

Diplomarbeit

**Post-okklusive reaktive Hyperämie: Erfassung und
Quantifizierung der Reaktionsdynamik**

eingereicht von

Romana Klasinc

Matr. Nr. : 0213427

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktorin der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Institut für Physiologie

Unter der Anleitung von

Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Herfried Pessenhofer

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am

Unterschrift

1	EINLEITUNG	9
1.1	Begriffsdefinition	9
1.1.1	Reaktive Hyperämie	9
1.1.2	Flow mediated dilatation	12
1.1.3	Endotheliale Dysfunktion	12
1.2	Regulation des Gefäßtonus	15
1.2.1	Regulation des Gefäßwiderstandes durch myogene und metabolische Faktoren	16
1.2.2	Durchblutungssteuerung durch das Nervensystem	16
1.2.3	Beeinflussung der Durchblutung durch Hormone	17
1.2.4	Beteiligung des Endothels an der lokalen Durchblutungsreaktion	18
1.3	Funktion des Endothels	19
1.3.1	Stickstoffmonoxid (NO)	20
1.3.2	Prostacyclin	23
1.3.3	EDHF	24
1.3.4	Endothelium-derived contracting factors (EDCFs)	26
1.4	Diagnostik der Endothelfunktion	31
1.4.1	Dysfunktion des Endothels als prognostischer Faktor zur kardiovaskulären Risikoeinschätzung	31
1.4.2	Möglichkeiten zur Erfassung der Endothelfunktion – bisher herangezogene Messgrößen	32
1.5	Ziel der Diplomarbeit	41
2	MATERIAL UND METHODEN	42
2.1	Versuchs-Kollektiv	42
2.2	Experimentelle Randbedingungen	42
2.3	Verwendete Messgeräte/-Systeme	44
2.4	Methoden zur Datenerfassung	45
2.5	Bestimmung der Parameter bei PORH	48
2.6	Normierung der Daten vor Modellanpassung	49

2.7	Datenanalyse/Signalanalyse	49
2.7.1	Kompartiment-Modell	50
2.7.2	Nicht-Kompartiment-Modell	52
2.8	Statistische Auswertung/ Gegenüberstellung	54
3	ERGEBNISSE	56
3.1	Beispiele von Einzelergebnissen	56
3.2	Gruppenergebnisse	58
3.2.1	Parameter der PORH	58
3.2.2	Ergebnisse der pharmakokinetischen Datenanalyse im Kompartiment- und im Nicht-Kompartiment-Modell	59
3.3	Statistische Analyse	63
3.3.1	Box-Whiskers-Plot	64
3.3.2	Gegenüberstellung von LDF und OPG	65
3.3.3	Gegenüberstellung Kompartiment- und Nicht-Kompartiment-Modell	69
4	DISKUSSION	71
4.1	Diskussion der Fragestellung	71
4.2	Diskussion der Methodik	72
4.3	Diskussion der Ergebnisse	74
5	ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNGEN	79
	LITERATURVERZEICHNIS	80

Abkürzungen und deren Erklärung

ACH	Acetylcholin
CM	compartment model (Kompartiment-Modell)
ED	Endotheldysfunktion
EDCF	endothelium-derived contracting factor
EDHF	endothelium-derived hyperpolarizing factor
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FMD	flow mediated dilatation
HWZ	Halbwertszeit
k_a	Resorptionskonstante
k_e	Eliminationskonstante
KHK	koronare Herzkrankheit
LDF	Laser-Doppler-Flowmetrie
L-NMMA	L-N ^G -Monomethyl-Arginin
NA	Noradrenalin
NCM	non-compartment model (Nicht-Kompartiment-Modell)
NO	Stickstoffmonoxid
OPG	optische Plethysmographie
PAT	periphere arterielle Tonometrie
PGI ₂	Prostacyclin
PK	pharmakokinetisch
PORH	postokklusive reaktive Hyperämie
PWA	Pulswellenamplitude
RH	reaktive Hyperämie
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffverbindungen)
US	Ultraschall

Zusammenfassung

Eine Störung der Endothelfunktion spielt eine zentrale Rolle bei der Atherogenese und geht morphologischen Gefäßveränderungen voraus. Daher ist eine frühzeitige Diagnose einer endothelialen Dysfunktion für die Abschätzung des kardiovaskulären Risikos von hoher Bedeutung. Die postokklusive reaktive Hyperämie (PORH) und die damit verknüpfte Erfassung der „flow mediated dilatation“ mittels bildgebender Ultraschall-Verfahren gilt dafür als Standard-Methode, sie besitzt jedoch ökonomischer Nachteile aufgrund hoher Investitionskosten und der Bindung von Humanressourcen.

