

Holzer Manuel, BSc.

Kinetische Charakterisierung der mittels Laser-Doppler-Flowmetrie erfassten post-okklusiven reaktiven Hyperämie-Reaktion

Masterarbeit



Medizinische Universität Graz
Institut für Physiologie
Harrachgasse 21

Eingereicht an der
Technischen Universität Graz

Betreuer:
Univ.Prof. DI Dr. techn. Pessenhofer Herfried

Graz, im Juli 2013

Gleichheitsgrundsatz

Um den Lesefluss durch die ständige Nennung beider Geschlechter nicht zu stören, wird entweder eine geschlechtsneutrale Formulierung verwendet, oder es wird nur eines der beiden Geschlechter angegeben. Im letzteren Fall sind selbstverständlich beide Geschlechter gemeint.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Physiologie für die tatkräftige Unterstützung meiner Vorhaben bedanken. Besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Wegbegleiter Univ.-Prof. DI Dr. techn. Herfried Pessenhofer, durch dessen Ideen und Bereitschaft zur Zusammenarbeit, dieses Vorhaben verwirklicht werden konnte. Vielen Dank liebe Burgi Sauseng und lieber Bernhard Kohla für die kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit während der letzten Jahre. Außerdem will ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr.med Günther Schwabinger und Herrn Dr. techn. Alexander Hohl für die Kooperation und unermüdliche Hilfestellung bedanken. Weiterer Dank gilt meiner Freundin Rebecca für die Korrektur dieser Arbeit und dafür, dass sie mich aushält.

Vielen Dank an die Versuchspersonen, Freunde und alle die mir dabei helfen, meine zukünftigen Ziele zu erreichen.

Inhaltsverzeichnis

i.	Abkürzungsverzeichnis	iv
ii.	Kurzfassung - Abstract	v
1.	Einleitung	1
1.1.	<i>Ausgangspunkt</i>	1
1.2.	<i>Histologischer Aufbau von Blutgefäßen</i>	1
1.3.	<i>Gefäßtonus</i>	3
1.3.1.	Definition – Allgemeines	3
1.3.2.	Extrinsische Faktoren.....	3
1.3.2.1.	Vegetatives Nervensystem (ANS)	3
1.3.2.2.	Humorale Faktoren	4
1.3.3.	Intrinsische Faktoren.....	5
1.3.3.1.	Myogene Faktoren.....	5
1.3.3.2.	Endotheliale Faktoren.....	6
1.3.3.3.	Lokale Regulation des Blutflusses (lokale Hormone und Metabolite).....	8
1.4.	<i>Rolle des Endothels bei der Tonusmodulation</i>	9
1.4.1.	NO-Bildung	9
1.4.1.1.	Grundprinzip	9
1.4.1.2.	Effekte von NO an der glatten Muskulatur	10
1.4.1.3.	Flussvermittelte NO-Bildung.....	13
1.4.2.	Endotheliale Dysfunktion	15
1.4.3.	Rolle von Nitraten bei der NO-Bildung.....	17
1.5.	<i>Nichtinvasive Methoden zur Beurteilung der Endothelfunktion</i>	19
1.5.1.	Allgemeines	19
1.5.2.	PWV.....	19
1.5.3.	Flow mediated dilatation - FMD.....	21
1.5.3.1.	Grundprinzip	21
1.5.3.2.	Bestimmung mittels Magnetresonanz-Tomografie (MRT)	22
1.5.3.3.	Bestimmung mittels Ultraschall.....	23
1.5.4.	Postokklusive reaktive Hyperämie (PORH)	25
1.5.4.1.	Grundprinzip	25
1.5.4.2.	Erfassung der PORH mittels optischer Plethysmografie (PORH/OPG).....	26
1.5.4.3.	Erfassung der PORH mittels Laser-Doppler-Flowmetrie (PORH/LDF).....	26
1.6.	<i>Pharmakokinetische Modelle</i>	28
1.6.1.	Modelle allgemein.....	28
1.6.2.	Kompartiment-Modelle	29
1.6.3.	Non-Kompartiment-Modelle	31
1.6.4.	PORH-Kompartiment-Modelle	32
1.7.	<i>Ziele der Arbeit</i>	33
2.	Methodik	35
2.1.	<i>Ethische Konformität</i>	35
2.2.	<i>Versuchskollektiv</i>	35

2.2.1.	Abschätzung der Sample Size (Probandenanzahl)	35
2.2.2.	Anthropometrische Daten der Versuchspersonen	36
2.3.	<i>Durchführung der Experimente</i>	37
2.4.	<i>Datenerfassung und -verarbeitung</i>	39
2.4.1.	Verwendete Messsysteme	39
2.4.2.	Verarbeitung der LDF-Signale	41
2.5.	<i>Berechnung der Kenngrößen der PORH</i>	42
1.5.1	Globale Kenngrößen der PORH.....	42
1.5.2	Kinetische Kenngrößen der PORH	43
2.6.	<i>Kardiovaskuläre Messgrößen</i>	45
2.7.	<i>Methoden der statistischen Analyse</i>	45
2.7.1.	Box-Whisker-Plot.....	45
3.	Ergebnisse	47
3.1.	<i>Exemplarische Einzelergebnisse</i>	47
3.2.	<i>Gruppenergebnisse</i>	50
3.2.1.	Globale Kenngrößen der PORH	50
3.2.1.1.	Tabellarische Übersicht.....	50
3.2.1.2.	Box-Plots und statistische Prüfung	52
3.2.2.	Ergebnisse der kinetischen Kenngrößen der PORH	53
3.2.2.1.	Tabellarische Übersicht.....	53
3.2.2.2.	Box-Plots und statistische Prüfung	56
3.2.3.	Ergebnisse der kardiovaskulären Messgrößen.....	59
3.2.4.	Zusammenfassung der statistischen Prüfungen	63
3.2.5.	Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse.....	63
4.	Diskussion	65
4.1.	<i>Diskussion der Fragestellung</i>	65
4.1.1.	Relevanz der Ziele der Arbeit	65
4.1.2.	Ziel der Modellierung	65
4.1.3.	NTG als modifizierender Ko-Faktor	66
4.2.	<i>Diskussion der Methodik</i>	68
4.2.1.	Praktikabilität der PORH/LDF und Relevanz des Messgebiets	68
4.2.2.	Vergleich der PORH/LDF mit konventioneller FMD	69
4.2.3.	Einfluss der Okklusionsdauer auf die PORH-LDF	71
4.2.4.	Verwendete Messgrößen.....	73
4.2.5.	Adäquanz des Modells	74
4.2.6.	Qualität der Modellanpassung, Verteilung der Residuen	74
4.3.	<i>Diskussion der Ergebnisse</i>	75
4.3.1.	Bateman-Funktion und deren theoretische Analyse	75
4.3.2.	Diskussion der globalen Messgrößen.....	76
4.3.3.	Diskussion der kinetischen Messgrößen	77
4.3.3.1.	Flächen unter den PORH/LDF-Reaktionskurven (AUC).....	77
4.3.3.2.	Kinetische Parameter k_a (Aktivierungsphase) und k_e (Restitutionsphase).....	78
4.3.3.3.	Analyse von Zusammenhängen (Korrelationen).....	80
4.3.4.	Monitoring des Effekts von NTG	81

4.3.5.	Erweiterung/Verbesserung des Modellansatzes	82
4.3.6.	Validität von PORH/LDF im Hinblick auf die EDF.....	82
5.	Zusammenfassung und Ausblick.....	84
6.	Literaturverzeichnis	85
7.	Abbildungsverzeichnis.....	95
8.	Tabellenverzeichnis.....	98
9.	Anhang	99
9.1.	<i>Listing der Matlab-Routine zur nichtlinearen Regression</i>	99

i. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
ADP	Adenosin Diphosphat	MRT	Magnetresonanztomographie
ATP	Adenosin Triphosphat	NA	Noradrenalin
AUC	Area under the curve	NCM	Non-Kompartiment-Modell
BH₄	Tetrahydrobiopterin	nm	Nanometer
Ca²⁺	Kalzium	NO	Stickstoffmonoxid
CaM	Calmodulin	NTG	Nitroglycerin / Glyceroltrinitrat
CVD	Kardiovaskuläre Erkrankung	OPG	Optische Plethysmographie
Dia	Diastolischer Blutdruck	OPS	Orthog. polarization spectral imaging
ECM	Ein-Kompartiment-Modell	p	Irrtumswahrscheinlichkeit
ED	Endotheliale Dysfunktion	PAT	Pulsamplitudentonometrie
EKG	Elektrokardiogramm	PCA	Pulskonturanalyse
eNOS	endotheliale NO-Synthase	PDK	PIP-abhängige Kinase
ER	Endoplasmatisches Retikulum	PIP2	Phosphatidylinositid-biphosphat
FMD	Flow mediated dilatation	PIP3	Phosphatidylinositid-triphosphat
GTP	Guanosin Triphosphat	PO₂	Sauerstoffpartialdruck
Hf	Herzfrequenz	PORH	Post-okklusive reaktive Hyperämie
IQR	Interquartilsabstand	PTM	Transmuraler Druck
k_a	Invasions/Absorptionskonstante	PWV	Pulswellengeschwindigkeit
k_e	Eliminationskonstante	RR	Blutdruck nach Riva Rocci
LDF	Laser-Doppler-Flowmetrie	s	Sekunden
L-NMMA	N ^G -monomethyl-L-Arginin	Sys	Systolischer Blutdruck
MAX	Maximalwert	t	Zeit
MHz	Megahertz	Tab.	Tabelle
min	Minuten	T_{MAX}	Reaktionszeit bis zum Maximalwert
MLC	Myosin light chain	US	Ultraschall
MLCK	Myosin light chain kinase	WHO	World-Health-Organization

ii. Kurzfassung

Kinetische Charakterisierung der mittels Laser-Doppler-Flowmetrie erfassten post-okklusiven reaktiven Hyperämie-Reaktion

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind weltweit die häufigste Todesursache. Zur Prävention sind effiziente Diagnoseverfahren vonnöten, die einfach, nichtinvasiv und kostengünstig eine reliable Quantifizierung des kardiovaskulären Risikos ermöglichen, um therapeutische Interventionen frühzeitig in Gang zu setzen. Als etablierter Marker gilt die endotheliale Dysfunktion (EDF), die durch eine mangelnde vasodilatatorische Gefäßreaktion auf einen Flussanstieg mittels bildgebendem Ultraschall erfasst wird (flow mediated dilatation – FMD). Verantwortlich für die Vasodilatation gilt das vom Endothel freigesetzte Stickoxid (NO).

Wir haben in einer vorausgegangenen „Feasibility-Study“ festgestellt, dass die postokklusive reaktive Hyperämie, erfasst über Laser-Doppler-Flowmetrie an der Haut (PORH/LDF), die die metabolisch-autoregulatorischen Eigenschaften der Mikrozirkulation erfasst, ein einfaches und kostengünstiges diagnostisches Werkzeug darstellen kann. Zur Quantifizierung der PORH/LDF-Reaktion wird dabei die Modellierung der Reaktionskinetik über ein Zweikompartiment-Modell und eine nachfolgende Parameter-Identifikation herangezogen.

Um diese Methode detailliert zu evaluieren und um die Frage abzuklären, ob die Bioverfügbarkeit von NO die PORH/LDF-Reaktion beeinflusst, wurde eine Studie mit dem Ziel durchgeführt, die NO-Bioverfügbarkeit durch orale Gabe von Glyceroltrinitrat (NTG) zu modifizieren.

Zu diesem Zweck wurde an einem Kollektiv von 16 gesunden Probanden beiderlei Geschlechts die PORH/LDF am Unterarm nach 5-minütiger suprasystolischer Stauung mittels Blutdruckmanschette jeweils ohne und nach Gabe von NTG (0,8mg oral) erhoben. Die Perfusionsdaten wurden mittels LDF (Periflux 5000) erfasst und abgespeichert. Aus den entsprechenden Datensätzen wurden nach Normierung ein Zweikompartiment-Modell, dessen Lösung die „Bateman-Funktion“ darstellt, mittels nichtlinearer Regression angepasst und die kinetischen Kenngrößen k_a (Aktivierungsphase) und k_e (Restitutionsphase) ermittelt. Zusätzlich wurde die Fläche unter den Reaktionskurven (AUC) berechnet.

Die Experimentalserie brachte das Ergebnis, dass unter der Gabe von NTG sowohl der Maximalwert der Reaktion als auch die AUC signifikant erhöht waren. Die kinetischen Parameter k_a bzw. k_e zeigten hingegen keine signifikanten Änderungen unter NTG. Die Medianwerte ohne NTG betragen für k_a 0,4078 bzw. für k_e 0,0223, bei Gabe von NTG lagen die Medianwerte für k_a bei 0,3141 bzw. für k_e bei 0,0198 (Einheiten jeweils 1/s).

Im Rahmen der Untersuchungsserie konnte gezeigt werden, dass die PORH/LDF ein einfaches, kostengünstiges und reliables Verfahren zur Quantifizierung der Autoregulation der kutanen Mikrozirkulation darstellt. Im Gegensatz zur konventionellen FMD ist für dieses Verfahren auch nur ein geringer Zeitaufwand für die Schulung des Untersuchers notwendig. Die Parametrisierung der Reaktion über das Zweikompartiment-Modell bzw. die AUC erwies sich als überaus robust.

Allerdings wird über die PORH/LDF nicht die NO-abhängige Dilatation der Blutgefäße erfasst, sondern die autoregulatorische Kapazität der kutanen Mikrozirkulation. Daher wurde in unserer Untersuchung keine signifikante Beeinflussung der Reaktionskinetik durch die NTG-Gabe gefunden. Auch zeigten Vergleiche der PORH/LDF-Kinetik mit tierexperimentell

erhobenen Kinetiken von NO in der Literatur größenordnungsmäßige Unterschiede im Zeitverhalten.

In welchem Umfang die autoregulatorische Kapazität der kutanen Mikrozirkulation in Analogie zur FMD als diagnostischer Marker für die Entwicklung einer EDF herangezogen werden kann und inwieweit die autoregulatorische Kapazität mit der FMD korrespondiert, muss durch weiterführende Untersuchungen an unterschiedlichen Patientenkollektiven abgeklärt werden.

Schlüsselwörter:

Post-okklusive reaktive Hyperämie, Laser-Doppler-Flowmetrie, Endotheliale Dysfunktion, Kardiovaskuläre Erkrankungen, Zweikompartiment-Modell, Bateman-Funktion, Glyceroltrinitrat, Stickstoffmonoxid

Abstract

Kinetic characterization of post occlusive reactive hyperemia response determined by laser Doppler flowmeter

Cardiovascular diseases are the most dominant causes of death worldwide. To initiate preventive therapeutic interventions in an early phase of the disease, diagnostic means which provide simple, noninvasive and economic quantification of cardiovascular risk are a prerequisite.

Endothelial dysfunction (EDF) is an established marker which is characterized by a lack of vasodilatation in blood vessels in consequence to an increase in blood flow measured by ultrasound techniques. The immediate agent for vasodilatation is nitric oxide (NO), which is liberated from the vascular endothelium.

In a preceding feasibility study we have observed that post occlusive reactive hyperemia, a measure of autoregulative properties of the microcirculation, assessed by a laser Doppler flowmeter (PORH/LDF) in the skin is a simple and economic procedure. To quantify the PORH/LDF response a modeling approach using a two-compartment-model and subsequently an identification procedure were applied.

For a detailed evaluation of this method and for the estimation of a possible effect of bioavailability of NO onto the PORH/LDF response, an investigation was performed, where the NO bioavailability was modified using an orally applied dose of glyceroltrinitrate (NTG).

In a group of 16 healthy volunteers (including males and females) PORH/LDF in the forearm was assessed after a 5 minute's suprasystolic occlusion by a pneumatic cuff, both with and without an oral dose of NTG (0,8 mg). Microcirculatory perfusion was measured by a laser Doppler flowmeter (LDF, Periflux 5000) and the data were stored on a laptop computer. A "Bateman function", which represents the mathematical solution of the applied two-compartment-model, was fitted to the normalized sets of data using a nonlinear regression procedure. The parameters k_a (activating phase of PORH), k_e (restitutive phase) and the area under the response curve (AUC) were calculated.

Our experiments lead to the result that with NTG both maximal amplitude and AUC increased significantly. The kinetic parameters (k_a resp. k_e) showed no significant changes with NTG.

Median values without NTG were calculated as 0,4078 for k_a and 0,0223 for k_e . After the application of NTG the median values for k_a were 0,3141 and for k_e 0,0198 (units 1/s).

Our study demonstrated that PORH/LDF is a simple, cost effective and reliable method for the quantification of the autoregulative capacity of the cutaneous microcirculation. In contrast to conventional FMD the expenditure of time for investigator's training can be markedly reduced. The parameterization of the response using a model oriented approach resp. AUC calculation proved to be a robust method.

However, PORH/LDF does not reflect the NO-dependent vessel vasodilatation but the autoregulative capacity of the cutaneous microcirculation. As a consequence of that fact our investigation showed no significant effect of NTG on the kinetics of the response. Furthermore a comparison of PORH/LDF kinetics to NO-kinetics (animal experiments in the literature) exhibited enormous differences in the time constants of the responses.

To answer the question to which extend the autoregulative capacity of the cutaneous microcirculation, as a substitute for FMD, can be taken as a diagnostic marker for endothelial dysfunction, further explorative studies in different collectives of patients have to be performed.

Key words:

Post occlusive reactive hyperemia, laser Doppler flowmeter, endothelial dysfunction, cardiovascular diseases, two compartment model, "Bateman-function", glycerol trinitrate, nitric oxid

1. Einleitung

1.1. Ausgangspunkt

Kardiovaskuläre Erkrankungen (CVDs) waren 2008 weltweit die Todesursache für 17,3 Millionen Menschen. CVDs waren für 31% aller tödlichen Ereignisse verantwortlich und somit die Haupttodesursache (siehe Abb. 1). Darüber hinaus sind ungefähr 80 Millionen Menschen akut von einer kardiovaskulären Erkrankung betroffen. Einer Schätzung der WHO zufolge werden im Jahre 2030 23,6 Millionen Menschen an CVDs sterben. Die Mortalität durch CVDs soll außerdem aufgrund inadäquater präventiver Messverfahren weiterhin steigen (Holowatz et al. 2008; WHO 2011). Die jährlichen Kosten, welche EU-weit durch CVDs entstehen, werden auf 169 Milliarden Euro geschätzt. CVDs sind also nicht nur ein klinisches, sondern außerdem ein ökonomisches Problem (Leal et al. 2006).

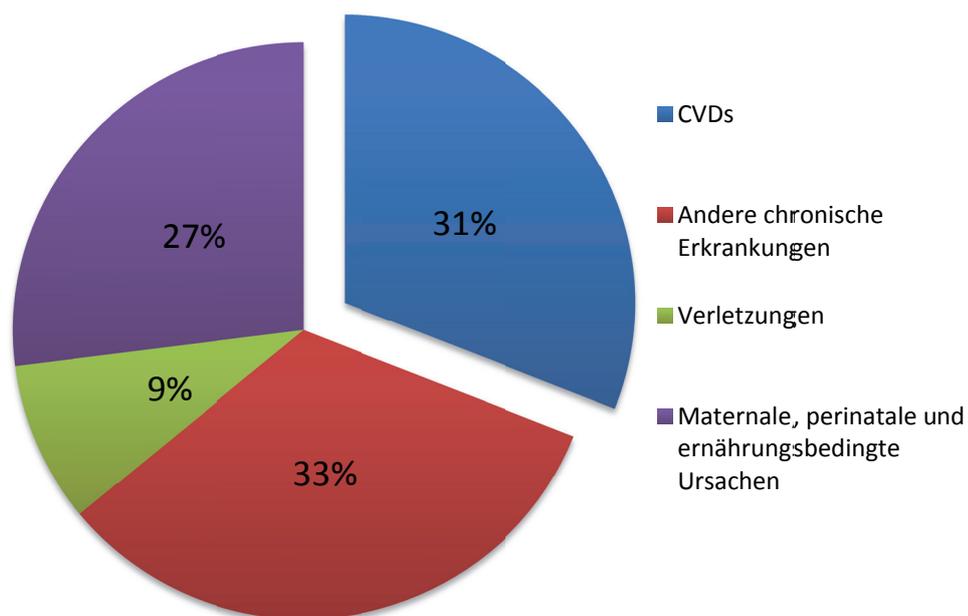


Abbildung 1: Verteilung der Todesursachen im Jahre 2008 (modifiziert nach WHO 2011)

1.2. Histologischer Aufbau von Blutgefäßen

Das Kreislaufsystem wird gegliedert in ein Hochdrucksystem (herznahe Arterien vom elastischen Typ und periphere Arterien vom muskulären Typ), in ein Niederdrucksystem (periphere Venen und große Venenstämme; enthält nahezu 85% des gesamten Blutvolumens) und in die Mikrozirkulation (terminale Strombahn bestehend aus Arteriolen, Kapillaren und

Venolen.) Die zellulären Schichten, vor allem das Endothel und die glatte Gefäßmuskulatur, regulieren den Durchmesser der Blutgefäße. Dies geschieht primär über die vegetative Innervation sowie durch Freisetzung vasoaktiver Substanzen (Klinke et al. 2005). Grundlegend bestehen Blutgefäße aus 3 Schichten, welche sich je nach Lokalisation und der Funktion des Gefäßes in dessen Zusammensetzung unterscheiden. Lediglich die terminale Endstrombahn zeigt eine andere morphologische Zusammensetzung mit fehlender Muskelschicht (Marieb et al. 2010). Die Schichten eines Blutgefäßes sind wie folgt definiert:

Tunica Adventitia / Tunica Externa Äußerste Schicht	Besteht vorwiegend aus kollagenen Fibrillen und elastischen Fasern, dient als Bindeglied zum umliegenden Gewebe
Tunica Media Mittlere Schicht	Besteht aus Kollagen I u III sowie Elastin, mit glatten Muskelzellen zur Regulation des Gefäßwiderstandes
Tunica Intima / Tunica Interna Innerste Schicht	Dünne Bindegewebsschicht – Stratum subendotheliale; besteht aus Endothelzellen; verhindert Aggregation; wichtig für Tonusmodulation

Tab. 1: Morphologischer Aufbau der Gefäße (Marieb et al. 2010)

In Abb. 2 ist der Schichtenaufbau von Gefäßen dargestellt.

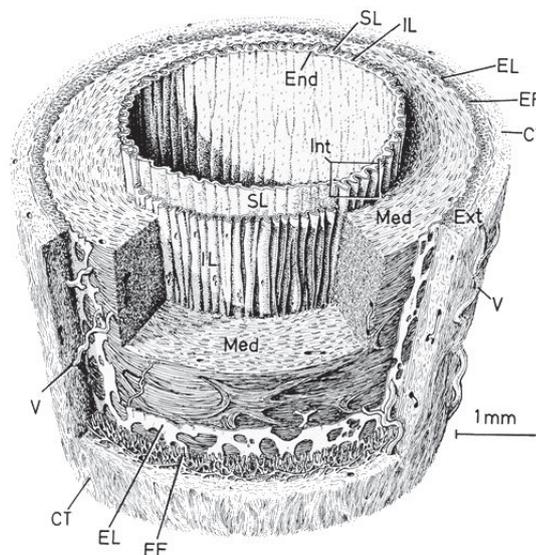


Abbildung 2: Darstellung der Wandschichten einer muskulären Arterie. Tunica intima (Int), Endothel (End) mit Stratum subendotheliale (SL) und Stratum intima (IL), Tunica media (Med) mit den elastischen Fasern (EF), Tunica externa (Ext) mit den Laminae elasticae (EL) und EF, dazwischengelegenes Bindegewebe (CT), Vasa vasorum (V)

1.3. Gefäßtonus

1.3.1. Definition – Allgemeines

Unter dem Begriff des „Gefäßtonus“ versteht man den Grad der Konstriktion eines Blutgefäßes in Relation zu dessen maximal dilatiertem Zustand. Alle Arterien und Venen zeigen unter Ruhebedingungen einen bestimmten Grad der Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur und dementsprechend einen Gefäßtonus.

Der Gefäßtonus ist das Ergebnis von kompetitiv am Blutgefäß wirksamen vasokonstriktorischen und vasodilatatorischen Einflussgrößen. Diese Einflussgrößen lassen sich in extrinsische Faktoren (von außerhalb des Gefäßes oder Organs) und intrinsische Faktoren (vom Gefäß selbst) einteilen.

Die Aufgabe der extrinsischen Faktoren ist die Regulation des Blutdrucks über eine Veränderung des Gefäßwiderstands, die intrinsischen Faktoren sind für die lokale Regulation der Durchblutung innerhalb eines bestimmten Organs verantwortlich (Klabunde 2012).

1.3.2. Extrinsische Faktoren

1.3.2.1. *Vegetatives Nervensystem (ANS)*

Der Gefäßtonus, also die aktiv gehaltene Spannung, die in einem Gefäßabschnitt isometrisch von der glatten Muskulatur entwickelt wird, steht in einem Gleichgewicht mit dem Blutdruck bzw. kann den Blutdruck regulieren. Zur Modulation des Gefäßtonus dient die Durchmesseränderung durch das Endothel (basaler Tonus), die Regulation durch eine myogene Antwort sowie auch der permanente Basistonus, welcher durch die blutgefäßumgebenden sympathisch-adrenergen Nervenfasern gebildet wird (Schmidt et al. 2007).

Die Blutgefäße werden an der Grenze zwischen Tunica Adventitia (außen) und Tunica Media innerviert. Die Innervationsdichte nimmt in der Regel von Arterien zu Kapillaren hin ab. Das venöse System zeigt eine deutlich schwächere Innervation als das arterielle. Die Plasmakonzentration von Noradrenalin (NA) gilt als indirektes Maß der efferenten sympathischen Impulsaktivität. NA, welches aus den Vesikeln der Nervenzellen freigesetzt wird, hängt mit einer Reihe von Faktoren wie etwa dem Aktionspotenzial und lokal-chemischen Substanzen zusammen (siehe Abb. 15). Durch die Bindung von ligandenabhängigen Membranrezeptoren führt NA zu einer Vasokonstriktion der Gefäßmuskelzelle (Schmidt et al. 2007; Klinke et al. 2005). In Abb. 3 werden die Faktoren

der Neuromodulation von NA, sowie die Rezeptoren an der Gefäßmuskelzelle, welche NA als Liganden besitzen, dargestellt.

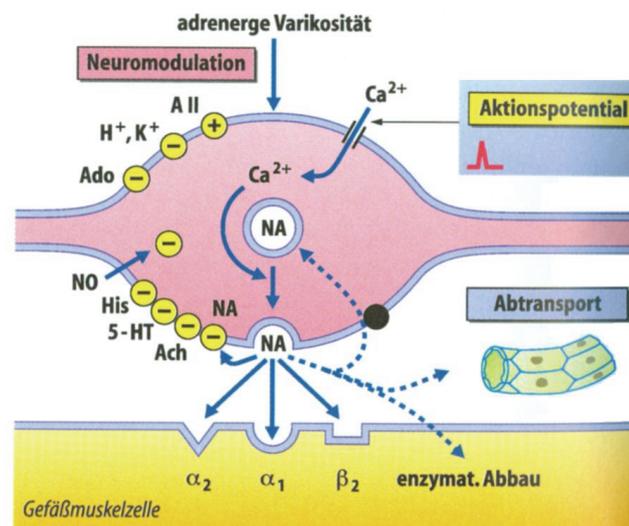


Abbildung 3: Präsynaptische Modulation der Noradrenalinfreisetzung sowie Mechanismen der Noradrenalinaktivierung in der Gefäßwand: NA Noradrenalin; Ach Acetylcholin; 5-HT Serotonin; His Histamin; Ado Adenosin; A II Angiotensin II; NO Stickstoffmonoxid; α_1 α_1 -Adrenozeptor; α_2 α_2 -Adrenozeptor; β_2 β_2 -Adrenozeptor; + Förderung der NA-Freisetzung; - Hemmung der NA-Freisetzung (Schmidt et al. 2007)

Cholinerge Nervenfasern bilden im Gegensatz zu adrenergen Nerven keine tonische Grundaktivität. Eine funktionell wichtige Bedeutung der parasymphatisch-cholinergen Innervation der glatten Gefäßmuskulatur wurde bisher nur an den Genitalorganen, den Koronararterien sowie den kleinen Piaarterien nachgewiesen. Die Aktivierung dieser Nervenfasern führt über indirektem Wege, über die Freisetzung von NO aus den terminalen Nervenendigungen, zu einer Vasodilatation (Schmidt et al. 2007; Burnett 1997; Rettori et al. 1992).

1.3.2.2. *Humorale Faktoren*

Zusätzlich zu Einflüssen des vegetativen Nervensystems können zahlreiche zirkulierende Faktoren das Gefäßsystem beeinflussen. Zu diesen zählen:

- Zirkulierende Katecholamine
- Renin/Angiotension/Aldosteron-System (RAAS)
- Atriales natriuretisches Peptid (ANP)
- Antidiuretisches Hormon (ADH)

Darüber hinaus besitzen andere Hormone wie Thyroxin, Östrogen, Insulin und das Wachstumshormon direkte bzw. indirekte Einflüsse auf das vaskuläre System (hier nicht im Detail diskutiert).

Zirkulierende Katecholamine stammen sowohl aus dem Nebennierenmark als auch von den sympathischen Nervenfasern, die die Blutgefäße innervieren. Adrenalin stimuliert über β 1-Rezeptoren das Herz und senkt über β 2-Rezeptoren den Gefäßtonus bzw. den Gefäßwiderstand. Über α 1- bzw. α 2-Rezeptor wird der Gefäßtonus bzw. der Gefäßwiderstand erhöht.

Das RAAS regelt prinzipiell die Wasserausscheidung über die Niere, Angiotensin II ist jedoch zusätzlich ein potenter Vasokonstriktor.

ANP wird von den Myozyten der Vorhöfe als Folge von deren Dehnung produziert und wirkt als gegenregulatorisches System zum RAAS.

ADH (Vasopressin) wird vom Hypophysenhinterlappen sezerniert und verringert die Wasserausscheidung über die Niere. Gleichzeitig besitzt es eine vasokonstriktorische Wirkung – daher die Bezeichnung „Vasopressin“.

1.3.3. Intrinsische Faktoren

1.3.3.1. *Myogene Faktoren*

Bei der myogenen Tonusmodulation wird ohne Beteiligung der Gefäßnerven eine Konstriktion der glatten Muskelzellen erreicht. Durch die Erhöhung des transmuralen Drucks (P_{tm}) in den terminalen Arterien und Arteriolen reagieren Gefäßmuskelzellen dehnungsabhängig mit einer verringerten myogenen Tonusentwicklung. Auf zellulärer Ebene kommt es zu einer Öffnung mechanosensitiver Kationenkanäle und daher zu einer spontanen Depolarisation. Ein Einstrom von Kalziumionen über spannungsabhängige Kalziumkanäle wird ausgelöst. Aufgrund dieser Tatsache verringert sich der Gefäßradius soweit, sodass die tangentialen Wandspannung wieder in die Nähe des Ausgangswerts zurückgeführt wird (siehe Abb. 4). Aufgrund dieser dehnungsinduzierten Kontraktion, welche auch als „Bayliss-Effekt“ bezeichnet wird, kann der Blutdruck in den Organen auf einem konstanten Niveau gehalten werden. Dies gilt vor allem für Niere und Gehirn. Bei einer Veränderung der Körperlage (Orthostase), die zu einer Erhöhung des transmuralen Drucks in den Beingefäßen führt, sorgt der Bayliss-Effekt dafür, dass der kapilläre Filtrationsdruck einigermaßen konstant gehalten

wird. Dies dient zur Vorbeugung von Ödemen (Klinke et al. 2005; Schmidt et al. 2007; Guyton et al. 2006)

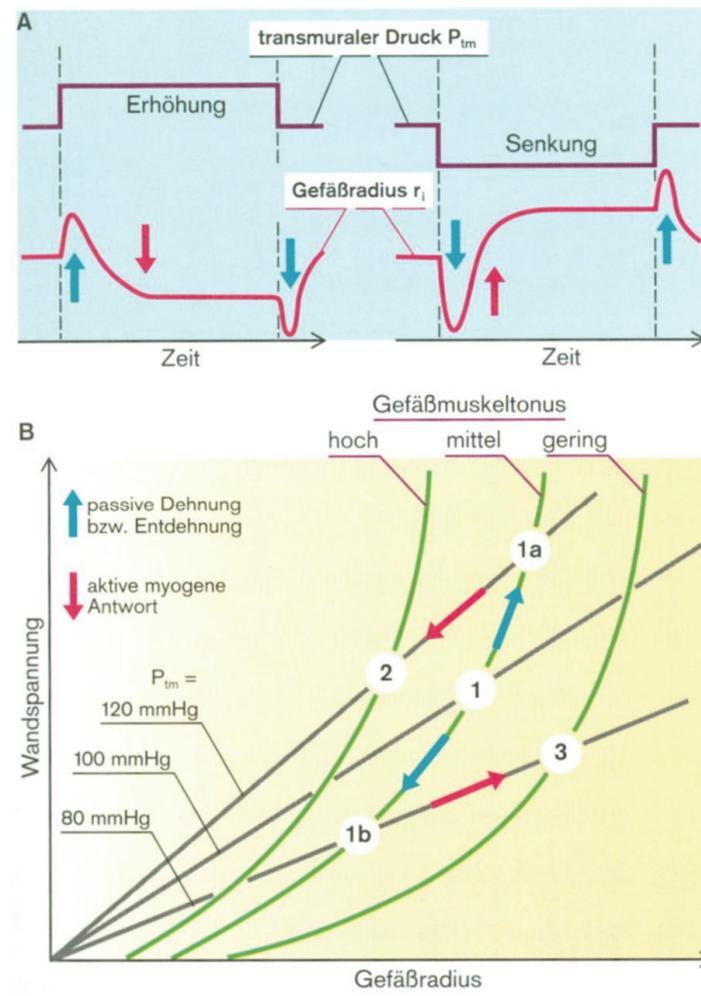


Abbildung 4: Passive und aktive Antwort der Gefäßmuskulatur auf Dehnung: A: bei einer plötzlichen Erhöhung des transmuralen Drucks P_{tm} , folgt nach kurzer passiver Zunahme des Gefäßradius r_i , eine aktive Vasokonstriktion unterhalb des Ausgangswertes und vice versa. B: Beziehung zwischen Gefäßradius und Wandspannung für drei Tonuslagen der Gefäßmuskulatur. Ausgangspunkt 1 führt durch Veränderung von P_{tm} passiv zu den Punkten 1a bzw. 1b. Die aktive myogene Antwort führt aufgrund Gefäßdurchmesseränderung zu Punkt 2 bzw. 3. Dieser Schritt führt die Wandspannung des Gefäßes wieder zurück in die Nähe des Ausgangswertes (Klinke et al. 2005)

1.3.3.2. Endotheliale Faktoren

Das Endothel, die innerste Schicht der Blutgefäße, ist eine Grenzbarriere zwischen Blut und Gefäßwand. Es produziert Substanzen, welche einerseits autokrin auf das Endothel selbst, parakrin auf benachbarte Zellen und endokrin über den Blutweg wirken (Schechter et al. 2003). Außerdem sind Endothelzellen für die Thrombozytenaktivierung, Leukozytenadhäsion und die Regulation des vasomotorischen Tonus durch die Produktion vasoaktiver Substanzen

von wesentlicher Bedeutung. Als vasoaktive Substanzen werden meist Autakoide (Gewebshormone) bezeichnet, welche die Fähigkeit besitzen, den Gefäßtonus zu modulieren und damit verbunden den Blutfluss - gefäßdurchmesserabhängig - zu regulieren. Die wichtigsten Vertreter dieser vasoaktiven Substanzen sind Stickstoffmonoxid (NO), Endothelin, Prostazyklin und Angiotensin II (Furchgott et al. 1980). In Tabelle 2 werden die endothelialen Faktoren aufgelistet, welche an der vaskulären Homöostase beteiligt sind. Durch die Produktion, Freisetzung und Aktivierung/Inaktivierung dieser vasoaktiven Substanzen stellt das Endothel einen wichtigen Modulator bei der Regulation des Gefäßtonus dar. Aufgrund der NO-Produktion ist das Endothel der Protagonist bei der vaskulären Homöostase (Rafikov et al. 2011). NO ist darüber hinaus ein Schlüsselmolekül bei der Prävention von Atherosklerose und wird lediglich vom gesunden Endothel produziert (Cooke & Dzau 1997; R K Kharbanda & J E Deanfield 2001). Ist das Endothel beschädigt, fällt dieser protektive Faktor weg (Förstermann & Münzel 2006; Al-Qaisi et al. 2008). Die Endothelfunktion wird in der modernen Medizin als Surrogat verwendet, um den Gefäßzustand zu evaluieren und ist dadurch ein prognostisches Hilfsmittel bei der Früherkennung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Die Methoden zur Beurteilung der Endothelfunktion werden in den folgenden Kapiteln diskutiert. Die Regulation des Gefäßtonus kann sowohl durch Scherkräfteinwirkung am Endothel (physikalisch) sowie biochemisch durch ligandenabhängige Rezeptoren erfolgen.

