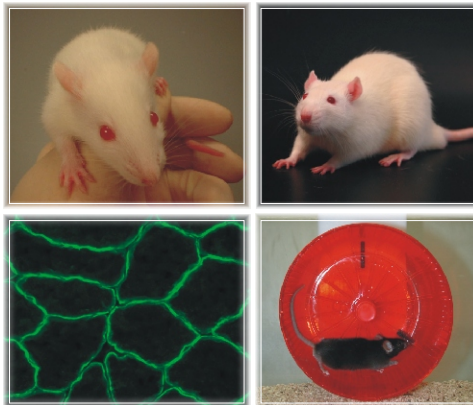


NEUE TIERMODELLE FÜR DIE INDIKATION CLAUDICATIO INTERMITTENS

SUSANNE VOGELBERGER



INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Tierphysiologie
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Betreuer: Prof. Dr. W. Clauss

und

der Abteilung für Herz-Kreislauf Forschung
der Sanofi-Aventis Deutschland GmbH

Betreuer: Prof. Dr. W. Linz

NEUE TIERMODELLE FÜR DIE INDIKATION CLAUDICATIO INTERMITTENS

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades eines
Dr.med.vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

eingereicht von

Susanne Vogelsberger

Tierärztin aus Dernbach/WW

Giessen 2006

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. W. Clauss
Prof. Dr. W. Linz

Tag der Disputation: 17.01.2006

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

<u>1</u>	<u>EINLEITUNG</u>	<u>13</u>
<u>2</u>	<u>LITERATURÜBERSICHT</u>	<u>15</u>
2.1	DIE PERIPHERE ARTERIELLE VERSCHLUSSKRANKHEIT (PAVK)	15
2.2	EPIDEMIOLOGIE UND RISIKOFAKTOREN	15
2.2.1	EPIDEMIOLOGIE	15
2.2.2	RISIKOFAKTOREN	16
2.3	PATHOPHYSIOLOGIE	18
2.3.1	ATHEROSKLEROSE	18
2.3.2	FOLGEN DER ATHEROSKLEROTISCH BEDINGTEN STENOSE	20
2.4	DIAGNOSE UND SYMPTOMATIK	21
2.5	THERAPIE	23
2.5.1	BEHANDLUNG DES ERHÖHTEN KARDIOVASKULÄREN RISIKOS	23
2.5.1.1	Behandlung der Risikofaktoren	23
2.5.1.2	Thrombozytenaggregationshemmer	25
2.5.2	THERAPIE DER SYMPTOME	25
2.5.2.1	Konservative Therapie	26
2.5.2.2	Chirurgische Therapie	32
2.6	PRÄKLINISCHE MODELLE FÜR DIE INDIKATION PAVK	33
2.7	ZIELE DIESER ARBEIT	36
<u>3</u>	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>37</u>
3.1	VERSUCHSTIERE UND IHRE HALTUNG	37
3.2	BEHANDLUNG	37
3.2.1	CILOSTAZOL	37
3.3	STUDIENPROTOKOLLE	38
3.3.1	TIERMODELLE AN DER RATTE	38
3.3.1.1	Invasive Messung der Muskelermüdung	38
3.3.1.2	Nicht invasive Messung der Muskelermüdung	39

Inhaltsverzeichnis

3.3.2	TIERMODELL AN DER MAUS	40
3.3.2.1	Messung der Laufleistung	40
3.4	VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	41
3.4.1	TIERMODELLE AN DER RATTE	41
3.4.1.1	Induktion der unilateralen Hinterlaufischämie	41
3.4.1.2	Perfusionsdruckmessung	42
3.4.1.3	Messung der Muskelermüdung (invasiv)	44
3.4.1.4	Messung der Muskelermüdung (nicht invasiv)	46
3.4.1.5	Histologische Untersuchungen	47
3.4.1.6	Blutuntersuchung	48
3.4.2	TIERMODELL AN DER MAUS	49
3.4.2.1	Induktion der bilateralen Hinterlaufischämie	49
3.4.2.2	Messung der Laufradleistung	49
3.4.2.3	Blutdruckmessung	51
3.5	STATISTIK	52
4	ERGEBNISSE	53
4.1	UNILATERALE HINTERLAUFISCHÄMIE BEI DER RATTE	53
4.2	ENTWICKLUNG DES MODELLS AN DER DIABETISCHEN RATTE	53
4.2.1.1	Perfusionsdruckmessung	53
4.2.1.2	Messung der Muskelermüdung	54
4.2.1.2.1	Kontraktionskraft (F) und Kontraktionsgeschwindigkeit (dF/dt_{max})	55
4.2.1.2.2	Relaxationszeit (RZ) und Relaxationsgeschwindigkeit (dF/dt_{min})	57
4.2.1.3	Messung der Muskelermüdung (nicht invasiv)	60
4.2.1.3.1	Kontraktionskraft (F) und Kontraktionsgeschwindigkeit (dF/dt_{max})	60
4.2.1.3.2	Relaxationszeit (RZ) und Relaxationsgeschwindigkeit (dF/dt_{min})	62
4.3	VALIDIERUNG DER MODELLE	64
4.3.1	ZDF/GMI/CRL- (FA/LEAN) RATTEN	64
4.3.1.1	Körpergewichte	64
4.3.1.2	Ergebnisse der Blutuntersuchung	64
4.3.1.3	Applikation der Testsubstanz	65
4.3.1.4	Blutdruck	65
4.3.1.5	Perfusionsdruckmessung	65
4.3.1.6	Messung der Muskelermüdung (invasiv)	66

Inhaltsverzeichnis

4.3.1.6.1	Kontraktionskraft	66
4.3.1.6.2	Kontraktionsgeschwindigkeit	68
4.3.1.6.3	Relaxationszeit	69
4.3.1.6.4	Relaxationsgeschwindigkeit	71
4.3.2	ZDF/GMiCRL-(FA/FA) RATTEN	72
4.3.2.1	Körpergewichte	72
4.3.2.2	Ergebnisse der Blutuntersuchung	72
4.3.2.3	Applikation der Testsubstanz	73
4.3.2.4	Blutdruck	73
4.3.2.5	Perfusionsdruckmessung	73
4.3.2.6	Messung der Muskelermüdung (invasiv)	74
4.3.2.6.1	Kontraktionskraft	74
4.3.2.6.2	Kontraktionsgeschwindigkeit	75
4.3.2.6.3	Relaxationszeit	76
4.3.2.6.4	Relaxationsgeschwindigkeit	78
4.3.2.7	Messung der Muskelermüdung (nicht invasiv)	80
4.3.2.7.1	Kontraktionskraft	80
4.3.2.7.2	Kontraktionsgeschwindigkeit	81
4.3.2.7.3	Relaxationszeit	82
4.3.2.7.4	Relaxationsgeschwindigkeit	83
4.3.2.8	Histologie	86
4.3.2.8.1	Fläche der Muskelzellen in μm^2	87
4.3.2.8.2	Kapillare pro Muskelzelle	88
4.4	BILATERALE HINTERLAUFISCHÄMIE BEI DER MAUS	89
4.4.1	C57BL/6-MÄUSE	89
4.4.1.1	Messung der Laufradleistung	89
4.4.1.1.1	Gesamtstrecke	89
4.4.2	ENOS -/- MÄUSE	91
4.4.2.1	Messung der Laufradleistung	91
4.4.2.1.1	Gesamtstrecke	91
4.4.2.1.2	Spitzen- und Durchschnittsgeschwindigkeit	93
4.4.2.1.3	Weiteste und Längste Laufperiode	94
4.4.2.1.4	Gesamtzeit im Laufrad	95
4.4.2.1.5	Anzahl der Laufperioden	96

Inhaltsverzeichnis

4.4.2.1.6	Symptomklassifikation (Grad 1-Grad 4) -----	97
4.4.2.1.7	Gesamtstrecke bei unoperierten eNOS-/- Mäusen -----	98
4.4.2.2	Blutdruckmessung -----	99
<u>5</u>	<u>DISKUSSION -----</u>	<u>100</u>
5.1	NEUE TIERMODELLE -----	100
5.2	VALIDIERUNG DER TIERMODELLE -----	116
<u>6</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG -----</u>	<u>120</u>
<u>7</u>	<u>SUMMARY -----</u>	<u>122</u>
<u>8</u>	<u>DANKSAGUNG -----</u>	<u>141</u>
<u>9</u>	<u>ERKLÄRUNG -----</u>	<u>142</u>

Abkürzungen

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Aa.	Arteriae
ABI	ankle brachial index
ADP	Adenosindiphosphat
ASS	Azetylsalicylsäure
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BSI	Bandeiraea simplicifolia I-isolectin
°C	Grad Celcius
C57BL/6	Inzuchtlinie Labormaus
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalziumionen
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter (10 ⁻² Meter)
CRL	Charles River Laboratories
CRP	C-reaktives Protein
dF/dt _{max}	Kontraktionsgeschwindigkeit
dF/dt _{min}	Relaxationsgeschwindigkeit
eNOS	endotheliale NO Synthase
eNOS ^{-/-} Mäuse	eNOS defiziente Mäuse
et al.	et alii
F	Kontraktionskraft
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramm
g/s	Gramm pro Sekunde
HbA _{1C}	glykiertes Hämoglobin
HDL	high density lipoprotein
IGF	Insulin like growth factor
IgG	Immunglobulin Gamma
Kg	Kilogramm
KHK	koronare Herzkrankheit
LDI	laser doppler imaging

Abkürzungen

LDL	low density lipoprotein
M.	Musculus
max.	maximal
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
ms	Millisekunde
n	Anzahl
mA	Milliampère
MW	Mittelwert
NADPH	Nicotinamid-Adenin Dinucleotid
	Phosphat
NO	Stickstoffmonoxid
OP	Operation
p	Signifikanzniveau
PAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	phosphate buffered saline
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	platelet derived growth factor
PGE ₁	Prostaglandin E ₁
PGI ₂	Prostazyklin I ₂
PLC	Propionyl-L-Carnitin
Ppm	parts per million
PTA	perkutane transluminale Angioplastie
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RZ	Relaxationszeit
s. c.	subkutan
SEM	standard error of the mean/ Standardfehler des Mittelwertes
sGC	soluble guanylate cyclase
V.	Vena
Vol.	Volumen

Abkürzungen

z. B.

ZDF Ratte

zum Beispiel

„Zucker diabetic fatty“ Ratte

1 Einleitung

Die periphere arterielle Verschlusskrankheit (PAVK) ist bei älteren Menschen eine häufige Manifestation der systemischen Atherosklerose (Ouriel 2001). Durch eine atherosklerotisch bedingte Verengung der Arterien kommt es zur Minderdurchblutung der Extremitätenmuskulatur. Der überwiegende Teil (2/3) der Erkrankten ist asymptomatisch (Stadium I nach Fontaine), kann aber über einen verminderten Knöchel Arm Index (ankle brachial index (ABI) < 0,9) diagnostiziert werden. Die Symptome im Stadium II nach Fontaine (Claudicatio intermittens) sind belastungsabhängige Schmerzen, die zu körperlichen Leistungseinbußen führen. Im Stadium III nach Fontaine leidet der Patient schon in Ruhe an Schmerzen und zur chronisch kritischen Extremitätenischämie, mit trophischen Störungen, kommt es im Stadium IV nach Fontaine (Cetin & Baumgartner 2004).

Neben einer allgemein höheren Morbidität und Mortalität infolge anderer kardiovaskulärer Ereignisse, liegt bei Patienten mit Claudicatio intermittens eine erhebliche Einschränkung der Belastbarkeit vor. Die maximale Belastungsgrenze ist verglichen mit Gesunden im gleichen Alter um 50 % reduziert (Hiatt *et al.* 1990). Dies führt zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Lebensqualität, da sowohl berufliche, als auch Freizeitaktivitäten stark eingeschränkt sind (Regensteiner *et al.* 1996, Dumville *et al.* 2004).

Therapien verfolgen also zwei Ziele: Zum einen soll das Fortschreiten der Atherosklerose vermindert und damit das erhöhte kardiovaskuläre Risiko gesenkt werden, zum anderen sollen die Symptome vermindert werden, um eine Steigerung der Leistungsfähigkeit und Lebensqualität zu erreichen.

Die Verminderung der Symptomatik bei Patienten mit Claudicatio intermittens stellt allerdings noch eine Herausforderung dar. Operative Ansätze sind hauptsächlich für Patienten in fortgeschrittenen Stadien (Stadium III und IV nach Fontaine) indiziert (Comerota 2001). Gehtraining ist nur unter strenger ärztlicher Überwachung sinnvoll und effektiv (Stewart *et al.* 2002). Arzneimittel zur medikamentösen Behandlung beschränken sich zur Zeit auf wenige wirksame Präparate. Aus diesem Grund ist die Entwicklung neuer Substanzen zur symptomatischen Behandlung der Claudicatio intermittens notwendig.

Einleitung

Allerdings sind die derzeit vorhandenen präklinischen Modelle für die Indikation PAVK nicht standardisiert und außerdem zum größten Teil nicht mit klinisch wirksamen Substanzen validiert. Daher war es Ziel dieser Arbeit neue, standardisierte in vivo Modelle für die Indikation Claudicatio intermittens zu entwickeln, die sich möglichst nah an der klinischen Situation orientieren. Diese Modelle sollen mit dem derzeitigen Therapie-Standard Cilostazol validiert werden und können im Anschluss zur Testung neuer Entwicklungssubstanzen verwendet werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Die periphere arterielle Verschlusskrankheit (PAVK)

Der Pariser Neurologe Jean Martin Charcot beschrieb 1858 erstmals die Symptome eines Patienten mit PAVK. Er prägte den Begriff der „Claudicatio intermittens“. *Claudicare* kommt aus dem lateinischen und bedeutet hinken. Claudicatio intermittens steht also für ein intermittierend auftretendes Hinken und beschreibt das Hauptsymptom des Stadiums II nach Fontaine (Cetin & Baumgartner 2004).

2.2 Epidemiologie und Risikofaktoren

2.2.1 Epidemiologie

Die klinische Prävalenz der PAVK liegt bei Menschen über 65 bei etwa 12 %, bei Menschen über siebzig steigt sie auf bis zu 20 % (Regensteiner & Hiatt 1994). Trotz einer allgemein progressiven Entwicklung der PAVK, haben 75 % der Patienten stabile Symptome. Diese Stabilisierung ist allerdings auch durch die verringerte Aktivität der Patienten und nicht nur durch eine fehlende Progressivität der Erkrankung erklärbar (McDermott *et al.* 2004). Nur bei 25 % kommt es zu einer Verschlechterung der Symptome. Bei etwa 10 % davon wird eine Revaskularisierung und bei weniger als 2 % eine Amputation durchgeführt (Dormandy *et al.* 1999). Zu einer Verschlechterung der PAVK kommt es am häufigsten bei Patienten mit multiplen Stenosen, die einen niedrigen ABI haben, an Diabetes mellitus leiden oder eine Niereninsuffizienz haben und außerdem starke Raucher sind.

Bei Patienten mit PAVK liegt außerdem eine stark erhöhte Gefährdung für andere atherosklerotisch bedingten Krankheiten wie z. B. Herzinfarkt oder Schlaganfall vor (Leng *et al.* 1996). Die 5-Jahres Mortalität bei Patienten mit PAVK liegt insgesamt etwa bei 30 % (Dormandy *et al.* 1999). Von diesen Patienten sterben etwa 55 % an den Folgen einer koronaren Herzerkrankung, etwa 10 % an den Folgen eines Schlaganfalls und etwa 10 % an den Folgen eines anderen vaskulären Ereignisses (z. B. rupturiertes Aortenaneurysma). Nur etwa 25 % sterben an Folgen nicht kardiovaskulärer Erkrankungen (Ouriel 2001).

Dabei konnte gezeigt werden, dass die Mortalität umso höher ist, je stärker ausgeprägt der Verschluss ist (Hiatt 2001).

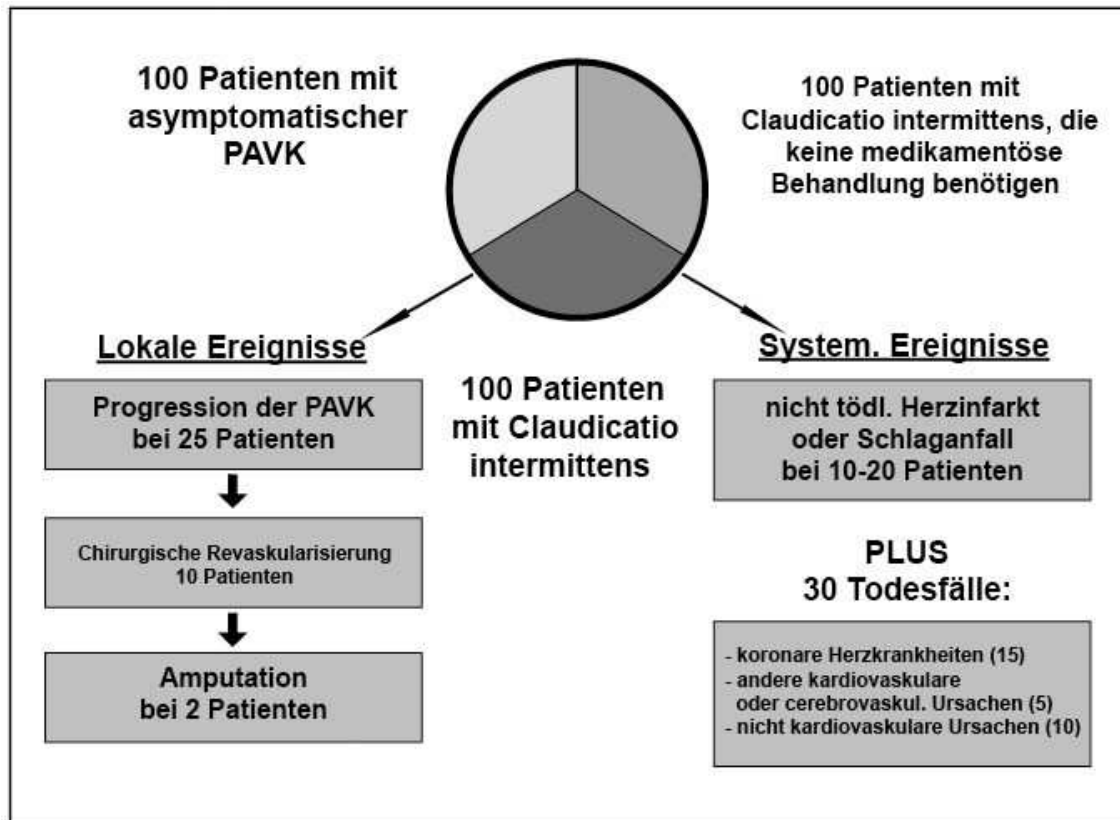


Abbildung 2-1

5 Jahres Mortalität bei Patienten mit PAVK (modifiziert nach Diehm *et al.* 2004)

2.2.2 Risikofaktoren

Die PAVK betrifft häufig ältere Patienten (Ouriel 2001). Das Risiko an einer PAVK zu erkranken verdoppelt sich ab dem 40. Lebensjahr alle zehn Jahre (Hiatt 2001). Neben dem Alter ist das Rauchen einer der größten Risikofaktoren. Raucher haben, verglichen mit Nichtrauchern, ein 1,7 bis 5,6 mal größeres Risiko an der PAVK zu erkranken und sie leiden drei mal so häufig an Symptomen (Fowkes *et al.* 1992, Dormandy & Rutherford 2000). Des weiteren liegt das Risiko einer Amputation bei rauchenden Patienten bei 11 % und bei nichtrauchenden bei 0 % (Dormandy *et al.* 1999).

Auch Diabetes mellitus gilt als Risikofaktor an der PAVK zu erkranken. Unklar ist allerdings ob Diabetes selbst (Dormandy *et al.* 1999) oder die bei dieser Erkrankung auftretenden

Literaturübersicht

Faktoren im Zusammenhang mit dem metabolischen Syndrom (Insulinresistenz, Hyperinsulinämie, Adipositas, Hyperlipidämie, Hypertonie) im Vordergrund stehen (Reaven 1988). Die Prävalenz der PAVK ist auf jeden Fall bei diabetischen Patienten 1,5 bis 6 mal höher als bei nichtdiabetischen Patienten (Kannel & McGee 1985, Murabito *et al.* 1997). Als weiterer Risikofaktor ist die arterielle Hypertonie zu nennen. In der „Framingham Heart Study“ wurde gezeigt, dass Männer mit Hypertonie ein 2,5 mal höheres Risiko und Frauen mit Hypertonie ein 3,9 mal höheres Risiko haben, zusätzlich an einer PAVK zu erkranken (Kannel & McGee 1985). Dahingegen zeigte die „Whitehall Study“ keine Verbindung zwischen Hypertonie und PAVK (Smith *et al.* 1990). Diese Diskrepanz lässt sich damit erklären, dass die Hypertonie Ursache der Atherosklerose, aber auch Folge einer Atherosklerose sein kann. Außerdem ist es möglich, dass die Hypertonie, infolge eines verstärkten Perfusionsdrucks, das Auftreten der Symptome eines Claudicatio intermittens verzögern kann (Dormandy *et al.* 1999).

Das Vorhandensein einer Hyperlipidämie (Serum Cholesterin Konzentration > 240 mg/dl) geht nach Untersuchungen der „Framingham Heart Study“ mit einem zweifach höheren Risiko einher an einer PAVK zu erkranken (Murabito *et al.* 1997). Dabei ist die Konzentration an HDL (high density lipoprotein) der spezifischste Parameter. Je geringer das Serum HDL, desto höher das Risiko (Kannel & McGee 1985). Eine aktuelle Studie (Ridker *et al.* 2001), bei der verschiedene Lipide und atherothrombotische Biomarker untersucht wurden, kam zu dem Ergebnis, dass der Quotient aus Gesamtcholesterin und HDL und zusätzlich das C-reaktive Protein (CRP) die wichtigsten Parameter zur Vorhersage des PAVK Risikos sind. Die Arbeitsgruppe um Cheng (Cheng *et al.* 1997) fand außerdem heraus, dass Lipoprotein (a) Konzentrationen von mehr als 24 mg/dl ein zweifach höheres Risiko für eine PAVK darstellen.

Bei Patienten, die in jungen Jahren (< 55 Jahren) eine PAVK entwickeln liegt bei bis zu 30 % eine mittelgradige Hyperhomocysteinämie vor (Clarke *et al.* 1991). Die Hyperhomocysteinämie entsteht meist aufgrund eines genetischen Defektes eines Enzyms (z. B. Cystathionin β Synthase) im Homocysteinmetabolismus. Bei der genetisch vererbten Hyperhomocysteinämie kommt es dadurch frühzeitig zu atherosklerotischen Veränderungen in den Gefäßen (Dormandy *et al.* 1999). Aber auch Defekte im Vitamin B₁₂ Metabolismus und ein Folsäuremangel können ursächlich sein. Homocystein erleichtert die Oxidation von LDL (low density lipoprotein) und verursacht über die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) eine endotheliale Dysfunktion und führt zu einer vermehrten Proliferation von glatten Muskelzellen (Hiatt & Nehler 2001). Eine Metaanalyse (Boushey *et*

al. 1995) ergab, dass die Hyperhomocysteinämie allgemein mit einem ca. sechsfachen Risiko einhergeht, an einer PAVK zu erkranken. Allerdings wird die Wertigkeit erhöhter Lipoprotein (a)-Spiegel und Homocystein-Spiegel als Risikofaktoren für die PAVK noch diskutiert (Ridker *et al.* 2001).

2.3 Pathophysiologie

Die systemische Atherosklerose ist meist für die Entstehung einer PAVK verantwortlich. Selten sind es entzündliche (Thromboangiitis obliterans) oder tumoröse Prozesse, die zu dieser Erkrankung führen.

2.3.1 Atherosklerose

Die Pathophysiologie der Atherosklerose beinhaltet verschiedene eng miteinander verknüpfte Prozesse, wie Veränderungen im Lipidprofil (erhöhtes LDL, erniedrigtes HDL), oxidativer Stress, endotheliale Dysfunktion, Entzündung, vermehrte Proliferation von glatten Muskelzellen, Plättchenaktivierung und Thrombosen.

Die endotheliale Funktion spielt bei der Entstehung und Progression der Atherosklerose eine entscheidende Rolle. Seit Furchgott und Zawadzki (Furchgott & Zawadzki 1980) ist das Endothel als Regulator der vaskulären Homöostase identifiziert. Die Aufgaben beinhalten die Regulation des vaskulären Tonus (Vasodilatation oder –konstriktion), die Kontrolle der vaskulären Permeabilität und der Blutgerinnung. Unter physiologischen Bedingungen stellt das Endothel eine anti-thrombotische (Plättchenaggregationshemmung) und anti-inflammatorische (Hemmung der Monozytenadhesion) Oberfläche dar (Faxon *et al.* 2004). Vielfältige vaskuläre Funktionen des Endothels werden über die Freisetzung auto- und parakrin wirkender Mediatoren, wie z. B. Stickstoffmonoxid (NO), Prostaglandine, Endothelin und Angiotensin II vermittelt. NO wird im Endothel durch die endotheliale NO Synthase (eNOS) aus der Aminosäure L-Arginin gebildet. Dabei wird L-Arginin unter Sauerstoffverbrauch durch NADPH zu L-Citrullin oxidiert und NO freigesetzt. NO diffundiert in zahlreiche Zielzellen, um dort über die Aktivierung zum Beispiel der löslichen Guanylatzyklase (sGC) zu einer vermehrten Bildung von cGMP zu führen. Über diesen Signaltransduktionsweg werden im funktionellen Gefäß zahlreiche Aufgaben (Vasodilatation,

Literaturübersicht

Plättchenaggregationshemmung, Proliferationshemmung von glatten Muskelzellen) vermittelt (Linz *et al.* 1995).

Die endotheliale Dysfunktion hingegen ist gekennzeichnet durch eine verminderte endothelabhängige Vasodilatation. Schon bei Patienten mit Risikofaktoren für die Entstehung einer Atherosklerose, ohne dass bereits atherosklerotische Gefäßveränderungen nachweisbar sind, kann eine endotheliale Dysfunktion diagnostiziert werden (Celermajer *et al.* 1992). Die endotheliale Dysfunktion gilt daher als Vorläufer der Atherosklerose. Zentrales Charakteristikum der endothelialen Dysfunktion ist eine verminderte Produktion von NO durch eine entkoppelte eNOS (Mangel am Substrat L-Arginin, Abwesenheit des Kofaktors Tetrahydrobiopterin (BH₄), Inhibition der eNOS z. B. durch asymmetrisches Dimethylarginin (Boger *et al.* 1997)) und damit eine verminderte Bioverfügbarkeit von NO. Diese führt zu einer verminderten Vasodilatation, zu einer Plättchenaktivierung, zu einer vermehrten Bildung inflammatorischer Zytokine und endothelialer Zelladhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin) und damit zu einer gesteigerten Adhäsion und Transmigration von Entzündungszellen in die Gefäßwand. Da freigesetztes NO unter physiologischen Bedingungen die glatte Muskelzellproliferation hemmt, ist die Folge einer verminderten Bioverfügbarkeit von NO die erhöhte Proliferation von glatten Muskelzellen. Diese Faktoren fördern weiterhin die Entstehung einer Atherosklerose (Faxon *et al.* 2004). Gleichzeitig kommt es durch die Entkoppelung der eNOS zu einer vermehrten Bildung von Superoxidradikalen. Diese vermindern die NO Bioverfügbarkeit noch mehr und wirken außerdem zellschädigend und direkt proatherogen (Kawashima & Yokoyama 2004).

Eng mit diesem Mechanismus der Atheroskleroseentstehung verbunden ist ein verändertes Lipidprofil; d. h. erhöhte LDL und erniedrigte HDL Cholesterin Serum Spiegel. An der Oberfläche von Endothelzellen befinden sich Rezeptoren für LDL Cholesterin. Bei einem veränderten Lipidprofil, zugunsten des LDL Cholesterins, kommt es zu einer Anhäufung von LDL in der Gefäßwand (Brown & Goldstein 1990). LDL wird dann dort unter oxidativen Bedingungen vermehrt oxidiert (Henriksen *et al.* 1981, Morel *et al.* 1984, Chisolm *et al.* 1999) und als oxLDL von Makrophagen, aber auch von anderen vaskulären Zielzellen aufgenommen. Die Makrophagen wandeln sich daraufhin in ortsständige Schaumzellen um. Darauf folgt eine vermehrte Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, die wiederum zu einer weiteren Aktivierung und Migration von Monozyten und zu einer gesteigerten Proliferation von glatten Muskelzellen führen. Entstehende Schaumzellen und die vermehrte Proliferation von glatten Muskelzellen führen zu einem weiteren Plaquewachstum, da aktivierte glatte Muskelzellen Matrixproteine produzieren, die etwa

50 % des Plaquevolumens ausmachen (Faxon *et al.* 2004). Ein kardiovaskuläres Ereignis entsteht dann meist als Folge einer Ruptur der fibrösen Kappe des Plaque, da durch den vermehrten oxidativen Stress und die verminderte NO Verfügbarkeit Matrixmetalloproteine freigesetzt werden, die zu einer Schwächung der fibrösen Kappe führen (Endemann & Schiffrin 2004).

2.3.2 Folgen der atherosklerotisch bedingten Stenose

Bei der PAVK führen atherosklerotisch bedingte Stenosen in den Beinarterien zu einer Minderdurchblutung der entsprechenden Muskulatur. Dies hat, über die isolierte Stenose hinausgehende, funktionelle und strukturelle Folgen für die poststenotischen Gefäße und die von ihnen versorgte Muskulatur.

Die normale Ruhedurchblutung des Skelettmuskels liegt bei etwa 5 ml/min pro 100 g Muskel und kann unter normalen Bedingungen durch Belastung auf das zehnfache gesteigert werden. Liegt in einem Gefäß eine Stenose vor, ist der Strömungswiderstand in den betroffenen Gefäßen stark erhöht, und eine physiologische Durchblutungssteigerung unter Belastung ist nicht mehr möglich (Steinacker *et al.* 2002). Eine Kompensation ist durch Kollateralgefäßbildung (Arteriogenese), vermehrte Kapillarisation (Angiogenese) oder Gefäßdilatation möglich. Die Arteriogenese und Gefäßdilatation werden durch verstärkte Scherkräfte am Endothel, die zu einer Aktivierung von vasoregulativen Mechanismen führen, ausgelöst (Heil & Schaper 2004). Bei der Aktivierung der Angiogenese spielen lokale Ischämie bedingte Faktoren eine Rolle (Ito *et al.* 1997).

Bei Patienten mit peripherer Verschlusskrankheit ist allerdings die Endothelfunktion durch vorhandene Risikofaktoren wie Rauchen oder Diabetes im Vergleich zum Gesunden meist schon stark eingeschränkt. Vasokonstriktive Mechanismen überwiegen dadurch. Es kann nur noch bedingt zu einer Kompensation kommen. Infolge der peripheren Minderperfusion wird zusätzlich lokal das Renin-Angiotensin System aktiviert. Dieses führt wiederum zu einer verstärkten Vasokonstriktion, und damit zu einer weiteren Verminderung des Blutfluss. Diese Mangeldurchblutung selbst führt dann, zusammen mit der vermehrten körperlichen Inaktivität der betroffenen Patienten, zu einer Abnahme der Muskelmasse (Steinacker *et al.* 2002), so dass insgesamt eine Einschränkung der maximalen Belastbarkeit von bis zu 50 % vorliegt (Hiatt *et al.* 1990).

2.4 Diagnose und Symptomatik

Die Diagnose PAVK wird häufig übersehen, beziehungsweise bei einem multimorbiden Patienten nicht als erste Priorität behandelt (Hirsch *et al.* 2001). Das liegt oft daran, dass die Erkrankung zum einen in Ruhe meist gut kompensiert wird und zum anderen meist andere Erkrankungen (z. B. KHK) vorhanden sind, die zunächst medizinisch im Vordergrund stehen (Dawson *et al.* 2002).

Zur Diagnose ist die Erhebung einer gründlichen Anamnese unumgänglich. Eine Möglichkeit dafür ist die Verwendung eines Fragebogens der WHO („Rose questionnaire“ (Rose 1962)), der 1992 von Leng und Fowkes („Edinburgh Claudication Questionnaire“) (Leng & Fowkes 1992) weiter modifiziert wurde. Weiteren Aufschluss gibt die genaue klinische Untersuchung des Patienten (Criqui *et al.* 1985).

Kardinalsymptom der PAVK ist das Auftreten von Schmerzen, Krämpfen oder einer Muskelermüdung unter Belastung, die in Ruhe wieder komplett verschwindet. Die Ausprägung der Symptome ist abhängig von der Lokalisation und Ausdehnung der Stenose (Cetin & Baumgartner 2004). Bei Stenosen im Bereich der A. femoralis kommt es zu Schmerzen vor allem im Bereich der Wadenmuskulatur. Bei Schmerzen in der Hüfte, im Oberschenkel oder im Gesäß liegt die Stenose eher im Bereich der Aorta oder der A. iliaca communis (Ouriel 2001).

Das spezifischste und sensitivste Screening Instrument zur klinischen Diagnostik einer PAVK ist die Messung des ABI, die relativ einfach durchführbar ist. Dabei wird der Knöchelarteriendruck mit dem Oberarmarteriendruck ins Verhältnis gesetzt. Normal ist in Ruhe ein ABI von 1. Patienten mit PAVK dagegen haben in Ruhe einen ABI von $< 0,91$. Dabei haben sie im Stadium I und II nach Fontaine (Claudicatio intermittens) einen ABI von 0.91 bis 0.41. Bei niedrigeren Werten befinden sich die Patienten bereits im Stadium III bis IV nach Fontaine. Im Stadium III kommen Schmerzen auch schon in Ruhe vor, im Stadium IV kommt es darüber hinaus zu ischämischen Läsionen. Diese Messung gilt als sehr spezifisch. Eventuell sind bei Patienten mit Diabetes mellitus oder Niereninsuffizienz falsch negative ABI Messungen möglich. Durch diese Erkrankungen kann es zu einer Kalzinose der Gefäßmedia kommen. Die Gefäße werden dadurch zunehmend inkompressibel und es kommt zur Messung falsch hoher Verschlussdrücke von $>1,3$. In manchen leichten Fällen kann der ABI, trotz vorhandener Symptomatik, im Normbereich liegen. Hier kann ein Belastungstest auf dem Laufband, unter standardisierten Bedingungen weiter Aufschluss geben (Cetin & Baumgartner 2004). Dieser wird auch zur allgemeinen klinischen Diagnostik verwandt.

Literaturübersicht

Bei einem standardisierten Belastungstest auf dem Laufband wird die Strecke ermittelt, die der Patient gehen kann, bis die ersten Schmerzen auftreten (maximale schmerzfreie Gehstrecke). Außerdem wird die Strecke ermittelt, die der Patient gehen kann, bis ihn die Schmerzen zum Anhalten zwingen (maximale Gehstrecke). Die Bestimmung der maximalen schmerzfreien und der maximalen Gehstrecke geben Aufschluss über die funktionelle Einschränkung des Patienten. Außerdem ist es eine gute Möglichkeit zur Dokumentation des Therapieverlaufs (Dawson *et al.* 2002).

Stadium	klinische Symptomatik	ABI
I	asymptomatisch	> 0,91
IIa	max. schmerzfreie Gehstrecke > 200m	0,41-0,9
IIb	max. schmerzfreie Gehstrecke < 200m	
II kompl.	ischämische Läsionen ohne hämodynamische Störungen (Knöchelarteriendruck >50mmHg)	
III	Ruheschmerzen	
IV	ischämische Läsionen (Gangrän, Nekrose, Ulzeration)	< 0,4

Abbildung 2-2

Einteilung der Stadien der PAVK nach Fontaine mit der entsprechenden klinischen Symptomatik und des ABI

Ist aufgrund der Schwere der Erkrankung eine operative Intervention vorgesehen, wird auch bildgebende apparative Diagnostik durchgeführt. Ein häufig verwendetes, nicht invasives Verfahren ist die farbkodierte Duplex Sonographie. Mit Hilfe dieses Verfahrens lässt sich die Morphologie der Stenose und ihre funktionelle Auswirkung beschreiben. Die Entscheidung, ob eine Intervention notwendig ist, kann mit diesem Verfahren getroffen werden (Koppensteiner 2005). Der Goldstandard zur Lokalisation und Bestimmung des Ausmaßes von Stenosen, ist die Kontrast Angiographie. Bedingt durch die Nierentoxizität der Kontrastmittel darf die Kontrast Angiographie allerdings nicht bei Patienten mit Niereninsuffizienz angewendet werden. Bei diesen Patienten ist die Durchführung einer Magnet Resonanz Angiographie angezeigt (Ouriel 2001).

2.5 Therapie

Die Therapie der PAVK hat zwei Ziele. Einerseits soll das Fortschreiten der Atherosklerose vermindert und damit das erhöhte kardiovaskuläre Risiko gesenkt werden, andererseits soll die Symptomatik verringert und damit die Leistungsfähigkeit und Lebensqualität gesteigert werden.

Bei der Therapie der Atherosklerose und Senkung des erhöhten kardiovaskulären Risikos stehen die Behandlung der Risikofaktoren und eine Plättchenaggregationshemmung im Vordergrund.

2.5.1 Behandlung des erhöhten kardiovaskulären Risikos

2.5.1.1 Behandlung der Risikofaktoren

Zu der Behandlung der Risikofaktoren gehört die Aufgabe des Rauchens (Baumgartner *et al.* 2005). Die Aufgabe des Rauchen führt aber nach einer Metaanalyse von Girolami und Kollegen (Girolami *et al.* 1999) nicht automatisch zu einer Verlängerung der maximalen Gehstrecke. Sie verringert aber das Risiko einer kritischen Extremitätenischämie und senkt das kardiovaskuläre Risiko allgemein (Hirsch *et al.* 1997).

Diabetikern, die an der peripheren Verschlusskrankheit leiden, wird von der American Diabetes Association eine Einstellung des HbA1c auf unter 7 % empfohlen (Hiatt 2002).

Literaturübersicht

Verschiedene Studien (UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group 1998) zeigten allerdings, dass damit nur eine Verbesserung von mikrovaskulären Störungen (z. B. Retinopathien) und ein Trend in Richtung einer Verminderung des kardiovaskulären Risikos erzielt werden kann. Eine Verbesserung der Symptome der PAVK konnte nicht eindeutig gezeigt werden.

Bei PAVK Patienten, die an Hypertonie leiden, sollte der Blutdruck auf $< 130/85$ mmHg gesenkt werden. Zur Behandlung der Hypertonie werden häufig z. B. Betarezeptorenblocker eingesetzt. Die Gefahr einer Verschlechterung der Symptome durch eine Betarezeptorenblocker bedingte Vasokonstriktion konnte in einer Metaanalyse verschiedener Studien nicht bestätigt werden (Radack & Deck 1991). Außerdem hat der Einsatz von Betarezeptorenblocker eine zusätzliche kardioprotektive Wirkung (Hiatt 2002). In der HOPE Studie konnte durch den Einsatz des ACE Hemmers Ramipril bei Patienten mit PAVK, zusätzlich zur Blutdrucksenkung, auch ein positiver kardioprotektiver Effekt nachgewiesen werden (Yusuf *et al.* 2000).

Durch eine entsprechende Behandlung (Diät, medikamentöse Lipidsenkung) sollte zusätzlich vor allem die LDL Konzentration auf < 100 mg/dl gesenkt werden. In der „Heart Protection Study“ konnte gezeigt werden, dass eine Senkung von LDL durch Simvastatin allgemein zu einem stark verminderten kardiovaskulären Risiko führt (MRC/BHF Heart Protection Study 2002). Außerdem führen Statine auch zu einer Senkung von erhöhten CRP Spiegeln, die als proinflammatorischer Faktor ein Risiko für die Erkrankung mit der PAVK darstellen (Ridker *et al.* 2001).

Eine Senkung der Homocysteinspiegel durch eine Gabe von Vitamin B oder Folsäure ist möglich, allerdings sind noch keine Daten verfügbar, die zeigen, dass eine Senkung der Homocysteinspiegel zu einer Verbesserung der Symptome der PAVK führt (Hiatt 2001).

2.5.1.2 Thrombozytenaggregationshemmer

Bei Patienten mit PAVK ist eine lebenslange Thrombozytenaggregationshemmung angezeigt (Baumgartner *et al.* 2005). In einer Metaanalyse (Antithrombotic Trialists' Collaboration. 2002) wurde durch eine Thrombozytenaggregationshemmung mit Aspirin eine 25 %ige Reduktion des Risikos errechnet, ein kardiovaskuläres Ereignis (Herzinfarkt, Schlaganfall, kardiovaskulärer Tod) zu erleiden. Als Thrombozytenaggregationshemmer kommen außerdem zwei weitere Präparate der Klasse der Thienopyridine in Frage: Ticlopidine und Clopidogrel. Ticlopidine zeigte zum Beispiel in der „Swedish Ticlopidine Multicenter Study“ eine signifikante Risikoreduktion ein kardiovaskuläres Ereignis (Herzinfarkt, Schlaganfall, vaskulärer Tod) zu erleiden (Janzon 1996). Aber aufgrund von schweren Nebenwirkungen, wie Neutropenie und Thrombozytopenie, wird Ticlopidine kaum eingesetzt (Hiatt 2002). In der „CAPRIE“ Studie (Clopidogrel versus Aspirin in Patients at Risk of Ischemic Event) wurde in mehr als 19.000 Patienten die Wirksamkeit beider Substanzgruppen erstmals miteinander verglichen. Die relative Risikoreduktion von Clopidogrel versus Aspirin lag bei 8,7 % in der Gesamtpopulation und bei 23,8 % in der Subpopulation von PAVK Patienten (CAPRIE 1996). Clopidogrel wird außerdem intestinal besser vertragen als Aspirin (Cetin & Baumgartner 2004).

Insgesamt senken diese Strategien zwar allgemein das kardiovaskuläre Risiko, führen aber nicht zu einer Verbesserung der Symptomatik bei Patienten mit PAVK.

2.5.2 Therapie der Symptome

Bei Patienten mit PAVK soll eine Therapie zu einer Steigerung der Leistungs- und Belastungsfähigkeit und zu einer Verbesserung der Lebensqualität führen. Es reicht nicht, dass zum Beispiel eine perkutane transluminale Angioplastie eine Verbesserung des ABI zur Folge hat. Es muss auch deutlich gezeigt werden, dass solche Therapien langfristig zur Verbesserung der Leistungsfähigkeit und Lebensqualität führen (Hiatt 2004). Behandlungsmöglichkeiten im Stadium III oder IV nach Fontaine schließen meist zusätzlich eine chirurgische Intervention mit ein, da rein konservative Therapien hier nicht mehr ausreichen.

