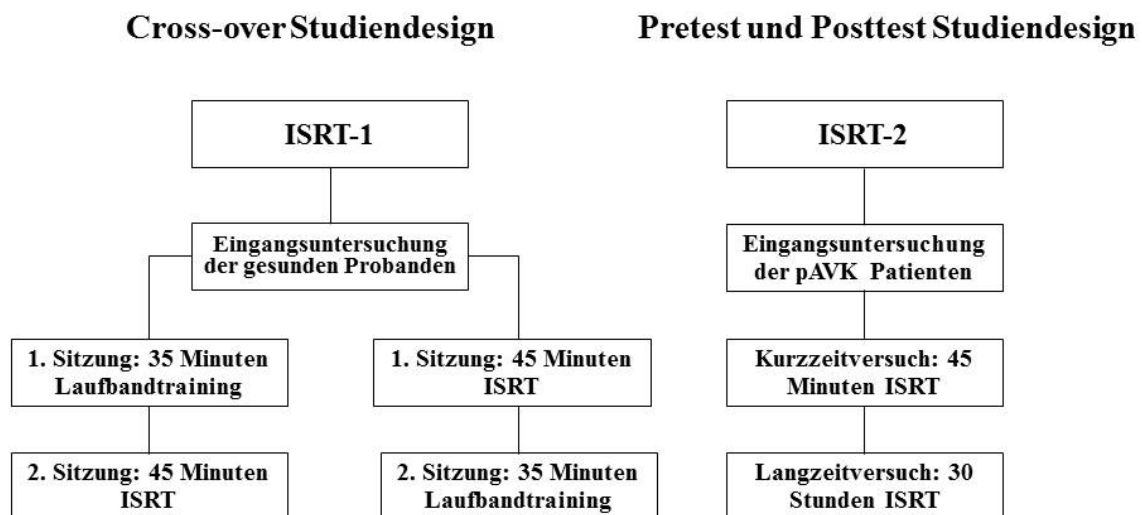


Abbildung 2. Flussdiagramm der ISRT-1 und der ISRT-2 Studie. Die ISRT-1 Studie erfolgte in einem cross-over Studiendesign. Nach der Eingangsuntersuchung erfolgte die Einteilung in dem Laufbandtraining oder der ISRT. In einer 2. Sitzung wurde dann die andere Trainingseinheit durchgeführt. Die ISRT-2 Studie untersuchte den Effekt der ISRT in einem Kurz- und Langzeitversuch in einem Pretest und Posttest Studiendesign.

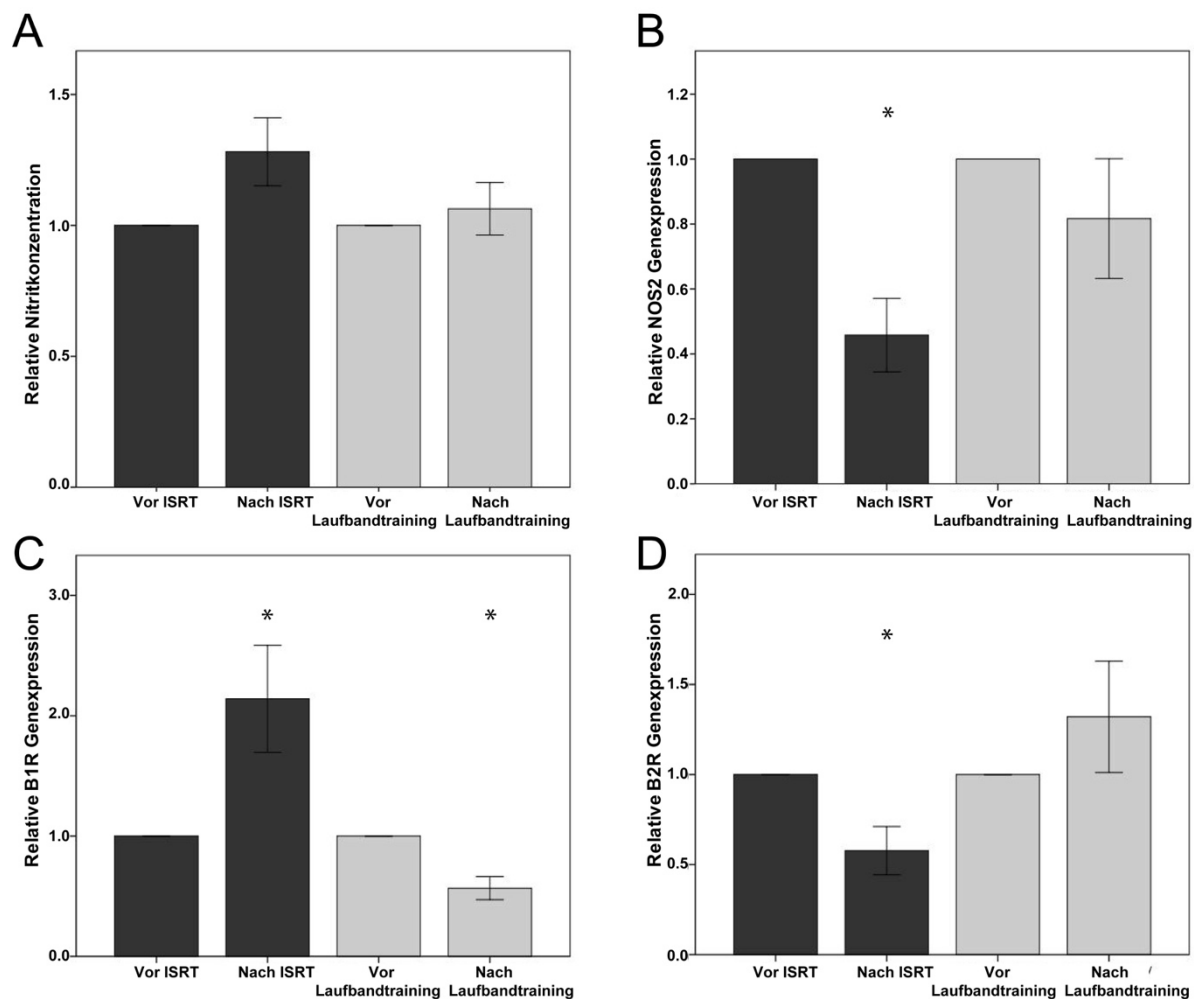


Abbildung 3. Laufbandtraining und ISRT in der ISRT-1 Studie

A) Relative Plasma Nitritkonzentration vor und nach ISRT und Laufbandtraining. n = 26. B-D) Genexpressionsdarstellung nach 45 Minuten ISRT und 35 Minuten Laufbandtraining. Die Daten werden als Durchschnittswert \pm SEM relativ zum Ausgangswert dargestellt. PBMC Expression für B) NOS2 (ISRT: n = 19, Laufbandtraining: n = 18) C) B1R (ISRT: n = 16, Laufbandtraining: n = 10) D) B2R (ISRT: n = 19; Laufbandtraining: n = 20). * $p \leq 0.05$. Abbildung modifiziert von Brix *et al.*⁹.

