

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

Richard-Thoma-Laboratorien für Arteriogenese  
Medizinische Klinik (CC 11) mit Schwerpunkt Kardiologie  
Center for Cardiovascular Research (CCR)

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

# **Untersuchungen zu den Einflüssen des Renin-Angiotensin- und Kallikrein-Kinin-Systems auf die zerebrale Arteriogenese der Ratte**

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

vorgelegt von

Stephanie Nagorka  
Tierärztin aus Spremberg

Berlin 2013

Journal-Nr.: 3628

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl  
Zweiter Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Ivo R. Buschmann  
Dritter Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Friederike Stumpff

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

angiotensin, bradykinin, receptors, animal models, rats, vessels, cerebrovascular disorders, circulation

Tag der Promotion: 12.08.2013

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86387-361-5

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2013**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

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

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

This document is protected by copyright law.

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

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2013

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

*Die wahre Entdeckung besteht nicht darin, Neuland zu finden,  
sondern die Dinge mit neuen Augen zu sehen.*

~ Marcel Proust ~



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. ZIELSETZUNG</b>	<b>1</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
<b>2.1 WACHSTUM VON BLUTGEFÄßEN</b>	<b>3</b>
2.1.1 VASKULOGENESE	3
2.1.2 ANGIOGENESE	4
2.1.3 ARTERIOGENESE	5
<b>2.2 ARTERIOGENESE – VORKOMMEN, ABLAUF UND PARALLELEN</b>	<b>6</b>
2.2.1 VORKOMMEN	6
2.2.2 ABLAUF ARTERIOGENER PROZESSE	6
2.2.3 PARALLELEN ZU ANGIOGENESE UND ATHEROGENESE	8
<b>2.3 RENIN-ANGIOTENSIN-SYSTEM</b>	<b>10</b>
2.3.1 ALLGEMEIN	10
2.3.2 REZEPTOREN	12
2.3.3 VASKULÄRE BEDEUTUNG	12
2.3.4 PHARMAKOLOGISCHE BEEINFLUSSUNG	14
<b>2.4 KALLIKREIN-KININ-SYSTEM</b>	<b>15</b>
2.4.1 ALLGEMEIN	15
2.4.2 REZEPTOREN	17
2.4.3 VASKULÄRE BEDEUTUNG	18
2.4.4 PHARMAKOLOGISCHE BEEINFLUSSUNG	19
<b>2.5 PARALLELE BETRACHTUNG DES RENIN-ANGIOTENSIN- UND KININ-SYSTEMS IN BEZUG AUF DIE ARTERIOGENESE</b>	<b>20</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODIK</b>	<b>21</b>
<b>3.1 VERSUCHSTIERE</b>	<b>21</b>
3.1.1 TIERHALTUNG	21
3.1.2 TIERVERSUCHSGENEHMIGUNG	22
<b>3.1 OPERATIONEN</b>	<b>22</b>
3.1.1 DREI-GEFÄß-VERSCHLUSS-MODELL	22
3.1.2 MESSUNG DER ZEREBROVASKULÄREN RESERVEKAPAZITÄT	25
3.1.3 LATEXANGIOGRAPHIE	28
3.1.4 IMPLANTATION DER ALZET® OSMOTISCHEN MINIPUMPEN	29
<b>3.2 VERSUCHSSTRUKTUR UND BEHANDLUNGSSCHEMA</b>	<b>30</b>
3.2.1 VERSUCHSGRUPPEN	30
3.2.2 MEDIKAMENTÖSE BEHANDLUNG	30
3.2.3 ZEITLICHER ÜBERBLICK	33
3.2.4 DOSISBESTIMMUNG	33
<b>3.3 AUSWERTUNGSVERFAHREN</b>	<b>34</b>
3.3.1 FUNKTIONELLE AUSWERTUNG NACH BLUTFLUSSMESSUNG	34
3.3.2 MORPHOLOGISCHE AUSWERTUNG NACH LATEXANGIOGRAPHIE	34

3.3.3	HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG	35
3.3.4	STATISTISCHE AUSWERTUNG	39
<b>3.4</b>	<b>GERÄTE, INSTRUMENTE UND REAGENZIEN</b>	<b>41</b>
3.4.1	GERÄTE	41
3.4.2	CHIRURGISCHES INSTRUMENTARIUM	42
3.4.3	VERBRAUCHSMATERIALIEN	42
3.4.4	PHARMAKA	44
3.4.5	CHEMIKALIEN, LÖSUNGEN, GASE	45
3.4.6	BIOREAGENZIEN UND ANTIKÖRPER	46
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>48</b>
<hr/>		
<b>4.1</b>	<b>ÜBERLEBENS RATEN / AUSWERTUNGSRATE</b>	<b>48</b>
<b>4.2</b>	<b>GEWICHTSVERLÄUFE</b>	<b>49</b>
4.2.1	GEWICHTE IM ERSTEN TEILVERSUCH	49
4.2.2	GEWICHTE IM ZWEITEN TEILVERSUCH	50
<b>4.3</b>	<b>DREI-GEFÄß-VERSCHLUSS</b>	<b>51</b>
<b>4.4</b>	<b>MESSUNG DER ZEREBROVASKULÄREN RESERVEKAPAZITÄT, BLUTGASANALYSE UND BLUTDRUCK</b>	<b>52</b>
4.4.1	BLUTGASWERTE	52
4.4.2	MESSUNG DER ZEREBROVASKULÄREN RESERVEKAPAZITÄT	54
4.4.3	BLUTDRUCKWERTE IM VERGLEICH	60
<b>4.5</b>	<b>LATEXANGIOGRAPHIE</b>	<b>62</b>
4.5.1	DIAMETER DER ARTERIA CEREBRI POSTERIOR IM ERSTEN TEILVERSUCH	62
4.5.2	DIAMETER DER ARTERIA CEREBRI POSTERIOR IM ZWEITEN TEILVERSUCH	64
<b>4.6</b>	<b>HISTOLOGIE</b>	<b>68</b>
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>73</b>
<hr/>		
<b>5.1</b>	<b>BEWERTUNG DER METHODEN</b>	<b>74</b>
5.1.1	DREI-GEFÄß-VERSCHLUSS-MODELL	74
5.1.2	MESSUNG DER ZEREBROVASKULÄREN RESERVEKAPAZITÄT	75
5.1.3	LATEXANGIOGRAPHIE	77
5.1.4	HISTOLOGIE	78
<b>5.2</b>	<b>INTERPRETATION DER ERGEBNISSE</b>	<b>79</b>
5.2.1	EINFLUSS AUF DAS KÖRPERGEWICHT	79
5.2.2	EINFLUSS AUF DIE BLUTDRUCKWERTE	80
5.2.3	DREI-GEFÄß-VERSCHLUSS-MODELL	81
5.2.4	MESSUNG DER ZEREBROVASKULÄREN RESERVEKAPAZITÄT, LATEXANGIOGRAPHIE UND HISTOLOGIE	82
<b>5.3</b>	<b>KLINISCHE RELEVANZ UND THERAPEUTISCHE KONSEQUENZEN</b>	<b>94</b>
<b>5.4</b>	<b>FAZIT</b>	<b>96</b>
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>97</b>
<hr/>		
<b>7.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>98</b>

<b>8.</b>	<b><u>VERZEICHNIS DER VERWENDETEN LITERATUR</u></b>	<b>99</b>
<b>9.</b>	<b><u>ABKÜRZUNGEN</u></b>	<b>112</b>
<b>10.</b>	<b><u>ABBILDUNGEN / TABELLEN / FORMELN</u></b>	<b>114</b>
<b>10.1</b>	<b>ABBILDUNGEN</b>	<b>114</b>
<b>10.2</b>	<b>TABELLEN</b>	<b>116</b>
<b>10.3</b>	<b>FORMELN</b>	<b>116</b>
<b>11.</b>	<b><u>PUBLIKATIONEN</u></b>	<b>117</b>
<b>12.</b>	<b><u>DANKSAGUNGEN</u></b>	<b>118</b>
<b>13.</b>	<b><u>SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG</u></b>	<b>119</b>





## 1. ZIELSETZUNG

Die Arteriogenese ist der aktive Umbauprozess (Remodeling) von präexistenten Arteriolen zu funktionellen Konduktanzgefäßen. Ein erhöhter Blutfluss und die resultierende Änderung physikalischer Kräfte (Schubspannung) werden vom Endothel erkannt und lösen die Arteriogenese aus. Die am Ende dieses Umbauprozesses stehende kollaterale Arterie ist sowohl im Durchmesser als auch in der Länge vergrößert. Arteriogenese ist von hoher klinischer Relevanz, da kollaterale Arterien als „biologische Bypässe“ die Blutversorgung in einem infarktgefährdeten Gewebe aufrecht erhalten können (Schaper und Buschmann, 1999).

Mit Hilfe verschiedener *in vivo*-Modelle werden seit einigen Jahren die einzelnen zellulären und molekularen Mechanismen der Arteriogenese schrittweise analysiert und ausgewertet. Das vorliegende Dissertationsprojekt „Untersuchungen zu den Einflüssen des Renin-Angiotensin- und Kallikrein-Kinin-Systems auf die zerebrale Arteriogenese der Ratte“ legt den Fokus auf den Zusammenhang zwischen dem zerebralen Kollateralwachstum und dem Renin-Angiotensin-System (RAS) sowie dem Kallikrein-Kinin-System (KKS), welche beide in vaskuläre Umbauprozesse involviert sind.

Das RAS ist ein Hormonsystem, dessen wichtigste Funktion die Blutdruckregulierung im Organismus ist. Angiotensin II (Ang II) als Haupteffektorhormon vermittelt seine Wirkungen über zwei Rezeptoren, den Angiotensin II-Rezeptor Subtyp 1 (AT<sub>1</sub>R) und Subtyp 2 (AT<sub>2</sub>R). Eine AT<sub>1</sub>R-Stimulation führt neben der Vasokonstriktion zu inflammatorisch-proliferativen Gefäßwandveränderungen, wohingegen die Stimulation des AT<sub>2</sub>R hemmend auf solche Prozesse wirkt (de Gasparo, Catt *et al.*, 2000). Da entzündliche Vorgänge in der Gefäßwand für das Remodeling der Kollateralgefäße essentiell sind, ist es das erste Teilziel dieser Arbeit, herauszufinden, ob eine Inhibierung des AT<sub>1</sub>R oder einer Stimulierung des AT<sub>2</sub>R hemmende Auswirkungen auf die zerebrale Arteriogenese der Ratte haben.

Ein Gegengewicht zum RAS vermittelt das KKS, dessen vielseitige physiologische Wirkung, wie beispielsweise die Vasodilatation, über die Kinine Bradykinin und Kallidin vermittelt wird. Diese Kinine werden durch das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) abgebaut. ACE ist somit die Schnittstelle von RAS und KKS, da es gleichermaßen regulatorisch in beiden Systemen agiert. Eine Hemmung des ACE senkt den Ang II-Spiegel, erhöht aber die Menge an Bradykinin. In vorangegangenen Studien konnte für die korrespondierenden

Kininrezeptoren bereits eine deutliche proarteriogene Wirkung nachgewiesen werden (Hillmeister, Gatzke *et al.*, 2011). Als zweites Teilziel soll im Rahmen dieses Projektes geklärt werden, ob eine Inhibierung des ACE und eine daraus resultierende erhöhte Konzentration von Bradykinin eine vergleichbar proarteriogene Wirkung auf das kollaterale Remodeling ausübt. Als gezielter Nachweis, dass es sich im positiven Fall tatsächlich um die Bradykininrezeptor-Stimulation handelt, soll ein weiterer Versuch zeigen, dass sich diese Stimulation mit einer zusätzlichen Blockade beider Kininrezeptoren aufheben lässt.

Es ist das Gesamtziel der vorliegenden Dissertationsarbeit, die funktionelle Bedeutung zweier divergierender vasoaktiver Hormonsysteme, RAS und KKS, für die Arteriogenese aufzuklären. Demnach erfolgt eine Untersuchung der Angiotensin II-Rezeptoren AT<sub>1</sub>R und AT<sub>2</sub>R, des ACE und der Kininrezeptoren im zerebralen Hypoperfusionsmodell der Ratte auf funktioneller, morphologischer und histologischer Ebene.

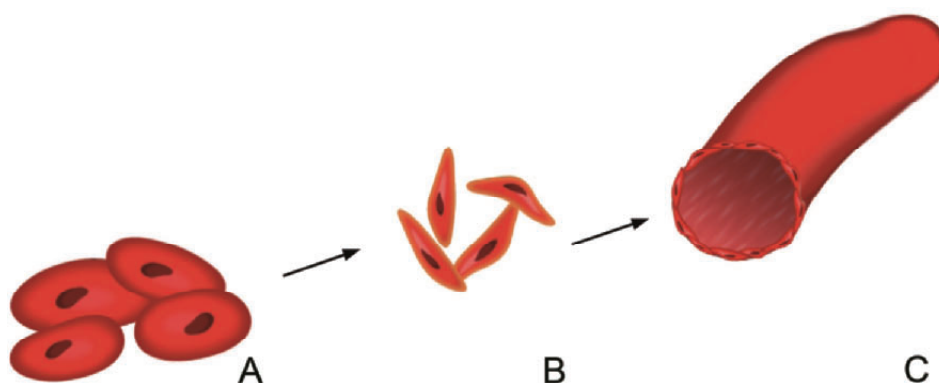
## 2. EINLEITUNG

### 2.1 WACHSTUM VON BLUTGEFÄßEN

In der Entwicklung von Blutgefäßen unterscheidet man auf Grund zeitlicher und morphologischer Unterschiede im Wesentlichen drei Formen, die Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese (Buschmann und Schaper, 1999). Seit etwa zwei Jahrzehnten sind diese differenzierenden Bezeichnungen in der Medizin etabliert.

#### 2.1.1 VASKULOGENESE

Während der embryonalen Entwicklung formen sich *de novo* erste primitive Blutgefäße. Nach der Gastrulation und der damit verbundenen Ausbildung der drei Keimblätter wird ein Teil der mesodermalen Zellen im splanchnopleuralen Raum zu Angioblasten differenziert, welche die Vorläufer von endothelialen Zellen darstellen. Diese formen zunächst Konglomerate und bilden sich anschließend zu sog. Blutinseln um. Letztere weisen peripher eine Ansammlung von Angioblasten und zentral hämatopoetischen Vorläuferzellen auf. Die Entwicklung solcher Urgefäße bezeichnet man als Vaskulogenese (Risau und Flamme, 1995). Die Weiterentwicklung dieses vaskulären Plexus unterliegt mechanischen und biochemischen Einflüssen, wie u.a. der Richtung des Blutflusses und den damit verbundenen Scherkräften sowie dem Sauerstoffbedarf des Gewebes (Kalka, Asahara *et al.*, 2000).



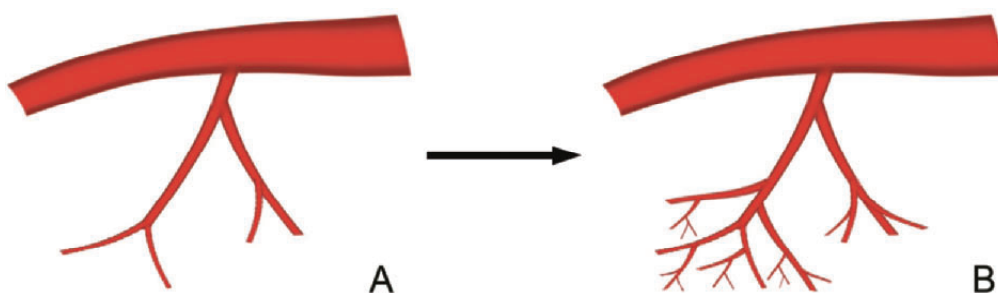
**Abbildung 1** Skizzierte Darstellung der Vaskulogenese. In konglomerierten Angioblasten (A) formen sich im Laufe der Entwicklung endotheliale Vorläuferzellen (B), die ein sog. Urgefäß säumen (C).

Im adulten Organismus ist die Vaskulogenese auf physiologischer Ebene minimiert, ausgenommen hiervon ist der weibliche Reproduktionszyklus (Kalka, Asahara *et al.*, 2000). Jedoch sind auch im Knochenmark und dem peripheren Blut von Erwachsenen endotheliale Vorläuferzellen nachweisbar. Diese werden durch Zytokine wie dem GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor) oder durch Ischämien mobilisiert und können somit auch postnatal Vaskulogenese induzieren (Shi, Rafii *et al.*, 1998; Takahashi, Kalka *et al.*, 1999).

### 2.1.2 ANGIOGENESE

Im Gegensatz zur Vaskulogenese wird bei der Angiogenese ein Gefäßplexus nicht neu angelegt. Allerdings dienen die einfachen Urgefäße während der embryonalen Entwicklung als Grundlage und erweitern sich durch Aussprossung („Sprouting“), Einstülpung (Intussuszeption) und Verzweigung („Branching“) zu einem komplexen Gefäßnetz (Patan, 2000). Die Angiogenese ermöglicht auf diese Weise eine Blutzirkulation in zuvor avaskulärem Gewebe.

Das Wachstum neuer Kapillaren aus präexistente(n) Blutgefäßen beschränkt sich keinesfalls auf die Embryogenese, sondern findet auch postnatal in verschiedenen physiologischen und pathologischen Situationen statt. Beispiele hierfür bilden die Wundheilung, die Prozesse während des weiblichen Reproduktionszyklus sowie das Tumorstadium, rheumatische Arthritis und Retinopathien (Buschmann und Schaper, 1999).

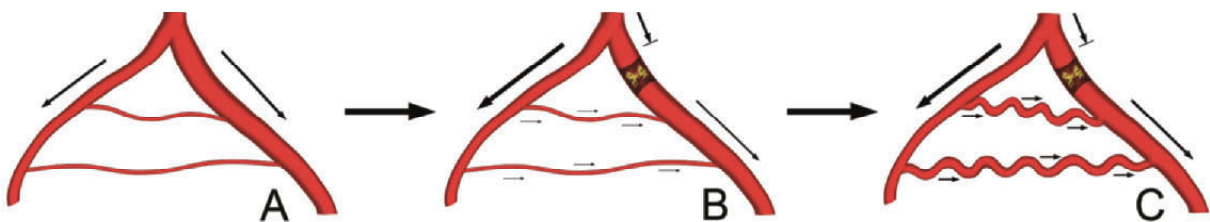


**Abbildung 2** Skizzierte Darstellung der Angiogenese. Aus präexistente(n) Gefäßen (A) wird das Gefäßnetz durch Aussprossung und Verzweigung komplexer und kann so zuvor avaskuläres Gewebe erreichen.

Initialer Auslöser für die Aussprossung neuer Kapillaren ist eine Hypoxie im umliegenden Gewebe. Dieser Zustand fördert die Aktivität von Transkriptionsfaktoren, die Hypoxie-induzierte Faktoren genannt werden. Über sie wird auf zellulärer und systemischer Ebene die Sauerstoffversorgung von Zellen reguliert, so z.B. durch die Aktivierung von Erythropoetin oder durch die VEGF (vascular endothelial growth factor)-vermittelte Stimulierung der Angiogenese (Pugh und Ratcliffe, 2003).

### 2.1.3 ARTERIOGENESE

Der Begriff Arteriogenese beschreibt seit vielen Jahren das Auswachsen präexistenter, kollateralarterieller Anastomosen in ihrem Durchmesser und ihrer Länge. Kollateralen stellen Widerstandsgefäße dar, die mit ihrem vergleichsweise geringen Durchmesser nur wenig Blut führen. Durch aktives, nach außen gerichtetes Remodeling können sie jedoch bedarfsgerecht ihre Diameter erweitern und sich damit zu funktionellen Konduktanzgefäßen entwickeln. Die Basis für diesen physiologischen Wachstumsprozess liefert der Verschluss eines größeren arteriellen Gefäßastes. Distal einer Stenose fällt der Druck im Gefäß ab, wodurch sich ein Druckgradient gegenüber dem kollateral verlaufenden Arterienast aufbaut. Zum Ausgleich dieses Gradienten erfolgt eine Blutflussumleitung, die zu einer erhöhten Schubspannung am Gefäßendothel der arteriolen Anastomosen führt. Diese Schubspannung des Blutstroms aktiviert die Endothelzellen, was eine zelluläre Signalkaskade auslöst. Auf diesem Weg werden Umbau- und Wachstumsprozesse eingeleitet, die die Wiederherstellung der Gewebepfusion distal der Stenose ermöglichen (Schirmer, van Royen *et al.*, 2009).



**Abbildung 3** Skizzierte Darstellung der Arteriogenese. Im physiologischen Fall existieren kollaterale Arteriolen (A), die bei Okklusionen oder Stenosen durch eine Blutflussumleitung (B) aktiviert werden und ihre Diameter vergrößern (C). Dabei wachsen sie auch in die Länge, was zu einer korkenzieherartigen Struktur führt.

## **2.2 ARTERIOGENESE – VORKOMMEN, ABLAUF UND PARALLELEN**

### **2.2.1 VORKOMMEN**

Die Gefahr von Gefäßverschlüssen kann sowohl von spontanen, als auch von langsam progredienten Prozessen ausgehen. Eine Embolie ist zum Beispiel ein perakuter Gefäßverschluss, wohingegen atherosklerotische Läsionen von chronischem Verlauf sind. Auf Grund des lokalen Auftretens der Verschlüsse unterscheidet man koronare (koronare Herzerkrankung, KHK), zerebrale (zerebrovaskuläre Verschlusskrankheit, ZVK) und periphere Gefäßverschlusskrankheiten (periphere arterielle Verschlusskrankheit, pAVK). Der körpereigene Kompensationsmechanismus für alle drei Varianten ist die Fähigkeit, biologische Bypässe zu bilden, indem die Okklusion oder Stenose eines Gefäßastes durch den Ausbau kollateraler Arteriolen zu Konduktanzgefäßen induziert wird.

Wegen der klinischen Relevanz des Kollateralarterienwachstums wurden verschiedene tierexperimentelle Modelle entwickelt, die diesen Mechanismus auslösen und so die Grundlage für wissenschaftliche Untersuchungen bilden. Das Drei-Gefäß-Verschluss-Modell ist hierbei eine Methode zur Untersuchung der zerebralen Arteriogenese (Busch, Buschmann *et al.*, 2003).

Die Tiermodelle der Arteriogenese-Forschung lieferten bereits vielversprechende Ergebnisse, um neue nicht-invasive therapeutische Verfahren zu entwickeln. Hierfür laufen erste klinische Studien, indem bei Ischämie-Patienten die Arteriogenese stimuliert wird, um invasiven Eingriffen durch Angioplastieverfahren oder Bypassoperation vorzubeugen (Bondke, Buschmann *et al.*, 2007; Buschmann, Utz *et al.*, 2009).

### **2.2.2 ABLAUF ARTERIOGENER PROZESSE**

Nach einer Stenose oder Okklusion eines arteriellen Hauptastes wird der Blutstrom auf Grund des entstehenden Druckgradienten über kollaterale Arteriolen umgeleitet. Arteriolen ähneln im Wandaufbau den Arterien, ihre Tunica media ist allerdings dünnere. Da sie aber einen kleineren Durchmesser haben, steigt der Strömungswiderstand des Blutflusses stark an und folgt damit in Teilen dem Gesetz von Hagen-Poiseuille (siehe Formel 1), wonach der Volumenstrom ( $\dot{V}$ ) bei konstantem Durchströmungsdruck zur vierten Potenz des Gefäßradius ( $r$ ) zunimmt. Eine Halbierung des Durchmessers führt demgemäß zu einer 16-

fachen Erhöhung des Strömungswiderstandes. Der Ausdruck  $\frac{\pi r^4}{8\eta l}$  wird auch als Strömungsleitwert  $L$  bezeichnet. Dessen Kehrwert stellt den Strömungswiderstand  $R$  dar,

$$R = \frac{1}{L}.$$

$$\dot{V} = \frac{\pi r^4}{8\eta l} \Delta p$$

**Formel 1** Das Gesetz von Hagen-Poiseuille.  $\dot{V}$  = Volumenstromstärke (Stromzeitvolumen),  $r$  = Radius,  $\eta$  = Viskosität,  $l$  = Länge,  $\Delta p$  = Druckdifferenz

Dieses Gesetz setzt allerdings eine homogene, laminare Strömung und eine konstante Viskosität ( $\eta$ ) voraus, die so exakt im Blutkreislauf nicht zu finden sind. Dennoch ist dieses physikalische Gesetz ein maßgeblicher Faktor in der Arteriogenese.

Mit steigendem Blutfluss erhöht sich die Wirkung der Schubspannung (Gesamtheit der auf eine Fläche wirkenden Scherkräfte) auf das Endothel der Kollateralen (englisch fluid shear stress). Die endothelialen Zellen reagieren auf diese Schubspannung mit der Aktivierung mechanosensitiver Kationenkanäle, vor allem des TRPV4 (transient receptor potential cation channel subfamily V member 4), und schwellen an (Kohler und Hoyer, 2007). Als Gegenregulation werden Anionenkanäle (volume regulated chloride channels, VRAC) geöffnet (Ziegelhoeffer, Scholz *et al.*, 2003), womit ein Ausstrom von Osmolyten ermöglicht wird und das Zellvolumen wieder den Ausgangswert erreicht. Zusätzlich wird der  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx gesteigert. Verschiedene noch nicht vollständig aufgeklärte, intrazelluläre Signalwege induzieren hiernach eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und demzufolge Genexpressionen, vorrangig für Adhäsionsmoleküle, Zyto- wie Chemokine und Wachstumsfaktoren (Heil und Schaper, 2004). Die Expression von MCP-1 (Monozyten chemotaktisches Protein 1, monocyte chemoattractant protein 1) sowie Zelladhäsionsmolekülen wie ICAM-1 (Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1, intercellular adhesion molecule 1) und VCAM-1 (vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1, vascular cell adhesion molecule 1) hat eine Rekrutierung von zirkulierenden Leukozyten (insbesondere Monozyten) zur Folge. Monozyten nähern sich dem aktivierten Endothel, adhären und transmigrieren in die Gefäßwand, wo sie schließlich akkumulieren. Im Folgenden reifen Monozyten zu Makrophagen und produzieren selbst Zytokine wie MCP-1, verschiedene

Wachstumsfaktoren und Matrixmetalloproteasen (Bergmann, Hoefler *et al.*, 2006), welche den Umbauprozess steuern. Während nun auf der einen Seite die Matrixmetalloproteasen lokal subendotheliale Matrix degradieren, um Platz für die Vergrößerung des Gefäßes zu schaffen, wird auf der anderen Seite bereits die Proliferation von Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen stimuliert.

Bereits wenige Minuten nach der Okklusion einer Hauptarterie beginnt der Umbau von kollateralen Arteriolen zu Arterien über die beschriebene Aktivierung des Endothels (Hillmeister, Lehmann *et al.*, 2008). Nach wenigen Stunden werden verstärkt Adhäsionsmoleküle exprimiert, was das Anheften der Monozyten ermöglicht. Dieser Prozess wird als Initiation beschrieben. Ein bis drei Tage nach der Initiation beginnt die Proliferationsphase, die durch eine maximale mitotische Aktivität in der Gefäßwand gekennzeichnet ist. Die anschließende Wachstumsphase erstreckt sich über etwa zwei Wochen. Die mitotische Aktivität fällt nun ab, wohingegen synthetische und proteolytische Aktivität von glatten Gefäßmuskelzellen ansteigen. Bemerkenswert ist auch, dass hier keine weiteren Monozyten mehr rekrutiert werden. Die Phase zwischen dem 14. und 21. Tag nach der Initiation wird als Reifung bezeichnet, da sich in dieser Zeit hauptsächlich die glatten Muskelzellen vom synthetischen in den kontraktiven Phänotyp zurückbilden (Scholz, Ito *et al.*, 2000).

Grundsätzlich sind nach heutigem Wissensstand die Schubspannung, eine inflammatorische Umgebung und zirkulierende Monozyten unerlässliche Faktoren für die Arteriogenese.

### **2.2.3 PARALLELEN ZU ANGIOGENESE UND ATHEROGENESE**

Die arteriogenen Umbauprozesse werden von vielen Faktoren begleitet, die sich auch in der Angiogenese und ebenso Atherogenese finden lassen. Die Angiogenese tritt zumeist mit der gleichen Ursache auf wie die Arteriogenese. Wird ein übergeordneter Gefäßast durch eine Okklusion oder Stenose verschlossen, so findet zwar eine Blutflussumleitung durch präexistente Arteriolen statt, womöglich ist jedoch die Blutversorgung im akuten Fall soweit reduziert, dass eine Hypoperfusion oder gar Ischämie im betroffenen Gewebe nicht vollständig verhindert werden kann. Die damit einhergehende Hypoxie löst reaktiv die Aussprossung von Kapillaren aus. Es besteht ein Unterschied zwischen den initialen Auslösern und der Lokalisation beider Prozesse. Auf der Seite der Arteriogenese wirkt eine erhöhte Schubspannung am Gefäßendothel, die zudem in direkter Umgebung zum



Gefäßverschluss stattfindet, andererseits finden sich hypoxische Gewebezustände bei der Angiogenese deutlich weiter distal im Versorgungsgebiet (Heil, Eitenmüller *et al.*, 2006).

Mit den sich zunehmend verdichtenden Kenntnissen über die Mechanismen der Arteriogenese wird auch deutlich, dass dieser Wachstumsprozess viele Parallelen mit der Atherogenese aufweist. Die Crux liegt darin, dass eine Stimulation des Kollateralwachstums mit einer Progression atherosklerotischer Prozesse einhergeht (Epstein, Stabile *et al.*, 2004). Nach dem Gott Janus aus der römischen Mythologie, dessen doppeltes Gesicht als Symbol der Zwiespältigkeit gilt, werden die Parallelen zwischen Arterio- und Atherogenese auch als Janus-Phänomen bezeichnet. Bei einer Vielzahl von proinflammatorischen Chemokinen und Adhäsionsmolekülen wurde dieser ambivalente Einfluss bereits beschrieben, so z.B. bei MCP-1 (Viedt, Vogel *et al.*, 2002; Ley, 2003), ICAM-1 (Davies, Gordon *et al.*, 1993; Hoefler, van Royen *et al.*, 2004) und VCAM-1 (Fotis, Agrogiannis *et al.*, 2012). In die Gefäßwand einwandernde Monozyten übernehmen auch hier die Schlüsselrolle. Monozyten werden mittels MCP-1 angelockt und können an exprimierten ICAM-1 anheften, um schließlich in die Tunica intima und media zu transmigrieren. Wieder unterscheidet sich der initiale Auslöser. Eine atherosklerotische Läsion beginnt primär mit der Akkumulation von oxidiertem LDL (Lipoprotein geringer Dichte, low density lipoprotein) in der subendothelialen Matrix (Lusis, 2000).

Ein sehr bedeutender Risikofaktor für atherosklerotische Läsionen ist ein chronisch hoher Blutdruck. Die andauernde Reizung des Endothels erhöht die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) und stört so die Integrität der endothelialen Schicht im Gefäß (Ross, 1999).

## 2.3 RENIN-ANGIOTENSIN-SYSTEM

### 2.3.1 ALLGEMEIN

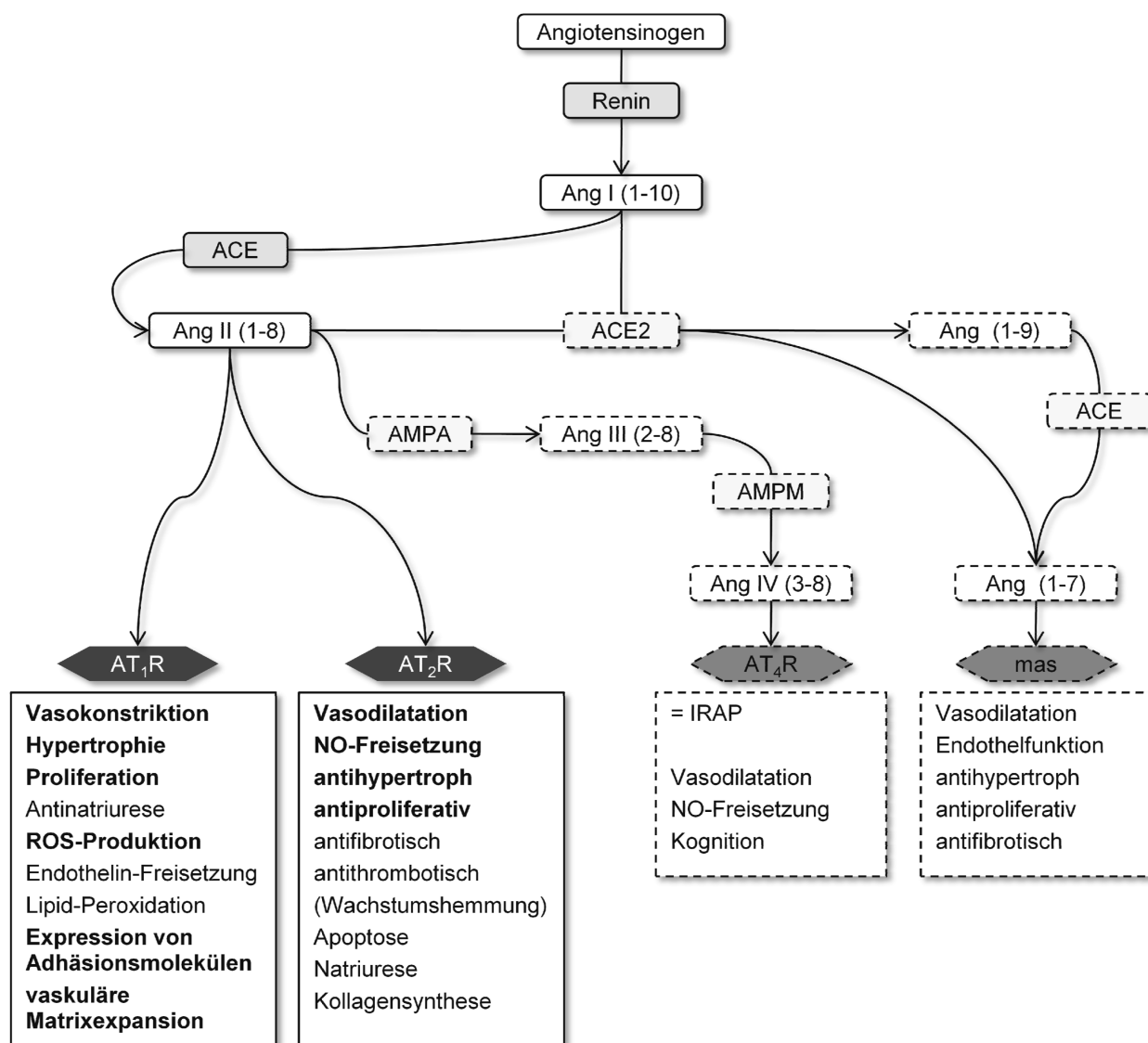
Das Renin-Angiotensin-System (RAS) ist der Grundmechanismus zur endogenen Blutdruckregulation und der Kontrolle des Wasserhaushaltes im Säugetierorganismus. In ihren Untersuchungen bewiesen Irvine H. Page und O. M. Helmer 1939 erstmals die Funktion einer blutdrucksteigernden Substanz, die nach der gezielten Gabe von Renin in den Blutkreislauf produziert wurde (Page und Helmer, 1940). Sie bezeichneten die Substanz zunächst als „Angiotonin“. Zeitgleich fanden auch Braun-33Menendez *et al.* diese vasokonstriktorische Substanz und nannten sie „Hypertensin“ (Braun-Menendez, Fasciolo *et al.*, 1940). Später einigte sich die Wissenschaftswelt auf den Namen Angiotensin.

Bis heute sind die einzelnen Abläufe des RAS nicht zur Gänze aufgeklärt, so erscheinen jedes Jahr weitere Publikationen, welche zusätzliche Involvierungen des RAS bei physio- und pathologischen Situationen aufdecken. Die Hauptfunktionen sind dennoch unstrittig: Sinkt im Organismus die renale Perfusion durch Hypovolämie oder Hypotonie, so registrieren dies die juxtaglomerulären Zellen der Niere, woraufhin das Enzym Renin freigesetzt wird. Auch Hyponatriämie oder eine Stimulation des Sympathikus führen zur Abgabe von Renin, dem das in der Leber gebildete Angiotensinogen als Substrat dient. Als Produkt entsteht Angiotensin I (Ang I), ein Dekapeptid, das selbst weitgehend inaktiv ist. Im weiteren Verlauf kann Ang I mittels des vorrangig am pulmonalen Gefäßendothel lokalisierten Angiotensin Converting Enzyme (ACE, auch Kininase II) durch Abspaltung zweier Aminosäuren in das schließlich aktive Oktapeptid Angiotensin II (Ang II) umgewandelt werden. Die hier beschriebene Enzymkaskade bildet die Grundlage zum Verständnis des RAS.

Die molekularen Interaktionen des RAS sind jedoch vielfältig, so kann zum Beispiel die Konvertierung der Prohormone auch über andere Enzyme erfolgen (zum Beispiel Trypsin, Cathepsin und Chymase). Hier ist jedoch noch nicht hinreichend geklärt, wie sehr dies bei der Bildung von Ang II ins Gewicht fällt (Levy, 2005).

Auch erweitert sich bis heute das RAS um zusätzliche Angiotensin-Abkömmlinge und deren Rezeptoren, obwohl Ang II immer noch als das Haupteffektorhormon des RAS gewertet wird. Obgleich die Funktionen der neu hinzugekommenen Elemente weiterhin untersucht werden müssen, wird das „klassische Bild“ des RAS, bei dem alleinig Ang II als Hormon eine Rolle

spielt, in den Hintergrund gedrängt und die allumfassende Betrachtung deutlich aussagekräftiger. Es wurde eine biologische Aktivität der Derivate Angiotensin 2-8 (Ang III) und Angiotensin 3-8 (Ang IV) nachgewiesen. Auch die Entdeckung von Angiotensin 1-7 (Ang 1-7), seines mas-Rezeptors und des Enzyms ACE2 lassen das RAS fortlaufend komplexer werden, da es die Wirkung von Ang II gegenzuregulieren scheint (Fyhrquist und Saijonmaa, 2008). Abbildung 4 gibt hierzu eine Übersicht.



**Abbildung 4** Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Systems. Ang = Angiotensin, AMPA = Aminopeptidase A, ACE = Angiotensin Converting Enzyme, AMPM = Aminopeptidase, IRAP = Insulin-regulierte Aminopeptidase, AT<sub>1</sub>R/AT<sub>2</sub>R/AT<sub>4</sub>R = Angiotensin-Rezeptor Subtyp 1, 2 und 4, mas = mas-Rezeptor, NO = Stickstoffmonoxid. Einfach umrandete Elemente = Klassisches Renin-Angiotensin-System, gestrichelte Elemente = erweitertes Renin-Angiotensin-System.

### 2.3.2 REZEPTOREN

Angiotensin II und seine Derivate vermitteln ihre biologische Wirkung über verschiedene Angiotensin-Rezeptoren (ATR). Besonders die Strukturen und Funktionen der Angiotensin II-Rezeptor-Subtypen 1 (AT<sub>1</sub>R) und 2 (AT<sub>2</sub>R) wurden in den letzten Jahrzehnten detailliert aufgeklärt. So wie die Subtypen 3 (AT<sub>3</sub>R) und 4 (AT<sub>4</sub>R), die zwar bereits beschrieben, aber noch nicht ausreichend analysiert wurden, unterliegt auch der neuartige mas-Rezeptor nach wie vor intensiver Erforschung (Alexander, Bernstein *et al.*, 2009; Ferrario, Ahmad *et al.*, 2010).

Es handelt sich bei AT<sub>1</sub>R und AT<sub>2</sub>R grundsätzlich um heptahelikale Transmembranrezeptoren, die G-Protein-gekoppelt sind. In ihrer Verbreitung und Funktion unterscheiden sie sich allerdings erheblich. Der AT<sub>1</sub>R kommt ubiquitär vor und ist für die klassischen Ang II-Reaktionen verantwortlich, ergo Vasokonstriktion, erhöhte kardiale Kontraktilität, renale Natriumreabsorption, Zellproliferation, Aktivität im Entzündungsgeschehen und für oxidativen Stress (Levy, 2005).

Im Gegensatz dazu wird der AT<sub>2</sub>R vorrangig im fetalen Gewebe exprimiert und ist schon nach der Geburt herunter reguliert. Im Adulten findet man den AT<sub>2</sub>R hauptsächlich in der Nebenniere, dem Herzen und speziellen Hirnarealen, aber auch bei pathologischen Situationen wie bei Herzerkrankungen, zerebralen Läsionen, Gefäßverletzungen und Wundheilungsprozessen (Wan, Wallinder *et al.*, 2004). Seine Wirkung wird oft als diametral zur AT<sub>1</sub>R-Funktion beschrieben. Vornehmlich in Bezug auf AT<sub>1</sub>-gesteuertes Zellwachstum von beispielsweise Endothelzellen und Kardiomyozyten wirkt er gegenregulierend (de Gasparo, Catt *et al.*, 2000). Bemerkenswert ist hierbei die Tatsache, dass die AT<sub>2</sub>R-Signalwirkung nicht ausschließlich ligandgesteuert ist, sondern dass womöglich eine direkte Bindung von AT<sub>2</sub>R und AT<sub>1</sub>R in Form einer Heterodimerisation stattfindet und dadurch die AT<sub>1</sub>-Wirkung unterbunden wird (AbdAlla, Lothar *et al.*, 2001). Es wird auch von Signal-Crosstalks zwischen den Rezeptoren berichtet (Miura, Matsuo *et al.*, 2010).