2.5.2.1 Konservative Therapie

Gehtraining

Zur Behandlung einer PAVK ist, nach vorhandener Diagnose und Therapie der Risikofaktoren, ein konsequentes Gehtraining empfehlenswert. Dabei ist der Effekt bei reinem Gehtraining, im Vergleich zu Krafttraining oder einer Kombination aus Kraft- und Gehtraining, größer (Regensteiner *et al.* 1996). Das Gehtraining muss jedoch, wenn es effektiv sein soll, mindestens jeweils über 30 Minuten 3-5 mal pro Woche stattfinden. (Stewart *et al.* 2002) Bei einem streng professionellen und dauerhaft überwachtem Gehtraining verlängern sich die maximale schmerzfreie Gehstrecke und die maximale Gehstrecke um über 100 % (Gardner & Poehlman 1995, Leng *et al.* 2000). Das in „Eigenregie“ durchgeführte Gehtraining wird meist, aufgrund mangelnder Motivation, nicht konsequent durchgeführt und ist daher nicht effektiv. Auch können andere Erkrankungen die Belastbarkeit des Patienten schon erheblich einschränken (z. B. diabetische Druckläsionen am Fuß, schwere kardiale Erkrankungen) und damit ein konsequentes Gehtraining erschweren.

Medikamentöse Therapien

Zur medikamentösen Therapie der Symptome der PAVK stehen nur wenige Substanzen zur Verfügung. In den USA sind von der Food and Drug Administration (FDA) nur zwei Medikamente (Pentoxifyllin, Cilostazol) zugelassen. In Europa werden weiterhin noch Naftidrofuryl und Buflomedil eingesetzt. Neue Therapiemöglichkeiten sind therapeutische Angiogenese, Behandlung mit Statinen oder Substanzen (z. B. Propionyl-L-Carnitin), die den Muskelstoffwechsel beeinflussen. Hierzu sind allerdings noch weitere Studien notwendig, um eine Effektivität sicher nachzuweisen.

Cilostazol

Cilostazol ist ein 2-Oxoquinolon Derivat, das selektiv die Phosphodiesterase III (PDE III) inhibiert. Die Wirkmechanismen von Cilostazol zur symptomatischen Behandlung der Claudicatio intermittens sind noch nicht vollständig geklärt.

Die PDE III kommt hauptsächlich in Thrombozyten, glatten Muskelzellen und in Herzmuskelzellen vor (Beavo 1995). Sie baut zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) in der Zelle ab. Durch die Inhibition der PDE III durch Cilostazol kommt es zu erhöhten cAMP Spiegeln (Physician Prescribing Information, Pletal, Otsuka Pharmaceuticals). cAMP führt

Literaturübersicht

zum Beispiel in den glatten Muskelzellen über die cAMP abhängige Proteinkinase zum Schließen der Ca^{2+} Kanäle und zu einer Aktivierung der Ca^{2+} Pumpe im Sarkoplasmatischen Retikulum und damit zu einer Erniedrigung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration. Dies führt zur Dephosphorylierung der Myosin leichten Kette und damit zur Vasodilatation (Tanaka *et al.* 1988, Kohda *et al.* 1999). Dabei ist die vasodilatatorische Wirkung in den peripheren Gefäßen stärker, als in den vertebralen und mesenterialen Gefäßen. In den renalen Gefäßen zeigt Cilostazol keine vasodilatatorische Wirkung (Physician Prescribing Information, Pletal, Otsuka Pharmaceuticals). Cilostazol hemmt über cAMP die primäre und die sekundäre Phase der Plättchenaggregation, induziert durch ADP, Kollagen oder Arachidonsäure, etwa zehnmal stärker als Aspirin (Kimura *et al.* 1985). Trotzdem führt es nicht zu einer Verlängerung der Blutungszeit, wenn es simultan mit Aspirin oder Clopidogrel eingesetzt wird (Wilhite *et al.* 2003). Cilostazol hat außerdem eine hemmende Wirkung auf die Proliferation von glatten Muskelzellen *in vitro* (Takahashi *et al.* 1992). Aber auch *in vivo* konnte gezeigt werden, dass Cilostazol eine Restenose, infolge einer vermehrten Proliferation von glatten Muskelzellen, nach einer Ballonkatheterdilatation verhindert (Ishizaka *et al.* 1999, Aoki *et al.* 2001). Zusätzlich induziert Cilostazol eine endothelabhängige Relaxation und verbessert gleichzeitig die NO Verfügbarkeit (Nakamura *et al.* 2001, Ito *et al.* 2002). Auch eine positive Wirkung auf das Lipidprofil konnte in klinischen Studien für Cilostazol nachgewiesen werden. Es erhöht den Anteil an HDL um 10 % und verringert gleichzeitig die Triglyceridspiegel um etwa 15 % (Elam *et al.* 1998).

In acht klinischen Studien mit insgesamt 2702 Patienten hat die Behandlung mit Cilostazol zu einer klinisch relevanten, signifikanten Verlängerung der maximalen schmerzfreen und der maximalen Gehstrecke um 32 % – 59 % im Vergleich zu Placebo geführt (Dawson 2001). Eine retrospektive Metaanalyse von sechs klinischen Studien mit 1751 Patienten hat außerdem gezeigt, dass Cilostazol nicht nur zu einer signifikanten Gehstreckenverlängerung, sondern auch zu einer Verbesserung der Lebensqualität führt (Regensteiner *et al.* 2002). Nebenwirkungen treten bei etwa 10 % der behandelten Patienten auf. Dazu gehören zum Beispiel Kopfschmerzen, abnormer Stuhlgang, Diarrhoe und Tachykardien. Limitierend einsetzbar ist Cilostazol bei Patienten mit Herzinsuffizienz, wegen der Gefahr einer erhöhten Mortalität, die mit Substanzen dieser Klasse (PDE III Inhibitoren) assoziiert ist (Jacoby & Mohler, III 2004). Da alle Patienten mit PAVK eine erhöhte Inzidenz an kardiovaskulären Erkrankungen haben, sollten alle Patienten, die mit Cilostazol behandelt werden, regelmäßig auf das Vorhandensein einer Herzinsuffizienz untersucht werden.

Pentoxifyllin

Pentoxifyllin, ein Methyl-Xanthin Derivat, wirkt als unspezifischer Phosphodiesterase Inhibitor. Pentoxifyllin ist ein hämorrheologisch wirksames Agens. Es führt zu einer Verringerung der Blutviskosität, erhöht die Verformbarkeit von Erythrozyten und verringert die Plättchenaktivität und die Hyperkoagulabilität des Plasmas. Ob dies allerdings die Grundlage der Wirkung von Pentoxifyllin bei der PAVK darstellt, ist nicht einwandfrei bewiesen (Dawson 2001). Andere Untersuchungen gehen davon aus, dass Pentoxifyllin eher eine Wirkung auf die weißen Blutkörperchen hat und zum Beispiel die Funktion der Neutrophilen (Currie *et al.* 1991) oder die Zytokinproduktion (Thanhauser *et al.* 1993) beeinflusst.

Mehrere kleinere Studien haben eine geringfügige Wirkung von Pentoxifyllin auf die maximale schmerzfreie Gehstrecke gezeigt (Girolami *et al.* 1999). Eine Wirkung auf die Lebensqualität wurde hierbei nicht untersucht. In einer neueren großen Studie (Dawson *et al.* 2000) mit 689 Patienten wurde eine Behandlung mit Cilostazol mit einer Pentoxifyllin Behandlung verglichen. Mit 239 Patienten in der Pentoxifyllingruppe war es für diese Substanz, die größte bisher durchgeführte Placebo kontrollierte Studie (Hiatt 2004). Pentoxifyllin führte im Vergleich zur Placebogruppe zu keiner Verbesserung der maximalen schmerzfreien und der maximalen Gehstrecke. Dahingegen ergab sich für Cilostazol, im Vergleich zu Placebo, eine signifikante Verbesserung der maximalen schmerzfreien und der maximalen Gehstrecke. Die Wirksamkeit von Pentoxifyllin gilt seither für die Behandlung von Patienten mit PAVK als umstritten (Hiatt 2004).

Als wichtigste Nebenwirkung ist die Möglichkeit des Auftretens von Netzhautblutungen zu nennen.

Naftidrofuryl

Naftidrofuryl inhibiert den Serotonin 5 HT₂ Rezeptor und führt zu einer peripheren Vasodilatation und einem verbesserten aeroben Stoffwechsel (Lehert *et al.* 1990). Naftidrofuryl ist in Europa seit mehr als 20 Jahren zur Behandlung der Claudicatio intermittens zugelassen.

In einigen Studien (Maass *et al.* 1984) konnte eine Verlängerung der maximalen schmerzfreien Gehstrecke nachgewiesen werden. Eine neuere Studie (Kieffer *et al.* 2001) zeigte zusätzlich zu einer Verlängerung der maximalen schmerzfreien Gehstrecke um 92 %, eine Verlängerung der maximalen Gehstrecke um 83 %. Dahingegen wurde jedoch in einer

Metaanalyse (Girolami *et al.* 1999) nur ein geringfügiger Effekt auf die maximale schmerzfreie Gehstrecke und die maximale Gehstrecke nachgewiesen.

Nebenwirkungen sind meist gastrointestinaler Natur, aber auch Kopfschmerzen, Schwindel, Bewusstlosigkeit und Leberentzündungen sind möglich. Intravenöse Applikationen werden weltweit nicht mehr praktiziert, da eine tödlich verlaufende Herzmuskel- und Neurotoxizität vorkommen kann. Auch das Auftreten eines akuten Nierenversagens nach intravenöser Applikation ist möglich. Außerdem ist Naftidrofuryl kontraindiziert bei Patienten mit Hyperoxalurie oder wiederholtem Auftreten von kalziumhaltigen Nierensteinen (Jacoby & Mohler, III 2004).

Buflomedil

Buflomedil ist nur in Europa zu Behandlung der PAVK zugelassen. Buflomedil wirkt über eine α_1 - und α_2 - Rezeptor Blockade vasodilatatorisch. Seine geringe Ca^{2+} - antagonistische Wirkung führt zu Plättchenaggregationshemmung und Veränderungen der Erythrozytenverformbarkeit (Dawson 2001).

Eine Metaanalyse mit 744 Patienten zeigte, dass es bei mit Buflomedil behandelten Patienten im Mittel zu einer 60 % igen Verbesserung der maximalen schmerzfreien Gehstrecke kam. Als Nebenwirkungen können gastrointestinale Beschwerden, Kopfschmerzen, Schwindel, Synkopen und Pruritus auftreten (Jacoby & Mohler, III 2004).

Prostanoide

Zur Behandlung der PAVK, vor allem im Stadium III und IV, sind verschiedene Prostanoide (Prostazyklin I_2 (PGI_2) und Prostaglandin E_1 (PGE_1)), aufgrund ihrer thrombozytenaggregationshemmenden und vasodilatatorischen Wirkung, einsetzbar. Zusätzlich dazu ist für PGE_1 eine Hemmung der Leukozytenaktivierbarkeit *in vitro* und eine Verminderung der Spiegel löslicher Adhäsionsmoleküle (z. B. VCAM-1) nachgewiesen. Dadurch könnten die positiven Effekte von PGE_1 auf die lokale Durchblutung bei Patienten mit PAVK erklärt werden. Auch eine Verbesserung der endothelialen Funktion wird diskutiert (Schorr & Hohlfeld 2004).

Eine intravenöse oder intraarterielle Applikation von PGI_2 führte bei Patienten im Stadium III oder IV zu einer Verminderung der Schmerzen in Ruhe und zu einer beschleunigten Heilung von Ischämie bedingten Ulzerationen. Auch das stabilere Prostazyklin Iloprost zeigte in einer Studie, im Vergleich zu Placebo, eine signifikante Verminderung der Schmerzen in Ruhe und

fürte zu einer beschleunigten Heilung von Ischämie bedingten Ulzerationen (Baumgartner *et al.* 2005). Auch bei PAVK im Stadium II können Prostanoiden eine Wirksamkeit zeigen. In einer Metaanalyse (Reiter *et al.* 2002) wurde gezeigt, dass Patienten auch mit PAVK im Stadium II nach Fontaine von einer Behandlung mit Prostaglandin E₁ profitieren können. Die Behandlung mit PGE₁ führte zu einer signifikanten Verlängerung der maximalen schmerzfreien und der maximalen Gehstrecke. Allerdings wird PGE₁ schon über die erste Lungenpassage sehr schnell inaktiviert (bis zu 90%) (Piper *et al.* 1970) und muss daher für zwei bis vier Wochen täglich, jeweils über mehrere Stunden intraarteriell verabreicht werden. Dies macht die Anwendung in der täglichen Praxis eher schwierig (Baumgartner *et al.* 2005). Die Behandlung mit dem oral verfügbaren PGI₂ Analogon Beraprost führte jedoch nur in einer Studie zu einer Verbesserung der Symptome (Lievre *et al.* 2000). Zwei andere Studien zeigten dahingegen keinen Effekt von Beraprost auf die maximale Gehstrecke (Mohler III *et al.* 2003b). Aus diesem Grund hat sich die orale Behandlung mit Prostanoiden bisher nicht durchgesetzt.

Neue Therapiemöglichkeiten (Statine, Propionyl-L-Carnitin, Gentherapie)

Statine werden in der Therapie der PAVK bereits zur Senkung der Cholesterinspiegel und damit zur Senkung des allgemeinen kardiovaskulären Risikos eingesetzt. Zusätzlich dazu werden Effekte diskutiert, die auch direkt eine positive Wirkung (z. B. über die Aktivierung des NO/cGMP Signaltransduktionsweges) auf die PAVK haben könnten. In einigen Studien wurde daher untersucht, ob Statine einen Einfluss auf die Symptome der PAVK haben könnten. In einer Studie (Mondillo *et al.* 2003) zeigte die Behandlung mit Simvastatin einen deutlichen Einfluss auf die maximale Gehzeit. Auch in einer anderen Studie (Mohler III *et al.* 2003a) konnte bei Patienten mit PAVK durch die Behandlung mit Atorvastatin eine signifikante Verbesserung der maximalen schmerzfreien Gehzeit auf dem Laufband und der allgemeinen körperlichen Aktivität, ermittelt durch einen Fragebogen, im Vergleich zu Placebo erreicht werden. Es sind allerdings noch weitere Studien notwendig, um die Wirksamkeit von Statinen sicher zu belegen.

Propionyl-L-Carnitin (PLC) soll den bei der PAVK veränderten Muskelstoffwechsel und die folgende Akkumulation von Acylcarnitin positiv beeinflussen (Hiatt *et al.* 2001). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass PLC bei PAVK Patienten mit einer Gehstrecke < 250m zu einer Verbesserung der maximalen schmerzfreien Gehstrecke führt (Brevetti *et al.* 1999). Dies konnte auch in einer anderen Studie gezeigt werden (Hiatt *et al.* 2001). Auch für PLC sind

Literaturübersicht

noch weitere Studien notwendig, um eine Wirksamkeit in der symptomatischen Behandlung der PAVK sicher zu bestätigen.

Die Gentherapie mit Wachstumsfaktoren oder deren direkte Applikation soll bei Patienten mit PAVK zu einer gesteigerten Arterio- und/oder Angiogenese führen und dadurch den Blutfluss in die entsprechende Muskulatur wiederherstellen. Zu den wichtigsten Wachstumsfaktoren gehören VEGF, HGF und FGF. Therapeutische Angiogenese gehört zu den vielversprechendsten Therapiemöglichkeiten und wird nach Erfolgen (Lederman *et al.* 2002), aber auch Misserfolgen in Phase I und II (Rajagopalan *et al.* 2003a) in weiteren Studien getestet (van Royen *et al.* 2003, Rajagopalan *et al.* 2004). Diese Studien sind notwendig, um die Effektivität und Sicherheit der therapeutischen Angiogenese eindeutig zu belegen (Jacoby & Mohler, III 2004) und eventuelle Nebenwirkungen auszuschließen. Diskutiert wird hier eine, durch therapeutische Angiogenese induzierte, vermehrte Progression von klinisch inapparenten Tumoren und die Tatsache, dass eine therapeutische Angiogenese eventuell auch zu einer vermehrten Plaqueinstabilität bei Atherosklerose führen und so das Risiko für ischämische Ereignisse (Herzinfarkt, Schlaganfall) erhöht werden könnte (Isner *et al.* 2001).

2.5.2.2 Chirurgische Therapie

Die chirurgische Intervention ist meist Patienten im Stadium III/IV vorbehalten. Selten wird sie auch bei Patienten im Stadium IIb angewendet. Der Patient sollte hier dann auf jeden Fall bereits ein ärztlich überwachtes Trainingsprogramm, eine therapeutische Beeinflussung der Risikofaktoren und eine medikamentöse Therapie zu Behandlung der Symptome durchgeführt haben. Führt diese zu keiner Verbesserung der Symptome und der Patient blieb weiterhin in seiner Leistungsfähigkeit massiv eingeschränkt, sollte eine chirurgische Intervention in Betracht gezogen werden. Geklärt werden sollte allerdings auch, ob eine solche Maßnahme überhaupt zu einer Steigerung der Leistungsfähigkeit führen kann oder ob zusätzlich noch andere funktionell einschränkende Erkrankungen (z. B. Angina pectoris, Neuropathie, degenerative Gelenkerkrankungen) vorliegen, die durch einen solchen Eingriff nicht beeinflusst werden (Dawson *et al.* 2002).

Interventionelle Katheterverfahren

Diese haben heute einen festen Platz in der Therapie von Patienten mit PAVK. Dazu gehören die perkutane transluminale Angioplastie (PTA), die Stentimplantation, Rotationsangioplastie, und die Laserangioplastie. Ziel dieser Verfahren ist eine Verminderung der Schmerzen in Ruhe, einer beschleunigten Heilung von Ischämie bedingten Ulzerationen und der Erhalt der Extremität. Diese Methoden können allerdings nur bei einzelnen, kurzstreckigen Stenosen angewandt werden. Eine begleitende medikamentöse Therapie mit Heparin und Azetylsalizylsäure ist notwendig (Lawall 2002).

Operative Eingriffe

Dazu gehört die verschlussumgehende Bypassoperation mit körpereigenen Venen und wenn dies nicht möglich ist, der prothetische Gefäßersatz. Primäres Ziel dieses Eingriffs ist es, die Amputationgrenze nach distal zu verschieben bzw. die Heilung von Ischämie bedingten Ulzerationen zu erreichen. Auch hier ist postoperativ eine Behandlung mit Plättchenaggregationshemmern (ASS) und Antikoagulantien (Heparin) indiziert. Diese operativen Eingriffe sind alle mit verschiedenen Früh- und Spätkomplikationen, wie erheblichen Wundheilungsstörungen und einem erneutem Verschluss der Stenose, verbunden (Lawall 2002).

2.6 Präklinische Modelle für die Indikation PAVK

Um neue Substanzen, die zur Behandlung der PAVK im Stadium II nach Fontaine in Frage kommen zu evaluieren, bedarf es aussagekräftiger präklinischer Tiermodelle. Diese sollen die klinische Situation so genau wie möglich darstellen. Bisher etabliert sind verschiedene Tiermodelle, die allerdings nicht standardisiert sind und daher in den untersuchten Endpunkten kaum zu vergleichen sind.

Longland (Longland 1953) beschrieb in den 50iger Jahren ein Modell der chronischen Hinterlaufischämie. Dabei spritzte er eine Mischung aus Thrombin und einem Sklerosant in die A. femoralis von Ratten und erreichte damit eine Stenosierung des Gefäßes. Dieses Verfahren war aber mit hohen Tierverlusten verbunden und daher nicht praktikabel, stellte aber das Gerüst für spätere Modelle dar (Waters *et al.* 2004). Eine andere Möglichkeit der Durchblutungseinschränkung ist die „Stau Methode“, bei der ein Stauschlauch proximal um die gesamte Gliedmaße gelegt wird (Barie & Mullins 1988). Nachteile sind hier aber, dass nur akute Untersuchungen möglich sind, da nach einigen Stunden Gewebnekrosen in der entsprechenden Muskulatur auftreten, und dass mit einem Stauschlauch natürlich auch alle Kollateralgefäße abgebunden werden (Waters *et al.* 2004). Daher wurden zur chronischen Einschränkung der Durchblutung in der Beinmuskulatur einfache Ligaturen der peripheren Gefäße durchgeführt. Dazu sind verschiedene Techniken etabliert worden, die die Durchblutung in Ruhe in unterschiedlichem Maße einschränken. Die einfache Ligatur der A. femoralis bei der Ratte, proximal der Abzweigung der A. epigastrica superficialis, führte bei der Arbeitsgruppe von Challiss (Challiss *et al.* 1986) zu keiner signifikanten Durchblutungseinschränkung in Ruhe. Die Blutversorgung konnte wahrscheinlich über Kollateralgefäße aufrechterhalten werden. Dahingegen führte die komplette Exzision der A. femoralis, von ihrem Ursprung aus der A. iliaca externa bis zu ihrer Aufzweigung in die A. saphena und die A. poplitea und der Ligation aller ihrer Seitenäste, bei Kaninchen (Hershey *et al.* 2001, Hong *et al.* 2001), Ratten (Takeshita *et al.* 2001) und Mäusen (Couffinhal *et al.* 1998) zu einer stärkeren Durchblutungseinschränkung. Sie konnte hier in Ruhe für etwa eine Woche aufrechterhalten werden. Eine Steigerung davon ist die einfache Ligatur der A. iliaca communis, die eine Blutversorgung nur noch über Kollateralgefäße erlaubt. Sie führte in Ruhe, bis zu 2 Wochen lang, zu signifikanten Einschränkungen im Blutfluss (Fulgenzi *et al.* 1998). Eine weitere Steigerung ist das Modell von Janiak und Kollegen. Er kombinierte die Exzision der A. femoralis und der A. iliaca externa mit einer Embolisation der A. iliaca interna mittels Mikrosphären, um von dort ausgehende Kollateralgefäße auszuschliessen und

so die Durchblutungseinschränkung zu verlängern. Vierzehn Tage nach der Exzision und Embolisation war die Durchblutung im ischämischen Bein damit noch um etwa 50 % reduziert (Janiak *et al.* 2002). Bei der Ligatur der Aorta direkt über der Bifurcation kommt es zu einer bilateralen Durchblutungseinschränkung (Doi *et al.* 2000). Die Einschränkung der Durchblutung in Ruhe wurde in dieser Arbeit nicht beschrieben, man kann aber von einer Einschränkung ausgehen, die in etwa im Bereich der unilateralen Ligatur der A. iliaca communis liegt.

In all diesen Modellen mit gesunden Tieren folgten der Induktion der unilateralen Hinterlaufischämie starke endogene Mechanismen, die nach unterschiedlichen Zeitspannen zu einer relativen Kompensation der Durchblutungseinschränkung in Ruhe führten. Diese Kompensationsfähigkeit ist dagegen bei Tieren mit bestimmten Vorerkrankungen deutlich eingeschränkt (Waters *et al.* 2004). Als solches pathologisches Tiermodell eignen sich Tiere mit Diabetes (Janiak *et al.* 2002), mit Hyperhomozysteinämie (Duan *et al.* 2000), mit Hypercholesterolämie (Couffinhal *et al.* 1999), eNOS -/- Mäuse (Murohara *et al.* 1998) oder gealterte Tiere (Rivard *et al.* 1999). Diese pathologischen Modelle sind auch enger an die klinische Situation von Patienten mit PAVK angepasst, da diese zusätzlich meist Co-Morbiditäten (Risikofaktoren wie Diabetes oder Hypercholesterolämie) aufweisen.

Endpunkte, die mit präklinischen Modellen untersucht werden können, sind zum Beispiel die Durchblutung oder die Muskelfunktion unter Belastung. Durchblutungsmessungen sind in verschiedenen Modellen in unterschiedlichsten Formen durchgeführt worden. Die am häufigsten verwendete Methode ist die histologische Auswertung der Kapillarisation der Muskulatur, die Rückschlüsse auf das arterio-/angiogenetische Potential einer Behandlung, und damit ihren Einfluss auf die Durchblutung geben soll (Waters *et al.* 2004). Hierfür werden die Kapillaren immunhistochemisch (z. B. alkalische Phosphatase/Lectin BSI) angefärbt und mit der Anzahl der Muskelzellen ins Verhältnis gesetzt. Die Kapillarisation im ischämischen Bein wird mit der Kapillarisation im gesunden Bein verglichen (Brown *et al.* 2003). Auch eine angiographische Darstellung von Kollateralgefäßen wird häufig verwendet (Brevetti *et al.* 2003). Die Durchblutung der Muskulatur im ischämischen Bein kann außerdem *in vivo*, nicht invasiv, durch die Messung des Perfusionsdruckes im ischämischen Hinterlauf bestimmt werden. Hong und Kollegen führten 2001 diese Messung beim anästhesierten Kaninchen durch. Hierbei wurde mittels eines Oszillographen und einer Druckmanschette der mittlere Blutdruck am Hinterlauf bestimmt. Die Messung wurde gleichzeitig an beiden Hinterläufen durchgeführt. Das nicht ischämische Bein wurde als interne Kontrolle verwendet. Dargestellt wurde der Perfusionsdruckindex als Verhältnis des

Literaturübersicht

Perfusionsdrucks im ischämischen Hinterlauf zum Perfusionsdruck im nicht ischämischen Hinterlauf (Hong *et al.* 2001).

Eine weitere Möglichkeit der nicht invasiven Messung des Blutflusses zur unteren Extremität ist die Methode des „laser doppler imaging“ (LDI). Dabei wird ein Laserstrahl auf die Hautoberfläche gerichtet und Servomotoren führen den Laserstrahl dann exakt von Meßpunkt zu Meßpunkt. Dies ermöglicht eine Darstellung der Mikrozirkulation innerhalb größerer Areale, wie z. B. dem gesamten Hinterlauf. Das reflektierte dopplerverschobene Licht wird zur Darstellung eines farbcodierten Bildes der mikrovaskulären Blutströmung in 2 mm Tiefe verwendet. Helle Farben stehen für einen hohen Fluss, während dunkle Farben für niedrigen Blutfluss stehen. Die mittlere Durchblutung im ischämischen Bein wird mit der im nicht ischämischen Bein ins Verhältnis gesetzt (Couffinhal *et al.* 1998, Rivard *et al.* 1999).

Eine invasive Messung des Blutflusses zur unteren Extremität ist die Implantation von Fluss-Sonden über die hauptzuführenden Arterien (z. B. A. iliaca communis). Folgend wird die maximale vasodilatatorische Reserve, definiert als maximale Blutflusssteigerung in der A. iliaca communis, infolge eines kurzzeitigen Verschlusses der abdominellen Aorta bestimmt (Janiak *et al.* 2002). Auch die Verwendung von Mikrosphären ist eine direkte, aber invasive Möglichkeit die Durchblutung der Muskulatur zu messen (Laughlin *et al.* 1982). Die Mikrosphären können entweder radioaktiv (Yang & Feng 2000) oder mit Fluoreszenz markiert (Brevetti *et al.* 2001) sein und werden über einen Katheter direkt in den linken Ventrikel (Challiss *et al.* 1986) oder in die Aorta descendens (Yang *et al.* 1995) appliziert. Dies kann zunächst in Ruhe und später unter Belastung stattfinden, um die jeweils unterschiedliche Durchblutung zu bestimmen. Um die Belastung darzustellen, wurden von verschiedenen Gruppen unterschiedliche Muskelstimulationsmodelle etabliert. Die Arbeitsgruppe von Elander (Elander *et al.* 1985) stimulierte die mit einem Kraftaufnehmer verbundene, freipräparierte Wadenmuskulatur (M. soleus, M. plantaris, M. gastrocnemius) mit bipolaren Elektroden über den Nervus ischiadicus mit einer Frequenz von 4 Hz, einer Breite von 0,4 ms und einer Spannungsstärke von 2-4 V am anästhesierten Tier. Eine andere Arbeitsgruppe (Fulgenzi *et al.* 1998) dahingegen stimulierte den mit einem Kraftaufnehmer verbundene M. tibialis anterior und den M. extensor digitalis longus mit bipolaren Elektroden über den Nervus ischiadicus mit einer Frequenz von 4 Hz, einer Breite von 0,3 ms und einer Spannungsstärke von 5-6 V über fünf Minuten, um den maximalen Blutfluss zu bestimmen. Dinn und Kollegen etablierten ein Laufbandmodell, bei dem der Blutfluss am wachen Tier während der Laufbelastung bestimmt werden konnte (Dinn *et al.* 1990).

Direkte Messungen der Muskelfunktion unter Belastung wurden in präklinischen Modellen seltener durchgeführt. Die italienische Arbeitsgruppe um Fulgenzi zum Beispiel wertete zusätzlich zu der Durchblutung unter Belastung, auch die Muskelkraft unter Belastung aus. Gemessen wurde hierbei die maximal erreichte Kraft im ischämischen Bein zu Beginn der Stimulation und am Ende der Stimulation nach fünf Minuten. Diese Werte wurden dann miteinander ins Verhältnis gesetzt und als „Fatigue Index“ in % dargestellt (Fulgenzi *et al.* 1998). Ähnliche Messungen der Muskelkraft führten auch andere Arbeitsgruppen (Okyayuz-Baklouti *et al.* 1989, Doi *et al.* 2000) durch. In anderen Modellen wurde die maximale Ausdauerleistung von Ratten mit bi/unilateraler Hinterlaufischämie auf dem Laufband (Dinn *et al.* 1990, Yang *et al.* 1995) und im Laufrad (Okyayuz-Baklouti *et al.* 1989) nach einem strengen Trainingsprogramm bestimmt. Dahingegen wurde in einer japanischen Arbeitsgruppe nicht die Zeit ermittelt bis die Tiere maximal erschöpften, sondern die Zeit bis sich spezifische Gangveränderungen, als erstes Anzeichen der Erschöpfung, bei den Tieren zeigten (Orito *et al.* 2004).

2.7 Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, neue Tiermodelle für die Indikation Claudicatio intermittens zu entwickeln. Dabei sollten die Modelle folgende Kriterien erfüllen:

Die klinische Situation von Patienten mit PAVK im Stadium II (Claudicatio intermittens) sollte möglichst genau wiedergespiegelt werden. Außerdem sollten die Modelle validiert werden, indem gezeigt wird, dass der derzeitige pharmakologische Gold-Standard in der Therapie, Cilostazol, in diesen Modellen klinisch relevante Endpunkte positiv beeinflusst.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere und ihre Haltung

Für die Studie mit Ratten wurden männliche diabetische (Zucker diabetic fatty rats (ZDF/Gmi/Crl-(fa/fa)) und männliche nicht diabetische (Zucker diabetic lean rats (ZDF/Gmi/Crl-(fa/lean)) Tiere eingesetzt (Charles River Deutschland, Sulzfeld). Sie waren bei Versuchsbeginn zwischen 16-18 Wochen alt und wogen im Mittel 380 g. Die Ratten wurden auf Weichholzgranulat jeweils zu zweit in Makrolonkäfigen Typ IV S gehalten. Für die Studie mit Mäusen wurden weibliche C57BL/6 Mäuse und männliche eNOS-/- Mäuse eingesetzt (Charles River Deutschland, Sulzfeld). Die Mäuse für die Laufradmessungen wurden einzeln in Makrolonkäfigen Typ IV S mit Laufrad gehalten. Sie waren zu Beginn des Versuches zwischen 7-10 Wochen alt und wogen im Mittel 20 g. Die Raumtemperatur in allen Tierställen lag bei 20 – 24 °C und die relative Luftfeuchtigkeit lag bei 50 ± 20 %. Die Raumtemperatur und die Luftfeuchtigkeit wurden permanent über ein zentrales Überwachungssystem kontrolliert. Durch ein Lichtprogramm lag die Tagphase beim künstlichen Tag/ Nachtrhythmus im Zeitraum zwischen 6.00 und 18.00 Uhr. Futter (ssniff® R/M-H, Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und Wasser (Leitungswasser aus Tränkeflaschen) standen den Tieren frei zur Verfügung.

3.2 Behandlung

3.2.1 Cilostazol

Cilostazol wurde als pharmakologischer Gold-Standard in der Therapie der PAVK im Stadium II nach Fontaine zur Validierung der neuen Tiermodelle eingesetzt.

Cilostazol wurde in allen Studien oral über das Futter in einer Dosierung von 2500 ppm verabreicht. Die tägliche Dosis lag bei Ratten bei etwa 180 mg/kg/d (Orito *et al.* 2004) und bei Mäusen bei 340 mg/kg/d.

3.3 Studienprotokolle

3.3.1 Tiermodelle an der Ratte

3.3.1.1 Invasive Messung der Muskelermüdung

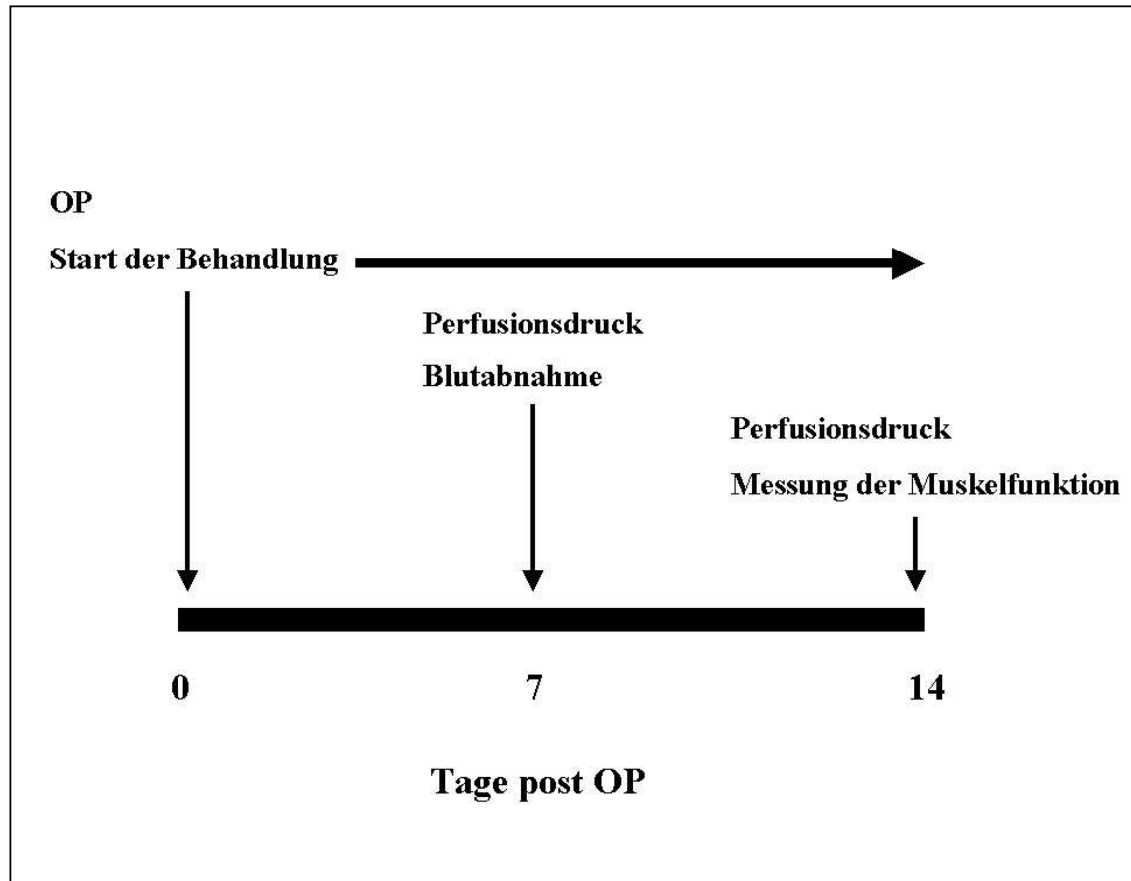


Abbildung 3-1

Studienplan Ratte-1:

An Tag 0 wurde eine unilaterale Hinterlaufischämie induziert. Sieben Tage später wurden die Perfusionsdrücke gemessen. An Tag 14 wurden erneut Perfusionsdruckmessungen an den Hinterläufen durchgeführt und es wurde invasiv die Muskelermüdung gemessen.

3.3.1.2 Nicht invasive Messung der Muskelermüdung

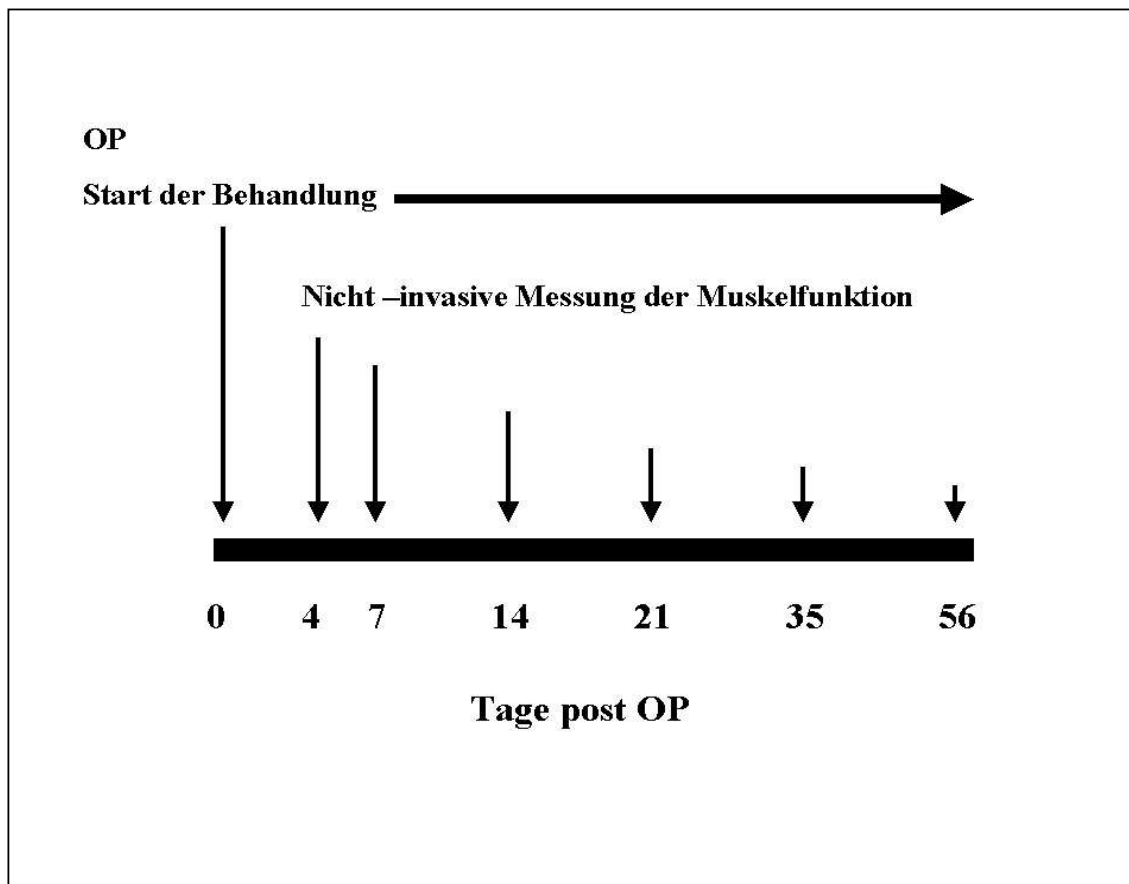


Abbildung 3-2

Studienplan Ratte-2:

An Tag 0 wurde eine unilaterale Hinterlaufischämie induziert. Vier, sieben, vierzehn, einundzwanzig, fünfunddreißig und sechsundfünfzig Tage später wurde die ischämie-bedingte Muskelermüdung nicht invasiv gemessen.

3.3.2 Tiermodell an der Maus

3.3.2.1 Messung der Laufleistung

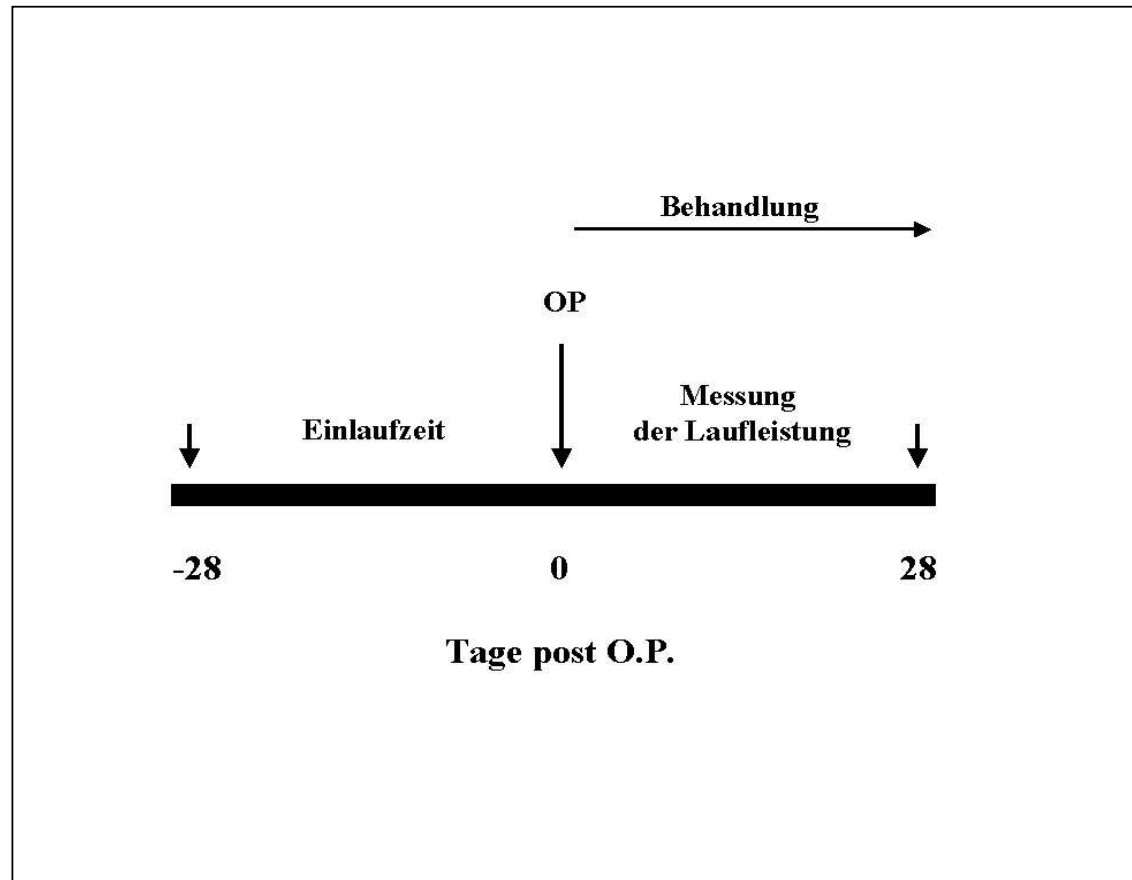


Abbildung 3-3

Studienplan Maus-1:

Nach einer vierwöchigen Einlaufzeit wurde bei den Mäusen eine bilaterale Hinterlaufischämie induziert. Darauf folgten die kontinuierliche Messung der Laufleistung über einen Zeitraum von vier Wochen.