ISRT-2 Studie

Die Expression der Zielgene und Plasma-Nitritkonzentration wurde in einem Kurz- und Langzeitversuch analysiert. Dazu wurden die Messparameter vor ISRT, nach 45 Minuten ISRT und nach 30 Stunden ISRT ermittelt (Abbildung 2). Die Nitritkonzentration verbesserte sich nicht nach 45 Minuten ISRT (1.12 ± 0.10), konnte jedoch nach einer Langzeittherapie mit ISRT signifikant gesteigert werden (1.64 ± 0.25) (Abbildung 4A). NOS2 verringerte sich ähnlich wie in der ISRT-1 Studie nach 45 Minuten (0.57 ± 0.20), aber nicht nach 30 Stunden Therapie (0.68 ± 0.20) (Abbildung 4B). Die B1R mRNA Expression änderte sich nicht nach 45 Minuten (2.85 ± 1.67) oder 30 Stunden ISRT (1.54 ± 0.64) (Abbildung 4C). Die B2R mRNA Expression änderte sich nicht nach 45 Minuten (0.64 ± 0.23) und verringerte sich nach 30 Stunden ISRT (0.44 ± 0.18) (Abbildung 4D). Kallikrein mRNA Expression änderte sich

nicht nach 45 Minuten (0.77 ± 0.28) oder 30 Stunden ISRT (1.09 ± 0.56). Kininogen zeigte wie bei B2R keine Änderung nach 45 Minuten (0.52 ± 0.22), aber eine Verringerung nach Langzeittherapie mit ISRT (0.51 ± 0.20). Anschließend wurden die Shelterin Komponenten TRF-1 und TRF-2 mRNA Expression untersucht. Die TRF-1 Expression veränderte sich weder nach einer Einheit (0.67 ± 0.25) noch nach 30 Stunden ISRT (1.00 ± 0.20). TRF2 Expression erhöhte sich nicht nach einer Sitzung ISRT (2.15 ± 0.63) und verdoppelte sich nach 30 Stunden ISRT (2.21 ± 0.48). Die Ku Heterodimere Ku70 und Ku80 zeigten keine Änderung der Genexpression nach 45 Minuten und 30 Stunden ISRT (Ku70: 1.34 ± 0.19 und 1.50 ± 0.25 , Ku80: 1.44 ± 0.36 und 1.31 ± 0.18).

