

Aus dem Bereich Innere Medizin III  
Klinische und Experimentelle Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg (Saar)  
(Prof. Dr. med. U. Laufs)

**Effekte der Herzfrequenzreduktion  
durch I<sub>f</sub> – Kanalblockade  
auf das Kollateralarterienwachstum**

***Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin***

**der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2012

Vorgelegt von:

Achim Degen

geboren am 01.09.1986

in Kaiserslautern



Gutachter:

1. Prof. Dr. U. Laufs
2. NN
3. NN

Dekan: Prof. Dr. M. Menger



“If some means could emerge of encouraging the rate at which normal coronary arterial anastomoses enlarge to form the wide channels for collateral blood flow, then a considerable potential advantage would be gained in the management of ischaemic heart disease.”

WF Fulton, Acta Cardiology 1969



# Inhaltsverzeichnis

I. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	9
1. Zusammenfassung	13
<b>1.1 Herzfrequenzreduktion durch I<sub>f</sub>-Kanalblockade mit Ivabradin stimuliert das Kollateralarterienwachstum bei hypercholesterinämischer Atherosklerose</b>	13
<b>1.2 Heart Rate Reduction by I<sub>f</sub>-Channel Blockade with Ivabradine Stimulates Collateral Artery Growth in Hypercholesterolemic Atherosclerosis</b>	14
2. Einleitung	15
<b>2.1 Hintergrund</b>	15
<b>2.2 Grundlagen der Arteriogenese</b>	18
2.2.1 Mechanische Faktoren	19
2.2.2 Zytokinfreisetzung	19
2.2.3 Effekte auf die glatten Muskelzellen (smooth muscle cells)	20
2.2.4 Die Rolle von Stickstoffmonoxid (NO)	21
2.2.5 Hemmung der Arteriogenese	21
<b>2.3 Ziele der Arbeit</b>	22
3. Material	23
<b>3.1 Enzyme und Kits</b>	23
<b>3.2 Geräte</b>	24
<b>3.3 Chemikalien und Reagenzien</b>	25
<b>3.4 Verbrauchsmaterialien</b>	27
<b>3.5 Primer</b>	28
<b>3.6 Antikörper für Immunhistochemie</b>	28
3.6.1 Primärantikörper	28
3.6.2 Sekundärantikörper	29
<b>3.7 Antikörper für Western Blot – Analyse</b>	29

3.7.1 Primärantikörper	29
3.7.2 Sekundärantikörper	29
<b>3.8 Verwendete Lösungen</b>	<b>30</b>
<b>3.9 Software</b>	<b>32</b>
<b>4. Methoden</b>	<b>33</b>
<b>4.1 Perfusionsmessungen</b>	<b>33</b>
4.1.1 Modellbeschreibung	33
4.1.2 Behandlung	34
4.1.3 Narkose	34
4.1.4 Ligatur der rechten A. femoralis	36
4.1.5 Perfusion mit Mikrosphären	37
4.1.6 Gewebeentnahme	39
4.1.7 Prinzip des Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)	39
4.1.8 FACS – Analyse	40
4.1.9 Angiographien	40
<b>4.2 Immunhistochemie</b>	<b>41</b>
4.2.1 Probengewinnung für Immunhistochemie	41
4.2.2 Hämatoxylin – Eosin – Färbung	41
4.2.3 Fixierung der Schnitte	43
4.2.4 $\alpha$ – smooth – muscle – actin – Färbung	43
4.2.5 MOMA – Färbung	43
4.2.6 CD31 – Färbung	43
4.2.7 Desmin – Färbung	44
4.2.8 Smoothelin – Färbung	44
4.2.9 Dihydroethidium (DHE) – Färbung	45
<b>4.3 Quantitative Real – Time (qRT) – PCR</b>	<b>45</b>
4.3.1 Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR)	45
4.3.2 Probengewinnung für qRT – PCR	46
4.3.3 Probenaufbereitung Blut	47
4.3.4 Probenaufbereitung Adduktor	49
4.3.5 qRT – PCR	50



<b>4.4 Western Blot</b>	51
4.4.1 Probengewinnung für Western Blot	51
4.4.2 Probenaufbereitung	51
4.4.3 Proteinbestimmung	51
4.4.4 SDS – PAGE	52
4.4.5 Western Blot	53
4.4.6 Entwickeln	54
4.4.7 Membran strippen	54
<b>4.5 NOS detect assay Kit</b>	55
4.5.1 Prinzip des NOS detect assay Kits	55
4.5.2 Probengewinnung	55
4.5.3 Probenaufbereitung	55
4.5.4 Aktivitätsmessung	56
<b>4.6 Statistische Analysen</b>	56
<b>5. Ergebnisse</b>	57
<b>5.1 Puls – und Blutdruckmessung</b>	57
5.1.1 Ivabradin führt zu einer selektiven Herzfrequenzsenkung ohne Beeinflussung des Blutdrucks	57
<b>5.2 Perfusion</b>	57
5.2.1 Ivabradin verbessert die Perfusionswiederherstellung im Hinterlauf von ApoE <sup>-/-</sup> - Mäusen nach Femoralarterienligatur	57
5.2.2 Die Behandlung mit Ivabradin führt zu einer höheren Dichte an kaliberstarken Kollateralgefäßen	62
<b>5.3 Immunhistochemie</b>	64
5.3.1 Ivabradin führt nicht zur Verminderung von oxidativem Stress in Gefäßmuskelzellen	64
5.3.2 Keine Erhöhung der Kapillarendichte im Muskelgewebe durch Herzfrequenzreduktion	65
5.3.3 Herzfrequenzreduktion durch Ivabradin führt zu Verminderung des Desmingehalts in Kollateralgefäßen	70

5.3.4	<i>Keine Unterschiede in der Anzahl perivaskulärer Makrophagen zwischen Behandlungs – und Kontrollgruppe</i>	71
5.3.5	<i>Keine Verminderung des Smoothelin – Gehalts in Gefäßmuskelzellen durch Ivabradin</i>	72
<b>5.4</b>	<b>eNOS – Proteinexpression</b>	74
5.4.1	<i>Steigerung der eNOS – Expression durch Ivabradin sowie erhöhte Phosphorylierung von eNOS</i>	74
<b>5.5</b>	<b>qRT – PCR – Analysen</b>	77
5.5.1	<i>Reduktion der systemischen Zytokinexpression in mononukleären Zellen nach Herzfrequenzreduktion</i>	77
5.5.2	<i>Adduktoren</i>	79
<b>5.6</b>	<b>Arginin – Citrullin – Assay</b>	83
5.6.1	<i>Ivabradin steigert die eNOS – Aktivität in Hinterläufen von ApoE<sup>-/-</sup> - Mäusen</i>	83
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b>	85
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	90
<b>8.</b>	<b>Dank</b>	97
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf und Publikationen</b>	97

# I. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

°C	Grad Celsius
A, mA	Ampere, Milliampere
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ABRA	Actin – binding Rho – activating protein
AK	Antikörper
ANOVA	Analysis of variance
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
AV – Knoten	Atrioventrikularknoten
bFGF	basic fibroblast growth factor
bpm	beats per minute
ca.	circa
CARP	cardiac ankyrin repeat protein
CCL2	CC Chemokin Ligand 2
CCR2	Chemokin Rezeptor 2
CD	cluster of differentiation
cDNA	copy DNA
COX	cyclooxygenase, Cyclooxygenase
CWS	circumferential wall stress
CXCL10	C-X-C motif Chemokin 10
CXCL11	C-X-C motif Chemokin 11
d	Tag
Da, kDa	Dalton, Kilodalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DBP	diastolic blood pressure
DHE	Dihydroethidium / Hydroethidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	Elektrochemolumineszenz
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
Egr1	Early Growth Response Protein 1

eNOS	endothelial NO – Synthase
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FAK	focal adhesion kinase
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSC	forward scatter
FSS	fluid shear stress
g, mg, µg, pg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Pikogramm
GM – CSF	Granulocyte – Monocyte colony stimulating factor
h	Stunde(n)
HCl	Hydrochlorid
HCN	Hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Horseradishperoxidase, Meerrettichperoxidase
HRR	heart rate reduction
ICAM	intracellular adhesion molecule
IE	internationale Einheiten
IFNβ	Interferon β
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
iNOS	inducible NO – Synthase
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
KLF	Krüppel like factor
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
L – NAME	L – Nitro – Arginine Methyl Ester
M, mM, µM	Molar, Millimolar, Mikromolar
MAPK	mitogen activated protein kinase
MBP	mean blood pressure
MCP1	Monocyte chemoattractant protein 1
min	Minuten(n)
mm, µm, nm	Millimeter, Mikrometer, Nanometer
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule

MMP	Matrixmetalloproteinase
MNC	mononuclear cell
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NaOH	Natriumhydroxid
NO	nitric oxide, Stickstoffmonoxid
NOS	NO – Synthase
ns	nicht signifikant
NSAID	non-steroidal antiinflammatory drugs, nicht-steroidale Antirheumatika
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet derived growth factor
PECAM	platelet endothelial cell adhesion molecule
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
p.o.	per os
qRT – PCR	quantitative Real – Time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen / min
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
s.	siehe
SBP	systolic blood pressure
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS – PAGE	Natriumdodecylsulfat – Polyacrylamidgelelektrophorese
SMA	smooth muscle actin
SMC	smooth muscle cell
SSC	side scatter
t – PA	tissue Plasminogen activator
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGFβ	transforming growth factor β

TIMP	tissue inhibitor of matrix metalloproteinase
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TRITC	Tetramethyl Rhodamine Iso-Thiocyanate
V	Volt
V.	Vena
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
WT	Wildtyp
WTD	western type diet

# 1. Zusammenfassung

## 1.1 Herzfrequenzreduktion durch I<sub>f</sub>-Kanalblockade mit Ivabradin stimuliert das Kollateralarterienwachstum bei hypercholesterinämischer Atherosklerose

Eine Reduktion der Herzfrequenz verbessert die Endothelfunktion und reduziert die Atherogenese im Modell der hypercholesterinämischen Atherosklerose und vermindert vaskuläre Endpunkte bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit und eingeschränkter linksventrikulärer Funktion. In dieser Arbeit wurden die Effekte der Herzfrequenzreduktion durch den I<sub>f</sub> – Kanal – Inhibitor Ivabradin auf das Kollateralarterienwachstum untersucht.

Die Behandlung mit Ivabradin verminderte die Herzfrequenz um 11% in Wildtypmäusen und um 15% in ApoE<sup>-/-</sup> – Mäusen, die cholesterinreiches Futter (WTD) erhielten. Nach Ligatur der A. femoralis zeigten Angiographien ein verbessertes Kollateralarterienwachstum nach Herzfrequenzreduktion, während die Kapillardichte unverändert blieb. Perfusionsmessungen mit Mikrosphären zeigten, dass Ivabradin die Wiederherstellung der Hinterlaufperfusion bei Wildtypmäusen nicht beeinflusste, aber die Perfusionswiederherstellung der ligierten Seite bei ApoE<sup>-/-</sup> – Mäusen von 40,5 ± 4,4 auf 60,2 ± 4,0% des Flusses der nicht – ligierten Seite steigerte. Die Proteinexpression der endothelialen NO-Synthase (eNOS) wurde im kollateralisierten Gewebe durch Ivabradin gesteigert (177 ± 26% der Kontrollgruppe), ebenso wurden eine gesteigerte Phosphorylierung der eNOS (185 ± 17% der Kontrollgruppe) und eine vermehrte NOS-Aktivität im Gewebe (111 ± 3% der Kontrollgruppe) nachgewiesen. Die Herzfrequenzreduktion verminderte inflammatorische Zytokine in zirkulierenden mononukleären Zellen (TNFα 8 ± 1%, IL6 8 ± 4%, MCP1 6 ± 3%, CCR2 12 ± 3% der Kontrollgruppe). Anti – arteriogenetisch wirksame inflammatorische Zytokine waren im kollateralisierten Gewebe nach Behandlung mit Ivabradin vermindert (CXCL10 auf 24 ± 8% und CXCL11 auf 44 ± 15% der Kontrollgruppe). Ivabradin verminderte außerdem die Expression von Desmin- und Smoothelin- mRNA im Hinterlaufgewebe (Smoothelin auf 65 ± 5% und Desmin auf 64 ± 6% der Kontrollgruppe).

Zusammenfassend stimuliert die Herzfrequenzreduktion durch Ivabradin das kompensatorische Kollateralarterienwachstum nach einseitigem Verschluss der A. femoralis durch die Modulation der Expression inflammatorischer Zytokine und induziert einen proliferativen Phänotyp vaskulärer glatter Muskelzellen.

## **1.2 Heart Rate Reduction by I<sub>f</sub>-Channel Blockade with Ivabradine Stimulates Collateral Artery Growth in Hypercholesterolemic Atherosclerosis**

Heart rate reduction (HRR) improves endothelial dysfunction, decreases atherogenesis in hypercholesterolemic atherosclerosis and reduces vascular endpoints in patients with coronary artery disease and impaired left – ventricular function. In this work, the effects of HRR by the I<sub>f</sub>-channel inhibitor ivabradine on collateral artery growth in the peripheral circulation were examined.

Treatment with Ivabradine slowed heart rate by 11% in wildtype and 15% in ApoE<sup>-/-</sup> – mice fed a high – cholesterol diet (WTD). After femoral artery ligation, angiographies showed improved collateralization following HRR while capillary density was unaffected. Microsphere perfusion indicated that the restoration of hindlimb perfusion in wildtype mice remained unchanged. However, perfusion restoration in ApoE<sup>-/-</sup> – mice increased from 40.5 ± 4.4 to 60.2 ± 4.0% ligated/unligated hindlimb. Expression of endothelial nitric oxide synthase was enhanced in collateral tissue (177 ± 26% of vehicle) as well as phosphorylation of eNOS (185 ± 17% of vehicle) and NOS-activity (111 ± 3% of vehicle). The expression of classical inflammatory cytokines in circulating mononuclear cells was strongly attenuated upon treatment with ivabradine (TNFα to 8 ± 1%, IL6 to 8 ± 4%, MCP1 to 6 ± 3% and CCR2 to 12 ± 3% of vehicle) but remained unaltered in collateral – containing hindlimb tissue. Cytokines shown to have anti – arteriogenic properties were reduced in hindlimb tissue following HRR (CXCL10 to 24 ± 8% and CXCL11 to 44 ± 15% of vehicle). Ivabradine reduced mRNA – expression of smoothelin and desmin (smoothelin to 65 ± 5% and desmin to 64 ± 6% of vehicle) in collateral – containing tissue.

Heart rate reduction by ivabradine stimulates compensatory collateral artery growth after femoral artery occlusion by modulating inflammatory cytokine gene expression and inducing a more proliferative collateral smooth muscle phenotype.



## 2. Einleitung

### 2.1 Hintergrund

Herz – Kreislauferkrankungen stellen heute in Industriestaaten trotz neuer therapeutischer Konzepte und verbesserter Prävention noch immer die häufigste Todesursache dar. Auch weltweit sind Herz – Kreislauferkrankungen nach Infektionskrankheiten noch vor Krebserkrankungen die häufigste Todesursache. Hierbei spielen vor allem akute und subakute vaskuläre Ereignisse eine gewichtige Rolle (Abb. 1). Insbesondere sind die koronare Herzkrankheit (KHK) und arterielle Hypertonie mit ihren Folgen wie Myokardinfarkt und Schlaganfall zu nennen (Statistisches Bundesamt, 2009; WHO 2008). Auch die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) trägt zur Morbidität der Herz – Kreislauferkrankungen bei.

Kollateralarterienwachstum oder Arteriogenese ist ein natürlicher Mechanismus, um Gewebe nach einer Stenose oder einem Verschluss eines großen Gefäßes vor Ischämie zu bewahren (Carmeliet P, 2000). Dieses Kollateralarterienwachstum zu stimulieren scheint daher eine der vielversprechendsten nichtinvasiven Therapieansätze zur Behandlung der pAVK und der KHK zu sein (Hirsch et al., 2006). Eine wichtige Rolle spielt hierbei nicht das Aussprossen neuer kapillärer Gefäße (Angiogenese), sondern vor allem der Ausbau bestehender arteriolärer Gefäße zu arteriellen Gefäßen, die Arteriogenese (Schirmer et al., 2004). Inflammatorische Signalwege, die die Ansammlung von mononukleären Zellen und die Ausschüttung von Zytokinen beeinflussen, sind einer der Grundpfeiler der Arteriogenese (Lee et al., 2004). Weitere Voraussetzungen sind eine erhaltene Endothelfunktion, die Expression von endothelalem Stickstoffmonoxid und eine optimale Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies (Carmeliet P, 2000; Cai et al., 2004/2; Rocic et al., 2007).

In der Vergangenheit wurde bereits mehrfach versucht, durch die Induktion inflammatorischer und anderer bekanntermaßen arteriogener Signalwege mit Substanzen wie dem *fibroblast growth factor* (FGF), dem *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und *granulocyte – macrophage colony stimulating factor* (GM – CSF)

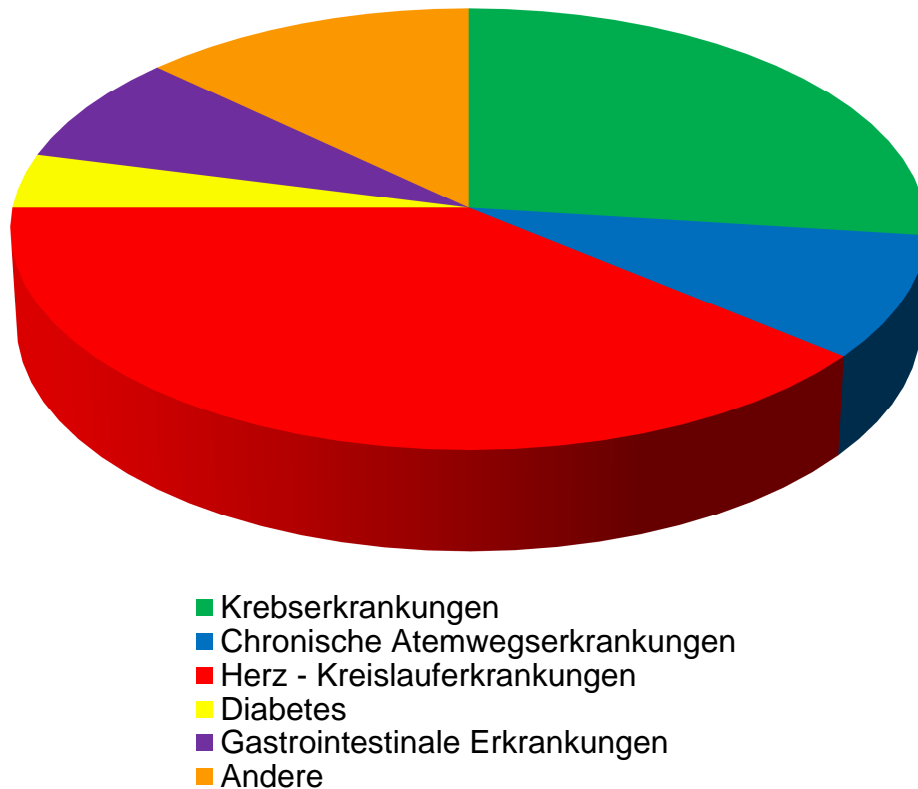


Abb. 1: Todesursachen nicht infektiöser Genese bei unter 70jährigen (WHO "Global status report on noncommunicable diseases 2010"). Herz – Kreislauferkrankungen führen die Statistik mit großem Abstand an.

die Arteriogenese zu stimulieren. Diese Ansätze schienen nach Betrachtung der zugrundeliegenden Mechanismen vielversprechend zu sein, führten aber in vivo entweder nicht zu einer gesteigerten Arteriogeneserate bei gesteigerter Angiogeneserate oder zu schweren Nebenwirkungen wie einer Aggravation der Atherosklerose und einer Plaquedestabilisierung (van Royen et al., 2003). Es ist davon auszugehen, dass Kollateralarterienwachstum einen biochemischen und mechanischen Stimulus benötigt (Lu et al., 2011). Bisher ist noch keine selektive Stimulierung dieses Prozesses ohne signifikante Nebenwirkungen gelungen (Schirmer et al., 2004).

Eine hohe Herzfrequenz wird mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko in Verbindung gebracht werden, da eine hohe Herzfrequenz zu endothelialer Dysfunktion und einer erhöhten Gefäßsteifigkeit führt (Sa Cunha et al., 1997; Beere

et al., 1984; Williams et al., 2009). Diese endotheliale Dysfunktion führt zu Atherosklerose und somit zu KHK und pAVK (Mitchell et al., 2010). Eine erhöhte Herzfrequenz ist ein Marker für ein erhöhtes Risiko kardiovaskulärer Komplikationen sowie auch ein unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Komplikationen (Fox et al., 2008; Böhm et al., 2008; Böhm et al., 2010; Custodis et al., 2010; Reil et al., 2007). Eine Senkung der Herzfrequenz könnte deswegen ein therapeutischer Ansatz zum Erhalt der Endothelfunktion und damit zur Prävention von atherosklerotischen Gefäßveränderungen sein (Reil et al., 2008). Bisher waren Strategien, um die Herzfrequenz zu reduzieren, jedoch auf Betablocker beschränkt, die wiederum negativ inotrope Effekte am Myokard aufweisen. Der Gebrauch von Betablockern vermindert zudem den Blutfluss über Kollateralgefäße, da sie die Vasodilatation dieser Gefäße einschränken. Dies ist besonders bei Patienten mit pAVK problematisch (Traverse et al., 1995; Billinger et al., 2004).

In der kardiovaskulären Medizin wurde daher eine pharmakologische Reduktion der Herzfrequenz durch die Blockade des  $I_f$  – Kanals propagiert (Bucchi et al., 2007; Bois et al., 2007). Der  $I_f$  – Kanal ist ein Kationenkanal aus der Familie der *Hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated* – Kanäle (HCN – Kanäle), der in den spontan aktiven Teilen des Reizleitungssystems des Herzens, also dem Sinusknoten, dem AV – Knoten und dem His – Bündel, vorkommt. Während der Diastole wird der  $I_f$  – Kanal durch Hyperpolarisation aktiviert und verursacht einen gemischten Natrium – und Kaliumstrom. Dieser wiederum triggert eine spontane diastolische Depolarisation des Reizleitungssystems (Baruscotti et al., 2005). Die Aktivität des  $I_f$  – Kanals bestimmt die Sinusfrequenz des Herzens, und seine Hemmung resultiert in einer niedrigeren Herzfrequenz (Liu et al., 2007; Bois et al., 2007). Der  $I_f$  – Kanal – Inhibitor Ivabradin senkt die Herzfrequenz, ohne die myokardiale Kontraktilität zu beeinflussen (Bois et al., 1996). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der Herzfrequenz durch Ivabradin die Endothelfunktion wiederherstellen und oxidativen Stress und Atherosklerose im Modell einer hypercholesterinämischen Maus mit endothelialer Dysfunktion vermindern kann (Custodis et al., 2008; Drouin et al., 2008).

Eine Subgruppenanalyse der vor kurzem durchgeführten BEAUTI<sub>f</sub>UL – Studie zeigte ein geringeres Auftreten vaskulärer Endpunkte bei Patienten mit instabiler Angina pectoris und eingeschränkter linksventrikulärer Funktion bei Ruheherzfrequenzen

> 70 bpm, wenn ihre Herzfrequenz durch Ivabradin gesenkt wurde (Fox et al., 2008/2; Fox et al., 2009). In dieser Subgruppe sank vor allem die Notwendigkeit einer koronaren Revaskularisation signifikant nach Herzfrequenzreduktion. Die kürzlich veröffentlichte SHIfT – Studie beschreibt einen positiven Effekt von Ivabradin auf die Mortalität bei Herzinsuffizienz, insbesondere bei Patienten mit einer erhöhten Herzfrequenz (Swedberg et al., 2010). In beiden Studien wurden kardiovaskuläre Endpunkte anhand von klinischen Parametern betrachtet. Effekte auf zellulärer Ebene, die die zugrundeliegenden Mechanismen erklären könnten, wurden aber nicht beleuchtet. So ist beispielsweise ungeklärt, ob diese Beobachtungen möglicherweise auf einen positiven Effekt einer geringeren Herzfrequenz auf die Arteriogenese oder die Angiogenese zurückzuführen sind (Wright et al., 1981; Zheng et al., 1999).

Die folgende Arbeit hat untersucht, ob eine Herzfrequenzreduktion mit Ivabradin die Gefäßfunktion verbessert und das Kollateralarterienwachstum anregt und somit einen möglichen Behandlungsansatz für Patienten mit KHK oder pAVK darstellt.

## **2.2 Grundlagen der Arteriogenese**

Der Begriff der Arteriogenese wurde geprägt, um die Reifung präexistenter Kollateralgefäße zu großen Arteriolen zu beschreiben und eine Differenzierung zur Angiogenese und der Vaskulogenese zu ermöglichen (Schaper et al., 1999). Angiogenese beschreibt das Aussprossen von kapillären Gefäßen, während mit Vaskulogenese die Neubildung eines vaskulären Netzwerks in der Embryonalentwicklung bezeichnet wird (Buschmann et al., 1999; Carmeliet, 2000). Die Arteriogenese ist ein Mechanismus, der der Perfusionswiederherstellung nach Gefäßokklusion oder – stenose dient. Der Gefäßdurchmesser präexistenter Kollateralarterien kann hierbei um den Faktor 20 steigen (Schaper W, 2009). Die Arteriogenese ist der einzige Gefäßwachstumsprozess, der eine suffiziente Ersatzdurchblutung eines Endorgans gewährleisten kann (Schirmer et al., 2004).

### **2.2.1 Mechanische Faktoren**

Anders als die Angiogenese ist die Arteriogenese ein ischämieunabhängiger Prozess, der von mehreren mechanischen Faktoren beeinflusst wird (van Royen et al., 2001). Sie hängt vor allem vom laminaren Scherstress oder *fluid shear stress* (FSS) ab, welcher durch den Blutfluss innerhalb des Gefäßes auf das Endothel wirkt. Der FSS ist direkt proportional zur Flussgeschwindigkeit und umgekehrt proportional zum Quadrat des Gefäßdurchmessers (Cai et al., 2008). Eine weitere Kraft, die die Arteriogenese beeinflusst, ist die zyklische Belastung auf die Gefäßwand oder *circumferential wall stress* (CWS). Der CWS ist direkt proportional zum Druck und umgekehrt proportional zur Wanddicke und ist wesentlich stärker als der FSS (Lu et al., 2011). Nach der Okklusion eines Gefäßes steigt der Fluss über die präexistenten Kollateralen, wodurch der auf das Endothel wirkende FSS ebenfalls steigt. Dies führt zu einer Endothelaktivierung mit Zellschwellung durch Aktivierung von Calciumkanälen und nachfolgend einer gesteigerten Öffnungswahrscheinlichkeit der Kationenkanäle mit Chlorideinstrom (Buschmann et al., 1999). Zudem wird NO schnell produziert und ausgeschüttet und VEGF induziert (Wessells et al., 2006; Cai et al., 2008; Schaper W, 2009). VEGF kann weitere Endothelzellen aktivieren und führt zu einer gesteigerten Ausschüttung von MCP1.

### **2.2.2 Zytokinfreisetzung**

Nach der Endothelaktivierung wird ein Proteinkomplex hochreguliert, der aus PECAM, E – Cadherin und VEGFR besteht. Einige Stunden nach erster Stimulation des Endothels findet eine Ausschüttung von MCP1, TGFβ und verschiedenen Prostazykline im Sinne einer Entzündungsreaktion statt. Außerdem führt MCP1 zu einer Chemotaxis mononukleärer Zellen aus peripherem Blut und Knochenmark, einer erhöhten Expression des MCP1 – Rezeptors CCR2 und einer Mehrexpression endothelialer Rezeptoren für zirkulierende Monozyten, wie z.B. ICAM – 1 und VCAM. Monozyten wandern daher in das perivaskuläre Gewebe ein und differenzieren zu Makrophagen (Cai et al., 2008). Auch eine basophile Reaktion mit Gewebeinvasion und Differenzierung zu Mastzellen wurde beobachtet (Schaper et al., 2003). Die Makrophagen schütten ihrerseits weiter MCP1 aus. Es kommt zur Chemotaxis weiterer mononukleärer Zellen, sowie zur Sekretion von TNFalpha, bFGF, MMP2,

MMP9, t – PA und einer gesteigerten Expression von *focal adhesion kinase* (FAK), *mitogen activated kinase* (MAPK), und der Integrine  $\alpha 5\beta 1$  und  $\alpha \beta 3$  (Cai et al., 2008). MCP1 löst zudem eine gesteigerte Sekretion von GM – CSF aus, was zu einer längeren Lebensdauer der perivaskulären Makrophagen führt (Buschmann et al., 2001). TGF $\beta$  sorgt durch Hochregulation von bFGF und PDGF zu einer Mitose von glatten Muskelzellen (*smooth muscle cells* = SMCs), während TNF $\alpha$  für die Aufrechterhaltung des notwendigen entzündlichen Milieus sorgt.

Die ausgeschütteten Metallomatrixproteinasen (MMPs) sorgen in Verbindung mit den in Intima und Adventitia herunterregulierten Hemmern der MMPs (*tissue inhibitor of matrix metalloproteinase* = TIMP) für eine Auflösung der extrazellulären Matrix und der Intima. Sie schaffen somit Platz für das Gefäßwachstum und die Migration glatter Gefäßmuskelzellen (Cai et al., 2008).

### **2.2.3 Effekte auf die glatten Muskelzellen (SMCs)**

Insgesamt ändert sich der Subtyp der SMCs im Gefäß von einem kontraktilen zu einem proliferativen Phänotyp. Hierbei wird die Polymerisation von *smooth muscle actin* (SMA) inhibiert, sowie Proteine des kontraktilen Apparates der SMCs herunterreguliert. Dazu gehören Desmin, Myosin und Vimentin. Auch Laminin und Kollagen IV, welche charakteristischerweise im kontraktilen Subtyp der SMCs vorkommen und dort die Proliferation inhibieren, werden typischerweise in proliferierenden SMCs weniger exprimiert. SMA selbst wird nicht herunterreguliert sondern liegt weiter in depolymerisierter Form in der Zelle vor (Schaper et al., 2003; Cai et al., 2004; Yoshida et al., 2005). Gleichzeitig werden einige Marker, die während der Embryonalentwicklung im arteriellen System exprimiert werden, auch im proliferierenden Subtyp der SMCs wieder exprimiert. Dazu gehört vor allem Connexin37, aber auch CARP oder ABRA, die normalerweise im kontraktilen Subtyp der SMCs nicht vorkommen (Cai et al., 2004). CARP spielt eine direkte Rolle bei der Proliferation der SMCs, während ABRA eher an der Hemmung der Polymerisierung des SMA beteiligt ist (Cai et al., 2008). Allerdings werden auch typische Marker adulter vaskulärer SMCs wie Calponin und SM22 weiter exprimiert. Es findet also keine vollständige Dedifferenzierung und embryonale Regression der Zellen statt (Yoshida et al., 2005). Nach Auflösung der Lamina elastica interna und der Phänotypänderung der SMCs wandern diese dort ein und bilden eine Neointima.