3.4 Versuchsdurchführung

3.4.1 Tiermodelle an der Ratte

3.4.1.1 Induktion der unilateralen Hinterlaufischämie

Die Ratte wurde gewogen und in einer Narkosebox (Feinmechanische Werkstatt Sanofi-Aventis, H. Wohnig, Frankfurt a. Main) mit 5 Vol % Isofluran (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim) und einem Luftfluss von 1 l/min in Narkose gelegt. In Narkose wurde die Ratte in Rückenlage auf den beheizten Narkoseplatz (FMI GmbH, Seeheim/Ober-Beerbach) umgelagert. Hier wurde die Narkose über eine Maske mit 3 Vol % Isofluran und einem Luftfluss von 0,4 l/min aufrechterhalten. Die Haare im Bereich des ventralen Abdomen wurden abrasiert und das Operationsfeld mit Cutasept®F (Bode Chemie, Hamburg) desinfiziert. Der Hautschnitt verlief vom Nabel an etwa 2 cm nach kaudal. Das Abdomen wurde dann mit einer Metzenbaumschere vorsichtig paramedian der Linea alba eröffnet. Unter stereomikroskopischer Sicht (MZ6, Leica, Wetzlar) wurde mittels Wattestäbchen die Bifurkation der Aorta und die beiden Aa. iliacae communes freipräpariert. Die rechte A. iliaca communis wurde mit einer kleinen Pinzette von der Bifurkation bis etwa 1 cm nach distal von dem umliegenden Gewebe abgelöst. Mit Seide (5/0 Seide, Vömel, Kronberg) wurde die A. iliaca communis 5 mm distal der Bifurkation ligiert (Fulgenzi *et al.* 1998). Eine zweite Ligatur erfolgt dann 5 mm weiter distal und die Arterie wurde zwischen beiden Ligaturen mit einem Elektrokauter (ME 82, Martin Medizin Technik, Tuttlingen) durchtrennt.

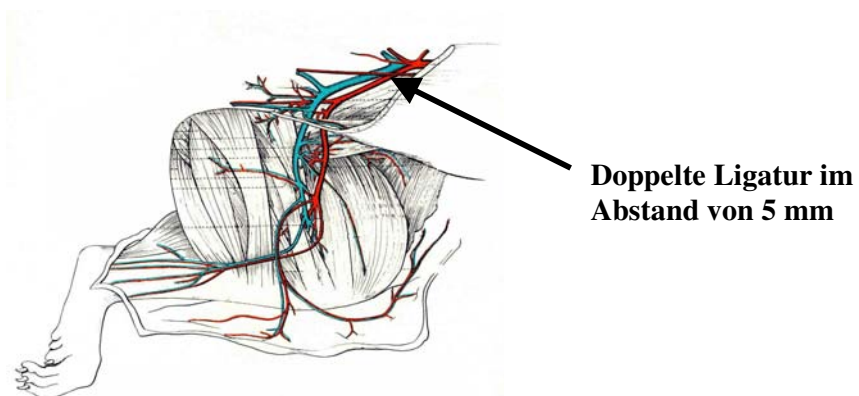


Abbildung 3-4

Anatomische Darstellung der Gefäße am Hinterlauf der Ratte.

Material und Methoden

Peritoneum und Bauchmuskulatur wurden mit einer fortlaufenden Naht (3-0, Vicryl, Ethicon, Johnson and Johnson Intl., St-Stevens-Woluwe, Belgien) verschlossen. Auch die Unterhaut wurde fortlaufend genäht (5-0, Vicryl, Ethicon, Johnson and Johnson Intl., St-Stevens-Woluwe, Belgien) und die Haut zusätzlich mit Klammern verschlossen. Postoperativ erhielten die Ratten ein Analgetikum (0,02mg/kg Temgesic, s.c., Essex Pharma GmbH, München). Die Ratten wurden postoperativ überwacht und folgend täglich kontrolliert.

3.4.1.2 Perfusionsdruckmessung

Vor, sowie sieben und vierzehn Tage nach der Induktion der unilateralen Hinterlaufischämie wurden Perfusionsdruckmessungen an den Hinterläufen der Ratte durchgeführt. Hierzu wurden die Ratten nach dem Wiegen mit 5 Vol % Isofluran in Narkose gelegt und auf einen beheizten Narkoseplatz umgelagert. Hier wurde die Narkose mit 1,6 Vol % Isofluran aufrechterhalten und die Körperkerntemperatur auf 37 - 38 °C reguliert. Zunächst wurden der Ratte 25 mm weite Druckmanschetten mit einer Breite von 1,6 cm (Perimed AB, Järfälla, Schweden) um die Hinterläufe gelegt. Diese wurden mittels einer selbstentwickelten „Hose“ an der Ratte fixiert, um ein Abrutschen der Druckmanschetten vom konisch geformten Rattenbein während der Messung zu verhindern. An der plantaren Seite des Fußes wurden mittels doppelseitigem Klebeband Lasersonden befestigt, die den Blutfluss registrieren. Dieser wurde digital an einem „Laser Doppler Flowmeter“ (Periflux 5000, Perimed AB, Järfälla, Schweden) angezeigt.

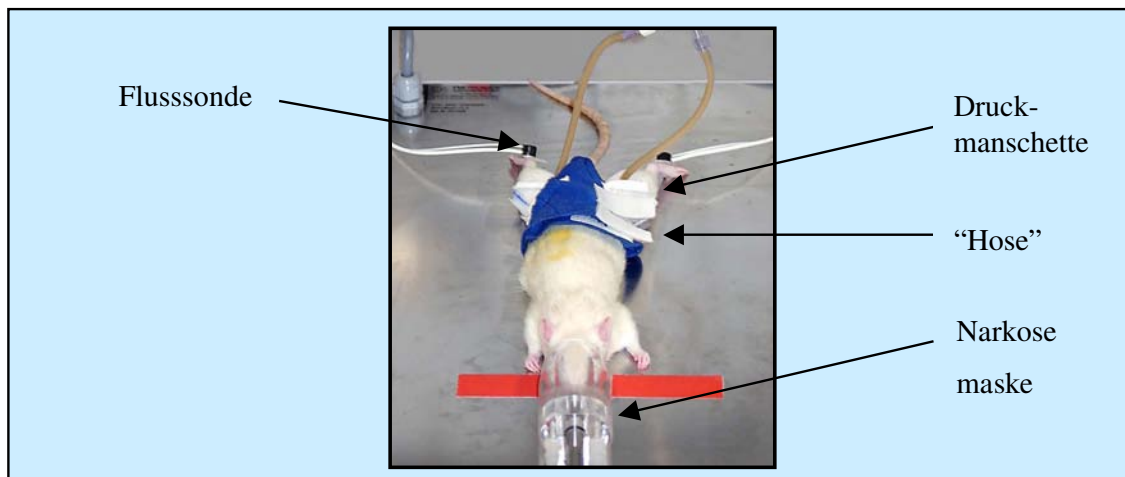


Abbildung 3-5

Ratte mit „Hose“ und Druckmanschetten zur Messung der Perfusionsdrücke

Material und Methoden

Vor Beginn der Messung lag eine zehnmünütige Equilibrierungsphase. Die Messung begann, indem die Druckmanschetten maximal aufgepumpt wurden. War kein Blutfluss mehr messbar, wurde der Manschettendruck linear abgelassen. Bei dem Druck, bei dem wieder ein Blutfluss messbar war, handelte es sich um den jeweiligen Perfusionsdruck. Die Perfusionsdrücke wurden dreimal im Abstand von drei Minuten bestimmt. Diese drei Messwerte wurden jeweils für das ischämische Bein und das nicht ischämische Bein gemittelt. Aus diesen Mittelwerten wurde dann der Index des Perfusionsdrucks errechnet. Der Perfusionsdruck Index stellt bei jedem Tier das Verhältnis vom Perfusionsdruck des ischämischen Beins zum Perfusionsdruck des nicht ischämischen Beins dar (Hong *et al.* 2001).

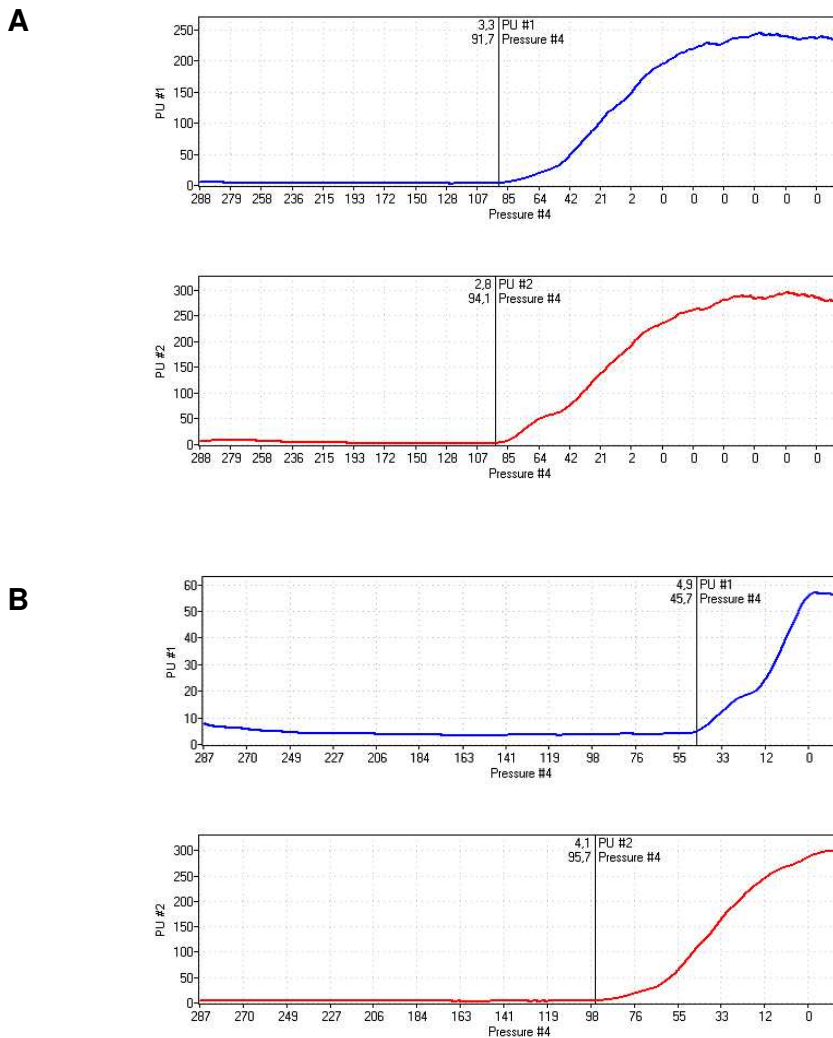


Abbildung 3-6

Exemplarische Darstellung einer Perfusionsdruckmessung im ischämischen Bein (blau) und im nicht ischämischen Bein (rot) vor der Ligatur, sowie vierzehn Tage nach der Ligatur.

3.4.1.3 Messung der Muskelermüdung (invasiv)

Vierzehn Tage nach der Induktion der unilateralen Hinterlaufischämie wurden Messungen der Ermüdung der Wadenmuskulatur unter Belastung durchgeführt. Die Ratte wurde in einer Narkosebox mit 5 Vol % Isofluran narkotisiert und anschließend in Rückenlage auf einen beheizten Narkoseplatz gelegt. Die Körperkerntemperatur wurde hier auf 37 - 38 °C gehalten. Das Fell wurde im Halsbereich und an den Hinterläufen abrasiert.

Nach einem medianen Hautschnitt mit einer chirurgischen Schere entlang des ventralen Halsbereichs und Auseinanderspreizen der Muskulatur, wurde die Trachea freipräpariert und mit einem Faden (3/0 Seide, Vömel, Kronberg) unterführt. Dann wurde mit einer kleinen Schere ein Schnitt zwischen zwei Trachealspangen durchgeführt. Durch diese Öffnung wurde eine Trachealkanüle geschoben und mit dem Faden festgeknotet. Die Trachealkanüle war mit einem universellen Respirator RUS-1301 der Firma FMI GmbH verbunden. Darüber wurde die Ratte mit einer Frequenz von 60 Atemzügen pro Minute und einer Inspirationsrate von 40 % mit 0,6 l/min Luft plus 3 Vol % Isofluran ventiliert.

Nun wurde die Haut über der Wadenmuskulatur (M. gastrocnemius, M. plantaris, M. soleus) mit einer chirurgischen Schere vorsichtig abgelöst. Die Faszie wurde zum Schutz der Muskeln belassen. Danach wurde die Achillessehne freigelegt und mit einem Faden (3/0 Seide, Vömel, Kronberg) sicher befestigt (Fulgenzi *et al.* 1998). Nach der Präparation wurde die Ratte auf den eigentlichen Messplatz umgelagert, die Pfoten wurden festgeklemmt und die Beine fixiert. Die Achillessehne wurde unterhalb des Knotens durchtrennt und mittels des Fadens mit einem Kraftaufnehmer (K1000, Typ 354, FMI GmbH, Seeheim/Ober-Beerbach) verbunden. Nun wurden in die Wadenmuskulatur Nadelelektroden im Abstand von etwa 12 mm platziert. Über diese Nadelelektroden erfolgte später mit dem Stimulator II (Typ 215/II, Hugo Sachs Elektronik, March- Hugstetten) die Stimulation der Muskeln zur Kontraktion. Die optimale Stimulation, die in Vorversuchen in unserem Labor ermittelt wurde, war ein Rechteckpuls mit einer Breite von 1 ms und einer Stromstärke von 15 mA. Der Verlauf der Kontraktionen wurde von einer speziellen Computer- Software (Notocord HEM, Notocord Systems, Croissy sur Seine, Frankreich) automatisch aufgezeichnet. Zu Beginn der Messung wurden die Wadenmuskeln für fünf Minuten auf 50 g vorgespannt. Dann folgten im Abstand von zwei Minuten zwei mal 30 Sekunden Kontraktionen mit einer Frequenz von 30 Kontraktionen pro Minute. Nach zweiminütiger Pause folgte die eigentliche Kontraktionsmessung mit 80 Kontraktionen pro Minute über zehn Minuten. Die Vorspannung von 50 g wurde konstant über den gesamten Zeitraum der Messung gehalten.

Material und Methoden

Die ausgewerteten Parameter sind in Tabelle 3-1 dargestellt:

Tabelle 3-1

Parameter zur Ermittlung der Muskelermüdung. Analysiert wurden diese nach fünf und nach zehn Minuten.

Bezeichnung	Formelzeichen	Einheit
Kontraktionskraft	F	g
Kontraktionsanstiegsgeschwindigkeit	dF/dt (max)	g/s
Relaxationszeit (25 %)	RZ	ms
Relaxationsgeschwindigkeit	dF/dt (min)	g/s

Als interne Kontrolle diente das nicht ischämische Bein. Die Werte wurden immer als Absolutwerte und als Verhältnis vom ischämischen zum nicht ischämischen Bein dargestellt.

3.4.1.4 Messung der Muskelermüdung (nicht invasiv)

Vier, sieben, vierzehn, einundzwanzig, fünfunddreißig und sechsundfünfzig Tage nach der Induktion der unilateralen Hinterlaufschämie wurden nicht invasive Messungen der Ermüdung der Wadenmuskulatur unter Belastung durchgeführt. Die Ratte wurde in einer Narkosebox mit 5 Vol % Isofluran in Narkose gelegt und dann in die von uns entwickelte „Stepper Apparatur“ (Feinmechanische Werkstatt Sanofi- Aventis, H. Wohnig, Frankfurt a. M.) umgelagert.

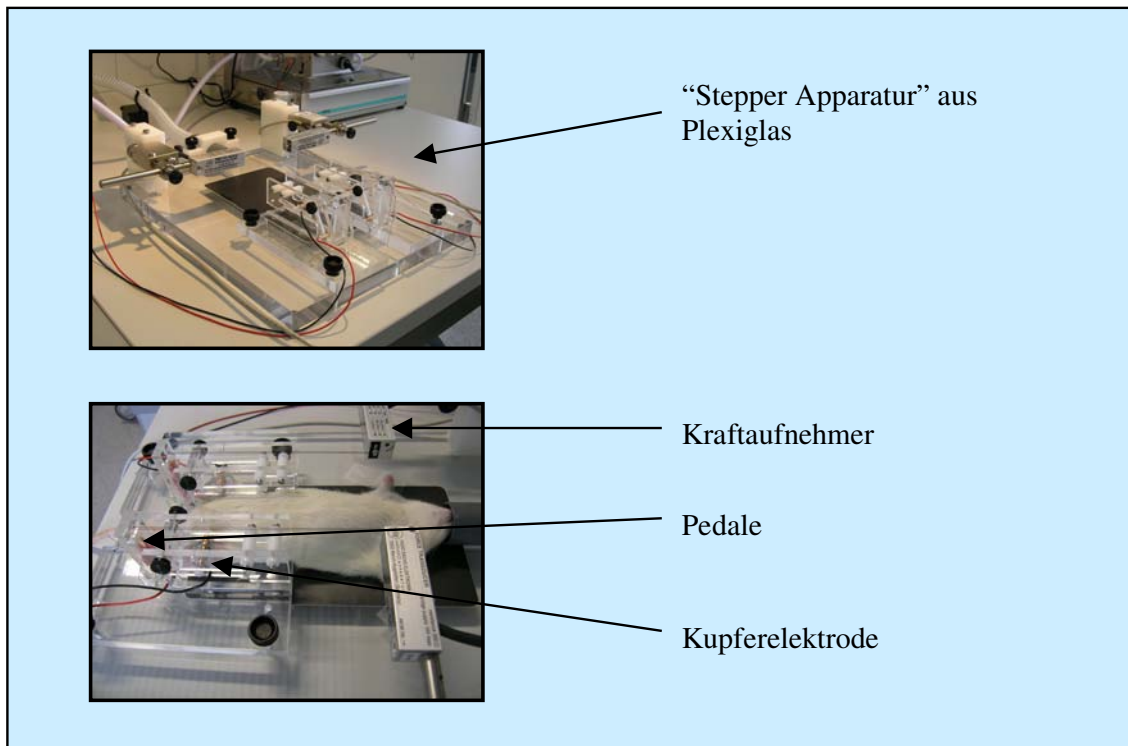


Abbildung 3-7

„Stepper Apparatur“ aus Plexiglas für die nicht invasive Messung der Muskelermüdung an der Ratte

Die aus Plexiglas gefertigte Apparatur besitzt eine integrierte Heizplatte, die eine konstante Körpertemperatur sicherstellt. Die Hinterläufe der Ratte wurden in speziell gefertigten Schienen fixiert, sodass die Achillessehne und der vordere Oberschenkel jeweils mit einer Elektrode Kontakt hatten. Die Elektroden bestehen aus einem Plastikstab, der mit Kupferfolie überzogen ist. Die Kupferfolie ist mit einem Kabel verlötet, welches mit dem Stimulator II (Typ 215/II, Hugo Sachs Electronik, March- Hugstetten) verbunden ist. Die Pfoten der Ratte wurden mit Klebefolie auf einer Pedale befestigt.

Material und Methoden

Die Pedalen waren jeweils über einen Faden (3/0 Seide, Vömel, Kronberg) mit je einem Kraftaufnehmer (K1000, Typ 354, FMI GmbH, Seeheim/Ober-Beerbach) verbunden. Zu Beginn der Messung wurden die Wadenmuskeln für drei Minuten auf 15 g vorgespannt. Dann folgte die Kontraktionsmessung mit einer Reizstärke von 15 mA und mit einer Frequenz von 80 Kontraktionen pro Minute über 10 Minuten. Die Vorspannung von 15 g wurde konstant über den gesamten Zeitraum der Messung gehalten.

Die Auswertung erfolgte wie bei der invasiven Messung der Muskelermüdung (Tabelle 3-1).

3.4.1.5 Histologische Untersuchungen

Für die histologische Untersuchung des Wadenmuskels der Ratte wurde der *M. gastrocnemius* benutzt. Dieser wurde direkt nach der Präparation in, mit flüssigem Stickstoff gekühltem, Isopentan eingefroren und dann bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Zur histologischen Untersuchung wurden Schnitte aus drei Ebenen angefertigt und untersucht.

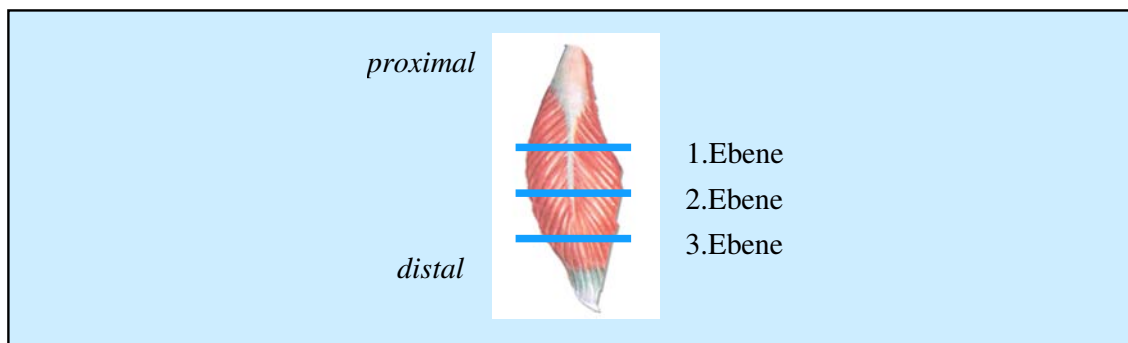


Abbildung 3-8

Schematische Darstellung der Schnittebenen am *M. gastrocnemius*, die zur immunhistochemischen Untersuchung verwendet wurden.

Die histologische Untersuchung der Muskelprobe beinhaltete die Feststellung der Anzahl der Muskelzellen pro μm^2 und der Anzahl der Kapillare pro Muskelzelle in einer Muskelprobe. Zur Feststellung der Anzahl der Muskelzellen pro μm^2 wurde eine Dystrophin (spezifisches Muskelprotein) Färbung durchgeführt, zur Messung der Anzahl der Kapillaren pro Muskelzelle wurde eine Lectin BSI Färbung durchgeführt. Die Schnitte wurden zunächst mit Aceton (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) fixiert und bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Nun wurde für eine Stunde ein Ig Blocking Reagenz aus dem Vector

Material und Methoden

M.O.M.TM Fluorescein Kit (VC-FMK-2201-KI01, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) auf den Schnitt gegeben, um endogene Antikörper abzublocken. Überschüssiges Reagenz wurde mit PBS (Dulbecco's PBS mit Ca²⁺, Invitrogen GmgH, Karlsruhe) abgewaschen. Folgend wurde die Lösung, in der später auch der Antikörper verdünnt wurde, auf den Schnitt gegeben. Dann wurde der Schnitt mit dem primären Antikörper (Anti – Dystrophin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) in einer Verdünnung von 1:50 inkubiert. Nach 30 Minuten wurden überschüssige Antikörper mit PBS abgewaschen. Nun wurde als sekundärer Antikörper ein biotinyliertes Anti IgG Reagenz für zehn Minuten auf den Schnitt gegeben. Nach zweimaliger PBS Waschung wurde für acht Minuten mit Fluorescein gekoppeltem Avidin gefärbt. Nach einer weiteren PBS Waschung wurde nun zur Färbung der Endothelzellen Lectin BSI auf den Schnitt gegeben und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das überschüssige Lectin BSI zweimal für fünf Minuten mit PBS abgewaschen. Danach wurde noch Höchst 33258 in einer Dosierung von 0,1mg/l zur Zellkernfärbung auf den Schnitt gegeben. Ausgezählt wurden die Schnitte unter dem Mikroskop, nachdem sie in ein entsprechendes Medium (Fluorescent mounting medium, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) eingebettet und bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt wurden.

3.4.1.6 Blutuntersuchung

Sieben Tage nach der Induktion der unilateralen Hinterlaufischämie wurde den Ratten mit einer 20 µl Kapillare aus dem retrobulbären Plexus Blut abgenommen. Eine Kapillare mit 5 µl Blut wurde mit 500 µl Hämolyse Reagenz, beziehungsweise mit 250 µl Digitonin vermischt. Die Proben mit Digitonin dienten der Glucose Bestimmung und die mit Hämolyse Reagenz der HbA1c Bestimmung. Außerdem wurde zur Bestimmung von LDL Cholesterin, Triglyceriden und Gesamt -Cholesterin noch Blut für Serum gewonnen.

3.4.2 Tiermodell an der Maus

3.4.2.1 Induktion der bilateralen Hinterlaufischämie

Die Maus wurde gewogen und in einer Narkosebox (Feinmechanische Werkstatt Sanofi-Aventis, H. Wonnig, Frankfurt a. Main) mit 5 Vol % Isofluran (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim) narkotisiert. In Narkose wurde die Maus in Rückenlage auf den beheizten Narkoseplatz (FMI GmbH, Seeheim/Ober-Beerbach) umgelagert. Hier wurde die Narkose über eine Maske mit 3 Vol % Isofluran aufrechterhalten. Die Haare im Bereich der Leiste und der medialen Oberschenkel wurden rasiert und das Operationsfeld mit Cutasept®F (Bode Chemie, Hamburg) gründlich desinfiziert. Der etwa 5 mm lange Hautschnitt verlief am medialen Oberschenkel direkt über dem Leistenband (Ligamentum inguinale). Unter stereomikroskopischer Sicht wurde mittels Wattestäbchen und mikrochirurgischen Pinzetten die A. und V. femoralis mit ihren Seitenästen proximal bis zum Leistenband freipräpariert. Mit Seide (6/0 Seide, Vömel, Kronberg) wurde die A. femoralis oberhalb der A. profunda femoris ligiert. Eine zweite Ligatur erfolgte dann 5 mm proximal der ersten. Zwischen beiden Ligaturen wurde die Arterie mit einem Elektrokauter (ME 82, Martin Medizin Technik, Tuttlingen) durchtrennt. Die Haut wurde mit Einzelheften (6-0, Prolene*, Ethicon, Johnson and Johnson Intl., St-Stevens-Woluwe, Belgien) verschlossen. Die Mäuse für die Laufradstudie wurden bilateral; d.h. an beiden Hinterläufen operiert.

3.4.2.2 Messung der Laufradleistung

Die Mäuse wurden, jeweils einzeln, in mit Laufrädern ausgestatteten Käfigen gehalten. Dabei waren die Laufräder der ersten Studie mit C57/Bl6 Mäusen aus Metall und hatten einen Umfang von 1 m, die Laufräder der zweiten Studie mit eNOS^{-/-} Mäusen waren aus Plastik und hatten einen Umfang von 43 cm. Die Mäuse liefen nun aufgrund ihrer natürlichen Lauffreude in den Laufrädern. Die Laufintensität steigerte sich zunächst, bis nach zwei Wochen ein konstantes Laufniveau erreicht wurde. Zwei Wochen nach Erreichen dieses konstanten Laufniveaus, wurde eine bilaterale Hinterlaufischämie induziert. Die Mäuse wurden nach ihrer individuellen Laufleistung randomisiert in die Behandlungsgruppen eingeteilt. Danach begann die Messung der Laufleistung mittels eines computergestützten Messsystems (Laufrad V1.48, Ingenieurbüro Jäckel, Hanau). Die Software erfasst die Aktivitäten an bis zu 48 Laufrädern und speichert diese in einstellbaren Intervallen direkt in

Material und Methoden

einem Excel-Arbeitsblatt. Die Aktivität (Anzahl der Umdrehungen) wurde im Minutentakt gespeichert. Dabei galt als Aktivität, wenn mehr als vier Umdrehungen pro Minute erfolgten. Später wurde aus diesen Daten täglich folgende Parameter berechnet und jeweils über zwei Tage gemittelt graphisch dargestellt:

- **Gesamtstrecke** [Anzahl der Umdrehungen x Durchmesser des Laufrads] in km
- **Spitzengeschwindigkeit** [(max. Umdrehungen/min x Durchmesser)x 60 min] in km/h
- **Durchschnittsgeschwindigkeit** [Gesamtstrecke/ Gesamtlaufzeit] in km/h
- **längste Laufperiode** in min
- **weiteste Laufperiode** in km
- **Anzahl der Laufperioden**
- **Gesamtlaufzeit** in h

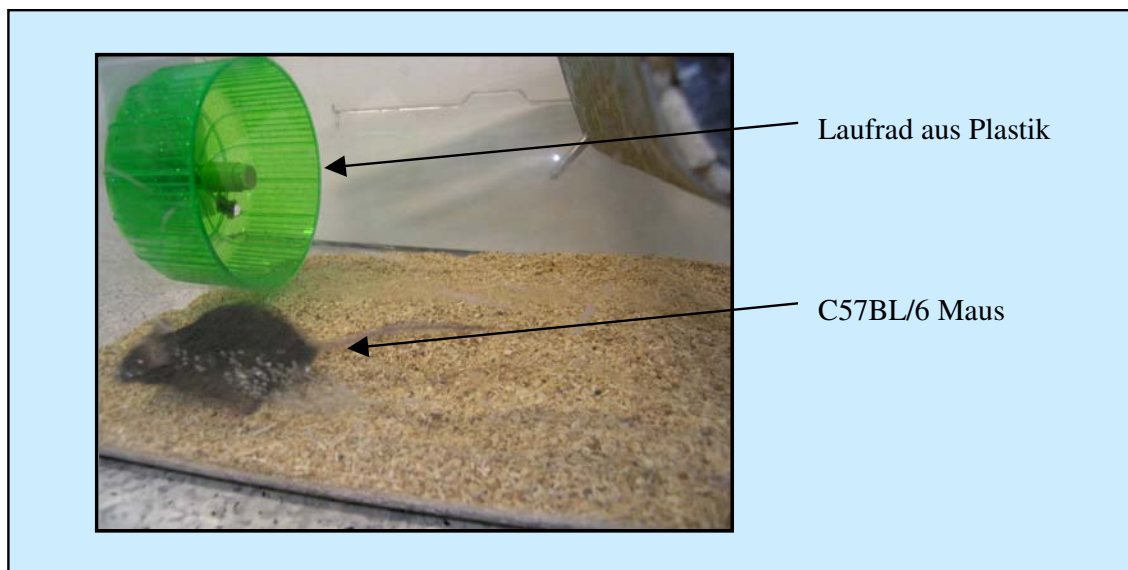


Abbildung 3-9

Maus in einem mit Laufrad ausgestattetem Käfig.

Material und Methoden

Die Laufradmäuse wurden nach der bilateralen Ligatur der A. femoralis alle zwei Tage kontrolliert. Hierbei wurden sie aufgrund der Schwere der jeweiligen Symptome in verschiedene Kategorien eingeteilt:

Grad 1: schwarz verfärbte Krallen

Grad 2: weniger als ein nekrotisches Zehenglied

Grad 3: mehr als ein nekrotisches Zehenglied

Grad 4: Nekrose der gesamten Pfote

Tiere, bei denen die gesamte Pfote nekrotisch wurde (Grad 4), wurden euthanasiert. Die Einzelwerte (Grad 1- Grad 4) wurden innerhalb der jeweiligen Gruppe gemittelt und statistisch miteinander verglichen.

3.4.2.3 Blutdruckmessung

Bei allen Mäusen wurde nach Versuchsende der Blutdruck gemessen. Dafür wurden die Mäuse über drei Tage trainiert und an den zwei folgenden Tagen der Blutdruck gemessen.

Nach dem Trainingsplan wurden die Mäuse an Tag eins für 10 Minuten in die „Tail Cuff Apparatur“ (BP-2000 Blood Pressure Analysis SystemTM, Visitech Systems, Inc., Apex, NC, USA) gesetzt. Dabei sitzen die Mäuse zur Fixation in kleinen Kästchen an deren Ende eine Öffnung für den Schwanz ist. Der Schwanz wird dann durch eine Druckmanschette geführt und über einem Pulsmesser fixiert. An Tag zwei wurde der Zeitraum auf 20 Minuten erhöht. An Tag drei wurde nach 30 Minuten zusätzlich noch eine Testmessreihe angeschlossen. Hierbei wurden die Druckmanschetten maximal aufgepumpt. Nachdem das Pulssignal nicht mehr messbar war, wurde der Druck linear abgelassen und der systolische Blutdruck bestimmt. An Tag vier und fünf wurden die eigentlichen Messreihen durchgeführt. Hierzu mussten die Mäuse für 30 Minuten in der Apparatur sitzen. An diese Akklimatisationsphase schlossen sich 10 Vormessreihen an, die noch nicht verwertet wurden. Danach wurden 20 aufeinanderfolgende Messreihen durchgeführt. Aus diesen Einzelwerten wurde dann der Mittelwert \pm SEM pro Tier errechnet und statistisch ausgewertet.

3.5 Statistik

Die statistische Auswertung aller Daten erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms GraphPad Prism® 4.03 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA). Die Daten wurden paarweise mittels Student's *t*- Test verglichen. Die Tests wurden auf einem Signifikanzniveau von 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit pro Parameter durchgeführt, d.h. $p < 0,05$ wurde als signifikant betrachtet und mit einem * gekennzeichnet. Ein Signifikanzniveau von 1 %, d.h. $p < 0,01$ wurde mit ** und ein Signifikanzniveau von 0,1 %, d.h. $p < 0,001$ wurde mit *** gekennzeichnet. Alle Ergebnisse wurden als arithmetisches Mittel \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes) angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Unilaterale Hinterlaufischämie bei der Ratte

4.2 Entwicklung des Modells an der diabetischen Ratte

4.2.1.1 Perfusionsdruckmessung

Entsprechend der Messung des „ankle brachial index“ (ABI) beim Patienten mit PAVK, bei der der Perfusionsdruck des Knöchels mit dem Perfusionsdruck des Oberarms ins Verhältnis gesetzt wird, haben wir nach der Induktion der unilateralen Hinterlaufischämie eine Messung des „Perfusionsdruck Index“ an den Hinterläufen der Ratte durchgeführt. Der Perfusionsdruck des ischämischen Beins wurde hierbei mit dem Perfusionsdruck des nicht ischämischen Beins ins Verhältnis gesetzt. Der „Perfusionsdruck Index“ ist wie auch der Knöchel Arm Index ein Maß für das Perfusionsdefizit im ischämischen Bein. Vor der Induktion der unilateralen Hinterlaufischämie, war der gemessene Perfusionsdruck an beiden Beinen gleich. Dies entspricht einem „Perfusionsdruck Index“ von etwa 100 %. Sieben Tage nach der Induktion der unilateralen Hinterlaufischämie wurde vom ischämischen Bein nur ein Perfusionsdruck erreicht, der etwa $39 \pm 2 \%$, des Perfusionsdruckes des nicht ischämischen Beines entspricht. Nach vierzehn Tagen war es dann $48 \pm 2 \%$. Dies entspricht einem ABI von etwa 0,5, vergleichbar mit Patienten unserer Zielpopulation mit Claudicatio intermittens.

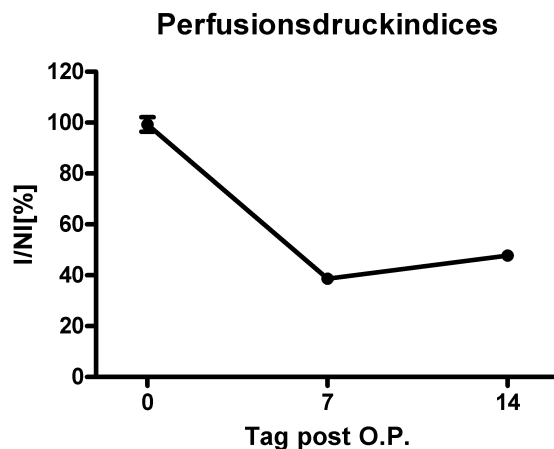


Abbildung 4-1

Perfusionsdruckindices in % bei diabetischen Tieren vor ($n = 9$), sowie sieben ($n=30$) und vierzehn Tage ($n=34$) nach der Ligatur der A. iliaca communis. (MW \pm SEM)

4.2.1.2 Messung der Muskelermüdung

Bei Patienten mit PAVK Stadium II nach Fontaine kommt es unter Belastung schnell zu einer Muskelermüdung. Um in unserem Modell der Ratte mit unilateraler Hinterlaufischämie eine Ischämie bedingte Ermüdung der Muskulatur zu messen, haben wir die Wadenmuskeln am anästhesierten Tier mit einer Frequenz von 80 Kontraktionen pro Minute über 10 Minuten elektrisch stimuliert. Das Stimulationsprotokoll war so ausgelegt, dass die Parameter im nicht ischämischen Bein konstant blieben. Zu Beginn der Messung (Abb. 4-2A) erkennt man keinen Unterschied zwischen dem ischämischen und dem nicht ischämischen Bein. Beide Beine kontrahierten mit derselben Kraft und Kontraktionsgeschwindigkeit und relaxierten in derselben Relaxationszeit, sowie mit derselben Relaxationsgeschwindigkeit. Nach zehnminütiger Belastung (Abb. 4-2B) waren diese Parameter im ischämischen Bein deutlich reduziert, während die Parameter im nicht ischämischen Bein konstant blieben.

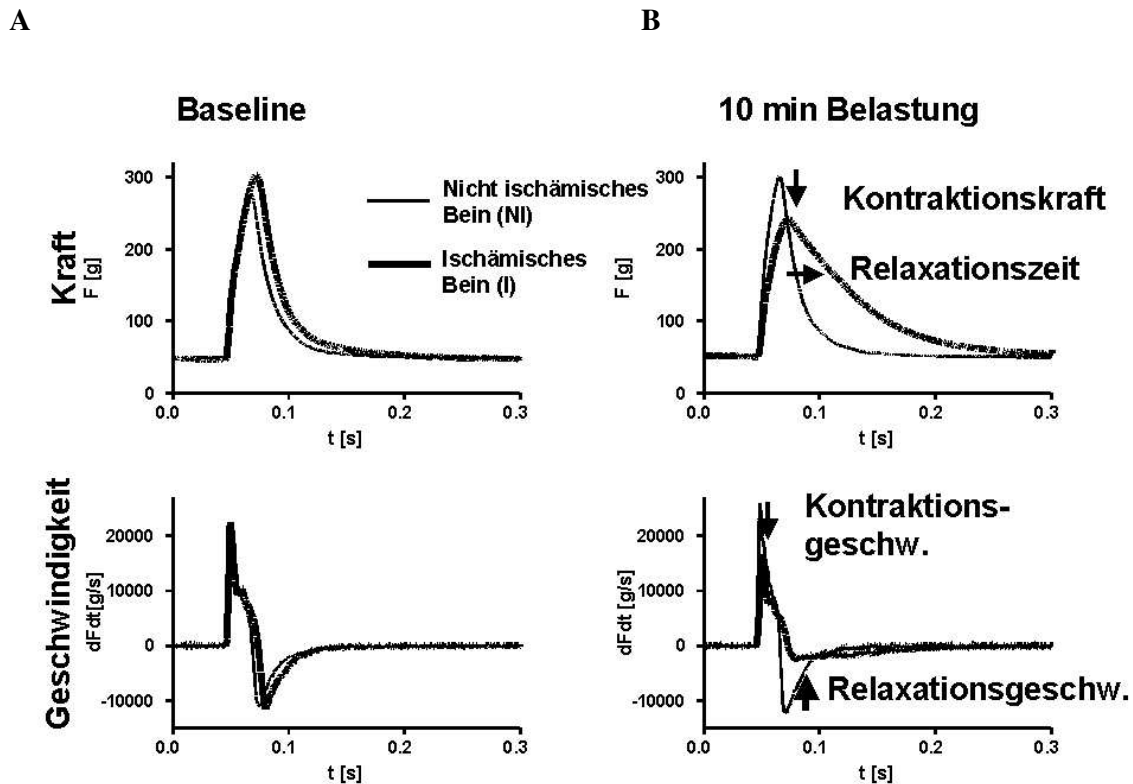


Abbildung 4-2

Beispielhafte Darstellung einer Kontraktion und ihrer 1. Ableitung zu Beginn der Ermüdungsmessung (A) und nach zehnminütiger Belastung (B) im nicht ischämischen Bein (NI) und im ischämischen Bein (I).

