

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

Forschergruppe für Experimentelle und Klinische Arteriogenese
Innere Medizin CC 13 Schwerpunkt Kardiologie
Center for Cardiovascular Research (CCR)

eingereicht über das
Institut für Tier-Pathologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Auswirkungen von Acetylsalicylsäure und Clopidogrel auf das Kollateralgefäßwachstum im zerebralen Arteriogenesemodell der Ratte

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

vorgelegt von
André Dülsner
Tierarzt
aus Berlin

Berlin 2009
Journal-Nr.: 3293

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: PD Dr. Anja Sterner-Kock
Zweiter Gutachter: PD Dr. Ivo R. Buschmann
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Fink

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

rats, animal models, monocytes, colony stimulating factor, Granulocyte Colony-Stimulating Factor (MeSH), collateral circulation (MeSH), arterial occlusive diseases (MeSH), stroke, aspirin, anticoagulants, anti-inflammatory agents

Tag der Promotion: 19.05.2009

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: 978-3-86664-585-1

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2009

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 2009

choriner str. 85 - 10119 berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Nicht der Wind, sondern das Segel bestimmt die Richtung.

Chinesische Weisheit

Inhalt

1.	Einleitung und Aufgabestellung	1
1.1.	Aufgabenstellung	1
1.2.	Blutversorgung des Gehirns	4
1.3.	Zerebrovaskuläre Krankheiten	6
1.3.1.	Epidemiologie	6
1.3.2.	Ätiologie und Pathogenese	6
1.3.3.	Klinische Erscheinungsformen (TIA, Prind, Schlaganfall, Demenz)	8
1.3.4.	Aktuelle Therapie (Primärprävention, Akuttherapie, Sekundärprävention) ...	10
1.4.	Formen des Gefäßwachstums	11
1.4.1.	Vaskulogenese: Die Bildung eines einfachen Netzwerkes	11
1.4.2.	Angiogenese: Das Aussprossen neuer Kapillaren	12
1.4.3.	Arteriogenese	13
1.4.3.1.	Das Kollateralwachstum präexistenter Arteriolen	13
1.4.3.2.	Tiermodelle und Alternativen in der Arteriogeneseforschung	15
1.4.3.3.	Zerebrale Arteriogenese	17
1.4.3.4.	Kolonie-stimulierende Faktoren in der zerebralen Arteriogenese	18
1.5.	Antikoagulations-Therapeutika	20
1.5.1.	Acetylsalicylsäure (<i>Aspirin</i>®, <i>ASS</i>®, <i>Aspisol</i>®)	20
1.5.2.	Clopidogrel (<i>Plavix</i>®, <i>Iscover</i>®)	21
1.5.3.	Aspirin, Clopidogrel und Arteriogenese	22
2.	Materialien und Methoden	24

2.1.	Materialien	24
2.1.1.	Tierhaltung.....	24
2.1.2.	Geräte	24
2.1.3.	Chirurgische Instrumente.....	25
2.1.4.	Medikamente.....	26
2.1.5.	Chemikalien & Lösungen & Gase.....	27
2.1.6.	Verbrauchsmaterialien	27
2.2.	Versuchstiere und Methoden.....	28
2.2.1.	Versuchstiere.....	28
2.2.1.1.	Haltungsbedingungen.....	29
2.2.1.2.	Tierversuchsgenehmigung	29
2.2.1.3.	Randomisierung.....	29
2.2.2.	Tierexperimentelle Methoden	33
2.2.2.1.	Zeitlicher Ablauf.....	33
2.2.2.2.	Narkose	34
2.2.2.3.	Blutflussmessung mittels Laser-Dopplerflowmetrie	35
2.2.2.4.	Drei-Gefäß-Verschluss (<i>Three Vessel Occlusion = 3-VO</i>)	36
2.2.2.5.	Sham-Operation.....	37
2.2.2.6.	Reaktionsfähigkeit (Reagibilität) der Gefäße	37
2.2.2.7.	Zerebrovaskuläre hämodynamische Reservekapazität	38
2.2.2.8.	Postmortale Latexangiographie (<i>Latexperfusion</i>).....	39
2.2.2.9.	Entnahme des Gehirns	40

2.2.3.	Morphologische Aufarbeitung - Bestimmung der Diameter	41
2.2.4.	Statistische Auswertung	41
3.	Ergebnisse.....	43
3.1.	3-VO erzeugte zerebrale Hypoperfusion.....	43
3.2.	Prolongierte Clopidogrel-Behandlung erhöhte die Sterblichkeitsrate	44
3.3.	Clopidogrel, nicht aber ASS, verlangsamte die Gewichtsregenerierungsphase ...	45
3.4.	Untersuchung der adaptiven und therapeutischen Arteriogenese.....	48
3.4.1.	G-CSF verbesserte die hämodynamische Reservekapazität	48
3.4.2.	3-VO induzierte Kollateralwachstum in der PCA.....	51
3.5.	Einfluss von ASS und Clopidogrel auf die adaptive zerebrale Arteriogenese...	54
3.5.1.	Weder ASS noch Clopidogrel beeinflussten die Reagibilität.....	54
3.5.2.	ASS verschlechterte die hämodynamische Reservekapazität	55
3.5.3.	Kein Einfluss auf das adaptive Kollateralwachstum durch ASS/Clop.....	58
3.6.	Einfluss auf die therapeutisch induzierte zerebrale Arteriogenese	59
3.6.1.	ASS hemmte die therapeutische Verbesserung der Reservekapazität	59
3.6.2.	ASS hemmte die therapeutische Verbesserung des Kollateralwachstums.....	62
4.	Diskussion.....	65
4.1.	Reproduzierbarkeit der adaptiven zerebralen Arteriogenese im 3-VO-Modell	65
4.2.	Therapeutische Induktion der zerebralen Arteriogenese durch G-CSF.....	67
4.3.	Effekte von ASS und Clopidogrel auf die zerebrale Arteriogenese	69
4.3.1.	Effekte auf die adaptive zerebrale Arteriogenese.....	69
4.3.2.	Einfluss auf die Reagibilität.....	71

4.3.3.	Einfluss auf die therapeutisch induzierte Arteriogenese	72
4.3.4.	Schlussfolgerung	73
4.4.	Nebeneffekte der Studie	75
4.5.	Übertragbarkeit der Daten in die Klinik.....	77
5.	Zusammenfassung	79
6.	Summary	80
7.	Zitierte Literatur	81
8.	Abkürzungen.....	92
9.	Abbildungen und Tabellen	96
9.1.	Abbildungen.....	96
9.2.	Tabellen	97
10.	Publikationsliste.....	98
11.	Danksagung.....	99
12.	Selbstständigkeitserklärung	100

1. Einleitung und Aufgabestellung

1.1. Aufgabenstellung

Diese Dissertation beschäftigt sich mit dem Thema „Auswirkungen von Acetylsalicylsäure und Clopidogrel auf das Kollateralgefäßwachstum im zerebralen Arteriogenesemodell der Ratte“.

Wie bereits im Kaninchenhinterlauf gezeigt wurde, hemmt Acetylsalicylsäure (ASS) nach Verschluss der Arteria femoralis die periphere Arteriogenese, welche das Auswachsen von präexistenten kollateralen Arteriolen zu funktionellen Konduktanzgefäßen beschreibt (*Hoefer et al., 2005a*). Die anhand dieser experimentellen Ergebnisse eingeleitete klinische Studie an peripherer arterieller Verschlusskrankheit (PaVK) erkrankten Patienten beweist die hohe klinische Relevanz (*Singer et al., 2006*).

Eine ähnliche klinische Studie könnten die Daten der vorliegenden Studie nach sich ziehen. Bei der zerebralen Arteriogenese hätte ein anti-arteriogener Effekt von ASS nicht nur eine hohe klinische Bedeutung, sondern würde die gesamte ASS-Therapie im Zusammenhang vaskulärer, sowohl zerebraler als auch kardialer Ereignisse infrage stellen. Nach wie vor wird ASS allein oder in Kombination mit Clopidogrel in deren Sekundärprophylaxe angewandt. Daher ist die Untersuchung, ob ASS und Clopidogrel im Tiermodell ähnliche Auswirkungen auf die zerebrale wie auf die periphere Arteriogenese haben, sehr bedeutungsvoll. Eine große Rolle spielt im Gehirn das Kollateralgefäßsystem zwischen den Arteriae carotides communes und der Arteria basilaris, der Circulus arteriosus cerebri. Nach Verschluss beider Vertebralarterien und einer Arteria carotis communis (Common carotid artery, CCA), welches Dreigeäßverschlussmodell (Three vessel occlusion, 3-VO) genannt wird, kommt es zu veränderten Flussverhältnissen im Circulus, um die Blutversorgung des Gehirnes zu gewährleisten. Sollte dies durch die ASS-Behandlung unterdrückt werden, ist eine ausreichende Blutversorgung nicht mehr möglich und ischämische Insulte wären zu erwarten.

Bisher existieren keine Daten über das Zusammenspiel von zerebraler Arteriogenese und der Behandlung mit Aspirin und Clopidogrel. Unabhängig von den verschiedenen Indikationen in der Praxis, bei denen unterschiedlich hohe Konzentrationen von ASS angewendet werden, soll in dieser Studie die für die Sekundärprophylaxe übliche humane Dosierung von 100 mg/d angewendet werden.

Das Projekt wird in zwei Komplexe geteilt. Im ersten Teil werden die Auswirkungen von ASS und Clopidogrel auf die adaptive Arteriogenese untersucht. Hierbei ist wichtig, festzustellen, dass Arteriogenese ein Prozess ist, der bereits innerhalb weniger Stunden nach der 3-VO-Prozedur in Gang gesetzt wird (*Hillmeister et al., 2008*). Daher erfolgt eine Untersuchung anhand der funktionellen Methoden der postmortalen Latexangiographie und der zerebrovaskulären Reaktivität (CVR) bereits eine Woche nach 3-VO. Dabei gibt die während der CVR gemessene zerebrovaskuläre Reservekapazität (CVRC) die Gehirndurchblutung an, die ausgehend von Ruhebedingungen, durch Stimulation noch ansteigen kann (*Stoll and Hamann, 2002*). Da ASS im Rahmen der Sekundärprophylaxe in der Klinik üblicherweise jedoch über viele Monate verabreicht wird, ist für uns ebenso ein späterer Untersuchungszeitpunkt von Bedeutung, so dass in weiteren Gruppen die oben genannten Untersuchungsmethoden nach drei Wochen durchgeführt werden. Die Hypothese ist in beiden Fällen, dass das Kollateralwachstum und die CVRC während der adaptiven Arteriogenese durch ASS gehemmt werden, während Clopidogrel keinen Einfluss ausübt.

Bereits mehrfach wurde gezeigt, dass sich die adaptive zerebrale Arteriogenese therapeutisch stimulieren lässt (*Buschmann et al., 2003a; Schneeloch et al., 2004; Schneider et al., 2007; Todo et al., 2008*). Der in diesen Studien verabreichte Granulozyten-Makrophagen Colony-Stimulating-Factor (GM-CSF), welcher die Mobilisierung, Differenzierung und Reifung von Granulozyten und Monozyten stimuliert, geriet jedoch in jüngster Zeit in Kritik wegen der hohen Nebenwirkungsrate, welche auch in der bisher einzigen von Art.Net. durchgeführten klinischen Studie zur Untersuchung der peripheren Arteriogenese bestätigt wurde (*van Royen et al., 2005*). Daher wird im zweiten Teilprojekt dieser Studie zunächst erstmals die therapeutische Induktion der zerebralen Arteriogenese durch den Granulozyten Colony-Stimulating Factor (G-CSF), welcher vorrangig auf Granulozyten wirkt, als mögliche Alternative zu GM-CSF untersucht. Die bereits beschriebene Wirkung auf das periphere und koronare Kollateralwachstum (*Deindl et al., 2006*) und die Gemeinsamkeiten gegenüber GM-CSF lassen vermuten, dass auch G-CSF die zerebrale Arteriogenese zu beschleunigen vermag.

Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen, bei denen die Arteriogenese durch Wachstumsfaktoren stimuliert werden soll, könnten durch die gleichzeitige sekundärprophylaktische Behandlung mit ASS im Kollateralwachstum benachteiligt werden. Deshalb soll ebenfalls im zweiten Teilprojekt erstmals der Einfluss von ASS und Clopidogrel

auf die therapeutisch induzierte zerebrale Arteriogenese untersucht werden. Die Hypothese ist, dass das durch G-CSF wesentlich beschleunigte Kollateralwachstum und die hämodynamische Reserve nach 3-VO durch die gleichzeitige Behandlung mit ASS gehemmt werden, während Clopidogrel keinen Einfluss ausübt.

Zusammenfassend soll in dieser Studie geklärt werden, ob zum einen die zerebrale Arteriogenese durch G-CSF beschleunigt werden kann und ob zum anderen sowohl das adaptive als auch das durch G-CSF therapeutisch beschleunigte Kollateralwachstum durch ASS gehemmt wird, während Clopidogrel keinen Effekt ausüben soll.

1.2. Blutversorgung des Gehirns

Die Blutversorgung des Gehirns erfolgt über vier Arterien, die Arteriae carotides internae und die Arteriae vertebrales (*Delank and Gehlen, 2006; Poeck and Hacke, 2006*).

Die Arteriae carotides communes, die links direkt aus dem Aortenbogen und rechts aus dem Truncus brachiocephalicus entspringen, teilen sich in die Arteriae carotides internae und externae (*Poeck and Hacke, 2006*). Der externe Strang bildet anastomotische Verbindungen zum internen Strang und zu den Arteriae vertebrales (*Delank and Gehlen, 2006*).

Die Arteriae vertebrales, die beidseits aus den Arteriae subclaviae entspringen, verlaufen durch die Foramina transversaria der oberen Halswirbel und treten beim Menschen am Atlas durch die Foramina occipitale magna bzw. bei der Ratte durch die Foramina alare in die hintere Schädelgrube ein (*Poeck and Hacke, 2006*).

Die vier großen zuführenden Arterien werden an der Hirnbasis durch Anastomosen als Circulus arteriosus cerebri, der nach seinem Entdecker, dem englischen Anatom Thomas Willis auch als Circulus Willisii bezeichnet wird, miteinander verbunden. Dabei werden die Arteriae carotides internae (ICA), die Arteriae cerebri mediae (MCA), die Arteriae cerebri anteriores (ACA) zusammen mit den Arteriae communicantes posteriores (PCoA) als Carotis-media-anterior-Territorium bezeichnet. Während die Arteriae vertebrales und die Arteria basilaris mit ihren Abgängen, den Arteriae cerebri posteriores (PCA), zum Vertebralis-basilaris-posterior-Territorium zählen und über die Arteriae communicantes posteriores die Verbindung zum vorderen Territorium bilden (*Poeck and Hacke, 2006*).

Von den großen Arterien zweigen sich Zirkumferenzarterien und perforierende Arterien ab. Zirkumferenzarterien entspringen aus dem Circulus willisi und bilden auf der Hirnoberfläche ausgedehnte, leptomeningeale Anastomosen, den sogenannten Heubnerschen Anastomosen. Die perforierenden Äste entspringen aus den proximalen intrakraniellen Gefäßen, aus dem Circulus arteriosus Willisii und den basalen Abschnitten der langen Zirkumferenzarterien und dringen sofort intrazerebral ein. Sie sind funktionelle Endarterien und versorgen die subkortikalen Kerngebiete und große Anteile des Marklagers.

Die Kapillaren des Gehirns bilden die Blut-Hirn-Schranke als selektiv permeable Barriere zwischen Blutkreislauf und Zentralnervensystem (ZNS). Deren Endothelzellen sind über tight

junctions miteinander verbunden, wodurch sie eine stark kontrollierbare Diffusionsbarriere bilden. Induziert wird die Bildung der tight junctions durch Astrozyten, deren Fortsätze die Endothelzellen umgeben.

Im Gehirn verlaufen die Venolen und Venen unabhängig von Arteriolen und Arterien. Das Blut des tiefen (Venae profundae cerebri) und des oberflächlichen (Venae superficiales cerebri) Venensystems wird in Duplikaten der harten Hirnhaut (Dura mater), den Sinus durae matris (Blutleitern), gesammelt und in die Vena jugularis interna überführt (Samandari and Mai, 1995).

Circulus arteriosus cerebri (Circle of Willis)

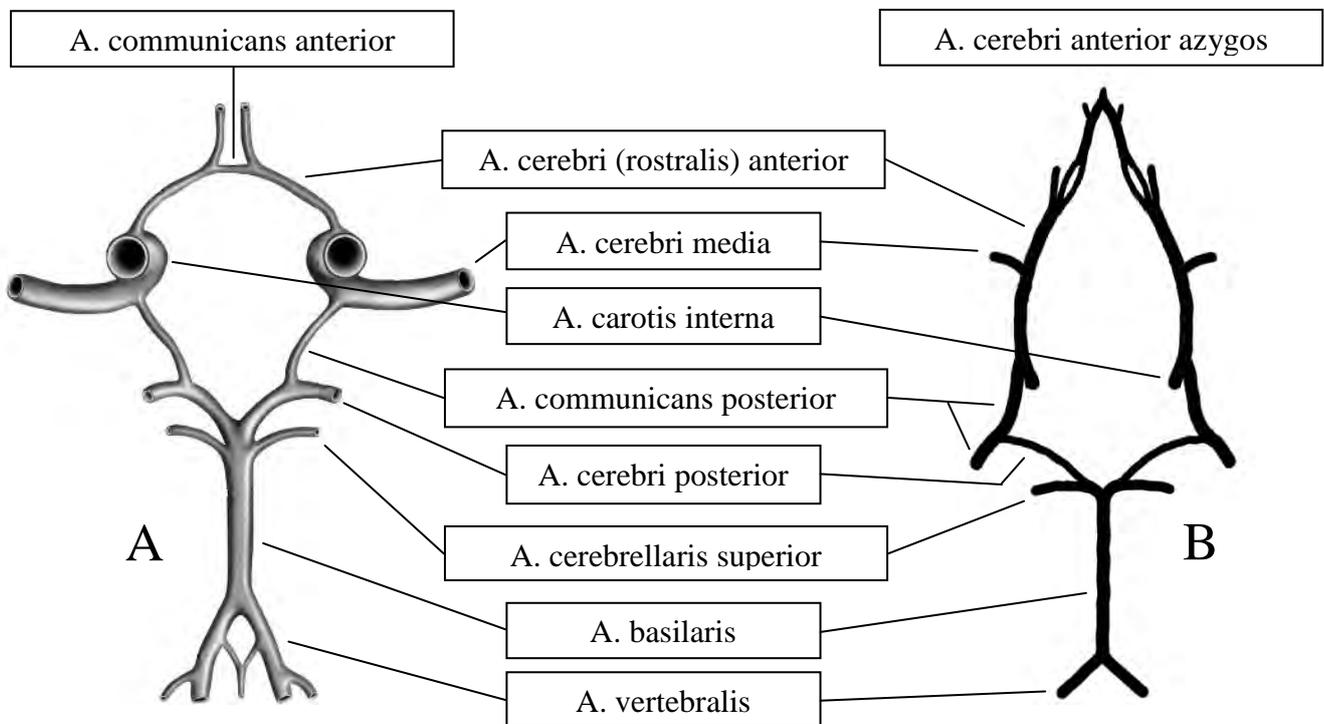


Abbildung 1 - Der Circulus Willisii

Vergleich zwischen Mensch (A, modif. nach Franco Folino (Franco Folino, 2007)) und Ratte (B, modif. nach Lee (Lee, 1995))

1.3. Zerebrovaskuläre Krankheiten

1.3.1. Epidemiologie

Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation WHO waren 2005 ischämische Herzerkrankungen die häufigste und zerebrovaskuläre Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache weltweit. In Deutschland zählten 2006 Herzerkrankungen, Lungentumore und Schlaganfälle zu den drei häufigsten Haupttodesursachen insgesamt, während differenziert nach Geschlechtern der Schlaganfall bei Frauen nach Herzerkrankungen die zweithäufigste und bei Männern nach Prostatakarzinomen die vierthäufigste Todesursache darstellten (*Statistisches Bundesamt, www.destatis.de*).

Der Schlaganfall wird in zerebrale Ischämien (85%) und vaskuläre Hirnblutungen (15%) unterschieden (*Masuhr and Neumann, 2005*). Zerebrale Ischämien treten meist als Folge von Thromboembolien der Hirngefäße, kardiogenen Embolien, zerebralen Mikroangiopathien, Vaskulitiden, Hirnvenen- und Sinusthrombophilien auf. Zu den vaskulären Hirnblutungen zählen das intrazerebrale Hämatom und die Subarachnoidalblutung (*Masuhr and Neumann, 2005*).

Als ischämischer Schlaganfall wird ein akutes fokales neurologisches Defizit aufgrund einer umschriebenen Durchblutungsstörung des Gehirns bezeichnet. Als Synonym für den ischämischen Schlaganfall wird der Begriff „Hirninsult“ (englisch Stroke) verwendet (*Diener and (DGN), 2005b*).

1.3.2. Ätiologie und Pathogenese

Die Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN) nennt die arterielle Hypertonie als den bedeutendsten Risikofaktor für zerebrovaskuläre Erkrankungen (*Diener and (DGN), 2005a*). Weitere Risikofaktoren sind Rauchen, Fettstoffwechselstörungen, Diabetes mellitus, Übergewicht und körperliche Minderaktivität, Migräne, chronischer Alkoholismus, ebenso akute und chronische Infektionen wegen der damit einhergehenden Entwicklung atherosklerotischer Läsionen.

Die Auslöser für einen ischämischen Schlaganfall werden in Makro- und Mikroangiopathien und hämodynamische Ursachen unterschieden.

Als Makroangiopathien (große Gefäßveränderungen) führen am häufigsten Thromboembolien zu Territorialinfarkten. Dabei ist meist das Mediagebiet betroffen (*Poeck and Hacke, 2006*). Embolien, können vom Herzen, aus der Aorta ascendens und von arteriosklerotischen Plaques stammen. Ein Embolus, ein im Blutplasma nicht lösliches Gebilde, kann ein in einer Gefäßbifurkation aufgelagerter (reitender) oder bakteriell infizierter (septischer) Embolus sein. Die häufigste Form ist der Thromboembolus, der aufgrund von Vaskulitis, Atherosklerose und Koagulopathien auftritt und als verschlepptes Blutgerinnsel ein Gefäß verstopft (*Poeck and Hacke, 2006*).

Die Mikroangiopathie (kleine Gefäßveränderungen), wird durch Bluthochdruck (Hypertonie) oder jahrelangem Diabetes verursacht und kennzeichnet Wandveränderungen wie Hyalinierungen kleiner Endarterien und Arteriolen mit Verlust der Autoregulation und Lumeneinengung bis zum Verschluss. Dies führt zu isolierten oder multiplen Blutgerinnseln (Thrombosen), sogenannten lakunären Infarkten (*Masuhr and Neumann, 2005; Poeck and Hacke, 2006*). Führen diese Auslöser weiter zu extra- und/oder intrakraniellen Stenosen, lösen sie hämodynamische Infarkte aus. Diese werden in Endstrominfarkte der penetrierenden Arterien und in Grenzzoneninfarkte, zwischen den Versorgungsgebieten zweier großen Gefäße liegend, unterschieden werden.

Ein hämorrhagischer Infarkt entsteht, wenn nach vollständig ausgebildetem Infarkt die über Anastomosen erhaltene Restdurchblutung zu einer erhöhten Diapedese (Übertritt ins Gewebe) führt (*Masuhr and Neumann, 2005; Poeck and Hacke, 2006*).

Bei einem ischämischen Schlaganfall kommt es zum Sistieren der Blut- und damit Sauerstoffversorgung im Gehirngewebe. Dies führt zunächst zu einem reversiblen Funktionsverlust mit verminderter Proteinsynthese, gesteigerter anaerober Glykolyse mit zunehmender Laktatazidose und verminderter Erregungsweiterleitung (siehe Abbildung 2). Bei länger bestehendem Energieverlust stirbt das betroffene Hirngewebe schließlich ab. Der Bereich, der zwischen Funktions- und Infarktschwelle, also zwischen dem nekrotischen Gewebe und dem nichtischämischen Hirnbereich liegt, wird in Analogie an das teilweise erleuchtete Gebiet um den kompletten Schatten des Mondes herum bei totaler Finsternis als

„Penumbra“ (Halbschatten) bezeichnet. Das Penumbra-Konzept unterliegt der Überlegung, dass, wenn auch zeitlich streng limitiert, dieses Gebiet wieder funktionell herstellbar ist (Hossmann, 2006).

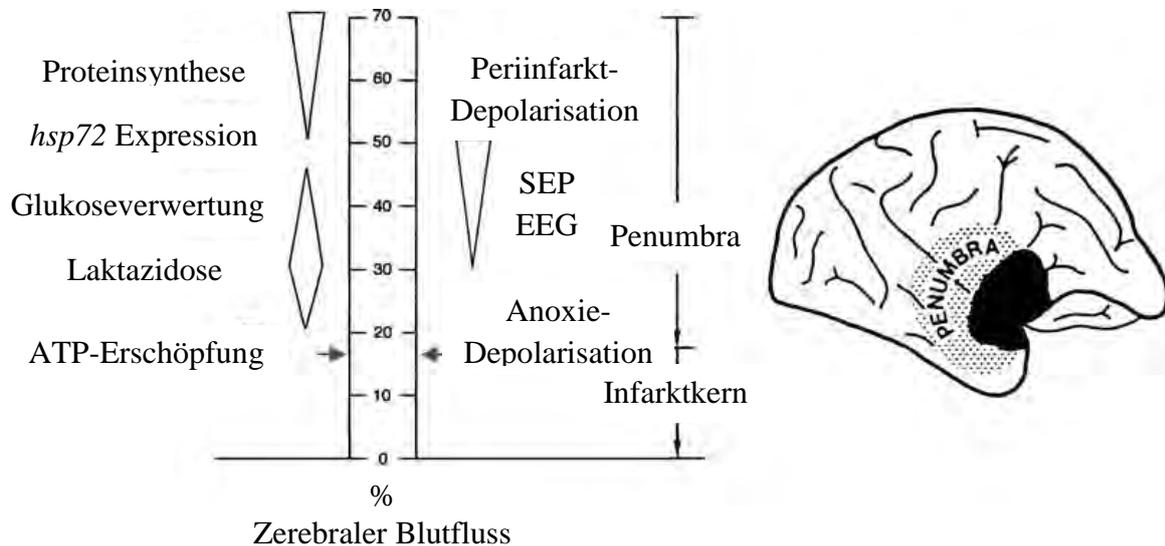


Abbildung 2 – Grenzwerten

Grenzwerten metabolischer (links) und elektrophysiologischer (rechts) Störungen während gestaffelter Reduktion des kortikalen Blutflusses. Der Infarktkern ist die Region, in der der Blutfluss unter die Energieausfallsgrenze absinkt. Die Penumbra ist das Gebiet mit eingeschränkter Blutversorgung, in welcher der Energiestatus erhalten bleibt. (modifiziert nach Symon (Symon et al., 1977) und Hossmann (Hossmann, 1994)) SEP: somatically evoked potentials (körperlich hervorgerufene Signale); EEG: Elektroenzephalogram;

1.3.3. Klinische Erscheinungsformen (TIA, Prind, Schlaganfall, Demenz)

Neben den verschiedenen Ursachen zerebraler Ischämien, ist auch der zeitliche Verlauf sehr variabel. Daher können die Symptome nur Minuten oder Stunden andauern (sogenannte transitorisch-ischämische Attacke – TIA) oder dauerhaft anhalten (vollendeter Schlaganfall) (Diener and (DGN), 2005b).

Als transitorisch ischämische Attacke (TIA) werden neurologische Symptome definiert, die sich innerhalb von 24 Stunden vollständig zurückbilden. In einer neueren Definition müssen sich die Symptome innerhalb einer Stunde vollständig zurückbilden und dürfen in der bildgebenden Diagnostik keine morphologische Läsion hinterlassen haben (*Poeck and Hacke, 2006*). TIA dauern wenige Minuten an, haben aber die Tendenz zu Rezidiven. Sie gehen oft mit Sensibilitäts- und Motilitätsstörungen einher (*Masuhr and Neumann, 2005*). Symptomatisch ist für eine TIA im vorderen Kreislauf eine flüchtige monokulare Sehstörung (Amaurosis fugax) charakteristisch. Während bei einer TIA im hinteren Kreislauf Schwindel, Erbrechen, Ataxien, Verschwommensehen, Sprech- und Schluckstörung sowie Sturzanfälle auftreten.

Klingen die klinischen Symptome eines ischämischen Insults erst innerhalb einiger Tage bis maximal drei Wochen ab, wird dies als prolongiertes reversibles ischämisches neurologisches Defizit (PRIND) definiert (*Delank and Gehlen, 2006*). Hier sind oftmals trotz der Rückbildung der klinischen Symptome Läsionen mittels Computertomographie (CT) / Magnetresonanztomographie (MRT) feststellbar (*Delank and Gehlen, 2006*).

Bei einem vollendeten Hirninfarkt („complete stroke“) setzt die Symptomatik meist schlagartig ein, schreitet dann nicht weiter fort, bildet sich allerdings nicht oder nur unvollständig zurück. Dem Schlaganfall geht meist eine TIA voraus. Bei dem seltener vorkommenden progredienten Hirninfarkt nehmen die Symptome kontinuierlich oder schubweise zu. Dieser kann sich dann entweder partiell zurückbilden oder in einen kompletten Hirninfarkt übergehen (*Delank and Gehlen, 2006; Masuhr and Neumann, 2005*).

Die neurologische Symptomatik des Hirninfarktes ist abhängig von ihrem Entstehungsort und reicht von Hemi- oder Tetraparese von Bein, Arm und Gesicht, Aphasie (zentrale Sprachstörung), Hemianopsie (Halbseitenblindheit), Störung der Berührungsempfindung (Hemihypästhesie), Gedächtnisstörungen (Amnesie), Bewegungs- (Apraxie) und Orientierungsstörungen, Schwindel (Vertigo), Bewegungsstörung (Ataxie) bis hin zum Koma (*Masuhr and Neumann, 2005*).

Zu den subakuten und chronischen Erscheinungsbildern zerebraler Durchblutungsstörungen zählt die Multi-Infarkt-Demenz, die durch Gedächtnis-, Denk- und Affektstörungen, Starrsinnigkeit, affektive Reizbarkeit, depressive Verstimmungen und episodische nächtliche

Verwirrheitszustände, wiederholte Schlaganfälle und vor allem durch multiple Infarkte gekennzeichnet ist (*Delank and Gehlen, 2006*).