### 2.3.3 VASKULÄRE BEDEUTUNG

Die Signalwege des AT<sub>1</sub>R sind sehr komplex und führen zu vielschichtigen Reaktionen der jeweiligen Zellen. Der bedeutendste Signalweg ist die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus dem sarkoplasmatischen Retikulum von glatten Gefäßmuskelzellen, welches über die an den AT<sub>1</sub>R

gekoppelten G-Proteine gesteuert wird. Freies  $\text{Ca}^{2+}$  führt zu der Interaktion von Aktin und Myosin-Filamenten und damit zur Kontraktion der Zelle. Ein weiterer wichtiger Signalweg der G-Proteine am  $\text{AT}_1\text{R}$  führt zu einer Aktivierung von Proteinkinase C und des ERK-Signalwegs, welcher zusätzlich die Kontraktion unterstützt, jedoch auch an zellulärem Wachstum beteiligt ist (Mehta und Griendling, 2007). Die Bindung von Ang II an den  $\text{AT}_1\text{R}$  kann darüber hinaus die Arachidonsäure-Produktion über eine Phospholipase  $\text{A}_2$ -Interaktion induzieren. Derivate der Arachidonsäure üben eine Wirkung bei der Erhaltung des Gefäßtonus sowie der Oxidierung von NAD(P)H in glatten Gefäßmuskelzellen aus (Griendling, Sorescu *et al.*, 2000). Eine weitere wichtige Bedeutung der  $\text{AT}_1\text{R}$ -Signalwege liegt in den diffizilen Transaktivierungen und Interaktionen (Crosstalks) mit unterschiedlichen MAP (mitogen aktiviertes Protein)-Kinasen, Tyrosinkinase- und Nicht-Tyrosinkinaserzeptoren. Verschiedene Arbeiten zeigten hier vielseitige regulatorische Funktionen für die Hypertrophie sowie Differenzierung, Proliferation, Migration und Fibrose von glatten Gefäßmuskelzellen (Mehta und Griendling, 2007).

Diese Vielzahl von Interaktionen potenziert die möglichen Signalwege, die einerseits zu physiologischen Gefäßreaktionen führen, aber auch ein empfindliches Ziel für Ungleichgewichte im RAS bilden. Störungen der Signalwege führen zu progredienten vaskulären Erkrankungen. So ist heute bekannt, dass eine langfristige Ang II-Stimulation zu kardialer Hypertrophie, In-Stent-Restenose, reduzierter Fibrinolyse und renaler Fibrose führen kann. Ang II verursacht oxidativen Stress in der Gefäßwand und ist nachweislich ein Hauptfaktor für Entzündungen, Thrombosen und Fibrosen (Mehta und Griendling, 2007). Die  $\text{AT}_1\text{R}$ -Wirkung resultiert in einer erhöhten Konzentration an ROS, welche zu der Entstehung von atherosklerotischen Läsionen beitragen, da sie u.a. die Expression redox-sensitiver Genprodukte wie VCAM-1 und MCP-1 induzieren (Chen, Tummala *et al.*, 1998; Tummala, Chen *et al.*, 1999; Nickenig, 2002). ROS werden gemeinhin als eine wesentliche Ursache für die Pathogenese von endothelialer Dysfunktion und damit in Zusammenhang stehender Atherosklerose beschrieben. Ob sich die physiologischen Effekte von Ang II in Gefäßen zu pathologischen Prozessen wandeln, hängt dabei von der Dauer (akut oder chronisch) und der Lokalisation der Einwirkung ab (Ruiz-Ortega, Lorenzo *et al.*, 2001).

Bei den drei oben beschriebenen vaskulären Entwicklungsprozessen (Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese) gibt es viele gemeinsame biologische Grundmechanismen. Der  $\text{AT}_1\text{R}$  hat eine regulatorische Funktion bei atherosklerotischen Prozessen und

gleichermaßen bei der Angiogenese inne. In einem Hinterlauf-Ischämie-Modell der Maus wurde gezeigt, dass die frühe Angiogenese von der Ang II-AT<sub>1</sub>R-Interaktion gefördert wird, insbesondere die Infiltration mit mononukleären Zellen und die Zytokinproduktion werden unterstützt (Sasaki, Murohara *et al.*, 2002). Demgegenüber stellten Munk *et al.*, 2007, fest, dass kapilläres „Sprouting“ in einem Mäuseherz-Modell ausschließlich unter hypoxischen Bedingungen durch Ang II ausgelöst und über den AT<sub>2</sub>R-B<sub>2</sub>R-Komplex erreicht wird (Munk, Sanchez de Miguel *et al.*, 2007). Dass diese der Angiogenese dienlichen Eigenschaften des RAS auch einen Einfluss auf das Kollateralgefäßwachstum ausüben, zeigten Ren und seine Kollegen 2008 in einem Hinterlauf-Modell (Ren, Li *et al.*, 2008). Hier wurde nachgewiesen, dass eine Hemmung des ACE über gezielte Genexpression proangiogener Substanzen den Ausbau von Kollateralgefäßen fördert. Des Weiteren wurde die Wirkung von Ang II bezüglich der koronaren Arteriogenese untersucht. Es stellte sich heraus, dass Ang II dosisabhängig den Blutfluss im Gebiet der Kollateralgefäße beeinflusst. Die Autoren nahmen an, dass die Ang II/AT<sub>1</sub>R-Achse zumindest teilweise den koronaren Kollateralausbau reguliert und ihre Bedeutung in der Produktion einer optimalen Menge ROS liegt, durch die es zur Aktivierung redox-sensitiver Mechanismen kommt (Reed, Kolz *et al.*, 2008).

#### 2.3.4 PHARMAKOLOGISCHE BEEINFLUSSUNG

Auf Grund der großen Relevanz des AT<sub>1</sub>R für die Blutdruckregulation sowie für die Kontrolle des Wasser- und Elektrolythaushaltes hat sich Mitte der 1980er Jahre eine pharmakologische Substanzklasse, die Sartane, zur spezifischen, hochselektiven Hemmung dieses Rezeptors etabliert. Losartan war der erste marktreife AT<sub>1</sub>-Antagonist (ARB, angiotensin II type 1 receptor blocker). Basierend auf der chemischen Struktur von Losartan wurden bald zahlreiche andere Sartane wie Irbesartan, Valsartan, Telmisartan und Candesartan entwickelt, die in ihrer Pharmakokinetik und -dynamik stark variieren können (Timmermans, Wong *et al.*, 1993).

Candesartan, appliziert in Form seiner Prodrug Candesartan-Cilexetil, hat den Vorteil eines sehr guten Dosis-Wirkungs-Verhältnisses bei lang anhaltender Wirkdauer (Oparil, 2000). Candesartan hat neben Sapisartan die höchste Affinität zum AT<sub>1</sub>R und wird darüber hinaus als pseudo-irreversibler oder auch unüberwindbarer (engl. insurmountable) Antagonist bezeichnet (Altmannsberger, Paneitz *et al.*, 2001), da die Dissoziationsrate des Candesartans vom Rezeptor deutlich länger dauert als die konkurrierende Interaktion von Ang II (Swinney, 2004).

Substanzen zur spezifischen Modulation des AT<sub>2</sub>R finden bisher keine Anwendung in der Klinik. Nichtsdestoweniger stehen Agonisten wie Novokinin oder Compound 21 (Vicore Pharma, Göteborg, Schweden) und Antagonisten (PD 123319) zur Verfügung, die die Untersuchung von Physio- und Pathologie des AT<sub>2</sub>R ermöglichen. In einer 2004 veröffentlichten Untersuchung wurden die pharmakologischen Eigenschaften von Compound 21 ausführlich beschrieben (Wan, Wallinder *et al.*, 2004). Seither gilt es als der erste oral verfügbare AT<sub>2</sub>-Agonist und wird in vorklinischen Studien zu Herzinsuffizienz, Nephroprotektion, Entzündungshemmung, Schlaganfällen und einigen dermatologischen Anwendungen eingesetzt (Unger und Dahlof, 2010).

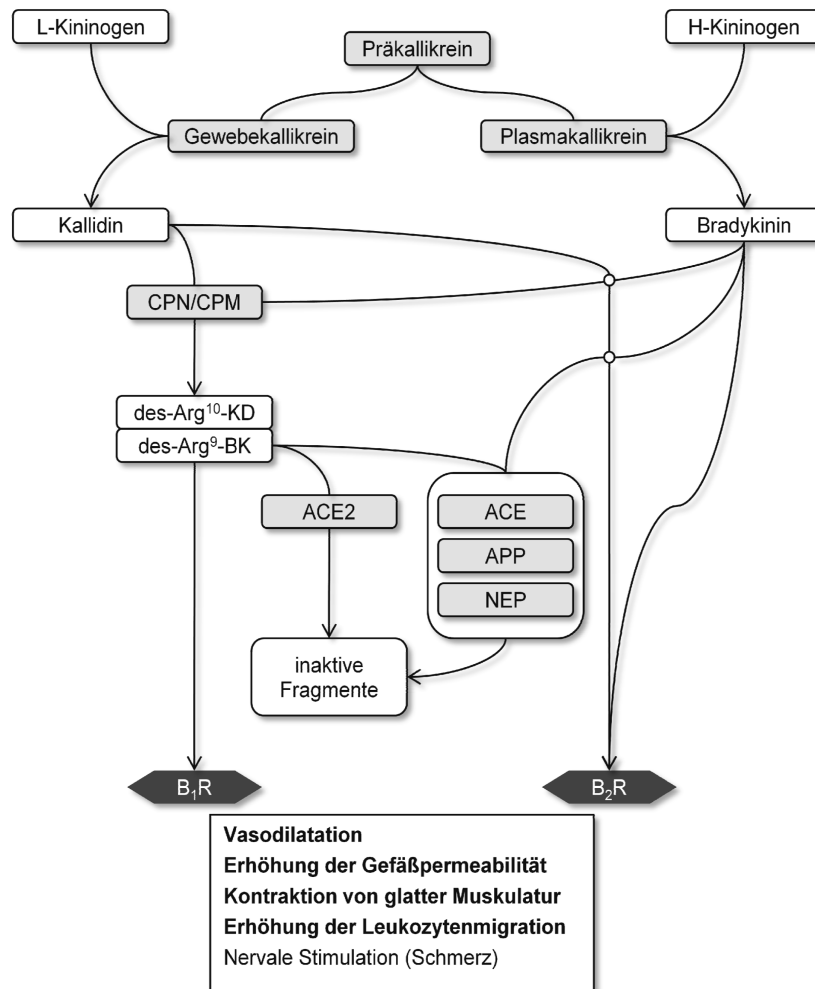
## 2.4 KALLIKREIN-KININ-SYSTEM

### 2.4.1 ALLGEMEIN

Die französischen Wissenschaftler Abelous und Bardier gelten als die Entdecker des Kallikrein-Kinin-Systems (KKS), da sie 1909 als erste die hypotensive Wirkung von Urin nachwiesen. Urin hat einen hohen Gehalt an Kininen, jedoch waren deren komplexe biologische Wirkungen noch nicht absehbar (Abelous und Bardier, 1909). Bis heute besteht reges Interesse am Kallikrein-Kinin-System, vor allem wegen der facettenreichen Aktivität während verschiedener physiologischer Prozesse. Das KKS hat eine Wirkung auf verschiedene Hormonsysteme, so interagiert es beispielsweise mit dem RAS und lebenswichtigen Mechanismen wie der Gerinnungskaskade. Darüber hinaus beteiligen sich Kinine am Entzündungsgeschehen und zeigen eine kardio- und nephroprotektive Wirkung (Moreau, Garbacki *et al.*, 2005).

Kinine, mit denen gemeinhin das Nonapeptid Bradykinin und das Dekapeptid Kallidin (auch Lysylbradykinin) gemeint sind, sind die bioaktiven Bestandteile des KKS. Sie werden auf zwei Wegen freigesetzt. Es ist anzunehmen, dass diese unterschiedlichen Enzymwege auch funktionell verschiedene pathophysiologische Rollen spielen (Bhoola, Figueroa *et al.*, 1992). Als Ausgangspunkt dienen Serinproteasen, die, nach ihrem Vorkommen benannt, als Plasma- und Gewebekallikrein bezeichnet werden, sowie die Kininogene, welche das Substrat für das Kallikrein zur Generierung der Kinine bilden. Kininogene werden anhand ihres Molekulargewichtes in hochmolekulares Kininogen (high-molecular-weight kininogen, HK) und niedermolekulares Kininogen (low-molecular-weight kininogen, LK) differenziert. Beide

zirkulieren im Plasma, LK allerdings in höherer Konzentration als HK (Adam, Albert *et al.*, 1985). Das Plasmakallikrein spaltet aus dem HK Bradykinin ab, wohingegen das Gewebekallikrein aus LK das Kallidin formt. Die Carboxypeptidasen N und M wandeln diese anschließend in ihre des-Arg-Derivate um. Die systematische Darstellung ist in Abbildung 5 zu sehen.



**Abbildung 5** Schematische Darstellung des Kallikrein-Kinin-Systems. L = niedermolekular, H = hochmolekular, BK = Bradykinin, KD = Kallidin, CPN/CPM = Carboxypeptidase N und M, APP = Aminopeptidase P, NEP = neutrale Endopeptidase, ACE = Angiotensin Converting Enzyme, B<sub>1</sub>R/B<sub>2</sub>R = Bradykininrezeptor Subtyp 1 und 2.



### 2.4.2 REZEPTOREN

Die Wirkung der Kinine wird über zwei Rezeptor-Subtypen vermittelt. Beide gehören zu der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen. Der Bradykininrezeptor Subtyp 1 (B<sub>1</sub>R) hat eine höhere Affinität für die des-Arg-Derivate und ist im gesunden Gewebe nur geringfügig exprimiert. Im Falle eines Traumas oder einer entzündlichen Reaktion wird seine Expression hoch reguliert. Ihm gegenüber steht der Bradykininrezeptor Subtyp 2 (B<sub>2</sub>R), welcher ubiquitär vorkommt und konstitutiv exprimiert ist. Zudem haben Kinine in nativer Form gegenüber B<sub>2</sub>R eine höhere Affinität (Leeb-Lundberg, Marceau *et al.*, 2005).

Entsteht eine Bindung zwischen den Kininen oder ihren des-Arg-Derivaten mit den jeweiligen Rezeptoren, kann das abhängig von dem Zielgewebe zu Reaktionen wie Vasodilatation, erhöhte Gefäßpermeabilität und Leukozytenmigration führen (Bhoola, Figueroa *et al.*, 1992). Je nach Zelltypus kann der stimulierte Kininrezeptor über verschiedene second messenger agieren (Moreau, Garbacki *et al.*, 2005). Zunächst werden die gekoppelten G-Proteine aktiviert, welche ihrerseits Adenylat- oder Guanylatcyclasen aktivieren. Diese bilden aus ATP bzw. GTP cAMP oder cGMP (zyklisches Adenosin-/Guanosinmonophosphat, cyclic adenosine/guanosine monophosphate). Beide bewirken eine Dilatation von vaskulären glatten Muskelzellen. Daneben können aber auch die Phospholipasen A<sub>2</sub> und C aktiviert werden. Die Phospholipase C-Produkte sind IP<sub>3</sub> (Inositoltriphosphat) und Diacylglycerol. IP<sub>3</sub> ermöglicht durch Bindung an den IP<sub>3</sub>-Rezeptor an intrazellulären Calciumspeichern den Transport von Ca<sup>2+</sup> in das Cytosol. Diacylglycerol und Ca<sup>2+</sup> sind zusammen für eine Aktivierung der Proteinkinase C verantwortlich. Wird alternativ die Phospholipase A<sub>2</sub> aktiviert, so wird Arachidonsäure aus zellulären Membranphospholipiden abgespalten.

Arachidonsäure ist Grundlage für die Synthese von Eikosanoiden wie Prostaglandin und Leukotrien, welche mittels Cyclooxygenase resp. Lipoxygenasen entstehen. Eikosanoide wirken hemmend auf die Thrombozytenaggregation und Plasma kann aus dem Gefäß austreten (Horn, 2009). Werden die Bradykininrezeptoren auf den Leukozyten stimuliert, so fördert dies die Wanderung weißer Blutzellen in entzündliche Bereiche, was die chemotaktische Wirkung von Kininen erklärt (Bhoola, Figueroa *et al.*, 1992). Zusätzlich verursachen die auf sensorischen und sympathischen Nervenendigungen befindlichen Kininrezeptoren einen brennenden Schmerz, wie er typisch für eine entzündliche Umgebung

ist (Couture, Harrisson *et al.*, 2001). In Uterus, Intestinum und den Bronchien führt eine Bindung von Kininen zur Kontraktion von glatten Muskelzellen (Regoli und Barabe, 1980).

### 2.4.3 VASKULÄRE BEDEUTUNG

Nach seiner Entdeckung wurde das KKS neben seiner Funktion bei inflammatorischen und nozizeptiven Reaktionen auf Grund seines Einflusses bei der intrinsischen Gerinnungskaskade zusätzlich der Hämostase zugeordnet. Der Hageman-Faktor (Faktor XII) wandelt bei seiner Voraktivierung über negativ geladene Oberflächen Präkallikrein in das Kallikrein um und löst damit die Bildung von Bradykinin aus. Kallikrein und Bradykinin selbst verursachen dann rückwirkend die komplette Aktivierung des Faktors XII (XIIa). Auf diese Weise wird die Fibrinbildung induziert. Dem gegenüber bildet Faktor XIIa auch Plasmin aus Plasminogen, was die Fibrinolyse steuert (Schmaier, 2003). Das KKS ist also nicht unwesentlich an einem Gleichgewicht in der Hämostase beteiligt.

Im Laufe der Zeit wurde aber die große Bedeutung der Kinine in der Blutdruckregulation erkannt. Durch die vasodilatatorische Wirkung und die damit verbundene Blutdrucksenkung wird das KKS mittlerweile als die physiologische Gegenregulation zum RAS bezeichnet. Das wurde umso deutlicher, als man Anfang der 1970er Jahre erkannte, dass es sich beim ACE um das Kinin-metabolisierende Enzym Kininase II handelt (Yang, Erdos *et al.*, 1970; Yang, Erdos *et al.*, 1971). Auf der einen Seite wandelt ACE Ang I in das aktive Ang II um, auf der anderen Seite wird damit Bradykinin gespalten. Wird das ACE inhibiert, so wird die Bildung von Ang II reduziert und die Bradykinin-Konzentration steigt (Schmaier, 2002; Campbell, 2003). Bemerkenswert ist, dass bei einer Manipulation dieses Gleichgewichtes eine Hypertonie offensichtlich erst eintritt, wenn beide Kininrezeptoren blockiert werden. Für den Fall, dass ein Rezeptor in seiner Funktion eingeschränkt ist, wirkt der andere kompensierend und wird ggf. hoch reguliert (Duka, Duka *et al.*, 2006).

Auf Grund des klinisch relevanten Befundes, dass eine ACE-Hemmung eine proangiogene Wirkung erzielt, rückte nun zudem vermehrt der Einfluss der Bradykininrezeptoren auf Angiogenese und Neovaskularisation ins Blickfeld. In einem *in vitro*-Angiogenese-Modell wurden mittels Immunhistochemie B<sub>2</sub>R in angiogenen Endothelzellen dargestellt und in erhöhtem Maße in aktivierten Endothelzellen lokalisiert (Plendl, Snyman *et al.*, 2000). Silvestre und Kollegen fanden heraus, dass ein proangiogener Effekt bei einer ACE-Blockade über den B<sub>2</sub>R-Signalweg vermittelt wird, der mit einer Hochregulierung von der endothelialen

Stickstoffmonoxid-Synthase (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) einhergeht (Silvestre, Bergaya *et al.*, 2001). Kurz darauf wurde auch für den B<sub>1</sub>R eine positive Wirkung auf die reparative Angiogenese nachgewiesen (Emanuelli, Salis *et al.*, 2002b). Vorarbeiten zeigten, dass die proangiogene Eigenschaft des KKS vermutlich auf einer chemotaktischen Wirkung gegenüber Leukozyten beruht und über eine Interleukin 1 (IL-1)-vermittelte Reaktion eine gesteigerte Adhäsion und Migration durch das Endothel bewirkt (Bhoola, Figueroa *et al.*, 1992). Bei Untersuchungen zu vaskulären Wachstumsprozessen zeigte sich in einem *in vivo*-Schwamm-Modell, dass die Angiogenese durch Injektion von Bradykinin und IL-1 stimuliert werden konnte (Hu und Fan, 1993). Angiogene, zirkulierende Vorläuferzellen besitzen eine hohe Anzahl an B<sub>2</sub>R, was eine Migration in Richtung von Bradykinin erklärt. Dieser Mechanismus lockt u.a. mononukleäre Zellpopulationen dieser Vorläuferzellen an, die ebenso wie verschiedene adulte leukozytäre Subpopulationen ein Neovaskularisationspotenzial besitzen (Krankel, Katare *et al.*, 2008).

Eine gezielte Untersuchung der Bradykinin-Rezeptoren in kollateralen Wachstumsprozessen erfolgte von Hillmeister sowie Gatzke und Kollegen. Sie konnten in Maus- und Ratten-Modellen nachweisen, dass die Kinin-Rezeptoren als positive Modulatoren der Arteriogenese fungieren. Besonders der B<sub>1</sub>R wirkte über eine Rekrutierung peripherer Immunzellen stimulierend auf das Kollateralwachstum (Gatzke, 2011; Hillmeister, Gatzke *et al.*, 2011).

#### **2.4.4 PHARMAKOLOGISCHE BEEINFLUSSUNG**

Um den Abbau von Kininen zu verhindern, hemmt man die Wirkung des ACE (auch bekannt als Kininase II). ACE-Hemmer werden heute primär als Antihypertensiva, aber auch bei Herzinsuffizienz eingesetzt, da sie die Bildung von Ang II inhibieren. Die ursprüngliche Substanz, die zu der Entwicklung der ACE-Hemmer führte, wurde als Bradykinin potenzierendes Peptid (englisch bradykinin potentiating factor/peptide) durch die Forschung der Arbeitsgruppe um Vane und Ferreira bekannt (Ferreira, Greene *et al.*, 1970; Smith und Vane, 2003). Mit einigen strukturellen Veränderungen gelang es, ACE-Hemmer oral applizierbar zu machen, und so wurde in den frühen 1980er Jahren schließlich Captopril zur Behandlung der arteriellen Hypertonie auf den Markt gebracht (Smith und Vane, 2003). Weiterentwicklungen dieser Substanz führten zur Verbesserung der Wirkdauer und Stabilität. Ein Großteil der ACE-Hemmer wird nunmehr als Prodrug verabreicht. So auch Ramipril, ein ACE-Hemmer der zweiten Generation, das erst als Ramiprilat aktiv wird (Tabata, Yamazaki *et al.*, 1990).

Ein klinischer Einsatz von ACE-Hemmern kann insbesondere über die oben beschriebene Konzentrationserhöhung von Bradykinin Nebenwirkungen verursachen. Eine unkontrollierte Erhöhung des Bradykininspiegels führt über den B<sub>2</sub>R zu einer erhöhten Permeabilisierung des Endothels und zu pathologischen Prozessen (zum Beispiel Angioödem). Dahingehend ist die Antagonisierung der Kininrezeptoren hochinteressant und findet mit der Substanz Icatibant (firazyr<sup>®</sup>, Jerini AG/Shire Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland) bereits klinische Anwendung, da sie über eine Hemmung des B<sub>2</sub>R zur Behandlung des hereditären Angioödems geeignet ist. Icatibant, auch als HOE 140 bezeichnet, antagonisiert hochaffin und ist durch seine Peptidaseresistenz langlebig (Moreau, Garbacki *et al.*, 2005). Mit der Inhibierung des B<sub>2</sub>R wird zudem die Erforschung der weitreichenden Einflüsse des KKS bei Gefäßwachstum und -remodeling, allergischen oder entzündlichen Reaktionen ermöglicht.

Demgegenüber ist des-Arg<sup>9</sup>,[Leu<sup>8</sup>]-Bradykinin geeignet, den B<sub>1</sub>R selektiv zu hemmen. Es stellt den Prototyp der B<sub>1</sub>R-Antagonisten dar und ist viel genutzt (Bathon und Proud, 1991; Marceau, Hess *et al.*, 1998).

## **2.5 PARALLELE BETRACHTUNG DES RENIN-ANGIOTENSIN- UND KININ-SYSTEMS IN BEZUG AUF DIE ARTERIOGENESE**

Obwohl die einzelnen Effekte des RAS und des KKS zunächst gegensätzlich erscheinen, bestehen vielschichtige Interaktionen zwischen beiden Systemen. Betrachtet man sie als einen Komplex, sind sie der Schlüsselmechanismus für regulatorische Gefäßaktivitäten (Schmaier, 2003). Der AT<sub>1</sub>R ist maßgeblich an entzündlichen Prozessen in der Gefäßwand beteiligt (siehe Punkt 2.3.3), wobei seine Aktivierung u.a. zur Expression von MCP-1 und VCAM-1 führt (Ruiz-Ortega, Lorenzo *et al.*, 2001). Vorarbeiten zeigten, dass solche parakrinen, inflammatorischen Prozesse wichtige regulatorische Funktionen bei der Arteriogenese einnehmen (Heil und Schaper, 2004). Das hohe proarteriogene Potenzial einer direkten Bradykininrezeptor-Stimulation wurde bereits ausführlich unter Punkt 2.4.3 erläutert. Über die Schnittstelle zwischen dem KKS und RAS, dem ACE, welches für die Bildung von Ang II und die Inaktivierung von Bradykinin verantwortlich ist, greifen diese Systeme physiologisch ineinander. An einer zusammenfassenden Betrachtung beider Systeme im arteriogenen Geschehen mangelt es bisher. Erste Schritte in Richtung eines solchen Perspektivenwechsels zeigen sich allerdings für die Angiogenese (Emanuelli und Madeddu, 2002).

### 3. MATERIAL UND METHODIK

#### 3.1 VERSUCHSTIERE

Im Rahmen dieses Projektes wurde mit adulten, männlichen Ratten vom Stamm Sprague-Dawley gearbeitet. Die Tiere wurden im Alter von elf bis zwölf Wochen und einem Gewicht zwischen 300 und 324 Gramm aus der Zucht der Firma Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln, Deutschland, übernommen. Ein Gesundheitszeugnis bestätigte stets den spezifisch-pathogenfreien (SPF) Zustand der Ratten. Nach Ankunft wurden sie zunächst für mindestens eine Woche an die Tierhaltung des Center for Cardiovascular Research (CCR) der Charité Universitätsmedizin Berlin adaptiert.

##### 3.1.1 TIERHALTUNG

Die Ratten befanden sich über die gesamte Zeit in diesem SPF-Bereich. Die Haltung erfolgte nach der Richtlinie 86/609/EWG. Das Futter und die Einstreu wurden vor der Verbringung in den Tierhaltungsbereich autoklaviert. Es herrschte eine konstante Raumtemperatur von 22 Grad Celsius mit einer Luftfeuchtigkeit von 50 bis 70 Prozent. Die künstliche Beleuchtung war auf ein Lichtregime von zwölf Stunden Helligkeit und zwölf Stunden Dunkelheit eingestellt.

Die Tiere wurden als Gruppe mindestens zu zweit, maximal jedoch zu viert in folgender Grundausrüstung gehalten:

- ◆ Makrolonkäfig vom Typ IV; Bodenfläche ca. 1.800 cm<sup>2</sup>, Höhe ca. 20 cm  
*TECNIPLAST Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg (Deutschland)*
- ◆ Einstreu JRS Lignocel<sup>®</sup> FS 14 Hygienic Animal Bedding  
*J. Rettenmaier & Söhne GmbH + Co. KG, Rosenberg (Deutschland)*
- ◆ Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse „V1534-300“, ad libitum  
*sniff Spezialdiäten GmbH, Soest (Deutschland)*
- ◆ Trinkwasser, ad libitum
- ◆ Behausung
- ◆ Nagestange aus Holz
- ◆ Nestbaumaterial aus Zellstoff

### **3.1.2 TIERVERSUCHSGENEHMIGUNG**

Gemäß §8 des deutschen Tierschutzgesetzes wurde der Tierversuch behördlich von dem Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigt. Die Genehmigung wurde vor Versuchsbeginn am 11. August 2009 erteilt und wird unter dem Versuch Nummer G 0071/09 mit dem Kurztitel „RAS and Arteriogenesis“ geführt.

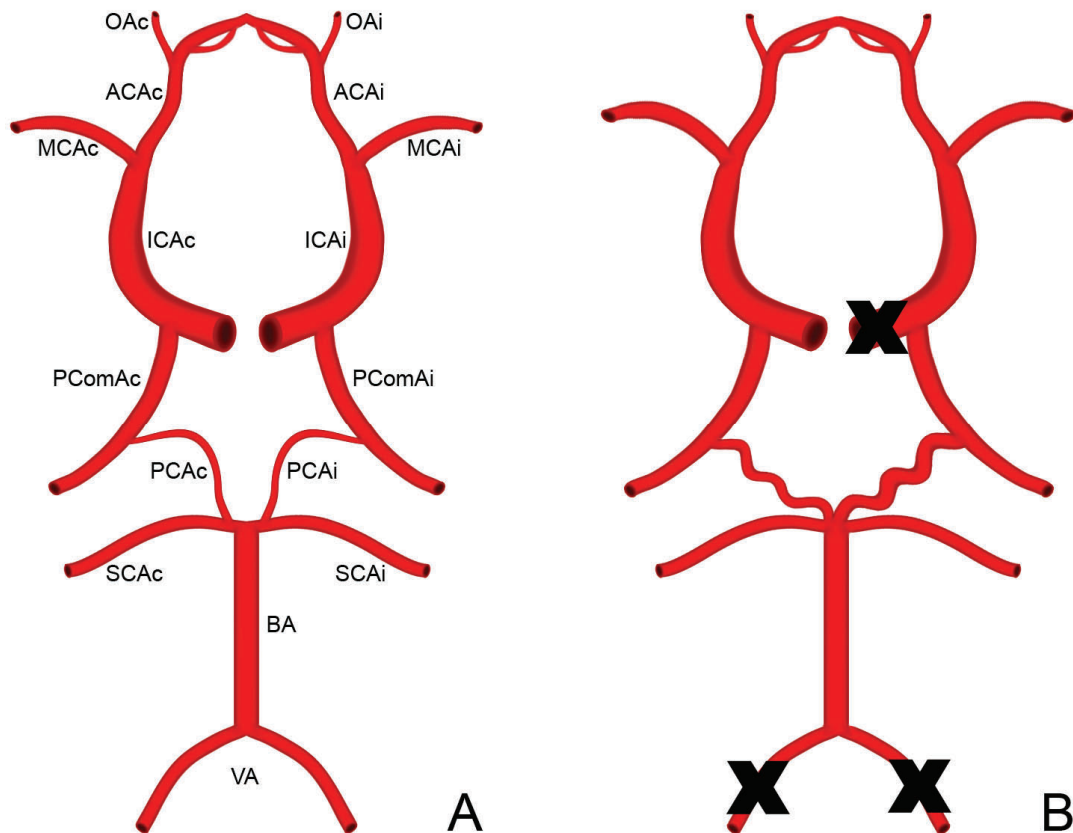
## **3.1 OPERATIONEN**

### **3.1.1 DREI-GEFÄß-VERSCHLUSS-MODELL**

Das Drei-Gefäß-Verschluss-Modell (Three Vessel Occlusion, 3-VO) wurde in der hier angewandten Form erstmals von Busch *et al.* beschrieben (Busch, Buschmann *et al.*, 2003; Hillmeister, Lehmann *et al.*, 2008). Es basiert methodisch auf der zuvor von Kawata *et al.* bei Ratten vom Wistar-Stamm etablierten 3-VO (Kawata, Sako *et al.*, 1996). Mit dieser Operation lässt sich eine nicht letale Hypoperfusion im Gehirn der Ratte erzeugen, welche mit der Durchblutungssituation vor einem Schlaganfallgeschehen vergleichbar ist, ohne dabei die typischen neurologischen Ausfallserscheinungen während eines Insultes zu verursachen. Es wird hierbei direkt das Kollateralgefäßsystem im Circulus arteriosus cerebri (Willisi) angesprochen, das als biologischer Bypass die zerebrale Blutversorgung sicherstellt. Der Zufluss in den Circulus Willisi erfolgt vorrangig über vier Gefäße, die beiden Aa. vertebrales (dextra et sinistra) sowie die linke und rechte A. carotis interna.

Bei einem operativen Verschluss dreier dieser vier Arterien wird der Zufluss aus dem verbliebenen Hauptgefäß über den präexistenten Kollateralring umgeleitet, sodass dieser verstärkt beansprucht wird. Dies führt zu einer Stimulation des Kollateralwachstums und ermöglicht neben einer gesicherten ausreichenden Blutversorgung die Wiedererlangung der zerebralen Autoregulation. Eine besonders auffällige Diameterzunahme ist an der kontralateralen und deutlicher noch an der ipsilateralen A. cerebri posterior zu erkennen. Als ipsilateral wird hierbei die Seite bezeichnet, auf der die A. carotis communis ligiert wurde. Im Gegensatz dazu werden die Gefäße auf der gegenüberliegenden Seite kontralateral genannt (siehe Abbildung 6).

Anhand dieser Induktion der Arteriogenese im Gehirn der Ratte lassen sich damit verbundene Signalwege und Umbauprozesse analysieren und pharmakologisch beeinflussen.



**Abbildung 6** Skizzierte Struktur des Circulus Willisi vor (A) und nach (B) Drei-Gefäß-Verschluss. Das Kreuz markiert den Verschluss des jeweiligen Gefäßes. i = ipsilateral, c = kontralateral, VA = Aa. vertebrales, BA = A. basilaris, SCA = A. cerebelli superior, PCA = A. cerebri posterior, PComA = A. communicans posterior, ICA = A. carotis interna, MCA = A. cerebri media, ACA = A. cerebri anterior, OA = A. ophthalmica.

### *Narkose und Analgesie*

Die Narkose der Ratte wurde mit einer Kombinationsanästhesie aus 50 mg/kg KG Ketamin und 4 mg/kg KG Xylazin als intraperitoneale Injektion eingeleitet. Ketamin diente sowohl als Narkotikum als auch als Analgetikum. Nach der Applikation wurde das Tier für 15 Minuten einzeln in einen abgedunkelten Käfig in ruhiger Umgebung gesetzt. Während der gesamten Operation wurde die Narkose mit Isofluran-Inhalation über eine Atemmaske aufrechterhalten (Gemisch aus 100 % Sauerstoff als Trägergas mit 1,5-2 Vol.-% Isofluran). Während der Vorbereitung wurde zusätzlich eine subkutane Lokalanästhesie mit einem Milliliter (5 mg/kg KG) Ropivacain gesetzt.

### *Vorbereitung*

Zunächst ist dem Tier zur Vorbeugung von Hornhautschäden eine Augensalbe aufgetragen worden. Anschließend wurde im Nacken des Tieres ein etwa drei mal vier Zentimeter großes Operationsfeld freigeschoren, mit alkoholischer Lösung gereinigt und mit Povidon-Iod-Lösung desinfiziert. Der Bereich der Inzisionsstellen wurde mit einem Milliliter Ropivacain diffus unterspritzt. Da haarlose Hautflächen bei Kontakt mit der Neutralelektrodenplatte während der späteren Koagulation geschädigt worden wären, wurden die Vorderpfoten mit Pflaster und das Präputium mit Tupfern und Pflaster geschützt.

### *Operation*

Waren diese Vorbereitungen getroffen, wurde die Ratte auf einer rückgekoppelten Heizplatte in Bauchlage verbracht. Für die spätere Messung des Blutflusses mittels Laser-Doppler-Flowmetrie ist die Haut in der Regio temporalis maximal fünf Millimeter inzisiert worden. Unter Vermeidung größerer Traumata wurde die darunter liegende Muskulatur stumpf gerade soweit eröffnet, dass der Schädelknochen sichtbar war, höchstens jedoch zwei Millimeter.

Anschließend wurde der Kopf des Tieres im stereotaktischen Gerät fixiert, um das präzise Arbeiten an den Vertebralarterien zu ermöglichen. Hierbei wurden in den Meatus acusticus externus Metallstäbe eingeführt, die sich am Gerät feststellen ließen. Dies ermöglichte eine sichere Positionierung des Kopfes.

Vom Os occipitale aus wurde medial die Haut in kaudaler Richtung etwa einen Zentimeter eröffnet. Die nun sichtbar gewordenen M. semispinalis capitis und M. longissimus capitis wurden median stumpf mit Hilfe von gebogenen, anatomischen Pinzetten getrennt. Zwischen diesen Muskelpartien wurde ein Wundspreizer so platziert, dass die Sicht auf die Mm. rectus capitis dorsales major et minor frei war. Durch den Einsatz glatter Mikroskopierpinzetten wurde diese dann beidseitig ebenfalls stumpf durchtrennt, um schließlich die Foramina alaria des Atlas frei zu präparieren. Es war dabei unbedingt auf die Schonung der Arteriae et Nervi vertebrales zu achten.

Eine monopolare Koagulationssonde (0,45 Millimeter Durchmesser) wurde anschließend in das linke Foramen alare eingeführt und die Arteria vertebralis sinister koaguliert, somit also dauerhaft verschlossen. Analog erfolgte diese Prozedur auf der rechten Seite. Nach einer



Blutungskontrolle wurde das stereotaktische Gerät gelöst und die Wunde genäht. Die Muskulatur, die Unterhaut und die Haut wurden separat verschlossen.

Die Ratte wurde nun auf den Rücken umgelagert und im Halsbereich geschoren, gereinigt und desinfiziert. An der linken Halsseite, etwa einen Zentimeter kranial lateral des palpierbaren Manubrium sterni, wurde die Haut einen halben bis einen Zentimeter inzidiert. Zwischen den Mm. sternocephalicus et sternohyoideus wurde stumpf in die Tiefe präpariert, bis die Arteria carotis communis sinistra sichtbar war. Sie wurde anschließend unter Schonung des Nervus laryngeus recurrens und des Truncus vagosympathicus frei präpariert und eine Ligatur wurde vorbereitet.

Die Sonde des Laser-Doppler-Flowmeters wurde an der bereits präparierten Schläfe mit direktem Kontakt zum Schädelknochen angesetzt. Der hierbei gemessene zerebrale Blutfluss wurde für die späteren Berechnungen aufgezeichnet. Zunächst wurde der Basisblutfluss bestimmt. Nach dem Verschluss der Ligatur an der Arteria carotis communis sinistra konnte anhand des dauerhaften Perfusionsabfalls von circa 50 % (mindestens jedoch 35 %) geprüft werden, ob die 3-VO gelungen war. Dafür wurde der Blutfluss nach der Ligatur noch für weitere zehn Minuten beobachtet.

Nach Abschluss der Messung wurden die Hautöffnungen an Hals und Schläfe der Ratte vernäht. Sämtliche Wunden wurden noch einmal mit einer Povidon-Iod-Lösung desinfiziert, bevor das Tier in eine mit Rotlicht bestrahlte Einzelbox gelegt wurde. Erst nach vollständigem Erwachen und bei Abwesenheit von Orientierungs- und motorischen Störungen wurde es zurück in den Gruppenkäfig gesetzt.

### **3.1.2 MESSUNG DER ZEREBROVASKULÄREN RESERVEKAPAZITÄT**

Um die Arteriogenese funktionell zu bestimmen, bedient man sich der physiologischen Prozesse während der zerebralen Autoregulation. Diese steuert protektiv die Aufrechterhaltung einer konstanten Blutversorgung während systemischer Blutdruckveränderungen durch Vasokonstriktion und -dilatation (Franco Folino, 2007). Die zerebrovaskuläre Reaktivität (cerebrovascular reactivity, CVR) gilt dabei als hämodynamischer Parameter, der eine Perfusionserhöhung nach vasodilatatorischen Reizen wie dem Anstieg des CO<sub>2</sub>-Partialdruckes (pCO<sub>2</sub>) und einer Blut-pH-Senkung vermittelt. Damit die zerebrovaskuläre Reaktivität quantifizierbar ist, wird die zerebrovaskuläre

Reservekapazität (cerebrovascular reserve capacity, CVRC) ermittelt. Sie stellt die Durchmessererweiterung nach einem vasodilatatorischen Stimulus gegenüber der Ausgangssituation prozentual dar.

Für diese Messung wird analog zur Blutflussbestimmung während der 3-VO die Laser-Doppler-Flowmetrie herangezogen. Die Applikation des Carboanhydrase-Hemmers Acetazolamid führt zu einem reduzierten Spiegel von Hydrogencarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ), wodurch gleichermaßen der  $\text{pCO}_2$  des Blutes ansteigt. Wird  $\text{CO}_2$  nicht vermehrt abgeatmet, bleibt eine erhöhte Menge an Protonen ( $\text{H}^+$ ) erhalten, folglich sinkt auch der pH-Wert des Blutes ab. Diese Änderungen führen im physiologischen Fall zu einer Weitstellung der Gefäße. Misst man die CVRC kurze Zeit nach einer 3-VO, so sind die Kollateralen bereits durch die Blutflussumleitung *in vivo* maximal dilatiert und reagieren nicht auf diesen Reiz. Eine Woche und markanter noch drei Wochen nach der 3-VO erholt sich die CVRC und ein Anstieg des zerebralen Blutflusses wird wieder möglich.

Anhand dieses funktionellen Mechanismus kann überprüft werden, inwieweit die pharmakologische Beeinflussung der arteriogenen Signalwege hemmende oder stimulierende Wirkung zeigt.

#### *Narkose und Analgesie*

Die Narkose der Ratte wurde mit einem Gemisch aus 30% Sauerstoff, 70% Distickstoffmonoxid und 4 Vol.-% Isofluran eingeleitet. Distickstoffmonoxid stellte hierbei die analgetische Komponente dar. Zur Inhalation des Gasgemisches wurde das Tier für etwa eine Minute in eine Narkosebox gesetzt. Daran anschließend erfolgte die Narkoseaufrechterhaltung mit 1,5 bis 2 Vol.-% Isofluran-Beimischung über die Narkosemaske. Das Tier lag zusätzlich während der gesamten Operation auf einer rückgekoppelten Heizplatte, um eine konstante Körpertemperatur zu wahren.

#### *Operation*

Zunächst wurde die linke Schläfe des Tieres gereinigt und desinfiziert. Es wurde wie bei der 3-VO eine kleine Öffnung in Haut- und Muskelgewebe präpariert, bis ein Berührungspunkt der Sonde des Laser-Doppler-Flowmeters direkt am Schädelknochen möglich war.