Ergebnisse

Die Messwerte wurden als Absolutwerte des ischämischen Beins und als % vom ischämischen Bein zum kontralateralen, nicht ischämischen Bein dargestellt. Bei jeder Messung diente also das nicht ischämische Bein als interne Kontrolle. Zur Messung der Muskelermüdung wurden folgende Parameter ausgewertet:

4.2.1.2.1 Kontraktionskraft (F) und Kontraktionsgeschwindigkeit (dF/dt_{\max})

Die Kraft im nicht ischämischen Bein (NI) blieb über den Zeitraum der zehnminütigen Messung relativ konstant. Die Kontraktionsgeschwindigkeit stieg sogar zunächst leicht an, bis sie nach etwa 300 Sekunden ein Plateau erreichte. Im ischämischen Bein (I) kam es dahingegen nach einem kurzen Anstieg zu einer deutlichen Verminderung der Kraft und Kontraktionsgeschwindigkeit (Abbildung 4-3A und B)

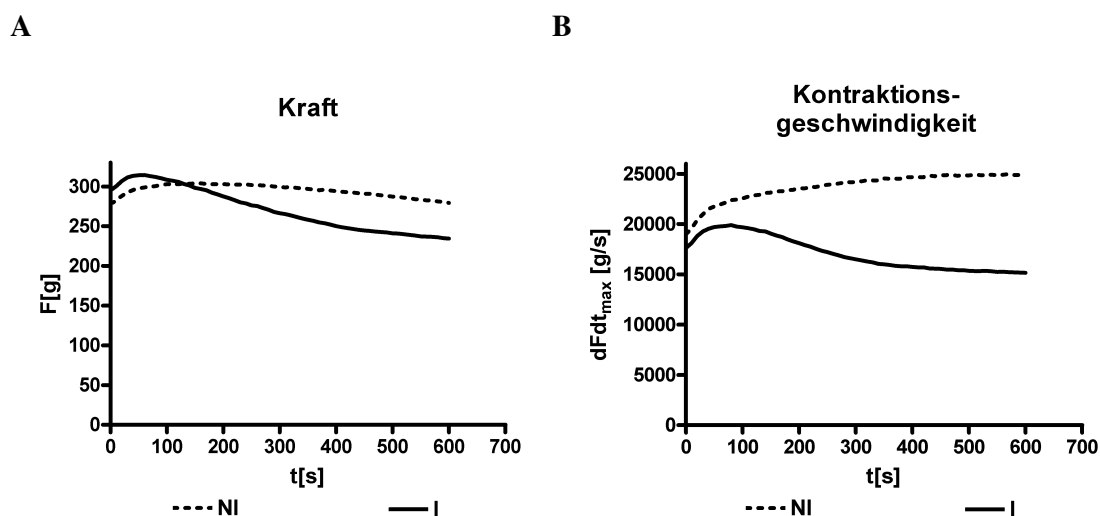


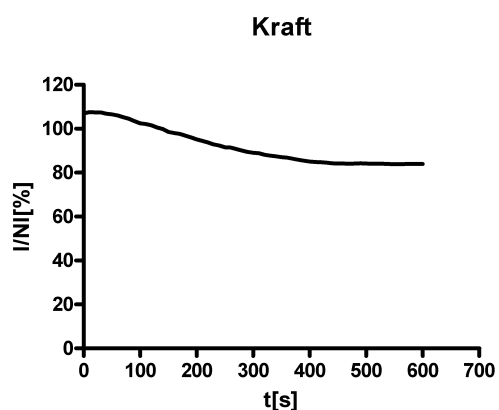
Abbildung 4-3

Darstellung der absoluten Kraft in g (A) und der absoluten Kontraktionsgeschwindigkeit in g/s (B) im nicht ischämischen Beins (NI) und im ischämischen Beins (I) über den Messzeitraum von zehn Minuten. Auf die Darstellung des SEM wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. (MW, n = 25)

Ergebnisse

Zu Beginn entwickelten beide Beine dieselbe Kraft (F) und dieselbe Kontraktionsgeschwindigkeit (dF/dt_{\max}), d.h. das Verhältnis vom ischämischen zum nicht ischämischen Bein lag zunächst bei ca. 100 %. Im Verlauf der Messung kam es zu einer Verminderung der Kraft im ischämischen Bein im Vergleich zum nicht ischämischen Bein von $92 \pm 2 \%$ nach fünf Minuten, auf $84 \pm 3 \%$ nach zehn Minuten. Die Kontraktionsgeschwindigkeit sank im ischämischen Bein im Verhältnis zum nicht ischämischen Bein im Verlauf der Messung von $74 \pm 2 \%$ nach fünf Minuten, auf $64 \pm 3 \%$ nach zehn Minuten. (Abbildung 4-4 A und B)

A



B

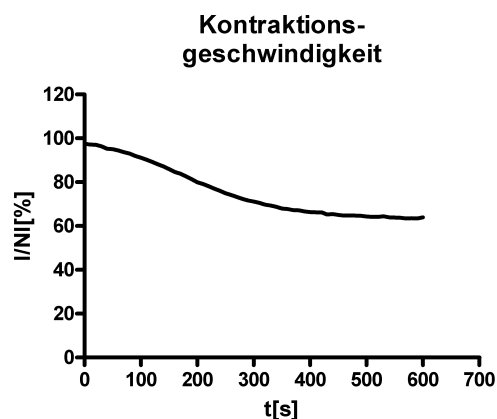


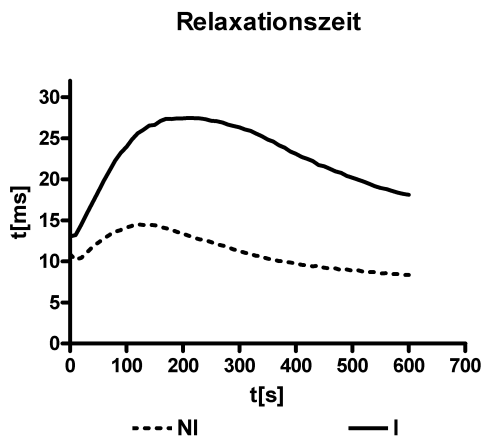
Abbildung 4-4

Verlauf von Kraft (A) und Kontraktionsgeschwindigkeit (B), dargestellt als Verhältnis vom ischämischen Bein zum nicht ischämischen Bein (I/NI) in % über den Zeitraum der zehnminütigen Messung. Auf die Darstellung des SEM wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. (MW, $n = 25$)

4.2.1.2.2 Relaxationszeit (RZ) und Relaxationsgeschwindigkeit (dF/dt_{\min})

Die Relaxationszeit stieg im nicht ischämischen Bein minimal an, um sich nach 10 Minuten auf einem konstanten Niveau einzupendeln. Die Relaxationsgeschwindigkeit fiel im nicht ischämischen Bein in den ersten zwei Minuten etwas ab, stieg dann aber wieder an und blieb über die letzten fünf Minuten relativ konstant. Im ischämischen Bein kam es dahingegen zu einer deutlichen Verlängerung der Relaxationszeit, die nach etwa fünf Minuten ihr Maximum erreichte, sich dann aber bis zum Ende der Messung wieder etwas verkürzte. Auch die Relaxationsgeschwindigkeit sank innerhalb der ersten fünf Minuten drastisch ab und blieb dann bis zum Ende der Messung auf diesem Niveau. (Abb. 4-5 A und B)

A



B

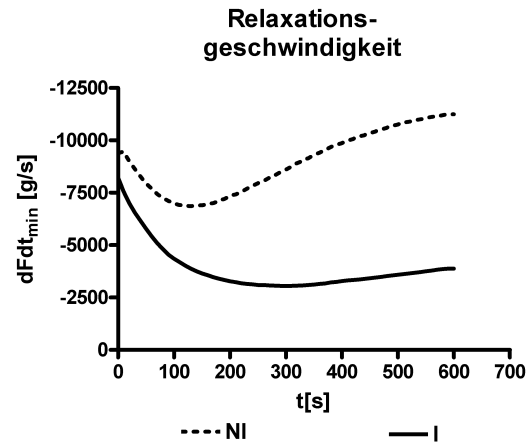


Abbildung 4-5

Verlauf der absoluten Relaxationszeit in ms (A) und der absoluten Relaxationsgeschwindigkeit in g/s (B) vom nicht ischämischen (NI) und vom ischämischen Bein (I) im Verlauf der zehnmütigen Messung. Auf die Darstellung des SEM wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. (MW, n = 25)

Ergebnisse

Zu Beginn der Kontraktionsmessung relaxierten beide Beine in der gleichen Zeit und mit gleicher Geschwindigkeit, d.h. das Verhältnis vom ischämischen zum nicht ischämischen Bein lag auch hier zunächst bei etwa 100 %. Das Verhältnis I/NI der Relaxationszeit stieg rapide von Beginn der Messung bis nach fünf Minuten auf über 200 % an und blieb dort bis zum Ende der Messung nach zehn Minuten ($220 \pm 15 \%$). Das Verhältnis der Relaxationsgeschwindigkeit vom I/NI sank vor allem in den ersten fünf Minuten um mehr als 50 % ab und blieb dort bis zum Ende der Messung nach 10 Minuten ($33 \pm 5 \%$).

A



B

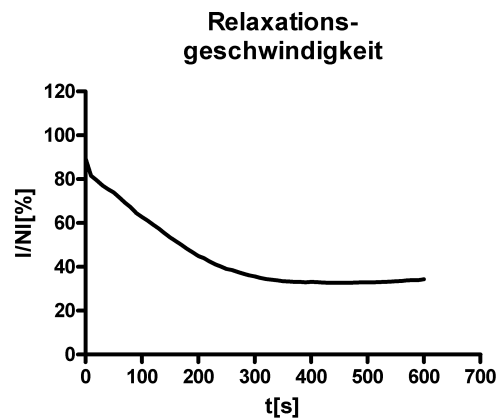


Abbildung 4-6

Beispielhafter Verlauf der Relaxationsgeschwindigkeit (A) und der Relaxationszeit (B), dargestellt als Verhältnis vom ischämischen Bein zum nicht ischämischen Bein I/NI in %. Auf die Darstellung des SEM wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. (MW, n = 25)

Ergebnisse

In Abb. 4-7 sind die verschiedenen Parameter, die eine Ischämie bedingte Muskelermüdung charakterisieren, in einem Graphen, jeweils als % vom ischämischen zum nicht ischämischen Bein (I/NI), dargestellt. Das Verhältnis I/NI der Kontraktionskraft fiel im Verlauf der zehnminütigen Messung von $107 \pm 2 \%$ auf $84 \pm 2 \%$ ab, während das Verhältnis I/NI der Kontraktionsgeschwindigkeit (dF/dt_{\max}) von $98 \pm 3 \%$ bis auf $64 \pm 3 \%$ abfiel. Das Verhältnis I/NI der Relaxationszeit (RZ) erreichte erst nach fünf Minuten mit $236 \pm 11 \%$ sein Maximum, um dann in den folgenden fünf Minuten relativ konstant zu bleiben. Nach 10 Minuten lag das Verhältnis bei $214 \pm 11 \%$. Das Verhältnis I/NI der Relaxationsgeschwindigkeit (dF/dt_{\min}) fiel relativ schnell nach Beginn der Kontraktionen ab, hatte nach fünf Minuten den Tiefstwert bei $36 \pm 2 \%$ erreicht und blieb dort bis zum Ende der Messung ($34 \pm 2 \%$).

Alle Parameter veränderten sich also in den ersten Minuten im ischämischen Bein im Verhältnis zum nicht ischämischen Bein relativ stark. Etwa fünf Minuten nach Beginn der Messung wurde ein Maximalwert erreicht. Nach zehn Minuten hatten sich alle Parameter jeweils auf einem konstanten Plateau eingependelt. Abgeleitet aus diesen Verläufen wurden die Parameter aus den Messungen nach fünf und nach zehn Minuten statistisch ausgewertet.

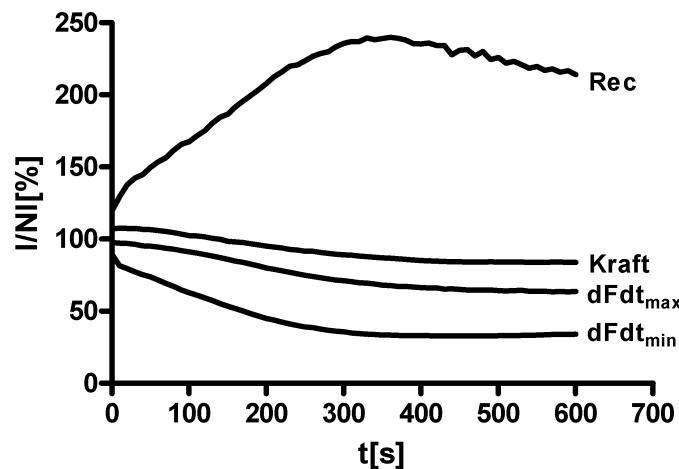


Abbildung 4-7

Verlauf der Ermüdung der Muskulatur bei allen Parametern der Muskelermüdung. Die Werte sind als % vom ischämischen zum nicht ischämischen Bein dargestellt. Auf die Darstellung des SEM wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet. (MW, n = 25)

4.2.1.3 Messung der Muskelermüdung (nicht invasiv)

Zusätzlich zur invasiven Messung der Muskelermüdung wurde eine nicht invasive Methode entwickelt. Diese hatte den Vorteil, dass ein individuelles Tier über einen längeren Zeitraum beobachtet werden konnte und damit insgesamt weniger Versuchstiere für eine Studie benötigt wurden. Auch hier wurden die Parameter Muskelkraft, Kontraktionsgeschwindigkeit, Relaxationszeit und Relaxationsgeschwindigkeit nach zehn Minuten ausgewertet. Die Parameter wurden zu verschiedenen Messzeitpunkten, und zwar vier, sieben, vierzehn, einundzwanzig, fünfunddreißig und sechsundfünfzig Tage nach der Ligatur ermittelt.

4.2.1.3.1 Kontraktionskraft (F) und Kontraktionsgeschwindigkeit (dF/dt_{max})

Die Kontraktionskraft und die Kontraktionsgeschwindigkeit blieben im nicht ischämischen Bein relativ konstant. Die zunächst deutlich reduzierte Kraft des ischämischen Beins verbesserte sich innerhalb der ersten fünf Wochen langsam von 56 ± 5 g nach vier Tagen, auf 74 ± 3 g nach fünf Wochen und näherte sich dann mit 96 ± 6 g nach acht Wochen, den Werten des nicht ischämischen Beins (113 ± 5 g) an, blieb aber noch signifikant unterschiedlich. Die Kontraktionsgeschwindigkeiten im ischämischen Bein verbesserten sich von Messung zu Messung immer mehr. Sie lagen nach vier Tagen bei 4223 ± 445 g/s und nach fünf Wochen bei 7088 ± 490 g/s, bis nach acht Wochen kein signifikanter Unterschied mehr zwischen dem ischämischen (11962 ± 1487 g/s) und dem nicht ischämischen Bein (14807 ± 898 g/s) erkennbar war. (Abb.4-8 A und B)

Ergebnisse

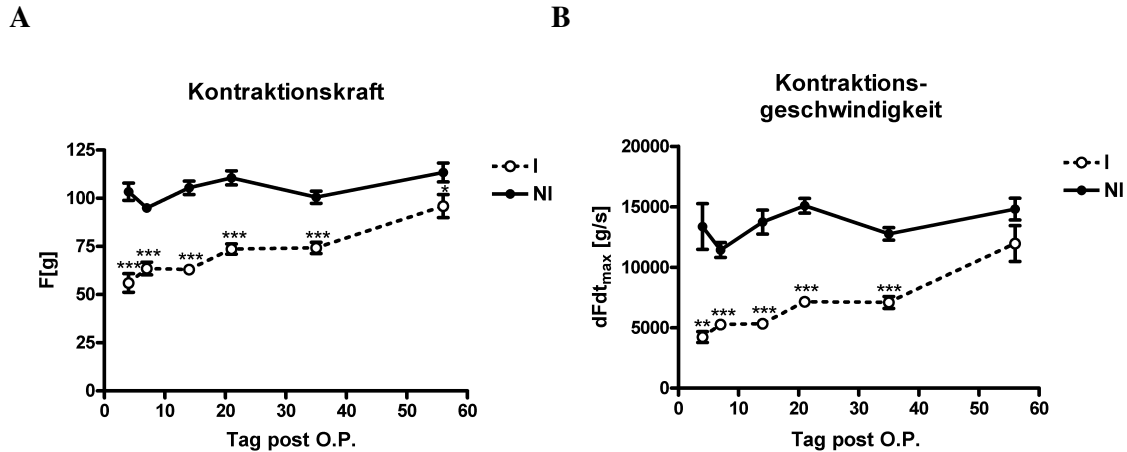


Abbildung 4-8

Absolute Kontraktionskraft in g (A) und absolute Kontraktionsgeschwindigkeit in g/s (B) im nicht ischämischen Bein (NI) und im ischämischen Bein (I) nach zehn Minuten, vier (n = 4), sieben (n = 10), vierzehn (n=11), einundzwanzig (n = 11), fünfunddreißig (n = 11) und sechsundfünfzig (n = 6) Tage nach der Ligatur der A. iliaca communis. (MW ± SEM, I vs. NI, *: p < 0,05, **: p < 0,01, ***: p < 0,001)

Das Verhältnis I/NI der Kontraktionskraft lag nach vier Tagen bei $55 \pm 7 \%$, stieg innerhalb der drei Wochen auf $67 \pm 2 \%$ und lag dann nach acht Wochen bei $84 \pm 3 \%$. Das Verhältnis I/NI der Kontraktionsgeschwindigkeit lag nach vier Tagen bei $34 \pm 7 \%$, nach drei Wochen bei $48 \pm 3 \%$ und nach acht Wochen bei $80 \pm 7 \%$. (Abb. 4-9 A und B)

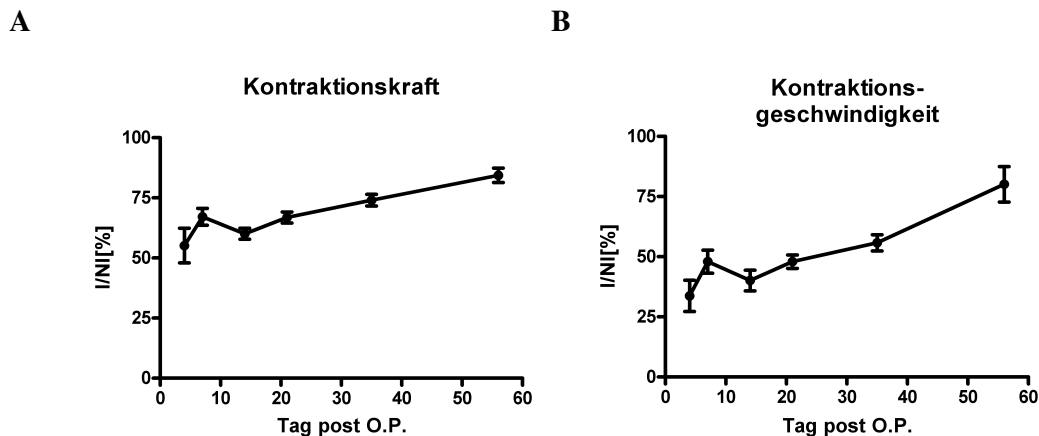


Abbildung 4-9

Das Verhältnis I/NI der Kontraktionskraft (A) und der Kontraktionsgeschwindigkeit (B) in % nach zehn Minuten. Messzeitpunkte sind vier (n = 4), sieben (n = 10), vierzehn (n=11), einundzwanzig (n = 11), fünfunddreißig (n = 11) und sechsundfünfzig (n = 6) Tage nach der Ligatur der A. iliaca communis. (MW ± SEM)

Ergebnisse

4.2.1.3.2 Relaxationszeit (RZ) und Relaxationsgeschwindigkeit (dF/dt_{\min})

Die Relaxationszeit blieb im nicht ischämischen Bein über den gesamten Messzeitraum konstant bei etwa 6 ms. Auch die Relaxationsgeschwindigkeit im nicht ischämischen Bein blieb im Verlauf der acht Wochen relativ konstant. Die Relaxationszeit im ischämischen Bein lag dahingegen nach vier Tagen bei 19 ± 2 ms, verkürzte sich dann innerhalb der drei Wochen auf 13 ± 1 ms und fiel weiter auf 11 ± 7 ms nach acht Wochen. Im ischämischen Bein erhöhte sich die Relaxationsgeschwindigkeit über den Zeitraum von drei Wochen von -917 ± -152 g/s nach vier Tagen auf -1774 ± 126 g/s nach drei Wochen und weiter auf -3629 ± 735 g/s nach acht Wochen. (Abb. 4-10)

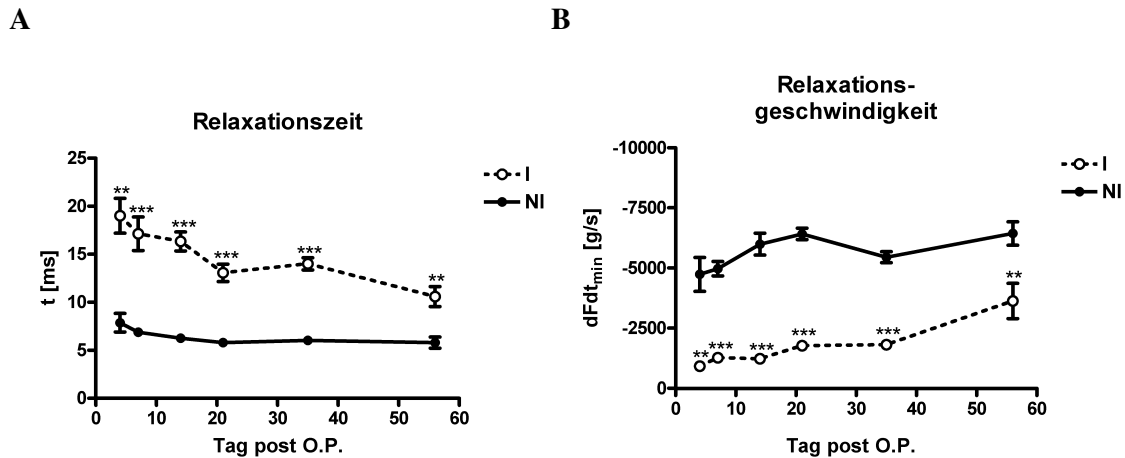


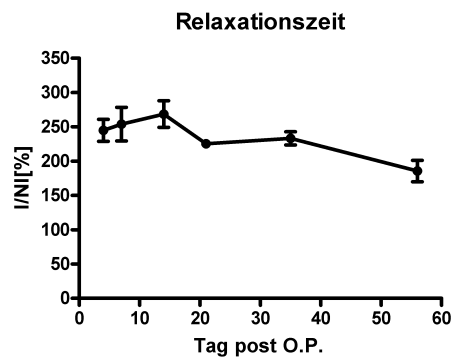
Abbildung 4-10

Absolute Relaxationszeit in ms (A) und absolute Relaxationsgeschwindigkeit in g/s (B) im nicht ischämischen (NI) und im ischämischen Bein (I) nach zehn Minuten. Messzeitpunkte sind vier ($n = 4$), sieben ($n = 10$), vierzehn ($n = 11$), einundzwanzig ($n = 11$), fünfunddreißig ($n = 11$) und sechsundfünfzig ($n = 6$) Tage nach der Ligatur der A. iliaca communis. (MW \pm SEM, I vs. NI, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$)

Ergebnisse

Bei der Relaxationszeit veränderte sich das Verhältnis vom ischämischen zum nicht ischämischen Bein von $245 \pm 16 \%$ nach vier Tagen, auf $225 \pm 6 \%$ nach drei Wochen, und erreichte dann nach acht Wochen $186 \pm 16 \%$. Bei der Relaxationsgeschwindigkeit verbesserte sich das Verhältnis über den Messzeitraum von drei Wochen geringgradig, von $21 \pm 4 \%$ auf $28 \pm 2 \%$, und erreichte nach acht Wochen $57 \pm 11 \%$. (Abb. 4-11)

A



B

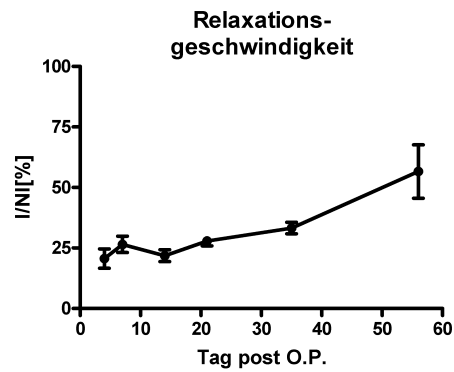


Abbildung 4-11

Verhältnis von I/NI in % der Relaxationszeit (A) und der Relaxationsgeschwindigkeit (B), vier (n = 4), sieben (n = 10), vierzehn (n = 11), einundzwanzig (n = 11), fünfunddreißig (n = 11) und sechsundfünfzig (n = 6) Tage nach der Ligatur der A. iliaca communis. (MW ± SEM)

4.3 Validierung der Modelle

4.3.1 ZDF/Gmi/Crl- (fa/lean) Ratten

4.3.1.1 Körpergewichte

Zum Zeitpunkt der Operation lag das durchschnittliche Körpergewicht in der Placebo Gruppe bei 381 ± 4 g und in der mit Cilostazol behandelten Gruppe bei 394 ± 5 g. Zur Zeit der ersten Messung des Perfusionsdrucks lag das Körpergewicht in der Placebo Gruppe bei 375 ± 4 g und in der Cilostazol Gruppe bei 383 ± 5 g. Eine Woche später ergab sich für die unbehandelten Tiere ein Körpergewicht von 378 ± 5 g und für die mit Cilostazol behandelten Tiere ein Körpergewicht von 388 ± 5 g.

Die Körpergewichte der unbehandelten Tiere unterschieden sich zu keinem der Messzeitpunkte signifikant von der behandelten Gruppe.

4.3.1.2 Ergebnisse der Blutuntersuchung

Die Blutuntersuchung nach sieben Tagen bestätigte, dass die Tiere, die in der Studie verwendet wurden, gesund waren. Alle untersuchten Parameter lagen im Normbereich. Die Behandlung mit Cilostazol zeigte außerdem keinen Einfluss auf die untersuchten Parameter.

Tabelle 4-1

Gehalt an Glucose, HbA_{1C}, Cholesterin, LDL Cholesterin und Triglyceriden im Serum von unbehandelten und mit Cilostazol behandelten Tieren. (n = 6)

Parameter	Einheit	Placebo	Cilostazol
Glucose	(mmol/L)	$5,6 \pm 0,1$	$7,2 \pm 1,0$
HbA _{1C}	(%)	$3,4 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,04$
Gesamt Cholesterin	(mmol/L)	$2,2 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,1$
LDL Cholesterin	(mmol/L)	$0,3 \pm 0,03$	$0,3 \pm 0,03$
Triglyceride	(mmol/L)	$0,8 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,1$

4.3.1.3 Applikation der Testsubstanz

Cilostazol wurde über das Futter appliziert. Bei einem durchschnittlichen Gewicht von 390 g und einer durchschnittlichen Futteraufnahme von 30 g täglich, wurde Cilostazol durchschnittlich in einer Dosis von 190 mg/kg/Tag von den Tieren aufgenommen.

4.3.1.4 Blutdruck

Der am anästhesierten Tier gemessene systolische Blutdruck, lag nach vierzehntägiger Behandlung bei den unbehandelten Tieren bei 112 ± 3 mmHg und bei den mit Cilostazol behandelten Tieren bei 109 ± 2 mmHg. Es konnte damit kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden.

4.3.1.5 Perfusionsdruckmessung

Nachdem die Perfusionsdrücke beider Beine vor der Ligatur gleich waren (nicht dargestellt), ergaben sich für Tag 7 und 14 nach der Ligatur folgende, in Tabelle 4-2 dargestellte Werte:

Tabelle 4-2

Perfusionsdruckindices der Gruppen Placebo (n = 16) und Cilostazol (n = 13) sieben und vierzehn Tage nach der Ligatur der *A. iliaca communis*. (MW \pm SEM, *: p < 0,05 vs. Placebo)

Tage	Einheit	Placebo	Cilostazol
7	(%)	42 \pm 2	46 \pm 2
14	(%)	42 \pm 8	51 \pm 2 *

Sieben Tage nach der Ligatur der *A. iliaca communis* konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Nach vierzehn Tagen unterschieden sich die Perfusionsdruckindices der mit Cilostazol behandelten Tiere signifikant von denen der unbehandelten Tiere.

4.3.1.6 Messung der Muskelermüdung (invasiv)

Für die invasive Messung der Muskelermüdung wurden Placebo Tiere (n = 15) mit Tieren verglichen, die mit Cilostazol (n = 10) behandelt wurden.

4.3.1.6.1 Kontraktionskraft

Bei der Messung der Muskelermüdung ergaben sich für die Kontraktionskraft im ischämischen Bein folgende Werte. Nach fünf Minuten lag die Kraft bei Placebo bei 318 ± 5 g und bei Cilostazol bei 345 ± 9 g, und nach zehn Minuten in der Placebo Gruppe bei 247 ± 11 g und in der Cilostazol Gruppe bei 297 ± 9 g. Die mit Cilostazol behandelten Tiere zeigten somit zu beiden Zeitpunkten eine signifikant höhere Kontraktionskraft im ischämischen Bein als die unbehandelten Tiere. (Abbildung 4-12)

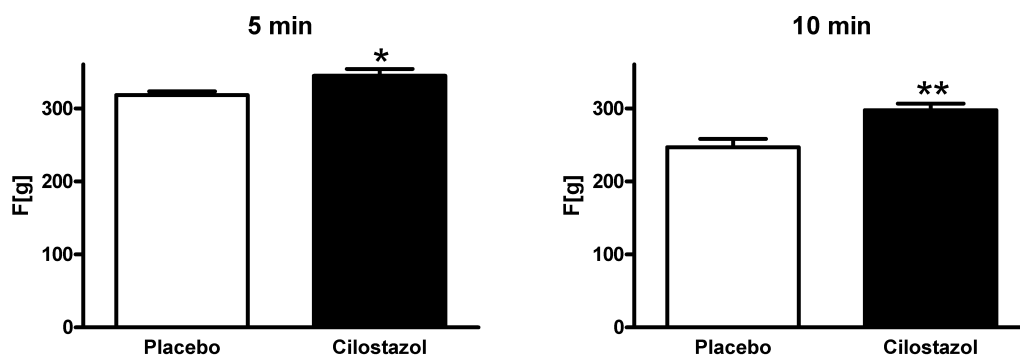


Abbildung 4-12

Absolute Kontraktionskraft (F) des ischämischen Beins in g, bei unbehandelten Tieren (n = 15) im Vergleich zu Tieren, die mit Cilostazol (n = 10) behandelt wurden, jeweils ausgewertet nach fünf und zehn Minuten. (MW \pm SEM, Placebo vs. Cilostazol, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$)

Ergebnisse

Das Verhältnis der Kontraktionskraft vom ischämischen zum nicht ischämischen Bein wurde durch die Behandlung mit Cilostazol nach fünf und nach zehn Minuten signifikant verbessert. Es lag nach fünf Minuten bei $93 \pm 1 \%$ (Placebo) und bei $100 \pm 3 \%$ (Cilostazol) und nach zehn Minuten bei $76 \pm 3 \%$ (Placebo) und bei $92 \pm 3 \%$ (Cilostazol). (Abbildung 4-13)

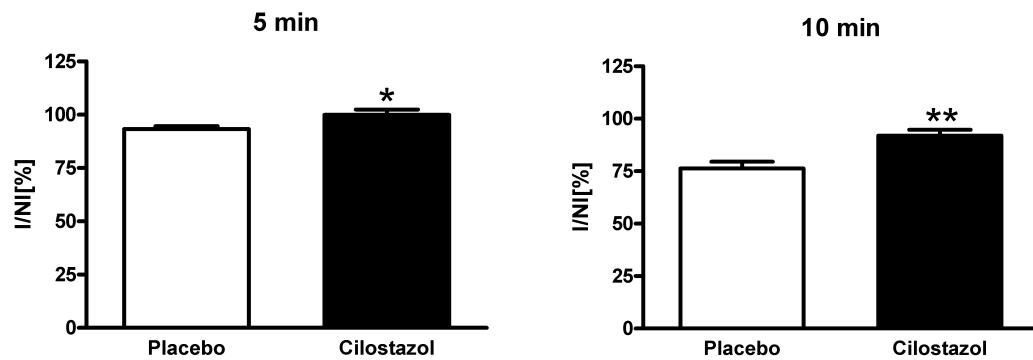


Abbildung 4-13

Verhältnis I/NI der Kontraktionskraft in %, bei Placebo und bei Cilostazol, die nach fünf und zehn Minuten ausgewertet wurde. (MW \pm SEM, Placebo vs. Cilostazol, *: $p < 0,05$ **: $p < 0,01$, $n = 10 - 15$)

4.3.1.6.2 Kontraktionsgeschwindigkeit

Die Kontraktionsgeschwindigkeit dF/dt_{\max} war nach fünf und zehn Minuten durch die Behandlung mit Cilostazol signifikant erhöht (Placebo 22192 ± 690 g/s und 17179 ± 1198 g/s; Cilostazol 26390 ± 745 g/s und 23472 ± 827 g/s). (Abbildung 4-14)

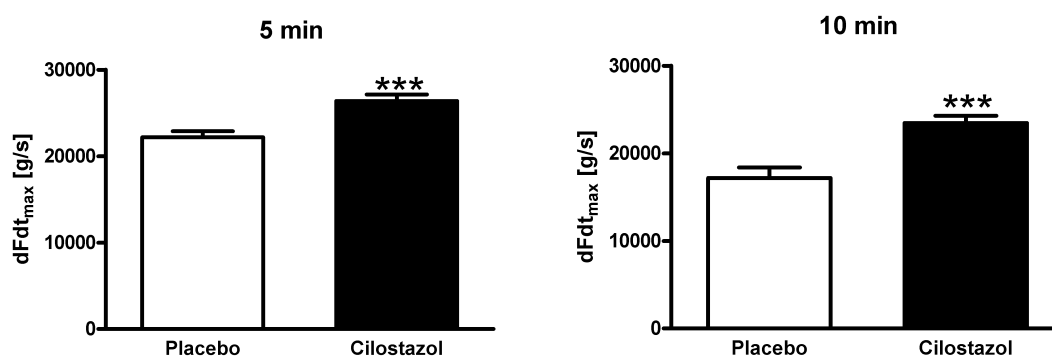


Abbildung 4-14

Kontraktionsgeschwindigkeit (dF/dt_{\max}) in g/s, im Vergleich von unbehandelten (Placebo) zu mit Cilostazol behandelten Tiere, die fünf und zehn Minuten nach Beginn der Messung ausgewertet wurde. (MW \pm SEM, Placebo vs. Cilostazol, ***: $p < 0,001$, $n = 10 - 15$)

Dies spiegelte sich auch im Verhältnis vom ischämischen zum nicht ischämischen Bein wider. Nach fünf Minuten lagen die Verhältnisse bei Placebo bei 71 ± 2 % und bei Cilostazol bei 85 ± 3 % und nach zehn Minuten lagen sie bei Placebo bei 53 ± 3 % und bei Cilostazol bei 74 ± 3 %. Somit führte die Behandlung mit Cilostazol zu einer signifikanten Verbesserung der Kontraktionsgeschwindigkeit im ischämischen Bein im Vergleich zum nicht ischämischen Bein. (Abbildung 4-15)

Ergebnisse

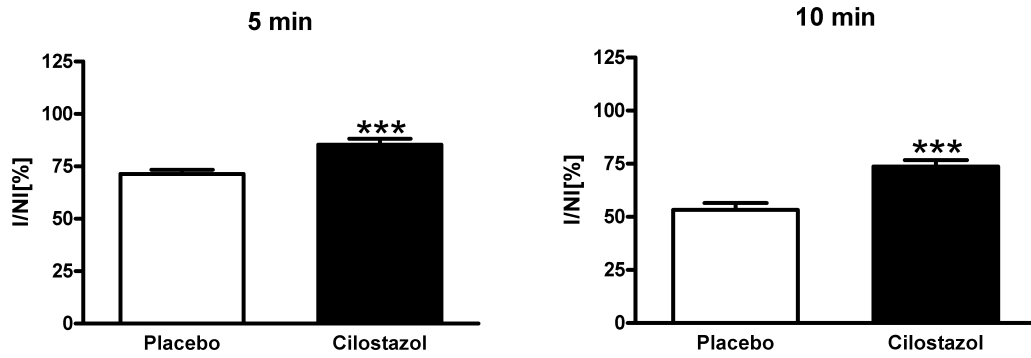


Abbildung 4-15

Verhältnis I/NI der Kontraktionsgeschwindigkeit in %, die nach fünf und zehn Minuten ausgewertet wurde. (MW \pm SEM, Placebo vs. Cilostazol, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, $n = 10 - 15$)

4.3.1.6.3 Relaxationszeit

Die Relaxationszeit RZ wurde durch die Behandlung mit Cilostazol signifikant verkürzt, und zwar von 29 ± 3 ms (Placebo) auf 20 ± 1 ms (Cilostazol) bzw. von 18 ± 1 ms (Placebo) auf $13 \pm 0,7$ ms (Cilostazol) nach fünf bzw. zehn Minuten. (Abbildung 4-16)

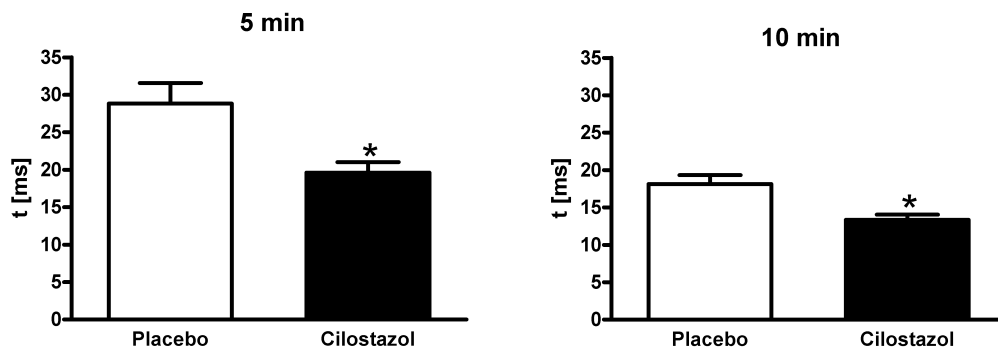


Abbildung 4-16

Relaxationszeit (RZ) in ms, von unbehandelten (Placebo), sowie von mit Cilostazol behandelten Tieren, jeweils dargestellt fünf und zehn Minuten nach Beginn der Messung. (MW \pm SEM, Placebo vs. Cilostazol, *: $p < 0,05$, $n = 10 - 15$)

Ergebnisse

Das Verhältnis I/NI der Relaxationszeit lag bei Placebo im Mittel nach fünf Minuten bei $281 \pm 22 \%$ und bei Cilostazol bei $226 \pm 17 \%$. Damit war die Behandlung mit Cilostazol nur tendenziell besser als Placebo. Nach zehn Minuten aber lag das Verhältnis bei Placebo im Mittel bei 254 ± 16 und bei Cilostazol bei $198 \pm 8 \%$. Die Behandlung mit Cilostazol führte zu diesem Zeitpunkt zu einer signifikanten Verbesserung des Verhältnisses I/NI der Relaxationszeit. (Abbildung 4-17)

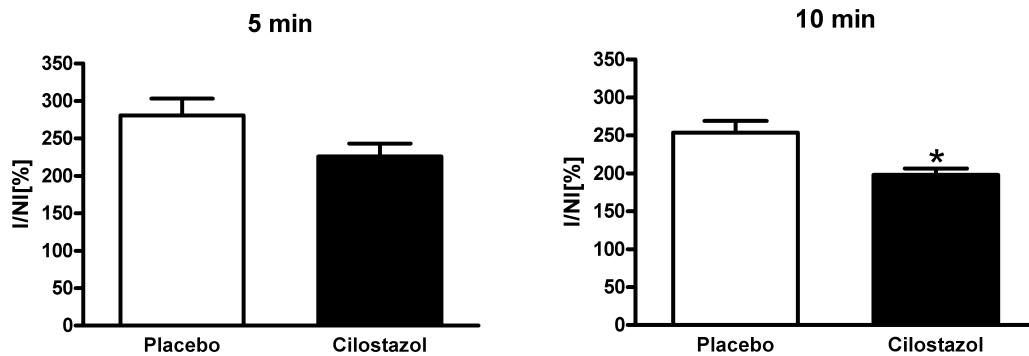


Abbildung 4-17

Relaxationszeit (RZ), dargestellt als Verhältnis vom ischämischen zum nicht ischämischen Bein der Gruppen Placebo und Cilostazol in %, ausgewertet fünf und zehn Minuten nach Beginn der Messung. (MW \pm SEM, Placebo vs. Cilostazol, *: $p < 0,05$, $n = 10 - 15$)

4.3.1.6.4 Relaxationsgeschwindigkeit

Die Relaxationsgeschwindigkeit dF/dt_{\min} , wurde durch die Behandlung mit Cilostazol nach fünf und zehn Minuten signifikant erhöht. Sie lag bei den unbehandelten Tieren nach fünf Minuten bei -3552 ± 384 g/s und nach zehn Minuten bei -4062 ± 488 g/s. Die Behandlung mit Cilostazol beschleunigte die Relaxationsgeschwindigkeit auf -5161 ± 517 g/s nach fünf Minuten und nach zehn Minuten auf -6352 ± 525 g/s. (Abbildung 4-18)

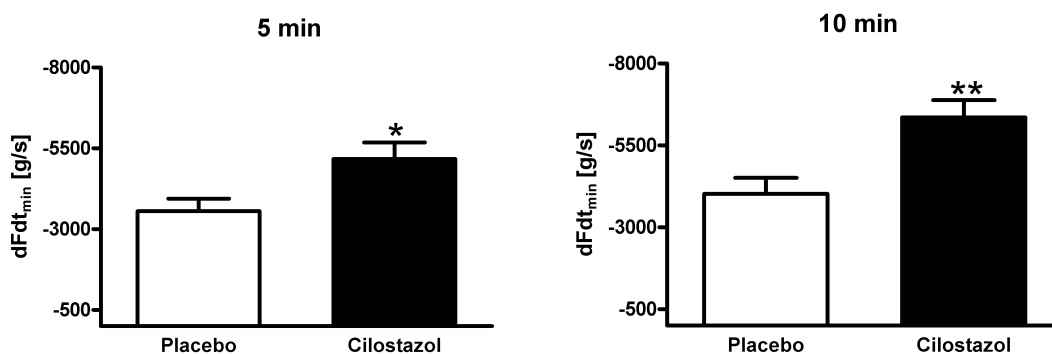


Abbildung 4-18

Relaxationsgeschwindigkeit (dF/dt_{\min}) in g/s nach fünf und zehn Minuten, bei unbehandelten Tieren (Placebo) im Vergleich zu mit Cilostazol behandelten Tieren. (MW \pm SEM, Placebo vs. Cilostazol, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, $n = 10 - 15$)

Die Behandlung mit Cilostazol führte nach zehn Minuten zu einer signifikanten Verbesserung des Verhältnisses I/NI von 28 ± 3 % (Placebo) auf 41 ± 3 % (Cilostazol). (Abbildung 4-19)

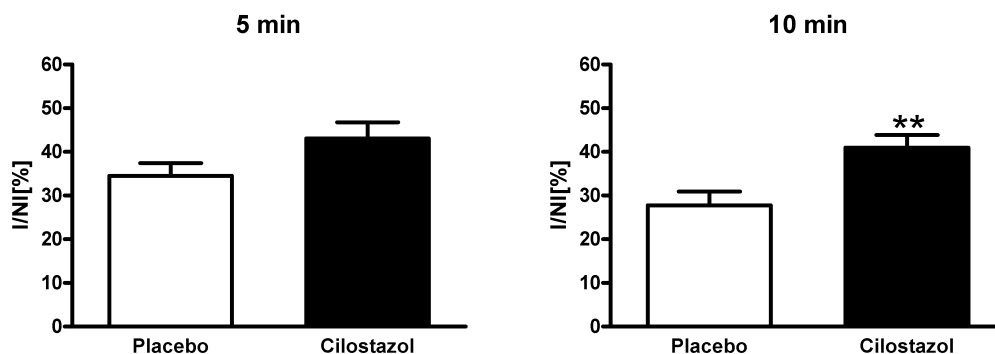


Abbildung 4-19

Verhältnis der Relaxationsgeschwindigkeit (I/NI) bei Placebo und Cilostazol, in %, ausgewertet nach fünf und nach zehn Minuten. (MW \pm SEM, Placebo vs. Cilostazol, *: $p < 0,05$, $n = 10 - 15$)

4.3.2 ZDF/GmiCrl-(fa/fa) Ratten

4.3.2.1 Körpergewichte

Zum Zeitpunkt der Operation lag das durchschnittliche Körpergewicht (MW \pm SEM) in der Placebo Gruppe bei 384 ± 7 g und in der mit Cilostazol behandelten Gruppe bei 351 ± 6 g. Zum Zeitpunkt der ersten Perfusionsdruckmessung lag das Körpergewicht in der Placebo Gruppe bei 372 ± 10 g und bei 340 ± 5 g in der Cilostazolgruppe. Eine Woche später ergab sich für die unbehandelten Tiere ein Körpergewicht von 369 ± 10 g und für die mit Cilostazol ein Körpergewicht von 350 ± 6 g. Die Körpergewichte der Tiere in der Behandlungsgruppe unterschieden sich zu keinem Messzeitpunkt signifikant vom Körpergewicht der unbehandelten Tiere.