Dieser Prozess wird allerdings nur bei Tieren beobachtet, die mindestens die Größe eines Kaninchens haben. Bei Mäusen ist die Bildung einer Neointima aufgrund des kleineren Gefäßdurchmessers offensichtlich nicht notwendig (Schaper et al., 2003). Der eigentlichen Proliferation geht eine Aktivierung der Mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK) und eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren CARP, KLF2 und Egr – 1 (*early growth response protein 1*) voraus (Cai et al., 2008). Während der Proliferationsphase wird weiterhin der typische Proliferationsmarker Ki67 exprimiert. Nach abgeschlossenem Wachstum des Gefäßes findet erneut ein Phänotypwechsel der SMCs zum kontraktilen Subtyp statt.

#### **2.2.4 Die Rolle von Stickstoffmonoxid (NO)**

NO selbst ist zwar dosisabhängig antimitogen, führt aber zu einer gesteigerten Expression von VEGF. VEGF A hat eine schwache Monozytenattraktionswirkung, also auch proarteriogene Effekte, spielt aber vor allem bei der Angiogenese eine entscheidende Rolle (Schaper W, 2009). Frühere Studien haben gezeigt, dass die endotheliale NO – Synthase (eNOS) keinen direkten Effekt auf die Arteriogenese hat, sondern eher für die Vasodilatation während des Kollateralarterienwachstums entscheidend ist (Mees et al., 2007). Allerdings wurde bewiesen, dass die Applikation von L – NAME, welches ein Hemmer der NO – Synthasen ist, die Arteriogenese einschränkt (Eitenmüller et al., 2006; Schaper W, 2009). Dies wurde vor allem auf eine Hemmung der induzierbaren NO – Synthase (iNOS), welche in peripher zirkulierenden mononukleären Zellen vorkommt, zurückgeführt. Eine Hemmung der iNOS der MNCs und die direkt folgende Zelldysfunktion dieser Zellen wurde als Grund für die antiarteriogene Wirkung von L – NAME diskutiert (Cai et al., 2008). Allerdings fanden sich in neuen Studien Hinweise darauf, dass das Vorliegen von NO die entscheidende Voraussetzung für die Arteriogenese darstellt. Hierbei scheint neben der NO – Synthese durch iNOS auch die NO – Synthese durch eNOS eine entscheidende Rolle zu spielen (Troidl et al., 2009).

#### **2.2.5 Hemmung der Arteriogenese**

IFN $\beta$  – abhängige Signalwege hemmen durch Zellzyklusinhibition und antiproliferative Effekte auf glatte Muskelzellen die Arteriogenese (Schirmer et al.,

2008; Schirmer et al., 2010). Es ist außerdem bekannt, dass Monozyten nach Stimulation mit IFN $\beta$  vermehrt CXCL10 und CXCL11 ausschütten (Schirmer et al. 2010). Diesen wurde bereits eine antiangiogene Wirkung zugeschrieben (Angiolillo et al., 1995). Frühere Studien haben außerdem eine Hemmung der Arteriogenese durch nicht-steroidale Antirheumatika (NSAID) über die Hemmung inflammatorischer Reaktionen durch Inhibition der Cyclooxygenase (COX) gezeigt (Hoefler et al., 2005).

## **2.3 Ziele der Arbeit**

Die Auswirkungen einer Herzfrequenzreduktion mittels I<sub>f</sub> – Kanalblockade auf die Arteriogenese sind bisher nicht erforscht. Zwar zeigen frühere Studien einen positiven Einfluss auf die Wiederherstellung der Endothelfunktion durch Ivabradin, aber ein direkter Bezug zum Wachstum kollateralarteriöler Gefäße im peripheren Gefäßsystem konnte nicht hergestellt werden. Dennoch erscheint es plausibel, dass ein Zusammenhang zwischen einer verminderten Herzfrequenz und Arteriogenese bestehen könnte, da eine intakte Endothelfunktion eine Voraussetzung der Arteriogenese ist.

Die folgende Arbeit untersucht daher folgende Punkte:

1. Den Einfluss einer Herzfrequenzreduktion auf die Perfusionswiederherstellung im Mäusehinterlauf
2. Die Effekte von Herzfrequenzreduktion auf zirkulierende mononukleäre Zellen
3. Die lokalen Effekte von Herzfrequenzreduktion im Hinterlaufgewebe nach einseitigem Gefäßverschluss



## 3. Material

### 3.1 Enzyme und Kits

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
10x PCR reaction buffer S	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Absolutely RNA Microprep Kit	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare LTD, Little Chalfont, UK
Aprotinin	Sigma – Aldrich Co. St. Louis, MO, USA
DC Protein Assay Reagent A	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
DC Protein Assay Reagent B	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
DNase I RNase free	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Developer G 153 A	AgfaPhoto GmbH, Leverkusen
Developer G 153 B	AgfaPhoto GmbH, Leverkusen
FluoSpheres® Blood Flow Determination Fluorescent Color Kit #2, polystyrene microspheres, 15 µm	Invitrogen, Eugene, OR, USA
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Leupeptin hemisulfate salt	Sigma – Aldrich Co. St. Louis, MO, USA
Microfil Compound MV – 122	Flow Tech Inc., Carver, MA, USA
NOS detect Assay Kit	Agilent Technologies, Stratagene Products Division, La Jolla, CA, USA
peqGold RNA Pure	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma – Aldrich Co. St. Louis, MO, USA
Power SYBR Green MasterMix	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Prestained SDS – PAGE Standards, Low Range	Bio – Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Proteinase K	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Rapid Fixer G 354	AgfaPhoto GmbH, Leverkusen
RNAasin Ribonuclease inhibitor	Promega Co., Madison, WI, USA
Sensiscript Kit	Qiagen GmbH, Hilden

### 3.2 Geräte

Produkt	Hersteller
Autoklaviergerät Tuttnauer 3850 EL	Tuttnauer Europe B.V., Breda, Niederlande
BP – 2000 Series II Blood Pressure Analysis System	Visitech Systems Inc., Apex, NC, USA
CanoScan LiDE90	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
Druckgeregeltes Perfusionssystem mit Rollerpumpe und SCP Modul für Perfusion mit Mikrosphären – Perfusionslösungen	Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus GmbH, March – Hugstetten
DU 730 Life Science UV / Vis Spectrophotometer	Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA
Eismaschine Scotsman Frimont MF 22	Scotsman Frimont, Milano, Italien
Entwicklermaschine Curix 60	AgfaPhoto GmbH, Leverkusen
FACSCalibur	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
HandyStep electronic Handdispenser	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Homogenisator Potter S	B. Braun AG, Melsungen
Hybaid Mini Oven Hybridisierungsöfen	Thermo Electron Corp., Waltham, MA, USA
Ika Topolino	Ika Werke GmbH & Co. KG, Staufen
IKAMAG RCT	Ika Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Leica CM 1900 Kryostat	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch
Metallblockthermostat HTMR-133	HLC Biotech, Bovenden
Mini – PROTEAN 3 System	Bio – Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Mikroskope: Nikon Eclipse E600 Nikon DXM1200F Nikon SMZ800 mit KL 1500 LCD Kaltlichtquelle	Nikon GmbH, Düsseldorf Nikon GmbH, Düsseldorf Nikon GmbH, Düsseldorf Schott AG, Mainz
Mini – PROTEAN 3 System	Bio – Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
pH-Meter 526	WTW GmbH, Weilheim
Pipettierhilfe Pipetus Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Power Pac 200 Power Supply	Bio – Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Px2 Thermocycler	Thermo Electron Corp., Waltham, MA, USA
Röntgenkassette 24 x 30cm	Dr. Goos-Suprema, Heidelberg

Schüttelwasserbad Typ 1086	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwendel
StepOne Plus Real Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Szintillationszähler Wallac 1400 DAS	Wallac Scintillation Products, Wallac, Turku, Finnland
Trans – Blot SD semi – dry transfer cell	Bio – Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Überkopfschüttler REAX 2	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Ultraschallreiniger Sonorex RK 31 0,9l	Bandelin electronics, Berlin
Vortex VV3	VWR International, Darmstadt
Waagen:	
ALC-Series 0.0001g Analytical Balances	Acculab UK, Edgewood, NY, USA
VIC-Series 0.01g Precision Balances	Acculab UK, Edgewood, NY, USA
Zentrifugen:	
Heraeus Biofuge Pico	Thermo Electron Corp., Waltham, MA, USA
Heraeus Labofuge 400R	Thermo Electron Corp., Waltham, MA, USA
Kühlzentrifuge 1 K 15	SIGMA Laborzentrifugen, Osterode am Harz
Napco 2019R refrigerated microcentrifuge	Napco, Winchester, VA, USA

### 3.3 Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Hersteller
0,9% NaCl – Lösung	B. Braun AG, Melsungen
2 – Mercaptoethanol	Sigma – Aldrich Co. St. Louis, MO, USA
2 – Methylbutan	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
2 – Propanol	Merck KGaA, Darmstadt
30% Acrylamidmix	BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA
Adrekar Injektionslösung (Adenosin)	Sanofi – Aventis GmbH, Frankfurt (Main)
Algezid II	AgfaPhoto GmbH, Leverkusen
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Aqua ad injectabilia (Ampuwa)	B. Braun AG, Melsungen
Aqua dest.	B. Braun AG, Melsungen
[3H] – Arginin – monohydrochlorid (1 µCi / µl)	Amersham, Arlington Heights, IL, USA
Biocoll Separating Solution	Biochrom AG, Berlin
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt

Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma – Aldrich Co. St. Louis, MO, USA
Chloroform	Sigma – Aldrich Co. St. Louis, MO, USA
di – Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
Dihydroethidium (DHE)	Invitrogen, Eugene, OR, USA
Dikaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	VWR International GmbH, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma – Aldrich Co. St. Louis, MO, USA
Entellan	Merck KGaA, Darmstadt
Eosin (gelblich)	Merck KGaA, Darmstadt
Essigsäure 100% (Eisessig)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol (reinst, zur Analyse)	Merck KGaA, Darmstadt
FACS Clean	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
FACS Flow	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
FACS Rinse	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Fettfutter (21% fat, 19.5% casein, 1.25% cholesterol)	ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Fluorescent Mounting Medium	Dako Cytomation, Glostrup, DK
Glucose	Sigma – Aldrich Co. St. Louis, MO, USA
Glycerol (reinst)	Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt
Goat Serum	Sigma – Aldrich Co. St. Louis, MO, USA
Hämatoxylin	Merck KGaA, Darmstadt
Heparin – Na Braun, 10000 IE / ml	B.Braun AG, Melsungen
HEPES – Na	Merck KGaA, Darmstadt
Igepal CA – 630	Sigma – Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Ivabradin	Servier, Suresnes, France
Kalialaun	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
KCl	Merck KGaA, Darmstadt
Ketavet 10% (Ketamin)	Pfizer Pharma GmbH, Berlin
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
N <sub>2</sub> , flüssig	Air Liquide, Paris, FR
NaCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Na – Azid	Sigma – Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
NADPH	Sigma – Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	VWR International GmbH, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn
Rimadyl Injektionslösung (Carprofen) 5%	Pfizer Pharma GmbH, Berlin
Rompun (Xylazin) 2%	Bayer AG, Leverkusen
Rotiszint Szintillationscocktail	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Sucofin Magermilchpulver	TSI GmbH & Co. KG, Zeven
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma – Aldrich Co. St. Louis, MO, USA
Tissue freezing medium	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch
tri – Natriumcitrat	Merck KGaA, Darmstadt
Tris – (hydroxymethyl) aminomethan	Merck KGaA, Darmstadt
Tris – HCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tween 20	Sigma – Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Tween 80	Sigma – Aldrich Co., St. Louis, MO, USA
Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA

### 3.4 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
24 G Venenverweilkatheter mit Flügeln	BD Medical, Franklin Lakes, NJ, USA
6.0 Seide (geflochten)	Feuerstein GmbH, Berlin
Amersham Hyperfilm MP	GE Healthcare LTD, Little Chalfont, UK
Combitips (1,25 ml)	VWR International GmbH, Darmstadt
Dako Pen	Dako Cytomation, Glostrup, DK
Deckgläser 24 x 60 mm	VWR International GmbH, Darmstadt
Einwegskalpelle	Aeskulap AG, Tuttlingen
Extra Thick Filter Paper	Bio – Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Konische Polypropylenröhrchen (15ml, 50ml)	BD Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
MicroAmp 96 well plates	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Mikrotomklingen S35	Feather Safety Razor Co. LTD. Medical Division, Osaka, JP
Objektträgerkästen	VWR International GmbH, Darmstadt
Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Pipettenspitzen (weiß, gelb, blau)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Polysine slides	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Reagiergefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Trans – Blot Transfer Medium (pure nitrocellulose membrane, 0,2 µm)	Bio – Rad Laboratories, Hercules, CA, US

### 3.5 Primer (alle von Eurofins MWG Operon, Ebersberg)

Target	Primer
18S	fwd: TCA ACA CGG GAA ACC TCA C rev: ACC AGA CAA ATC GCT CCA C
bFGF	fwd: GGC TGC TGG CTT CTA AGT GT rev: CCG TTT TGG ATC CGA GTT TA
CCR2	fwd: AGA GAG CTG CAG CAA AAA GG rev: GGA AAG AGG CAG TTG CAA AG
Cofilin (Cfl2)	fwd: TCT CAG CCA CAG TTC CTT CA rev: TCC GGC TAA TAG CAG AGA GC
Connexin 37	fwd: TGG AAT ACC TGG AGC CTT TG rev: AGG AGA AGT GGG GTG TGA TG
Desmin	fwd: CCC TTT GTG GTC TTC ATG CT rev: CCC TCT CTG GTA CCC TCT CC
IL6	fwd: TCC TAC CCC AAT TTC CAA TG rev: ACC ACA GTG AGG AAT GTC CA
KLF2	fwd: ACC AAG AGC TCG CAC CTA AA rev: AGT GGC ACT GAA AGG GTC TG
ABRA	fwd: TGA TAA AGT CGT GGG CAT CC rev: AGC TTG CCT TGG AGC TTG TA
CXCL10	fwd: CCC ACG TGT TGA GAT CAT TG rev: CAC TGG GTA AAG GGG AGT GA
CXCL11	fwd: AAG TCA CGT GCA CAC TCC AC rev: CGT GTG CCT CGT GAT ATT TG
MCP1	fwd: TGC CCT AAG GTC TTC AGC AC rev: AAA ATG GAT CCA CAC CTT GC
Smoothelin	fwd: GAG GAG CGC AAG CTG ATC A rev: GGC AGC CTT AAT CTC CTG AGC
TNF $\alpha$	fwd: GAT TAT GGC TCA GGG TCC AA rev: CTC CCT TTG CAG AAC TCA GG

### 3.6 Antikörper für Immunhistochemie

#### 3.6.1 Primärantikörper

Produkt	Hersteller
Monoclonal anti – $\alpha$ – smooth muscle actin – FITC antibody, Clone 1A4	Sigma – Aldrich Co. St. Louis, MO, USA
Purified monoclonal rat anti – mouse macrophages / monocytes antibody, Clone MOMA – 2	AbD Serotec, Kidlington, UK

Purified Rat Anti-Mouse CD31 antibody, Clone MEC13.3	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
Monoclonal rabbit anti – mouse Desmin antibody, Clone Y266	Abcam Inc., Cambridge, MA, USA
Polyclonal rabbit anti – Smoothelin antibody	Abcam Inc., Cambridge, MA, USA

### **3.6.2 Sekundärantikörper**

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Alexa Fluor® 546 goat anti – rat IgG	Invitrogen, Eugene, OR, USA
Goat anti – rabbit – TRITC antibody, IgG F(ab)2 – Fragment	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA
Goat anti – rat – TRITC antibody, IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA

## **3.7 Antikörper für Westernblot-Analyse**

### **3.7.1 Primärantikörper**

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
eNOS / NOS – III rabbit – anti – mouse	Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen
p – eNOS (Ser1177) mouse – anti – mouse	Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen
GAPDH mouse – anti – mouse	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA

### **3.7.2 Sekundärantikörper**

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Goat anti – mouse IgG (H+L) HRP conjugate	Bio – Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Anti – rabbit IgG (whole molecule) peroxidase conjugate	Sigma – Aldrich Co. St. Louis, MO, USA

### 3.8 Verwendete Lösungen

Lösung / Puffer	Zusammensetzung
Laufgel für Western Blot 8%	9,3 ml Aqua dest. 6,7 ml 30% Acrylamid – Mix 5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8) 0,2 ml 10% SDS 0,2 ml 10% Ammonium Persulfat 0,012 ml TEMED
Sammelgel für Western Blot	3,4 ml Aqua dest. 0,83 ml 30% Acrylamid – Mix 0,63 ml 1,0 M Tris (pH 6,8) 0,05 ml 10% SDS 0,05 ml 10% Ammonium Persulfat 0,005 ml TEMED
10% SDS	50 g Natriumdodecylsulfat (SDS) 500 ml Aqua dest.
Lysepuffer für Western Blot	5 ml 1M Tris (pH 6,8) 20 ml 10% SDS 10 ml Glycerol 15 ml Aqua dest. 50 µl PMSF 50 µl Leupeptin 35 µl Aprotinin
Stacking Gel Buffer	6,06 g Tris - (hydroxymethyl) aminomethan 4 ml 10% SDS ad 100 ml mit Aqua dest. pH 6,8
Ladepuffer für Western Blot	2 ml Glycerol 2 ml 10% SDS 2,5 ml Stacking Gel Buffer 3 ml Aqua dest. Bromphenolblau 5% 1M DTT
10x Elektrophoresepuffer	720 g Glycin 151,5 g Tris - (hydroxymethyl) aminomethan 50 g SDS ad 5 l mit Aqua dest.
Transferpuffer	2,9 g Tris - (hydroxymethyl) aminomethan 14,5 g Glycin 200 ml Methanol ad 1 l mit Aqua dest. pH 8,3



1 M Tris	60,6 g Tris - (hydroxymethyl) aminomethan 500 ml Ampuwa pH 6,8
1,5 M Tris	90,9 g Tris – (hydroxymethyl) aminomethan 500 ml Ampuwa pH 8,8
10x PBS (- Tween)	80 g NaCl 2 g KCl 2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 14,4 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ad 1 l mit Aqua dest. pH 7,4 (10 ml Tween 20)
Stripping Buffer	31,25 ml 1 M Tris - HCl pH 6,8 10g SDS 3,5 ml β - Mercaptoethanol
Eosin (gelblich)	100 ml Aqua dest. 2 g Eosin (gelblich) 1 – 2 Tropfen Essigsäure (Eisessig)
Hämatoxylin nach Ehrlich	2 g Hämatoxylin 100 ml 96% Isopropanol 100 ml Aqua dest. 100 ml Glycerin 10 ml Essigsäure (Eisessig) 3 g Kalialaun Reifung 2 – 4 Wochen
4% PFA	4 g Paraformaldehyd 100 ml 1x PBS
0,5% Goat – Serum	9,95 ml PBS 50 µl Goat – Serum
KH – Puffer	2,893 g NaCl 0,175 g KCl 0,137 g CaCl <sub>2</sub> 0,148 g MgSO <sub>4</sub> 2,603 g HEPES – Na 0,090 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,05 g NaHCO <sub>3</sub> 500 ml Ampuwa 1 g Glucose pH 7,4
Perfusionspuffer	15 mg Adenosin 994 ml 0,9% NaCl 1 ml Tween 20

Lysepuffer für Gewebe	10 ml 10% SDS 0,5 g Na – Azid 800µl Tween 80 5 ml 1M Tris (pH 8,0) 85 ml Aqua dest. 33 mg Proteinase K
DNase 1x Master Mix	6 µl Ampuwa 2 µl 10x PCR buffer S 2 µl DNase I
Master Mix für qRT – PCR	13,5 µl Ampuwa 7,5 µl Power SYBR Green Master Mix 0,5 µl fwd Primer 0,5 µl rev Primer
Sensiscript Master Mix	2 µl RT Buffer 2 µl dNTP Mix 2 µl Random Primer 1 µl RNasin 1 µl Sensiscript RT
Applied RT Master Mix	2 µl 10x RT Buffer 0,8 µl 25x dNTP Mix (100 mM) 2 µl 10x RT Random Primers 1 µl MultiScribe Reverse Transcriptase 1 µl RNase Inhibitor 3,2 µl Ampuwa

### 3.9 Software

Zur Auswertung wurden ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), LabWorks (UVP, LLC, Upland, CA, USA), Lucia G Version 4.60 (Laboratory Imaging, s.r.o., Prag, CZ), sowie Photoshop 7 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) verwendet. Statistische Analysen wurden mit IBM SPSS Statistics Version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt.

## 4. Methoden

### 4.1 Perfusionsmessungen

#### 4.1.1 Modellbeschreibung

Die verwendeten Versuchstiere waren ApoE – *knockout* – Mäuse; die Kontrollgruppe bestand aus Wildtyp – (WT) C57Bl/6 – Mäusen. Die Inaktivierung des ApoE – Gens führt zu einem erhöhten Plasmacholesterinspiegel und einem veränderten Lipoproteinprofil, was zu einer schnellen Entwicklung atheromatöser Veränderungen in Gefäßen führt. Daher ist die ApoE<sup>-/-</sup> – Maus ein viel verwendetes Modell zur Atherosklerose. Durch zusätzliche Gabe von Fettfutter (*western type diet* = WTD, 21% Fett, 19.5% Casein, 1.25% Cholesterin) wurde die Atheroskleroserate weiterhin beschleunigt, sodass in einer sechswöchigen Fütterungsphase eine deutliche Atherosklerose erzeugt werden konnte.

Das Modell der Ligatur der Arteria femoralis im Mäusehinterlauf stellt ein etabliertes Modell in der vaskulären Forschung dar. Insbesondere Mechanismen der Arteriogenese am Beispiel der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) werden daran erforscht. Durch die Ligatur der rechten A. femoralis distal des Abgangs der A. profunda femoris wird einseitig ein Gefäßverschluss hervorgerufen, wobei auf Grund präexistenter kollateralarteriöler Anastomosen nur eine unwesentliche Ischämie der unteren Extremität induziert wird (Deindl et al., 2001). Durch den entstehenden Druckgradienten steigt der Fluss in den präexistenten Kollateralgefäßen und damit der laminare Scherstress auf die Gefäßwand an.

Die Messung des Blutflusses kann in der Folge in Form einer Laser – Doppler Pulsmessung oder einer Perfusionsmessung mit Hilfe von Mikrosphären durchgeführt werden. Letzteres stellt zurzeit den Goldstandard zur Bestimmung der Perfusionswiederherstellung im Mäusehinterlaufmodell dar, da sich in früheren Studien gezeigt hat, dass sie wesentlich präziser ist als die bisher verwendete Laser – Doppler Pulsmessung (Hoefler et al. 2002). Dies ist darauf zurückzuführen, dass einerseits bei der Laser – Doppler Pulsmessung keine valide Aussage über den Fluss in den tiefen Gewebeschichten getroffen werden kann und zum anderen bei

der Mikrosphärenperfusion unter maximaler Vasodilatation der Fluss unabhängig vom Gefäßtonus bestimmt werden kann.

Zur Perfusion mit Mikrosphären wird nach 7 Tagen ein Katheter antegrad in die Aorta abdominalis eingeführt und Mikrosphären mit konstantem Druck unter maximaler Vasodilatation infundiert. Die Mikrosphären verbleiben durch ihre Größe von 15µm im Kapillarbett des Unterschenkels und können nach Extraktion des Muskelgewebes mit anschließender Lyse durch FACS – Analyse nachgewiesen werden.

Die relative Perfusionswiederherstellung kann anschließend anhand des Vergleichs zwischen ligierter und unligierter Seite berechnet werden.

#### **4.1.2 Behandlung**

Zunächst wurden männliche C57Bl/6 – Mäuse in eine Behandlungs – und eine Placebogruppe eingeteilt. Über einen Zeitraum von 6 Wochen wurde die Behandlungsgruppe mit Ivabradin 10 mg / kg KG / d p.o. im Trinkwasser behandelt, entsprechend 0,067g Ivabradin / 500 ml Trinkwasser. Die Placebogruppe erhielt reines Trinkwasser ohne Zusätze. Während dieser Behandlungsphase wurden bei beiden Gruppen Herzfrequenz und Blutdruck wöchentlich überprüft. Die Messung erfolgte nichtinvasiv nach Anlegen einer Blutdruckmanschette am Schwanz und Messung des Verschlussdrucks durch Infrarotsensoren an der Schwanzwurzel (*Abb. 2*). Desweiteren wurden männliche ApoE<sup>-/-</sup> – Mäuse verwendet. Diese Mäuse erhielten über 6 Wochen Fettfutter, um in Verbindung mit der ApoE – Defizienz eine endotheliale Dysfunktion hervorzurufen. Weiterhin wurden auch diese Mäuse in eine Behandlungs – und eine Placebogruppe eingeteilt und die Behandlungsgruppe mit Ivabradin in gleicher Dosierung behandelt. Eine Herzfrequenz – und Blutdruckkontrolle fand ebenfalls statt.

#### **4.1.3 Narkose**

Zur Narkotisierung der Mäuse während der Eingriffe wurden 10 mg Xylazin entsprechend 0,5 ml Injektionslösung mit 200 mg Ketamin entsprechend 2 ml Injektionslösung gemischt und 1:5 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Für die meisten Eingriffe wurden 0,3 ml dieser Lösung entsprechend 10 mg / kg KG

Xylazin und 200 mg / kg KG Ketamin intraperitoneal injiziert. Für Prozeduren, denen eine Blutentnahme folgte, wurden der Narkose 100 IE Heparin / ml zugesetzt.



Abb. 2: Gerät zur Herzfrequenz – und Blutdruckmessung bei Mäusen.  
Die Messung erfolgt mit Hilfe einer Manschette und eines Infrarotsensors an der Schwanzwurzel.

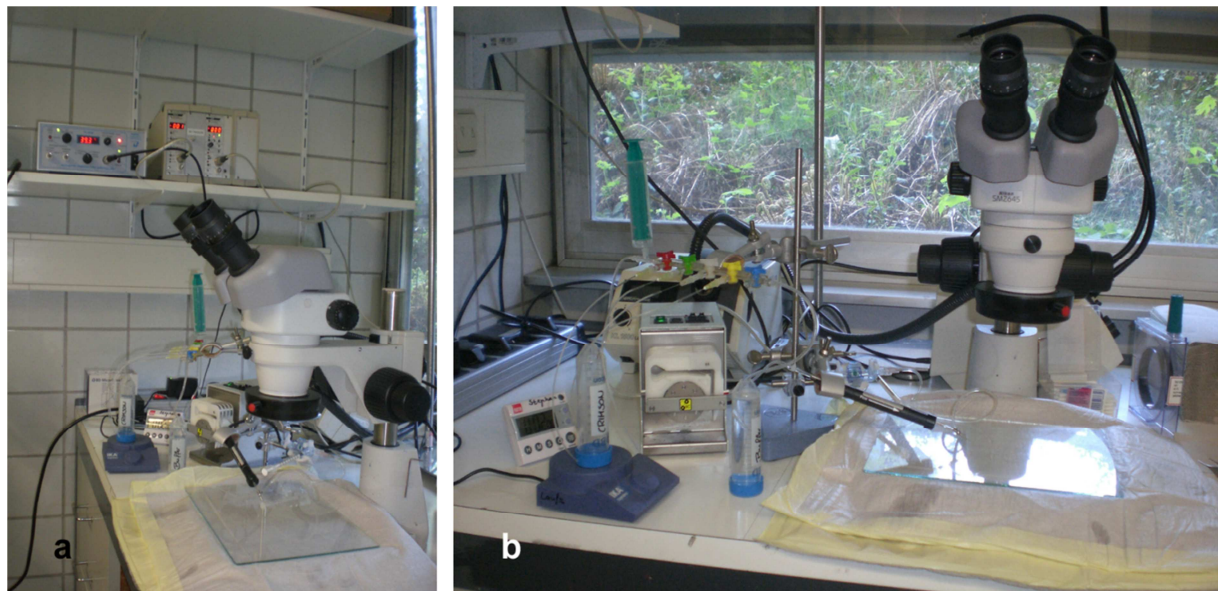


Abb. 3: Ansichten des Perfusionsarbeitsplatzes. Auf dem Regal sind die Steuer – und Messeinheiten der Pumpe und des Durchlauferhitzers zu erkennen (a). Neben dem Operationsmikroskop befinden sich ein kleiner Magnetrührer, eine Pumpe und eine Kaltlichtquelle (b; von vorne nach hinten). In der Mitte ist der Durchlauferhitzer mit Katheterspitze zu erkennen.

#### 4.1.4 Ligatur der rechten A. femoralis

Nach erfolgter Narkose wurde ein kleiner Hautschnitt an der Oberschenkelinnenseite über der A. femoralis durchgeführt. Im weiteren Operationsverlauf wurde die A. femoralis mit einer Pinzette freipräpariert und von der V. femoralis getrennt. Die Pinzette wurde distal des Abgangs der A. profunda femoris unter der Arterie hindurchgeführt, um einen Faden (6.0 geflochtene Seide) um das gesamte Gefäß legen zu können (Abb. 4 a). Anschließend wurde eine Schlinge gebildet und vorsichtig zugezogen (Abb. 4 c). Um einen möglichst vollständigen, sicheren Verschluss des Gefäßes zu erreichen, wurde eine zweite Ligatur knapp distal des ersten Knotens durchgeführt (Abb. 4 d). Abschließend erfolgte eine Hautnaht und eine intraperitoneale Verabreichung von 10mg Carprofen entsprechend 0,2 ml Injektionslösung zur Behandlung postoperativer Schmerzen.