Nun wurde die Ratte in Rückenlage gebracht und die Hintergliedmaßen auf der Unterlage mit Pflaster fixiert. Der linke Schenkelspalt wurde gereinigt, desinfiziert und anschließend etwa zwei bis drei Zentimeter eröffnet. Unter Schonung oberflächlicher Gefäßstrukturen wurden Arteria und Vena femoralis freipräpariert und vorsichtig voneinander getrennt. Nacheinander wurden nun sowohl Arterie, als auch Vene zunächst distal ligiert, mit einer Mikroschere minimal eröffnet und mit einem Katheter nach proximal kanüliert. Proximal wurde eine Ligatur um das Gefäß mit dem Katheter gesetzt, um ein Herausgleiten dessen zu verhindern. Beide Katheter wurden zur Vermeidung von Koagula mit einer Heparin-Lösung (50 IE/ml Kochsalzlösung) gespült.

Mit Hilfe des arteriellen Katheters wurde sogleich eine erste Blutprobe entnommen und die arteriellen Blutgaswerte sowie der pH-Wert analysiert. Nach der Probenentnahme wurde der arterielle Katheter an das Blutdruckmessgerät angeschlossen und die Werte im Minutentakt protokolliert.

Die Sonde für die Laser-Doppler-Flowmetrie wurde an der präparierten Schläfe platziert und der zerebrale Blutfluss als Basis zwei bis drei Minuten gemessen und aufgezeichnet. Es folgte die zügige Applikation von 30 mg/kg KG Acetazolamid als Bolus über den venösen Katheter. Die Messung und Aufzeichnung wurde über eine Zeitspanne von acht Minuten fortgeführt. Im Anschluss wurde eine zweite arterielle Blutprobe entnommen und bezüglich der Blutgaswerte analysiert.

Für die spätere Histologie war es nötig, das Gehirn mit Formalin-Lösung zu konservieren. Die Narkose der Ratte wurde dafür mit 4 Vol.-% Isofluran vertieft, der Thorax eröffnet und das Atrium dextrum inzisiert, damit eine vaskuläre Druckentlastung ermöglicht wurde. Hierfür wurden ebenso die zuvor gelegten Katheter aus Arteria und Vena femoralis entfernt. Die Applikation von 20 Milliliter 4%iger Formalin-Lösung in die linke Herzkammer führte unmittelbar zum Tod des Tieres. Nach Dekapitation und Eröffnung der Schädelkalotte wurde das Gehirn herausgelöst und bis zur histologischen Aufbereitung in zehn Milliliter der 4%igen Formalin-Lösung aufbewahrt.

### 3.1.3 LATEXANGIOGRAPHIE

Gegenüber der funktionellen Bestimmung der Arteriogenese über die Messung der CVRC wird das Kollateralwachstum mit Hilfe der Latexangiographie auch morphologisch auswertbar. Hierbei wird das Gefäßsystem mit schwarz gefärbter Latexmilch perfundiert, wodurch die Gefäßdiameter des Circulus Willisii unter dem Mikroskop ausgemessen werden können.

#### *Narkose und Analgesie*

Die Narkose des Tieres erfolgte analog zu der CVRC-Bestimmung. Dabei befand sich die Ratte auch hier während der gesamten Operation auf einer rückgekoppelten Heizplatte.

#### *Operation*

Die Ratte wurde im Halsbereich gereinigt und desinfiziert. Etwa zwei Millimeter paramedian wurde die Haut der rechten Halsseite zwei Zentimeter eröffnet. Die Arteria carotis communis dextra wurde aufgesucht, schonend freipräpariert und vorgelagert. Sie wurde anschließend möglichst weit kaudal ligiert. Nach der Eröffnung des Gefäßes mit der Mikroschere wurde ein Katheter in kranialer Richtung in die Arterie eingeführt. Eine kraniale Ligatur um Gefäßwand und Katheter wurde nun gesetzt, um das Herausgleiten des Schlauches zu verhindern. Der Katheter wurde zur Vermeidung von Koagula mit einer geringen Menge Heparin-Lösung (50 IE/ml Kochsalzlösung) gespült.

Die Arteria carotis communis sinistra wurde aufgesucht und kranial der Ligatur aus der 3-VO-Operation durchtrennt. Damit wurde dem zerebrovaskulären System ein Durchfluss ermöglicht und verhindert, dass Gefäße durch zu hohen Druck rupturieren oder künstlich vergrößert werden. Aus diesem Grund war es ebenso nötig, nach einer Vertiefung der Narkose mit 4 Vol.-% Isofluran den Thorax zu eröffnen und das Atrium dextrum zu inzisieren.

Anschließend sind über den Katheter nacheinander zwei Milliliter Kochsalzlösung und ein Milliliter Papaverin (50 bis 65 mg/kg KG) appliziert worden. Die damit verbundene maximale Vasodilatation führte rasch zu einer für das Tier letalen Hypotonie. Der Katheter wurde an eine Perfusionspumpe, die mit einem konstanten Druck von 150 mmHg arbeitet,

angeschlossen. Das zerebrale Gefäßsystem wurde mit zwei Milliliter der auf 37° Celsius gewärmten, schwarz gefärbten Latexmilch perfundiert.

Um das Aushärten der Latexmilch zu ermöglichen, wurde der Tierkörper für circa 15 Minuten auf Eis gebettet. Anschließend folgten die Dekapitation und Schädelöffnung sowie die schonende Entnahme des Gehirns, welches bis zur kurz darauf folgenden Durchmessermessung in einer speziellen Schutzlösung für Gewebe (RNAlater<sup>®</sup>) aufbewahrt wurde. RNAlater<sup>®</sup> dient der stabilisierten Aufbewahrung von Ribonukleinsäuren (RNS), da RNasen sofort inaktiviert werden und die Lagerung für spätere molekularbiologische Untersuchungen möglich ist.

#### **3.1.4 IMPLANTATION DER ALZET<sup>®</sup> OSMOTISCHEN MINIPUMPEN**

Im zweiten Teilversuch dieser Arbeit wurde eine Tiergruppe sowohl mit einem ACE-Hemmer als auch mit Bradykininrezeptor-Blockern (BRB) behandelt. Letztere wurden subkutan appliziert. Auf Grund seiner höheren Empfindlichkeit wurde der BR<sub>1</sub>-Inhibitor des-Arg<sup>9</sup>,[Leu<sup>8</sup>]-Bradykinin über osmotische Minipumpen kontinuierlich abgegeben. Zu diesem Zweck wurden die zuvor befüllten Minipumpen direkt im Anschluss an die 3-VO-Operation nach Anleitung des Herstellers implantiert.

Zunächst wurde bei dieser Tiergruppe das Operationsfeld im Nacken bis zu den Schulterblättern erweitert, indem das Fell geschoren und die Haut gereinigt und desinfiziert wurde. Nach der erfolgreichen 3-VO wurde zwar die Muskulatur im Nacken, nicht aber die Haut mit einer Wundnaht verschlossen. So konnte sofort nach den erfolgreichen Gefäßverschlüssen die Minipumpe eingesetzt werden. Der kaudale Wundwinkel der Hautöffnung wurde mit einer Pinzette angehoben und dabei eine zweite in kaudaler Richtung unter der Haut vorgeschoben. Durch vorsichtiges Öffnen und Schließen der Pinzette wurde eine Hauttasche zwischen den Scapulae präpariert. Mit der Pinzette wurde diese Hauttasche offen gehalten, während die Minipumpe eingeführt wurde. Eine Unterhautheft am kranialen Taschenrand half, ein Verrutschen der Pumpe zu verhindern. Abschließend wurden jeweils die Unterhaut und die Haut mit Einzelheften verschlossen.

## **3.2 VERSUCHSSTRUKTUR UND BEHANDLUNGSSCHEMA**

### **3.2.1 VERSUCHSGRUPPEN**

Das Projekt wurde in zwei Teilversuche gegliedert: Im ersten wurde der Fokus auf die Angiotensin-Rezeptoren gelegt, im zweiten auf das ACE und die Bradykinin-Rezeptoren (BR).

In der Annahme, dass eine Blockade des AT<sub>1</sub>R bzw. eine Stimulierung des AT<sub>2</sub>R zu einer Einschränkung der Arteriogenese führt, wurde ein Versuchszeitraum von 21 Tagen gewählt, da dies den Zeitraum für den Remodeling-Prozess der Kollateralen abdeckt. Demgegenüber wurde von einer ACE-Hemmung ein verbessertes Kollateralwachstum erwartet. Proarteriogene Effekte lassen sich bereits nach einer Woche bewerten, weshalb der Zeitraum im zweiten Teilversuch auf sieben Tage verkürzt wurde. Dies folgt dem Konzept der 3R (Replacement, Reduction, Refinement / Ersatz, Reduktion, Verbesserung) des Tierschutzes.

Eine Gesamtzahl von 150 Ratten wurde randomisiert in Zehnergruppen den unter Punkt 3.2.2 aufgeführten Behandlungen unterzogen (Vgl. hierzu Tabelle 1 unter Punkt 3.2.2).

### **3.2.2 MEDIKAMENTÖSE BEHANDLUNG**

Im Folgenden sind die Behandlungen der verschiedenen Tiergruppen aufgeführt.

#### 3.2.2.1 Keine Behandlung

*Unbehandelte, nicht operierte Tiere [„unbehandelt“]*

Die Messung der zerebrovaskulären Reservekapazität (CVRC) sowie die Latexangiographie fanden ohne vorherigen Drei-Gefäß-Verschluss und ohne vorherige Behandlung statt.

*Unbehandelte, operierte Tiere, 24 Stunden [„unbehandelt (24h)“]*

Einen Tag nach der 3-VO-Operation wurde bei unbehandelten Ratten die CVRC als funktionelle Kontrolle gegenüber den unbehandelten, nicht operierten Tieren bestimmt. Auf eine Latexangiographie wurde verzichtet, da der Zeitraum von 24 Stunden für eine relevante Diameteränderung des Gefäßes zu kurz ist.

### 3.2.2.2 Teilversuch I – Renin-Angiotensin-System

Im ersten Teilversuch erfolgte die Behandlung der Tiere über 21 Tage. An „Tag 0“ fanden die erste Behandlung und die 3-VO-Operation statt. Am 21. Tag wurde eine CVRC-Messung oder Latexangiographie durchgeführt.

*Kontrolle, 21 Tage [„Kontrolle (21d)“]*

Jedes Tier erhielt einmal täglich 0,5 ml einer 0,5%igen Methylcellulose-Lösung per os.

*AT<sub>1</sub>R-Antagonist [„AT<sub>1</sub>R-Antagonist“]*

Jedes Tier erhielt einmal täglich 2 mg/kg Körpergewicht (KG) Candesartan-Cilexetil gelöst in 0,5 ml 0,5%iger Methylcellulose-Lösung per os.

*AT<sub>2</sub>R-Agonist [„AT<sub>2</sub>R-Agonist“]*

Jedes Tier erhielt einmal täglich 0,3 mg/kg KG Compound 21, nach Vorlösung in Aqua ad injectabilia und Auffüllung mit 0,5%iger Methylcellulose-Lösung. Die Applikation von 0,5 ml erfolgte ebenfalls per os.

### 3.2.2.3 Teilversuch II – Kallikrein-Kinin-System

Im zweiten Teilversuch erfolgte die Behandlung der Tiere über sieben Tage. An „Tag 0“ fanden analog zum Teilversuch I die erste Behandlung und die 3-VO-Operation statt. Am siebenten Tag wurden CVRC-Messung bzw. Latexangiographie durchgeführt.

*Kontrolle, 7 Tage [„Kontrolle (7d)“]*

Jedem Kontrolltier wurde einmal täglich 0,5 ml Trinkwasser per os appliziert.

*ACE-Hemmer [„ACE-Hemmer“]*

Jedes Tier erhielt einmal täglich oral 0,2 mg/kg KG Ramipril, gelöst in 0,5 ml Trinkwasser.

*ACE-Hemmer und Bradykininrezeptor-Blocker [„ACE-Hemmer & BRB“]*

Den Tieren wurde einmal täglich 0,2 mg/kg KG Ramipril per os verabreicht. Die am „Tag 0“ subkutan implantierten osmotischen Minipumpen sorgten für eine kontinuierliche Abgabe von täglich 50 nmol/kg KG des Bradykininrezeptor 1-Inhibitors des-Arg<sup>9</sup>,[Leu<sup>8</sup>]-Bradykinin. Icatibant als Bradykininrezeptor 2-Inhibitor wurde einmal täglich in einer Dosis von 0,5 mg/kg KG subkutan appliziert.

Gruppe (Zeit nach 3-VO-Operation)	Tierzahl CVRC-Messung	Tierzahl Latexangiographie	Tierzahl Gesamt
Unbehandelt, nicht operiert	10	10	
Unbehandelt (24 Stunden)	10		
Kontrolle (21 Tage)	10	10	
Kontrolle (7 Tage)	10	10	
AT <sub>1</sub> R-Antagonist (21 Tage)	10	10	
AT <sub>2</sub> R-Agonist (21 Tage)	10	10	
ACE-Hemmer (7 Tage)	10	10	
ACE-Hemmer & BRB (7 Tage)	10	10	
Gesamt			150

**Tabelle 1** Übersicht der Tiergruppen und ihrer Größen. CVRC = zerebrovaskuläre Reservekapazität, 3-VO = Drei-Gefäß-Verschluss, BRB = Bradykininrezeptor-Blocker.



### 3.2.3 ZEITLICHER ÜBERBLICK

Im Folgenden soll Tabelle 2 einen Überblick zu den Zeitpunkten der Initial- sowie Auswertungsoperation und der Behandlungsdauer der jeweiligen Versuchsgruppe geben.

	Tag 0	Tag 1	Tag 7	Tag 21
unbehandelt	CVRC-Messung / Angiographie			
unbehandelt (24h)	3-VO	CVRC-Messung / Angiographie		
Kontrolle (21d)	3-VO			CVRC-Messung / Angiographie
AT <sub>1</sub> R-Antagonist				
AT <sub>2</sub> R-Agonist				
Kontrolle (7d)	3-VO		CVRC-Messung / Angiographie	
ACE-Hemmer				
ACE-Hemmer & BRB				

**Tabelle 2** Zeitliche Übersicht des Versuchs. CVRC = zerebrovaskuläre Reservekapazität, 3-VO = Drei-Gefäß-Verschluss.

### 3.2.4 DOSISBESTIMMUNG

Bei den für die Humanmedizin zugelassenen Medikamenten ARB Candesartan-Cilexetil und ACE-Hemmer Ramipril wurden die jeweiligen Dosierungen für einen ausgewachsenen Menschen unter Berücksichtigung des metabolischen Körpergewichtes auf die Ratte umgerechnet.

### 3.3 AUSWERTUNGSVERFAHREN

#### 3.3.1 FUNKTIONELLE AUSWERTUNG NACH BLUTFLUSSMESSUNG

Die Laser-Doppler-Flowmetrie wurde eingesetzt, um den zerebralen Blutfluss zu bestimmen. Die Lasersonde sendet Licht einer bestimmten Wellenlänge in das Gewebe, welches dieses in unterschiedlichem Maße absorbiert. Das reflektierte Licht wird erfasst und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Im Gegensatz zu festem Gewebe, ändert sich die Wellenlänge, wenn der Laserstrahl auf sich bewegende Zellen wie denen des Blutes trifft. Höhe und Häufigkeit dieser Änderungen lassen direkte Schlüsse auf die Anzahl und Geschwindigkeit der Blutzellen zu (Fredriksson, Fors *et al.*, 2007). Die Messwerte werden in Perfusionseinheiten (perfusion unit, PU) ausgegeben. Es wurde ein Transmissionsgrad ( $\tau$ ) von 0,02 eingestellt.

Parallel zu der Aufnahme wurden mit Hilfe der Software PSW 2 sämtliche Daten in Echtzeit graphisch dargestellt und aufgezeichnet, um sie nach der beendeten Operation auszuwerten.

Zunächst mussten sowohl während der 3-VO-Operation als auch bei der CVRC-Messung Basiskurven bestimmt werden, bevor der dritte Gefäßverschluss resp. die Acetazolamid-Applikation erfolgten. Für die Berechnung der Mittelwerte der Perfusionseinheiten wurden standardisierte Zeitpunkte festgelegt. Für die 3-VO galt, vier 30-sekündige Zeitspannen zu erfassen, unmittelbar vor und nach der Okklusion der A. carotis communis sowie noch einmal fünf und zehn Minuten danach. Bezüglich der CVRC-Messung wurden 30 Sekunden vor der Azetazolamid-Injektion bestimmt sowie der Zeitraum ab der ersten bis zur achten Minute.

Die Basiskurven wurden während der rechnerischen Auswertung als 100 % des Ausgangsblutflusses gewertet. Auf diese Weise konnten die prozentualen Unterschiede der gemittelten Perfusionseinheiten gegenüber den Basiswerten errechnet werden. Die Ergebnisse wurden dementsprechend relativiert, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen.

#### 3.3.2 MORPHOLOGISCHE AUSWERTUNG NACH LATEXANGIOGRAPHIE

Im Anschluss an die Latexperfusion wurden die Gehirne mit Hilfe eines Stereomikroskops mit integriertem Objektmikrometer ausgemessen. Um die Gefäße mit einem höheren Kontrast vom umliegenden Gewebe abzugrenzen, wurde Latex zuvor mit schwarzer Tinte eingefärbt.

Im Circulus Willisi der Ratte wurden sowohl ipsi- als auch kontralateral die Arteriae cerebri posteriores, Aa. communicantes posteriores, Aa. carotides internae, Aa. cerebri mediae und die Aa. cerebrales anteriores ausgemessen. An jedem Gefäß wurden an vier verschiedenen festgelegten Punkten die Diameter bestimmt. Aus diesen vier Werten wurde anschließend ein Mittelwert gebildet.

Auf Grund der zuverlässigen Umbauvorgänge an den beiden A. cerebri posterior werden diese bei 3-VO-Studien grundsätzlich ausgewertet, um projektübergreifende Vergleiche zu ermöglichen. Basierend auf der veränderten Strömungsphysiologie nach der 3-VO-Operation sind Wachstumsprozesse an der ipsilateralen A. cerebri posterior markanter als auf der kontralateralen Seite (Busch, Buschmann *et al.*, 2003; Gatzke, 2011). Dieser Effekt konnte jedoch nicht in allen 3-VO-Studien beobachtet werden (Dülsner, 2009).

Zudem ist es möglich, dass sich ähnlich ausgeprägte Diameteränderungen auch an den Aa. cerebri anteriores darstellen. Diese sind allerdings sehr variabel, weshalb von einer Auswertung mangels Vergleichbarkeit abgesehen wird (Busch, Buschmann *et al.*, 2003).

### **3.3.3 HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG**

Anhand der histologischen Darstellung der Arteria cerebri posterior konnte der Gefäßwandaufbau genau dargestellt und ausgewertet werden. Methodisch kamen dabei die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung zur Schnittübersicht sowie immunhistochemische Markierungen zur Anwendung. Die histologische Untersuchung erfolgte ergebnisorientiert nur für die Tiergruppen, welche während der funktionellen und morphologischen Auswertung bereits eine verbesserte CVRC resp. einen Diameterzuwachs der A. cerebri posterior zeigten. Es wurden demzufolge die Gehirne von je drei zufällig ausgewählten Tieren, die mit dem ACE-Hemmer behandelt wurden sowie der Gruppe, die ACE-Hemmer und Bradykininrezeptor-Blockern appliziert bekamen, für die Histologie genutzt. Zum Vergleich wurden analog drei Tiere aus der Kontrollgruppe (sieben Tage) ausgewählt.

#### *Gewebevorbereitung*

Nach der CVRC-Messung (siehe Punkt 3.3.1) wurde das Gefäßsystem mit einer 4%igen Formalin-Lösung perfundiert und das Gehirn der Ratte so fixiert. Durch die Entnahme des Gehirns und dessen Aufbewahrung in zehn Milliliter für 48 Stunden bei 4° Celsius fand eine

Nachfixierung statt. Anschließend wurde die präparierte Region des Gehirns im Bereich der A. cerebri posterior in einer beschrifteten Einbettkassette geschützt und durchlief dann eine aufsteigende Alkoholreihe (70 % und 96 % sowie dreimal 100 % Ethanol für je eine Stunde), welche der Entwässerung des Gewebes diente. Nachdem es für 30 Minuten in Aceton lag, wurde das Gewebe zweimal ebenfalls für eine halbe Stunde in flüssiges, 60° Celsius heißes Paraffin Typ 9 verbracht. In einem dritten Paraffinbad verblieb es schließlich über Nacht.

Am nächsten Tag erfolgte das Ausgießen des Paraffinblockes an einer Ausgießstation. Das Gewebestück wurde so positioniert, dass beim späteren Anschneiden ein Sagittalschnitt in Höhe der ipsilateralen Region der A. cerebri posterior erfolgen konnte.

#### *Herstellung der Gewebeschnitte*

Das Schneiden dieser Blöcke in fünf Mikrometer dünne Schnitte erfolgte manuell an einem Rotationsmikrotom. Es wurden für die Schnitte Adhäsionsobjektträger verwendet, die auf Grund einer oberflächlichen, positiven Ladung im Gegensatz zu Standardobjektträgern deutlich bessere Haftungseigenschaften für das Gewebe aufweisen. Fünf Gewebeschnitte wurden auf einen Adhäsionsobjektträger gezogen und auf diese Weise 30 Objektträger (OT) je Tier angefertigt. Zum Trocknen und Anbacken der Schnitte an den OT wurden diese über Nacht im Wärmeschrank bei 60° Celsius aufbewahrt.

#### *Übersichtsfärbung mit der Hämatoxylin-Eosin-Methode*

Um die A. cerebri posterior und gegebenenfalls die A. communicans posterior besser im Schnitt lokalisieren zu können, wurde aus jeder Schnittreihe ein OT mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Dies erleichterte das Auffinden der A. cerebri posterior während der immunhistochemischen Auswertung. Die Schnitte wurden zunächst zweimal für jeweils fünf Minuten in Xylol und anschließend für je 15 Sekunden in 100 %, 95 %, 80 % und 70 % Ethanol gebadet. Nach dem Waschen (15 Sekunden) in destilliertem Wasser, wurden die Schnitte 30 Sekunden mit Mayers Hämalaun-Lösung gefärbt und anschließend mit Leitungs- und destilliertem Wasser gewaschen (je 15 Sekunden). Danach erfolgte ein Tauchen (zehn Sekunden) in Eosin G-Lösung 0,5 %. Die Objektträger wurden dann je 15 Sekunden in 70 %, 80 %, 95 % und zweimalig in 100 % Ethanol gebadet. Nach einem abschließenden Bad in Xylol für eine Minute wurden die Schnitte mit Entellan als Eindeckmedium und Deckgläsern eingedeckt.

*Immunhistochemie*

Die Umbauprozesse während der Arteriogenese sind deutlich von proliferativen Gefäßwandänderungen begleitet. Als Resultat ist neben der morphologisch sichtbaren Diametervergrößerung eine Verstärkung der vaskulären Muskelzellschicht erkennbar. Im histologischen Querschnitt einer Kollateralarterie kann mit Hilfe des monoklonalen Anti-Actin,  $\alpha$ -Smooth Muscle-Antikörpers, der direkt mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) kombiniert ist, spezifisch die  $\alpha$ -Isoform des Aktins der glatten Gefäßmuskelschichten markiert werden (Skalli, Ropraz *et al.*, 1986). Die Anzahl der Muskelschichten kann so ausgezählt und bewertet werden.

Im aktiven Umbauprozess sind zudem proliferierende Zellkerne in der Tunica intima und media sowie perivaskulär vertreten, die man ebenfalls spezifisch markieren und auswerten kann. Der hierfür verwendete monoklonale Mouse Anti-Rat Ki-67-Antikörper richtet sich gegen das in Zellkernen von Ratten während der aktiven Zellzyklusphase exprimierte Ki-67-Antigen (Scholzen und Gerdes, 2000). Als Positivkontrolle der Ki-67-Markierung wurden parallel intestinale Gewebeschnitte der Ratte in dem Protokoll verwendet (Muskhelishvili, Latendresse *et al.*, 2003). Der Antikörper wurde schließlich mit einem Cy3-konjugierten, sekundären Antikörper markiert.

Dieser Zweifach-Immunhistochemie folgte zudem eine reine Kernfärbung mit dem Hoechst 33342-Reagenz. Eine Übersicht der verwendeten Substanzen ist in Tabelle 3 gegeben.

Substanz	bindende Struktur	Farbe
Ziegenserum / Goat serum	Blocken unspezifischer Bindungsstellen	/
Monoclonal Mouse Anti-Rat Ki-67 Antigen, Clone MIB-5	proliferierende Zellen	/
Cy <sup>TM</sup> <sub>3</sub> -conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG	Sekundärantikörper zu Mouse Anti-Rat Ki-67	orange bis hellrot
Monoclonal Anti-Actin, $\alpha$ -Smooth Muscle - FITC antibody	glatte Gefäßmuskelzellen	hellgrün
Hoechst 33342	DNS	blau bis cyan

**Tabelle 3** Übersicht und Details zu den einzelnen Substanzen. DNS = Desoxyribonukleinsäure, FITC = Fluoresceinisothiocyanat, IgG = Immunglobulin G.

Es wurden insgesamt drei Objektträger pro Tier ausgewählt. Jeweils einer vom Beginn, der Mitte und dem Ende der Schnittreihe. Zusätzlich wurde ein Schnitt Darmgewebe einbezogen. Die ausgewählten OT mussten zunächst entparaffiniert und rehydriert werden. Hierzu wurden sie dreimal in Xylol (je zehn Minuten), danach für drei Minuten in 100 %, 95 %, 80 % und 70 % Ethanol gebadet. Es folgten Waschungen in destilliertem Wasser, Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, PBS) und erneut destilliertem Wasser, jeweils mindestens für eine Minute.

Da das Gewebe formalinfixiert war, benötigte es vor der Markierung eine Vorbehandlung. Formalin führt zu einer Vernetzung von Proteinen, wodurch es zu einer Maskierung von Antigenen kommt. Als sogenannte Antigenmaskierung wurde hier nach der Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte das Kochen in Zitratpuffer (pH 6,0) mit 0,05 % Tween<sup>®</sup> 20 als Detergens gewählt. Das Kochen erfolgte in einer Mikrowelle, zunächst fünf Minuten bei 360 Watt (Vorheizen) und danach 15 Minuten bei 600 Watt. Waren die Schnitte anschließend ausreichend abgekühlt, wurden sie in PBS (drei Minuten) sowie 0,5%igem Tween<sup>®</sup> 20 (dreimal 15 Minuten) gewaschen. Die Schnitte mussten nun mit einem Fettstift umrandet werden, damit die aufgetragenen Lösungen nicht abfließen konnten.

Nun erfolgte das Blocken mit Ziegen Serum (Goat Serum), welches 1:20 in PBSA [PBS mit bovinem Serumalbumin (BSA)] verdünnt wurde. Dieser Schritt diente der Blockade unspezifischer Bindungsstellen. Die Inkubation des Serums fand in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 30 Minuten statt. Die jeweils auf eine Inkubation folgenden Waschschritte waren nötig, um ungebundene Antikörper zu entfernen. So erfolgte hier ein Waschen in PBS (zwei Minuten), danach wurden die Schnitte mit dem Antikörper gegen das Rat Ki-67-Antigen (Monoclonal Mouse Anti-Rat Ki-67 Antigen, 1:50 in PBSA 2 %) für zwei Stunden in der feuchten Kammer inkubiert. Die Objektträger wurden ebenfalls mit PBS (zweimal drei Minuten) gewaschen, bevor die Markierung mit dem Sekundärantikörper Cy<sup>TM</sup>3-konjugiertes Immunglobulin G (Cy<sup>TM</sup>3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, 1:100 in PBSA 2 %) folgte. Auch hiernach wurde mit PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit dem Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-gelabelten Anti-Actin,  $\alpha$ -Smooth Muscle-Antikörper (Monoclonal Anti-Actin,  $\alpha$ -Smooth Muscle - FITC antibody, 1:100 in PBS) in der feuchten Kammer. Nach Waschschritten mit PBS (zweimal drei Minuten), PBS mit 0,1 % Tween<sup>®</sup> 20 (drei Minuten) und erneut PBS (drei Minuten) wurde die Kernfärbung mittels Hoechst 33342-Reagenz durchgeführt (eine Minute), welches wieder

mit PBS (zweimal drei Minuten) und destilliertem Wasser (eine Minute) von den Schnitten gewaschen wurde. Mit Hilfe des Eindeckmediums Fluoromount-G und Deckgläsern wurden die Schnitte abschließend eingedeckt.

#### *Auszählung der Zellschichten und proliferierenden Kerne*

Die angefertigten Schnitte wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops betrachtet. Die Auswertung wurde geblindet durchgeführt, das heißt zum Zeitpunkt der Untersuchung war unbekannt, von welchem Tier der Schnitt stammte. Unter blauem Fluoreszenzlicht und mit 40-facher Vergrößerung wurden die Schichten der mit Anti-Actin,  $\alpha$ -Smooth Muscle-markierten, glatten Gefäßmuskelzellen der A. cerebri posterior ausgezählt (hellgrün leuchtend). Mit grünem Fluoreszenzlicht konnten die hellroten, mit Mouse Anti-Rat Ki-67 markierten, proliferierenden Kerne lokalisiert werden. Diese wurden unter Betrachtung ihrer Lage (Tunica intima, Tunica media oder perivaskulär) gezählt und protokolliert. Um sicher zu gehen, dass es sich tatsächlich um hellrot angefärbte Kerne handelte, konnte dies anhand der Kernfärbung mit Hoechst 33342-Reagenz unter rotem Licht gegengeprüft werden, wodurch sie blau dargestellt waren. Von jedem Objektträger wurde ein Mittelwert der Auszählungsergebnisse unter Berücksichtigung der Anzahl der darauf befindlichen Schnitte gebildet.

Für die fotografische Dokumentation der immunhistochemisch markierten Schnitte wurden die Aufnahmen der drei Farbspektren digital übereinander gelagert, sodass alle drei in einer Abbildung sichtbar und die proliferierenden Kerne durch die Farbmischung in einem pinken Ton dargestellt wurden.

#### **3.3.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG**

Die statistische Auswertung aller Daten erfolgte mit dem Programm IBM<sup>®</sup> SPSS<sup>®</sup> Statistics (Version 20.0; IBM Corporation, Armonk/New York, Vereinigte Staaten).

Zwischen den Gruppen wurden die statistischen Unterschiede der Werte über eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA, analysis of variance) als Gruppentest berechnet. Als Post-Hoc-Test wurde der LSD (least significant difference, kleinster signifikanter Unterschied) genutzt. Dieser Signifikanztest wird zwar als liberal kategorisiert, eignet sich allerdings gut bei ungleichen Gruppengrößen (Jones, 2002). Da der Alpha-Fehler bei dem

LSD nicht korrigiert wird, wurden die Signifikanzniveaus ( $p$ ), die für den LSD-Test auf  $p = 0,05$  angesetzt waren, zusätzlich unter Nutzung der false discovery rate (FDR)-Prozedur korrigiert (nominaler  $p$ -Wert) (Benjamini und Hochberg, 1995). Die ermittelten nominalen  $p$ -Werte wurden in den jeweiligen Ergebnissen aufgeführt. Aus Gründen der Vergleichbarkeit mit vorangegangenen Studien, bei denen ebenfalls mit dem Drei-Gefäß-Verschluss-Modell gearbeitet wurde, wurde diese Auswertungsmethode übernommen (Dülsner, 2009; Glaser, 2010; Gatzke, 2011; Dülsner, Gatzke *et al.*, 2012b).

Bei der Bestimmung des zerebralen Blutflusses wurden die Mittelwerte der Blutflussänderung zu den zuvor ermittelten Basiskurven in Relation gesetzt und als Prozentwerte angegeben. Alle Daten wurden als Mittelwerte (Mean)  $\pm$  Standardabweichung (Standard Deviation, SD) angegeben, wohingegen die Werte in den Balken- und Liniendiagrammen als Mittelwerte (Mean)  $\pm$  Standardfehler (Standard Error of Mean, SEM) dargestellt wurden.



### 3.4 GERÄTE, INSTRUMENTE UND REAGENZIEN

Für den Versuch waren die im Folgenden aufgeführten Materialien und Geräte in Gebrauch.

#### 3.4.1 GERÄTE

- ◆ Ausgießstation EC 350 mit Kühlplatte  
*MICROM International, Walldorf (Deutschland)*
- ◆ Blutdruckmessgerät  
*medres – medical research GmbH, Köln (Deutschland)*
- ◆ Blutgasanalysegerät Radiometer ABL555  
*Radiometer Medical ApS, Brønshøj (Dänemark)*
- ◆ Dekapitator  
*FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim/Ober-Beerbach (Deutschland)*
- ◆ Digitalkamera PowerShot S70  
*Canon Deutschland GmbH, Krefeld (Deutschland)*
- ◆ Einbettmaschine Shandon Citadel 1000  
*Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts (Vereinigte Staaten)*
- ◆ Elektrokoagulator ICC 50  
*Erbe Elektromedizin, Tübingen (Deutschland)*
- ◆ Fluoreszenzmikroskop Leica DMR HC  
*Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (Deutschland)*
- ◆ Haarschneider Philips QC 5000/00  
*Philips Deutschland GmbH, Hamburg (Deutschland)*
- ◆ Isofluran-Verdampfer Vapor 2000  
*Dräger Medical AG & Co. KG, Lübeck (Deutschland)*
- ◆ Laser-Doppler-Perfusionsmesser PeriFlux System 5000  
*Perimed AG, Järfälla (Schweden)*
- ◆ Magnetrührer mit Heizung RCT basic  
*IKA<sup>®</sup>-Werke GmbH & Co. KG, Staufen (Deutschland)*
- ◆ Narkosebox  
*Zitt-Thoma GmbH, Freiburg (Deutschland)*

- ◆ Notebook Samsung X20  
*Samsung Electronics GmbH, Schwalbach/Ts. (Deutschland)*
- ◆ Objektmikrometer für Mikroskop  
*Leica Microsystems Ltd., Heerbrugg (Schweiz)*
- ◆ Operationsmikroskop OPMI 1FC und Bodenstativ S21  
*Carl Zeiss AG, Göttingen (Deutschland)*
- ◆ Präzisionswaage LP6200S  
*Sartorius AG, Göttingen (Deutschland)*
- ◆ Rotationsmikrotom HM 325  
*MICROM International, Walldorf (Deutschland)*
- ◆ Rotlichtlampe Philips Infrared R95E  
*Philips Deutschland GmbH, Hamburg (Deutschland)*
- ◆ Spritzenpumpe Perfusor segura  
*B. Braun AG, Melsungen (Deutschland)*
- ◆ Stereomikroskop MZ6 mit Kaltlichtquelle KL1500 LCD  
*Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (Deutschland)*
- ◆ Stereotaxiegerät für Ratten  
*FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim/Ober Beerbach (Deutschland)*
- ◆ Wärmeplatte  
*Haustechnik, Charité Universitätsmedizin, Berlin (Deutschland)*

#### **3.4.2 CHIRURGISCHES INSTRUMENTARIUM**

- ◆ Chirurgische Schere (gerade spitz/stumpf), Knochenschere, Metzenbaumscheren (gerade und gebogen), Mikro-Federschere nach VANNAS, chirurgische und anatomische Pinzetten, Mikroskopierpinzetten (gerade und abgewinkelt), Splitterpinzetten (gerade und gebogen), Mikro-Pinzetten (gerade), Nadelhalter nach MATHIEU, Arterienklemme (gebogen), Wundspreizer nach LOGAN (GOLDSTEIN), Klein-Set-Container  
*Aesculap AG, Tuttlingen (Deutschland)*

#### **3.4.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN**

- ◆ Alzet<sup>®</sup> Osmotische Minipumpen  
*DURECT Corporation, Cupertino/Kalifornien (Vereinigte Staaten)*

- ◆ Dako Pen  
*Dako Denmark, Glostrup (Dänemark)*
- ◆ Deckgläser, 24x60 mm  
*Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (Deutschland)*
- ◆ Einbettkassetten Turboflow-II  
*McCormick<sup>TM</sup> Scientific, Richmond/Illinois (Vereinigte Staaten)*
- ◆ Einbettschälchen aus Edelstahl  
*MEDITE GmbH, Burgdorf (Deutschland)*
- ◆ Einmalspritzen BD Plastipak<sup>TM</sup> (1 ml)  
*Becton Dickinson GmbH, Heidelberg (Deutschland)*
- ◆ Einmalspritzen BD Discardit<sup>TM</sup> II (2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)  
*Becton Dickinson GmbH, Heidelberg (Deutschland)*
- ◆ Fixierpflaster Leukoplast<sup>®</sup>  
*BSN medical GmbH&Co. KG, Hamburg (Deutschland)*
- ◆ Kanülen BD Microlance<sup>TM</sup> 3, 23 G x 1“; 0,6 mm x 25 mm  
*Becton Dickinson GmbH, Heidelberg (Deutschland)*
- ◆ Kanülen BD Microlance<sup>TM</sup> 3, 30 G x ½“; 0,3 mm x 13 mm  
*Becton Dickinson GmbH, Heidelberg (Deutschland)*
- ◆ Krankenunterlagen Kolibri<sup>®</sup> extra  
*Kolibri GmbH, Bad Gottleuba (Deutschland)*
- ◆ Nahtmaterial Ethicon Ethibond<sup>®</sup> Excel, nicht resorbierbar, synthetisch, geflochten, beschichtet, 4/0 USP, 1,5 metric, 75 cm  
*Johnson & Johnson MEDICAL GmbH, Norderstedt (Deutschland)*
- ◆ Nahtmaterial Ethicon Perma-Hand<sup>®</sup> Seide, nicht resorbierbar, geflochten, 4/0 USP, 1,5 metric, 45 cm  
*Johnson & Johnson MEDICAL GmbH, Norderstedt (Deutschland)*
- ◆ Objektträger, SuperFrost<sup>®</sup> Plus  
*Thermo Scientific / Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig (Deutschland)*
- ◆ Original-Perfusor<sup>®</sup>-Spritze OPS 50 ml Luer Lock  
*B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)*
- ◆ Polyethylen-Schlauch, kleinflumig, 0,58 mm ID / 0,96 mm OD  
*Smiths Medical International Ltd., Ashford (Vereinigtes Königreich)*

- ◆ Reaktionsgefäße, Safe-Lock, 1,5 ml und 2 ml  
*Eppendorf AG, Hamburg (Deutschland)*
- ◆ Röhrchen BD Falcon Tubes, konisch, 15 und 50 ml  
*Becton Dickinson GmbH, Heidelberg (Deutschland)*
- ◆ Skalpellklingen, No. 10  
*Schreiber<sup>®</sup> Instrumente, Schreiber GmbH, Fridingen/Donau (Deutschland)*
- ◆ Tupfer, Zellstoff 4x5 cm  
*Beese Medical, Karl Beese GmbH & Co. KG, Barsbüttel (Deutschland)*
- ◆ Wattestäbchen  
*Rauscher & Co. Verbandstoff- und Wattefabrik Löbnitztal GmbH & Co. KG, Oederan (Deutschland)*

#### 3.4.4 PHARMAKA

- ◆ Ampuwa<sup>®</sup> (Aqua ad injectabilia - Wasser für Injektionszwecke)  
*Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg (Deutschland)*
- ◆ Atacand<sup>®</sup> 16mg (Wirkstoff: Candesartancilexetil)  
*AstraZeneca GmbH, Wedel (Deutschland)*
- ◆ Bepanthen<sup>®</sup> Augen- und Nasensalbe (Wirkstoff: Dexpanthenol)  
*Bayer Vital GmbH, Leverkusen (Deutschland)*
- ◆ Diamox<sup>®</sup> Parenteral Trockensubstanz (Wirkstoff: Azetazolamid-Natrium)  
*Goldshield Pharmaceuticals Ltd., Croydon/Surrey (Vereinigtes Königreich)*
- ◆ firazyf<sup>®</sup> (Wirkstoff: Icatibant)  
*Jerini AG / Shire Deutschland GmbH, Berlin (Deutschland)*
- ◆ Forene<sup>®</sup> (Wirkstoff: Isofluran)  
*Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden (Deutschland)*
- ◆ Heparin-Natrium-25000-ratiopharm<sup>®</sup> (Wirkstoff: Heparin-Natrium)  
*ratiopharm GmbH, Ulm (Deutschland)*
- ◆ Isotonische Kochsalzlösung 0,9% (Wirkstoff: Natriumchlorid)  
*Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg (Deutschland)*
- ◆ Ketavet<sup>®</sup> 100 mg/ml (Wirkstoff: Ketaminhydrochlorid)  
*Pfizer / Pharmacia GmbH, Berlin (Deutschland)*

- ◆ Naropin<sup>®</sup> 2 mg/ml (Wirkstoff: Ropivacainhydrochlorid 1 H<sub>2</sub>O)  
*AstraZeneca GmbH, Wedel (Deutschland)*
- ◆ Paveron<sup>®</sup> N 25 mg/ml (Wirkstoff: Papaverinhydrochlorid)  
*Linden Arzneimittel-Vertrieb-GmbH, Heuchelheim (Deutschland)*
- ◆ Ramipril-CT 2,5 mg (Wirkstoff: Ramipril)  
*CT Arzneimittel GmbH, Berlin (Deutschland)*
- ◆ Rompun<sup>®</sup> 2 % (Wirkstoff: Xylazinhydrochlorid)  
*Bayer Vital GmbH, Leverkusen (Deutschland)*
- ◆ T 61 (Wirkstoffe: Embutramid, Mebezoniumiodid, Tetracainhydrochlorid)  
*Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim (Deutschland)*

#### 3.4.5 CHEMIKALIEN, LÖSUNGEN, GASE

- ◆ Aceton  
*J.T. Baker<sup>®</sup>/Avantor<sup>™</sup> Performance Materials, Phillipsburg/New Jersey (Vereinigte Staaten)*
- ◆ Braunol<sup>®</sup> (Wirkstoff: Povidon-Iod)  
*B. Braun AG, Melsungen (Deutschland)*
- ◆ Chicago Latex (Industrial Latex Product No. 563)  
*Spartan Adhesives & Coatings Co., Inc., Crystal Lake/Illinois (Vereinigte Staaten)*
- ◆ Descosept, alkoholisches Schnelldesinfektionsmittel (Wirkstoff: Ethanol)  
*Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld-Beiseförth (Deutschland)*
- ◆ Entellan<sup>®</sup>  
*Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)*
- ◆ Ethanol 100%  
*Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (Deutschland)*
- ◆ Eosin G-Lösung 0,5 %  
*Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (Deutschland)*
- ◆ Fluoromount-G  
*SouthernBiotech, Birmingham/Alabama (Vereinigte Staaten)*
- ◆ Indian Ink (Chinesische Tusche, schwarz)  
*Royal Talens, Apeldoorn (Niederlande)*

- ◆ Mayers Hämlaunlösung  
*Merck KGaA, Darmstadt (Deutschland)*
- ◆ Medizinische Gase Sauerstoff (O<sub>2</sub>) / Distickstoffmonoxid (N<sub>2</sub>O, Lachgas)  
*Linde AG, Unterschleißheim (Deutschland)*
- ◆ Methylcellulose 0,5%ige Lösung  
*Apotheke der Charité Universitätsmedizin, Berlin (Deutschland)*
- ◆ Paraffin Typ 9  
*MICROM International, Walldorf (Deutschland)*
- ◆ RNAlater<sup>®</sup> Solution (Aufbewahrungsreagenz für Gewebe)  
*Life Technologies<sup>™</sup> Corp./Ambion<sup>®</sup>, Carlsbad/California (Vereinigte Staaten)*
- ◆ Softasept<sup>®</sup> N (Wirkstoff: Ethanol)  
*B. Braun AG, Melsungen (Deutschland)*
- ◆ Tween<sup>®</sup> 20  
*Sigma-Aldrich<sup>®</sup> Corp., St. Louis/Missouri (Vereinigte Staaten)*
- ◆ Xylol (Xylene)  
*J.T. Baker/Avantor Performance Materials, CenterValley/Pennsylvania (Vereinigte Staaten)*

#### **3.4.6 BIOREAGENZIEN UND ANTIKÖRPER**

- ◆ Bovines Serumalbumin (Albumin from bovine serum)  
*Sigma-Aldrich<sup>®</sup> Corp., St. Louis/Missouri (Vereinigte Staaten)*
- ◆ Compound 21 / C21 (AT<sub>2</sub>R-Agonist)  
*Vicore Pharma, Göteborg (Schweden)*
- ◆ Cy<sup>™</sup>3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)  
*Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove/Pennsylvania (Vereinigte Staaten)*
- ◆ des-Arg<sup>9</sup>,[Leu<sup>8</sup>]-Bradykinin (B<sub>1</sub>R-Inhibitor)  
*Biomol GmbH, Hamburg (Deutschland)*
- ◆ Hoechst 33342, Trihydrochloride, Trihydrate  
*Life Technologies<sup>™</sup> Corp./Molecular Probes<sup>®</sup>, Carlsbad/California (Vereinigte Staaten)*

- ◆ Monoclonal Anti-Actin,  $\alpha$ -Smooth Muscle - FITC antibody produced in mouse  
*Sigma-Aldrich<sup>®</sup> Corp., St. Louis/Missouri (Vereinigte Staaten)*
- ◆ Monoclonal Mouse Anti-Rat Ki-67 Antigen, Clone MIB-5  
*Dako Denmark, Glostrup (Dänemark)*
- ◆ Ziegenserum (Goat serum)  
*Sigma-Aldrich<sup>®</sup> Corp., St. Louis/Missouri (Vereinigte Staaten)*

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 ÜBERLEBENS RATEN / AUSWERTUNGSRATE

Wie in der Versuchsstruktur beschrieben, wurden in dieser Studie 150 Tiere zur Untersuchung der zerebralen Arteriogenese herangezogen (Vgl. hierzu Tabelle 1 und 2 unter Punkt 3.2). Nach dem operativen Drei-Gefäß-Verschluss überlebten insgesamt 141 Tiere, deren Gruppenzugehörigkeit in Tabelle 4 aufgeführt ist. Aus diesen Zahlen resultierte in vorliegendem Projekt eine Gesamtüberlebensrate von 94 %. Die Ursache für die Todesfälle waren stets intra- oder postoperative Atemstillstände.