Vasoaktive Faktoren	NO Prostazyklin Prostaglandin EDHF, Endothel Derived Hyperpolarizing Factor C-natriuretisches Peptid Endothelin-1 Endoperoxide (PGH ₂) Angiotensin II Urotensin II
Hämostatische und fibrinolytische Faktoren	Tissue Plasminogen Aktivator (tPA) Thrombomodulin Plasminogenaktivator Inhibitor-1 (PAI-1) Tissue-Faktor Von-Willebrand-Faktor
Wachstumsmodulatoren	NO Prostazyklin EDHF C-natriuretisches Peptid Endothelin-1 Angiotensin II Urotensin II

Entzündungsmodulatoren	Chemokine (MCP-1) Adhäsionsmoleküle (VCAM-1, ICAM-1, Selektine) Zytokine (TNF- α , Interleukine 1, 16 und 18)
-------------------------------	--

Tab. 2. Endotheliale Faktoren für die Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase (modifiziert nach Schmidt & Lang 2007)

1.3.3.3. Lokale Regulation des Blutflusses (lokale Hormone und Metabolite)

Gewebe und Organe besitzen in wechselndem Ausmaß die Fähigkeit zur lokalen Regulation ihrer eigenen Versorgung mit Blut. Dieses Phänomen wird häufig als „lokale Regulation“ bezeichnet oder – da Metaboliten aus dem Zellstoffwechsel überwiegend dafür verantwortlich sind – als „metabolische Autoregulation“ (metAR).

Dabei verändert der Anstieg oder Abfall der lokalen Stoffwechselaktivität die Freisetzung dieser vasoaktiven Substanzen, sodass metabolische Aktivität und Organdurchblutung eng miteinander gekoppelt sind.

Beteiligt an der lokalen Regulation sind Faktoren aus dem Gewebe, das die Blutgefäße umgibt, entweder parakrine Substanzen (Histamin, Bradykinin, Prostaglandine) oder Metaboliten des Zellstoffwechsels (CO_2 , Laktat, H^+ , K^+ etc.). Eine übersichtliche Darstellung der Wirkung vasoaktiver Substanzen auf die Arteriolen zeigt Abb. 5.

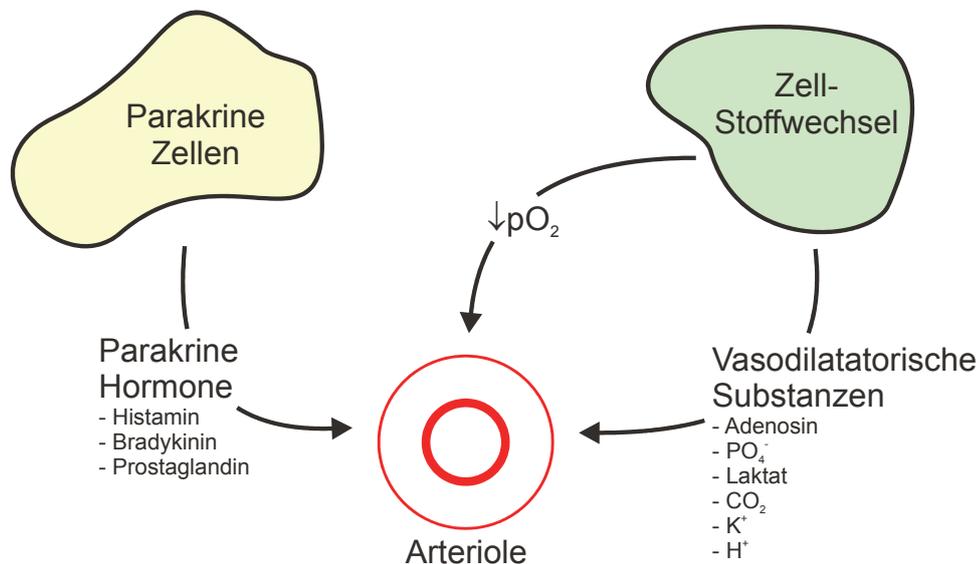


Abbildung 5: Metabolische Autoregulation (schematisch) nach Klabunde 2012

Zu den wichtigsten metabolisch autoregativ wirksamen Substanzen zählen die im Folgenden diskutierten Faktoren (Klabunde 2012).

Adenosin ist ein potenter Vasodilatator in den meisten Organen, es entsteht durch die Dephosphorylation von AMP, das wiederum über die Hydrolyse von ATP und ADP zustande kommt.

Anorganisches Phosphat (PO_4^-) wird aus der Hydrolyse von AMP, ADP und ATP freigesetzt und weist vasodilatatorische Wirkungen vor allem in der arbeitenden Muskulatur auf.

Kohlendioxid (CO_2) entsteht als Endprodukt des oxidativen Stoffwechsels. Es kann ausgezeichnet von den Parenchymzellen zur glatten Gefäßmuskulatur diffundieren und verursacht eine Vasodilatation.

Wasserstoffionen und Laktat (H^+ und La): H^+ steigt als Folge der Abpufferung von CO_2 über das Bikarbonat-Puffersystem an, ebenso wird es beim anaeroben Stoffwechsel zugleich mit La als Endprodukt produziert. H^+ verursacht eine lokale Vasodilatation.

Kaliumionen (K^+) werden von Muskelzellen freigesetzt, die Aktionspotentiale erzeugen. In der Repolarisationsphase eines Aktionspotentials kommt es zu einem K^+ -Ausstrom aus dem intrazellulären Raum, die durch die Na^+/K^+ -Pumpe nicht rasch genug kompensiert werden kann. K^+ hyperpolarisiert die glatten Gefäßmuskelzellen und führt zu deren Relaxation.

Sauerstoff (O_2) spielt im Blut, in der Gefäßwand und im umgebenden Gewebe eine wichtige Rolle bei der lokalen metabolischen Regulation. Ein Abfall des O_2 -Partialdrucks (als Folge unzureichender Versorgung oder verstärktem Bedarf) führt direkt oder indirekt über H^+ , CO_2 und Laktat zu Vasodilatation (mit Ausnahme des Lungenkreislaufs).

1.4. Rolle des Endothels bei der Tonusmodulation

1.4.1. NO-Bildung

1.4.1.1. Grundprinzip

Endothelzellen exprimieren eine konstitutive NO-Synthase (eNOS), welche mittels Ca^{2+} /Calmodulin, sowie über mehrere Proteinkinasen (Phosphorylierung) aktiviert wird. Diese eNOS bilden aus der Aminosäure L-Arginin unter Abspaltung von L-Zitrullin Stickstoffmonoxid (NO). In Ruhe kommt es in nahezu allen Gefäßen zu einer

kontinuierlichen Freisetzung von NO aus dem Endothel und damit zu einer Abschwächung der sympathisch-adrenergen Vasokonstriktion. Die Ca^{2+} /Calmodulin - Abhängigkeit der eNOS beinhaltet, dass alle Agonisten, welche die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in den Endothelzellen erhöhen, die NO-Bildung steigern. Als wichtige Agonisten gelten ACh, Bradykinin, Histamin, Thrombin und Substanz P (Schmidt et al. 2007; Furchgott et al. 1989). Interessanterweise steigt die Expression von eNOS mit dem Alter an, obwohl die Endothelfunktion (also die Produktion von NO) sinkt. Dies könnte ein Mechanismus sein, um die Bioverfügbarkeit von NO zu steigern (Donato et al. 2009). In Abb. 6 werden die generellen Mechanismen der endothelialen NO-Bildung schematisch dargestellt.

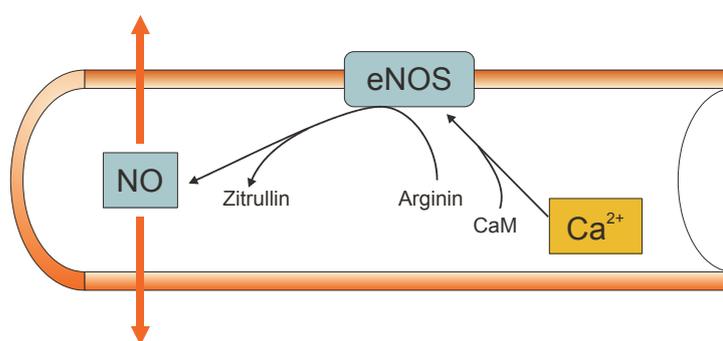


Abbildung 6: Schematische Darstellung des endothelialen L-Arginin-Pathways zur Illustration der endothelialen NO Bildung

1.4.1.2. Effekte von NO an der glatten Muskulatur

Einige Studien in den letzten 20 Jahren haben gezeigt, dass NO als Modulator einer Vielzahl von Funktionen wie Muskelkontraktilität, Thrombozytenaggregation, Metabolismus, neuronale Aktivität und Immunfunktionen gilt. Weiters wird die Zellatmung der Mitochondrien durch cytochrome C-Oxidase inhibiert und diverse Proteine und Enzyme NO-abhängig nitrosyliert. Unter pathophysiologischen Bedingungen führt die erhöhte Produktion von NO wiederum zu einer Bildung von Peroxynitrit, einem potenten Oxidant, und dadurch zu Gewebeschädigung (Gao 2010). Die sehr unterschiedlichen biologischen Effekte von NO liegen an der Interaktion zwischen NO und NO-Derivaten und vielen weiteren relevanten Biomolekülen wie zum Beispiel „Reactive Oxygen Species (ROS)“ (Laroux et al. 2000; Erusalimsky et al. 2007; Jobgen et al. 2006). NO gilt als hochpotenter Faktor bei der Vasodilatation durch Relaxation am glatten Muskel des Gefäßes. Dieser Effekt ist auf die erhöhte intrazelluläre cGMP Konzentration durch die Stimulation von cytosolischer Guanylatzyklase (sGC) zurückzuführen, einem heterodimeren Enzym, welches aus einer Alpha - ($\alpha 1$ oder $\alpha 2$) und einer Beta - Untereinheit ($\beta 1$) besteht. Das $\alpha 1\beta 1$ -Dimer ist die

dominierende Isoform und in den meisten Geweben exprimiert. Die $\alpha 2\beta 1$ Isoform ist jedoch in Hirn, Lunge, Darm, Herz, Milz, Uterus und Plazenta exprimiert. sGC wird bei NO-Konzentrationen <10 nM aktiviert (Cathrine et al. 2009). Die Aktivierung von sGC erhöht die Produktion von cGMP um das 100- bis 400-fache. Es wird davon ausgegangen, dass die Bindung von NO an die Eisenuntereinheit von sGC zu einer Konformationsänderung des benachbarten katalytischen Zentrums desselben führt und damit die inaktive Form in eine aktive umgeformt wird. Aufgrund dessen wird die Konversionsrate von GTP zu cGMP erhöht (Schmidt et al. 2007; Friebe et al. 2009). Die cGMP-abhängige Protein Kinase (PKG) ist das Hauptenzym für cGMP, damit der Muskeltonus der glatten Muskulatur reduziert werden kann. In eukaryotischen Zellen werden 2 Formen von PKG ausgeformt. PKG I kommt hauptsächlich in Thrombozyten, glatter Muskulatur, Lunge und in einigen Gehirnbereichen vor. PKG II ist im Bereich der intestinalen Mukosa, der Niere, Drüsen, Chondrozyten und ebenfalls im Gehirn lokalisiert. Jedoch findet man PKG II nicht in Herz- und Gefäßmuskelzellen, was PKG I zum funktionellen Bestandteil der Muskelrelaxation/Vasodilatation macht (Francis et al. 2005; Hofman et al. 2009). PKG abhängige Muskelrelaxation funktioniert hauptsächlich über die Inhibierung des extrazellulären Ca^{2+} -Influx in die Zelle. Weiters wird die Ca^{2+} -Ausschüttung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) verhindert und die Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente gesenkt. PKG I hat außerdem die Fähigkeit, den Inositol 1,4,5-triphosphat (IP3) Rezeptor zu phosphorylieren um dadurch wiederum die Ca^{2+} -Ausschüttung aus dem SR zu inhibieren (Gao et al. 2010). Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ist ein wesentlicher Mechanismus des NO-cGMP-Pathways bei der Regulation des Muskeltonus. PKG könnte außerdem die Myosin Light Chain Phosphatase (MLCP) inhibieren und somit RhoA ersetzen, welches GTPase Aktivität besitzt (Hofman et al. 2009; Ito et al. 2004). Der Phosphorylierungsgrad der Myosin Light Chain (MLC) gilt als wesentlicher zellulärer Mechanismus bei der Regulation des Gefäßmuskeltonus (siehe Abb. 7) (Klinke et al. 2005).

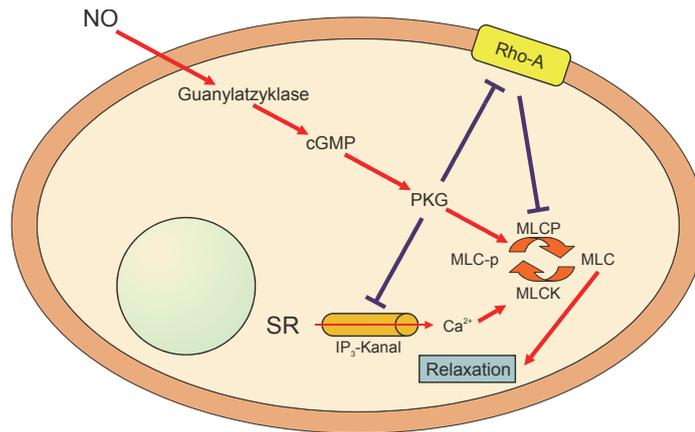


Abbildung 7: Mechanismus der NO-abhängigen Vasodilatation in der glatten Muskelzelle

Es muss beachtet werden, dass die vasomotorische Antwort eines Gefäßes einen Nettoeffekt von endothelabhängiger Dilatation (NO) und direkt glattmuskulär vermittelter Konstriktion darstellt. Ist das Endothel nicht intakt, wie zum Beispiel bei Diabetes mellitus, Arteriosklerose oder Hypercholesterinämie, sinkt die Bioverfügbarkeit des NO stark ab, was in einem Nicht-Gleichgewicht der vasodilatatorischen und vasokonstriktorischen Faktoren zu Gunsten Letzterer resultiert (Schmidt et al. 2007). In Abb. 8 wird dieser Zusammenhang verdeutlicht.

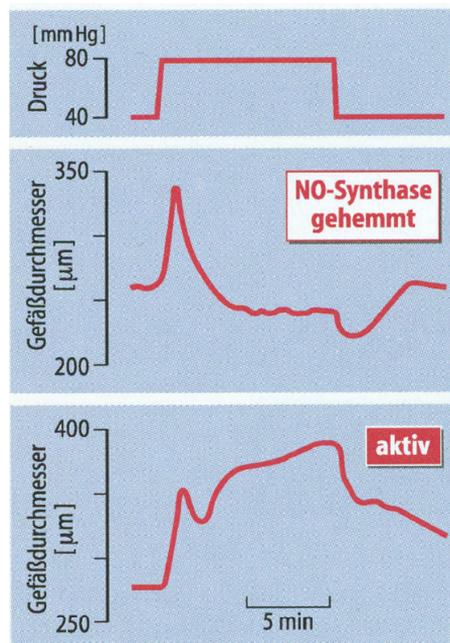


Abbildung 8: Effekt der flussvermittelten NO-Bildung auf die myogene Vasokonstriktion bei Mesenterialarterien (Schmidt et al. 2007)

Die spontane Erhöhung des transmuralen Druckes (siehe Abb. 8, oberstes Bild) führt in einem Gefäß ohne NO- Produktion (durch Hemmung der eNOS meist durch L-NMMA; Abb. 8,

Bildmitte) ausschließlich zu einer myogenen Antwort. Nach kurzer druckvermittelter Gefäßzunahme folgt eine starke Vasokonstriktion. Bei einem intakten Gefäß mit funktioneller eNOS (siehe Abb. 8, unteres Bild) erfolgt flussvermittelt eine Vasodilatation, welche die vasokonstriktorische myogene Antwort übertrifft (Schmidt et al. 2007; Tschudi et al. 1996).

1.4.1.3. Flussvermittelte NO-Bildung

Laminare Strömungen homogener Flüssigkeiten können mittels des „Newtonschen Gesetzes über die innere Reibung von Flüssigkeiten“ beschrieben werden. Dieses besagt, dass wenn sich zwischen zwei Platten eine homogene Flüssigkeit befindet, eine Kraft K zum Ziehen der oberen Platte mit der Fläche F und der Geschwindigkeit v erforderlich ist (siehe Abb. 9). Aufgrund des Anhaftens der äußeren Flüssigkeitsschichten an den jeweiligen Platten beträgt die Geschwindigkeit der oberen Platte v , die Geschwindigkeit der unteren Platte ist Null. Infolge der Reibung stellt sich ein lineares Geschwindigkeitsprofil (Geschwindigkeitsgefälle dv/dx) zwischen den Platten ein (siehe Abb. 9). Der Quotient K/F wird als Schubspannung τ (shear stress) bezeichnet, der Geschwindigkeits-Gradient dv/dx als Scherrate γ (shear rate). Der Quotient τ/γ wird als dynamische Viskosität η bezeichnet (Schmidt & Lang 2007).

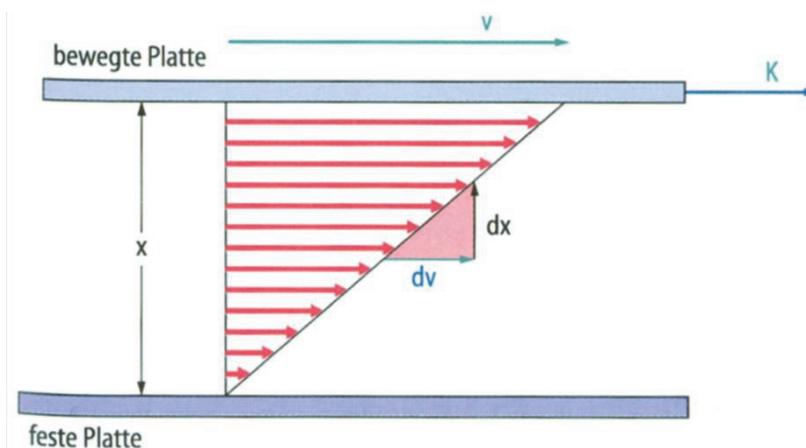


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Scherung (nach Schmidt & Lang 2007)

Bei laminaren Strömungen in zylindrischen Rohren haftet die unmittelbar an der Gefäßwand angrenzende Schicht an dieser, die übrigen Schichten verschieben sich teleskopartig gegeneinander. Das resultierende Geschwindigkeitsprofil ist eine quadratische Parabel mit dem Maximum von v im Axialstrom (siehe Abb. 10 – links)

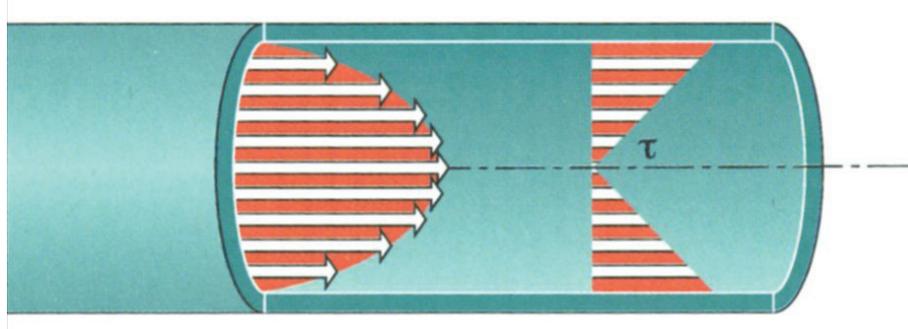


Abbildung 10: Darstellung des Geschwindigkeitsprofils und der Schubspannung bei laminarer Strömung (nach Schmidt & Lang 2007)

Nach dem Hagen-Poiseuillschen Gesetz lässt sich bei laminarer stationärer Strömung im starren Rohr (Radius r , Länge l) zwischen Stromstärke I und der Druckdifferenz Δp folgende Beziehung ableiten:

$$I = \frac{r^4 \cdot \pi \cdot \Delta p}{8 \cdot \eta \cdot l}$$

Die Schubspannung τ variiert linear von einem Maximalwert an der Gefäßwand und Null in der Gefäßmitte (siehe Abb. 10 – rechts).

Mittelt man die Strömungsgeschwindigkeit v über den Gefäßquerschnitt (mittlere Geschwindigkeit v_m), so ergibt sich die Wandschubspannung τ_w zu:

$$\tau_w = \frac{4v_m \cdot \eta}{r}$$

Die flussvermittelte, auch schubspannungsabhängige oder strömungsinduzierte NO-Bildung genannt, gilt als wesentliche Regulation des erhöhten Durchblutungsbedarfs der Gewebe. Dies erfolgt durch die Anpassung der Leitfähigkeit der vorgeschalteten Gefäßabschnitte, welche nicht von der metabolisch induzierten Vasodilatation in der Mikrozirkulation erfasst werden. Sie tritt sowohl an großen als auch an kleinen, widerstandsbestimmenden Arterien und Arteriolen auf. Aufgrund dieser Anpassung lässt sich bei gegebenem Perfusionsdruck, zusätzlich zur metabolischen Dilatation, die volle Durchblutungsreserve eines Organs ausschöpfen (Schmidt et al. 2007). Der an der Endothelzelloberfläche einwirkende erhöhte Blutfluss führt zu einer erhöhten Schubspannung. Über diesen Mechanismus wird das interendotheliale Adhäsionsmolekül PECAM-1 phosphoryliert. Nachfolgend wird die PI3-Kinase (PI3K) aktiviert, welche erneut zu einer verstärkten Bildung von PIP3 führt. PIP3

rekrutiert die Proteinkinase B/Akt an die Plasmamembran, wobei PDK phosphoryliert und dadurch aktiviert wird. In weiterer Folge wird über Akt die endotheliale NO-Synthase ebenfalls phosphoryliert. Diese Phosphorylierung erfolgt an der Aminosäure Serin an Stelle 1177 (Serin 1177). Die Enzymaktivität wird aufgrund des gesteigerten Elektronenflusses erhöht und NO synthetisiert (Schmidt & Lang 2007). In folgender Abbildung wird der molekulare Mechanismus der flussvermittelten NO-Bildung der Endothelzelle dargestellt.

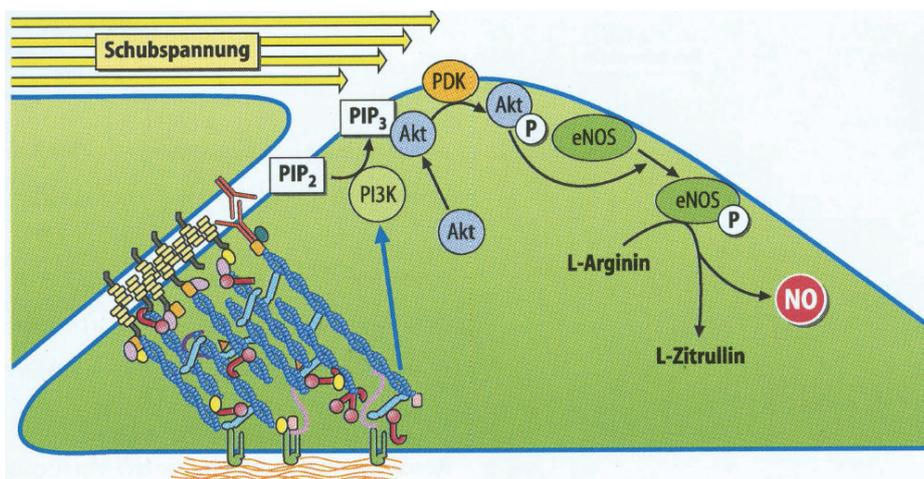


Abbildung 11: Molekularer Mechanismus der flussvermittelten NO-Bildung (Schmidt & Lang 2007) PIP2 Phosphatidylinositid-Biphosphat; PIP3 Phosphatidylinositid-Triphosphat; PI3K Phosphatidylinositid-3-Kinase; PDK Phosphatidylinositid-abhängige Kinase

1.4.2. Endotheliale Dysfunktion

Das Endothel ist maßgebend an der vaskulären Homöostase und an der Tonusmodulation der Gefäße beteiligt (siehe vorne). Als wichtigster Faktor bei der Kontrolle des Gefäßtonus gilt vom Endothel produziertes Stickstoffmonoxid (NO), welches durch eine Vielzahl von Faktoren stimuliert beziehungsweise reguliert wird. In Tabelle 3 werden die relevanten Einflussfaktoren für die NO-Stimulation aufgelistet.

Acetylcholin	Blutfluss (Schubspannung)
Bradykinin	Katecholamine
Serotonin	A 23187 Ca ²⁺ -ionophore
ADP, ATP	Ca ²⁺ Gen-abhängiges Peptid
Histamin	Platelet-activating factor
Thrombin	Substanz P

Tab. 3: Faktoren zur NO-Stimulation (Anderson et. al 1999)

Zu endothelialer Dysfunktion (engl. „Endothelial Dysfunction – EDF) kommt es, wenn die Substanzsezerneung aus dem Endothel gestört ist und es daher zu einer Dysbalance zwischen gefäßerweiternden (vasodilatierenden) und gefäßverengenden (vasokonstriktorisches) Substanzen kommt (Deanfield et al. 2007). Es besteht die Möglichkeit, dass die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) an Stelle von NO das hoch reaktive, atherogene Superoxid exprimiert. (Wever et al. 1998). Superoxid reagiert sehr leicht mit NO zu Peroxynitrit, welches wiederum den Kofaktor der NO-Bildung Tetrahydrobiopterin (BH₄) abbaut. Es entsteht ein Teufelskreis, in dem die normalerweise gefäßschützende eNOS zu einem gefäßschädigenden Faktor entkoppelt wird. Man spricht in diesem Zusammenhang von „eNOS-Entkoppelung“ (Förstermann et al. 2006). Endotheliale Dysfunktion (EDF) wurde 1990 zum ersten Mal bei Patienten mit Hypertonie beschrieben (Panza et al. 1990). Die Dysfunktion der Endothelzelle führt zu einer gestörten vaskulären Homöostase und wird daher als Vorstufe von atherosklerotischen Prozessen angesehen. Die EDF geht morphologisch-pathologischen Veränderungen der Gefäßwand voraus und eignet sich daher auch für Prognose und Risikoeinschätzung bei Atherosklerose und anderen kardiovaskulären Erkrankungen (Epstein et al. 1999; Anderson et al. 1999). In folgender Tabelle werden die wesentlichsten Risikofaktoren bei der EDF aufgelistet.

Atherosklerose	Diabetes Mellitus Typ I und II
Hypercholesterinämie	Hyperglykämie
Niedriges HDL-Cholesterin	Akute postprandiale Hypertriglyceridämie
Hohes Lp(a)	Rauchen (aktiv und passiv)
Kleine LDL-Partikel	Kardiomyopathie
Oxidiertes LDL	Chagas-Krankheit (Parasitose)
Hypertonie	Jegliche Art von Herzfehlern
Hyperhomocysteinämie	Familiäre Prädisposition von Herzkrankheiten
Alter	Postmenopause
Gefäßentzündungen	Post-Kawasaki Krankheit (Form einer Vaskulitis)
Transplantation	Schwangerschafts-induzierte Hypertonie
Kardiales Syndrom X	Pulmonale Hypertonie
Insulinresistenz	Erhöhte Konzentration von Methionin

Tab. 4: Risikofaktoren, welche mit eingeschränkter endothelabhängiger Vasodilatation einhergehen. (Anderson 1999)

Wird ein gesundes Endothel stimuliert, resultiert dies primär in einer Vasodilatation. Daraus ergibt sich, dass bei einer endothelialen Dysfunktion vorwiegend die Dilatation des Gefäßes eingeschränkt ist. Einige Studien im letzten Jahrzehnt konnten dies bestätigen (Park et al. 2001; Schiffrin et al. 2000; Park et al. 2001; Beckman et al. 2003; Rizzoni et al. 2001;

Schofield et al. 2002; Endemann et al. 2004; Landmesser et al. 2002; Bolton et al. 2001; Thambyrajah et al. 2000; Yildiz et al. 2003). Endemann et al. zeigten 2001, dass bei rund 60% aller Hypertoniepatienten eine eingeschränkte Vasodilatation der kleinen Arterien vorhanden ist (Park et al. 2001). In Abbildung 12 werden die Zusammenhänge der Risikofaktoren mit den pathologischen Auswirkungen verdeutlicht, eine Messung der Endothelfunktion gilt daher als wichtiger prognostischer Marker zur Evaluierung eines kardiovaskulären Ereignisses. Sowohl bei Patienten mit, als auch ohne Kardiopathien, konnte EDF mit kardiovaskulären Ereignissen assoziiert werden (Halcox et al. 2002; Schächinger et al. 2000; Suwaidi et al. 2000). In der folgenden Abbildung sind sowohl die Risikofaktoren als auch die Auswirkung der EDF dargestellt.

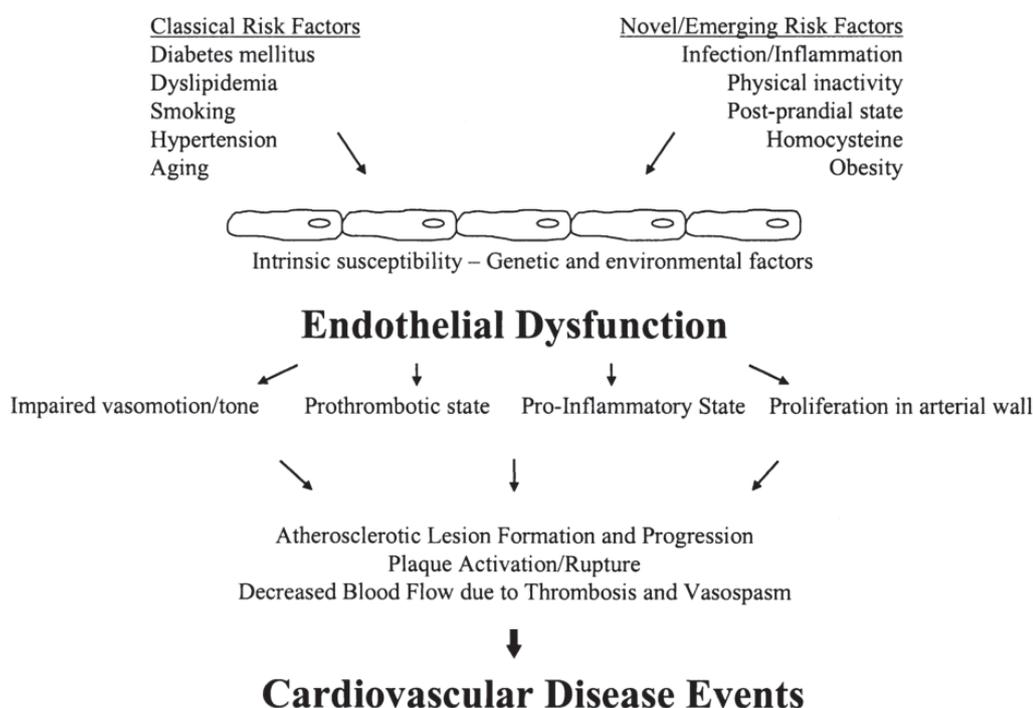


Abbildung 12: Ursache und Auswirkung der EDF (Widlansky et al. 2003)

1.4.3. Rolle von Nitraten bei der NO-Bildung

Unter Nitraten werden im medizinischen Kontext Ester der salpetrigen Säure und der Salpetersäure mit antianginöser (Anti-Angina-pectoris) Wirkung beschrieben. Einige Studien haben gezeigt, dass Glyceroltrinitrat (früher: Nitroglycerin, Abb. 13) über SH-Gruppen aus vorwiegend Cystein, zur Freisetzung von NO führt und wiederum zu einer Vasodilatation in der Gefäßmuskulatur beiträgt (Desk et al. 1986; Mutschler 1991). Sublingual wirkt

Glyceroltrinitrat unretardiert als Zerbeikapsel am schnellsten (innerhalb von Sekunden bis wenigen Minuten), aber auch am krziesten (ca. 10 Minuten) (Mutschler et al. 1991).