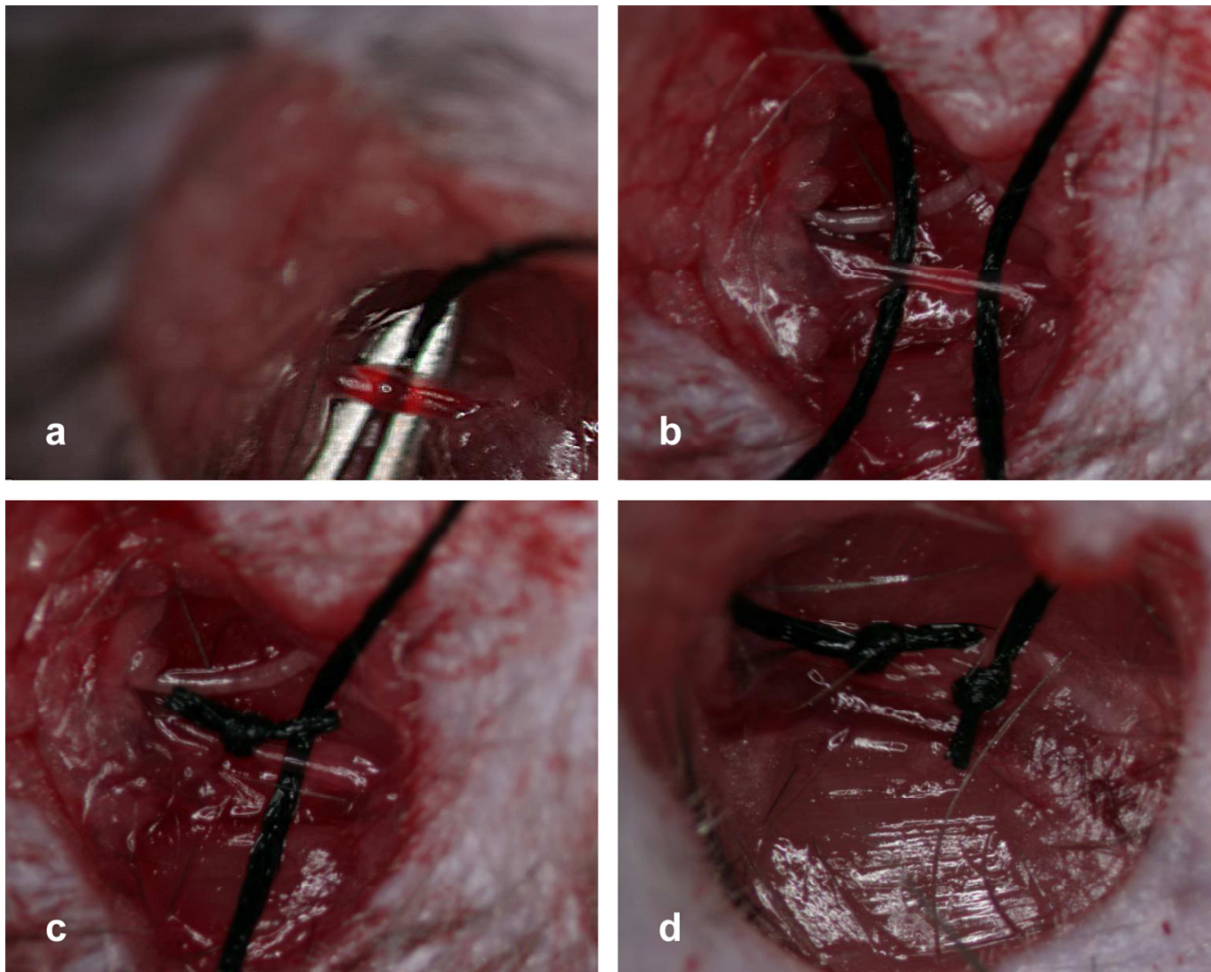
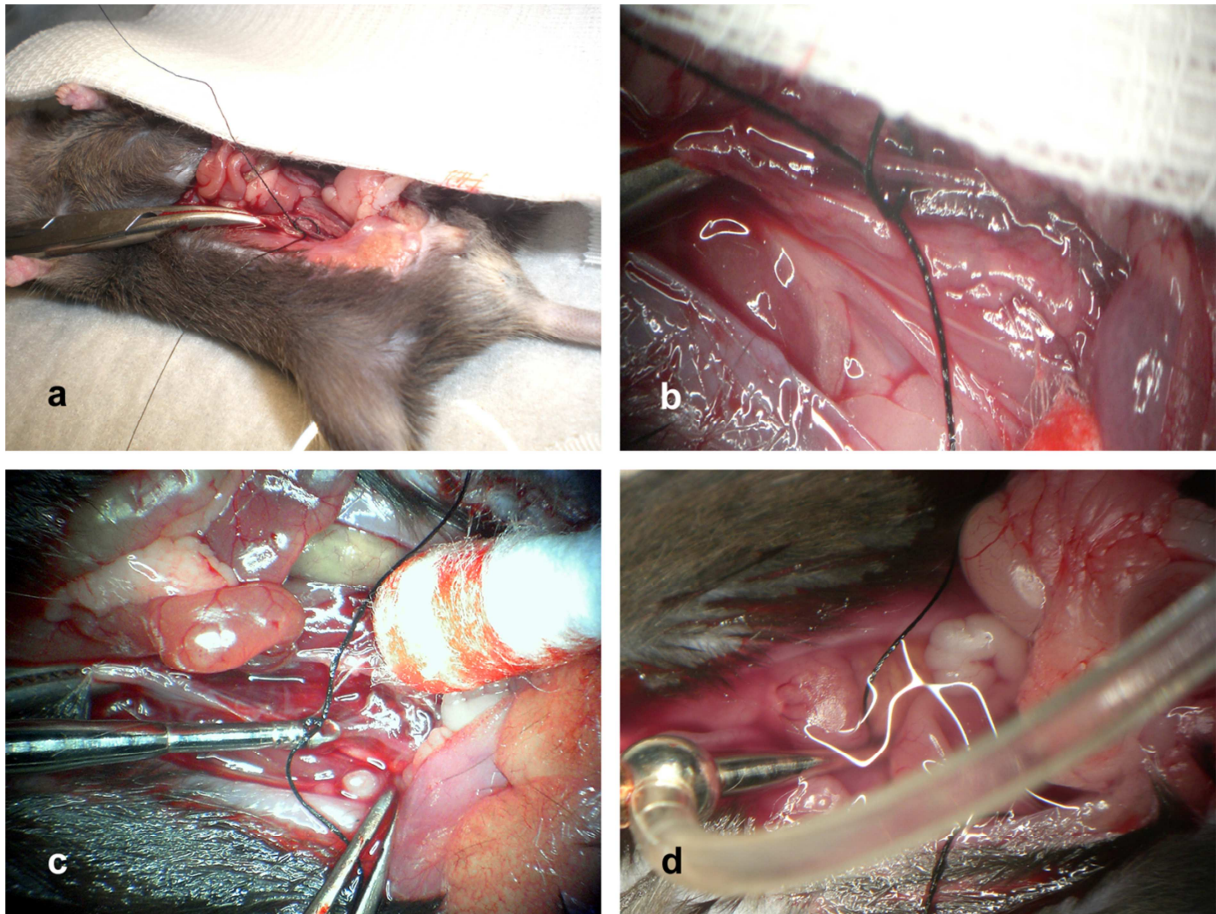


Abb. 4: Nach Aufsuchen der A. femoralis werden mit der Pinzette zwei Fäden zur doppelten Ligatur unter dem Gefäß durchgezogen (a, b). Diese werden vorsichtig verknotet und verschließen die Arterie (c, d). Die Vene wird nicht unterbunden (d; unterhalb der beiden Knoten).

#### **4.1.5 Perfusion mit Mikrosphären**

Nach tiefer Narkotisierung erfolgte ein medialer Einschnitt durch die Bauchdecke. Mit Hilfe von Wattestäbchen wurden vorsichtig die Baueingeweide zur Seite geschoben, bis V. cava inferior und Aorta abdominalis zu sehen waren (*Abb. 5 a*). Dann wurde mit einer Pinzette das Bindegewebe über der Aorta entfernt und die Aorta vorsichtig von der V. cava getrennt. Danach wurde ein Faden (6.0 geflochtene Seide) unter der Aorta hindurchgezogen und ein Knoten vorgelegt, aber noch nicht zugezogen (*Abb. 5 b*). Mit einer Klemme wurden dann die großen Gefäße oberhalb der Nierenarterien abgeklemmt. Die Aorta wurde mit der Pinzette gut festgehalten und mit einer kleinen Gefäßschere eröffnet. In das entstandene Loch wurde nun der Katheter in die Aorta vorgeschoben und mit dem Knoten fixiert (*Abb. 5 c*). Zu beachten war, dass der Katheter immer proximal der Aortenbifurkation liegen musste, um eine einseitige Perfusion zu verhindern. Die V. cava wurde bei liegendem Katheter mit zwei Pinzetten eröffnet und der Katheter mit Perfusionspuffer gefüllt. Dann wurden der Perfusionsschlauch und der Druckabnehmer an den Katheter angeschlossen und 30 s lang mit Perfusionspuffer perfundiert, der mittels eines Durchlauferhitzers auf 38°C vorgewärmt wurde. Anschließend wurde eine zweiminütige Perfusion mit der ersten der vier verschiedenen Mikrosphärensuspensionen durchgeführt (*Abb. 5 d*). Für verschiedene Druckstufen wurden hierbei unterschiedlich fluoreszierende Mikrosphären verwendet. So wurde bei 60 mmHg mit purpurnen Mikrosphären (*crimson*; Absorptionsmaximum 612 nm / Emissionsmaximum 638 nm), bei 70 mmHg mit roten Mikrosphären (*red*; Absorptionsmaximum 570 nm / Emissionsmaximum 598 nm), bei 80 mmHg mit orangefarbenen Mikrosphären (*orange*; Absorptionsmaximum 534 nm / Emissionsmaximum 554 nm) und bei 90 mmHg mit blaugrünen Mikrosphären (*blue – green*; Absorptionsmaximum 427 nm / Emissionsmaximum 468 nm) perfundiert. Die Konzentration der Suspensionen betrug in jedem Fall 2500 / ml. Die Mikrosphärensuspension wurde während der Perfusion dauernd auf einem kleinen Magnetrührer durchmischt, um ein Verklumpen der Mikrosphären zu verhindern und eine gleichmäßige Verteilung der Mikrosphären im Perfusionspuffer zu gewährleisten. Der Druck wurde je um 10 mmHg gesteigert und jeweils eine andere Farbe der Mikrosphären gewählt. Zwischen den einzelnen Druckstufen wurde wiederholt 30 s lang mit Perfusionspuffer ohne Mikrosphären perfundiert. Durch die Kopplung einer drucksteuerbaren Pumpe und eines Druckabnehmers

konnte hierbei ein konstanter Perfusionsdruck gewährleistet werden. Da die maximale Förderleistung der verwendeten Pumpe von 20 ml / min bei verschiedenen Versuchstieren bereits bei submaximalem Druck erreicht wurde, wurde teilweise nicht mit dem gewünschten Druck, sondern mit einem konstanten Fluss von 20 ml / min perfundiert.



*Abb. 5:* Nach Eröffnen der Bauchdecke wird die Aorta abdominalis aufgesucht und ein noch offener Knoten vorgelegt (a, b). Der Katheter wird in die Aorta eingeführt und festgeknotet (c). Bei sicherer Lage des Katheters erfolgt dann die druckkontrollierte Perfusion (d).



#### **4.1.6 Gewebeentnahme**

Nach der Perfusion wurde die Maus getötet und der Katheter entfernt. Anschließend wurde das gesamte Muskelgewebe beider Unterschenkel separat mit Hilfe einer chirurgischen Pinzette entfernt. Der Muskel wurde gewogen und dann mit dem Skalpell zerkleinert. Dem Lysepuffer wurden Proteinase K (1 mg / 3 ml) und scharlachrote Mikrosphären (*scarlet*; Absorptionsmaximum 651 nm / Emissionsmaximum 680 nm) in einer Konzentration von 5000 / ml als Referenz zugegeben. Das zerkleinerte Gewebe jedes Beines wurde einzeln in ein frisches 5 ml FACS – Röhrchen überführt und mit je 3 ml Lysepuffer gemischt. Die anschließende Lyse erfolgte 7 d bei 50°C im Wasserbad. Während dieser Zeit wurden die FACS – Röhrchen regelmäßig geschüttelt. Nach abgeschlossener Lyse wurden die Röhrchen 30 min lang bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Das mikrosphärenreiche Pellet wurde anschließend mit 250 µl PBS resuspendiert.

#### **4.1.7 Prinzip des Fluorescence activated cell sorting (FACS)**

Zur Durchflusszytometrie werden Zellen in einem Medium suspendiert, vom Zytometer angesaugt und passieren dann in einer Kapillare einen oder mehrere Laserstrahlen. Die Zellen streuen einen Teil des Lichts, das durch mehrere Detektoren nachgewiesen werden kann. Hierbei entsteht durch Beugung des Lichts im flachen Winkel ein sogenannter *forward scatter* (fsc), der eine Bestimmung des Volumens der Zelle zulässt, und durch Brechung des Lichts im rechten Winkel der sogenannte *side scatter* (ssc), der Schlüsse auf die Granularität der Zelle zulässt. Zudem sind die Sensoren des Zytometers durch Verwendung verschiedener Filter in der Lage, verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe zu detektieren. Zelluläre Oberflächenantigene können mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert werden um sie im FACS quantitativ nachzuweisen. Auch ermöglicht dieses Verfahren die von uns gewünschte Detektion verschiedenfarbiger fluoreszierender Mikrosphären nach druckkontrollierter Perfusion.

#### **4.1.8 FACS – Analyse**

Die resuspendierten Mikrosphären wurden anschließend im Durchflusszytometer gemessen. Zuvor waren in mehreren vorherigen Sitzungen *Thresholds* und *Gates* so eingestellt worden, dass eine möglichst vollständige Detektion aller Mikrosphären erreicht wurde. Die gemessene Menge der einzelnen Mikrosphären wurde dann in Bezug zur Referenz gesetzt und zwischen rechtem und linkem Bein, also ligierter und unligierter Seite, verglichen.

#### **4.1.9 Angiographien**

Zur besseren optischen Darstellung wurde in Folge eine Perfusion der Gefäße der unteren Extremität mit MicroFil – Compound durchgeführt. Der MicroFil – Compound ist ein aushärtendes, röntgendichtes Kontrastmittel und ermöglicht post mortem die Präparation auch kleinster Gefäße.

Für die Durchführung der Perfusion wurde eine 24GA – Venenverweilkanüle entsprechend des Vorgehens bei der Mikrosphärenperfusion in die Aorta abdominalis proximal der Aortenbifurkation eingeführt und mit Nahtmaterial fixiert. Zusätzlich wurde die Haut über den großen Beingefäßen eröffnet, um in der Maus die Füllung mit dem Kontrastmittel beobachten zu können. Mit der Pumpe wurde zunächst 2 min lang mit konstantem Druck vorgewärmter Perfusionspuffer in die Maus geleitet. Danach wurden 1 ml Compound, 1 ml Diluent und 0,2 ml Curing Agent in einem kleinen Becherglas zur anschließenden Infusion mit Hilfe des Magnetrührers gründlich vermischt. Die Perfusion erfolgte direkt im Anschluss mit konstantem Druck unter Sichtkontrolle. Sobald die arterielle Füllungsphase abgeschlossen war, wurde umgehend die Pumpe abgeschaltet um eine venöse Füllung zu vermeiden. Dies diente vor allem dazu, keinen irrtümlicherweise scheinbar größeren Gefäßdurchmesser zu zeigen.

Abschließend wurde die Maus durch zervikale Dislokation getötet und bis zur Präparation bei -20°C gelagert. Die Eigenschaften des Kontrastmittels wurden hierbei nicht beeinträchtigt. Die Präparation erfolgte unter mikroskopischer Sicht.

## **4.2 Immunhistochemie**

### **4.2.1 Probengewinnung für Immunhistochemie**

Männliche ApoE – defiziente Mäuse (ApoE<sup>-/-</sup>) wurden gleichmäßig in eine Placebo – und eine Behandlungsgruppe aufgeteilt (n = 5 je Gruppe). Beide Gruppen erhielten Fettfutter, der Behandlungsgruppe wurden zusätzlich 10 mg / kg KG / d Ivabradin über das Trinkwasser verabreicht. Währenddessen wurden regelmäßig der Blutdruck und die Pulsfrequenz der Individuen bestimmt, um eine Frequenzreduktion infolge der Behandlung nachweisen zu können.

Nach einem Zeitraum von 6 Wochen wurde jeweils die rechte A. femoralis distal des Abgangs der A. profunda femoris mit chirurgischem Nahtmaterial (6.0 geflochtene Seide) in Narkose unterbunden. Eine weitere Woche später wurden die Tiere durch eine erhöhte Dosis der Injektionsnarkose getötet. Auf beiden Seiten wurden dann der M. quadriceps femoris, Teile des M. adductor magnus, sowie der M. triceps surae entnommen und auf Trockeneis in Einbettmedium eingebettet.

Die weitere Lagerung erfolgte bei -80°C.

Zur Färbung und Auswertung der Schnitte wurden 5 µm dicke Schnitte am Kryostat (Leica, Bensheim) angefertigt; das geschnittene Gewebe wurde auf Polysin – beschichtete Objektträger aufgebracht. Um sicherzugehen, dass nicht immer die gleiche Zelle angeschnitten wurde, wurde darauf geachtet, dass zwischen Schnitten auf dem gleichen Objektträger immer ein Abstand von 20 µm bestand.

Die fertigen Schnitte wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C in Objektträgerkästen aufbewahrt.

### **4.2.2 Hämatoxylin – Eosin – Färbung**

Vor der Durchführung immunhistochemischer Methoden wurden zur Evaluation der Gewebequalität zunächst Präparate jedes Individuums mit Hämatoxylin und Eosin eingefärbt (Abb. 6).

Hierzu wurden die Objektträger zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe von 96%igem, 90%igem und 70%igem Isopropanol je 2 min präpariert. Anschließend wurde kurz in Aqua dest. gewaschen und dann 2 min in Hämatoxylin nach Ehrlich gefärbt. Danach erfolgte wieder ein kurzer Waschschrift in Aqua dest., wonach 15 min unter fließendem Leitungswasser gebläut wurde. Ein kurzer Waschschrift in Aqua dest. war wiederum erforderlich.

Die Eosinfärbung erfolgte durch nur kurzes Eintauchen in eine 1%ige gelbliche Eosinlösung, gefolgt einem weiteren Waschschrift.

Dann wurden die Schnitte in eine aufsteigende Alkoholreihe von 90%igem und 96%igem Isopropanol je 2 min gewaschen und schließlich je 3 min in drei verschiedenen Xylolbädern geklärt. Abschließend wurden die Schnitte blasenfrei mit Entellan überschichtet, mit Deckgläsern abgedeckt und über Nacht zum Trocknen bei RT liegen gelassen.

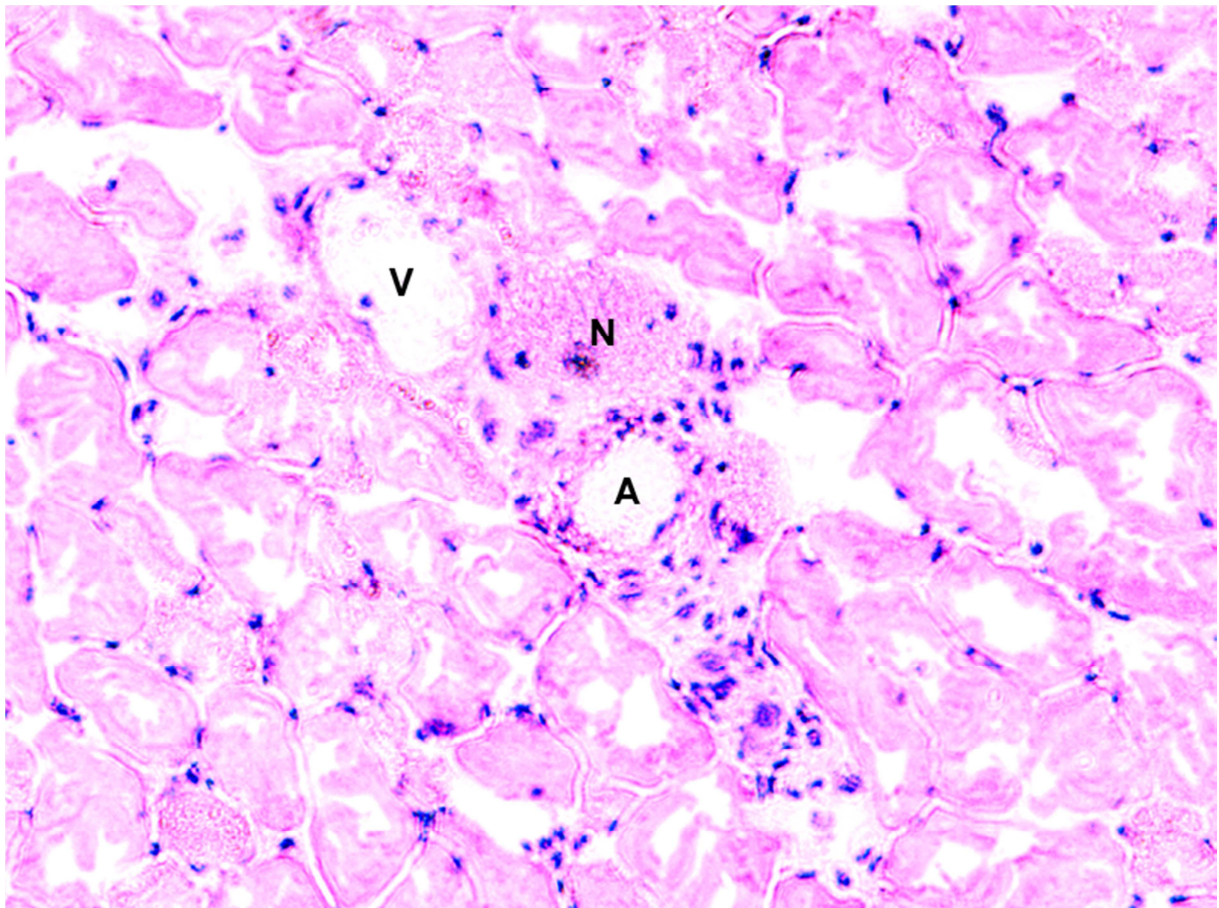


Abb. 6: HE – Färbung des die Kollateralarterien enthaltenden M. adductor magnus. Zu erkennen ist eine Gefäß – Nervenscheide im Muskel mit Vene (V), Nerv (N) und Arterie (A).

#### **4.2.3 Fixierung der Schnitte**

Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Danach erfolgte eine 15 minütige Fixierung in 4% PFA in einer Färbeküvette. Nach dem Fixiervorgang wurden die Objektträger 10 min in 1x PBS gewaschen und die Schnitte mit dem DAKO – Pen umrandet.

#### **4.2.4 $\alpha$ – smooth muscle actin – Färbung**

Nach erfolgter Fixierung wurden die Schnitte 10 min mit 0,5% Goat – Serum bei RT inkubiert. Der FITC – gelabelte anti –  $\alpha$  – smooth muscle actin – Antikörper wurde 1:250 in 0,5% Goat – Serum verdünnt und direkt auf die Schnitte gegeben.

Die Inkubation erfolgte 1 h in einer feuchten Kammer bei 37°C im Wasserbad.

Dann wurden die Objektträger zweimal 5 min in 1x PBS gewaschen. Abschließend wurden die Schnitte mit Mounting Medium mit DAPI zur Kernfärbung und Deckgläsern eingedeckt.

#### **4.2.5 MOMA – Färbung**

Zunächst war eine Fixierung der Schnitte erforderlich. Dann wurde der anti – mouse macrophages/monocytes – Antikörper 1:100 in 0,5% Goat – Serum verdünnt und auf die Schnitte gegeben. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die feuchte Kammer noch 1 h bei 37°C ins Wasserbad gestellt. Nach der Primärinkubation mussten die Schnitte zweimal 5 min in 1x PBS gewaschen werden, dann wurde der anti – rat AlexaFluor® 546 – Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 in 1x PBS in einer feuchten Kammer bei 37°C im Wasserbad 1 h inkubiert. Nach zweimaligem fünfminütigem Waschen in 1x PBS wurde eine  $\alpha$  – smooth muscle actin – Färbung durchgeführt.

#### **4.2.6 CD31 – Färbung**

Ein Fixierschritt entfällt, daher wurden die Objektträger nach dem Trocknen direkt 10 min in 1x PBS gewaschen. Zum Inkubieren mit dem anti – mouse CD31 – Antikörper wurde dieser in 1x PBS 1:100 verdünnt und auf die mit dem DAKO – Pen

umrandeten Schnitte gegeben. Die Inkubation erfolgte anschließend über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C. Dann wurden die Objektträger zweimal 5 min in 1x PBS gewaschen und mit dem 1:100 in 1x PBS verdünnten anti – rat TRITC – Antikörper 1 h in einer feuchten Kammer bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Vor dem Eindecken mit Vectashield Mounting Medium with DAPI wurde noch eine  $\alpha$  – smooth muscle actin – Färbung durchgeführt.

#### **4.2.7 Desmin – Färbung**

Auch für die Färbung zytoplasmatischen Desmins wurden die Schnitte nicht fixiert. Nach dem Auftauen wurden sie mit dem Dako Pen umrandet und 10 min in 1x PBS gewaschen. Danach erfolgte ein Permeabilisierungsschritt zweimal 5 min mit 0,5% Igepal. Die Inkubation mit dem primären Antikörper in einer Verdünnung von 1:50 in 1x PBS fand über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C statt.

Am nächsten Tag wurden die Objektträger zweimal 5 min in 1x PBS gewaschen und der Sekundärantikörper 1:100 verdünnt auf die Schnitte gegeben und in einer feuchten Kammer 1h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach zweimaligem fünfminütigem Waschen mit 1x PBS wurden die Schnitte  $\alpha$  – smooth muscle actin gegengefärbt. Bei Aufnahmen mit exakt gleichen Belichtungszeiten nach Desmin – Färbung wurde dann nach selektivem Filtern eines Farbkanals und Umrechnen des Bildes in Graustufen die relative Helligkeit jeder Aufnahme bestimmt. Die Helligkeit korreliert hierbei mit der Expression von Desmin im Gefäß.

#### **4.2.8 Smoothelin – Färbung**

Zum Anfärben zytoskelettalen Smoothelins wurden die Objektträger zunächst nach dem Auftauen trocknen gelassen und anschließend in 1x PBS – Tween 10 min lang gewaschen. Danach wurden die einzelnen Schnitte mit Fettstift umrandet und zweimal 5 min mit 0,5% Igepal in 1x PBS permeabilisiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C. Der Antikörper wurde hierbei 1:30 in 1x PBS – Tween verdünnt. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 2 h bei 37°C in der feuchten Kammer im Wasserbad inkubiert. Im anschließenden Waschschrift wurden die Präparate zweimal 5 min in 1x PBS – Tween gewaschen. Die Inkubation mit dem ebenfalls 1:30 in PBS – Tween

verdünnten TRITC – konjugierten anti – rabbit – Sekundärantikörper erfolgte 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer im Wasserbad. Nach dem erneuten Waschen zweimal 5 min in 1x PBS folgte die Färbung von smooth – muscle actin.

#### **4.2.9 Dihydroethidium (DHE) – Färbung**

Für die DHE – Färbung wurden einzeln auf die Objektträger aufgebrachte Schnitte verwendet. Nach dem Umranden mit Fettstift wurde zunächst eine  $\alpha$  – smooth muscle actin – Färbung durchgeführt. Anschließend wurden die Objektträger einzeln im Abstand von 5 min genau 30 min lang mit 2  $\mu$ M Dihydroethidium in KH – Puffer in einer feuchten Kammer bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Schnitte direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und 2 Aufnahmen der großen Gefäße angefertigt. Für jeden Muskel jedes Versuchstieres wurden 3 Schnitte gefärbt.

Für die Auswertung der Schnitte wurde anschließend das nach der  $\alpha$  – smooth muscle actin – Färbung grün fluoreszierende Gefäß in Photoshop ausgeschnitten. Die Zellkerne wurden rot fluoreszierend dargestellt (*Abb. 13 a*).

Nach Selektion des roten Farbkanals wurde dieser in Graustufen umgewandelt und die Helligkeit des dann resultierenden Bildes mit ImageJ ausgegeben (*Abb. 13 b*).

Das Ergebnis wurde in Bezug zur Zahl der Zellkerne im Gefäß gesetzt. Die Messung erfolgte in der relativen Einheit „Helligkeit/Zellkern“ und wurde an je 6 Schnitten pro Tier mit ApoE<sup>-/-</sup> - Mäusen durchgeführt.

### **4.3 Quantitative Real Time (qRT) – PCR**

#### **4.3.1 Prinzip der Polymerase – Kettenreaktion (PCR)**

Die PCR ist eine automatisierte Methode, die das Vervielfältigen einer Template – DNA ermöglicht. Hierzu wird die Template – DNA mit Primern der gewünschten Sequenz in einen Mastermix gegeben. Dieser besteht aus Nukleotidtriphosphaten, einer thermostabilen DNA – abhängigen DNA – Polymerase und einem Puffermedium, welches für die Replikation wichtige Ca<sup>2+</sup> – und Mg<sup>2+</sup> – Ionen enthält.

Durch zyklisches Aufwärmen und Abkühlen der Proben im Thermocycler werden jeweils ideale Temperaturen für die verschiedenen Reaktionsschritte erreicht. Die Ausbeute der PCR beträgt  $2^n$  DNA – Stränge, wobei n für die Anzahl der Zyklen steht.

Anschließend wird bei der klassischen PCR eine Analyse in Form einer Gelelektrophorese durchgeführt. Dies entfällt jedoch bei der quantitativen Real Time – PCR (qRT – PCR). Das entstehende Produkt kann hierbei direkt im Cycler durch photometrische Analyse eines in doppelsträngige DNA interkalierenden Farbstoffs quantifiziert werden. Eine einheitliche Größe des Reaktionsprodukts kann bei diesem Verfahren durch stufenweises Erhitzen und gleichzeitiges Aufzeichnen einer Schmelzkurve ermittelt werden.

Für Analysen, die den Bereich der Transkription betreffen, ist es nach Isolation der RNA zunächst erforderlich, diese in DNA umzuschreiben, bevor sie in einer PCR – Analyse eingesetzt werden kann. Dies geschieht durch reverse Transkription (RT). Der entscheidende Unterschied zur PCR liegt bei diesem Verfahren darin, dass RNA in cDNA umgeschrieben wird und keine Amplifikation von DNA – Sequenzen erfolgt. Außerdem liegt ein weiterer Unterschied in der Verwendung zufälliger Primer und einer RNA – abhängigen DNA – Polymerase. Zudem findet die RT nicht in Form einer Kettenreaktion statt, sondern wird nur einmal durchlaufen.

#### **4.3.2 Probengewinnung für qRT – PCR**

Nach abgeschlossener Behandlung männlicher ApoE<sup>-/-</sup> – Mäuse (n = 10 je Gruppe) fand eine Ligatur der rechten A. femoralis statt. Drei Tage später wurden die Mäuse durch eine erhöhte Dosis des mit Heparin versetzten Narkosemittels getötet.

Nach Eröffnung des Abdomens per Laparotomie erfolgte die Entnahme von ca. 0,8 ml Blut direkt aus der V. cava inferior mit einer vorheparinisierten Spritze. Hierzu wurden 0,05 ml Heparin mit der Spritze aspiriert und im gesamten Innenraum gut verteilt. Die Blutproben wurden bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Desweiteren wurde die Aorta thoracalis entnommen. Vom Hinterlauf erfolgte die Entnahme des M. triceps surae, des M. adductor magnus und des M. quadriceps femoris. Die Muskeln und Organe wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren



und bis zur weiteren Bearbeitung bei – 80°C gelagert.

### **4.3.3 Probenaufbereitung Blut**

Das heparinisierte Vollblut wurde 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Das Plasma wurde in ein frisches Eppendorfggefäß überführt und nochmals 4 min bei 4000 rpm zentrifugiert, um zelluläre Verunreinigungen zu entfernen. Der dann zelldepletierte Überstand wurde in ein neues Eppendorfggefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die erythrozytenreiche rote Phase, die nach der Zentrifugation des Vollblutes übrig blieb, wurde mit 1x PBS auf 3 ml aufgefüllt. In einen 15 ml Falcon wurden 1,5 ml Biocoll gefüllt und dann mit der Zellsuspension vorsichtig überschichtet, um ein Vermischen zu verhindern. Dann wurde 20 min lang ohne Bremse bei 2400 rpm in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert.