Von den 141 Tieren konnten bei 130 Ratten Ergebnisse ermittelt werden, die in die Auswertung einfließen (Vgl. Tabelle 4). Dies entspricht einer Fehlerrate von 7,8 %. Gründe für ergebnislose Erhebungen waren auftretende Apnoe als Narkosezwischenfall während der Blutflussmessung und technische Probleme zum Zeitpunkt der Perfusion.

Gruppe	CVRC-Messung			Latexangiographie			Gesamt		
	in Versuch	überlebt	ausgewertet	in Versuch	überlebt	ausgewertet	in Versuch	überlebt	ausgewertet
unbehandelt	10	10	10	10	10	10			
unbehandelt (24h)	10	8	6						
Kontrolle (21d)	10	10	10	10	9	8			
Kontrolle (7d)	10	10	10	10	10	10			
AT <sub>1</sub> R-Antagonist	10	9	7	10	9	8			
AT <sub>2</sub> R-Agonist	10	10	8	10	9	7			
ACE-Hemmer	10	10	10	10	8	8			
ACE-Hemmer & BRB	10	10	10	10	9	8			
Gesamt							150	141	130

**Tabelle 4** Übersicht der im Versuch eingesetzten Tiere unter Angabe derer, die die initiale Operation überlebt haben und derer, deren Untersuchungsergebnisse ausgewertet werden konnten. CVRC = zerebrovaskuläre Reservekapazität.

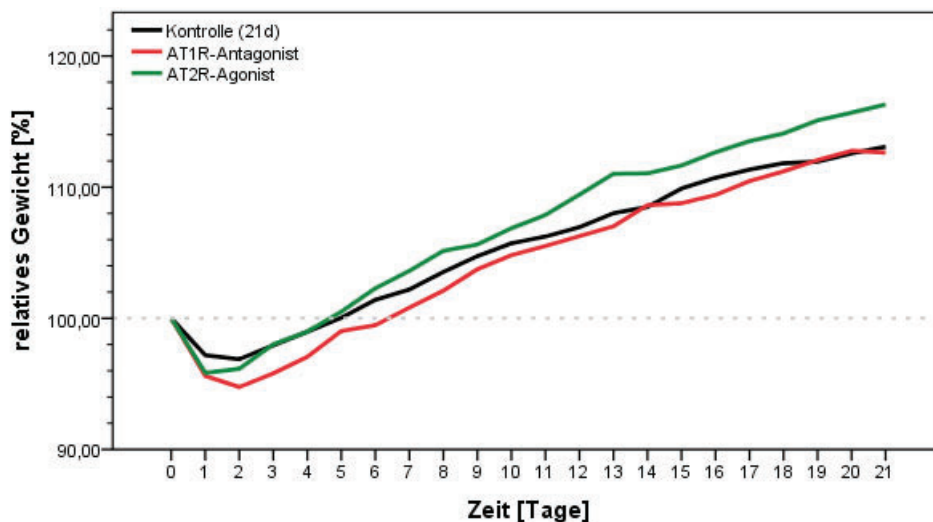


## 4.2 GEWICHTSVERLÄUFE

Das Gewicht eines jeden Tieres wurde als verlässliches Maß für den Gesundheitszustand täglich erfasst. Das durchschnittliche absolute Gewicht am ersten Tag des Versuches lag bei  $337,6 \pm 19,2$  Gramm. In den ersten zwei Tagen nach der 3-VO-Operation verloren die Tiere zwar im Mittel  $4,9 \pm 2,1$  % an Körpermasse, erlangten jedoch zwischen dem fünften und siebenten Tag wieder ihr Ausgangsgewicht.

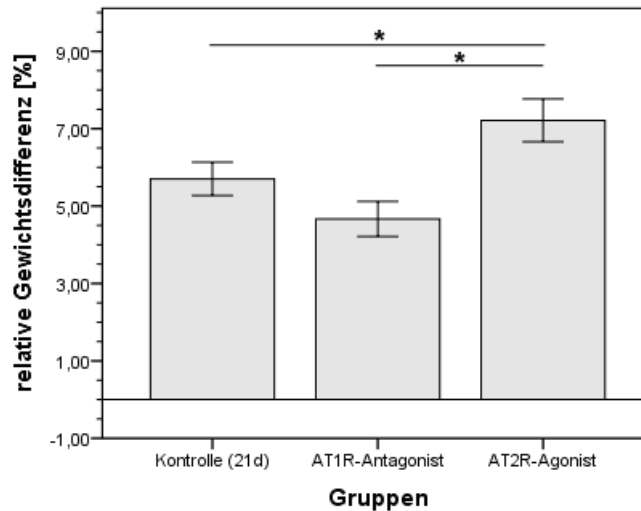
### 4.2.1 GEWICHTE IM ERSTEN TEILVERSUCH

Der Gewichtsverlauf in diesem Teilversuch, der der Untersuchung des RAS galt, wurde über den Versuchszeitraum von 21 Tagen beobachtet (Abbildung 7).



**Abbildung 7** Darstellung des relativen Gewichtsverlaufes über 21 Tage, Kontrollgruppe (21 Tage nach 3-VO,  $n=19$ ),  $AT_1R$ -Antagonisten-Gruppe ( $n=18$ ) und  $AT_2R$ -Agonisten-Gruppe ( $n=19$ ).

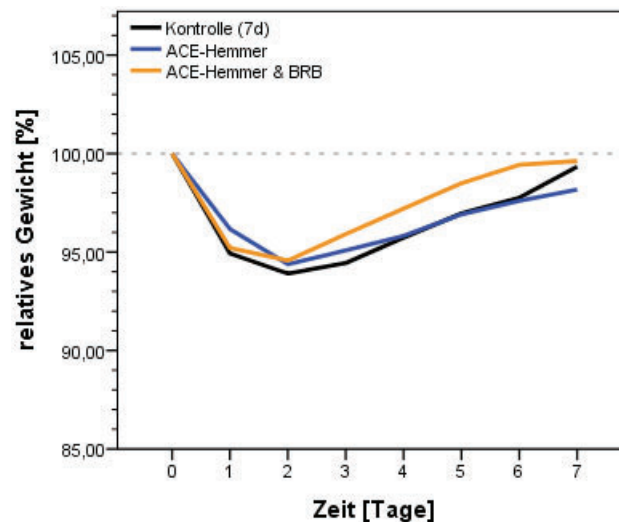
Betrachtet man die Differenz zwischen Ausgangs- und Finalgewicht, so zeigte sich eine durchschnittliche relative Gewichtszunahme von  $5,7 \pm 1,9$  % bei den Kontrolltieren,  $4,7 \pm 1,9$  % bei den mit dem  $AT_1R$ -Antagonisten behandelten und  $7,2 \pm 2,4$  % bei den mit dem  $AT_2R$ -Agonisten behandelten Tieren, womit letztere eine signifikant höhere relative Gewichtszunahme zeigten als die Kontrollgruppe sowie die  $AT_1R$ -Antagonisten-Gruppe (nominaler p-Wert = 0,033). Dies ist in Abbildung 8 veranschaulicht.



**Abbildung 8** Darstellung der relativen Gewichtsdiffrenz über 21 Tage, Kontrollgruppe (21 Tage nach 3-VO, n=19), AT<sub>1</sub>R-Antagonisten-Gruppe (n=18) und AT<sub>2</sub>R-Agonisten-Gruppe (n=19). Fehlerbalken: Standardfehler +/- 1. (\*nominaler p-Wert ≤0,033)

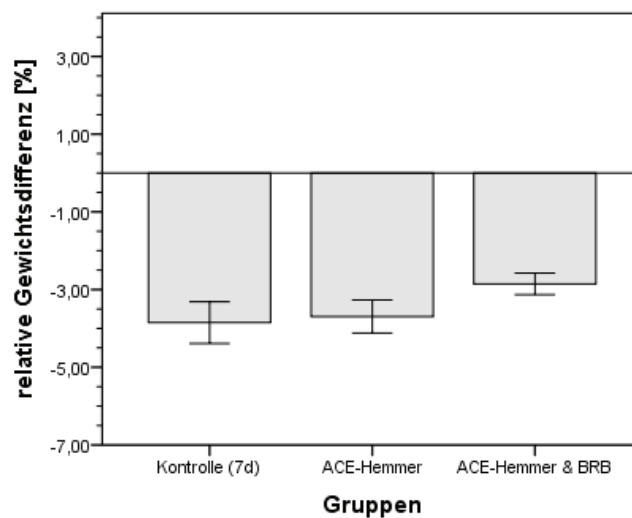
#### 4.2.2 GEWICHTE IM ZWEITEN TEILVERSUCH

Das Gewicht der Tiere in dem KKS-Teilversuch wurde über den Versuchszeitraum von sieben Tagen beobachtet. Der Verlauf ist in Abbildung 9 aufgezeichnet.



**Abbildung 9** Darstellung des relativen Gewichtsverlaufes über 7 Tage, Kontrollgruppe (7 Tage nach 3-VO, n=20), die mit ACE-Hemmer behandelte Gruppe (n=18) und Tiere, die mit ACE-Hemmer und Bradykininrezeptor-Blocker (BRB) (n=19) behandelt wurden.

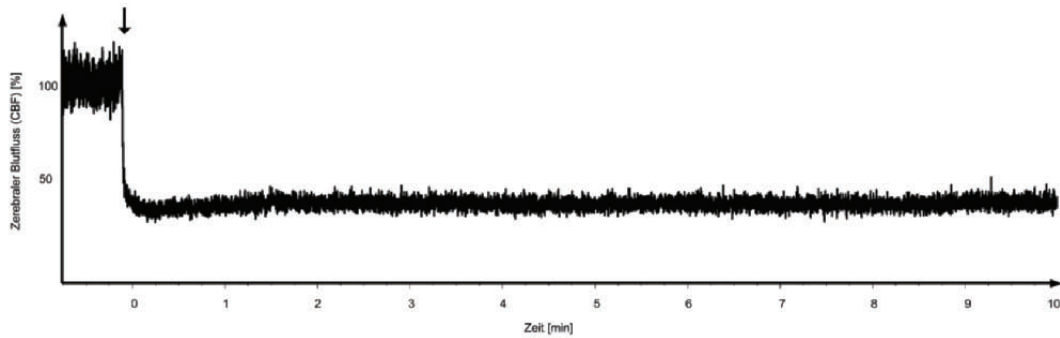
Zwischen dem Tag der Operation und der Durchführung von CVRC-Messung oder Latexangiographie ergab sich ein Gewichtsverlust von  $3,9 \pm 2,4 \%$  bei den Tieren in der Kontrollgruppe,  $3,7 \pm 1,8 \%$  in der mit dem ACE-Hemmer behandelten Gruppe und  $2,9 \pm 1,2 \%$  in der Gruppe, die sowohl mit ACE-Hemmer als auch mit Bradykininrezeptor-Blockern behandelt wurde. Zwischen den einzelnen Gruppen waren die Unterschiede nicht signifikant (Abbildung 10).



**Abbildung 10** Darstellung der relativen Gewichtsänderung über 7 Tage, Kontrollgruppe (7 Tage nach 3-VO,  $n=20$ ), die mit ACE-Hemmer behandelte Gruppe ( $n=18$ ) und Tiere, die mit ACE-Hemmer und Bradykininrezeptor-Blocker (BRB) ( $n=19$ ) behandelt wurden. Fehlerbalken: Standardfehler  $\pm 1$ .

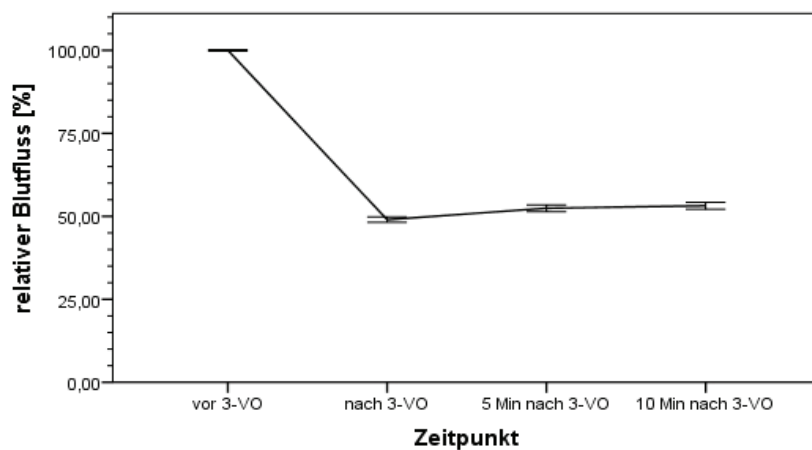
### 4.3 DREI-GEFÄß-VERSCHLUSS

Während der Messung des zerebralen Blutflusses wurden die Ausgangswerte (Basiskurve) und der zehnmütige Verlauf nach dem Verschluss der Ligatur an der Arteria carotis communis sinistra aufgezeichnet. Anhand des dauerhaften Perfusionsabfalls von etwa 50 % (mindestens jedoch 35 %) wurde geprüft, ob die 3-VO gelungen ist (Vgl. hierzu Abbildung 11).



**Abbildung 11** Beispiel einer Aufzeichnung des zerebralen Blutflusses bei dem Drei-Gefäß-Verschluss über 10 Minuten. Der Pfeil zeigt den Zeitpunkt der Ligatur der A. carotis communis an.

Werden die Werte des relativen zerebralen Blutflusses aller Gruppen nach der 3-VO gemittelt, so zeigt sich ein Perfusionsabfall auf  $53 \pm 11 \%$  (Abbildung 12). Keines der Tiere, deren Drei-Gefäß-Verschluss erfolgreich war, zeigte neurologische Symptome.



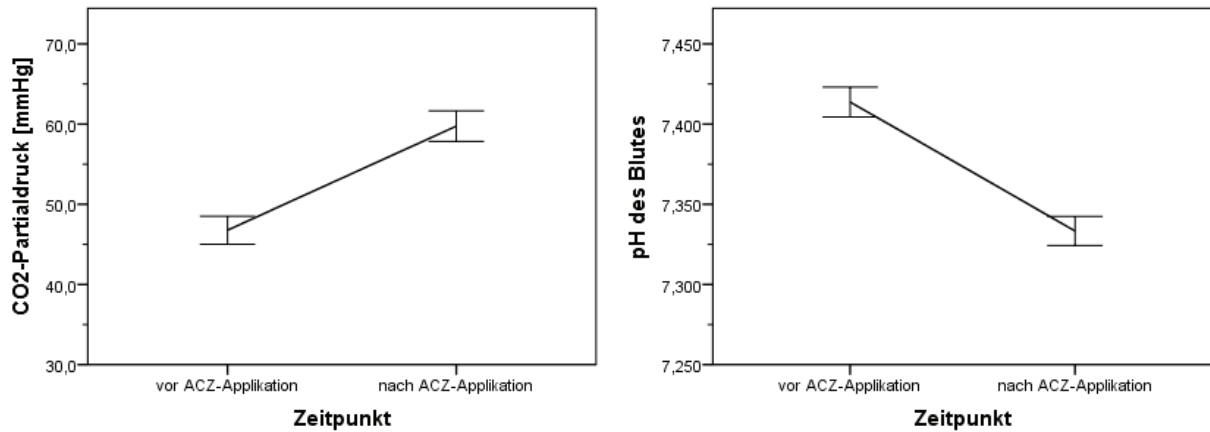
**Abbildung 12** Darstellung des relativen Blutflusses vor und bis zu 10 Minuten nach dem Drei-Gefäß-Verschluss aller Gruppen. Fehlerbalken: Standardfehler  $\pm 1$ .

#### 4.4 MESSUNG DER ZEREBROVASKULÄREN RESERVEKAPAZITÄT, BLUTGASANALYSE UND BLUTDRUCK

##### 4.4.1 BLUTGASWERTE

Für die Messung der zerebrovaskulären Reservekapazität wurde nach der Erfassung einer Basiskurve als Ausgangswert intravenös Acetazolamid appliziert. Damit stieg der Kohlendioxidpartialdruck ( $pCO_2$ ) des Blutes von  $47 \pm 14$  mmHg auf  $60 \pm 16$  mmHg an,

Parallel fiel der pH-Wert von  $7,42 \pm 0,08$  auf  $7,33 \pm 0,08$  (Abbildung 13). Tabelle 5 stellt die Mittelwerte der per Blutgasanalyse erfassten Blutwerte dar.



**Abbildung 13** Darstellung der Veränderung von CO<sub>2</sub>-Partialdruck und pH des Blutes vor und nach der Applikation von Acetazolamid (ACZ) aller Gruppen. Fehlerbalken: Standardfehler +/- 1.

	<b>vor Acetazolamid-Applikation (vor CVRC-Messung)</b>	<b>nach Acetazolamid-Applikation (nach CVRC-Messung)</b>
<b>pH</b>	7,42 ± 0,08	7,33 ± 0,08
<b>CO<sub>2</sub>-Partialdruck (mmHg)</b>	46,8 ± 14,3	59,8 ± 15,8
<b>O<sub>2</sub>-Partialdruck (mmHg)</b>	166,8 ± 49,3	169,9 ± 42,1
<b>Hämatokrit (%)</b>	37,5 ± 6,5	40,2 ± 4,3

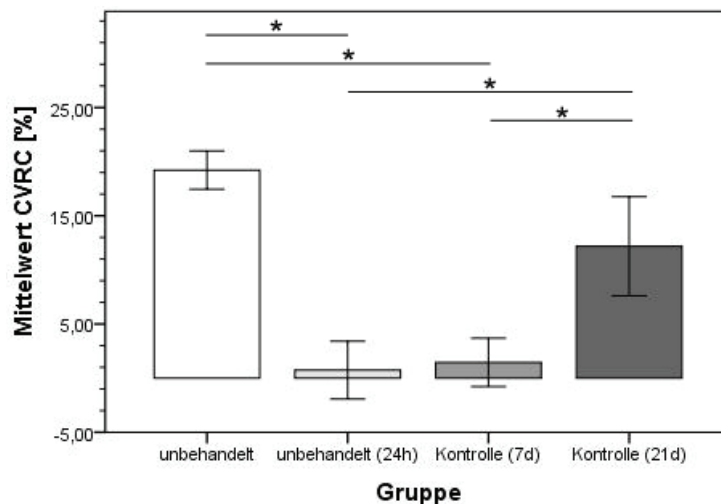
**Tabelle 5** Blutwerte im Gruppenvergleich. Mittelwerte +/- Standardabweichung.

#### 4.4.2 MESSUNG DER ZEREBROVASKULÄREN RESERVEKAPAZITÄT

Der zerebrale Blutfluss vor der Acetazolamid-Applikation wurde mit 100 % als Basis betrachtet. Die nach der Applikation einsetzende Änderung über acht Minuten wurde schließlich prozentual errechnet.

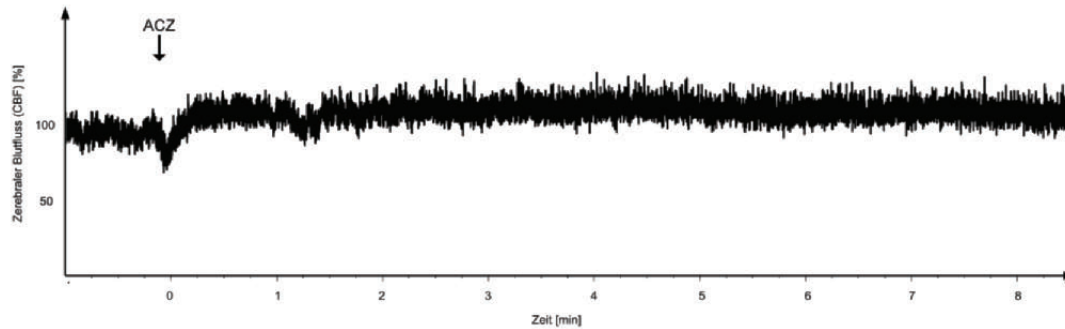
Die CVRC der unbehandelten und nicht operierten Tiergruppe betrug  $19 \pm 6$  %. Bei Tieren, die 24 Stunden vor der Messung einer 3-VO unterzogen wurden, lag dieser Wert bei  $1 \pm 7$  %. Somit war 24 Stunden nach der 3-VO die CVRC nicht nur signifikant verringert, sondern nahezu aufgehoben.

Die Kontrolltiere, deren CVRC-Messung sieben Tage nach dem Drei-Gefäß-Verschluss stattfand, hatten eine zerebrale Reservekapazität von  $2 \pm 7$  %, was ebenfalls signifikant geringer war als die der unbehandelten und nicht operierten Gruppe. Wurde die Messung nach drei Wochen durchgeführt, lag der Wert bei  $12 \pm 15$  % und war damit signifikant höher als bei der 7-Tages-Kontrollgruppe. Demnach erholte sich die zerebrovaskuläre Reaktivität, und die Reservekapazität stieg signifikant gegenüber der der unbehandelten 24-Stunden-Gruppe an. Als Übersicht dienen die in der Abbildung 14 dargestellten Gruppenmittelwerte.

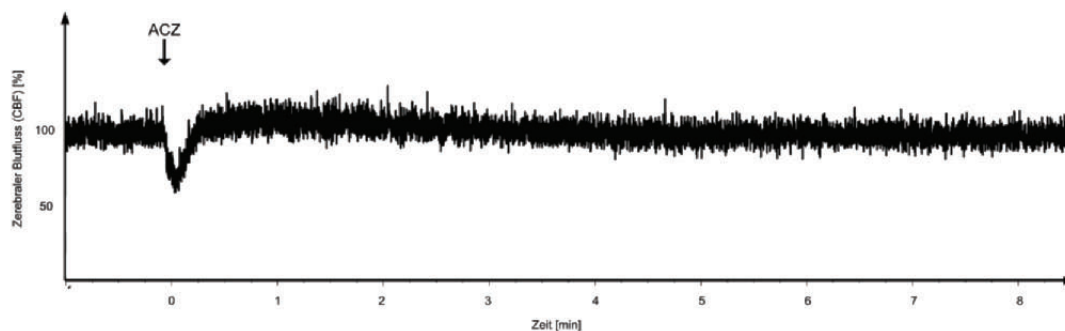


**Abbildung 14** Übersicht der Gruppenmittelwerte aus der Messung der zerebrovaskulären Reservekapazität (CVRC). Fehlerbalken: Standardfehler +/- 1. \*nominaler p-Wert  $\leq 0,033$ .

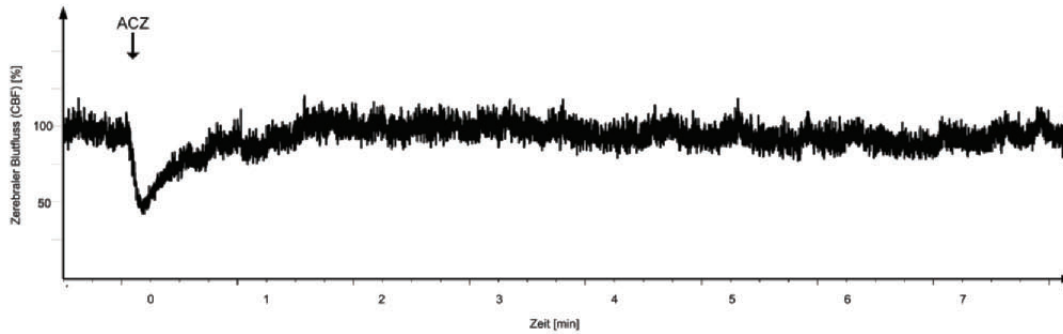
Die Abbildung 15 bis Abbildung 18, Abbildung 20 und Abbildung 21 sowie Abbildung 23 und Abbildung 24 zeigen Aufzeichnungen der zerebralen Blutflussmessung beispielhaft aus jeder Tiergruppe.



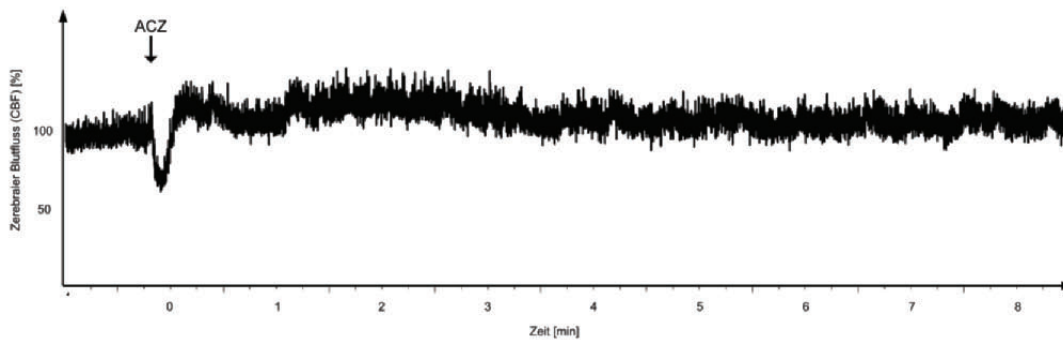
**Abbildung 15** Aufzeichnung der Messung der zerebrovaskulären Reservekapazität (CVRC) eines unbehandelten, nicht operierten Tieres über 8 Minuten nach Acetazolamid-Applikation. Gruppenmittelwert ist  $19 \pm 6$  %. Der Pfeil markiert den Applikationszeitpunkt des Acetazolamids (ACZ).



**Abbildung 16** Aufzeichnung der Messung der zerebrovaskulären Reservekapazität (CVRC) eines Tieres (24 Stunden nach 3-VO) über 8 Minuten nach Acetazolamid-Applikation. Gruppenmittelwert ist  $1 \pm 7$  %. Der Pfeil markiert den Applikationszeitpunkt des Acetazolamids (ACZ).



**Abbildung 17** Aufzeichnung der Messung der zerebrovaskulären Reservekapazität (CVRC) eines Kontrolltieres (7 Tage nach 3-VO) über 8 Minuten nach Acetazolamid-Applikation. Gruppenmittelwert ist  $2 \pm 7 \%$ . Der Pfeil markiert den Applikationszeitpunkt des Acetazolamids (ACZ).



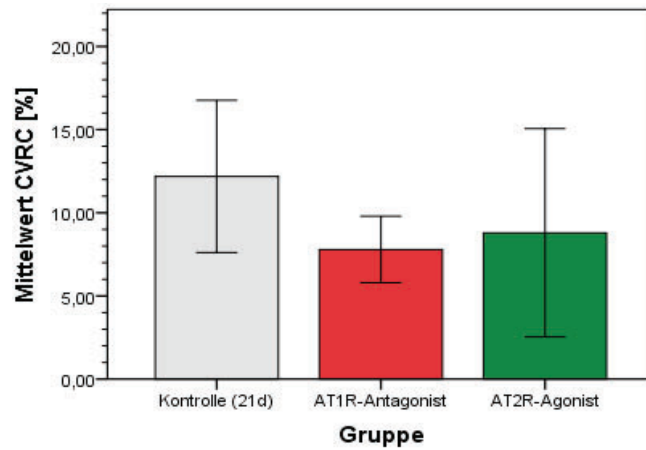
**Abbildung 18** Aufzeichnung der Messung der zerebrovaskulären Reservekapazität (CVRC) eines Kontrolltieres (21 Tage nach 3-VO) über 8 Minuten nach Acetazolamid-Applikation. Gruppenmittelwert ist  $12 \pm 15 \%$ . Der Pfeil markiert den Applikationszeitpunkt des Acetazolamids (ACZ).

#### 4.4.2.1 Zerebrovaskuläre Reservekapazität im ersten Teilversuch

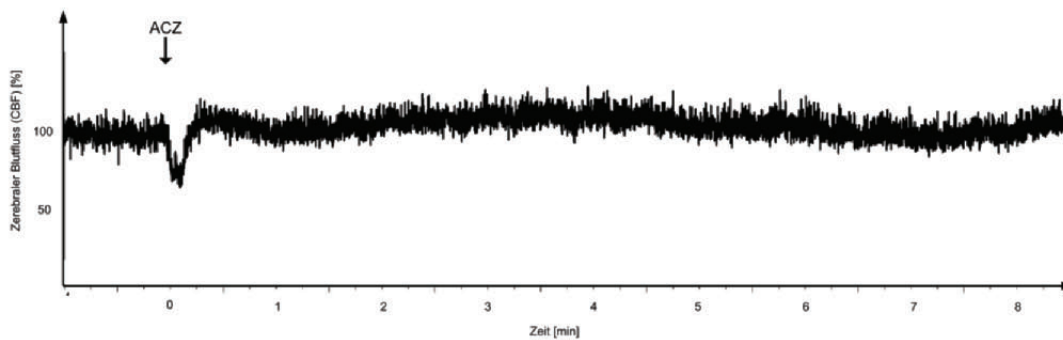
Bei den 3-VO-operierten Tieren der Gruppe, die mit der Kontrolllösung über 21 Tage behandelt wurden, betrug die CVRC  $12 \pm 15 \%$ .

Im Vergleich zu der Kontrollgruppe fielen die CVRC-Werte in der AT<sub>1</sub>R-Antagonisten-Gruppe ( $8 \pm 5 \%$ ) und der AT<sub>2</sub>R-Agonisten-Gruppe ( $9 \pm 18 \%$ ) geringer aus. Die Unterschiede zwischen den Gruppen erreichten jedoch kein signifikantes Niveau (Vgl. Abbildung 19).

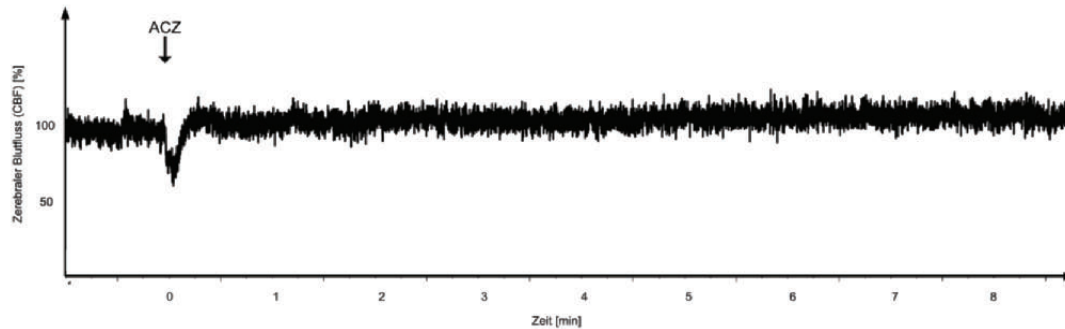




**Abbildung 19** Übersicht der Gruppenmittelwerte der Messung der zerebrovaskulären Reservekapazität (CVRC). Fehlerbalken: Standardfehler  $\pm$  1.



**Abbildung 20** Aufzeichnung der Messung der zerebrovaskulären Reservekapazität (CVRC) eines Tieres nach  $AT_1R$ -Antagonist-Behandlung (21 Tage nach 3-VO) über 8 Minuten nach Acetazolamid-Applikation. Gruppenmittelwert ist  $12 \pm 15$  %. Der Pfeil markiert den Applikationszeitpunkt des Acetazolamids (ACZ).



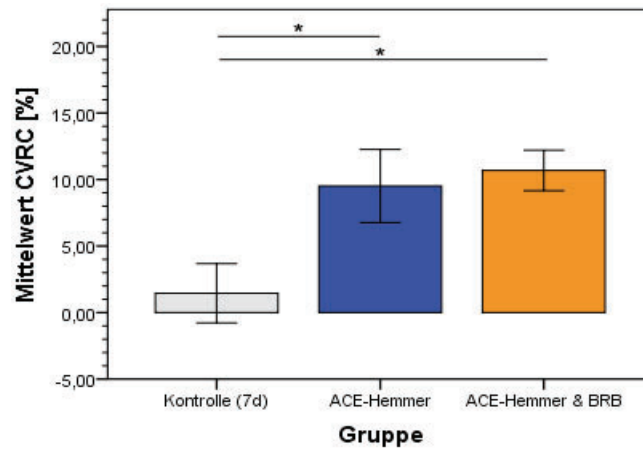
**Abbildung 21** Aufzeichnung der Messung der zerebrovaskulären Reservekapazität (CVRC) eines Tieres nach  $AT_2R$ -Agonist-Behandlung (21 Tage nach 3-VO) über 8 Minuten nach Acetazolamid-Applikation. Gruppenmittelwert ist  $12 \pm 15$  %. Der Pfeil markiert den Applikationszeitpunkt des Acetazolamids (ACZ).

#### 4.4.2.2 Zerebrovaskuläre Reservekapazität im zweiten Teilversuch

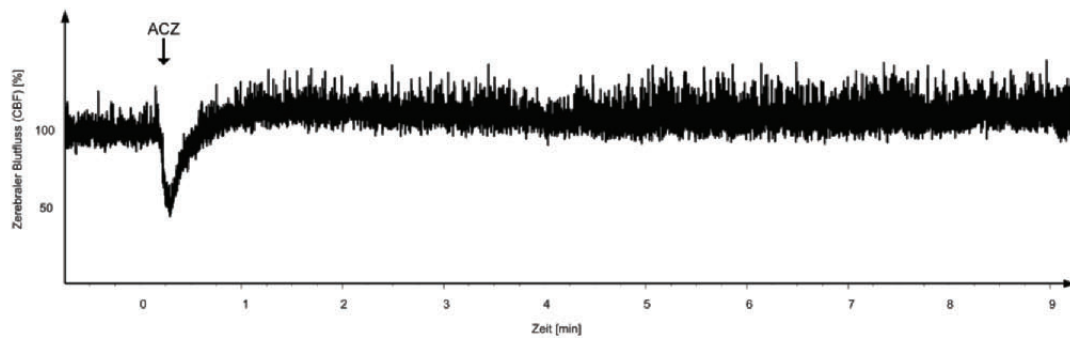
Bei den Kontrolltieren, deren zerebraler Blutfluss nach sieben Tagen gemessen wurde, ergab die CVRC  $2 \pm 7$  % und war so nach einer Woche verglichen mit den unbehandelten, nicht operierten Tieren immer noch signifikant verringert.

Die Tiere, welche mit dem ACE-Hemmer behandelt wurden, zeigten eine CVRC von  $10 \pm 9$  %. Diese Werte lagen damit signifikant höher als die CVRC-Ergebnisse der Kontrolltiere (sieben Tage).

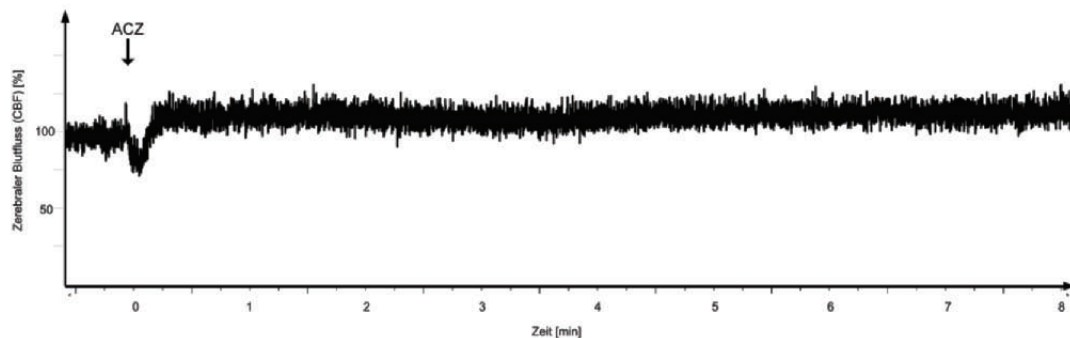
Wurden die Tiere zusätzlich zum ACE-Hemmer mit Bradykininrezeptor-Blockern behandelt, ergab die Messung einen Wert von  $11 \pm 5$  %, was ebenfalls eine signifikante Erhöhung gegenüber den Kontrollwerten bedeutet. Es bestand jedoch kein signifikanter Unterschied zu der mit dem ACE-Hemmer behandelten Gruppe (Abbildung 22).



**Abbildung 22** Übersicht der Gruppenmittelwerte der Messung der zerebrovaskulären Reservekapazität (CVRC). Fehlerbalken: Standardfehler +/- 1. \*nominaler p-Wert  $\leq 0,033$ .



**Abbildung 23** Aufzeichnung der Messung der zerebrovaskulären Reservekapazität (CVRC) eines Tieres nach ACE-Hemmer-Behandlung (7 Tage nach 3-VO) über 8 Minuten nach Acetazolamid-Applikation. Der Pfeil markiert den Applikationszeitpunkt des Acetazolamids (ACZ).



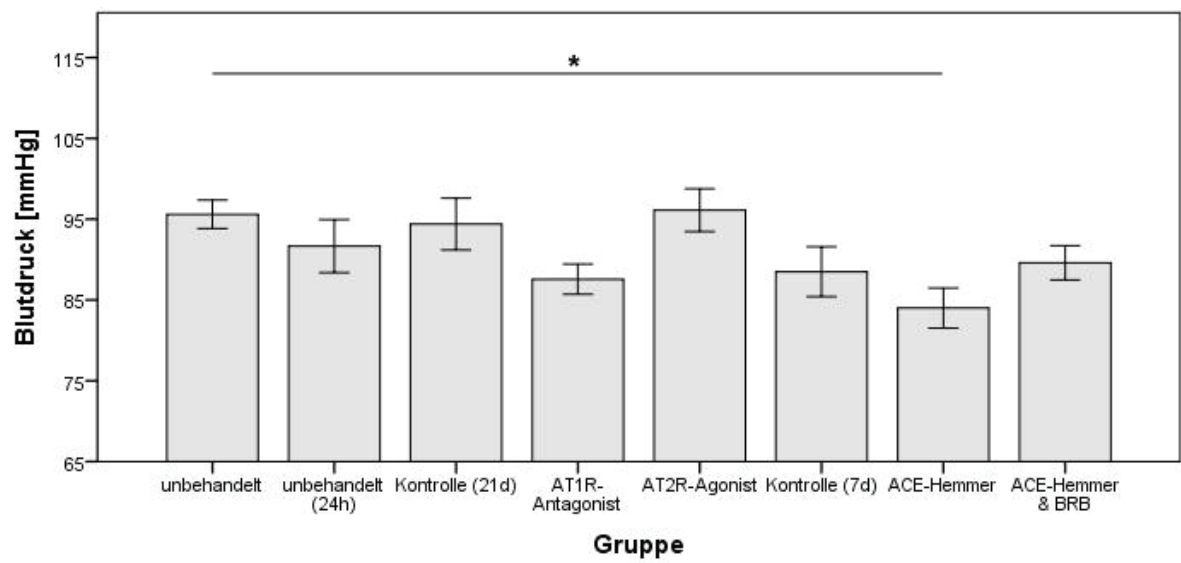
**Abbildung 24** Aufzeichnung der Messung der zerebrovaskulären Reservekapazität (CVRC) eines Tieres nach ACE-Hemmer- und Bradykininrezeptor-Blocker-Behandlung (7 Tage nach 3-VO) über 8 Minuten nach Acetazolamid-Applikation. Der Pfeil markiert den Applikationszeitpunkt des Acetazolamids (ACZ).