4.3.2.2 Ergebnisse der Blutuntersuchung

Alle in der Studie verwandten Tiere zeigten erhöhte Glukose-, HbA_{1c}-, Cholesterin-, LDL-Cholesterin- und Triglyceridspiegel und waren somit diabetisch. Die Behandlung mit Cilostazol zeigte keinen Einfluss auf die Glukose Spiegel oder die HbA_{1c} Spiegel. Allerdings wurden durch die Behandlung die Triglyceridspiegel signifikant reduziert, während die Gesamtcholesterin- und die LDL Spiegel durch die Behandlung signifikant anstiegen. (Tabelle 4-3)

Tabelle 4-3

Gehalt an Glucose, HbA_{1c}, Cholesterin, LDL-Cholesterin und Triglyceriden im Serum von unbehandelten Tieren und von Tieren, die sieben Tage lang mit Cilostazol behandelt wurden. (MW \pm SEM, Placebo vs. Cilostazol, *: p < 0,05, **: p < 0,01, ***: p < 0,001, n =6)

Parameter	Einheit	Placebo	Cilostazol
Glucose	(mmol/L)	24,5 \pm 2,0	26,2 \pm 2,9
HbA _{1c}	(%)	9,3 \pm 0,9	8,6 \pm 0,8
Gesamt Cholesterin	(mmol/L)	5,2 \pm 0,3	6,2 \pm 0,3***
LDL Cholesterin	(mmol/L)	0,4 \pm 0,07	0,6 \pm 0,1**
Triglyceride	(mmol/L)	5,6 \pm 2,2	3,4 \pm 0,5*

4.3.2.3 Applikation der Testsubstanz

Cilostazol wurde über das Futter appliziert. Bei einem durchschnittlichen Gewicht von 350g und einer durchschnittlichen Futteraufnahme von 30 g täglich, wurde Cilostazol durchschnittlich in einer Dosis von 210 mg/kg/Tag von den Tieren aufgenommen.

4.3.2.4 Blutdruck

Der am anästhesierten Tier gemessene systolische Blutdruck, lag nach vierzehntägiger Behandlung bei den Placebo Tieren bei 120 ± 2 mmHg und bei den mit Cilostazol behandelten Tieren bei 126 ± 2 mmHg. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden.

4.3.2.5 Perfusionsdruckmessung

Bei den Perfusionsdruckmessungen, dargestellt in Tabelle 4-4, ergaben sich sieben und vierzehn Tage nach der Ligatur der rechten A. iliaca communis folgende Verhältnisse:

Tabelle 4-4

Perfusionsdruckindices der Gruppen Placebo (n = 34) und Cilostazol (n = 8) sieben und vierzehn Tage nach der Ligatur der A. iliaca communis. (MW \pm SEM, Placebo vs. Cilostazol)

Tage	Einheit	Placebo	Cilostazol
7	(%)	39 \pm 2	44 \pm 2
14	(%)	48 \pm 2	53 \pm 2

Damit unterschieden sich die mit Cilostazol behandelten Tiere nicht signifikant von den unbehandelten.

4.3.2.6 Messung der Muskelermüdung (invasiv)

Für die Messung der Muskelermüdung wurden unbehandelte Tiere ($n = 25$) mit Tieren verglichen, die mit Cilostazol ($n = 8$) behandelt wurden.

4.3.2.6.1 Kontraktionskraft

Bei der Messung der Muskelermüdung ergaben sich für die Kontraktionskraft (F) im ischämischen Bein folgende Werte: Nach fünf Minuten erreichten die Placebo Tiere eine Kraft von 276 ± 9 g und die Cilostazol Tiere eine Kraft von 307 ± 5 g, nach zehn Minuten lag die Kraft bei Placebo bei 237 ± 9 g und bei Cilostazol bei 283 ± 6 g.

Nach fünf Minuten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Nach zehn Minuten unterschied sich die Kontraktionskraft im ischämischen Bein, in der Cilostazol Gruppe signifikant von der, der unbehandelten (Placebo) Gruppe. (Abbildung 4-20)

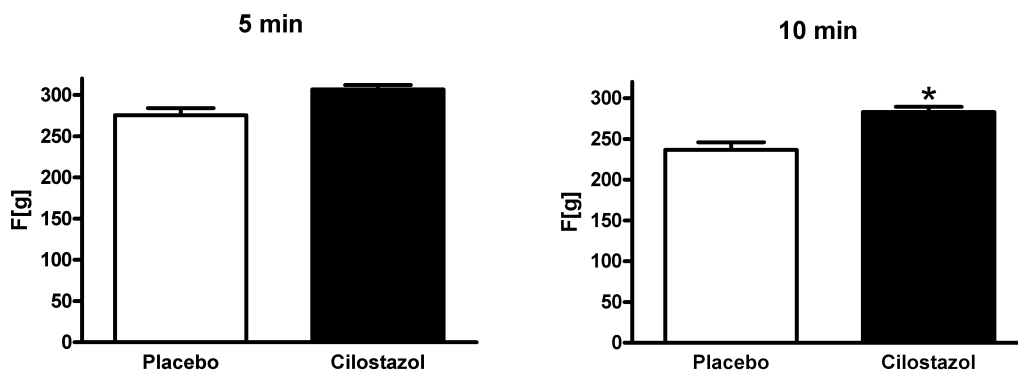


Abbildung 4-20

Absolute Kontraktionskraft (F) in g nach fünf und zehn Minuten der Gruppen Placebo und Cilostazol. (MW \pm SEM, Placebo vs. Cilostazol, *: $p < 0,05$, $n = 8-25$)

Das Verhältnis I/NI der Kontraktionskraft lag nach fünfminütiger Messung bei Placebo bei 92 ± 2 % und bei Cilostazol bei 98 ± 3 %. Nach zehnminütiger Messung lag das Verhältnis in der Placebo Gruppe bei 84 ± 3 % und in der Cilostazol Gruppe bei 96 ± 2 %.

Das Verhältnis I/NI der Kontraktionskraft unterschied sich somit bei den mit Cilostazol behandelten Tieren nach zehn Minuten signifikant von denen, die mit Placebo behandelt wurden. (Abbildung 4-21)

Ergebnisse

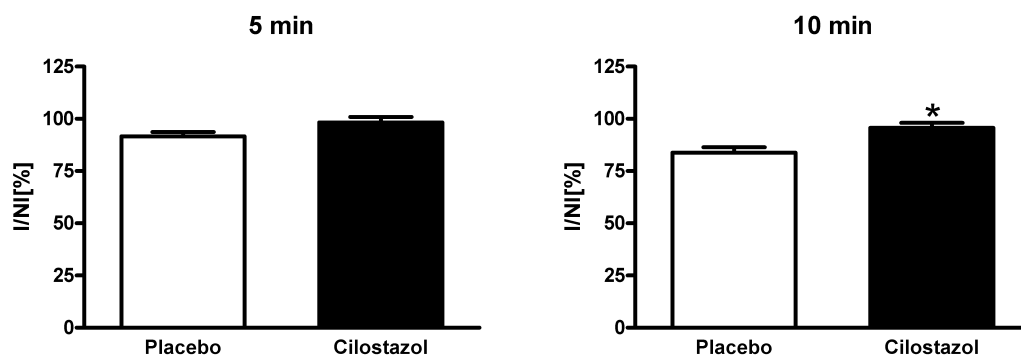


Abbildung 4-21

Kontraktionskraft, nach fünf und zehn Minuten, dargestellt als Verhältnis (I/NI) vom ischämischen Bein zum nicht ischämischen Bein in %. (MW \pm SEM, Placebo vs. Cilostazol, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, $n=8-25$)

4.3.2.6.2 Kontraktionsgeschwindigkeit

Die Kontraktionsgeschwindigkeit dF/dt_{max} betrug in der Placebo Gruppe nach fünf Minuten 17963 ± 895 g/s und in der Cilostazol Gruppe 21911 ± 715 g/s. Nach zehn Minuten lag sie in der Placebo Gruppe bei 15961 ± 930 g/s und in der Cilostazol Gruppe bei 21137 ± 678 g/s. Damit unterschieden sich die mit Cilostazol behandelten Tiere nach fünf und zehn Minuten signifikant von den unbehandelten Tieren. (Abbildung 4-22)

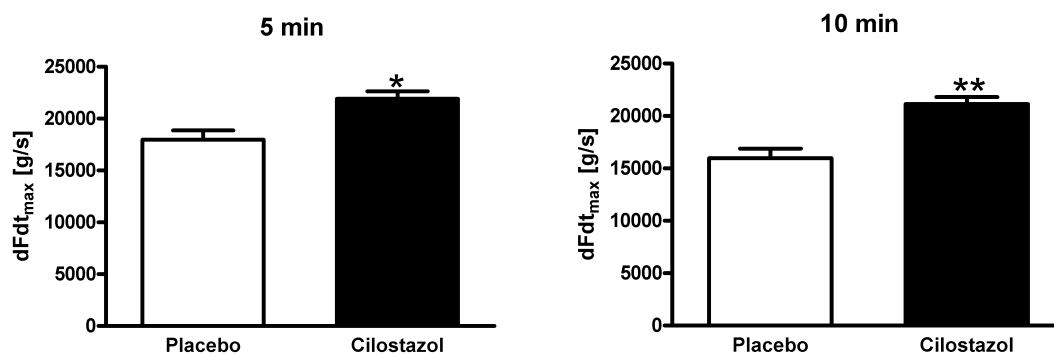


Abbildung 4-22

Kontraktionsgeschwindigkeit (dF/dt_{max}) bei Placebo- behandelten und bei Cilostazol- behandelten Tieren, in g/s, nach fünf und zehn Minuten. (MW \pm SEM, Placebo vs. Cilostazol, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, $n=8-25$)

Ergebnisse

Für die Kontraktionsgeschwindigkeit ergab sich nach fünf Minuten ein Verhältnis vom ischämischen Bein zum nicht ischämischen Bein (I/NI) von $75 \pm 4 \%$ in der Placebo Gruppe und von $90 \pm 3 \%$ in der Cilostazol Gruppe. Nach zehn Minuten lag das Verhältnis I/NI in der Placebo Gruppe bei $64 \pm 3 \%$ und in der Cilostazol Gruppe bei $83 \pm 2 \%$.

Die Behandlung mit Cilostazol führte somit an beiden Messzeitpunkten zu einer signifikanten Erhöhung des Verhältnisses I/NI. (Abbildung 4-23)

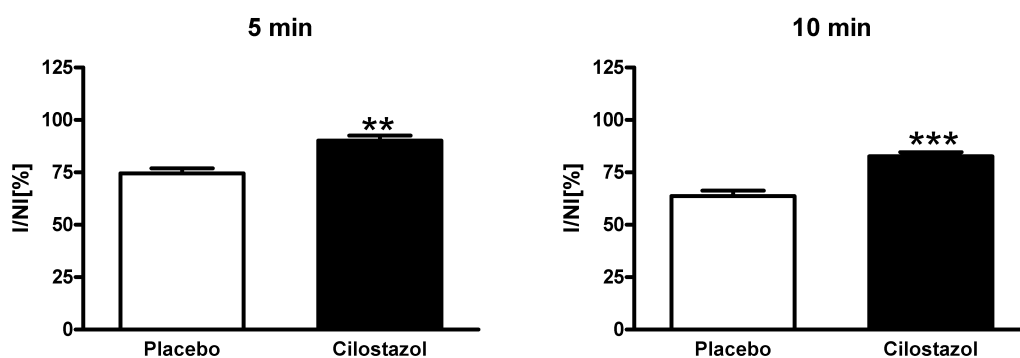


Abbildung 4-23

Verhältnis I/NI der Kontraktionsgeschwindigkeit in %, bei Placebo und Cilostazol, ausgewertet fünf und zehn Minuten nach Beginn der Messung. (MW \pm SEM, Placebo vs. Cilostazol, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, $n = 8-25$)

4.3.2.6.3 Relaxationszeit

Die Relaxationszeit RZ betrug bei den unbehandelten Tieren nach fünf Minuten 27 ± 2 ms, und bei den mit Cilostazol behandelten Tieren 17 ± 1 ms. Nach zehn Minuten lag sie bei den unbehandelten Tieren bei 19 ± 1 ms und bei den mit Cilostazol behandelten Tieren bei $12 \pm 0,4$ ms.

Somit unterschieden sich an beiden Messzeitpunkten, die mit Cilostazol behandelten Tiere signifikant von den unbehandelten Tieren. (Abbildung 4-24)

Ergebnisse

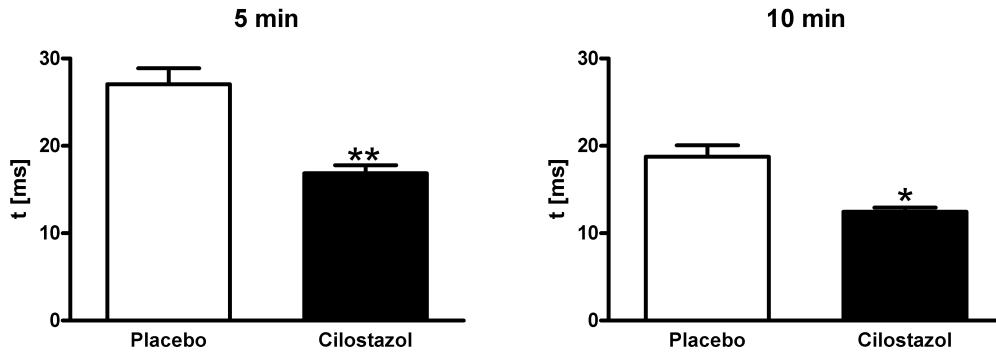


Abbildung 4-24

Absolute Relaxationszeiten (RZ) der Gruppen Placebo und Cilostazol in ms. (MW \pm SEM, Placebo vs. Cilostazol, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, $n = 8-25$)

Bei der Relaxationszeit ergab das Verhältnis des ischämischen Beins zum nicht ischämischen Bein (I/NI) folgende Werte: Nach fünf Minuten zeigte sich in der Placebo Gruppe ein Verhältnis von $226 \pm 10 \%$ und in der Cilostazol Gruppe ein Verhältnis von $160 \pm 11 \%$. Nach zehn Minuten lag das Verhältnis dann in der Placebo Gruppe bei $219 \pm 15 \%$ und in der Cilostazol Gruppe bei $157 \pm 6 \%$.

Das Verhältnis I/NI wurde nach fünf und nach zehn Minuten durch die Behandlung mit Cilostazol im Vergleich zu den unbehandelten Tieren signifikant erniedrigt. (Abbildung 4-25)

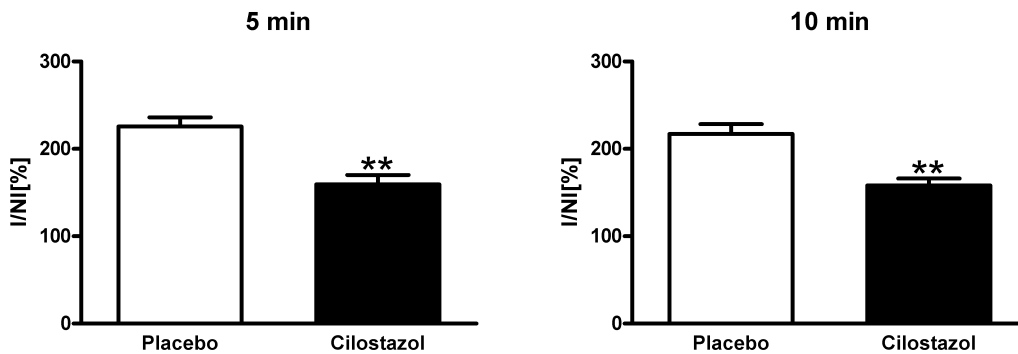


Abbildung 4-25

Die Verhältnisse (I/NI) der Relaxationszeiten der Gruppen Placebo und Cilostazol in %. (MW \pm SEM, Placebo vs. Cilostazol, **: $p < 0,01$, $n = 8-25$)

4.3.2.6.4 Relaxationsgeschwindigkeit

Die Relaxationsgeschwindigkeit dF/dt_{\min} lag in der Placebo Gruppe nach fünf Minuten bei -3088 ± 252 g/s und in der Cilostazol Gruppe bei -4992 ± 457 g/s. Zehn Minuten nach Beginn der Messung lag sie in der Placebo Gruppe bei -3773 ± 375 g/s und in der Cilostazol Gruppe bei -6325 ± 448 g/s.

Damit unterschied sich die Relaxationszeit der mit Cilostazol behandelten Tiere, nach fünf Minuten und nach zehn Minuten signifikant von den unbehandelten Tieren. (Abbildung 4-26)

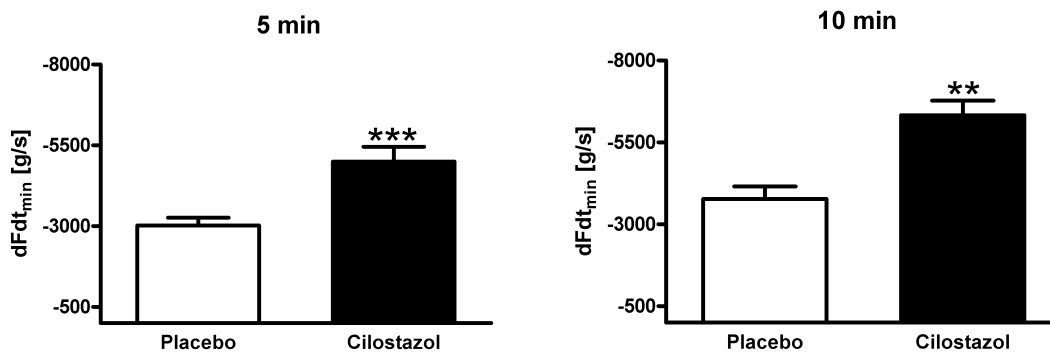


Abbildung 4-26

Die absolute Relaxationsgeschwindigkeit (dF/dt_{\min}) in g/s ist dargestellt, fünf und zehn Minuten nach Beginn der Messung. (MW \pm SEM, Placebo vs. Cilostazol, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, $n = 8-25$)

Der prozentuale Anteil der absoluten Relaxationsgeschwindigkeit des ischämischen Beins an der absoluten Relaxationsgeschwindigkeit des nicht ischämischen Beins betrug nach fünfminütiger Messung in der Placebo Gruppe 39 ± 2 % und in der Cilostazol Gruppe 57 ± 5 %. Nach zehnmütiger Messung lag der prozentuale Anteil bei Placebo bei 34 ± 2 % und bei Cilostazol bei 53 ± 4 %.

Die Behandlung mit Cilostazol führte zu beiden Zeitpunkten zu einer signifikanten Verbesserung des Verhältnisses im Vergleich zu den unbehandelten Tiere. (Abbildung 4-27)

Ergebnisse

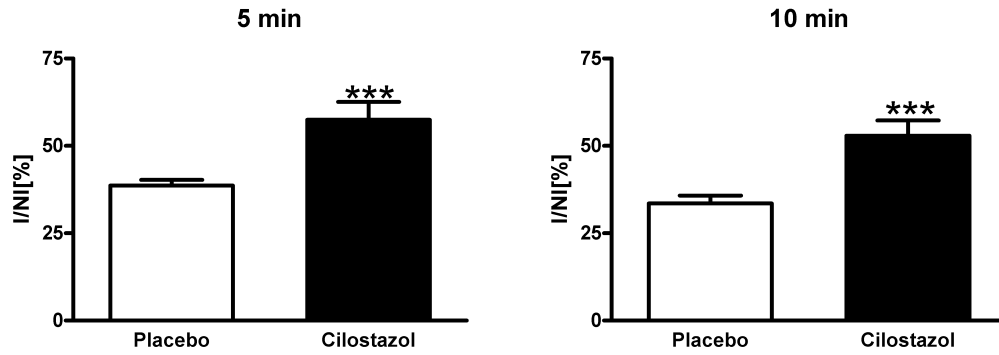


Abbildung 4-27

Verhältnis von I/NI der Relaxationsgeschwindigkeit in %, von unbehandelten (Placebo) und mit Cilostazol behandelten Tieren. (MW \pm SEM, Placebo vs. Cilostazol, ***: $p < 0,001$, $n = 8-25$)

4.3.2.7 Messung der Muskelermüdung (nicht invasiv)

Für die nicht invasive Studie wurden unbehandelte (n = 11) und mit Cilostazol behandelte diabetische Ratten (n = 11) eingesetzt. Sechsfundfünfzig Tage nach der Ligatur wurden nur sechs Tiere pro Gruppe gemessen.

4.3.2.7.1 Kontraktionskraft

Die mit Cilostazol behandelten Tiere zeigten nach der induzierten Ischämie, im Vergleich zu den unbehandelten Tieren, eine signifikant stärkere und schnellere Erholung der Kontraktionskraft. Nach acht Wochen war zwischen den Behandlungsgruppen, die sich beide stark erholt hatten, kein Unterschied mehr zu erkennen. (Abbildung 4-28)

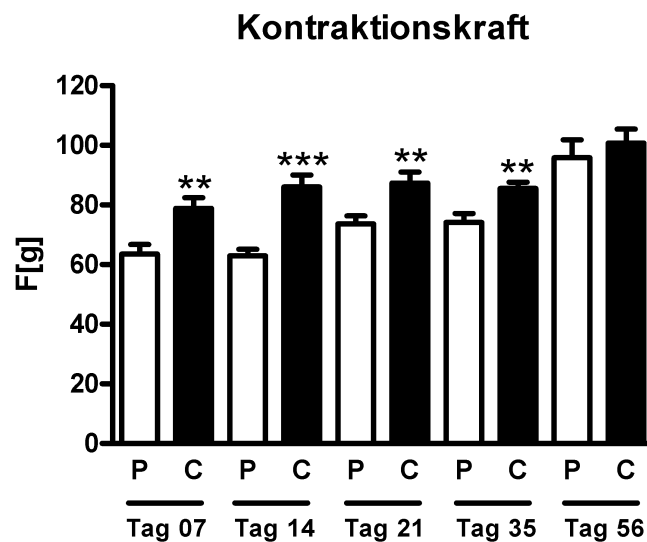


Abbildung 4-28

Absolute Kontraktionskraft (F) des ischämischen Beins in g, von unbehandelten (P) und mit Cilostazol behandelten (C) diabetischen Tieren, sieben, vierzehn, einundzwanzig, fünfunddreißig (n=11) und sechsfundfünfzig (n=6) Tage nach der Ligatur. (MW ± SEM, Placebo vs. Cilostazol, **: p < 0,01, ***: p < 0,001)

4.3.2.7.2 Kontraktionsgeschwindigkeit

Auch die Kontraktionsgeschwindigkeit dF/dt_{\max} erholte sich bei den mit Cilostazol behandelten Tieren, im Vergleich zu den unbehandelten Tieren, signifikant stärker. Nach acht Wochen war kein signifikanter Unterschied mehr zu erkennen. (Abbildung 4-29)

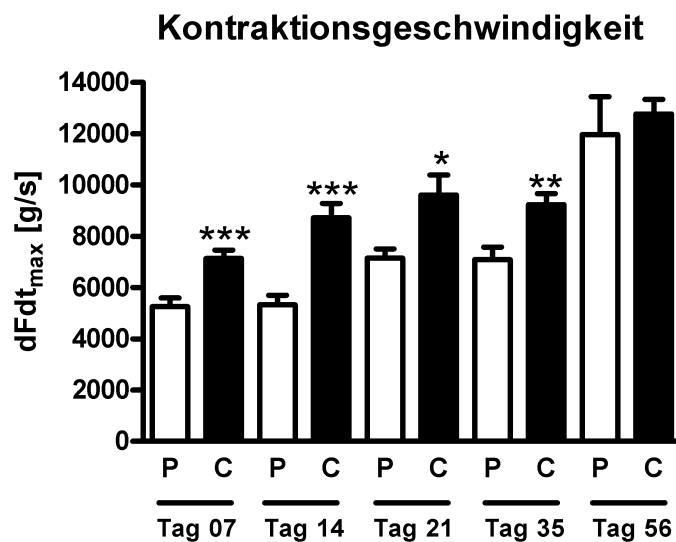


Abbildung 4-29

Absolute Kontraktionsgeschwindigkeit (dF/dt_{\max}) des ischämischen Beins in g/s von unbehandelten (P) und mit Cilostazol behandelten (C) diabetischen Tieren, sieben, vierzehn, einundzwanzig, fünfunddreißig (n=11) und sechsundfünfzig (n=6) Tage nach der Ligatur. (MW \pm SEM, Placebo vs. Cilostazol, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$)

4.3.2.7.3 Relaxationszeit

Die Relaxationszeit RZ war sieben und vierzehn Tage nach der Ligatur bei den mit Cilostazol behandelten Tieren, im Vergleich zu den unbehandelten, signifikant reduziert. Ausnahme war Tag einundzwanzig. Hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Nach fünfunddreißig Tagen war wieder ein signifikanter Unterschied ermittelbar, der aber, wie bei den anderen Parametern, nach acht Wochen wieder verschwand. (Abbildung 4-30)

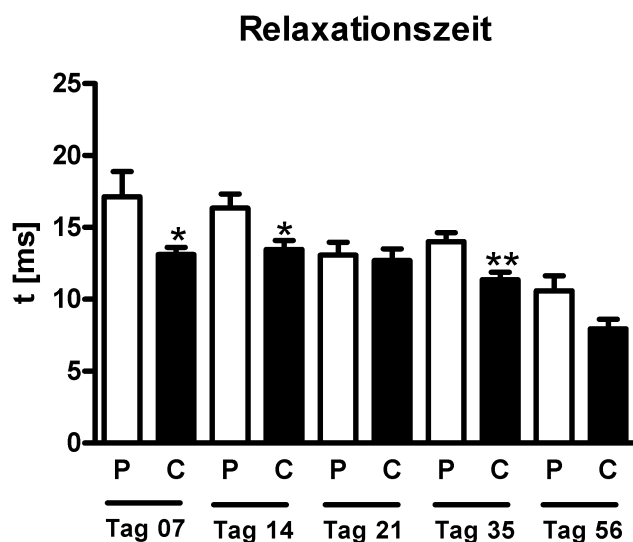


Abbildung 4-30

Absolute Relaxationszeit (RZ) in ms des ischämischen Beins von unbehandelten (P) und mit Cilostazol (C) behandelten diabetischen Tieren, sieben, vierzehn, einundzwanzig, fünfunddreißig (n=11) und sechsfundfünfzig (n=6) Tage nach der Ligatur. (MW \pm SEM, Placebo vs. Cilostazol, *: p < 0,05, **: p < 0,01)

4.3.2.7.4 Relaxationsgeschwindigkeit

Auch bei der Relaxationsgeschwindigkeit dF/dt_{\min} erkennt man, dass sie sich bei den mit Cilostazol behandelten Tieren schneller und stärker erholte. Nach vierzehn Tagen war der maximale Unterschied erreicht. Dann wurde der Abstand zwischen beiden Behandlungsgruppen wieder geringer und blieb bis nach fünf Wochen auf diesem Niveau. Nach acht Wochen hatte sich die Relaxationsgeschwindigkeit im ischämischen Bein in beiden Gruppen stark verbessert und es konnte kein signifikanter Unterschied mehr zwischen ihnen festgestellt werden. (Abbildung 4-31)

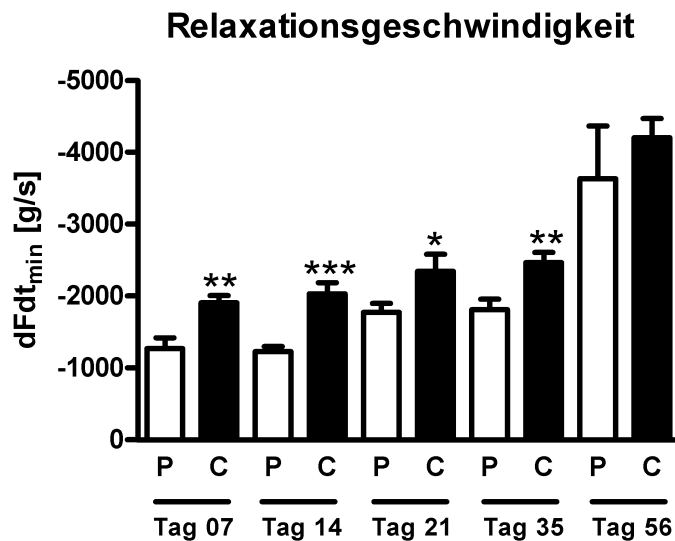


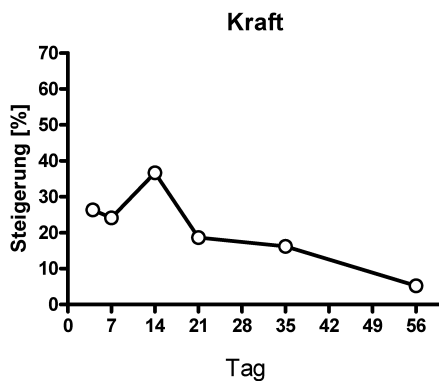
Abbildung 4-31

Absolute Relaxationsgeschwindigkeit (dF/dt_{\min}) des ischämischen Beins in g/s von unbehandelten (P) und mit Cilostazol (C) behandelten diabetischen Tieren, sieben, vierzehn, einundzwanzig, fünfunddreißig (n=11) und sechsundfünfzig (n=6) Tage nach der Ligatur. (MW ± SEM, Placebo vs. Cilostazol, *: p < 0,05, **: p < 0,01, ***: p < 0,001)

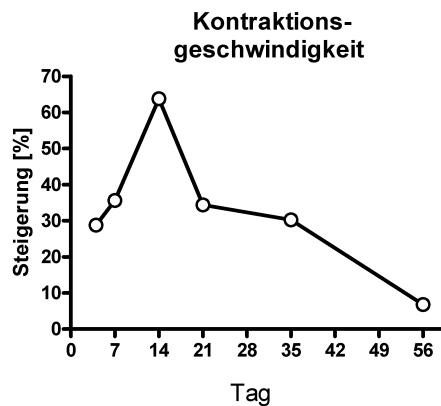
Ergebnisse

Abbildung 4-32 zeigt die Darstellung der prozentualen Steigerung der Parameter Kraft (A), Kontraktionsgeschwindigkeit (B), Relaxationszeit (C) und Relaxationsgeschwindigkeit (D) durch die Behandlung mit Cilostazol. Sie führte über den gesamten Zeitraum der Messungen zu einer signifikanten Verbesserung der oben genannten Parameter. Offenbar maximal war die Steigerung durch die Behandlung bei Kraft, Kontraktionsgeschwindigkeit und Relaxationsgeschwindigkeit vierzehn Tage nach der Ligatur. Die maximale Verringerung der Relaxationszeit lag sieben Tage nach der Ligatur. Insgesamt verkleinerte sich der Behandlungseffekt über den Verlauf der acht Wochen.

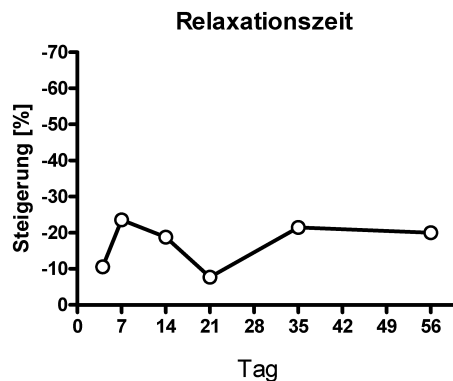
A



B



C



D

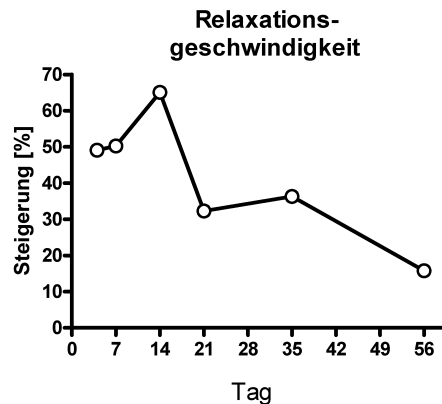


Abbildung 4-32

Prozentuale Steigerung der Absolutwerte des ischämischen Beins durch die Behandlung mit Cilostazol in %, vier (n = 4), sieben, vierzehn, einundzwanzig und fünfunddreißig (n = 11) und sechsundfünfzig (n = 6) Tage nach der Ligatur der A. iliaca communis. (MW)

Ergebnisse

Da die maximale Steigerung durch die Behandlung mit Cilostazol bei einem Großteil der Parameter vierzehn Tage nach der Ligatur erkennbar war, wurden die Messwerte als Verhältnis zu diesem Zeitpunkt exemplarisch dargestellt. (Abbildung 4-33)

Die Behandlung mit Cilostazol führte bei allen Parametern, im Vergleich zu den unbehandelten Tieren (Placebo), zu einer signifikanten Verbesserung des Verhältnisses.

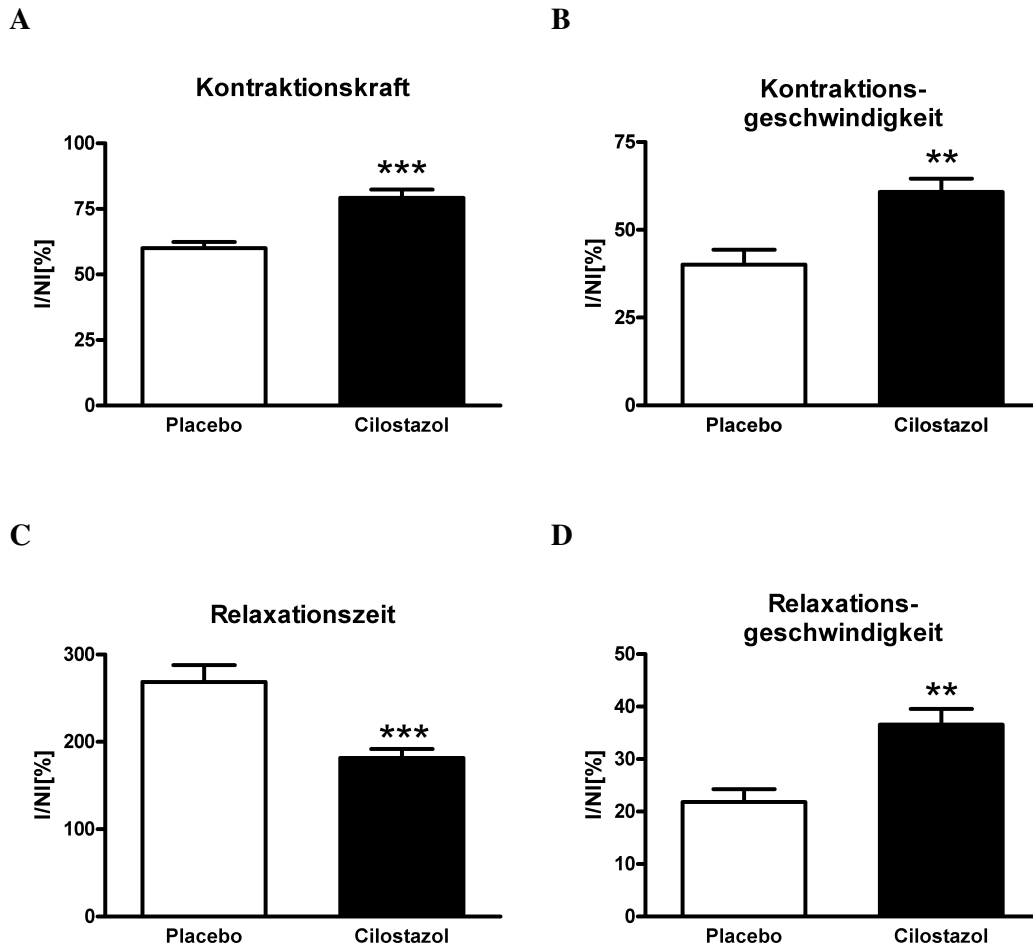


Abbildung 4-33

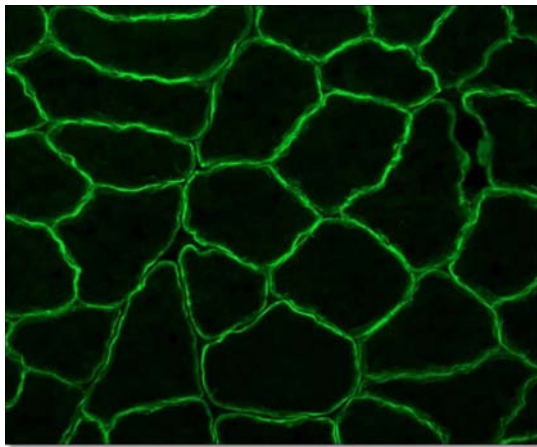
Exemplarische Darstellung des Verhältnisses vom ischämischen zum nicht ischämischen Bein (I/NI) in %, vierzehn Tage nach der Ligatur der *A. iliaca communis*, von unbehandelten (Placebo) und mit Cilostazol behandelten Tieren, nach zehnmündiger Messung. (MW \pm SEM, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, $n = 11$)

4.3.2.8 Histologie

Für die immunhistochemische Untersuchung wurde der M. gastrocnemius von unbehandelten diabetischen Ratten (n = 7) in drei Ebenen untersucht. Auf die Untersuchung von mit Cilostazol behandelten Tieren wurde zunächst verzichtet. (Abbildung 4-34)

Die Einzelwerte wurden graphisch als Mittelwerte vom ischämischen und vom nicht ischämischen Muskel dargestellt.

A



B

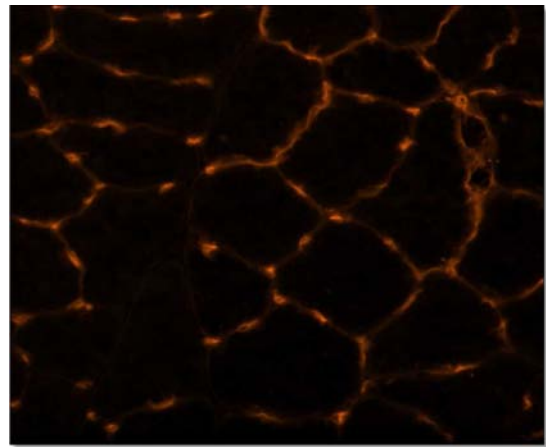


Abbildung 4-34

Immunhistochemische Darstellung der mit Anti Dystrophin Antikörper angefärbten Muskelzellen (A) und der mit Lectin BSI angefärbten Kapillaren (B).