1.3.4. Aktuelle Therapie (Primärprävention, Akuttherapie, Sekundärprävention)

Das Ziel der primären Prävention ist die Vermeidung von zerebralen Ischämien oder TIA bei Patienten ohne bisherige zerebrovaskuläre Erkrankungen und ohne oder mit Risikofaktoren, asymptomatischen Stenosen und anderen vaskulären Erkrankungen wie Herzinfarkt, Koronarer Herzkrankheit (KHK) und peripherer arterieller Verschlusskrankheit (paVK) (*Diener and (DGN), 2005a; Diener and Weimar, 2006; Diener et al., 2007*). Die wichtigste Empfehlung zur Primärprävention ist ein „gesunder Lebensstil“, d.h. Sport, der Verzicht auf Nikotin und gemüsereiche Kost sowie an die jeweiligen Vorerkrankungen angepasste Therapien. Laut „Physician’s Health Study“ ist die Primärprophylaxe mit Aspirin kontraindiziert, da zwar eine Minderung an Herzinfarkten, aber eine Steigerung an Schlaganfällen beobachtet wurde (*Diener and (DGN), 2005a; Kappeler and Fischer, 2005*).

Da der Schlaganfall nicht nach einheitlichem Muster entsteht und ein komplexes Geschehen darstellt, bleibt der Therapieablauf im akuten Stadium auf die Behandlung der einzelnen Symptom-Komplexe beschränkt. Dazu hat die Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN) Leitlinien erstellt, nach denen der Schlaganfall als medizinischer Notfall zu betrachten ist (*Diener and (DGN), 2005b*). Schlaganfallpatienten sollten in spezialisierte Schlaganfallstationen, sogenannte „Stroke Units“, aufgenommen werden. Nach dem „Time is brain“-Konzept sind alle medizinischen Abläufe zeitlich festgelegt (*(NINDS), 1996*). Zur Notfallbehandlung zählt eine intravenöse oder –arterielle Thrombolyse mit dem Plasminogen-Aktivator Alteplase oder Acetylsalicylsäure innerhalb der ersten drei Stunden.

Das Ziel einer sekundären Prävention ist die Vermeidung einer erneuten zerebralen Ischämie nach einem ersten solchen Ereignis. Nach den Leitlinien der DGN (*Diener and (DGN), 2005a; Diener and Weimar, 2006; Diener et al., 2007*) liegt der Hauptschwerpunkt bei den Thrombozytenfunktionshemmern, wobei die Dosierungen von ASS keinen Unterschied aufzeigen. Laut der Food and Drug Administration (FDA) kann daher jede Dosis zwischen 50 und 325 mg empfohlen werden (*Department of Health and Human Services, 1998*), während

in Deutschland eine tägliche Applikation von 100mg Acetylsalicylsäure angewendet wird. Wegen der Nebenwirkungen (1.5.1.) von ASS ist die Gabe von Clopidogrel als Monotherapie oder in Kombination weniger problematisch. Das Rezidivrisiko für Schlaganfall und Myokardinfarkt wird durch die Kombination von ASS mit Clopidogrel signifikant herabgesetzt (*CAPRIE-Steering-Committee, 1996*), allerdings ist die Blutungskomplikationsrate mit Clopidogrel unter Monotherapie signifikant geringer einzustufen (*Diener et al., 2004; Diener et al., 2007*). Ähnliches gilt für die Kombination von Dipyridamol und ASS. Der früher übliche Einsatz von Heparin bietet keinen Vorteil gegenüber ASS.

Operationstechnisch stehen die Karotis-Endarteriektomie (TEA) und die Stent-Setzung zur Verfügung, wobei sich die Endarteriektomie erst bei einem Stenosegrad zwischen 70 und 95 Prozent als nützlich erweist (*Diener and (DGN), 2005a; Diener et al., 2007*).

1.4. Formen des Gefäßwachstums

Die Bildung eines funktionsfähigen, integrierten Gefäßnetzwerkes ist ein wesentlicher Prozess für das Wachstum und die Versorgung von Geweben. Die Gefäßbildung (Vaskularisierung) erfolgt durch drei verschiedene Prozesse: Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese (*Buschmann and Schaper, 1999*).

1.4.1. Vaskulogenese: Die Bildung eines einfachen Netzwerkes

Die Vaskulogenese ist der früheste morphogenetische Prozess von Gefäßentwicklung und findet während der frühen embryonalen Phase statt. Dabei ist das kardiovaskuläre System das erste Organsystem, welches während der embryonalen Entwicklung ausgebildet wird (*Buschmann and Schaper, 1999*).

Endothel- und Blutzellen haben einen gemeinsamen Vorläufer, den Hämangioblasten. Im Dottersack formieren Hämangioblasten zelluläre Aggregate, deren innere Zellen sich zu hämatopoietischen Vorläuferzellen und deren äußere Populationen sich zu primitiven Endothelzellen entwickeln (*Carmeliet, 2000; Risau, 1997*).

Die Endothelvorläuferzellen (Angioblasten) bilden ein primitives Netzwerk (Vaskulogenese), während glatte Muskelzellen diese umlagern und die Gefäße stabilisieren. Die Umbildung in ein komplexes Gefäßsystem erfolgt durch Angio- und Arteriogenese.

1.4.2. Angiogenese: Das Aussprossen neuer Kapillaren

Die Angiogenese ist definiert als das Aussprossen neuer Kapillaren aus präexistierenden Gefäßen oder als die Teilung einer Kapillare in zwei gleichstarke neue Gefäße (intussusception), welche dann neue kapilläre Netzwerke bilden (Risau, 1997). Diese Kapillarnetzwerke bestehen aus Endothelzellröhren, denen zusätzliche Wandstrukturen inklusive glatter Muskelzellen oder Adventitia (Bindegewebe) stabilisierende Strukturen und Zellen fehlen. Im adulten Organismus findet die Angiogenese sowohl unter physiologischen Bedingungen in den weiblichen Reproduktionsorganen während des Ovarialzyklus statt, als auch bei pathologischen Prozessen wie Wundheilung, rheumatischer Arthritis und Tumorwachstum.

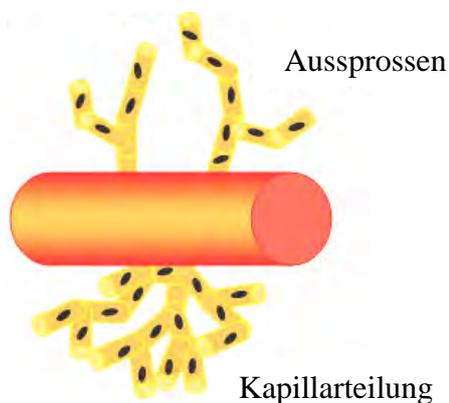


Abbildung 3 - Angiogenese

beschreibt das Wachstum von Kapillaren aus präexistierenden Gefäßen. Dies erfolgt entweder durch Aussprossen von Endothelzellen oder durch Kapillarteilung (intussusception). Der initiale Auslöser ist Hypoxie. (Helisch and Schaper, 2000; Heil, 2006)

Die treibende Kraft der Angiogenese ist Hypoxie (Sauerstoffmangel) im umliegenden Gewebe. Lokal freigesetzte Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren führen zu Vasodilatation, gesteigerter Gefäßpermeabilität und Akkumulation von Monozyten, die nach Adhäsion oder auch Transmigration ins perivaskuläre Gewebe weitere Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren sezernieren (Arras *et al.*, 1998; Folkman, 1995; Helisch and Ware, 1999; Ware and Simons, 1997). Diese inflammatorischen Zellen geben Metalloproteinasen ab, die die umliegende Matrix und die Basalmembran partiell auflösen.

Auf molekularer Ebene werden durch den Sauerstoffmangel sogenannte Hypoxie induzierte Transkriptionsfaktoren (HIFs) aktiviert, welche als Hauptaktivatoren die Expression vieler angiogener Faktoren wie des Vascular endothelial growth factor (VEGF), Nitric oxide synthase (NOS), Platelet-derived growth factor (PDGF), Angiopoietin-2, Transforming growth factor beta (TGF- β), Fibroblast growth factor (FGF), Hepatocyte growth factor (HGF) induzieren. Dadurch werden nachgeschaltete Signaltransduktionswege in Gang gesetzt, welche die Proliferation, Migration und Differenzierung von Endothelzellen regulieren (*Buschmann and Schaper, 2000; Lehmann, 2005*).

Das Aussprossen von Kapillaren führt zur Zunahme der Gefäßdichte, die äquivalent zur Abnahme des Freiraumes zwischen den benachbarten Gefäßen ist. Da die effektive Diffusion auf kurze Distanzen limitiert ist, erhöht das angiogene Wachstum die Durchblutung des hypoxischen Gewebes und ist wichtig für die Aufrechterhaltung oder Wiederherstellung lokaler Sauerstoff- und Nährstoffversorgung (*Heil et al., 2006*).

1.4.3. Arteriogenese

1.4.3.1. Das Kollateralwachstum präexistenter Arteriolen

Kollaterale Anastomosen wurden erstmals 1669 vom englischen Anatom Richard Lower am menschlichen Herzen demonstriert (*Lower, 1669*). Im Gegensatz zur Aussprossung neuer Gefäße aus präexistierenden Gefäßen bei der Angiogenese beschreibt die Arteriogenese das Wachsen bereits vorhandener kollateraler Anastomosen zu funktionell bedeutsamen Konduktanzgefäßen (*Arras et al., 1998; Buschmann and Schaper, 1999; Schaper and Buschmann, 1999*).

Obwohl räumlich voneinander getrennt, finden beide Wachstumsprozesse nach Gefäßverschluss zeitlich parallel statt, wenn auch mit unterschiedlicher Geschwindigkeit: Angiogenese findet in von Ischämie betroffenen hypoxischen Gebieten und Arteriogenese weiter proximal in nichtischämischen Gebieten statt (*Deindl et al., 2001; Heil et al., 2006*). Dabei unterscheidet letztere sich von der Angiogenese in drei wichtigen Eigenschaften: die Induktion über biomechanische Kräfte, die Unabhängigkeit von Ischämie und Hypoxie, sowie

die ausschlaggebende Rolle zirkulierender Zellen für die Steigerung des Gefäßwachstums (Buschmann and Hoefer, 2004; Hossmann and Buschmann, 2005).

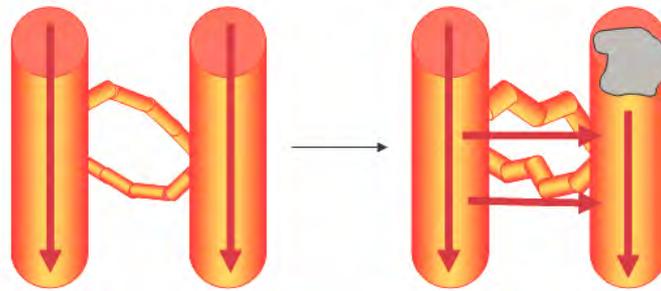


Abbildung 4 – Arteriogenese

Arteriogenese wird induziert durch eine Stenose oder den Verschluss einer Hauptarterie (siehe graue Markierung). Schubspannung, verursacht durch veränderte Durchblutungsverhältnisse in den präexistierenden Kollateralanastomosen, fungiert als initialer Auslöser. Das Wachstum der Kollateralen erfolgt durch Umbauprozesse von präexistierenden Arteriolen. (Heil et al., 2006)

Nach dem plötzlichen Verschluss eines Hauptgefäßes sind kleine präexistente Arteriolen die einzige Verbindung zwischen dem prästenotischen Hochdruckgebiet und dem poststenotischen Tiefdruckgebiet. Da diese nun die gesamte Blutversorgung des Hauptgefäßes übernehmen müssen, erhöhen sich die Durchflussgeschwindigkeit und damit die Scherkräfte in den Arteriolen erheblich (Schaper and Ito, 1996). Der initiale Auslöser der Arteriogenese ist die Schubspannung. Im Tiermodell wurde gezeigt, dass nach Ligatur mit anschließendem distalen arteriovenösen Shunt die Schubspannung nach Ausbildung von Kollateralgefäßen gleichbleibend hochgehalten werden kann und der maximale Blutfluss vier Wochen nach Initialoperation doppelt so hoch ist als im normalen Gefäßbett (Eitenmuller et al., 2006). Die Schubspannung führt zur Aktivierung der Endothelzellen (EC) in der kollateralen Gefäßwand. Diese Aktivierung induziert die Expression von Adhäsionsmolekülen wie Intercellular adhesion molecule-1 and -2 (ICAM-1/-2) und Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) (Hoefer et al., 2004) und Zytokinen wie dem Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Diese locken (Attraktion) Leukozyten, meist Monozyten sowie auch T-Zellen und basophile Zellen an und vermitteln deren Anlagerung (Adhäsion) an das Endothel. Nach Invasion in die Kollateralgefäßwand differenzieren sich die Monozyten zu Makrophagen und beginnen

Zytokine wie TNF- α (Tumor-Nekrosefaktor alpha), MCP-1, Basic fibroblast growth factor (bFGF) und TGF- β , welche für weitere Aktivierungskaskaden des Endothels, glatter Muskelzellen und Monozyten bedeutsam sind, zu synthetisieren. Der notwendige Raum für die sich ausweitenden Kollateralarterien wird durch gewebeabbauende Proteasen wie urokinase plasminogen activator (u-PA) und Matrix Metalloproteinasen (MMPs) erzeugt (*Cai et al., 2003; Heil and Deindl, 2004*).

Bei der Arteriogenese spielt das Gesetz von Hagen-Poiseuille für laminare Strömungen eine wesentliche Rolle, bei dem die Volumenstromstärke I mit der vierten Potenz des Radius r zunimmt.

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

Hagen-Poiseuillesches Gesetz für laminare Strömungen in Rohren: Die Volumenstromstärke I ist in vierter Potenz vom Radius r des Rohres abhängig.

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

Bereits geringfügige Änderungen im Gefäßdurchmesser führen zu einem wesentlichen Anstieg des Blutflusses und der Ausbau bereits vorhandener Kollateralen kann somit relativ schnell den Verschluss einer großen Arterie kompensieren.

Das aktive Remodeling präexistenter Arteriolen zur Bildung des biologischen Bypasses im Sinne der Arteriogenese ist ein spezifischer, streng regulierter Prozess, der als ein wichtiger Kompensationsmechanismus bei Atherosklerose-bedingten Gefäßverschlüssen gilt (*Buschmann and Schaper, 1999; Buschmann et al., 2003b*).

1.4.3.2. Tiermodelle und Alternativen in der Arteriogeneseforschung

Derzeit ist ein neuartiges Alternativmodell in der Etablierung, welches als „künstliche Arterie“ die Erforschung von Grundmechanismen der Arteriogenese ermöglichen soll und zukünftig für Vorversuche zu Tierversuchen Einsatz finden wird, wodurch im Sinne des 3R-Konzeptes (Replacement, Reduction, Refinement) nach dem Tierschutzgesetz und der EU-

Richtlinie 86/609/EWG die benötigte Tieranzahl reduziert werden kann. Dennoch ist für die Erforschung der systemischen kardiovaskulären Zusammenhänge der Arteriogenese nach wie vor das Tiermodell sowohl von herausragender Bedeutung als auch bisher nicht ersetzbar.

Für ein Arteriogenesemodell ist entscheidend, dass es zu keiner absoluten Ischämie mit nachfolgenden Nekrosen oder Infarkten kommt, sondern zu einer Minderperfusion in den nachgeschalteten Gebieten. Die Ligatur der Arteria femoralis ist der Prototyp des peripheren Arteriogenese-Modells (*Hoefler et al., 2006*). Infolge des zunehmenden Einsatzes von Knockout-Tieren wird auf das Hinterlaufmodell der Maus zugegriffen. Allerdings stellt die Maus als Krankheitsmodell und in der Forschung von Basis-Mechanismen zum Testen von Substanzen auf ihren stimulatorischen Effekt auf das Gefäßwachstum als natürliche Antwort nicht die erste Wahl dar. Denn zwischen den verschiedenen Stämmen bestehen gerade bei den gesunden Tieren diverse Unterschiede. Während wiederum die behandelten Mäuse verschiedener Stämme in Hinsicht auf ihre arteriogene Antwort durchaus vergleichbar sind, weil die präexistierenden Kollateralgefäße der verschiedenen Spezies ein vergleichbares Niveau erreichen (*Pipp et al., 2003; Scholz et al., 2003; van Royen et al., 2003*). Aber auch Kaninchen sind für das Femoralismodell sehr gut geeignet (*Ito et al., 1997*), da sie eine schnelle arteriogene und angiogene Antwort auf Stimulation und Hemmung ausbilden. Sowohl das Kaninchen als auch die Maus bieten die Möglichkeit, Gefäßwachstum mit Mikrosphären-basierter Technik unter simultaner Blutdruckmessung darzustellen (*Grundmann et al., 2005; Hoefler et al., 2006; van Royen et al., 2002*). Um jedoch Substanzen für den Einsatz in der Klinik nutzen zu können, müssen diese vorher in einem Modell getestet werden, welches dem Menschen sehr ähnlich in Größe, Gewicht und Metabolismus ist, wie das Hinterlaufmodell im Schwein (*Buschmann et al., 2003b; Voskuil et al., 2003*). Allerdings ist aufgrund der Gefäßgröße die Menge der einzusetzenden Substanzen sehr hoch und die Mikrosphären-Technik für Routine-Tests finanziell nicht tragbar. Außerdem ist beim Schwein das Kollateralgefäßwachstum vom Gebiet des Zielgefäßes abhängig und Funktionen wie die Durchblutungswiederherstellung laufen wesentlich langsamer ab als beispielsweise im Kaninchen (*Hoefler et al., 2001; Voskuil et al., 2003*).

Bei der koronaren Arteriogenese ist bekannt, dass der Einsatz eines kolonie-stimulierenden Faktors die ischämische Kardiomyopathie nach induziertem Myokardinfarkt aufgrund des beschleunigten Kollateralwachstums vermindert (*Deindl et al., 2006*).

Weiterhin sind in verschiedenen Tierarten Modelle zur Untersuchung der zerebralen Arteriogenese entwickelt worden (*Busch et al., 2003; Schneider et al., 2007; Todo et al., 2008*), auf die im folgenden näher eingegangen werden soll.

1.4.3.3. Zerebrale Arteriogenese

Untersuchungen auf das Vorhandensein von Kollateralen und deren visuelle Darstellung machten vor allem *Coyle et al. (Coyle and Jokelainen, 1982)*. Durch die Injektion einer letalen Dosierung von Papaverinhydrochlorid in die Vena jugularis von Wistar Ratten wurde eine maximale Vasodilatation erzeugt. Durch die anschließende Perfusion mit körperwarmer Latexmilch über die Aorta ascendens und einem Entlastungsschnitt des rechten Vorhofes wurde das Blut ausgespült und die Gefäße wurden nahezu komplett mit Latex gefüllt. Auf diese Art und Weise gelang es, nicht nur die großen Gefäße des Circulus Willisii darzustellen, sondern auch einen visuellen Beweis für das Vorhandensein von Anastomosen zwischen der Arteria cerebri anterior (ACA) und der Arteria cerebri media (MCA) zu erbringen. Nach Verschluss der Arteria cerebri media (MCAO) beobachtete er auf diese Weise, dass diese Anastomosen 20 Tage danach auf der Verschlussseite (ipsilateral) signifikant in ihrem Durchmesser und ihrer Länge vergrößert waren, während sich die Anzahl der Anastomosen nicht veränderte (*Coyle, 1984*). In einem weiteren Experiment in Fischer-344 Ratten wurde eine Arteria carotis communis (CCA) permanent verschlossen. Nach zwei Tagen bzw. sechs Wochen wurde auch die kontralaterale CCA temporär verschlossen. In beiden Fällen wurde der ipsilaterale Blutflussabfall während der zweiten Okklusion beobachtet. Verglichen mit dem Blutflussabfall am zweiten Tag nach der ersten Okklusion war der Wert bereits sechs Wochen um das Doppelte verbessert. Gleichzeitig waren die Diameter der ipsilateralen PCA/PComA zu beiden Zeitpunkten nach Erstokklusion signifikant vergrößert gegenüber Kontrolltieren. Die Vergrößerung am zweiten Tag nach Erstokklusion begründete er mit dem Eintritt passiver Dilatation zur Aufrechterhaltung der zerebralen Blutversorgung. Dass die Durchmesser (Diameter) jedoch nach sechs Wochen noch einmal signifikant vergrößert waren, lag seiner Meinung nach an einem stattgefundenen aktiven Gefäßumbau (*Coyle and Panzenbeck, 1990*). Noch vor der Definition von Kollateralwachstum als Arteriogenese waren diese Ergebnisse bereits ein Beweis für deren Existenz.

In einer klinischen Studie, in die Patienten mit einseitigem Verschluss der ICA und einer Stenose der anderen ICA einbezogen wurden, wurde ebenfalls ein signifikant erhöhter Durchmesser der PComA und mittels MRT ein signifikant gesteigerter Blutfluss beobachtet (*Hendrikse et al., 2001*). Während in einer anderen Studie festgestellt wurde, dass nach einem asymptomatischen Stenosegrad von 70% einer ICA der Blutfluss der ACA und MCA auf der kontralateralen Seite erhöht war (*Kablak-Ziembicka et al., 2005*). Dies beweist den bedeutsamen klinischen Hintergrund für die experimentellen Untersuchungen der zerebralen Arteriogenese.

Busch et al. etablierten das Dreigeäßverschlussmodell (Three Vessel Occlusion, 3-VO) als erstes zerebrales Arteriogenesemodell (*Busch et al., 2003*). Dieses Modell, bei dem drei der vier hirnversorgenden Arterien verschlossen werden, stellt eine modifizierte Form des von *Kawata et al. (Kawata et al., 1996)* entwickelten 3-VO-Modells in Wistar-Ratten dar. Da das 3-VO-Modell auch in diesem Dissertationsprojekt Anwendung findet, wird in den nachfolgenden Abschnitten näher darauf eingegangen (siehe auch 1.1. und 2.2.2.4.).

1.4.3.4. Kolonie-stimulierende Faktoren in der zerebralen Arteriogenese

Störungen in der Bildung von neutrophilen Granulozyten, insbesondere verursacht durch die akute myeloische Leukämie, AIDS und die Chemotherapie-bedingte Neutropenie (*Aapro et al., 2006; Welte et al., 1996*), führen zu einem erhöhten Risiko lebensbedrohlicher Infektionen (*Steward, 1993*). Hier kommen der Granulozyten und der Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierende Faktor (G-CSF und GM-CSF), beide zur Zytokin-Familie von hematopoietischen Wachstumsfaktoren gehörend, zum therapeutischen Einsatz (*Steward, 1993*).

G-CSF wird hauptsächlich von Endothelzellen, Monozyten und Fibroblasten gebildet und beeinflusst vorwiegend Vorläuferzellen der späteren Granulozyten-Monozyten-Linie. Es stimuliert die Reifung zu Neutrophilen, die Ausbreitung vom Knochenmark in die periphere Zirkulation und erhöht die chemotaktische und phagozytotische Funktion.

GM-CSF dagegen kann von vielen Zelltypen gebildet werden, hat ein großes Spektrum von potentiellen Zielen und fördert das Wachstum von Vorläuferzellen der myeloischen und

megakaryozytischen Linie (*Steward, 1993*). Weiterhin erhöht es die Lebensdauer von Makrophagen nach ihrer Transmigration ins perivaskuläre Gewebe (*Buschmann et al., 2001; Nakagawa et al., 2006; Ujihara et al., 2001*), wodurch das Kollateralwachstum sowohl in der peripheren (*Buschmann et al., 2001; Grundmann et al., 2006*), der koronaren (*Seiler et al., 2001*) und der zerebralen Zirkulation (*Buschmann et al., 2003a; Schneeloch et al., 2004*) gesteigert werden kann. So konnte im oben genannten 3-VO-Modell gezeigt werden, dass die hämodynamische Reservekapazität während der zerebrovaskulären Reaktion (CVR), die bei Sprague Dawley-Ratten direkt nach 3-VO nicht mehr nachweisbar ist, durch GM-CSF-Behandlung bereits nach einer Woche wieder auf den Ausgangswert ansteigt, während diese bei kontrollbehandelten 3-VO-Tieren selbst nach drei Wochen weit unter dem Ausgangswert liegt. Bestätigt werden diese Daten auch durch eine messbare Vergrößerung der Gefäßdurchmesser (*Buschmann et al., 2003a*). Beim mittels Hypotension ausgelösten hämodynamischen Schlaganfall konnte durch Applikation von GM-CSF das Schlaganfallvolumen im 3-VO-Modell signifikant verringert werden (*Schneeloch et al., 2004*). Auch im 2-VO-Modell, wo beide CCAs ligiert wurden, verbesserte GM-CSF die hämodynamische Reserve und das Kollateralwachstum signifikant (*Schneider et al., 2007*). In einem Mausmodell, in dem nach unilateraler CCA-Okklusion mittels GM-CSF-Behandlung das Kollateralwachstum der Heubnerschen Anastomosen und des Circulus willisi beschleunigt werden konnte, führte dies nach zusätzlich durchgeführter MCAO zu einer Verminderung des Infarktvolumens (*Todo et al., 2008*).

Im Gegensatz zu den sehr erfolgreichen experimentellen Studien wurde in der bisher einzigen vom Arteriogenese Kompetenznetzwerk Art.Net. durchgeführten klinischen Studie mit GM-CSF zur therapeutischen Induktion der peripheren Arteriogenese festgestellt, dass bei deren Anwendung eine hohe Nebenwirkungsrate erwartet werden muss (*van Royen et al., 2005*).

Während für G-CSF beschrieben wurde, dass es das periphere und koronare Kollateralwachstum verbessert (*Deindl et al., 2006*), fehlen bisher Daten über die therapeutische Induktion der zerebralen Arteriogenese.

Bekannt ist, dass sowohl der zur GH (Growth Hormone)-Rezeptorfamilie gehörige G-CSF Rezeptor als auch der zur gp-140-Rezeptorfamilie gehörige GM-CSF Rezeptor über gleiche Untereinheiten des Jak-STAT-Mechanismus, nämlich Jak-2/STAT-3, agieren können (*Marino and Roguin, 2008; Valdembri et al., 2002*). Außerdem sind beide Rezeptoren unter

anderem auf myeloischen Vorläuferzellen, reifen Neutrophilen und Monozyten sowie auf Endothelzellen gefunden worden (*Barreda et al., 2004*). Dies lässt vermuten, dass auch G-CSF das zerebrale Kollateralwachstum beschleunigen könnte.

1.5. Antikoagulations-Therapeutika

1.5.1. Acetylsalicylsäure (*Aspirin*®, *ASS*®, *Aspisol*®)

Auf der Suche nach einem wirksamen, verträglichen Rheumamittel synthetisierte der Chemiker Dr. Felix Hoffman am 10. August 1897 die Acetylsalicylsäure in chemisch reiner und stabiler Form. Bereits zwei Jahre später wurde sie als schmerzstillendes und fiebersenkendes Mittel unter dem Namen Aspirin® als Marke beim Kaiserlichen Patentamt zu Berlin angemeldet und ist heute das weltweit meistverkaufte Schmerzmittel (<http://www.aspirin.de>).

Die Acetylsalicylsäure (ASS) entsteht durch Acetylierung aus Salicylsäure, die selbst ursprünglich aus der Weide (*Salix alba*) isoliert wurde. Die pharmakologische Wirkung von ASS wurde zuerst über die irreversible Acetylierung der Cyclooxygenase (COX) am Serin-530-Rest beobachtet (*Vane, 1971*). Heute kennt man zwei COX-Isoformen, die konstitutive COX-1 und die induzierbare COX-2 (*Vane et al., 1998*). Die beschriebene COX-3, die im Hundehirn gefunden wurde, stellt lediglich eine Splice-Variante der COX-1 dar (*Chandrasekharan et al., 2002*). Die COX, welche in Leukozyten, Thrombozyten, Endothelzellen, Nieren- und neuronalen Zellen zu finden sind, katalysieren ausgehend von der Arachidonsäure die Bildung des Vorläufers Prostaglandin G-2 (PGG-2). In einem zweiten Schritt wird daraus das Prostaglandin H-2 (PGH-2) gebildet, aus dem wiederum durch spontane Isomerisation oder durch Synthasen oder Oxidasen die verschiedenen Prostaglandine (PGs), Prostacyclin bzw. Prostaglandin I-2 (PGI₂) und Thromboxan (TXA₂) entstehen, welche als Prostanoiden bezeichnet werden (*Botting, 2006*).

Die Hemmung der COX durch nichtsteroidale Antiphlogistika (non-steroidal antiinflammatory drugs = NSAIDs) führt daher zur Beeinträchtigung der Plättchenaggregation durch die Thromboxan-Synthesehemmung sowie zur Prostaglandin/Leukotrien-Synthesehemmung. Da Thrombozyten anders als Endothelzellen

nicht in der Lage sind, COX ständig nachzubilden, entspricht die Dauer der Thromboxansynthese-Hemmung der Plättchenlebensdauer von 8-11 Tagen (*Lüllmann, 2006*).

Aufgrund seiner gerinnungshemmenden Wirkung wird ASS klinisch oft in akuten Situationen wie Herzinfarkt und Schlaganfall und bei der langzeitlichen antithrombotischen Sekundärprophylaxe eingesetzt (*Chiang et al., 2004*). Dabei erfolgt die Applikation als Monotherapie oder in Kombination mit Clopidogrel (*Cornett et al., 2008; Diener et al., 2007; Hart et al., 2008; Helgason et al., 2008*). Die Thrombozytenaggregationshemmung durch ASS beginnt bereits bei weniger als 30mg/Tag.

Weitere Einsatzgebiete findet ASS als Analgetikum, Antipyretikum und Antiphlogistikum (*Chiang et al., 2004*). Die analgetische/antipyretische Wirkung liegt bei bis zu 2-3 g/Tag. Der antiphlogistische Einsatz bei chronisch entzündlichen Erkrankungen erfolgt mit 2-4 g/Tag. Eine massiv antiphlogistische Wirkung bei akutem rheumatischen Fieber wird mit 6-8 g/Tag erreicht. Toxische Dosierungen liegen bei > 7 g ASS (*Lemmer, 2007*).

Unerwünschte Wirkungen sind die Entstehung von Magen- und Duodenalulcera, Analgetika-Asthma, Natrium- und Wasserretention und bei langandauernder Einnahme eine Analgetika-Nephropathie bis hin zur dialysepflichtigen Niereninsuffizienz sowie Analgetika-Kopfschmerz.

1.5.2. Clopidogrel (*Plavix*®, *Iscover*®)

Clopidogrel gehört zur Gruppe der Thienopyridine und hat aufgrund besserer Verträglichkeit seinen Vorgänger Ticlopidin ersetzt. Zudem löst es im Gegensatz zu Ticlopidin keine Leukozytopenie aus (*Lüllmann, 2006*).