Der erythrozytenfreie Überstand mit der Interphase (buffy coat) wurde in einen frischen 15 ml Falcon überführt und mit 1x PBS auf 10 ml aufgefüllt. Nach einem weiteren zehnminütigen Zentrifugationsschritt in der Kühlzentrifuge bei 2400 rpm mit Bremse war am Boden des Reaktionsgefäßes ein Pellet zu erkennen, welches vorwiegend aus zirkulierenden mononukleären Zellen bestand. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Pellet in 300 µl Lysereagenz (im RNA Microprep Kit enthalten) resuspendiert, die Suspension anschließend in ein frisches Eppendorfggefäß überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

Die Isolierung der RNA erfolgte mit Hilfe des Absolutely RNA Microprep Kits nach dem mitgelieferten Protokoll. Hierzu wurden dem Zelllysate zunächst 300 µl 70% Ethanol zugesetzt und für 5 s mit dem Vortex Mixer gemischt. Diese Mischung wurde in einen leeren RNA – binding spin cup überführt und 60 s in einer Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und der spin cup mit 600 µl 1x Low Salt Wash Buffer befüllt. Anschließend wurde nochmals 60 s bei maximaler Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Wieder wurde das Filtrat verworfen und der spin cup bei maximaler Geschwindigkeit 2 min lang zentrifugiert. Auf die nun trockene Membran wurden dann direkt 30 µl DNase – Lösung (25 µl DNase Digestion Buffer + 5 µl RNase – free DNase I) gegeben und 15 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 500 µl 1x High Salt Wash zugegeben und erneut bei maximaler Geschwindigkeit 60 s lang zentrifugiert, das

Filtrat verworfen und die Membran wiederholt mit 600 µl Low Salt Wash Buffer gewaschen. Wieder wurde das Filtrat verworfen und 300 µl Low Salt Wash Buffer auf die Membran gegeben. Die Membran wurde dann durch 2 min Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit getrocknet. Der spin cup mit der gebundenen RNA wurde dann auf ein frisches, Nukleinsäure – und RNase – freies Eppendorfgefäß gesteckt. Der Elutionspuffer wurde auf 60°C vorgewärmt, um die RNA – Ausbeute zu verbessern. Dann wurden je 30 µl des erwärmten Puffers auf die Membranen gegeben und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Filtrat enthielt die RNA der peripher zirkulierenden mononukleären Zellen und wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Um möglichst gleiche RNA – Konzentrationen in der RT einzusetzen musste zunächst der RNA Gehalt der einzelnen Proben nach der Isolation bestimmt werden. Dazu wurden je 1 µl der RNA – Lösung in 49 µl Ampuwa verdünnt und gegen 50 µl reines Ampuwa als Leerwert bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm im Photometer gemessen. Vom Stock wurden 50 ng RNA entnommen und auf ein Volumen von 10 µl mit Ampuwa aufgefüllt. Diese Lösung wurde in der anschließenden RT (Sensiscript Qiagen GmbH, Hilden) verwendet, der Rest wurde bei – 80°C aufbewahrt.

Die RT erfolgte nach dem von Hersteller mitgelieferten Protokoll. In je einem frischen 0,5 ml – Reagenzgefäß wurden zunächst die 10µl der Template – RNA – Lösung vorgelegt, die dann auf Eis gestellt wurden. Dann wurde ein MasterMix aus 2 µl 10x Buffer RT, 2 µl dNTP Mix (5nM), 2 µl Random Primer und 2 µl Ampuwa je Probe angesetzt. Kurz vor Verwendung wurde dem MasterMix je Probe 1 µl RNAsin (10 U / µl) und 1 µl Sensiscript RT zugegeben, gut durchmischt und jeweils 10 µl des MasterMix auf die vorgelegte Template – RNA gegeben. Nach einem kurzen Durchmischen und Herunterspinnen wurden die Eppendorfgefäße 1h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Dann wurden die Enzyme durch fünfminütiges Erhitzen auf 93°C im vorgeheizten Heizblock inaktiviert. Abschließend wurden die Proben bis zur Verwendung in der qRT – PCR in der -20°C – Truhe gelagert.

#### **4.3.4 Probenaufbereitung Adduktor**

Die Hälfte des *M. adductor magnus* wurde in 1 ml RNA Pure gepottert.

Das Homogenat wurde mit 300 µl Chloroform versetzt und gut mit dem Vortex Mixer gemischt, sodass die Probe milchig wurde. Das Gemisch wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 4°C in der Kühlzentrifuge bei 14000 rpm 30 min lang zentrifugiert. Währenddessen wurden in frischen 1,5 ml Reaktionsgefäßen je 400 µl Isopropanol vorgelegt. Nach der Zentrifugation hatte sich das Chloroform – Zellhomogenat – Gemisch in 3 Phasen getrennt. Die obere, wässrige Phase enthielt die RNA und wurde in die vorgelegten Eppis mit dem Isopropanol überführt. Die Reaktionsgefäße wurden dann über Nacht bei -20°C in den Gefrierschrank gestellt, um die Nukleinsäure auszufällen.

Am nächsten Tag erfolgte eine 60 minütige Zentrifugation bei 4°C in der Kühlzentrifuge bei 14000 rpm. Danach war ein Pellet am Boden des Eppendorfgefäßes zu sehen. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen, zum Pellet wurden 800 µl eisgekühltes 70% Ethanol gegeben. Es wurde kräftig im Vortex Mixer durchmischt, bis sich das Pellet vom Boden gelöst hatte. Anschließend wurde bei 4°C in der Kühlzentrifuge bei 14000 rpm 15 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abpipettiert und verworfen, das Pellet an der Luft leicht antrocknen gelassen. Dann wurde es in 20 µl Ampuwa resuspendiert und 5 min bei 65°C im Heizblock inkubiert.

Je 7 µl der gelösten RNA wurden mit dem gleichen Volumen DNase 1x Master Mix versetzt und 30 min bei 25°C inkubiert. Um die DNase zu denaturieren wurde dann für 5 min auf 75°C erhitzt. Auch in diesem Fall war es wieder erforderlich, den jeweiligen RNA – Gehalt der einzelnen Proben zu bestimmen. Dazu wurden je 1 µl der RNA – Lösung in 49 µl Ampuwa verdünnt und gegen 50 µl reines Ampuwa als Leerwert bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm im Photometer gemessen. 2 µg der RNA wurden von jeder Probe entnommen und auf ein einheitliches Volumen von 10 µl mit Ampuwa aufgefüllt, der Rest bei -80°C gelagert.

Die 10 µl Template – RNA wurden in je einem frischen 0,5 ml – Eppendorfgefäß vorgelegt und bis zum Hinzufügen des MasterMix auf Eis gestellt. Der MasterMix wurde nach dem mitgelieferten Protokoll des Herstellers angesetzt und bestand je Probe aus 2,0 µl 10x RT Buffer, 0,8 µl 25x dNTP Mix (100 mM), 2,0 µl 10x RT

Random Primers, und 3,2 µl Ampuwa. Kurz vor dem Zugeben zur Template – RNA wurden noch jeweils 1,0 µl Multiscribe Reverse Transcriptase und 1,0 µl RNase Inhibitor hinzugefügt und das Ganze gut gemischt. Auf jede Probe wurden dann 10 µl des MasterMix gegeben, kurz durchmischt und anschließend kurz zentrifugiert, um alle Reagenzien auf den Boden des Gefäßes zu bekommen. Die Inkubation erfolgte im Thermocycler. Der erste Schritt war ein zehninütiges Erwärmen auf 25°C. Die eigentliche Reaktion erfolgte 120 min lang bei 37°C. Die Inaktivierung der Enzyme fand 5 min bei 85°C statt, dann wurden die Proben auf 4°C abgekühlt.

Für die Verwendung in der qRT – PCR war ein zusätzlicher Aufreinigungsschritt erforderlich. Dieser erfolgte mit Hilfe eines Säulensystems (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers.

Dazu wurde der Buffer PB mit der in der RT gewonnenen cDNA im Verhältnis 1:5 gemischt. Hierbei wurden je Probe 10 µl cDNA mit 50 µl Buffer PB in einem frischen Eppendorfgefäß gemischt. Die Lösung wurde dann auf die Säulen gegeben und 1 min bei 13000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und 0,75 ml Buffer PE auf jede Säule pipettiert. Wieder wurde 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Um die Membran zu trocknen wurde nochmals 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Säulen mussten dann in frische Eppendorfgefäße überführt werden. Es wurden je 30 µl Buffer EB direkt auf jede Membran gegeben und 1min bei RT stehen gelassen. Abschließend wurde 1min bei 13000 rpm zentrifugiert, danach befand sich die aufgereinigte cDNA im Eppendorfgefäß. Um eine Gesamtverdünnung von 1:10 zu erreichen wurden dann noch 70 µl Ampuwa in jede Probe dazugegeben.

#### **4.3.5 qRT – PCR**

Für die qRT – PCR wurde die cDNA je 1:10 verdünnt. Um die PCR anschließend über eine relative Standardkurve auswerten zu können, war es erforderlich, eine Mischung von je 10 µl cDNA aller Proben anzufertigen. Dieser Mix wurde dann 1:2 weiterverdünnt, sodass im Endeffekt cDNA in 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 und 1:160 Verdünnung vorlag.

Auf die 96 – well – Plate wurde dann in der ersten Reihe jeweils 3 µl DEPC – Wasser zur Negativkontrolle und des cDNA – Mix in den verschiedenen Verdünnungen zum

Erstellen einer Standardkurve pipettiert. In die anderen Reihen wurden je 3 µl der Proben pipettiert. Zum Erreichen einer höheren Genauigkeit und Fehlervermeidung wurde eine Doppelbestimmung aller Proben, Standardkurvenwerte und Negativkontrollen durchgeführt. Anschließend wurde jedem well auf der Platte 22 µl Real Time PCR Master Mix hinzugefügt. Nach dem Verschließen mit Optical Adhesive Covers wurde die Platte 3 min bei 300 rpm zentrifugiert, um Luftblasen zu vermeiden und sicherzustellen, dass sich das Reaktionsgemisch vollständig am Boden des wells befand.

Die Reaktion fand in einem StepOne Plus – Real Time PCR – Gerät 50 Zyklen lang mit einer Annealingtemperatur von 60°C statt. Um sicherzustellen, dass keine unspezifische Amplifikation oder Primerdimerisierung stattfand, wurde zu jedem Lauf eine Schmelzkurve im Anschluss an den Reaktionsablauf einprogrammiert.

## **4.4 Western Blot**

### ***4.4.1 Probengewinnung für Western Blot***

Zur Proteinanalyse wurde ein Teil des Adduktormuskels aus der RNA – Isolation verwendet.

### ***4.4.2 Probenaufbereitung***

Ca. 150 µg Gewebe wurden mit 500 µl des Lysepuffers gepottert. Dazu musste dem Puffer vor dem Gebrauch je ml noch 0,7 µl Aprotinin, 1 µl Leupeptin und 1 µl PMSF frisch zugegeben werden. Falls das Lysat noch zu viskös war, wurden je noch 200 µl Lysepuffer hinzugefügt und nochmals durchmischt. Das Homogenat wurde anschließend bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt und längerfristig bei -20°C gelagert.

### ***4.4.3 Proteinbestimmung***

Um gleiche Proteinmengen beim Western Blot zu verwenden wurde eine

Proteinbestimmung aller Proben durchgeführt.

Je Probe wurden 3 frische Eppendorfgefäße mit je 18 µl Aqua dest. vorgelegt; zusätzlich außerdem 1 Eppendorfgefäß mit 20 µl Aqua dest., welches als Leerwert für die Messung diente. Die Proben wurden auf Eis langsam aufgetaut und dreimal 2 µl jeder Probe in die vorgelegten Gefäße gegeben. Dies ermöglichte eine Dreifachbestimmung jeder Probe und somit eine geringere Messungenauigkeit. Dann wurden in jede Probe erst 800 µl Reagent B hinzugefügt und dann 100 µl Reagent A, auch in das Gefäß mit 20 µl Wasser. Alle Proben wurden dann sorgfältig mit dem Vortex – Mixer durchmischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die eigentliche Messung erfolgte bei 750 nm mit voreingestellter Standardkurve. Bei Extinktionswerten > 0,5 wurde die Probe nochmals mit 200 µl Lysepuffer verdünnt und wiederum gemessen.

#### **4.4.4 SDS – PAGE**

Entsprechend der gewünschten Konzentration der Trenngele wurden Aqua dest., SDS, Acrylamid, Tris und APS in einem Falcon gemischt. Zuletzt wurde TEMED zugegeben, welches die Polymerisation des Gels startet und nochmals sorgfältig gemischt. Mit Hilfe einer Pipette wurde das noch flüssige Gel in den vorbereiteten Gelgießstand eingefüllt und vorsichtig mit einer Schicht Aqua dest. überschichtet, ohne dass Wasser und Gel sich vermischten. Nach ca. 20 min waren die Gele ausgehärtet und die Wasserschicht konnte abgeschüttet werden. Dann wurden in einem frischen Falcon die Reagenzien für das Sammelgel gemischt, wobei wiederum TEMED zuletzt zugegeben wurde. Das Sammelgel wurde mit Hilfe einer Pipette auf das Trenngel gegeben und der Kamm eingeführt. Die Gele wurden dann wiederum ca. 20 min lang aushärten gelassen.

Derweil wurden die Proben auf Eis langsam auftauen gelassen und je 50 µg Protein in ein frisches Eppendorfgefäß pipettiert. Der Ladepuffer wurde mit 5% DTT versetzt, gründlich durchmischt und ein gleiches Volumen zur Probe gegeben. Dann wurden die Proben mit dem Ladepuffer 7 min bei 70°C im Heizblock denaturiert.

Das Gel wurde nach dem Aushärten in die Elektrophoresekammer gestellt und der Kamm entfernt. Die Kammer wurde mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt und anschließend die denaturierten Proben in die Slots pipettiert. Dann wurde die

Elektrophoresekammer mit einem Powerpack verbunden und bei 30 mA ca. 2,5 h laufen gelassen.

#### **4.4.5 Western Blot**

Während der Laufzeit der Gele wurden Filter und Membranen auf die ungefähre Größe der Gele zugeschnitten und die Filter in Transferpuffer eingeweicht.

Der eingeweichte Filter wurde dann in eine Blotkammer gelegt und glattgestrichen. Nachdem die blaue Lauffront den unteren Rand der Gele erreicht hatte, wurde das Powerpack ausgeschaltet und von der Elektrophoresekammer getrennt. Die Gele wurden herausgenommen und das Sammelgel vom Trenngel abgetrennt und entsorgt. Das Trenngel wurde nun vorsichtig von den Glasplatten gelöst.

Die Nitrocellulosemembran wurde dann mit Transferpuffer befeuchtet, auf den Filter in der Blotkammer gelegt und glattgestrichen. Schließlich wurden die Trenngele auf die Membranen gelegt, mit in Transferpuffer eingeweichten Filtern abgedeckt und wiederum glattgestrichen. Dann wurde die Blotkammer verschlossen und mit dem Powerpack verbunden.

Der Blottingschritt erfolgte über 1 h bei 200 mA. Nach dem Blotten wurden die Membranen aus der Kammer genommen und in 50 ml 5% Milch in PBS – Tween gelegt. Diese wurden dann 30 min auf dem Schüttler stark wippend geblockt.

Vor der Inkubation musste die Membran zwischen den gewünschten Targets durchtrennt werden. Die einzelnen Fragmente konnten dadurch simultan mit verschiedenen Antikörpern inkubiert werden. Die Antikörper wurden hierzu in je 5 ml 1% Milch in PBS – Tween verdünnt. Verdünnungen für verschiedene Antikörper waren für GAPDH 1:10000, für eNOS 1:400 und für p-eNOS 1:200.

Die Membran wurde mit der gewünschten Antikörper – Lösung in einen 50 ml Falcon gegeben, und über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler langsam rotierend inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Membranen aus dem Falcon genommen und zweimal 5 min in 1x PBS – Tween, dann zweimal 10 min in 1x PBS – Tween und schließlich zweimal 5 min in 1x PBS jeweils stark wippend gewaschen. Der HRP – konjugierte Sekundärantikörper wurde in 50 ml 1x PBS verdünnt, auf die Membran gegeben und

dann schwach wippend bei RT inkubiert. Hierbei wurde bei Verwendung eines Primärantikörpers aus der Maus eine Verdünnung von 1:5000 und eine Inkubationszeit von 20 min benutzt, bei Verwendung eines Primärantikörpers aus Kaninchen eine Verdünnung von 1:4000 und eine Inkubationszeit von 30 min. Dann wurde wieder zweimal 5 min in 1x PBS – Tween, dann 2 x 10 min in 1x PBS – Tween und schließlich zweimal 5 min in 1x PBS jeweils stark wippend gewaschen.

#### **4.4.6 Entwickeln**

Zum Entwickeln der Membranen wurden 5 ml ECL – Lösung 1 mit 5 ml ECL – Lösung 2 gemischt. Diese wurde direkt auf die Membran gegeben und 1 min bei RT inkubiert. Dabei wurde das Licht gelöscht, da die ECL – Lösung lichtempfindlich ist.

Nach 1 min wurden die Membranen aus der ECL – Lösung genommen und kurz abtropfen gelassen. Dann wurden sie knitterfrei mit Frischhaltefolie eingewickelt und in eine Entwicklerkassette gelegt. In der Dunkelkammer wurde anschließend der Röntgenfilm zugeschnitten und auf die eingewickelten Membranen gelegt.

Die Kassette wurde danach geschlossen und der Film belichtet.

GAPDH als Laufkontrolle erforderte nur sehr kurze Belichtungszeit von ca. 2 s, während eNOS oder p-eNOS Belichtungszeiten von 10 – 20 min benötigten.

Nach der Belichtungszeit wurde der Film aus der Kassette genommen und in die Entwicklermaschine gelegt. Wenn das Ergebnis nicht zufriedenstellend war, dann wurde erneut belichtet. Hatte auch dies keinen Erfolg oder war die zweite Belichtung zu schwach, dann wurden die Membranen noch einmal gewaschen und erneut mit der ECL – Lösung inkubiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Scanners und Labworks.

#### **4.4.7 Membran strippen**

Bei einer erneuten Inkubation der Membranen mussten zunächst die gebundenen Antikörper von der Membran gewaschen werden.

Dazu wurde der Hybridisierungssofen auf 57°C eingestellt und dann die ECL – Lösung von der Membran abgewaschen. Dies erfolgte auf dem Schüttler stark



wippend 5 min in 1x PBS – Tween und 10 min in 1x PBS. Dann wurden die Membranen mit ca. 20 ml Stripping Buffer in Hybridisierungsröhren gegeben und langsam drehend 30 min im Ofen inkubiert. Anschließend wurde die Temperatur auf 20°C eingestellt und schnell drehend zweimal 5 min mit 1x PBS – Tween, 10 min mit 1x PBS – Tween, zweimal 5 min mit 1x PBS und 10 min mit 1x PBS gewaschen. Dann konnte wieder normal geblockt und mit einem neuen Antikörper inkubiert werden.

## **4.5 NOS detect assay Kit**

### ***4.5.1 Prinzip des NOS detect – assay kits***

Zur Quantifizierung der Aktivität der NO – Synthase (NOS) in einem Gewebe macht man sich die enzymatische NO – Abspaltung von Arginin unter stöchiometrischer Produktion von Citrullin durch die NO – Synthasen zu Nutze. Durch die unterschiedlichen Ladungen von Arginin und Citrullin bei einem pH – Wert von 5,5 ist eine Trennung der beiden Stoffe bei diesem pH – Wert möglich. Bei Verwendung von radioaktiv markiertem [<sup>3</sup>H] – Arginin und Inaktivierung der NO – Synthase durch EDTA nach einer bestimmten Reaktionszeit kann daher nach Trennung von Arginin und Citrullin die Aktivität der Citrullinfraktion als Maß für die enzymatische NO – Produktion durch einen Szintillationszähler bestimmt werden.

### ***4.5.2 Probengewinnung***

Für den direkten Nachweis der NOS – Aktivität mittels Arginin – Citrullin – Assay wurden Teile des Adduktoren Muskels aus der RNA – Isolation verwendet.

### ***4.5.3 Probenaufbereitung***

Die Gewebestücke wurden mit einem zehnfachen Volumen des im Kit mitgelieferten Homogenisierungspuffers gepottert. Das Gewebehomogenat wurde dann bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelegt. Jeweils 1 ml des Homogenats wurden in Eppendorfgefäße pipettiert und 5 min bei 13000 rpm in der Kühlzentrifuge bei 4°C

zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und in saubere Reaktionsgefäße überführt, das Pellet wurde verworfen.

#### **4.5.4 Aktivitätsmessung**

Für je 10 Reaktionen wurden 250 µl des mitgelieferten 2x reaction buffer in einem sauberen Reaktionsgefäß mit 50 µl 10 mM NADPH in 10 mM Tris – HCl, 50 µl 6 mM Calciumchlorid, 40 µl destilliertem Wasser und 10 µl [<sup>3</sup>H] – Arginin gemischt und auf Eis gestellt. Dann wurden je 10 µl der Gewebekomponente mit je 40 µl des vorbereiteten Reaktionspuffers in frischen Eppendorfgefäßen gemischt und für 60 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. In einer Kontrollreaktion wurden 5 µl Rattenhirnhomogenat statt der 10 µl Hinterlaufgewebekomponente eingesetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Hinzugeben von 400 µl des Stopppuffers beendet.

Zu den Proben wurden dann je 100 µl des resuspendierten mitgelieferten Harz zur Bindung des [<sup>3</sup>H] – Arginins pipettiert und dann in spin cups überführt. Nach 30 s Zentrifugation bei 13000 rpm wurde das Eluat in Szintillationsröhrchen pipettiert, in denen je 500 µl Szintillationscocktail vorgelegt worden waren. Anschließend erfolgte die Radioaktivitätsmessung im Szintillationszähler.

## **4.6 Statistische Analysen**

Vergleiche zwischen drei oder mehr Gruppen erfolgten mittels univariater Varianzanalyse (analysis of variance = ANOVA) und anschließender Bonferroni – Korrektur. Vergleiche innerhalb einer Gruppe wurden mittels gepaartem T – Test durchgeführt. Die Daten werden nachfolgend als arithmetisches Mittel ± Standardfehler angegeben. P – Werte < 0,05 werden als statistisch signifikant angesehen.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Puls und Blutdruckmessung

#### ***5.1.1 Ivabradin führt zu einer selektiven Herzfrequenzsenkung ohne Beeinflussung des Blutdrucks***

Die Gabe von Ivabradin zu einer Herzfrequenzreduktion von  $80 \pm 11$  Schlägen pro Minute (- 11%,  $p < 0,01$ ) in C57Bl/6 – Wildtypmäusen ( $n = 10$  pro Gruppe) und zu einer Herzfrequenzreduktion von  $86 \pm 10$  Schlägen pro Minute (- 15%,  $p < 0,01$ ) in ApoE<sup>-/-</sup> – Mäusen ( $n = 10$  pro Gruppe). Ein Unterschied zwischen Wildtyp – und ApoE<sup>-/-</sup> – Mäusen bestand weder vor noch am Ende der Behandlung (Abb. 7). Ein maximaler Effekt der Behandlung auf die Herzfrequenz wurde bereits nach 2 Wochen beobachtet.

Die Behandlung mit Ivabradin führte zu keiner signifikanten Verringerung des systolischen, diastolischen und mittleren arteriellen Blutdruckes (Abb. 8).

### 5.2 Perfusion

#### ***5.2.1 Ivabradin verbessert die Perfusionswiederherstellung im Hinterlauf von ApoE<sup>-/-</sup> - Mäusen nach Femoralarterienligatur***

Die akute Ligatur der rechten A. femoralis resultierte in einer Perfusions – vermindernung auf  $3,5 \pm 0,7\%$  der unligierten Seite ( $n = 8$ ). Bei einer zuvor durchgeführten Nativperfusion zeigte sich kein Unterschied. Eine Woche nach Ligatur der rechten A. femoralis wurde in Wildtypmäusen keine signifikante Verbesserung der Perfusion unter frequenzsenkender Behandlung festgestellt. Stattdessen zeigte sich hier ein nicht – signifikanter Trend zur Hemmung der Perfusionswiederherstellung (in % der nicht – ligierten Seite) nach Behandlung mit Ivabradin ( $62,1 \pm 6,8\%$  in der Placebogruppe ( $n = 10$ ) vs.  $55,5 \pm 4,2\%$  in der behandelten Gruppe ( $n = 10$ );  $p = 0,226$ ).

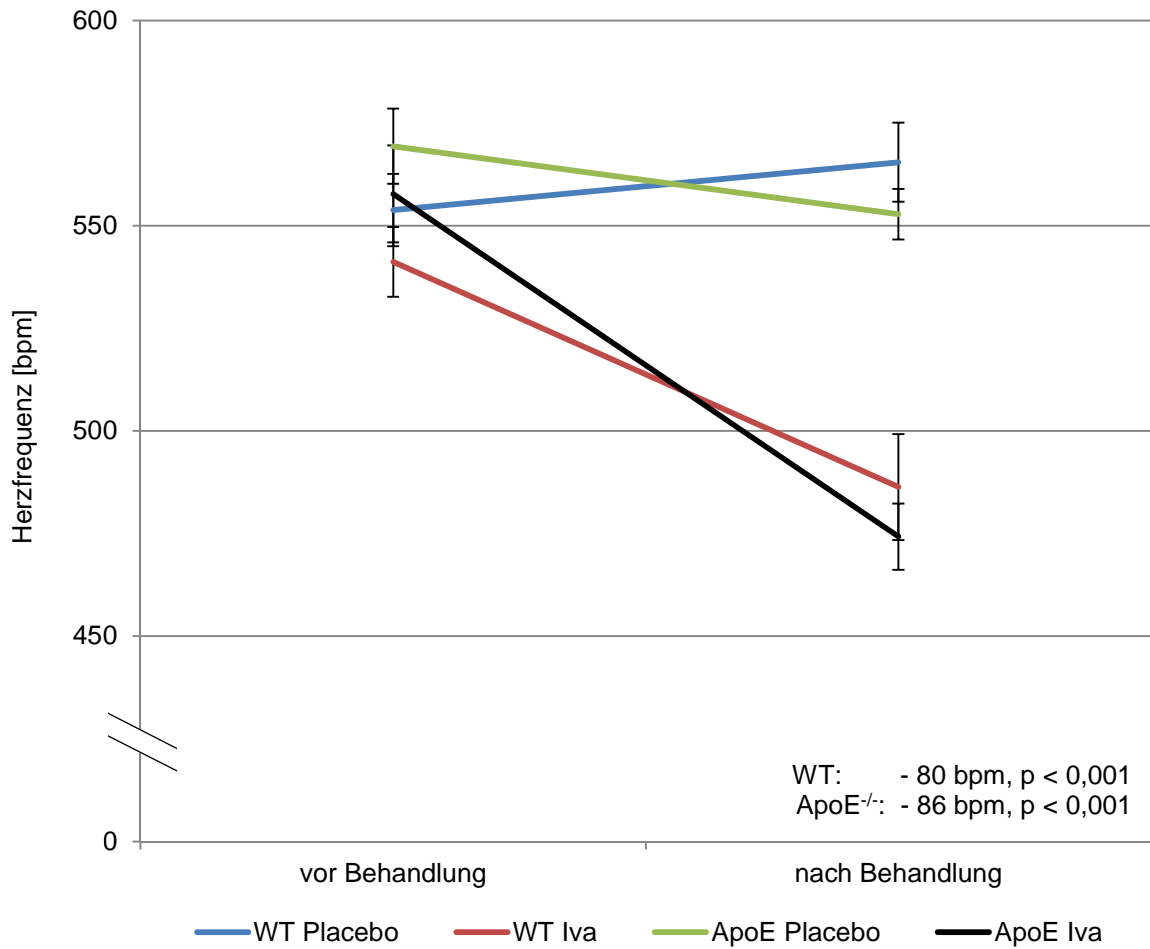


Abb. 7: Herzfrequenz von Wildtypmäusen (WT) und ApoE<sup>-/-</sup> – Mäusen (ApoE) vor und nach der Behandlung mit Ivabradin bzw. Placebo. In den mit Ivabradin behandelten Gruppen wurde eine Reduktion der Herzfrequenz von 11% (WT) bzw. 15% (ApoE) erreicht. Beide Kontrollgruppen zeigten keine signifikante Veränderung der Herzfrequenz.

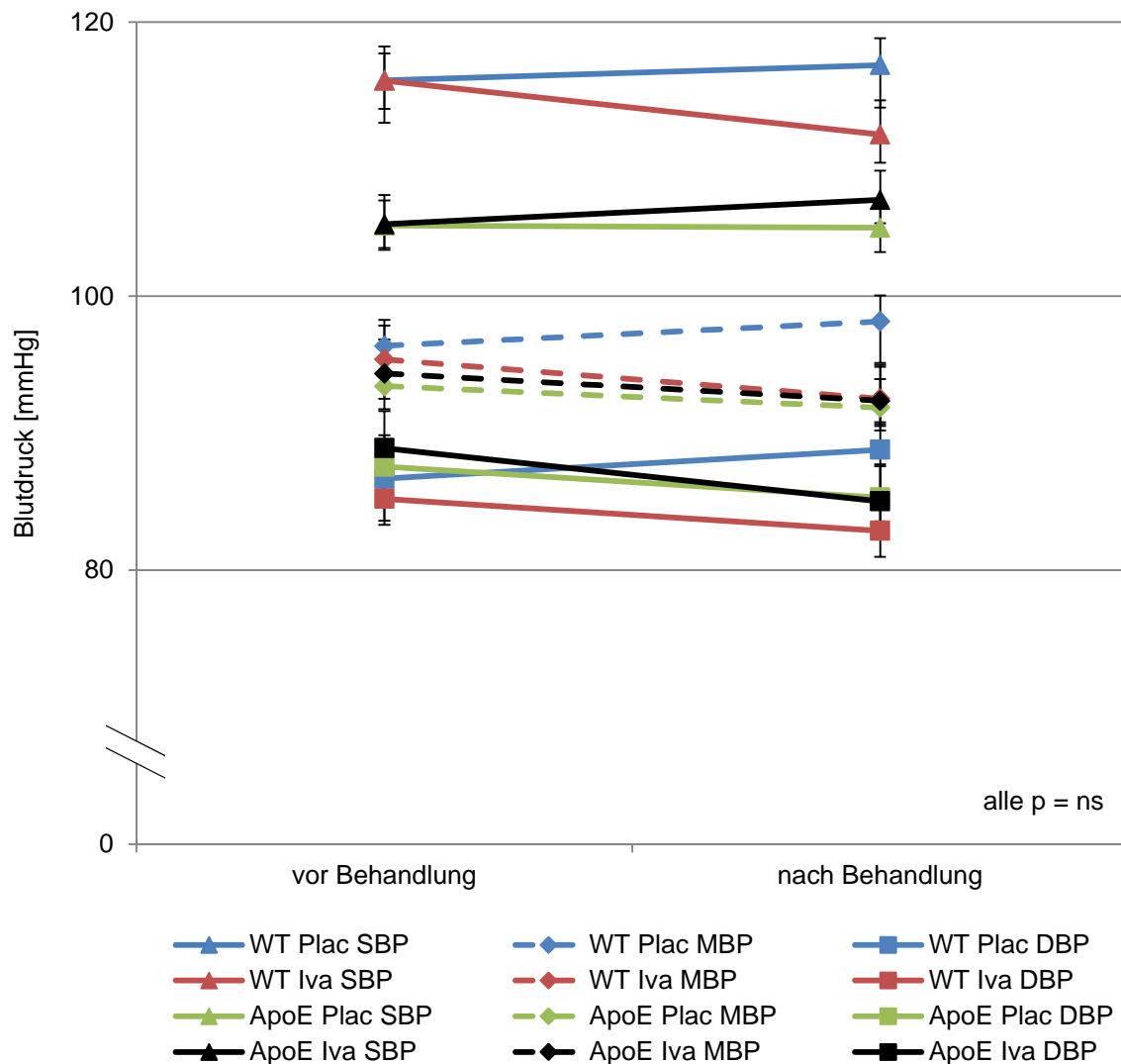


Abb. 8: Bestimmung des systolischen (SBP), mittleren (MBP) und diastolischen Blutdrucks (DBP) in Behandlungs – und Kontrollgruppen von Wildtyp – und ApoE<sup>-/-</sup> – Mäusen. In keiner der Gruppen kommt es im Verlauf des follow-up zu einer Veränderung eines oder mehrerer dieser Parameter.