	CVRC	Blutdruck (mmHg)
unbehandelt (n=10)	19 ± 6 %	96 ± 6
unbehandelt (24h) (n=6)	1 ± 7 %	92 ± 8
Kontrolle (21d) (n=10)	12 ± 15 %	94 ± 10
AT1R-Antagonist (n=7)	8 ± 5 %	88 ± 5
AT2R-Agonist (n=8)	9 ± 18 %	96 ± 8
Kontrolle (7d) (n=10)	2 ± 7 %	89 ± 10
ACE-Hemmer (n=10)	10 ± 9 %	84 ± 8
ACE-Hemmer & BRB (n=10)	11 ± 5 %	90 ± 7

**Tabelle 6** Übersicht der Werte von zerebrovaskulärer Reservekapazität (CVRC) und Blutdruck im Gruppenvergleich. Mittelwerte +/- Standardabweichung.

#### 4.4.3 BLUTDRUCKWERTE IM VERGLEICH

Während jeder CVRC-Messung wurde bei den Tieren zur Überwachung der Anästhesie der Blutdruck über einen intraarteriellen Katheter gemessen und aufgezeichnet. Die Blutdruckmittelwerte der Gruppen vor Beginn der CVRC-Messung sind in Tabelle 6 und Abbildung 25 aufgeführt. Dabei fällt auf, dass die Tiere mit 21-tägiger AT<sub>1</sub>R-Antagonisten- und die mit siebentägiger ACE-Hemmer-Behandlung einen verringerten Blutdruck hatten (88 ± 5 mmHg resp. 84 ± 8 mmHg). Doch nur bei letzteren war der Blutdruck im Vergleich mit den unbehandelten, nicht operierten Tieren (96 ± 6 mmHg) signifikant verändert.



**Abbildung 25** Übersicht der Gruppenmittelwerte des arteriellen Blutdruckes. Fehlerbalken: Standardfehler +/- 1. \*nominaler p-Wert  $\leq 0,013$ .

#### 4.5 LATEXANGIOGRAPHIE

Die Abbildung 26 bietet eine topographische Übersicht der mit schwarz gefärbtem Latex perfundierten Gefäße des Circulus arteriosus cerebri (Willisi). Die Messung der Gefäßdiameter der jeweiligen Versuchsgruppen ergab die in Tabelle 7 erfassten Mittelwerte. Der Drei-Gefäß-Verschluss initiierte eine Durchmesservergrößerung dieser zerebralen Arterien, vor allem im Bereich der Aa. cerebri posteriores.

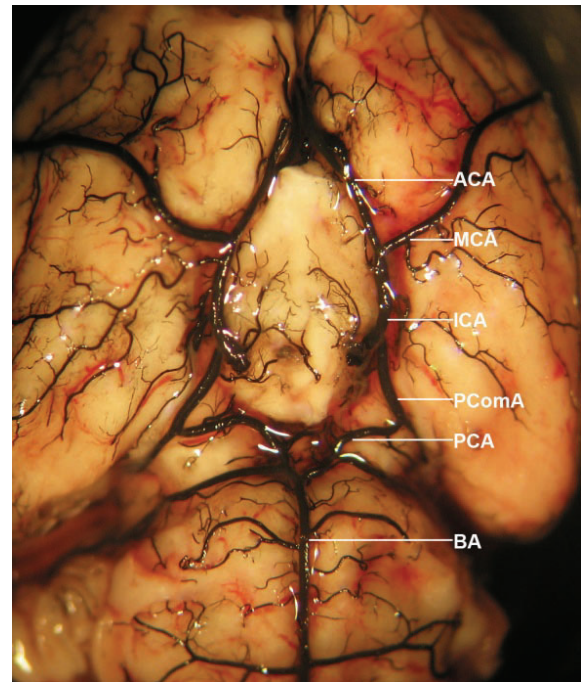
Die A. cerebri posterior der Tiere, die zuvor weder einer 3-VO unterzogen noch behandelt wurden, war ipsilateral  $154 \pm 34 \mu\text{m}$  und kontralateral  $143 \pm 19 \mu\text{m}$  groß.

Die A. communicans posterior (ipsilateral  $196 \pm 34 \mu\text{m}$ , kontralateral  $214 \pm 18 \mu\text{m}$ ), A. carotis interna (ipsilateral  $264 \pm 28 \mu\text{m}$ , kontralateral  $286 \pm 22 \mu\text{m}$ ), A. cerebri media (ipsilateral  $196 \pm 38 \mu\text{m}$ , kontralateral  $214 \pm 22 \mu\text{m}$ ) und A. cerebri anterior (ipsilateral  $213 \pm 22 \mu\text{m}$ , kontralateral  $210 \pm 25 \mu\text{m}$ ) wurden bei den unbehandelten, nicht operierten Tieren als Vergleichsbasis ebenso ausgewertet.

##### 4.5.1 DIAMETER DER ARTERIA CEREBRI POSTERIOR IM ERSTEN TEILVERSUCH

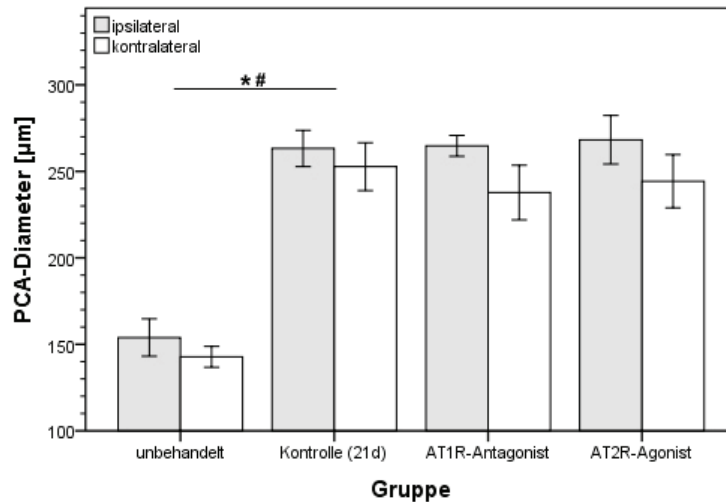
Nach 21 Tagen einer Behandlung mit der Kontrolllösung wurde bei den 3-VO-operierten Tieren ein Durchmesser der A. cerebri posterior von  $263 \pm 30 \mu\text{m}$  ipsilateral und  $253 \pm 39 \mu\text{m}$  kontralateral gemessen, dies entspricht beidseitig einer signifikanten Vergrößerung gegenüber den nicht operierten Tieren.

Mit den Werten der A. communicans posterior (ipsilateral  $275 \pm 57 \mu\text{m}$ , kontralateral  $246 \pm 41 \mu\text{m}$ ), der A. carotis interna (ipsilateral  $367 \pm 57 \mu\text{m}$ , kontralateral  $318 \pm 45 \mu\text{m}$ ), der



**Abbildung 26** Der Circulus arteriosus cerebri nach der Latexperfusion. BA = A. basilaris, PCA = A. cerebri posterior, PComA = A. cerebri communicans posterior, ICA = A. carotis interna, MCA = A. cerebri media und ACA = A. cerebri anterior.

A. cerebri media (ipsilateral  $268 \pm 25 \mu\text{m}$ , kontralateral  $232 \pm 41 \mu\text{m}$ ) und der A. cerebri anterior (ipsilateral  $341 \pm 52 \mu\text{m}$ , kontralateral  $285 \pm 56 \mu\text{m}$ ) wurden bis auf die kontralaterale A. cerebri media ebenfalls nominale Signifikanzniveaus der Kontrolltiere gegenüber den unbehandelten Tieren erreicht.



**Abbildung 27** Darstellung der Diameter-Mittelwerte [ $\mu\text{m}$ ] der A. cerebri posterior (PCA) im Gruppenvergleich des ersten Teilversuchs. \* nominaler p-Wert  $\leq 0,013$  ipsilateral, # nominaler p-Wert  $\leq 0,013$  kontralateral. Fehlerbalken: Standardfehler  $\pm 1$ .

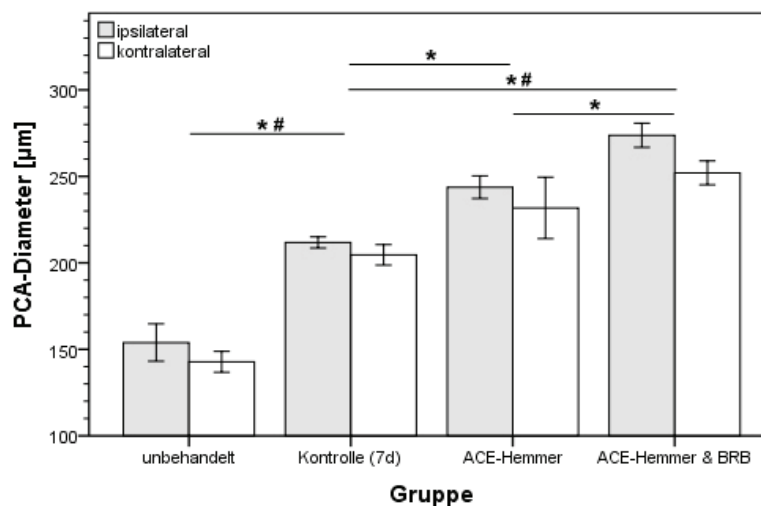
Wie auch in Abbildung 27 dargestellt, führte die Behandlung mit dem AT<sub>1</sub>R-Antagonist (ipsilateral  $265 \pm 17 \mu\text{m}$ ; kontralateral  $238 \pm 45 \mu\text{m}$ ) und dem AT<sub>2</sub>R-Agonisten (ipsilateral  $268 \pm 37 \mu\text{m}$ ; kontralateral  $244 \pm 41 \mu\text{m}$ ) zu keiner signifikanten Änderung der A. cerebri posterior -Diameter gegenüber der entsprechenden Kontrollgruppe. Auffällig zeigten sich lediglich die ipsilateralen Diameter der A. cerebri media (AT<sub>1</sub>R-Antagonist: ipsilateral  $236 \pm 19 \mu\text{m}$ ; AT<sub>2</sub>R-Agonist: ipsilateral  $233 \pm 29 \mu\text{m}$ ), die signifikant kleiner ausfielen als die der Kontrollgruppe. Außerdem war die A. cerebri anterior der AT<sub>2</sub>R-Agonisten-Gruppe (ipsilateral  $280 \pm 42 \mu\text{m}$ ; kontralateral  $237 \pm 30 \mu\text{m}$ ) beidseitig ebenfalls signifikant kleiner als die der Kontrolltiere. Zwischen AT<sub>1</sub>R-Antagonist-Behandlung und AT<sub>2</sub>R-Agonist-Behandlung war ausschließlich die ipsilaterale A. cerebri anterior signifikant verschieden (AT<sub>1</sub>R-Antagonist: ipsilateral  $325 \pm 32 \mu\text{m}$ ; AT<sub>2</sub>R-Agonist: ipsilateral  $280 \pm 42 \mu\text{m}$ ).

Die nominalen Signifikanzniveaus lagen in diesem Teilversuch für die A. cerebri posterior, A. communicans posterior und A. carotis interna jeweils beidseitig bei  $p = 0,013$ , für die A. cerebri media ipsilateral bei  $p = 0,038$ , kontralateral gab es keine Signifikanz. Für die ipsilaterale A. cerebri anterior war  $p = 0,038$  und kontralateral  $p = 0,025$ .

#### 4.5.2 DIAMETER DER ARTERIA CEREBRI POSTERIOR IM ZWEITEN TEILVERSUCH

Die Durchmesser der Kontrollgruppe (sieben Tage) maßen  $212 \pm 10 \mu\text{m}$  auf der ipsilateralen und  $205 \pm 19 \mu\text{m}$  auf der kontralateralen Seite. So haben die Tiere, die einer 3-VO unterzogen wurden, auch nach sieben Tagen gegenüber den nicht operierten Ratten bereits beidseitig signifikant vergrößerte Diameter der A. cerebri posterior. Demgegenüber fielen die kontralaterale A. carotis interna ( $228 \pm 21 \mu\text{m}$ ) und die kontralaterale A. cerebri media ( $187 \pm 22 \mu\text{m}$ ) gegenüber den nicht operierten Tiere signifikant kleiner aus.

Nach der Behandlung mit dem ACE-Hemmer über sieben Tage vergrößerte sich die A. cerebri posterior ipsilateral auf  $244 \pm 18 \mu\text{m}$  und kontralateral auf  $232 \pm 50 \mu\text{m}$  und erreichte damit ipsilateral ein signifikantes Niveau gegenüber der entsprechenden Kontrollgruppe. Daneben erreichte die Vergrößerung der A. communicans posterior (ipsilateral  $203 \pm 31 \mu\text{m}$ , kontralateral  $233 \pm 44 \mu\text{m}$ ), der A. carotis interna (ipsilateral  $260 \pm 40 \mu\text{m}$ , kontralateral  $280 \pm 56 \mu\text{m}$ ) und der A. cerebri media (ipsilateral  $201 \pm 36 \mu\text{m}$ , kontralateral  $222 \pm 36 \mu\text{m}$ ) jeweils auf der kontralateralen Seite ebenfalls ein signifikantes Niveau.



**Abbildung 28** Darstellung der Diameter-Mittelwerte [ $\mu\text{m}$ ] der A. cerebri posterior (PCA) im Gruppenvergleich des zweiten Teilversuchs. \* nominaler p-Wert  $\leq 0,05$  ipsilateral, # nominaler p-Wert  $\leq 0,025$  kontralateral. Fehlerbalken: Standardfehler  $\pm 1$ .

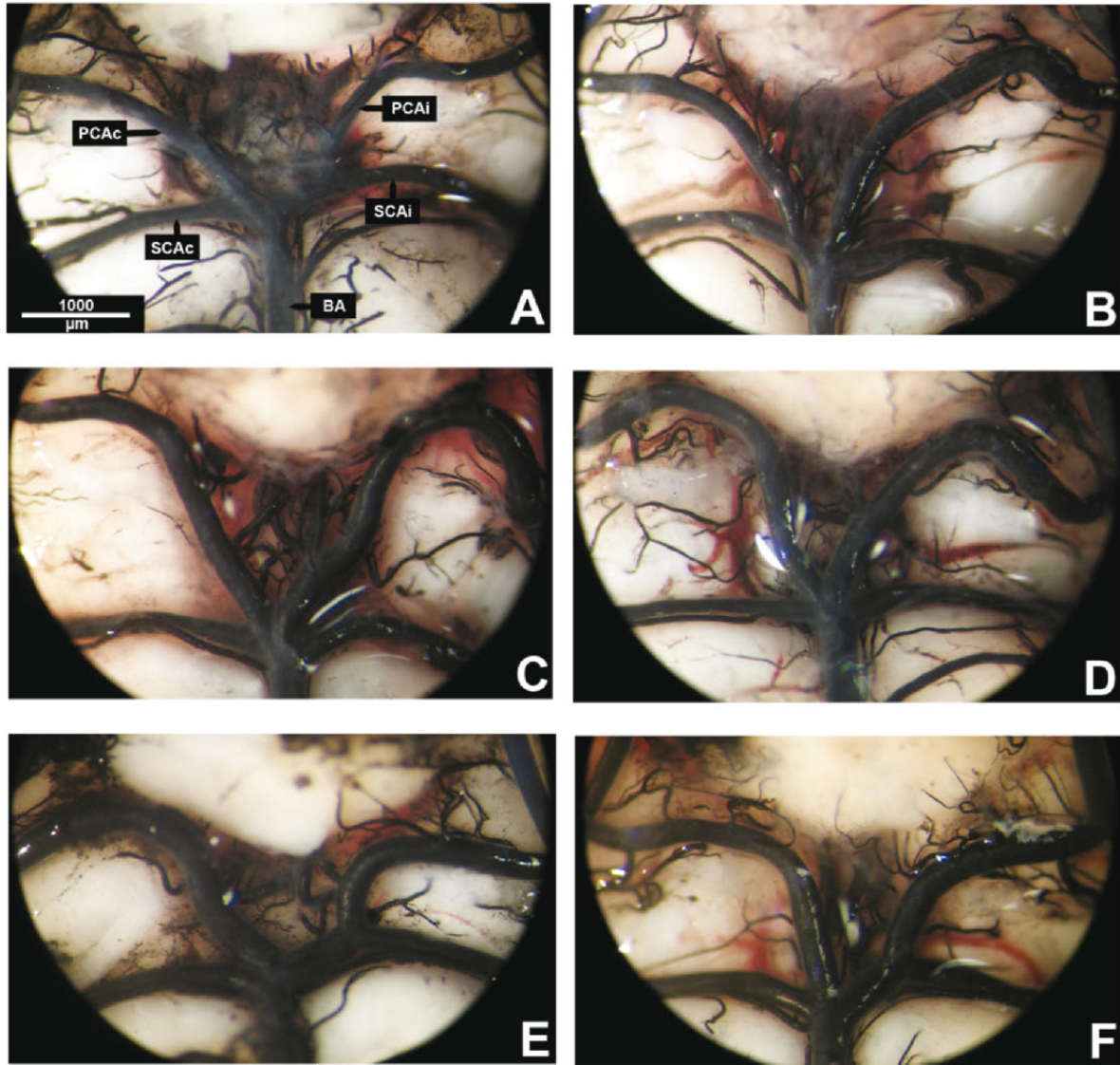
Die mit dem ACE-Hemmer und den Bradykininrezeptor-Blockern behandelten Tiere hatten ebenfalls vergrößerte Diameter der A. cerebri posterior (ipsilateral  $274 \pm 20 \mu\text{m}$ , kontralateral  $252 \pm 20 \mu\text{m}$ ). Auch A. communicans posterior (ipsilateral  $259 \pm 38 \mu\text{m}$ , kontralateral  $221 \pm$



22  $\mu\text{m}$ ), A. carotis interna (ipsilateral  $302 \pm 43 \mu\text{m}$ , kontralateral  $269 \pm 37 \mu\text{m}$ ), A. cerebri media (ipsilateral  $223 \pm 33 \mu\text{m}$ , kontralateral  $212 \pm 12 \mu\text{m}$ ) und A. cerebri anterior (ipsilateral  $243 \pm 48 \mu\text{m}$ , kontralateral  $226 \pm 30 \mu\text{m}$ ) zeigten vergrößerte Diameter. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe stellte sich somit bei der A. cerebri posterior bilateral, A. communicans posterior ipsilateral, A. carotis interna bilateral sowie der A. cerebri anterior kontralateral eine Signifikanz dar. Im Vergleich mit der mit dem ACE-Hemmer behandelten Gruppe waren die ipsilateralen A. cerebri posterior, A. communicans posterior, A. carotis interna und A. cerebri anterior signifikant vergrößert (Abbildung 28).

Die nominalen Signifikanzniveaus lagen im zweiten Teilversuch für die A. cerebri posterior ipsilateral bei  $p = 0,05$ , für die A. cerebri posterior kontralateral, A. communicans posterior beidseitig, A. carotis interna ipsilateral und A. cerebri anterior ebenfalls beidseitig bei jeweils  $p = 0,025$ . Für die ipsilaterale A. cerebri media bestand keinerlei Signifikanz. Bei der kontralateralen A. carotis interna und A. cerebri media galt  $p = 0,038$ .

Zur Veranschaulichung sollen in Abbildung 29 repräsentative Beispiele aus den jeweiligen Gruppen dienen.



**Abbildung 29** Vergleich von Aufnahmen der Aa. cerebri posteriores nach Latexperfusion. A = unbehandelt, B = Kontrolle (21d), C =  $AT_1R$ -Antagonist, D =  $AT_2R$ -Agonist, E = ACE-Hemmer und F = ACE-Hemmer & Bradykininrezeptor-Blocker. BA = A. basilaris, SCA = A. cerebelli superior, PCA = A. cerebri posterior, i = ipsilateral, c = kontralateral.

ERGEBNISSE

	A. cerebri posterior		A. communicans posterior		A. carotis interna		A. cerebri media		A. cerebri anterior	
	ipsi	kontra	ipsi	kontra	ipsi	kontra	ipsi	kontra	ipsi	kontra
<b>unbehandelt (n=10)</b>	154 ± 34	143 ± 19	196 ± 34	214 ± 18	264 ± 28	286 ± 22	196 ± 38	214 ± 22	213 ± 22	210 ± 25
<b>Kontrolle (21d) (n=8)</b>	263 ± 30*	253 ± 39*	275 ± 57*	246 ± 41*	367 ± 57*	318 ± 45*	268 ± 25*	232 ± 41	341 ± 52*	285 ± 56*
<b>AT<sub>1</sub>R-Antagonist (n=8)</b>	265 ± 17	238 ± 45	251 ± 29	243 ± 24	362 ± 38	291 ± 28	236 ± 19 <sup>#</sup>	226 ± 23	325 ± 32 <sup>†</sup>	257 ± 34
<b>AT<sub>2</sub>R-Agonist (n=7)</b>	268 ± 37	244 ± 41	249 ± 50	248 ± 19	341 ± 49	301 ± 21	233 ± 29 <sup>#</sup>	231 ± 28	280 ± 42 <sup>#†</sup>	237 ± 30 <sup>#</sup>
<b>Kontrolle (7d) (n=10)</b>	212 ± 10*	205 ± 19*	201 ± 35	191 ± 18	243 ± 25	228 ± 21*	212 ± 40	187 ± 22*	206 ± 27	187 ± 23
<b>ACE-Hemmer (n=8)</b>	244 ± 18 <sup>#‡</sup>	232 ± 50	203 ± 31 <sup>‡</sup>	233 ± 44 <sup>#</sup>	260 ± 40 <sup>‡</sup>	280 ± 56 <sup>#</sup>	201 ± 36	222 ± 36 <sup>#</sup>	200 ± 43 <sup>‡</sup>	236 ± 64
<b>ACE-Hemmer &amp; BRB (n=8)</b>	274 ± 20 <sup>#‡</sup>	252 ± 20 <sup>#</sup>	259 ± 38 <sup>#‡</sup>	221 ± 22	302 ± 43 <sup>#‡</sup>	269 ± 37 <sup>#</sup>	223 ± 33	212 ± 12	243 ± 48 <sup>‡</sup>	226 ± 30 <sup>#</sup>

**Tabelle 7** Übersicht der Ergebnisse aus der Latexangiographie. Mittelwerte ± Standardabweichung, auf volle µm gerundet, ipsi = ipsilateral, kontra = kontralateral. \*  $p \leq 0,05$  gegenüber den Unbehandelten, #  $p \leq 0,05$  gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe (7 resp. 21 Tage), †  $p \leq 0,05$  AT<sub>1</sub>R-Antagonist gegenüber AT<sub>2</sub>R-Agonist, ‡  $p \leq 0,05$  ACE-Hemmer gegenüber ACE-Hemmer plus Bradykininrezeptor-Blocker.

#### 4.6 HISTOLOGIE

Für die histologische Auswertung wurden die Gehirne von je drei Tieren der Kontrollgruppe (sieben Tage), der ACE-Hemmer-Gruppe und der Gruppe, die mit ACE-Hemmer und Bradykininrezeptor-Blocker behandelt wurden, untersucht. Aus jeder Schnittreihe, die pro Tier angefertigt wurde, wurde jeweils ein Objektträger aus der Anfangs-, Mittel- und Endregion gewählt und für die immunhistologische Untersuchung verwendet.

Die Auszählung der einzelnen Parameter der Arteria cerebri posterior ergab die in Tabelle 8 aufgezeigten Ergebnisse.

Gruppe	Schnitte (Anzahl)	Kerne (T. intima)	Kerne (T. media)	Kerne (perivaskulär)	SMC-Schichten
Kontrolle (7d) (n=3)	50	1,24 ± 0,67	1,04 ± 0,80	0,76 ± 0,55	2,62 ± 0,44
ACE-Hemmer (n=3)	47	0,48 ± 0,65*	0,41 ± 1,13	0,17 ± 0,38*	3,23 ± 0,47*
ACE-Hemmer & BRB (n=3)	47	1,11 ± 0,82	0,50 ± 0,66	0,13 ± 0,23*	3,36 ± 0,45*

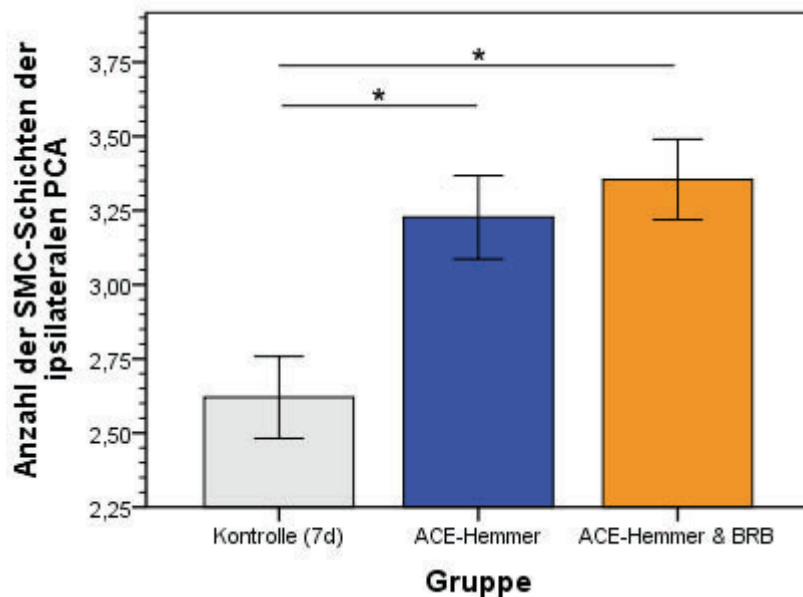
**Tabelle 8** Übersicht der Ergebnisse aus der immunhistochemischen Untersuchung. Mittelwerte ± Standardabweichung, auf zwei Stellen nach dem Komma gerundet, SMC = smooth muscle cells (glatte Muskulatur), T. = Tunica. \* nominaler p-Wert ≤ 0,033 gegenüber der Kontrollgruppe (7d).

Alle Antikörper, die während dieser Färbung verwendet wurden, sind für formalinfixierte, in Paraffin gebettete Schnitte geeignet. Zu Beginn konnte mit dem Ziegen Serum eine sehr gute Blockade unspezifischer Bindungsstellen erzielt werden.

##### *Anzahl der Schichten glatter Muskulatur*

Die Markierung mit dem Anti-Actin,  $\alpha$ -Smooth Muscle – FITC-Antikörper führte unter blauem Licht zu einer hellgrünen Darstellung der Muskelzellschichten in der Gefäßwand, wodurch diese abgrenz- und zählbar waren. Die Kontrollgruppe (sieben Tage) zeigte im Mittel  $2,62 \pm 0,44$  Schichten glatter Gefäßmuskulatur im Querschnitt der A. cerebri posterior. Dagegen waren die Muskelzellschichten der ACE-Hemmer-Gruppe ( $3,23 \pm 0,47$ ) und der

Gruppe, die mit ACE-Hemmer und Bradykininrezeptor-Blockern behandelt wurde ( $3,36 \pm 0,45$ ), signifikant erhöht. Diese Ergebnisse sind in der Abbildung 30 veranschaulicht.



**Abbildung 30** Darstellung der Anzahl glatter Gefäßmuskelschichten der A. cerebri posterior (PCA) im Gruppenvergleich. SMC = smooth muscle cells / glatte Muskelzellen. \* nominaler p-Wert  $\leq 0,033$ . Fehlerbalken: Standardfehler  $\pm 1$ .

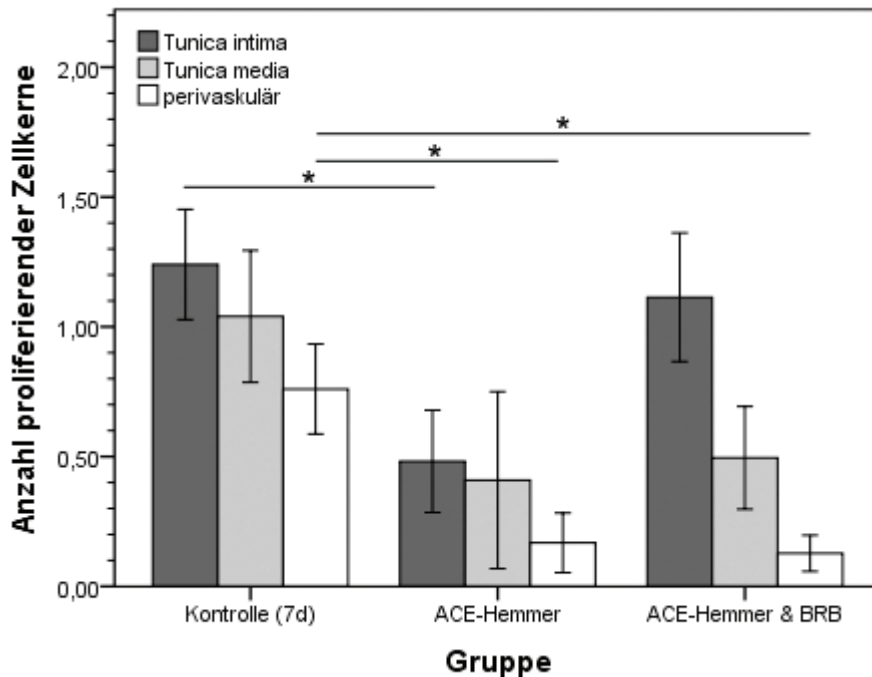
#### Anzahl proliferierender Zellkerne

Mit Hilfe des Cy3-markierten Ki-67-Antikörpers wurden einzelne, in der Interphase des Zellzyklus befindliche Zellkerne detektiert, die zusätzlich mit einer Hoechst-Zellkernfärbung gegengefärbt wurden. Dadurch konnten diese aktiven Kerne deutlich von anderen Zellkernen unterschieden werden.

In der Tunica intima der A. cerebri posterior fanden sich dabei in der Kontrollgruppe im Mittel  $1,24 \pm 0,67$  aktive Zellkerne, in der Gruppe „ACE-Hemmer & BRB“  $1,11 \pm 0,82$ . Demgegenüber war die Anzahl proliferierender Kerne in der ACE-Hemmer-Gruppe signifikant reduziert ( $0,48 \pm 0,65$ ).

In der Tunica media waren keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf aktive Zellkerne erkennbar [Kontrolle (7d)  $1,04 \pm 0,80$ ; ACE-Hemmer-Gruppe  $0,41 \pm 1,13$  und die mit ACE-Hemmer und Bradykininrezeptor-Blockern behandelte Gruppe  $0,50 \pm 0,66$ ].

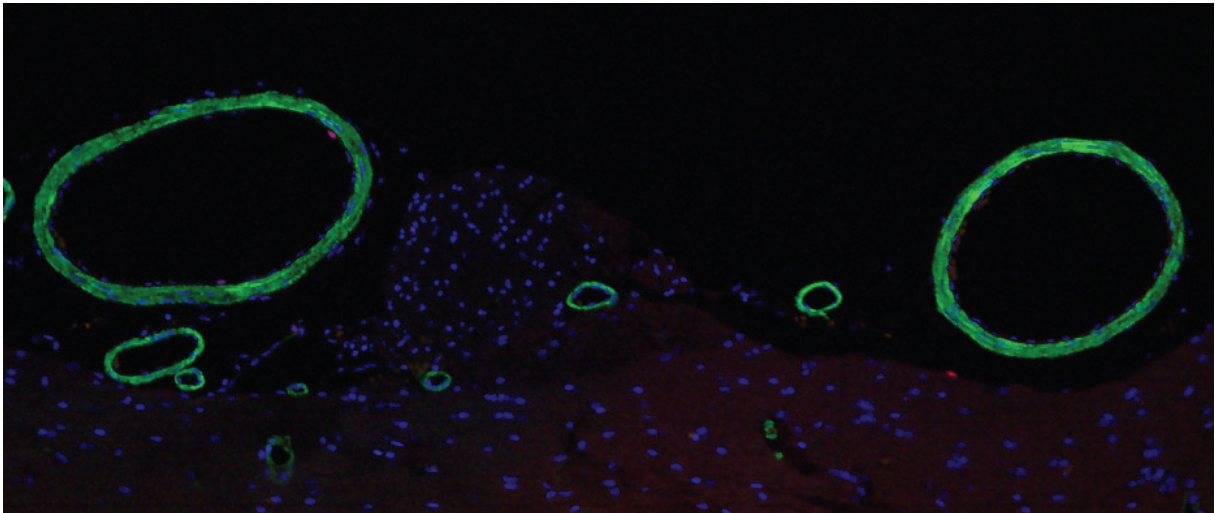
Im perivaskulären Bereich hingegen zeigten sich in der Kontrollgruppe signifikant mehr proliferierende Zellkerne ( $0,76 \pm 0,55$ ) als in der mit ACE-Hemmer behandelten Gruppe ( $0,17 \pm 0,38$ ) sowie der Gruppe, die mit ACE-Hemmer und Bradykininrezeptor-Blockern behandelt wurde ( $0,13 \pm 0,23$ ). Als Gegenüberstellung dieser Auswertung dient Abbildung 31.



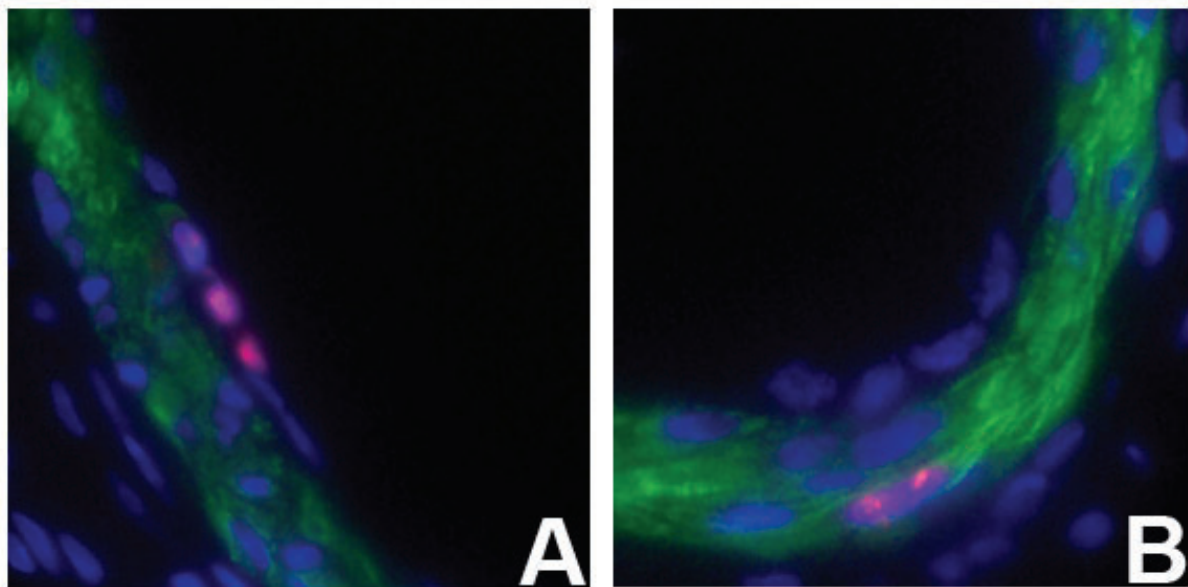
**Abbildung 31** Darstellung der Anzahl proliferierender Zellkerne der *A. cerebri posterior* im Gruppenvergleich. \* nominaler  $p$ -Wert  $\leq 0,033$ . Fehlerbalken: Standardfehler  $\pm 1$ .

#### *Fotografische Darstellung der Immunfluoreszenz-Auswertung*

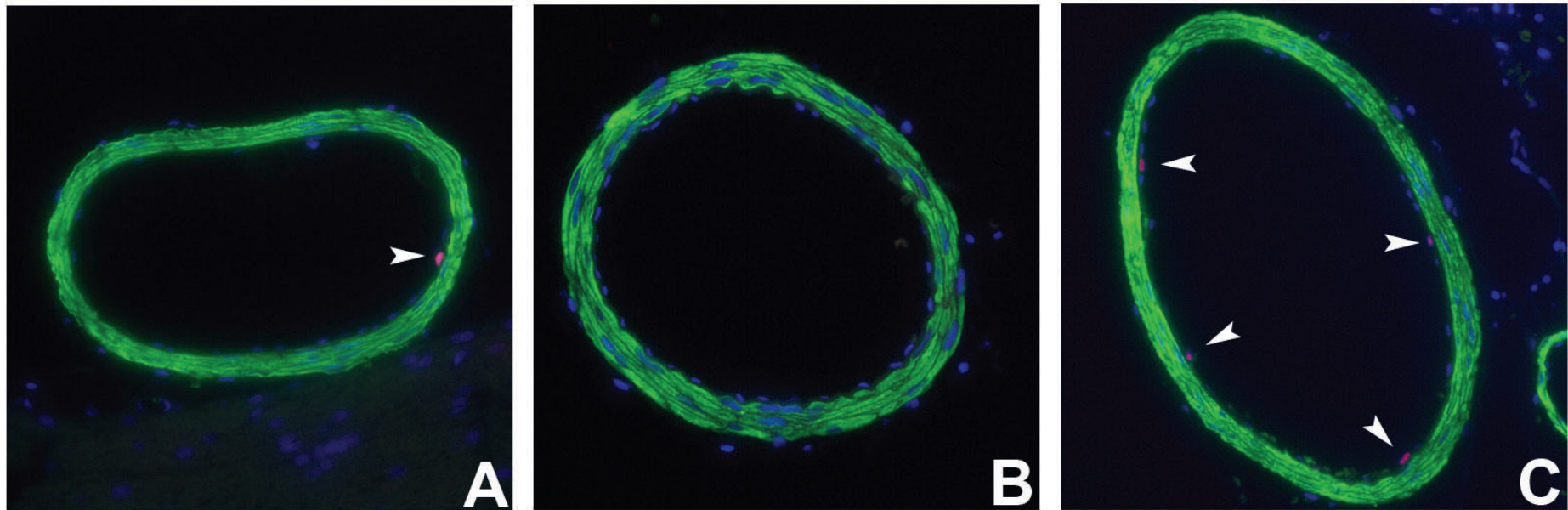
Die jeweilig eingesetzten Antikörper agieren in verschiedenen Wellenlängenspektren, das heißt sie fluoreszierten auch nicht unter einer einheitlichen Wellenlänge. Zur fotografischen Darstellung wurden daher die Einzelaufnahmen übereinander gelegt. Dadurch färbten sich proliferierende Kerne pink (hellrot auf blau). Die Abbildung 32 und Abbildung 33 zeigen zum einen Anschnitte der *A. cerebri posterior* sowie der *A. communicans posterior* und zum anderen unterschiedliche Lokalisationen von markierten, proliferierenden Zellkernen der Gefäßwand. Die Abbildung 34 demonstriert repräsentative Beispiele aus den jeweiligen Versuchsgruppen.



**Abbildung 32** Sagittal angeschnittene Hirnregion mit der ipsilateralen A. cerebri posterior (links) und A. communicans posterior (rechts) im Querschnitt. Grün = Anti-Actin,  $\alpha$ -Smooth Muscle-markierte glatte Gefäßmuskelzellen, blau = Hoechst 33342-markierte Zellkerne, pink = Anti-Rat Ki-67-markierte Zellkerne (im Proliferationsstatus).



**Abbildung 33** Unterschiedliche Formen bzw. Lokalisierung der proliferierenden Zellkerne. Sichtbare Endothelzellkerne (A) und Kerne der Gefäßmuskelzellen (B). Grün = Anti-Actin,  $\alpha$ -Smooth Muscle-markierte glatte Gefäßmuskelzellen, blau = Hoechst 33342-markierte Zellkerne, pink = Anti-Rat Ki-67-markierte Zellkerne (im Proliferationsstatus).



**Abbildung 34** Beispielbilder der immunhistochemischen Untersuchung aus der Kontrollgruppe (A), der mit ACE-Hemmer behandelten Gruppe (B) und der Gruppe, die sowohl mit ACE-Hemmer als auch mit Bradykininrezeptor-Blockern behandelt wurde (C). Die Pfeilspitzen markieren proliferierende Zellkerne. Grün = Anti-Actin,  $\alpha$ -Smooth Muscle-markierte glatte Gefäßmuskelzellen, blau = Hoechst 33342-markierte Zellkerne, pink = Anti-Rat Ki-67-markierte Zellkerne (im Proliferationsstatus).



## 5. DISKUSSION

Das Anliegen dieser Arbeit war es, den potentiellen Einfluss der Angiotensin II-Rezeptoren vom Subtyp 1 und 2 auf das zerebrale Kollateralwachstum zu untersuchen, da sie eine hohe vaskuläre Aktivität zeigen und an Strukturänderungen der Gefäßwand beteiligt sind (Mehta und Griendling, 2007). Darüber hinaus wurde das Potenzial des Kallikrein-Kinin-Systems, kollaterales Gefäßwachstum zu stimulieren, untersucht. Insbesondere die Schnittstelle des RAS und KKS, das Angiotensin Converting Enzyme (ACE), war hierbei von Interesse. Eine Hemmung des ACE führt zu einer Anhäufung von Bradykinin, von dem gezeigt werden konnte, dass es stimulierende Wirkung auf das Kollateralwachstum besitzt (Gatzke, 2011; Hillmeister, Gatzke *et al.*, 2011).