In der Arbeit wurden zwei nichtinvasive Messverfahren, die optische Plethysmographie (OPG) und die Laser-Doppler-Flowmetrie (LDF) verbunden mit einer modellorientierten Auswertung über pharmakokinetische Modelle hinsichtlich der Eignung zur Quantifizierung der PORH-Dynamik untersucht. Bei 20 Versuchspersonen beiderlei Geschlechts wurde die PORH-Reaktion durch 10-minütigen suprasystolischen Stau und nachfolgendes Lösen der Okklusion provoziert, die physiologische Reaktion wurde durch eine LDF-Sonde (Periflux 5000) an der Innenseite des Unterarms und einen OPG-Aufnehmer am Mittelfinger (Infrarot-Clip – Eigenentwicklung) erfasst. Offline wurden nach Vorfilterung, ROI-Auswahl und Normierung der Daten, pharmakokinetische Modelle (sowohl ein Kompartiment-Modell als auch ein Nichtkompartiment-Modell) an die PORH-Reaktionen angepasst und die Modellparameter berechnet.

Die Parameter im Kompartiment-Ansatz waren bei der Absorptions-/Invasionskonstanten k_a (charakterisiert die Aktivierungsphase) signifikant unterschiedlich (LDF: $k_a = 0,075 \text{ s}^{-1}$, OPG: $k_a = 0,139 \text{ s}^{-1}$), die Eliminationskonstanten k_e (charakterisieren die Restitutionsphase) zeigten keine signifikanten Unterschiede (LDF: $k_e = 0,0138 \text{ s}^{-1}$; OPG: $k_e = 0,0187 \text{ s}^{-1}$). Die Auswertung über den Nichtkompartiment-Ansatz ergab bei den Eliminations-Halbwertszeiten signifikante Differenzen (LDF: $t_{1/2} = 68,61 \text{ s}$, OPG: $t_{1/2} = 30,63 \text{ s}$).

Bei der modellorientierten Auswertung war der Kompartiment-Ansatz dem Nichtkompartiment-Ansatz hinsichtlich Robustheit deutlich überlegen. Die Unterschiede des Parameters k_a bei LDF bzw. OPG sind darauf zurückzuführen, dass LDF die Reaktion in der Mikrozirkulation abbildet (größere Zeitverzögerung), OPG erfasst die Reaktion in größeren Gefäßen, daher ist k_a kleiner. Ein Vergleich der Reaktionsdynamik mit der Kinetik von NO (aus Literaturdaten) erbrachte hierfür erheblich größere k_a - und k_e -Werte als bei der von uns ermittelte PORH-Dynamik. Daher kann der NO-Mechanismus nur einen Teil der Reaktion in der Aktivierungsphase darstellen.

Beide Methoden zur Signalerfassung und die modellorientierte Auswertung über pharmakokinetische Modelle stellen einfache, gute und ökonomische Verfahren zur Erfassung und Quantifizierung der PORH-Dynamik dar.

Abstract

Endothelial dysfunction plays a central role in the development of atherosclerosis and appears before morphological changes of the vessel wall are visible. The early diagnosis of endothelial dysfunction is therefore important to assess cardiovascular risk. Post-occlusive reactive hyperemia (PORH) assessed by Flow mediated dilatation (FMD) of the brachial artery using a high-resolution ultrasound is currently the standard for noninvasive measurement of endothelial function. However, the technically challenging performance and the need of investigators with appropriate training represent economic disadvantages of this method.

In our study two different methods for noninvasive assessment of endothelial function are compared: The optic plethysmography (OPG) and the laser-doppler-flowmetry (LDF). Both methods were linked to a model-associated evaluation, using pharmacokinetic models to quantify the dynamic of the PORH-reaction. 20 subjects (male and female) participated in the study. PORH was achieved after supra-systolic occlusion-time of 10 minutes followed by the release of that occlusion. The measurement of the perfusion-flow was done using LDF with an integrating probe (Periflux 5000) placed on the inner surface of the forearm and OPG with a finger probe (Infrared-clip, in-house development) placed on the middle finger of each subject's hand. The adaptation to pharmacokinetic models (using both a compartmental- and a non-compartmental approach) followed offline, after pre-filtering, ROI-selection and standardization.

The parameters using the compartmental-approach showed significant different results regarding the absorption/invasion rate constant k_a (phase of activation, LDF: $k_a = 0,075 \text{ s}^{-1}$, OPG: $k_a = 0,139 \text{ s}^{-1}$), the elimination rate constant k_e (phase of restitution) showed comparable results (LDF: $k_e = 0,0138 \text{ s}^{-1}$; OPG: $k_e = 0,0187 \text{ s}^{-1}$). The evaluation using the non-compartmental-approach showed significant different results regarding the elimination half-life (LDF: $t_{1/2} = 68,61 \text{ s}$, OPG: $t_{1/2} = 30,63 \text{ s}$).