Unbehandelte ApoE<sup>-/-</sup> - Mäuse demonstrierten eine verminderte Perfusions – wiederherstellung nach Ligatur der A. femoralis ( $40,5 \pm 4,4\%$  in der ApoE<sup>-/-</sup> - Gruppe ( $n = 10$ ) vs.  $62,1 \pm 6,8\%$  in der Wildtyp – Gruppe ( $n = 10$ );  $p = 0,015$ ).

In ApoE<sup>-/-</sup> - Mäusen führte die Senkung der Herzfrequenz zu einer verbesserten Perfusionswiederherstellung ( $60,2 \pm 4,0\%$  in der Behandlungsgruppe ( $n = 10$ ) vs.  $40,5 \pm 4,4\%$  in der Placebogruppe ( $n = 10$ );  $p = 0,003$ ). Insgesamt wurde also die Perfusionswiederherstellung in ApoE<sup>-/-</sup> - Mäusen mit endothelialer Dysfunktion durch die Behandlung mit Ivabradin auf das Niveau gesunder C57Bl/6 – Wildtypmäuse verbessert (Abb. 9; Abb. 10).

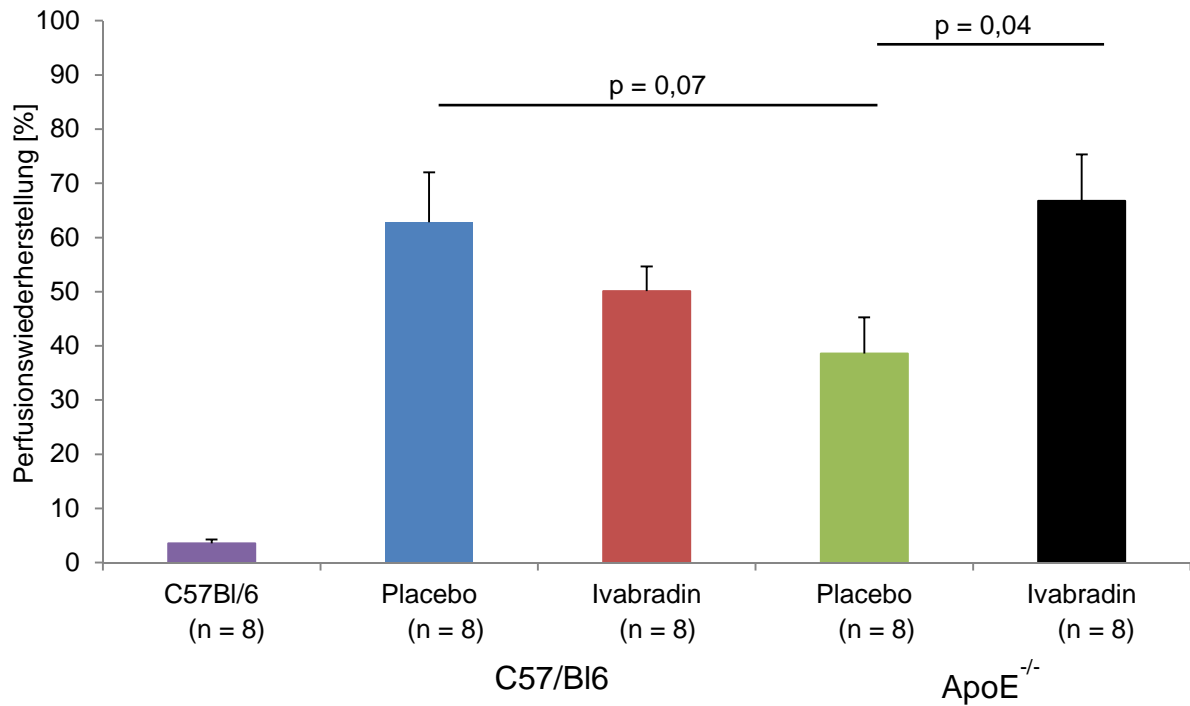


Abb. 9: Perfusionswiederherstellung durch Ivabradin in ApoE<sup>-/-</sup> – Mäusen.

Bei der Akutperfusion direkt nach Verschluss der rechten A. femoralis ist der Fluss im rechten Bein auf 3,5% des unligierten Beines gesunken. Gegenüber normalen Wildtyp – mäusen ist die Perfusionswiederherstellung nach einer Ligatur bei ApoE<sup>-/-</sup> – Mäusen vermindert. In C57/BI6 – Wildtypmäusen hat Ivabradin einen nicht – signifikanten negativen Effekt auf die Perfusionswiederherstellung. In hyperlipidämischen ApoE<sup>-/-</sup> – Mäusen verbessert Ivabradin die Perfusionswiederherstellung auf das Niveau gesunder Wildtypmäuse.

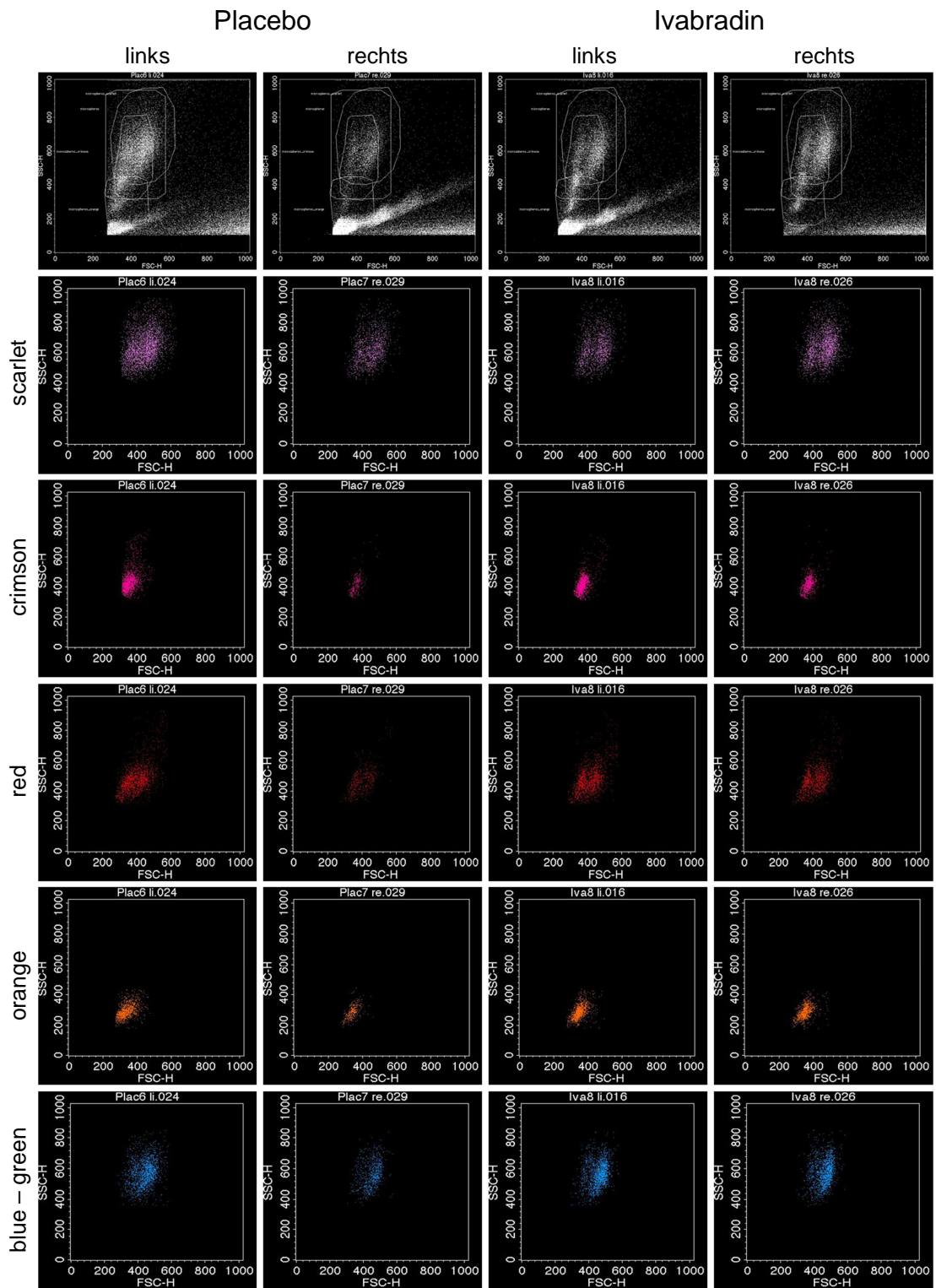


Abb. 10: FACS – Analyse des lysierten Gewebes nach Perfusion mit Mikrosphären. Durch die Behandlung mit Ivabradin werden in beiden Hinterläufen fast gleich viele Mikrosphären detektiert. Unter Placebogabe ist die Perfusion im rechten, ligierten Bein deutlich vermindert.

### 5.2.2 Die Behandlung mit Ivabradin führt zu einer höheren Dichte an kaliberstarken Kollateralgefäßen

MicroFil – Angiographien zeigten nach der Behandlung mit Ivabradin eine höhere Dichte an kaliberstarken Kollateralgefäßen (Abb. 11).

Während der Effekt einen Tag nach der Ligatur der A. femoralis noch nicht zu beobachten war, imponierten 3 Tage und 7 Tage nach Ligatur mehr und größere Kollateralgefäße nach Präparation des M. adduktor magnus in den mit Ivabradin behandelten Tieren als in der Kontrollgruppe (Abb. 12).

Diese zeigen zudem die für Kollateralarteriolen typische Korkenzieherform. Eine quantitative Analyse wurde nicht durchgeführt.

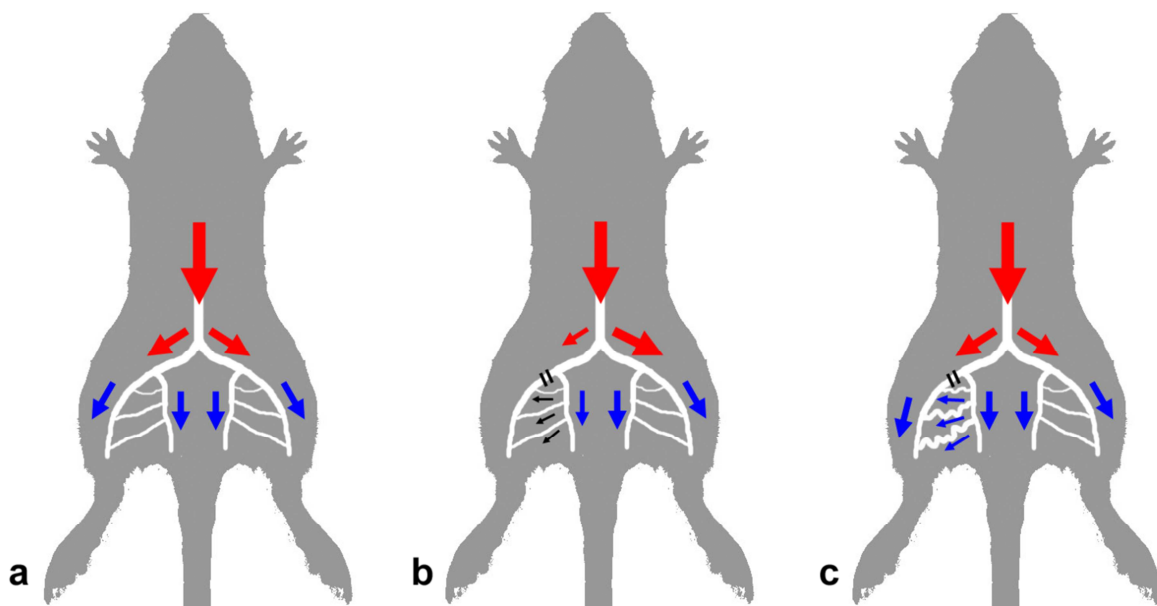


Abb. 11: Schema der Perfusionswiederherstellung durch Arteriogenese. Zu sehen ist eine Maus vor (a), direkt nach (b) und 7 Tage nach Ligatur der rechten A. femoralis (c). Direkt nach der Ligatur (b) nimmt der Fluss durch das rechte Bein ab (rote und blaue Pfeile). Durch den Verschluss eines Gefäßes steigt der Scherstress (schwarze Pfeile) auf die bestehenden, kapillären Kollateralgefäße. Diese wachsen nach einigen Tagen zu arteriellen Gefäßen heran (c) und stellen die arterielle Gefäßversorgung im Gebiet der A. femoralis wieder her (blaue Pfeile).



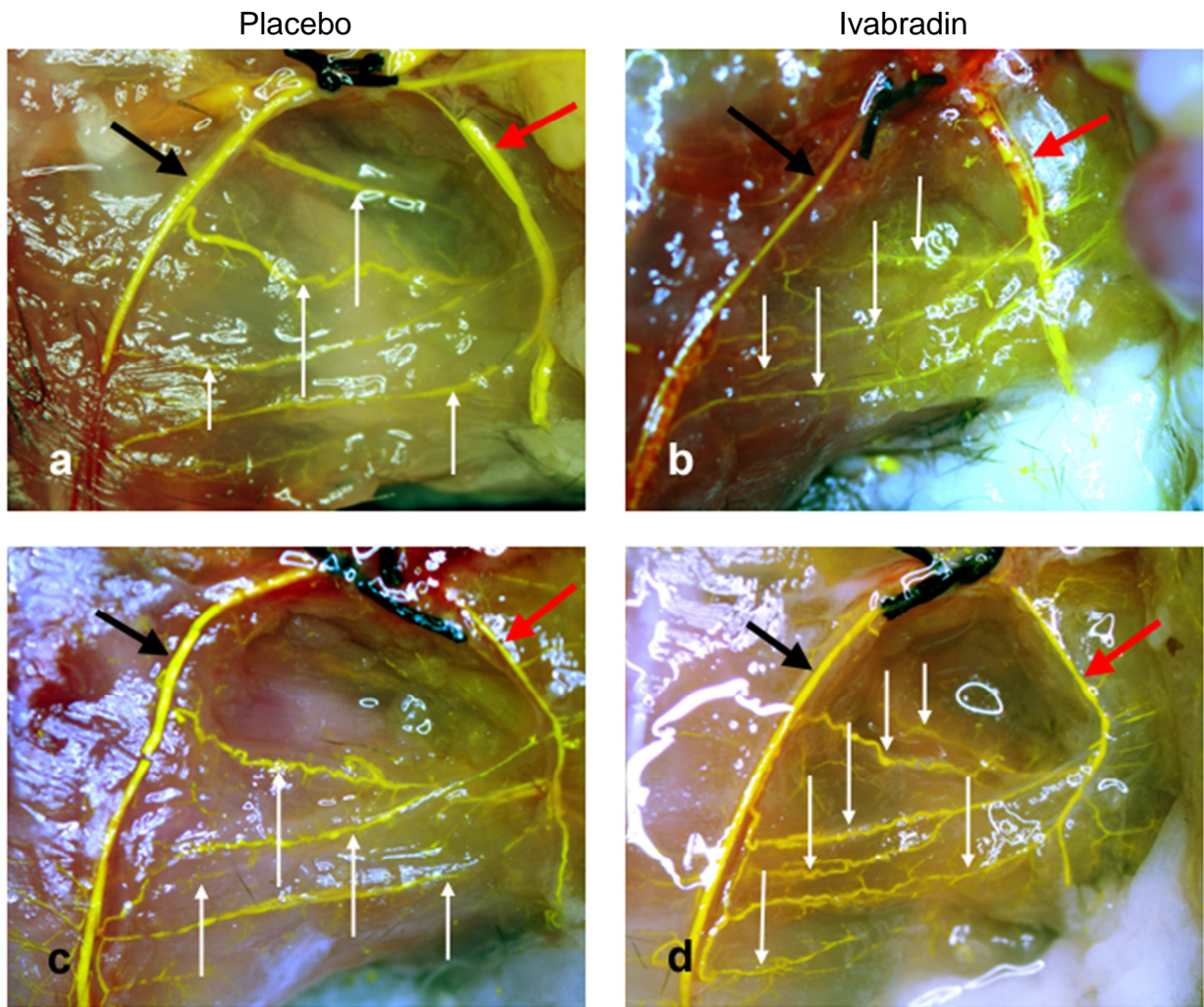


Abb. 12: Angiographien jeweils 3 (a, b) und 7 Tage (c, d) nach Ligatur der rechten A. femoralis (schwarzer Knoten Bildmitte oben). Erkennbar sind die A. femoralis (schwarzer Pfeil), die A. profunda femoris (roter Pfeil, Abgang proximal der Ligatur), sowie dazwischenliegende Kollateralgefäße (weiße Pfeile). Der scheinbar größere Gefäßdurchmesser der A. profunda femoris (a, b) resultiert aus einer retrograden Füllung der begleitenden Vene.

## 5.3 Immunhistochemie

### 5.3.1 Ivabradin führt nicht zur Verminderung von oxidativem Stress in Gefäßmuskelzellen

Eine qualitative Aussage zum oxidativen Status der Zelle lässt sich durch Anfärbung der Zellkerne mit Dihydroethidium (DHE) erreichen, welches ein Marker für oxidativen Stress darstellt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen placebo – und ivabradinbehandelten ApoE<sup>-/-</sup> - Tieren ( $0,579 \pm 0,11$  in der Kontrollgruppe (n = 5) vs.  $0,551 \pm 0,06$  in der Behandlungsgruppe (n = 5); p = 0,836; s. Abb. 14).

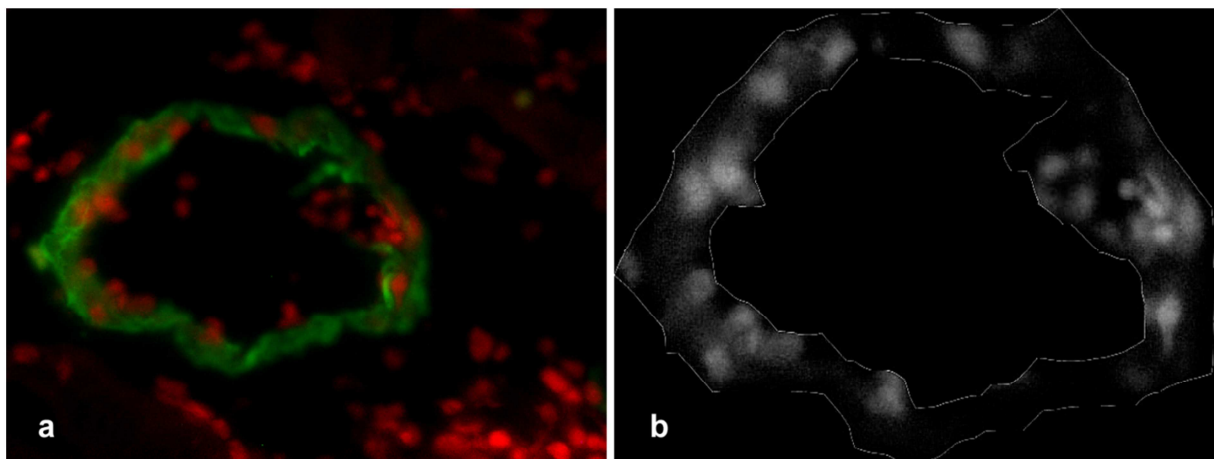


Abb. 13: Aufnahme eines DHE – gefärbten Kollateralgefäßes. In grün sind die glatten Gefäßmuskelzellen angefärbt, in rot die Zellkerne zu erkennen (a). Zur Auswertung wurde das Gefäß ausgeschnitten und der rote Farbkanal in Graustufen umgewandelt (b).

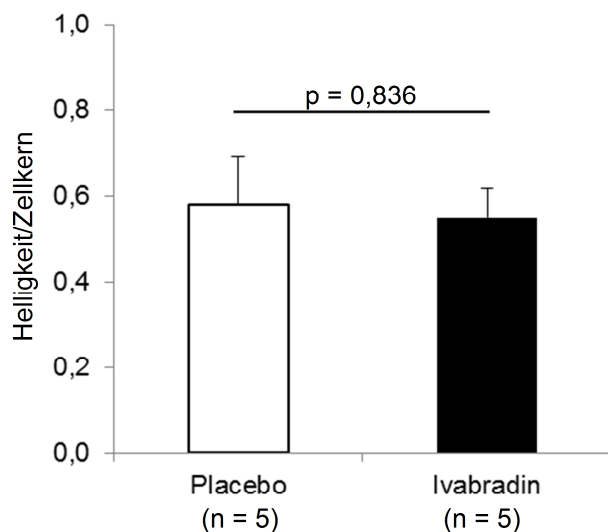


Abb. 14: Auswertung der DHE – Färbung des kapillarisierten Adduktorgewebes von ApoE<sup>-/-</sup> – Mäusen in der relativen Einheit „Helligkeit/Zellkern“. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen Kontroll – und Behandlungsgruppe.

### **5.3.2 Keine Erhöhung der Kapillarendichte im Muskelgewebe durch Herzfrequenzreduktion**

Die Bestimmung der Kapillardichte im Muskelgewebe wurde sowohl in Adduktoren – als auch Peronaeusgewebe durchgeführt. Hierzu wurden nach der Färbung die Anzahl der Kapillaren pro Gesichtsfeld ausgezählt und diese in Bezug zur Anzahl der Muskelfasern im gleichen Gesichtsfeld gesetzt. Die Bestimmung erfolgte daher in der relativen Einheit „Kapillaren/Muskelfaser“ (= *capillary/fiber ratio*).

Bei der unbehandelten ApoE<sup>-/-</sup> - Maus wurde im M. peronaeus kein Unterschied der Kapillardichte zwischen ligierter und unligierter Seite festgestellt (1,490 ± 0,06 Kapillaren/Muskelfaser links (n = 4) vs. 1,522 ± 0,10 Kapillaren/Muskelfaser rechts (n = 7); p = 0,792; s. *Abb. 15 a, b; Abb. 16*). Ebenso bestand in der Behandlungsgruppe kein Unterschied in der Kapillarisation des Peronaeusgewebe der ligierten und unligierten Seite (1,6 ± 0,13 Kapillaren/Muskelfaser links (n = 8) vs. 1,501 ± 0,11 Kapillaren/Muskelfaser rechts (n = 12); p = 0,583; s. *Abb. 15 c, d; Abb. 16*). Auch stellte sich kein Unterschied der Kapillarendichte zwischen Behandlungs – und der Placebogruppe in Peronaeusgewebe der rechten, ligierten Seite dar (1,522 ± 0,1 Kapillaren/Muskelfaser in der Placebogruppe (n = 7) vs. 1,501 ± 0,11 Kapillaren/Muskelfaser in der Behandlungsgruppe (n = 12), p = 0,893; s. *Abb. 16*).

Im Adduktorengewebe der rechten Seite wurde bei ApoE<sup>-/-</sup> - Mäusen kein Unterschied in der Kapillarisation zwischen der Placebo – und der Behandlungsgruppe festgestellt (1,247 ± 0,08 Kapillaren/Muskelfaser in der Placebogruppe (n = 5) vs. 1,384 ± 0,08 Kapillaren/Muskelfaser in der Behandlungsgruppe (n = 5); p = 0,2215; s. *Abb. 17 a, b; Abb. 18*).

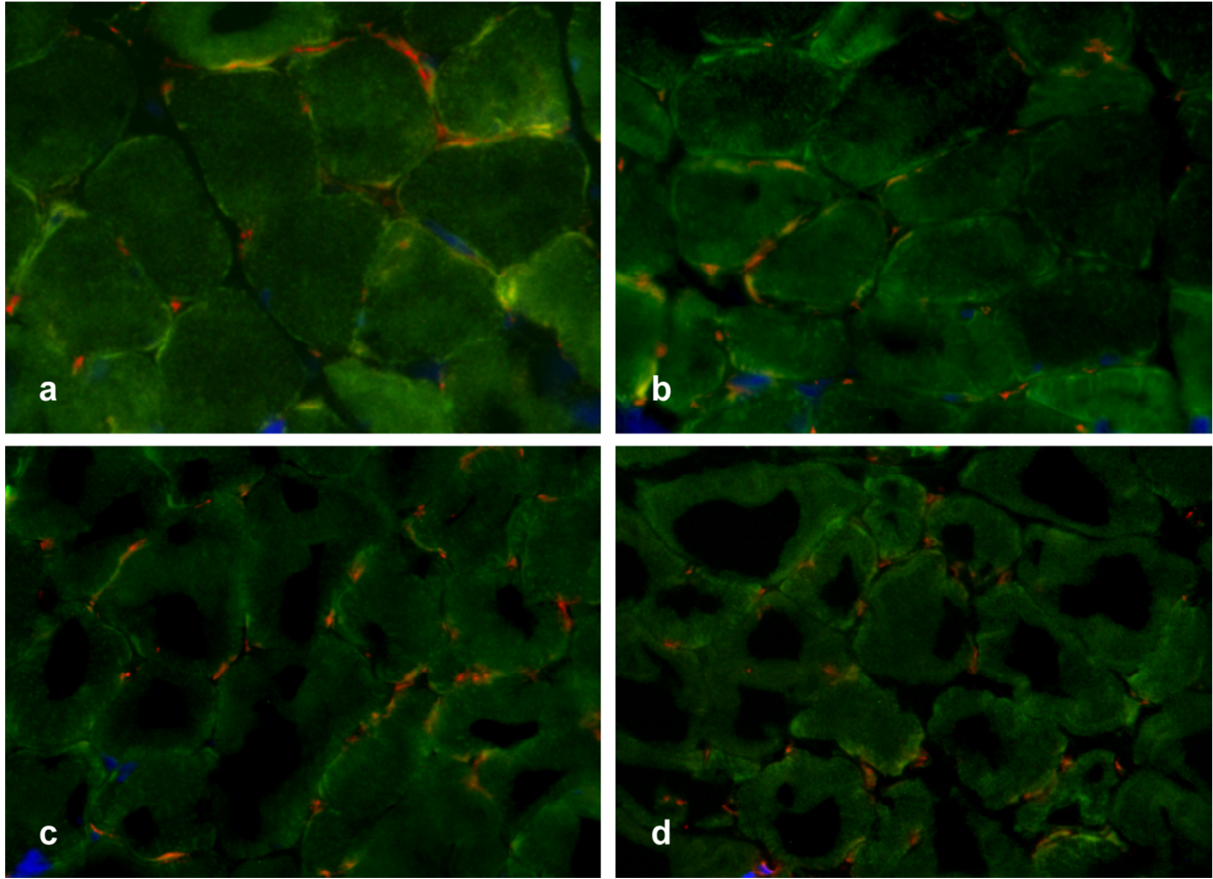


Abb. 15: CD31 – Färbung von Peroneusgewebe unbehauelter (a, b) und behauelter (c, d) ApoE<sup>-/-</sup> – Mäuse. Zu sehen ist Muskelgewebe (grün) unligierter linker (a, c) und ligierter rechter (b, d) Hinterläufe mit dazwischenliegenden Kapillaren (rot). Vereinzelt sind Zellkerne (blau) sichtbar.

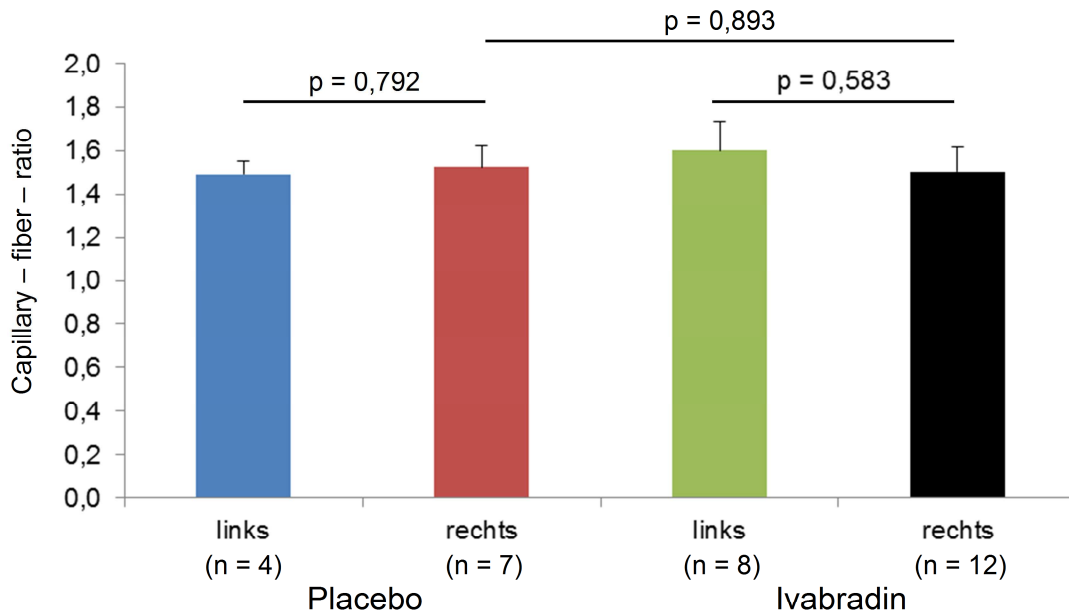


Abb. 16: Capillary - fiber - ratio im Peroneusgewebe von ApoE<sup>-/-</sup> – Mäusen. Es zeigten sich weder Unterschiede zwischen ligierter und unligierter Seite noch zwischen Behandlungs - und Kontrollgruppe.