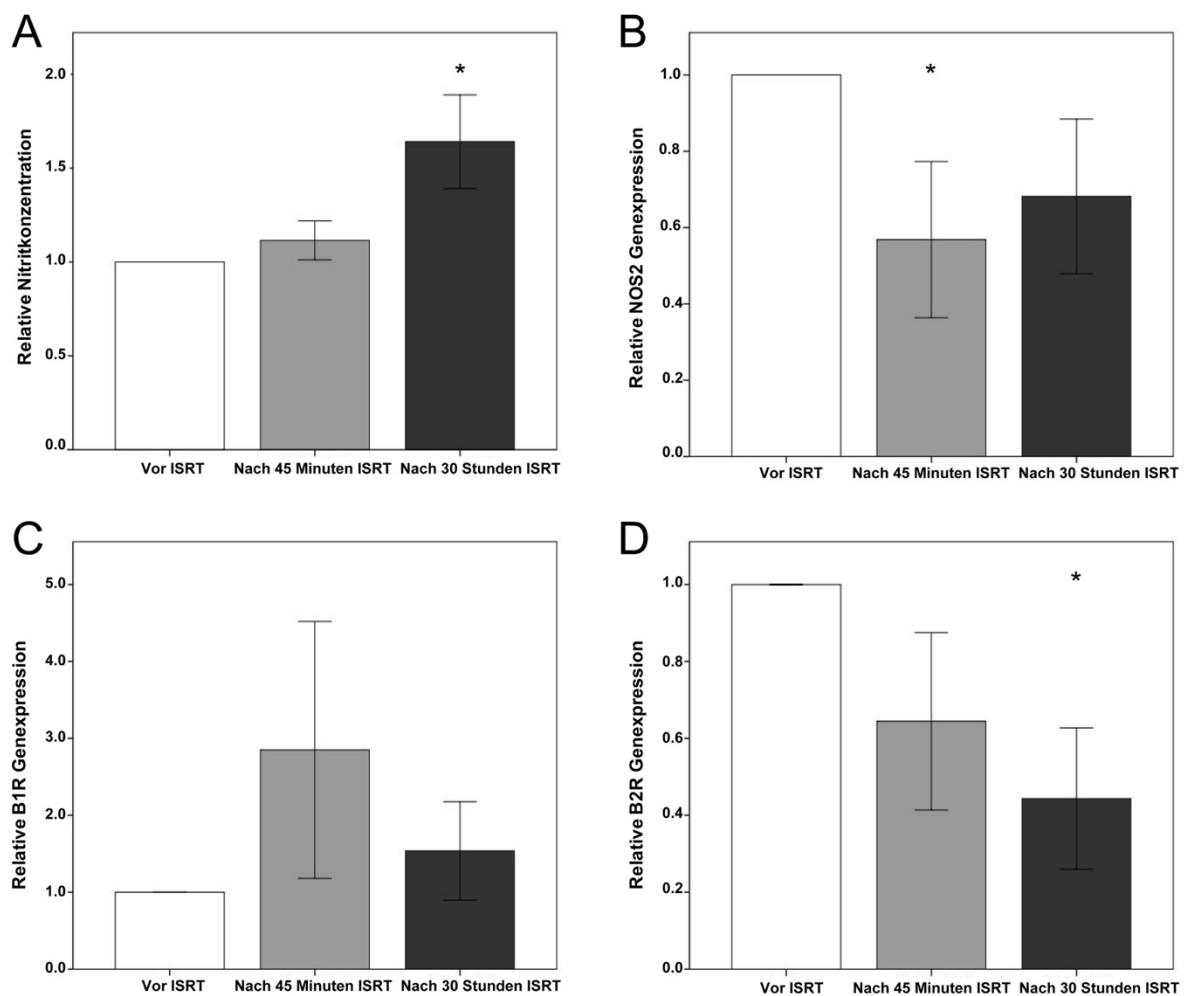


Abbildung 4. Kurz- und Langzeitversuch in der ISRT-2 Studie

A) Relative Plasma Nitritkonzentration im Kurz- und Langzeitversuch nach ISRT. n = 14. B-D) Genexpressionsdarstellung von PBMCs. Die Daten werden als Durchschnittswert \pm SEM relativ zum Ausgangswert dargestellt. Die PBMC Genexpression für B) NOS2 (n=11) C) B1R (nach 45 Minuten ISRT: n=9, nach 30 Stunden ISRT: n=10) D) B2R (n=9). * $p \leq 0.05$. Abbildung modifiziert von Brix *et al.*⁹.

Klinische Daten

ISRT-2 Studie

Um die periphere Perfusion bei den pAVK Patienten unter ISRT zu untersuchen, wurde die systolische Blutflussgeschwindigkeit und die Blutflussbeschleunigung mittels eines Ultraschallgerätes in den Knöchelarterien unter Ruhebedingungen und zwischen den Druckstufen von 40 bis 160 mmHg untersucht. In der Abbildung 5 wird die maximale systolische Blutflussgeschwindigkeit in Ruhe (A) und unter ISRT (B) anhand eines pAVK Patienten in der *Arteria tibialis posterior* exemplarisch dargestellt. Die maximale systolische Blutflussgeschwindigkeit verdoppelte sich unter der ISRT (47.6 cm/s zu 104 cm/s). Der weiße Pfeil markiert den Übergang von der Therapie zur Ruhe. Die Blutflussbeschleunigung verbesserte sich von 152.5 cm/s^2 auf 394.5 cm/s^2 .

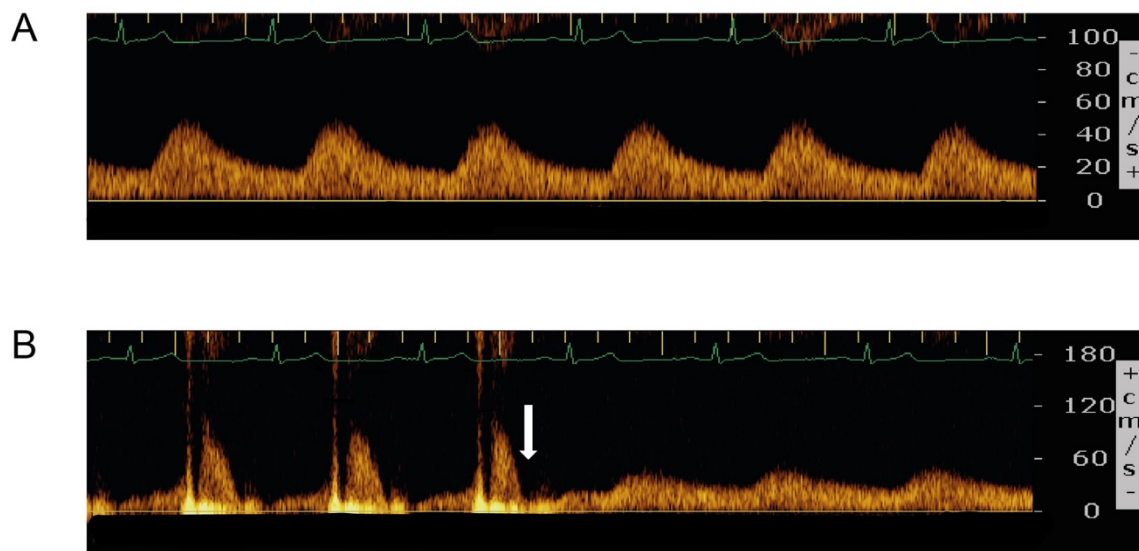


Abbildung 5. Die periphere Durchblutung verbesserte sich unter ISRT. Die maximale systolische Blutflussgeschwindigkeit wird in der Arteria tibialis posterior in Ruhe (A) und unter ISRT (B) exemplarisch bei einem pAVK Patienten dargestellt. Der weiße Pfeil markiert den Übergang von ISRT zur Ruhe. Abbildung modifiziert von Buschmann und Brix *et al.*¹¹.

Die FMD Messung in der AB wurde vor und nach 30 Stunden ISRT durchgeführt, um die Endothelfunktion klinisch zu beurteilen. Die absolute Veränderung des Gefäßdurchmesser und die prozentuale Veränderung von der FMD in der AB verbesserte sich nach 30 Stunden signifikant im Vergleich zum Ausgangswert ($0.13 \text{ mm} \pm 0.09 \text{ mm}$ zu $0.38 \text{ mm} \pm 0.05 \text{ mm}$, beziehungsweise $2.28 \% \pm 1.85 \%$ zu $8.54 \% \pm 1.04 \%$) (Abbildung 6A und 6B). Die endothelunabhängige Gefäßerweiterung wurde mit NMD in der AB untersucht. Es konnte keine Veränderung der NMD gezeigt werden ($0.36 \text{ mm} \pm 0.10 \text{ mm}$ zu $0.45 \text{ mm} \pm 0.08 \text{ mm}$,

beziehungsweise $9.25 \% \pm 1.8 \%$ zu $9.81 \% \pm 1.74 \%$) (Abbildung 6C und 6D). Die FMD in der AFC verbesserte sich nicht signifikant ($0.38 \text{ mm} \pm 0.08 \text{ mm}$ zu $0.67 \text{ mm} \pm 0.19 \text{ mm}$).