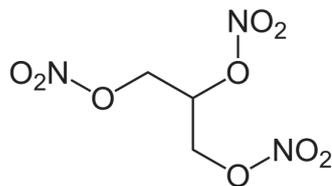


Abbildung 13: Chemische Strukturformel von Glyceroltrinitrat

In Abb. 14 wird der biochemische endotheliale L-Arginin-Pathway auch unter Einfluss von Glyceroltrinitrat vereinfacht dargestellt. Durch reduzierende SH-Gruppen, vorwiegend aus Cystein, werden Nitrate zur eigentlichen Wirksubstanz NO überführt. NO wirkt dann, wie schon in den vorhergehenden Kapiteln beschrieben, über die Stimulation von cytosolischer Guanylatcyclyase. Diese katalysiert die Bildung von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP). ber eine Abnahme der intrazellulären Calciumionen-Konzentration wird schlussendlich der Gefäßtonus erniedrigt. Medizinische Bedeutung kommt Glyceroltrinitrat bei der Behandlung von Angina pectoris und Herzinsuffizienz zu. In der Notfallmedizin kommt es auch bei Linksherzinsuffizienz und kardial bedingtem Lungenödem zum Einsatz (Mutschler 1991). In Tabelle 5 werden die wichtigsten pharmakologischen Auswirkungen von Nitraten zusammengefasst.

Vorlastsenkung (Preload – Reduktion)	Nachlastsenkung (Afterload – Reduktion)
Vasodilatation	Dilatation großer Arterien
Venous Pooling	Senkung des Aortendrucks
Senkung des venösen Rückstroms	Senkung des Totalen Peripheren Widerstand (TPR)
Senkung des Fllungsvolumen	Senkung der systolischen Wandspannung
Senkung der diastolischen Wandspannung	

Generelle Auswirkung

Sauerstoffbedarf sinkt, Herzarbeit sinkt, Verbesserung des Sauerstoffangebots

Tab. 5: Nitrate und deren Wirkung; modifiziert nach Mutschler 1991

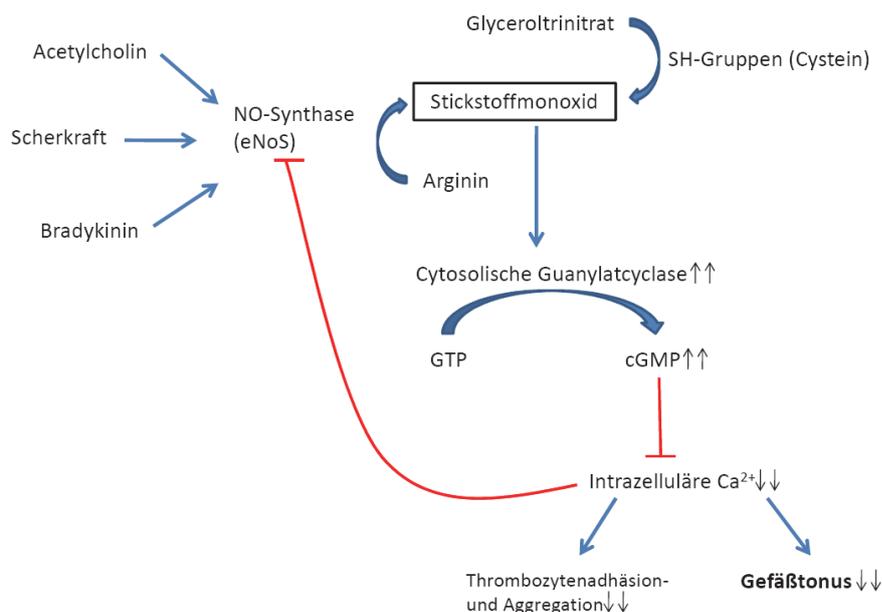


Abbildung 14: Vereinfachter eNOS-NO-Pathway: erstellt nach Toutouzas et al. 2008; Desk et al. 1986; Mutschler 1991

1.5. Nichtinvasive Methoden zur Beurteilung der Endothelfunktion

1.5.1. Allgemeines

Die Ermittlung der Endothelfunktion hat im Laufe der Zeit einen hohen Stellenwert bei der Früherkennung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen eingenommen. Aus diesem Grund haben sich viele Techniken zur Beurteilung verschiedenster Aspekte der Pathologie des Kreislaufsystems eingebürgert. Es wird jedoch primär versucht Techniken zu entwickeln, welche einerseits nichtinvasiv, verlässlich, reproduzierbar, einfach handhabbar und andererseits günstig in der Durchführung sind.

1.5.2. PWV

Die elastischen Eigenschaften der Gefäße sind hochkomplex, anisotrop, dynamisch und nichtlinear. Des Weiteren sind alle arteriellen Gefäßabschnitte aufgrund der zellulären und histologischen Strukturen morphologisch unterschiedlich. Die Elastizität der Blutgefäße nimmt aufgrund des Verhältnisses von Gefäßdurchmesser zur Wanddicke von proximal nach distal zu. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Pulswelle (PWV), welche schneller ist als die Blutströmungsgeschwindigkeit, hängt nun invers mit der Dehnbarkeit (Compliance) der Arterie zusammen. Bei jungen Menschen beträgt die PWV in der aufsteigenden Aorta ca. 4–

5 m/s, in der abdominellen Aorta ca. 5–6 m/s in a. femoralis und in der der a. iliaca ca. 8–9 m/s. Bei 80-jährigen Personen ist eine Karotis-Femoralis- (cf-) PWV von mehr als 12 m/s möglich (siehe Abb. 15) (Weber 2010).

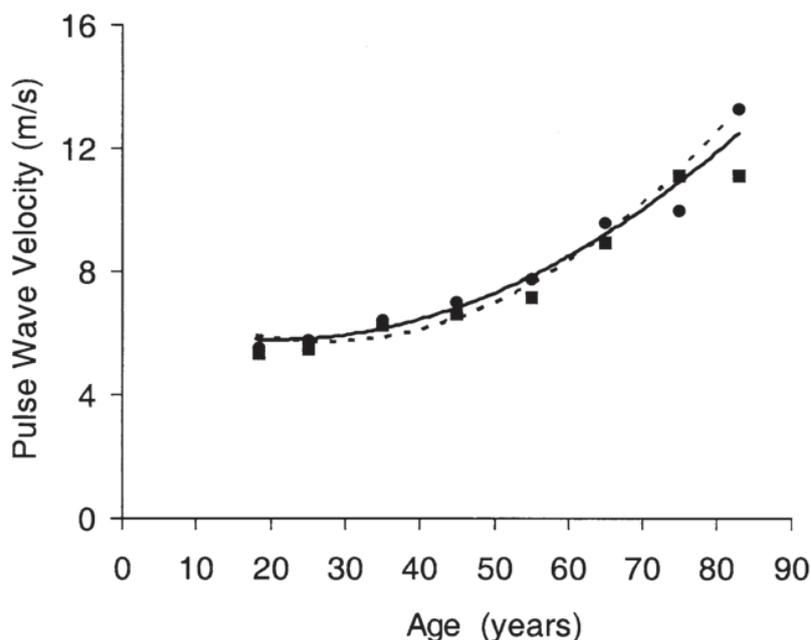


Abbildung 15: Effekt der altersabhängigen Veränderung der Pulswellengeschwindigkeit (McEniery et al. 2005). In dieser Abbildung wird die Pulswellengeschwindigkeit (m/s) gegen das Alter in Jahren aufgetragen. Die durchgehende Linie, welche sich aus den Punkten ergibt, stellt die Veränderung bei Männern dar; die unterbrochene Linie, welche sich aus den Quadraten ergibt, stellt die Veränderung bei Frauen dar.

Die Messung der PWV dient somit als Maß für die regionale arterielle Elastizität bzw. zur Beurteilung der arteriellen Steifigkeit („arterial stiffness“) (Weber et al. 2008). Die Pulswellengeschwindigkeit erhält man, indem die Zeit gemessen wird, welche die Pulswelle braucht, um eine gewisse Strecke in einer Arterie zu durchlaufen. Die Pulswelle wird mittels Ultraschall, Applanationstonometrie oder mit MR erfasst (Kröger et al. 2007). Die arterielle Steifigkeit dient als unabhängiger Prädiktor für kardiovaskuläre Gefäßkrankheiten und wird von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von „Vascular Aging“. McEniery et al. zeigten in ihrer Studie im Jahre 2006, dass es eine Korrelation zwischen Endothelfunktion und Pulswellengeschwindigkeit gibt. In dieser Studie wurde 309 Probanden sowohl ein endothelabhängiger β 2-Agonist (Albuterol) als auch ein endothelunabhängiges Glyceroltrinitrat verabreicht und anschließend die Pulswellengeschwindigkeit ermittelt (McEniery et al. 2006).

1.5.3. Flow mediated dilatation - FMD

1.5.3.1. Grundprinzip

Unter dem Begriff „Flow-mediated dilatation“ (kurz: FMD, deutsch: „flussvermittelte Vasodilatation“) versteht man die Vasodilatation aufgrund erhöhten Blutflusses. Die FMD ist auf Schubspannungsänderungen am Endothel zurückzuführen und lässt sich, wie später beschrieben, auf einfache Weise mittels Ultraschall messen. Das Ausmaß der an der a. brachialis, a. radialis beziehungsweise a. femoralis gemessenen Vasodilatation wird zur Beurteilung der Endothelfunktion herangezogen und ist somit ein Werkzeug für die Prognose eines möglichen Atheroskleroserisikos. Silber et al. haben 2005 gezeigt, dass die Ausprägung der FMD stark von der Größe des jeweiligen Gefäßes abhängig ist. Kleine Gefäße wie die a. brachialis zeigen aufgrund stärkerer Scherkrafteinwirkung eine stärkere Vasodilatation im Vergleich zu größeren Gefäßen (Silber et al. 2005; Kröger et al. 2007). Auch bei der FMD gilt vom Endothel produziertes NO als Hauptfaktor bei der Gesamtreaktion der Vasodilatation. Tschudi et al. konnten bereits 1996 zeigen, dass NO vor allem in den ersten Sekunden nach Stauöffnung vorwiegend an der Vasodilatation beteiligt ist (Tschudi et al. 1996). Durch die Inhibierung der eNOS durch NG-Monomethyl L-Arginin (L-NMMA) konnte bei mehreren Studien eine starke Verminderung der FMD gezeigt werden und demnach NO als mediiierende Substanz evaluiert werden (Dakak et al. 1998; Joannides et al. 1995; Rajesh K Kharbanda et al. 2001). In anderen Arbeiten konnte durch die Substitution von L-NMMA keine Veränderung im Verlauf der Gefäßreaktion gezeigt werden (Engelke et al., 1996; Tschakovsky et al. 2005; Wong et al. 2003). Nach unbestimmter Zeit folgen weitere, noch weitgehend unbekannte Mechanismen bei der Charakteristik der FMD (Pyke et al. 2005). In folgender Abbildung wird die hypothetische Abfolge von Mechanismen während einer FMD dargestellt.

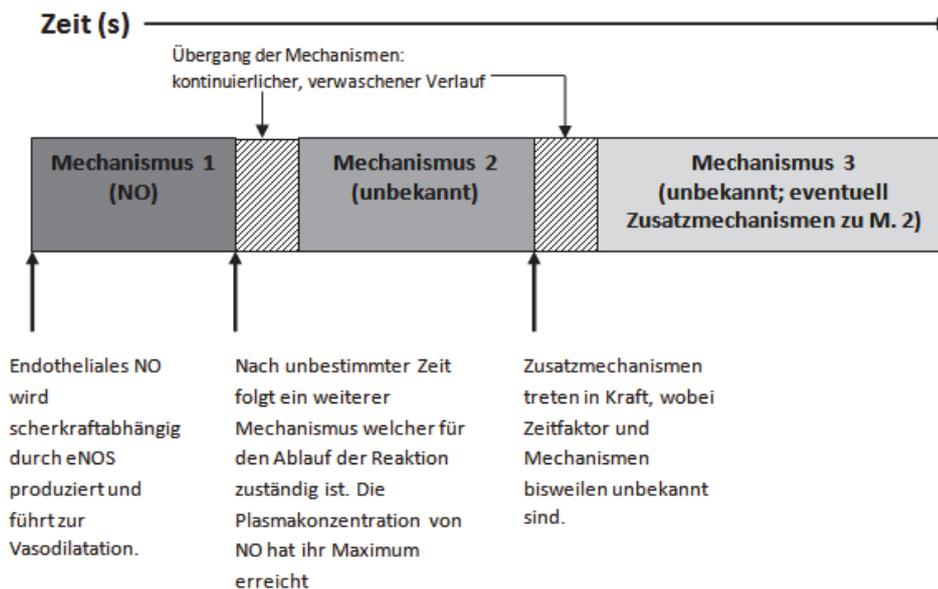


Abbildung 16: Mechanismus der FMD als Funktion der Zeit: modifiziert nach Pyke et al. 2005

1.5.3.2. Bestimmung mittels Magnetresonanztomografie (MRT)

Die Magnetresonanztomographie (MRT; Tomographie von altgriechisch $\tau\omicron\mu\eta$, tome, „Schnitt“ und $\gamma\rho\acute{\alpha}\phi\epsilon\upsilon\nu$, graphein, „schreiben“) ist ein weiteres nichtinvasives, bildgebendes Verfahren und wird vor allem in der medizinischen Diagnostik bei der Darstellung von Organstruktur und -funktion angewendet. Bei der MRT wird das physikalische Prinzip der Kernspinresonanz ausgenutzt, deswegen wird die MRT auch oft als Kernspintomographie bezeichnet. Dabei werden starke magnetische Gleichfelder, sowie elektromagnetische Wechselfelder im Radiofrequenzbereich, zur resonanten Anregung von Atomkernen (meistens Wasserstoffprotonen) genutzt. Diese Anregung induziert elektrische Signale. Je nach Protonengehalt der Gewebe erzielt man unterschiedliche Relaxationszeiten. Dies ist die Grundlage zur Bildkontrastgebung (Reiser et al. 2002). In Abb. 17 erkennt man die Gefäßveränderung der a. brachialis, welche mittels MRT dargestellt wurde.

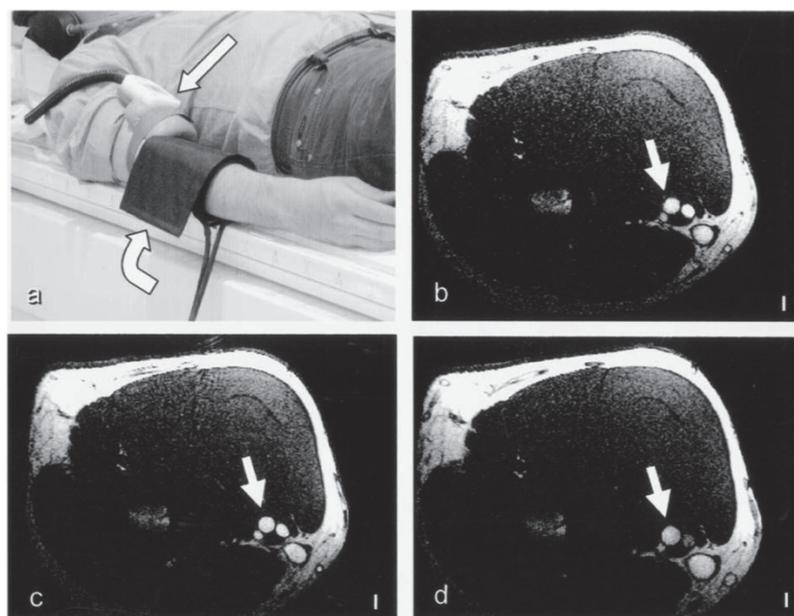


Abbildung 17: MRT der a. brachialis (sagittal) nach proximaler Okklusion am Unterarm (Wiesmann et al. 2004). (a) Versuchsanordnung mittels pneumatischer Manschette am Unterarm und einer Magnetspule distal des Ellbogens für die optimale Magnetresonanzsignaldetektion. (b) Baseline der a. brachialis (Pfeil) vor der Okklusion; (c) 1 min nach Okklusion und (d) 3 min nach der Okklusion. Der senkrechte Strich, jeweils rechts unten, dient als Längenmaß (3mm).

1.5.3.3. Bestimmung mittels Ultraschall

Diese Methode ist die gängigste und am häufigsten genutzte Technik zur Beurteilung der Endothelfunktion. Sie wird sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern angewandt und war die methodische Grundlage vieler Forschungsstudien mit großer Probandenzahl. Die Messung der Endothelfunktion in der Brachialarterie stellt schon seit über 18 Jahren (Anderson 1999; Sorensen et al. 1995) ein gutes Werkzeug dar, um ein präklinisches kardiovaskuläres Risiko bei Patienten mit oder ohne weiteren Risikofaktoren zu ermitteln (Sorensen et al. 1995; Corretti et al. 2002), wobei noch Resultate großer longitudinaler Kohortenstudien erwartet werden (Shimbo et al. 2010). Bei der FMD-Messung werden die schubspannungsabhängigen (flussvermittelten) Veränderungen des Durchmessers der a. brachialis mittels bildgebenden Ultraschalls ermittelt (siehe Abb. 18).

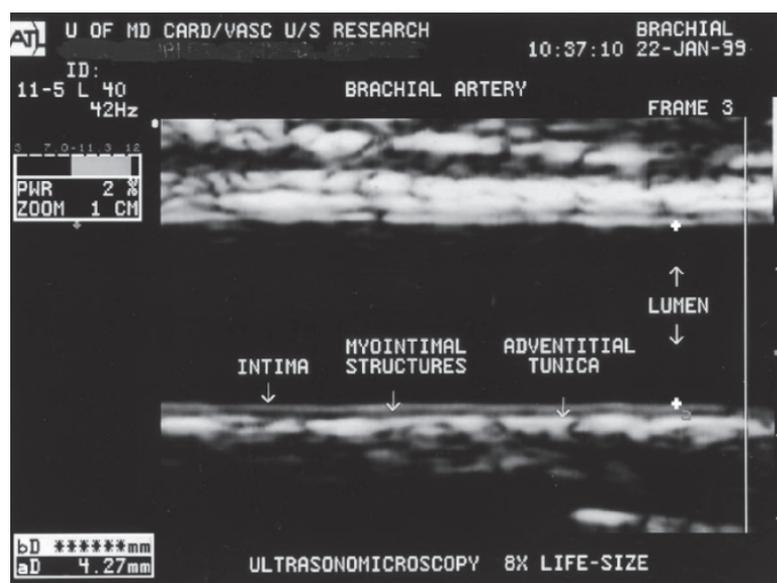


Abbildung 18: Ultraschallbild der Brachialarterie (longitudinal, 8-fach vergrößert, 11MHz) mit Beschriftung der Gefäßschichten und des Gefäßdurchmessers (Lumen) (Corretti et al. 2002)

Ein erhöhter Fluss in der Brachialarterie wird durch das Anlegen und Aufpumpen einer pneumatischen Manschette 50 mmHg suprasystolisch vorbereitet und durch Ablassen des Manschettendrucks nach 5 Minuten erzielt. Eine Minute nach Ablassen des Manschettendrucks wird die relative Änderung des Arterienradius im Vergleich zur Ausgangslage (präokklusiv) beurteilt (Al-Qaisi et al. 2008). Da der arterielle Durchmesser in der Systole, also während der Anspannungs- und Austreibungsphase, zu Beginn der Systole größer ist als zum Ende der Systole, muss der Messzeitpunkt genau an den Herzzyklus angepasst werden (Corretti et al. 2002). Um den richtigen Messzeitpunkt zu erzielen, orientiert man sich am EKG des Probanden. In Abb. 19 wird die Versuchsanordnung der FMD schematisch dargestellt.

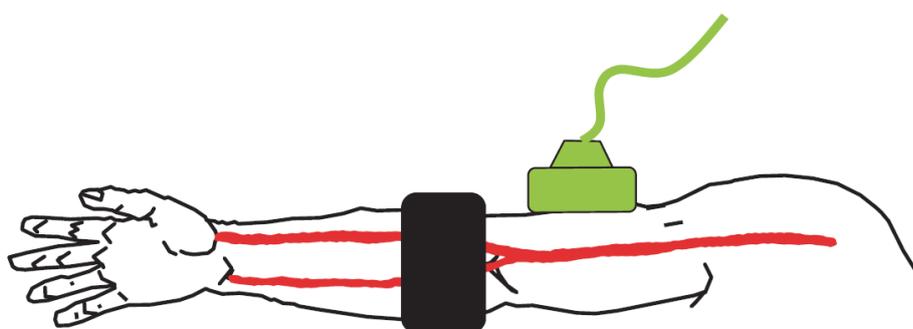


Abbildung 19: Position der Manschette (schwarz) und des Ultraschallkopfes (grün) bei der US-FMD (Al-Qaisi et al. 2008)

1.5.4. Postokklusive reaktive Hyperämie (PORH)

1.5.4.1. Grundprinzip

Von einer „reaktive Hyperämie“ spricht man, wenn zeitlich nach einer arteriellen Drosselung und daher eingeschränkten Blutzufuhr, ein Gewebe verstärkt durchblutet wird (Klinke et al. 2005). Ursachen für diese „Mehrdurchblutung“ sind vor allem körpereigene Kompensationsmechanismen, wie eine Anhäufung von Metaboliten im Gewebe und ein Abfall des Sauerstoffpartialdruckes (PO_2) (Beaufort-Krol et al. 1989; Silverthorn et al. 2009; Klinke et al. 2005). Aufgrund dieser Durchblutungssteigerung kommt es zu einer erhöhten Scherspannung (Synonym: Schubspannung) am Endothel und dadurch zu einer Vasodilatation (Pyke et al. 2005; Pohl et al. 1986; Koller et al. 1990). Die Beteiligung von Stickstoffmonoxid (NO) bei der Vasodilatation wird jedoch teilweise widersprüchlich diskutiert (Kooijman et al. 2008; Green et al. 2005; Tschakovsky et al. 2005; Wong et al. 2003).

Die PORH wird im Regelfall nach einer 5-minütigen suprasystolischen Stauphase distal der Okklusionsstelle gemessen. Nach Öffnen der Okklusion kommt es bei einer gesunden Person zu einer stark erhöhten Durchblutung des betroffenen Gewebes. Dieser physiologische Vorgang wird als „postokklusive reaktive Hyperämie“ (PORH) bezeichnet. Ungefähr 5 Minuten nach Beendigung der Stauphase wird wieder annähernd eine Ruhedurchblutung erreicht (siehe Abb. 20).

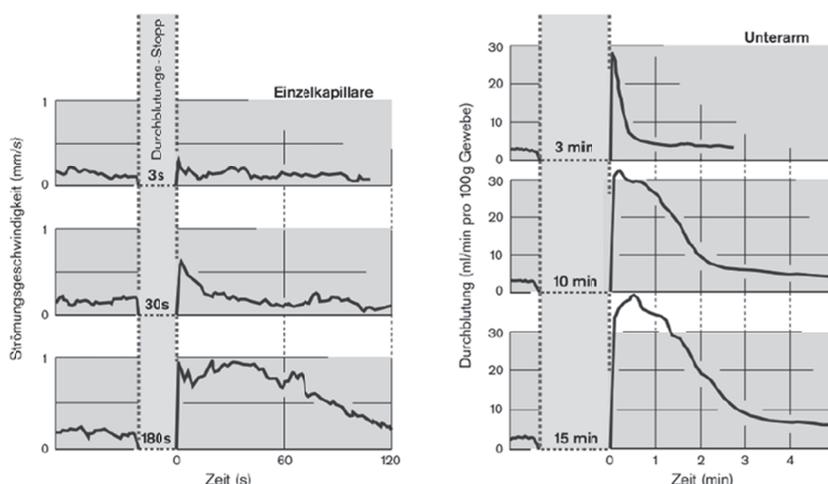


Abbildung 20: Kurvenverlauf der PORH; am Beispiel einer Einzelkapillare (links) mit einer Stauphase (Durchblutungs-Stopp) von 3 s, 30 s und 180 s; am Beispiel des Unterarms (rechts) mit einer Stauphase von 3 min, 10 min und 15 min; (Klinke et al. 2005)

1.5.4.2. Erfassung der PORH mittels optischer Plethysmografie (PORH/OPG)

Photoplethysmographie (auch optische Plethysmographie; kurz: OPG) ist eine nichtinvasive Technik, welche die relative Veränderung des Blutvolumens mittels eines optischen Verfahrens misst. Während der Systole erhöht sich sowohl der Durchmesser der Arterien als auch die Menge an Licht, welches von Hämoglobin absorbiert wird. Während der Diastole nimmt der Durchmesser und damit auch Blutfluss und Menge an absorbiertem Licht ab. Es kommt dadurch zu einer pulsatilen Signalveränderung (Zaheditochai et al. 2009; Kaltenecker 2010; Klasinc 2011). In Abb. 21 werden diese Veränderungen verdeutlicht. Es ist somit möglich, mittels Photoplethysmographie den erhöhten post-okklusiven Blutfluss zu messen, um in weiterer Folge die Endothelfunktion beurteilen zu können.

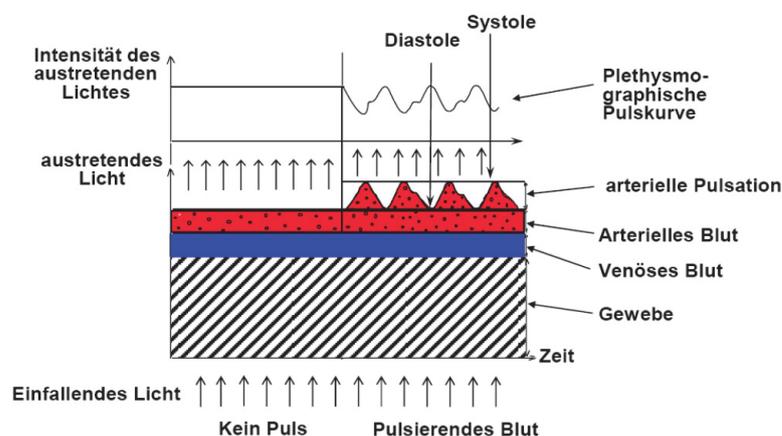


Abbildung 21: Prinzip der Lichtabsorption durch Blutvolumenveränderung bei der OPG (Kaltenecker et al. 2010)

1.5.4.3. Erfassung der PORH mittels Laser-Doppler-Flowmetrie (PORH/LDF)

Mit Hilfe der Laser-Doppler-Flowmetrie (LDF) ist es möglich, die mikrovaskuläre Perfusion zu erfassen. Monochromatisches Licht verändert seine Richtung, wenn es auf nicht bewegte Strukturen trifft. Die Frequenz ändert sich in diesem Fall nicht. Trifft das Laserlicht jedoch auf sich bewegende Teilchen, führt dies zu einer Frequenzveränderung. Dieser Mechanismus wird als Dopplershift (Doppler-Effekt) bezeichnet. Im konkreten Fall handelt es sich bei den bewegten Strukturen um Erythrozyten. Je schneller die Erythrozyten und je höher deren lokale Konzentration, umso stärker ist die Dopplershift. Die Eindringtiefe des Laserlichts wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst wie etwa Gewebeeigenschaften, Kapillarisdichte, Oxygenationsgrad der Erythrozyten, Pigmentation der Haut,

Wellenlänge des Lichts und Abstand von Sender zu Empfänger des Laser-Doppler-Kopfes etc. Die zu erwartende Eindringtiefe des Laserlichts bei 780 nm und einem Abstand von Sender zu Empfänger von 0,25 mm beträgt etwa 0,5 – 1 mm. Aufgrund dieser sehr geringen Eindringtiefe ist lediglich die Messung der oberflächlichen Mikrozirkulation möglich (Perimed, 2011).

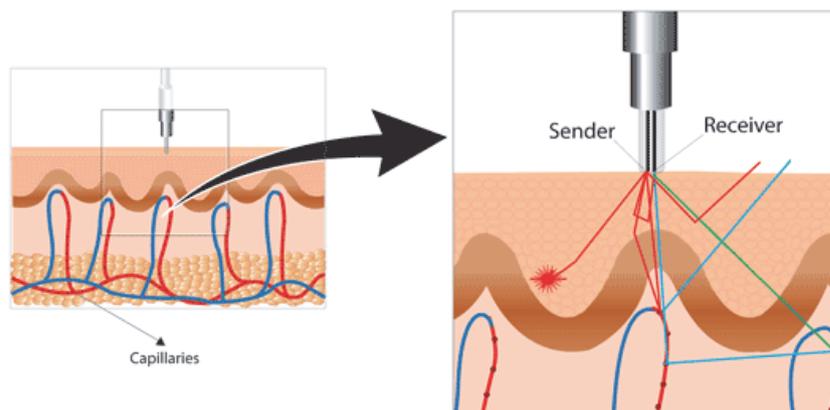


Abbildung 22: Schematische Darstellung einer LDF-Messung: vom Sender ausgehendes Laserlicht verändert seine Richtung bei nicht bewegten Strukturen. Trifft das Laserlicht auf sich bewegende Teilchen, wird die Frequenz verändert und vom Empfänger detektiert (Perimed 2001).

Die gemessenen Signale werden in „arbitrary units“ angegeben und in dieser Arbeit als „perfusion units“ [PU] bezeichnet, die den gemessenen Blutfluss repräsentieren. Je nach Architektur der Gefäße, Konzentration des zirkulierenden Hämoglobins, Hämatokrit, Dicke der Epidermis und der möglichen Eindringtiefe des Lasers variiert die Reaktion der LDF-Messung. Es ist somit nicht möglich, absolute Flussgrößen mittels Laser-Doppler-Flowmetrie aufzuzeichnen. Während der Okklusion, also bei fehlender Perfusion, wird ein geringes Dopplersignal gemessen, das auf die Brownsche Molekularbewegung zurückzuführen ist. Dieses Signal entspricht dem „biologischen Nullpunkt“ (Cracowski et al. 2006; Perimed 2001; Klasinc 2011).

In folgender Abbildung ist eine generalisierte LDF-Reaktionskurve bei Änderung des Perfusionszustandes dargestellt.

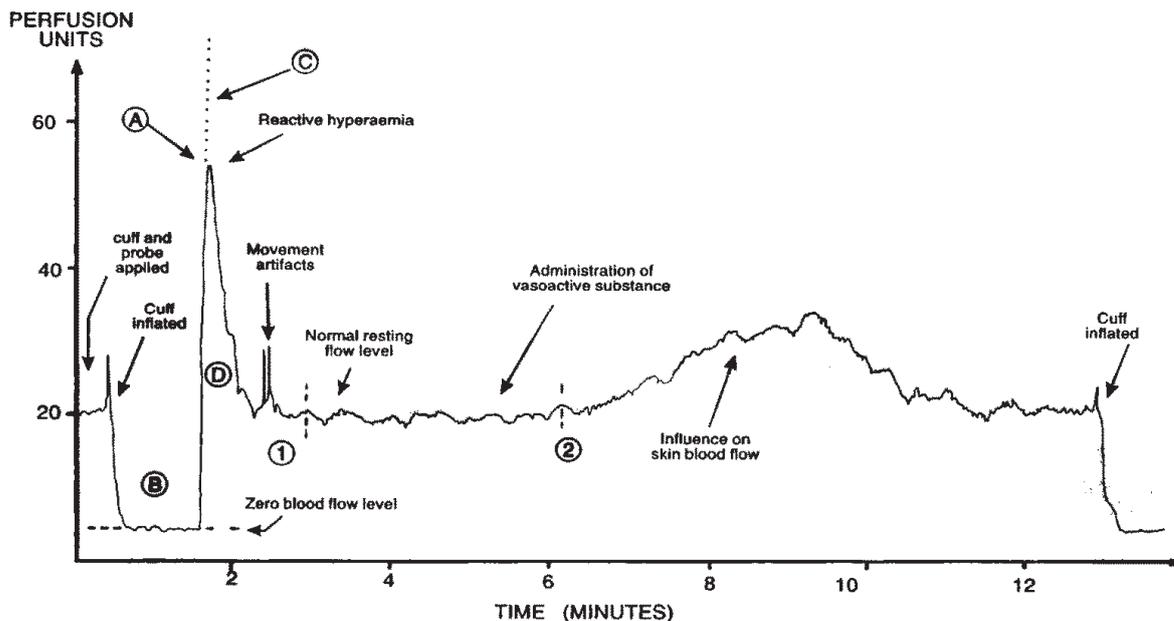


Abbildung 23: Charakteristik einer LDF-Messung. In dieser Abbildung sind die wesentlichen Merkmale einer LDF-Messung inklusive Stauphase (B) dargestellt. Nach der Stauphase kommt es zur reaktiven Hyperämie (A), welche zum Zeitpunkt C ihr Maximum erreicht und zum Zeitpunkt D nahezu Ausgangswerte annimmt. Zwischen Zeitpunkt 1 und 2 ist die Ruhedurchblutung zu erkennen. Zusätzlich sind Bewegungsartefakte zu sehen, diese weisen charakteristische, nicht-physiologische Peaks auf. Eine Durchblutungssteigerung der Haut (z.B. durch vasoaktiven Substanzen) führt zu einer Erhöhung der Perfusion Units [PU]. (Perimed 2001)

1.6. Pharmakokinetische Modelle

1.6.1. Modelle allgemein

Modelle sind Abbildungen bzw. abstrakte Repräsentationen von Gegenständen oder Prozessen der realen Welt (Stachowiak 1973; Stachowiak 1983). Sie sind durch 3 Merkmale gekennzeichnet:

- Abbildungs-Merkmal
- Verkürzungs-Merkmal
- Pragmatisches Merkmal

Modelle sind demnach Abbildungen oder Repräsentationen von Originalen, die nicht alle Attribute des Originals umfassen, sondern nur jene, die dem Modellersteller relevant erscheinen. Modelle erfüllen ihre Funktion auch nur für bestimmte modellbenutzende Subjekte innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls.

Der Prozess der Modellbildung kann über Abstraktion oder Idealisierung von Systemen bzw. Subsystemen des Modelloriginals erfolgen.

1.6.2. Kompartiment-Modelle

Die Pharmakokinetik beschreibt den zeitlichen Verlauf von Arzneistoff-Konzentrationen im Organismus bzw. dessen Subsystemen. Die Pharmakokinetik umfasst primär die Prozesse Absorption/Aufnahme, Distribution/Verteilung und Elimination (siehe Abb. 24).

Invasion (Anfluten)	Liberation (Freisetzung) Absorption (Resorption) Distribution (Verteilung)
Elimination (Abfluten)	Metabolismus (Biotransformation) Exkretion (Ausscheidung)

Abbildung 24: Prozesse in der Pharmakokinetik

In der Pharmakokinetik ist es von Vorteil, den Organismus als System von sog. „Kompartments“ zu charakterisieren. Diese Kompartments sind Subsysteme, die räumlich oder funktionell begrenzt sind und die den entsprechenden Abschnitten des Organismus zugeordnet werden. Die Subsysteme bzw. Kompartments sind homogen, ideal durchmischt und werden häufig durch mathematische Modelle auf der Basis von Massenbilanz-Ansätzen beschrieben (siehe Abb. 25).