4.3.2.8.1 Fläche der Muskelzellen in μm^2

Die Auswertung der mit Dystrophin gefärbten Schnitte ergab für die Muskelzellen im nicht ischämischen Bein im Mittel eine Fläche von $2099 \pm 173 \mu\text{m}^2$. Im ischämischen Bein hatten die Muskelzellen eine mittlere Fläche von $2072 \pm 205 \mu\text{m}^2$. Somit war hier zwischen dem nicht ischämischen und ischämischen Bein kein signifikanter Unterschied zu erkennen. (Abbildung 4-35)

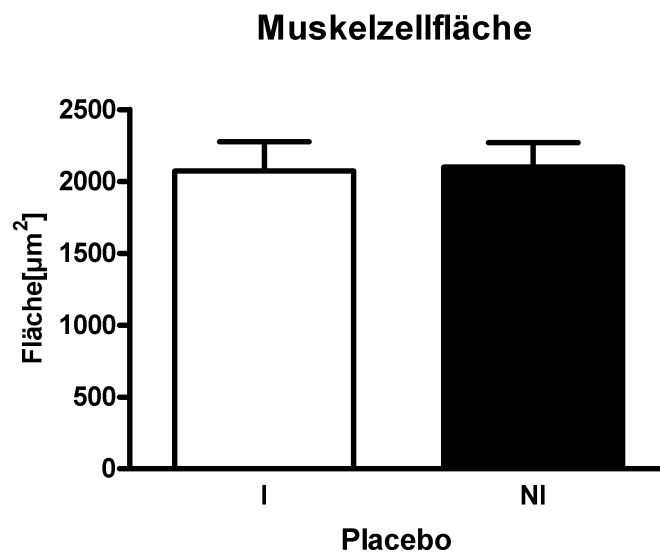


Abbildung 4-35

Die mittlere Muskelzellfläche in μm^2 in Muskelschnitten vom ischämischen (I) und vom nicht ischämischen Bein (NI) von unbehandelten (Placebo) Tieren. (MW \pm SEM, n = 7)

4.3.2.8.2 Kapillare pro Muskelzelle

Die Anzahl der Kapillare pro Muskelzelle (n) lag im Mittel bei den unbehandelten Tieren im nicht ischämischen Bein bei $2,15 \pm 0,14$ und im ischämischen Bein bei $2,19 \pm 0,09$. Insgesamt konnte kein Unterschied zwischen dem ischämischen und dem nicht ischämischen Bein festgestellt werden. (Abbildung 4-36)

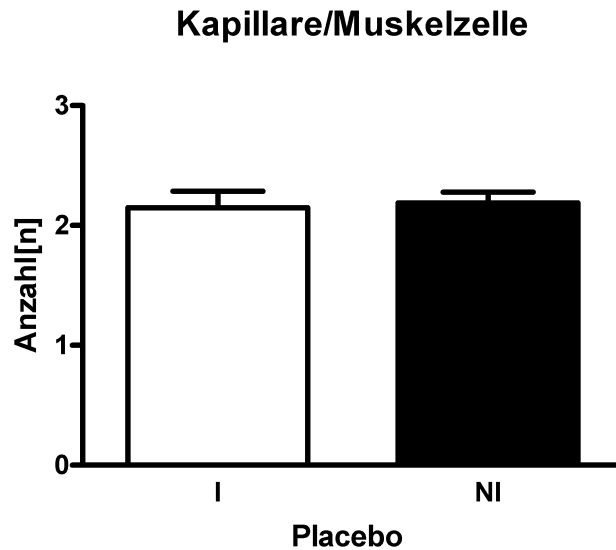


Abbildung 4-36

Die mittlere Kapillardichte, als Anzahl der Kapillare pro Muskelzelle (n), in Muskelschnitten vom ischämischen (I) und nicht ischämischen Bein (NI) von Placebo Tieren. (MW \pm SEM, n = 7)

4.4 Bilaterale Hinterlaufischämie bei der Maus

4.4.1 C57BL/6-Mäuse

4.4.1.1 Messung der Laufradleistung

4.4.1.1.1 Gesamtstrecke

Die Mittelwerte der täglich zurückgelegten Laufstrecke der behandelten, genetisch unveränderten C57BL/6-Mäuse unterschieden sich nur zwischen der zweiten und dritten Woche nach der Ligatur von den Mittelwerten der täglichen Strecke der unbehandelten C57BL/6-Mäuse. Insgesamt erholten sich die C57BL/6-Mäuse beider Gruppen innerhalb eines relativ kurzen Zeitraums. Vier Wochen nach der Ligatur erreichten beide Gruppen fast wieder ihre Ausgangsleistung. (Abbildung 4-37)

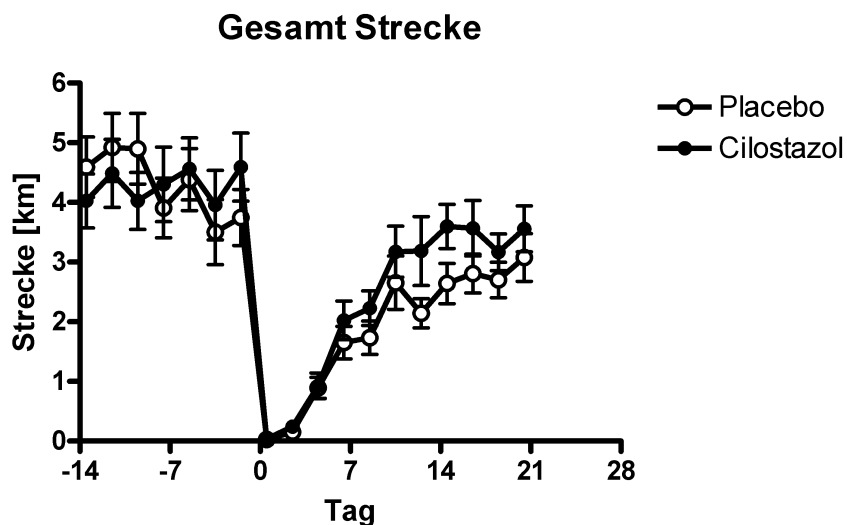


Abbildung 4-37

Tägliche Gesamtstrecke in km gemessen in einem Zeitraum von zwei Wochen vor der Ligatur der A. femoralis bis zu drei Wochen nach der Ligatur. Die täglichen Einzelwerte wurden jeweils über zwei Tage gemittelt dargestellt. (MW \pm SEM, n = 12)

Ergebnisse

Die mit Cilostazol behandelten Tiere erreichten nur in der zweiten und dritten Woche nach der Ligatur, bezogen auf die Ausgangsleistung, eine signifikant weitere Gesamtstrecke. Nach vier Wochen war die auf die Ausgangsleistung bezogene Strecke bei beiden Gruppen fast gleich. (Abbildung 4-38)

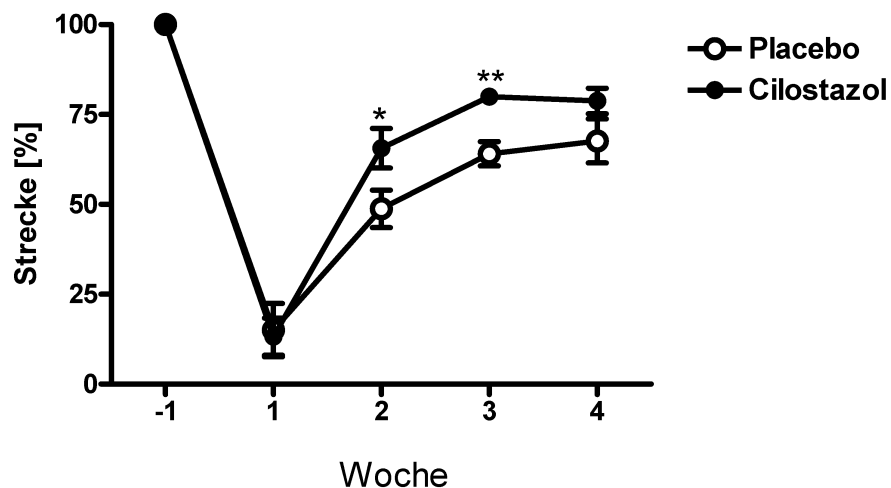


Abbildung 4-38

Zurückgelegte Strecke der Mäuse in % von ihrer mittleren Ausgangsstrecke (100 %) in den zwei Wochen vor der Ligatur, jeweils gemittelt über eine Woche. (MW \pm SEM, Placebo vs. Cilostazol, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, $n = 12$)

Da sich die Gesamtstrecke in Vorversuchen als der sensibelste Parameter herausgestellt hat und hier dauerhaft kein deutlicher Unterschied zwischen den Gruppen gezeigt werden konnte, wurde auf die statistische Auswertung von weiteren Parametern (Spitzengeschwindigkeit, Durchschnittsgeschwindigkeit, weiteste und längste Strecke, Anzahl der Laufinitiationen) verzichtet.

4.4.2 eNOS -/- Mäuse

4.4.2.1 Messung der Laufradleistung

4.4.2.1.1 Gesamtstrecke

Die eNOS-/- Mäuse erholten sich nach der Ligatur der A. femoralis deutlich langsamer als die genetisch unveränderten C57Bl/6-Mäuse. Die unbehandelten Tiere (Placebo) zeigten auch 35 Tage nach der Operation keine deutliche Verbesserung der Laufleistung. Dahingegen zeigten die mit Cilostazol behandelten Tiere eine deutliche Verbesserung der Gesamtlauflistung. Die täglich zurückgelegte Gesamtstrecke war, im Vergleich zu den unbehandelten Tieren, ab der dritten Woche signifikant verlängert. (Abbildung 4-39)

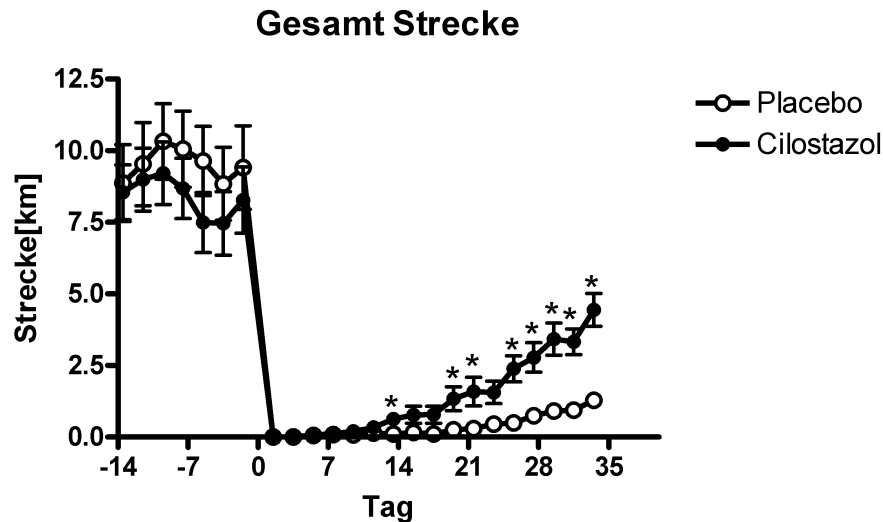


Abbildung 4-39

Mittlere Gesamtstrecke in km, dargestellt in einem Zeitraum von zwei Wochen vor der Ligatur der A. femoralis bis zu fünf Wochen danach. Die täglichen Einzelwerte wurden jeweils über zwei Tage gemittelt dargestellt. Verglichen werden Tiere, die mit Cilostazol behandelt wurden, mit unbehandelten (Placebo) Tieren. (MW ± SEM, Placebo vs. Cilostazol, *: $p < 0,05$, $n = 12$)

Ergebnisse

Die mit Cilostazol behandelten eNOS^{-/-} Mäuse erreichten nach fünf Wochen über 40 % ihrer Ausgangsstrecke (100 %), während die unbehandelten Tiere nur etwa 15 % davon zurücklegten. (Abbildung 4-40)

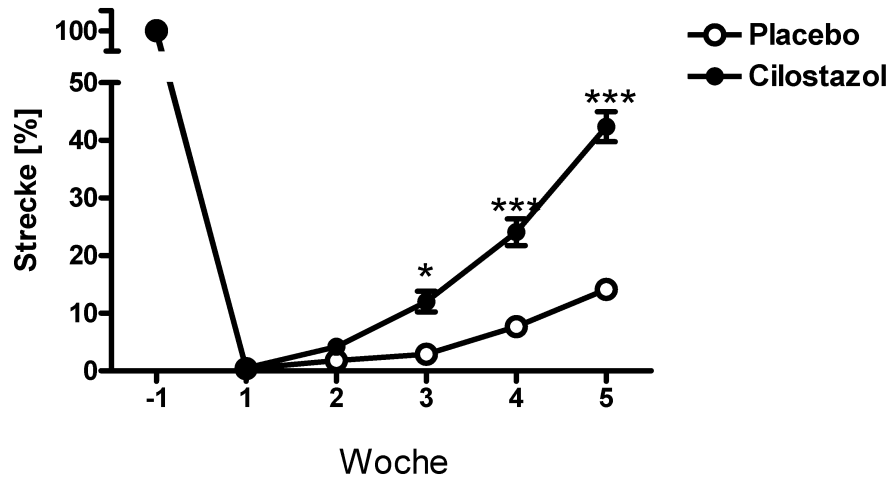


Abbildung 4-40

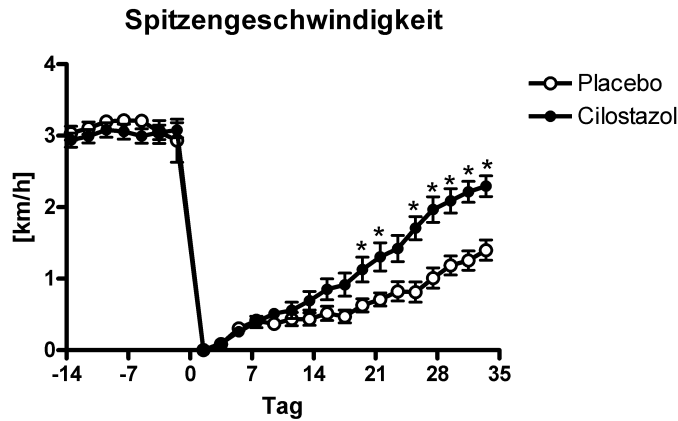
Zurückgelegte Strecke der Mäuse in % von ihrer mittleren Ausgangsstrecke (100 %), in den zwei Wochen vor der Ligatur, jeweils gemittelt über eine Woche. (MW \pm SEM, Placebo vs. Cilostazol, *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$, $n = 12$)

Ergebnisse

4.4.2.1.2 Spitzen- und Durchschnittsgeschwindigkeit

Die Spitzen- und die Durchschnittsgeschwindigkeit waren bei den mit Cilostazol behandelten Tieren, im Vergleich zu den Placebo Tieren, ab der dritten Woche signifikant erhöht und näherten sich bis nach 35 Tagen immer mehr ihrer Ausgangsleistung an. (Abbildung 4-41 A und B)

A



B

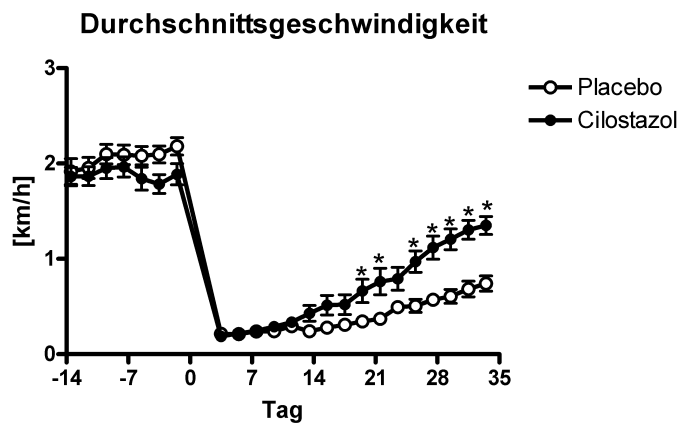


Abbildung 4-41

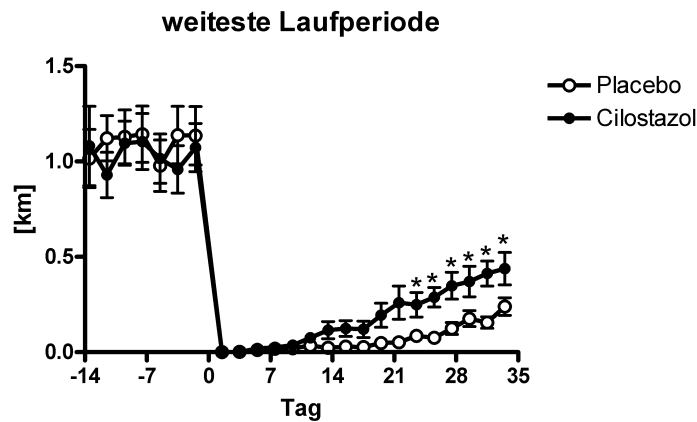
Spitzengeschwindigkeit (A) und Durchschnittsgeschwindigkeit (B) in km/h von unbehandelten (Placebo) und mit Cilostazol behandelten (Cilostazol) eNOS $-/-$ Mäuse. Die täglichen Einzelwerte wurden jeweils über zwei Tage gemittelt dargestellt. (MW \pm SEM, Placebo vs. Cilostazol, *: $p < 0,05$, $n = 12$)

Ergebnisse

4.4.2.1.3 Weitesten und Längsten Laufperiode

Die Behandlung mit Cilostazol führte ab der dritten Woche zu einer signifikanten Verlängerung der weitesten am Stück zurückgelegten Strecke. Dahingegen unterschieden sich die zwei Behandlungsgruppen hinsichtlich der längsten Laufperiode am Stück nicht so deutlich voneinander. Die längste am Stück dauernde Laufperiode war nach der bilateralen Ligatur der A. femoralis durch die Behandlung nicht dauerhaft signifikant verlängert.

A



B

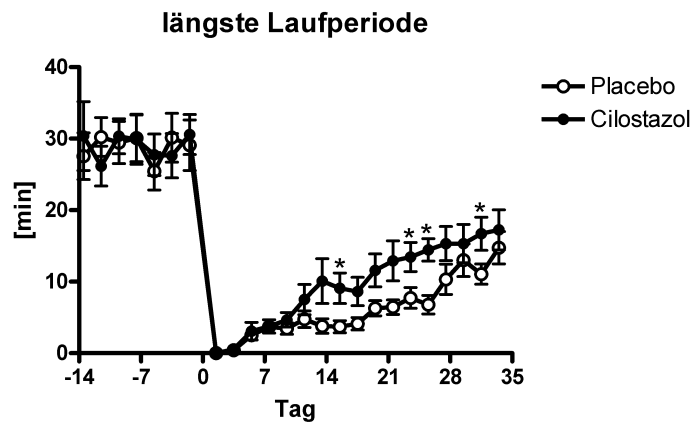


Abbildung 4-42

Die weiteste Laufperiode in km und die längste Laufperiode in Minuten von unbehandelten und mit Cilostazol behandelten eNOS^{-/-} Mäusen. Die täglichen Einzelwerte wurden jeweils über zwei Tage gemittelt dargestellt. (MW \pm SEM, Placebo vs. Cilostazol, *: $p < 0,05$, $n = 12$)

4.4.2.1.4 Gesamtzeit im Laufrad

Die Gesamtzeit, die Mäuse in ihrem Laufrad verbrachten, war durch die Behandlung mit Cilostazol, ab der dritten Woche, signifikant verlängert.

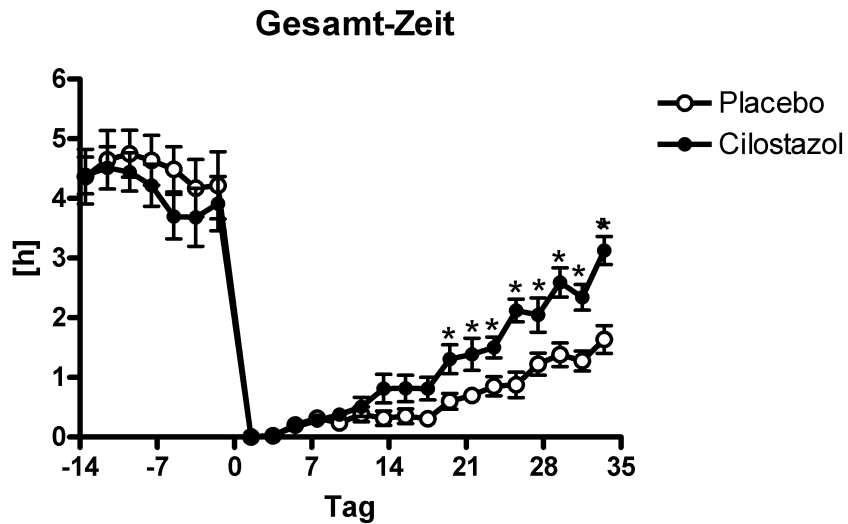


Abbildung 4-43

Absolute Gesamtzeit in Stunden (h), die Mäuse aus der Placebo Gruppe und der Cilostazol Gruppe im Laufrad verbrachten. Die täglichen Einzelwerte wurden jeweils über zwei Tage gemittelt dargestellt. (MW \pm SEM, Placebo vs. Cilostazol, *: $p < 0,05$, $n = 12$)

4.4.2.1.5 Anzahl der Laufperioden

Die Anzahl der Laufperioden war zwischen den zwei Gruppen, bis einschließlich zur vierten Woche, signifikant unterschiedlich.

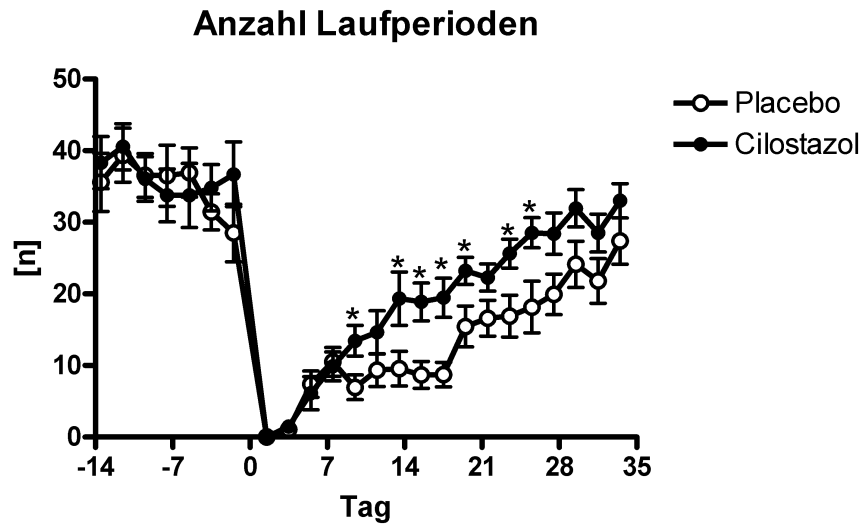


Abbildung 4-44

Die Anzahl der Laufperioden von Mäusen aus der unbehandelten oder der mit Cilostazol behandelten Tiergruppe. Die täglichen Einzelwerte wurden jeweils über zwei Tage gemittelt dargestellt. (MW \pm SEM, Placebo vs. Cilostazol, *: $p < 0,05$, $n = 12$)

4.4.2.1.6 Symptomklassifikation (Grad 1-Grad 4)

Bei der Klassifikation der Symptome erkennt man deutlich, dass von Beginn an die Behandlung mit Cilostazol zu einem verminderten Schweregrad der Symptome führte. Viele der unbehandelten Tiere ($n = 7$) mussten im Laufe der Zeit nach der Ligatur der A. femoralis abgetötet werden, da der komplette Fuß nekrotisch wurde (Grad 4). Dies kam bei den mit Cilostazol behandelten Tieren nur bei einer einzigen Maus vor. Die Tiere aus dieser Gruppe zeigten meist nur eine schwarze Verfärbung des Zehennagels (Grad 1).

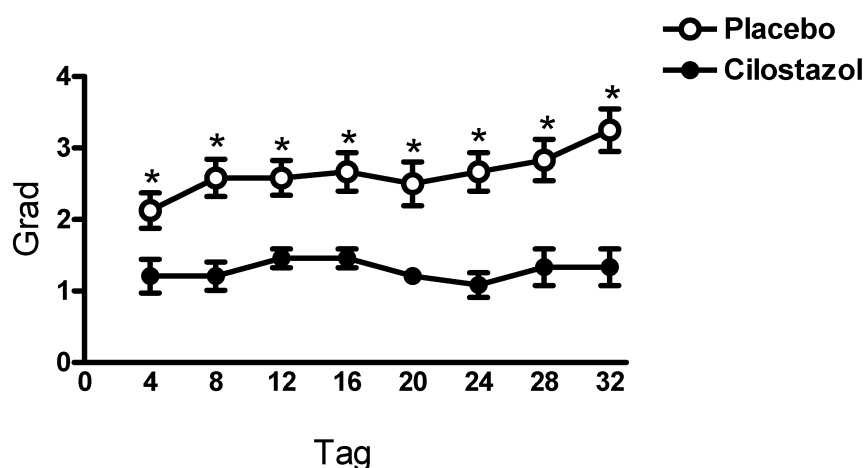


Abbildung 4-45

Symptomklassifikation der unbehandelten und der mit Cilostazol behandelten Tiere über einen Zeitraum von fünf Wochen nach der bilateralen Ligatur der A. femoralis. (MW \pm SEM, Placebo vs. Cilostazol, *: $p < 0,05$, $n = 12$)

4.4.2.1.7 Gesamtstrecke bei unoperierten eNOS^{-/-} Mäusen

Die Gesamtstrecke von unoperierten eNOS^{-/-} Mäusen wurde durch eine Behandlung von Cilostazol nicht beeinflusst. Da die Gesamtstrecke der sensitivste Parameter ist, und hier kein Einfluss von Cilostazol erkennbar war, wurde auf die Auswertung von weiteren Parametern verzichtet.

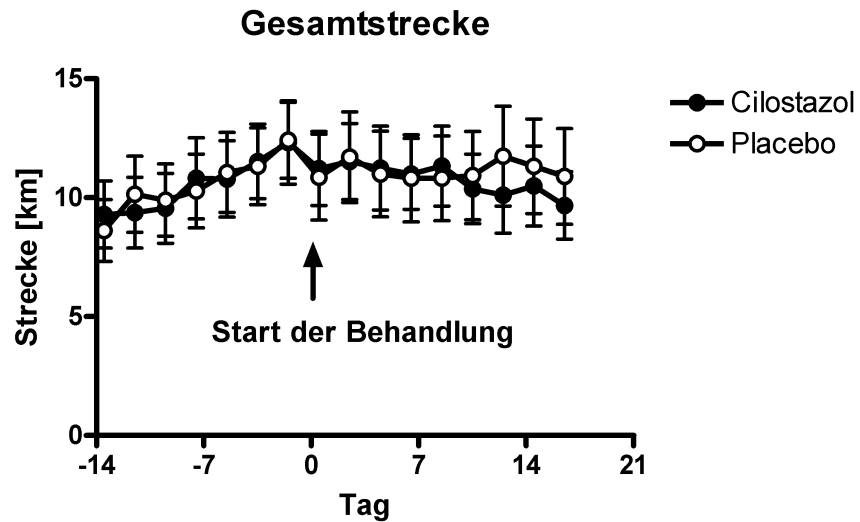


Abbildung 4-46

Mittlere Gesamtstrecke in km, dargestellt in einem Zeitraum von zwei Wochen vor der Behandlung, bis zu 2 1/2 Wochen danach. Verglichen wurden Tiere, die mit Cilostazol behandelt wurden, mit Tieren die mit Placebo behandelt wurden. Die täglichen Einzelwerte sind jeweils über zwei Tage gemittelt dargestellt. (MW \pm SEM, n = 9)

4.4.2.2 Blutdruckmessung

Die Blutdruckmessung mittels „Tail Cuff“ ergab einen Blutdruck von 121 ± 5 mmHg in der unbehandelten Gruppe und einen Blutdruck von 121 ± 3 mmHg in der mit Cilostazol behandelten Gruppe. Cilostazol hatte somit in dieser Studie keinen Einfluss auf den systolischen Blutdruck der eNOS^{-/-} Mäuse. (Abbildung 4-47)

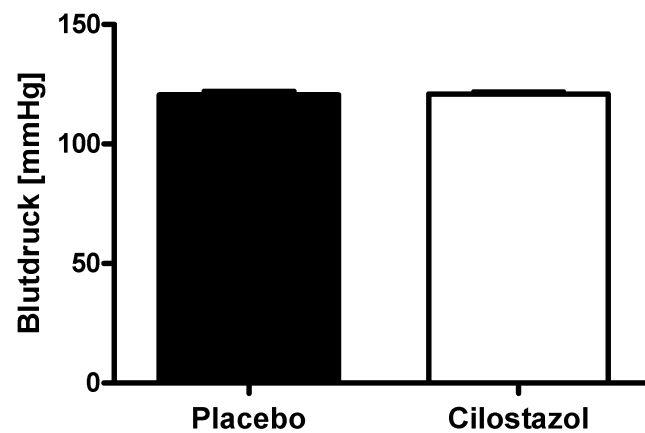


Abbildung 4-47

Systolischer Blutdruck in mmHg bei unbehandelten und mit Cilostazol behandelten eNOS^{-/-} Mäusen. (MW \pm SEM, n= 12)

5 Diskussion

5.1 Neue Tiermodelle

Allgemein

Die PAVK im Stadium II (Claudicatio intermittens) ist eine Erkrankung, welche die Lebensqualität und die Leistungsfähigkeit des Patienten erheblich einschränken kann. Zur symptomatischen Therapie stehen allerdings nur wenige zugelassene Substanzen zur Verfügung. Für Cilostazol wurde zwar eine Wirksamkeit nachgewiesen, allerdings besteht für Cilostazol nur eine beschränkte Einsatzfähigkeit, da es bei Patienten mit Herzinsuffizienz, wegen einer erhöhten Mortalität, nicht angewendet werden darf (Jacoby & Mohler, III 2004). Bei Pentoxifyllin existieren widersprüchliche Studienergebnisse, die seine Wirksamkeit als umstritten erscheinen lassen (Dawson *et al.* 2000). Naftidrofuryl und Buflomedin zeigen eine geringe Effektivität, sind aber nur in Europa zur Behandlung erhältlich (Jacoby & Mohler, III 2004). Insgesamt sind die Möglichkeiten zur symptomatischen Therapie der Claudicatio intermittens eingeschränkt, und daher ist die Entwicklung neuer Substanzen notwendig. Neue Medikamente können über verschiedene Mechanismen in die Erkrankung eingreifen. Interessant erscheinen Substanzen, die rheologische, vasodilatatorische und plättchenaggregationshemmende Eigenschaften besitzen (Dawson *et al.* 1998). Es reicht aber meist nicht aus, dass Substanzen eingesetzt werden, die nur über einen dieser Mechanismen wirken. Zum Beispiel haben reine Vasodilatoren (Solomon *et al.* 1991) oder reine Plättchenaggregationshemmer (Ciocon *et al.* 1997) keine Verlängerung der maximalen Gehstrecke gezeigt, während z. B. Cilostazol, das über vasodilatatorische und plättchenaggregationshemmende Eigenschaften verfügt, eine signifikante Verlängerung der Gehstrecke bewirkt (Dawson *et al.* 1998). Auch Substanzen zur therapeutischen Arterio- und Angiogenese (Lederman *et al.* 2002) werden zur Zeit auf ihre Wirksamkeit geprüft. Darauf wurden, aufgrund von vielversprechenden Ergebnissen in präklinischen Studien, große Hoffnungen gesetzt, die bislang in klinischen Studien jedoch nicht eindeutig bewiesen werden konnten (Rajagopalan *et al.* 2003). Außerdem führten Substanzen, die in den Muskelstoffwechsel eingreifen, (z. B. Propionyl-L-Carnitin) in der Behandlung der Claudicatio intermittens zu einer signifikanten Verlängerung der maximalen Gehstrecke, was aber auch noch in weiteren Studien bestätigt werden muss (Hiatt *et al.* 2001).

Diskussion

Um diese Vielzahl von klinischen Studien mit unterschiedlichen Substanzen vergleichen zu können, wurde die Durchführung von solchen Studien 1997 in Basel durch eine internationale Kommission (Transatlantic Conference on Clinical Trial Guidelines in Peripheral Art. Disease) standardisiert. Hier wurden Kriterien festgelegt, die das Studiendesign, die Patientenauswahl und die primären Endpunkte der Studien betreffen. Danach sollen in Phase III nur randomisierte, Placebo kontrollierte Doppelblindstudien mit einer Behandlungslänge von mind. 6 Monaten und einer mindestens vierwöchigen Nachbeobachtungsphase durchgeführt werden. Um eine stabile Ausgangssituation zu haben, soll eine längere Vorbeobachtungsphase (Run In Phase) eingeplant werden. In dieser Zeit werden die Patienten mehrmals untersucht und die Stabilität ihrer Symptome ermittelt. Patienten mit instabilen Symptomen sollten ausgeschlossen werden. Durch die lange Behandlungszeit können eventuelle Toleranzeffekte aufgedeckt werden. In der vierwöchigen Nachbeobachtungsphase soll gezeigt werden, dass es nach dem Absetzen der Substanz zu keinem Rebound Effekt kommt. Der primäre Endpunkt klinischer Studien sollte die maximale und die maximale schmerzfreie Gehstrecke sein. Diese können mit international akzeptierten Protokollen auf dem Laufband ermittelt werden. Sekundärer Endpunkt sollte die Ermittlung der Lebensqualität sein. Zusätzlich sollten immer Daten zu Morbidität und Mortalität erhoben werden, um die Sicherheit der Substanzen feststellen zu können (Labs *et al.* 1999). Diese Standards führen seitdem bei klinischen Studien zu einer hohen Vergleichbarkeit, bezüglich der Effektivitäten der getesteten Substanzen.

Dahingegen gibt es für präklinische Untersuchungen keinen validierten Standard. Die zahlreichen Studien untersuchen mit vielen verschiedenen Methoden ähnliche Endpunkte. Diese sind daher kaum miteinander zu vergleichen. So wurde z. B. in einigen Studien die Effektivität einer Behandlung durch die Bestimmung der Kapillarisation ermittelt (Emanuelli *et al.* 2001), wobei in anderen hierzu eine angiographische Darstellung der Kollateralgefäße (Brevetti *et al.* 2003) erfolgte. Zur nicht invasiven Messung der Hautdurchblutung wurde häufig die Methode des „laser doppler imaging“ (LDI) verwendet (Silvestre *et al.* 2000) oder die Muskeldurchblutung wurde direkt invasiv mittels Mikrosphären untersucht (Okyayuz-Baklouti *et al.* 1989). Das gleiche gilt für die Messung der Muskelermüdung, bei der die Vergleichbarkeit durch unterschiedliche Stimulationsprotokolle und Versuchsaufbauten erschwert wird. Es ist außerdem nicht klar, mit welchem Parameter die klinische Situation des Patienten mit Claudicatio intermittens am Genausten dargestellt wird und welcher sich somit am Besten eignet, um die klinische Wirksamkeit von Substanzen vorherzusagen.

Diskussion

Die Situation wird zusätzlich dadurch erschwert, dass für die Standardtherapie Cilostazol kaum präklinische Daten in Modellen für die Indikation PAVK vorliegen, an denen man sich orientieren könnte. Es erscheint daher sinnvoll neue präklinische Modelle zu entwickeln, die die klinische Situation des Patienten mit Claudicatio intermittens möglichst genau widerspiegeln und diese dann mit Cilostazol, als momentan einzig wirksamer Substanz zur Behandlung der PAVK, zu validieren.

Patienten mit Claudicatio intermittens haben atherosklerotisch bedingte Stenosen in den Arterien der Beine, die zu einer verminderten Perfusion der entsprechenden Muskulatur führen. Dieser verminderte Perfusionsdruck im ischämischen Bein (ABI 0,4 - 0,9) führt in Ruhe zu keinen Ischämie bedingten Schmerzen oder trophischen Störungen. Erst unter Belastung kann die Durchblutungseinschränkung nicht mehr kompensiert werden und es kommt zu den typischen ischämischen Schmerzen in der entsprechenden Muskulatur, die weiterhin zu funktionellen Einschränkungen und damit zu einer Verkürzung der Gehstrecke führen (Cetin & Baumgartner 2004).

Primärer Endpunkt klinischer Studien ist daher die funktionelle Verbesserung, die durch die Bestimmung der maximalen schmerzfreien und der maximalen Gehstrecke ermittelt wird (Money *et al.* 1998, Kieffer *et al.* 2001, Mohler, III *et al.* 2003). Aber gerade in präklinischen Modellen zur therapeutischen Arterio- und Angiogenese (Emanuelli *et al.* 2002), als auch in anderen Modellen (Couffinhal *et al.* 1998), wurde häufig nur die Wirkung von Substanzen auf die Kapillarisation, beziehungsweise die Durchblutung in Ruhe überprüft.

Die Messung der Durchblutung in Ruhe (z. B. ABI) ist zwar ein guter diagnostischer Parameter, korreliert aber klinisch nicht unbedingt mit der funktionellen Einschränkung der Patienten mit Claudicatio intermittens (Hiatt *et al.* 1995). Im Einklang dazu existieren einige Therapien, die zwar zu einer Verbesserung des Gehvermögens und der Leistungsfähigkeit führen, gleichzeitig aber nicht den ABI bzw. die Extremitätendurchblutung verbessern (Hiatt *et al.* 1990, Regensteiner *et al.* 1993, Hiatt *et al.* 1995). Dahingegen führten in einer anderen Studie die Behandlungen mit Cilostazol und mit Pentoxifyllin zu einer geringen Verbesserung des ABI, von 0,66 auf 0,7, aber nur die Behandlung mit Cilostazol führte gleichzeitig auch zu einer funktionellen Verbesserung, in Form einer signifikant verlängerten Gehstrecke (Dawson *et al.* 2000). Außerdem gibt es Behandlungsstrategien, die nur über eine Beeinflussung des Muskelstoffwechsel zu einer signifikanten Gehstreckenverbesserung bei Claudicatio-Patienten geführt haben (Brevetti *et al.* 1999).

Daher sollten auch präklinische Modelle als Endpunkt die funktionelle Verbesserung miteinschließen. Eine konservative Therapie beim Patienten muss ja schließlich nicht zeigen, dass sie eine Verbesserung der Durchblutung in Ruhe bedingt, sondern dass sie zu einer Verbesserung der Leistungsfähigkeit (Gehstrecke) des Patienten mit Claudicatio intermittens führt (Hiatt 2004).

Das Modell der unilateralen Hinterlaufischämie an der Ratte

Um für die Klinik eine höhere Prädiktabilität zu erreichen, wurde an der Ratte ein Modell entwickelt, mit dem Ziel, dass die Tiere eine chronische Einschränkung in der Durchblutung haben, die beim Patienten einem ABI von etwa 0,5 entspricht. Die verminderte Durchblutung sollte keine Beschwerden in Ruhe (Hinken, trophische Störungen) bedingen, sondern nur innerhalb von fünf bis zehn Minuten zu einer belastungsinduzierten Muskelermüdung führen. Außerdem sollte in dem neuen Modell die Multimorbidität des Patienten mit Claudicatio intermittens berücksichtigt werden.

Um die festgelegten Ziele zu erreichen, wurde in dieser Arbeit bei Ratten eine Ligatur der rechten A. iliaca communis (Fulgenzi *et al.* 1998) durchgeführt. Dies hatte gegenüber einer einfachen Ligatur (Challiss *et al.* 1986) oder Exzision der A. femoralis (Hong *et al.* 2001) den Vorteil, dass die signifikante Einschränkung der Durchblutung in Ruhe mindestens über zwei Wochen (Fulgenzi *et al.* 1998) aufrechterhalten werden konnte, ohne aber dass es zu trophischen Störungen kam, was mehr einem Modell der kritischen Extremitätenischämie (Stadium II und IV nach Fontaine) und nicht einer Claudicatio intermittens (Stadium II nach Fontaine) entsprochen hätte.

Dadurch, dass die Durchblutungseinschränkung über zwei Wochen erhalten werden konnte, war es möglich die Chronizität der Erkrankung darzustellen. Außerdem kommt es vor allem innerhalb der ersten Woche nach der Ligatur zu den stärksten endogenen Kompensationen der Ischämie (Ito *et al.* 1997, Herzog *et al.* 2002), die etwa nach ca. 2 Wochen ein Plateau erreichen. Damit erreichte das Modell erst eine gewisse Stabilität und eine Überlagerung von endogener Kompensation und Substanzeffekt wurde dadurch weitestgehend vermieden (Waters *et al.* 2004).

Diskussion

Um die Durchblutungseinschränkung in Ruhe zu quantifizieren, wurde in dieser Arbeit die Perfusionsdruckmessung angewandt. Diese wurde bisher nur beim Kaninchen (Hong *et al.* 2001) durchgeführt und stellt somit für die Ratte eine neue, nicht invasive Methode zur Messung der Muskeldurchblutung dar. Die Einschränkung des Perfusionsdruckes im ischämischen Bein der Ratte lag in diesem Modell nach zwei Wochen im Vergleich zum nicht ischämischen Bein bei 50 %. Dies entspricht in etwa einem ABI von 0,5 und liegt damit im Bereich von Patienten mit Claudicatio intermittens, die in verschiedenen klinischen Studien zur Evaluierung von Substanzen untersucht wurden. Zum Beispiel lag der mittlere ABI in einer klinischen, randomisierten Doppelblindstudie zur Testung von Cilostazol im Mittel bei 0,55 (Dawson *et al.* 1998), in anderen zur Testung von Pentoxifyllin bzw. Naftidrofuryl bei ungefähr 0,6 (Donaldson *et al.* 1984, Gallus *et al.* 1985, Adhoute *et al.* 1990).

Andere Arbeitsgruppen verwendeten zur nicht invasiven Durchblutungsmessung in Ruhe die Methode des LDI (Couffinhal *et al.* 1998, Rivard *et al.* 1999). Mit dieser Methode wird die Durchblutung in der Mikrozirkulation der Haut und nicht die Durchblutung der Muskulatur gemessen. Es gibt zwar Studien die im Modell der unilateralen Hinterlaufischämie die Einschränkung im Blutfluss mittels LDI gemessen haben (Couffinhal *et al.* 1998, Murohara *et al.* 1998, Scholz *et al.* 2002, Emanuelli *et al.* 2002), aber es bleibt unklar, ob eine Einschränkung in der Muskelperfusion 1:1 zu einer Veränderung in der Hautdurchblutung führt. Dazu zeigte eine präklinische Studie bei Mäusen nach unilateraler Ligatur der A. femoralis, dass die Ergebnisse der LDI Messung nicht mit denen der Mikosphärentechnik korrelierten. Die Mikosphärentechnik gilt als eine sehr genaue Messmethode zur Bestimmung der gesamten Muskeldurchblutung. In der präklinischen Studie wurde, gemessen mit dem LDI sieben Tage nach der Ligatur keine Einschränkungen im Blutfluss mehr festgestellt werden. Dahingegen konnte mit der Mikosphärentechnik noch eine erhebliche Einschränkung ermittelt werden (Hofer *et al.* 2002). Diese unterschiedlichen Ergebnisse sind wahrscheinlich auf eine fehlende Standardisierung der LDI Messung zurückzuführen. Gerade die Temperatur hat einen großen Einfluss auf die Messergebnisse. Die Körperkerntemperatur der Tiere hat Einfluss auf den Grad der Vasodilatation der Hautgefäße. In eigenen Untersuchungen zeigte sich, dass die Vasodilatation der Hautgefäße erst bei Kerntemperaturen von über 39,5 °C maximal ist. Zusätzlich wurde erkennbar, dass auch geringgradig unterschiedliche Umgebungstemperaturen oder Zugluft den Gefäßtonus der Hautgefäße beeinflussen. Problematisch ist dies insofern, dass eine vermehrte Vasokonstriktion hauptsächlich im nicht ischämischen Bein zu einer verminderten Hautdurchblutung führen kann.

Diskussion

Im ischämischen Bein ist die Durchblutung schon massiv vermindert. Nachfolgend kommt es zu einer Verschiebung des Verhältnisses vom ischämischen zum nicht ischämischen Bein und so zu falsch negativen Ergebnissen. Insbesondere bei Mäusen ist die Konstanthaltung der Temperatur schwierig, da sie in Narkose sehr schnell auskühlen. Eine Wärmeplatte alleine reichte in unseren Versuchen, im Gegensatz zu anderen Studien (Murohara *et al.* 1998, Couffinhal *et al.* 1998, Emanuelli *et al.* 2002), nicht aus. Um zusätzlich den Einfluss von wechselnden Umgebungstemperaturen und Zugluft zu mindern, lagen die Mäuse in einer aus Plexiglas gefertigten, beheizten Kammer (Scholz *et al.* 2002). Insgesamt hat sich diese Messung dadurch, im Vergleich zur Perfusionsdruckmessung, in unseren Modellen als variabler und zeitaufwendiger erwiesen. Aus diesem Grund wurde diese Methode nicht in die vorliegende Arbeit aufgenommen.

Mit der Implantation von Flusssonden über den hauptzuführenden Arterien kann die maximale vasodilatatorische Reserve der Gefäße in der Extremitätenmuskulatur gemessen werden (Janiak *et al.* 2002). Nachteil ist, dass die Arterien über denen die Flusssonden implantiert werden auch andere, nicht ischämische Muskeln versorgen, in denen der periphere Gefäßwiderstand durch eine Behandlung sehr viel stärker gesenkt werden kann, als in den ischämischen Muskeln, die über Kollateralgefäße versorgt werden. Dies kann zu falsch positiven Ergebnissen führen (Waters *et al.* 2004).

Eine weitere invasive Methode der Durchblutungsmessung ist die Verwendung von Mikrosphären (Laughlin *et al.* 1982). Die Messung der Durchblutung mit Mikrosphären hat den Vorteil, dass mit ihr sehr genau der Blutfluss in die entsprechende Muskulatur messbar ist. Nachteil ist dahingegen, dass dieser Versuch und die Aufbereitung sehr zeitaufwendig sind und infolge der hohen Invasivität nur als Finalversuch durchgeführt werden kann. In unseren Untersuchungen mit Mikrosphären (nicht dargestellt), konnte bei Wistar Ratten vierzehn Tage nach der Ligatur in Ruhe eine Einschränkung der Durchblutung ermittelt werden, die mit der, der Perfusionsdruckmessung vergleichbar war. Daher wurde weiterhin auf diese aufwendige Technik der Durchblutungsmessung verzichtet.

Die an die Ratte adaptierte Perfusionsdruckmessung stellt eine einfache Methode dar die Muskeldurchblutung zu bestimmen. Durch ihre fehlende Invasivität erlaubt sie die individuelle Evaluierung des Blutflusses bei jedem Tier unmittelbar vor und nach der Ligatur der A. iliaca communis und im weiteren Verlauf des Versuches. Außerdem entspricht der Perfusionsdruckindex dem klinischen Parameter ABI und erlaubt so einen Vergleich mit den klinischen Stadien für die Indikation PAVK.