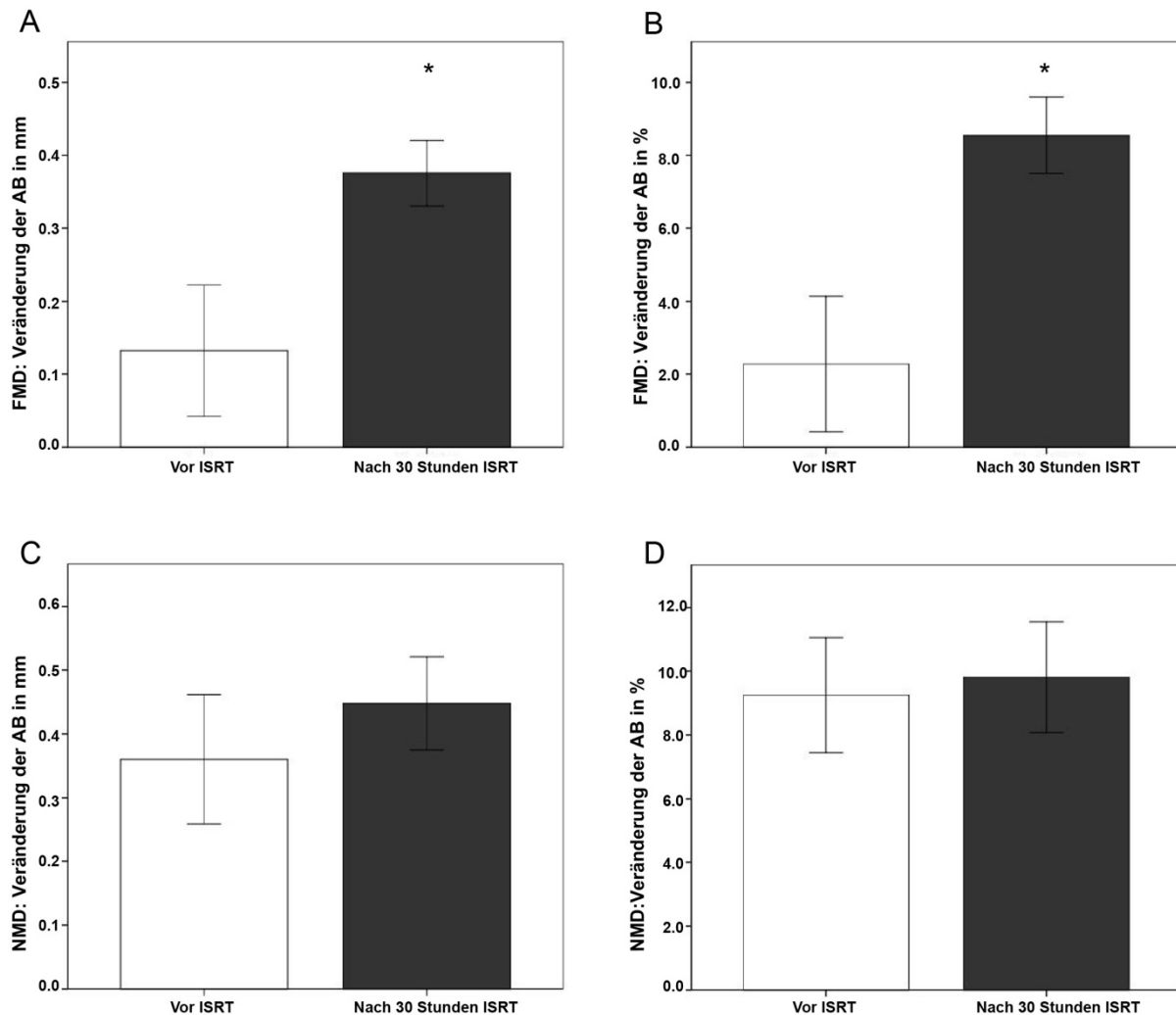


Abbildung 6. Langzeit-ISRT verbesserte die flussvermittelte Gefäßerweiterung (FMD, in Englisch flow-mediated dilation) in der Arteria brachialis (AB).

Alle Daten werden als Durchschnittswert \pm SEM angegeben. $*p \leq 0.05$. A) FMD: Absolute Veränderung der AB in mm (n=13). B) FMD: Prozentuale Veränderung der AB (n=12). C) Nitro-vermittelte Gefäßerweiterung (NMD, in Englisch nitro-mediated dilation): Absolute Veränderung der AB in mm (N=10). NMD: Prozentuale Veränderung der AB (n=10). Abbildung modifiziert von Buschmann und Brix *et al.*¹¹.

Die Gehstrecken der pAVK Patienten wurden für ICD und ACD ermittelt und dargestellt. Die ICD verbesserte sich nach 10, 20 und 30 Stunden ISRT im Vergleich zum Ausgangswert ($92.57 \text{ m} \pm 8.21 \text{ m}$ zu $154.86 \text{ m} \pm 14.08 \text{ m}$, $227.43 \text{ m} \pm 55.72 \text{ m}$ und $280 \text{ m} \pm 101.28 \text{ m}$). Die ACD verbesserte sich ebenso nach 10, 20 und 30 Stunden ISRT im Vergleich zum Ausgangswert ($167.82 \text{ m} \pm 18.04 \text{ m}$ zu $237.14 \text{ m} \pm 21.87 \text{ m}$, $328.35 \text{ m} \pm 81.36 \text{ m}$, $446.72 \text{ m} \pm 133.31 \text{ m}$) (n=14). Der ABI verbesserte sich nicht im Vergleich zum Ausgangswert (0.58 ± 0.03 zu 0.65 ± 0.04) (n=12).

6. Diskussion

Die pAVK ist eine progressive atherosklerotische Erkrankung, die zwischen 12 bis 15% der Bevölkerung über 65 Jahre betrifft¹⁵. Bereits bei fortgeschrittener Erkrankung der pAVK führen limitierte Gehstrecken zu einem eingeschränkten bis nicht durchführbaren konventionellen Laufbandtraining¹⁶. Die ISRT-2 Studie wurde daher durchgeführt, um einen neuen Therapieansatz für pAVK Patienten mit einem Fontaine Stage IIB zu untersuchen. Anhand von klinischen und molekularen Daten konnte in der ISRT-2 Studie erstmals eine Verbesserung der Endothelfunktion bei pAVK Patienten nach Langzeit-ISRT gezeigt werden.