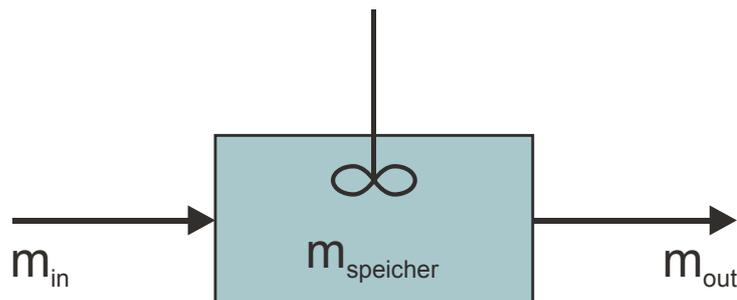


Abbildung 25: Massenbilanz-Ansatz in einem Kompartiment-Modell

$$dm_{\text{speicher}} = m_{\text{in}} - m_{\text{out}}$$

D.h. die Änderung der im Kompartiment gespeicherten Masse einer Substanz ergibt sich als Differenz von Massenzustrom und Massenabstrom.

In der Pharmakokinetik werden im Massenbilanz-Ansatz die beteiligten Massen meist durch Konzentrationen (C_i) ersetzt, dementsprechend gilt:

$$C_i = \frac{m_i}{V_i}$$

Das bedeutet, dass die Konzentration im Kompartiment i (mit C_i bezeichnet) sich als Quotient von Masse der jeweiligen Substanz im Kompartiment (m_i) und dem Volumen des Kompartiments (V_i) ergibt.

Die jeweiligen Kompartments können miteinander verknüpft werden, um pharmakokinetische Prozesse zu beschreiben.

Als klassisches Beispiel gilt das 2-Kompartiment-Modell für die intramuskuläre Injektion (siehe Abb. 26). Das Kompartiment 1 stellt das muskuläre Kompartiment dar, in das eine impulsförmige Injektion (Dosis D) erfolgt. Kompartiment 2 repräsentiert das Blut- bzw. Plasma-Kompartiment. Der Parameter k_a repräsentiert die Invasion vom Muskel- ins Blut-Kompartiment, der Parameter k_e quantifiziert die Elimination aus dem Blut-Kompartiment.

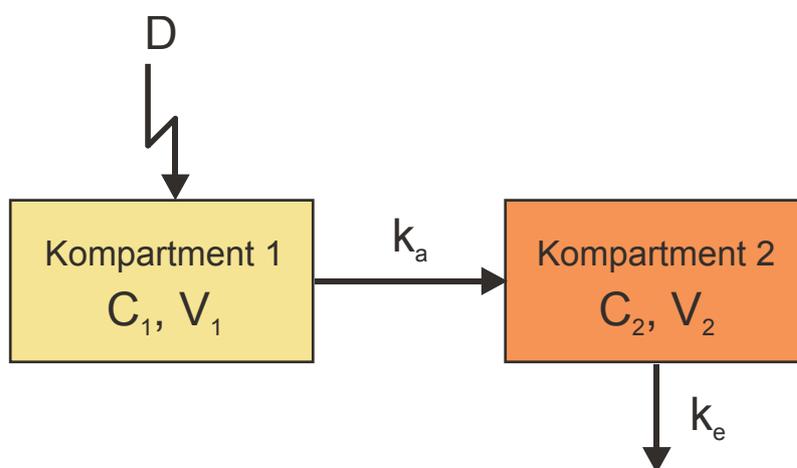


Abbildung 26: 2-Kompartiment-Modell

Dieses 2-Kompartiment-Modell kann durch ein System von 2 gekoppelten Differentialgleichungen beschrieben werden, die Lösung dieser Differentialgleichungen stellt die bekannte „Bateman-Funktion“ dar, die in Abb. 27 grafisch dargestellt ist.

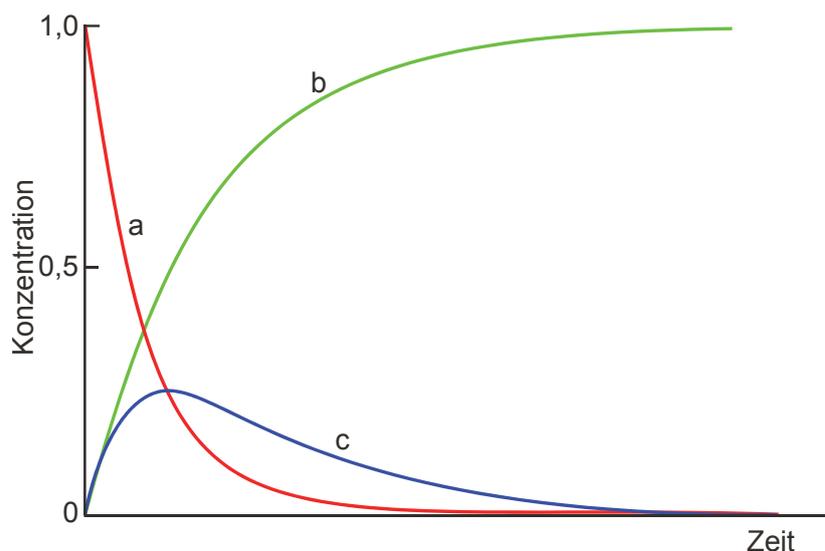


Abbildung 27: Bateman-Funktion: Zeitverlauf der Elimination (a) aus Kompartiment 1; Zeitverlauf der Invasion (b) in Kompartiment 2; Zeitverlauf von gleichzeitiger Invasion und Elimination in Kompartiment 2, Bateman-Funktion (c)

Der Zeitverlauf der Konzentration im Kompartiment 2, $C(t)$, kann als Funktion der Invasionskonstante (k_a), der Eliminationskonstante (k_e), der applizierten Dosis (D) und des Verteilungsvolumens (V_d) beschrieben werden:

$$C(t) = \frac{k_a D}{V_d(k_a - k_e)} (e^{-k_e t} - e^{-k_a t})$$

Mittels mathematischer Methoden (z.B. nichtlineare Regression) können die Modellparameter auf Basis experimentell aufgezeichneter Konzentrations-Zeit-Verläufe (reales Experiment) geschätzt werden. Diese Schätzung der Parameter wird häufig mit dem Begriff der „Systemidentifikation“ belegt.

Kompartiment-Modelle besitzen den Vorteil der Anschaulichkeit und Rückinterpretierbarkeit der einzelnen Modell-Parameter, als Nachteil gilt die Notwendigkeit der Annahme einer Kompartiment-Struktur (Anzahl der Kompartments, Art der Verknüpfung etc.), die nicht immer einfach aus den realen Gegebenheiten ableitbar ist.

1.6.3. Non-Kompartiment-Modelle

Ein anderer Weg zur Modellierung pharmakokinetischer Prozesse ist die sog. „Non-Kompartiment-Analyse“. Dabei wird keine Kompartiment-Struktur zugrunde gelegt, sondern man bezieht sich auf sog. „statistische Momente“, die mathematische Beschreibungen diskreter Verteilungen darstellen. Ausgangspunkt hierfür sind Flächen unter der

Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC – area under the curve) bzw. Flächen unter der zeitgewichteten Konzentrations-Zeit-Kurve (AUMC), die über numerische Integration bestimmt werden (siehe Abb. 28).

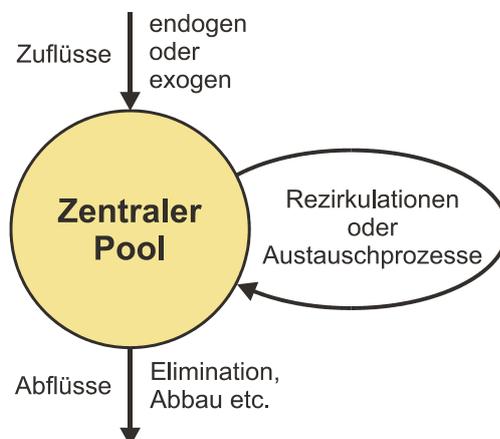


Abbildung 28: Non-Kompartiment-Modell

Durch einfache mathematische Verknüpfungen können aus diesen Größen Kenngrößen wie beispielsweise die Eliminations-Halbwertszeit, die mittlere Verweilzeit oder die Clearance berechnet werden.

1.6.4. PORH-Kompartiment-Modelle

Die in Betracht gezogene methodische Vorgangsweise zur Erfassung der PORH in der kutanen Mikrozirkulation mittels LDF verwendet die Perfusion der Mikrozirkulation als charakteristische Messgröße.

Der Prozess der PORH kann in 2 Phasen gegliedert werden:

- Okklusions-Phase
- Phase der postokklusiven Hyperämie

Während der Okklusionsphase nehmen in der Mikrozirkulation aufgrund der sistierenden Blutzufuhr der O_2 -Partialdruck ab, der CO_2 -Partialdruck und die Konzentration von Metaboliten zu (siehe vorne). Aufgrund der metabolischen Autoregulation kommt es in Folge zu einer Öffnung der präkapillären Sphinkteren und der Strömungswiderstand des Mikrozirkulations-Areals sinkt.

Nach dem plötzlichen („sprungförmigen“) Lösen der Okklusion kommt es aufgrund des niedrigen Strömungswiderstands in der Mikrozirkulation zu einem Anstieg der Perfusion, die über die NO-bedingte Vasodilatation der versorgenden Gefäße zusätzlich verstärkt wird. Die nunmehr supraoptimale Blutversorgung führt zu einem Anstieg des O_2 -Partialdrucks, zu einem Abfall des CO_2 -Partialdrucks und zu einem Abtransport der Metaboliten, dies bedingt die Rückkehr des Strömungswiderstands zum Ausgangswert und damit eine Reduktion der Perfusion. Die reaktive Zunahme und nachfolgende Abnahme der Perfusion der Mikrozirkulation weisen einen charakteristischen Zeitverlauf auf.

Zur Quantifizierung dieses dynamischen Prozesses der zeitabhängigen Änderung der Perfusion in der Mikrozirkulation hat sich ein Standard-2-Kompartiment-Modell als gut geeignet erwiesen (Klasinc 2011).

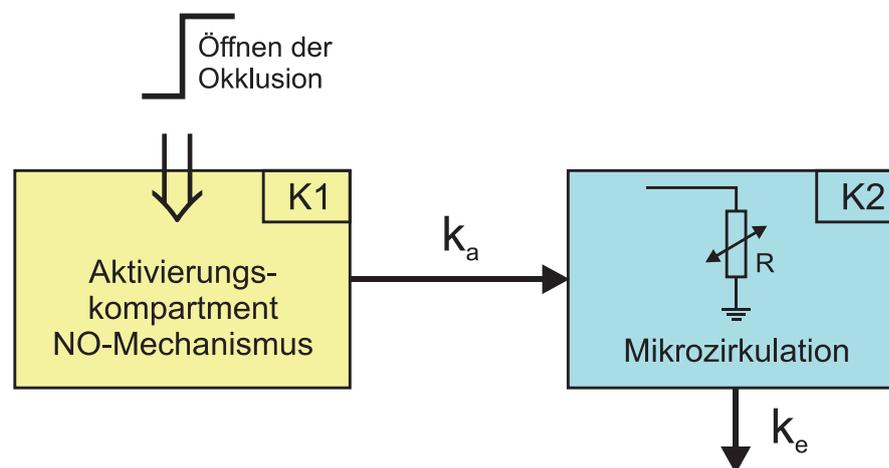


Abbildung 29: Blockdiagramm und Zuordnung des Zwei-Kompartiment-Modells (nach Klasinc 2011)

Dieses Modell (siehe Abb. 29) kann den Zeitverlauf des Prozessablaufs mittels zweier Parameter (k_a bzw. k_e) beschreiben, wobei k_a die Phase des Perfusionsanstiegs (Aktivierungsphase), k_e die Restitution der Perfusion zum Ausgangswert (Restitutionsphase) charakterisiert.

Die gewählte Vorgangsweise stellt eine ausschließlich phänomenologische Modellierung des Prozesses der PORH in der kutanen Mikrozirkulation dar.

1.7. Ziele der Arbeit

Im Rahmen einer „feasibility study“ (Klasinc 2011) wurde gefunden, dass die PORH in der subkutanen Mikrozirkulation des Unterarms mittels LDF einfach und problemlos erfasst

werden kann und dass eine Charakterisierung bzw. Parametrisierung der Reaktion mittels des oben beschriebenen Modells möglich und günstig ist.

Um eine Anwendung der PORH und deren Parametrisierung als diagnostischen Ansatz zur Früherkennung der EDF beurteilen zu können, ist neben der methodischen Optimierung eine Abklärung von möglichen Störeinflüssen erforderlich.

Einen der möglichen Einflussfaktoren auf Kinetik und Reaktionsstärke der PORH stellt die Bioverfügbarkeit von NO dar.

Es ist daher das Hauptziel der vorliegenden Arbeit, die Reaktionsstärke und Kinetik der PORH-Reaktion an einer Gruppe von Versuchspersonen einmal unter Ruhebedingungen (Leerversuch) und danach nach oraler Gabe von NTG zur Modifikation der NO-Bioverfügbarkeit zu vergleichen. Als Nebenziel wird eine Optimierung und Standardisierung der methodischen Vorgangsweise angestrebt.

Als Messgrößen dienen dabei globale Messgrößen wie Amplitude der Reaktion, Zeitpunkt des Maximums etc. und die Parameter der PORH-Reaktion aus der Anpassung eines pharmakokinetischen Zwei-Kompartiment-Modells sowie Kenngrößen aus der Non-Kompartiment-Charakterisierung (AUC etc.).

2. Methodik

2.1. Ethische Konformität

Die Versuchsplanung, Case Report Form und Informed Consent Form, sowie die verwendeten medizintechnische Systeme wurden der Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz vorgelegt. Die Ethikkommission ist in ihrem Votum (EK-Nummer 25-084 ex 12/13) zu dem Schluss gekommen, dass kein Einwand gegen die Durchführung der Studie in der vorliegenden Form besteht.

2.2. Versuchskollektiv

2.2.1. Abschätzung der Sample Size (Probandenanzahl)

Die Sample Size wurde mit der Software „G*Power“ Version 3.1.3 (Franz Faul, Universität Kiel) anhand der Mittelwerte und Standardabweichungen von Daten aus Vorversuchen ermittelt. Die Probandenzahl wurde auf Basis des Parameters der Invasion (k_a) errechnet, da dieser die größeren Standardabweichungen zeigt. Zusätzlich wurde ein Sicherheitszuschlag von 4 Personen plus eine Drop-Out Quote von 10 % einbezogen. Die resultierende Sample Size wurde demnach mit 16 Personen festgelegt. In Abb. 30 ist ein Screenshot der Sample Size-Bestimmung zu sehen.

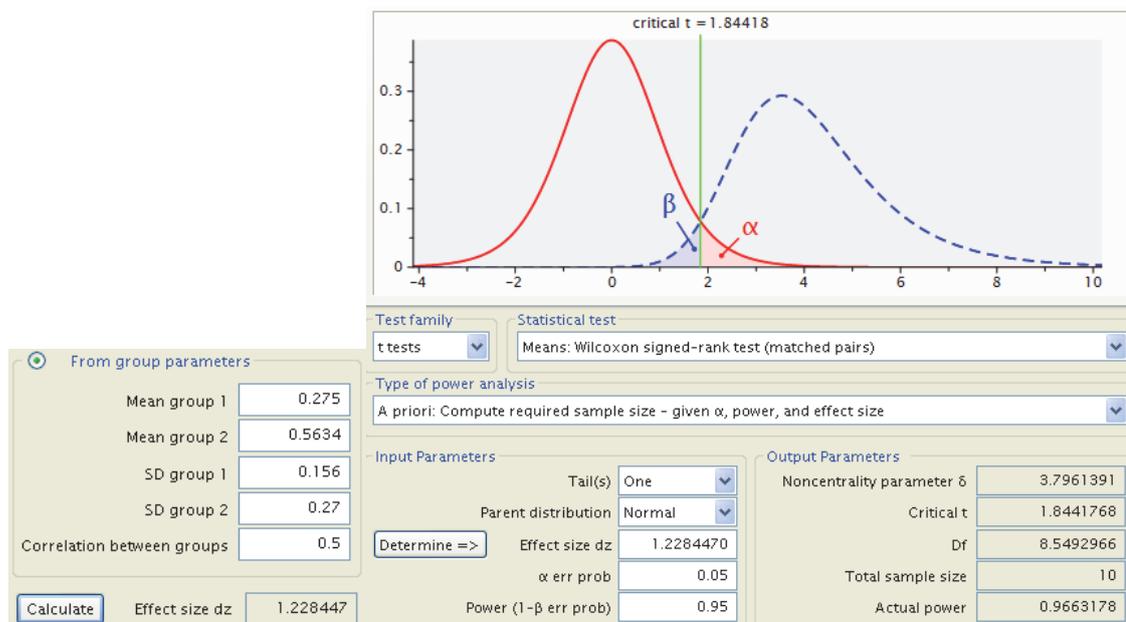


Abbildung 30: Screenshot des Resultats der Sample-Size-Abschätzung. Anhand der Mittelwerte (Mean) und Standardabweichungen (SD) zweier Gruppen, welche aus Vorversuchen ermittelt wurden, konnte eine Sample Size von 10 Personen bestimmt werden.

2.2.2. Anthropometrische Daten der Versuchspersonen

Entsprechend der Abschätzung (siehe vorne) umfasste das Versuchskollektiv 16 gesunde Probanden zwischen 25 und 68 Jahren, wobei 9 männliche und 7 weibliche Probanden an den Experimenten teilnahmen. In Tab. 6 sind die anthropometrischen Daten der jeweiligen Probanden aufgelistet.

Body-Mass-Index (BMI) und Körperoberfläche (BSA) wurden wie folgt berechnet:

Body-Mass-Index [kg/m²]:

$$BMI = \frac{m}{l^2}$$

m ... Körpermasse [kg], l ... Körpergröße [m]

Körperoberfläche BSA nach DuBois [m²]:

$$BSA = (m^{0,425} \times l^{0,725}) \times 0,007184$$

m ... Körpermasse [kg], l ... Körpergröße [cm]

Proband	Age [a]	Sex	height [cm]	weight [kg]	BMI	BSA (DuBois) [m ²]
1	37	m	167	60	21,51	1,67
2	26	m	186	72	20,81	1,95
3	68	m	171	77	26,33	1,89
4	57	m	172	80	27,04	1,93
5	34	m	183	83	24,78	2,05
6	54	w	163	53	19,95	1,56
7	27	m	175	70	22,86	1,85
8	26	w	156	51	20,96	1,49
9	52	w	154	50	21,08	1,46
10	25	m	186	83	23,99	2,08
11	46	w	163	59	22,21	1,63
12	30	m	188	83	23,48	2,09
13	25	m	185	82	23,96	2,06
14	60	w	176	89	28,73	2,06
15	45	w	167	70	25,10	1,79
16	26	w	173	65	21,72	1,78
Mittelwert	39,88		172,81	70,44	23,41	1,83
Stabw.	14,66		10,79	12,80	2,50	0,22

Tab. 6: Anthropometrische Daten der Versuchspersonen

2.3. Durchführung der Experimente

Die Experimente wurden bei einer Raumtemperatur zwischen 24°C und 26°C durchgeführt, die PORH-Messung erfolgte jeweils am rechten Arm. Dazu wurde der Messkopf des LDF-Systems mit Hilfe eines Kleberings am Unterarm, circa 10 cm distal der regio cubitalis anterior (Ellenbeuge) angebracht. Zusätzlich wurde eine Blutdruckmanschette am Oberarm so positioniert, dass der untere Manschettenrand 2 bis 3 cm proximal der Ellenbeuge abschloss. (siehe Abb. 31). Die Probanden wurden in liegender Position untersucht, um Bewegungsartefakte zu vermeiden.

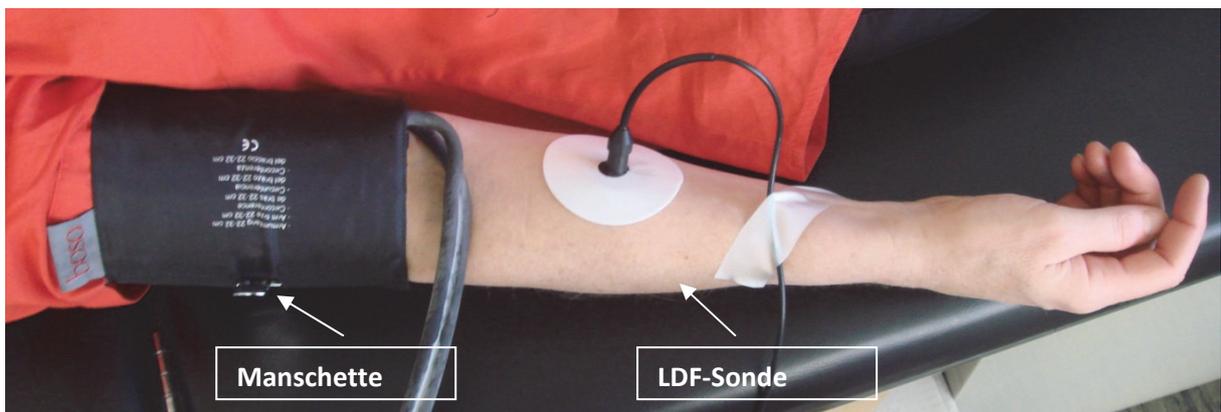


Abbildung 31: Lage der pneumatischen Manschette und der LDF-Sonde

Jeder Proband absolvierte zwei Messdurchgänge der PORH, wobei jeweils ein Messdurchgang ohne NTG (Abb. 32) und einer mit NTG durchgeführt wurde (Abb. 33). Jeder Durchgang begann mit einer einminütigen Vorlaufzeit, welche der Erfassung der Ruhedurchblutung diente (Baseline). Im Anschluss daran wurde die Blutdruck-Manschette auf 50 mmHg suprasystolisch für die Dauer von 5 Minuten aufgepumpt. Dadurch kam es zu einer arteriellen Okklusion und damit verbunden zur Ischämie der distalen Gewebepartien. Nach Ablauf dieser Zeit erfolgten das Entlüften der Manschette und die anschließende Erfassung der PORH für die Dauer von ca. 120 Sekunden.

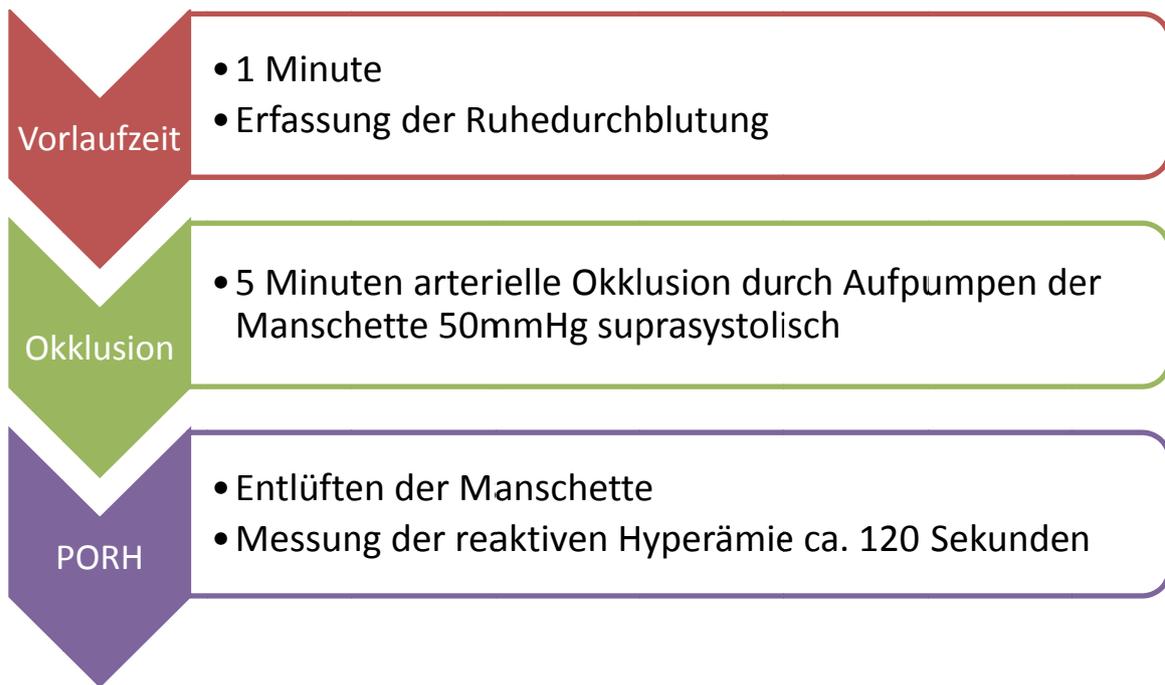


Abbildung 32: Versuchsablauf zur Erfassung der Normalreaktion

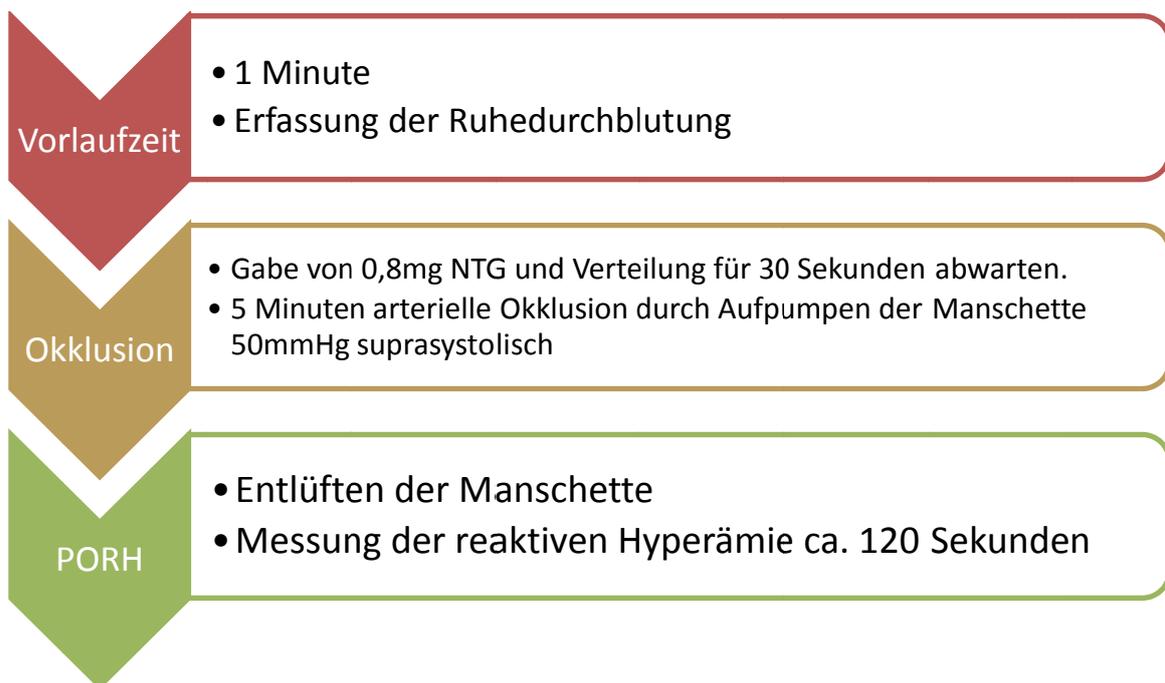


Abbildung 33: Versuchsablauf zur Erfassung der PORH bei erhöhter NO-Verfügbarkeit

Nach der ersten Messung wurde eine 10-minütige Ruhephase eingehalten, welche dazu diente, um Einflüsse der ersten Messung auf die zweite Messung zu minimieren (Corretti et al. 2002). Im Anschluss begann die zweite Versuchs-Sequenz, in deren Rahmen den Probanden ein kurzwirksames orales Glyceroltrinitrat (Nitrolingual[®], Kapsel, Pohl Boskamp,

Deutschland, Chargenbezeichnung: 206024, Wirkdauer 10 – 30 min., Einzeldosis 0,8 mg) verabreicht und der Messablauf nach 30 Sekunden Wirkdauer wiederholt wurde.

Parallel dazu wurden Herzfrequenz und Blutdruck diskontinuierlich während des gesamten Versuchs aufgezeichnet. Die Blutdruck-Messungen erfolgten am linken Oberarm, jeweils eine Basismessung vor der Gabe von NTG, weitere Messpunkte lagen in der 2., 4., 7. und 10. Minute nach der Einnahme von NTG. Die Zeitpunkte wurden an die Vorschläge von Armstrong et al. 1979 angepasst.

2.4. Datenerfassung und -verarbeitung

2.4.1. Verwendete Messsysteme

Die Messung der PORH erfolgte mittels des Laser-Doppler-Systems PeriFlux® 5000 (PERIMED®, Schweden; CE Nummer 0413; Abb. 34), dessen prinzipielle Funktionsweise vorne bereits beschrieben wurde.



Abbildung 34: PeriFlux® 5000 (Perimed, 2012)

Die Erfassung von Herzfrequenz und Blutdruck wurde mittels Critikon DINAMAP TM PRO Series 100 V2 durchgeführt (© GE Healthcare, US, CE Nummer 0086; Abb. 35). In das Periflux 5000 System war ein Modul zur Erfassung des Manschettendrucks integriert.



Abbildung 35: Critikon DINAMAPTTM PRO Series 100 V2 (Quelle: GE Healthcare)

Manschettendrucksignal und LDF-Signal des Perimed 5000 wurden einem Laptop über USB-Anschluss zugeführt. Der Laptop wurde verwendet, um die Daten vorzuverarbeiten und zu speichern. Dies wurde durch die installierte systemspezifische Software PeriSoft for Windows Version 1.30 (PERIMED®, Schweden) durchgeführt. Die Daten wurden mit einer Abtastfrequenz von 0,1/s aufgezeichnet. In Abb. 36 ist ein Screenshot der Messung, dokumentiert mit der Software Perisoft for Windows, dargestellt. Die Daten wurden im Anschluss an die Experimente in ein Microsoft-Excel Datenfile übergeführt.

Diskontinuierliche Daten (Blutdruck, Herzfrequenz etc.), die handschriftlich festgehalten wurden, wurden ebenfalls in eine Excel-Tabelle übertragen.

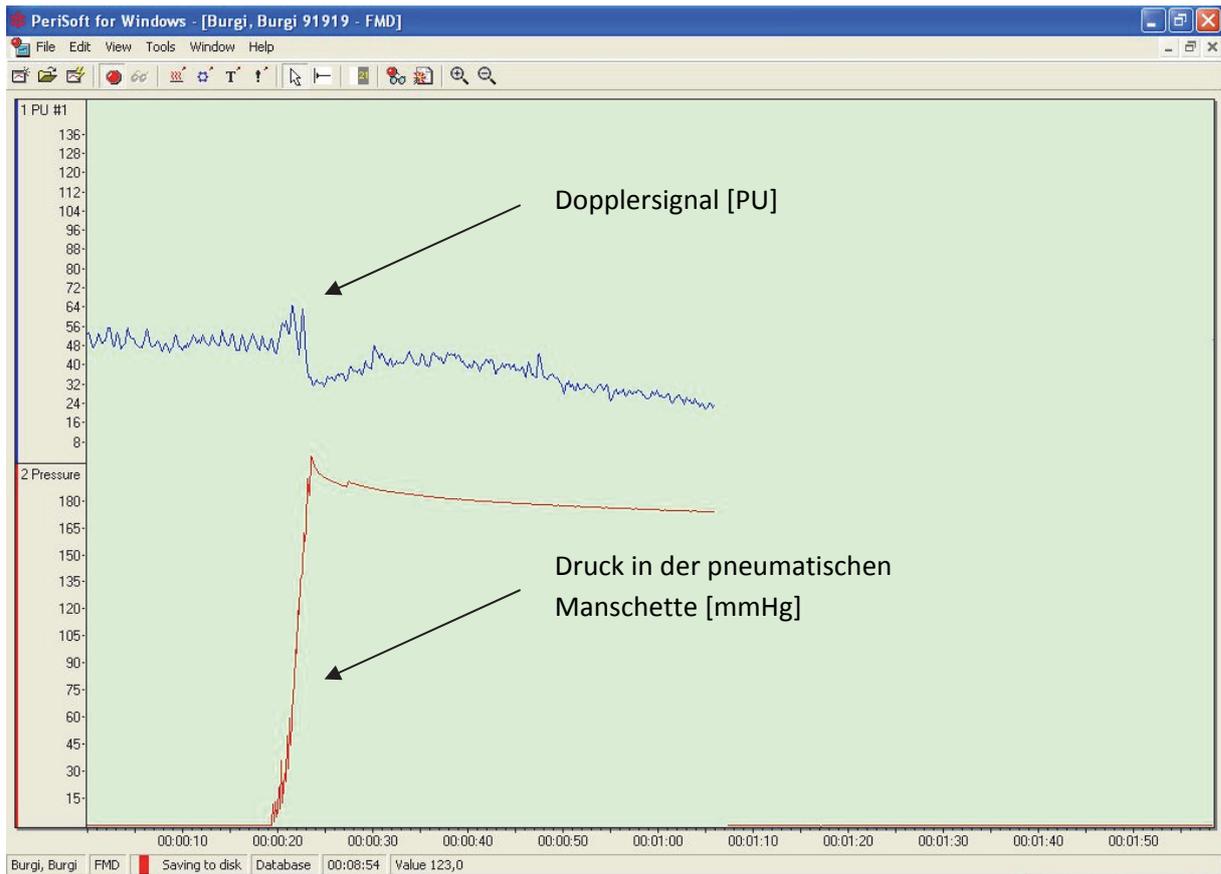


Abbildung 36: Screenshot einer Messung, dokumentiert mit der Software PeriSoft for Windows

2.4.2. Verarbeitung der LDF-Signale

Aus den als Excel-File vorliegenden LDF-Signalen wurde die Baseline errechnet. Diese ergab sich als Mittelwert der letzten Messminute vor dem Aufblasen der pneumatischen Manschette (Präokklusionszeit). Danach wurde ein Zeitfenster zur Berechnung der PORH festgelegt, das mit dem Öffnen der Manschette begann (erster PU Messwert > Baseline wird als Zeitpunkt 0 angenommen) und mit dem Ende der PORH-Reaktion (Wiedererreichen der Baseline, ungefähr 120 Sekunden) endete. Von den Datenwerten (Abtastrate 0,1 s) wurde der Baseline-Wert subtrahiert und die Daten durch Division durch den maximalen Signalwert auf den Wertebereich von 0 bis 1 normiert. Danach wurden die Daten für die weiteren Analysen zwischengespeichert (siehe Abb. 37).