Die an der Membran von Thrombozyten existierenden purinergen Rezeptoren des Subtyps P2Y₁₂ aktivieren nach Bindung von Adenosindiphosphat (ADP) über eine G-Protein-Vermittlung das Glykoprotein IIb/IIIa aus seiner Ruheform. Dieses kann dann Fibrinogen binden und damit die Gerinnung unterstützen. Durch Bindung von Clopidogrel an jenen Rezeptor werden die Funktionen der Thrombozyten irreversibel gehemmt und damit die Vernetzung der Thrombozyten über Fibrinogen-Moleküle, die ADP-induzierte Freisetzung

mitogener Plättchenfaktoren sowie die Thrombozytenadhäsion am Subendothel blockiert (*CAPRIE-Steering-Committee, 1996; Cattaneo, 2004; Lemmer, 2007; Lüllmann, 2006*)).

Clopidogrel selbst ist ein Prodrug und wird erst in der Leber durch Oxidation und Hydrolyse aktiviert, daher setzt die Wirkung erst nach Stunden ein (*Karow, 2005; Lemmer, 2007; Lüllmann, 2006*). Die maximale Thrombozyten-funktionshemmende Wirkung tritt nach drei bis fünf Tagen ein und hält nach Absetzen ebensolange an.

Clopidogrel wird in Kombination mit ASS oder bei dessen Unverträglichkeit, Resistenz, oder Kontraindikation als dessen Alternative bei der kardiovaskulären Sekundärprophylaxe eingesetzt (*Cornett et al., 2008; Diener et al., 2007; Hart et al., 2008; Helgason et al., 2008*).

Bei Patienten mit Arteriosklerose ist hinsichtlich der Vermeidung arterieller Thromben aus den schon genannten Gründen Clopidogrel als Reservemittel gegenüber ASS indiziert. Die Clopidogrel-Therapie wird mit einer Loading-Dose von 300 mg/Tag p.o. begonnen und diese dann mit 75 mg/Tag erhalten (*Lemmer, 2007*).

Weitere Einsatzgebiete für Clopidogrel mit und ohne ASS sind die periphere Verschlusskrankheit (paVK), Zustand nach perkutaner Koronarintervention und Zustand nach Bypassoperationen im arteriellen Stromgebiet. Bei akuten perkutanen Koronarinterventionen wird Clopidogrel mit 300 bzw. 600 mg einmalig aufgesättigt und ab dem nächsten Tag mit 75 mg/Tag erhalten.

Unerwünschte Wirkungen von Clopidogrel sind die Auslösung von Diarrhoe, Vomitus und Leibschmerzen.

1.5.3. Aspirin, Clopidogrel und Arteriogenese

Neben der bereits beschriebenen therapeutischen Induktion der Arteriogenese, besteht auch die Möglichkeit, dass Therapeutika, die bei kardiovaskulären Erkrankungen eingesetzt werden, das Kollateralwachstum hemmen. Bereits im Kaninchenhinterlaufmodell, bei dem nach Ligatur der Arteria femoralis Aspirin und Clopidogrel eine Woche lang verabreicht wurden, konnte ein hemmender Einfluss von Aspirin nachgewiesen werden (*Hoefler et al., 2005a*). Dabei wurde beobachtet, dass die kollaterale Konduktanz gegenüber Kontrolltieren

und Clopidogrel-behandelten Gruppen bei der Aspirin-Gruppe signifikant verringert war. In den postmortalen Angiographien wurden keine Unterschiede gefunden. Histologisch wurde ein signifikanter Rückgang der Zellmigration und Proliferation unter Aspirin-Einfluss gefunden.

Da Patienten mit PaVK zum Schutz vor ischämischen Komplikationen routinemäßig mit ASS behandelt werden, führten die oben genannten präklinischen Daten dazu, dass das Arteriogenese Kompetenznetzwerk (Art.Net.) eine klinische, multizentrische Doppelblindstudie durchführt. Lokalisiert in 20 Zentren unter anderem in Basel, Freiburg und Berlin werden derzeit 250 Patienten mit PaVK einem Lauftrainingsprogramm unterzogen und mit ASS oder Clopidogrel behandelt (*Singer et al., 2006*).

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Tierhaltung

Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse (V1534-300)

sniff Spezialdiäten GmbH, Soest (Deutschland)

Makrolonkäfige Typ IV (Innenbodenfläche: 1800 bis 1815 cm², Höhe: 19cm)

Ehret Labor- und Pharmatechnik GmbH & Co. KG, Emmendingen

Weichholzgranulat

2.1.2. Geräte

Blutdruckmessgerät

Medtronic GmbH, Düsseldorf (Deutschland)

ICC 50

Erbe Elektromedizin, Tübingen (Deutschland)

Objektmikrometer für Mikroskop

Leica Microsystems Ltd., Heerbrugg (Schweiz)

Operationsmikroskop OPMI 1FC und Bodenstativ S21

Carl Zeiss AG, Göttingen (Deutschland)

Perfusor segura

B. Braun AG, Melsungen (Deutschland)

Periflux System 5000

Perimed AG, Järfälla (Schweden)

PowerShot S70 Digitalcamera

Canon Deutschland GmbH, Krefeld (Deutschland)

Radiometer Copenhagen

Radiometer Medical ApS, Brønshøj (Denmark)

Stereomikroskop Leica MZ6 mit Kaltlichtquelle KL 1500 LCD

Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (Deutschland)

Stereotaktisches Instrument

FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim/Ober-Beerbach (Deutschland)

Vapor 2000 Isofluran

Dräger Medical AG & Co. KG, Lübeck (Deutschland)

Waage

Sartorius AG, Göttingen (Deutschland)

Wärmeplatte *IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen (Deutschland)*

2.1.3. Chirurgische Instrumente

Anatomische und chirurgische Pinzetten; Anlegepinzette und Biemer-Gefäßclips; Inzisionsschere geknöpft; Klein-Set-Container; Knochenschere; Metzenbaumscheren, gerade und gebogen; Mikrofederscheren; Mikroskopierpinzetten, gerade und

abgewinkelt; Nadelhalter nach Mathieu; Splitterpinzetten, gerade und abgewinkelt;
Wundspreizer Logan modif. Reill;

Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen (Deutschland)

2.1.4. Medikamente

Ampuwa® (Aqua ad injectabilia - Wasser für Injektionszwecke)

Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg (Deutschland)

ASS-ratiopharm® 100 TAH (Wirkstoff: Acetylsalicylsäure 100mg)

Merckle GmbH, Blaubeuren (Deutschland)

Clopidogrel Reinsubstanz (Wirkstoff: Clopidogrel)

Bristol-Myers Squibb GmbH & Co. KGaA, München (Deutschland)

Diamox® parenteral Trockensubstanz (Wirkstoff: Azetazolamid-Natrium)

Goldshield Pharmaceuticals Ltd., Surrey (England)

Neupogen® (Wirkstoff: Filgrastim – G-CSF)

Sygnis Pharma AG, Heidelberg (Deutschland)

Forene® (Wirkstoff: Isofluran)

Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden (Deutschland)

Isotonische Kochsalzlösung (Wirkstoff: Natriumchlorid)

Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg (Deutschland)

Liquemin® N 25 000 (Wirkstoff: Heparin-Natrium)

Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen (Deutschland)

Naropin® (Wirkstoff: Ropivacainhydrochlorid)

AstraZeneca AB, Södertälje (Schweden)

Paveron® N (Wirkstoff: Papaverinhydrochlorid)

Weimer Pharma GmbH, Rastatt (Deutschland)

2.1.5. Chemikalien & Lösungen & Gase

Ambion´s RNAlater solution

Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH, Darmstadt (Deutschland)

Chicago Latex, Industrial Latex Product No. 563

Chicago Latex – A division of Spartan Adhesives & Coatings Co. (USA)

Indian Link (Chinesische Tusche schwarz)

Royal Talens, Apeldoorn (Holland)

Medizinische Gase Sauerstoff (O₂) / Distickoxid (N₂O, Lachgas)

Linde AG, Unterschleißheim (Deutschland)

Softasept® N (Wirkstoff: Ethanol)

B. Braun AG, Melsungen (Deutschland)

2.1.6. Verbrauchsmaterialien

EcoLab-Polyethylen-Mikroschlauch 0,58*0,96 mm

SIMS Portex Ltd. (Vereinigtes Königreich)

Einmalspritzen Luer 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, Perfusorspritzen 50 ml

B. Braun Melsungen AG, Melsungen (Deutschland)

Falcontube 50ml

Sarstedt AG & Co, Nümbrecht (Deutschland)

Kanülen BD Microlance™ 3; 23 G * 1“ – Nr. 16; 0,6 mm * 25 mm

Necton Dickinson GmbH, Heidelberg (Deutschland)

Nahtmaterial Polyester, nicht resorbierbar, geflochten, 5/0 USP, 1 metric, 75 cm

Ethicon, Norderstedt (Deutschland)

2.2. Versuchstiere und Methoden

Alle Operationen, Behandlungen und weitergehenden Untersuchungen in dieser Studie wurden in den Laboren und Operationsräumen im Center for Cardiovascular Research (CCR) der Charité-Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

2.2.1. Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche Sprague Dawley-Ratten verwendet.

Bei Versuchsbeginn wogen die Tiere 320-350 Gramm und waren etwa 11 bis 12 Wochen alt. Die Tiere stammten alle von der Firma Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln (Deutschland) und wurden mit einem Gesundheitszeugnis geliefert.

2.2.1.1. Haltungsbedingungen

Die Haltungsbedingungen entsprachen den Empfehlungen der Kommission vom 18. Juni 2007 mit Leitlinien für die Unterbringung und Pflege von Tieren, die für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendet werden (2007/526/EG). Die Tiere wurden artgerecht zu je zwei bis vier Ratten in Makrolonkäfigen gehalten. Als Einstreu diente staubfreies, sterilisiertes Weichholzgranulat. Das Alleinfuttermittel für Ratten stand ihnen ad libitum zur Verfügung. Ebenso hatten sie freien Zugang zu den Trinkflaschen, die 2mal wöchentlich mit frischem Trinkwasser gefüllt wurden. Die Raumtemperatur betrug durchgehend 22 °C, die Luftfeuchte lag bei 50-70 %. Der Hell-Dunkel-Lichtwechsel erfolgte im 12-Stunden-Rhythmus.

2.2.1.2. Tierversuchsgenehmigung

Diese Studie ist gemäß § 8 des Tierschutzgesetzes unter der Genehmigungsnummer G 0316/05 am 11.07.2006 unter dem Titel „Auswirkungen von Aspirin und Clopidogrel auf die Kollateralgefäßbildung im Gehirn der Ratte nach extrakraniellm Arterienverschluss unter Berücksichtigung des vaskulären Risikofaktors Bluthochdruck“ (Kurzbezeichnung: „Aspirin, Clopidogrel and Arteriogenesis“) vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit, Fachgruppe V B Veterinärwesen, Alt-Friedrichsfelde 60, 10315 Berlin (heute: Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin, Postfach 310929, 10639 Berlin) genehmigt worden.

2.2.1.3. Randomisierung

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

Die Umrechnung der Humandosierungen in Tierdosierungen wurde unter Einbeziehung des metabolischen Körpergewichts mithilfe folgender Formel ermittelt:

$$\text{Tierdosis [mg/kg]} = \text{Dosis/Tier [mg]} / \text{KGW [kg]}$$

unter Berücksichtigung folgender Formel

$$\text{Dosis/Tier [mg]} = \text{met.KGW [kg}^{0,75}] * \text{HD [mg/kg]} * \text{Umrechnungsfaktor [2,84 kg/kg}^{0,75}]$$

(*HD=Humandosis*) (*Quelle: (Löscher et al., 1998)*)

Tiere, die mit ASS behandelt wurden, erhielten eine tägliche Dosis von 6,34 mg/kg dieser Substanz. Dies entspricht der humanen Dosis von 100 mg/Mensch.

Da durch die Behandlung mit Clopidogrel kein Einfluss erwartet wurde, wurde die Behandlung bei solchen Tieren täglich mit 10 mg/kg appliziert. Dies würde einer humanen Dosis von 160 mg/Mensch entsprechen.

Sowohl ASS als auch Clopidogrel wurden jeweils in 1ml Trinkwasser gelöst und über Gavage verabreicht.

Die Behandlung mit G-CSF stützte sich auf die Erfahrungen mit GM-CSF und erfolgte mit 40 µg/kg jeden zweiten Tag subkutan.

Projektteil I: Einfluss auf die adaptive zerebrale Arteriogenese

Gruppen mit einer Behandlungsdauer von 7 Tagen

Ziel: Angiographie oder CVR

- 1 ml Trinkwasser p.o. täglich
 - „7Tage 3-VO Trinkwasser“
 - „7Tage Sham Trinkwasser“
- 6,34 mg/kg ASS in 1ml Trinkwasser p.o. täglich
 - „7Tage 3-VO ASS 100“
 - „7Tage Sham ASS 100“

- 10 mg/kg Clopidogrel in 1ml Trinkwasser p.o. täglich
 - “7Tage 3-VO Clopidogrel”
 - “7Tage Sham Clopidogrel”

Ziel: 1-VO

- 1 ml Trinkwasser p.o. täglich
 - „7Tage Trinkwasser 1-VO“
- 6,34 mg/kg ASS in 1ml Trinkwasser p.o. täglich
 - “7Tage ASS 100 1-VO”
- 10 mg/kg Clopidogrel in 1ml Trinkwasser p.o. täglich
 - “7Tage Clopidogrel 1-VO”

Gruppen mit einer Behandlungsdauer von 21 Tagen

Ziel: Angiographie oder CVR

- 1 ml Trinkwasser p.o. täglich
 - „21Tage 3-VO Trinkwasser“
 - „21Tage Sham Trinkwasser“
- 6,34 mg/kg ASS in 1ml Trinkwasser p.o. täglich
 - „21Tage 3-VO ASS 100“
 - „21Tage Sham ASS 100“
- 10 mg/kg Clopidogrel in 1ml Trinkwasser p.o. täglich

- “21Tage 3-VO Clopidogrel”
- “21Tage Sham Clopidogrel”

Gruppen ohne Operation und Behandlung

Ziel: Angiographie oder CVR

„Unbehandelt“

Projektteil II: Einfluss auf die therapeutisch induzierte zerebrale Arteriogenese

Zusätzlich benötigte Gruppen mit zusätzlicher Behandlung von G-CSF über 7 Tage

Ziel: Angiographie oder CVR

- 1ml Trinkwasser/Tag p.o. + 40 µg/kg/2.Tag G-CSF s.c.
 - „7Tage 3-VO CSF“
 - „7Tage Sham CSF“
- 6,34 mg/kg/Tag ASS p.o. + 40 µg/kg/2.Tag G-CSF s.c.
 - „7Tage 3-VO ASS & CSF“
 - „7Tage Sham ASS & CSF“
- 10 mg/kg/Tag Clopidogrel p.o. + 40 µg/kg/2.Tag G-CSF s.c.
 - “7Tage 3-VO Clop & CSF”
 - “7Tage Sham Clop & CSF”

2.2.2. Tierexperimentelle Methoden

2.2.2.1. Zeitlicher Ablauf

Nach Ankunft im hauseigenen Tierstall erhielten alle Tiere mindestens 5 Tage Eingewöhnungsphase an ihre neue Umgebung.

1te Operation	Behandlung für 7 / 21 Tage	2te Operation
3-VO / Sham	Kontrolllösung (Trinkwasser) per os ASS per os Clopidogrel per os	CVR versus Angiographie
Tag 0	Tag 0 bis 6 / 20	Tag 7 / 21
1te Operation	Behandlung für 7 Tage	2te Operation
3-VO / Sham	Kontrolllösung (Trinkwasser) vs. CSF ASS allein vs. ASS&CSF Clopidogrel allein vs. Clop&CSF	CVR versus Angiographie
Tag 0	Tag 0 bis 6	Tag 7

Abbildung 5 - Zeitlicher Projektablauf

Während des gesamten Beobachtungszeitraums wurden der Gesundheitszustand und das Gewicht täglich kontrolliert. Hierbei wurde auf das Vorhandensein von Symptomen geachtet, die in den „Empfehlungen des Arbeitskreises Berliner Tierschutzbeauftragter für die vorzeitige Tötung erheblich leidender Versuchstiere“ beschrieben werden. Wurde eines der folgend genannten Abbruchkriterien ermittelt, wurden die Tiere umgehend schmerzfrei getötet. Die Angaben beziehen sich auf die bei Antragstellung des Versuchsvorhabens angegeben und genehmigten tierschutzrechtlichen Vorgaben:

- Zuständen, die das Versuchsergebnis beeinflussen können, wie beispielsweise neurologische Ausfälle (Ataxie, Desorientierung);

- Anzeichen von Nekrosen oder Wundheilungsstörungen im Bereich der Operationswunden;
- Verschlechtertes Allgemeinbefinden erkennbar durch reduzierte Futter- und Wasseraufnahme (Dehydratation), beeinträchtiges soziales Verhalten (Absondern von der Gruppe), Fieber;
- Infektionen (Sepsis, Atemwegserkrankungen, Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes);
- Gewichtsverlust ab 20 % des Körpergewichts

Die schmerzfreie Tötung erfolgte per intrakardialer Applikation von T61® während tiefer Isoflurannarkose mit einer Einleitung von 4 Volumen-% in der Narkosekammer und einer kurzzeitigen zum Zwecke der tödlichen Applikation Aufrechterhaltung mit 6 Volumen-% über die Atemmaske. Dies führte bereits zu vollständiger Bewusstlosigkeit. Nun erfolgte entsprechend der Gebrauchsinformation für kleine Labortiere die intrakardiale Applikation von 1-2 ml T61®. Dabei handelt es sich um ein Kombinationspräparat aus den Wirkstoffen Ebutramid, Tetracain, Mebezoniumjodid, das zur Euthanasie per intravenöser, intrakardialer und intrapulmonaler Injektion bei kleinen Labortieren zugelassen ist. Um sicher zu gehen, dass die Applikation direkt ins Herz erfolgt, wurde vor und nach der Applikation Blut über die Spritze aspiriert.

Entsprechend des Beobachtungszeitraumes erfolgte 1 Woche bzw. 3 Wochen nach Erstoperation die Zweitoperation, aus der die Tiere nicht wieder erwachten.

2.2.2.2. Narkose

Vor der Narkose wurden die Tiere keinem Futter- oder Wasserentzug unterzogen. Die Narkoseeinleitung erfolgte bei 3-VO und 1-VO etwa 20 Minuten vor der Operation als Injektionsnarkose mit 50mg/kg Ketamin und 4 mg/kg Xylazin. Die Narkoseaufrechterhaltung wurde mittels Inhalationsnarkose mit 2 % Isofluran in 30 % Sauerstoff / 70 % Distickoxid (Lachgas) über eine Atemmaske durchgeführt und je nach Zustand der Tiere angeglichen. Die

intraoperative Schmerzausschaltung erfolgte mittels subkutaner und intramuskulärer Injektion des Lokalanästhetikums Ropivacain (5 mg/kg). Nach Abschluss der Operation wurden die Tiere in einen Aufwachkäfig gelegt. Nach dem Aufwachen kamen die Tiere zurück in den jeweiligen Gemeinschaftskäfig. Der gesamte Vorgang wurde tierärztlich überwacht. Die postoperative Schmerzausschaltung am Tag nach der Operation wurde ebenfalls mit 5 mg/kg Ropivacain subkutan durchgeführt und bei Bedarf wiederholt verabreicht.

2.2.2.3. Blutflussmessung mittels Laser-Dopplerflowmetrie

Die Messung des zerebralen Blutflusses erfolgte mittels Laser Dopplerflowmetrie (LDF: PeriFlux System 5000). Das Funktionsprinzip basiert auf dem Doppler-Effekt, welcher eine scheinbare Frequenz- bzw. Wellenlängenänderung einer Welle bei einer Relativbewegung von Quelle und Empfänger bezeichnet. Dazu wird auf der ipsilateralen (linken) Schädelseite oberhalb des linken Ohres im Schläfenbereich minimal chirurgisch der Schädel auf 3mm Größe freipräpariert. Zur Messung wurde dort ein Sondenkopf direkt am Schädelknochen platziert. Ausgehend vom LDF-Gerät wird ein monochromatischer Laserstrahl über ein Glasfaserkabel durch den Sondenkopf in die Hirnareale geleitet. Durch die dort zirkulierenden Blutkörperchen (vorwiegend Erythrozyten) wird er unter Frequenzverschiebung reflektiert, vom Sondenkopf registriert und über das Glasfaserkabel zurückgeleitet. Aus dem Frequenzspektrum und der Signalstärke wird ein Wert bezogen, welcher zum Blutfluss proportional ist. Da der Blutfluss an jeder Stelle des Schädels bei demselben Tier und gegenüber anderen Tieren nie gleich ist, können zum Vergleich der Messergebnisse mehrerer Tiere nicht die absoluten, sondern nur die relativen (prozentualen) Änderungen in Bezug auf den Ausgangswert herangezogen werden (*Fabricius and Lauritzen, 1996*).

Die Messung begann nach Anlegen der Sonde an den Schädelknochen, wobei die Sonde über den gesamten Messzeitraum unberührt bleiben musste. Dieser Wert galt als Ausgangswert. Die Messung verlief kontinuierlich. Die zweite Ablesung erfolgte direkt nach Verschluss der linken CCA während der 3-VO-Operation. Diese wurde gefolgt von einer dritten und vierten Ablesung nach 5 und 10 Minuten. Während der relative Wert direkt nach 3-VO auf etwa 50 (40-60) Prozent des Ausgangswertes fallen sollte, musste er nach 10 Minuten immer noch unter 65 Prozent liegen, damit die 3-VO als erfolgreich eingestuft werden konnte. Dabei wird

ein Zustand eines progressiven Verschlusses mit steigender zerebraler Hypoperfusion erzeugt, der bei stenotischen Gefäßveränderungen auftritt und dessen Folge ein akuter Schlaganfall sein kann.

2.2.2.4. Drei-Gefäß-Verschluss (*Three Vessel Occlusion = 3-VO*)

Nach Einleitung der Narkose wurde das Tier mit der Bauchseite auf eine mit Zellstoff geschützte Wärmeplatte gelegt und zur Aufrechterhaltung der Narkose an eine speziell für kleine Nager gebaute Atemmaske angeschlossen. Danach wurde die Messstelle für die LDF-Messung freipräpariert wie vorab beschrieben.

Für die Prozedur der 3-VO-Operation nach Busch et al. (*Busch et al., 2003*) in der Sprague Dawley-Ratte, welche eine modifizierte Form des von Kawata et al. (*Kawata et al., 1996*) entwickelten Modells in der Wistar-Ratte darstellt, werden erst beide Vertebralarterien mittels Elektrokoagulation okkludiert. Hierzu wurde das Tier in einem stereotaktischen Gerät mittels zweier Metallstäbe, welche jeweils vorsichtig in den Meatus acusticus externus vorgeschoben wurden, fixiert. Der Nackenbereich wurde freigeschert und desinfiziert. Direkt hinter dem Os occipitale des Schädelknochens wurde die Haut etwa 0,5-1 cm entlang der Linea mediana dorsalis eröffnet. Jeweils auf Höhe der Linea mediana dorsalis wurden die Musculi spleni, Musculi semispinales capites et longissimus capites voneinander getrennt. Mithilfe eines Wundspreizers wurden diese Muskelpartien zusammen mit den Musculi recti dorsales minores et majores stumpf auseinander gezogen, um Atlaskörper freizulegen. Nun wurden beide Foramina vertebrale laterale et alare mit Schonung der Arteriae et Nervi vertebrales freipräpariert.

Die Arteriae vertebrales wurden mit einer Koagulationssonde (ICC 50) mit einem Durchmesser von 0,45 mm in den Foraminae alare elektrokoaguliert. Danach wurden mittels Diagonalnähten erst die Unterhaut und Muskulatur und anschließend die Haut mit nichtresorbierbarem 5/0 USP (1,0 metric) Faden verschlossen.

Anschließend wurde das Tier zur Ligatur der Arteria carotis communis (CCA) mit dem Rücken auf eine Wärmeplatte gelegt. Nach Scheren der Haare und alkoholischer Desinfektion im linken Halsbereich, d.h. der ipsilateralen Seite, wurde die Haut etwa 0,5 cm paramedian

etwa 0,5-1 cm weit eröffnet. Median der linken Glandula mandibularis wurden die Musculi sternocephalicus pars mastoidea et sternohyoideus stumpf voneinander getrennt. Der Musculus sternohyoideus wurde mittig mit einem Längsschnitt von etwa 0,5 cm eröffnet und die darunter liegende Arteria carotis communis unter weitgehender Schonung des Truncus vagosympathicus freipräpariert. Ein nichtresorbierbarer Faden (5/0 USP; 1,0 metric) wurde um die Arteria carotis communis gelegt und so die Ligatur zunächst nur vorbereitet. Nun wurde die LDF-Sonde zur Blutfluss-Messung an der dafür freipräparierten Stelle am Schädel platziert. Unter kontinuierlicher Messung wurde die Ligatur um die Arteria carotis communis festgezogen.

Nach 10 Minuten wurde die Messung beendet und die Wunden wurden mittels Diagonalnähten (5/0 USP; 1,0 metric) verschlossen. Anschließend wurde das Tier in den Aufwachkäfig gelegt.

2.2.2.5. Sham-Operation

Die Sham (Schein) Operationen liefen im Prinzip genauso ab wie die 3-VO-Prozedur, jedoch wurden die Arteriae vertebrales und die Arteria carotis communis nur bis zu ihrer Sicht ohne jegliche Berührung freipräpariert. Eine LDF-Messung erfolgte hier nicht.

2.2.2.6. Reaktionsfähigkeit (Reagibilität) der Gefäße

Durch die Behandlung mit verschiedenen Medikamenten ist die Möglichkeit gegeben, dass diese direkt die vasodilatatorische Reaktionsfähigkeit der Gefäße beeinflussen. Um zu zeigen, dass die pharmakodynamisch bedingten Einflüsse der einzelnen Compounds auf die im folgenden beschriebene zerebrovaskuläre hämodynamische Reservekapazität (CVR) unabhängig von der Reagibilität der Gefäße sind, wurde in zusätzlichen Tiergruppen eine 1-VO-Operation durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 6 Tiere entweder mit Trinkwasser als Kontrolllösung, ASS oder Clopidogrel für 7 Tage per Gavage behandelt. Nach einer Woche wurde in tiefer Narkose und unter LDF-Kontrolle eine Ligatur der linken Arteria carotis

communis durchgeführt (siehe 2.2.2.4.). Die LDF-Messung erfolgte kontinuierlich für 10 Minuten. Danach wurden die Tiere in tiefer Narkose schmerzlos getötet.

2.2.2.7. Zerebrovaskuläre hämodynamische Reservekapazität

Unter der zerebrovaskulären hämodynamischen Reservekapazität versteht man die Perfusionsreserve des Gehirns. Es soll damit angegeben werden, wie sehr die Gehirndurchblutung, ausgehend von Ruhebedingungen, durch Stimulation noch ansteigen kann (*Stoll and Hamann, 2002*). Dabei korreliert die hämodynamische Reservekapazität umgekehrt mit der Schwere von zerebralen Infarkten und dies scheint wiederum auf der Effizienz der kollateralen Zirkulation zu beruhen. Die Verbesserung der zerebralen Kollateraldurchblutung, welche zur Verbesserung der Reservekapazität führt, ist eine aussichtsreiche Verfahrensweise für die Prävention von zerebrovaskulären Ereignissen (*Coyle and Jokelainen, 1982*). Um die Reservekapazität zu testen, wird die zerebrale Durchblutung durch einen künstlich erzeugten Anstieg des arteriellen Partialdruckes von CO₂ (PaCO₂) oder durch Acetazolamid stimuliert. Dies führt zu einer Dilatation von zerebralen Arteriolen, wodurch der Strömungswiderstand sinkt und bei gleichem Perfusionsdruck mehr Blutvolumen durch das Hirngewebe fließen kann (*Demolis et al., 2000; Stoll and Hamann, 2002*). Der genaue Mechanismus der Acetazolamidreaktion, dessen heutige klinische Anwendung im wesentlichen auf der Etablierung von Piepgras et al. (*Piepgras et al., 1990*) beruht, ist nicht bekannt. Acetazolamid hemmt die Carboanhydrase, welche die Umwandlung von H⁺-Ionen und Hydrogencarbonat in Kohlendioxid und Wasser katalysiert, wodurch vermutlich eine Gewebsazidose erzeugt wird. Diese wiederum soll einen ähnlichen Effekt auf die Arteriolen ausüben wie CO₂ (*Stoll and Hamann, 2002*). Aufgrund des Anstiegs des PaCO₂, wird die Methode entweder als CO₂-Reaktion oder als zerebrovaskuläre Reaktion (CVR) bezeichnet. In Sprague-Dawley Ratten wurde die Durchführung der CVR mit Acetazolamid vor allem von Demolis et al. (*Demolis et al., 2000*) beschrieben.

Dazu wurde das Tier nach Einleitung der Narkose mit der Bauchseite auf die Wärmeplatte gelegt und an die Atemmaske angeschlossen. Zunächst wurde auf der ipsilateralen (linken) Schädelseite im Schläfenbereich die bereits für die 3-VO-Operation genutzte Ableitstelle für die LDF-Messung nach alkoholischer Desinfektion erneut freipräpariert.

Nun wurde das Tier auf die Rückenseite gelegt und nach alkoholischer Desinfektion die Haut im linken Schenkelinnenbereich eröffnet und die linke Arteria und Vena femoralis freipräpariert. Die Kanülierung der Gefäße erfolgte nach folgendem Prinzip: Distal der zu eröffnenden Stelle am Gefäß wurde eine Ligatur (USP 5/0) gesetzt, um Blutungen zu vermeiden. Proximal davon wurde eine weitere Ligatur vorbereitet, jedoch noch nicht festgezogen. Dazwischen wurde die Arterie eröffnet und ein mit heparinisierte Kochsalzlösung (5000 IE in 100 ml) gefüllter Katheter (ecoLab-PE-Mikroschlauch 0,58*0,96 mm) in die Arterie vorgeschoben, die Klemme entfernt und die vorbereitete Ligatur festgezogen.

Der Katheter der Arteria femoralis wurde an ein Blutdruckmessgerät angeschlossen und zwischenzeitlich für die Blutentnahme zur Blutgasbestimmung genutzt. Über den Katheter der Vena femoralis erfolgte die Applikation von Acetazolamid.

Für das Blutfluss-Monitoring wurde die Sonde an die Messstelle am Schädel platziert. Danach wurde die Messung gestartet. Zuerst wurden der Blutfluss und Blutdruck vor der CVR gemessen, ebenso wurde eine arterielle Blutprobe zur Blutgasbestimmung entnommen. Bei Normokapnie wurde die CVR gestartet. Die achtminütige Messung begann mit der Applikation von 30 mg/kg Azetazolamid als Bolus in die Vene. Über den gesamten Zeitraum wurden der Blutfluss und Blutdruck gemessen und minütlich aufgezeichnet. Eine weitere Blutprobe für die Blutgasanalyse wurde nach Abschluss der Messung entnommen.