FMD ist eine etablierte Messung, die die klinische Analyse der Endothelfunktion erlaubt. Braith *et al.* beschrieben eine Verbesserung der FMD nach 35 Stunden Gegenpulsationstherapie in der AB und AFC bei KHK Patienten⁴. In der ISRT-2 Studie zeigte sich ebenfalls eine signifikante Verbesserung der FMD in der AB nach 30 Stunden ISRT. Die FMD Messung in der AFC hingegen zeigte keine statistisch signifikante Verbesserung nach 30 Stunden ISRT, obwohl sich der ermittelte FMD Wert fast verdoppelte. Bei den Messungen mussten auf Grund von schweren atherosklerotischen Veränderungen 7 Patienten aus den Berechnungen ausgeschlossen werden. Statistische Aussagen beruhen hier also nur auf einer Fallzahl von 7 Patienten. Als weiterer wichtiger Parameter wurde die NMD untersucht. Da die NMD keine Veränderungen nach 30 Stunden ISRT zeigte, kann man schlussfolgern, dass die Ergebnisse der FMD Untersuchungen nicht auf einer erhöhten Nitrosensibilität der glatten Muskelzellen, sondern auf einer verbesserten Endothelfunktion zurückzuführen sind. Eine Anwendung der Gegenpulsations-Therapie schien bei pAVK Patienten bisher nicht ratsam. In einer Arbeit von Werner *et al.* zeigte sich eine reduzierte Flussgeschwindigkeit in der *Arteria tibialis posterior* um $69\% \pm 23\%$ bei KHK Patienten. Angewendet wurde hier jedoch das sogenannte gesteigerte Gegenpulsationsverfahren mit Therapiedrücken zwischen 250-300 mmHg⁵. Die ISRT basiert auf einem modifizierten Gegenpulsations-Verfahren und ermöglichte erstmals die Therapie von pAVK Patienten in der ISRT-2 Studie. Im Rahmen der ISRT wurden zur Therapie der Patienten hingegen nur zwei Druckluftmanschetten mit niedrigen Drücke zwischen 120-160 mmHg verwendet und es fand eine sonographische Erfassung von Dopplerflussparametern in den fußversorgenden Arterien vor Therapiebeginn statt. In der ISRT-2 Studie konnte dadurch eine erhöhte systolische Blutflussgeschwindigkeit in den fußversorgenden Arterien bei pAVK Patienten erzielt werden. Weiterhin wurden die klinischen Funktionsparameter, die Gehstrecke und der ABI, in der ISRT-2 Studie untersucht. Die ICD verdreifachte und die ACD verdoppelte sich nach Langzeit-ISRT. Der ABI zeigte

keine Veränderung nach 30 Stunden ISRT. In einer Meta-Analyse von Parmenter *et al.* wurde in ähnlicher Weise beschrieben, dass sich der ABI trotz Gehstreckenverbesserung nach Lauftraining nicht verbesserte. Parmenter *et al.* vermuten, dass eine Blutdruckänderung nicht im Zusammenhang mit einer verbesserten Gehstrecke stehen¹⁵. Gehstreckenverbesserungen wurden bisher über eine Zunahme der Kollateralgefäße um das stenosierte Gefäßareal und damit einhergehender erhöhter Blutflussgeschwindigkeit beschrieben. Es wird dadurch eine verbesserte Perfusion im betroffenen Gewebe gewährleistet und damit eine längere Gehstrecke erreicht¹⁷. Durch die verbesserte Gehstrecke im Rahmen einer Langzeit-ISRT ist folglich eine Stimulation des kollateralen Gefäßwachstums wahrscheinlich. Arteriogenese ist hierbei ein wichtiger endogener Kompensationsmechanismus zur Wiederherstellung einer stabilen Blutperfusion.

Als molekulare Messparameter der Endothelfunktion wurde die Nitritkonzentration in den ISRT Studien gemessen. Nitrit ist ein Endprodukt von NO und stellt, im Gegensatz zu Nitrat, die vasoaktive Komponente von den NO Metaboliten dar und reflektiert weiterhin die NOS Aktivität¹⁸. Die Plasmakonzentration von Nitrit zeigte keine Veränderung im Kurzzeitversuch, weder bei gesunden Probanden noch bei pAVK Patienten. Erst nach einer Langzeittherapie von 30 Stunden ISRT konnte eine signifikante Erhöhung der vasoaktiven Nitrit Plasmakonzentration erzielt werden. Im Zusammenspiel mit der verbesserten FMD und der erhöhten Nitritkonzentration bei pAVK Patienten kann von einer verbesserten Endothelfunktion nach Langzeittherapie ISRT ausgegangen werden. Als weiterer molekularer Messparameter wurde die Telomerbiologie in den ISRT Studien untersucht. Eine verminderte Telomerlänge wird mit der biologischen Alterung assoziiert und konnte bei pAVK Patienten nachgewiesen werden¹⁹. Telomerlängen in PBMCs gelten zudem als ein Maß für das vaskuläre Alter und damit auch als Richtwert für die vaskuläre Funktionsfähigkeit^{20,21}. Die Kontrolle der Telomerlänge erfolgt zum einen durch das Enzym Telomerase und zum anderen durch den Shelterin Komplex. Der Shelterin Komplex besteht aus 6 Proteinen, darunter auch TRF-1 und TRF-2. Der Ku70/80 Komplex spielt eine entscheidende Rolle bei der DNA Reparatur. Der entscheidende Mechanismus für die Erhöhung der Ku70/80 mRNA in PBMCs und dem Shelterin Komplex bei Ausdauersport ist die Aktivierung von endothelialer NOS (NOS3)¹⁴. In der ISRT-2 Studie konnte nach einem Langzeittraining mit ISRT eine Erhöhung der TRF-2 mRNA gemessen werden, die im Zusammenspiel mit der Plasmanitrit-Erhöhung auf eine Aktivierung von NOS3 hinweisen könnte. Weiterhin wurden aufgrund der erhöhten Plasmanitritkonzentration die mRNA Genexpressionen von NOS2 und KKS untersucht. Die ISRT-1 Studie diente dabei als Pilotphase für die ISRT-2 Studie. Die Untersuchung der