Die vorliegende Dissertation demonstriert erstmals die Auswirkungen einer Beeinflussung des RAS und KKS auf die zerebrale Arteriogenese im normotensiven Tier. In Bezug auf die Angio- und Atherogenese wurden dem AT<sub>1</sub>R bereits proliferative Eigenschaften nachgewiesen (Nickenig, 2002; Sasaki, Murohara *et al.*, 2002). Angesichts der Parallelen dieser vaskulären Umbauprozesse rückte nun die Überprüfung der Einflüsse auf die Arteriogenese ins Blickfeld. Die Annahme, dass eine Inhibierung des AT<sub>1</sub>R, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde, auch mit einer Proliferationshemmung während des Kollateralwachstums einhergeht, hat sich hier nicht bestätigt. Auch die Stimulation mit dem AT<sub>2</sub>R-Agonisten, der dem AT<sub>1</sub>R gegenüber counterregulatorisch wirkt, hemmte die zerebrale Arteriogenese nicht signifikant.

Demgegenüber konnte gezeigt werden, dass die Hemmung des ACE und die korrelierende erhöhte Bradykininkonzentration das kollaterale Wachstum gefördert hat. Dagegen wurde durch die zusätzliche Blockade beider Kininrezeptoren der arteriogene Prozess nicht - wie erwartet - aufgehoben, sondern erfuhr paradoxerweise eine weitere Stimulation.

## 5.1 BEWERTUNG DER METHODEN

### 5.1.1 DREI-GEFÄß-VERSCHLUSS-MODELL

Zur Erzeugung einer zerebralen Hypoperfusion wurde der Drei-Gefäß-Verschluss, d.h. ein bilateraler Verschluss der Aa. vertebrales gefolgt von einer Ligatur der linken A. carotis communis, durchgeführt. Dadurch kommt es zu einem veränderten Blutfluss im Circulus arteriosus cerebri (Willisi), sodass der Blutfluss durch das vorhandene Kollateralgefäßsystem umgeleitet wird. Durch die verstärkte Beanspruchung dieser Arteriolen findet ein Umbauprozess statt, an dessen Ende ein funktionell ausgereiftes Kollateralgefäß steht. Im Jahre 2003 haben Busch und seine Kollegen die Etablierungsstudie für dieses Versuchsmodell veröffentlicht. Die bedeutendste Eigenschaft dieses *in vivo*-Modells ist es, die Arteriogenese im zerebrovaskulären System zu induzieren, ohne dabei Gewebeschäden hervorzurufen (Busch, Buschmann *et al.*, 2003).

Die Gefäßarchitektur des Circulus arteriosus cerebri (Willisi) weist nur wenige Unterschiede zwischen Mensch und Ratte auf. Die großen, den Kollateralring bildenden Gefäße sind morphologisch bei beiden Spezies vergleichbar. In dem rostralen Anteil lassen sich Unterschiede bezüglich der Arteria cerebri anterior erkennen, die beim Menschen meist nur einseitig, bei Ratten aber beidseitig prominent ausfällt. Daneben ist die Arteria olfactoria zwar bei der Ratte, aber nicht beim Menschen ausgebildet (Lee, 1995). Dies bietet eine gute Voraussetzung, die Reaktion von Kollateralgefäßen im zerebralen System während des Zustandes einer Hypoperfusion im Tiermodell zu simulieren. Die Fähigkeit der Kollateralen, das Gehirn trotz einer Minderung des Blutflusses adäquat zu versorgen, ist von großer medizinischer Bedeutung und unterliegt in der Klinik sowohl funktionellen als auch bildgebenden Untersuchungen. Der Grad der Kollateralgefäßausbildung ist mitunter für das Eintreten oder Ausbleiben eines ischämischen Insultes entscheidend (Derdeyn, Videen *et al.*, 1999; Liebeskind, 2005).

Es ist demnach durchaus anzunehmen, dass eine Übertragbarkeit der Erkenntnisse aus dem zerebralen Hypoperfusionsmodell in der Ratte auf den Menschen möglich ist. Auf Grund des regen wissenschaftlichen Interesses am zerebralen Kollateralwachstum, gerade in Bezug auf zerebrale Ischämien, wurde das Drei-Gefäß-Verschluss-Modell in diversen Projekten an verschiedenen Instituten erfolgreich verwendet (Buschmann, Busch *et al.*, 2003; Schneeloch, Mies *et al.*, 2004; Hillmeister, Lehmann *et al.*, 2008; Duelsner, Gatzke *et al.*, 2012a).

Alternative Versuche für den spezifischen Ansatz, die zerebrale Arteriogenese operativ zu induzieren, ohne dabei eine zerebrale Ischämie auszulösen, haben sich bisher nicht durchsetzen können. Reduziert man die Verschlüsse auf zwei (Aa. vertebrales) oder lediglich ein Gefäß (A. carotis communis), so lässt sich bei der Ratte keine dauerhafte oder hämodynamisch ausreichende Hypoperfusion erzeugen. Werden dagegen alle vier Gefäße okkludiert (Aa. vertebralis und A. carotis sinistra et dextra), übersteigt das die Kompensationsfähigkeit des Kollateralsystems und der zerebrale Blutfluss fällt stark ab. Auch dies konnten Busch und Kollegen beweisen (Busch, Buschmann *et al.*, 2003). Es soll jedoch erwähnt werden, dass das 3-VO-Modell nicht auf die Maus übertragbar ist (nicht publizierte Daten vorangegangener Studien). Bei der Maus lässt sich bereits durch den Verschluss einer A. carotis communis (common carotid artery occlusion, CCAO) eine Blutflussänderung erzielen, die für eine Induktion der zerebralen Arteriogenese ausreichend ist (Duelsner, Gatzke *et al.*, 2012b).

Mit dem vorliegenden Projekt konnte einmal mehr die Reproduzierbarkeit dieses 3-VO-Modells in der Ratte bestätigt werden. Es zeigt seine Eignung, die vaskulären Umbauprozesse während der zerebralen Arteriogenese zu analysieren und zu bewerten. Basierend auf dieser Stabilität, die bereits in den o.g. Arbeiten bewiesen werden konnte, wurde im Rahmen des vorliegenden Projektes auf den Einsatz von Sham-Gruppen verzichtet. Solche Gruppen dienen lediglich dazu, die Effekte eines Modells zu validieren.

### **5.1.2 MESSUNG DER ZEREBROVASKULÄREN RESERVEKAPAZITÄT**

Die physiologische Basis, die man für die Messung der zerebrovaskulären Reservekapazität ausnutzt, ist die zerebrale Autoregulation. Punkt 3.1.2 beschreibt dies im Detail. Die CVRC-Messung ermöglicht eine Quantifizierung der zerebrovaskulären Reaktivität als funktioneller Parameter zur Bestimmung der zerebralen Arteriogenese.

Mit Hilfe der Laser-Doppler-Flowmetrie wird bereits seit den 1970er Jahren der Blutfluss in der Mikrozirkulation non-invasiv gemessen (Fredriksson, Fors *et al.*, 2007). Diese Messung, ggf. auch mittels Doppler-Ultraschall, in Kombination mit dem Acetazolamid-Stimulationstest hat längst Einzug in die Klinik gehalten, um wichtige Erkenntnisse bezüglich des Gefäßstatus von Patienten zu erhalten sowie ein effektives Monitoring zu gewährleisten (Rogg, Rutigliano *et al.*, 1989; Piepgras, Schmiedek *et al.*, 1990; Stoll und Hamann, 2002).

Nach einer 3-VO wird der zerebrale Blutfluss im Circulus arteriosus cerebri (Willisi) so umgeleitet, dass die Kollateralgefäße in vermehrtem Maße beansprucht werden, da das zu transportierende Blutvolumen erhöht ist (Hossmann, 1993). Das führt zu einer maximalen passiven Vasodilatation dieser Gefäße, um die ausreichende Perfusion des Gehirns aufrechtzuerhalten. In der Folge kann nun kein zusätzlicher Stimulus eine weitere Vasodilatation hervorrufen. Dies bedeutet, dass die zerebrovaskuläre Reservekapazität null entspricht, also aufgehoben ist. Durch die verstärkte Beanspruchung und die somit erhöhte Schubspannung an der Gefäßwand wird das Endothel aktiviert und die adaptive Arteriogenese wird eingeleitet. Die Kollateralen wachsen im Durchmesser und in der Länge, wodurch wiederum nicht nur der Grundbedarf des Gewebes gedeckt wird, sondern darüber hinaus die zerebrale Autoregulation wieder einsetzen kann (Busch, Buschmann *et al.*, 2003; Franco Folino, 2007).

Ein wirksamer Stimulus für eine maximal durchführbare zerebrale Vasodilatation *in vivo* ist die Gabe von Acetazolamid. Dieser Carboanhydrase-Hemmer erhöht den  $p\text{CO}_2$  und senkt parallel den pH des Blutes. Beides lässt sich mit Hilfe einer Blutgasanalyse kontrollieren. Durch den Abfall des Blutdruckes werden die arteriellen Gefäße im Gehirn gemäß der Autoregulation weit gestellt (Rogg, Rutigliano *et al.*, 1989; Franco Folino, 2007). Der unterschiedliche Reifungsgrad der Kollateralen spiegelt sich schließlich in der Höhe der CVRC wider. Somit kann der Einfluss verschiedener Agenzien auf die Arteriogenese funktionell abgeschätzt werden.

Neben der Gabe von Acetazolamid lässt sich eine zerebrale Vasodilatation auch über eine direkte Beatmung mit erhöhtem  $\text{CO}_2$  erzielen, wodurch folglich auch der  $p\text{CO}_2$  des Blutes ansteigt. Busch *et al.* verwenden diese Methode (Busch, Buschmann *et al.*, 2003). Sie ist aber aus Gründen der Praktikabilität und Modellsicherheit von der Acetazolamid-Applikation ersetzt worden. Von dem Acetazolamid genügt bei der Ratte üblicherweise eine Dosis von 20 mg/kg KG, um standardisierte maximale Effekte zu erzielen (Demolis, Florence *et al.*, 2000; Duelsner, Gatzke *et al.*, 2012b; Duelsner, Gatzke *et al.*, 2012a). Der in der Humanmedizin weiterhin übliche Breath-Holding (engl., Atemanhalten)- und auch der Hand-Gripping-Test (englisch für Handgreifen) zur Steigerung der zerebralen Perfusion sind im Tierversuch nicht anwendbar (Stoll und Hamann, 2002).

Bei der Untersuchung eines funktionellen Parameters ist es immer ratsam, sich an ein striktes Protokoll zu halten, da die Streuung der Ergebnisse durch verschiedenste Einflüsse möglichst gering gehalten werden sollte. Ein Kriterium, welches die funktionalen Parameter beeinflusst, ist das Vorhandensein individueller anatomischer Varietäten. Solche biologischen Eigenschaften konnten mit einer angemessenen Gruppengröße von mindestens sechs Tieren ausgeglichen werden. Auch musste auf die Wahl des Rattenstammes geachtet werden, da das 3-VO-Modell für Ratten vom Sprague-Dawley-Stamm optimiert wurde, die im Vergleich zu Wistar-Ratten eine einheitlichere und deutlichere Kollateralausbildung zeigen (Busch, Buschmann *et al.*, 2003). Weitere wichtige Kriterien sind die Einhaltung des Narkoseregimes und der Umgebungstemperatur, da Abweichungen zu einer Beeinträchtigung der Methode führen können und das Auswerten erschweren bzw. unmöglich machen.

Sind diese Grundlagen bekannt und erfolgt eine gezielte Einhaltung der Methodenabläufe, so lassen sich anhand des funktionellen Mechanismus der zerebrovaskulären Reaktivität zuverlässig Beeinflussungen der arteriogenen Signalwege analysieren.

### **5.1.3 LATEXANGIOGRAPHIE**

Für die morphologische Auswertung der Gefäßdiameter wurde mit schwarzer Tinte gefärbte Latexmilch über die A. carotis communis in das zerebrale Gefäßsystem perfundiert. Die postmortale Latexangiographie ist eine Methode, die Coyle und Kollegen zur Untersuchung von Hirngefäßen veröffentlichten (Coyle und Jokelainen, 1983; Coyle und Panzenbeck, 1990). Erst Maeda *et al.* mischten die Latexmilch mit einer kleinen Menge schwarzer Tinte, um den Kontrast zum umliegenden Hirngewebe zu erhöhen (Maeda, Hata *et al.*, 1998). Diese modifizierte Methode hat sich seither zur Darstellung von zerebralen Gefäßen im Tiermodell durchgesetzt und findet in verschiedenen Forschergruppen beständig Anwendung.

In tiefer Narkose erfolgte die Applikation von Papaverin, was über die Relaxation von glatten Muskelzellen vasospasmolytisch wirkt, wodurch sich die Gefäße maximal weitstellen und das Tier durch die akut einsetzende Hypotonie schmerzlos stirbt. Nur mittels einer maximalen Vasodilatation konnte ein standardisierter Vergleich der Gefäßdurchmesser gewährleistet werden. Damit sich die Viskosität der Latexmilch nicht erhöhte, wurde auf deren Warmhaltung bis zur Anwendung geachtet. Um eine künstliche Dehnung oder gar eine Ruptur der zerebralen Gefäße zu verhindern, wurde für die Perfusion eine automatische Pumpe genutzt, sodass ein Druck von 150 mmHg nicht überschritten werden konnte.

Weiterhin waren die Inzisionen der linken Arteria carotis communis sowie des rechten Herzohres obligat, um einer Druckerhöhung zu entgehen. In seltenen Fällen konnte es durch individuell-anatomische Besonderheiten dennoch zu Rupturen kommen, falls durch diese der Abfluss des flüssigen Latex behindert war. Solche Tiere konnten nicht in die Auswertung einbezogen werden, da die Gefäßfüllung durch erhöhte Drücke beeinflusst und damit die Werte der Diameter fehlerhaft gewesen wären.

Nach Abschluss der Latexperfusion musste schließlich auf eine ausreichende Kühlung des Tieres vor der Dekapitation geachtet werden, andernfalls wäre es möglich gewesen, dass Latex über die durchtrennte Arteria basilaris wieder aus dem Circulus arteriosus cerebri (Willisi) herausfließt und die Gefäße kollabieren.

Auch in dem vorliegenden Projekt erwies sich die Latexangiographie als zuverlässige Methode, mit der eine morphologische Auswertung sehr gut durchgeführt werden konnte.

#### **5.1.4 HISTOLOGIE**

Für die histologische Auswertung wurden die HE-Färbung und die Immunhistochemie gewählt. Die letztere, sehr sensible Methode verlangte eine strikte Einhaltung des Versuchsprotokolls, um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen.

Der verwendete monoklonale Antikörper gegen das in Zellkernen von Ratten exprimierte Ki-67 ist ein Immunglobulin G (IgG) 1 aus der Maus. Das Ki-67-Antigen ist ausschließlich in Zellkernen vorzufinden, die sich in der aktiven Phase ihres Zellzyklus befinden (Scholzen und Gerdes, 2000). Zur Markierung dieses IgG1 wurde ein Cy3-konjugierter sekundärer Antikörper gegen IgG der Maus eingesetzt. Dieser reagiert sehr spezifisch nur auf das IgG1, das heißt nicht mit anderen Maus-IgG-Untergruppen. Als Positivkontrolle der Anti-Ki-67/Cy3-Färbung wurde parallel ein Kolonschnitt der Ratte gefärbt. Zur genauen Differenzierung ruhender und aktiver Zellkerne war eine Gegenfärbung mit Hoechst 33342-Reagenz sehr hilfreich.

Der Antikörper spezifisch gegen die  $\alpha$ -Isoform des Aktins von glatten Muskelzellen ist ein IgG2a der Maus (Skalli, Ropraz *et al.*, 1986) und ist bereits direkt mit FITC markiert.

## **5.2 INTERPRETATION DER ERGEBNISSE**

### **5.2.1 EINFLUSS AUF DAS KÖRPERGEWICHT**

Während der täglichen klinischen Untersuchung der Versuchstiere wurden deren Gewichte über den jeweiligen Versuchszeitraum gemessen und protokolliert. Auf diese Weise ließ sich der Gesundheitsstatus der Ratten kontinuierlich beobachten.

Bei der Verwendung des 3-VO-Modells zeigt sich einheitlich, dass unabhängig von der Art der Behandlung in den ersten beiden Tagen post operationem ein Gewichtsverlust von etwa fünf Prozent eintritt (Dülsner, 2009; Glaser, 2010; Gatzke, 2011). In der Regel erlangen Tiere, die in diesem Modell eingesetzt werden, etwa eine Woche nach der OP wieder ihr Ausgangsgewicht. Dies konnte hier ebenfalls bestätigt werden, besonders im ersten Teilversuch. Die Ratten im Teilversuch II erreichten bis zum Tag der Auswertung noch nicht ganz das Ausgangsgewicht, wobei sich auch zeigte, dass die ACE-Hemmer-Gruppe im Vergleich am weitesten vom Ausgangsgewicht entfernt war. Eine Signifikanz konnte dabei nicht beobachtet werden.

Der Gewichtsverlust nach der OP scheint in Zusammenhang mit der Invasivität des 3-VO-Eingriffes sowie der einsetzenden Hypoperfusion zu stehen, da Ratten in anderen Studien weniger Gewichtsverlust zeigten, wenn sie eine simulierte 3-VO erhielten, das heißt eine Operation ohne den Gefäßverschluss (Sham-Operation). Je größer ein invasiver Eingriff ist, desto deutlicher ist die postoperative Stressantwort, welche zu einer katabolen Stoffwechsellage führt (Desborough, 2000). Der Gewichtsverlust ist zudem ein Resultat der gesenkten zerebralen Perfusion. Diese führt zwar, wie beschrieben, zu keinen sichtbaren neurologischen Defiziten, aber es ist anzunehmen, dass das Tier anfänglich eine erhöhte Müdigkeit sowie Appetitlosigkeit zeigt, bis es sich von der Operation erholt hat. Nach der Erholungsphase zeigten insgesamt alle Tiergruppen bis zum Tag der Auswertung konstante Gewichtszunahmen.

#### 5.2.1.1 Gewichte im ersten Teilversuch

Über den Zeitraum von 21 Tagen ließ die AT<sub>2</sub>R-Agonist-Gruppe signifikant höhere Gewichtszunahmen erkennen als die Kontrolltiere und die AT<sub>1</sub>R-Antagonisten-Gruppe.

Da vorherige Studien um die Substanz Compound 21 keine vergleichbaren Daten bezüglich des Gewichtsverlaufes im genetisch unveränderten Tier publizierten, kann lediglich eine vorsichtige Aussage anhand der Resultate aus Diabetes-Studien getroffen werden. Sie zeigten, dass Mäuse mit einer AT<sub>2</sub>R-Defizienz nach einer Hochfettdiät vor einer Adipositas geschützt sind (Yvan-Charvet, Even *et al.*, 2005). Eine Stimulierung dieses Rezeptors könnte im Umkehrschluss also einen Einfluss auf den Fettstoffwechsel mit einer Erhöhung des Körpergewichts bedeuten. Dies würde die hier als Nebenbefund ermittelte Gewichtsdivergenz gegenüber den beiden Vergleichsgruppen erklären.

#### 5.2.1.2 Gewichte im zweiten Teilversuch

Die Tiere, die über einen Zeitraum von insgesamt sieben Tagen gehalten wurden, erlangten bis zum Tag der Auswertung etwa 99 % des Ausgangsgewichtes wieder. Dieser Wert fiel bei der mit dem ACE-Hemmer behandelten Tiergruppe minimal geringer aus. Auch wenn die Versuchszeit von einer Woche für diese Betrachtung sehr kurz war, geht sie konform mit Studien, die eine Gewichtsreduktion durch ACE-Hemmung bzw. -Eliminierung beschreiben (Jayasooriya, Mathai *et al.*, 2008; Weisinger, Begg *et al.*, 2008). Da sich hier keinerlei signifikante Unterschiede, sondern Tendenzen zeigen, soll dies nur am Rande erwähnt sein.

### **5.2.2 EINFLUSS AUF DIE BLUTDRUCKWERTE**

Die Messung des Blutdruckes diente der Überwachung der Vitalwerte während der Messung der zerebrovaskulären Reservekapazität am 21. resp. siebenten Tag. Erwartungsgemäß senkten sowohl der AT<sub>1</sub>R-Antagonist Candesartan, als auch der ACE-Hemmer Ramipril den arteriellen Blutdruck ab. Bei letzterem wurde zudem ein signifikantes Niveau gegenüber unbehandelten Tieren erreicht. Die Behandlung der normotensiven Ratten vom Sprague-Dawley-Stamm mit dem AT<sub>2</sub>R-Agonisten Compound 21 führte zu keiner Änderung des Blutdrucks. Dies geht mit der Studie von Bosnyak und Kollegen konform, welche sowohl in normo- als auch in hypertensiven Ratten keine Blutdruckänderung durch AT<sub>2</sub>R-Stimulation ergab (Bosnyak, Welungoda *et al.*, 2010). Demgegenüber wurde jedoch durch eine andere



Arbeitsgruppe eine Senkung des Blutdruckes bei spontan hypertensiven Ratten gemessen (Wan, Wallinder *et al.*, 2004).

Die Doppelblockade der Bradykinin-Rezeptoren während der Behandlung mit dem ACE-Hemmer resultierte in einem leichten Wiederanstieg des Blutdruckes. Dies lässt darauf schließen, dass zumindest ein Teil der ACE-Hemmer-Wirkung über die Aktivierung der Bradykinin-Rezeptoren erfolgt (Bao, Gohlke *et al.*, 1992; Tom, Dendorfer *et al.*, 2002).

### **5.2.3 DREI-GEFÄß-VERSCHLUSS-MODELL**

Um die Funktionalität des Drei-Gefäß-Verschluss-Modells in der Ratte zu bestätigen, wurde bereits in mehreren Projekten mit Sham-Gruppen gearbeitet (Dülsner, 2009; Glaser, 2010; Gatzke, 2011). Sie zeigten einheitlich, dass ausschließlich die über eine 3-VO eingeleitete Hypoperfusion der Auslöser des zerebralen Kollateralwachstums ist und nicht eine Operation an sich. Im Sinne des 3R-Konzeptes des Tierschutzes wurde daher im vorliegenden Projekt auf Sham-Operationen verzichtet.

Die Überlebensrate von Tieren, die einer 3-VO unterzogen wurden, war sehr hoch und reiht sich zahlenmäßig in die Ergebnisse der vorangegangenen 3-VO-Studien ein (Dülsner, 2009; Glaser, 2010). Es handelte sich in den wenigen Todesfällen um Atemstillstände entweder während oder aber nach der Operation. Trotz strikter Einhaltung des Narkoseregimes kam es in seltenen Fällen vor, dass die anästhetische und analgetische Medikation zu einer Atemdepression führte, die sich nur in Ausnahmefällen beheben ließ. Hatten die Tiere jedoch die kritische OP-Phase überlebt, so kam es im gesamten jeweiligen Versuchszeitraum zu keinen gesundheitlichen Zwischenfällen mehr.

Während der Ligatur der linken A. carotis communis konnte ein ipsilateraler Perfusionsabfall auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes festgestellt werden. Der Wert blieb über eine Beobachtungszeit von zehn Minuten auf diesem Niveau erhalten, womit der Nachweis für eine dauerhafte Durchblutungssenkung erbracht war. Der zerebrale Blutfluss genügte jedoch, um zu jeder Zeit eine angemessene Versorgung des Hirngewebes zu gewährleisten.

Anhand der Kontrollgruppen ist erkennbar, dass das Kollateralwachstum im Gegensatz zu den unbehandelten Tieren induziert wurde. Das demonstrieren besonders die Ergebnisse der Latexangiographie (siehe Punkt 4.5). Funktionell zeigt sich das Kollateralwachstum durch die

Wiedererlangung der zerebrovaskulären Reservekapazität (Coyle und Panzenbeck, 1990; Busch, Buschmann *et al.*, 2003).

#### **5.2.4 MESSUNG DER ZEREBROVASKULÄREN RESERVEKAPAZITÄT, LATEXANGIOGRAPHIE UND HISTOLOGIE**

##### 5.2.4.1 Folgerungen aus den Ergebnissen

Zunächst wurden die Werte der zerebrovaskulären Reservekapazität von unbehandelten Tieren gemessen und als physiologischer Status vorausgesetzt. Die Ergebnisse zeigen, dass einen Tag nach der 3-VO die CVRC durch die maximale Beanspruchung der Gefäße nahezu vollständig ausgeschöpft ist. Dieser Vergleich dient als Funktionskontrolle und ist für die folgenden Analysen sehr aussagekräftig. Ein Anstieg des CVRC-Wertes in den Folgetagen nach einer 3-VO lässt den Schluss zu, dass dies nur durch Kollateralwachstum ermöglicht wurde.

Betrachtet man nun die Werte der Kontrollgruppe nach sieben resp. 21 Tagen, erkennt man deutlich den Verlauf der CVRC-Regeneration. Nach einer Woche ist diese nur marginal verbessert, doch nach drei Wochen ist bereits wieder ein Niveau erreicht, das für eine funktionierende, zerebrovaskuläre Reaktivität spricht. Diese Wiedererlangung der zerebralen Gefäßreaktivität resultiert aus dem Kollateralwachstum, durch welches nun nicht nur die ausreichende Perfusion gewährleistet ist, sondern überdies adäquat auf vasodilatatorische Stimuli reagiert werden kann (Busch, Buschmann *et al.*, 2003).

Wurden bei der CVRC-Messung negative Werte ermittelt, so liegt dem das sog. intrazerebrale Steal-Phänomen zu Grunde. Bei diesem wird nach einem vasodilatatorischen Reiz die Durchblutung in einem zerebrovaskulären Versorgungsgebiet zu Gunsten eines anderen verringert: Bei ernsten zerebralen Verschlüssen ist die autoregulatorische Reserve auf der betroffenen Seite erschöpft, wodurch es zu einem „Blut-Abzug“ über andere, weiter dilatierte Gefäße kommt und damit die Perfusion unter den Ausgangswert fällt. Es wurde festgestellt, dass dieses Phänomen häufiger bei Patienten mit schwach ausgebildeten Kollateralgefäßen in Erscheinung tritt (Kuwabara, Ichiya *et al.*, 1995). Solch ein gemessener Wert offenbart gleichwohl eine vollständig aufgehobene CVRC.

#### 5.2.4.2 AT-Rezeptoren haben keinen Einfluss auf zerebrale Arteriogenese nach 3-VO

Im Teilversuch I wurde den Ratten entweder der AT<sub>1</sub>R-Antagonist Candesartan-Cilexetil oder der AT<sub>2</sub>R-Agonist Compound 21 verabreicht. Nach der 21-tägigen Behandlung wurde bei der CVRC zwar kein signifikanter Unterschied zu der Kontrollgruppe gemessen, dennoch zeichnete sich eine leichte Hemmungstendenz ab. Dieser Trend trifft allerdings nicht gleichermaßen für die angiographischen Ergebnisse zu, bei denen sich die Durchmesser der drei verglichenen Gruppen nicht unterschieden. Daher bleibt zu ergründen, ob die jeweilige Modulation an den AT-Rezeptoren lediglich die Reagibilität der Kollateralgefäße beeinflusst, nicht aber deren Remodeling nach einem Drei-Gefäß-Verschluss.

Wie bereits beschrieben, dient die Blockade des AT<sub>1</sub>R therapeutisch der Senkung des Blutdruckes. Durch die Hemmung wird die von Ang II als Ligand ausgelöste Vasokonstriktion verhindert (Timmermans, Wong *et al.*, 1993). Ein vasodilatatorischer Effekt wird auch durch die Stimulation des AT<sub>2</sub>R erzielt (Jones, Vinh *et al.*, 2008). Geht man davon aus, dass sowohl die Behandlung mit dem AT<sub>1</sub>R-Antagonisten als auch mit dem AT<sub>2</sub>R-Agonisten über 21 Tage eine Relaxation der Gefäße zur Folge hat, lässt sich daraus schließen, dass ein vasodilatatorischer Stimulus, wie die Applikation von Acetazolamid, keine erhebliche Änderung des Tonus erzielt. Dies könnte erklären, warum die angiographische Untersuchung keinen Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen erkennen lässt, jedoch eine tendenziell reduzierte CVRC gemessen wurde.

Die Resultate des ersten Teilversuches ließen allgemein erkennen, dass die Modulation der AT-Rezeptoren keinen signifikanten Einfluss auf die zerebrale Arteriogenese im 3-VO-Modell hat. Ang II als vasoaktives Hormon ist bekannt für seine Beteiligung an Entzündungsprozessen in der Gefäßwand. Es agiert über redox-sensitive Signalwege und kann auf diese Weise Adhäsionsmoleküle und Zytokine regulieren. So fördert es die Rekrutierung und Migration von Monozyten und deren Differenzierung zu Makrophagen (Ruiz-Ortega, Lorenzo *et al.*, 2001). Dies stellt eine deutliche Parallele zu den proliferativen Abläufen der Arteriogenese dar. Die Annahme, dass durch die Hemmung der AT<sub>1</sub>R eine Blockade der Monozyteninvasion erfolgt und damit gleichzeitig der Kollateralausbau gehemmt wird, hat sich jedoch nicht bestätigt. Ein wesentlicher Punkt unterscheidet die ATR-induzierten von den arteriogenen Entzündungsprozessen. Der initiale Auslöser für die Arteriogenese ist die aus der Schubspannung am Endothel resultierende Aktivierung von

Umbauvorgängen. Die Zellen eines unter permanenten Ang II-Einfluss stehenden Gefäßes hingegen produzieren eine hohe Menge reaktiver Sauerstoffspezies, deren Einwirkung zu den benannten inflammatorischen Prozessen führt (siehe Punkt 2.3.3). In Bezug auf die AT-Rezeptoren erscheint offensichtlich nur eines der beiden „Janus“-Gesichter (Vgl. Punkt 2.2.3, Janus-Phänomen), nämlich das der Atherosklerose. Die mechanische Belastung durch Spannungsreize, wie sie bei Hypertonikern auftritt, ist dabei ein weiterer Faktor zu dem Ang II-induzierten, pathologischen Remodeling, vor allem, weil es zu einer zusätzlichen Ausschüttung von MCP-1 beiträgt (Tummala, Chen *et al.*, 1999; Weiss, Kools *et al.*, 2001). Wandern schließlich lipidbeladene Monozyten in das Gebiet ein, so entwickeln sich entzündliche Läsionen zu atherosklerotischen Plaques (Steffens und Mach, 2004). Dieses Zusammenwirken beschreibt das Risiko für Bluthochdruckpatienten, an Atherosklerose zu erkranken.

Es soll hier herausgestellt werden, dass der Einfluss der AT-Rezeptoren im vorliegenden Projekt an gesunden Sprague Dawley-Ratten untersucht wurde, um die Signalwege und Modulationsmechanismen der zerebralen Arteriogenese nach einer 3-VO zu analysieren. Die Situation im hypertonen Kreislaufsystem offenbart bereits ohne einen Gefäßverschluss Umbauprozesse der Gefäßwandstrukturen (Thubrikar und Robicsek, 1995), wodurch die Erkennung und Bewertung der Signalkaskaden erschwert wird. Es ist dementsprechend möglich, dass eine Untersuchung des RAS in Bezug auf das Kollateralwachstum in spontanhypertensiven Rattenstämmen zu divergenten Ergebnissen führt. So wurde beispielsweise von einer japanischen Arbeitsgruppe gezeigt, dass eine antihypertensive Behandlung von spontan hypertensiven Ratten mit Olmesartan das zerebrale Infarktisiko signifikant senkt, da sie die endotheliale Funktion erhält (Oyama, Yagita *et al.*, 2010). Es wurde zusätzlich aufgeführt, dass der Bluthochdruck das leptomeningeale Kollateralwachstum nach einer Karotisligatur (common carotid artery occlusion, CCAO) abschwächt, jedoch durch die zweiwöchige antihypertensive Behandlung wieder hergestellt und auch so das Infarktvolumen reduziert werden konnte (Omura-Matsuoka, Yagita *et al.*, 2011).

Daneben konnte in anderen Organsystemen von spontan hypertensiven Ratten die dosisabhängige, anti-inflammatorische Wirkung einer AT<sub>1</sub>R-Blockade gezeigt werden. In den Nieren dieser Ratten haben höhere Dosen von Candesartan zu einer Reduktion von MCP-1 und NF- $\kappa$ B beigetragen (Yu, Gong *et al.*, 2007).

#### 5.2.4.3 Nicht umfassend geklärte Rolle des AT<sub>2</sub>R bei der Arteriogenese

Bindet ein Ligand an den AT<sub>2</sub>R, sorgt dies für eine Einschränkung der AT<sub>1</sub>R-vermittelten Reaktionen oder gar für eine gegensätzliche Wirkung der AT<sub>1</sub>R-vermittelten Effekte. Das Vorkommen des AT<sub>2</sub>R ist vornehmlich auf das fetale Gewebe begrenzt, er wird jedoch bei Adulten in entzündlicher Umgebung reexprimiert (Wan, Wallinder *et al.*, 2004). Angenommen, die durch den Drei-Gefäß-Verschluss ausgelöste zerebrale Arteriogenese ist ein ausreichender inflammatorischer Stimulus, welcher eine Erhöhung der AT<sub>2</sub>R-Expression bewirkt, so scheint die Behandlung mit einem Agonisten hier keine entscheidende Beteiligung am zerebralen Kollateralwachstum zu haben.

Dennoch ist nicht gänzlich klar, inwieweit der vasomotorische Einfluss des AT<sub>2</sub>R zu berücksichtigen ist. Es wurde gezeigt, dass der AT<sub>2</sub>R in seiner Konformation längst nicht so strikt ist wie der AT<sub>1</sub>R (Miura und Karnik, 1999). Damit wird er nicht nur nach der Erkennung eines spezifischen Epitops aktiviert, sondern lässt eine Bindung von Ang II-Metaboliten zu. So löst nicht nur die Bindung von Ang II eine Stimulation aus, sondern auch Ang(1-9), welches durch ACE2 aus Ang I entsteht (Vgl. Abbildung 4 unter Punkt 2.3.1). Die physiologische Funktion der als ACE2/Ang(1-9)-Achse bezeichneten Interaktion liegt aktuell im Forschungsinteresse vieler Arbeitsgruppen. Bisher wird angenommen, dass sie durch ihre Signalwirkung am AT<sub>2</sub>R als counterregulatorischer Mechanismus zum RAS fungiert (Flores-Munoz, Smith *et al.*, 2011; Ocaranza und Jalil, 2012). Damit kommt der ACE2/Ang(1-9)-Achse eine ähnliche Funktion zu wie dem Kininsystem.

Darüber hinaus ist bekannt, dass eine AT<sub>1</sub>R-Blockade, wie mit der Candesartan-Behandlung, in einer Erhöhung des verfügbaren Angiotensin II resultiert. Ang II kann schließlich über seine Bindung am AT<sub>2</sub>R den AT<sub>1</sub>R-induzierten Prozessen entgegenwirken (Widdop, Matrougui *et al.*, 2002). Wird hingegen mit einem AT<sub>2</sub>R-Agonisten behandelt, so kann parallel auch eine AT<sub>1</sub>R-Aktivierung stattfinden, da AT<sub>1</sub>R keiner Blockade unterliegt und Ang II binden kann. Im ersten Fall ist im Renin-Angiotensin-Komplex also möglicherweise ein Aktionsweg über den AT<sub>2</sub>R verfügbar, wohingegen sich im zweiten Fall *in vivo* gegebenenfalls ein Gleichgewicht beider Rezeptoraktivitäten einstellen kann (Savoia, D'Agostino *et al.*, 2011).

Ergänzend kommt hinzu, dass die Wirkung des AT<sub>2</sub>R nicht präzise von der des B<sub>2</sub>R zu differenzieren ist. Auf letzteren wird in den folgenden Abschnitten genauer eingegangen. Dennoch soll erwähnt sein, dass in der Literatur vom Vorkommen eines Heterodimers zwischen AT<sub>2</sub>R und B<sub>2</sub>R gesprochen wird (Abadir, Periasamy *et al.*, 2006). Verschiedene Studien zeigen, dass protektive Einflüsse von ARB durch eine Blockade des AT<sub>2</sub>R und des B<sub>2</sub>R moduliert werden können. Zum Beispiel konnte in einem Myokardischämie-Modell bei Schweinen die Infarktgröße mit einer Candesartan-Behandlung verringert werden (Jalowy, Schulz *et al.*, 1998). Dieser Effekt war jedoch aufgehoben, als zusätzlich die Applikation eines AT<sub>2</sub>R-Antagonisten sowie eines B<sub>2</sub>R-Antagonisten erfolgte. Beide Substanzen allein hatten keine Auswirkung auf die Infarktgröße. Es liegt daher nahe, dass die Infarktgrößenreduktion durch Candesartan über eine sekundäre Aktivierung des AT<sub>2</sub>R in Kombination mit dem Kininsystem erzielt wurde.

Betrachtet man nun atherosklerotische Aspekte in Bezug auf den AT<sub>2</sub>R, so zeigte eine Studie von Iwai und Kollegen ein interessantes Ergebnis: In ApoE-Knockout-Mäusen, welche zur Ausbildung atherosklerotischer Läsionen neigen, wurde über die Deletion des AT<sub>2</sub>R-Gens ein Doppel-Knockout entwickelt (ApoE-AT<sub>2</sub>R-Doppel-Knockout). Bei diesen Tieren war die Ausbildung der Atherosklerose noch einmal erhöht (Iwai, Chen *et al.*, 2005). Hier wurde schließlich postuliert, dass der anti-atherosklerotische Effekt des ARB Valsartan zumindest teilweise über die Stimulierung durch ungebundenes Ang II stattfindet.

Obwohl dem AT<sub>2</sub>R im vorliegenden Versuch keine Bedeutung für die zerebrale Arteriogenese nachgewiesen wurde, scheint er also in anderen kardiovaskulären Prozessen durchaus eine Rolle zu spielen. Wie bereits einleitend beschrieben, bedienen sich die Umbauvorgänge am Gefäßsystem oftmals ähnlicher Signalwege. Demnach sollte dieser Rezeptor weiterhin im Blickfeld der Forschung verbleiben, um seine genaue Involvierung in vaskuläre Wachstumsprozesse, einschließlich der Arteriogenese, aufzudecken.

#### 5.2.4.4 Stimulation des Kollateralwachstums durch Inhibierung von ACE

Während die Behandlung mit dem Angiotensin II-Rezeptor-Blocker keine Auswirkung auf die Arteriogenese hatte, führte die Hemmung des ACE mit Ramipril bereits nach einer Woche zu einer signifikanten Steigerung der CVRC gegenüber der dazugehörigen Kontrollgruppe. Ebenso wurde ein signifikanter Diameterzuwachs im Bereich der A. cerebri posterior gemessen. Histologisch konnte zudem eine signifikante Erhöhung der Gefäßmuskelschichten

nachgewiesen werden. Zwar waren bei der mit ACE-Hemmer behandelten Tiergruppe weniger Zellkerne mit einer aktiven Zellzyklusphase zu sehen, doch war eine signifikante Erhöhung der Gefäßmuskelschichten zu erkennen. Anhand dieses Resultates ist anzunehmen, dass im 3-VO-Modell die ACE-Hemmung eine stimulierende Wirkung auf die zerebrale Arteriogenese hat und besonders in deren frühen Phase eine evidente Rolle spielt.

Erste Hinweise auf dieses proarteriogene Potenzial der ACE-Inhibitoren konnten von verschiedenen Seiten gezeigt werden. Bei einem Femoralarterienligatur-Modell (femoral artery occlusion) wird davon ausgegangen, dass der Verschluss der A. femoralis zu einer Blutflussumleitung durch vorhandene Kollateralarterien führt. Nach der Applikation von ACE-Hemmern konnte nachgewiesen werden, dass der Blutfluss distal der Ligatur im Gegensatz zu Kontrolltieren deutlich erhöht war (Yang und Terjung, 1993). Auch Fabre und Kollegen (1999) kamen in einem Kaninchenhinterlauf-Modell zu einem ähnlichen Ergebnis. Sie untersuchten primär die Rolle von Quinaprilat auf die Angiogenese und stellten dessen positive angiogene Eigenschaften fest. Diese gingen mit einer hohen Affinität des Quinaprilats zu im Gewebe lokalisierten ACE, das heißt nicht zirkulierendem ACE, einher. Daneben ergänzten sie, dass die verbesserte Durchblutung in Teilen auch auf ein erhöhtes Kollateralwachstum zurückzuführen ist (Fabre, Rivard *et al.*, 1999). Bald darauf wurde bekannt, dass diese Effekte auf einer Erhöhung des Bradykininspiegels durch ACE-Hemmer basieren und über eine B<sub>2</sub>R-Aktivierung mit einer gesteigerten eNOS-Aktivität verbunden sind (Silvestre, Bergaya *et al.*, 2001).

Demgegenüber stellten Forschergruppen die Beteiligung des RAS bei angiogenen Prozessen immer wieder in Frage, da widersprüchliche Ergebnisse erzielt wurden. Bei einer Studie, die die Perfusionswiedererlangung nach Femoralarterienentnahme überprüfte, wurde festgestellt, dass sowohl der ACE-Hemmer Ramipril als auch der ARB Losartan die reparative Angiogenese negativ beeinflusst haben (Emanuelli, Salis *et al.*, 2002a). Doch bald darauf veröffentlichte dieselbe Arbeitsgruppe die Erkenntnisse, dass zwar die kapilläre Dichte durch ACE-Hemmer unbeeinflusst bleibt, jedoch die Reaktion auf vasodilatatorische Reize bei Hypertonikern durch die Behandlung erhöht werden konnte, mit dem Zusatz, dass der B<sub>1</sub>R für die proangiogenen Effekte verantwortlich sei (Emanuelli, Salis *et al.*, 2002b).

Nach einer ACE-Blockade in einem Femoralarterien-Okklusionsmodell (FAO) konnte hingegen die gesteigerte Genexpression von proangiogenen Faktoren wie MCP-1 und eNOS

ermittelt werden, zwei Faktoren, die ebenso eine wichtige Funktion für die Arteriogenese ausüben. Schließlich galt dies als Grund für ein verbessertes peripheres, kollaterales Remodeling nach einer Hemmung des ACE (Ren, Li *et al.*, 2008).