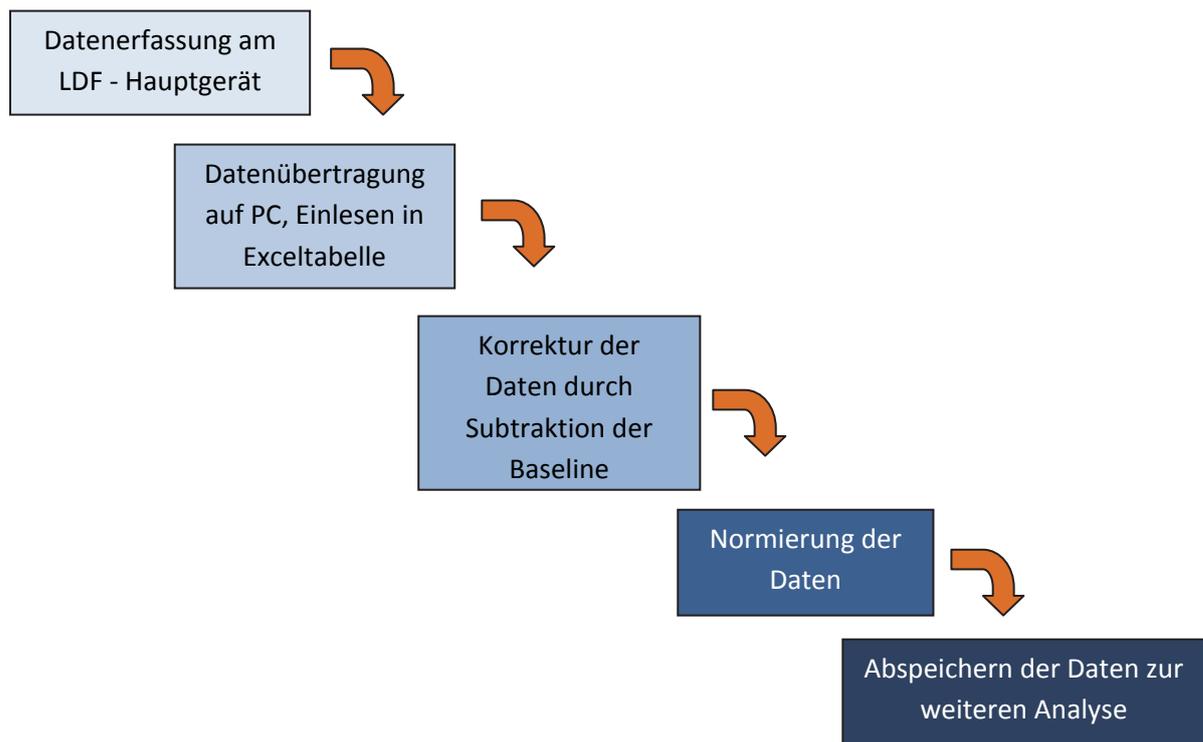


Abbildung 37: Prozess der Datenverarbeitung

2.5. Berechnung der Kenngrößen der PORH

1.5.1 Globale Kenngrößen der PORH

Aus den abgespeicherten LDF-Daten wurden vor der Normierung folgende globale Kenngrößen der PORH-Reaktion berechnet:

- Basis: entspricht der normierten Ruhedurchblutung vor der Okklusion in Perfusion-units (PU)
- Basis_{NTG}: entspricht der präokklusiven Ruhedurchblutung vor der Einnahme von NTG in PU
- Maximum: entspricht dem Maximalwert der PORH in absoluten PU
- Maximum_{NTG}: entspricht dem Maximalwert der PORH nach Einnahme von NTG in PU

- T_{MAX} : entspricht der Zeitdifferenz vom Öffnen der Manschette bis zum Erreichen des maximalen Blutflusses in Sekunden
- $T_{MAX-NTG}$: entspricht der Zeitdifferenz vom Öffnen der Manschette bis zum Erreichen des maximalen Blutflusses nach Einnahme von NTG in Sekunden
- ΔMAX : entspricht der Differenz ($Maximum_{NTG} - Maximum$) in PU
- ΔT_{MAX} : entspricht der Differenz ($T_{MAX-NTG} - T_{MAX}$) in Sekunden

1.5.2 Kinetische Kenngrößen der PORH

Wie bereits vorne beschrieben, zeigen die PORH-Reaktionen einen analogen Kurvenverlauf zur Plasmakonzentration eines Pharmakons nach intramuskulärer Applikation. Daher wurde die Kinetik der PORH mittels eines Zwei-Kompartiment-Modells modelliert. Die Lösung der beschreibenden Differentialgleichung für den linearen Fall stellt die Bateman-Funktion dar (siehe vorne). Mit Hilfe einer nicht-linearen Regressions-Routine (Gauss-Newton-Verfahren), realisiert in der Software MATLAB (Mathworks, USA), konnten die Geschwindigkeitskonstanten k_a (Absorptionskonstante bzw. Invasionskonstante) und k_e (Eliminationskonstante) aus den normierten Daten ermittelt werden (Listing der Matlab-Routine siehe Anhang). In Abb. 38 wird ein grafisches Beispiel einer solchen Modellanpassung dargestellt. Bei dem Verfahren der nichtlinearen Regression werden die Parameter derart errechnet, dass die quadratischen Abweichungen zwischen Original-Daten und angepasster Kurve (Residuen) minimiert werden („least-square-Verfahren“). Die für den jeweiligen Datensatz berechneten Residuen beschreiben die Güte der Modellanpassung, wobei ein geringeres Residuum eine bessere Anpassung charakterisiert.

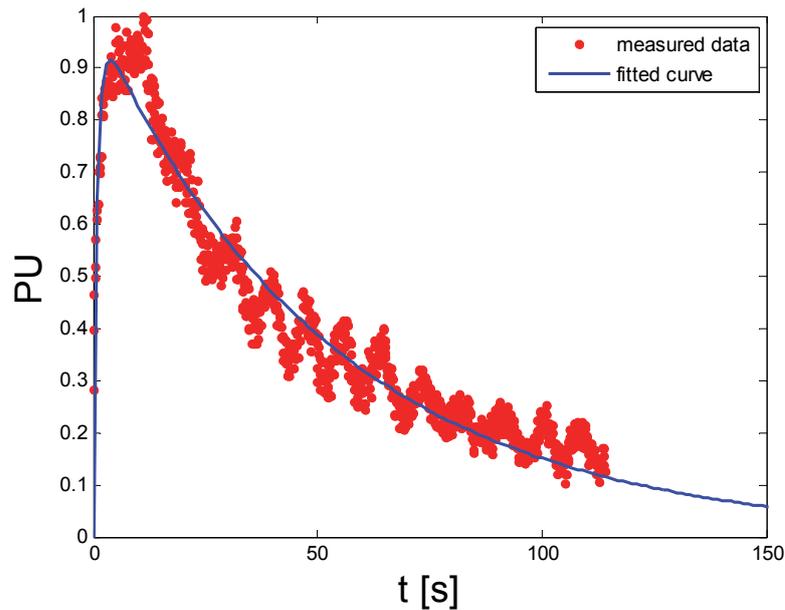


Abbildung 38: Darstellung einer Modellanpassung: mittels nichtlinearer Regression angepasste Kurve (fitted curve, blau) an die gemessenen und normierten Perfusions-Units (PU; measured data, rot)

Zusätzlich wurden die Flächen unter den Perfusionskurven (area under the curve – AUC) sowohl für die absoluten als auch für die normierten Perfusionskurven berechnet. Diese Flächen wurden bis zum Zeitpunkt $t = \infty$ extrapoliert. Die Berechnung der Flächen erfolgte ebenfalls mittels MATLAB.

Dementsprechend ergaben sich folgende kinetische Kenngrößen:

- k_a : Invasionskonstante [1/s]; entspricht der Geschwindigkeit der Invasion bis hin zur Maximalreaktion. Je größer dieser Parameter, umso schneller die Invasion.
- k_e : Eliminationskonstante [1/s]; entspricht der Geschwindigkeit der Elimination von Beginn der Maximalreaktion bis zum Reaktionsende. Je größer dieser Parameter, umso schneller die Elimination.
- Residuen: diese beschreiben die Güte der Modellanpassung durch das Curve-Fit Verfahrens.
- AUC: mittels Trapezregel errechnete Fläche unter der normierten Kurve. Diese Berechnung geht über die Messung hinaus bis zum Zeitpunkt $t = \infty$.
- AUCabs: mittels Trapezregel errechnete Fläche der absoluten, nicht normierten Reaktionskurve, ebenfalls bis zum Zeitpunkt $t = \infty$.

2.6. Kardiovaskuläre Messgrößen

Zusätzlich zu den Laser-Doppler Messungen wurden sowohl Herzfrequenz als auch Blutdruck nach der Gabe von NTG aufgezeichnet. Es wurde eine Basismessung vor der Gabe von NTG durchgeführt. Danach wurde 2 Minuten nach NTG, 4 Minuten nach NTG, 7 Minuten nach NTG und 10 Minuten nach NTG (nach PORH) je eine Herzfrequenz- und Blutdruckmessung durchgeführt.

Die kardiovaskulären Messgrößen wurden zur Beurteilung der Wirkung des verabreichten NTG registriert. Aufgrund der vasodilatierenden Wirkung des NTG ist ein Absinken sowohl des systolischen als auch des diastolischen Drucks zu erwarten, die Gegenregulation über den Barorezeptor-Regelkreis führt zu einem Anstieg der Herzfrequenz.

2.7. Methoden der statistischen Analyse

Die Ergebnis-Daten wurden mithilfe des Softwarepakets MedCalc (MedCalc Software, Mariakerke/B) analysiert. Nachdem gepaarte Stichproben vorliegen (Ergebnisse mit bzw. ohne NTG), wurden 2 Testverfahren herangezogen:

- Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummentest für gepaarte Stichproben und
- t-Test für gepaarte Stichproben

Der Wilcoxon-Test setzt keine Normalverteilung voraus, der t-Test kann nur bei Vorhandensein einer Normalverteilung schlüssige Aussagen liefern. Die Prüfung auf Vorhandensein einer Normalverteilung erfolgte mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests.

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

2.7.1. Box-Whisker-Plot

Zur grafischen Darstellung der Ergebnisse wurde der Box-Whisker-Plot (Tukey 1977) herangezogen. Sein Vorteil ist, dass verschiedene Streuungs- und Lagemaße in einer Grafik dargestellt werden und somit einen schnellen Eindruck über die Verteilung der Daten liefern. Ein Box-Whisker-Plot besteht aus einem Rechteck (Box), welches durch zwei Linien verlängert wird. Diese Linien werden als „Whisker“ bezeichnet. Die mittleren 50% der Daten werden durch die Box repräsentiert, die Länge der Box entspricht also dem Interquartilabstand (engl.: Interquartile Range, IQR). Der Median wird durch eine durchgehende Linie in der Box eingezeichnet. Durch dessen Lage kann die Schiefe der

zugrunde liegenden Verteilung abgeschätzt werden. Die Whisker stellen die Werte außerhalb des IQR dar. Die Länge der Whisker wird durch die Datenwerte bestimmt, ist jedoch auf die 1,5-fache Länge des IQR maximiert. Wird diese definierte Länge nicht überschritten, wird die Länge der Whisker von Maximal- und Minimalwert begrenzt. Datenwerte außerhalb des 1,5-fachen IQR werden als „Ausreißer“ bezeichnet. Werte zwischen $1,5 \times \text{IQR}$ und $3 \times \text{IQR}$ sind als milde Ausreißer definiert, Werte über dem $3 \times \text{IQR}$ werden als extreme Ausreißer deklariert (Weiß 2010; Jann 2005; Tukey 1977). Ein Beispiel eines Box-Whisker-Plots wird in Abb. 39 dargestellt. In Tabelle 7 werden die dargestellten statistischen Kenngrößen aufgelistet und beschrieben.

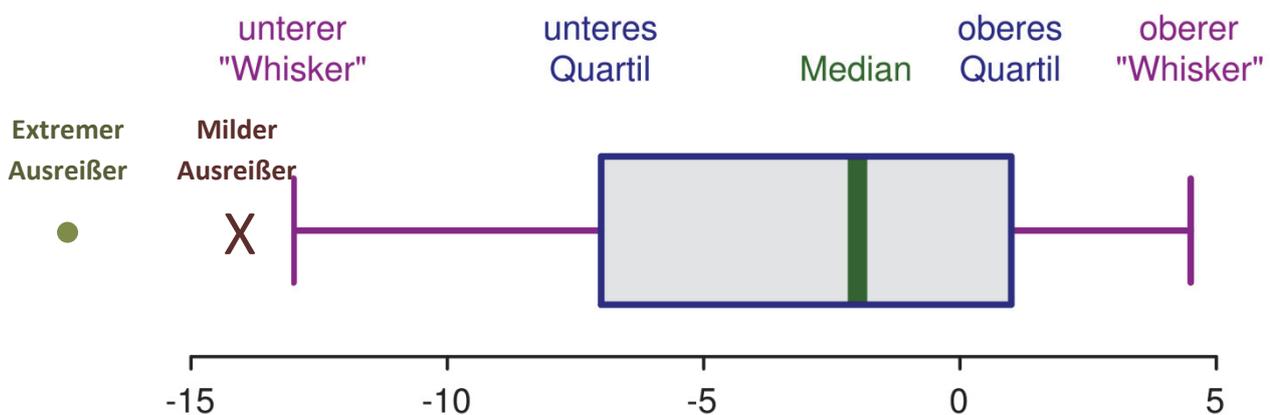


Abbildung 39: Beispiel eines Box-Whisker-Plots

Untere Quartile	25% aller Werte liegen unterhalb und 75% oberhalb dieses Wertes
Obere Quartile	75% aller Werte liegen unterhalb und 25% oberhalb dieses Wertes
Median	50% aller Werte liegen unterhalb und 50% oberhalb des Medians
Interquartilabstand (IQR)	Differenz aus oberer und unterer Quartile (Längsseite der Box)
Milde Ausreißer	Werte, die zwischen oberer oder unterer Quartile $+1,5 \text{ IQR}$ liegen (werden als X dargestellt)
Extreme Ausreißer	Werte, die außerhalb der Kategorie für milde Ausreißer liegen (werden als Punkt dargestellt)

Tab. 7: Statistische Kenngrößen bei einem Box-Whisker-Plot

3. Ergebnisse

3.1. Exemplarische Einzelergebnisse

In Abb. 40 ist ein gesamter Messzyklus, bestehend aus Präokklusion, Okklusion und PORH in normierten PU dargestellt. Der Zeitverlauf einer PORH, ermittelt mittels LDF, kann der Abb. 41 entnommen werden. Bei diesen Abbildungen wurden aus Gründen einer besseren Übersicht die durch Vasomotion hervorgerufenen Schwankungen im LDF-Signal durch Tiefpassfilterung mittels eines Moving-Average-Filters eliminiert.

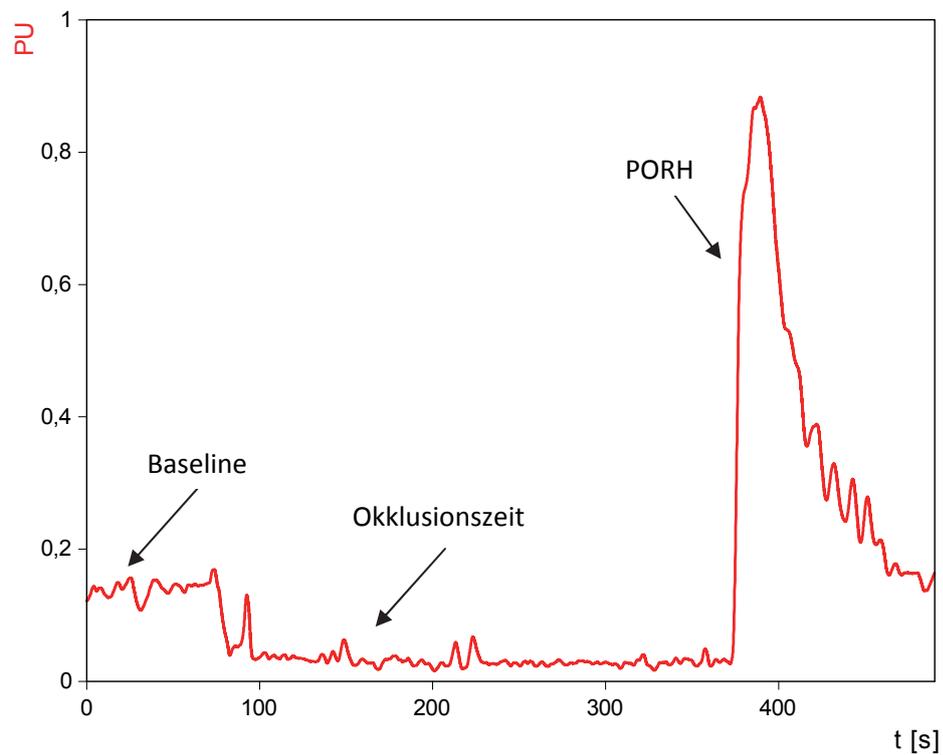


Abbildung 40: Einzelbeispiel der Durchblutungsreaktion während eines gesamten Messzyklus. Zu erkennen sind sowohl die Baseline (Ruhedurchblutung: Dauer 1 Minute), die 5-minütige Okklusionszeit und die post-okklusive reaktive Hyperämie

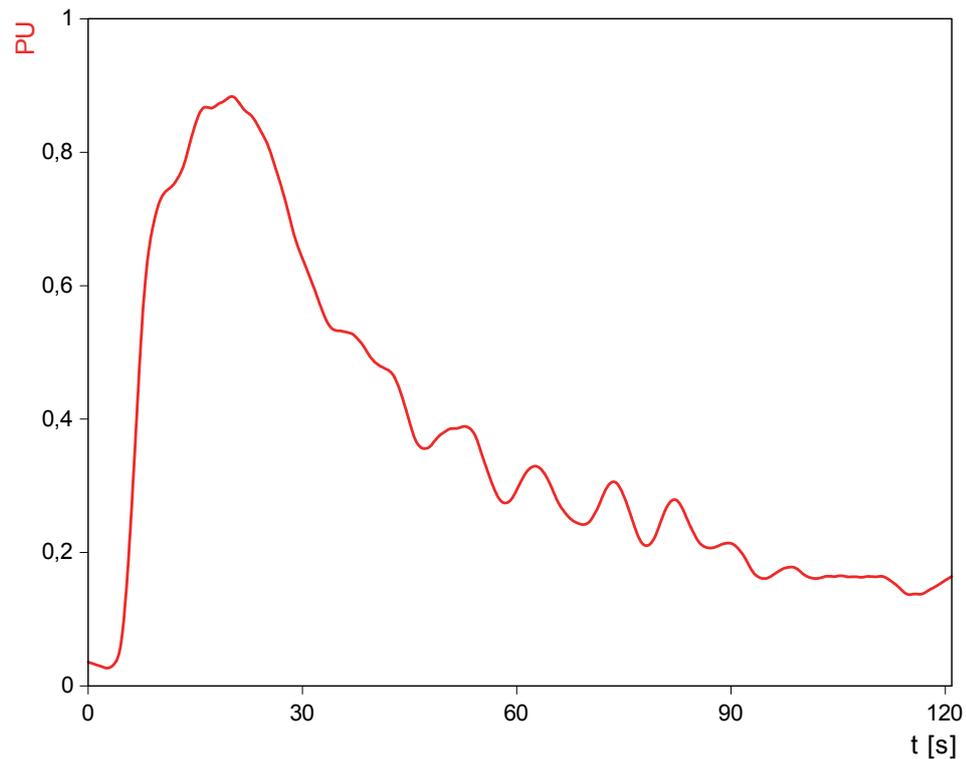


Abbildung 41: Einzelbeispiel einer PORH (normiert und geglättet); in dieser Abbildung ist nur die PORH dargestellt, Okklusionszeit und Baseline wurden entfernt.

Der Verlauf der PORH-Reaktion zeigt einen raschen Anstieg der Durchblutung bis hin zu einem Maximum, das im Mittel bei ca. 10 s erreicht wird, danach erfolgt ein Abfall der Durchblutung. Der Zeitverlauf der Kurve weist eine deutliche Analogie zur Bateman-Funktion auf.

Beispiele für die Anpassung der Bateman-Funktion an die experimentellen Daten werden in den nachfolgenden Abbildungen vorgestellt.

Abb. 42 zeigt den Fall einer guten Anpassung der Bateman-Funktion an die experimentellen Daten (Residuen klein), Abb. 43 im Gegensatz dazu eine ungünstige Anpassung (Residuen groß).

Im Falle der guten Anpassung wird die Bateman-Funktion an die ungeglättet vorliegenden experimentellen Daten robust angenähert, d.h. die durch Vasomotion bedingten Schwankungen in der Durchblutung werden ausgemittelt.

Im Falle der mangelhaften Anpassung (siehe Abb. 43) weicht der Zeitverlauf der experimentellen Daten deutlich von jenem einer Bateman-Funktion ab, sodass entsprechend große Residuumswerte resultieren.

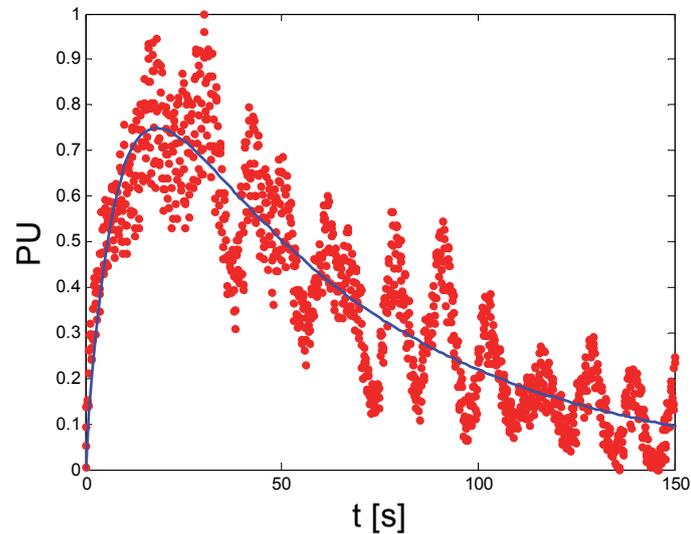


Abbildung 42: Anpassung der Bateman-Funktion an experimentelle Durchblutungsdaten – Beispiel einer guten Anpassung

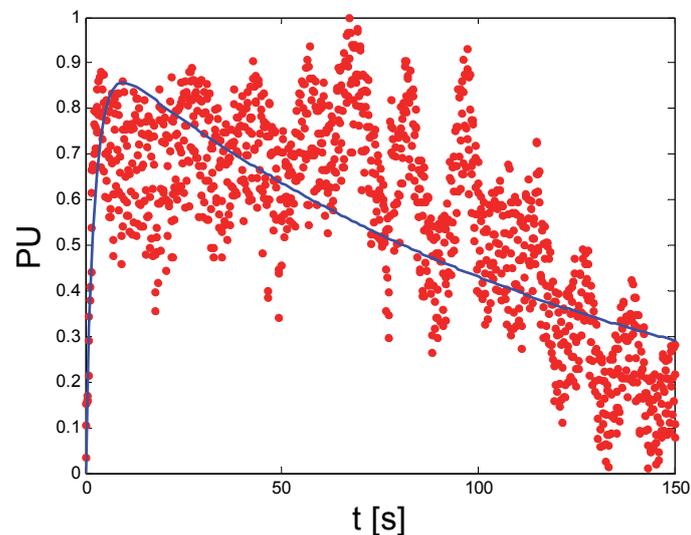


Abbildung 43: Anpassung der Bateman-Funktion an experimentelle Durchblutungsdaten – Beispiel einer mangelhaften Anpassung.

Die nachfolgende Abbildung stellt an einer Einzelperson die angepassten Bateman-Funktionen mit und ohne NTG vor. Die geringen Unterschiede in der Reaktionskinetik können deutlich ausgemacht werden.

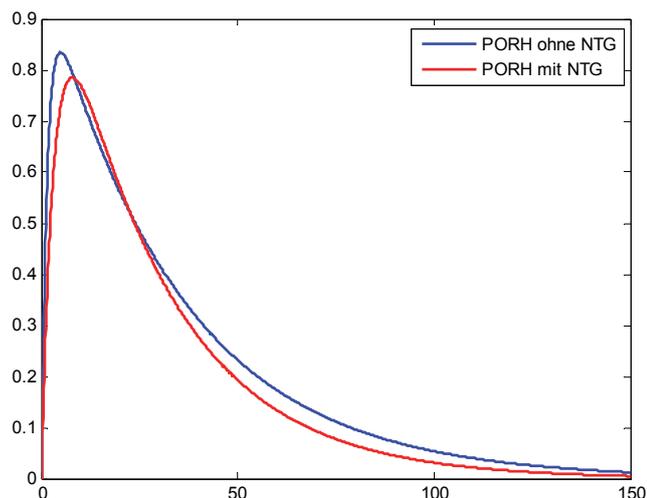


Abbildung 44: Vergleich zweier Einzelmessungen nach Modellanpassung einer PORH vor und nach der Gabe von 0,8mg NTG. Die blaue Kurve entspricht der Reaktion nach der Gabe von NTG (PORH mit NTG); die rote Kurve entspricht der Reaktion vor der Gabe von NTG.

3.2. Gruppenergebnisse

3.2.1. Globale Kenngrößen der PORH

3.2.1.1. Tabellarische Übersicht

Die nachfolgende Tabelle 8 gibt eine Übersicht über die globalen Kenngrößen der PORH:

ohne NTG	mit NTG	Beschreibung	Einheit
Basis	Basis _{NTG}	Normierte Ruhedurchblutung	PU
Maximum	Maximum _{NTG}	Maximalwert der PORH	PU
T _{MAX}	T _{MAX-NTG}	Zeitdifferenz vom Öffnen der Manschette bis zum Erreichen des maximalen Blutflusses	s
ΔMAX	ΔMAX	Differenz Maximum _{NTG} - Maximum	PU
ΔT _{MAX}	ΔT _{MAX}	Differenz T _{MAX-NTG} - T _{MAX}	s

Tab. 8: Globale Kenngrößen der PORH

In Tabelle 9 werden die einzelnen Kenngrößen der PORH für alle Probanden aufgelistet.

Zusätzlich zu den Einzelwerten sind Mittelwert, Median und Standardabweichung angegeben.

Proband	Basis [PU]	Basis _{NTG} [PU]	Maximum [PU]	Maximum _{NTG} [PU]	T _{MAX} [s]	T _{MAX-NTG} [s]	ΔMAX [PU]	ΔT _{MAX} [s]
1	35,4283	23,3537	129,2147	124,1993	11	9,2	-5,0153	-1,8
2	17,9963	21,5173	156,8387	165,4947	8,6	8,2	8,6560	-0,4
3	68,7127	73,5450	72,8583	54,6590	6,9	9,7	-18,1993	2,8
4	20,5220	16,8317	160,2640	177,1383	13,5	9,1	16,8742	-4,4
5	21,5988	27,1761	106,6972	118,3319	4,6	9,4	11,6347	4,8
6	50,5418	46,1014	75,0072	110,4846	25,4	19,4	35,4774	-6
7	20,8099	17,4942	80,5081	97,4658	4,1	16,5	16,9576	12,4
8	26,8824	21,8256	103,4276	111,1394	22	11	7,7118	-11
9	68,9716	79,6928	86,9734	76,6182	10,3	11	-10,3552	0,7
10	38,4808	27,6424	111,5442	122,8096	9	12	11,2654	3
11	29,2148	24,6816	84,1882	107,4294	10	10,8	23,2412	0,8
12	14,4218	11,4875	105,9092	110,7355	10,2	9,2	4,8263	-1
13	11,6329	17,7420	102,5641	92,4570	17,0	10,6	-10,1072	-6,4
14	15,6807	18,3298	112,8293	117,2292	14,9	14,4	4,3999	-0,5
15	12,1842	10,1001	59,1658	78,5839	11,8	19,0	19,4181	7,2
16	21,3180	16,4533	95,5030	100,3987	1,3	18,2	4,8957	16,9
Mittelwerte	29,6498	28,3734	102,7183	110,3234	11,3	12,4	7,6051	1,1
Median	21,4584	21,6715	102,9959	110,6101	10,3	10,9	8,1839	0,1
Standardabweichung	18,4680	20,5681	28,0977	30,3344	6,3	3,8	13,7884	7,0

Tab. 9: Gesamtliste der globalen PORH-Kenngrößen

3.2.1.2. Box-Plots und statistische Prüfung

Die Box-Plot-Darstellung der Verteilungen der **Maximalwerte** der PORH-Reaktion mit und ohne NTG kann Abb. 45 entnommen werden. Mittels des Kolmogorov-Smirnov Tests konnte das Vorliegen einer Normalverteilung bestätigt werden. Der Mittelwert des Maximums ohne NTG beträgt 102,7183 PU (Perfusion Units) mit einer Standardabweichung von 28,0977 PU. Das Maximum mit NTG beträgt 110,3234 PU mit einer Standardabweichung von 30,3344 PU. Jedoch konnte nur mittels t-Test statistische Signifikanz erreicht werden. (t-Test: $p = 0,0434$). Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummentest ergab keine statistische Signifikanz ($p = 0,0654$).

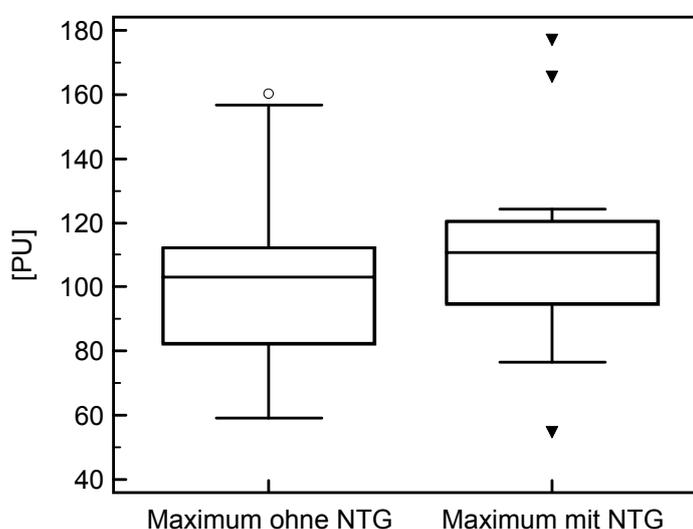


Abbildung 45: Gegenüberstellung der PORH-Maxima ohne NTG und mit NTG

Der Median-Wert des Maximalwerts der PORH nach der Gabe von NTG lag höher als jener ohne NTG. Die Interquartil-Abstände waren in beiden Experimentalserien vergleichbar.

In Abb. 46 ist die **Zeitdauer bis zum Maximalwert** der PORH-Reaktion (T_{MAX}) mit und ohne NTG vergleichend dargestellt.

Der Kolmogorov-Smirnov Test akzeptierte die Annahme einer Normalverteilung, der Mittelwert von T_{MAX} ohne NTG beträgt 11,29 Sekunden mit einer Standardabweichung von 6,31 Sekunden. Mit NTG beträgt der Mittelwert von T_{MAX} 12,36 Sekunden mit einer Standardabweichung von 3,85 Sekunden. Es konnte weder mit dem t-Test noch mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummentest ein statistisches Ergebnis erreicht werden. (t-Test: $p = 0,5508$; Wilcoxon: $p = 0,7057$)

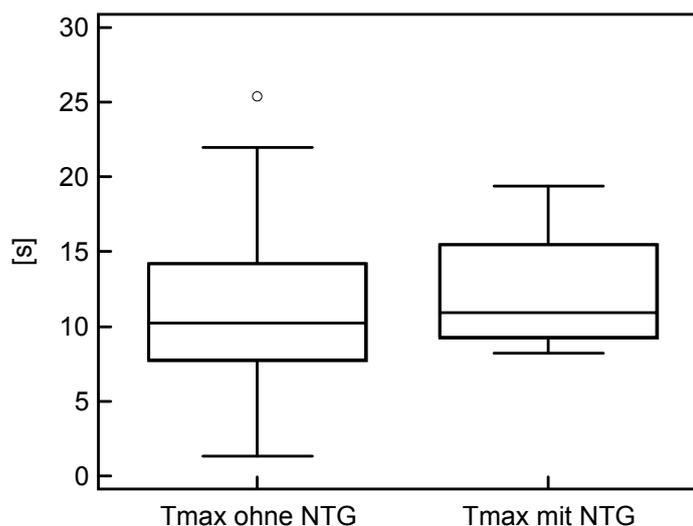


Abbildung 46: Vergleich der Reaktionsdauer bis zum Maximum ohne und mit NTG.

Der Median der Zeitdifferenzen vom Öffnen der Manschette bis zum Erreichen des maximalen Blutflusses T_{MAX} lag bei Applikation von NTG geringfügig über dem vergleichbaren Medianwert ohne NTG. Die Interquartilabstände waren in beiden Serien vergleichbar.

3.2.2. Ergebnisse der kinetischen Kenngrößen der PORH

3.2.2.1. Tabellarische Übersicht

Die nachfolgende Tabelle 10 gibt eine Übersicht über die kinetischen Kenngrößen der PORH:

ohne NTG	mit NTG	Beschreibung	Einheit
k_a	k_a	Invasionskonstante	1/s
k_e	k_e	Eliminationskonstante	1/s
Residuen	Residuen	Güte der Modellanpassung	
AUC	AUC	Fläche unter der normierten Kurve	s
AUCabs	AUCabs	Fläche der absoluten Reaktionskurve	PU.s

Tab. 10: Kinetische Kenngrößen der PORH

Tabelle 11 listet die Ergebnisse der kinetischen Berechnungen (Modellanpassungen) an die PORH-Reaktionen auf. Es werden sowohl die Kenngrößen, die auf Basis des Kompartimentmodells ermittelt wurden, als auch die AUC-Berechnungen, die dem Nicht-Kompartiment-Ansatz zuzuordnen sind, zusammengefasst.

Zusätzlich zu den Einzelwerten sind Mittelwert, Median und Standardabweichung angegeben.