Genexpressionen in PBMCs zeigte nach einer Einheit ISRT eine Herunterregulation von NOS2 und B2R und eine Erhöhung von B1R in der ISRT-1 Studie. Im Vergleich dazu zeigte sich in der ISRT-2 Studie ebenfalls eine Herunterregulation der NOS2 mRNA im Kurzzeitversuch und eine Herunterregulation von B2R und Kininogen mRNA Genexpression im Langzeitversuch. B1R gilt als wichtiger Initiator schubspannungs-induzierter Arteriogenese²². B2R stellt, als Upstream Regulator von NOS2, die Regulation von NOS2, anti-inflammatorische Signale und vaskuläres Remodelling sicher^{22,23}. Da das KKS durch pro-inflammatorische Signale und NF-kB aktiviert wird, könnten unsere Ergebnisse auf einen anti-inflammatorischen Effekt nach Langzeit ISRT hinweisen^{9,23}. Für zukünftige Studien wäre hierfür auch die Analyse von leukozytären Subpopulationen interessant, da diese für die parakrinen regulatorischen Funktionen, wie etwa der Bradykinin- und NO-Signalvermittlung, bekannt sind²⁴.

Hinsichtlich Limitierungen beim Design und Durchführung der Studien kann das Fehlen einer Placebo-Gruppe oder aktiven Gefäßsportgruppe genannt werden. Placebo-Gruppen in Studien zur Gegenpulsationstherapie wurden bislang mit Niedrigdrücken von 70 mmHg durchgeführt⁴. Da unsere Voruntersuchungen jedoch erhöhte Flussgeschwindigkeiten bei 40 mmHg in den Unterschenkelarterien der pAVK Patienten zeigten, konnte keine solche Placebo-Gruppe für die ISRT verwendet werden. Ein Laufbandtraining wäre aufgrund der starken Claudicatio-Beschwerden bei den meisten Patienten nicht mehr möglich gewesen. Ein Patientenkollektiv mit pAVK Patienten ausschließlich im Fontaine Stadium IIa wäre für ein kontrolliertes Studiendesign mit Laufbandtraining interessant. Die ISRT-2 Studie diene als Pilotstudie, um den Effekt von ISRT erstmals bei pAVK Patienten zu untersuchen. Die Fallzahl stellt hiermit eine Studienlimitation dar, obwohl vielversprechende erste Ergebnisse gezeigt werden konnten. Um weitere Aussagen über den Effekt von ISRT bei pAVK Patienten vornehmen zu können, sind weitere Studien mit größeren Fallzahlen ratsam.

Zusammenfassend konnte ISRT als neues nicht-invasives Therapieverfahren für pAVK Patienten etabliert werden. Nach 30 Stunden ISRT verbesserte sich die Endothelfunktion, sowohl anhand des klinischen Parameters FMD als auch durch den molekularen Endothelmarker Nitrit und die initiale und absolute Gehstrecke um mehr als das Doppelte im Vergleich zu den Ausgangspunkten. Für die weitere Evaluation der ISRT für pAVK Patienten wurde nun bereits eine Studie mit einer größeren Fallzahl initiiert.

7. Literaturverzeichnis

- 1 Stehouwer CD, Clement D, Davidson C, Diehm C, Elte JW, Lambert M, Sereni D, Group EVMW. Peripheral arterial disease: a growing problem for the internist. *Eur J Intern Med* 2009; 20: 132-8
- 2 Steg PG, Bhatt DL, Wilson PW, D'Agostino R, Ohman EM, Röther J, Liao CS, Hirsch AT, Mas JL, Ikeda Y, Pencina MJ, Goto S, Investigators RR. One-year cardiovascular event rates in outpatients with atherothrombosis. *JAMA* 2007; 297: 1197-206
- 3 Buschmann EE, Utz W, Pagonas N, Schulz-Menger J, Busjahn A, Monti J, Maerz W, le Noble F, Thierfelder L, Dietz R, Klauss V, Gross M, Buschmann IR, Net.) ANA. Improvement of fractional flow reserve and collateral flow by treatment with external counterpulsation (Art.Net.-2 Trial). *Eur J Clin Invest* 2009; 39: 866-75
- 4 Braith RW CC, Nichols WW, Choi CY, Khuddus MA, Beck DT, Casey DP. Enhanced External Counterpulsation Improves Peripheral Artery Flow-Mediated Dilation in Patients With Chronic Angina. *Circulation* 2010 Oct 4; 122: 1612-20
- 5 Werner D MF, Hinz B, Werner U, Voigt JU, Daniel WG. Impact of enhanced external counterpulsation on peripheral circulation *Angiology*. 2007; 58:185-90.
- 6 Eitenmüller I, Volger O, Kluge A, Troidl K, Barancik M, Cai WJ, Heil M, Pipp F, Fischer S, Horrevoets AJ, Schmitz-Rixen T, Schaper W. The range of adaptation by collateral vessels after femoral artery occlusion. *Circ Res* 2006; 99: 656-62
- 7 Buschmann I, Pries A, Styp-Rekowska B, Hillmeister P, Loufrani L, Henrion D, Shi Y, Duelsner A, Hoefler I, Gatzke N, Wang H, Lehmann K, Ulm L, Ritter Z, Hauff P, Hlushchuk R, Djonov V, van Veen T, le Noble F. Pulsatile shear and Gja5 modulate arterial identity and remodeling events during flow-driven arteriogenesis. *Development* 2010; 137: 2187-96
- 8 M. Fioranelli GF. *Sports Cardiology-From Diagnosis to Clinical Management*, 2012
- 9 Brix M, Buschmann EE, Zietzer A, Jaurigue JA, Li L, Jungk C, Buschmann I, Janke D, Hillmeister P. Long-term individual shear rate therapy counterpulsation enhances plasma nitrite release in patients with PAD. *Vasa* 2016: 1-9
- 10 Dr. H. Lawall PDPH, Prof. Dr. G. Rümenapf. S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit: Deutsche Gesellschaft für Angiologie - Gesellschaft für Gefäßmedizin, 2015; 29-30
- 11 Buschmann EE, Brix M, Li L, Doreen J, Zietzer A, Li M, Buschmann I, Hillmeister P. Adaptation of external counterpulsation based on individual shear rate therapy improves endothelial function and claudication distance in peripheral artery disease. *Vasa* 2016; 45: 317-24
- 12 Cheung YF, O K, Tam SC, Siow YL. Induction of MCP1, CCR2, and iNOS expression in THP-1 macrophages by serum of children late after Kawasaki disease. *Pediatr Res* 2005; 58: 1306-10
- 13 Janke D, Jankowski J, Rütth M, Buschmann I, Lemke HD, Jacobi D, Knaus P, Spindler E, Zidek W, Lehmann K, Jankowski V. The "artificial artery" as in vitro perfusion model. *PLoS One* 2013; 8: e57227
- 14 Laye MJ, Solomon TP, Karstoft K, Pedersen KK, Nielsen SD, Pedersen BK. Increased shelterin mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells and skeletal muscle following an ultra-long-distance running event. *J Appl Physiol* (1985) 2012; 112: 773-81
- 15 Parmenter BJ, Dieberg G, Smart NA. Exercise training for management of peripheral arterial disease: a systematic review and meta-analysis. *Sports Med* 2015; 45: 231-44