Nach Abschluss der CVR wurde bei diesen Tieren eine Formalin-Perfusion durchgeführt, um die Gehirne zu konservieren. Durch diese Prozedur, die in tiefer Narkose stattfand, wurden die Tiere schmerzlos getötet.

2.2.2.8. Postmortale Latexangiographie (*Latexperfusion*)

Zur angiographischen Darstellung der Gefäße des Circulus (arteriosus) Willisii wurde eine Latexperfusion durchgeführt. Diese Methode wurde, wie vorab beschrieben, erstmals von *Coyle et al.* (*Coyle and Jokelainen, 1982*) in Wistar-Ratten durchgeführt und von *Busch et al.* (*Busch et al., 2003*) für die Anwendung an Sprague Dawley-Ratten modifiziert.

Nach Einleitung der Narkose wurde das Tier mit dem Rücken auf eine Wärmeplatte gelegt und an eine Atemmaske zur Narkoseaufrechterhaltung angeschlossen. Der linke Halsbereich wurde nach ausreichender alkoholischer Desinfektion wie bei der 3-VO-Operation eröffnet und die linke CCA freigelegt. Die Katheterisierung der CCA erfolgte nach demselben Schema, wie unter 2.2.2.7. für die Arteria femoralis beschrieben.

Die Haut wurde unterhalb des Processus xiphoideus eröffnet. Durch das Zwerchfell wurde die Brusthöhle erreicht. Am freiliegenden Herzen wurde das rechte Herzohr eingeschnitten, wodurch wird eine Druckentlastung für die bevorstehende Perfusion erreicht und ein „Aufpumpen“ der Gefäße verhindert wurde.

Durch den Katheter erfolgte zunächst eine Spülung mit heparinierter Kochsalzlösung (5000 IE in 100 ml) und dann eine Injektion mit 40-50 mg/kg Papaverinhydrochlorid, um eine maximale Vasodilatation zu erreichen, wodurch die Tiere schmerzlos starben. Anschließend wurden druckgesteuert bei 150 mmHg Druck 2 ml einer 37 °C warmen Latexlösung perfundiert. Die Latexlösung bestand aus flüssiger Latexmilch (Chicago Latex Products no. 563) und handelsüblicher schwarzer Tinte (Indian ink) in einem Verhältnis von 10:1. Sofort nach Beendigung der Perfusion wurde der Kopfbereich des Tieres zur Aushärtung des Latex für 10 Minuten in Eis gelegt. Danach wurde das Gehirn entnommen und in ein 50 ml-Falcon-Tube mit Ambion-Lösung überführt und dort bis zur anschließenden Diametermessung gelagert. Die Ambion-Lösung fixiert das Gewebe im Gegensatz zu Formalin ohne Enzymaktivierung. So werden spätere Untersuchungen auf Molekularebene ermöglicht.

Die Messung der Diameter fand unter einem Lichtmikroskop statt, wie nachfolgend beschrieben wird.

2.2.2.9. Entnahme des Gehirns

Die Entnahme des Gehirns erfolgte, nachdem der Kopf direkt auf Höhe Atlas/Axis mittels Guillotine vom Körper getrennt wurde. Mithilfe einer Inzisionsschere wurde die Haut inklusive Unterhaut und Muskulatur vom Schädel gelöst. Auf Höhe der beiden medialen Augenwinkel wurde mit einer Knochenschere der Schädel eröffnet. Ausgehend von dieser Stelle wurde der Schädel medial mit der Inzisionsschere komplett eröffnet. Anschließend

wurde mit einer abgewinkelten Pinzette das Gehirn entnommen und je nach weiterer Vorgehensweise fixiert.

Die tierischen Abfallprodukte wurden in einer -20°C kalten Tiefkühltruhe gesammelt und vom Tierpflegepersonal entsprechend des Tierkörperbeseitigungsgesetzes entsorgt.

2.2.3. Morphologische Aufarbeitung - Bestimmung der Diameter

Unter einem Lichtmikroskop mit integriertem geeichten Messmaß wurden die Diameter (Durchmesser) aller Arterien des Circulus (arteriosus) Willisi an jeweils vier verschiedenen standardisierten Punkten der jeweiligen Gefäße ermittelt. Zu den Gefäßen des Circulus Willisi zählen die Arteria cerebialis (rostralis) anterior (Anterior cerebral artery, ACA), Arteria cerebri media (Middle cerebral artery, MCA), Arteria carotis interna (Internal carotid artery, ICA), Arteria communicans posterior (Posterior communicating artery, PComA), Arteria cerebri posterior (Posterior cerebral artery, PCA). Die bei 4-facher Vergrößerung gemessenen Intervall-Einheiten wurden in Mikrometer umgerechnet.

2.2.4. Statistische Auswertung

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

Die Veränderungen des zerebralen Blutflusses (CBF) werden als prozentuale (relative) Veränderungen der gemessenen absoluten LDF-Werte gegenüber des Ausgangswertes dargestellt. Die Gruppenunterschiede des CBF während 3-VO und 1-VO werden mithilfe des SPSS Independent-Samples T-Test auf statistische Signifikanz untersucht.

Die Berechnung der intraoperativen Überlebensrate auf signifikante Unterschiede wurde mittels SPSS ANOVA Post Hoc LSD Test errechnet. Die Signifikanzen der postoperativen Überlebensraten wurden mit demselben Test, jedoch wegen der unterschiedlichen Beobachtungszeiträume unter Berücksichtigung des General Linear Models (GLM) ermittelt.

Für die Darstellung der Gewichtsunterschiede wurden die Mittelwerte der relativen Gewichtsveränderung errechnet. Die Signifikanzen zwischen den Gruppen wurden ebenso mittels SPSS ANOVA Post Hoc LSD GLM Test kalkuliert.

Zum Vergleich der hämodynamischen Reservekapazität während der CO₂-Reaktion zwischen den einzelnen Gruppen wurden für die ersten vier Minuten jeweils die relativen Means der mittels LDF gemessenen absoluten zerebralen Blutflüsse errechnet. Dabei stellten diese Means bereits die relativen Veränderungen gegenüber dem Ausgangswert dar, der auf 100 % gesetzt wurde. Der Mittelwert aus den relativen Minutenwerten wurde dann zur Analyse der CVRC herangezogen. Dabei wird der Blutfluss, der die 100 %-Grenze übersteigt als hämodynamische Reservekapazität bezeichnet.

Die Gruppenunterschiede für die hämodynamische Reservekapazität und die Gefäß-Diameter wurden mithilfe des SPSS ANOVA Post Hoc LSD Tests auf statistische Signifikanz untersucht.

Für alle Berechnungen wurde die statistische Signifikanz als $p \leq 0.05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1. 3-VO erzeugte zerebrale Hypoperfusion

Die Okklusion von drei der vier hirnersorgenden Hauptarterien führte in der Sprague Dawley-Ratte zur zerebralen Minderperfusion, wobei der ipsilaterale Blutfluss auf etwa 50% absank und in diesem Bereich persistierte (Abb. 6A). Demgegenüber sank der zerebrale Blutfluss nach dem Verschluss von nur einem Gefäß, der CCA, zwar auch auf circa 50% ab, aber stieg innerhalb der nächsten zehn Minuten wieder an (Abb. 6B).

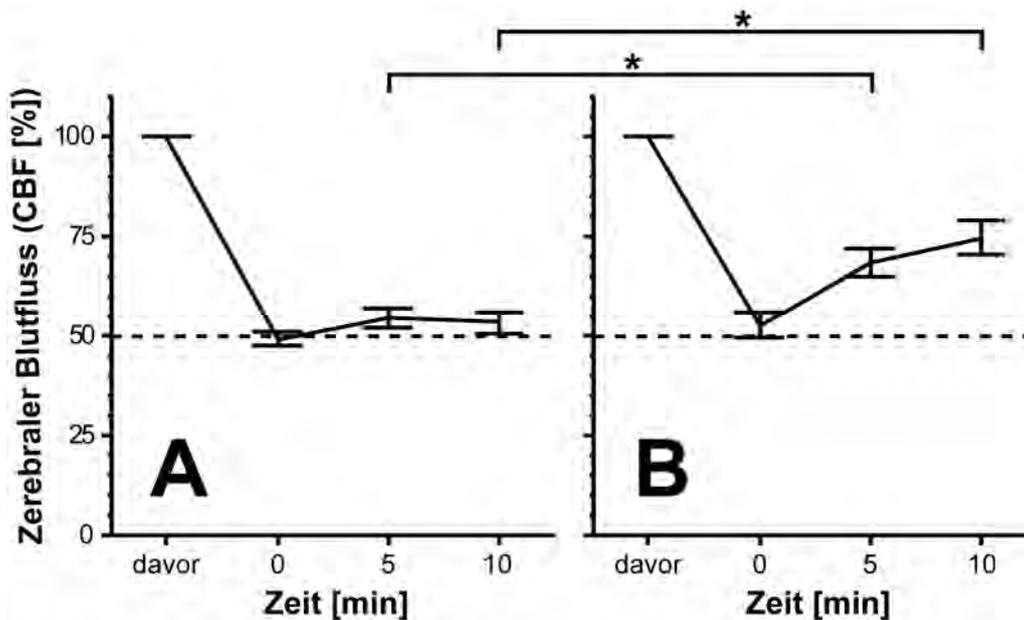


Abbildung 6 - Zerebraler Blutfluss (CBF) nach 3-VO versus 1-VO

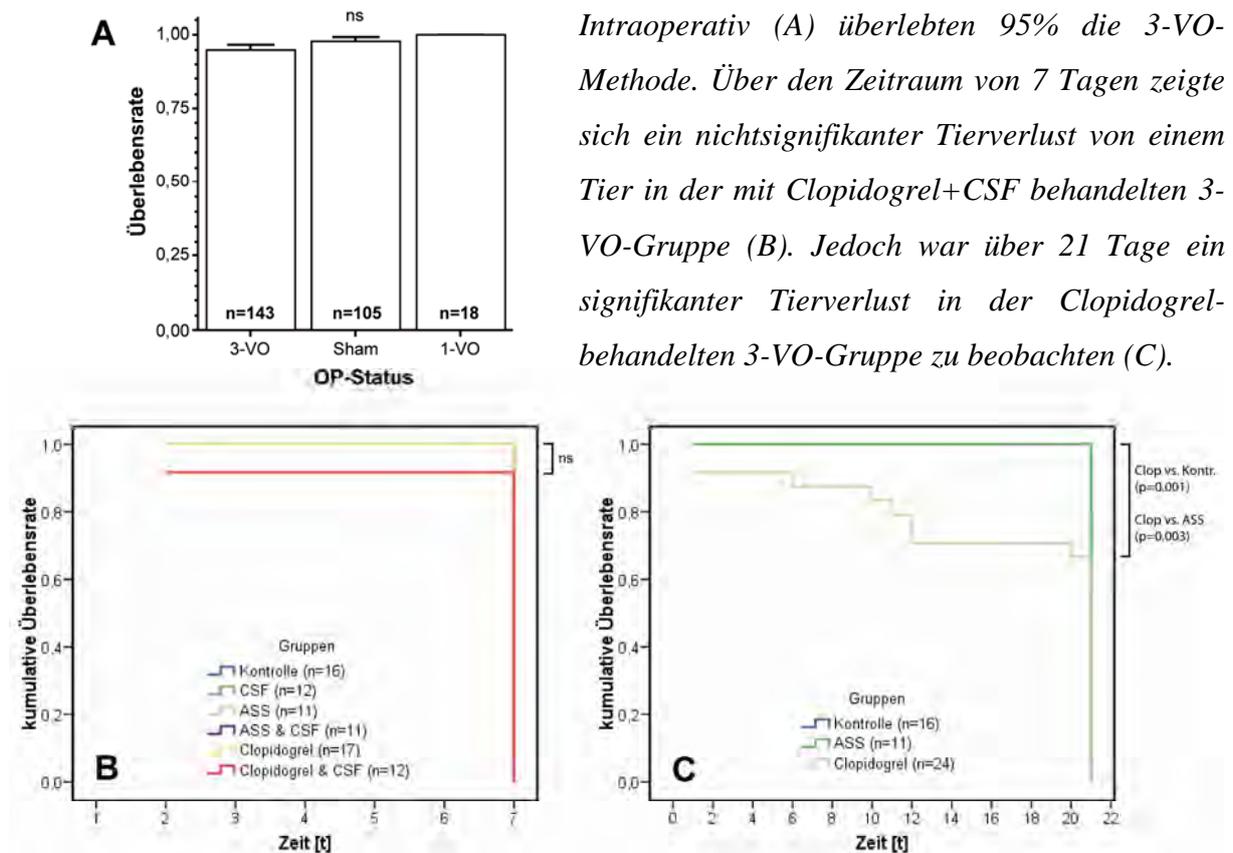
Während der zerebrale Blutflussabfall nach 3-VO (A, n=16) erhalten blieb, erholte er sich nach 1-VO (B, n=6) innerhalb weniger Minuten. Der Unterschied war bereits nach 5 Minuten signifikant.

3.2. Prolongierte Clopidogrel-Behandlung erhöhte die Sterblichkeitsrate

Von den insgesamt 266 in diese Studie einbezogenen Tieren wurden 143 der 3-VO-Methode, 105 der Sham-Methode und 18 der 1-VO-Methode unterzogen. Die 1-VO-Methode haben alle Tiere überlebt, die (3-VO-)Sham-Methode 98% und die 3-VO-Methode 95%. D.h. während der 3-VO-Operation starben von 143 Tiere sieben und während der Sham-Methode von 105 Tieren zwei (Abb. 7A).

Die Tiere wurden entweder mit ASS, Clopidogrel oder Trinkwasser als Kontrolllösung oral über Gavage erstmals vor der Erstoperation behandelt, um einer Aspirationspneumonie wegen eingeschränkter Schluckfähigkeit nach der Operation vorzubeugen. Die erste Behandlung mit G-CSF wurde bei den entsprechenden Gruppen direkt nach der Operation subkutan durchgeführt. Daher erfolgt die nachfolgende Analyse bereits gruppenorientiert.

Abbildung 7 - Überlebensraten



Über den Zeitraum von 7 Tagen überlebten bis auf die Gruppe „3-VO Clopidogrel&CSF“ alle Tiere der 3-VO-(Abb. 7B) und Sham-Gruppen. Aus der genannten Gruppe musste ein Tier am dritten Tag nach 3-VO wegen starker Dyspnoe und Gewichtsverlust schmerzlos getötet werden.

Innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 21 Tagen starben in der Clopidogrel-behandelten 3-VO-Gruppe insgesamt 8 von 24 Tieren (Abb. 7C). Davon mussten 5 Tiere wegen starker Dyspnoe und Gewichtsverlust innerhalb der ersten zwei Wochen schmerzlos getötet werden. Bei 2 Tieren zeigte sich am OP-Folgetag eine Hemiparese. Bei einem weiteren Tier, welches unter Krämpfen litt und am 20.Tag ebenfalls schmerzlos getötet werden musste, wurde eine Entzündung im Harnwegsbereich diagnostiziert. Im übrigen überlebten alle Tiere der 3-VO- und Sham-Gruppen. Der Verlust der Clopidogrel-behandelten 3-VO-Gruppe ist signifikant gegenüber der ASS- und der kontrollbehandelten 3-VO-Gruppe.

3.3. Clopidogrel, nicht aber ASS, verlangsamte die Gewichtsregenerierungsphase

Durch die tägliche Gewichtskontrolle kann ein kontinuierlicher Gewichtsverlauf dargestellt werden. Dabei zeigte sich, dass Kontrolltiere, die einer 3-VO-Operation unterzogen wurden, etwa 3 Prozent des Ausgangsgewichtes verloren, welches sich aber in den folgenden Tagen wieder erholte (Abb. 8A). Dabei offenbarte sich, dass die Sham-Kontrollen zwar innerhalb einer Woche kein Gewicht zulegten, jedoch der Ausgangswert kontinuierlich beibehalten werden konnte (Abb. 8B), es also zu keinem Gewichtsverlust kam.

Um einen eventuellen Einfluss der eingesetzten Medikamente auf das Gewicht besser vergleichen zu können, wurden jeweils die Mittelwerte der Gruppen über die jeweiligen Beobachtungszeiträume ermittelt (Abb. 8C-F).

Über den Beobachtungszeitraum von sieben Tagen bestand ein signifikant größerer Gewichtsverlust bei der mit Clopidogrel behandelten 3-VO-Gruppe gegenüber der 3-VO-Kontrollgruppe (Kontrolle: $-3,49 \pm 2,1$ %; Clopidogrel: $-5,27 \pm 1,99$ %), während sich zwischen allen anderen Gruppen keine Unterschiede zeigten (ASS: $-4,07 \pm 1,51$ %; CSF: $-3,84 \pm 3,31$ %; ASS&CSF: $-3,49 \pm 1,91$ %; Clop&CSF: $-4,08 \pm 2,32$ %) (Fig. 3C). Gegenüber den 3-VO-Gruppen fielen die Gewichtsverluste der behandelten Sham-Gruppen signifikant

geringer aus. Zwischen den einzelnen Sham-Gruppen bestanden jedoch keine Unterschiede (Kontrolle: $-0,47 \pm 1,31$ %; ASS: $0,55 \pm 1,86$ %; Clopidogrel: $0,76 \pm 3,03$ %; CSF: $-0,16 \pm 2,58$ %; ASS&CSF: $0,14 \pm 0,58$ %; Clop&CSF: $0,15 \pm 1,35$ %) (Abb. 8D).

Während der 21-Tages-Periode gab es deutliche Unterschiede innerhalb der 3-VO- und Sham-Gruppen. Während die Tiere der 3-VO-Kontrollgruppe und der mit ASS behandelten 3-VO-Gruppe wieder deutlich an Gewicht zunahmen, so dass vorherige Verluste ausgeglichen waren, konnte dies mit der Clopidogrel-Behandlung nicht erreicht werden. Die relative Gewichtsänderung dieser Gruppe war signifikant größer als der der anderen beiden Gruppen (Kontrolle: $-0,19 \pm 2,01$ %; ASS: $1,21 \pm 2,64$ %; Clopidogrel: $-3,25 \pm 2,69$ %) (Abb. 8E). Innerhalb der Sham-Gruppen, deren relative Gewichtsänderungen signifikant besser gegenüber den 3-VO-Gruppen waren, zeigten sich ebenso Unterschiede. Wiederum lag der Mittelwert der mit Clopidogrel behandelten Gruppe signifikant unter der mit ASS oder Kontrolllösung behandelten Gruppen (Kontrolle: $5,09 \pm 4,08$ %; ASS: $6,07 \pm 2,93$ %; Clopidogrel: $-0,68 \pm 2,97$ %) (Abb. 8F).

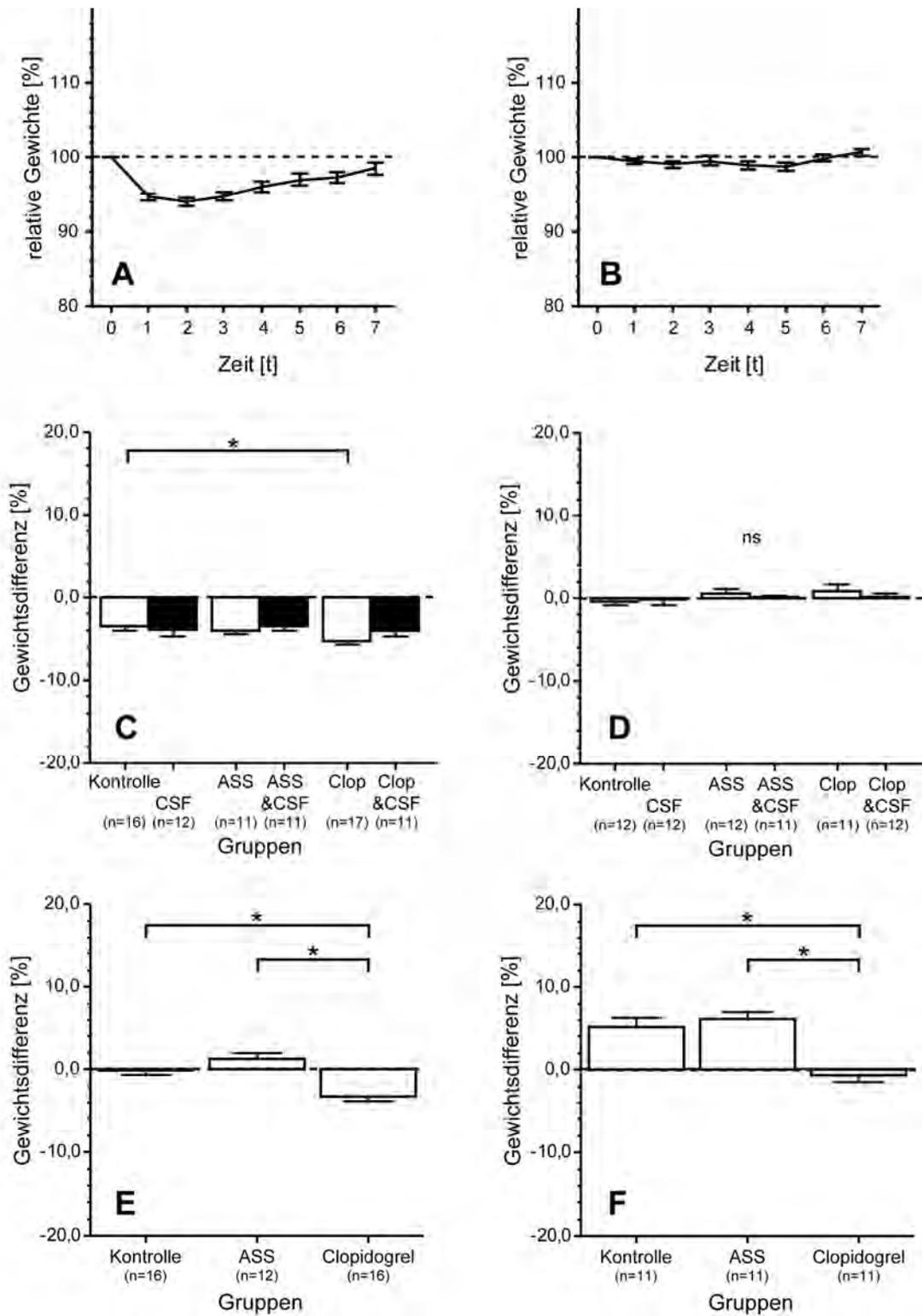


Abbildung 8 - Gewichtsmonitoring

Darstellung des kontinuierlichen Gewichtsverlaufes zwischen 3-VO (A)- und Sham (B)-Kontrollen über 7 Tage und Vergleich der Gewichtsunterschiede für alle 3-VO- und Sham-Gruppen über 7 Tage (C-D) und 21 Tage (E-F).

3.4. Untersuchung der adaptiven und therapeutischen Arteriogenese

3.4.1. G-CSF verbesserte die hämodynamische Reservekapazität

Um eine Verbesserung der hämodynamischen Reservekapazität darzustellen, wurde die CVR mittels intravenöser Injektion von Acetazolamid durchgeführt. Dies erhöhte in allen Gruppen den PaCO₂ (Abb. 9A, Tabelle 3.4.1-1) und senkte den pH-Wert (Abb. 9B, Tabelle 3.4.1-1). Die ausgelöste Vasodilatation leitete die CO₂-Reaktion bzw. CVR ein. Der zerebrale Blutfluss (CBF) stieg dabei an, bis der gemessene Wert nach zwei Minuten ein Plateau erreichte (Abb. 9C). Die Blutflussdifferenz der ersten vier Minutenwerte während der CVR lag für Unbehandelte bei 120 ± 9 % (Tabelle 3.4.1-1). Ausgehend davon, dass der relative Ausgangswert bei 100 % vorausgesetzt wird und der dann gemessene CBF über 100 % als zerebrovaskuläre hämodynamische Reservekapazität bezeichnet wird, liegt diese hier in der unbehandelten Gruppe bei 20 ± 9 % (Abb. 9D). Bei der direkt nach 3-VO durchgeführten CVR war die hämodynamische Reservekapazität vollständig aufgehoben. Der gemessene zerebrale Blutfluss lag bei 98 ± 8 %. Innerhalb der nächsten Wochen begann sich die Reservekapazität zu erholen, bis auf 2 ± 8 % nach einer Woche. Nach drei Wochen lag sie bereits bei 9 ± 12 %. Der Wert der bei Unbehandelten gemessenen Reservekapazität wurde in dieser Zeit aber noch nicht erreicht.

Durch die Behandlung mit G-CSF wurde die hämodynamische Reservekapazität gegenüber der 3-VO-Kontrolle innerhalb einer Woche signifikant verbessert und erreichte mit 20 ± 8 % wieder den Wert der Unbehandelten.

Sowohl innerhalb der Sham-Gruppen zu beiden Zeitpunkten als auch gegenüber der unbehandelten Gruppe wurden keine signifikanten Unterschiede gemessen (Abb. 9E).

3.4.1-1 Adaptive und therapeutisch induzierte Arteriogenese - CVR

	Zerebraler Blutfluss (pLDFMean [%])		PaCO ₂ (mmHg)		pH					
	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher				
Unbehandelt (n = 13)	120 ± 9		42,1 ± 8,5	57,5 ± 8,3	7,38 ± 0,05	7,29 ± 0,07				
3-VO & CVR (n = 4)	98 ± 8*§		42,0 ± 6,2	65,0 ± 18,4	7,40 ± 0,04	7,27 ± 0,11				
	3-VO	Sham	3-VO	Sham	3-VO	Sham				
	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher				
7 Tage Kontrolle (3-VO / Sham: n = 10 / 6)	102 ± 8*§	112 ± 16	50,4 ± 8,9	63,5 ± 13,2	58,2 ± 7,7	81,4 ± 10,8	7,34 ± 0,08	7,28 ± 0,08	7,33 ± 0,04	7,19 ± 0,06
21 Tage Kontrolle (3-VO / Sham: n = 10 / 5)	109 ± 12*	124 ± 16	40,6 ± 8,6	56,6 ± 12,4	34,2 ± 4,3	56,9 ± 1,4	7,40 ± 0,09	7,31 ± 0,09	7,47 ± 0,04	7,30 ± 0,03
7 Tage G-CSF (3-VO / Sham: n = 6 / 6)	120 ± 8†	117 ± 20	43,5 ± 4,9	50,8 ± 5,0	43,0 ± 10,0	57,7 ± 7,3	7,38 ± 0,02	7,30 ± 0,08	7,42 ± 0,06	7,32 ± 0,04

Werte sind Means ± SD;

Vergleiche nur für CBF;

* p ≤ 0,05 = gegenüber Unbehandelt; † p ≤ 0,05 = gegenüber 7 Tage Kontrolle;

§ p ≤ 0,05 = gegenüber CSF; || p ≤ 0,05 = gegenüber 3-VO&CVR

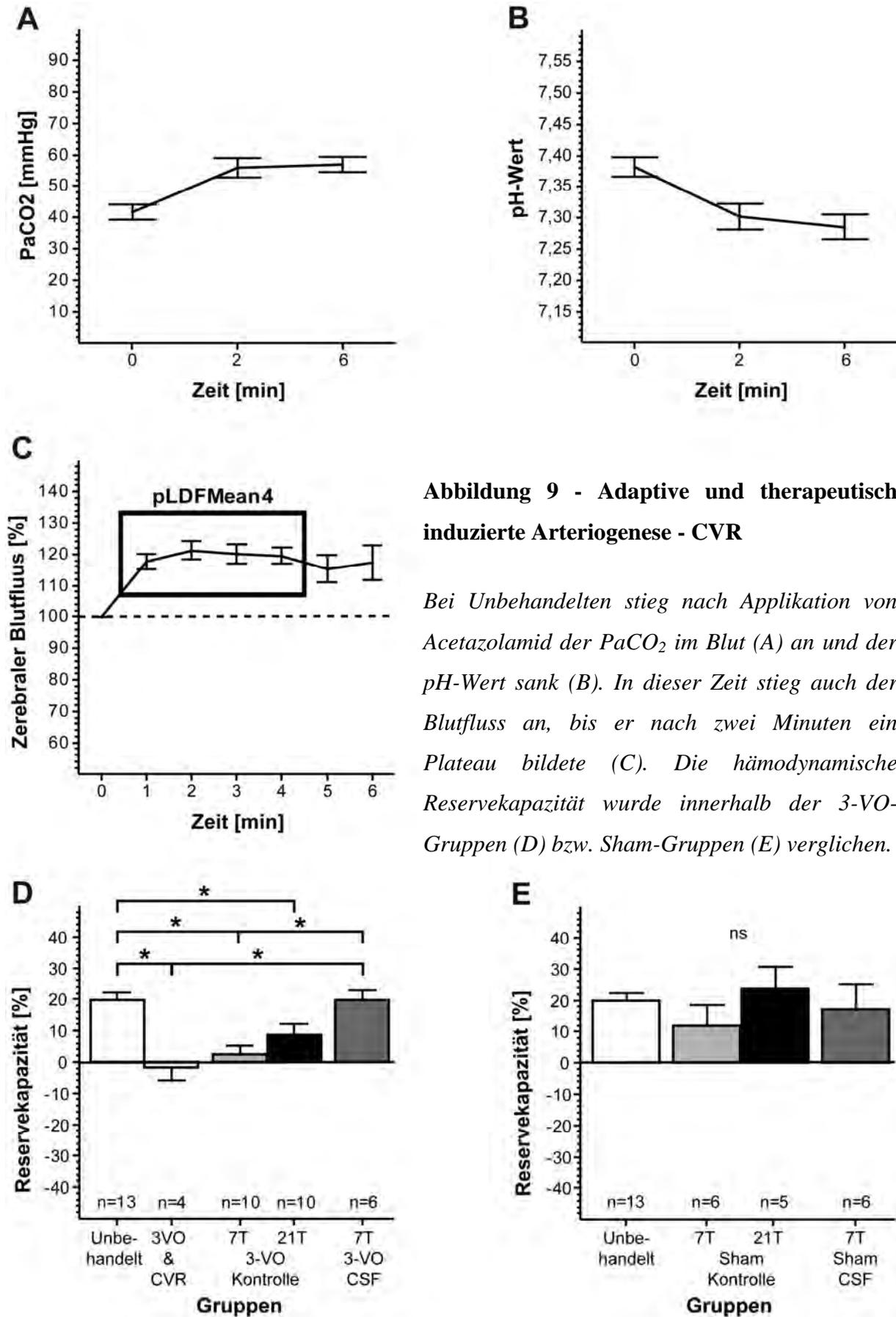


Abbildung 9 - Adaptive und therapeutisch induzierte Arteriogenese - CVR

Bei Unbehandelten stieg nach Applikation von Acetazolamid der PaCO₂ im Blut (A) an und der pH-Wert sank (B). In dieser Zeit stieg auch der Blutfluss an, bis er nach zwei Minuten ein Plateau bildete (C). Die hämodynamische Reservekapazität wurde innerhalb der 3-VO-Gruppen (D) bzw. Sham-Gruppen (E) verglichen.