Probanden	ohne NTG					mit NTG					Differenzen			
	ka	ke	Residuen	AUC	AUCabs	ka	ke	Residuen	AUC	AUCabs	Δ ka	Δ ke	Δ AUC	Δ AUCabs
1	0,4943	0,0219	8,9934	46,1856	5967,90	0,3244	0,0188	7,7920	54,3493	6750,10	-0,1699	-0,0031	8,1637	782,20
2	0,5145	0,0200	6,2989	50,1743	7869,30	0,3821	0,0195	6,0992	53,9830	8933,90	-0,1324	-0,0005	3,8087	1064,60
3	0,4188	0,0162	8,9466	49,7139	3629,80	0,2866	0,0109	12,5763	71,9662	4658,10	-0,1322	-0,0053	22,2523	1028,30
4	0,2356	0,0203	7,0998	46,9355	7521,90	0,3685	0,0178	4,6138	52,8743	9366,20	0,1329	-0,0025	5,9388	1844,30
5	1,1668	0,0213	6,0247	43,9877	4693,40	1,3893	0,0142	11,0667	56,6796	6707,20	0,2225	-0,0071	12,6919	2013,80
6	0,4826	0,0165	15,4175	55,5138	4164,40	0,2020	0,0174	11,7507	59,3968	6563,30	-0,2806	0,0009	3,8830	2398,90
7	0,6671	0,0293	4,9681	35,3398	2845,20	0,3068	0,0363	3,7505	33,6614	3275,30	-0,3603	0,0070	-1,6784	430,10
8	0,1563	0,0172	5,9958	59,1647	6119,30	0,2463	0,0132	10,0641	81,6719	7788,80	0,0900	-0,0040	22,5072	1669,50
9	0,1883	0,0346	7,1754	34,2471	2954,40	0,2162	0,0583	6,7526	23,5267	1802,30	0,0279	0,0237	-10,7204	-1152,10
10	1,0028	0,0221	9,5749	43,4815	4850,10	0,5377	0,0201	10,5643	53,1198	6523,70	-0,4651	-0,0020	9,6383	1673,60
11	0,3967	0,0282	7,8990	35,7380	3008,70	0,4102	0,0258	7,0861	37,3406	4011,50	0,0135	-0,0024	1,6026	1002,80
12	0,3420	0,0225	7,2481	42,5740	4509,00	0,5727	0,0221	5,7377	40,2021	4451,80	0,2307	-0,0004	-2,3719	-57,20
13	0,2241	0,0232	6,1358	46,8442	4804,50	0,3214	0,0265	10,8703	41,6942	3854,90	0,0973	0,0033	-5,1500	-949,60
14	0,3955	0,0264	5,1102	39,7808	4488,50	0,2128	0,0297	3,0195	39,7937	4664,90	-0,1827	0,0033	0,0129	176,40
15	0,1976	0,0279	4,3489	41,9729	2483,40	0,1876	0,0172	4,2862	61,4498	4829,00	-0,0100	-0,0107	19,4769	2345,60
16	1,1005	0,0290	6,3043	33,5514	3204,20	0,1464	0,0384	12,0158	38,1310	3828,30	-0,9541	0,0094	4,5796	624,10
Mittelwert	0,4990	0,0235	7,3463	44,0753	4569,63	0,3819	0,0241	8,0029	49,9900	5500,58	-0,1170	0,0006	5,9147	930,96
Median	0,4078	0,0223	6,7021	43,7346	4498,75	0,3141	0,0198	7,4391	52,9971	4746,95	-0,0711	-0,0013	4,2313	1015,55
Stabw	0,3258	0,0052	2,6160	7,4228	1620,76	0,2942	0,0120	3,2548	14,9231	2105,08	0,3003	0,0080	9,5926	1067,11

Tab. 11: Gesamtliste der kinetischen Kenngrößen

3.2.2.2. Box-Plots und statistische Prüfung

Vergleicht man die **Invasionskonstanten** k_a , die über die Anpassung des Zwei-Kompartiment-Modells mittels nichtlinearer Regression erhalten wurden, für den Fall ohne und mit NTG, so ergibt sich für die Invasionskonstante ohne NTG ein Mittelwert von 0,4990 [1/s] mit einer Standardabweichung von 0,3258, für den Fall mit NTG ein Mittelwert von 0,3819 [1/s] mit einer Standardabweichung von 0,2942. Nach dem Kolmogorov-Smirnov-Test liegt eine Normalverteilung vor, es konnte weder beim t-Test ($p = 0,1398$) noch beim Wilcoxon-Rangsummentest ($p = 0,2522$) eine statistische Signifikanz der Differenzen der Mediane bzw. Mittelwerte gefunden werden.

Abb. 47 zeigt die Box-Plot-Darstellung der Verteilungen der Invasionskonstante k_a mit und ohne NTG.

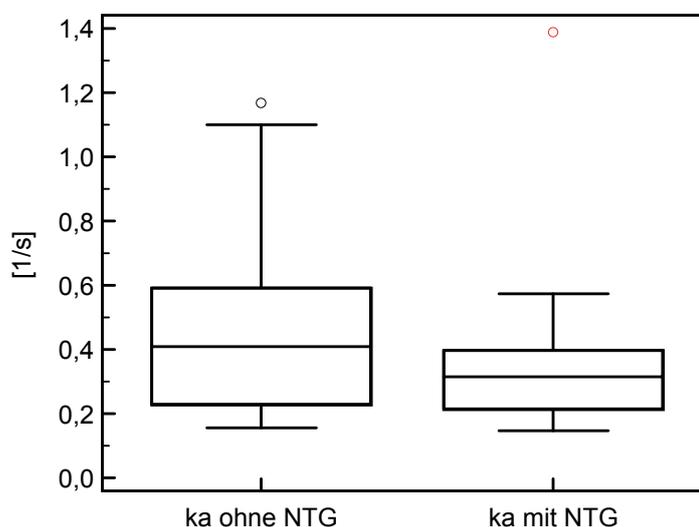


Abbildung 47: Gegenüberstellung der Invasionskonstante k_a ohne Glyceroltrinitrat (NTG) und mit NTG

Der Median-Wert der Invasionskonstanten mit Applikation von NTG liegt niedriger als jener in der Serie ohne NTG, der Interquartilabstand der Invasionskonstanten bei Applikation von NTG war geringer als jener ohne NTG.

Ein Vergleich der **Eliminationskonstanten** k_e mit und ohne NTG ergab für den Mittelwert der Eliminationskonstanten k_e ohne NTG den Wert von 0,02354 mit einer Standardabweichung von 0,005240, mit NTG beträgt der Mittelwert der k_e 0,02414 mit einer Standardabweichung von 0,01199. Es lag eine Normalverteilung vor, jedoch konnte keine

statistisch signifikante Veränderung der Eliminationskonstanten gefunden werden (t-Test: $p = 0,7672$; Wilcoxon: $p = 0,7820$).

Abb. 48 zeigt die Box-Plot-Darstellung der Verteilung der Eliminationskonstanten ohne und mit NTG

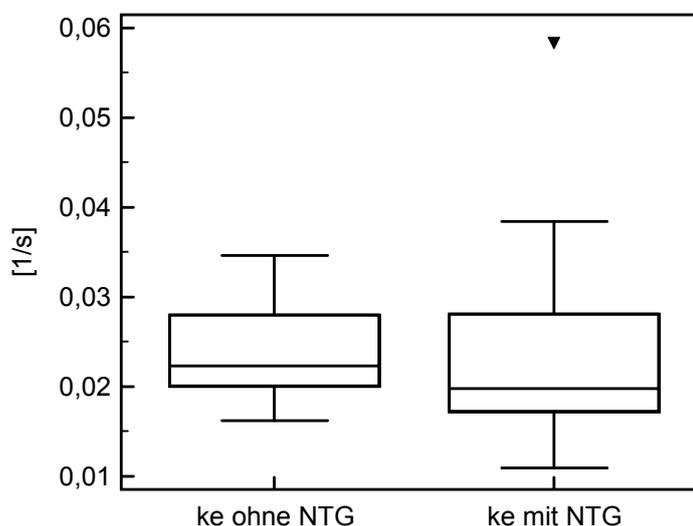


Abbildung 48: Vergleich der Eliminationskonstanten k_e ohne Glyceroltrinitrat (NTG) und mit NTG

Der Medianwert der Eliminationskonstanten mit Applikation von NTG liegt niedriger als jener in der Serie ohne NTG, der Interquartilabstand der Eliminationskonstanten bei Applikation von NTG war größer als jener ohne NTG.

Additiv zu den kinetischen Parametern, welche aus dem Kompartimentmodell errechnet wurden, wurden auch die AUCs (Kenngrößen aus dem Nicht-Kompartiment-Ansatz) sowohl in der normierten als auch in der nichtnormierten Form einander gegenübergestellt.

Bei den **normierten** AUCs konnte eine Normalverteilung laut Kolmogorov-Smirnov angenommen werden. Der Mittelwert der normierten AUCs ohne NTG beträgt 44,0753 mit einer Standardabweichung von 7,4228. Der Mittelwert der AUC mit NTG beträgt 49,9900 mit einer Standardabweichung von 14,9231. Es konnte sowohl im t-Test und im Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummentest eine statistische Signifikanz erzielt werden (t-Test: $p = 0,0262$; Wilcoxon: $p = 0,0335$).

Die nachfolgende Abb. 49 verdeutlicht die Unterschiede in der Verteilung der normierten AUCs mit und ohne NTG.

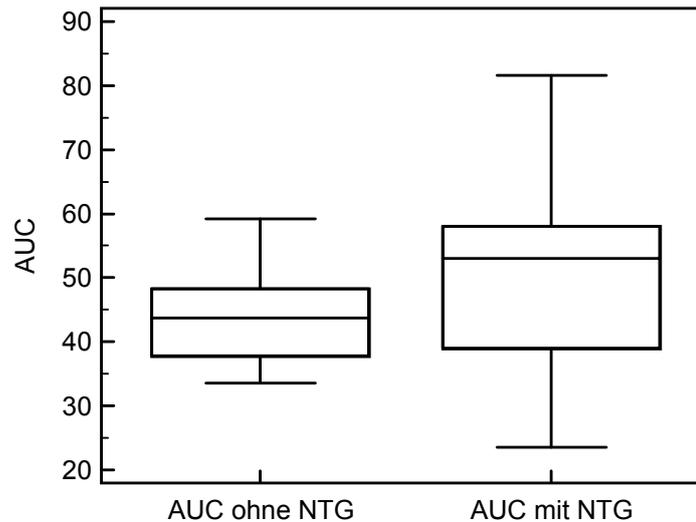


Abbildung 49: Gegenüberstellung der normierten AUCs ohne NTG und mit NTG

Die Medianwerte der berechneten AUCs bei Applikation von NTG lagen deutlich über jenen ohne NTG, der Interquartilabstand mit NTG war größer als jener ohne NTG.

Es wurden auch die **nicht normierten AUCs** mit und ohne NTG einander gegenübergestellt. Diese AUCs sind Absolutwerte und geben Aufschluss über die Stärke der PORH. Je größer die AUC, desto stärker ausgeprägt die Perfusion. Es konnte analog zu den normierten AUCs eine Normalverteilung angenommen werden. Der Mittelwert der absoluten AUC ohne NTG beträgt 4569,6250 mit einer Standardabweichung von 1620,7639. Mit NTG beträgt der Mittelwert der absoluten AUCs 5500,5812 mit einer Standardabweichung von 2105,0798. Es konnte auch hier ein statistisch signifikantes Ergebnis errechnet werden (t-Test: $p = 0,0033$; Wilcoxon: $p = 0,0063$).

Die nachfolgende Abb. 50 verdeutlicht die Unterschiede in den Verteilungen mit und ohne NTG in Form eines Box-Plots.

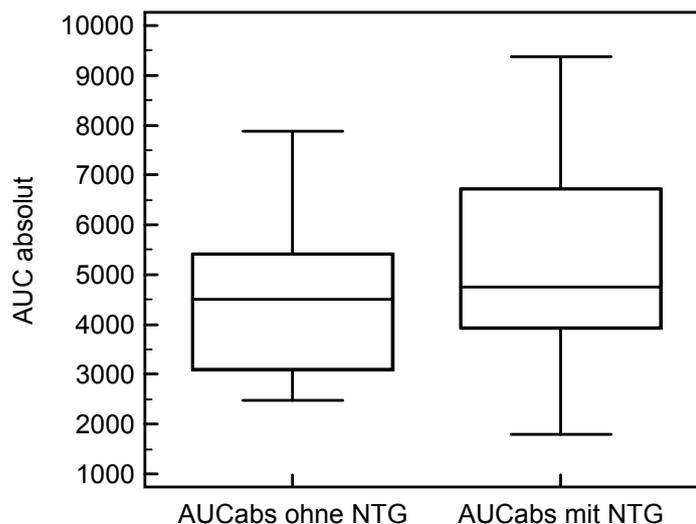


Abbildung 50: Vergleich der absoluten (nicht normierten) AUCs vor und nach der Gabe von NTG

Die Medianwerte der berechneten absoluten AUCs bei Applikation von NTG lagen deutlich über jenen ohne NTG, der Interquartilabstand mit NTG war größer als jener ohne NTG.

3.2.3. Ergebnisse der kardiovaskulären Messgrößen

Die nachfolgenden Tabellen 12, 13 und 14 geben eine Übersicht über die parallel zur Ermittlung der PORH erhobenen kardiovaskulären Messgrößen Herzfrequenz (Hf), systolischer Blutdruck (Sys) und diastolischer Blutdruck (Dia). Bei allen Tabellen sind neben den Einzelwerten auch Median, Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

Proband	Hf vor NTG	Hf nach 2 Minuten	Hf nach 4 Minuten	Hf nach 7 Minuten	Hf nach PORH
1	54			63	
2	59	69	72	67	64
3	62	63	65	63	65
4	57	61	60	64	65
5	64	77	83	79	75
6	61	64	67	63	61
7	75	71	75	72	78
8	83	83	88	85	80
9	67	67	67	72	72
10	52	60	64	56	52
11	83	83	89	80	76
12	47	52	55		
13	68	70	69	68	72
14	77	80	79	75	72
15	72	75	71	74	70
16	72	72	90	79	67
Median	65,5	70	71	72	71
Mittelwert	65,81	69,80	72,93	70,67	69,21
Standardabweichung	10,75	8,93	10,83	8,11	7,49

Tab. 12: Gesamtliste der Herzfrequenzen [1/min]

Proband	Sys vor NTG	Sys nach 2 Minuten	Sys nach 4 Minuten	Sys nach 7 Minuten	Sys nach PORH
1	110	101		101	
2	121	114	105	113	115
3	139	132	122	122	128
4	138	128	129	128	136
5	108	112	106	98	105
6	115	115	106	109	111
7	131	123	115	115	121
8	115	105	104	102	111
9	105	95	96	96	96
10	104	106	108	102	101
11	109	110	117	106	109
12	110	109	112	102	106
13	122	111	111	111	116
14	139	137	138	134	135
15	106	102	99	106	105
16	113	112	115	106	106
Median	114	111,5	111	106	111
Mittelwert	117,81	113,25	112,20	109,44	113,40
Standardabweichung	12,48	11,54	11,13	10,76	11,94

Tab. 13: Gesamtliste des systolischen Blutdruckes [mmHg]

Proband	Dia vor NTG	Dia nach 2 Minuten	Dia nach 4 Minuten	Dia nach 7 Minuten	Dia nach PORH
1	68	64		57	
2	56	58	50	51	52
3	88	82	82	77	82
4	90	93	86	85	91
5	65	63	55	54	56
6	74	75	76	77	75
7	67	63	58	52	58
8	66	64	61	65	61
9	60	52	50	48	49
10	63	61	58	54	54
11	60	55	62	63	53
12	65	55	49	49	48
13	62	53	51	52	51
14	80	73	71	68	65
15	68	67	63	61	59
16	73	66	63	66	63
Median	66,5	63,5	61	59	58
Mittelwert	69,06	65,25	62,33	61,19	61,13
Standardabweichung	9,75	11,04	11,69	11,17	12,54

Tab. 14: Gesamtliste des diastolischen Blutdruckes [mmHg]

Zur besseren Übersicht werden die Verteilungen der Messwerte im Kollektiv zu den entsprechenden Zeitpunkten (siehe vorne) auch in Form von Box-Plots dargestellt, die Abbildungen 51 und 52 zeigen die Box-Plots für den systolischen bzw. diastolischen Blutdruck, Abb. 53 gibt den Box-Plot für die Herzfrequenz wieder.

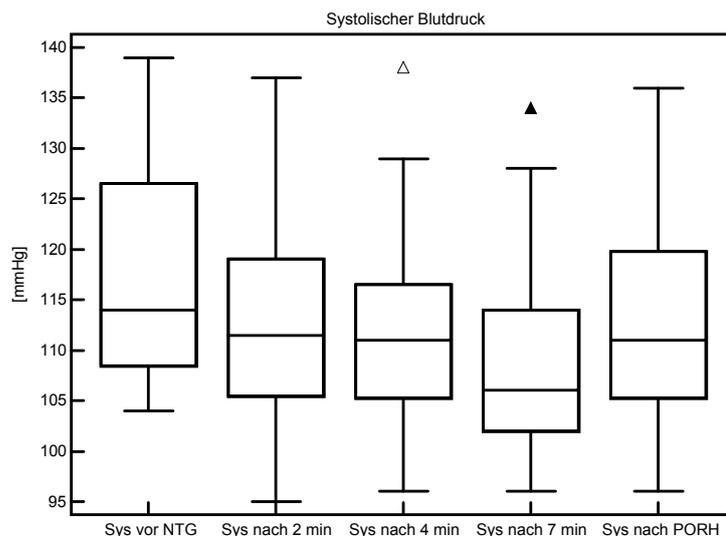


Abbildung 51: Boxplot des systolischen Blutdruckes

Sowohl der systolische als auch der diastolische Blutdruck zeigen bedingt durch die NTG-
verursachte Vasodilatation eine Abnahme, deren Maximalwert nach 7 Minuten (systolischer
Druck) bzw. nach 10 Minuten – nach PORH – (diastolischer Druck) erreicht wurde.

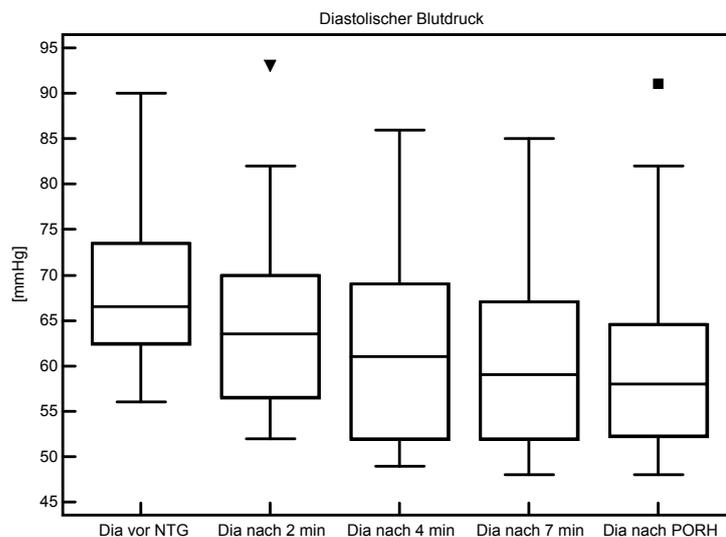


Abbildung 52: Boxplot des diastolischen Blutdruckes

Nach Einnahme von NTG nahm die Herzfrequenz zu und erreichte nach 7 Minuten ein
Maximum. Dies ist eine Folge der Gegenregulation über den Barorezeptor-Regelkreis auf den
durch NTG bedingten Blutdruckabfall.

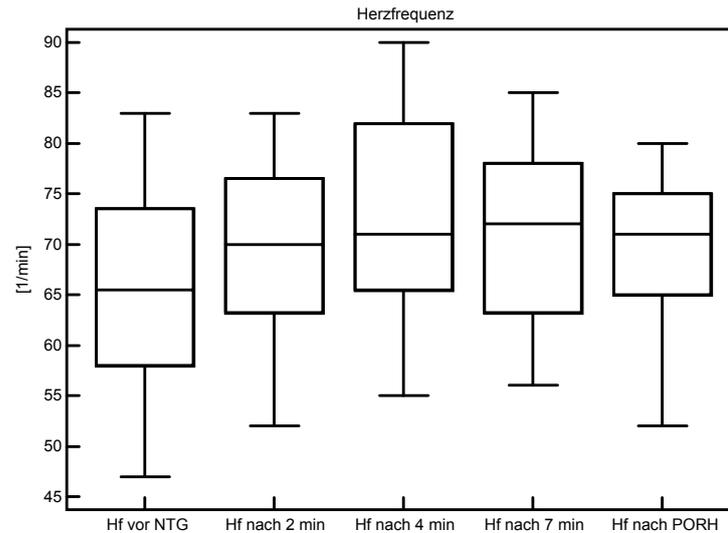


Abbildung 53: Boxplot der Herzfrequenz

3.2.4. Zusammenfassung der statistischen Prüfungen

In der folgenden Tabelle werden die analysierten Resultate sowohl aus dem t-Test (Unterschiede in den Mittelwerten) als auch aus dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummentest (Unterschiede in den Medianwerten) unter Berücksichtigung einer zweiseitigen Irrtumswahrscheinlichkeit (Two tailed probability, p) aufgelistet.

Sample 1	Sample 2	Sample size	Two tailed probability t-Test	Two tailed probability Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummentest
Maximum ohne NTG	Maximum mit NTG	16	0,0434	0,0654
Tmax ohne NTG	Tmax mit NTG	16	0,5508	0,7057
ka ohne NTG	ka mit NTG	16	0,1398	0,2522
ke ohne NTG	ke mit NTG	16	0,7672	0,7820
AUC ohne NTG	AUC mit NTG	16	0,0262	0,0335
AUCabs ohne NTG	AUCabs mit NTG	16	0,0033	0,0063

Tab. 15: Gesamtliste der Irrtumswahrscheinlichkeiten, die signifikanten Ergebnisse sind gelb markiert.

3.2.5. Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

In der nachstehenden Tabelle werden die Ergebnisse übersichtlich zusammengefasst, wobei jeweils die Änderungsrichtungen nach Gabe von NTG zum Referenzexperiment ohne NTG angegeben sind.

KenngroÙe	Richtung der Änderung	Signifikanz
Maximum	↑	p<0,05
Tmax	↑	n.s.
ka	↓	n.s.
ke	↓	n.s.
AUC	↑	p<0,05
AUCabs	↑	p<0,05

Tab. 16: Zusammenfassung der Ergebnisse

4. Diskussion

4.1. Diskussion der Fragestellung

4.1.1. Relevanz der Ziele der Arbeit

Eine Früherkennung der EDF zum Zwecke der Abschätzung eines allfälligen Artherosklerose-Risikos ist im Hinblick auf die Epidemiologie kardiovaskulärer Erkrankungen wesentlich. Daher sind nichtinvasive Methoden, die wenig kostenintensiv sind, zur Detektion der EDF von Vorteil.

Für die Implementation eines diagnostischen Verfahrens in die Routine sind die Gütekriterien von Testverfahren zu beachten (Lienert 1961). Diese umfassen als Haupt-Gütekriterien:

- Objektivität
- Reliabilität
- Validität

Zu den Neben-Gütekriterien zählen u.a. Normier- bzw. Standardisierbarkeit und Ökonomie des Verfahrens.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem wichtigen Aspekt der Reliabilität, die sowohl die Test-Retest-Reliabilität (intraindividuelle Streuung bei Testwiederholung) als auch die Empfindlichkeit des Tests gegenüber Kofaktoren (zusätzliche Einfluss- bzw. Störfaktoren) umfasst.

Als einer der relevanten Kofaktoren wird die Bioverfügbarkeit von NO angesehen, daher wurde diese durch orale Gabe von NTG modifiziert. Ebenso wurde die methodische Standardisierung hinsichtlich der Dauer der Okklusion und der Vorverarbeitung der experimentellen Daten bearbeitet.

4.1.2. Ziel der Modellierung

Dynamische Systeme werden sinnvollerweise mit dynamischen Methoden untersucht, d.h. es erfolgt eine Anregung des Systems mit Standard-Testfunktionen (Sprungfunktion, Impulsfunktion) und die zeitliche Änderung von Systemgrößen als Folge der Anregung wird aufgezeichnet.

Die PORH-Reaktion stellt einen dynamischen Prozess dar, nämlich die Systemantwort der Perfusion der Mikrozirkulation auf die „sprungförmige“ Aufhebung der suprasystolischen Okklusion. Der Zeitverlauf der Perfusion zeigt einen Anstieg bis zu einem Maximum und danach einen langsamen Abfall bis zum Wiedererreichen des Ausgangswerts vor der Okklusion.

Die Modellierung über ein phänomenologisch orientiertes 2-Kompartiment-Modell erlaubt eine quantitative Charakterisierung dieses Zeitverlaufs durch wenige Modellparameter, die über nichtlineare Regression auf Basis des zugrundeliegenden Modells und der experimentellen Daten bestimmt werden. Da der Modellansatz möglichst einfach gefasst werden soll, wurde auf empirisch-induktiver Basis das Standard-2-Kompartiment-Modell der intramuskulären Injektion gewählt, das sich als günstig erwiesen hat.

Diese Vorgangsweise der Modell-Identifikation bzw. Parameterschätzung stellt den klassischen Ansatz der sog. „modellorientierten Diagnostik“ dar.

4.1.3. NTG als modifizierender Ko-Faktor

Durch die Gabe von NTG wird eine endothelunabhängige Vasodilatation erzeugt, die durch eine zusätzliche Bereitstellung von NO verursacht ist. Bisher sind keine Studien zur Auswirkung von NTG bei der PORH bekannt. Direkte Vergleiche mit anderen Forschungsarbeiten sind daher in dieser Hinsicht nicht möglich. Bei der FMD hat sich jedoch NTG bereits als Positivkontrolle für die Messung etabliert. Als Alternative zu NTG würde sich N^G-monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) anbieten. Durch diese Substanz wird die eNOS blockiert und in weiterer Folge kein NO freigesetzt. Vorteil von L-NMMA wäre, dass die Reaktion die direkte Abhängigkeit des Endothels zeigt. Nachteilig ist die Bedenklichkeit des Einsatzes von L-NMMA am Menschen. Tagawa et al. konnten bei Experimenten L-NMMA zeigen, dass NO primär in der mid-to-late Phase der PORH-Reaktion, also in der postokklusiven Zeitspanne von 35 Sekunden bis 110 Sekunden, die Hauptwirkung besitzt. In Abb. 54 sind die Reaktionskurven der PORH vor und nach L-NMMA dargestellt. Der Reduktion des Blutflusses nach L-NMMA liegt bei ca. 20 – 30%. Hingegen zeigen andere Faktoren wie etwa Prostaglandin, Adenosin und ATP-sensitive Kaliumkanäle einen wesentlich stärkeren Einfluss bei der PORH (Kilbom et al. 1976; Carlsson et al. 1987; Aversano et al. 1991; Kanatsuka et al. 1992). In Tab. 17 sind die Einflussfaktoren inklusive der blockierenden Substanzen, mit der Stärke der Auswirkung aufgelistet.

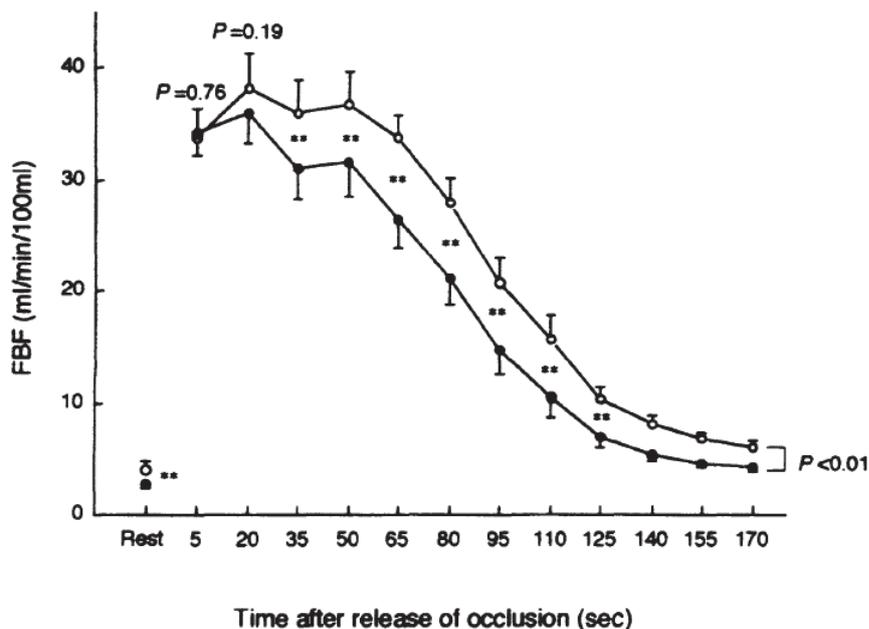


Abbildung 54: Vergleich PORH unter Einfluss von L-NMMA. Zu sehen ist der Blutfluss des Unterarms nach 10-minütiger arterieller Okklusion vor (○) und nach (●) L-NMMA (n=13). *P < 0,05; **P < 0,01 (Tagawa et al., 1994)

Ein anderer Weg zur Variation der bereitgestellten NO-Menge wäre die Supplementierung der Aminosäure L-Arginin. L-Arginin gilt als wichtiges Precursor-Molekül für die NO Synthese am Endothel. Eine höhere Konzentration dieser Aminosäure könnte in weiterer Folge zu einer erhöhten Konzentration von NO führen und somit vasodilatierend wirken. Einer Studie von Lerman et al. zufolge müsste jedoch L-Arginin über einen Zeitraum von 6 Monaten verabreicht werden, um eine Veränderung der Endothelfunktion beobachten zu können (Lerman et al. 1998). Aufgrund dieser langen Supplementierungsdauer, haben wir diese Möglichkeit nicht in Betracht gezogen.

Einflussfaktor	Blocker	Einfluss	Referenz
Prostaglandin	Indomethacin, Ibuprofen	-50% Blutfluss in Peak (MAX) und mid-to-late Phase (Elimination)	Kilbom et al. 1974; Kilbom et al. 1976; Carlsson et al. 1983; Carlsson et al. 1987
Adenosin	Theophyllin	-35% Blutfluss	Carlsson et al. 1987
ATP-sensitive Kalium Kanäle	Glibenclamid	-30% Blutfluss, -50% Reaktionsdauer	Aversano et al. 1991; Kanatsuka et al. 1992
Stickstoffmonoxid	N ^G -monomethyl-L-Arginin	-20 – 30% Blutfluss in mid-to-late Phase	Tagawa et al. 1994

Tab. 17: Einflussfaktoren und Auswirkung auf die PORH

4.2. Diskussion der Methodik

4.2.1. Praktikabilität der PORH/LDF und Relevanz des Messgebiets

Die Erfassung der PORH mittels LDF gestaltet sich methodisch relativ einfach, da nur der LDF-Messkopf mittels eines Schaumstoff-Kleberings am Unterarm befestigt werden muss. Die Verbrauchsmaterial-Kosten sind dementsprechend gering und die Schulung des Anwenders beschränkt sich vornehmlich auf die Bedienung der Datenerfassungs-Software.

Die Messung ist nichtinvasiv und daher für den Probanden schmerzfrei und erfolgt überdies an einer leicht zugänglichen Körperstelle (Unterarm), sodass Aus- und Ankleideprozeduren entfallen.

Für die Datenerfassung sind nur einige Standardisierungs-Maßnahmen erforderlich, diese betreffen neben Ausschluss von Medikamenten vorwiegend die Umgebungstemperatur, um thermoregulatorisch bedingte Perfusionsänderungen in der Haut auszuschließen.

Als Nachteil der LDF-Methodik gilt jedoch, dass keine Absolutwerte der Perfusion, sondern nur Relativwerte („perfusion units“) erhoben werden können, sodass die Messungen immer auf einen Basiswert (Ruhewert) bezogen werden müssen.

In unserem Fall zeigten die Basiswerte vor dem Leerversuch und vor dem NTG-Experiment nur geringe Schwankungen, wie Abb. 55 entnommen werden kann, dies kann als Indikator für eine gute Reproduzierbarkeit interpretiert werden.

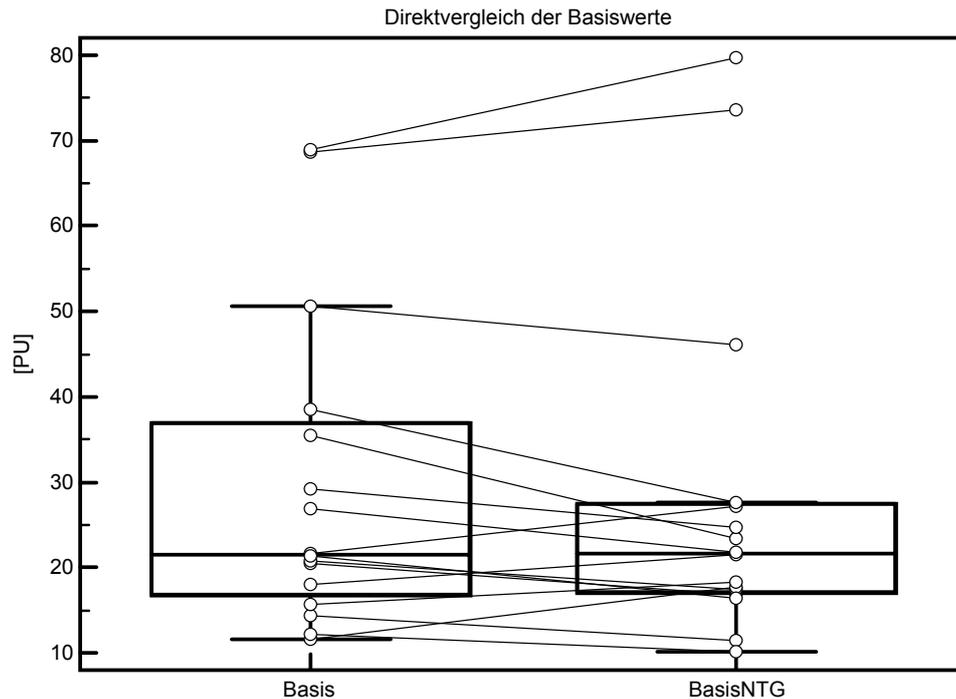


Abbildung 55: Direktvergleich der Basiswerte: Die jeweiligen gemessenen Werte (o) sind probandenabhängig durch eine unterbrochene Linie verbunden

Die Übertragbarkeit der PORH der kutanen Mikrozirkulation auf andere Mikrozirkulationsbereiche (Skelettmuskel, Herzmuskel etc.) ist bislang weder experimentell noch klinisch verifiziert, es herrscht jedoch in der Literatur Übereinstimmung, dass beispielsweise Änderungen der Durchblutung der Netzhaut auf Flicker-Licht („dynamic retinal vessel analysis“ – Patel 2010; Baumann et al. 2012) als prognostischer Faktor für die EDF herangezogen werden können. Daraus kann man vorsichtig schlussfolgern, dass Änderungen in einem bestimmten Mikrozirkulations-Areal im Hinblick auf andere Areale generalisierbar sind.

4.2.2. Vergleich der PORH/LDF mit konventioneller FMD

Die mittels Ultraschall gemessene Gefäßdilatation nach arterieller Okklusion (FMD) gilt als Goldstandard in der Diagnose und Prognose von EDF und damit von kardiovaskulären Erkrankungen.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen PORH/LDF und FMD liegt im Ort der Okklusion. Bei der FMD wird distal von der Messstelle die Arterie mittels Blutdruck-Manschette okkludiert, bei der PORH/LDF liegt die Okklusionsstelle proximal zur Lage des LDF-Messkopfs.

Darüber hinaus sind die betrachteten Gefäßdurchmesser unterschiedlich: bei der FMD verwendet man größere Gefäße (z.B. a. brachialis), bei der PORH/FMD betrachtet man die Mikrozirkulation der Haut, d.h. überwiegend Arteriolen und Kapillaren.

Ein weiterer wesentlicher Unterschied liegt in der Beurteilung der Reaktion. Bei der FMD wird routinemäßig nur zu einem Zeitpunkt (45-60 Sekunden nach Aufhebung der Okklusion) die relative Änderung des Gefäßdurchmessers gemessen. Eine Erfassung der Gesamtreaktion ist äußerst aufwändig und in der Routine schwer umsetzbar. Bei der PORH/LDF kann die relative Änderung der Perfusion jedoch kontinuierlich mit hoher zeitlicher Auflösung erfasst werden.