- 16 Bondke Persson A, Buschmann EE, Lindhorst R, Troidl K, Langhoff R, Schulte KL, Buschmann I. Therapeutic arteriogenesis in peripheral arterial disease: combining intervention and passive training. *Vasa* 2011; 40: 177-87
- 17 Delis KT, AN N. Effect of Intermittent Pneumatic Compression of Foot and Calf on Walking Distance, Hemodynamics, and Quality of Life in Patients With Arterial Claudication. *Ann Surg* 2005: 431–441
- 18 Lauer T, Preik M, Rassaf T, Strauer BE, Deussen A, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 12814-9
- 19 Raschenberger J, Kollerits B, Hammerer-Lercher A, Rantner B, Stadler M, Haun M, Klein-Weigel P, Fraedrich G, Kronenberg F. The association of relative telomere length with symptomatic peripheral arterial disease: results from the CAVASIC study. *Atherosclerosis* 2013; 229: 469-74
- 20 Zietzer A, Hillmeister P. Leucocyte telomere length as marker for cardiovascular ageing. *Acta Physiol (Oxf)* 2014; 211: 251-6
- 21 Wilson WR, Herbert KE, Mistry Y, Stevens SE, Patel HR, Hastings RA, Thompson MM, Williams B. Blood leucocyte telomere DNA content predicts vascular telomere DNA content in humans with and without vascular disease. *Eur Heart J* 2008; 29: 2689-94
- 22 Hillmeister P, Gatzke N, Dülsner A, Bader M, Schadock I, Hoefler I, Hamann I, Infante-Duarte C, Jung G, Troidl K, Urban D, Stawowy P, Frensch M, Li M, Nagorka S, Wang H, Shi Y, le Noble F, Buschmann I. Arteriogenesis is modulated by bradykinin receptor signaling. *Circ Res* 2011; 109: 524-33
- 23 Bader M. Kallikrein-kinin system in neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 617-9
- 24 Troidl C, Jung G, Troidl K, Hoffmann J, Mollmann H, Nef H, Schaper W, Hamm CW, Schmitz-Rixen T. The temporal and spatial distribution of macrophage subpopulations during arteriogenesis. *Curr Vasc Pharmacol* 2013; 11: 5-12

8. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Michèle Brix, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Untersuchung klinischer und molekularer Parameter der Endothelfunktion nach *Individual Shear Rate* Gegenpulsationstherapie bei Patienten mit einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit, selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

9. Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Michèle Brix hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Autoren:

Brix M*, Buschmann EE*, Zietzer A, Jaurigue JA, Li L, Jungk C, Buschmann I, Janke D und Hillmeister P

Titel:

Long-term individual shear rate therapy counterpulsation enhances plasma nitrite release in patients with PAD

Zeitschrift und Erscheinungsjahr:

Vasa, 2017

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):

Frau Brix führte maßgeblich die Studienplanung sowie die Antragstellung des Ethikantrages der vorliegenden ISRT-2 Studie durch. Sie war für die Patientenrekrutierung sowie die selbstständige Prüfung der Ein- und Ausschlusskriterien der Patienten in der ISRT-2 Studie hauptverantwortlich. Frau Brix war an der Etablierung des ISRT Verfahrens bei pAVK Patienten maßgeblich mitbeteiligt und führte Duplexmessungen an den Beinarterien von pAVK Patienten zur optimalen Therapiebestimmung eigenständig durch. Die Messungen der klinischen Endpunkte (Gehstreckenbestimmung, ABI, FMD, NMD und Duplexparametermessungen unter ISRT) und Auswertung der ISRT-2 Studie erfolgten als Hauptverantwortliche der klinischen Studie durch Frau Brix. Sie trägt den Hauptteil der vorliegenden Publikation.

Publikation 2:

Autoren:

Buschmann EE*, Brix M*, Li L, Janke, D, Zietzer A, Li M, Buschmann I und Hillmeister P

Titel:

Adaptation of external counterpulsation based on individual shear rate therapy improves endothelial function and claudication distance in peripheral artery disease.

Zeitschrift und Erscheinungsjahr:

Vasa, 2016

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):

Frau Brix war an der Studienplanung und Probanden- und Patientenrekrutierung der ISRT-1 Studie beteiligt und für die ISRT-2 Studienplanung und Probanden- und Patientenrekrutierung hauptverantwortlich. Sie war für die Isolierung der PBMCs (zusammen mit Andreas Zietzer) verantwortlich. Hauptverantwortlich war Frau Brix für die RNA-Isolierung und cDNA-Synthese, sowie für die anschließende Genexpressionsanalyse und Auswertung. Hauptverantwortlich war Frau Brix auch für die Nitritkonzentrations-Messungen und Auswertungen. Frau Brix trägt den Hauptteil der vorliegenden Publikation.