3.4.2. 3-VO induzierte Kollateralwachstum in der PCA

Um festzustellen, ob die Veränderungen in der hämodynamischen Reservekapazität mit dem eingeleiteten aktiven Gefäßumbau korrelieren, wurde die Latexangiographie mit anschließender Diametermessung durchgeführt. Die Messung zeigte vor allem für die PCA signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 10, Tabelle 3.4.2-1). Bereits eine Woche nach 3-VO waren die Diameter der PCA beidseits signifikant erhöht gegenüber Unbehandelten (ipsilateral: Unbehandelt: $160 \pm 39 \mu\text{m}$; 7 Tage 3-VO Kontrolle: $210 \pm 11 \mu\text{m}$; kontralateral: Unbehandelt: $172 \pm 12 \mu\text{m}$; 7 Tage 3-VO Kontrolle: $214 \pm 38 \mu\text{m}$). Bei den anderen Arterien des Circulus Willisi wurden keine signifikanten Veränderungen festgestellt (Tabelle 3.4.2-1). Drei Wochen nach 3-VO waren die PCA-Diameter wiederum beidseits signifikant vergrößert gegenüber den Werten nach einer Woche (ipsilateral: $252 \pm 11 \mu\text{m}$; kontralateral: $252 \pm 17 \mu\text{m}$). Bezüglich der ACA, der MCA und jeweils der ipsilateralen ICA und PComA wurden Diameter gemessen, die sowohl gegenüber Unbehandelten als auch gegenüber denen einer Woche nach 3-VO gemessenen Werten signifikant zugenommen hatten.

Die Behandlung mit G-CSF zeigte, dass vor allem die PCA beidseits in ihrem Durchmesser signifikant gegenüber den Unbehandelten und den nach einer Woche nach 3-VO gemessenen Diametern zulegen konnte (ipsilateral: $264 \pm 54 \mu\text{m}$; kontralateral: $248 \pm 27 \mu\text{m}$). Die Diameter der PComA und der jeweils ipsilateralen ICA und ACA waren gegenüber Unbehandelten signifikant größer.

Der Vergleich zwischen allen 3-VO-Gruppen gegenüber den Sham-Gruppen offenbarte zu beiden Zeitpunkten, dass die PCA-Diameter der 3-VO-Gruppen immer signifikant größer waren als bei den Sham-Gruppen. Innerhalb der Sham-Gruppen wurden keine Unterschiede der PCA gefunden. Mit Ausnahme der kontralateralen ICA und MCA waren die Diameter der anderen Arterien bei den 3-VO-Tieren nach 21 Tagen signifikant größer als bei den Sham-Tieren. Nach Behandlung mit G-CSF waren außer der kontralateralen ICA und ACA die Diameter aller Gefäße bereits eine Woche nach 3-VO signifikant vergrößert gegenüber der Sham-Gruppe (Tabelle 3.4.2-1). Ausgehend von diesen Daten, die belegen, dass sich die Veränderungen im Gefäßdiameter sowohl für die adaptive als auch die therapeutisch induzierte Arteriogenese am eindeutigsten für die PCA nachweisen lassen, wurden alle folgenden Diameter-Untersuchungen ausschließlich für die PCA durchgeführt.

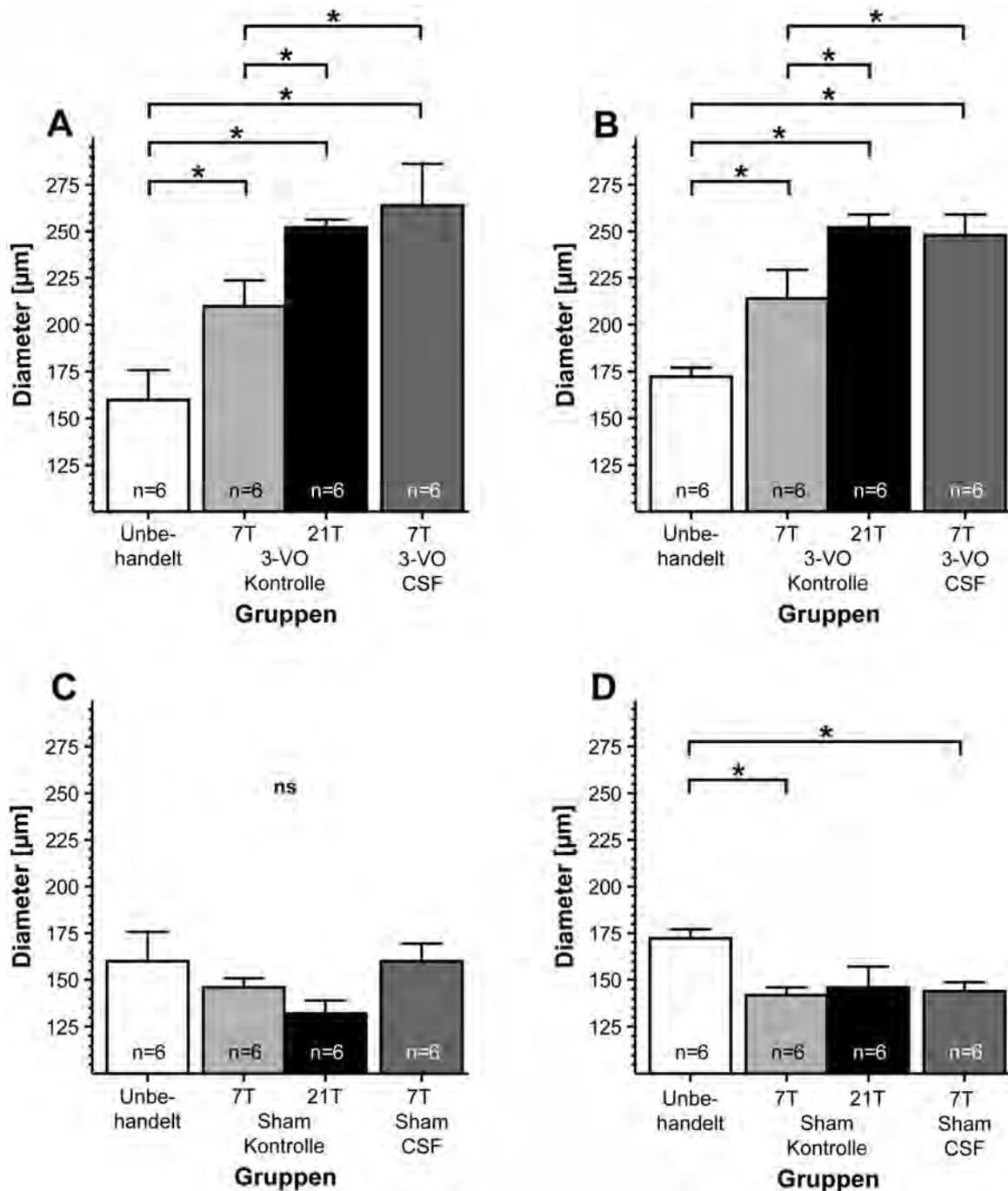


Abbildung 10 - Adaptive und therapeutisch induzierte Arteriogenese – PCA

Durch 3-VO ist die PCA sowohl auf der ipsilateralen (A) als auch auf der kontralateralen Seite (B) in ihrem Durchmesser signifikant gewachsen gegenüber unbehandelten Tieren. Die zusätzliche Behandlung mit G-CSF führte dazu, dass die Diameter bereits nach einer Woche so groß waren, wie es bei der adaptiven Arteriogenese erst nach drei Wochen der Fall gewesen ist. Innerhalb der Sham-Gruppen wurden weder ipsi- (C) noch kontralateral (D) signifikante Unterschiede gemessen.

3.4.2-1 Diameter des Circulus Willisii [μm]

	Posterior cerebral artery		Posterior communicating artery		Internal carotid artery		Middle cerebral artery		Anterior cerebral artery	
	Ipsi-lateral	Kontra-lateral	Ipsi-lateral	Kontra-lateral	Ipsi-lateral	Kontra-lateral	Ipsi-lateral	Kontra-lateral	Ipsi-lateral	Kontra-lateral
Unbehandelt	160 \pm 39	172 \pm 12	178 \pm 26	186 \pm 28	210 \pm 38	228 \pm 36	202 \pm 37	200 \pm 29	170 \pm 18	178 \pm 14
7 Tage 3-VO Kontrolle	210 \pm 34*	214 \pm 38*	202 \pm 31	198 \pm 22	236 \pm 28	244 \pm 10	206 \pm 43	206 \pm 22	206 \pm 39	194 \pm 43
21 Tage 3-VO Kontrolle	252 \pm 11*†	252 \pm 17*†	270 \pm 35*†	206 \pm 19	286 \pm 21*†	246 \pm 10	252 \pm 30*†	238 \pm 12*†	258 \pm 30*†	262 \pm 39*†
7 Tage 3-VO G-CSF	264 \pm 54*†	248 \pm 27*†	224 \pm 20*§	224 \pm 35*	284 \pm 46*†	240 \pm 20	228 \pm 13	220 \pm 34	218 \pm 51*§	202 \pm 21§
7 Tage Sham Kontrolle	146 \pm 12‡	142 \pm 9*‡	174 \pm 13	172 \pm 18	240 \pm 24	220 \pm 32	198 \pm 24	194 \pm 9	176 \pm 15	184 \pm 35
21 Tage Sham Kontrolle	132 \pm 17‡	146 \pm 28‡	178 \pm 31‡	172 \pm 20‡	242 \pm 29‡	230 \pm 9	188 \pm 10‡	188 \pm 12	209 \pm 27*‡	184 \pm 12‡
7 Tage Sham G-CSF	160 \pm 24‡	144 \pm 11*‡	188 \pm 16‡	180 \pm 25‡	240 \pm 27‡	230 \pm 38	198 \pm 17‡	188 \pm 18‡	176 \pm 29‡	174 \pm 41

Werte sind Means \pm SD; † für alle Gruppen: n = 6

* p \leq 0.05 gegenüber Unbehandelt; † p \leq 0.05 gegenüber 7 Tage 3-VO Kontrolle;

‡ p \leq 0.05 Shams gegenüber 3-VOs; § p \leq 0.05 G-CSF gegenüber 21 Tage 3-VO Kontrolle

3.5. Einfluss von ASS und Clopidogrel auf die adaptive zerebrale Arteriogenese

3.5.1. Weder ASS noch Clopidogrel beeinflussten die Reagibilität

Nach täglicher Behandlung mit ASS, Clopidogrel oder Kontrolllösung für eine Woche und anschließender Durchführung der 1-VO-Methode konnte gezeigt werden, dass keines der Compounds die Reaktionsfähigkeit der Gefäße beeinflusste (Abb. 11). In allen drei Gruppen sank der zerebrale Blutfluss nach Verschluss der linken CCA auf etwa 50%, erholte sich jedoch innerhalb von zehn Minuten und zeigte zu keinem Zeitpunkt Unterschiede zwischen den Behandlungen (Tabelle 3.5.1-1).

3.5.1-1 Einfluss auf die Reagibilität

	Zerebraler Blutfluss [%]		
	Direkt nach 1-VO	5 min. nach 1-VO	10 min. nach 1-VO
Kontrolle	53 ± 8	68 ± 8	75 ± 11
ASS	56 ± 13	69 ± 17	69 ± 11
Clopidogrel	50 ± 11	73 ± 16	72 ± 17

Werte sind Means ± SD.; für alle Gruppen: n = 6

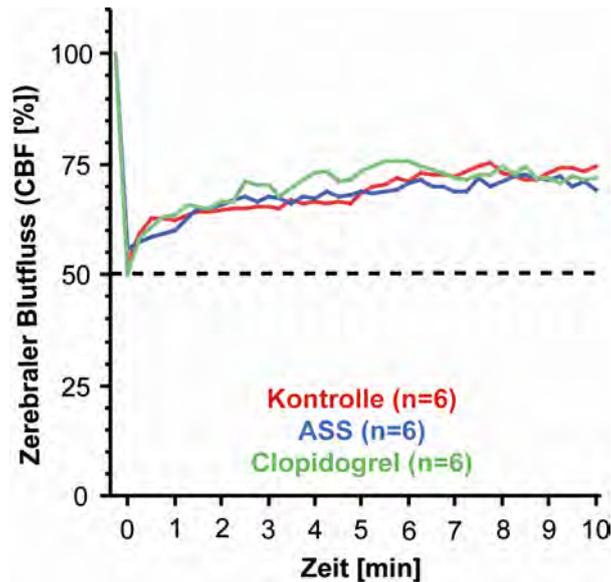


Abbildung 11 - Einfluss auf die Reagibilität

In allen Gruppen sank der Blutfluss nach 1-VO ab und erholte sich innerhalb weniger Minuten. Unterschiede zwischen den Gruppen bestanden zu keinem Zeitpunkt.

3.5.2. ASS verschlechterte die hämodynamische Reservekapazität

Sowohl die ein- als auch die dreiwöchige tägliche Behandlung mit ASS nach 3-VO beeinflusste den Blutfluss während der CVR signifikant (Abb. 12A, Tabelle 3.5.2-1). Die hämodynamische Reservekapazität war unter dieser Behandlung zu beiden Zeitpunkten völlig aufgehoben. Der CBF war deutlich verringert gegenüber den kontrollbehandelten und den mit Clopidogrel behandelten Gruppen. Dabei lag der CBF in der ASS-Gruppe eine Woche nach 3-VO bei $86 \pm 14 \%$, während die kontrollbehandelten Tiere mit $102 \pm 8 \%$ und die mit Clopidogrel-behandelten Tiere mit $108 \pm 21 \%$ bereits wieder eine Reservekapazität aufzeigten. Die tendenzielle Verbesserung des CBF während CVR nach drei Wochen ASS-Behandlung war nicht signifikant. Ebenso wurde die Reservekapazität weder in der kontroll- noch in der mit Clopidogrel behandelten Gruppe über drei Wochen signifikant verbessert gegenüber den Werten, die nach einer Woche beobachtet wurden. Zwischen den Behandlungen lag auch nach drei Wochen die mit ASS behandelte Gruppe mit einem CBF von $95 \pm 11 \%$ signifikant unter der Kontrollgruppe mit $109 \pm 12 \%$ und der mit Clopidogrel behandelten Gruppe mit $111 \pm 11 \%$.

Bei den Sham-Gruppen wurden zwischen den Medikationen zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede der Reservekapazität aufgezeigt. Jedoch war der CBF während CVR in der mit Clopidogrel behandelten Gruppe nach einer Woche signifikant kleiner gegenüber drei Wochen nach Sham (Abb. 12B).

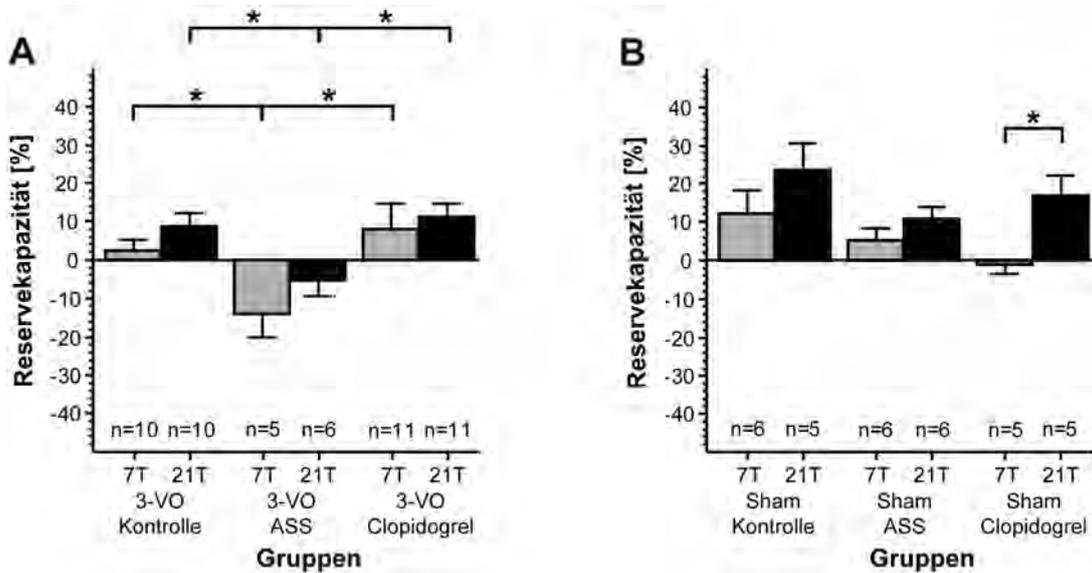


Abbildung 12 - Einfluss auf die CVR nach adaptiver zerebraler Arteriogenese

Vergleich der hämodynamischen Reservekapazität unter ASS-, Clopidogrel- oder Kontrollbehandlung nach 7 oder 21 Tagen nach 3-VO (A) oder Sham (B).

3.5.2-1 Effekte auf die adaptive Arteriogenese

	Postmortem Latexangiographie - Diameter				CVR	
	PCA ipsi [μm]	PCA kontra [μm]	PCA ipsi [μm]	PCA kontra [μm]		Zerebraler Blutfluss (pLDF/Min [%])
	3-VO		Sham			3-VO
7 Tage Kontrolle	210 \pm 34 (n = 6)	214 \pm 38 (n = 6)	146 \pm 12 (n = 6)	142 \pm 9 (n = 6)	102 \pm 8 \ddagger (n = 10)	112 \pm 16 (n = 6)
7 Tage ASS	222 \pm 29 (n = 6)	210 \pm 15 (n = 6)	150 \pm 25 (n = 6)	178 \pm 23 \ddagger (n = 6)	86 \pm 14 \ddagger (n = 5)	105 \pm 8 (n = 6)
7 Tage Clopidogrel	252 \pm 44 \ddagger (n = 6)	234 \pm 21 (n = 6)	138 \pm 13 (n = 6)	174 \pm 15 \ddagger (n = 6)	108 \pm 21 \ddagger (n = 11)	99 \pm 6 (n = 5)
21 Tage Kontrolle	252 \pm 11* (n = 6)	252 \pm 17* (n = 6)	132 \pm 17 (n = 6)	146 \pm 28 (n = 6)	109 \pm 12 \ddagger (n = 10)	124 \pm 16 (n = 5)
21 Tage ASS	244 \pm 20 (n = 6)	260 \pm 26* (n = 6)	139 \pm 14 (n = 5)	156 \pm 17 (n = 5)	95 \pm 11 \ddagger (n = 6)	111 \pm 8 (n = 6)
21 Tage Clopidogrel	266 \pm 27 (n = 5)	266 \pm 16* (n = 5)	170 \pm 30* (n = 6)	152 \pm 34 (n = 6)	111 \pm 11 \ddagger (n = 11)	117 \pm 12* (n = 5)

Werte sind Means \pm SD; * $p \leq 0.05 = 21$ Tage Kontrolle/ASS/Clopidogrel gegenüber 7 Tage Kontrolle/ASS/Clopidogrel;

$\dagger p \leq 0.05 = 7$ Tage bzw. 21 Tage ASS/Clopidogrel gegenüber Kontrolle;

$\ddagger p \leq 0.05 = 7$ Tage bzw. 21 Tage Kontrolle/Clopidogrel gegenüber ASS

3.5.3. Kein Einfluss auf das adaptive Kollateralwachstum durch ASS/Clop

Während sich die PCA-Diameter der Kontrollgruppen auf beiden Seiten innerhalb von drei Wochen signifikant gegenüber den Werten von einer Woche nach 3-VO vergrößerten, wurde dies bei der Behandlung mit ASS und Clopidogrel nur auf der kontralateralen Seite beobachtet (Kontrolle: von $214 \pm 38 \mu\text{m}$ auf $252 \pm 17 \mu\text{m}$; ASS: von $210 \pm 15 \mu\text{m}$ auf $260 \pm 26 \mu\text{m}$; Clop: von $234 \pm 21 \mu\text{m}$ auf $266 \pm 16 \mu\text{m}$) (Tabelle 3.5.2-1, Abb. 13A/B).

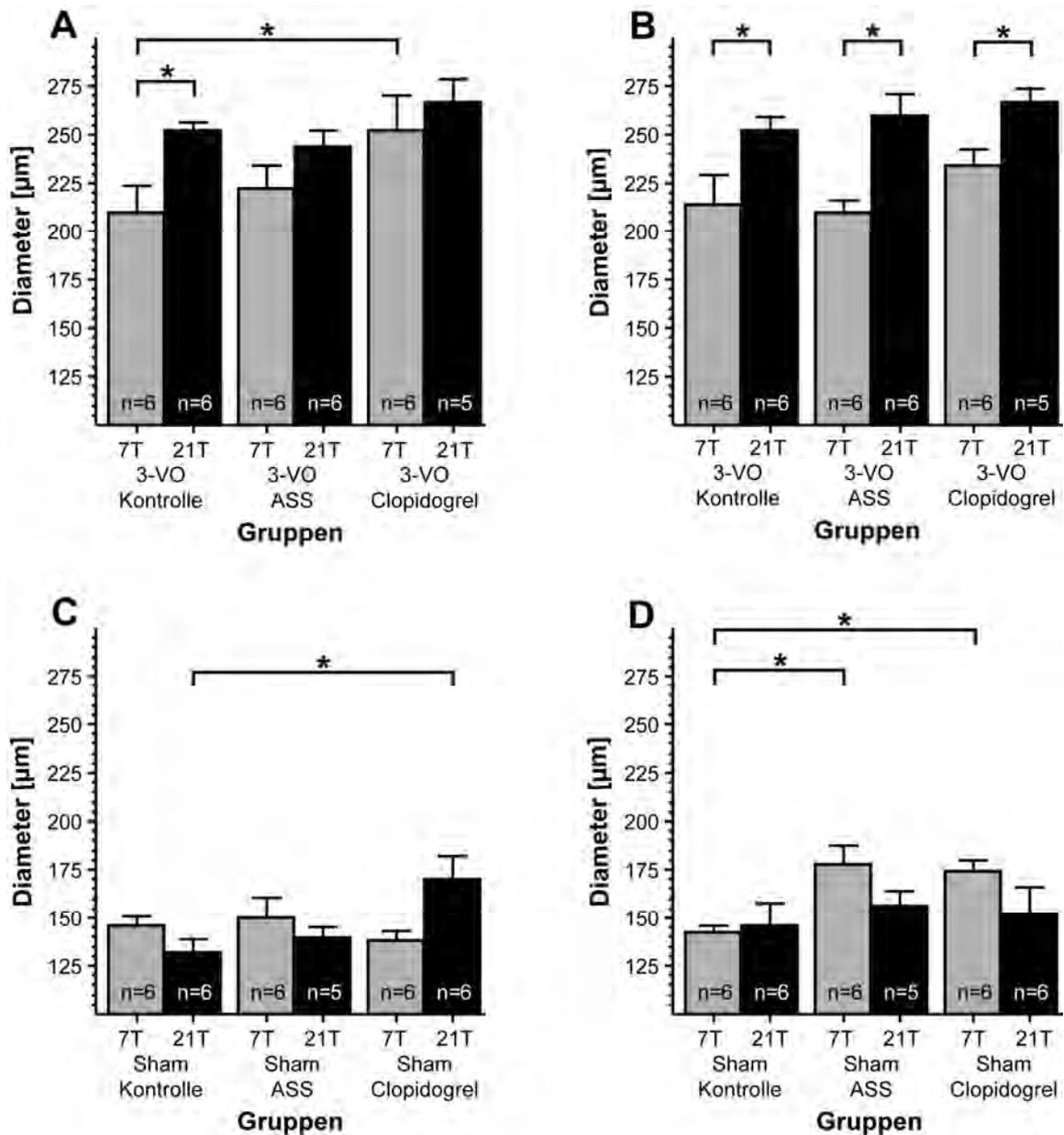


Abbildung 13 - Einfluss auf das adaptive Kollateralwachstum

Vergleich der ipsi- und kontralateralen PCA-Diameter nach 3-VO (A/B) und Sham (C/D)

Zwischen den unterschiedlich behandelten Gruppen bestand nur zwischen der mit Clopidogrel behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe nach einer Woche ein signifikanter Unterschied der ipsilateralen PCA-Diameter. Bei den anderen Gruppen bestanden zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den ipsi- bzw. kontralateralen Diametern.

Bei den Sham-Gruppen bestanden nach einer Woche keine Unterschiede in den ipsilateralen PCA-Diametern. Allerdings war die ipsilaterale PCA drei Wochen nach Sham unter Clopidogrel-Behandlung signifikant vergrößert gegenüber der mit Kontrolllösung behandelten Sham-Gruppe (Abb. 13C/D). Die kontralateralen PCA-Diameter waren eine Woche, aber nicht drei Wochen nach ASS- und Clopidogrel-Behandlung signifikant größer als nach Kontrollbehandlung.

3.6. Einfluss auf die therapeutisch induzierte zerebrale Arteriogenese

Da der hemmende Einfluss von ASS auf die hämodynamische Reservekapazität in Hinblick auf seine scheinbare Neutralität auf das Kollateralwachstum der PCA ein reiner Effekt auf die Blutzirkulation sein könnte, wurde weiterhin der Einfluss von ASS und Clopidogrel auf die mit G-CSF therapeutisch induzierte zerebrale Arteriogenese untersucht.

3.6.1. ASS hemmte die therapeutische Verbesserung der Reservekapazität

Wie bereits erwähnt, verbesserte sich die hämodynamische Reservekapazität innerhalb einer Woche nach G-CSF-Behandlung signifikant gegenüber den 3-VO-Kontrollen (Kontrolle: 102 ± 8 %; CSF: 120 ± 8 %). Der negative Einfluss von ASS auf die Reservekapazität ließ sich mithilfe der zusätzlichen Behandlung mit G-CSF deutlich, jedoch nicht signifikant ausgleichen (ASS: 86 ± 14 %; ASS&CSF: 101 ± 4 %; $p = 0.059$) (Abb. 14A, Tabelle 3.6.1.-1). Trotzdem war die bereits verbesserte Reservekapazität noch signifikant geringer als bei der reinen Behandlung mit G-CSF oder der kombinierten Behandlung mit Clopidogrel und G-CSF (Clop&CSF: 117 ± 20 %).

Die kombinierte Behandlung mit Clopidogrel und G-CSF erhöhte die Reservekapazität zwar tendenziell gegenüber der Clopidogrel-Monotherapie, jedoch nicht signifikant.

Ebenso wie die Monotherapie mit G-CSF führte auch die Kombination aus Clopidogrel und G-CSF zu einer signifikant verbesserten Reservekapazität gegenüber der mit Kontrolllösung behandelten 3-VO-Gruppe.

Bei den Sham-Gruppen war die Reservekapazität nach Monotherapie mit G-CSF signifikant vergrößert als nach Monotherapie mit Clopidogrel. Weitere Unterschiede wurden zwischen den verschiedenen Behandlungen nicht gefunden (Abb. 14B).

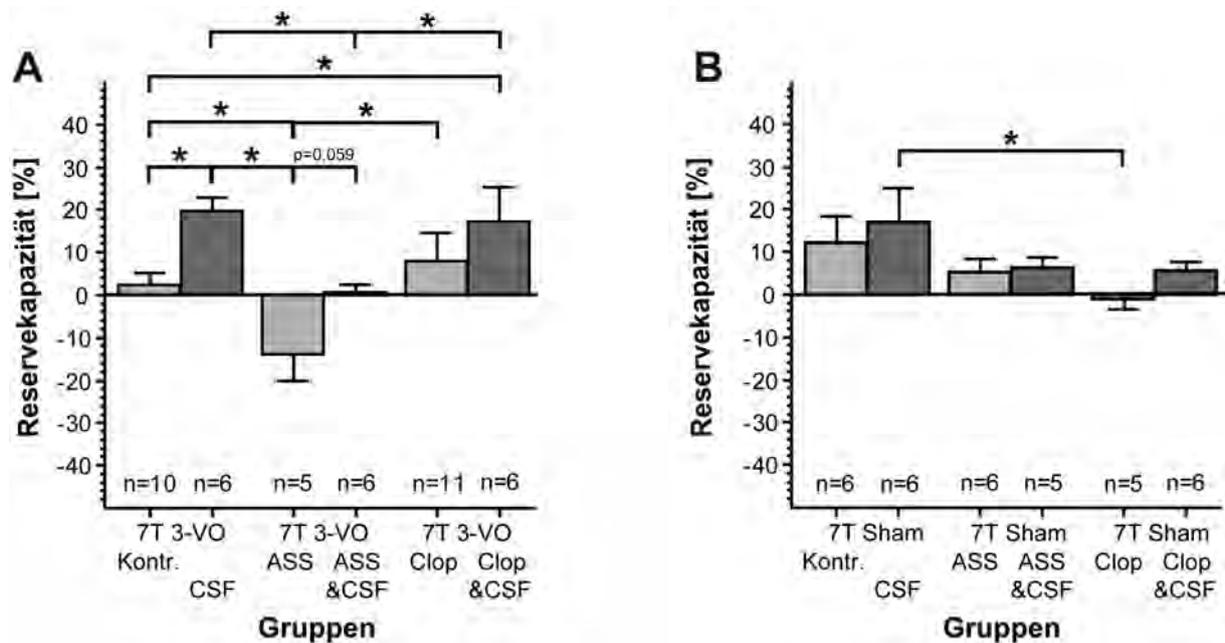


Abbildung 14 - Einfluss auf die Reservekapazität nach therapeutischer Induktion

Der hemmende Effekt von ASS nach 3-VO konnte durch die Kombination mit G-CSF zwar therapeutisch ausgeglichen werden, blieb aber dennoch signifikant kleiner gegenüber der Monotherapie mit G-CSF und der Kombination mit Clopidogrel und G-CSF (A). Bei den Sham-Gruppen wurde zwischen den Monotherapien mit G-CSF bzw. Clopidogrel ein signifikanter Unterschied beobachtet (B).