Der Vorteil der FMD liegt in der möglichen Erfassung von Absolutwerten und der zusätzlich erzielbaren Information über die Intima-Media-Dicke. Als Nachteil gilt der hohe Schulungsaufwand des Untersuchers und der Mangel an Automatisierbarkeit. Im Gegensatz dazu ist die LDF-Methode einfach und gut automatisierbar, allerdings sind keine Absolutwerte messbar.

Der Zeitverlauf der FMD-Reaktion im Vergleich zur PORH/LDF-Reaktion zeigt markante Unterschiede, wie sie in Abb. 56 dargestellt sind.

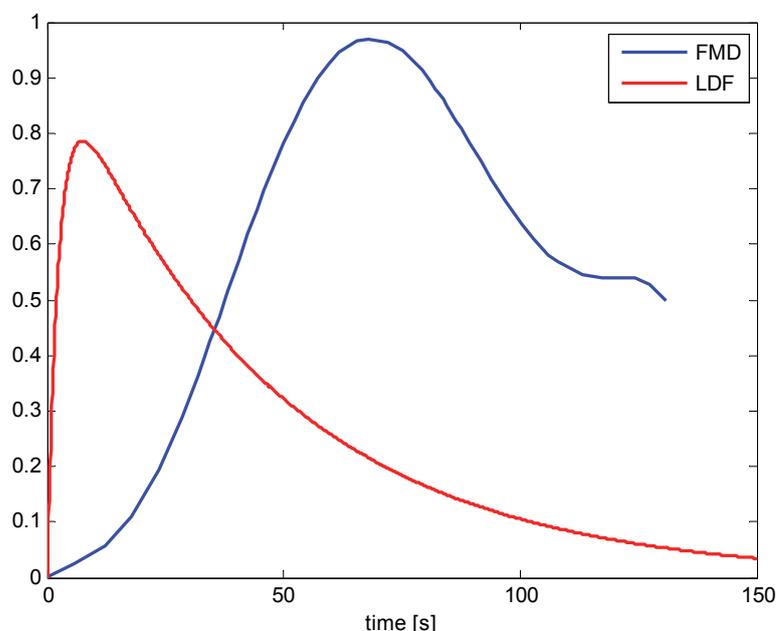


Abbildung 56: Darstellung der normierten Gesamtreaktion einer FMD und einer PORH. Die rote Kurve entspricht der mittels Laser-Doppler gemessenen post-okklusiven reaktiven Hyperämie, die FMD entspricht der blauen Kurve. T_{MAX} ... Reaktionsdauer bis zur Maximalreaktion

Bei Versuchen mit NTG und der Messung der konventionellen FMD konnte gezeigt werden, dass nach der sublingualen Gabe eine Gefäßdurchmesserzunahme zwischen 18,3% und 21,2% erfolgt, wobei es ohne NTG zu einer Kaliber-Änderung von ca. 11% (Drexler et al. 1989; Corretti et al. 2002) kommt. Dies bedeutet eine Verstärkung der Reaktion nach NTG-Gabe um ca. 7-10%.

4.2.3. Einfluss der Okklusionsdauer auf die PORH-LDF

Im Rahmen von Vorversuchen haben wir ermittelt, dass die Dauer der arteriellen Okklusion die Reaktionskinetik der PORH wesentlich beeinflusst. Dies ist eine Folge der metabolischen Autoregulation (siehe vorne) des betreffenden Zirkulationsareals, da über die Dauer der Okklusion das Ausmaß der lokalen Hypoxie beeinflusst wird.

Darüber hinaus wiesen die kinetischen Parameter (k_a , k_e , AUC) bei 5 - bzw. 10 - minütiger Okklusionsdauer deutliche Veränderungen auf. Dies wurde in einer Testserie mit 8 gesunden Personen zwischen 25 und 66 Jahren erhoben, bei denen sowohl eine 5-minütige als auch eine 10-minütige Okklusionsdauer angewandt wurde.

Nach der Anpassung des beschriebenen Kompartiment-Modells der PORH konnte mit Hilfe des Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummentests eine statistisch signifikante Veränderung von k_e ($p = 0,0078$) und der normierten AUC ($p = 0,0078$) ermittelt werden. Bei der Invasionskonstante k_a konnte kein statistisch signifikantes Ergebnis erzielt werden ($p = 0,1494$).

In den Abbildungen 57 bis 59 sind die Resultate als Boxplot dargestellt. Da vor allem die Elimination (Parameter k_e) langsamer erfolgt, steigt die Fläche unter der Kurve (AUC) an. In Abb. 60 sind anhand einer beispielhaften Messung die wesentlichen Unterschiede der nicht normierten PORH-Reaktionen zu erkennen.

Im Gegensatz dazu haben bei der konventionellen FMD weder Okklusionsdauer noch Lage der Manschette (distal oder proximal des Messpunktes) einen Einfluss auf Zeitverlauf und Intensität der Reaktion (Corretti et al. 2002). Dies bestärkt die Annahme, dass mittels FMD eine reduzierte autoregulatorische Kapazität nicht detektiert werden kann.

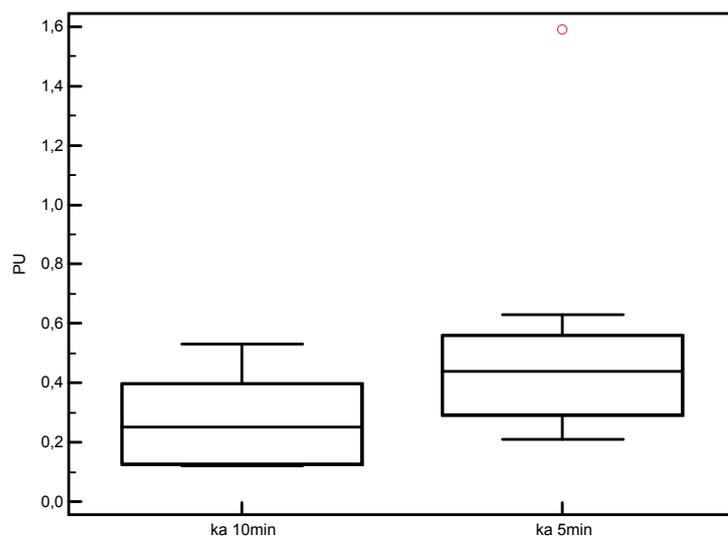


Abbildung 57: Boxplot der Invasionskonstante k_a nach 10-minütiger Okklusionsdauer und 5-minütiger Okklusionsdauer

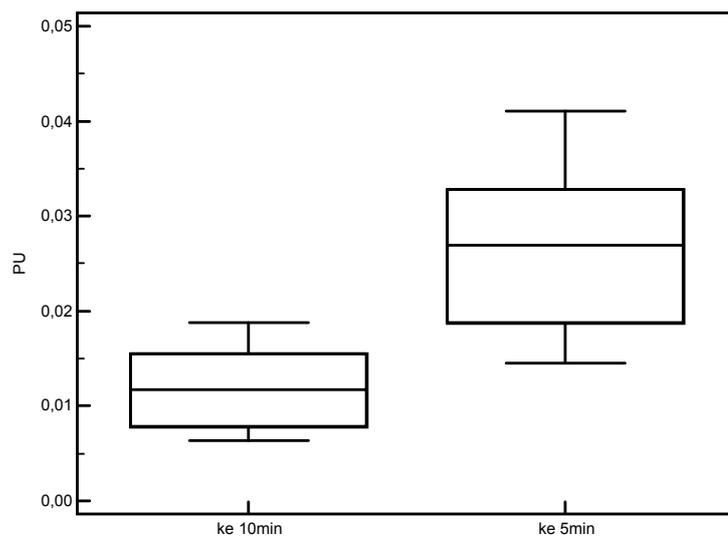


Abbildung 58: Boxplot der Eliminationskonstante k_e nach 10-minütiger Okklusionsdauer und 5-minütiger Okklusionsdauer

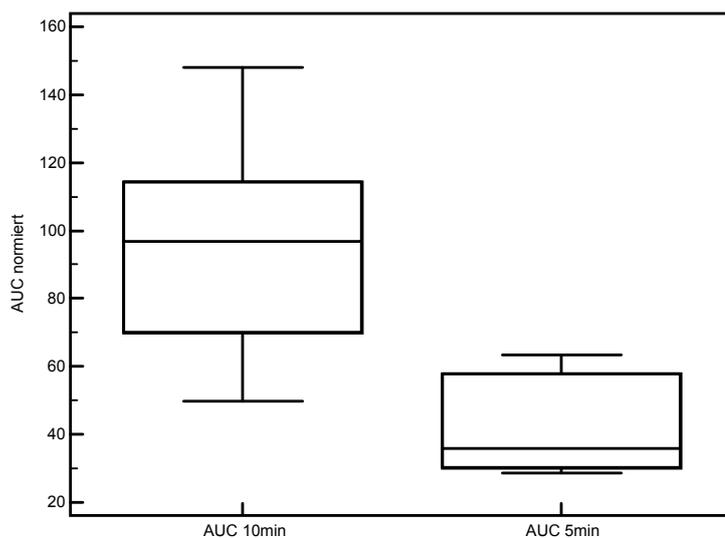


Abbildung 59: Boxplot der normierten AUC nach 10-minütiger Okklusionsdauer und 5-minütiger Okklusionsdauer

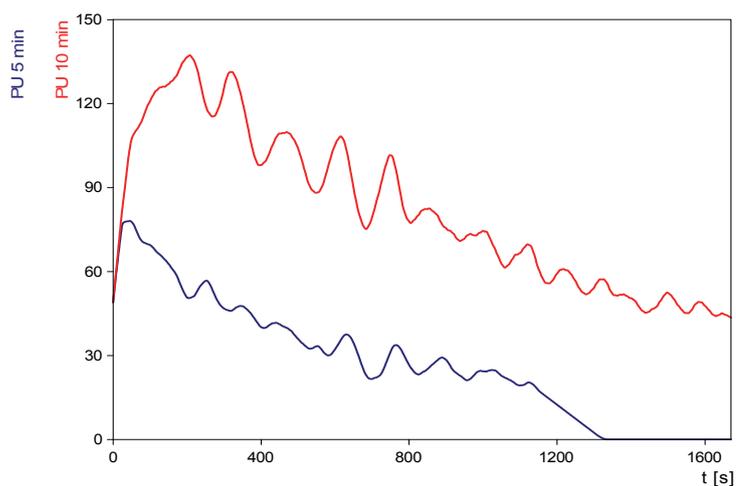


Abbildung 60: Beispiel nicht normierter Reaktionsunterschiede bei einer Okklusionsdauer von 10 Minuten (rot) und 5 Minuten (blau)

4.2.4. Verwendete Messgrößen

Wir unterscheiden in dieser Arbeit zwischen globalen, kinetischen und kardiovaskulären Messgrößen. Die globalen Messgrößen bieten eine einfache und summarische Beschreibung des Zeitverlaufs der Gesamtreaktion. Die kinetischen Parameter beschreiben die Reaktion auf Basis des vorne beschriebenen 2-Kompartiment-Modells und geben über die Residuen zusätzlich einen Hinweis zur Güte der Modellanpassung. Die kardiovaskulären Messgrößen dienen zur Abschätzung der individuellen Wirksamkeit von NTG bei den Probanden.

Die globalen Messgrößen „Maximum“ und „ T_{MAX} “ charakterisieren grob den Zeitverlauf der PORH/LDF-Reaktion. Ihre mathematisch-analytische Zuordnung zur Bateman-Funktion ist in Kapitel 4.3.1 erläutert.

Zur detaillierteren Beschreibung werden die auf Basis des 2-Kompartment-Modells identifizierten Modellparameter herangezogen. Der Parameter k_a charakterisiert die Aktivierungsphase der PORH/LDF-Reaktion, der Parameter k_e die Restitutionsphase. Da die Maximalamplitude der Reaktion auf den Wert 1 normiert wurde, ist der ebenfalls bei der Identifikation bestimmte Parameter D/V_d nur von geringem Informationsgehalt. Um die Intensität der Reaktion übersichtlich beurteilen zu können, wurden zusätzlich sowohl für den normierten als auch den nicht normierten Reaktionsverlauf die Flächen unter der Kurve (AUC) bestimmt.

Die kardiovaskulären Messgrößen (systolischer bzw. diastolischer Blutdruck und Herzfrequenz) dienten zur individuellen Abschätzung der Wirkintensität des verabreichten NTG. Da NTG eine Vasodilatation verursacht, sinkt der arterielle Blutdruck (vor allem der diastolische Wert), dieser Blutdruck-Abfall wird über den Barorezeptor-Regelkreis über einen Herzfrequenz-Anstieg gegenregulatorisch ausgeglichen.

4.2.5. Adäquanz des Modells

Es konnte in der Arbeit von Klasinc 2011 bereits gezeigt werden, dass ein Zwei-Kompartimentmodell für die Beschreibung der PORH-Reaktion im Vergleich zur Non-Kompartimentanalyse einen praktikablen Ansatz darstellt. Durch die Anpassung der Bateman-Funktion mittels nichtlinearer Regression an die experimentell erhobenen Datenpunkte wird ein robustes Verhalten erreicht, d.h. dass einzelne Ausreißer in den Daten die Gesamtqualität der Parameterschätzung nur unwesentlich beeinflussen.

Die Non-Kompartimentanalyse weist im Vergleich eine reduzierte Robustheit auf, da vor allem die Schätzung von k_e aus nur wenigen Datenpunkten im Endbereich der Reaktionskurve erfolgt. Messfehler in diesem Bereich wirken sich dadurch beträchtlich auf die Berechnung von k_e aus (Klasinc 2011). Daher haben wir von der Berechnung von k_e auf Basis des Non-Kompartiment-Modells abgesehen und nur die AUC aus diesem Ansatz verwendet.

4.2.6. Qualität der Modellanpassung, Verteilung der Residuen

Da im Kompartimentmodell die Regression durch ein „least-square-curve-fit-Verfahren“ durchgeführt wird, erfolgt eine robuste Anpassung an die gemessenen Datenpunkte. Die Güte

der Anpassung wird durch die Residuen angegeben. Je größer deren Wert, umso mangelhafter ist die Modellanpassung. In der folgenden Abbildung ist die Verteilung der Residuen vor und nach der Gabe von NTG dargestellt.

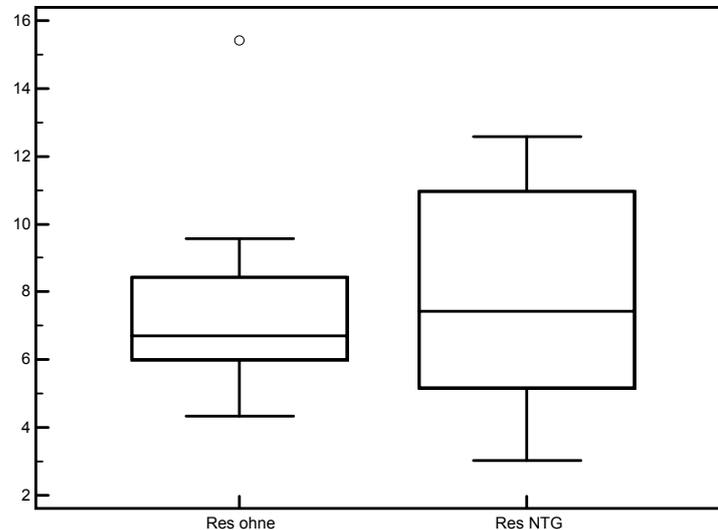


Abbildung 61: Boxplot der Residuen: Residuen vor NTG (Res ohne) und Res nach NTG (Res NTG)

Es ist zu erkennen, dass die Streuung der Residuen nach NTG größer ist als bei der Kontrolluntersuchung ohne NTG. Anhand des Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummentest konnte keine statistisch signifikante Differenz in den Medianwerten gezeigt werden ($p = 0,782$). Die größere Streubreite der Residuen nach NTG-Gabe kann möglicherweise über Bewegungsartefakte, die als Folge der langen Versuchsdauer oder eines subjektiven Miss-Empfindens nach NTG-Gabe auftreten, erklärt werden.

4.3. Diskussion der Ergebnisse

Die Gabe von NTG, welche mit einem erhöhten Blutfluss einhergeht, führt zu keiner statistisch signifikanten Veränderung der Aktivierungsphase (k_a) bzw. Restitutionsphase (k_e) der PORH/LDF. Es lässt sich jedoch eine Tendenz zur Verkleinerung beider Parameter ablesen. Vergleicht man jedoch die AUC und Maximalwerte, konnte eine statistisch signifikante Differenz vor und nach der Gabe von NTG gefunden werden ($p < 0,05$), die Reaktionsdauer bis zum Maximum (T_{MAX}) wurde durch NTG nicht beeinflusst.

4.3.1. Bateman-Funktion und deren theoretische Analyse

Die phänomenologische Beschreibung der PORH-Reaktion erfolgte durch ein Zwei-Kompartiment-Modell der intramuskulären Injektion, das durch ein System von 2 gekoppelten

gewöhnlichen Differentialgleichungen mit entsprechenden Anfangsbedingungen beschrieben werden kann. Die Lösung dieses Differentialgleichungs-Systems ergibt die sog. „Bateman-Funktion“ (siehe auch Kap. 1.6.2), die einen biexponentiellen Verlauf der Konzentration $C(t)$ in Abhängigkeit von Dosis und Verteilungsvolumen (D/V_d), Invasion (k_a) und Elimination (k_e) beschreibt.

$$C(t) = \frac{k_a D}{V_d(k_a - k_e)} - (e^{-k_e t} - e^{-k_a t})$$

Durch Integration der Bateman-Funktion ergibt sich die Fläche unter der Konzentrations-Kurve (AUC) wie folgt:

$$AUC = \int_0^{\infty} C(t) dt = \frac{D}{V_d k_e}$$

Die berechnete AUC zeigt eine Abhängigkeit von Dosis und Verteilungsvolumen sowie der Eliminationskonstante k_e , jedoch keine Abhängigkeit von k_a .

Durch Differenzieren der Bateman-Funktion ergibt sich der Zeitpunkt des Maximums der Konzentration (t_{max}) zu:

$$t_{max} = \frac{\ln\left(\frac{k_a}{k_e}\right)}{(k_a - k_e)}$$

Für die maximale Konzentration C_{max} folgt:

$$C_{max} = \frac{D}{V_d} e^{-k_e t_{max}}$$

Im Verlauf der Arbeit wird der Zeitpunkt des Maximums der Konzentration (t_{max}) als „ T_{MAX} “ bezeichnet, der Maximalwert der Konzentration (C_{max}) als „Maximum“.

4.3.2. Diskussion der globalen Messgrößen

Die globalen Messgrößen „Maximum“ und der Zeitpunkt des Auftretens des Maximalwertes T_{MAX} zeigten nach Gabe von NTG beide eine schwache Tendenz zur Erhöhung (Bereich 5-10 %), die bei „Maximum“ statistisch signifikant war (siehe Abb. 45 bzw. 46, Ergebnisse).

Aufgrund der Analyse der Bateman-Funktion (siehe oben) stellt T_{MAX} eine funktionale Beziehung der kinetischen Konstanten k_a bzw. k_e dar. „Maximum“ wiederum zeigt eine Abhängigkeit von D/V_d und von den kinetischen Konstanten k_a bzw. k_e .

D/V_d sollte aufgrund der Normierung der Primärdaten auf den maximalen Konzentrationswert (siehe Methodik) nahe am Wert 1 liegen und nur geringfügig aufgrund der Messunsicherheiten schwanken.

Eine detaillierte Analyse der identifizierten Werte für D/V_d (siehe Abb. 62) ergab jedoch, dass bei NTG der Medianwert geringfügig vom Wert 1 nach oben abwich und außerdem der Streubereich wesentlich größer war. Dies führt zu einem Einfluss auf all jene Größen, die von D/V_d abhängig sind, im Sinne einer Wertevergrößerung.

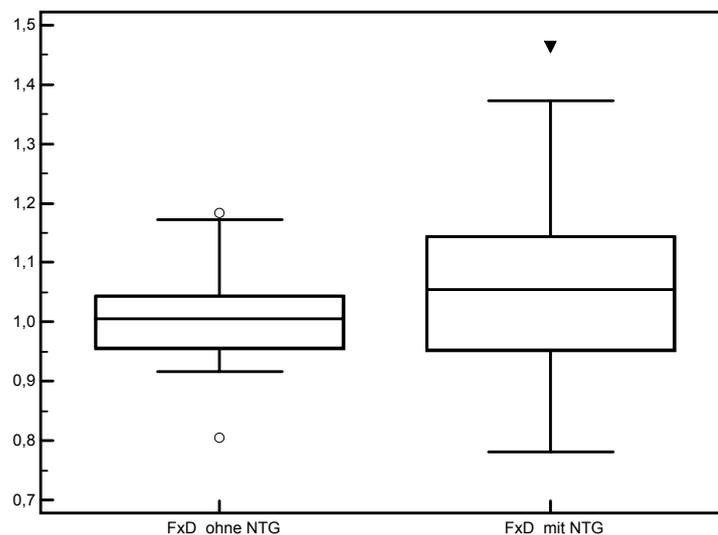


Abbildung 62: FxD/Vd

Da k_a bzw. k_e keine signifikanten Änderungen bei Gabe von NTG aufwiesen (siehe unten), kann der Anstieg von „Maximum“ möglicherweise auf die Erhöhung von D/V_d bei NTG-Gabe zurückgeführt werden.

4.3.3. Diskussion der kinetischen Messgrößen

4.3.3.1. Flächen unter den PORH/LDF-Reaktionskurven (AUC)

Die Flächen unter den Reaktionskurven, die als Kenngrößen der Non-Kompartiment-Analyse gelten, zeigen sowohl im normierten Fall (AUC) bzw. im nicht-normierten (absoluten) Fall (AUCabs) nach NTG-Gabe eine statistisch sicherbare Erhöhung im Ausmaß von etwa 10%.

Aufgrund der theoretischen Analyse der Bateman-Funktion ist eine Abhängigkeit der AUC von D/V_d und k_e gegeben. Da k_e (siehe vorne) keine signifikanten Änderungen bei NTG-Gabe aufweist, dürfte der Anstieg der AUC auf den Einfluss von D/V_d zurückzuführen sein. Der Anstieg der AUC kann darüber hinaus wahrscheinlich als Effekt der höheren Bioverfügbarkeit von NO interpretiert werden.

4.3.3.2. Kinetische Parameter k_a (Aktivierungsphase) und k_e (Restitutionsphase)

Wie im phänomenologischen Modell der PORH/LDF (siehe Abb. 29) bereits beschrieben, repräsentiert die Invasionskonstante k_a die Aktivierungsphase der PORH nach Aufheben der arteriellen Okklusion, die Eliminationskonstante k_e die Restitutionsphase der PORH/LDF.

Beide Konstanten k_a und k_e weisen unter NTG keine signifikanten Änderungen auf, besitzen jedoch eine Tendenz zur Verkleinerung. Das bedeutet, dass die Gabe von NTG keinen nennenswerten Einfluss auf den Zeitverlauf der PORH/LDF-Reaktion ausübt. Dafür existieren zwei Erklärungsmöglichkeiten:

- Unterschiede in der NO-Kinetik im Vergleich zum PORH/LDF-Zeitverlauf
- Anordnung der Strömungswiderstände im Bereich distal der Okklusion.

Die *NO-Kinetik*, untersucht an der gesunden Rattenaorta (Tschudi et al. 1996), weist einen wesentlich rascheren Verlauf auf als die PORH/LDF-Reaktion, d.h. die Gabe von NTG und damit eine erhöhte Bioverfügbarkeit kann sich primär in der frühen Aktivierungsphase auswirken. Sie wird wahrscheinlich durch den starken Abfall des Strömungswiderstandes der kutanen Mikrozirkulation aufgrund der metabolischen Autoregulation maskiert.

Die identifizierten Kenngrößen der Reaktionskurven an der Rattenaorta werden den Mittelwerten der von uns erhobenen kinetischen Kenngrößen der PORH/LDF-Reaktion in Tabelle 18 sowie in der Abb. 63 gegenübergestellt.

	k_a	k_e	T_{MAX} [s]
PORH	0,4078	0,0223	10
NO-Release	0,2646	0,1933	4

Tab. 18: Pharmakokinetische Parameter der PORH und des NO-Release

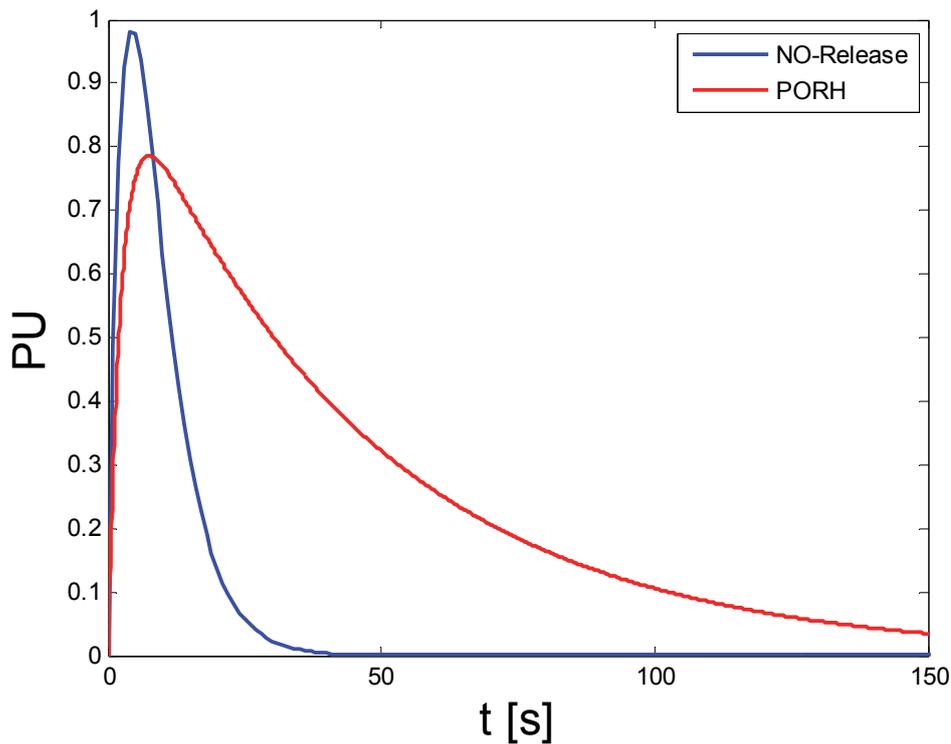


Abbildung 63: Vergleich PORH und NO-Release aus Aorta, blaue Kurve entspricht dem NO-Release aus der gesunden Rattenaorta, die rote Kurve entspricht der PORH

Die *Anordnung der Strömungswiderstände* im Bereich distal der Okklusion kann durch ein Widerstandsmodell, wie es in Abb. 64 dargestellt ist, angenähert werden. Der arterielle Zustrom nach Aufhebung der Okklusion ist I_a , der Strompfad führt über den Widerstand der zuführenden Gefäße R_z zu den beiden Widerständen der Mikrozirkulation, jenem der Mikrozirkulation des Muskels R_m und jenem der Mikrozirkulation der Haut R_{sk} . Der Widerstand der Muskulatur R_m liegt dabei deutlich niedriger als jener der Haut R_{sk} .

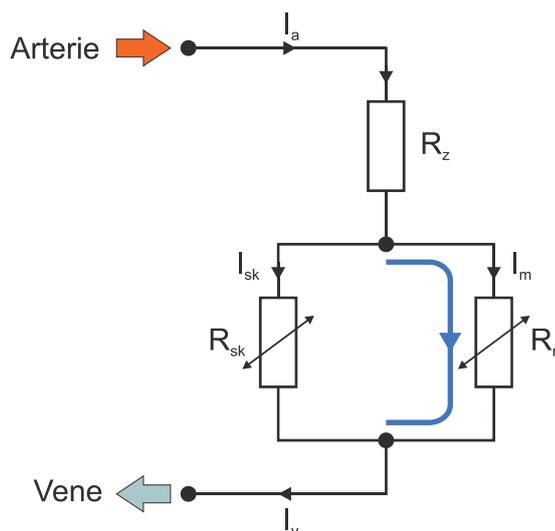


Abbildung 64: Anordnung der Strömungswiderstände

Nach Aufheben der Okklusion ist demzufolge der Strom I_m größer als der Strom I_{sk} (blaue Pfeilmarkierung in Abb. 64), demzufolge ist die Wandscherspannung in der muskulären Mikrozirkulation größer als jene der Mikrozirkulation der Haut. Die NO-abhängige Dilatation, die eine Funktion der Wandscherspannung darstellt, tritt daher verstärkt im Bereich der muskulären Mikrozirkulation und auf und nur in geringerem Maße in der kutanen Mikrozirkulation.

4.3.3.3. Analyse von Zusammenhängen (Korrelationen)

Im Rahmen unserer Analysen wurde gefunden, dass der Parameter k_e (Restitutionsphase) deutlich mit der AUC korreliert (siehe Abb. 65).

Dies kann über die theoretische Analyse der Bateman-Funktion erklärt werden, da die Fläche unter der Kurve (AUC) neben einer Abhängigkeit von D/V_d auch eine reziproke Abhängigkeit von k_e aufweise (siehe vorne). Dies bedeutet, dass eine Abnahme des Parameters k_e zu einer Zunahme von AUC führt.

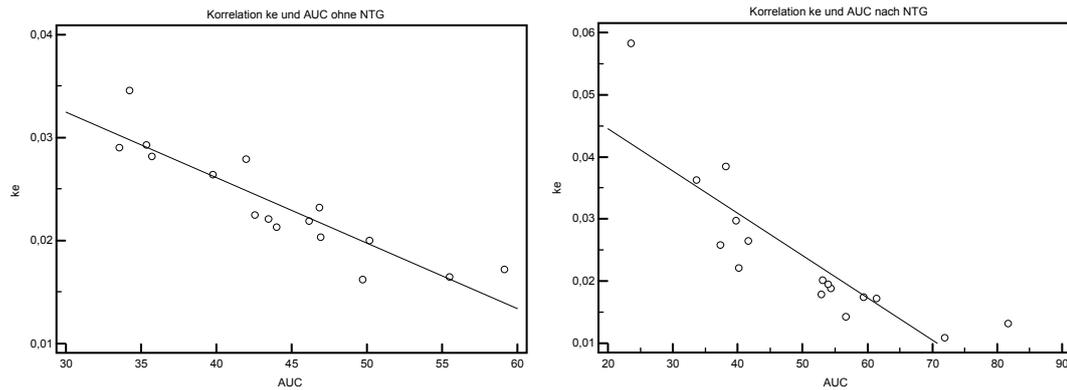


Abbildung 65: Zusammenhang k_e und AUC ohne NTG. Korrelationskoeffizient $r = -0,8455$; $p < 0,0001$; Zusammenhang k_e und AUC nach NTG. Korrelationskoeffizient $r = -0,8455$; $p < 0,0001$

Der Parameter k_a (Aktivierungsphase) zeigt keine signifikante Korrelation mit der AUC, ebenso konnten keine signifikanten Korrelationen zwischen AUC und „Maximum“ (sowohl ohne als auch mit NTG) nachgewiesen werden.

Zwischen dem Parameter k_a und der globalen Messgröße T_{MAX} konnte ohne NTG eine negative Korrelation (Korrelationskoeffizient $r = -0,6002$; $p = 0,0140$) gefunden werden, bei der Applikation von NTG war diese Korrelation allerdings nicht sicherbar (Korrelationskoeffizient $r = -0,4286$; $p = 0,0976$). Aufgrund der theoretischen Analyse der Bateman-Funktion (siehe vorne) weist T_{MAX} sowohl eine funktionale Abhängigkeit von k_a als auch von k_e auf. Nachdem der Zahlenwert für k_a wesentlich größer ist als jener für k_e (Faktor 10), dürfte sich k_a auf T_{MAX} deutlicher auswirken.

Ein Einfluss der biometrischen Daten auf die PORH/LDF-Reaktion konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

4.3.4. Monitoring des Effekts von NTG

In diskreten Zeitabständen (siehe Methodik/Ergebnisse) wurden die kardiovaskulären Messgrößen Herzfrequenz und Blutdruck (systolisch / diastolisch) erfasst. Diese Messungen dienen dem Monitoring der individuellen Wirksamkeit von NTG und der Beobachtung des Zustandes der Probanden. Wie erwartet konnte nach der Gabe von NTG eine Erniedrigung des Blutdruckes (sowohl des systolischen als auch des diastolischen Blutdruckes) beobachtet werden. Als Gegenregulation zur Erniedrigung des Blutdruckes konnte eine gesteigerte Herzfrequenz gefunden werden.

4.3.5. Erweiterung/Verbesserung des Modellansatzes

Für detailliertere physiologische Aussagen ist eine Erweiterung des derzeit angewandten „phänomenologischen Modells“ durch detailliertere Modelle, die die Architektur der kutanen Mikrozirkulation strukturell abbilden und das Strömungsverhalten in den Blutgefäßen einbeziehen, denkbar. Ebenso ist die Einbeziehung von einfachen Funktionsansätzen für die metabolische Autoregulation bzw. die NO-abhängige Vasodilatation sinnvoll. Beispiele für derartige Modelle sind in der Literatur bereits beschrieben (Middleman 1972) und werden auch beispielsweise in der Radiologie für die Untersuchung der Verteilung von intravasal applizierten Kontrastmitteln in der Magnetresonanztomografie eingesetzt (Brix et al. 2009). Ebenso existieren zahlreiche Modelle der metabolischen Autoregulation sowie der NO-abhängigen Vasodilatation (Carlson et al. 2008).

Derartige – im Vergleich zur verwendeten Bateman-Funktion – komplexere nichtlineare Modelle erfordern verfeinerte Identifikations- bzw. Parameterschätz-Algorithmen, beispielsweise die Erweiterung des in dieser Arbeit verwendeten Gauss-Newton-Verfahrens durch eine Gradientensuche, wie sie beispielsweise im Levenberg-Marquardt-Algorithmus implementiert ist.

4.3.6. Validität von PORH/LDF im Hinblick auf die EDF

Unsere Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, dass die kinetischen Parameter k_a bzw. k_e , die den Zeitverlauf der PORH-Reaktion charakterisieren, keine signifikante Beeinflussung durch Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit über NTG-Gabe erfahren.

Die endotheliale Dysfunktion EDF wird in der Literatur vorherrschend als Verschiebung der Endothel-Reaktion in Richtung reduzierter Vasodilatation beschrieben (Endemann et al. 2004; Esper et al. 2006). Sie wird über die endothelvermittelte, NO-abhängige post-ischämische Vasodilatation, bezogen auf einen Basiswert, dargestellt. Als klassisches Bestimmungsverfahren gilt die FMD, wobei über Ultraschall-Verfahren an größeren Arterien (a. brachialis, a. radialis, a. femoralis) die postischämischen Durchmesseränderungen erfasst werden.