Histologische Untersuchungen

Die histologischen Untersuchungen der Kapillardichte in der Wadenmuskulatur, die von uns zwei Wochen nach der Ligatur durchgeführt wurden, sollten Rückschlüsse auf den Grad der Angiogenese in der Muskulatur geben. Normalerweise führt ein fallender Sauerstoffpartialdruck zu einer Induktion von Transkriptionsfaktoren (z. B. HIF-1 α) und nachfolgend zur vermehrten Expression von VEGF (Carmeliet 2000). Zusätzlich kommt es im ischämischen Gebiet durch lokale Gewebszerstörung zu entzündlichen Veränderungen (Arras *et al.* 1998). Diese können zu einer verstärkten Angiogenese führen.

In unseren Versuchen konnte kein Unterschied zwischen der Kapillardichte des ischämischen Beins und der des nicht ischämischen Beins festgestellt werden. Dies kann damit erklärt werden, dass die Ischämie und die nachfolgende Hypoxie in der Wadenmuskulatur in unserem Modell in Ruhe so gering waren, dass sie nicht zu einer Stimulation der Angiogenese führten. Aus diesem Grund wurden auch keine mit Cilostazol behandelten Tiere mehr untersucht.

Unsere Untersuchungsergebnisse entsprechen denen einer Studie, in der eine Ligatur der A. iliaca communis bei der Ratte nach einer und nach zwei Wochen zu keinen Unterschieden in der Kapillardichte führte. Erst nach fünf Wochen konnte eine geringfügige, nicht signifikante Steigerung (+12 %) der Kapillardichte ermittelt werden, die durch eine vermehrte Aktivität und eine damit verbundene stärkere Ischämie in der entsprechenden Muskulatur der Tiere erklärt wurde (Brown *et al.* 2003). Dahingegen konnte in einer anderen Studie bei Mäusen sieben Tage nach einer Exzision der A. femoralis eine signifikante Steigerung der Kapillardichte beobachtet werden. Hier kam es allerdings schon in Ruhe zu starken trophischen Störungen (Couffinhal *et al.* 1998) und ist daher nicht mit den Ergebnissen unserer Studien zu vergleichen.

Dies zeigt, dass es nur zu einer vermehrten Angiogenese und damit Kapillarisation kommt, wenn Ischämie und die nachfolgende Hypoxie in der entsprechenden Muskulatur stark genug ausgeprägt sind. Damit erscheint die Untersuchung der Kapillarisation eher für ein Modell der kritischen Extremitätenischämie geeignet zu sein, als für ein Modell der Claudicatio intermittens.

Invasive Messung der Muskelermüdung an der Ratte

Um zu überprüfen, ob eine verminderte Perfusion in Ruhe in diesem Modell auch zu einer stärkeren Ermüdung der Wadenmuskulatur unter Belastung führt, wurden in dieser Arbeit Messungen der Muskelfunktion durchgeführt. Das Stimulationsprotokoll, welches in Vorversuchen ermittelt wurde, bedingte maximale Kontraktionen, die allerdings nur in der Wadenmuskulatur des ischämischen, aber nicht in der Wadenmuskulatur des nicht ischämischen Beins innerhalb der zehnminütigen Messung zu einer Ermüdung führten. Das nicht ischämische Bein konnte so als interne Kontrolle verwendet werden.

Die Kontraktionskraftmessungen wurden bisher nur von wenigen Arbeitsgruppen *in vivo* ausgewertet. Die Stimulation der Wadenmuskulatur zur Kontraktion wurde meist nur zur Messung der Durchblutung unter Belastung mittels Mikrosphären verwendet (Elander *et al.* 1985, Okyayuz-Baklouti *et al.* 1989). Seltener wurde hiermit auch direkt die Muskelfunktion bestimmt. Dabei wurde von allen Arbeitsgruppen die Kraftentwicklung der Wadenmuskulatur im ischämischen Bein im Verlauf der Stimulation gemessen. Ausgewertet wurde dann der „Fatigue Index“, bei dem die entwickelte Kraft am Ende der Stimulation mit der entwickelten Kraft der Stimulation zu Beginn ins Verhältnis gesetzt wurde (Okyayuz-Baklouti *et al.* 1989, Fulgenzi *et al.* 1998). Dies galt dann als Maß der Ermüdung im ischämischen Bein. In der Arbeit von Okyayuz -Baklouti sank die Kraft über den Zeitraum der Messung im ischämischen Bein relativ stark ab. Sie lag zu Beginn bei 240 g, nach 15 min bei 68 g und am Ende der Messung nach 45 min bei 55 g. Die Kraft im ischämischen Muskel verminderte sich also um etwa 78 %. Aber auch im nicht ischämischen Bein sank sie stark, nämlich um 70 % (Okyayuz-Baklouti *et al.* 1989). In der Arbeit von Fulgenzi, der allerdings den M. tibialis anterior und den M. extensor digitalis longus zur Kontraktion stimulierte, sank die Kraft im ischämischen Bein innerhalb des fünfminütigen Stimulationsprotokolls um mehr als 60 %. Aber auch hier ermüdete das nicht ischämische Bein stark, um etwa 30 % (Fulgenzi *et al.* 1998). Dies könnte eventuell an der relativ hohen Stimulationfrequenz von 4 Hz gelegen haben, die zu einer rascheren und stärkeren Ermüdung führte. In der Arbeit von Doi und Kollegen waren nach der Ligatur der Aorta die Muskeln beider Beine ischämisch. Die absolute Verminderung der Kraft lag nach 10 min etwa bei – 20 % und nach 60 min bei – 40 %. Stimuliert wurde hier nur mit einer Frequenz von 1,33 Hz (Doi *et al.* 2000). Lediglich in einer Arbeit wurde zusätzlich zur Kraft auch die Relaxationszeit ermittelt (Challiss *et al.* 1986). Hier führte die Stimulation mit 1 Hz dazu, dass die Kraft im nicht ischämischen Bein im Verlauf der siebenminütigen Messung sogar zunächst etwas anstieg,

Diskussion

aber dann konstant blieb, während die Kraft im ischämischen Bein nach einem geringgradigen Anstieg relativ stark abfiel. Die Relaxationszeit verkürzte sich im nicht ischämischen Bein über den Zeitraum der Messung stark, während sie sich im ischämischen Bein sogar noch verlängerte. Diese Ergebnisse entsprechen prinzipiell denen unserer Studien. Hier war das Stimulationsprotokoll so konzipiert, dass es nur zu einer Ermüdung im ischämischen Bein kam. Das nicht ischämische Bein des gleichen Tieres blieb gleichzeitig konstant und konnte so als interne Kontrolle verwendet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden zusätzlich zur Kraft und zur Relaxationszeit auch die 1. Ableitung der Kraft und der Relaxationszeit, d. h. die Geschwindigkeit der Kraft bzw. Relaxationszeitänderung, berechnet. Die Parameter Kontraktionsgeschwindigkeit und Relaxationsgeschwindigkeit wurden unseres Wissens bisher noch nie zur Bestimmung der Ermüdung im Skelettmuskel herangezogen. Durch die Stimulation kam es im ischämischen Bein zu einer deutlichen Abnahme der Kraft, der Kontraktionsgeschwindigkeit, der Relaxationszeit und der Relaxationsgeschwindigkeit, während diese Parameter im nicht ischämischen Bein konstant blieben. Dabei war der sensitivste Parameter nach der zehnmütigen Messung in unserem Modell nicht die Kraft (- 20 %), sondern die Kontraktionsgeschwindigkeit (- 40 %), die Relaxationsgeschwindigkeit (- 50 %) und die Relaxationszeit (+ 100 %). Die Tatsache, dass insbesondere die Relaxationsfähigkeit des ischämischen Muskels eingeschränkt war, lässt sich eventuell dadurch erklären, dass im Muskel ATP als Energielieferant hauptsächlich bei der Relaxation eine Rolle spielt. Bei der Muskelkontraktion verschieben sich Aktin und Myosin übereinander, ohne sich dabei selbst zu verkürzen (Gleitfilamenttheorie). Die Myosinköpfe rudern durch eine Kippbewegung die Aktinfilamente in Richtung Sarkomermitte (Querbrückenzyklus). Dadurch kommt es zu einer Muskelverkürzung. Durch die Ablösung der Myosinköpfe vom Aktin erschlafft der Muskel wieder. Gerade für diesen Vorgang ist ATP essentiell. Nach einem erfolgten Ruderschlag wird ein Molekül ATP gebunden und liefert so die notwendige Energie. Daraufhin kommt es zur Ablösung des Myosinköpfchens vom Aktinfilament. Anschließend wird ATP in ADP + Phosphat hydrolysiert. In einem ischämischen Muskel kann der erhöhte Energiebedarf bei Kontraktionen nicht mehr gedeckt werden und es kommt zu einer Abnahme der Relaxationszeit und Relaxationsgeschwindigkeit. Aber auch die Kraft und Kontraktionsgeschwindigkeit sind, wenn auch wohl weniger sensitiv, mit dem ATP Gehalt korreliert. Denn je mehr Querbrücken aktiviert werden, desto größer ist die ATP Spaltung pro Zeiteinheit und damit die Muskelkraft (Schmidt & Thews 1995). Eine andere Möglichkeit

Diskussion

wäre, dass infolge von Störungen die zytoplasmatische Ca^{2+} Konzentration erhöht bleibt und dadurch die Relaxation verlangsamt wird.

Im physiologischen Zustand breitet sich ein Aktionspotential, infolge der elektromechanischen Koppelung, entlang des Transversalsystems ins Innere der Zelle aus, springt auf das Longitudinalsystem des Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) über und bewirkt so die Freisetzung von Ca^{2+} aus den Terminalzisternen in das Zytoplasma. Die Muskelrelaxation setzt ein, sobald Ca^{2+} durch die Kalziumpumpe SR Ca^{2+} ATPase wieder in das SR rücktransportiert werden und so die intrazelluläre Kalziumkonzentration vermindert wird. Dadurch wird die Aktin-Myosin-Interaktion und die Aktin-Myosin-ATPase gehemmt. So werden die Myosinköpfe vom Aktin abgelöst und können auch nicht mehr „geschlagen“ werden (Schmidt & Thews 1995). Verschiedene in vitro Studien zeigen, dass zum Beispiel eine Anreicherung von ADP und P_i zu einem Kalziumverlust aus dem SR und damit zu erhöhten zytoplasmatischen Kalziumkonzentrationen führen kann (Steele & Duke 2003). Außerdem könnte eine verminderte Aktivität der SR Ca^{2+} ATPase, eine verminderte Rückspeicherung von Ca^{2+} in das SR bedingen, zu einer Erhöhung der Kalziumkonzentration im Zytoplasma führen und so zu einer verzögerten Relaxation führen. Die Aktivität der SR Ca^{2+} ATPase könnte zum Beispiel durch erhöhten oxidativen Stress gestört werden (Viner *et al.* 1996) oder durch einen Mangel an ATP vermindert sein.

Die Tatsache, dass die Relaxationsgeschwindigkeit und die Kontraktionsgeschwindigkeit sensitivere Parameter zur Messung der Muskelfunktionsmessung darstellen, konnte auch schon bei Herzfunktionsmessungen beobachtet werden. Bei der chronischen Herzinsuffizienz kann nämlich der Blutdruck noch relativ lange konstant gehalten werden, während die Kontraktionsgeschwindigkeit ($\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$), die Relaxationsgeschwindigkeit ($\text{dP}/\text{dt}_{\text{min}}$) und die Relaxationszeit (τ) schon verändert sind. Der Blutdruck würde in unserem Modell der Kontraktionskraft entsprechen. Damit zeigt sich, dass die Kontraktionsgeschwindigkeit und die Relaxationsgeschwindigkeit im Vergleich zur Kraft (Blutdruck) sensitivere Parameter darstellen eine Funktionsstörung des Herzens zu messen. Dies konnte nun mit den Messungen zur Skelettmuskelfunktion bestätigt werden.

Diskussion

Im Gegensatz zu anderen Experimenten wurden die Parameter zur Muskelermüdung auch nicht erst nach 45 min (Okyayuz-Baklouti *et al.* 1989) oder 60 min (Doi *et al.* 2000) ausgewertet, sondern schon nach fünf und nach zehn Minuten. Diese Zeitpunkte ermittelten wir aufgrund des Verlaufs der Muskelfunktionsmessung, bei der nach fünf Minuten ein Maximalwert und nach zehn Minuten ein konstantes Plateau erreicht wurde. Aber auch bei Patienten mit PAVK im Stadium II treten die Symptome der Muskelermüdung nicht erst nach 45 oder 60 min auf, sondern schon innerhalb der ersten Minuten nach Beginn der Belastung. In einer Studie bei Patienten mit einem mittleren ABI von 0,5 lag die maximale schmerzfreie Gehzeit bei etwa 5 Minuten und die maximale Gehzeit bei etwa sieben Minuten (Menard *et al.* 2004). Auch bei Ratten war nach einer bilateralen Stenose der Femoralarterie die maximale Laufdauer auf dem Laufband von initial 40 Minuten auf 10 Minuten reduziert (Dinn *et al.* 1990).

Insgesamt stellt das hier entwickelte Modell zur invasiven Messung der Muskelermüdung eine neue Möglichkeit dar, die Ischämie bedingte Muskelermüdung zu untersuchen.

Nicht invasive Messung der Muskelermüdung an der Ratte

Da die Methode der Messung der Muskelermüdung invasiv ist, kann dieser Versuch nur als Finalversuch durchgeführt werden. Um die gleichen Tiere auch zu verschiedenen Zeitpunkten auf ihre Muskelfunktion zu testen, wurde zusätzlich eine nicht invasive Methode zur Messung der Muskelfunktion entwickelt, die sehr einfach und zeitsparend durchgeführt werden kann. Hierzu wurde eine Apparatur konstruiert, in der die Muskulatur an beiden Hinterläufen der Ratte, über Elektroden an der Haut, zur Kontraktion stimuliert wurde. Dadurch kam es zur Extension der Pfoten, die dadurch eine Pedale bewegten. Die dabei ausgeübte Kraft wurde von einem Kraftaufnehmer gemessen und von einem computergestützten System aufgezeichnet. Wie auch bei den invasiven Messungen der Muskelfunktion wurden die Parameter der Muskelermüdung zur Auswertung herangezogen. Das nicht ischämische Bein konnte als intraindividuelle Kontrolle verwendet werden, um Unterschiede zwischen den Tieren auszugleichen.

Die Parameter der Muskelermüdung verbesserten sich im Verlauf der Messungen im ischämischen Bein immer mehr, bis sie sich nach acht Wochen fast an das nicht ischämische Bein angeglichen hatten. Man erkennt außerdem, dass die Auswahl des Zeitpunktes von vierzehn Tagen nach der Ligatur, auch für die invasive Messung, durch den hier beobachteten

Diskussion

Zeitverlauf bestätigt werden konnte. Vierzehn Tage nach der Ligatur der A. iliaca communis konnte für die Ermüdungsparameter der maximale Unterschied zwischen den unbehandelten Tieren und der Positivkontrolle, den mit Cilostazol behandelten Tieren, ermittelt werden. Insgesamt waren die Ergebnisse dieser nicht invasiven Messungen mit den Ergebnissen aus der Studie mit den invasiven Messungen vergleichbar, wobei die absoluten Werte bei der nicht invasiven Studie allgemein etwas niedriger lagen. Dies kann dadurch erklärt werden, dass das System zur nicht invasiven Messung der Muskelermüdung wahrscheinlich etwas „träger“ reagierte. Mit dieser Methode wurde die Kraft zunächst von der Pfote auf eine Pedale übertragen und von da erst von einem Kraftaufnehmer aufgenommen. Im Gegensatz dazu wurde bei der invasiven Messung die vom Muskel produzierte Kraft direkt von einem Kraftaufnehmer gemessen und war daher sensitiver. Da aber auch mit der nicht invasiven Messung ein deutliches Fenster zur Substanzwirkung bereitgestellt werden konnte, ist sie der invasiven Methode gleichzustellen. Sie bietet zusätzlich den Vorteil der sehr zeitsparenden Durchführung und der fehlenden Invasivität, was eine Wiederholbarkeit der Experimente am gleichen Tier ermöglicht.

Diese Methode wurde, nach unserem Wissen, bisher in der Literatur noch nicht beschrieben. Sie stellt somit bei der Ratte eine neue, nicht invasive Methode zur bilateralen Messung der Ischämie bedingten Muskelermüdung über einen Zeitraum von mindestens acht Wochen dar.

Ko-Morbiditäten

In vielen präklinischen Studien zur Testung neuer Substanzen für die Indikation PAVK wurden ausschliesslich gesunde Tiere eingesetzt (Okuyuz-Baklouti *et al.* 1989, Dinn *et al.* 1990, Fulgenzi *et al.* 1998, Doi *et al.* 2000). Nachteil ist hier, dass die Ligation bzw. Exzision der entsprechenden Arterie innerhalb eines gesunden Gefäßbettes durchgeführt wird. Dies entspricht aber nicht der klinischen Situation. Patienten mit PAVK weisen normalerweise zahlreiche Ko-Morbiditäten, wie z. B. Diabetes oder Hypertonie auf (Diehm *et al.* 2004). Auch konnte in einem direkten Vergleich von diabetischen und nicht diabetischen Tieren in einem präklinischen Modell gezeigt werden, dass eine Behandlung mit einem Serotonin Antagonisten nur bei diabetischen Tieren zu einer Wirkung führt, während die gesunden Tiere von der gleichen Behandlung nicht profitierten. Dies wurde durch eine, nur bei diabetischen Tieren vorliegende, Hypersensitivität gegenüber Vasokonstriktoren wie Serotonin, bei gleichzeitig erhöhten Spiegel an Serotonin, erklärt (Janiak *et al.* 2002).

Diskussion

Es zeigt auch, dass pathologische Tiermodelle, im Vergleich zu Modellen mit gesunden Tieren, auf medikamentöse Therapien in ganz unterschiedlicher Weise reagieren können, was dann auch beim Menschen eine Rolle spielen könnte.

Um die klinische Situation des Patienten im Modell der unilateralen Hinterlaufischämie noch genauer darzustellen wurden zusätzlich zu den gesunden (lean) Tieren, noch Tiere mit manifestem Diabetes verwandt. Diese diabetischen Tiere zeichnen sich durch Adipositas, Hypertonie, Hyperglykämie, Hyperinsulinämie, Insulinresistenz und Hyperlipidämie aus und zeigen dadurch eine verminderte endogene Kompensationsfähigkeit, wie sie auch bei Patienten mit Diabetes zu beobachten ist. Beim Patienten führen metabolische Veränderungen, die mit Diabetes einhergehen, zu endothelialer Dysfunktion, vermehrtem oxidativem Stress, verstärkter Plättchenadhäsion und -aggregation, sowie zu Veränderungen der Rheologie des Blutes und nachfolgend zu atherosklerotischen Prozessen (American Diabetes Association 2003). Ähnliche Veränderungen sind auch bei den diabetischen Ratten (ZDF Ratten) zu erwarten (Peterson *et al.* 1999), die etwa im Alter von 7-10 Wochen an Diabetes erkranken. Um sicher zu gehen, dass die ZDF Ratten im Versuch auch alle diabetisch waren, wurden im Serum verschiedene Parameter überprüft (Glukose, HbA1c, Gesamt Cholesterin, LDL Cholesterin, Triglyceride). Diese zeigten eindeutig, dass die verwendeten Tiere zum Zeitpunkt des Versuches an einem manifesten Diabetes erkrankt waren. Im Gegensatz dazu konnten im Serum der Kontroll (lean) Ratten keine solchen Veränderungen festgestellt werden.

Pathologische Tiermodelle eignen sich eher, um die klinische Situation des Patienten mit meist zahlreich vorhandenen Ko-Morbiditäten genau darzustellen.

Laufradversuche an Mäusen

Um zusätzlich zur Messung der reinen Muskelfunktion am anästhesierten Tier auch die „maximale Gehstrecke“ am wachen Tier untersuchen zu können, haben wir ein weiteres Modell zur Bestimmung der Laufleistung entwickelt. Aus der Literatur waren bereits verschiedene Möglichkeiten bekannt. In der Arbeit von Dinn und Kollegen wurde bei femoralarterienligierten Ratten die maximale Laufzeit bei verschiedenen Geschwindigkeiten (20m/min, 25m/min, 30m/min) des Laufbandes ermittelt. Die Laufzeit war zunächst auf 25 % der Ausgangsleistung beschränkt und erreichte nach ca. drei Wochen wieder etwa 50 % davon (Dinn *et al.* 1990).

Diskussion

Die Arbeitsgruppe von Yang und Kollegen führte einen ähnlichen Versuch durch, bei dem femoralarterienligierte Ratten auf dem Laufband bei 15m/min bis zur Erschöpfung laufen mussten. Die Erschöpfung zeigte sich durch spezifische Gangveränderungen der Ratten (Yang *et al.* 1990). Diese Gangveränderungen wurden auch von einer japanischen Arbeitsgruppe als Endpunkt verwandt (Orito *et al.* 2004). Außerdem wurden Belastungstests in Laufrädern durchgeführt. Dabei liefen die Ratten nach der Induktion einer unilateralen Hinterlaufischämie über zwei Wochen täglich zunächst bei 12m/min und später bei 20m/min in einem elektrisch betriebenen Laufrad (Okuyayuz-Baklouti *et al.* 1989). Bei all diesen Versuchen mit Ratten wurden forcierte funktionelle Belastungstests auf dem Laufband bzw. im Laufrad durchgeführt. Eine Behandlung sollte zu einer Verlängerung der Laufzeit führen. Bei diesen Versuchen waren die Ratten gezwungen, bei einer vorgegebenen Geschwindigkeit bis zur Erschöpfung zu laufen. Dies war notwendig, da Ratten nur eine geringe freiwillige Laufleistung zeigen. Diese Art der Belastungstests ist dadurch aber mit einem vermehrten Stress für die Tiere verbunden. Dieser Stress resultiert einmal aus der Tatsache, dass die Tiere zum Laufen gezwungen werden, aber auch schon allein die neue Umgebung bedeutet Stress für die Tiere. Chronischer Stress wiederum führt aber zu Veränderungen, die unabhängig von Substanzeffekten das Ergebnis beeinflussen können (Moraska *et al.* 2000). Um dies zu vermeiden, haben wir freiwillige Laufradversuche mit Mäusen durchgeführt. Dazu haben wir zunächst gesunde C57BL/6-Mäuse ausgewählt, da diese eine starke freiwillige Laufleistung von knapp 8 km/ 24 h zeigen. Andere Mausstämmen (z. B. DBA/1J, C3H/HeJ, BALB/cyBJ) erreichten nur weniger als 4 km/ 24h (Lerman *et al.* 2002). In unseren Versuchen zeigten die gesunden C57BL/6-Mäuse zunächst nur eine Laufleistung von 4 km/ 24 h. Dies konnte aber auf die Verwendung von anderen Laufrädern zurückgeführt werden. Diese hatten einen Umfang von einem Meter und waren aus einem Metallgeflecht gefertigt. Dadurch waren sie relativ schwergängig und nicht mit den kleineren, leichten Plastiklaufrädern (Umfang: 42 cm) aus der Studie von Lerman *et al.* zu vergleichen. Daher verwendeten wir in den folgenden Studien auch kleinere Laufräder aus Plastik.

Die C57BL/6-Mäuse wurden nach einer Einlaufzeit von vier Wochen operiert. Die Ligatur der Femoralarterie wurde bilateral durchgeführt, da die Mäuse nach einer unilateralen Ligatur auf drei Beinen weiterlaufen können. Somit hätte die gemessene Laufleistung nicht mehr eindeutig auf die funktionelle Einschränkung der Durchblutung in der entsprechenden Muskulatur zurückgeführt werden können, sondern es wären auch individuelle Geschicklichkeit und Gleichgewichtssinn in Betracht gekommen. Nach der bilateralen Ligatur

Diskussion

liefen die Mäuse zunächst kaum noch. Im Verlauf konnte man aber eine Erholung in Form einer sich steigernden Laufstrecke und Laufgeschwindigkeit beobachten.

In unserem Pilotversuch mit C57BL/6-Mäusen war die Beeinträchtigung der Laufleistung nach der Ligatur durch endogene Kompensationsmechanismen schon nach kurzer Zeit aufgehoben. Damit war das Fenster zur Messung eines Therapieeffektes zu klein. Aus diesem Grund haben wir im Anschluss zusätzlich Studien in eNOS^{-/-} Mäusen durchgeführt. Als pathologisches Tiermodell mit endothelialer Dysfunktion und verminderter Angiogenese (Murohara *et al.* 1998) sollten sich diese Tiere viel langsamer von einer Ligatur der hauptzuführenden Arterien erholen. Die Ligatur der A. iliaca communis bei eNOS^{-/-} Mäusen führte in eigenen Vorversuchen (nicht dargestellt) auch zu erheblichen Einschränkungen des Blutflusses und zu starken trophischen Störungen an den Hintergliedmaßen. Darum haben wir uns, im Gegensatz zu unseren Studien an Ratten, zur Durchführung der einfachen Ligatur der A. femoralis und nicht der A. iliaca communis entschieden. Trotzdem konnten die Einschränkungen in Ruhe damit nicht vollständig verhindert werden. Dies ist auf ein weniger stark ausgeprägtes, endogen vorhandenes Kollateralgefäßnetzwerk bei Mäusen allgemein (Waters *et al.* 2004) und auf eine verminderte Kompensationsfähigkeit speziell bei eNOS^{-/-} Mäusen (Murohara *et al.* 1998) zurückzuführen. Daher wurden die Tiere nach der Ligatur alle zwei Tage kontrolliert und abhängig von den Veränderungen in verschiedene Kategorien (Grad 1- Grad 4) eingeteilt. Tiere mit zu starken trophischen Störungen (Nekrose der gesamten Pfote) wurden mit Grad 4 beurteilt und aus der Studie entfernt. Die Gesamtstrecke, die Spitzengeschwindigkeit, die Durchschnittsgeschwindigkeit, die längste Laufperiode am Stück und die weiteste Strecke am Stück, die Laufinitiationen und die Gesamtzeit die eine Maus im Laufrad verbrachte, waren bei den eNOS^{-/-} Mäusen nach der Ligatur stark vermindert. Diese Parameter verbesserten sich auch über den gesamten Messzeitraum von vier Wochen kaum. Mit der Verwendung eines pathologischen Tiermodells und einer weniger starken Ligatur konnte somit ein größeres Zeitfenster zur Wirkung von therapeutischen Substanzen bereitgestellt werden.

In unserer Studie lag die Ausgangslaufleistung der eNOS^{-/-} Mäuse bei etwa 8 km/h. Diese Versuche wurden aber auch in kleineren und leichteren Plastiklaufrädern durchgeführt. Die Gesamtstrecke, die Gesamtzeit und die Durchschnittsgeschwindigkeit der eNOS^{-/-} Mäuse war hier, mit den gemessenen Parametern der gesunden 5-6 Monate alten C57BL/6-Mäuse (Lerman *et al.* 2002) vergleichbar. Auch hier wurden kleinere Laufräder verwendet. Die Vergleichbarkeit kann auf der Tatsache beruhen, dass der genetische Hintergrund der eNOS^{-/-}

Diskussion

Maus die C57BL/6-Maus ist und daher von ihnen vergleichbare Leistungen erzielt werden können. Andererseits zeigte eine Vergleichsstudie zwischen unoperierten C57BL/6-Mäusen und eNOS^{-/-} Mäusen einen deutlichen Unterschied zwischen den untersuchten Parametern, wie Gesamtstrecke und Durchschnittsgeschwindigkeit. Die eNOS^{-/-} Tiere erreichten hier im Vergleich zu den gesunden Mäusen eine signifikant kürzere Gesamtstrecke und eine signifikant geringere Durchschnittsgeschwindigkeit (Momken *et al.* 2004a). Der Unterschied in der Gesamtstrecke und in der Durchschnittsgeschwindigkeit der eNOS^{-/-} Mäuse in unserem Versuch, im Vergleich zu der Studie von Momken und Kollegen, lässt sich wahrscheinlich durch den großen Altersunterschied erklären. Die eNOS^{-/-} Mäuse in Momken's Studie waren schon zu Beginn 10 Monate alt, während die eNOS^{-/-} Mäuse in der vorliegenden Arbeit erst knapp 10 Wochen alt waren. Die Einschränkung der Laufleistung bei eNOS^{-/-} Mäusen nimmt daher wahrscheinlich mit dem Alter zu. Bestätigt werden konnte dies in einer Studie, in der der Einfluss des Alters auf die Laufleistung von eNOS^{-/-} Mäusen, im Vergleich zu gesunden Mäusen, untersucht wurde. Die eNOS^{-/-} Mäuse und die gesunden Vergleichs- Mäuse wurden im Alter von 12 Monaten und im Alter von 21 Monaten auf ihre Laufleistung untersucht. Dies wurde mittels einer forcierten Laufbandmessung ermittelt, bei der die Mäuse bis zu ihrer Erschöpfung laufen mussten. Die Laufleistung der eNOS^{-/-} Mäuse war zwar schon im Alter von 12 Monaten im Vergleich zu den gesunden Mäusen signifikant vermindert und fiel aber bis zum Alter von 21 Monaten noch weiter ab. Dies führten die Autoren auf eine, sich mit dem Alter verstärkende Einschränkung der Herzfunktion zurück (Ojaimi *et al.* 2005). Die Einschränkung der forcierten Laufleistung lag hier bei 12 Monate alten Tieren bei 30 % (Ojaimi *et al.* 2005). Im Gegensatz dazu lag die Einschränkung der freiwilligen Laufleistung bei 10 Monaten alten Tieren schon bei 50 % (Momken *et al.* 2004). Dies zeigt, dass die Einschränkung der freiwilligen Laufleistung früher und stärker auftritt, als die bei der forcierten Laufleistung. Da die Tiere in der vorliegenden Arbeit jedoch noch keine eingeschränkte freiwillige Laufleistung zeigten, konnte davon ausgegangen werden, dass sie im Alter von 7-10 Wochen an keinen Herzfunktionsstörungen litten. Dies ist insbesondere wichtig, da sonst keine klare Abgrenzung zwischen einer eingeschränkten Herzfunktion und einer eingeschränkten peripheren Muskelfunktion möglich wäre. Somit könnte eine Behandlung auch über eine Verbesserung der Herzfunktion effektiv sein. In der vorliegenden Arbeit kann aber davon ausgegangen werden, dass die Einschränkung der Laufleistung alleine auf die verminderte periphere Muskelfunktion zurückzuführen war und dass eine Behandlung zu einer Verbesserung derselben führte. Dies konnte zusätzlich durch die Studie bestätigt

werden, in der eine Behandlung mit Cilostazol bei unoperierten Tieren im selben Alter zu keiner Verbesserung der Laufleistung führte.

Insgesamt stellt die Messung der Laufleistung der freiwillig im Laufrad laufenden, bilateral ligierten eNOS-/- Mäuse ein neues Modell für Claudicatio intermittens da. Da teilweise trophische Störungen nicht vermieden werden konnten, entspricht dieses Modell allerdings eher einer schweren Claudicatio intermittens, mit fließenden Übergängen zur PAVK im Stadium III nach Fontaine.

5.2 Validierung der Tiermodelle

Cilostazol

Cilostazol ist ein 2-Oxoquinolon Derivat und verhindert durch die Inhibition der PDE III den Abbau von cAMP. So führt es zu erhöhten cAMP Spiegeln. cAMP wiederum bedingt über verschiedene Mechanismen eine Vasodilatation (Tanaka *et al.* 1988), eine Plättchenaggregationshemmung (Kimura *et al.* 1985) und eine Proliferationshemmung von glatten Muskelzellen (Takahashi *et al.* 1992). Außerdem führt Cilostazol zu Veränderungen im Lipidprofil (Elam *et al.* 1998).

Cilostazol ist zur Zeit der Standard in der medikamentösen Therapie der Claudicatio intermittens. Aus diesem Grund haben wir dieses Medikament zur Validierung unserer Modelle eingesetzt. In präklinischen Modellen zur Hinterlaufischämie wurde Cilostazol bisher selten eingesetzt. In einem Modell wurde der Einfluss von Cilostazol auf die Hauttemperatur und die Entstehung von ulzerativen Veränderungen an den Hinterläufen von Hunden nach akuter arterieller Obstruktion mit Natrium-Laurat-Saline Lösung beobachtet. Cilostazol führte hier zu einer signifikanten Verminderung der trophischen Störungen und verhinderte den Temperaturabfall im okkludierten Hinterlauf (Kawamura *et al.* 1985). Diese Wirkung wurde auch in einer anderen Studie gezeigt (Murai *et al.* 1989). Bei beiden Studien handelte es sich jedoch wegen der trophischen Störungen eher um Modelle für die kritische Extremitätenischämie. In einer anderen Studie untersuchte eine japanische Arbeitsgruppe die Wirkung von Cilostazol in einem Modell für Claudicatio intermittens. Hier liefen Ratten nach Induktion einer unilateralen Hinterlaufischämie auf einem Laufband, bis sich bei ihnen spezifische Gangveränderungen zeigten. Die Behandlung mit Cilostazol führte nach vier

Diskussion

Wochen zu einer signifikanten Verlängerung der Laufzeit, bis diese Gangveränderungen auftraten (Orito *et al.* 2004). Die Gangveränderungen wurden in dieser Studie allerdings subjektiv ausgewertet. Daher sind die Ergebnisse nicht eindeutig zu bewerten. Insgesamt liegen daher, nach unserem Wissen, keine aussagekräftigen Ergebnisse für Cilostazol in präklinischen Modellen für Claudicatio intermittens vor.

In unserem Modell der unilateralen Hinterlaufischämie der Ratte hatte die Behandlung mit Cilostazol keinen Einfluss auf das Körpergewicht oder den systolischen Blutdruck. Bei den gesunden Ratten (lean) konnte außerdem kein Einfluss auf die untersuchten Blutparameter festgestellt werden. Dahingegen führte Cilostazol bei den diabetischen Ratten zu einer signifikanten Senkung der Triglyceride und gleichzeitig zu einer signifikanten Erhöhung der LDL- Cholesterin Spiegel. Außerdem kam es in unserer Studie, wahrscheinlich infolge der Steigerung der LDL- Cholesterin Spiegel, auch zu einer signifikanten Steigerung der Gesamtcholesterinspiegel. Letzteres konnte jedoch in einer anderen Studie, in der bei männlichen, diabetischen Tieren eine signifikante Erhöhung der HDL Spiegel beobachtet wurde, während das Gesamtcholesterin unverändert blieb, nicht bestätigt werden (Tani *et al.* 2000). Bei diesen Tieren handelte es sich jedoch nicht um ZDF Ratten (Typ II Diabetes), sondern um Wistar Ratten, bei denen im Alter von etwa acht Wochen durch Streptozotocin spontan Diabetes ausgelöst wurde, was einem Typ I Diabetes entspricht. Außerdem waren die Tiere in der Studie von Tani und Kollegen jünger (Tani *et al.* 2000). In dieser präklinischen Studie konnte aber auch gezeigt werden, dass die Behandlung mit Cilostazol bei diabetischen Tieren zu einer signifikanten Senkung der Triglyceridspiegel führte, was auf eine vermehrte Aktivität der Lipoprotein Lipase zurückgeführt werden konnte (Tani *et al.* 2000). Dies wurde für Cilostazol auch in klinischen Studien nachgewiesen. Eine Metaanalyse von acht Phase III Studien zeigte, dass die Behandlung mit Cilostazol zu einer signifikanten Senkung der Triglyceridspiegel um 15,8 % führt (Thompson *et al.* 2002). Der Einfluss von Cilostazol auf die LDL- Cholesterin Spiegel ist unseres Wissens bisher in keiner anderen präklinischen oder klinischen Studie untersucht worden.

Bei der Messung der Perfusionsdruckindices konnte bei den nicht diabetischen Tieren, nach vierzehn Tagen Behandlung mit Cilostazol, ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Bei den diabetischen Tieren war durch die Behandlung mit Cilostazol ein Trend zur Verbesserung der Perfusionsdruckindices messbar, der aber nicht signifikant wurde. In klinischen Studien führte die Behandlung mit Cilostazol meist zu einer Verbesserung des ABI (Samra *et al.* 2003), die aber zum Teil auch nur gering war (Mohler, III *et al.* 2001). In einer Studie mit diabetischen Patienten konnte, trotz Verlängerung der Gehstrecke, keine

Diskussion

Verbesserung des ABI festgestellt werden (Tsushima *et al.* 1996). Daher ist es möglich, dass die Wirkung von Cilostazol auf den Perfusionsdruckindex in unserem Modell zwar vorhanden, aber nicht sehr stark ausgeprägt ist. Da in klinischen Studien der primäre Endpunkt eigentlich die maximale Gehstrecke ist (Labs *et al.* 1999), wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Cilostazol auf die Muskelfunktion überprüft.

Bei der invasiven Messung der Ischämie bedingten Muskelermüdung war die Wirkung von Cilostazol eindeutig. Die Behandlung bewirkte bei den nicht diabetischen als auch bei den diabetischen Tieren eine signifikante Verbesserung der absoluten Werte, aber auch der Verhältnisse vom ischämischen zum nicht ischämischen Bein (I/NI) von allen in der vorliegenden Arbeit untersuchten Parametern. Ausnahmen davon waren ausschließlich fünf Minuten nach Beginn der Messung festzustellen. Grund hierfür könnte sein, dass sich die Parameter bei einigen Tieren zu diesem Zeitpunkt noch nicht auf den Maximalwert abgesenkt bzw. gesteigert hatten. Damit konnte gezeigt werden, dass hier die Behandlung mit Cilostazol, im Gegensatz zu dem Serotonin Antagonisten (Janiak *et al.* 2002), zu keiner unterschiedlichen Wirkung bei diabetischen und nicht diabetischen Tieren geführt hat.

Auch bei der nicht invasiven Messung der Ischämie bedingten Muskelermüdung führte die Behandlung mit Cilostazol bei den ZDF Ratten zu einer signifikant schnelleren und stärkeren Erholung. Am deutlichsten war diese Wirkung vierzehn Tage nach der Ligatur zu beobachten. Erst nach acht Wochen verringerte sich die prozentuale Steigerung der Ermüdungsparameter durch die Behandlung mit Cilostazol auf unter 20 %. Dies war aber hauptsächlich dadurch zu erklären, dass sich nach acht Wochen das ischämische Bein, infolge endogener Kompensationsmechanismen, langsam wieder an das nicht ischämische Bein angenähert hatte. Zu diesem Zeitpunkt hätte eine Steigerung der Parameter der Muskelermüdung im ischämischen Bein um mehr als 20 % zu einer Verbesserung geführt, die über denen des nicht ischämischen Beins gelegen hätten.

Um zu sehen, ob die Verbesserung der reinen Funktion durch Cilostazol auch eine Verlängerung der Laufstrecke von Mäusen mit beidseitiger Hinterlaufischämie bedingt, wurden 50 % der Tiere nach der Operation mit Cilostazol behandelt. Die Wirkung von Cilostazol auf die Laufstrecke von gesunden Mäusen mit induzierter bilateraler Hinterlaufischämie war zwischen der ersten und dritten Woche nach der Ligatur signifikant. Aber aufgrund der raschen Erholung der unbehandelten Mäuse konnte dieser Effekt nicht dauerhaft herausgestellt werden. Dieses Modell entsprach aber auch nicht der klinischen Situation der meist multimorbiden Patienten mit Claudicatio intermittens.

Diskussion

Aus diesem Grund wurden die Versuche an einem pathologischen Tiermodell mit endothelialer Dysfunktion wiederholt. Bei der Studie mit eNOS -/- Mäusen konnte nun dauerhaft gezeigt werden, dass die Behandlung mit Cilostazol zu einer Verbesserung der Laufleistung führt. Insgesamt legten die behandelten Mäuse, im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen, eine längere Gesamtstrecke zurück, erreichten höhere Spitzengeschwindigkeiten und damit auch eine höhere Durchschnittsgeschwindigkeit und verbrachten außerdem eine längere Zeit im Laufrad. Auch die weiteste, am Stück zurückgelegte Strecke und die längste, am Stück gelaufene Periode waren 24 Tage nach der Ligatur signifikant verlängert. Die Behandlung führte außerdem zu einer erhöhten Anzahl an Laufinitiationen. Um zu sehen, ob die Behandlung mit Cilostazol vielleicht doch auch andere Parameter als die Muskelfunktion (z. B. Herzfunktion, Verhalten) beeinflusst, die zu einer erhöhten Laufleistung führen könnten, haben wir eine weitere Studie mit unoperierten Mäusen durchgeführt. Dazu wurde eine Gruppe von Mäusen nach der Einlaufzeit mit Cilostazol behandelt und es wurde der Einfluss der Behandlung über 2 1/2 Wochen beobachtet. Die Auswertung zeigte, dass die Behandlung mit Cilostazol bei unoperierten Mäusen zu keiner Veränderung der Laufleistung führte. Dies bestätigt die Annahme, dass Cilostazol nur zu einer Verbesserung der Ischämie bedingten Muskelfunktion führt. Bei den trophischen Störungen, die in diesem Modell der bilateralen Hinterlaufischämie der Maus zum Teil auftraten, führte Cilostazol zu einer signifikanten Verminderung der Häufigkeit des Auftretens und der Schwere der Störung. In der Gruppe der mit Cilostazol behandelten Tiere kam es zu signifikant weniger totalen Nekrosen (Grad 4). Dies ist auch in anderen Studien gezeigt worden, in denen eine Behandlung mit Cilostazol zu einer signifikanten Verminderung der trophischen Störungen geführt hat (Kawamura *et al.* 1985, Murai *et al.* 1989).

Die Tatsache, dass Cilostazol zu einer Verbesserung der in diesen neuen Modellen untersuchten Parameter geführt hat, bestätigt die Prädiktabilität dieser Modelle und zeigt, dass sie sich zur Testung von neuen Substanzen für die Indikation Claudicatio intermittens eignen.

6 Zusammenfassung

Die periphere arterielle Verschlusskrankheit im Stadium II nach Fontaine, (Claudicatio intermittens) ist eine Erkrankung, die zu einer Einschränkung der Leistungsfähigkeit und der Lebensqualität des Betroffenen führt. Medikamente zur symptomatischen Behandlung sind allerdings nur begrenzt verfügbar. Zur Entwicklung neuer Substanzen stehen aber kaum prädiktive Tiermodelle zur Verfügung. Ziel dieser Arbeit war es daher verschiedene neue Tiermodelle an der Ratte und an der Maus zu entwickeln. Diese sollten die klinische Situation des Patienten genau widerspiegeln. Zur Validierung der neuen Modelle wurde der PDE3 Inhibitor Cilostazol eingesetzt. Cilostazol gilt als der Gold-Standard der symptomatischen Therapie von Claudicatio intermittens.