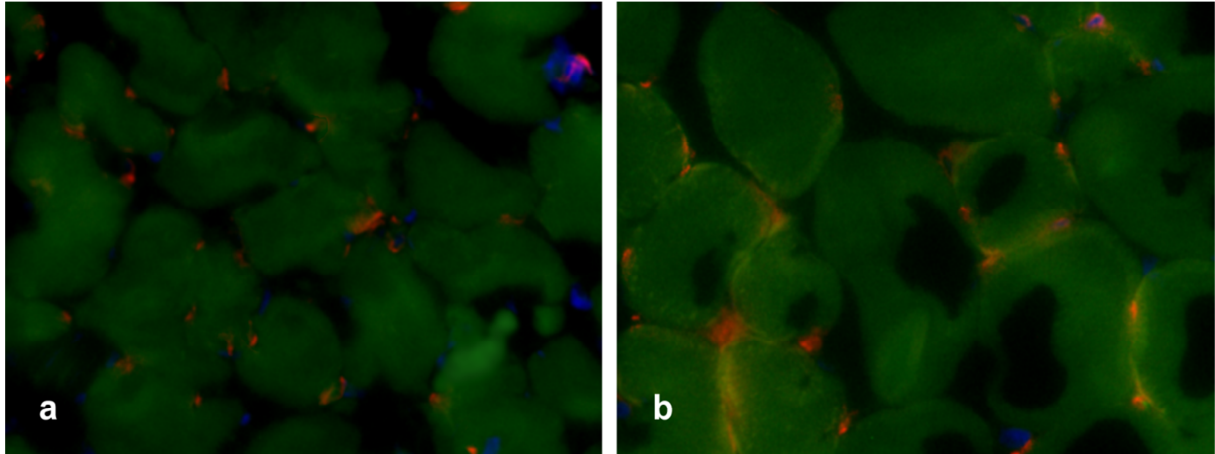


Abb. 17: CD31 – Färbung von Adduktorgewebe des rechten Hinterlaufs unbehandelter (a) und behandelter (b) ApoE<sup>-/-</sup> – Mäuse. Zwischen dem Muskelgewebe (grün) sind Kapillaren (rot) und vereinzelt Zellkerne (blau) sichtbar.

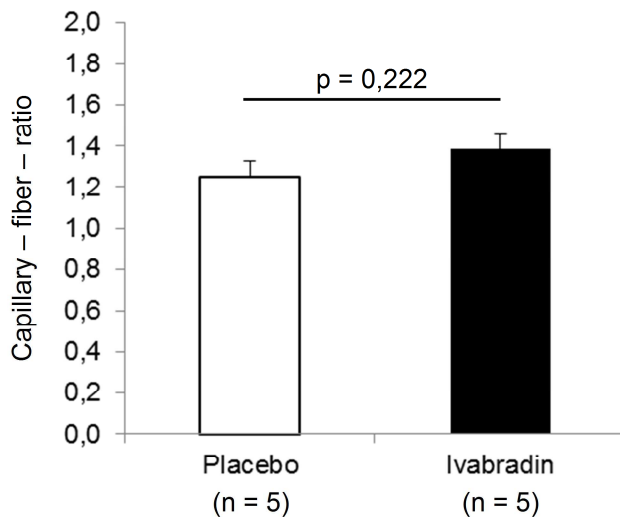


Abb. 18: *Capillary – fiber – ratio* im Gewebe rechter Adduktoren von ApoE<sup>-/-</sup> – Mäusen. Es konnte kein Unterschied zwischen Ivabradin – behandelten Tieren und der Kontrollgruppe festgestellt werden.

In Bl6 – Wildtypmäusen wurde weiterhin die Kapillarendichte im Gewebe des M. peroneus der ligierten Seite bestimmt. Auch hier wurde kein signifikanter Unterschied zwischen Placebo – und Behandlungsgruppe nachgewiesen ( $1,61 \pm 0,07$  Kapillaren/Muskelfaser in der Placebogruppe (n = 12) vs.  $1,78 \pm 0,12$  Kapillaren/Muskelfaser in der Behandlungsgruppe (n = 12); p = 0,266; s. Abb. 19 a, b; Abb 20). Ebenfalls in Bl6 – Wildtypmäusen wurde im M. adductor magnus der ligierten Seite kein Unterschied in der Kapillarendichte zwischen behandelten und nicht behandelten Mäusen gezeigt ( $1,673 \pm 0,11$  Kapillaren/Muskelfaser in der Placebogruppe (n = 5) vs.  $1,744 \pm 0,1$  Kapillaren/Muskelfaser in der Behandlungsgruppe (n = 5); p = 0,643; s. Abb. 21 a, b; Abb .22).

ApoE<sup>-/-</sup> – Mäuse zeigten insgesamt unabhängig von der Behandlung weniger Kapillaren/Muskelfaser als Wildtypmäuse.

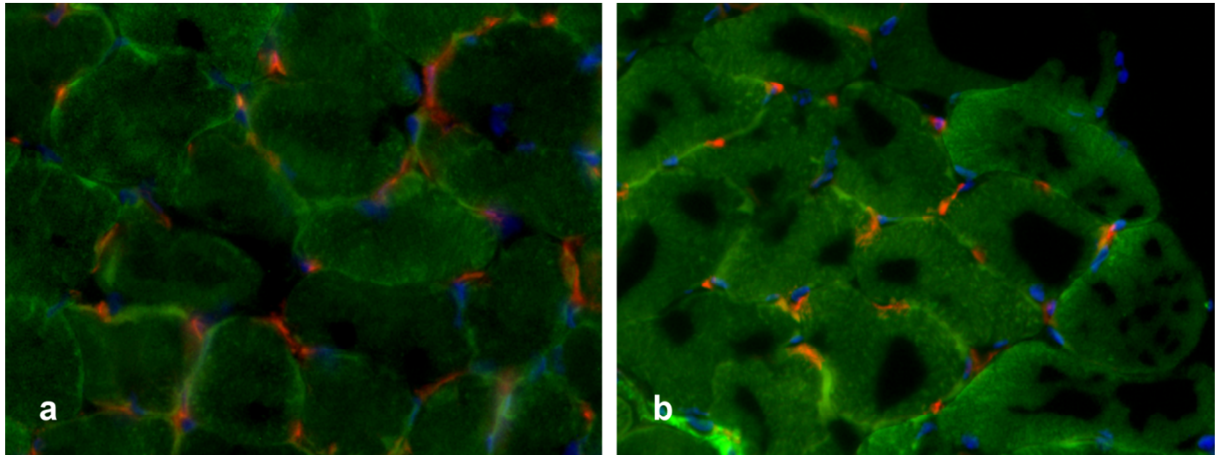


Abb. 19: CD31 – Färbung von Peroneusgewebe des rechten Hinterlaufs unbehandelter (a) und behandelter (b) B16 – Mäuse. Zu erkennen sind Kapillaren (rot) und Zellkerne (blau) zwischen Muskelzellen.

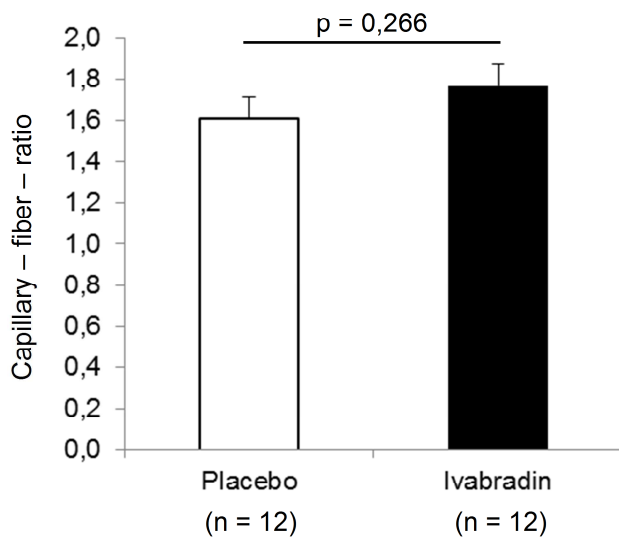


Abb. 20: *Capillary – fiber – ratio* im Peroneusgewebe rechter Hinterläufe von B16 – Mäusen. Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Kapillarisation zwischen der Ivabradin – und der Placebogruppe.

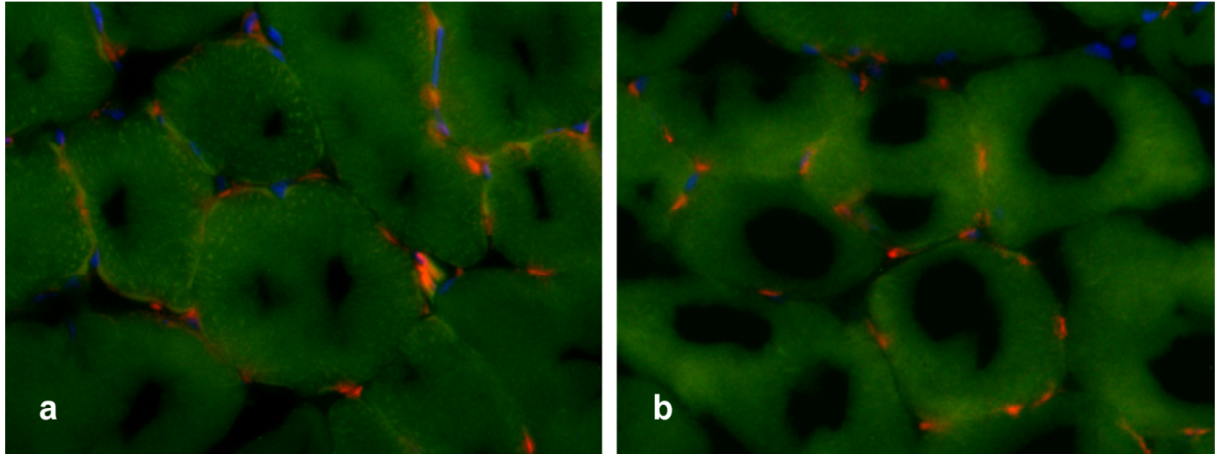


Abb. 21: CD31 – Färbung von Adduktorgewebe des rechten Hinterlaufs unbehandelter (a) und behandelter (b) Wildtypmäuse. Randständige Zellkerne (blau) sind vereinzelt in Muskelfasern (grün) sichtbar. Dazwischen sieht man Kapillaren (rot).

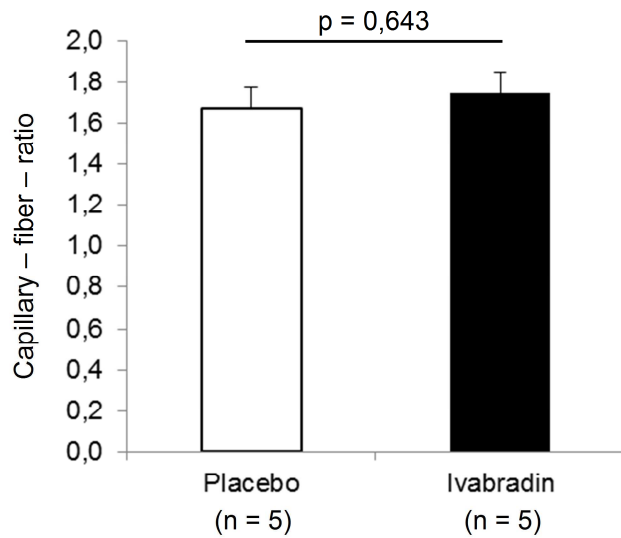


Abb. 22: Capillary – fiber – ratio im Gewebe des rechten M. adductor magnus von Wildtypmäusen. Zwischen der Placebo – und der mit Ivabradin behandelten Gruppe waren keine Unterschiede zu sehen.

### 5.3.3 Herzfrequenzreduktion durch Ivabradin führt zu Verminderung des Desmingehalts in Kollateralgefäßen

Es wurde eine signifikante Mindereexpression von Desmin in Gefäßen des rechten M. adduktor magnus von behandelten ApoE<sup>-/-</sup> - Mäusen gegenüber ApoE<sup>-/-</sup> - Mäusen, die nicht mit Ivabradin behandelt wurden, beobachtet (18,921 ± 1,63 in der Kontrollgruppe (n = 5) vs. 12,803 ± 1,35 in der Behandlungsgruppe (n = 5); p = 0,032; s. Abb. 23 a, b; Abb. 24).

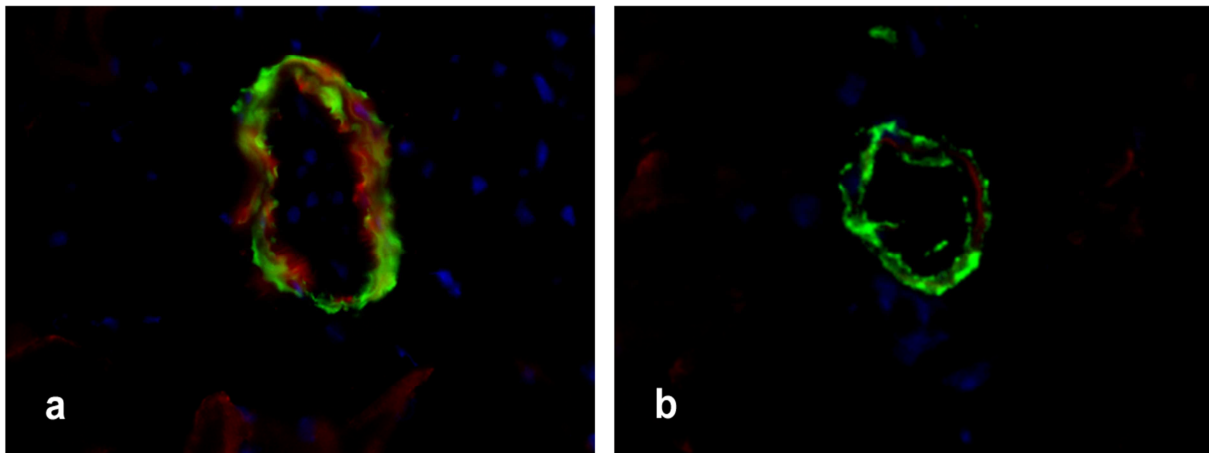


Abb. 23: Färbung zytoskelettalen Desmins im kollateralisierten Adduktorengewebe des rechten Hinterlaufs von mit Ivabradin behandelten ApoE<sup>-/-</sup> - Mäusen (b) und der Kontrollgruppe (a). In der Gefäßwand (grün) ist Desmin (rot) zu sehen. Vereinzelt sieht man Zellkerne (blau).

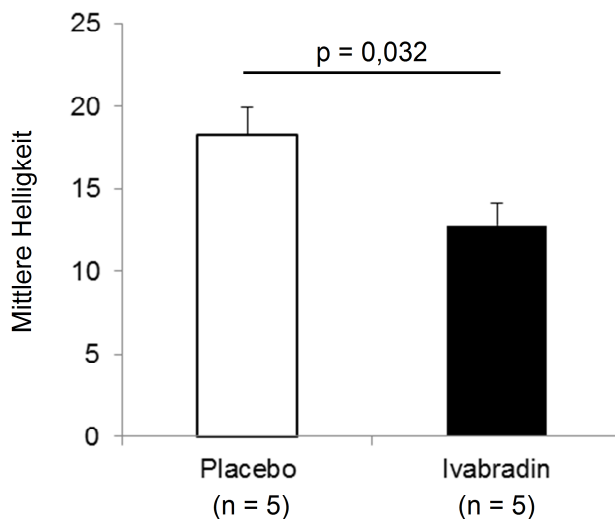


Abb. 24: Mittlere Helligkeit der Gefäße im Adduktorengewebe der rechten Seite von ApoE<sup>-/-</sup> - Mäusen nach Desmin - Färbung. Unter Ivabradin vermindert sich der Desmingehalt in der Gefäßwand signifikant.



### 5.3.4 Keine Unterschiede in der Anzahl perivaskulärer Makrophagen zwischen Behandlungen – und Kontrollgruppe

Bei der Zählung perivaskulärer Makrophagen wurden Positivitäten nach MoMA – Färbung gezählt und deren Anzahl auf die Zahl der Gefäße bezogen.

Die Bestimmung erfolgte daher in der relativen Einheit „Makrophagen/Gefäß“.

Es zeigte sich kein Unterschied zwischen der Anzahl perivaskulärer Makrophagen im Gewebe des M. adduktor magnus von ApoE<sup>-/-</sup> - Mäusen zwischen Placebo – und Behandlungsgruppe (2,828 ± 0,36 Makrophagen/Gefäß in der Placebogruppe (n = 5) vs. 2,561 ± 0,40 Makrophagen/Gefäß in der Behandlungsgruppe (n = 5); p = 0,623; s. Abb. 25 a, b; Abb. 26).

Ebenso wurde bei Bl6 – Wildtypmäusen kein Unterschied im Auftreten perivaskulärer Makrophagen im Gewebe des M. adduktor magnus zwischen einer Kontrollgruppe und einer mit Ivabradin behandelten Gruppe festgestellt (3,319 ± 0,53 Makrophagen/Gefäß in der Kontrollgruppe (n = 12) vs. 3,944 ± 0,64 Makrophagen/Gefäß in der Behandlungsgruppe (n = 12); p = 0,459; s. Abb. 26).

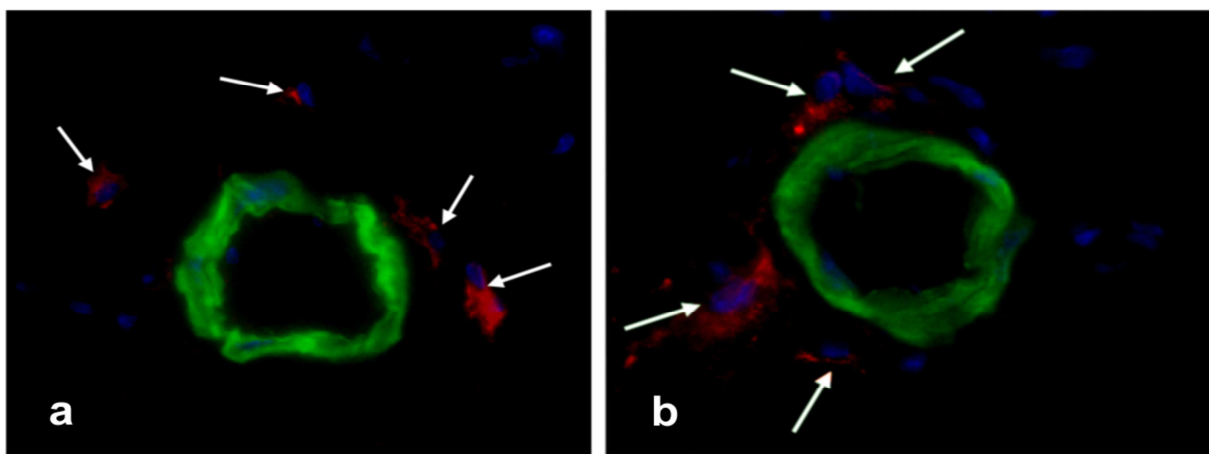


Abb. 25: MoMA – Färbung von rechten Adduktoren unbehandelter (a) und Ivabradinbehandelter (b) ApoE<sup>-/-</sup> – Mäuse. Neben dem Gefäß (grün) sind mehrere Makrophagen (rot, weiße Pfeile) zu sehen.

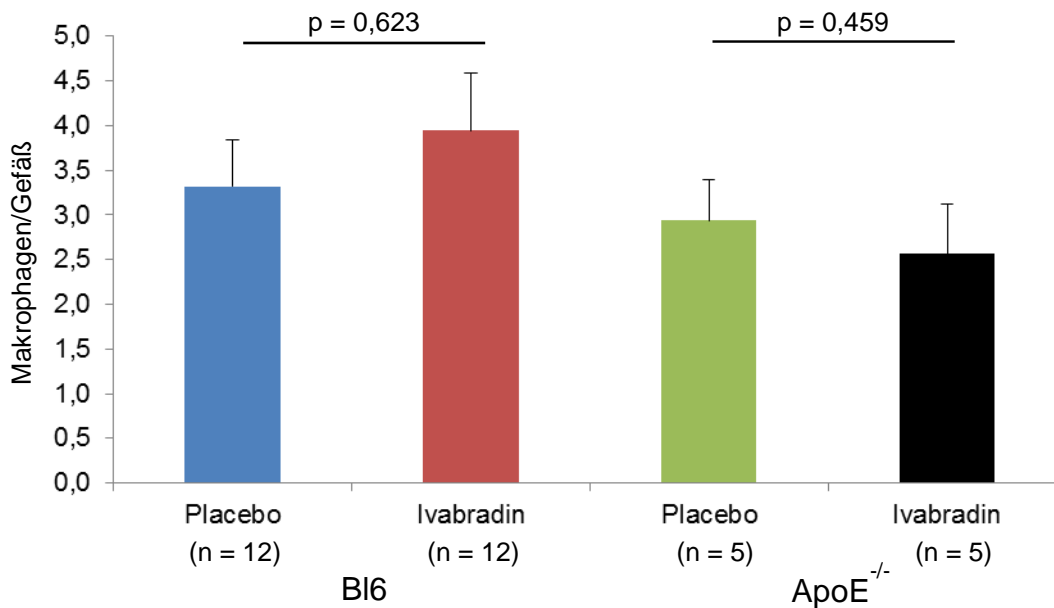


Abb. 26: Makrophagen/Gefäß in rechten Adduktoren nach MoMA – Färbung. Weder in Wildtyp – noch in ApoE<sup>-/-</sup> – Mäusen fand sich ein Unterschied zwischen der Behandelungs – und der Kontrollgruppe.

### 5.3.5 Keine Verminderung des Smoothelin – Gehalts in Gefäßmuskelzellen durch Ivabradin

Die Auswertung der Smoothelin – Färbung erfolgte analog zur Desmin – Färbung, auch hier wurde nach Extraktion eines Farbkanals und Umwandlung in Graustufen die relative Helligkeit dieses Farbkanals gemessen. Die relative Helligkeit korreliert mit der Expression von Smoothelin im Gefäß. Insgesamt zeigte sich kein Unterschied in der Expression von Smoothelin in Gefäßen im M. adductor magnus von ApoE<sup>-/-</sup> - Mäusen zwischen unbehandelten Mäusen und einer mit Ivabradin behandelten Gruppe (25,84 ± 6,75 in der Kontrollgruppe (n = 4) vs. 26,90 ± 4,45 in der behandelten Gruppe (n = 5); p = 0,895; s. Abb. 27 a, b; Abb. 28).

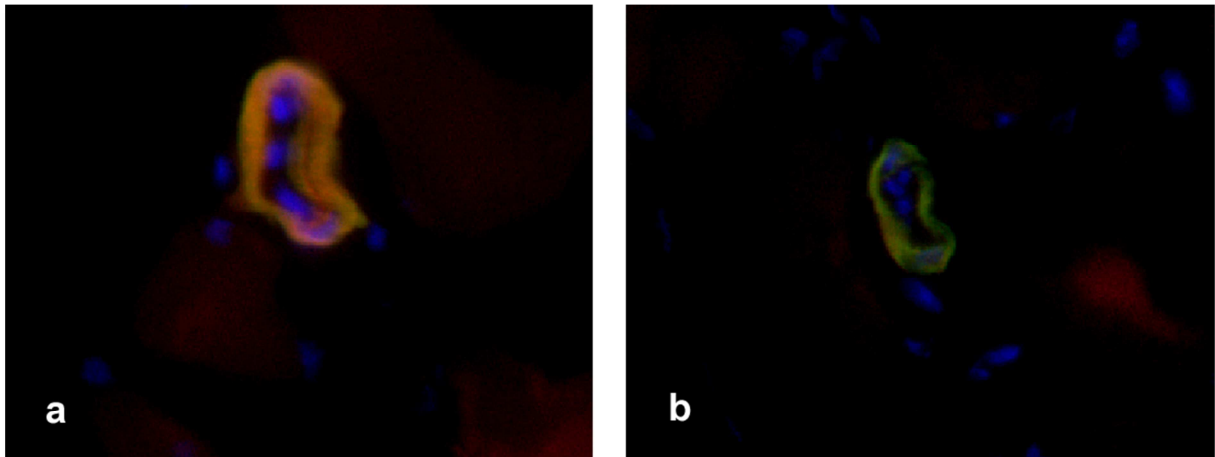


Abb. 27: Smoothelinfärbung von kollateralisiertem Adduktorengewebe des rechten Hinterlaufs von mit Ivabradin behandelten ApoE<sup>-/-</sup> – Mäusen (b) und der Kontrollgruppe (a). In der Gefäßwand (grün) ist zytoskelettales Smoothelin (rot) zu sehen. Um das Gefäß befinden sich mehrere Zellkerne (blau).

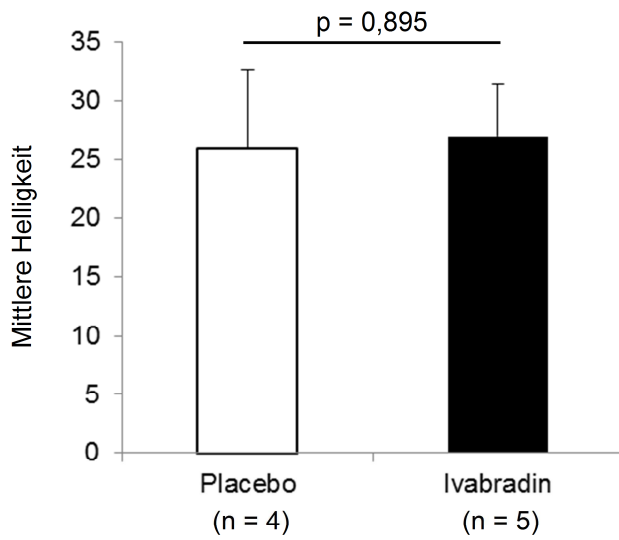


Abb. 28: Mittlere Helligkeit der Gefäße nach Smoothelin – Färbung rechter Adduktoren. Es findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen Behandlungs – und der Placebogruppe in ApoE<sup>-/-</sup> – Mäusen.

## 5.4 eNOS – Proteinexpression

### 5.4.1 Steigerung der eNOS – Expression durch Ivabradin sowie erhöhte Phosphorylierung von eNOS

Bei der Western Blot – Analyse endothelialer NO – Synthase (eNOS) mit GAPDH als Laufkontrolle zeigte sich eine vermehrte Expression von eNOS in der Behandlungs – gruppe im Vergleich zur Placebogruppe ( $0,154 \pm 0,037$  normalisierte relative Dichteeinheiten in der Kontrollgruppe ( $n = 8$ ) vs.  $0,272 \pm 0,039$  normalisierte relative Dichteeinheiten in der Behandlungsgruppe ( $n = 8$ );  $p = 0,048$ ; s. *Abb. 29; Abb. 30*). Insgesamt entspricht dies einer Steigerung der eNOS – Expression auf 177 %.

Bei der Analyse von phosphoryliertem (Ser1177) eNOS (p – eNOS) wurde auch eine gesteigerte Phosphorylierung und damit Aktivierung von eNOS nachgewiesen ( $1,813 \pm 0,191$  normalisierte relative Dichteeinheiten in der Kontrollgruppe ( $n = 15$ ) vs.  $3,369 \pm 0,575$  normalisierte relative Dichteeinheiten in der Behandlungs – gruppe ( $n = 16$ );  $p = 0,018$ ; s. *Abb. 31; Abb. 32*). Dies entspricht insgesamt einer erhöhten Expression von eNOS (s. oben) bei unverändertem Aktivierungsstatus ( $100 \pm 12\%$  in der Placebogruppe ( $n = 8$ ) vs.  $90,8 \pm 16,9\%$  in der Ivabradin – gruppe ( $n = 8$ );  $p = 0,672$ ).

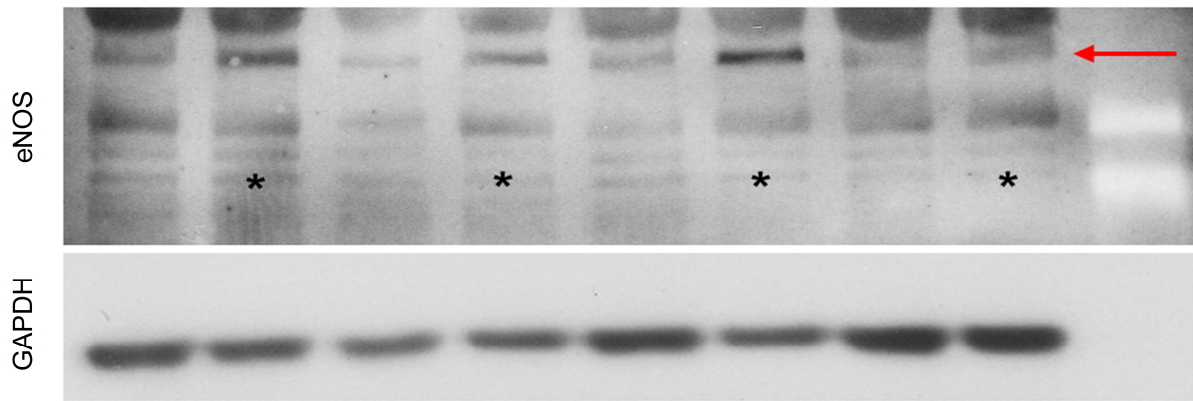


Abb. 29: eNOS – Western Blot des rechten Adduktorgewebes behandelter (\*) und unbehalteter ApoE<sup>-/-</sup> – Mäuse. Zu sehen ist eNOS als Bande bei 140 kDa (oberes Bild, roter Pfeil) und GAPDH bei 36 kDa (unteres Bild).

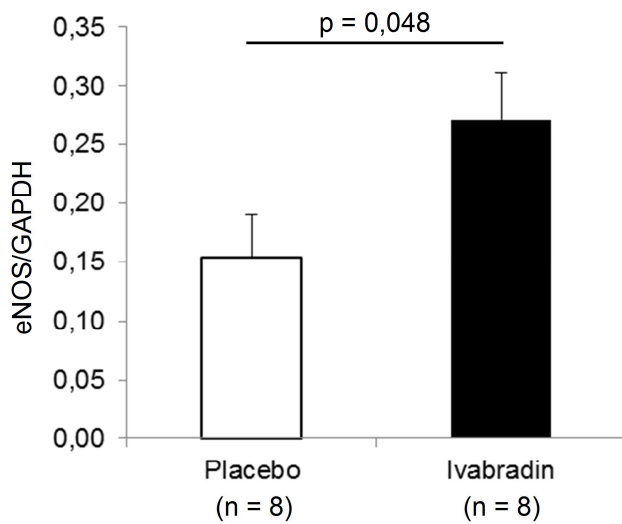


Abb. 30: eNOS – Expression im Adduktorgewebe nach Western Blot. Unter Ivabradin wird signifikant mehr eNOS exprimiert als in der Kontrollgruppe.

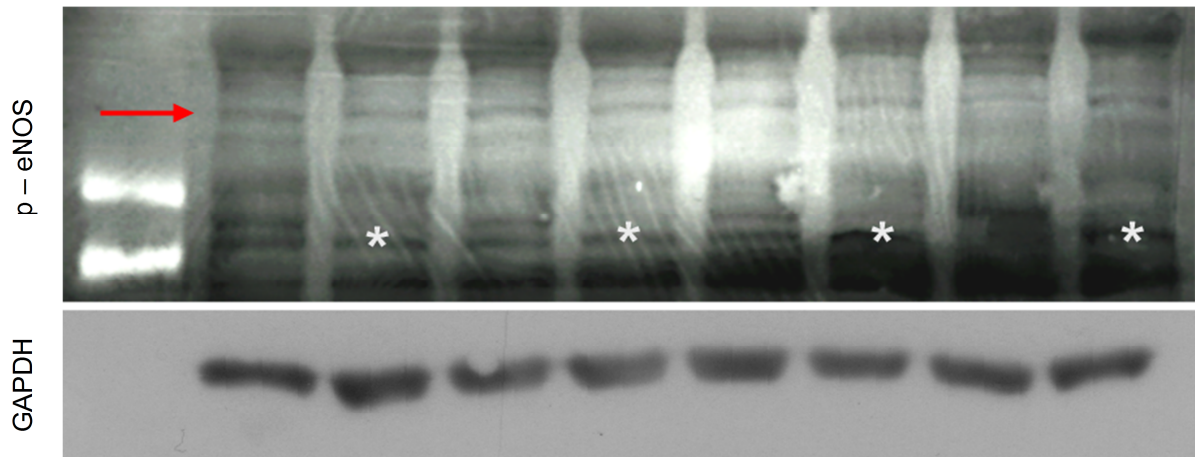


Abb. 31: phospho – eNOS (Ser1177) – Western Blot von Gewebe des rechten M. adductor magnus von ApoE<sup>-/-</sup> – Mäusen aus der Kontroll – und der Behandlungsgruppe (\*). p – eNOS stellt sich als Bande bei 140 kDa dar (roter Pfeil, oberes Bild), GAPDH als Bande bei 36 kDa (unteres Bild).