Publikation 3:

Autoren:

Zietzer A*, Buschmann EE, Janke D, Li L, Brix M, Meyborg H, Stawowy P, Jungk C, Buschmann I und Hillmeister P

Titel:

Acute physical exercise and long-term individual shear rate therapy increase telomerase activity in human peripheral blood mononuclear cells

Zeitschrift und Erscheinungsjahr:

Acta Physiologica, 2016

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):

Frau Brix war an der Studienplanung und Probanden- und Patientenrekrutierung der ISRT-1 Studie beteiligt und für die ISRT-2 Studienplanung und Probanden- und Patientenrekrutierung hauptverantwortlich. Sie war für die Isolierung der PBMCs (zusammen mit Andreas Zietzer) verantwortlich. Hauptverantwortlich war Frau Brix für die RNA-Isolierung und cDNA-Synthese sowie für die anschließender Genexpressionsanalysen und Auswertung. Frau Brix war an der Korrektur und Revision der Publikation beteiligt.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

10. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

10.1 Publikation 1

Brix M*, Buschmann EE*, Zietzer A, Jaurigue JA, Li L, Jungk C, Buschmann I, Janke D und Hillmeister P. Long-term individual shear rate therapy counterpulsation enhances plasma nitrite release in patients with PAD. *Vasa* 2017; 46

<http://dx.doi.org/10.1024/0301-1526/a000600>

10.2 Publikation 2

Buschmann EE*, Brix M*, Li L et al. Adaptation of external counterpulsation based on individual shear rate therapy (ISRT) improves endothelial function and claudication distance in PAD. *Vasa*.2016;45

<http://dx.doi.org/10.1024/0301-1526/a000544>

10.3 Publikation 3

Zietzer A, Buschmann E, Janke D, Li L, Brix M et al. Acute Physical Exercise and Long-Term Individual Shear Rate Therapy Increase Telomerase Activity in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Acta Physiol*, Oct 2016

<http://dx.doi.org/10.1111/apha.12820>

11. Lebenslauf

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

12. Komplette Publikationsliste

Originalarbeiten

Erstautorenschaften

- 2017 **Brix M***, Buschmann EE*, Zietzer A, Jaurigue JA, Li L, Jungk C, Buschmann I, Janke D und Hillmeister P. Long-term individual shear rate therapy counterpulsation enhances plasma nitrite release in patients with PAD. *Vasa* 2017; 46 **Impact Factor:1.122**
- 2016 Buschmann EE*, **Brix M***, Li L, Janke, D, Zietzer A, Li M, Buschmann I und Hillmeister P. Adaptation of external counterpulsation based on individual shear rate therapy (ISRT) improves endothelial function and claudication distance in PAD. *Vasa* 2016; 45 **Impact Factor:1.122**

Ko-Autorenschaften

- 2016 Zietzer A*, Buschmann EE*, Janke D, Li L, **Brix M**, Meyborg H, Stawowy P, Jungk C, Buschmann I und Hillmeister P. Acute Physical Exercise and Long-Term Individual Shear Rate Therapy Increase Telomerase Activity in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Acta Physiol* 2016; 220 **Impact Factor:4.066**

Abstracts

- 2016 Li L., Buschmann E., **Brix M.**, Zietzer A., Hillmeister P., Buschmann I.. Novel Computer-aided Diagnosis using Doppler-derived Indices of ACCmax and RPSI to detect PAD in diabetic populations. Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim
- 2015 **Brix M**, Zietzer A, Li L, Hillmeister P, Janke D, Buschmann I, Buschmann EE. Individual Shear Rate Therapy (ISRT) verbessert die Endothelfunktion und periphere Perfusion bei pAVK Patienten. 6. Kongress des Wahlpflichtpraktikums 2 der Charité im Reformstudiengang, Berlin
- 2014 **Brix M***, Zietzer A*, Li L, Hillmeister P, Janke D, Buschmann I, Buschmann EE. Individual Shear Rate Therapy bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit. 43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Angiologie (DGA), Hamburg
- 2014 Zietzer A*, **Brix M***, Janke D, Jungk C, Buschmann I, Buschmann E, Hillmeister P. Das Bradykinin-Kallikrein-Kininogen System und seine Rolle beim funktionellen Kollateralwachstum. 43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Angiologie (DGA), Hamburg

13. Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. Ivo Buschmann für die Möglichkeit einer Dissertation in seiner Forschungsgruppe an der Charité im Campus Virchow Klinikum mit Schwerpunkt Kardiologie und im Center for Cardiovascular Research bedanken. Vielen Dank für die durchgehend ehrgeizigen und motivierenden Worte.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. rer. nat. Philipp Hillmeister für die Leitung der wissenschaftlichen Projekte über den gesamten Zeitraum und seine zuversichtlichen Art, unmögliche Dinge möglich erscheinen zu lassen. Ohne seine Hilfe wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Vielen Dank für die fachlichen und menschlichen Gespräche, die eine starke Inspiration für mich waren und sein werden.

Frau Dr. med. Eva-Elina Buschmann möchte ich für die Einarbeitung in die diagnostische Angiologie und die Studienplanung danken. Dank ihrer Hilfe konnte die ISRT-2 Studie erst realisiert werden. Vielen Dank für die professionelle Zusammenarbeit.

Dieser Dank gilt auch Frau Dr. rer. nat. Doreen Janke, die mich mit viel Geduld in die molekularbiologischen Grundlagen eingearbeitet hat. Besonders durch ihre motivierende und anregende Art wurde die Arbeit im Labor zu einer wunderbaren Zeit, die ich nie vergessen werde.

Des Weiteren möchte ich auch allen anderen Mitarbeitern der Forschungsgruppe danken. Andreas Zietzer, Constantin Jungk und Lulu Li für die gute Zusammenarbeit im Labor und bei der Realisierung der klinischen Studien. Jonnel Anthony Jaurigue für seinen wissenschaftlichen Beitrag und die vielen Korrekturen der Manuskripte.

Weiterhin möchte ich meinen Eltern, Astrid und Thorsten Brix, sowie meinem Bruder Marcel Brix für ihre Unterstützung danken.

Abschließend möchte ich Timofej Stordeur für seine unermüdliche Unterstützung und sein großes Verständnis während dieser Arbeit danken.