Die PORH/LDF hingegen bestimmt primär den Grad der Ausprägung der metabolischen Autoregulation in der kutanen Mikrozirkulation. Diese Autoregulation bewirkt nach Okklusion des zuführenden Gefäßes ein Absinken des Strömungswiderstandes in der Mikrozirkulation, in Folge der Anhäufung von lokalen Metaboliten, einem Abfall des O_2 -

Partialdrucks und einem Ansteige des CO₂-Partialdrucks sowie die Restitution des Strömungswiderstands zum Ausgangswert nach Wiederherstellung der Perfusion (siehe vorne).

Die PORH/LDF wird nur in geringem Maße – wie in dieser Arbeit gezeigt wurde – von der NO-abhängigen Vasodilatation beeinflusst. Die EDF nach der klassischen Definition (siehe oben) kann daher nicht direkt über die PORH/LDF charakterisiert werden.

Die PORH/LDF erfasst die autoregulatorische Kapazität der kutanen Mikrozirkulation und es stellt sich demzufolge die Frage, ob diese repräsentativ für die autoregulatorische Kapazität in anderen Gefäßgebieten angesehen werden kann.

Änderungen der retinalen Mikrozirkulation („retinal vessel analysis“ – RVA) hingegen wird in der Literatur hohe Relevanz für die EDF beigemessen (Patel 2010; Baumann et al. 2012)

Die Bedeutung der autoregulatorischen Kapazität als prognostischer Marker für kardiovaskuläre Erkrankungen muss durch weiterführende Untersuchungen an speziellen Patienten-Kollektiven (z.B. Diabetiker, Hypertoniker etc.) evaluiert werden. Ebenso sind zusätzliche Einflussfaktoren auf die PORH/LDF vonseiten experimenteller Randbedingungen (Alter, Hauttemperatur, weiblicher Zyklus etc.) und Lifestyle-Faktoren (Rauchen, Alkohol, Ernährungsgewohnheiten) abzuklären.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die PORH/LDF stellt ein einfach anzuwendendes, kostengünstiges, nichtinvasives und gut standardisierbares Verfahren zur Erfassung der autoregulatorischen Kapazität der kutanen Mikrozirkulation dar. Die experimentelle Methodik und Datenerfassung gestalten sich einfach und sind automatisierbar.

Die Modellierung über ein phänomenologisches Modell und die Schätzung der Modellparameter über Identifikationsverfahren lässt sich problemlos bewerkstelligen und liefert verlässliche Resultate.

Die PORH/LDF erfasst nicht die EDF im Sinne der klassischen Definition, sondern es wird die autoregulatorische Kapazität der kutanen Mikrozirkulation quantitativ beurteilt. Für die Anwendung als prognostisches Verfahren sind weiterführende Untersuchungen erforderlich, beispielsweise:

- Überprüfung der „Generalisierbarkeit“ der Reaktion der kutanen Mikrozirkulation auf andere Gefäßgebiete des Organismus
- Beeinflussung der PORH/LDF-Reaktion durch pathologische Prozesse oder Lifestyle-Faktoren
- Die Korrespondenz zwischen FMD und PORH/LDF in unterschiedlichen Patientengruppen.

Die PORH/LDF gestattet, funktionelle Einschränkungen der autoregulatorischen Kapazität zu quantifizieren und kann somit als diagnostisches und prognostisches Verfahren für Herz-Kreislauf-Erkrankungen einen wichtigen untersuchungstechnischen Meilenstein darstellen.

6. Literaturverzeichnis

- Al-Qaisi, M. et al., 2008. Measurement of endothelial function and its clinical utility for cardiovascular risk. *Vascular health and risk management*, 4(3), pp.647–52.
- Anderson, T J, 1999. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *Journal of the American College of Cardiology*, 34(3), pp.631–8.
- Arciero, J. et al., 2008. Theoretical model of metabolic blood flow regulation: roles of ATP release by red blood cells and conducted responses. *American Journal of Physiology*, 295(4), pp.1562-1571.
- Armstrong, P.W., Armstrong, J. a. & Marks, G.S., 1979. Blood levels after sublingual nitroglycerin. *Circulation*, 59(3), pp.585–588.
- Aversano, T., Ouyang, P & Silverman, H., 1991. Blockade of the ATP-sensitive potassium channel modulates reactive hyperemia in the canine coronary circulation. *Circulation research*, 69(3), pp.618–22.
- Baumann, R. & Schmiederl, R.E., 2012. Die Rolle der retinalen Mikrozirkulation in der Hypertonie. *Deutsche medizinische Wochenschrift*, 137, pp.2500–2504.
- Beaufort-Krol, G.C. et al., 1989. Postocclusive reactive hyperaemia of cutaneous blood flow in premature newborn infants. *Acta paediatrica Scandinavica. Supplement*, 360, pp.20–5.
- Beckman, J. a et al., 2003. Oral antioxidant therapy improves endothelial function in Type 1 but not Type 2 diabetes mellitus. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 285(6), pp.H2392–8.
- Bode-Böger, S.M., 2005. Effect of L-arginine supplementation on NO production in man. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 62(S1), pp.91–99.
- Bolton, C.H., 2001. Endothelial dysfunction in chronic renal failure: roles of lipoprotein oxidation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 16(6), pp.1189–1197.
- Brix, G., Zwick, S., Kiessling, F., & Griebel, J. (2009). Pharmacokinetic analysis of tissue microcirculation using nested models: Multimodel inference and parameter identifiability. *Medical Physiology*, 36(7), 2923–2933.
- Burnett, a L., 1997. Nitric oxide in the penis: physiology and pathology. *The Journal of urology*, 157(1), pp.320–4.
- Carlsson, B.Y.I., Sollevi, A.L.F. & Wennmalm, A.K.E., 1987. The Role of myogenic relaxation, adenosine and prostaglandins in human forearm reactive hyperemia. *Journal of Physiology*, 389, pp.147–161.
- Carlsson, I. & Wennmalm, A., 1983. Effect of different prostaglandin synthesis inhibitors on post-occlusive blood flow in human forearms. *Journal of Physiology*, 26, pp.241–251.

-
- Carlson, B.E., Arciero, J.C. & Secomb, T.W., 2008. Theoretical model of blood flow autoregulation: roles of myogenic, shear-dependent, and metabolic responses. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 295(4), pp.H1572–9.
- Cathrine, H. et al., 2009. What is the real physiological NO concentration in vivo. *Nitric Oxide*, 21(2), pp.92–103.
- Chong, W.C.F. et al., 2006. Comparison of flow characteristics and vascular reactivity of radial artery and long saphenous vein grafts. *Journal of cardiothoracic surgery*, 1, p.4.
- Cooke, J.P. & Dzau, V.J., 1997. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annual review of medicine*, 48, pp.489–509.
- Corretti, M.C. et al., 2002. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *Journal of the American College of Cardiology*, 39(2), pp.257–65.
- Cracowski, J.-L. et al., 2006. Methodological issues in the assessment of skin microvascular endothelial function in humans. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(9), pp.503–508.
- Dakak, N. et al., 1998. Contribution of Nitric Oxide to Reactive Hyperemia Impact of Endothelial Dysfunction. *Aging*, pp.9–15.
- Deanfield, John E, Halcox, J.P. & Rabelink, Ton J, 2007. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*, 115(10), pp.1285–95.
- Desk, R., Williams, L. & Health, K., 1986. Potentiation of nitroglycerin-induced dilatation by N-acetylcysteine. *Circulation*, 73(1), pp.138–142.
- DiStefano, J.J., 1982. Noncompartmental vs. compartmental analysis: some bases for choice. *American Journal of Physiology*, 243(1), pp.R1–R6.
- Donato, A.J. et al., 2009. Vascular endothelial dysfunction with aging: endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 297(1), pp.H425–32.
- Drexler, H. et al., 1989. Flow-dependent coronary artery dilatation in humans. *Circulation*, 80(3), pp.466–474.
- Echeverri, D. et al., 2010. Caffeine’s Vascular Mechanisms of Action. *International journal of vascular medicine*, 2010.
- Endemann, D.H. et al., 2004. Persistent remodeling of resistance arteries in type 2 diabetic patients on antihypertensive treatment. *Hypertension*, 43(2), pp.399–404.
- Endemann, D.H. & Schiffrin, E.L., 2004. Endothelial dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 15(8), pp.1983–92.
-

- Engelke, K.A. et al., 2012. Contribution of nitric oxide and prostaglandins to reactive hyperemia in the human forearm Contribution of nitric oxide and prostaglandins to reactive hyperemia in the human forearm. *Journal of Applied Physiology*, pp.1807–1814.
- Epstein, F. & Ross, R., 1999. *Atherosclerosis - An Inflammatory Disease*. New England Journal of Medicine, pp.115–126.
- Erusalimsky, J.D. & Moncada, S., 2007. Nitric oxide and mitochondrial signaling: from physiology to pathophysiology. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 27(12), pp.2524–31.
- Esper, R.J. et al., 2006. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovascular diabetology*, 5, p.4.
- Félétou, M. & Vanhoutte, P.M., 2006. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 291(3), pp.H985–1002.
- Francis, S., Blount, M. & Zoraghi, R., 2005. Molecular properties of mammalian proteins that interact with cGMP: protein kinases, cation channels, phosphodiesterases, and multi-drug anion transporters. *Front Biosci*, pp.2097–2117.
- Friebe, A. & Koesling, D., 2009. The function of NO-sensitive guanylyl cyclase: what we can learn from genetic mouse models. *Nitric oxide: biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*, 21(3-4), pp.149–56.
- Furchgott, F., 1989. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *The FASEB Journal*, 3, pp.2007–2018.
- Furchgott, R.F. & Zawadzki, J.V., 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288(5789), pp.373–376.
- Förstermann, U., 2006. Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal. *Biological Chemistry*, 387(12), pp.1521 – 1533.
- Förstermann, U. & Münzel, T., 2006. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*, 113(13), pp.1708–1714.
- Gabrielsson, J. & Weiner, D., 2007. *Pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis 4th ed.*, Stockholm: Apotekarsocieteten.
- Gao, Y., 2010. The multiple actions of NO. *Pflügers Archiv: European journal of physiology*, 459(6), pp.829–39.
- Gladtko, E., & Hattingberg, H. M. (1972). *Pharmakokinetik*. Berlin: Springer Verlag.
- Green, D., 2005. Point: Flow-mediated dilation does reflect nitric oxide-mediated endothelial function. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 99(3), pp.1233–1234; discussion 1237–1238.

-
- Guyton, A.C. & Hall, J.E., 2006. Textbook of Medical Physiology 11. Aufl., Philadelphia: Elsevier Inc.
- Halcox, J.P.J., 2002. Prognostic Value of Coronary Vascular Endothelial Dysfunction. *Circulation*, 106(6), pp.653–658.
- Hofman, F. et al., 2009. cGMP Regulated Protein Kinases (cGK). *Handbook of Experimental Pharmacology*, 191(1), pp.137–162.
- Holowatz, L. a, Thompson-Torgerson, C.S. & Kenney, W.L., 2008. The human cutaneous circulation as a model of generalized microvascular function. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md.: 1985), 105(1), pp.370–372.
- Ito, M. et al., 2004. Myosin phosphatase: structure, regulation and function. *Molecular and cellular biochemistry*, 259(1-2), pp.197–209.
- Jann, B., 2005. Einführung in die Statistik 2. Auflage., München: Oldenbourg Wissenschaftsverlag GmbH.
- Joannides, R. et al., 1995. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*, 91(5), pp.1314–1319.
- Jobgen, W.S. et al., 2006. Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. *The Journal of nutritional biochemistry*, 17(9), pp.571–588.
- Kaltenegger A, 2010. Acutronic MSG. Pulsoxymetrie & die Bedeutung der plethysmographischen Pulswelle. Available at: <http://www.acutronic-ms.at/> [Accessed November 2, 2011].
- Kanatsuka, H. et al., 1992. Microvascular sites and mechanisms responsible for reactive hyperemia in the coronary circulation of the beating canine heart. *Circulation research*, 71(4), pp.912–922.
- Karch, R., 2010. Medizinische Informatik - Kompartimentmodelle. , pp.7–28. Available at: <http://www.meduniwien.ac.at/user/rudolf.karch/ssm3/pkmodelle2010.pdf> [Accessed November 11, 2011].
- Karch, R., 2003. Pharmakokinetische Modelle: Skriptum zur Vorlesung. , pp.1–56. Available at: <http://www.meduniwien.ac.at/user/rudolf.karch/ssm3/pk.pdf> [Accessed November 11, 2011].
- Kharbanda, R K & Deanfield, J E, 2001. Functions of the healthy endothelium. *Coronary artery disease*, 12(6), pp.485–491.
- Kharbanda, Rajesh K et al., 2001. Heterogenous Nature of Flow-Mediated Dilatation in Human Relevance to Endothelial Dysfunction in Hypercholesterolemia. *Circulation Research*, pp.145–151.
-

- Kilbom, A. & Wennmalm, A., 1974. Prostaglandins and post-ischemic muscular vasodilation: effect of indomethacin on forearm blood flow after ischemia. *Int Res Commun.*, 2, p.1077.
- Kilbom, Å. & Wennmalm, Å., 1976. Endogenous prostaglandins as local regulators of blood flow in man: effect of indomethacin on reactive and functional hyperaemia. *The Journal of physiology*, 257, pp.109–121.
- Klabunde, R. E. (2012). *Cardiovascular Physiology Concepts* (2nd Editio.). Philadelphia: Wolters Kluwer.
- Klasinc, R., 2011. Post-okklusive reaktive Hyperämie: Erfassung und Quantifizierung der Reaktionsdynamik. Medizinische Universität Graz.
- Klinke, R. & Silbernagel, S., 2005. *Lehrbuch der Physiologie* 5th ed., Stuttgart: Thieme.
- Koch, H., & Ritschel, W. (1986). *Synopsis der Biopharmazie und Pharmakokinetik*. Landsberg, München: ecomed.
- Koller, A & Kaley, G, 1990. Role of endothelium in reactive dilation of skeletal muscle arterioles. *The American journal of physiology*, 259(5), pp.H1313–H1316.
- Koller, Akos, Sun, D. & Kaley, Gabor, 1993. Role of Shear Stress and Endothelial Prostaglandins in Flow- and Viscosity-Induced Dilation of Arterioles In Vitro. *Circulation Research*, 72(6), pp.1276–1284.
- Kooijman, M. et al., 2008. Flow-mediated dilatation in the superficial femoral artery is nitric oxide mediated in humans. *The Journal of physiology*, 586(4), pp.1137–1145.
- Kröger, K. & Gröchenig, E., 2007. *Nicht invasive Diagnostik angiologischer Krankheitsbilder*, ABW Wissenschaftsverlag GmbH.
- Krstic, R. V. (1991). *Human Microscopic Anatomy*. Berlin: Springer Verlag.
- Landmesser, U., 2002. Vascular Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction in Patients With Chronic Heart Failure: Role of Xanthine-Oxidase and Extracellular Superoxide Dismutase. *Circulation*, 106(24), pp.3073–3078.
- Laroux, F.S. et al., 2000. Role of nitric oxide in the regulation of acute and chronic inflammation. *Antioxidants and Redox Signaling*, 2(3), pp.391–396.
- Leal, J. et al., 2006. Economic burden of cardiovascular diseases in the enlarged European Union. *European heart journal*, 27(13), pp.1610–1619.
- Lerman, A., Burnett, J. C., Higano, S. T., McKinley, L. J., & Holmes, D. R. (1998). Long-term L-Arginine Supplementation Improves Small-Vessel Coronary Endothelial Function in Humans. *Circulation*, 97(21), 2123–2128.
- Lienert, G. A. (1961). *Testaufbau und Testanalyse* (3. Auflage.). Weinheim, Berlin, Basel: Verlag Julius Beltz.

- Lindert, J. et al., 2002. OPS imaging of human microcirculation: a short technical report. *Journal of vascular research*, 39(4), pp.368–372.
- Marieb, E.N. & Hoehn, K.N., 2010. *Anatomy & physiology 4th ed.* Pearson, ed., Upper Saddle River, NJ: Benjamin Cummings.
- Mathura, K.R. et al., 2001. Comparison of OPS imaging and conventional capillary microscopy to study the human microcirculation. *Journal of Applied Physiology*, 91, pp.74–78.
- McEniery, C.M. et al., 2006. Endothelial function is associated with pulse pressure, pulse wave velocity, and augmentation index in healthy humans. *Hypertension*, 48(4), pp.602–608.
- McEniery, C.M. et al., 2005. Normal vascular aging: differential effects on wave reflection and aortic pulse wave velocity: the Anglo-Cardiff Collaborative Trial (ACCT). *Journal of the American College of Cardiology*, 46(9), pp.1753–1760.
- Middleman, S. (1972). *Transport Phenomena in the Cardiovascular System.* New York: Wiley-Interscience.
- Mohler, E.R., 2013. Endothelial Dysfunction. , pp.1–15. Available at: http://www.uptodate.com/contents/endothelial-dysfunction?source=search_result&search=endothelial+dysfunction&selectedTitle=1~150 [Accessed June 12, 2013].
- Mutschler, E., 1991. *Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie* 6. Auflage., Wiss. Verl.-Ges.
- Niazi, S., 1979. *Textbook of Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics*, New York: Appleton-Century-Crofts.
- Panza, J.A. et al., 1990. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *New England Journal of Medicine*, 323(1), pp.22–27.
- Park, J B & Schiffrin, E L, 2001. Small artery remodeling is the most prevalent (earliest?) form of target organ damage in mild essential hypertension. *Journal of hypertension*, 19(5), pp.921–930.
- Park, J. & Charbonneau, F, 2001. Correlation of endothelial function in large and small arteries in human essential hypertension. *Journal of hypertension*, pp.415–420.
- Patel, S., 2010. Retinal Vessel Analysis: A novel approach to understanding vascular ocular disease? *Optometry today.* Available at: <http://www.optometry.co.uk/clinical/details?aid=716> [Accessed June 28, 2013].
- Pepine, C.J., 1998. Clinical implications of endothelial dysfunction. *Clinical cardiology*, 21(11), pp.795–799.
- Perimed, 2001. *PeriFlux System 5000 - Extended User Manual.* , p.23.
-

-
- Perimed, Perimed Theory Support. Available at: <http://www.perimed-instruments.com/support/theory/laser-doppler> [Accessed October 27, 2011].
- Pessenhofer, H. (2000). Modelle komplexer Systeme: Basis und Anwendungsbereiche. In Hinghofer-Szalkay (Ed.), *Physiologie an der Schwelle zum 21. Jahrhundert* (pp. 109–134). Wien, Heidelberg: Blackwell Wissenschaft Verlag.
- Pohl, U. et al., 1986. Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension*, 8(1), pp.37–44.
- Pohl, U. & Wit, C. De, 1999. A unique role of NO in the control of blood flow. *Physiology*, 14, pp.74–80.
- Pyke, K.E. & Tschakovsky, M.E., 2005. The relationship between shear stress and flow-mediated dilatation: implications for the assessment of endothelial function. *The Journal of physiology*, 568(Pt 2), pp.357–369.
- Quyyumi, a a, 1998. Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease. *The American journal of medicine*, 105(1A), p.32S–39S.
- Rafikov, R. et al., 2011. eNOS activation and NO function: Structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity. *The Journal of endocrinology*, 210(3), pp.271–284.
- Reiser, M. & Semmler, W., 2002. *Magnetresonanztomographie 3rd ed.*, Berlin Heidelberg: Springer.
- Remane, H. & Remane, Y., 2010. [The history of the discovery of nitroglycerin]. *Pharmazie in unserer Zeit*, 39(5), pp.340–344.
- Rettori, V. et al., 1992. Nitric oxide mediates norepinephrine-induced prostaglandin E2 release from the hypothalamus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(23), pp.11543–11546.
- Rizzoni, D. et al., 2001. Structural Alterations in Subcutaneous Small Arteries of Normotensive and Hypertensive Patients With. *Circulation*, 103, pp.1238–1244.
- Rubanyi, G., Romero, J. & Vanhoutte, P., 1986. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *The American journal of physiology*, 250(6), pp.1145–1149.
- Rudolph, T.K. et al., 2007. Acute effects of various fast-food meals on vascular function and cardiovascular disease risk markers: the Hamburg Burger Trial. *The American journal of clinical nutrition*, 86(2), pp.334–340.
- Schechter, A.N. & Gladwin, M.T., 2003. clinical implications of basic research Hemoglobin and the Paracrine and Endocrine Functions of Nitric Oxide. *Journal of Clinical Investigation*, pp.1483–1485.
- Schiffrin, Ernesto L et al., 2000. Correction of Arterial Structure and Endothelial Angiotensin Receptor Antagonist Losartan. *Circulation*, 101, pp.1653–1659.
-

- Schmidt, R. & Lang, F., 2007. Physiologie des Menschen 30. Aufl., Berlin Heidelberg: Springer Verlag.
- Schofield, I., 2002. Vascular Structural and Functional Changes in Type 2 Diabetes Mellitus: Evidence for the Roles of Abnormal Myogenic Responsiveness and Dyslipidemia. *Circulation*, 106(24), pp.3037–3043.
- Schächinger, V., Britten, M.B. & Zeiher, A.M., 2000. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation*, 101(16), pp.1899–1906.
- Shimbo, D. et al., 2010. Endothelial dysfunction and the risk of hypertension: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Hypertension*, 55(5), pp.1210–1216.
- Sidney, S., 1957. Nonparametric Statistics. *The American Statistician*, 11(3), pp.13–19.
- Silber, H. a et al., 2005. Why is flow-mediated dilation dependent on arterial size? Assessment of the shear stimulus using phase-contrast magnetic resonance imaging. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 288(2), pp.H822–828.
- Silverthorn, D.U., 2009. Physiologie 4. Aufl., München: Pearson Education.
- Smieško, V., Kož`ik, J. & Doležel, S., 1985. Role of endothelium in the control of arterial diameter by blood flow. *Journal of Vascular Research*, 22(5), pp.247–251.
- Sorensen, K.E. et al., 1995. Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *British heart journal*, 74(3), pp.247–253.
- Steeghs, N. et al., 2010. Reversibility of capillary density after discontinuation of bevacizumab treatment. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 21(5), pp.1100–1105.
- Stachowiak, H. (1973). Allgemeine Modelltheorie. Wien: Springer Verlag.
- Stachowiak, H. (1983). Modelle - Konstruktion der Wirklichkeit. München: Wilhelm Fink Verlag.
- Stoner, L. & Sabatier, M.J., 2012. Use of ultrasound for non-invasive assessment of flow-mediated dilation. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, 19(5), pp.407–421.
- Suwaidi, J.A. et al., 2000. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation*, 101(9), pp.948–954.
- Tagawa, T. et al., 1994. Role of nitric oxide in reactive hyperemia in human forearm vessels. *Circulation*, 90(5), pp.2285–2290.
- Thambyrajah, J. et al., 2000. Abnormalities of endothelial function in patients with predialysis renal failure. *Heart (British Cardiac Society)*, 83(2), pp.205–209.

- Toutouzas, K. et al., 2008. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and other endogenous nitric oxide synthase (NOS) inhibitors as an important cause of vascular insulin resistance. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*, 40(9), pp.655–659.
- Tschakovsky, M.E. & Pyke, K.E., 2005. Counterpoint: Flow-mediated dilation does not reflect nitric oxide-mediated endothelial function. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md.: 1985), 99(3), pp.1237–1238.
- Tschudi, M.R. et al., 1996. Rapid Publication Effect of Age on Kinetics of Nitric Oxide Release in Rat Aorta and Pulmonary Artery. *Society*, 98(4), pp.899–905.
- Tukey, J.W., 1977. *Exploratory data analysis* 1st Ed., Wesley Addison.
- Tuttle, J.L. et al., 2001. Shear level influences resistance artery remodeling: wall dimensions, cell density, and eNOS expression. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 281(3), pp.H1380–1389.
- WHO, 2011. *Global atlas on cardiovascular disease prevention and control*.
- Weber, T. et al., 2008. Pulswellengeschwindigkeit, zentraler Blutdruck und Augmentationsindex - “neue” Parameter zur Beschreibung eines Endorganschadens der arteriellen Strombahn bei Hypertonie. *Austrian Journal of Hypertension*, 12(1), pp.7–13.
- Weiß, C., 2010. *Basiswissen Medizinische Statistik* 5. Aufl., Heidelberg: Springer Verlag.
- Wever, R.M.F. et al., 1998. Atherosclerosis and the Two Faces of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Circulation*, 97(1), pp.108–112.
- Widlansky, M.E. et al., 2003. The clinical implications of endothelial dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology*, 42(7), pp.1149–1160.
- Wiesmann, F. et al., 2004. Global impairment of brachial, carotid, and aortic vascular function in young smokers: direct quantification by high-resolution magnetic resonance imaging. *Journal of the American College of Cardiology*, 44(10), pp.2056–2064.
- Wong, B.J. et al., 2003. Nitric oxide synthase inhibition does not alter the reactive hyperemic response in the cutaneous circulation. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985), 95(2), pp.504–510.
- Yakuri to, C., 1985. *Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier, 13, p.3649.
- Yildiz, A. et al., 2003. Left ventricular hypertrophy and endothelial dysfunction in chronic hemodialysis patients. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation*, 41(3), pp.616–623.
- Zaheditochai, M., Jaafar, R. & Zahedi, E., 2009. Noninvasive Techniques for Assessing the Endothelial Dysfunction: Ultrasound Versus Photoplethysmography. *IFBME*, 23, pp.65–68.

- Zhang, S., Day, I. & Ye, S., 2001. Nicotine induced changes in gene expression by human coronary artery endothelial cells. *Atherosclerosis*, 154(2), pp.277–283.
- Ziegler, M. & Distasi, M., 2010. Marvels, mysteries, and misconceptions of vascular compensation to peripheral artery occlusion. *Microcirculation*, 17(1), pp.3–20.
- Černý, V., Turek, Z. & Pařízková, R., 2007. Orthogonal polarization spectral imaging. *Physiol. Res*, 56, pp.141–147.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verteilung der Todesursachen im Jahre 2008	1
Abbildung 2: Darstellung der Wandschichten einer muskulären Arterie.	2
Abbildung 3: Präsynaptische Modulation der Noradrenalinfreisetzung	4
Abbildung 4: Passive und aktive Antwort der Gefäßmuskulatur auf Dehnung	6
Abbildung 5: Metabolische Autoregulation (schematisch).....	8
Abbildung 6: Schematische Darstellung des endothelialen L-Arginin-Pathways	10
Abbildung 7: Mechanismus der NO-abhängigen Vasodilatation in der glatten Muskelzelle.....	12
Abbildung 8: Effekt der flussvermittelten NO-Bildung auf die myogene Vasokonstriktion	12
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Scherung	13
Abbildung 10: Darstellung des Geschwindigkeitsprofils und der Schubspannung bei laminarer Strömung	14
Abbildung 11: Molekularer Mechanismus der flussvermittelten NO-Bildung.....	15
Abbildung 12: Ursache und Auswirkung der EDF.....	17
Abbildung 13: Chemische Strukturformel von Glyceroltrinitrat	18
Abbildung 14: Vereinfachter eNOS-NO-Pathway.....	19
Abbildung 15: Effekt der altersabhängigen Veränderung der Pulswellengeschwindigkeit	20
Abbildung 16: Mechanismus der FMD als Funktion der Zeit	22
Abbildung 17: MRT der a. brachialis (sagittal) nach proximaler Okklusion am Unterarm	23
Abbildung 18: Ultraschallbild der Brachialarterie (longitudinal)	24
Abbildung 19: Position der Manschette und des Ultraschallkopfes bei der US/FMD	24
Abbildung 20: Kurvenverlauf der PORH; am Beispiel einer Einzelkapillare	25
Abbildung 21: Prinzip der Lichtabsorption durch Blutvolumenveränderung bei der OPG	26
Abbildung 22: Schematische Darstellung einer LDF-Mesung.....	27
Abbildung 23: Charakteristik einer LDF-Messung	28
Abbildung 24: Prozesse in der Pharmakokinetik.....	29
Abbildung 25: Massenbilanz-Ansatz in einem Kompartiment-Modell.....	29
Abbildung 26: 2-Kompartiment-Modell	30

Abbildung 27: Bateman-Funktion	31
Abbildung 28: Non-Kompartment-Modell.....	32
Abbildung 29: Blockdiagramm und Zuordnung des Zwei-Kompartment-Modells	33
Abbildung 30: Screenshot des Resultats der Sample-Size-Abschätzung.....	35
Abbildung 31: Lage der pneumatischen Manschette und der LDF-Sonde	37
Abbildung 32: Versuchsablauf zur Erfassung der Normalreaktion.....	38
Abbildung 33: Versuchsablauf zur Erfassung der PORH bei erhöhter NO-Verfügbarkeit	38
Abbildung 34: PeriFlux® 5000	39
Abbildung 35: Critikon DINAMAPT™ PRO Series 100 V2.....	40
Abbildung 36: Screenshot einer Messung	41
Abbildung 37: Prozess der Datenverarbeitung	42
Abbildung 38: Darstellung einer Modellanpassung	44
Abbildung 39: Beispiel eines Box-Whisker-Plots.....	46
Abbildung 40: Einzelbeispiel der Durchblutungsreaktion während eines gesamten Messzyklus.	47
Abbildung 41: Einzelbeispiel einer PORH (normiert und geglättet).	48
Abbildung 42: Anpassung der Bateman-Funktion an experimentelle Durchblutungsdaten – Beispiel einer guten Anpassung.....	49
Abbildung 43: Anpassung der Bateman-Funktion an experimentelle Durchblutungsdaten – Beispiel einer mangelhaften Anpassung.	49
Abbildung 44: Vergleich zweier Einzelmessungen nach Modellanpassung einer PORH vor und nach der Gabe von 0,8mg NTG.	50
Abbildung 45: Gegenüberstellung der PORH-Maxima ohne NTG und mit NTG.....	52
Abbildung 46: Vergleich der Reaktionsdauer bis zum Maximum ohne und mit NTG.	53
Abbildung 47: Gegenüberstellung der Invasionskonstante k_a ohne Glyceroltrinitrat (NTG) und mit NTG	56
Abbildung 48: Vergleich der Eliminationskonstanten k_e ohne Glyceroltrinitrat (NTG) und mit NTG	57
Abbildung 49: Gegenüberstellung der normierten AUCs ohne NTG und mit NTG.....	58
Abbildung 50: Vergleich der absoluten (nicht normierten) AUCs vor und nach der Gabe von NTG	59
Abbildung 51: Boxplot des systolischen Blutdruckes	62

Abbildung 52: Boxplot des diastolischen Blutdruckes.....	62
Abbildung 53: Boxplot der Herzfrequenz	63
Abbildung 54: Vergleich PORH unter Einfluss von L-NMMA.....	67
Abbildung 55: Direktvergleich der Basiswerte.....	69
Abbildung 56: Darstellung der normierten Gesamtreaktion einer FMD und einer PORH	70
Abbildung 57: Boxplot der Invasionskonstante k_a nach 10-minütiger Okklusionsdauer und 5-minütiger Okklusionsdauer	72
Abbildung 58: Boxplot der Eliminationskonstante k_e nach 10-minütiger Okklusionsdauer und 5-minütiger Okklusionsdauer	72
Abbildung 59: Boxplot der normierten AUC nach 10-minütiger Okklusionsdauer und 5-minütiger Okklusionsdauer	73
Abbildung 60: Beispiel nicht normierter Reaktionsunterschiede bei einer Okklusionsdauer von 10 Minuten und 5 Minuten	73
Abbildung 61: Boxplot der Residuen: Residuen vor NTG (Res ohne) und Res nach NTG (Res NTG)	75
Abbildung 62: F_{xd}/V_d	77
Abbildung 63: Vergleich PORH und NO-Release aus Aorta	79
Abbildung 64:Anordnung der Strömungswiderstände.....	80
Abbildung 65: Zusammenhang k_e und AUC ohne NTG	81

8. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Morphologischer Aufbau der Gefäße	2
Tab. 2: Endotheliale Faktoren für die Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase	8
Tab. 3: Faktoren zur NO-Stimulation.....	15
Tab. 4: Risikofaktoren, welche mit eingeschränkter endothelabhängiger Vasodilatation einhergehen.....	16
Tab. 5: Nitrate und deren Wirkung; modifiziert nach	18
Tab. 6: Anthropometrische Daten der Versuchspersonen	36
Tab. 7: Statistische Kenngrößen bei einem Box-Whisker-Plot.....	46
Tab. 8: Globale Kenngrößen der PORH.....	50
Tab. 9: Gesamtliste der globalen PORH-Kenngrößen.....	51
Tab. 10: Kinetische Kenngrößen der PORH.....	53
Tab. 11: Gesamtliste der kinetischen Kenngrößen.....	54
Tab. 12: Gesamtliste der Herzfrequenzen [1/min].....	60
Tab. 13: Gesamtliste des systolischen Blutdruckes [mmHg].....	60
Tab. 14: Gesamtliste des diastolischen Blutdruckes [mmHg]	61
Tab. 15: Gesamtliste der Irrtumswahrscheinlichkeiten.....	63
Tab. 16: Zusammenfassung der Ergebnisse	64
Tab. 17: Einflussfaktoren und Auswirkung auf die PORH	67
Tab. 18: Pharmakokinetische Parameter der PORH und des NO-Release	78

9. Anhang

9.1. Listing der Matlab-Routine zur nichtlinearen Regression

```
function [] = bateman()
%BATEMAN Fit einer Bateman-Funktion
%   Nichtlineare Regression zur Schaetzung der Modellparameter:
%   a(1) = F*D/Vd
%   a(2) = ka
%   a(3) = ke

%Einlesen der Daten*****

data = xlsread ('Excel Data File.xls', 'Filename')

t=data(:,1)'
Cp=data(:,2)'

%Fitting Programm*****

randn('state',1);

f_fit=inline(' (a(1)*a(2)/(a(2)-a(3))).*(exp(-a(3).*t)-exp(-a(2).*t))', ...
            'a', 't');

a0 = [3 1 0.1]; % Startwerte
options = optimset(@lsqcurvefit);
options = optimset(options, 'LargeScale', 'off');

[a, resnorm] = lsqcurvefit( f_fit, a0, t, Cp, [], [], options )

xm = linspace(0, max(t), 150);
ym = f_fit(a, xm);

%AUC*****

x = linspace(0, 2500, 2500);
y = f_fit(a, x);
AUC=trapz(x,y)
AUCm=trapz(xm,ym)

%Graph*****

plot( t, Cp, 'or', x, y, '-b', ...
      'Linewidth', 1.4, ...
      'Markersize', 4, ...
      'MarkerFaceColor', 'r');
grid on;
axis([0 50 0 1.2]);
xlabel('t [s]', 'FontSize', 18);
ylabel('Cp', 'FontSize', 18);
title('Filename', 'FontSize', 18);

end
```