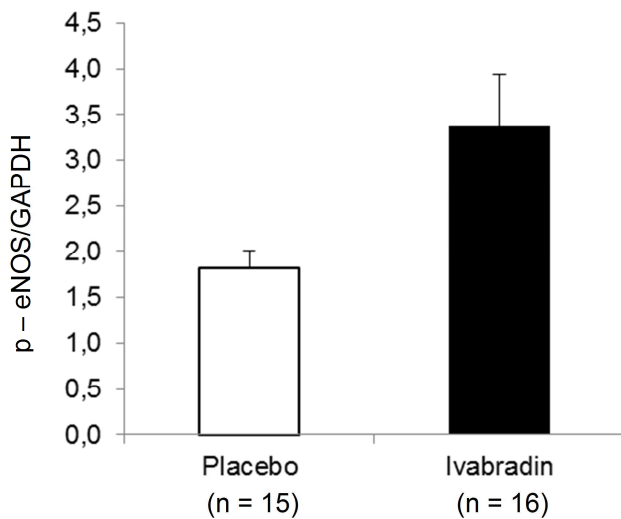


Abb. 32: phospho – eNOS (Ser1177) – Expression nach Western Blot. Es ist in der Behandlungsgruppe signifikant mehr p – eNOS – Protein im Adduktorengewebe vorhanden als in der Kontrollgruppe.

## 5.5 qRT – PCR – Analysen

### 5.5.1 Reduktion der systemischen Zytokinexpression in mononukleären Zellen nach Herzfrequenzreduktion

In peripher zirkulierenden mononukleären Zellen wurden inflammatorische Zytokine gemessen. Insgesamt wurde die relative Expression der Zytokine betrachtet und nicht die absolute Expression. Hierbei wurde die absolute Expression des Zielgens auf die Expression eines konstitutionell exprimierten Housekeeping – Gens bezogen.

Mit Ivabradin behandelte ApoE<sup>-/-</sup> - Mäuse zeigten hierbei eine signifikant geringere relative Expression von MCP1 in mononukleären Zellen verglichen mit ApoE<sup>-/-</sup> - Mäusen aus der Kontrollgruppe ( $4,219 \pm 1,53$  in der Kontrollgruppe (n = 6) vs.  $0,724 \pm 0,18$  in der Behandlungsgruppe (n = 6); p = 0,047; s. Abb. 33 a).

Ebenso war die Expression des MCP1 – Rezeptors CCR2 in MNCs von ApoE<sup>-/-</sup> - Mäusen der Behandlungsgruppe gegenüber Tieren der Kontrollgruppe deutlich vermindert ( $4,598 \pm 1,754$  in der Placebo – Gruppe (n = 6) vs.  $0,435 \pm 0,180$  in der Behandlungsgruppe (n = 6); p = 0,040; s. Abb. 33 b).

Die relative Expression von TGFβ in peripher zirkulierenden mononukleären Zellen war ebenfalls in der Behandlungsgruppe signifikant geringer als in der mit Placebo behandelten Gruppe von ApoE<sup>-/-</sup> - Mäusen ( $5,128 \pm 1,811$  in der Kontrollgruppe (n = 6) vs.  $0,867 \pm 0,279$  in der Behandlungsgruppe (n = 6); p = 0,042; s. Abb. 33 c).

Für die relative Expression von IL6 wurde eine signifikante Minderexpression in MNCs unter einer Behandlung mit Ivabradin gezeigt ( $8,55 \pm 3,96$  unter Placebo (n = 10) vs.  $0,72 \pm 0,73$  unter Ivabradin (n = 10); p = 0,045; s. Abb.33 d).

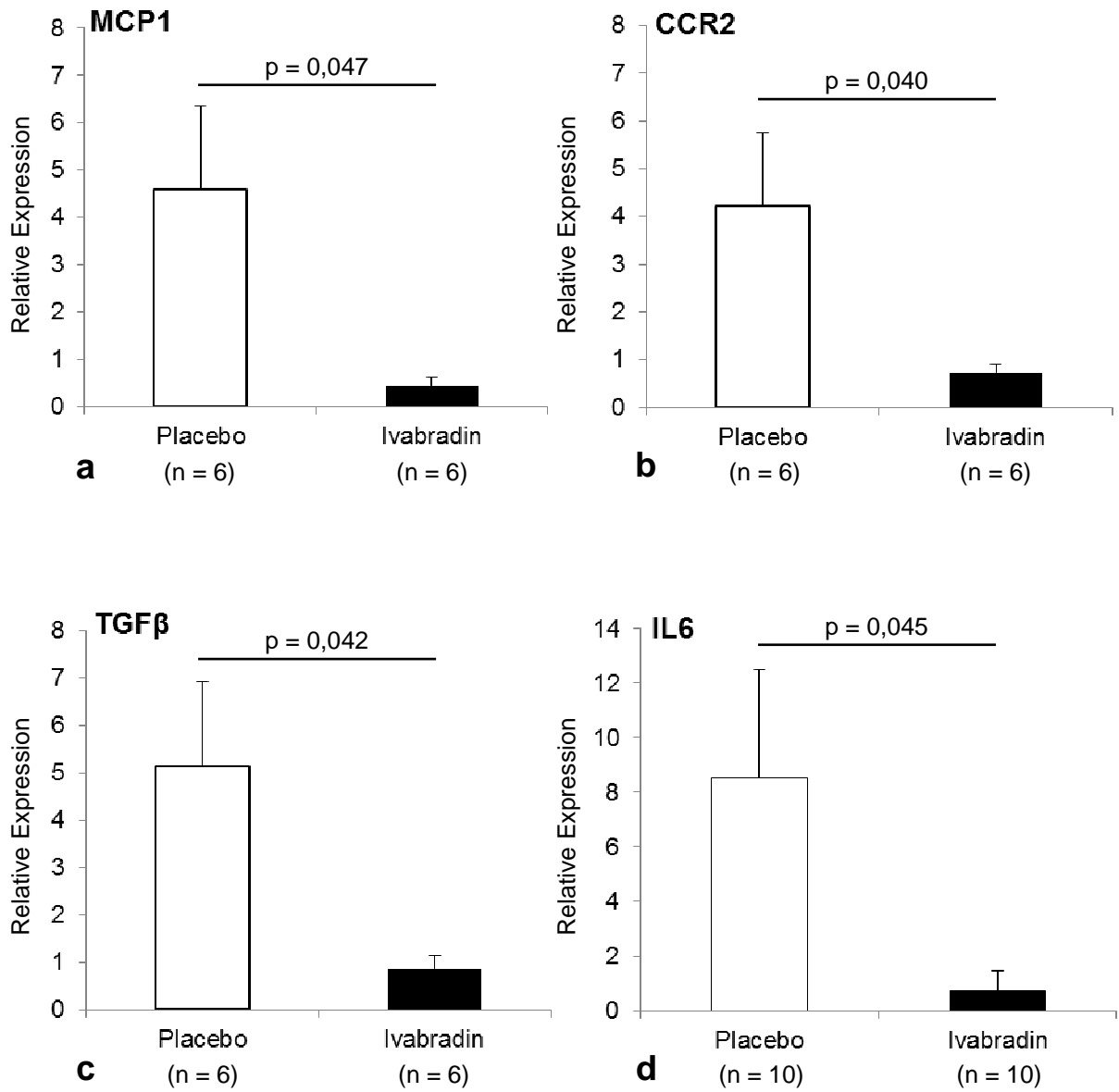


Abb. 33: Unter Therapie mit Ivabradin zeigt sich eine deutliche Verminderung der Expression der inflammatorischen Zytokine MCP1 (a), CCR2 (b), TGFβ (c) sowie IL6 (d) in mononukleären Zellen.



### 5.5.2 Adduktoren

Zur Analyse des lokalen inflammatorischen Status im Adduktorgewebe von ApoE<sup>-/-</sup> - Mäusen wurden PCR – Analysen der ligierten und der unligierten Seite durchgeführt, die relative Expression jeder Seite durch Bezug auf die Expression eines Housekeeping – Gens bestimmt und die relative Expression beider Seiten zueinander in Bezug gesetzt. Desweiteren wurden mehrere Marker der Arteriogenese betrachtet, die Bestandteile des kontraktiven Apparates glatter Gefäßmuskelzellen sind und somit Rückschlüsse auf den dominierenden Phänotyp der Gefäßmuskelzellen im Gewebe zulassen. Auch hier wurde die relative Expression der Marker im Bezug der rechten zur linken Seite bestimmt.

Lokal im Adduktorgewebe von ApoE<sup>-/-</sup> - Mäusen wurde MCP1 in der Behandlungsgruppe nicht signifikant geringer exprimiert als unter Placebogabe ( $1,066 \pm 0,247$  in der Kontrollgruppe (n = 8) vs.  $0,830 \pm 0,256$  in der Behandlungsgruppe (n = 7); p = 0,564; s. *Abb. 34 a*). Ebenfalls lokal unverändert wurde der MCP1 – Rezeptor CCR2 exprimiert ( $1,364 \pm 0,378$  in der Kontrollgruppe (n = 8) vs.  $0,932 \pm 0,373$  in der Behandlungsgruppe (n = 7); p = 0,433; s. *Abb. 34 b*).

IL6 wurde unter Ivabradinabgabe nicht signifikant vermindert exprimiert als in der Kontrollgruppe, der in den peripher zirkulierenden mononukleären Zellen festgestellte Trend besteht im Adduktorgewebe nicht mehr ( $5,596 \pm 3,253$  in der Kontrollgruppe (n = 5) vs.  $1,381 \pm 0,645$  in der Behandlungsgruppe (n = 6); p = 0,197; s. *Abb. 34 c*).

TNF $\alpha$  wurde im Gewebe des M. adductor magnus unter Placebo – und Ivabradinabgabe praktisch unverändert exprimiert ( $0,784 \pm 0,375$  in der Kontrollgruppe (n = 7) vs.  $0,565 \pm 0,189$  in der Behandlungsgruppe (n = 7); p = 0,612; s. *Abb. 34 d*).

Hingegen wurden antiarteriogen wirkende inflammatorische Zytokine lokal im Adduktorgewebe vermindert exprimiert. So wurde CXCL11 im Gewebe signifikant vermindert nachgewiesen ( $3,854 \pm 0,6$  in der Kontrollgruppe (n = 9) vs.  $1,983 \pm 0,567$  in der Behandlungsgruppe (n = 9); p = 0,019; s. *Abb. 35 a*). Auch war die Expression von CXCL10 signifikant vermindert ( $5,05 \pm 4,99$  in der Kontrollgruppe (n = 10) vs.  $0,57 \pm 0,32$  in der Behandlungsgruppe (n = 10); p = 0,045; s. *Abb. 35 b*).

Bei der Untersuchung der Marker für laminaren Scherstress wurde bei ABRA kein signifikanter Unterschied zwischen der mit Ivabradin behandelten Gruppe und der Placebogruppe ( $1,093 \pm 0,185$  in der Kontrollgruppe (n = 8) vs.  $1,128 \pm 0,345$  in der

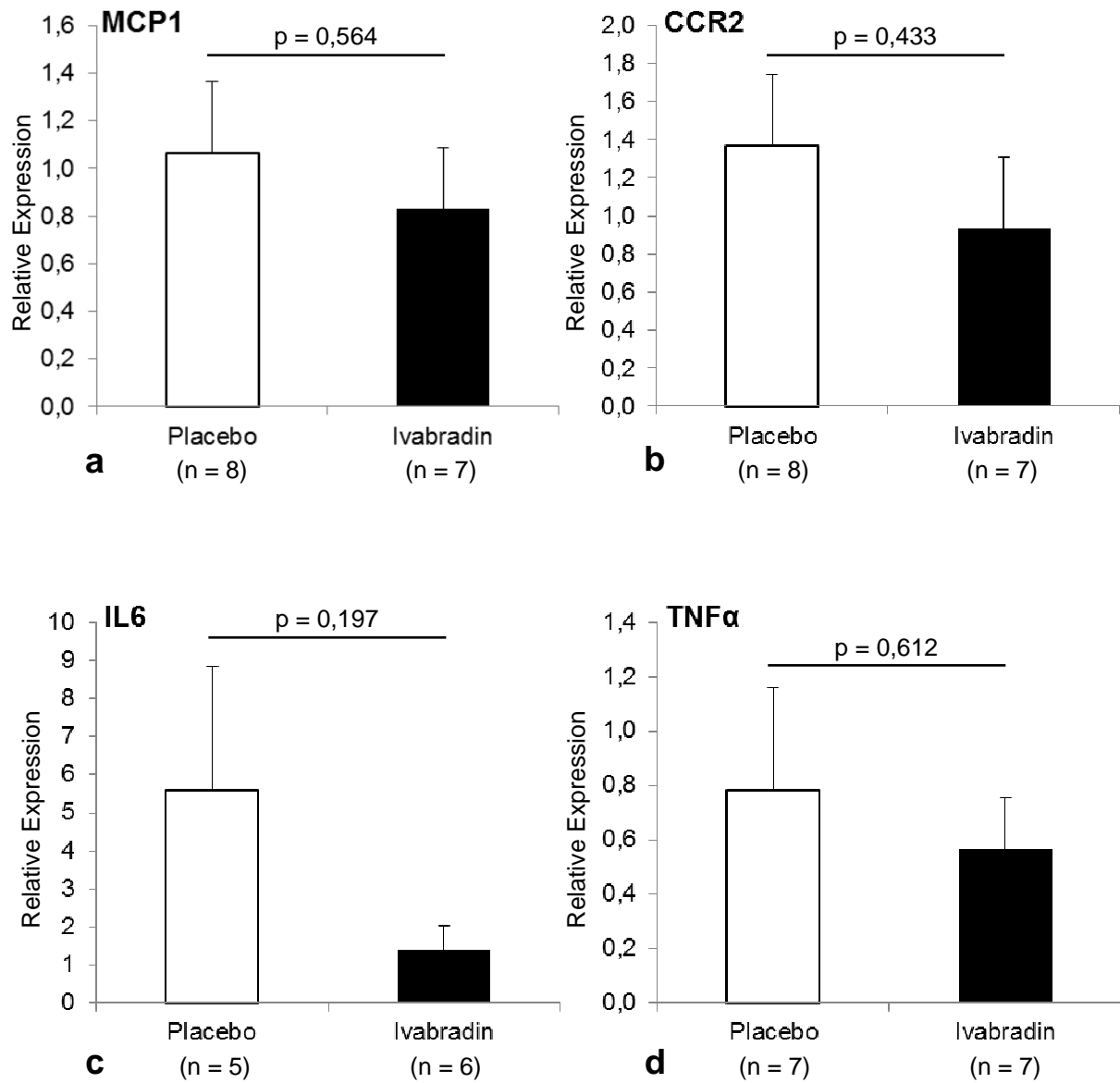


Abb. 34: Die Behandlung mit Ivabradin beeinflusst die mRNA – Expression der inflammatorischen Zytokine MCP1 (a), CR2 (b), IL6 (c) und TNF $\alpha$  (d) im Hinterlauf – gewebe nicht.

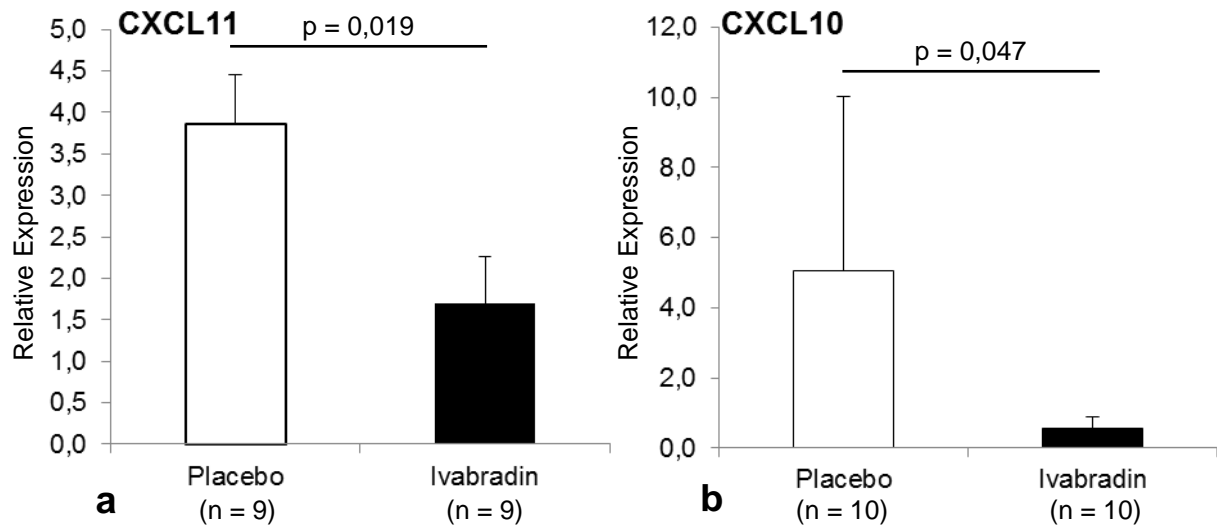


Abb. 35: Die Expression von CXCL11 (a) und CXCL 10 (b) wird durch eine Behandlung mit Ivabradin lokal signifikant vermindert.

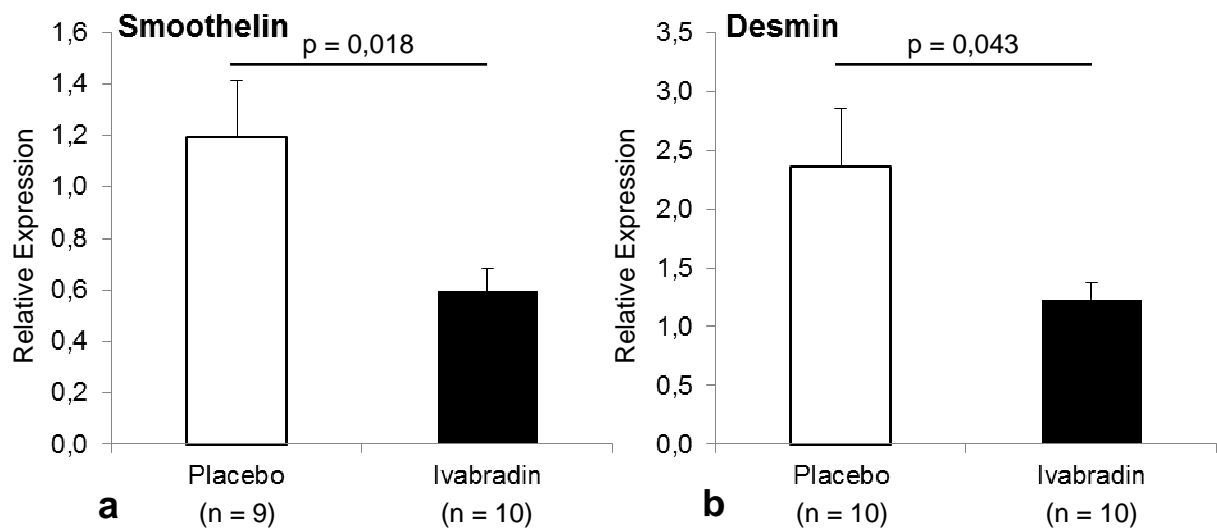


Abb. 36: Durch die Behandlung mit Ivabradin werden Smoothelin – (a) und Desmin – mRNA (b) im Hinterlaufgewebe vermindert exprimiert.

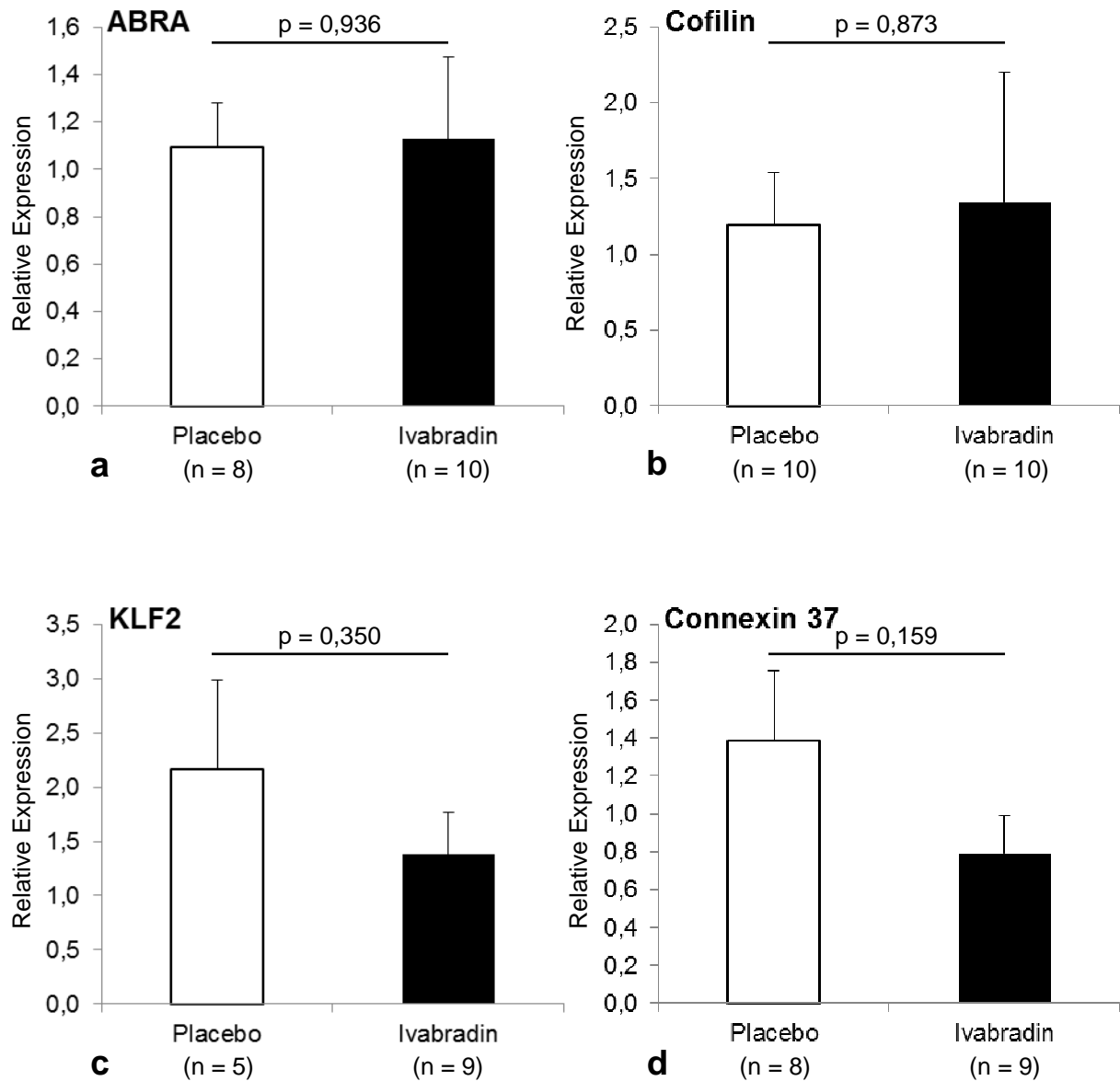


Abb. 37: Durch die Gabe von Ivabradin ändert sich die Expression von ABRA (a), Cofilin (b) und KLF2 (c) sowie Connexin 37 (d) im Gewebe des M. adductor magnus nicht.

Behandlungsgruppe (n = 10); p = 0,936; s. *Abb. 37 a*). Die Expression von Cofilin, einem weiteren aktinbindenden Protein, änderte sich ebenfalls nicht signifikant ( $1,195 \pm 0,343$  in der Kontrollgruppe (n = 10) vs.  $1,345 \pm 0,856$  in der Behandlungsgruppe (n = 10); p = 0,873; s. *Abb. 37 b*). Auch die Expression von KLF2 wurde durch die Behandlung nicht beeinflusst ( $2,168 \pm 0,820$  in der Kontrollgruppe (n = 5) vs.  $1,377 \pm 0,391$  in der Behandlungsgruppe (n = 9); p = 0,350; s. *Abb. 37 c*).

Im kontraktilem Apparat von Gefäßmuskelzellen vorkommendes Smoothelin wurde unter Ivabradin signifikant vermindert exprimiert als in der Kontrollgruppe ( $1,193 \pm 0,221$  in der Kontrollgruppe (n = 9) vs.  $0,595 \pm 0,088$  in der Behandlungsgruppe (n = 10); p = 0,018; s. *Abb. 36 a*). Auch die Expression von Desmin war in der Behandlungsgruppe signifikant geringer als in der Kontrollgruppe ( $2,359 \pm 0,5$  in der Kontrollgruppe (n = 10) vs.  $1,232 \pm 0,138$  in der Behandlungsgruppe (n = 10); p = 0,043; s. *Abb. 36 b*). Ein anderer früher Marker für kollateralarterioläres Wachstum, Connexin37, wurde hingegen unter Behandlung mit Ivabradin nicht vermindert exprimiert ( $1,389 \pm 0,366$  in der Kontrollgruppe (n = 8) vs.  $0,790 \pm 0,199$  in der Behandlungsgruppe (n = 9); p = 0,159; s. *Abb. 37 d*).

## 5.6 Arginin – Citrullin – Assay

### 5.6.1 *Ivabradin steigert die eNOS – Aktivität in Hinterläufen von ApoE<sup>-/-</sup> - Mäusen*

Die gemessene Radioaktivität wurde in der Einheit „Zerfälle / min“ angegeben. Hierbei zeigt sich eine signifikant gesteigerte Radioaktivität in der Citrullinfraktion der ApoE<sup>-/-</sup> - Tiere der Behandlungsgruppe gegenüber den ApoE<sup>-/-</sup> - Mäusen der Placebogruppe, was einer gesteigerten eNOS – Aktivität in der mit Ivabradin behandelten Gruppe entspricht ( $16019 \pm 354$  in der Kontrollgruppe (n = 10) vs.  $17842 \pm 558$  in der Behandlungsgruppe (n = 8); p = 0,021; s. *Abb. 39*).

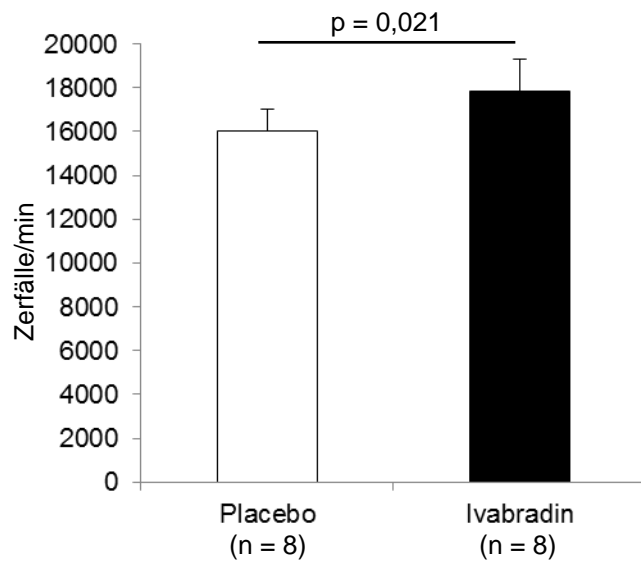


Abb. 38: Ivabradin führt zu einer gesteigerten NO-Synthese. Dies kann durch eine signifikant erhöhte Zerfallszahl pro Minute im Arginin – / Citrullin – Assay nachgewiesen werden.

## 6. Diskussion

Die Herzfrequenzreduktion mit dem  $I_f$  – Kanal – Inhibitor Ivabradin führte zu einer gesteigerten Arteriogenese nach Ligatur der A.femoralis im Hinterlauf von ApoE<sup>-/-</sup> – Mäusen. In gesunden Wildtypmäusen ohne endotheliale Dysfunktion wurde die Wiederherstellung der Perfusion nicht beeinflusst. Durch die Herzfrequenzreduktion wurde bei ApoE<sup>-/-</sup> – Mäusen die Expression und Phosphorylierung der endothelialen NO – Synthase sowie die NO-Vefügbarkeit in den Kollateralgefäßen des Hinterlaufgewebes gesteigert und die Endothelfunktion verbessert. Klassische inflammatorische Zytokine wurden hierbei systemisch herunterreguliert, aber blieben im Hinterlaufgewebe unbeeinflusst, während dort antiarteriogene Zytokine wie CXCL10 und CXCL11 vermindert exprimiert wurden. Desweiteren induzierte Ivabradin einen proliferativen Subtyp vaskulärer SMCs in Kollateralarterien von ApoE<sup>-/-</sup> – Mäusen.

Diese Ergebnisse sind übereinstimmend mit vorherigen Beobachtungen, die antioxidative und antiinflammatorische Effekte als zugrundeliegenden Mechanismus der Wiederherstellung der Endothelfunktion durch Herzfrequenzreduktion identifiziert haben (Custodis et al., 2008; Drouin et al., 2008).

Bei Perfusionsmessungen in ApoE<sup>-/-</sup> – Mäusen wurde unter Ivabradingabe eine deutliche Verbesserung der Hinterlaufperfusion nach einseitiger Femoralarterienligatur beobachtet. Die Möglichkeit, dass die festgestellten Effekte auf die Hinterlaufperfusion auf einen veränderten Gefäßtonus während der Perfusion zurückzuführen sind, kann ausgeschlossen werden, da die von uns durchgeführte Mikrosphärenperfusion unter maximaler Vasodilatation erfolgte. Dieses vom Vasotonus unabhängige Verfahren stellt derzeit den Goldstandard zur Bestimmung der Arteriogeneserate dar (Hofer et al., 2002).

In Western Blot – Analysen wurden nach Behandlung mit Ivabradin auf erhöhte Konzentrationen von eNOS im kollateralisierten Hinterlaufgewebe nachgewiesen. Zudem wurde verglichen mit der mit Placebo behandelten Gruppe eine gesteigerte Phosphorylierung der eNOS nachgewiesen. In einem Arginin-Citrullin-Assay zeigte sich nach Herzfrequenzreduktion eine gegenüber der Kontrollgruppe gesteigerte NOS-Aktivität im Gewebe. Die Expression der endothelialen NO – Synthase und die

NO – Produktion sind sowohl für die Arteriogenese als auch für die Endothelfunktion von zentraler Bedeutung (Venkatesh et al., 2010). Allerdings verursachen reaktive Sauerstoffspezies, die für das Wachstum arterieller Kollateralgefäße wichtig sind (Carrao et al., 2009) und die ebenfalls im Rahmen der NO – Synthese durch eNOS entstehen, endotheliale Dysfunktion und Atherosklerose (Halliwell B, 1989; McQuaid et al., 1997; Wang et al., 2000).