3.6.1-1 Effekte auf die therapeutisch induzierte Arteriogenese

	Postmortem Latexangiographie - Diameter				CVR	
	PCA ipsi [µm]	PCA kontra [µm]	PCA ipsi [µm]	PCA kontra [µm]		Zerebraler Blutfluss (pLDF/Min [%])
	3-VO		Sham		3-VO	Sham
7 Tage Kontrolle	210 ± 34 [‡] (n = 6)	214 ± 38 [‡] (n = 6)	146 ± 12 (n = 6)	142 ± 9 [†] (n = 6)	102 ± 8 ^{†‡} (n = 10)	112 ± 16 (n = 6)
7 Tage ASS	222 ± 29 [†] (n = 6)	210 ± 15 [‡] (n = 6)	150 ± 25 (n = 6)	178 ± 23 ^{*†‡} (n = 6)	86 ± 14 ^{*†‡} (n = 5)	105 ± 8 (n = 6)
7 Tage Clopidogrel	252 ± 44 [*] (n = 6)	234 ± 21 (n = 6)	138 ± 13 (n = 6)	174 ± 15 ^{*†‡} (n = 6)	108 ± 21 [†] (n = 11)	99 ± 6 [‡] (n = 5)
7 Tage G-CSF	264 ± 54 ^{*†} (n = 6)	248 ± 27 ^{*†} (n = 6)	160 ± 24 (n = 6)	144 ± 11 [†] (n = 6)	120 ± 8 ^{*†§} (n = 6)	117 ± 20 (n = 6)
7 Tage ASS&CSF	240 ± 17 (n = 5)	218 ± 16 [‡] (n = 5)	156 ± 35 (n = 6)	130 ± 18 [†] (n = 6)	101 ± 4 [‡] (n = 6)	106 ± 5 (n = 5)
7 Tage Clon&CSF	235 ± 48 (n = 5)	218 ± 41 [‡] (n = 5)	146 ± 33 (n = 6)	154 ± 19 (n = 6)	117 ± 20 ^{*§} (n = 6)	105 ± 5 (n = 6)

Werte sind Means ± SD;

* p ≤ 0.05 = gegenüber Kontrolle; † p ≤ 0.05 = ASS; ‡ p ≤ 0.05 = gegenüber CSF; § p ≤ 0.05 = gegenüber ASS&CSF

3.6.2. ASS hemmt die therapeutische Verbesserung des Kollateralwachstums

Die kombinierte Behandlung mit G-CSF führte weder bei der Anwendung von ASS noch von Clopidogrel zu einer signifikanten Vergrößerung der ipsi- bzw. kontralateralen PCA-Diameter gegenüber der Monotherapien (Abb. 15A/B, Tabelle 3.6.1-1).

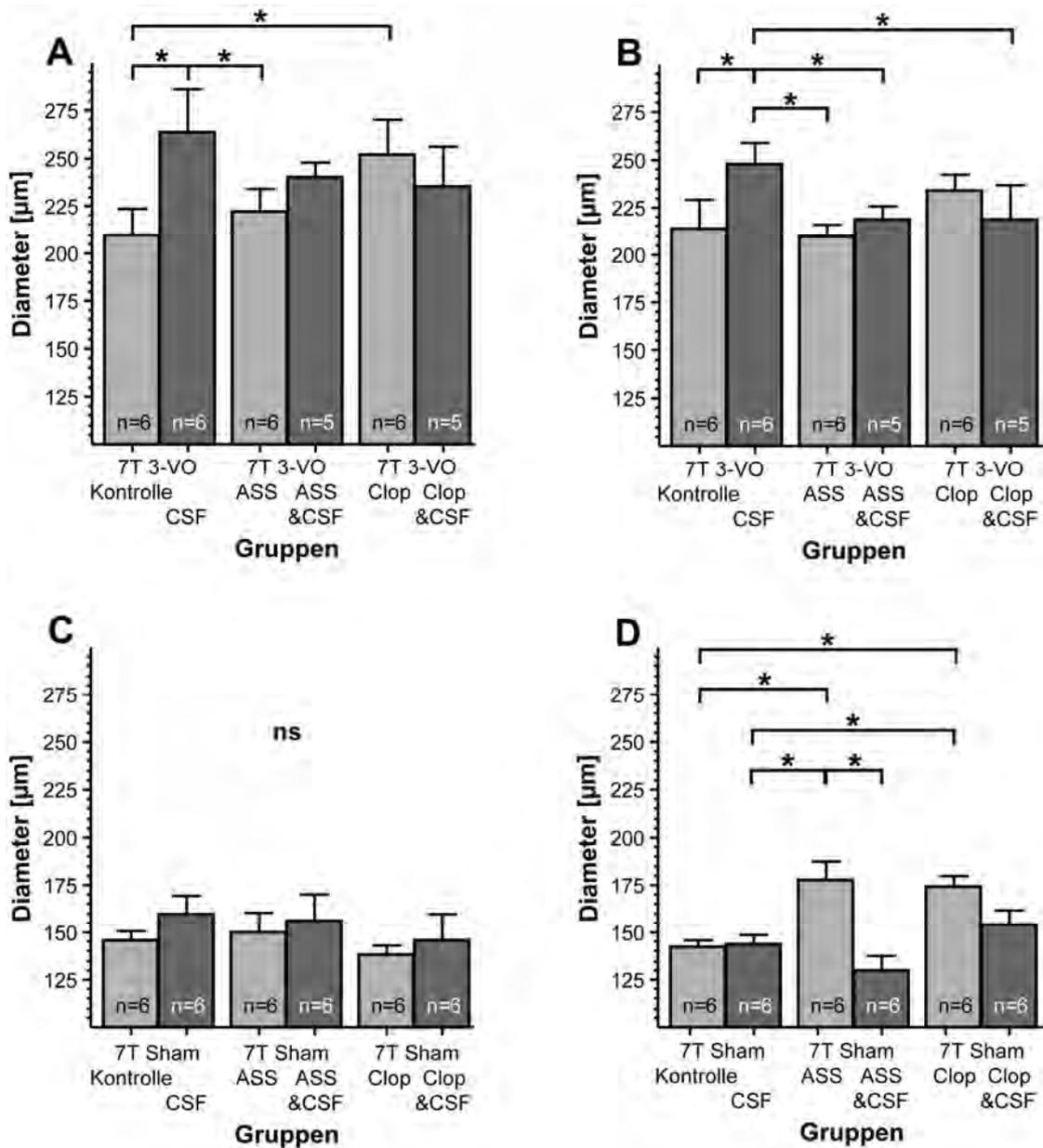


Abbildung 15 - Einfluss auf das Kollateralwachstum nach therapeutischer Induktion

ASS hemmt das Kollateralwachstum der ipsi- (A) und kontralateralen (B) PCA nach 3-VO. In den Sham-Gruppen wurden ipsilateral (C) keine Unterschiede im PCA-Diameter gefunden im Gegensatz zur kontralateralen Seite (D).

Dagegen waren sowohl der ipsi- als auch der kontralaterale PCA-Diameter nach Monotherapie mit G-CSF signifikant größer als bei der Kontrollgruppe und der mit ASS monobehandelten Gruppe (ipsilateral: CSF: $264 \pm 54 \mu\text{m}$; ASS: $222 \pm 29 \mu\text{m}$; kontralateral: CSF: $248 \pm 27 \mu\text{m}$; ASS: $210 \pm 15 \mu\text{m}$). Auf der kontralateralen Seite war der Diameter selbst nach der Kombination aus G-CSF und ASS ($218 \pm 16 \mu\text{m}$) signifikant kleiner gegenüber der G-CSF-Monotherapie.

Weiterhin wurde auf der kontralateralen Seite ein signifikant kleinerer PCA-Diameter nach Behandlung mit Clopidogrel und G-CSF ($218 \pm 41 \mu\text{m}$) gegenüber der G-CSF-Monotherapie gefunden, während dies nach Clopidogrel-Monotherapie nicht der Fall war. Auf der ipsilateralen Seite war der Diameter nach Clopidogrel-Monotherapie ($252 \pm 44 \mu\text{m}$) sogar signifikant größer gegenüber der Kontrollbehandlung ($210 \pm 34 \mu\text{m}$).

Bei den Sham-Gruppen bestanden auf beiden Seiten keine Unterschiede der PCA-Diameter zwischen der Kontrollbehandlung und der G-CSF-Monotherapie (Abb. 15C/D). Auf der kontralateralen Seite fallen, wie oben bereits erwähnt, die PCA-Diameter nach ASS- bzw. Clopidogrel-Monotherapie auf, die beide signifikant vergrößert waren gegenüber der G-CSF-Monotherapie und der Kontrollbehandlung. Ein weiterer signifikanter Unterschied wurde auf der kontralateralen Seite zwischen ASS-Monotherapie und Kombination aus ASS und G-CSF gefunden.

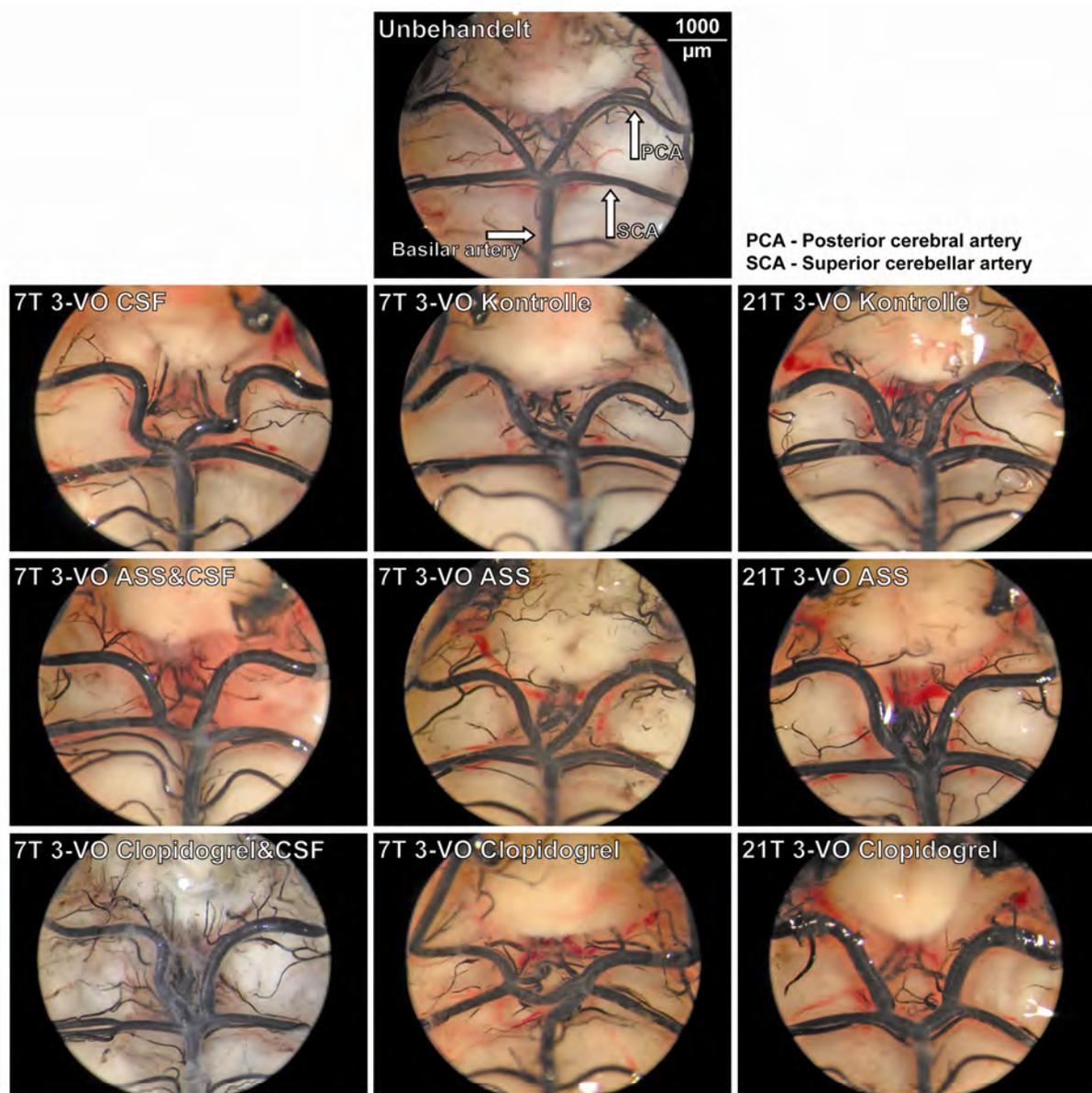


Abbildung 16 - Postmortem Latexangiographie der PCA

Die Fotos zeigen ausgehend von der unbehandelten Gruppe die deutlichen Vergrößerungen im Gefäßdurchmesser der PCA bereits eine Woche nach 3-VO. Dieser konnte durch die Monotherapie mit ASS bzw. Clopidogrel nicht beeinflusst werden. Innerhalb von drei Wochen vergrößerten sich die Durchmesser aller Gruppen abermals, zeigten zwischen den Behandlungen jedoch keinen Unterschied. Unter dem Einfluss von G-CSF konnte das Kollateralwachstum therapeutisch induziert und gegenüber der Kontrollbehandlung signifikant verbessert werden. Das Kollateralwachstum unter der Monotherapie mit ASS und der Kombinationstherapie mit ASS und G-CSF blieb jedoch signifikant verringert gegenüber der G-CSF-Monotherapie.

4. Diskussion

Ausgehend von Hoefers Daten, wonach Aspirin im Kaninchenhinterlauf die Arteriogenese hemmt (Hoefler *et al.*, 2005a), bestand in der vorliegenden Studie das Ziel darin, die Einflüsse von ASS im Vergleich zu Clopidogrel auf die zerebrale Arteriogenese zu untersuchen.

4.1. Reproduzierbarkeit der adaptiven zerebralen Arteriogenese im 3-VO-Modell

Zunächst war es notwendig, das 3-VO-Modell, welches von Busch (Busch *et al.*, 2003) etabliert und von Buschmann (Buschmann *et al.*, 2003a) und Schneeloch (Schneeloch *et al.*, 2004) erfolgreich angewandt wurde, zu reproduzieren und damit die adaptive zerebrale Arteriogenese zu initiieren.

Nach Okklusion der zwei Vertebral-Arterien und der linken CCA sank der zerebrale Blutfluss (CBF) der ipsilateralen Hemsphäre auf etwa 50 % und stieg nicht wieder an. Demgegenüber sank nach Verschluss von nur einer CCA der CBF zwar auch auf annähernd 50 % ab, erholte sich allerdings relativ schnell wieder. Dabei ist jedoch genau die Erhaltung der Hypoperfusion von ausschlaggebender Bedeutung. Sie simuliert zum einen die verminderte Blutversorgung infolge von Stenosen im Vorfeld von Schlaganfällen, ohne dabei Funktionsverluste, zerebrale Infarkte oder disseminierte Nervenzellnekrosen hervorzurufen (Busch *et al.*, 2006; Schneeloch *et al.*, 2004). Zum anderen leitet sie dadurch die adaptive Arteriogenese ein. Dabei scheinen Unterschiede zwischen Rattenstämmen zu bestehen, da bei eigenen (unveröffentlichten) Vorversuchen an Wistarratten beobachtet wurde, dass der CBF nach 3-VO zwar zunächst auf etwa 55% absank, sich aber dann im Gegensatz zu SD-Ratten in relativ kurzer Zeit wieder erholte. Durch den Verschluss dieser drei hirnversorgenden Hauptgefäße übernehmen nun die rechte CCA sowie kleinere Kollateralgefäße die Blutversorgung. Dazu kommt es zunächst zur passiven Dilatation der Gefäße. Der umgeleitete erhöhte Blutfluss durch diese präexistenten Arterien versetzt durch verstärkte Schubspannung die Endothelzellen in einen Aktivierungszustand (Nagel *et al.*, 1994; Sampath *et al.*, 1995). Dadurch werden in den Gefäßwänden aktive Umbauprozesse in Gang gesetzt, bei denen die Transmigration und Aktivierung von zirkulierenden Monozyten eine entscheidende Rolle spielt (Arras *et al.*, 1998; Hillmeister *et al.*, 2008). Nach 3-VO scheint vor allem die zum Kollateralsystem des Circulus Willisi gehörende PCA in das Remodeling involviert zu sein.

Bereits nach einer Woche waren deren ipsi- und kontralaterale Diameter signifikant gegenüber denen von nicht-operierten unbehandelten Tieren vergrößert. Wie schon in eigenen Voruntersuchungen beschrieben (*Hillmeister et al., 2008*), wurden im Gegensatz zu *Busch et al.* auch hier keine Unterschiede zwischen der ipsi- und kontralateralen Seite gefunden. Dieser Größenzuwachs konnte innerhalb von drei Wochen noch einmal signifikant gesteigert werden. Zu diesem Zeitpunkt waren dann auch beide ACA signifikant gegenüber den Unbehandelten in ihrem Diameter gewachsen. Dass dies tatsächlich als ein Effekt der 3-VO gesehen werden muss, belegen die Daten der Sham-Tiere, bei denen keinerlei Gefäßwachstum festgestellt wurde. Diese Daten zeigen auf, dass die übernommene Blutversorgung durch die Arteriolen anfänglich durch passive Dilatation und dann durch aktives Remodeling auf Dauer aufrecht erhalten werden konnte. Auf molekularer Ebene ist das Remodeling bereits 24 Stunden nach 3-VO nachweisbar (*Hillmeister et al., 2008*). In dieser frühen Phase der Arteriogenese ist eine erhöhte Aktivierung transmigrierter Monozyten sowie die Proliferation von Endothelzellen zu beobachten. Inwieweit die Hochregulierung bestimmter Gene wie t-Kininogen und TIMP-1 (Tissue inhibitor of metalloprotease) für die Arteriogenese von Bedeutung ist, unterliegt weiteren Untersuchungen (*Hillmeister et al., 2008*).

Auf funktioneller Ebene wirken sich basierend auf dem Hagen-Poiseuilleschen Gesetz schon kleinste Veränderungen des Gefäßdurchmessers auf die Durchblutungsrate aus. Für dessen Nachweis konnte mit der CVR zunächst gezeigt werden, dass die hämodynamische Reservekapazität direkt nach 3-VO aufgehoben ist. Dies ist nicht verwunderlich, da die nicht-okkludierten Gefäße für die Aufrechterhaltung der zerebralen Blutversorgung bereits maximal vasodilatiert sind. Eine zusätzliche Weitstellung ist nicht möglich (*Busch et al., 2003*).

Dabei spielt die Art der Versuchsdurchführung der CVR keine Rolle. Bei eigenen (*unveröffentlichten*) Voruntersuchungen in nichtoperierten unbehandelten Tieren wurde festgestellt, dass sowohl die Inhalation von 6 % CO₂ als auch die intravenöse Applikation von Acetazolamid zum gleichen Anstieg des CO₂-Partialdruckes (PaCO₂) und Abfall des pH-Wertes führt und eine Reservekapazität von etwa 20 % gemessen werden kann. Unabhängig davon, dass die Wirkungsweise von Acetazolamid in der Blutzirkulation unbekannt ist (*Stoll and Hamann, 2002*), konnte hier festgestellt werden, dass nach dessen intravenöser Applikation sowohl der PaCO₂ ansteigt und der pH-Wert sinkt, welches beides zu einer reflektorischen Vasodilatation führt.

Der bei direkt nach 3-VO durchgeführter CVR gemessene CBF lag unterhalb der 100 %-Grenze, was auf das sogenannte Steal-Phänomen zurückzuführen ist, dem eine Blutumverteilung zugrunde liegt. Im Bereich der okkludierten Gefäße, wo keine maximale Vasodilatation möglich ist, wird das Blut abgezogen zugunsten der Bereiche, wo maximale Vasodilatation möglich ist (*Kuwabara et al., 1995*). Dies führt dazu, dass während der CVR ein gegenüber dem Ausgangswert von 100 % fälschlicherweise verringerter Blutfluss gemessen wird. Da dieses Phänomen unabhängig der Behandlung mit verschiedenen Pharmaka und zu verschiedenen Messzeitpunkten auftritt, ist es als standardisierter Fehler vernachlässigbar. D.h. aber dennoch, dass der Wert der Reservekapazität eine klare Aussage über die Fähigkeit zur Vasodilatation bietet. Die vollständige Aufhebung der hämodynamischen Reserve direkt nach 3-VO ist im Gegensatz zu SD-Ratten bei Wistarratten nicht zu beobachten (*Kawata et al., 1996*). Innerhalb einer Woche liegt die gemessene Reservekapazität bei SD-Ratten wieder im positiven Bereich und erreicht nach drei Wochen 50 % des bei nichtoperierten unbehandelten Tieren gemessenen Wertes. Diese Verbesserung bedeutet, dass die Gefäße neben der Aufrechterhaltung der Blutversorgung nun wieder in der Lage sind, durch zusätzliche Dilatation den CBF zu erhöhen.

Zusammenfassend korreliert also die Verbesserung der hämodynamischen Reserve mit der aktiven Proliferation im Gefäßdurchmesser. Damit konnte das 3-VO-Modell in der SD-Ratte als Induktor der adaptiven zerebralen Arteriogenese bestätigt werden.

4.2. Therapeutische Induktion der zerebralen Arteriogenese durch G-CSF

Während GM-CSF vorklinisch bisher erfolgreich als pro-arteriogene Substanz im Femoralis-Ligatur-Modell im Kaninchen (*Buschmann et al., 2001*) und Schwein (*Grundmann et al., 2006*), im zerebralen Rattenmodell nach 3-VO (*Buschmann et al., 2003a; Schneeloch et al., 2004*) und 2-VO (*Schneider et al., 2007*), und im zerebralen Mausmodell nach 1-VO (*Todo et al., 2008*) eingesetzt wurde, lagen bislang keine Daten über die pro-arteriogene Wirkung von G-CSF in einem zerebralen Modell vor. Dabei lag es nahe, dass G-CSF aufgrund seiner vielen Gemeinsamkeiten mit GM-CSF ebenfalls über pro-arteriogenes Potential verfügt. Zudem machten die bisher einzigen Daten einer klinischen Arteriogenese-Studie mit GM-CSF bei

Patienten mit PAD aufgrund der hohen Nebenwirkungsrate (*van Royen et al., 2005*) die Untersuchung anderer stimulierender Faktoren erforderlich.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit G-CSF über eine Woche nach 3-VO zu einer signifikanten Verbesserung der hämodynamischen Reservekapazität gegenüber den 3-VO-Kontrollen führt. Dabei wurde ein Wert erreicht, der zum einen dem der Unbehandelten entsprach und zum anderen auch mit der Gabe von GM-CSF erzielt wurde (*Duelsner et al., Manuskript wird eingereicht, 2009*). Bei den Sham-Gruppen, die als Kontrollen der 3-VO-Gruppen eingesetzt wurden, konnten keine Unterschiede zwischen der Behandlung mit G-CSF und mit Kontrolllösung beobachtet werden. Dies bestätigt daher, dass die gefundenen Effekte auf Grund der 3-VO zustande gekommen sind.

Bestätigt wurden die Ergebnisse der CVR durch die Analyse der PCA-Diameter. Innerhalb von nur einer Woche nach 3-VO waren die Diameter sowohl ipsi- als auch kontralateral durch die Behandlung mit G-CSF signifikant vergrößert gegenüber der Kontrollbehandlung. So konnte durch G-CSF-Behandlung bereits nach einer Woche ein Gefäßdurchmesser erreicht werden, der bei der adaptiven Arteriogenese erst nach drei Wochen erreicht wurde.

Wie schon bei der CVR wurden auch hier bei den Sham-Gruppen keine Unterschiede gefunden.

Auch bei den Diametern stimmten die Daten nach G-CSF mit denen nach GM-CSF-Gabe überein (*Duelsner et al., Manuskript wird eingereicht, 2009*). Dabei scheint beiden Arteriogenese-Induktoren gemein zu sein, dass ihre Anwendung lediglich das Kollateralwachstum der PCA beschleunigt, da alle anderen Kollateralen selten signifikante Veränderungen aufzeigten.

Obwohl G-CSF bisher aufgrund seiner Spezifität für Granulozyten genutzt wurde (*Steward, 1993*) und eben diese Leukozyten-Spezies in der Arteriogenese keine Rolle spielen soll (*Hoefler et al., 2005b*), lassen die vorliegenden Daten an dieser These Zweifel aufkommen. Es lässt sich viel mehr daraus schließen, dass entweder auch Granulozyten ein bisher nicht entdecktes pro-arteriogenes Potential entfalten oder dass G-CSF auch auf Monozyten stimulierend wirken kann. Bekannt ist, dass die Gabe von G-CSF die Zahl zirkulierender Monozyten und deren Aktivität erhöht (*Ohsaka et al., 1995*). Zudem zeigen G-CSF -/- Knock

out-Mäuse einen Mangel an Granulozyten und Monozyten (*Lieschke et al., 1994*). Ebenso wurde publiziert, dass Monozyten in der Lage sind, den G-CSF-Rezeptor auf ihrer Oberfläche zu exprimieren (*Boneberg et al., 2000*). Andererseits bestehen auch Gemeinsamkeiten zwischen dem GM-CSF- und dem G-CSF-Rezeptor, da beide über die gleichen Untereinheiten des Jak-STAT-Signalweges agieren können (*Marino and Roguin, 2008; Valdembri et al., 2002*).

Erstmals in der Arteriogenese eingesetzt, führte die Behandlung mit G-CSF in einem Mausmodell mit induziertem Myokardinfarkt zu einer Verminderung der späteren ischämischen Kardiomyopathie, was dem beschleunigten Kollateralwachstum zugeschrieben wurde (*Deindl et al., 2006*). Auch hier wurde eine G-CSF-bedingte Erhöhung der Monozytenzahl gefunden.

Eine andere Möglichkeit der pro-arteriogenen Wirkung von G-CSF bestünde in der durch die Erhöhung der Granulozyten- und Monozytenanzahl verstärkte Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezien (ROS). Die Expression des auf Endothelzellen gefundenen Lectin-like receptor for oxidized (ox-LDL) low-density lipoproteins (LOX-1) (*Li and Mehta, 2000*) kann unter anderem durch oxLDL, ROS (*Li et al., 2003*) und Schubspannung (*Murase et al., 1998*) hochreguliert werden. LOX-1 vermittelt unter anderem die Hochregulierung von MCP-1 und die Adhäsion von Monozyten ans Endothel (*Li and Mehta, 2000*). Da auch GM-CSF im Endeffekt zu einer Erhöhung von ROS führt, sind auch hier die Parallelen ersichtlich.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die vorliegenden Daten eindeutig belegen, dass neben GM-CSF auch G-CSF in der Lage ist, die adaptive zerebrale Arteriogenese therapeutisch zu beschleunigen. Andere Daten lassen zudem vermuten, dass die Wirkungsweisen von G-CSF auf ähnlichen Mechanismen beruhen wie die von GM-CSF.

4.3. Effekte von ASS und Clopidogrel auf die zerebrale Arteriogenese

4.3.1. Effekte auf die adaptive zerebrale Arteriogenese

Nachdem die Gruppen für ein oder drei Wochen nach 3-VO entweder mit ASS, Clopidogrel oder Trinkwasser als Kontrolllösung behandelt wurden, offenbarte sich bei der Durchführung

der CVR ein signifikant negativer Einfluss von ASS auf die hämodynamische Reservekapazität. Zu beiden Zeitpunkten war die Reserve nicht nur völlig aufgehoben, sondern der während der CVR gemessene CBF lag nach einer Woche bei 86 % und nach drei Wochen immer noch bei 95 %. D.h. dass das bereits bei der direkt nach 3-VO durchgeführten CVR beobachtete Steal-Phänomen (*Kuwabara et al., 1995*) durch ASS noch verstärkt wurde. Der Wert begann sich innerhalb von drei Wochen tendenziell auszugleichen, verbesserte sich aber nicht signifikant. Dagegen wurde zu keinem Zeitpunkt ein Einfluss von Clopidogrel auf die Reservekapazität ausgeübt hat, was die Hypothese von deren Neutralität gegenüber der Arteriogenese bestätigt (*Hoefler et al., 2005a*).

Bei den Sham-Gruppen, die in der Regel keine Unterschiede aufweisen sollten, fällt auf, dass die Reservekapazität nach einer Woche nach Clopidogrel-Behandlung signifikant kleiner war als nach drei Wochen. Ausgehend von den bisherigen Daten, könnte die Ursache darin bestehen, dass die CVR eine sehr sensitive Methode ist. Die Tiere weisen dabei unabhängig vom Behandlungsschema in ihrer Gesamtheit eine relativ große Standardabweichung auf. Letztlich bildet aber erfahrungsgemäß der Gruppenmittelwert eine bestimmte Tendenz, der innerhalb verschiedener Gruppen verglichen werden kann. Der Unterschied in den Sham-Gruppen scheint daher von der biologischen Variabilität der Tiere verursacht zu sein.

Aus den PCA-Diameter-Daten ist zu sehen, dass gerade auf der kontralateralen Seite die jeweiligen Unterschiede zwischen beiden Zeitpunkten bei allen Behandlungsstrategien darauf hindeuten, dass Kollateralwachstum stattgefunden hat. Das bedeutet, dass sich die Diameter zwar innerhalb von einer Woche und drei Wochen nach 3-VO signifikant vergrößert haben, dies aber unabhängig von den verschiedenen Pharmaka ablief, weil zwischen den Behandlungsgruppen zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied bestand.

Ausgehend von Buschs Daten (*Busch et al., 2003*) und eigenen früheren Untersuchungen kann festgestellt werden, dass die PCA in unbehandelten nichtoperierten SD-Ratten beidseits in ihrem Durchmesser etwa zwischen 150 und 180 μm schwankt, jedoch nie 200 μm überschreitet. Auch bei den Sham-Gruppen, bei denen keine zerebrale Hypoperfusion erzeugt und damit kein Kollateralwachstum induziert wird, liegen die Werte etwa in diesem Bereich. Da zwischen den Ratten aufgrund der biologischen Varianz eine interindividuelle Streuung existiert, kann dies zwischen der mit Clopidogrel und der mit Kontrolllösung behandelten Gruppe nach drei Wochen auf der ipsilateralen Seite zu einem signifikanten Unterschied

führen. Dies beruht darauf, dass der PCA-Durchmesser der Kontrollgruppe im unteren Schwankungsbereich und der der Clopidogrel-Gruppe im oberen Schwankungsbereich liegt. Entscheidend ist jedoch, dass die Werte der Sham-Gruppen niemals die Durchmesser der jeweils gleichbehandelten 3-VO-Gruppen erreichen, sondern bei allen Zeitpunkten signifikant kleiner sind. Dadurch kann die durch 3-VO erreichte zerebrale Hypoperfusion eindeutig als der limitierende Faktor für das stattfindende Kollateralwachstum angesehen werden. Hinzu kommt, dass die Diameter auf der kontralateralen Seite, die sich ebenfalls alle im genannten Schwankungsbereich befinden, nach einer Woche ASS- und Clopidogrelbehandlung zwar signifikant größer sind gegenüber der Kontrollgruppe, aber nicht mehr nach drei Wochen. Da sich die Durchmesser aber nicht verkleinern, muss dies als Streuungsproblem vernachlässigt werden. Es fällt aber auf, dass sich die Schwankungen zwischen den verschiedenen Zeitpunkten nach 3-VO verringern, so dass zu vermuten ist, dass in allen Tieren durch den gemeinsamen Reiz des Gefäßverschlusses und das dadurch angeregte Kollateralwachstum die interindividuelle biologische Variabilität ausgeglichen wird.

Die bisher diskutierten Daten belegen keinen eindeutigen Einfluss von ASS und Clopidogrel auf die adaptive zerebrale Arteriogenese. Vielmehr wird anhand der Diameter eher der Eindruck erweckt, dass durch 3-VO zwar ein Reiz gesetzt wird, der aufgrund der zerebralen Minderperfusion das Kollateralwachstum anregt, allerdings unabhängig von der Behandlung mit ASS oder Clopidogrel.