Eine Vergleichsstudie sollte die Beziehung der ACE-Blockade und der Ausbildung koronarer Kollateralen im Menschen beleuchten (Miura, Nishikawa *et al.*, 2003). Patienten, die an einer koronaren Gefäßerkrankung litten und ACE-Hemmer erhielten, entwickelten mit hoher Wahrscheinlichkeit eine funktionell effektivere kollaterale Zirkulation. Die Autoren vermuteten bei diesem Prozess einen direkten Zusammenhang mit der erhöhten Bradykininkonzentration. Ebenso wurde den ACE-Hemmern, insbesondere Ramipril, in Bezug auf periphere Gefäßverschlüsse eine protektive Wirkung zugesprochen, vorrangig durch seine antiatherosklerotische Wirkung (Coppola, Romano *et al.*, 2008). Sie beruht nicht nur auf der Reduktion der überaktiven Ang II-Signalwirkung, ähnlich wie bei ARB, sondern über eine parallele Erhöhung des Bradykininspiegels. Sekundär wird dadurch das endotheliale Gleichgewicht zwischen ROS und NO wiederhergestellt.

In der Literatur finden sich widersprüchlich erscheinende Forschungsergebnisse, wenn die Funktion des RAS und des KKS in der Arteriogenese untersucht wurde. Die Ursache dafür beruht vermutlich auf den Unterschieden zwischen normo- und hypertensiven Spezies. Ein chronisch hoher Blutdruck mit einer Daueraktivierung der AT<sub>1</sub>R-Kaskade führt zu Ungleichgewichten zwischen ROS und NO. Erlangen Sauerstoffradikale die Überhand, so führt das längerfristig zu massiven Änderungen in der Gefäßstruktur und ihrer regulatorischen Eigenschaften. Eine Untersuchung in spontan hypertensiven Ratten mit einer gesonderten Betrachtung einzelner Enzyme, insbesondere Superoxid-Dismutase und NAD(P)H-Oxidase sowie deren Auswirkung auf das ROS/NO-Gleichgewicht ergab zum einen, dass einige ACE-Hemmer, hier Captopril, eine spezifische antioxidative Wirkung besitzen, welche als Grund für ein verbessertes Kollateralwachstum genannt wurde. Zum anderen wurde vermutet, dass die Belastung der Gefäßwand durch den erhöhten Blutdruck der spontan hypertensiven Ratten zu einer erhöhten Produktion von Oxidantien führte. Dieser exzessive oxidative Stress entkoppelt die endotheliale NO-Synthase mit der Folge einer reduzierten Arteriogenese (Miller, Norton *et al.*, 2007).



#### 5.2.4.5 Nimmt Bradykinin eine Schlüsselrolle bei der Arteriogenese ein?

Nachdem in der vorliegenden Studie nun erstmals die stimulierende Wirkung von ACE-Hemmern auch auf die zerebrale Arteriogenese gezeigt werden konnte, sollte in diesem Zusammenhang als Nächstes die große funktionelle Relevanz der Bradykinin-Rezeptoren untersucht werden. Vorangegangene Projekte konnten nachweisen, dass eine Stimulation der Kinin-Signalwege eine positive Auswirkung auf das zerebrale und periphere Kollateralwachstum hat (Gatzke, 2011; Hillmeister, Gatzke *et al.*, 2011). Im zweiten Teilversuch dieser Arbeit wurde, basierend auf der Annahme, dass eine Blockade der Bradykinin-Rezeptoren während einer gleichzeitigen ACE-Hemmung die proarteriogenen Effekte von Ramipril wieder aufheben müsste, die Rolle der Kininrezeptoren überprüft. Wider Erwarten stellte sich jedoch statt der Aufhebung der Ramipril-induzierten Verbesserung des Kollateralwachstums eine zusätzliche signifikante Steigerung der Diametervergrößerung heraus. Bei der CVRC konnte ebenfalls eine Verbesserung gemessen werden, die aber kein signifikantes Niveau erreichte. Dieser Effekt spiegelte sich gleichermaßen in der histologischen Untersuchung wider. Dort zeigte sich zwar zwischen der mit ACE-Hemmer behandelten Gruppe und den zusätzlich mit Bradykininrezeptor-Blockern behandelten Tieren eine vergleichbare Anzahl an Gefäßmuskelschichten in der A. cerebri posterior, jedoch war die Anzahl proliferierender Zellkerne des Endothels in letzterer Gruppe gegenüber der mit ACE-Hemmer behandelten Tiergruppe deutlich, aber nicht signifikant, erhöht.

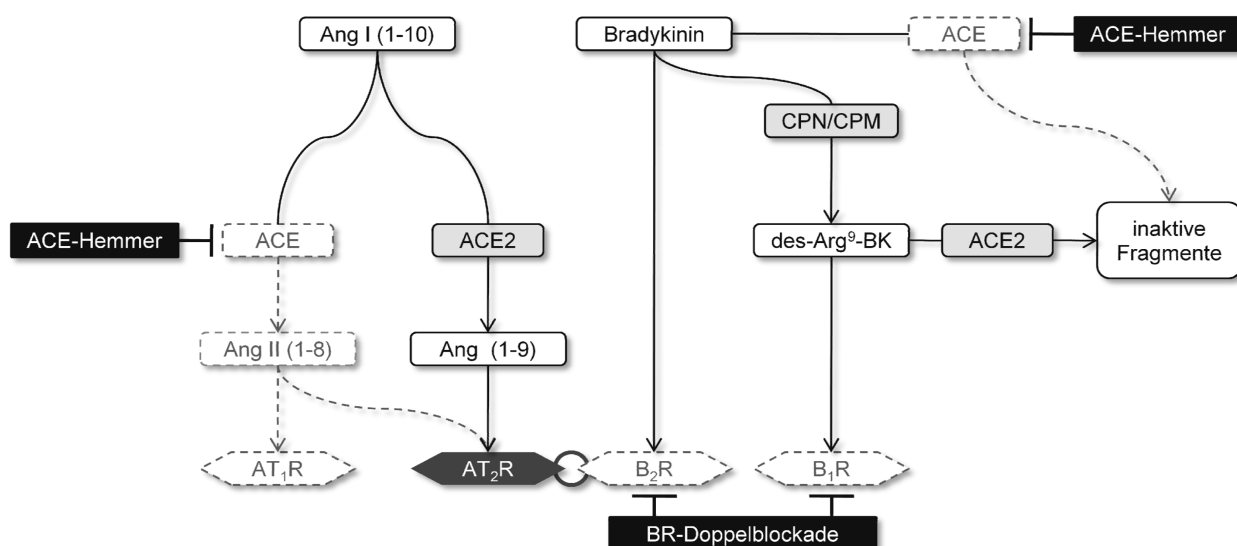
Dass ACE-Hemmer neben ihrer antihypertensiven Funktion zusätzliche Auswirkungen haben, die nicht allein durch die hämodynamischen Veränderungen ausgelöst werden, wurde bereits beschrieben. Es wird davon ausgegangen, dass diese Auswirkungen eng mit dem KKS korrelieren, denn bei *in vitro*-Versuchen mit Zellen unterschiedlicher Spezies erhöhte sich unter dem Einfluss von ACE-Hemmern der Wert für NO und Prostaglandin I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>). Dieser Effekt blieb unter Einsatz des B<sub>2</sub>R-Blockers Icatibant (HOE 140) aus (Linz, Wiemer *et al.*, 1995). Auch *in vivo* konnte eine vergleichbare Reaktion bestätigt werden. So war die kardioprotektive Wirkung der ACE- sowie AT<sub>1</sub>R-Blockade bei Tieren mit einem B<sub>2</sub>R-Knockout aufgehoben. Ein B<sub>2</sub>R-Knockout allein hatte darauf hingegen keinen Einfluss (Yang, Liu *et al.*, 2001).

Es stellt sich demnach die dringende Frage, warum die Doppelblockade des B<sub>1</sub>R und B<sub>2</sub>R während der ACE-Hemmung paradoxerweise zu einer zusätzlichen Stimulierung der Arteriogenese führte. Ein ähnlich unerwartetes Ergebnis wurde auch in der Dissertation von Hillmeister (2010) beschrieben: Verschiedene murine Bradykinin-Mutanten wurden in Bezug auf ihre Kapazität, nach einer Femoralarterien-Okklusion Kollateralwachstum zu zeigen, ausgewertet. Gegenüber Mäusen vom Wildtyp hatten B<sub>1</sub>R-Knockout (KO)-Tiere ein sehr deutlich verringertes arteriogenes Potenzial. In weniger starkem Maß war dies auch bei den B<sub>2</sub>R-KO-Mäusen zu beobachten. Wider Erwarten führte hingegen ein Doppel-KO beider Bradykininrezeptoren nicht zu einer kumulativen Reduktion des Kollateralwachstums, sondern dieses war im Vergleich zum B<sub>1</sub>R-KO wieder signifikant erhöht (Hillmeister, 2010).

Es zeigt sich hier einmal mehr, dass die klassische Betrachtung des RAS und KKS nicht mehr ausreicht, um die Folgen einer Modulation eindeutig zu klären. Vielmehr gibt es vermehrte Hinweise, dass beide Systeme nicht nur counterregulatorisch, sondern ebenso interaktiv arbeiten. Geht man davon aus, dass ACE das Hauptenzym zur Herstellung von Ang II ist, kann man bei einer Hemmung von einem stark reduzierten Ang II-Spiegel ausgehen. Es ist vorstellbar, dass es durch die Doppelblockade beider Bradykininrezeptoren zu einer Aktivierung von Rezeptoren des RAS kommt, die nicht primär durch eine Ang II-Bindung erfolgt. Denkbar wäre zum Beispiel auch die Möglichkeit einer Aktivierung des AT<sub>2</sub>R über Ang(1-9). Ang(1-9) wird mittels ACE2 aus Angiotensin I gebildet und ist in der Lage, an den AT<sub>2</sub>R zu binden (Vgl. Abbildung 4 unter Punkt 2.3.1). Diese Ang(1-9)/AT<sub>2</sub>R-Achse wird als counterregulatorisches Element im RAS beschrieben und wirkt sich mildernd auf pathologische, kardiovaskuläre Umbauprozesse aus (Kramkowski, Mogielnicki *et al.*, 2006; Flores-Munoz, Smith *et al.*, 2011; Ocaranza und Jalil, 2012). Seine physiologische Bedeutung ist womöglich der des KKS untergeordnet. Werden jedoch die Bradykinin-Rezeptoren blockiert, so könnte es wegen seiner kompensatorischen Wirkung durchaus an Relevanz gewinnen. Sollte sich dieser Befund in zukünftigen Studien als reproduzierbar erweisen, muss auch die Rolle des AT<sub>2</sub>R neu bewertet werden. Im Falle einer ACE-Hemmung kann der AT<sub>2</sub>R stimuliert werden, ohne dass parallel freies Ang II an den AT<sub>1</sub>R bindet und den AT<sub>2</sub>R-induzierten Signalwegen entgegenwirkt, wie es bei der alleinigen Behandlung mit einem AT<sub>2</sub>R-Agonisten der Fall wäre.

In Anbetracht des oben beschriebenen paradoxen Ergebnisses sollte ein weiterer wichtiger Aspekt beachtet werden. Nach der Induktion der AT<sub>2</sub>R-Expression bilden diese Heterodimere mit den B<sub>2</sub>R, wodurch sich die Produktion von NO erhöht. Die Rezeptorexpression wie auch in geringerem Maße die Heterodimerisation können über eine Blockade des B<sub>2</sub>R gefördert werden. Wurde also der B<sub>2</sub>R mit Icatibant gehemmt, so konnte die Hochregulierung und Dimerisierung von AT<sub>2</sub>R erleichtert und die NO-Produktion über den AT<sub>2</sub>R gewährleistet werden (Abadir, Periasamy *et al.*, 2006).

Zur Veranschaulichung dieser Prozesse soll die folgende angepasste Systemübersicht (Abbildung 35) dienen.



**Abbildung 35** Angepasste Systemübersicht des Renin-Angiotensin- und Kallikrein-Kinin-Systems unter Berücksichtigung ihrer Interaktionsstellen. Die gestrichelt gezeichneten Elemente stellen die blockierten Abläufe dar (bezogen auf die Versuchsgruppe, die sowohl mit dem ACE-Hemmer, als auch den Bradykininrezeptor-Blockern behandelt wurde). ACE = Angiotensin Converting Enzyme, Ang = Angiotensin, AT<sub>1</sub>R/AT<sub>2</sub>R = Angiotensin II Rezeptor Subtyp 1 und 2, B<sub>1</sub>R/B<sub>2</sub>R = Bradykininrezeptor Subtyp 1 und 2, BR = Bradykininrezeptoren, BK = Bradykinin.

Da die in der vorliegenden Studie durchgeführte Behandlung mit dem ACE-Hemmer Ramipril und die gleichzeitige Doppelblockade der Bradykininrezeptoren 1 und 2 das sehr vielversprechende Ergebnis einer signifikant stimulierten zerebralen Arteriogenese ergab, besteht an dieser Stelle ein weiterführender, intensiver Forschungsbedarf.

#### 5.2.4.6 eNOS und das NO/ROS-Gleichgewicht

Eine gemeinsame biologische Wirkung des AT<sub>2</sub>R und der Bradykinin-Rezeptoren besteht in der Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase und von cGMP. Die genannten Rezeptoren leisten auf diese Weise einen Beitrag zur kardiovaskulären Homöostase (Linz, Wiemer *et al.*, 1995; Jones, Vinh *et al.*, 2008).

Die Rolle der NO-Synthasen und von NO im Rahmen der Arteriogenese ist von großer Bedeutung, jedoch noch nicht eindeutig aufgeklärt und wird widersprüchlich diskutiert. NO ist durch seine antiproliferative Eigenschaft im Gefäßsystem gekennzeichnet (Dimmeler und Zeiher, 1999). *In vitro* führte eine basale Hemmung der NO-Produktion zu einer Hochregulierung der endothelialen MCP-1-Genexpression und -Sekretion (Zeiher, Fisslthaler *et al.*, 1995). Bei vaskulären Entzündungsprozessen hat, wie bereits beschrieben, MCP-1 als Zytokin für die Attraktion von Monozyten an die Gefäßwand eine wichtige Funktion. MCP-1-Genexpression und -Sekretion sind mit einer exogenen Zugabe von NO umkehrbar. Auch die Chemotaxis für Monozyten wurde mit NO reduziert (Zeiher, Fisslthaler *et al.*, 1995). Demzufolge wäre eine NO-Erhöhung hinderlich für den arteriogenen Prozess.

Auch Cai und Kollegen (2004) analysierten die eNOS-Expression von Gefäßen in verschiedenen Umbauphasen. Während in normalen Arteriolen eNOS nur geringfügig exprimiert war, konnte in wachsenden Kollateralgefäßen ein deutlicher Anstieg nachgewiesen werden. In ausgereiften Kollateralen war die Expression allerdings wieder reduziert (Cai, Kocsis *et al.*, 2004).

Dennoch zeigten Mäuse mit einem eNOS-Knockout keine gehemmte, sondern nur eine leicht verzögerte Arteriogenese. Auch eine Überexpression dieses Gens ging nicht mit einer Stimulation des Kollateralwachstums einher. Dies führte zu der Annahme, dass eNOS essentiell für die Vasodilatation während der Umbauprozesse ist, aber keinen direkten Einfluss darauf ausübt (Mees, Wagner *et al.*, 2007).

Neben eNOS kann NO auch über die induzierbare NO-Synthase (iNOS) von Monozyten produziert werden. Troidl und Kollegen (2010) berichteten, dass erst die parallele Ausschaltung beider Synthasen zu einer Aufhebung des Kollateralwachstums führte. Daraus wurde abgeleitet, dass im Falle einer Hemmung die eine Isoform die andere ersetzen kann, iNOS aber von größerer Bedeutung für die Arteriogenese ist. Zusätzlich konnte eine

grundsätzliche Notwendigkeit von NO für die proliferativen Prozesse während des Kollateralwachstums bewiesen werden. Unter Einsatz des NO-Donors detaNONOate wurde das Remodeling deutlich stimuliert (Troidl, Tribulova *et al.*, 2010). Als mögliche Ursache für die alternierende NO-Produktion wird angenommen, dass durch die anhaltend hohe Schubspannung am Endothel das von eNOS gebildete NO bald erschöpft ist. Im Anschluss haben Monozyten dank der sinkenden NO-Konzentration die Gelegenheit, am aktivierten Endothel zu adhären. Das monozytäre iNOS führt schließlich zur weiteren NO-Abgabe (Schaper, 2011).

In einer Studie an Ratten wurden nach einer Femoralarterien-Okklusion ebenfalls die beiden NO-Synthasen im zeitlichen Zusammenhang mit dem Kollateralwachstum untersucht. Sie bestätigte gleichermaßen, dass eNOS- und iNOS-Expression in den ersten 24 Stunden verringert waren und in diesem Zeitfenster vermehrt Monozyten akkumulieren können (Sager, Middendorff *et al.*, 2010).

Ein permanenter NO-Spiegel ist für die Erhaltung der endothelialen Integrität wesentlich. Ein intaktes Endothel steuert Prozesse wie Adhäsion und Migration von mononukleären Zellen in die Gefäßwand. Gehen Endothelzellen in die Apoptose über, werden proinflammatorische Ereignisse gefördert. NO wirkt inhibierend auf die endotheliale Apoptose, in dem es der Wirkung entzündlicher Faktoren wie ROS und Ang II entgegenwirkt (Dimmeler und Zeiher, 1999).

Überdies gibt es Untersuchungen, die auch den ROS eine potentielle Involvierung in arteriogenes Zellwachstum und in die Zellmigrationen zuschreiben. Belin De Chantemele und Kollegen (2009) induzierten in kleinen sog. Widerstandsgefäßen durch einen erhöhten Blutfluss ein arteriogenes Remodeling und konnten dabei eine Produktion von ROS beobachten. Der Superoxid-Dismutase-Hemmer Tempol führte akut zu einer Relaxation, nach chronischer Applikation jedoch auch zu einer Aufhebung des Kollateralwachstums. Die Senkung der ROS-Menge verbesserte die endothelgesteuerte Dilatation (Belin de Chantemele, Vessieres *et al.*, 2009). In einem ähnlichen Projekt wurden ebenfalls während des Diameterwachstums eine erhöhte eNOS-Expression und zugleich eine vermehrte ROS-Produktion ermittelt (Cousin, Custaud *et al.*, 2010). Dies spricht für ein empfindliches Gleichgewicht zwischen ROS und NO, die beide für das Kollateralwachstum notwendig sind.

Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wurden auch Studien am Menschen durchgeführt, welche noch einmal aufzeigten, dass das Gefäßnetz grundsätzlich in der Lage ist, Gefäßverschlüsse durch Kollateralwachstum zu kompensieren (Ziegler, Distasi *et al.*, 2010). Es ist aber ebenso bekannt, dass diese Fähigkeit in Anwesenheit von Risikofaktoren für vaskuläre Störungen (beispielsweise Hypertonie, Diabetes mellitus und Nikotinkonsum) stark vermindert sein kann. Risikofaktoren gehen mit abnormalen Leveln von NO und/oder ROS einher. Daher wurde ein Versuch mit spontan hypertensiven und normotensiven Ratten initiiert, welcher bei ersteren ein schlechteres Schubspannung-induziertes Remodeling zeigte. Dies konnte mit Hilfe einer Antioxidantientherapie verbessert werden, jedoch nur bei intaktem NOS-System. Die spontan hypertensiven Ratten wiesen gegenüber Kontrolltieren allerdings einen Mangel an eNOS auf (Unthank, Haas *et al.*, 2011). Eine Störung der NO-Synthese kann dementsprechend ebenso hinderlich für die Arteriogenese sein wie eine unausgewogene Menge ROS.

### **5.3 KLINISCHE RELEVANZ UND THERAPEUTISCHE KONSEQUENZEN**

In ihrer Form als körpereigene Rettungsmaßnahme ist die Arteriogenese in der klinischen wie auch präklinischen Forschung sehr interessant. Die Analyse der relevanten Signalwege während der Umbauprozesse besitzt großes therapeutisches Potenzial. Das Ziel ist die direkte Induktion der sog. biologischen Bypässe bei Risikopatienten, um im besten Fall invasive Verfahren bei diesen zu vermeiden. Mit dem Prinzip der externen Counterpulsation kann jetzt schon das koronare Kollateralwachstum von Patienten mit koronarer Herzerkrankung gefördert werden (Buschmann, Utz *et al.*, 2009).

Da die Ausbildung voll funktionsfähiger Kollateralgefäße im akuten Fall eines Gefäßverschlusses zu langsam ist, um das von einer Ischämie bedrohte Gewebe, die sog. „area at risk“, mit Blut zu versorgen, muss ein Weg gefunden werden, das Kollateralwachstum vorsorglich zu induzieren (Bondke Persson, Buschmann *et al.*, 2011). Momentan ist die induzierte Arteriogenese als eine prophylaktische Therapieform oder bei langsam progredienten Gefäßverschlüssen erfolgversprechend. Dennoch ist eine regelmäßige körperliche Aktivität sowie die Vermeidung von Risikofaktoren ein guter Weg, die körpereigenen, biologischen Bypässe zu fördern und so im besten Falle die Folgen einer arteriellen Verschlusskrankheit abzumildern (Bondke, Buschmann *et al.*, 2007).

Die Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization, WHO) veröffentlichte 2008 die häufigsten Todesursachen sowohl in Ländern mit hohem als auch mit mittlerem bis niedrigem Einkommen. In beiden Gruppen befanden sich zerebrovaskuläre Erkrankungen an zweiter Stelle, unmittelbar nach ischämischen Herzerkrankungen. Zusätzlich wurden die global häufigsten Gesundheitsrisiken veröffentlicht, an erster Stelle steht der Bluthochdruck (WHO, 2012a; WHO, 2012b).

Demnach ist die mögliche Interaktion des RAS und gleichermaßen des KKS mit der zerebralen Arteriogenese von großem Interesse. Zwar sind ARB und ACE-Hemmer vergleichbar wirkungsvolle Blutdrucksenker, die unterschiedlichen Auswirkungen beider Substanzklassen auf pathologische kardiovaskuläre Prozesse wurden gleichwohl in der Literatur immer wieder gegenübergestellt (Bohm, Baumhakel *et al.*, 2010; Roy, Shah *et al.*, 2012). Die Akkumulation von Bradykinin durch die ACE-Hemmer gilt auf der einen Seite als Vorteil, da es die endotheliale Funktionsfähigkeit unterstützt. Auf der anderen Seite kann es aber auch Auslöser unerwünschter Wirkungen sein, allen voran des trockenen Reizhustens und des nicht-allergischen Angioödems (Caldeira, David *et al.*, 2012; Lerch, 2012). Diese Nebenwirkungen sind häufig der Grund, warum die ARB von Patienten besser toleriert und auch regelmäßiger eingenommen werden (Pitt, Poole-Wilson *et al.*, 2000).

Betrachtet man die Resultate der vorliegenden Studie, so zeigt sich, dass die ACE-Hemmer im zerebralen Kollateralwachstum einen Vorteil gegenüber den ARB haben. Obwohl dies hier nicht eindeutig der alleinigen Aktivierung der Bradykinin-Rezeptoren zuzuweisen war, konnten doch vorangegangene Studien dahingehend Erkenntnisse liefern (Gatzke, 2011; Hillmeister, Gatzke *et al.*, 2011). Es existiert zweifelsohne weiterhin ein großer Aufklärungsbedarf, gerade weil ein persistierender Bluthochdruck den Gefäßwandaufbau sowohl anatomisch als auch funktionell verändert (Miller, Norton *et al.*, 2007), was dementsprechend das arteriogene Potenzial stark beeinflussen kann. Eine Überprüfung der Ergebnisse in hypertensiven Ratten wäre ratsam. Gleichwohl besteht die Möglichkeit, dass die Gefahr, einen zerebralen Insult zu erleiden, für Risikopatienten mit einer ACE-Hemmer-Therapie über eine proarteriogene Wirkung weiter reduziert werden kann. Das individuelle Reaktionsmuster auf die Inhibierung des ACE muss selbstverständlich weiterhin berücksichtigt werden.

## 5.4 FAZIT

Das pharmakologische Eingreifen in das klassische Renin-Angiotensin- und Kinin-System erfolgte im vorliegenden Dissertationsprojekt über AT<sub>1</sub>R-Antagonisten und AT<sub>2</sub>R-Agonisten sowie ACE-Hemmer, letztere sowohl allein als auch in Kombination mit einer Doppelblockade der Bradykininrezeptoren. Es konnten im normotensiven Tier erstmals mittels des 3-VO-Modells die Auswirkungen einer Modulation an verschiedenen Stellen dieser Systeme auf die zerebrale Arteriogenese gezeigt werden. Die folgenden Kernaussagen lassen sich schlussfolgern:

- ◆ Die Behandlung mit dem ACE-Hemmer Ramipril hat die zerebrale Arteriogenese stimuliert.
- ◆ Eine Behandlung mit Ramipril und eine zusätzliche Inhibierung der Kininrezeptoren 1 und 2 führte zu einer deutlichen und noch stärkeren Stimulation gegenüber der alleinigen Applikation von ACE-Hemmern.
- ◆ Sowohl die Behandlung mit dem ARB Candesartan-Cilexetil als auch die Stimulation des AT<sub>2</sub>R mit Compound 21 hatten keinen Einfluss auf das zerebrale Kollateralwachstum.

Insbesondere wegen des paradoxen Ergebnisses während der ACE-Hemmung und Doppelblockade der Kininrezeptoren sind weitere Untersuchungen ratsam, um dieses interessante Phänomen zu klären. In diesem Zusammenhang ist es nötig, auch die neuesten Erkenntnisse zu den Wirkmechanismen aus der RAS-Forschung, insbesondere der Rezeptor-Heterodimerisation und der biologischen Funktionen von Angiotensin II-Derivaten, in Betracht zu ziehen und zu untersuchen.



## 6. ZUSAMMENFASSUNG

### **Untersuchungen zu den Einflüssen des Renin-Angiotensin- und Kallikrein-Kinin-Systems auf die zerebrale Arteriogenese der Ratte**

**Ziele** – Es war das Anliegen dieser Arbeit, den Einfluss der Angiotensin II-Rezeptoren vom Subtyp 1 und 2 (AT<sub>1</sub>R und AT<sub>2</sub>R) auf das zerebrale Kollateralwachstum der Ratte zu untersuchen, da beide eine hohe vaskuläre Aktivität besitzen. Zudem wurde das arteriogene Potenzial des Kallikrein-Kinin-Systems (KKS), insbesondere dessen Schnittstelle zum Renin-Angiotensin-System (RAS), das Angiotensin Converting Enzyme (ACE), untersucht.

**Methoden** – Beim Drei-Gefäß-Verschluss (3-VO) erfolgt im Tiermodell ein Verschluss beider Arteriae vertebrales und der Arteria carotis communis sinistra, was eine Kollateralgefäßvergrößerung im Circulus arteriosus cerebri (Willisi) initiiert. Im ersten Teilversuch dieser Arbeit wurden 3-VO-operierte Ratten für 21 Tage mit einem AT<sub>1</sub>R-Antagonisten oder einem AT<sub>2</sub>R-Agonisten behandelt. Im zweiten Teilversuch wurden die Tiere über sieben Tage mit einem ACE-Inhibitor behandelt. Eine weitere Gruppe wurde zusätzlich zur ACE-Hemmung mit Blockern der Bradykininrezeptoren Subtyp 1 und 2 (BRB) behandelt. Für die Auswertung wurden die Messung der zerebrovaskulären Reservekapazität (CVRC), die Latexangiographie sowie immunhistochemische Untersuchungen herangezogen.

**Ergebnisse** – Die vorliegende Dissertation demonstriert erstmals die Auswirkungen einer Beeinflussung von RAS und KKS auf die zerebrale Arteriogenese im normotensiven Tier. Im ersten Teilversuch ergaben CVRC-Messung und Latexangiographie keinen signifikanten Unterschied zwischen AT<sub>1</sub>R-Antagonist-, AT<sub>2</sub>R-Agonist- und Kontrollbehandlung. Im zweiten Teilversuch führte die Hemmung von ACE ( $10 \pm 9 \%$ ) ebenso wie die Gabe von ACE-Hemmern und BRB ( $11 \pm 5 \%$ ) zu einer signifikant erhöhten CVRC gegenüber Kontrolltieren ( $2 \pm 7 \%$ ). Zudem waren die Diameter der ipsilateralen A. cerebri posterior im Vergleich zu den Kontrollen ( $212 \pm 10 \mu\text{m}$ ) bei beiden Gruppen signifikant vergrößert (ACE-Hemmer:  $244 \pm 18 \mu\text{m}$ ; ACE-Hemmer und BRB:  $274 \pm 20 \mu\text{m}$ ). Immunhistochemisch konnten signifikant mehr Gefäßmuskelschichten dargestellt werden, wohingegen sich nach alleiniger ACE-Hemmung weniger Zellen im Proliferationsstatus befanden.

**Schlussfolgerung** – Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Modulation von AT<sub>1</sub>R und AT<sub>2</sub>R keinen Einfluss auf die zerebrale Arteriogenese hat. Dagegen wirkt die Inhibierung des ACE stimulierend, was sich jedoch durch eine Applikation von BRB nicht aufheben ließ. Dieser Effekt ist daher für die Entwicklung biologischer Bypässe weiterhin hochinteressant.

## 7. SUMMARY

### **Investigations on the influences of renin-angiotensin and kallikrein-kinin system on cerebral arteriogenesis in rats**

**Aims** – Based on the high vascular activity of angiotensin II receptor subtype 1 and 2 (AT<sub>1</sub>R und AT<sub>2</sub>R), this study pursued the objective to investigate the influence of both receptors on cerebral collateral growth in rats. Additionally, the arteriogenic potential of the kallikrein-kinin system (KKS) was to be analyzed. In particular, its interface with the renin-angiotensin system (RAS), namely the angiotensin-converting-enzyme (ACE), had to be considered.

**Methods** – Three vessel occlusion (3-VO) is an animal model inducing an enlargement of collateral arteries in the Circle of Willis through bilateral occlusion of the vertebral arteries and the left common carotid artery. During the first part of this study, rats that underwent 3-VO were treated with an AT<sub>1</sub>R antagonist or an AT<sub>2</sub>R agonist for three weeks. In the second part, animals were treated with an angiotensin-converting-enzyme (ACE) inhibitor for seven days. Another group was treated with ACE inhibitor as well as bradykinin receptor inhibitors (BRB). The resulting effects were analyzed by measurement of cerebrovascular reserve capacity (CVRC), latex angiography and immunohistochemical staining.

**Results** – The present study is a first-time demonstration of the effects of a modulation of RAS and KKS on cerebral arteriogenesis in normotensive rats. In the first part, CVRC measurement and latex angiography did not reveal any significant differences between treatment with AT<sub>1</sub>R antagonist, AT<sub>2</sub>R agonist and control. In the second part, the application of ACE inhibitor (10 ± 9 %) as well as the application of ACE inhibitor and BRB (11 ± 5 %) led to a significant enhancement of the CVRC compared to control (2 ± 7 %). Furthermore, diameters of the ipsilateral posterior cerebral artery of both groups (ACE inhibitor: 244 ± 18 µm; ACE inhibitor and BR inhibitors: 274 ± 20 µm) were significantly increased compared to control (212 ± 10 µm). Accordingly, immunohistochemical staining revealed significantly more vascular smooth muscle layers, whereas single ACE inhibition led to fewer cells in a proliferative state.

**Conclusion** – This study demonstrated that a modulation of AT<sub>1</sub>R and AT<sub>2</sub>R has no influence on cerebral arteriogenesis. In contrast, ACE inhibition is a stimulating factor which is not abolished by application of BRB though. Hence, this aspect is still deeply interesting for the development of biological bypasses.

## 8. VERZEICHNIS DER VERWENDETEN LITERATUR

ABADIR, P. M.; PERIASAMY, A.; CAREY, R. M.; SIRAGY, H. M. (2006) Angiotensin II type 2 receptor-bradykinin B2 receptor functional heterodimerization. *Hypertension*. 48(2), 316-22.

ABDALLA, S.; LOTHER, H.; ABDEL-TAWAB, A. M.; QUITTERER, U. (2001) The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. *J Biol Chem*. 276(43), 39721-6.

ABELOUS, J. E.; BARDIER, E. (1909) Les substances hypotensives de l'urine humaine normale. *CR Soc Biol (Paris)*. 66, 511-12.

ADAM, A.; ALBERT, A.; CALAY, G.; CLOSSET, J.; DAMAS, J.; FRANCHIMONT, P. (1985) Human kininogens of low and high molecular mass: quantification by radioimmunoassay and determination of reference values. *Clin Chem*. 31(3), 423-6.

ALEXANDER, W.; BERNSTEIN, K. E.; CATT, K. J.; DE GASPARO, M.; GOODFRIEND, T. L.; HORIUCHI, M.; HUSAIN, A.; INAGAMI, T.; TIMMERMANS, P. B. M. W. M.; UNGER, T. (2009) Angiotensin receptors, introductory chapter. Abgerufen von der URL <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyIntroductionForward?familyId=6> am 23/04/2012 14:57.

ALTMANNBERGER, S. H.; PANEITZ, A.; SIEGMUND, W.; KROEMER, H. K. (2001) [Pharmacologic basics: the effect of AT1 receptor antagonists]. *Pharm Unserer Zeit*. 30(4), 296-302.

BAO, G.; GOHLKE, P.; UNGER, T. (1992) Role of bradykinin in chronic antihypertensive actions of ramipril in different hypertension models. *J Cardiovasc Pharmacol*. 20 Suppl 9, S96-9.

BATHON, J. M.; PROUD, D. (1991) Bradykinin antagonists. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 31, 129-62.

BELIN DE CHANTEMELE, E. J.; VESSIERES, E.; DUMONT, O.; GUIHOT, A. L.; TOUTAIN, B.; LOUFRANI, L.; HENRION, D. (2009) Reactive oxygen species are necessary for high flow (shear stress)-induced diameter enlargement of rat resistance arteries. *Microcirculation*. 16(5), 391-402.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*. 57(1), 289-300.

BERGMANN, C. E.; HOEFER, I. E.; MEDER, B.; ROTH, H.; VAN ROYEN, N.; BREIT, S. M.; JOST, M. M.; AHARINEJAD, S.; HARTMANN, S.; BUSCHMANN, I. R. (2006) Arteriogenesis depends on circulating monocytes and macrophage accumulation and is severely depressed in op/op mice. *J Leukoc Biol*. 80(1), 59-65.

BHOOLA, K. D.; FIGUEROA, C. D.; WORTHY, K. (1992) Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev*. 44(1), 1-80.

BOHM, M.; BAUMHAKEL, M.; MAHFOUD, F.; WERNER, C. (2010) From evidence to rationale: cardiovascular protection by angiotensin II receptor blockers compared with angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Cardiology*. 117(3), 163-73.

BONDKE, A.; BUSCHMANN, I. R.; BODE, C.; BUSCHMANN, E. E. (2007) [Inducing collaterals in due time. Arteriogenesis as a preventive principle]. *Hämostaseologie*. 27(5), 363-72.

BONDKE PERSSON, A.; BUSCHMANN, E. E.; LINDHORST, R.; TROIDL, K.; LANGHOFF, R.; SCHULTE, K. L.; BUSCHMANN, I. (2011) Therapeutic arteriogenesis in peripheral arterial disease: combining intervention and passive training. *Vasa*. 40(3), 177-87.

BOSNYAK, S.; WELUNGODA, I. K.; HALLBERG, A.; ALTERMAN, M.; WIDDOP, R. E.; JONES, E. S. (2010) Stimulation of angiotensin AT2 receptors by the non-peptide agonist, Compound 21, evokes vasodepressor effects in conscious spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol*. 159(3), 709-16.

BRAUN-MENENDEZ, E.; FASCIOLO, J. C.; LELOIR, L. F.; MUNOZ, J. M. (1940) The substance causing renal hypertension. *J Physiol*. 98(3), 283-98.

BUSCH, H. J.; BUSCHMANN, I. R.; MIES, G.; BODE, C.; HOSSMANN, K. A. (2003) Arteriogenesis in hypoperfused rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 23(5), 621-8.

BUSCHMANN, E. E.; 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, I. R. (2009) Improvement of fractional flow reserve and collateral flow by treatment with external counterpulsation (Art.Net.-2 Trial). *Eur J Clin Invest*. 39(10), 866-75.

BUSCHMANN, I.; SCHAPER, W. (1999) Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth. *News Physiol Sci*. 14, 121-125.

BUSCHMANN, I. R.; BUSCH, H. J.; MIES, G.; HOSSMANN, K. A. (2003) Therapeutic induction of arteriogenesis in hypoperfused rat brain via granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Circulation*. 108(5), 610-5.

CAI, W. J.; KOCSIS, E.; LUO, X.; SCHAPER, W.; SCHAPER, J. (2004) Expression of endothelial nitric oxide synthase in the vascular wall during arteriogenesis. *Mol Cell Biochem*. 264(1-2), 193-200.

CALDEIRA, D.; DAVID, C.; SAMPAIO, C. (2012) Tolerability of Angiotensin-receptor blockers in patients with intolerance to Angiotensin-converting enzyme inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *Am J Cardiovasc Drugs*. 12(4), 263-77.

CAMPBELL, D. J. (2003) The renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. *Int J Biochem Cell Biol*. 35(6), 784-91.

CHEN, X. L.; TUMMALA, P. E.; OLBRYCH, M. T.; ALEXANDER, R. W.; MEDFORD, R. M. (1998) Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 83(9), 952-9.

COPPOLA, G.; ROMANO, G.; CORRADO, E.; GRISANTI, R. M.; NOVO, S. (2008) Peripheral artery disease: potential role of ACE-inhibitor therapy. *Vasc Health Risk Manag.* 4(6), 1179-87.

COUSIN, M.; CUSTAUD, M. A.; BARON-MENGUY, C.; TOUTAIN, B.; DUMONT, O.; GUIHOT, A. L.; VESSIERES, E.; SUBRA, J. F.; HENRION, D.; LOUFRANI, L. (2010) Role of angiotensin II in the remodeling induced by a chronic increase in flow in rat mesenteric resistance arteries. *Hypertension.* 55(1), 109-15.

COUTURE, R.; HARRISSON, M.; VIANNA, R. M.; CLOUTIER, F. (2001) Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol.* 429(1-3), 161-76.

COYLE, P.; JOKELAINEN, P. T. (1983) Differential outcome to middle cerebral artery occlusion in spontaneously hypertensive stroke-prone rats (SHRSP) and Wistar Kyoto (WKY) rats. *Stroke.* 14(4), 605-11.

COYLE, P.; PANZENBECK, M. J. (1990) Collateral development after carotid artery occlusion in Fischer 344 rats. *Stroke.* 21(2), 316-21.

DAVIES, M. J.; GORDON, J. L.; GEARING, A. J.; PIGOTT, R.; WOOLF, N.; KATZ, D.; KYRIAKOPOULOS, A. (1993) The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol.* 171(3), 223-9.

DE GASPARO, M.; CATT, K. J.; INAGAMI, T.; WRIGHT, J. W.; UNGER, T. (2000) International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev.* 52(3), 415-72.

DEMOLIS, P.; FLORENCE, G.; THOMAS, L.; TRAN DINH, Y. R.; GIUDICELLI, J. F.; SEYLAZ, J.; ALKAYED, N. J. (2000) Is the acetazolamide test valid for quantitative assessment of maximal cerebral autoregulatory vasodilation? An experimental study. *Stroke.* 31(2), 508-15.

DERDEYN, C. P.; VIDEEN, T. O.; FRITSCH, S. M.; CARPENTER, D. A.; GRUBB, R. L., JR.; POWERS, W. J. (1999) Compensatory mechanisms for chronic cerebral hypoperfusion in patients with carotid occlusion. *Stroke.* 30(5), 1019-24.

DESBOROUGH, J. P. (2000) The stress response to trauma and surgery. *Br J Anaesth.* 85(1), 109-17.

DIMMELER, S.; ZEIHNER, A. M. (1999) Nitric oxide-an endothelial cell survival factor. *Cell Death Differ.* 6(10), 964-8.

DUELSNER, A.; GATZKE, N.; GLASER, J.; HILLMEISTER, P.; LI, M.; LEE, E. J.; LEHMANN, K.; URBAN, D.; MEYBORG, H.; STAWOWY, P.; BUSJAHN, A.; NAGORKA, S.; PERSSON, A. B.; BUSCHMANN, I. R. (2012a) Acetylsalicylic acid, but not clopidogrel, inhibits therapeutically induced cerebral arteriogenesis in the hypoperfused rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 32(1), 105-14.

DUELSNER, A.; GATZKE, N.; GLASER, J.; HILLMEISTER, P.; LI, M.; LEE, E. J.; LEHMANN, K.; URBAN, D.; MEYBORG, H.; STAWOWY, P.; BUSJAHN, A.; NAGORKA, S.; PERSSON, A. B.; BUSCHMANN, I. R. (2012b) Granulocyte colony-stimulating factor improves cerebrovascular

reserve capacity by enhancing collateral growth in the circle of Willis. *Cerebrovasc Dis.* 33(5), 419-29.

DUKA, A.; DUKA, I.; GAO, G.; SHENOUDA, S.; GAVRAS, I.; GAVRAS, H. (2006) Role of bradykinin B1 and B2 receptors in normal blood pressure regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 291(2), E268-74.

DÜLSNER, A. (2009) Auswirkungen von Acetylsalicylsäure und Clopidogrel auf das Kollateralgefäßwachstum im zerebralen Arteriogenesemodell der Ratte. Dissertation am Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin. Berlin, 19/05/2009.

EMANUELI, C.; MADEDDU, P. (2002) Renin-angiotensin and kallikrein-kinin systems coordinately modulate angiogenesis. *Hypertension.* 39(6), e29.

EMANUELI, C.; SALIS, M. B.; STACCA, T.; PINNA, A.; GASPA, L.; MADEDDU, P. (2002a) Angiotensin AT(1) receptor signalling modulates reparative angiogenesis induced by limb ischaemia. *Br J Pharmacol.* 135(1), 87-92.

EMANUELI, C.; SALIS, M. B.; STACCA, T.; PINTUS, G.; KIRCHMAIR, R.; ISNER, J. M.; PINNA, A.; GASPA, L.; REGOLI, D.; CAYLA, C.; PESQUERO, J. B.; BADER, M.; MADEDDU, P. (2002b) Targeting kinin B(1) receptor for therapeutic neovascularization. *Circulation.* 105(3), 360-6.