Mittels einer Ligatur der A. iliaca communis wurde bei gesunden und bei diabetischen Ratten eine unilaterale Hinterlaufischämie induziert. Diese führte in der entsprechenden Muskulatur zu chronischen Einschränkungen in der Durchblutung und im Perfusionsdruck, die mit den Einschränkungen beim Patienten mit Claudicatio intermittens zu vergleichen waren. Folgend wurde invasiv und nicht invasiv untersucht, inwieweit diese Einschränkung der Durchblutung in Ruhe unter Belastung zu Funktionsveränderungen der entsprechenden Muskulatur führen. Festgestellt werden konnte, dass der Hinterlauf mit induzierter Ischämie, im Vergleich zum kontralateralen Hinterlauf, innerhalb von zehnminütiger Belastung deutliche Zeichen der Ermüdung zeigte. Die Muskelermüdung war charakterisiert durch eine geringgradige Verminderung der Kraft, eine mittelgradige Verminderung der Kontraktionsgeschwindigkeit, eine deutliche Verlängerung der Relaxationszeit und eine starke Verminderung der Relaxationsgeschwindigkeit. Die Behandlung mit Cilostazol führte zu einer signifikanten Verbesserung der belastungsinduzierten Muskelermüdung.

Um die Muskelfunktionseinschränkung auch am wachen Tier zu messen, wurden zusätzlich Laufradversuche mit Mäusen entwickelt. Hier zeigten gesunde C57BL/6-Mäusen nach der Induktion einer bilateralen Hinterlaufischämie zunächst deutliche Einschränkungen in der freiwilligen Laufleistung, erreichten aber nach etwa drei Wochen fast wieder ihre Ausgangsleistung. Die Behandlung mit Cilostazol zeigte zwar eine Verbesserung, die aber aufgrund der schnellen Erholung der unbehandelten Mäuse nicht dauerhaft herausgestellt werden konnte. Damit war das Fenster zur Messung eines Therapieeffektes zu klein. Im Gegensatz dazu führte die bilaterale Ligatur der A. femoralis bei eNOS^{-/-} Mäusen zu einer chronischen Einschränkung der freiwilligen Laufleistung. Die Behandlung mit Cilostazol führte hier dauerhaft zu einer signifikanten Verbesserung der Laufleistung.

Zusammenfassung

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die neuen Modelle zur Testung von Substanzen für die Indikation Claudicatio intermittens eignen könnten.

7 Summary

Intermittent claudication is a common disease with limited treatment options. The identification of new drugs is hampered by the lack of predictive animal models. We therefore developed new in vivo models mimicking the situation of patients with intermittent claudication. To validate these models, we studied the effectiveness of the PDE3 inhibitor cilostazol, the current gold standard in the symptomatic therapy of patients with intermittent claudication.

Unilateral iliac artery ligation in rats (Zucker Diabetic Fatty rats and lean control rats) led to chronically impaired blood flow and perfusion pressure in the ischemic leg. The perfusion pressure index (ischemic to the non-ischemic control leg) closely resembled the ankle brachial index found in patients with intermittent claudication. This clinically relevant impairment of perfusion pressure at rest led to an exercised induced muscle fatigue in the ischemic leg minutes after the initiation of repetitive muscle contractions. This muscle fatigue was characterized by a slight reduction of contraction force, a moderate reduction of contraction velocity, a marked increase in relaxation time and a strong reduction of relaxation velocity. Cilostazol led to a significant amelioration of the exercise-induced muscle fatigue.

Furthermore we established an mouse voluntary running wheel model of bilateral hind limb ischemia. In wild type mice the running ability was reduced during the first 3 weeks after the induction of bilateral hind limb ischemia, but returned to nearly normal levels thereafter. Cilostazol treatment was associated with an improved running distance, however due to the strong recovery of the placebo treated animals the effect was diminished over time. In contrast to this finding the running ability was chronically impaired in eNOS deficient mice, in which we were able to show a positive effect by cilostazol, which even increased over time.

Taken together these novel animal models of intermittent claudication will be useful to identify potential drugs for the treatment of this disease.

Literaturübersicht

- Adhoute, G., B. Andreassian, H. Boccalon, M. Cloarec, M. G. Di, O. Lefebvre, P. Mondine, P. Plagnol, J. P. Pointel, X. Quancard. 1990. Treatment of stage II chronic arterial disease of the lower limbs with the serotonergic antagonist naftidrofuryl: results after 6 months of a controlled, multicenter study. *J Cardiovasc Pharmacol* **16 Suppl 3**:S75-S80.
- American Diabetes Association. 2003. Peripheral arterial disease in people with diabetes. *Diabetes Care* **26**:3333-3341.
- Antithrombotic Trialists' Collaboration. 2002. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* **324**:71-86.
- Aoki, M., R. Morishita, S. Hayashi, N. Jo, K. Matsumoto, T. Nakamura, Y. Kaneda, and T. Ogihara. 2001. Inhibition of neointimal formation after balloon injury by cilostazol, accompanied by improvement of endothelial dysfunction and induction of hepatocyte growth factor in rat diabetes model. *Diabet* **44**:1034-1042.
- Arras, M., W. D. Ito, D. Scholz, B. Winkler, J. Schaper, and W. Schaper. 1998. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest* **101**:40-50.
- Barie, P. S., and R. J. Mullins. 1988. Experimental methods in the pathogenesis of limb ischemia. *J Surg Res* **44**:284-307.
- Bauersachs, J., A. Bouloumie, A. Mulsch, G. Wiemer, I. Fleming, and R. Busse. 1998. Vasodilator dysfunction in aged spontaneously hypertensive rats: changes in NO synthase III and soluble guanylyl cyclase expression, and in superoxide anion production. *Cardiovasc Res.* **37**:772-779.
- Baumgartner, I., R. Schainfeld, and L. Graziani. 2005. Management of peripheral vascular disease. *Annu Rev Med* **56**:249-272.
- Beavo, J. A. 1995. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* **75**:725-748.

Literaturübersicht

- Boger, R. H., S. M. Bode-Boger, W. Thiele, W. Junker, K. Alexander, and J. C. Frolich. 1997. Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* **95**:2068-2074.
- Boushey, C. J., S. A. Beresford, G. S. Omenn, and A. G. Motulsky. 1995. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* **274**:1049-1057.
- Brevetti, G., C. Diehm, and D. Lambert. 1999. European multicenter study on propionyl-L-carnitine in intermittent claudication. *J Am Coll Cardiol* **34**:1618-1624.
- Brevetti, L. S., D. S. Chang, G. L. Tang, R. Sarkar, and L. M. Messina. 2003. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase increases skeletal muscle blood flow and oxygenation in severe rat hind limb ischemia. *J Vasc Surg* **38**:820-826.
- Brown, M. D., J. Kent, C. J. Kelsall, M. Milkiewicz, and O. Hudlicka. 2003. Remodeling in the microcirculation of rat skeletal muscle during chronic ischemia. *Microcirculation* **10**:179-191.
- Brown, M. S., and J. L. Goldstein. 1990. Atherosclerosis. Scavenging for receptors. *Nature* **343**:508-509.
- CAPRIE Steering Committee. 1996. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet* **348**:1329-1339.
- Carmeliet, P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* **6**:389-395.
- Celermajer, D. S., K. E. Sorensen, V. M. Gooch, D. J. Spiegelhalter, O. I. Miller, I. D. Sullivan, J. K. Lloyd, and J. E. Deanfield. 1992. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* **340**:1111-1115.
- Cetin C. & Baumgartner I. 2004. Die periphere arterielle Verschlusskrankheit (PAVK). *Schweiz Med Forum* **4**, 216-223.
- Challiss, R. A., D. J. Hayes, R. F. Petty, and G. K. Radda. 1986. An investigation of arterial insufficiency in rat hindlimb. A combined ³¹P-n.m.r. and bloodflow study. *Biochem J* **236**:461-467.

Literaturübersicht

- Cheng, S. W., A. C. Ting, and J. Wong. 1997. Lipoprotein (a) and its relationship to risk factors and severity of atherosclerotic peripheral vascular disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg* **14**:17-23.
- Chisolm, G. M., III, S. L. Hazen, P. L. Fox, and M. K. Cathcart. 1999. The oxidation of lipoproteins by monocytes-macrophages. Biochemical and biological mechanisms. *J Biol Chem.* **274**:25959-25962.
- Ciocon, J. O., D. Galindo-Ciocon, and D. J. Galindo. 1997. A comparison between aspirin and pentoxifylline in relieving claudication due to peripheral vascular disease in the elderly. *Angiology* **48**:237-240.
- Clarke, R., L. Daly, K. Robinson, E. Naughten, S. Cahalane, B. Fowler, and I. Graham. 1991. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* **324**:1149-1155.
- Comerota, A. J. 2001. Endovascular and surgical revascularization for patients with intermittent claudication. *Am J Cardiol.* **87**:34D-43D.
- Couffinhal, T., M. Silver, M. Kearney, A. Sullivan, B. Witzendichler, M. Magner, B. Annex, K. Peters, and J. M. Isner. 1999. Impaired collateral vessel development associated with reduced expression of vascular endothelial growth factor in ApoE^{-/-} mice. *Circulation* **99**:3188-3198.
- Couffinhal, T., M. Silver, L. P. Zheng, M. Kearney, B. Witzendichler, and J. M. Isner. 1998. Mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol* **152**:1667-1679.
- Criqui, M. H., A. Fronek, M. R. Klauber, E. Barrett-Connor, and S. Gabriel. 1985. The sensitivity, specificity, and predictive value of traditional clinical evaluation of peripheral arterial disease: results from noninvasive testing in a defined population. *Circulation* **71**:516-522.
- Currie, M. S., D. L. Simel, R. H. Christenson, C. Holmes, J. Crawford, H. J. Cohen, and K. M. Rao. 1991. Anti-inflammatory effects of pentoxifylline in claudication. *Am J Med Sci* **301**:85-90.

Literaturübersicht

- Dawson, D. L. 2001. Comparative effects of cilostazol and other therapies for intermittent claudication. *Am J Cardiol* **87**:19D-27D.
- Dawson, D. L., B. S. Cutler, W. R. Hiatt, R. W. Hobson, J. D. Martin, E. B. Bortey, W. P. Forbes, and D. E. Strandness, Jr. 2000. A comparison of cilostazol and pentoxifylline for treating intermittent claudication. *Am J Med* **109**:523-530.
- Dawson, D. L., B. S. Cutler, M. H. Meissner, and D. E. Strandness, Jr. 1998. Cilostazol has beneficial effects in treatment of intermittent claudication: results from a multicenter, randomized, prospective, double-blind trial. *Circulation* **98**:678-686.
- Dawson, D. L., W. R. Hiatt, M. A. Creager, and A. T. Hirsch. 2002. Peripheral arterial disease: medical care and prevention of complications. *Prev Cardiol*. **5**:119-130.
- Diehm, C., S. Kareem, and H. Lawall. 2004. Epidemiology of peripheral arterial disease. *Vasa* **33**:183-189.
- Dinn, R. F., H. T. Yang, and R. L. Terjung. 1990. The influence of pentoxifylline and torbafylline on muscle blood flow in animals with peripheral arterial insufficiency. *J Clin Pharmacol* **30**:704-710.
- Doi, H., M. Kaburaki, H. Inoue, K. Suzumura, and H. Narita. 2000. Protective effect of TA-993, a novel therapeutic agent for peripheral circulatory insufficiency, on skeletal muscle fatigue in a rat model of hindlimb ischemia. *Jpn J Pharmacol* **83**:73-81.
- Donaldson, D. R., T. J. Hall, R. C. Kester, C. W. Ramsden, and P. A. Wiggins. 1984. Does oxpentifylline ('Trental') have a place in the treatment of intermittent claudication? *Curr Med Res Opin* **9**:35-40.
- Dormandy, J., L. Heeck, and S. Vig. 1999a. The natural history of claudication: risk to life and limb. *Semin Vasc Surg* **12**:123-137.
- Dormandy, J., L. Heeck, and S. Vig. 1999b. Predictors of early disease in the lower limbs. *Semin Vasc Surg* **12**:109-117.

Literaturübersicht

- Dormandy, J. A., and R. B. Rutherford. 2000. Management of peripheral arterial disease (PAD). TASC Working Group. TransAtlantic Inter-Society Concensus (TASC). *J Vasc Surg* **31**:S1-S296.
- Duan, J., T. Murohara, H. Ikeda, K. Sasaki, S. Shintani, T. Akita, T. Shimada, and T. Imaizumi. 2000. Hyperhomocysteinemia impairs angiogenesis in response to hindlimb ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**:2579-2585.
- Dumville, J. C., A. J. Lee, F. B. Smith, and F. G. Fowkes. 2004. The health-related quality of life of people with peripheral arterial disease in the community: the Edinburgh Artery Study. *Br J Gen Pract* **54**:826-831.
- Elam, M. B., J. Heckman, J. R. Crouse, D. B. Hunninghake, J. A. Herd, M. Davidson, I. L. Gordon, E. B. Bortey, and W. P. Forbes. 1998. Effect of the novel antiplatelet agent cilostazol on plasma lipoproteins in patients with intermittent claudication. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**:1942-1947.
- Elander, A., J. P. Idstrom, S. Holm, T. Schersten, and A. C. Bylund-Fellenius. 1985. Metabolic adaptation to reduced muscle blood flow. II. Mechanisms and beneficial effects. *Am J Physiol* **249**:E70-E76.
- Emanuelli, C., A. Minasi, A. Zacheo, J. Chao, L. Chao, M. B. Salis, S. Straino, M. G. Tozzi, R. Smith, L. Gaspa, G. Bianchini, F. Stillo, M. C. Capogrossi, and P. Madeddu. 2001. Local delivery of human tissue kallikrein gene accelerates spontaneous angiogenesis in mouse model of hindlimb ischemia. *Circulation* **103**:125-132.
- Emanuelli, C., M. B. Salis, T. Stacca, A. Pinna, L. Gaspa, P. Madeddu, and P. Madeddu. 2002. Angiotensin AT(1) receptor signalling modulates reparative angiogenesis induced by limb ischaemia. *Br J Pharmacol* **135**:87-92.
- Endemann, D. H., and E. L. Schiffrin. 2004. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol* **15**:1983-1992.

Literaturübersicht

- Faxon, D. P., V. Fuster, P. Libby, J. A. Beckman, W. R. Hiatt, R. W. Thompson, J. N. Topper, B. H. Annex, J. H. Rundback, R. P. Fabunmi, R. M. Robertson, and J. Loscalzo. 2004. Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group III: pathophysiology. *Circulation* **109**:2617-2625.
- Fowkes, F. G., E. Housley, R. A. Riemersma, C. C. Macintyre, E. H. Cawood, R. J. Prescott, and C. V. Ruckley. 1992. Smoking, lipids, glucose intolerance, and blood pressure as risk factors for peripheral atherosclerosis compared with ischemic heart disease in the Edinburgh Artery Study. *Am J Epidemiol* **135**:331-340.
- Fulgenzi, G., L. Graciotti, M. G. Collis, and O. Hudlicka. 1998. The effect of alpha 1 adrenoceptor antagonist prazosin on capillary supply, blood flow and performance in a rat model of chronic muscle ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg* **16**:71-77.
- Furchgott, R. F., and J. V. Zawadzki. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**:373-376.
- Gallus, A. S., F. Gleadow, P. Dupont, J. Walsh, A. A. Morley, A. Wenzel, M. Alderman, and D. Chivers. 1985. Intermittent claudication: a double-blind crossover trial of pentoxifylline. *Aust N Z J Med* **15**:402-409.
- Gardner, A. W., and E. T. Poehlman. 1995. Exercise rehabilitation programs for the treatment of claudication pain. A meta-analysis. *JAMA* **274**:975-980.
- Girolami, B., E. Bernardi, M. H. Prins, J. W. ten Cate, R. Hettiarachchi, P. Prandoni, A. Girolami, and H. R. Buller. 1999. Treatment of intermittent claudication with physical training, smoking cessation, pentoxifylline, or nafronyl: a meta-analysis. *Arch Intern Med* **159**:337-345.
- Heil, M., and W. Schaper. 2004. Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (arteriogenesis). *Circ Res* **95**:449-458.
- Henriksen, T., E. M. Mahoney, and D. Steinberg. 1981. Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U.S A* **78**:6499-6503.

Literaturübersicht

- Hershey, J. C., E. P. Baskin, J. D. Glass, H. A. Hartman, D. B. Gilberto, I. T. Rogers, and J. J. Cook. 2001. Revascularization in the rabbit hindlimb: dissociation between capillary sprouting and arteriogenesis. *Cardiovasc Res* **49**:618-625.
- Herzog, S., H. Sager, E. Khmelevski, A. Deylig, and W. D. Ito. 2002. Collateral arteries grow from preexisting anastomoses in the rat hindlimb. *Am J Physiol* **283**:H2012-H2020.
- Hiatt, W. R. 2004. Treatment of disability in peripheral arterial disease: new drugs. *Curr. Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* **4**:227-231.
- Hiatt, W. R. 2002. Pharmacological therapy for peripheral arterial disease and claudication. *J Vasc Surg* **36**:1283-1291.
- Hiatt, W. R. 2001. Medical treatment of peripheral arterial disease and claudication. *N Engl J Med* **344**:1608-1621.
- Hiatt, W. R., J. A. Marshall, J. Baxter, R. Sandoval, W. Hildebrandt, L. R. Kahn, and R. F. Hamman. 1990. Diagnostic methods for peripheral arterial disease in the San Luis Valley Diabetes Study. *J Clin Epidemiol* **43**:597-606.
- Hiatt, W. R., and M. R. Nehler. 2001. Peripheral arterial disease. *Adv Intern Med* **47**:89-110.
- Hiatt, W. R., J. G. Regensteiner, M. A. Creager, A. T. Hirsch, J. P. Cooke, J. W. Olin, G. N. Gorbunov, J. Isner, Y. V. Lukjanov, M. S. Tsitsiashvili, T. F. Zabelskaya, and A. Amato. 2001. Propionyl-L-carnitine improves exercise performance and functional status in patients with claudication. *Am J Med* **110**:616-622.
- Hiatt, W. R., J. G. Regensteiner, M. E. Hargarten, E. E. Wolfel, and E. P. Brass. 1990. Benefit of exercise conditioning for patients with peripheral arterial disease. *Circulation* **81**:602-609.
- Hiatt, W. R., A. T. Hirsch, J. G. Regensteiner, and E. P. Brass. 1995. Clinical Trials for Claudication : Assessment of Exercise Performance, Functional Status, and Clinical End Points. *Circulation* **92**:614-621.

Literaturübersicht

- Hirsch, A. T., M. H. Criqui, D. Treat-Jacobson, J. G. Regensteiner, M. A. Creager, J. W. Olin, S. H. Krook, D. B. Hunninghake, A. J. Comerota, M. E. Walsh, M. M. McDermott, and W. R. Hiatt. 2001. Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care. *JAMA* **286**:1317-1324.
- Hirsch, A. T., D. Treat-Jacobson, H. A. Lando, and D. K. Hatsukami. 1997. The role of tobacco cessation, antiplatelet and lipid-lowering therapies in the treatment of peripheral arterial disease. *Vasc Med* **2**:243-251.
- Hoefler, I. E., R. N. van, J. E. Rectenwald, E. J. Bray, Z. Abouhamze, L. L. Moldawer, M. Voskuil, J. J. Piek, I. R. Buschmann, and C. K. Ozaki. 2002. Direct evidence for tumor necrosis factor-alpha signaling in arteriogenesis. *Circulation* **105**:1639-1641.
- Hong, J. H., Y. W. Bahk, J. S. Suh, B. K. Kwak, H. J. Shim, J. S. Kim, H. S. Kim, Y. H. Moon, S. J. Kim, J. W. Chung, and J. H. Park. 2001. An experimental model of ischemia in rabbit hindlimb. *J Korean Med Sci* **16**:630-635.
- Ishizaka, N., J. Taguchi, Y. Kimura, Y. Ikari, T. Aizawa, M. Togo, K. Miki, K. Kurokawa, and M. Ohno. 1999. Effects of a single local administration of cilostazol on neointimal formation in balloon-injured rat carotid artery. *Atherosclerosis* **142**:41-46.
- Isner, J. M., P. R. Vale, J. F. Symes, and D. W. Losordo. 2001. Assessment of Risks Associated With Cardiovascular Gene Therapy in Human Subjects. *Circ Res* **89**:389-400.
- Ito, C., E. Kusano, T. Akimoto, S. Takeda, N. Sasaki, T. Umino, O. Iimura, Y. Ando, and Y. Asano. 2002. Cilostazol enhances IL-1beta-induced NO production and apoptosis in rat vascular smooth muscle via PKA-dependent pathway. *Cell Signal* **14**:625-632.
- Ito, W. D., M. Arras, D. Scholz, B. Winkler, P. Htun, and W. Schaper. 1997. Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion. *Am J Physiol* **273**:H1255-H1265.
- Jacoby, D., and E. R. Mohler, III. 2004. Drug treatment of intermittent claudication. *Drugs* **64**:1657-1670.

Literaturübersicht

- Janiak, P., P. Laine, Y. Grataloup, C. E. Luyt, J. P. Bidouard, J. B. Michel, S. E. O'Connor, and J. M. Herbert. 2002. Serotonin receptor blockade improves distal perfusion after lower limb ischemia in the fatty Zucker rat. *Cardiovasc Res* **56**:293-302.
- Janzon, L. 1996. The STIMS trial: the ticlopidine experience and its clinical applications. Swedish Ticlopidine Multicenter Study. *Vasc Med* **1**:141-143.
- Kannel, W. B., and D. L. McGee. 1985. Update on some epidemiologic features of intermittent claudication: the Framingham Study. *J Am Geriatr Soc* **33**:13-18.
- Kawamura, K., S. Fujita, T. Tani, and Y. Kimura. 1985. Effect of cilostazol, a new antithrombotic drug, on an experimental model of peripheral circulation insufficiency. *Arzneimittelforschung* **35**:1154-1156.
- Kawashima, S., and M. Yokoyama. 2004. Dysfunction of Endothelial Nitric Oxide Synthase and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**:998-1005.
- Kieffer, E., A. Bahini, X. Mouren, and S. Gamand. 2001. A new study demonstrates the efficacy of naftidrofuryl in the treatment of intermittent claudication. Findings of the Naftidrofuryl Clinical Ischemia Study (NCIS). *Int Angiol* **20**:58-65.
- Kimura, Y., T. Tani, T. Kanbe, and K. Watanabe. 1985. Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. *Arzneimittelforschung*. **35**:1144-1149.
- Kohda, N., T. Tani, S. Nakayama, T. Adachi, K. Marukawa, R. Ito, K. Ishida, Y. Matsumoto, and Y. Kimura. 1999. Effect of Cilostazol, a Phosphodiesterase III Inhibitor, on Experimental Thrombosis in the Porcine Carotid Artery. *Throm Res* **96**:261-268.
- Koppensteiner, R. Amann-Vesti, BR. 2005. Nicht-invasive Diagnostik peripherer arterieller Gefäßkrankheiten. *Schweiz Med Forum*. **17**:438-444.
- Labs, K. H., J. A. Dormandy, K. A. Jaeger, C. S. Stuerzebecher, and W. R. Hiatt. 1999. Transatlantic Conference on Clinical Trial Guidelines in Peripheral Arterial Disease: clinical trial methodology. Basel PAD Clinical Trial Methodology Group. *Circulation* **100**:e75-e81.

Literaturübersicht

- Laughlin, M. H., R. B. Armstrong, J. White, and K. Rouk. 1982. A method for using microspheres to measure muscle blood flow in exercising rats. *J Appl Physiol* **52**:1629-1635.
- Lawall, M. 2002. Periphere arterielle Verschlusskrankung; Diagnostik und Therapie bei Diabetes mellitus. *Cardiovasc* **2**:38-43.
- Lederman, R. J., F. O. Mendelsohn, R. D. Anderson, J. F. Saucedo, A. N. Tenaglia, J. B. Hermiller, W. B. Hillegass, K. Rocha-Singh, T. E. Moon, M. J. Whitehouse, and B. H. Annex. 2002. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *Lancet* **359**:2053-2058.
- Lehert, P., F. E. Riphagen, and S. Gamand. 1990. The effect of naftidrofuryl on intermittent claudication: a meta-analysis. *J Cardiovasc Pharmacol* **16 Suppl 3**:S81-S86.
- Leng, G. C., and F. G. Fowkes. 1992. The Edinburgh Claudication Questionnaire: an improved version of the WHO/Rose Questionnaire for use in epidemiological surveys. *J Clin Epidemiol* **45**:1101-1109.
- Leng, G. C., B. Fowler, and E. Ernst. 2000. Exercise for intermittent claudication. *Cochrane Database Syst Rev* CD000990.
- Leng, G. C., A. J. Lee, F. G. Fowkes, M. Whiteman, J. Dunbar, E. Housley, and C. V. Ruckley. 1996. Incidence, natural history and cardiovascular events in symptomatic and asymptomatic peripheral arterial disease in the general population. *Int J Epidemiol* **25**:1172-1181.
- Lerman, I., B. C. Harrison, K. Freeman, T. E. Hewett, D. L. Allen, J. Robbins, and L. A. Leinwand. 2002. Genetic variability in forced and voluntary endurance exercise performance in seven inbred mouse strains. *J Appl Physiol* **92**:2245-2255.
- Lievre, M., S. Morand, B. Besse, J. N. Fiessinger, and J. P. Boissel. 2000. Oral Beraprost sodium, a prostaglandin I(2) analogue, for intermittent claudication: a double-blind, randomized, multicenter controlled trial. Beraprost et Claudication Intermittente (BERCI) Research Group. *Circulation* **102**:426-431.

Literaturübersicht

- Linz, W., G. Wiemer, P. Gohlke, T. Unger, and B. A. Scholkens. 1995. Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacol Rev* **47**:25-49.
- Longland, C. J. 1953. Collateral circulation in the limb. *Postgrad Med J* **29**:456-458.
- Maass, U., H. G. Amberger, H. Bohme, C. Diehm, H. Dimroth, H. Heidrich, F. Heinrich, H. Hirche, H. Morl, U. Muller-Buhl. 1984. Naftidrofuryl in arterial occlusive disease. Controlled multicenter double-blind study with oral administration. *Dtsch Med Wochenschr* **109**:745-750.
- McDermott, M. M., K. Liu, P. Greenland, J. M. Guralnik, M. H. Criqui, C. Chan, W. H. Pearce, J. R. Schneider, L. Ferrucci, L. Celic, L. M. Taylor, E. Vonesh, G. J. Martin, and E. Clark. 2004. Functional decline in peripheral arterial disease: associations with the ankle brachial index and leg symptoms. *JAMA* **292**:453-461.
- Menard, J. R., H. E. Smith, D. Riebe, C. M. Braun, B. Blissmer, and R. B. Patterson. 2004. Long-term results of peripheral arterial disease rehabilitation. *J Vasc Surg* **39**:1186-1192.
- Mohler, E. R., III, H. G. Beebe, S. Salles-Cuhna, R. Zimet, P. Zhang, J. Heckman, and W. P. Forbes. 2001. Effects of cilostazol on resting ankle pressures and exercise-induced ischemia in patients with intermittent claudication. *Vasc Med* **6**:151-156.
- Mohler, E. R., III, W. R. Hiatt, and M. A. Creager. 2003a. Cholesterol reduction with atorvastatin improves walking distance in patients with peripheral arterial disease. *Circulation* **108**:1481-1486.
- Mohler, E. R., III, W. R. Hiatt, J. W. Olin, M. Wade, R. Jeffs, and A. T. Hirsch. 2003b. Treatment of intermittent claudication with beraprost sodium, an orally active prostaglandin I₂ analogue: a double-blinded, randomized, controlled trial. *J Am Coll Cardiol* **41**:1679-1686.
- Momken, I., P. Lechene, R. Ventura-Clapier, and V. Veksler. 2004. Voluntary physical activity alterations in endothelial nitric oxide synthase knockout mice. *Am J Physiol* **287**:H914-H920.

Literaturübersicht

- Mondillo, S., P. Ballo, R. Barbati, F. Guerrini, T. Ammataro, E. Agricola, M. Pastore, F. Borrello, M. Belcastro, A. Picchi, and R. Nami. 2003. Effects of simvastatin on walking performance and symptoms of intermittent claudication in hypercholesterolemic patients with peripheral vascular disease. *Am J Med* **114**:359-364.
- Money, S. R., J. A. Herd, J. L. Isaacsohn, M. Davidson, B. Cutler, J. Heckman, and W. P. Forbes. 1998. Effect of cilostazol on walking distances in patients with intermittent claudication caused by peripheral vascular disease. *J Vasc Surg* **27**:267-274.
- Moraska, A., T. Deak, R. L. Spencer, D. Roth, and M. Fleshner. 2000. Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol* **279**:R1321-R1329.
- Morel, D. W., P. E. DiCorleto, and G. M. Chisolm. 1984. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis* **4**:357-364.
- MRC/BHF Heart Protection Study. 2002. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised Placebo-controlled trial. *Lancet* **360**:7-22.
- Murabito, J. M., R. B. D'Agostino, H. Silbershatz, and W. F. Wilson. 1997. Intermittent claudication. A risk profile from The Framingham Heart Study. *Circulation* **96**:44-49.
- Murai, T., K. Muraoka, K. Saga, A. Sakai, N. Sato, K. Amemiya, M. Yajima, T. Murata, T. Umetsu, and S. Nishio. 1989. Effect of beraprost sodium on peripheral circulation insufficiency in rats and rabbits. *Arzneimittelforschung*. **39**:856-859.
- Murohara, T., T. Asahara, M. Silver, C. Bauters, H. Masuda, C. Kalka, M. Kearney, D. Chen, J. F. Symes, M. C. Fishman, P. L. Huang, and J. M. Isner. 1998. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* **101**:2567-2578.
- Nakamura, T., H. Houchi, A. Minami, S. Sakamoto, K. Tsuchiya, Y. Niwa, K. Minakuchi, and Y. Nakaya. 2001. Endothelium-dependent relaxation by cilostazol, a phosphodiesterase III inhibitor, on rat thoracic aorta. *Life Sci* **69**:1709-1715.

Literaturübersicht

- Ojaimi, C., W. Li, S. Kinugawa, H. Post, A. Csiszar, P. Pacher, G. Kaley, and T. H. Hintze. 2005. Transcriptional Basis for Exercise Limitation in Male eNOS Knockout Mice with Age: Heart Failure and the Fetal Phenotype. *Am J Physiol* **289**:H1399-H1407.
- Okyayuz-Baklouti, I. 1989. The effects of Torbafylline on blood flow, pO₂ and function of rat ischaemic skeletal muscle. *Eur J Pharm* **166**:75-86.
- Orito, K., M. Kishi, H. Fujiki, T. Nakazawa, T. Imaizumi, Y. Kimura, T. Mori, and T. Kambe. 2004. A method for evaluating drug effects on intermittent claudication using a treadmill in rats with unilateral hindlimb artery occlusion. *J Pharmacol Toxicol Methods* **49**:25-29.
- Ouriel, K. 2001. Peripheral arterial disease. *Lancet* **358**:1257-1264.
- Peterson, R. G., W. N. Shaw, M. A. Neel, L. A. Little, and J. Eichberg. 1999. Zucker Diabetic Fatty Rat as a Model for Non-insulin-dependent Diabetes Mellitus. *ILAR J* **V32**.
- Piper, P. J., J. R. Vane, and J. H. Wyllie. 1970. Inactivation of prostaglandins by the lungs. *Nature* **225**:600-604.
- Radack, K., and C. Deck. 1991. Beta-adrenergic blocker therapy does not worsen intermittent claudication in subjects with peripheral arterial disease. A meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med* **151**:1769-1776.
- Rajagopalan, S., E. R. Mohler, III, R. J. Lederman, F. O. Mendelsohn, J. F. Saucedo, C. K. Goldman, J. Blebea, J. Macko, P. D. Kessler, H. S. Rasmussen, and B. H. Annex. 2003. Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication. *Circulation* **108**:1933-1938.
- Rajagopalan, S., J. W. Olin, S. Young, M. Erikson, P. M. Grossman, F. O. Mendelsohn, J. G. Regensteiner, W. R. Hiatt, and B. H. Annex. 2004. Design of the Del-1 for therapeutic angiogenesis trial (DELTA-1), a phase II multicenter, double-blind, Placebo-controlled trial of VLTS-589 in subjects with intermittent claudication secondary to peripheral arterial disease. *Hum Gene Ther* **15**:619-624.

Literaturübersicht

- Reaven, G. M. 1988. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* **37**:1595-1607.
- Regensteiner, J. G., M. E. Hargarten, R. B. Rutherford, and W. R. Hiatt. 1993. Functional benefits of peripheral vascular bypass surgery for patients with intermittent claudication. *Angiology* **44**:1-10.
- Regensteiner, J. G., and W. R. Hiatt. 1994. Medical management of peripheral arterial disease. *J Vasc Interv Radiol* **5**:669-677.
- Regensteiner, J. G., J. F. Steiner, and W. R. Hiatt. 1996. Exercise training improves functional status in patients with peripheral arterial disease. *J Vasc Surg* **23**:104-115.
- Regensteiner, J. G., J. E. Ware, Jr., W. J. McCarthy, P. Zhang, W. P. Forbes, J. Heckman, and W. R. Hiatt. 2002. Effect of cilostazol on treadmill walking, community-based walking ability, and health-related quality of life in patients with intermittent claudication due to peripheral arterial disease: meta-analysis of six randomized controlled trials. *J Am Geriatr Soc.* **50**:1939-1946.
- Reiter, M., R. A. Bucek, A. Stumpflen, A. Dirisamer, and E. Minar. 2002. Prostanoids in the treatment of intermittent claudication--a meta-analysis. *Vasa* **31**:219-224.
- Ridker, P. M., M. J. Stampfer, and N. Rifai. 2001. Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *JAMA* **285**:2481-2485.
- Rivard, A., J. E. Fabre, M. Silver, D. Chen, T. Murohara, M. Kearney, M. Magner, T. Asahara, and J. M. Isner. 1999. Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation* **99**:111-120.
- Rose, G. A. 1962. The diagnosis of ischaemic heart pain and intermittent claudication in field surveys. *Bull World Health Organ* **27**:645-658.

Literaturübersicht

- Samra, S. S., P. Bajaj, K. S. Vijayaraghavan, N. P. Potdar, D. Vyas, R. G. Devani, C. Ballary, and A. Desai. 2003. Efficacy and safety of cilostazol, a novel phosphodiesterase inhibitor in patients with intermittent claudication. *J Indian Med Assoc* **101**:561-2, 564.
- Schmidt R. F., and G. Thews. 1997. *Physiologie des Menschen*, 27. Auflage: 67-86.
- Scholz, D., T. Ziegelhoeffer, A. Helisch, S. Wagner, C. Friedrich, T. Podzuweit, and W. Schaper. 2002. Contribution of arteriogenesis and angiogenesis to postocclusive hindlimb perfusion in mice. *J Mol Cell Cardiol* **34**:775-787.
- Schorr, K., and T. Hohlfeld. 2004. Mechanisms of anti-ischemic action of prostaglandin E1 in peripheral arterial occlusive disease. *Vasa* **33**:119-124.
- Silvestre, J. S., Z. Mallat, M. Duriez, R. Tamarat, M. F. Bureau, D. Scherman, N. Duverger, D. Branellac, A. Tedgui, and B. I. Levy. 2000. Antiangiogenic effect of interleukin-10 in ischemia-induced angiogenesis in mice hindlimb. *Circ Res* **87**:448-452.
- Smith, G. D., M. J. Shipley, and G. Rose. 1990. Intermittent claudication, heart disease risk factors, and mortality. The Whitehall Study. *Circulation* **82**:1925-1931.
- Solomon, S. A., L. E. Ramsay, W. W. Yeo, L. Parnell, and W. Morris-Jones. 1991. Beta blockade and intermittent claudication: Placebo controlled trial of Atenolol and Nifedipine and their combination. *BMJ* **303**:1100-1104.
- Steele, D. S., and A. M. Duke. 2003. Metabolic factors contributing to altered Ca²⁺ regulation in skeletal muscle fatigue. *Acta Physiol Scand* **179**:39-48.
- Steinacker J., Liu Y. & Hanke H. 2002. Körperliche Bewegung bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit. *Dtsch Arztebl* **99**:A3018–A3025.
- Stewart, K. J., W. R. Hiatt, J. G. Regensteiner, and A. T. Hirsch. 2002. Exercise training for claudication. *N Engl J Med* **347**:1941-1951.

Literaturübersicht

- Takahashi, S., K. Oida, R. Fujiwara, H. Maeda, S. Hayashi, H. Takai, T. Tamai, T. Nakai, and S. Miyabo. 1992. Effect of cilostazol, a cyclic AMP phosphodiesterase inhibitor, on the proliferation of rat aortic smooth muscle cells in culture. *J Cardiovasc Pharmacol* **20**:900-906.
- Takeshita, S., H. Tomiyama, N. Yokoyama, Y. Kawamura, T. Furukawa, Y. Ishigai, T. Shibano, T. Isshiki, and T. Sato. 2001. Angiotensin-converting enzyme inhibition improves defective angiogenesis in the ischemic limb of spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* **52**:314-320.
- Tanaka, T., T. Ishikawa, M. Hagiwara, K. Onoda, H. Itoh, and H. Hidaka. 1988. Effects of cilostazol, a selective cAMP phosphodiesterase inhibitor on the contraction of vascular smooth muscle. *Pharmacology* **36**:313-320.
- Tani, T., K. Uehara, T. Sudo, K. Marukawa, Y. Yasuda, and Y. Kimura. 2000. Cilostazol, a selective type III phosphodiesterase inhibitor, decreases triglyceride and increases HDL cholesterol levels by increasing lipoprotein lipase activity in rats. *Atherosclerosis* **152**:299-305.
- Thanhauser, A., N. Reiling, A. Bohle, K. M. Toellner, M. Duchrow, D. Scheel, C. Schluter, M. Ernst, H. D. Flad, and A. J. Ulmer. 1993. Pentoxifylline: a potent inhibitor of IL-2 and IFN-gamma biosynthesis and BCG-induced cytotoxicity. *Immunology* **80**:151-156.
- Thompson, P. D., R. Zimet, W. P. Forbes, and P. Zhang. 2002. Meta-analysis of results from eight randomized, Placebo-controlled trials on the effect of cilostazol on patients with intermittent claudication. *Am J Cardiol.* **90**:1314-1319.
- Tsushima, N., H. Matsuo, T. Hayashi, and S. Homma. 1996. The clinical features and treatment of arteriosclerosis obliterans with diabetes. *Diabetes* **45 Suppl 3**:S101-S104.
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. 1998. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* **352**:837-853.

Literaturübersicht

- Van Royen, N., J. J. Piek, D. A. Legemate, W. Schaper, J. Oskam, B. Atasever, M. Voskuil, D. Ubbink, S. H. Schirmer, I. Buschmann, C. Bode, and E. E. Buschmann. 2003. Design of the START-trial: STimulation of ARTeriogenesis using subcutaneous application of GM-CSF as a new treatment for peripheral vascular disease. A randomized, double-blind, Placebo-controlled trial. *Vasc Med* **8**:191-196.
- Viner, R. I., A. F. Huhmer, D. J. Bigelow, and C. Schoneich. 1996. The oxidative inactivation of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase by peroxynitrite. *Free Radic Res* **24**:243-259.
- Waters, R. E., R. L. Terjung, K. G. Peters, and B. H. Annex. 2004. Preclinical models of human peripheral arterial occlusive disease: implications for investigation of therapeutic agents. *J Appl Physiol* **97**:773-780.
- Wilhite, D. B., A. J. Comerota, F. A. Schmieder, R. C. Throm, J. P. Gaughan, and A. K. Rao. 2003. Managing PAD with multiple platelet inhibitors: the effect of combination therapy on bleeding time. *J Vasc Surg* **38**:710-713.
- Yang, H. T., R. F. Dinn, and R. L. Terjung. 1990. Training increases muscle blood flow in rats with peripheral arterial insufficiency. *J Appl Physiol* **69**:1353-1359.
- Yang, H. T., and Y. Feng. 2000. bFGF increases collateral blood flow in aged rats with femoral artery ligation. *Am J Physiol* **278**:H85-H93.
- Yang, H. T., R. W. Ogilvie, and R. L. Terjung. 1995. Heparin increases exercise-induced collateral blood flow in rats with femoral artery ligation. *Circ Res* **76**:448-456.
- Yusuf, S., P. Sleight, J. Pogue, J. Bosch, R. Davies, and G. Dagenais. 2000. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* **342**:145-153.

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt allen, die das Gelingen dieser Arbeit ermöglicht haben:

Herrn Dr. Martin van Eickels (Sanofi Aventis Deutschland GmbH), für die Überlassung des Themas, sowie die immer freundliche Betreuung und Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Linz (Sanofi Aventis Deutschland GmbH) für die freundliche Betreuung und Begutachtung dieser Dissertation.

Herrn Dr. Hartmut Rütten (Sanofi Aventis Deutschland GmbH, Leiter der Abteilung für Herz-Kreislauf Forschung) und Herrn Prof. Dr. Andreas Busch (ehemaliger Leiter der Abteilung für Herz-Kreislauf Forschung) für die Ermöglichung dieser Arbeit in den Einrichtungen der Firma Sanofi Aventis in Frankfurt.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Clauss (Institut für Tierphysiologie, Universität Giessen) für die schnelle und unkomplizierte Betreuung und Begutachtung dieser Dissertation am Fachbereich Veterinärmedizin.

Dr. Martina Klein für die sehr engagierte Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Versuche. Vielen Dank für deine Hilfe!

Dr. Matthias Schäfer für die unermüdliche Beantwortung aller Fragen und die immer sehr konstruktive Hilfe bei allen möglichen Problemen!!!

Sybill Meister, Corinna Bartsch, Daniel Hein und Peter Hainz für die sehr schöne Zusammenarbeit im Labor und die hervorragende Hilfe bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Versuche.

Dr. Hans Gühring für die zur Verfügung gestellte Anlage, zur Untersuchung des Laufverhaltens von Mäusen und die Hilfe bei der Auswertung.

Herrn Gerald Fischer für die (Excel) Hilfe bei der Auswertung der Laufradversuche.

Herrn Dr. Martin Gerl, Frau Dr. Biemer-Daub und ihren Mitarbeitern danke ich für die Durchführung der Blutanalysen.

Monsieur Gouraud (Sanofi Aventis, Chilly-Mazarin) für die Durchführung der immunhistochemischen Auswertung der Muskelschnitte.

Danken möchte ich auch meinen Eltern und meinen Geschwistern, die mich bedingungslos unterstützt und mir bei allen Problemen immer tatkräftig zur Seite gestanden haben.

Danke auch meinem Engel, der immer auf mich aufpasst und mich auf meinem Lebensweg begleitet.

9 Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt ist, eingehalten.

Alle Versuche sind unter Beachtung des Tierschutzgesetzes und mit Genehmigung des Regierungspräsidiums Hessen durchgeführt worden (HMR 4a Anz. 29 PAVK-2003-R1, HMR 4a Anz. 29 PAVK-2003-M1).

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
GLEIBERGER WEG 4
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5007-X



9 783835 195007 8