4.3.2. Einfluss auf die Reagibilität

Der Einsatz von unterschiedlichen Pharmaka kann die vasodilatatorische Reaktionsfähigkeit beeinflussen. Im vorliegenden Fall sind jedoch nur bei der Messung der hämodynamischen Reservekapazität signifikante Unterschiede für ASS gefunden worden. Um auszuschließen, dass diese Reaktionen nicht dadurch bedingt sind, dass ASS eventuell die Fähigkeit der Gefäße zu dilatieren direkt beeinflusst, wurden zusätzliche Untersuchungen am 1-VO-Modell durchgeführt. Diese zeigten keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Pharmaka. Daher bleibt als letzte Schlussfolgerung, dass die für ASS gefundenen Unterschiede auf rheologischen Einflüssen beruhen. Da die Thrombozyten nach der Hemmung ihrer COX durch ASS nicht in der Lage sind, diese wieder neu zu bilden, reichen bereits Applikationen von 30-100 mg (Humandosis) täglich aus, um die Gerinnungsfähigkeit der Plättchen

längerfristig zu hemmen (Lüllmann, 2006). Genau diese Blutverdünnung ist die Voraussetzung für die Anwendung von ASS bei der Sekundärprophylaxe von vaskulären Ereignissen (CAPRIE-Steering-Committee, 1996; Diener et al., 2004). Die Beeinflussung der Durchblutung durch Behandlung mit ASS könnte die Ursache dafür sein, dass die Blutumverteilung durch das Steal-Phänomen verstärkt wird (Kuwabara et al., 1995). So dass die okkludierte Hemisphäre, welche aufgrund des gehemmten Kollateralwachstums keine vasodilatatorische Fähigkeit während der CVR aufweist, Blut zugunsten von der nichtokkludierten, also zur Vasodilatation fähigen Hemisphäre, abgibt.

4.3.3. Einfluss auf die therapeutisch induzierte Arteriogenese

Aufgrund der nicht eindeutigen Ergebnisse, ob ASS tatsächlich einen Einfluss auf die adaptive Arteriogenese ausübt, wurden zusätzlich Untersuchungen durchgeführt, die klären sollten, ob ASS Auswirkungen auf die mittels G-CSF therapeutisch induzierte Arteriogenese hat.

Dabei konnte bei den 3-VO-Gruppen gezeigt werden, dass sich die hämodynamische Reservekapazität in Kombinationstherapie aus ASS und G-CSF gegenüber der ASS-Monotherapie verbesserte ($p = 0.059$). Dennoch war sie signifikant schlechter als nach Kombinationstherapie aus Clopidogrel und G-CSF und nach Monotherapie mit G-CSF. Das heißt, dass ASS in der Kombinationstherapie die positiven Effekte von G-CSF signifikant gehemmt hat, während Clopidogrel diese Eigenschaften nicht aufwies.

Bei den PCA-Diametern der 3-VO-Gruppen wurden, wie auch bei den vorherigen Untersuchungen, vor allem auf der kontralateralen Seite signifikante Unterschiede gefunden. Sowohl nach ASS-Monotherapie als auch nach der Kombination aus ASS und G-CSF blieb der Diameter auf dieser Seite signifikant kleiner gegenüber der Monotherapie mit G-CSF. Während auf der ipsilateralen Seite nur ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Monotherapien aus ASS und G-CSF bestand. Dies bestätigt auch die Ergebnisse von der CVR, dass ASS die pro-arteriogenen Eigenschaften von G-CSF behindert.

Verwunderlich ist jedoch, dass die Kombination aus Clopidogrel und G-CSF, nicht aber die Clopidogrel-Monotherapie, auf der kontralateralen Seite zu einem signifikant kleineren

Diameter gegenüber der G-CSF-Monotherapie führte. Dies erscheint im Vergleich zur ipsilateralen Seite, wo keinerlei Unterschiede zwischen Clopidogrel und G-CSF in Mono- und Kombinationstherapien beobachtet wurden, nicht nachvollziehbar. Da Clopidogrel als Monotherapie nach einer Woche auf der ipsilateralen Seite einen signifikant größeren PCA-Durchmesser gegenüber der Kontrollgruppe aufweist und G-CSF auf beiden Seiten zu einem signifikant vergrößerten PCA-Durchmesser führt, beruht der signifikant geringere Durchmesser nach der Kombinationstherapie wahrscheinlich auf größerer Streuung innerhalb dieser Gruppe.

4.3.4. Schlussfolgerung

Fasst man nun die Daten der adaptiven und therapeutisch induzierten Arteriogenese zusammen, ergibt sich als Ergebnis die Aussage, dass ASS das Kollateralwachstum negativ beeinflusste, während Clopidogrel neutral reagierte. Speziell auf die adaptive Arteriogenese übte ASS zwar keinen signifikanten Einfluss auf die Diameter aus, so hemmte es aber die hämodynamische Reserve. Auch Höfer, der die Wirkungen von ASS und Clopidogrel auf die periphere adaptive Arteriogenese am Kaninchenhinterlauf untersuchte, beobachtete eine Hemmung der kollateralen Konduktanz, während die postmortem Angiogramme keine Unterschiede aufwiesen (Hoefer *et al.*, 2005a). Seine immunhistochemischen Untersuchungen ergaben allerdings, dass auf molekularer Ebene bereits massive Veränderungen stattgefunden hatten. Auch den vorliegenden Daten könnten bereits molekulare Einflüsse zugrunde liegen, die zwar im Kollateralwachstum noch nicht ersichtlich waren, sich aber im CBF bereits bemerkbar machten. Das Voranschreiten der Arteriogenese in seiner sehr frühen Phase kann mit der Diameterbestimmung nach Latexangiographie nicht erfasst werden (Hillmeister *et al.*, 2008). Selbst die Untersuchungen nach einer Woche versus drei Wochen zeigten lediglich das Voranschreiten der adaptiven Arteriogenese, aber keine Unterschiede durch die eingesetzten Pharmaka. Da die adaptive Arteriogenese jedoch recht langsam abläuft (Buschmann *et al.*, 2003a), wurde sie therapeutisch beschleunigt, so konnten Einflüsse von ASS auf den Prozess sichtbar gemacht werden.

Dabei waren Höfer *et al.* zwar die ersten, die die anti-arteriogenen Effekte von ASS gezeigt haben, allerdings ist ASS seit langem dafür bekannt, anti-inflammatorisch zu wirken, auch wenn der Mechanismus lange Zeit unklar war. Mehrere Möglichkeiten wurden dahingehend

untersucht. Diese Mechanismen könnten ebenfalls zu den Ergebnissen dieser geführt haben. Von großer Bedeutung für die Arteriogenese ist die Rolle der Monozyten (*Bergmann et al., 2006; Heil et al., 2002*), deren Chemotaxis (*Hascelik et al., 1994; Krumholz et al., 2000*) und Adhärenz (*Fricchione et al., 1998*) an das Endothel durch Aspirin gehemmt wird. So entdeckten Krumholz et al., dass nach Behandlung von Migräne mit unter anderem ASS die chemotaktische Wirkung auf Monozyten signifikant herabgesetzt war, wodurch die Hemmung von ASS auf die Arteriogenese erklärt werden könnte.

Während die gerinnungshemmenden Wirkungen von ASS über COX-1 vermittelt werden, führt die Acetylierung der COX-2 zur Bildung sogenannter Aspirin triggered epi-lipoxins (ATLs) (*Chiang et al., 2004*). Diese hemmen die Interaktion zwischen Leukozyten und dem Endothel (*Claria and Serhan, 1995*), indem sie die über die endotheliale Nitric oxide synthase (eNOS) und die in Endothelzellen und Leukozyten befindliche inducible Nitric oxide synthase (iNOS) vermittelte Bildung von Stickmonoxid (NO) steigern (*Paul-Clark et al., 2004*). Während Fiorucci *et al.* ebenfalls herausgefunden haben, dass die ATLs im Zusammenhang mit NO anti-adhäsiv wirken (*Fiorucci et al., 2004*), konnten Fricchione *et al.* zwar auch die Unterdrückung der Adhäsion von Monozyten und Granulozyten an das Endothel durch Aspirin beobachten, allerdings ohne erhöhte NO-Freisetzung (*Fricchione et al., 1998*). Die Rolle von eNOS und NO in der Arteriogenese ist jedoch umstritten. Zum einen ist eNOS nach arteriellem Gefäßverschluss in den sich regenerierenden und migrierenden Endothelzellen signifikant hochreguliert (*Poppa et al., 1998*). In eNOS-knockout-Mäusen wurde nach Femoralligatur gegenüber Kontrolltieren eine verschlechterte Durchblutung gemessen, die nach Applikation des NO-Donors SNAP wieder ausgeglichen werden konnte (*Scholz, 2004*). Durch Training konnte der NO-abhängige kollaterale Blutfluss nach arteriellem Gefäßverschluss sogar signifikant verbessert werden (*Yang et al., 2002*). Zum anderen aber wird auch beschrieben, dass eNOS während der Arteriogenese keine Rolle spielt (*Mees et al., 2007*), wodurch es schwierig ist, aus den vorliegenden Daten einen Zusammenhang zwischen ASS, eNOS und NO in der Arteriogenese zu ermitteln.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass ASS die Zell-Zell-Interaktion zwischen Monozyten und Endothelzellen unabhängig von seiner Wirkung auf COX-2 beeinflusst. Unter Einwirkung von Aspirin kommt es zur Hemmung der Bildung des Tumor necrosis factor (TNF-alpha) abhängigen Nuclear Factor κ -B (NFkappa-B) (*Weber et al., 1995*), was in der Folge wiederum durch Hemmung der Bildung des chemotaktischen Monocyte

chemoattractant proteins (MCP-1) die Monozyten-Adhäsion blockiert (*Grundmann et al., 2005*). Nach *Mehta et al.* wird dieser Prozess in Gang gesetzt, weil Aspirin die oxLDL vermittelte Expression des bereits beschriebenen LOX-1 Rezeptors auf Endothelzellen herabsetzt (*Mehta et al., 2004*).

Eisele et al. zeigen dagegen auf, dass Aspirin ähnlich wie Vitamin E und C durch seine antioxidative Wirkung in Endothelzellen die durch ROS gesteigerte Bildung der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 sowie von MCP-1 herabsetzt. Die dadurch gehemmte Monozyten-Endothelzell-Interaktion wurde bei Ibuprofen als reinem COX-Hemmer nicht beobachtet (*Eisele et al., 2004*).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass ASS in der Lage ist, in verschiedene Mechanismen, die in der Arteriogenese entscheidende Rollen für das Kollateralwachstum spielen, insbesondere die Chemotaxis und Adhäsion von Monozyten an das Endothel, hemmend einzuwirken. Daher kommen auf molekularer Ebene mehrere Möglichkeiten in Betracht, die zur Unterdrückung der Reservekapazität und des Gefäßwachstums durch ASS geführt haben können, während Clopidogrel keinen Einfluss ausübte. Zur Klärung dieser Mechanismen wären jedoch weitere molekulare Untersuchungen notwendig.

4.4. Nebeneffekte der Studie

Die intraoperative Überlebensrate im 3-VO-Modell lag bei 95 %. Dabei spielt die Wahl des Narkose-/Analgesieregimes eine entscheidende Rolle, sowohl für die Tierart als auch für das Untersuchungsziel. In einer parallel gelaufenen Studie konnte gezeigt werden, dass die Anwendung des Analgetikums Buprenorphin zur Isofluran-Inhalationsnarkose zwar die besten intraoperativen Überlebenschancen bietet, es aber in der postoperativen Phase durch Auslösung des Pica-Verhaltens zu erhöhten Sterbefällen kommt (*Duelsner et al., Manuskript wird eingereicht, 2009*). Während besonders die SD-Ratte dafür prädisponiert ist (*Takeda et al., 1993*), reicht bereits eine einmalige Applikation von 0,05mg/kg zur Auslösung des Syndroms aus (*Clark et al., 1997; Gades et al., 2001; Jacobson, 2000; Roughan and Flecknell, 2002; Thompson et al., 2004*). Hinzu kommt, dass die Arteriogenese als Untersuchungsgebiet mit ähnlichen Prozessen einhergeht wie Entzündungsreaktionen, was die Anwendung von Opioiden mit ihren anti-inflammatorischen Eigenschaften (*Hatsukari et*

al., 2006; Makman, 1994; Tubaro et al., 1983) hier als kontraindiziert angesehen werden musste. Die Rolle von nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAIDs) mit dem Prototyp ASS sollte in der vorliegenden Studie untersucht werden unter der Hypothese, dass es das Kollateralwachstum negativ beeinflusst, was deren Einsatz ebenfalls als kontraindiziert einstufte. Unter diesem Hintergrund wurde das hier angewandte Narkoseregime entwickelt. Derzeit sind zum einen weder Informationen über anti-inflammatorische Wirkungen von Ketamin, Xylazin oder dem Lokalanästhetikum Ropivacain bekannt, und zum anderen konnte die gesamte Überlebensrate intra- und bis 2 Tage postoperativ wesentlich erhöht werden (*Duelsner et al.*, Manuskript wird eingereicht, 2009).

Von den postoperativen Sterbefällen in der mit Clopidogrel behandelten 3-VO-Gruppe, lag bei zwei Tieren am OP-Folgetag eine Hemiparese vor. Dies scheinen aber unabhängig von der Clopidogrel-Behandlung, die zu diesem Zeitpunkt erst einmalig durchgeführt wurde, zwei der seltenen Fälle zu sein, bei denen die 3-VO zu Symptomen führt, die zum Schlaganfallgeschehen zählen (*Masuhr and Neumann, 2005*). Es ist bekannt, dass die längerfristige Behandlung von Clopidogrel zu verstärkten Durchfällen und Leibschmerzen führt (*Jones et al., 2004*). Da bei Tieren die erste Reaktion von Unwohlsein eine verringerte Futteraufnahme ist, kann dies auf Dauer zu Gewichtsverlusten führen und das Immunsystem schwächen, was zum einen die signifikant verringerte Gewichts Differenz gegenüber den anderen Gruppen und zum anderen das Auftreten der Dyspnoe in den mit Clopidogrel behandelten Gruppen erklärt. Dagegen sollen weder Clopidogrel noch ASS eine erhöhte Inzidenz haben, Dyspnoe direkt auszulösen (*Serebruany et al., 2008*). Gewichtsverluste ab 20 % und/oder das Auftreten von Dyspnoe wurden im Tierversuchsantrag als Abbruchskriterien angegeben, daher wurden solche Tiere tierschutzgerecht schmerzlos getötet.

Der Einfluss unterschiedlicher Vehikel auf die Mortalität, wie er nach MCAO beschrieben wurde (*Wengenmayer et al., 2008*), wird hier jedoch ausgeschlossen. Die Medikamente ASS und Clopidogrel wurden in Trinkwasser gelöst, welches dadurch allen Tieren, auch den Kontrollgruppen als Kontrolllösung über Gavage verabreicht wurde. Ein Einfluss des reinen Trinkwassers hätte Auswirkungen auf die Mortalität aller Gruppen haben müssen. Ebenso wurden im Rahmen der therapeutischen Arteriogenese die Gruppen entweder mit in Glucose gelöstem G-CSF oder mit reiner Glucose als Kontrolllösung behandelt. Da es hier nur zu einem einzigen Todesfall in einer Gruppe kam, während dies bei allen anderen Gruppen nicht beobachtet wurde, wird auch der Einfluss von Glucose ausgeschlossen.

4.5. Übertragbarkeit der Daten in die Klinik

Neben akuten Auslösern wie Embolien sind längerfristige Ursachen von zerebrovaskulären Ereignissen Stenosen, die oftmals durch atherosklerotische Veränderungen der Gefäßwand in Form sogenannter Plaques aufgrund von Grunderkrankungen wie unter anderem Bluthochdruck und Diabetes entstehen (*Kim et al., 2008; Niizuma et al., 2008; Vicenzini et al., 2008*). Diese Stenosen können zunächst jedoch asymptomatisch sein. Der Zustand der progredienten zerebralen Minderperfusion wird in der vorliegenden Arbeit anhand des 3-VO-Modells simuliert, bei dem Symptome, die auf neurologische Störungen hinweisen würden, ausbleiben. Die Verbesserung der Blutversorgung durch Kollateralwachstum, um zerebrovaskulären Ereignissen vorzubeugen, ist zeitlich nur durch die therapeutische Beschleunigung der Arteriogenese zu erreichen (*Schneeloch et al., 2004*).

Obwohl sowohl GM-CSF als auch G-CSF als Therapeutika bei Leukopenien eingesetzt werden (*Steward, 1993*), scheint die Anwendung von GM-CSF am Menschen wegen der erhöhten Nebenwirkungsraten fragwürdig (*van Royen et al., 2005*). Das im Rahmen der vorliegenden Studie eingesetzte G-CSF zeigte dasselbe Potential, Kollateralwachstum zu fördern und damit die hämodynamische Reserve zu verbessern wie GM-CSF. Dies führt zu dem Schluss, dass G-CSF auch in einer klinischen Studie dahingehend getestet werden sollte, ob der therapeutische Nutzen für die Arteriogenese und damit die Prävention von zerebrovaskulären Ereignissen gegenüber eventuellen Nebenwirkungen überlegen ist, was dessen klinischen Einsatz dann rechtfertigen würde.

Dagegen wird ASS bereits allein oder in Kombination mit Clopidogrel zur Sekundärprävention kardiovaskulärer Ereignisse eingesetzt (*Chiang et al., 2004; Cornett et al., 2008; Diener et al., 2007; Hart et al., 2008; Helgason et al., 2008*). Nach den Vorgaben der klinischen Anwendung von 100 mg/kg ASS pro Tag führte diese Dosierung beim Simulationsmodell 3-VO in der vorliegenden Studie zur Hemmung der hämodynamischen Reservekapazität. Die zusätzliche Behandlung mit G-CSF zeigte auf, dass ASS die therapeutisch induzierte Arteriogenese hemmt, während Clopidogrel keinen Einfluss ausübte. Diese Effekte könnten beim Menschen dafür Sorge tragen, dass ein Schlaganfall bereits wesentlich früher oder überhaupt erst auftritt durch die tägliche präventive Einnahme von ASS. Eine ähnliche klinische Studie, wie sie bei PAD-Patienten durchgeführt wird (*Singer et al., 2006*), ist auch für die Untersuchung von ASS auf die zerebrale Arteriogenese von großer

Bedeutung. Da die Hemmung der Arteriogenese durch ASS besonders nach therapeutischer Stimulation auftritt, bestünde die Gefahr, dass auch Menschen, denen G-CSF als proarteriogene Substanz und gleichzeitig ASS zur Sekundärprävention verabreicht werden, im Kollateralwachstum benachteiligt wären. Daher sollte der Einfluss von ASS auf das zerebrale Kollateralwachstum auch in einer klinischen Studie untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Auswirkungen von Acetylsalicylsäure und Clopidogrel auf das Kollateralgefäßwachstum im zerebralen Arteriogenesemodell der Ratte

Hintergrund - Zerebrovaskuläre Erkrankungen sind weltweit die zweithäufigsten Todesursachen. Acetylsalicylsäure (ASS) und Clopidogrel finden als Mono- oder Kombinationstherapien routinemäßigen Einsatz im Rahmen der Sekundärprävention. In dieser Studie wurden die Auswirkungen der anti-inflammatorischen Wirkungen von ASS gegenüber Clopidogrel auf die zerebrale Arteriogenese untersucht.

Methoden - Im ersten Teil der Studie, der Untersuchung der Effekte auf das natürliche Kollateralwachstum, wurde bei Sprague Dawley-Ratten die 3-VO-Methode durchgeführt, bei der beide Vertebralarterien und die linke Arteria carotis communis verschlossen werden. Die Tiere wurden dann für 7 oder 21 Tage entweder mit Trinkwasser als Kontrolllösung, ASS oder Clopidogrel behandelt. Im zweiten Teil wurde das Kollateralwachstum durch Gabe des Granulocyte Colony-Stimulating Factors (G-CSF) über eine Woche therapeutisch induziert. Gleichzeitig erfolgte die Behandlung mit Trinkwasser, ASS und Clopidogrel. Nach ein oder drei Wochen wurden jeweils entweder eine zerebrovaskuläre Reaktion oder eine postmortem Latexangiographie zur Bestimmung der Gefäßdurchmesser durchgeführt.

Ergebnisse - Während die PCA-Diameter sowohl nach einer als auch nach drei Wochen nach 3-VO unter ASS- oder Clopidogrel-Behandlung keinen Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe zeigten, war die hämodynamische Reserve unter ASS zu beiden Zeitpunkten aufgehoben. Der kombinierte Einsatz von ASS und G-CSF verbesserte die Reserve zwar, dennoch blieb sie signifikant schlechter gegenüber der Kombination aus Clopidogrel und G-CSF sowie der Monotherapie mit G-CSF. Die Diameter zeigten nach der Kombination aus ASS und G-CSF keinen Unterschied gegenüber der ASS-Monotherapie und blieben damit bedeutend kleiner gegenüber der G-CSF-Monotherapie.

Schlussfolgerung - Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass ASS das zerebrale Kollateralwachstum und die hämodynamische Reserve nach therapeutischer Induktion durch G-CSF hemmte, während Clopidogrel dies nicht beeinflusste. Diese Daten haben eine herausragende klinische Bedeutung für deren Einsatz in der Sekundärprävention zerebrovaskulärer Erkrankungen.

6. Summary

Effects of Acetylsalicyl Acid and Clopidogrel on Collateral Growth in the Hypoperfused Rat Brain Model

Background and Purpose – Ischemic heart diseases and cerebrovascular diseases are the leading causes of death worldwide (WHO). Acetylsalicyl acid (ASA) and clopidogrel are well-used in the secondary prevention in their combination or alone. Because of their anti-inflammatory effects ASA inhibits peripheral arteriogenesis, whereas clopidogrel had neutral effects. In this study we investigated the effects of ASA and clopidogrel on adaptive and therapeutically induced cerebral arteriogenesis.

Methods – For the first part of the study, the evaluation of the effects on adaptive cerebral arteriogenesis, male Sprague Dawley rats underwent 3-VO surgery, the occlusion of both vertebral arteries and the left common carotid artery, and were treated with either drinking water, ASA or clopidogrel for 7 or 21 days. For evaluation of the effects on therapeutically induced arteriogenesis rats received Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) every other day for one week in addition to drinking water, ASA or clopidogrel. After one or three weeks rats underwent cerebrovascular reactivity or post-mortem latexangiography.

Results – One as well as three weeks after 3-VO PCA diameters were significantly increased compared to untreated rats, but no differences were found in ASA or clopidogrel treated animals compared to 3-VO controls. Hemodynamic reserve capacity was completely abolished at one and three weeks after 3-VO by ASA.

The reserve capacity was improved after treatment combined with ASA and G-CSF, but was still significantly decreased compared to the combination of clopidogrel and G-CSF and the single treatment with G-CSF. The diameters were not different after combined treatment with ASA and G-CSF compared to ASA alone and still smaller compared to the G-CSF single treatment.

Conclusions – In this study it was shown, that ASA, but not Clopidogrel inhibited collateral growth and hemodynamic reserve capacity after therapeutically induction with G-CSF. These results of the pro-arteriogenic G-CSF as well as the anti-arteriogenic ASA are eminent for their clinical application in the secondary prevention of cerebrovascular events.

7. Zitierte Literatur

(NINDS), N.I.o.N.D.a.S., 1996. National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS). Proceedings of a National Symposium on Rapid Identification and Treatment of Acute Stroke.

http://www.ninds.nih.gov/news_and_events/proceedings/stroke_proceedings/recs-acute.htm.

Aapro, M.S., Cameron, D.A., Pettengell, R., Bohlius, J., Crawford, J., Ellis, M., Kearney, N., Lyman, G.H., Tjan-Heijnen, V.C., Walewski, J., Weber, D.C., Zielinski, C., 2006. EORTC guidelines for the use of granulocyte-colony stimulating factor to reduce the incidence of chemotherapy-induced febrile neutropenia in adult patients with lymphomas and solid tumours. *Eur J Cancer*. 42, 2433-53.

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

Barreda, D.R., Hanington, P.C., Belosevic, M., 2004. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev Comp Immunol*. 28, 509-54.

Bergmann, C.E., Hofer, I.E., Meder, B., Roth, H., van Royen, N., Breit, S.M., Jost, M.M., Aharinejad, S., Hartmann, S., Buschmann, I.R., 2006. Arteriogenesis depends on circulating monocytes and macrophage accumulation and is severely depressed in op/op mice. *J Leukoc Biol*. 80, 59-65.

Boneberg, E.M., Hareng, L., Gantner, F., Wendel, A., Hartung, T., 2000. Human monocytes express functional receptors for granulocyte colony-stimulating factor that mediate suppression of monokines and interferon-gamma. *Blood*. 95, 270-6.

Botting, R.M., 2006. Inhibitors of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses. *J Physiol Pharmacol*. 57 Suppl 5, 113-24.

Busch, H.J., Buschmann, I.R., Mies, G., Bode, C., Hossmann, K.A., 2003. Arteriogenesis in hypoperfused rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 23, 621-8.

Busch, H.J., Buschmann, I., Schneeloch, E., Bode, C., Mies, G., Hossmann, K.A., 2006. [Therapeutically induced arteriogenesis in the brain. A new approach for the prevention of cerebral ischemia with vascular stenosis]. *Nervenarzt*. 77, 215-20.

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

Buschmann, I., Schaper, W., 2000. The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis). *J Pathol*. 190, 338-42.

- Buschmann, I.R., Hoefler, I.E., van Royen, N., Katzer, E., Braun-Dulleaus, R., Heil, M., Kostin, S., Bode, C., Schaper, W., 2001. GM-CSF: a strong arteriogenic factor acting by amplification of monocyte function. *Atherosclerosis*. 159, 343-56.
- Buschmann, I.R., Busch, H.J., Mies, G., Hossmann, K.A., 2003a. Therapeutic induction of arteriogenesis in hypoperfused rat brain via granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Circulation*. 108, 610-5.
- Buschmann, I.R., Voskuil, M., van Royen, N., Hoefler, I.E., Scheffler, K., Grundmann, S., Hennig, J., Schaper, W., Bode, C., Piek, J.J., 2003b. Invasive and non-invasive evaluation of spontaneous arteriogenesis in a novel porcine model for peripheral arterial obstructive disease. *Atherosclerosis*. 167, 33-43.
- Buschmann, I.R., Hoefler, I.E., 2004. All arteriogenesis is local? Home boys versus the newcomers. *Circ Res*. 95, e72.
- Cai, W.J., Koltai, S., Kocsis, E., Scholz, D., Kostin, S., Luo, X., Schaper, W., Schaper, J., 2003. Remodeling of the adventitia during coronary arteriogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 284, H31-40.
- CAPRIE-Steering-Committee, 1996. CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet*. 348, 1329-39.
- Carmeliet, P., 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 6, 389-95.
- Cattaneo, M., 2004. Aspirin and clopidogrel: efficacy, safety, and the issue of drug resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 24, 1980-7.
- Chandrasekharan, N.V., Dai, H., Roos, K.L., Evanson, N.K., Tomsik, J., Elton, T.S., Simmons, D.L., 2002. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99, 13926-31.
- Chiang, N., Bermudez, E.A., Ridker, P.M., Hurwitz, S., Serhan, C.N., 2004. Aspirin triggers antiinflammatory 15-epi-lipoxin A4 and inhibits thromboxane in a randomized human trial. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101, 15178-83.
- Claria, J., Serhan, C.N., 1995. Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92, 9475-9.
- Clark, J.A., Jr., Myers, P.H., Goelz, M.F., Thigpen, J.E., Forsythe, D.B., 1997. Pica behavior associated with buprenorphine administration in the rat. *Lab Anim Sci*. 47, 300-3.
- Cornett, O., Ocava, L.C., Singh, M., Malhotra, S., Rosenbaum, D.M., 2008. Antithrombotic and thrombolytic therapy for ischemic stroke. *Cardiol Clin*. 26, 251-65, vii.

- Coyle, P., Jokelainen, P.T., 1982. Dorsal cerebral arterial collaterals of the rat. *Anat Rec.* 203, 397-404.
- Coyle, P., 1984. Diameter and length changes in cerebral collaterals after middle cerebral artery occlusion in the young rat. *Anat Rec.* 210, 357-64.
- Coyle, P., Panzenbeck, M.J., 1990. Collateral development after carotid artery occlusion in Fischer 344 rats. *Stroke.* 21, 316-21.
- Deindl, E., Buschmann, I., Hoefler, I.E., Podzuweit, T., Boengler, K., Vogel, S., van Royen, N., Fernandez, B., Schaper, W., 2001. Role of ischemia and of hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit. *Circ Res.* 89, 779-86.
- Deindl, E., Zaruba, M.M., Brunner, S., Huber, B., Mehl, U., Assmann, G., Hoefler, I.E., Mueller-Hoecker, J., Franz, W.M., 2006. G-CSF administration after myocardial infarction in mice attenuates late ischemic cardiomyopathy by enhanced arteriogenesis. *Faseb J.* 20, 956-8.
- Delank, H.-W., Gehlen, W., 2006. *Neurologie.* Georg Thieme Verlag Stuttgart*New York. 11. Auflage.
- Demolis, P., Florence, G., Thomas, L., Tran Dinh, Y.R., Giudicelli, J.F., Seylaz, J., Alkayed, N.J., 2000. Is the acetazolamide test valid for quantitative assessment of maximal cerebral autoregulatory vasodilation? An experimental study. *Stroke.* 31, 508-15.
- Department of Health and Human Services, F.a.D.A., 1998. Internal analgesic, antipyretic, and antirheumatic drug products for over-the counter human use. Final rule for professional labeling of aspirin, buffered aspirin and aspirin in combination with antacid drug products. Federal register 63, 56802-56819.
- Diener, H.C., Bogousslavsky, J., Brass, L.M., Cimminiello, C., Csiba, L., Kaste, M., Leys, D., Matias-Guiu, J., Rupprecht, H.J., 2004. Aspirin and clopidogrel compared with clopidogrel alone after recent ischaemic stroke or transient ischaemic attack in high-risk patients (MATCH): randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 364, 331-7.
- Diener, H.C., (DGN), D.G.f.N., 2005a. Deutsche Gesellschaft für Neurologie. Primär- und Sekundärprävention der zerebralen Ischämie in Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart. 3. Auflage.
- Diener, H.C., (DGN), D.G.f.N., 2005b. Deutsche Gesellschaft für Neurologie. Ischämischer Schlaganfall: Akuttherapie in Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart. 3. Auflage.
- Diener, H.C., Weimar, C., 2006. News in Stroke Prevention and Treatment (2006). *Akt Neurol,* Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York. 33, 533-537.