EPSTEIN, S. E.; STABILE, E.; KINNAIRD, T.; LEE, C. W.; CLAVIJO, L.; BURNETT, M. S. (2004) Janus phenomenon: the interrelated tradeoffs inherent in therapies designed to enhance collateral formation and those designed to inhibit atherogenesis. *Circulation.* 109(23), 2826-31.

FABRE, J. E.; RIVARD, A.; MAGNER, M.; SILVER, M.; ISNER, J. M. (1999) Tissue inhibition of angiotensin-converting enzyme activity stimulates angiogenesis in vivo. *Circulation.* 99(23), 3043-9.

FERRARIO, C. M.; AHMAD, S.; JOYNER, J.; VARAGIC, J. (2010) Advances in the renin angiotensin system focus on angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7). *Adv Pharmacol.* 59, 197-233.

FERREIRA, S. H.; GREENE, L. H.; ALABASTER, V. A.; BAKHLE, Y. S.; VANE, J. R. (1970) Activity of various fractions of bradykinin potentiating factor against angiotensin I converting enzyme. *Nature.* 225(5230), 379-80.

FLORES-MUNOZ, M.; SMITH, N. J.; HAGGERTY, C.; MILLIGAN, G.; NICKLIN, S. A. (2011) Angiotensin1-9 antagonises pro-hypertrophic signalling in cardiomyocytes via the angiotensin type 2 receptor. *J Physiol.* 589(Pt 4), 939-51.

FOTIS, L.; AGROGIANNIS, G.; VLACHOS, I. S.; PANTOPOULOU, A.; MARGONI, A.; KOSTAKI, M.; VERIKOKOS, C.; TZIVRAS, D.; MIKHAILIDIS, D. P.; PERREA, D. (2012) Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 at the early stages of atherosclerosis in a rat model. *In Vivo.* 26(2), 243-50.

FRANCO FOLINO, A. (2007) Cerebral autoregulation and syncope. *Prog Cardiovasc Dis.* 50(1), 49-80.

FREDRIKSSON, I.; FORS, C.; JOHANSSON, J. (2007) Laser Doppler Flowmetry - a Theoretical Framework. Abgerufen von der URL [www.imt.liu.se/bit/ldf/ldfmain.html](http://www.imt.liu.se/bit/ldf/ldfmain.html) am 01/09/2010 11:49.

FYHRQUIST, F.; SAIJONMAA, O. (2008) Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med.* 264(3), 224-36.

GATZKE, N. (2011) Auswirkungen der pharmakologischen Modulation der Bradykininrezeptoren auf die Arteriogenese im Tiermodell. Dissertation am Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin. Berlin, 24/11/2011.

GLASER, J. (2010) Einfluss des oralen Antidiabetikums Pioglitazon auf die Arteriogenese im Gehirn der Ratte. Dissertation am Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin. Berlin, 12/04/2010.

GRIENDLING, K. K.; SORESCU, D.; USHIO-FUKAI, M. (2000) NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 86(5), 494-501.

HEIL, M.; EITENMULLER, I.; SCHMITZ-RIXEN, T.; SCHAPER, W. (2006) Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. *J Cell Mol Med.* 10(1), 45-55.

HEIL, M.; SCHAPER, W. (2004) Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (arteriogenesis). *Circ Res.* 95(5), 449-58.

HILLMEISTER, P. (2010) Charakterisierung der frühen adaptiven zerebralen Arteriogenese - Direkter Nachweis der Bradykinin Rezeptor Signalwirkung auf die Arteriogenese. Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I, Humboldt Universität zu Berlin. Berlin, 07/01/2010.

HILLMEISTER, P.; GATZKE, N.; DULSNER, A.; BADER, M.; SCHADOCK, I.; HOEFER, I.; HAMANN, I.; INFANTE-DUARTE, C.; JUNG, G.; TROIDL, K.; URBAN, D.; STAWOWY, P.; FRENTSCH, M.; LI, M.; NAGORKA, S.; WANG, H.; SHI, Y.; LE NOBLE, F.; BUSCHMANN, I. (2011) Arteriogenesis is modulated by bradykinin receptor signaling. *Circ Res.* 109(5), 524-33.

HILLMEISTER, P.; LEHMANN, K. E.; BONDKE, A.; WITT, H.; DUELSNER, A.; GRUBER, C.; BUSCH, H. J.; JANKOWSKI, J.; RUIZ-NOPPINGER, P.; HOSSMANN, K. A.; BUSCHMANN, I. R. (2008) Induction of cerebral arteriogenesis leads to early-phase expression of protease inhibitors in growing collaterals of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 28(11), 1811-23.

HOEFER, I. E.; VAN ROYEN, N.; RECTENWALD, J. E.; DEINDL, E.; HUA, J.; JOST, M.; GRUNDMANN, S.; VOSKUIL, M.; OZAKI, C. K.; PIEK, J. J.; BUSCHMANN, I. R. (2004) Arteriogenesis proceeds via ICAM-1/Mac-1- mediated mechanisms. *Circ Res.* 94(9), 1179-85.

HORN, F. (2009) Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium. Stuttgart: Thieme, Auflage 4. ISBN: 3131308842 / 9783131308849, S. 423-424.

HOSSMANN, K. A. (1993): Collateral circulation of the brain. In: Collateral Circulation. Hrsg. W. Schaper and J. Schaper. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, Auflage 1. ISBN: 1402081251, S. 291-315.

HU, D. E.; FAN, T. P. (1993) [Leu8]des-Arg9-bradykinin inhibits the angiogenic effect of bradykinin and interleukin-1 in rats. *Br J Pharmacol.* 109(1), 14-7.

IWAI, M.; CHEN, R.; LI, Z.; SHIUCHI, T.; SUZUKI, J.; IDE, A.; TSUDA, M.; OKUMURA, M.; MIN, L. J.; MOGI, M.; HORIUCHI, M. (2005) Deletion of angiotensin II type 2 receptor exaggerated atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Circulation.* 112(11), 1636-43.

JALOWY, A.; SCHULZ, R.; DORGE, H.; BEHREND, M.; HEUSCH, G. (1998) Infarct size reduction by AT1-receptor blockade through a signal cascade of AT2-receptor activation, bradykinin and prostaglandins in pigs. *J Am Coll Cardiol.* 32(6), 1787-96.

JAYASOORIYA, A. P.; MATHAI, M. L.; WALKER, L. L.; BEGG, D. P.; DENTON, D. A.; CAMERON-SMITH, D.; EGAN, G. F.; MCKINLEY, M. J.; RODGER, P. D.; SINCLAIR, A. J.; WARK, J. D.; WEISINGER, H. S.; JOIS, M.; WEISINGER, R. S. (2008) Mice lacking angiotensin-converting enzyme have increased energy expenditure, with reduced fat mass and improved glucose clearance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(18), 6531-6.

JONES, D. (2002) Pharmaceutical Statistics. London: Pharmaceutical Press, Auflage 1. ISBN: 0853694257 / 9780853694250, S. 342-343.

JONES, E. S.; VINH, A.; MCCARTHY, C. A.; GASPARI, T. A.; WIDDOP, R. E. (2008) AT2 receptors: functional relevance in cardiovascular disease. *Pharmacol Ther.* 120(3), 292-316.

KALKA, C.; ASAHARA, T.; KRONE, W.; ISNER, J. M. (2000) [Angiogenesis and vasculogenesis. Therapeutic strategies for stimulation of postnatal neovascularization]. *Herz.* 25(6), 611-22.

KAWATA, Y.; SAKO, K.; YONEMASU, Y. (1996) Sequential changes in cerebrovascular reserve capacity in three-vessel occlusion rats. *Brain Res.* 739(1-2), 330-4.

KOHLER, R.; HOYER, J. (2007): Role of TRPV4 in the Mechanotransduction of Shear Stress in Endothelial Cells. In: TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades. Hrsg. W. B. Liedtke and S. Heller. Boca Raton (FL). ISBN: 0849340489 / 9780849340482. Abgerufen von der URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1856/> am 26/10/2012 11:52.

KRAMKOWSKI, K.; MOGIELNICKI, A.; BUCZKO, W. (2006) The physiological significance of the alternative pathways of angiotensin II production. *J Physiol Pharmacol.* 57(4), 529-39.

KRANKEL, N.; KATARE, R. G.; SIRAGUSA, M.; BARCELOS, L. S.; CAMPAGNOLO, P.; MANGIALARDI, G.; FORTUNATO, O.; SPINETTI, G.; TRAN, N.; ZACHAROWSKI, K.; WOJAKOWSKI, W.; MROZ, I.; HERMAN, A.; MANNING FOX, J. E.; MACDONALD, P. E.;



SCHANSTRA, J. P.; BASCANDS, J. L.; ASCIONE, R.; ANGELINI, G.; EMANUELI, C.; MADEDDU, P. (2008) Role of kinin B2 receptor signaling in the recruitment of circulating progenitor cells with neovascularization potential. *Circ Res.* 103(11), 1335-43.

KUWABARA, Y.; ICHIYA, Y.; SASAKI, M.; YOSHIDA, T.; MASUDA, K. (1995) Time dependency of the acetazolamide effect on cerebral hemodynamics in patients with chronic occlusive cerebral arteries. Early steal phenomenon demonstrated by [<sup>15</sup>O]H<sub>2</sub>O positron emission tomography. *Stroke.* 26(10), 1825-9.

LEE, R. M. (1995) Morphology of cerebral arteries. *Pharmacol Ther.* 66(1), 149-73.

LEEB-LUNDBERG, L. M.; MARCEAU, F.; MULLER-ESTERL, W.; PETTIBONE, D. J.; ZURAW, B. L. (2005) International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev.* 57(1), 27-77.

LERCH, M. (2012) Drug-induced angioedema. *Chem Immunol Allergy.* 97, 98-105.

LEVY, B. I. (2005) How to explain the differences between renin angiotensin system modulators. *Am J Hypertens.* 18(9 Pt 2), 134S-141S.

LEY, K. (2003) Arrest chemokines. *Microcirculation.* 10(3-4), 289-95.

LIEBESKIND, D. S. (2005) Collaterals in acute stroke: beyond the clot. *Neuroimaging Clin N Am.* 15(3), 553-73, x.

LINZ, W.; WIEMER, G.; GOHLKE, P.; UNGER, T.; SCHOLKENS, B. A. (1995) Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacol Rev.* 47(1), 25-49.

LUSIS, A. J. (2000) Atherosclerosis. *Nature.* 407(6801), 233-41.

MAEDA, K.; HATA, R.; HOSSMANN, K. A. (1998) Differences in the cerebrovascular anatomy of C57black/6 and SV129 mice. *Neuroreport.* 9(7), 1317-9.

MARCEAU, F.; HESS, J. F.; BACHVAROV, D. R. (1998) The B1 receptors for kinins. *Pharmacol Rev.* 50(3), 357-86.

MEES, B.; WAGNER, S.; NINCI, E.; TRIBULOVA, S.; MARTIN, S.; VAN HAPEREN, R.; KOSTIN, S.; HEIL, M.; DE CROM, R.; SCHAPER, W. (2007) Endothelial nitric oxide synthase activity is essential for vasodilation during blood flow recovery but not for arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27(9), 1926-33.

MEHTA, P. K.; GRIENGLING, K. K. (2007) Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 292(1), C82-97.

MILLER, S. J.; NORTON, L. E.; MURPHY, M. P.; DALSING, M. C.; UNTHANK, J. L. (2007) The role of the renin-angiotensin system and oxidative stress in spontaneously hypertensive rat

mesenteric collateral growth impairment. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 292(5), H2523-31.

MIURA, S.; KARNIK, S. S. (1999) Angiotensin II type 1 and type 2 receptors bind angiotensin II through different types of epitope recognition. *J Hypertens.* 17(3), 397-404.

MIURA, S.; MATSUO, Y.; KIYA, Y.; KARNIK, S. S.; SAKU, K. (2010) Molecular mechanisms of the antagonistic action between AT1 and AT2 receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* 391(1), 85-90.

MIURA, S.; NISHIKAWA, H.; ZHANG, B.; MATSUO, Y.; KAWAMURA, A.; TSUCHIYA, Y.; MATSUO, K.; SAKU, K. (2003) Angiotensin-converting enzyme inhibitor promotes coronary collateral circulation in patients with coronary artery disease. *Circ J.* 67(6), 535-8.

MOREAU, M. E.; GARBACKI, N.; MOLINARO, G.; BROWN, N. J.; MARCEAU, F.; ADAM, A. (2005) The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J Pharmacol Sci.* 99(1), 6-38.

MUNK, V. C.; SANCHEZ DE MIGUEL, L.; PETRIMPOL, M.; BUTZ, N.; BANFI, A.; ERIKSSON, U.; HEIN, L.; HUMAR, R.; BATTEGAY, E. J. (2007) Angiotensin II induces angiogenesis in the hypoxic adult mouse heart in vitro through an AT2-B2 receptor pathway. *Hypertension.* 49(5), 1178-85.

MUSKHELISHVILI, L.; LATENDRESSE, J. R.; KODELL, R. L.; HENDERSON, E. B. (2003) Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA. *J Histochem Cytochem.* 51(12), 1681-8.

NICKENIG, G. (2002) Central role of the AT(1)-receptor in atherosclerosis. *J Hum Hypertens.* 16 Suppl 3, S26-33.

OCARANZA, M. P.; JALIL, J. E. (2012) Protective Role of the ACE2/Ang-(1-9) Axis in Cardiovascular Remodeling. *Int J Hypertens*, Vol. 2012, 12 pages, DOI: 10.1155/2012/594361. Abgerufen von der URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22315665> am 02/07/2012 14:20.

OMURA-MATSUOKA, E.; YAGITA, Y.; SASAKI, T.; TERASAKI, Y.; OYAMA, N.; SUGIYAMA, Y.; TODO, K.; SAKODA, S.; KITAGAWA, K. (2011) Hypertension impairs leptomeningeal collateral growth after common carotid artery occlusion: restoration by antihypertensive treatment. *J Neurosci Res.* 89(1), 108-16.

OPARIL, S. (2000) Newly emerging pharmacologic differences in angiotensin II receptor blockers. *Am J Hypertens.* 13(1 Pt 2), 18S-24S.

OYAMA, N.; YAGITA, Y.; SASAKI, T.; OMURA-MATSUOKA, E.; TERASAKI, Y.; SUGIYAMA, Y.; SAKODA, S.; KITAGAWA, K. (2010) An angiotensin II type 1 receptor blocker can preserve endothelial function and attenuate brain ischemic damage in spontaneously hypertensive rats. *J Neurosci Res.* 88(13), 2889-98.

PAGE, I. H.; HELMER, O. M. (1940) A Crystalline Pressor Substance (Angiotonin) Resulting from the Reaction between Renin and Renin-Activator. *J Exp Med.* 71(1), 29-42.

PATAN, S. (2000) Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J Neurooncol.* 50(1-2), 1-15.

PIEPGRAS, A.; SCHMIEDEK, P.; LEINSINGER, G.; HABERL, R. L.; KIRSCH, C. M.; EINHAUPL, K. M. (1990) A simple test to assess cerebrovascular reserve capacity using transcranial Doppler sonography and acetazolamide. *Stroke.* 21(9), 1306-11.

PITT, B.; POOLE-WILSON, P. A.; SEGAL, R.; MARTINEZ, F. A.; DICKSTEIN, K.; CAMM, A. J.; KONSTAM, M. A.; RIEGGER, G.; KLINGER, G. H.; NEATON, J.; SHARMA, D.; THIYAGARAJAN, B. (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), 1582-7.

PLENDL, J.; SNYMAN, C.; NAIDOO, S.; SAWANT, S.; MAHABEER, R.; BHOOLA, K. D. (2000) Expression of tissue kallikrein and kinin receptors in angiogenic microvascular endothelial cells. *Biol Chem.* 381(11), 1103-15.

PUGH, C. W.; RATCLIFFE, P. J. (2003) Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med.* 9(6), 677-84.

REED, R.; KOLZ, C.; POTTER, B.; ROCIC, P. (2008) The mechanistic basis for the disparate effects of angiotensin II on coronary collateral growth. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28(1), 61-7.

REGOLI, D.; BARABE, J. (1980) Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev.* 32(1), 1-46.

REN, J.; LI, H.; PRIOR, B. M.; YANG, H. T. (2008) Angiotensin converting enzyme inhibition enhances collateral artery remodeling in rats with femoral artery occlusion. *Am J Med Sci.* 335(3), 177-87.

RISAU, W.; FLAMME, I. (1995) Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 11, 73-91.

ROGG, J.; RUTIGLIANO, M.; YONAS, H.; JOHNSON, D. W.; PENTHENY, S.; LATCHAW, R. E. (1989) The acetazolamide challenge: imaging techniques designed to evaluate cerebral blood flow reserve. *AJR Am J Roentgenol.* 153(3), 605-12.

ROSS, R. (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 340(2), 115-26.

ROY, J.; SHAH, N. R.; WOOD, G. C.; TOWNSEND, R.; HENNESSY, S. (2012) Comparative effectiveness of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers for hypertension on clinical end points: a cohort study. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 14(7), 407-14.

RUIZ-ORTEGA, M.; LORENZO, O.; RUPEREZ, M.; ESTEBAN, V.; SUZUKI, Y.; MEZZANO, S.; PLAZA, J. J.; EGIDO, J. (2001) Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field. *Hypertension*. 38(6), 1382-7.

SAGER, H. B.; MIDDENDORFF, R.; RAUCHE, K.; WEIL, J.; LIEB, W.; SCHUNKERT, H.; ITO, W. D. (2010) Temporal patterns of blood flow and nitric oxide synthase expression affect macrophage accumulation and proliferation during collateral growth. *J Angiogenes Res*. 2, 18.

SASAKI, K.; MUROHARA, T.; IKEDA, H.; SUGAYA, T.; SHIMADA, T.; SHINTANI, S.; IMAIZUMI, T. (2002) Evidence for the importance of angiotensin II type 1 receptor in ischemia-induced angiogenesis. *J Clin Invest*. 109(5), 603-11.

SAVOIA, C.; D'AGOSTINO, M.; LAURI, F.; VOLPE, M. (2011) Angiotensin type 2 receptor in hypertensive cardiovascular disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 20(2), 125-32.

SCHAPER, W. (2011): Multiple Pathways converge in the Development of a Collateral Circulation (Arteriogenesis). In: *Arteriogenesis - Molecular Regulation, Pathophysiology and Therapeutics I*. Hrsg. E. Deindl and W. Schaper. Aachen: Shaker Verlag, Auflage 1. ISBN: 978-3-8322-9797-8, S. 67-73.

SCHAPER, W.; BUSCHMANN, I. (1999) Arteriogenesis, the good and bad of it. *Eur Heart J*. 20(18), 1297-9.

SCHIRMER, S. H.; VAN ROYEN, N.; LAUFS, U.; BOHM, M. (2009) [Mechanisms and potential of the therapeutic stimulation of arteriogenesis]. *Dtsch Med Wochenschr*. 134(7), 302-6.

SCHMAIER, A. H. (2002) The plasma kallikrein-kinin system counterbalances the renin-angiotensin system. *J Clin Invest*. 109(8), 1007-9.

SCHMAIER, A. H. (2003) The kallikrein-kinin and the renin-angiotensin systems have a multilayered interaction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 285(1), R1-13.

SCHNEELOCH, E.; MIES, G.; BUSCH, H. J.; BUSCHMANN, I. R.; HOSSMANN, K. A. (2004) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced arteriogenesis reduces energy failure in hemodynamic stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(34), 12730-5.

SCHOLZ, D.; ITO, W.; FLEMING, I.; DEINDL, E.; SAUER, A.; WIESNET, M.; BUSSE, R.; SCHAPER, J.; SCHAPER, W. (2000) Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis). *Virchows Arch*. 436(3), 257-70.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 182(3), 311-22.

SHI, Q.; RAFII, S.; WU, M. H.; WIJELATH, E. S.; YU, C.; ISHIDA, A.; FUJITA, Y.; KOTHARI, S.; MOHLE, R.; SAUVAGE, L. R.; MOORE, M. A.; STORB, R. F.; HAMMOND, W. P. (1998) Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*. 92(2), 362-7.

SILVESTRE, J. S.; BERGAYA, S.; TAMARAT, R.; DURIEZ, M.; BOULANGER, C. M.; LEVY, B. I. (2001) Proangiogenic effect of angiotensin-converting enzyme inhibition is mediated by the bradykinin B(2) receptor pathway. *Circ Res.* 89(8), 678-83.

SKALLI, O.; ROPRAZ, P.; TRZECIAK, A.; BENZONANA, G.; GILLESSEN, D.; GABBIANI, G. (1986) A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol.* 103(6 Pt 2), 2787-96.

SMITH, C. G.; VANE, J. R. (2003) The discovery of captopril. *FASEB J.* 17(8), 788-9.

STEFFENS, S.; MACH, F. (2004) Inflammation and atherosclerosis. *Herz.* 29(8), 741-8.

STOLL, M.; HAMANN, G. F. (2002) [Cerebrovascular reserve capacity]. *Nervenarzt.* 73(8), 711-8.

SWINNEY, D. C. (2004) Biochemical mechanisms of drug action: what does it take for success? *Nat Rev Drug Discov.* 3(9), 801-8.

TABATA, S.; YAMAZAKI, H.; OHTAKE, Y.; HAYASHI, S. (1990) Rapid conversion of the new angiotensin converting enzyme inhibitor ramipril to its active metabolite in rats. *Arzneimittelforschung.* 40(8), 865-7.

TAKAHASHI, T.; KALKA, C.; MASUDA, H.; CHEN, D.; SILVER, M.; KEARNEY, M.; MAGNER, M.; ISNER, J. M.; ASAHARA, T. (1999) Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med.* 5(4), 434-8.

THUBRIKAR, M. J.; ROBICSEK, F. (1995) Pressure-induced arterial wall stress and atherosclerosis. *Ann Thorac Surg.* 59(6), 1594-603.

TIMMERMANS, P. B.; WONG, P. C.; CHIU, A. T.; HERBLIN, W. F.; BENFIELD, P.; CARINI, D. J.; LEE, R. J.; WEXLER, R. R.; SAYE, J. A.; SMITH, R. D. (1993) Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev.* 45(2), 205-51.

TOM, B.; DENDORFER, A.; DE VRIES, R.; SAXENA, P. R.; JAN DANSER, A. H. (2002) Bradykinin potentiation by ACE inhibitors: a matter of metabolism. *Br J Pharmacol.* 137(2), 276-84.

TROIDL, K.; TRIBULOVA, S.; CAI, W. J.; RUDING, I.; APFELBECK, H.; SCHIERLING, W.; TROIDL, C.; SCHMITZ-RIXEN, T.; SCHAPER, W. (2010) Effects of endogenous nitric oxide and of DETA NONOate in arteriogenesis. *J Cardiovasc Pharmacol.* 55(2), 153-60.

TUMMALA, P. E.; CHEN, X. L.; SUNDELL, C. L.; LAURSEN, J. B.; HAMMES, C. P.; ALEXANDER, R. W.; HARRISON, D. G.; MEDFORD, R. M. (1999) Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation.* 100(11), 1223-9.

UNGER, T.; DAHLOF, B. (2010) Compound 21, the first orally active, selective agonist of the angiotensin type 2 receptor (AT2): implications for AT2 receptor research and therapeutic potential. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 11(1), 75-7.

UNTHANK, J. L.; HAAS, T. L.; MILLER, S. J. (2011): Impact of Shear level and Cardiovascular Risk Factors on Bioavailable Nitric Oxide and Outward Vascular Remodeling. In: *Arteriogenesis - Molecular Regulation, Pathophysiology and Therapeutics I*. Hrsg. E. Deindl and W. Schaper. Aachen: Shaker Verlag, Auflage 1. ISBN: 978-3-8322-9797-8, S. 89-119.

VIEDT, C.; VOGEL, J.; ATHANASIOU, T.; SHEN, W.; ORTH, S. R.; KUBLER, W.; KREUZER, J. (2002) Monocyte chemoattractant protein-1 induces proliferation and interleukin-6 production in human smooth muscle cells by differential activation of nuclear factor-kappaB and activator protein-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22(6), 914-20.

WAN, Y.; WALLINDER, C.; PLOUFFE, B.; BEAUDRY, H.; MAHALINGAM, A. K.; WU, X.; JOHANSSON, B.; HOLM, M.; BOTOROS, M.; KARLEN, A.; PETTERSSON, A.; NYBERG, F.; FANDRIKS, L.; GALLO-PAYET, N.; HALLBERG, A.; ALTERMAN, M. (2004) Design, synthesis, and biological evaluation of the first selective nonpeptide AT<sub>2</sub> receptor agonist. *J Med Chem.* 47(24), 5995-6008.

WEISINGER, H. S.; BEGG, D. P.; EGAN, G. F.; JAYASOORIYA, A. P.; LIE, F.; MATHAI, M. L.; SINCLAIR, A. J.; WARK, J. D.; WEISINGER, R. S. (2008) Angiotensin converting enzyme inhibition from birth reduces body weight and body fat in Sprague-Dawley rats. *Physiol Behav.* 93(4-5), 820-5.

WEISS, D.; KOOLS, J. J.; TAYLOR, W. R. (2001) Angiotensin II-induced hypertension accelerates the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Circulation.* 103(3), 448-54.

WHO. (2012a) Causes of death in 2008. Abgerufen von der URL <http://www.who.int/gho/en/am> 29/10/2012 16:10.

WHO. (2012b) Global health risks (2009). Abgerufen von der URL [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/global\\_health\\_risks/en/index.html](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/global_health_risks/en/index.html) am 29/10/2012 13:24.

WIDDOP, R. E.; MATROUGUI, K.; LEVY, B. I.; HENRION, D. (2002) AT<sub>2</sub> receptor-mediated relaxation is preserved after long-term AT<sub>1</sub> receptor blockade. *Hypertension.* 40(4), 516-20.

YANG, H. T.; TERJUNG, R. L. (1993) Angiotensin-converting enzyme inhibition increases collateral-dependent muscle blood flow. *J Appl Physiol.* 75(1), 452-7.

YANG, H. Y.; ERDOS, E. G.; LEVIN, Y. (1970) A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochim Biophys Acta.* 214(2), 374-6.

YANG, H. Y.; ERDOS, E. G.; LEVIN, Y. (1971) Characterization of a dipeptide hydrolase (kininase II: angiotensin I converting enzyme). *J Pharmacol Exp Ther.* 177(1), 291-300.

YANG, X. P.; LIU, Y. H.; MEHTA, D.; CAVASIN, M. A.; SHESELY, E.; XU, J.; LIU, F.; CARRETERO, O. A. (2001) Diminished cardioprotective response to inhibition of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor in B(2) kinin receptor gene knockout mice. *Circ Res.* 88(10), 1072-9.

YU, C.; GONG, R.; RIFAI, A.; TOLBERT, E. M.; DWORKIN, L. D. (2007) Long-term, high-dosage candesartan suppresses inflammation and injury in chronic kidney disease: nonhemodynamic renal protection. *J Am Soc Nephrol.* 18(3), 750-9.

YVAN-CHARVET, L.; EVEN, P.; BLOCH-FAURE, M.; GUERRE-MILLO, M.; MOUSTAID-MOUSSA, N.; FERRE, P.; QUIGNARD-BOULANGE, A. (2005) Deletion of the angiotensin type 2 receptor (AT2R) reduces adipose cell size and protects from diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes.* 54(4), 991-9.

ZEIHER, A. M.; FISSLTHALER, B.; SCHRAY-UTZ, B.; BUSSE, R. (1995) Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res.* 76(6), 980-6.

ZIEGELHOEFFER, T.; SCHOLZ, D.; FRIEDRICH, C.; HELISCH, A.; WAGNER, S.; FERNANDEZ, B.; SCHAPER, W. (2003) Inhibition of collateral artery growth by mibefradil: possible role of volume-regulated chloride channels. *Endothelium.* 10(4-5), 237-46.

ZIEGLER, M. A.; DISTASI, M. R.; BILLS, R. G.; MILLER, S. J.; ALLOOSH, M.; MURPHY, M. P.; GEORGE AKINGBA, A.; STUREK, M.; DALSING, M. C.; UNTHANK, J. L. (2010) Marvels, mysteries, and misconceptions of vascular compensation to peripheral artery occlusion. *Microcirculation.* 17(1), 3-20.

## 9. ABKÜRZUNGEN

3-VO	Three Vessel Occlusion, Drei-Gefäß-Verschluss
A./Aa.	Arteria/Arteriae
ACE	Angiotensin Converting Enzyme / Angiotensin-konvertierendes Enzym
ACE2	Angiotensin Converting Enzyme 2 / Angiotensin-konvertierendes Enzym 2
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
Ang III	Angiotensin III / Angiotensin (2-8)
Ang IV	Angiotensin IV / Angiotensin (3-8)
Ang (1-7)	Angiotensin (1-7)
Ang (1-9)	Angiotensin (1-9)
ARB	Angiotensin II-Rezeptor Subtyp 1-Blocker
ATP	Adenosintriphosphat
AT <sub>1</sub> R - AT <sub>4</sub> R	Angiotensin II-Rezeptor Subtyp 1 bis Subtyp 4
ATR	Angiotensin II-Rezeptoren
B <sub>1</sub> R / B <sub>2</sub> R	Bradykininrezeptor Subtyp 1 / Subtyp 2
BR	Bradykininrezeptoren
BRB	Bradykininrezeptor-Blocker
BSA	bovines Serumalbumin
C21	Compound 21
cAMP	cyclic adenosine monophosphate / zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclic guanosine monophosphate / zyklisches Guanosinmonophosphat
CVRC	cerebrovascular reserve capacity
eNOS	endothelial nitric oxide synthase / endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor / Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GTP	Guanosintriphosphat
HE	Hämatoxylin-Eosin
HK	high-molecular-weight kininogen / hochmolekulares Kininogen
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1 / interzelluläres Adhäsionsmolekül 1



## ABKÜRZUNGEN

---

IE	Internationale Einheiten
IL-1	Interleukin 1
IgG	Immunglobulin G
iNOS	inducible nitric oxide synthase / induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
KG	Körpergewicht
KKS	Kallikrein-Kinin-System
KO	Knock out
LDL	low density lipoprotein / Lipoprotein niederer Dichte
LK	low-molecular-weight kininogen / niedermolekulares Kininogen
M./Mm.	Musculus/Musculi
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1 / Monozyten chemotaktisches Protein 1
NAD(P)H	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NO	nitric oxide / Stickstoffmonoxid
OT	Objektträger
PBS	phosphate buffered saline / Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBSA	PBS mit bovinem Serumalbumin
pCO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid (CO <sub>2</sub> )-Partialdruck
RAS	Renin-Angiotensin-System
ROS	reactive oxygen species / reaktive Sauerstoffspezies
SPF	spezifisch-pathogenfrei
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1 / vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1
VEGF	vascular endothelial growth factor / vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
WHO	World Health Organization / Weltgesundheitsorganisation

## 10. ABBILDUNGEN / TABELLEN / FORMELN

### 10.1 ABBILDUNGEN

<b>Abbildung 1</b> Skizzierte Darstellung der Vaskulogenese. _____	3
<b>Abbildung 2</b> Skizzierte Darstellung der Angiogenese. _____	4
<b>Abbildung 3</b> Skizzierte Darstellung der Arteriogenese. _____	5
<b>Abbildung 4</b> Schematische Darstellung des Renin-Angiotensin-Systems. _____	11
<b>Abbildung 5</b> Schematische Darstellung des Kallikrein-Kinin-Systems. _____	16
<b>Abbildung 6</b> Skizzierte Struktur des Circulus Willisi vor und nach Drei-Gefäß-Verschluss. _____	23
<b>Abbildung 7</b> Darstellung des relativen Gewichtsverlaufes über 21 Tage. _____	49
<b>Abbildung 8</b> Darstellung der relativen Gewichts Differenz über 21 Tage. _____	50
<b>Abbildung 9</b> Darstellung des relativen Gewichtsverlaufes über 7 Tage. _____	50
<b>Abbildung 10</b> Darstellung der relativen Gewichts Differenz über 7 Tage. _____	51
<b>Abbildung 11</b> Beispiel einer Aufzeichnung des zerebralen Blutflusses bei dem Drei-Gefäß-Verschluss über 10 Minuten. _____	52
<b>Abbildung 12</b> Darstellung des relativen Blutflusses vor und bis zu 10 Minuten nach dem Drei-Gefäß-Verschluss aller Gruppen. _____	52
<b>Abbildung 13</b> Darstellung der Veränderung von CO <sub>2</sub> -Partialdruck und pH des Blutes vor und nach der Applikation von Acetazolamid aller Gruppen. _____	53
<b>Abbildung 14</b> Übersicht der Gruppenmittelwerte aus der Messung der zerebrovaskulären Reservekapazität. _____	54
<b>Abbildung 15</b> Aufzeichnung der Messung der zerebrovaskulären Reservekapazität eines unbehandelten, nicht operierten Tieres über 8 Minuten nach Acetazolamid-Applikation. _____	55
<b>Abbildung 16</b> Aufzeichnung der Messung der zerebrovaskulären Reservekapazität eines Tieres (24 Stunden nach 3-VO) über 8 Minuten nach Acetazolamid-Applikation. _____	55
<b>Abbildung 17</b> Aufzeichnung der Messung der zerebrovaskulären Reservekapazität eines Kontrolltieres (7 Tage nach 3-VO) über 8 Minuten nach Acetazolamid-Applikation. _____	56
<b>Abbildung 18</b> Aufzeichnung der Messung der zerebrovaskulären Reservekapazität eines Kontrolltieres (21 Tage nach 3-VO) über 8 Minuten nach Acetazolamid-Applikation. _____	56
<b>Abbildung 19</b> Übersicht der Gruppenmittelwerte der Messung der zerebrovaskulären Reservekapazität. _____	57

<b>Abbildung 20</b> Aufzeichnung der Messung der zerebrovaskulären Reservekapazität eines Tieres nach AT <sub>1</sub> R-Antagonist-Behandlung (21 Tage nach 3-VO) über 8 Minuten nach Acetazolamid-Applikation.	57
<b>Abbildung 21</b> Aufzeichnung der Messung der zerebrovaskulären Reservekapazität eines Tieres nach AT <sub>2</sub> R-Agonist-Behandlung (21 Tage nach 3-VO) über 8 Minuten nach Acetazolamid-Applikation.	58
<b>Abbildung 22</b> Übersicht der Gruppenmittelwerte der Messung der zerebrovaskulären Reservekapazität.	59
<b>Abbildung 23</b> Aufzeichnung der Messung der zerebrovaskulären Reservekapazität eines Tieres nach ACE-Hemmer-Behandlung (7 Tage nach 3-VO) über 8 Minuten nach Acetazolamid-Applikation.	59
<b>Abbildung 24</b> Aufzeichnung der Messung der zerebrovaskulären Reservekapazität eines Tieres nach ACE-Hemmer- und Bradykininrezeptor-Blocker-Behandlung (7 Tage nach 3-VO) über 8 Minuten nach Acetazolamid-Applikation.	59
<b>Abbildung 25</b> Übersicht der Gruppenmittelwerte des arteriellen Blutdruckes.	61
<b>Abbildung 26</b> Der Circulus arteriosus cerebri nach der Latexperfusion.	62
<b>Abbildung 27</b> Darstellung der Diameter-Mittelwerte der A. cerebri posterior im Gruppenvergleich des ersten Teilversuchs.	63
<b>Abbildung 28</b> Darstellung der Diameter-Mittelwerte der A. cerebri posterior im Gruppenvergleich des zweiten Teilversuchs.	64
<b>Abbildung 29</b> Vergleich von Aufnahmen der Aa. cerebri posteriores nach Latexperfusion.	66
<b>Abbildung 30</b> Darstellung der Anzahl glatter Gefäßmuskelschichten der A. cerebri posterior im Gruppenvergleich.	69
<b>Abbildung 31</b> Darstellung der Anzahl proliferierender Zellkerne der A. cerebri posterior im Gruppenvergleich.	70
<b>Abbildung 32</b> Sagittal angeschnittene Hirnregion mit der ipsilateralen A. cerebri posterior und A. communicans posterior im Querschnitt.	71
<b>Abbildung 33</b> Unterschiedliche Formen bzw. Lokalisierung der proliferierenden Zellkerne. Sichtbare Endothelzellkerne und Kerne der Gefäßmuskelnzellen.	71
<b>Abbildung 34</b> Beispielbilder der immunhistochemischen Untersuchung aus der Kontrollgruppe, der mit ACE-Hemmer behandelten Gruppe und der Gruppe, die sowohl mit ACE-Hemmer als auch mit Bradykininrezeptor-Blockern behandelt wurde.	72
<b>Abbildung 35</b> Angepasste Systemübersicht des Renin-Angiotensin- und Kallikrein-Kinin-Systems unter Berücksichtigung ihrer Interaktionsstellen.	91

## 10.2 TABELLEN

<b>Tabelle 1</b> Übersicht der Tiergruppen und ihrer Größen. _____	32
<b>Tabelle 2</b> Zeitliche Übersicht des Versuchs. _____	33
<b>Tabelle 3</b> Übersicht und Details zu den einzelnen Substanzen. _____	37
<b>Tabelle 4</b> Übersicht der im Versuch eingesetzten Tiere unter Angabe derer, die die initiale Operation überlebt haben und derer, deren Untersuchungsergebnisse ausgewertet werden konnten. _____	48
<b>Tabelle 5</b> Blutwerte im Gruppenvergleich. _____	53
<b>Tabelle 6</b> Übersicht der Werte von zerebrovaskulärer Reservekapazität und Blutdruck im Gruppenvergleich. _____	60
<b>Tabelle 7</b> Übersicht der Ergebnisse aus der Latexangiographie. _____	67
<b>Tabelle 8</b> Übersicht der Ergebnisse aus der immunhistochemischen Untersuchung. _____	68

## 10.3 FORMELN

<b>Formel 1</b> Das Gesetz von Hagen-Poiseuille. _____	7
--	---

## 11. PUBLIKATIONEN

HILLMEISTER, P., GATZKE, N., DULSNER, A., BADER, M., SCHADOCK, I., HOEFER, I., HAMANN, I., INFANTE-DUARTE, C., JUNG, G., TROIDL, K., URBAN, D., STAWOWY, P., FRENTSCH, M., LI, M., **NAGORKA, S.**, WANG, H., SHI, Y., LE NOBLE, F. und BUSCHMANN, I. (2011) Arteriogenesis is modulated by bradykinin receptor signaling. *Circ Res* 109, 524-33.

DUELSNER, A., GATZKE, N., GLASER, J., HILLMEISTER, P., LI, M., LEE, E.J., LEHMANN, K., URBAN, D., MEYBORG, H., STAWOWY, P., BUSJAHN, A., **NAGORKA, S.**, PERSSON, A.B. und BUSCHMANN, I.R. (2011) Acetylsalicylic acid, but not clopidogrel, inhibits therapeutically induced cerebral arteriogenesis in the hypoperfused rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 32, 105-114.

DUELSNER, A. AND GATZKE, N., GLASER, J., HILLMEISTER, P., LI, M., LEE, E.J., LEHMANN, K., URBAN, D., MEYBORG, H., STAWOWY, P., BUSJAHN, A., **NAGORKA, S.**, BONDKE PERSSON, A. und BUSCHMANN, I.R. (2011) Granulocyte-Colony Stimulating Factor Improves Cerebrovascular Reserve Capacity by Collateral Growth in the Circle of Willis. *Cerebrovasc Dis* 33, 419-429.

HACKBUSCH, D., DÜLSNER, A., GATZKE, N., KRÜGER, J., HILLMEISTER, P., **NAGORKA, S.**, BLASCHKE, F., RITTER, Z., THÖNE-REINEKE, C., BÖHMER, F.D., BUSCHMANN, I.R. und KAPPERT, K. (2013) Knockdown of Density-Enhanced Phosphatase-1 (DEP-1) impairs Cerebrovascular Reserve Capacity in an Arteriogenesis Model in Mice. *BioMed Res Int*, vol. 2013, Article ID 802149, 9 pages.

## 12. DANKSAGUNGEN

An dieser Stelle möchte ich sehr herzlich Herrn Priv.-Doz. Dr. Ivo Buschmann danken, der mir den Einstieg in die medizinische Forschung ermöglicht hat. Ich bedanke mich besonders für das Vertrauen in meine Arbeit an dem vorliegenden Dissertationsthema und für die lehrreiche Zusammenarbeit im Kreise der Arbeitsgruppe für Experimentelle und Klinische Arteriogenese.

Bei Frau Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl möchte ich mich recht herzlich für die Übernahme der Betreuung seitens des Fachbereiches Veterinärmedizin bedanken, für die konstruktive Beratung und für ihren Enthusiasmus, der ausgesprochen motivierend für meine Arbeit war.

Ein großes Dankeschön richte ich an all meine Kollegen der „Richard Thoma Laboratorien für Arteriogenese“. Hier danke ich von ganzem Herzen Dres. André Dülsner und Nora Gatzke für die Einarbeitung in die Methoden, ihre stete Unterstützung und den immer währenden Rückhalt bei den Tücken einer Doktorarbeit. Gleichermäßen danke ich Dr. Philipp Hillmeister für die Einarbeitung in die histologischen Verfahren und für seine freundliche Hilfe bei molekularbiologischen Fragen.

Außerdem bedanke ich mich bei allen anderen Mitarbeitern des Center for Cardiovascular Research (CCR), die mir während meines Projektes mit Rat und Tat zu Seite standen. Besonders Janine Krüger gilt mein Dank, mit der ich so manch ein Doktorandenproblem diskutieren und lösen konnte.

Der Deutschen Herzstiftung e.V. und ebenso dem Deutschen Institut für Bluthochdruckforschung (DIB) e.V. möchte ich sehr für die finanzielle Unterstützung meines Promotionsvorhabens danken.

Für seinen unerschütterlichen guten Zuspruch, seine Geduld, die diese Arbeit oft von ihm abverlangt hat, und seinen fortwährenden Glauben an meinen Erfolg danke ich meinem Freund, Nils Röder, ganz besonders.

Mein tiefster Dank geht an meine bewundernswerte Mutter, Andrea, und meinen lieben Bruder, Norman Nagorka, an deren Seite ich alles schaffen kann.

### **13. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation, einschließlich aller Abbildungen, von mir selbst angefertigt wurde. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 06.02.2013

Stephanie Nagorka