Ein überraschendes Ergebnis dieser Arbeit war die Reduktion inflammatorischer Zytokine in zirkulierenden mononukleären Zellen trotz verbesserter Perfusionswiederherstellung. Zum jetzigen Zeitpunkt scheint dies der erste Bericht einer gesteigerten Arteriogenese bei systemischer Reduktion der Entzündungsreaktion zu sein, da inflammatorische Prozesse grundsätzlich sowohl an der Atherogenese als auch an der Arteriogenese beteiligt sind (Libby P, 2002) und Ansätze zur Stimulation der Arteriogenese bisher immer auch mit einer Aggravierung der Atherosklerose vergesellschaftet waren (van Royen et al., 2003).

Eine mögliche Erklärung könnten die Effekte der Herzfrequenz auf die vaskuläre Steifigkeit sein, welche wiederum einen unabhängigen prädiktiven Wert für kardiovaskuläre Mortalität aufweist (Zieman et al., 2005; Mitchell et al., 2010; Custodis et al., 2010). In mehreren Studien wurde gezeigt, dass mit Cholesterin gefütterte ApoE<sup>-/-</sup> – Mäuse ein steiferes Gefäßsystem entwickeln und eine geringere Arteriogeneserate aufweisen (van Weel et al., 2006) und diese arterielle Steifigkeit durch eine hohe Herzfrequenz verstärkt wird (Sa Cunha et al., 1997; Williams et al., 2009). In dieser Arbeit hatte die Herzfrequenzreduktion mittels Ivabradin zwar keine Effekte auf die Arteriogenese in Wildtypmäusen mit gesunden Arterien, förderte aber die Arteriogenese in ApoE<sup>-/-</sup> – Mäusen und reduzierte gleichzeitig die Inflammation in zirkulierenden Zellen. Wir vermuten daher, dass eine Herzfrequenzreduktion der cholesterininduzierten arteriellen Steifigkeit vorbeugt und dadurch lokale hämodynamische Kräfte, die für die Arteriogenese wichtig sind, wiederherstellt.

Frühere Studien haben zudem einen positiven Effekt einer Herzfrequenzreduktion auf den Koronarfluss gezeigt (Patel et al., 2000; Lamping et al., 2005). In diesem Fall muss allerdings zwischen Angiogenese (Aussprossen neuer Kapillaren) und Arteriogenese (Wachstum präexistenter arterieller Kollateralgefäße) unterschieden werden. Eine verbesserte koronare Angiogenese hängt von der gesteigerten



myokardialen Dehnung aufgrund einer verbesserten diastolischen Füllung und der daraufhin erfolgenden Sekretion der angiogenen Wachstumsfaktoren VEGF und TGF $\beta$  ab (Zheng et al., 2001; Zheng et al., 1999). Die Stimulation des koronaren Kollateralarterienwachstums durch die Herzfrequenzreduktion ist seinerseits eher auf einen gesteigerten laminaren Scherstress in der verlängerten Diastole zurückzuführen (Christensen et al., 2009; Lamping et al., 2005).

Eine Untersuchung der Effekte einer Herzfrequenzreduktion auf die vaskuläre Pathophysiologie in der peripheren Zirkulation wurde bisher noch nicht durchgeführt. Das Wachstum peripherer Kollateralarterien ist von besonderer Bedeutung für Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) (Hiatt et al., 1990), da die Arteriogenese als einziger Gefäßwachstumsprozess eine suffiziente Ersatzdurchblutung gewährleisten kann (Schirmer et al., 2004). Im Gegensatz zur koronaren Perfusion werden die Fluss- und Druckkurven in peripheren Gefäßen wesentlich weniger von der myokardialen Kontraktion und der Dauer der Diastole beeinflusst. Allerdings wird das Schlagvolumen gesteigert wenn die Herzfrequenz sinkt, um das Herzzeitvolumen (HZV = Schlagvolumen x Herzfrequenz) konstant zu halten (Mulder et al., 2004). Ein größeres Schlagvolumen steigert wiederum die Druckpulscurve (Williams et al., 2006), was den zirkulären Stress (CWS) auf die Gefäßwand erhöht (Giannoglou et al., 2008). Zelluläre Scherkräfte sind bekannt dafür, dass sie die Proliferation vaskulärer SMCs stimulieren (Wilson et al., 1993), was für das Kollateralarterienwachstum von zentraler Bedeutung ist. Daher aktivieren die zirkulären Zugspannungen durch die gesteigerte Pulsamplitude vaskuläre glatte Muskelzellen und Endothelzellen in präexistenten kollateralen Arteriolen. Dadurch werden die kontraktilen vaskulären SMCs in einen proliferativen Phänotyp umgewandelt (Schaper W, 2009). Kontraktile SMCs weisen verglichen mit proliferativen SMCs einen höheren Anteil charakteristischer zytoskelettaler Proteine wie Desmin und Smoothelin auf (Cai et al., 2004/3; Kramer et al., 1999). Eine verminderte Expression von Desmin wird daher als einer der frühen Marker der Arteriogenese angesehen (Cai et al., 2004). Die Herzfrequenzreduktion durch Ivabradin reduzierte die Expression von Desmin – mRNA im Hinterlaufgewebe von ApoE<sup>-/-</sup> – Mäusen auf zwei Drittel der Kontrollgruppe. Zudem wurde die Expression von Smoothelin – mRNA auf zwei Drittel der Kontrollgruppe vermindert.

Die Verminderung der Expression der inflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$ , IL6, MCP1 und CCR2 in den zirkulierenden mononukleären Zellen der ApoE<sup>-/-</sup> – Mäuse auf je ca. 10% der Kontrollgruppe nach Ivabradin-Gabe unterstützt frühere Studien über die antiatherogene Wirkung einer Herzfrequenzreduktion durch Ivabradin (Beere et al., 1984; Custodis et al., 2008). Lokal im Hinterlaufgewebe, welches die wachsenden Kollateralarterien beinhaltet, waren sowohl diese klassischen inflammatorischen Zytokine als auch die Anzahl der perivaskulären Makrophagen unverändert. Allerdings wurden die IFN $\beta$  – abhängigen Zytokine CXCL10 und CXCL11, welchen in mehreren Studien ein anti – arteriogenetischer Effekt zugeschrieben wurde (Schirmer et al., 2009; Schirmer et al., 2008; Angiolillo et al., 1995), durch die Gabe von Ivabradin im Hinterlaufgewebe herunterreguliert. Systemisch werden also inflammatorische Effekte und somit auch Atherogenese vermindert, während lokal ein günstiges Milieu für das Kollateralarterienwachstum entsteht.

Die Übertragung therapeutischer Ansätze zur Stimulation des Gefäßwachstums in der klinischen Praxis waren bisher aufgrund des proinflammatorischen Effekts und der damit verbundenen negativen atherosklerotischen Effekte schwierig (Epstein et al., 2004). Die beobachteten systemischen antiinflammatorischen Effekte von Ivabradin könnten jedoch für die Therapie von Patienten mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko von Nutzen sein. Besonders pAVK – Patienten könnten von einer Behandlung, die Atherosklerose vermindert und gleichzeitig die Arteriogenese stimuliert, profitieren.

Eine randomisierte Studie, welche die Auswirkungen einer Therapie mit Ivabradin auf inflammatorische Marker beim akuten Koronarsyndrom untersucht, wird derzeit vorbereitet und könnte helfen, einige der jetzt in Mäusen beobachteten Effekte im Menschen zu überprüfen (Dominguez-Rodriguez et al., 2009). Zudem unterstützen unsere Daten die Durchführung einer klinischen Studie zu den Effekten von Ivabradin auf die koronare Arteriogenese, die zurzeit durchgeführt wird (ClinicalTrials.gov; Ident.-Nr. NCT01039389).

Insgesamt verbessert eine Herzfrequenzreduktion mittels Ivabradin die periphere Arteriogenese im Hinterlaufmodell der Maus, indem sie die systemische und lokale Expression inflammatorischer Zytokine moduliert und den Phänotyp vaskulärer SMCs in Kollateralgefäßen verändert. Diese Daten zeigen die zentrale Rolle der

Herzfrequenz in der Regulation des Gefäßwachstums in der peripheren Strombahn.  
Zudem könnte die Induktion eines günstigen Zytokinexpressionsprofils eine mögliche  
Behandlungsoption zur Stimulation der Arteriogenese bei Patienten mit pAVK sein.

## 7. Literaturverzeichnis

Angiolillo AL, Sgadari C, Taub DD, Liao F, Farber JM, Maheshwari S, Kleinman HK, Reaman GH, Tosato G (1995) „Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo“. *J.Exp.Med.* 182 (1): 155-62.

Baruscotti M, Bucchi A, Difrancesco D. (2005) “Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker ("funny") current.” *Pharmacol Ther.* 2005 Jul;107(1):59-79. Review.

Beere PA, Glagov S, Zarins CK. (1984) “Retarding effect of lowered heart rate on coronary atherosclerosis”. *Science.* 1984;226(4671):180-182.

Billinger M, Raeber L, Seiler C, Windecker S, Meier B, Hess OM. (2004) “Coronary collateral perfusion in patients with coronary artery disease: effect of metoprolol”. *Eur Heart J.* 2004;25(7):565.

Bois P, Bescond J, Renaudon B, Lenfant J. (1996) “Mode of action of bradycardic agent, S 16257, on ionic currents of rabbit sinoatrial node cells”. *Br J Pharmacol.* 1996;118(4):1051-1057.

Bois P, Guinamard R, Chemaly AE, Faivre JF, Bescond J. (2007) “Molecular regulation and pharmacology of pacemaker channels.” *Curr Pharm Des.* 2007;13(23):2338-49. Review.

Böhm M, Reil JC, Danchin N, Thoenes M, Bramlage P, Volpe M. (2008) “Association of heart rate with microalbuminuria in cardiovascular risk patients: data from I-SEARCH”. *J Hypertens.* 2008;26(1):18-25.

Böhm M, Swedberg K, Komajda M, Borer JS, Ford I, Dubost-Brama A, Lerebours G, Tavazzi L; SHIFT Investigators (2010) “Heart rate as a risk factor in chronic heart failure (SHIFT): the association between heart rate and outcomes in a randomised placebo-controlled trial.” *Lancet.* (2010) Sep 11;376(9744):886-94.

Bucchi A, Barbuti A, Baruscotti M, DiFrancesco D. (2007) “Heart rate reduction via selective 'funny' channel blockers.” *Curr Opin Pharmacol.* 2007 Apr;7(2):208-13. Epub 2007 Jan 30. Review

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

Buschmann IR, Hofer IE, van Royen N, Katzer E, Braun-Dulleaus R, Heil M, Kostin S, Bode C, Schaper W. (2001) “GM-CSF: a strong arteriogenic factor acting by amplification of monocyte function.” *Atherosclerosis.* 2001 Dec;159(2):343-56.

Cai WJ, Kocsis E, Scholz D, Luo X, Schaper W, Schaper J. (2004) “Presence of Cx37 and lack of desmin in smooth muscle cells are early markers for arteriogenesis.” *Mol Cell Biochem.* 2004 Jul;262(1-2):17-23.

Cai WJ, Kocsis E, Luo X, Schaper W, Schaper J. (2004/2) "Expression of endothelial nitric oxide synthase in the vascular wall during arteriogenesis". *Mol Cell Biochem.* 2004;264(1-2):193.

Cai WJ, Kocsis E, Wu X, Rodriguez M, Luo X, Schaper W, Schaper J. (2004/3) "Remodeling of the vascular tunica media is essential for development of collateral vessels in the canine heart". *Mol Cell Biochem.* 2004;264(1-2):201.

Cai WJ, Schaper W (2008) „Mechanisms of arteriogenesis“. *Acta.Biochim.Biophys.Sin* 2008: 681-692. doi: 10.1111/j.1745-7270.2008.00436.x

Carmeliet P. (2010) "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis". *Nat Med.* 2000;6(4):389-395.

Carrao ACR, Chilian WM, Yun J, Kolz C, Rocic P, Lehmann K, van den Wijngaard JPHM, van Horssen P, Spaan JAE, Ohanyan V, Pung YF, Buschmann I. (2009) "Stimulation of Coronary Collateral Growth by Granulocyte Stimulating Factor: Role of Reactive Oxygen Species". *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(11):1817-1822.

Christensen LP, Zhang RL, Zheng W, Campanelli JJ, Dedkov EI, Weiss RM, Tomanek RJ. (2009) "Postmyocardial infarction remodeling and coronary reserve: effects of ivabradine and beta blockade therapy". *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;297(1):H322-330.

Custodis F, Baumhäkel M, Schlimmer N, List F, Gensch C, Böhm M, Laufs U. (2008) "Heart rate reduction by ivabradine reduces oxidative stress, improves endothelial function and prevents atherosclerosis in Apolipoprotein E-deficient mice". *Circulation.* 2008;117:2377-2387.

Custodis F, Schirmer SH, Baumhäkel M, Heusch G, Böhm M, Laufs U. (2010) "Vascular pathophysiology in response to increased heart rate." *J Am Coll Cardiol.* 2010 Dec 7;56(24):1973-83.

Deindl E, Buschmann I, Hofer IE, Podzuweit T, Boengler K, Vogel S, van Royen N, Fernandez B, Schaper W. (2001) "Role of ischemia and of hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit." *Circ Res.* 2001 Oct 26;89(9):779-86.

Dominguez-Rodriguez A, Fard SS, Abreu-Gonzalez P, Bosa-Ojeda F, Consuegra-Sanchez L, Jimenez-Sosa A, Grande AS, Kaski JC. (2009) "Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of ivabradine in patients with acute coronary syndrome: effects of the If current inhibitor ivabradine on reduction of inflammation markers in patients with acute coronary syndrome--RIVIERA trial study design and rationale". *Cardiovasc Drugs Ther.* 2009;23(3):243-247.

Drouin A, Gendron ME, Thorin E, Gillis MA, Mahlberg-Gaudin F, Tardif JC. (2008) "Chronic heart rate reduction by ivabradine prevents endothelial dysfunction in dyslipidaemic mice". *Br J Pharmacol.* 2008;154(4):749-757.

Eitenmüller I, Volger O, Kluge A, Troidl K, Barancik M, Cai WJ, Heil M, Pipp F, Fischer S, Horrevoets AJ, Schmitz-Rixen T, Schaper W. (2006) "The range of adaptation by collateral vessels after femoral artery occlusion." *Circ Res.* 2006 Sep 15;99(6):656-62.

Epstein SE, Stabile E, Kinnaird T, Lee CW, Clavijo L, Burnett MS. (2004) "Janus phenomenon: the interrelated tradeoffs inherent in therapies designed to enhance collateral formation and those designed to inhibit atherogenesis". *Circulation.* 2004;109(23):2826-2831.

Fox K, Ford I, Steg PG, Tendera M, Robertson M, Ferrari R. (2008) "Heart rate as a prognostic risk factor in patients with coronary artery disease and left-ventricular systolic dysfunction (BEAUTIFUL): a subgroup analysis of a randomised controlled trial". *Lancet.* 2008;372(9641):817-821.

Fox K, Ford I, Steg PG, Tendera M, Ferrari R. (2008/2) "Ivabradine for patients with stable coronary artery disease and left-ventricular systolic dysfunction (BEAUTIFUL): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial". *Lancet.* 2008;372(9641):807-816.

Fox K, Ford I, Steg PG, Tendera M, Robertson M, Ferrari R, on behalf of the BI. (2009) "Relationship between ivabradine treatment and cardiovascular outcomes in patients with stable coronary artery disease and left ventricular systolic dysfunction with limiting angina: a subgroup analysis of the randomized, controlled BEAUTIFUL trial". *Eur Heart J.* 2009;30(19):2337-2345.

Giannoglou GD, Chatzizisis YS, Zamboulis C, Parcharidis GE, Mikhailidis DP, Louridas GE. (2008) "Elevated heart rate and atherosclerosis: an overview of the pathogenetic mechanisms". *Int J Cardiol.* 2008;126(3):302-312.

Halliwell B. (1989) "Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis." *Br J Exp Pathol.* 1989 Dec;70(6):737-57. Review.

Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzner NR, Bakal CW, Creager MA, Halperin JL, Hiratzka LF, Murphy WRC, Olin JW, Puschett JB, Rosenfield KA, Sacks D, Stanley JC, Taylor LM, Jr., White CJ, White J, White RA. (2006) "ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease". *Circulation.* 2006;113(11):e463-465.

Hiatt WR, Regensteiner JG, Hargarten ME, Wolfel EE, Brass EP. (1990) "Benefit of exercise conditioning for patients with peripheral arterial disease". *Circulation.* 1990;81(2):602-609.

Hofer IE, van Royen N, Rectenwald JE, Bray EJ, Abouhamze Z, Moldawer LL, Voskuil M, Piek JJ, Buschmann IR, Ozaki CK. (2002) "Direct evidence for tumor necrosis factor-alpha signaling in arteriogenesis." *Circulation.* 2002 Apr 9;105(14):1639-41.

Hoefler IE, Grundmann S, Schirmer S, van Royen N, Meder B, Bode C, Piek JJ, Buschmann IR. (2005) "Aspirin, but not clopidogrel, reduces collateral conductance in a rabbit model of femoral artery occlusion."  
*J Am Coll Cardiol.* 2005 Sep 20;46(6):994-1001.

Kramer J, Aguirre-Arteta AM, Thiel C, Gross CM, Dietz R, Cardoso MC, Leonhardt H. (1999) "A novel isoform of the smooth muscle cell differentiation marker smoothelin".  
*J Mol Med.* 1999;77(2):294-298.

Lamping KG, Zheng W, Xing D, Christensen LP, Martins J, Tomanek RJ. (2005) "Bradycardia stimulates vascular growth during gradual coronary occlusion".  
*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(10):2122-2127.

Lee CW, Stabile E, Kinnaird T, Shou M, Devaney JM, Epstein SE, Burnett MS. (2004) "Temporal patterns of gene expression after acute hindlimb ischemia in mice: insights into the genomic program for collateral vessel development".  
*J Am Coll Cardiol.* 2004;43(3):474.

Libby P. (2002) "Inflammation in atherosclerosis". *Nature.* 2002;420(6917):868-874.

Liu J, Noble PJ, Xiao G, Abdelrahman M, Dobrzynski H, Boyett MR, Lei M, Noble D. (2008) "Role of pacemaking current in cardiac nodes: insights from a comparative study of sinoatrial node and atrioventricular node."  
*Prog Biophys Mol Biol.* 2008 Jan-Apr;96(1-3):294-304. Epub 2007 Aug 10. Review.

Lu D, Kassab GS. (2011) "Role of shear stress and stretch in vascular mechanobiology." *J R Soc Interface.* 2011 Jul 6. [Epub ahead of print]

McQuaid KE, Keenan AK. (1997) "Endothelial barrier dysfunction and oxidative stress: roles for nitric oxide?" *Exp Physiol.* 1997 Mar;82(2):369-76.

Mees B, Wagner S, Ninci E, Tribulova S, Martin S, van Haperen R, Kostin S, Heil M, de Crom R, Schaper W. (2007) "Endothelial nitric oxide synthase activity is essential for vasodilation during blood flow recovery but not for arteriogenesis".  
*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Sep;27(9):1926-33.

Mitchell GF, Hwang S-J, Vasan RS, Larson MG, Pencina MJ, Hamburg NM, Vita JA, Levy D, Benjamin EJ. (2010) "Arterial Stiffness and Cardiovascular Events: The Framingham Heart Study". *Circulation.* 2010;121(4):505-511.

Mulder P, Barbier S, Chagraoui A, Richard V, Henry JP, Lallemand F, Renet S, Lerebours G, Mahlberg-Gaudin F, Thuillez C. (2004) "Long-Term Heart Rate Reduction Induced by the Selective If Current Inhibitor Ivabradine Improves Left Ventricular Function and Intrinsic Myocardial Structure in Congestive Heart Failure".  
*Circulation.* 2004;109(13):1674-1679.

Patel SR, Breall JA, Diver DJ, Gersh BJ, Levy AP. (2000) "Bradycardia is associated with development of coronary collateral vessels in humans."  
*Coron Artery Dis.* 2000 Sep;11(6):467-72.

Reil JC, Böhm M. (2007) "The role of heart rate in the development of cardiovascular disease". *Clin Res Cardiol.* 2007;96(9):585-592.

Reil JC, Böhm M. (2008) "BEAUTIFUL results--the slower, the better?". *Lancet.* 2008;372(9641):779-780.

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

Sa Cunha R, Pannier B, Benetos A, Siche JP, London GM, Mallion JM, Safar ME. (1997) "Association between high heart rate and high arterial rigidity in normotensive and hypertensive subjects". *J Hypertens.* 1997;15(12 Pt 1):1423-1430.

Schaper W, Buschmann I. (1999) "Arteriogenesis, the good and bad of it". *Cardiovasc Res* 1999, 43: 835–837

Schaper W, Scholz D. (2003) „Factors regulating arteriogenesis“. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 2003;23:1143-1151.

Schaper W. (2009) "Collateral circulation: past and present." *Basic Res Cardiol.* 2009 Jan;104(1):5-21. Epub 2008 Dec 20. Review.

Schirmer SH, van Royen N. (2004) "Stimulation of collateral artery growth: a potential treatment for peripheral artery disease." *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2004 Jul;2(4):581-8. Review.

Schirmer SH, Fledderus JO, Bot PTG, Moerland PD, Hoefler IE, Baan J, Jr., Henriques JP, van der Schaaf RJ, Vis MM, Horrevoets AJ, Piek JJ, van Royen N. (2008) "Interferon-beta signaling is enhanced in patients with insufficient coronary collateral artery development and inhibits arteriogenesis in mice". *Circ Res.* 2008;102(10):1286-1294.

Schirmer SH, van Royen N, Moerland PD, Fledderus JO, Henriques JP, van der Schaaf RJ, Vis MM, Baan J, Jr., Koch KT, Horrevoets AJG, Hoefler IE, Piek JJ. (2009) "Local Cytokine Concentrations and Oxygen Pressure Are Related to Maturation of the Collateral Circulation in Humans". *J Am Coll Cardiol.* 2009;53(23):2141-2147.

Schirmer SH, Bot PT, Fledderus JO, van der Laan AM, Volger OL, Laufs U, Böhm M, de Vries CJ, Horrevoets AJ, Piek JJ, Hoefler IE, van Royen N (2010) „Blocking Interferon-beta Stimulates Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation And Arteriogenesis“. *Journal of Biological Chemistry* 2010.

Schirmer SH, van Nooijen FC, Piek JJ, van Royen N. (2009) "Stimulation of collateral artery growth: travelling further down the road to clinical application." *Heart.* 2009 Mar;95(3):191-7. Review.

Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, Klingbeil CK, Schaefer E, Damsky CH, Schlaepfer DD. (2000) "FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration."



*Nat Cell Biol.* 2000 May;2(5):249-56.

Statistisches Bundesamt Deutschland (2009) "Sterbefälle insgesamt 2009 nach den 10 häufigsten Todesursachen der International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-10)"

Swedberg K et al. (2010) "Ivabradine and outcomes in chronic heart failure (SHIFT): a randomised placebo-controlled study".  
*The Lancet* 2010;376:9744;875 – 885.

Traverse JH, Altman JD, Kinn J, Duncker DJ, Bache RJ. (1995) "Effect of  $\beta$ -Adrenergic Receptor Blockade on Blood Flow to Collateral-Dependent Myocardium During Exercise". *Circulation.* 1995;91(5):1560-1567.

Troidl K, Tribulova S, Cai WJ, Eitenmüller I, Wustrack H, Schierling W, Troidl C, Schmitz-Rixen T, Schaper W. (2009) "Effects of endogenous NO and of DETA NONOate in Arteriogenesis". *J Cardiovasc Pharmacol.* 2009 Nov 20.  
[Epub ahead of print]

Van Royen N, Piek JJ, Schaper W, Bode C, Buschmann I. (2001) "Arteriogenesis: Mechanisms and modulation of collateral artery development".  
*J.Nucl.Cardiol.* 2001;8:687-93.

van Royen N, Hoefer I, Böttinger M, Hua J, Grundmann S, Voskuil M, Bode C, Schaper W, Buschmann I, Piek JJ. (2003) "Local monocyte chemoattractant protein-1 therapy increases collateral artery formation in apolipoprotein E-deficient mice but induces systemic monocytic CD11b expression, neointimal formation, and plaque progression". *Circ Res.* 2003 Feb 7;92(2):218-25.

van Weel V, de Vries M, Voshol PJ, Verloop RE, Eilers PH, van Hinsbergh VW, van Bockel JH, Quax PH. (2006) "Hypercholesterolemia reduces collateral artery growth more dominantly than hyperglycemia or insulin resistance in mice".  
*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(6):1383-1390.

Venkatesh PK, Pattillo CB, Branch B, Hood J, Thoma S, Illum S, Pardue S, Teng X, Patel RP, Kevil CG. (2010) "Dipyridamole Enhances Ischemia-Induced Arteriogenesis through an Endocrine Nitrite/Nitric Oxide-Dependent Pathway".  
*Cardiovasc Res.* 2010;doi:10.1093/cvr/cvq002

Wang W, Wang S, Yan L, Madara P, Del Pilar Cintron A, Wesley RA, Danner RL. (2000) "Superoxide production and reactive oxygen species signaling by endothelial nitric-oxide synthase." *J Biol Chem.* 2000 Jun 2;275(22):16899-903.

Wessells H, Teal TH, Engel K, Sullivan CJ, Gallis B, Tran KB, Chitale K. (2006) "Fluid shear stress-induced nitric oxide production in human cavernosal endothelial cells: inhibition by hyperglycaemia." *BJU Int.* 2006 May;97(5):1047-52.

Williams B, Lacy PS, Thom SM, Cruickshank K, Stanton A, Collier D, Hughes AD, Thurston H, O'Rourke M, The Cafe Investigators for the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial ICSC, Writing C. (2006) "Differential Impact of Blood Pressure-Lowering Drugs on Central Aortic Pressure and Clinical Outcomes: Principal Results

of the Conduit Artery Function Evaluation (CAFE) Study". *Circulation*. 2006;113(9):1213-1225.

Williams B, Lacy PS. (2009) "Impact of heart rate on central aortic pressures and hemodynamics: analysis from the CAFE (Conduit Artery Function Evaluation) Study: CAFE-Heart Rate". *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(8):705-713.

Wilson E, Mai Q, Sudhir K, Weiss RH, Ives HE. (1993) "Mechanical strain induces growth of vascular smooth muscle cells via autocrine action of PDGF". *J Cell Biol*. 1993;123(3):741-747.

World Health Organization (2010)  
"Global status report on noncommunicable diseases 2010"

Wright AJ, Hudlicka O. (1981) "Capillary growth and changes in heart performance induced by chronic bradycardial pacing in the rabbit". *Circ Res*. 1981;49(2):469-478.

Yoshida T, Owens GK. (2005) "Molecular determinants of vascular smooth muscle cell diversity." *Circ Res*. 2005 Feb 18;96(3):280-91. Review.

Zheng W, Brown MD, Brock TA, Bjercke RJ, Tomanek RJ. (1991) "Bradycardia-induced coronary angiogenesis is dependent on vascular endothelial growth factor". *Circ Res*. 1999;85(2):192-198.

Zheng W, Seftor EA, Meininger CJ, Hendrix MJ, Tomanek RJ. (2001) "Mechanisms of coronary angiogenesis in response to stretch: role of VEGF and TGF-beta". *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280(2):H909-917.

Zieman SJ, Melenovsky V, Kass DA. (2005) "Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness". *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(5):932-943.

## 8. Dank

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Ulrich Laufs bedanken, der mir die Möglichkeit zum wissenschaftlichen Arbeiten gegeben hat. Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Betreuer, Dr. Dr. Stephan Schirmer bedanken, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat und mich durch seine Erfahrungen vorangebracht hat. Ich danke auch Dr. Andrej Kazakov, der mir durch seine Expertise im Bereich der Immunhistochemie bei der Lösung einiger schwieriger Fragestellungen behilflich war. Ein besonderer Dank geht auch an alle anderen Mitarbeiter des Labors, insbesondere Ellen Becker, Simone Jäger und Julia Marhofer für die ausgezeichnete Unterstützung im Labor. Zuletzt möchte ich noch meinen Eltern danken, die mir mein Studium ermöglicht haben und mir jederzeit moralischen Beistand geleistet haben.

## 9. Lebenslauf und Publikation

**Name** Achim Degen

**Kontakt** Mozartstraße 12  
67655 Kaiserslautern  
[achim-degen@gmx.de](mailto:achim-degen@gmx.de)

**Geburtsdatum** 01.09.1986 in Kaiserslautern

### Schulbildung

1992 – 1996	Goetheschule Otterbach (Grundschule)
1996 – 1998	Gymnasium am Rittersberg, Kaiserslautern
1998 – 2004	Hohenstaufen – Gymnasium Kaiserslautern

### Hochschulbildung und beruflicher Werdegang

2004 – 2011	Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes, Homburg (Saar)
08/2006	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
ab 08/2008	Promotionsarbeit in der Klinik für Innere Medizin III, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg (Saar)
08/2010 – 01/2011	Praktisches Jahr am Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg (Saar)

05/2011	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Approbation als Arzt
seit 08/2011	Assistenzarzt in der Klinik für Innere Medizin III, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg (Saar)

### Auslandsaufenthalte

02/2008 – 08/2008	ERASMUS – Semester an der Université Rennes I in Rennes (Frankreich)
02/2010 - 06/2010	Praktisches Jahr an der Université Victor Ségalen Bordeaux II in Bordeaux (Frankreich)
06/2010 - 08/2010	Praktisches Jahr an der University of Aberdeen (Schottland, UK)

### Abstracts

S.H. Schirmer, **A. Degen**, F. Custodis, M. Böhm, U. Laufs.  
 “Herzfrequenzreduktion mittels Ivabradin steigert die Arteriogenese durch  
 Verbesserung der Endothelfunktion im murinen Hinterlaufmodell”. *Clin Res  
 Cardiol* 99, Suppl 1, April 2010, 76. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft  
 für Kardiologie V522(2010); DOI 10.1007/s00392-010-1100-3

S.H. Schirmer, **A. Degen**, M. Baumhäkel, F. Custodis, M. Böhm, U. Laufs.  
 “Heart rate reduction by If-channel blockade with ivabradine stimulates  
 collateral artery growth in hypercholesterolemic atherosclerosis”.  
*European Heart Journal* (2010) 31 (Abstract Supplement), 620-621

S.H. Schirmer, **A. Degen**, M. Baumhäkel, F. Custodis, M. Kohlhaas, F.  
 Bahlmann, R. Kappl, M. Böhm, and U. Laufs. “Abstract 13721: Heart Rate  
 Reduction by If-Channel Blockade With Ivabradine Stimulates Collateral Artery  
 Growth in Hypercholesterolemic Atherosclerosis”.  
*Circulation* (2011), 124:A13721

### Publikation

S.H. Schirmer, **A. Degen**, M. Baumhäkel, F. Custodis, L. Schuh, M. Kohlhaas,  
 E. Friedrich, F. Bahlmann, R. Kappl, C. Maack, M. Böhm, U. Laufs. “Heart Rate  
 Reduction by If-Channel Inhibition with Ivabradine Restores Collateral Artery  
 Growth in Hypercholesterolemic Atherosclerosis”. *European Heart Journal*  
 (2011), doi: 10.1093/eurheartj/ehr255.