- Diener, H.C., Allenberg, J.R., Bode, C., Busse, O., Forsting, M., Grau, A.J., Hennerici, M., Grond, M., Haberl, R.L., Hamann, G.F., Ringelstein, E.B., Ringleb, P.A., 2007. Recommendations of the German Neurological Society and the German Stroke Society for Primary and Secondary Stroke Prevention: Update 2007. *Akt Neurol*, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York. 34, 8-12.
- Eisele, G., Schwedhelm, E., Schieffer, B., Tsikas, D., Boger, R.H., 2004. Acetylsalicylic acid inhibits monocyte adhesion to endothelial cells by an antioxidative mechanism. *J Cardiovasc Pharmacol*. 43, 514-21.
- Eitenmuller, I., Volger, O., Kluge, A., Troidl, K., Barancik, M., Cai, W.J., Heil, M., Pipp, F., Fischer, S., Horrevoets, A.J., Schmitz-Rixen, T., Schaper, W., 2006. The range of adaptation by collateral vessels after femoral artery occlusion. *Circ Res*. 99, 656-62.
- Fabricius, M., Lauritzen, M., 1996. Laser-Doppler evaluation of rat brain microcirculation: comparison with the [14C]-iodoantipyrine method suggests discordance during cerebral blood flow increases. *J Cereb Blood Flow Metab*. 16, 156-61.
- Fiorucci, S., Distrutti, E., Mencarelli, A., Rizzo, G., Lorenzo, A.R., Baldoni, M., Del Soldato, P., Morelli, A., Wallace, J.L., 2004. Cooperation between aspirin-triggered lipoxin and nitric oxide (NO) mediates antiadhesive properties of 2-(Acetyloxy)benzoic acid 3-(nitrooxymethyl)phenyl ester (NCX-4016) (NO-aspirin) on neutrophil-endothelial cell adherence. *J Pharmacol Exp Ther*. 309, 1174-82.
- Folkman, J., 1995. The influence of angiogenesis research on management of patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 36, 109-18.
- Franco Folino, A., 2007. Cerebral autoregulation and syncope. *Prog Cardiovasc Dis*. 50, 49-80.
- Fricchione, G.L., Bilfinger, T.V., Stefano, G.B., 1998. Aspirin inhibits granulocyte and monocyte adherence to saphenous vein endothelia in a process not mediated by nitric oxide. *Int J Cardiol*. 64 Suppl 1, S29-33.
- Gades, N.M., Wixson, S.K., Danneman, P.J., Tolley, E.A., 2001. Inefficacy of buprenorphine in rats. *Contemp Top Lab Anim Sci*. 40, 7.
- Grundmann, S., Hofer, I., Ulusans, S., van Royen, N., Schirmer, S.H., Ozaki, C.K., Bode, C., Piek, J.J., Buschmann, I., 2005. Anti-tumor necrosis factor- α therapies attenuate adaptive arteriogenesis in the rabbit. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 289, H1497-505.
- Grundmann, S., Hofer, I., Ulusans, S., Bode, C., Oesterle, S., Tijssen, J.G., Piek, J.J., Buschmann, I., van Royen, N., 2006. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates arteriogenesis in a pig model of peripheral artery disease using clinically applicable infusion pumps. *J Vasc Surg*. 43, 1263-9.
- Hart, R.G., Bhatt, D.L., Hacke, W., Fox, K.A., Hankey, G.J., Berger, P.B., Hu, T., Topol, E.J., 2008. Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of stroke in

- patients with a history of atrial fibrillation: subgroup analysis of the CHARISMA randomized trial. *Cerebrovasc Dis.* 25, 344-7.
- Hascelik, G., Sener, B., Hascelik, Z., 1994. Effect of some anti-inflammatory drugs on human neutrophil chemotaxis. *J Int Med Res.* 22, 100-6.
- Hatsukari, I., Hitosugi, N., Dinda, A., Singhal, P.C., 2006. Morphine modulates monocyte-macrophage conversion phase. *Cell Immunol.* 239, 41-8.
- Heil, M., Ziegelhoeffer, T., Pipp, F., Kostin, S., Martin, S., Clauss, M., Schaper, W., 2002. Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 283, H2411-9.
- Heil, M., Deindl, E., 2004. *Monocytes and Cytokines in: Arteriogenesis by Schaper & Schaper.* Kluwer Academic Publishers Group. 131-57.
- Heil, M., Eitenmuller, I., Schmitz-Rixen, T., Schaper, W., 2006. Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. *J Cell Mol Med.* 10, 45-55.
- Helgason, C.M., Grossi, E., Pandey, D., Valika, A., Cursio, J., Brace, L.D., 2008. Platelet aggregation and recruitment with aspirin-clopidogrel therapy. *Cerebrovasc Dis.* 25, 392-400.
- Helisch, A., Ware, J.A., 1999. Therapeutic angiogenesis in ischemic heart disease. *Thromb Haemost.* 82, 772-80.
- Helisch, A., Schaper, W., 2000. Angiogenesis and arteriogenesis--not yet for prescription. *Z Kardiol.* 89, 239-44.
- Hendrikse, J., Hartkamp, M.J., Hillen, B., Mali, W.P., van der Grond, J., 2001. Collateral ability of the circle of Willis in patients with unilateral internal carotid artery occlusion: border zone infarcts and clinical symptoms. *Stroke.* 32, 2768-73.
- Hillmeister, P., Lehmann, K.E., Bondke, A., Witt, H., Duelsner, A., Gruber, C., Busch, H.J., Jankowski, J., Ruiz-Noppinger, P., Hossmann, K.A., Buschmann, I.R., 2008. Induction of cerebral arteriogenesis leads to early-phase expression of protease inhibitors in growing collaterals of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 28, 1811-23.
- Hoefler, I.E., van Royen, N., Buschmann, I.R., Piek, J.J., Schaper, W., 2001. Time course of arteriogenesis following femoral artery occlusion in the rabbit. *Cardiovasc Res.* 49, 609-17.
- Hoefler, I.E., van Royen, N., Rectenwald, J.E., Deindl, E., Hua, J., Jost, M., Grundmann, S., Voskuil, M., Ozaki, C.K., Piek, J.J., Buschmann, I.R., 2004. Arteriogenesis proceeds via ICAM-1/Mac-1- mediated mechanisms. *Circ Res.* 94, 1179-85.
- Hoefler, I.E., Grundmann, S., Schirmer, S., van Royen, N., Meder, B., Bode, C., Piek, J.J., Buschmann, I.R., 2005a. Aspirin, but not clopidogrel, reduces collateral conductance in a rabbit model of femoral artery occlusion. *J Am Coll Cardiol.* 46, 994-1001.

- Hoefler, I.E., Grundmann, S., van Royen, N., Voskuil, M., Schirmer, S.H., Ulusans, S., Bode, C., Buschmann, I.R., Piek, J.J., 2005b. Leukocyte subpopulations and arteriogenesis: specific role of monocytes, lymphocytes and granulocytes. *Atherosclerosis*. 181, 285-93.
- Hoefler, I.E., van Royen, N., Jost, M.M., 2006. Experimental models of arteriogenesis: differences and implications. *Lab Anim (NY)*. 35, 36-44.
- Hossmann, K.A., 1994. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol*. 36, 557-65.
- Hossmann, K.A., Buschmann, I.R., 2005. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as an arteriogenic factor in the treatment of ischaemic stroke. *Expert Opin Biol Ther*. 5, 1547-56.
- Hossmann, K.A., 2006. Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell Mol Neurobiol*. 26, 1057-83.
- Ito, W.D., Arras, M., Winkler, B., Scholz, D., Schaper, J., Schaper, W., 1997. Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ Res*. 80, 829-37.
- Jacobson, C., 2000. Adverse effects on growth rates in rats caused by buprenorphine administration. *Lab Anim*. 34, 202-6.
- Jones, L., Griffin, S., Palmer, S., Main, C., Orton, V., Sculpher, M., Sudlow, C., Henderson, R., Hawkins, N., Riemsma, R., 2004. Clinical effectiveness and cost-effectiveness of clopidogrel and modified-release dipyridamole in the secondary prevention of occlusive vascular events: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess*. 8, iii-iv, 1-196.
- Kablak-Ziembicka, A., Przewlocki, T., Pieniazek, P., Musialek, P., Motyl, R., Rudko, R., Tracz, W., 2005. Evaluation of cerebral circulation in patients with significant carotid artery stenosis. *Kardiol Pol*. 63, 381-9; discussion 390.
- Kappeler, L., Keserue, B., Fischer, U., Mattle, HP, 2005. Medikamentöse Massnahmen bei der Betreuung zerebrovaskulärer Patienten - Drugs to prevent ischaemic stroke. *Kardiovaskuläre Medizin*. 8, 279-289.
- Karow, T., Lang-Roth, R., 2005. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 13. Auflage.
- Kawata, Y., Sako, K., Yonemasu, Y., 1996. Sequential changes in cerebrovascular reserve capacity in three-vessel occlusion rats. *Brain Res*. 739, 330-4.
- Kim, H.J., Yun, S.C., Cho, K.H., Cho, A.H., Kwon, S.U., Kim, J.S., Kang, D.W., 2008. Differential patterns of evolution in acute middle cerebral artery infarction with perfusion-diffusion mismatch: Atherosclerotic vs. cardioembolic occlusion. *J Neurol Sci*.

- Krumholz, W., Szalay, G., Ogal, H., Menges, T., 2000. [Effect of migraine medications on monocyte chemotaxis]. *Anaesthesiol Reanim.* 25, 102-4.
- Kuwabara, Y., Ichiya, Y., Sasaki, M., Yoshida, T., Masuda, K., 1995. Time dependency of the acetazolamide effect on cerebral hemodynamics in patients with chronic occlusive cerebral arteries. Early steal phenomenon demonstrated by [¹⁵O]H₂O positron emission tomography. *Stroke.* 26, 1825-9.
- Lee, R.M., 1995. Morphology of cerebral arteries. *Pharmacol Ther.* 66, 149-73.
- Lehmann, K., Buschmann, I, 2005. Therapeutic angiogenesis and arteriogenesis in vascular artery diseases. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms.* 2, 55-63.
- Lemmer, B., Burne, K., 2007. *Pharmakotherapie - Klinische Pharmakologie.* Springer Medizin Verlag Heidelberg. 13. Auflage.
- Li, D., Mehta, J.L., 2000. Antisense to LOX-1 inhibits oxidized LDL-mediated upregulation of monocyte chemoattractant protein-1 and monocyte adhesion to human coronary artery endothelial cells. *Circulation.* 101, 2889-95.
- Li, D., Williams, V., Liu, L., Chen, H., Sawamura, T., Romeo, F., Mehta, J.L., 2003. Expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptors during ischemia-reperfusion and its role in determination of apoptosis and left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 41, 1048-55.
- Lieschke, G.J., Grail, D., Hodgson, G., Metcalf, D., Stanley, E., Cheers, C., Fowler, K.J., Basu, S., Zhan, Y.F., Dunn, A.R., 1994. Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood.* 84, 1737-46.
- Löscher, W., Ungemach, F.R., Kroker, R., 1998. *Pharmakotherapie bei Haustieren und Nutztieren.* Blackwell Wissenschafts-Verlag. 3.Auflage.
- Lower, R., 1669. *Tractus de Corde.* Elsevier, Amsterdam.
- Lüllmann, H., Mohr, K., Hein, L., 2006. *Pharmakologie und Toxikologie.* Georg Thieme Verlag Stuttgart. 16. Auflage.
- Makman, M.H., 1994. Morphine receptors in immunocytes and neurons. *Adv Neuroimmunol.* 4, 69-82.
- Marino, V.J., Roguin, L.P., 2008. The granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) activates Jak/STAT and MAPK pathways in a trophoblastic cell line. *J Cell Biochem.* 103, 1512-23.
- Masuhr, K., Neumann, M., 2005. *Neurologie.* Georg Thieme Verlag Stuttgart. 5. Auflage.

- Mees, B., Wagner, S., Ninci, E., Tribulova, S., Martin, S., van Haperen, R., Kostin, S., Heil, M., de Crom, R., Schaper, W., 2007. Endothelial nitric oxide synthase activity is essential for vasodilation during blood flow recovery but not for arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27, 1926-33.
- Mehta, J.L., Chen, J., Yu, F., Li, D.Y., 2004. Aspirin inhibits ox-LDL-mediated LOX-1 expression and metalloproteinase-1 in human coronary endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 64, 243-9.
- Murase, T., Kume, N., Korenaga, R., Ando, J., Sawamura, T., Masaki, T., Kita, T., 1998. Fluid shear stress transcriptionally induces lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells. *Circ Res.* 83, 328-33.
- Nagel, T., Resnick, N., Atkinson, W.J., Dewey, C.F., Jr., Gimbrone, M.A., Jr., 1994. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest.* 94, 885-91.
- Nakagawa, T., Suga, S., Kawase, T., Toda, M., 2006. Intracarotid injection of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces neuroprotection in a rat transient middle cerebral artery occlusion model. *Brain Res.* 1089, 179-85.
- Niizuma, K., Shimizu, H., Takada, S., Tominaga, T., 2008. Middle cerebral artery plaque imaging using 3-Tesla high-resolution MRI. *J Clin Neurosci.*
- Ohsaka, A., Saionji, K., Kuwaki, T., Takeshima, T., Igari, J., 1995. Granulocyte colony-stimulating factor administration modulates the surface expression of effector cell molecules on human monocytes. *Br J Haematol.* 89, 465-72.
- Paul-Clark, M.J., Van Cao, T., Moradi-Bidhendi, N., Cooper, D., Gilroy, D.W., 2004. 15-epi-lipoxin A4-mediated induction of nitric oxide explains how aspirin inhibits acute inflammation. *J Exp Med.* 200, 69-78.
- Piegras, 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, 1306-11.
- Pipp, F., Heil, M., Issbrucker, K., Ziegelhoeffer, T., Martin, S., van den Heuvel, J., Weich, H., Fernandez, B., Golomb, G., Carmeliet, P., Schaper, W., Clauss, M., 2003. VEGFR-1-selective VEGF homologue PlGF is arteriogenic: evidence for a monocyte-mediated mechanism. *Circ Res.* 92, 378-85.
- Poeck, H., Hacke, W., 2006. *Neurologie.* Springer Medizin Verlag. 12. Auflage.
- Poppa, V., Miyashiro, J.K., Corson, M.A., Berk, B.C., 1998. Endothelial NO synthase is increased in regenerating endothelium after denuding injury of the rat aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18, 1312-21.
- Risau, W., 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 386, 671-4.

- Roughan, J.V., Flecknell, P.A., 2002. Buprenorphine: a reappraisal of its antinociceptive effects and therapeutic use in alleviating post-operative pain in animals. *Lab Anim.* 36, 322-43.
- Samandari, F., Mai, J.K., 1995. Curriculum Funktionelle Anatomie 2 für Zahnmediziner. Nervensysteme, Sinnesorgane, Hirn- und Rückenmarkshäute, Gefäßversorgung. Quintessenz Verlags-GmbH.
- Sampath, R., Kukielka, G.L., Smith, C.W., Eskin, S.G., McIntire, L.V., 1995. Shear stress-mediated changes in the expression of leukocyte adhesion receptors on human umbilical vein endothelial cells in vitro. *Ann Biomed Eng.* 23, 247-56.
- Schaper, W., Ito, W.D., 1996. Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circ Res.* 79, 911-9.
- Schaper, W., Buschmann, I., 1999. Arteriogenesis, the good and bad of it. *Eur Heart J.* 20, 1297-9.
- Schneeloch, E., Mies, G., Busch, H.J., Buschmann, I.R., Hossmann, K.A., 2004. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced arteriogenesis reduces energy failure in hemodynamic stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 12730-5.
- Schneider, U.C., Schilling, L., Schroeck, H., Nebe, C.T., Vajkoczy, P., Woitzik, J., 2007. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced vessel growth restores cerebral blood supply after bilateral carotid artery occlusion. *Stroke.* 38, 1320-8.
- Scholz, D., Elsaesser, H., Sauer, A., Friedrich, C., Luttun, A., Carmeliet, P., Schaper, W., 2003. Bone marrow transplantation abolishes inhibition of arteriogenesis in placenta growth factor (PlGF) $-/-$ mice. *J Mol Cell Cardiol.* 35, 177-84.
- Scholz, D., 2004. The role of NO in: Arteriogenesis by Schaper & Schaper. Kluwer Academic Publishers Group. 90-95.
- Seiler, C., Pohl, T., Wustmann, K., Hutter, D., Nicolet, P.A., Windecker, S., Eberli, F.R., Meier, B., 2001. Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Circulation.* 104, 2012-7.
- Serebruany, V., Pokov, I., Kulickowski, W., Vahabi, J., Atar, D., 2008. Incidence and causes of new-onset dyspnea in 3,719 patients treated with clopidogrel and aspirin combination after coronary stenting. *Thromb Haemost.* 100, 314-8.
- Singer, E., Imfeld, S., Hoffmann, U., Buschmann, I., Labs, K.H., Jaeger, K.A., 2006. Aspirin in peripheral arterial disease: breakthrough or pitfall? *Vasa.* 35, 174-7.
- Steward, W.P., 1993. Granulocyte and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Lancet.* 342, 153-7.
- Stoll, M., Hamann, G.F., 2002. [Cerebrovascular reserve capacity]. *Nervenarzt.* 73, 711-8.

- Symon, L., Branston, N.M., Strong, A.J., Hope, T.D., 1977. The concepts of thresholds of ischaemia in relation to brain structure and function. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)*. 11, 149-54.
- Takeda, N., Hasegawa, S., Morita, M., Matsunaga, T., 1993. Pica in rats is analogous to emesis: an animal model in emesis research. *Pharmacol Biochem Behav*. 45, 817-21.
- Thompson, A.C., Kristal, M.B., Sallaj, A., Acheson, A., Martin, L.B., Martin, T., 2004. Analgesic efficacy of orally administered buprenorphine in rats: methodologic considerations. *Comp Med*. 54, 293-300.
- Todo, K., Kitagawa, K., Sasaki, T., Omura-Matsuoka, E., Terasaki, Y., Oyama, N., Yagita, Y., Hori, M., 2008. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances leptomeningeal collateral growth induced by common carotid artery occlusion. *Stroke*. 39, 1875-82.
- Tubaro, E., Borelli, G., Croce, C., Cavallo, G., Santiangeli, C., 1983. Effect of morphine on resistance to infection. *J Infect Dis*. 148, 656-66.
- Ujihara, M., Nomura, K., Yamada, O., Shibata, N., Kobayashi, M., Takano, K., 2001. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ensures macrophage survival and generation of the superoxide anion: a study using a monocytic-differentiated HL60 subline. *Free Radic Biol Med*. 31, 1396-404.
- Valdembri, D., Serini, G., Vacca, A., Ribatti, D., Bussolino, F., 2002. In vivo activation of JAK2/STAT-3 pathway during angiogenesis induced by GM-CSF. *Faseb J*. 16, 225-7.
- van Royen, N., Hoefler, I., Buschmann, I., Heil, M., Kostin, S., Deindl, E., Vogel, S., Korff, T., Augustin, H., Bode, C., Piek, J.J., Schaper, W., 2002. Exogenous application of transforming growth factor beta 1 stimulates arteriogenesis in the peripheral circulation. *Faseb J*. 16, 432-4.
- van Royen, N., Hoefler, I., Bottinger, M., Hua, J., Grundmann, S., Voskuil, M., Bode, C., Schaper, W., Buschmann, I., Piek, J.J., 2003. Local monocyte chemoattractant protein-1 therapy increases collateral artery formation in apolipoprotein E-deficient mice but induces systemic monocytic CD11b expression, neointimal formation, and plaque progression. *Circ Res*. 92, 218-25.
- van Royen, N., Schirmer, S.H., Atasever, B., Behrens, C.Y., Ubbink, D., Buschmann, E.E., Voskuil, M., Bot, P., Hoefler, I., Schlingemann, R.O., Biemond, B.J., Tijssen, J.G., Bode, C., Schaper, W., Oskam, J., Legemate, D.A., Piek, J.J., Buschmann, I., 2005. START Trial: a pilot study on STimulation of ARTeriogenesis using subcutaneous application of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as a new treatment for peripheral vascular disease. *Circulation*. 112, 1040-6.
- Vane, J.R., 1971. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*. 231, 232-5.

- Vane, J.R., Bakhle, Y.S., Botting, R.M., 1998. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 38, 97-120.
- Vicenzini, E., Ricciardi, M.C., Puccinelli, F., Altieri, M., Vanacore, N., Di Piero, V., Lenzi, G.L., 2008. Sonographic carotid plaque morphologic characteristics and vascular risk factors: results from a population study. *J Ultrasound Med.* 27, 1313-9.
- Voskuil, M., van Royen, N., Hoefler, I.E., Seidler, R., Guth, B.D., Bode, C., Schaper, W., Piek, J.J., Buschmann, I.R., 2003. Modulation of collateral artery growth in a porcine hindlimb ligation model using MCP-1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 284, H1422-8.
- Ware, J.A., Simons, M., 1997. Angiogenesis in ischemic heart disease. *Nat Med.* 3, 158-64.
- Weber, C., Erl, W., Pietsch, A., Weber, P.C., 1995. Aspirin inhibits nuclear factor-kappa B mobilization and monocyte adhesion in stimulated human endothelial cells. *Circulation.* 91, 1914-7.
- Welte, K., Gabrilove, J., Bronchud, M.H., Platzer, E., Morstyn, G., 1996. Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first 10 years. *Blood.* 88, 1907-29.
- Wengenmayer, C., Krikov, M., Lucht K., Müller S., Villringer, A., Steckelings, U., Unger, T., Thöne-Reineke, C., 2008. Influence of the vehicle in stroke outcome in rats. Abstract in "46. Wissenschaftliche Tagung der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS)". 160.
- Yang, H.T., Ren, J., Laughlin, M.H., Terjung, R.L., 2002. Prior exercise training produces NO-dependent increases in collateral blood flow after acute arterial occlusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 282, H301-10.

8. Abkürzungen

1-/2-/3-VO	One/Two/Three vessel occlusion, 1-/2-/3-Gefäßverschluss
ACA	Arteria cerebri anterior, Anterior cerebral artery
ADP	Adenosindiphosphat
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ANOVA	Analysis of variance
ASS/ASA	Acetylsalicylsäure/Acetylsalicyl acid
AV-Shunt	Arterio-venöser Shunt
bFGF	Basic fibroblast growth factor
CBF	Cerebral blood flow, Zerebraler Blutfluss
CCA	Arteria carotis communis, Common carotid artery
COX	Cyclooxygenase
CSF	siehe G-CSF
CT	Computertomographie
CVR	Cerebrovascular reactivity, Zerebrovaskuläre Reaktivität, CO ₂ -Reaktion
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
EC	Endothelial cell
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast growth factor
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor

Abkürzungen

GLM	General Linear Models
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor
HD	Humandosis
HIF	Hypoxie induzierte Faktoren
HGF	Hepatocyte growth factor
ICA	Arteria carotis interna, Internal carotid artery
ICAM-1/-2	Intercellular adhesion molecule-1/2
IE	Internationale Einheiten
Jak	Janus kinase
KHK/CHD	Koronare Herzkrankheit/Coronary heart disease
LDF	Laser-Doppler flowmetry
LOX-1	Lectin-like receptor for ox-LDL
MCA	Arteria cerebri media, Middle cerebral artery
MCAO	MCA occlusion
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MMP	Matrix metalloproteinase
MRT	Magnetresonanztomographie
NFkappa-B	Nuclear factor-kappa B
NO	Nitric oxide, Stickmonoxid
NOS	Nitric oxide synthase

Abkürzungen

oxLDL	oxidized low-density lipoproteins
PaCO ₂	Partialdruck von Kohlendioxid (CO ₂)
PaVK/PAD	Periphere arterielle Verschlusskrankheit/ Peripheral artery disease
PCA	Arteria cerebri posterior, Posterior cerebral artery
PComA	Arteria communicans posterior, Posterior communicans artery
PDGF	Platelet-derived growth factor
PG	Prostaglandin
PGI	Prostacyclin
PRIND	Prolongiertes reversibles ischämisches neurologisches Defizit
ROS	Reactive oxygen species
SD	Standard Deviation
SD-Ratten	Sprague Dawley-Ratten
SEM	Standard Error of Mean
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TD	Tierdosis
TEA	Transaortic Endarterectomy
TGFbeta	Transforming growth factor beta
TIA	Transitorische ischämische Attacke
TNFalpha	Tumor necrosis factor-alpha
TXA	Thromboxan

Abkürzungen

u-PA	Uronary plasminogen activator
USP	United States Pharmacopeia (amerikanische Fadenstärke)
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	Weltgesundheitsorganisation, World Health Organization

9. Abbildungen und Tabellen

9.1. Abbildungen

Abbildung 1 - Der Circulus Willisi	5
Abbildung 2 – Grenzwerten	8
Abbildung 3 - Angiogenese.....	12
Abbildung 4 – Arteriogenese	14
Abbildung 5 - Zeitlicher Projektablauf	33
Abbildung 6 - Zerebraler Blutfluss (CBF) nach 3-VO versus 1-VO	43
Abbildung 7 - Überlebensraten	44
Abbildung 8 - Gewichtsmonitoring.....	47
Abbildung 9 - Adaptive und therapeutisch induzierte Arteriogenese - CVR	50
Abbildung 10 - Adaptive und therapeutisch induzierte Arteriogenese – PCA	52
Abbildung 11 - Einfluss auf die Reagibilität.....	55
Abbildung 12 - Einfluss auf die CVR nach adaptiver zerebraler Arteriogenese	56
Abbildung 13 - Einfluss auf das adaptive Kollateralwachstum	58
Abbildung 14 - Einfluss auf die Reservekapazität nach therapeutischer Induktion	60
Abbildung 15 - Einfluss auf das Kollateralwachstum nach therapeutischer Induktion	62
Abbildung 16 - Postmortem Latexangiographie der PCA	64

9.2. Tabellen

3.4.1-1 Adaptive und therapeutisch induzierte Arteriogenese - CVR..... 49

3.4.2-1 Diameter des Circulus Willisii [μm]..... 53

3.5.1-1 Einfluss auf die Reagibilität..... 54

3.5.2-1 Effekte auf die adaptive Arteriogenese..... 57

3.6.1-1 Effekte auf die therapeutisch induzierte Arteriogenese 61

10. Publikationsliste

Dülsner, A., Erdö, F., Buschmann, I., Lehmann, K., Busch, H.-J., Schneeloch, E., Hossmann, K.-A., Mies, G. (2005). Effekte von GM-CSF auf den zerebralen Blutfluss nach zerebraler Hypoperfusion im Arteriogenese Modell der Ratte. *Tagungsband der „43. Jahrestagung der Gesellschaft für Versuchstierkunde Society for Laboratory Animal Science GV-SOLAS“*. Poster 47, Seite 160.

Dülsner, A., Erdö, F., Lehmann, K., Busch, H.-J., Schneeloch, E., Mies, G., Hossmann, K.-A., Buschmann, I. (2005). Pro-arteriogenic effects of GM-CSF on brain injury after hemodynamic stroke. A new rat model of cerebral arteriogenesis. *Book of Abstracts “First International CCR Symposium”*. Poster, Seite 36.

Hillmeister, P., Lehmann, K. E., Bondke, A., Witt, H., **Dülsner, A.**, Gruber, C., Busch, H. J., Jankowski, J., Ruiz-Noppinger, P., Hossmann, K. A. and Buschmann, I. R. (2008). Induction of cerebral arteriogenesis leads to early-phase expression of protease inhibitors in growing collaterals of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* **28**, 1811-23.

Dülsner, A., and Glaser, J., Busch, H.-J., Hillmeister, P., John, A.-K., Lee, E.-J., Gotthold, C., Hossmann, K.-A., Busjahn, A., Lehmann, K. and Buschmann, I. R. (2009). Granulocyte Colony-Stimulating Factor triggers Adaptive Cerebral Arteriogenesis in Hypoperfused Rat Brain. (*Manuskript wird eingereicht*)

Dülsner, A., and Glaser, J., Busch, H.-J., Hillmeister, P., John, A.-K., Lee, E.-J., Gotthold, C., Hossmann, K.-A., Busjahn, A., Lehmann, K. and Buschmann, I. R. (2009). Acetylsalicyl Acid, but not Clopidogrel, inhibits Therapeutically induced Cerebral Arteriogenesis. (*Manuskript wird eingereicht*)

Dülsner, A., and Glaser, J., Gatzke, N., Lehmann, K. and Buschmann, I. R. (2009). Dual response to buprenorphine: Induction of pica without influence on cerebral arteriogenesis. (*Manuskript wird eingereicht*)

11. Danksagung

Herrn Priv.-Doz. Dr. I. Buschmann danke ich sehr für die umfassende wissenschaftliche und persönliche Förderung meiner Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe für Experimentelle und Klinische Arteriogenese an der Charité, sowie seinen vielen Anregungen bei deren Durchführung.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Priv.-Doz. Dr. A. Sterner-Kock für ihre außerordentliche Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit und ihre Übernahme des Erstgutachtens. Weiterhin danke ich ihr sehr für die aktive und diskussionsreiche Klärung veterinärmedizinisch relevanter Problemstellungen.

Ich danke Frau Univ.-Prof. Dr. H. Fink sehr herzlich für die Übernahme des Drittgutachtens.

Herrn Professor Dr. K.-A. Hossmann und Herrn Prof. Dr. G. Mies bin ich ebenfalls zu großem Dank verpflichtet für die Möglichkeit, im Max-Planck-Institut für neurologische Forschung in Köln das 3-VO-Modell von Herrn Dr. H.-J. Busch zu erlernen, dem ich hiermit auch vielmals danken möchte. Herrn Prof. Dr. Hossmann danke ich insbesondere für seine exzellente Unterstützung bei der Auswertung der Daten dieser Arbeit.

Ich möchte herzlichst den Kolleginnen Johanna Glaser, Dr. Anja Bondke, Dr. Katrin Reithmayer sowie Susanne Granzow danken, die mir über die gesamte Zeit mit ihrer veterinär- und humanmedizinischen Fachkompetenz bei der Projektdurchführung und bei Fragen des Tierschutzes Unterstützung boten. Insbesondere danke ich Johanna für eine erfrischende und erfolgreiche Zusammenarbeit.

Herrn Dr. habil. A. Busjahn danke ich vielmals für die Hilfe bei der statistischen Datenauswertung.

Abschließend möchte ich auch allen nichtgenannten MitarbeiterInnen unserer Arbeitsgruppe herzlich danken, ohne die die Zeit wohl nicht so angenehm verlaufen wäre.

Mein letzter, aber dennoch wichtigster Dank gilt meinem Bruder und meinen Eltern, die mich jederzeit unterstützt haben.

12. Selbstständigkeitserklärung

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

Berlin, 19.05.2009

André Dülsner