In terms of robustness the compartmental- approach was superior to the non-compartmental-approach. The differences in k_a using LDF or OPG could be explained during to the different measurement-sites of the two systems. The LDF displays the reaction measured in the microcirculatory system (major time-delay), the OPG measures in larger vessels, resulting in a smaller k_a . In comparison to our measurements the pharmacokinetic data characteristic for NO (what was obtained from literature) showed significantly larger k_a and k_e values. In this regard NO represents only a part (most likely the initial stimulus) of the mechanisms involved in the FMD.

Both methods for signal acquisition and the model-associated evaluation using pharmacokinetic models represent simple, good and economic techniques for acquisition and quantification of the PORH dynamics.

1 Einleitung

1.1 Begriffsdefinition

1.1.1 Reaktive Hyperämie

Unter dem Begriff Reaktive Hyperämie (hyper-, über normal; (h)aima, Blut) versteht man die Durchblutungssteigerung eines Gewebes im Anschluss an eine Unterbrechung oder starke Einschränkung seiner Blutzufuhr (1).

In den Lehrbüchern der Physiologie werden ihre Ursachen überwiegend als Folge einer Dilatation der Blutgefäße aufgrund lokaler Metabolitenanhäufung und des Sauerstoffpartialdruck-Abfalls beschrieben (2), wobei aber auch die Gefäßwand bzw. ihre innerste Schicht, das Endothel, und die darauf einwirkenden Scherkräfte grundlegend daran beteiligt sind (3; 4). Eine vereinfachte Darstellung der bei der reaktiven Hyperämie (RH) beteiligten Mechanismen ist in Abbildung 1 veranschaulicht.

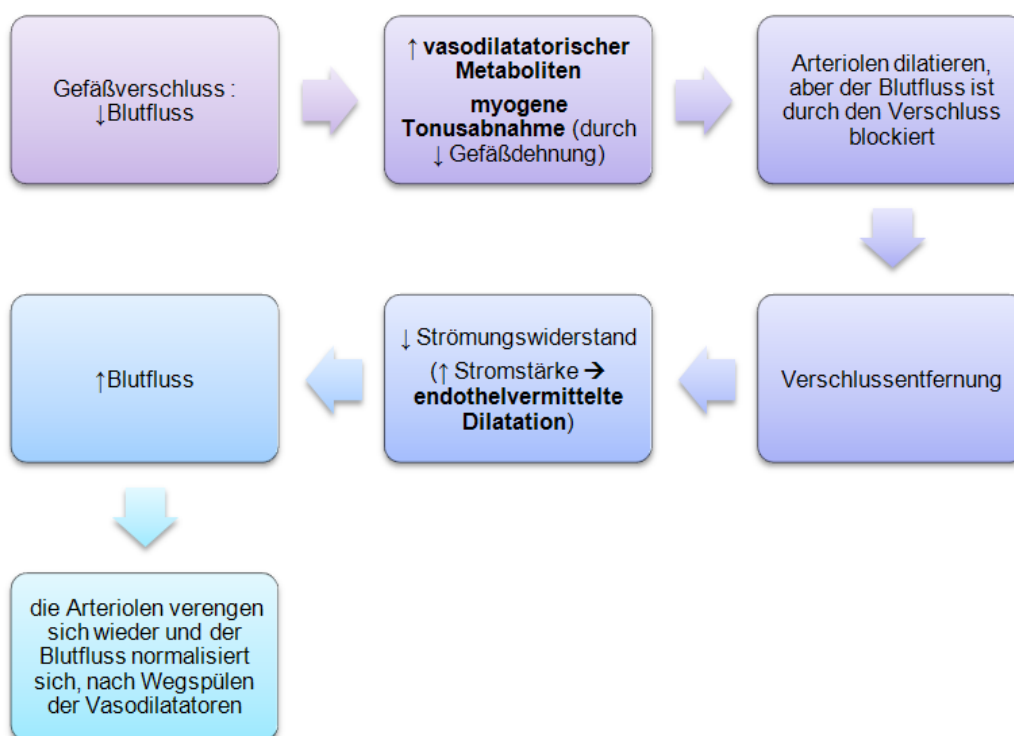


Abbildung 1: An der RH beteiligte Mechanismen; Modifiziert nach (1)

Die Messung der RH erfolgt in der Regel nach einer mehrere Minuten dauernden suprasystolischen Stauung am Oberarm. Während der Okklusion stagniert die

Zirkulation fast komplett, wobei es nach entfernen der Stauungsursache bei einer gesunden Person zu einem steilen Anstieg der Durchblutung bzw. zu einer RH kommt (siehe Abb. 2). Da sich der Ausdruck der reaktiven Hyperämie auf den Zustand nach einem Gefäßverschluss bezieht, wird synonym die Bezeichnung „postokklusive reaktive Hyperämie“ (PORH, engl. „post occlusive hyperemia“ oder „post-ischemic hyperemia“) verwendet.

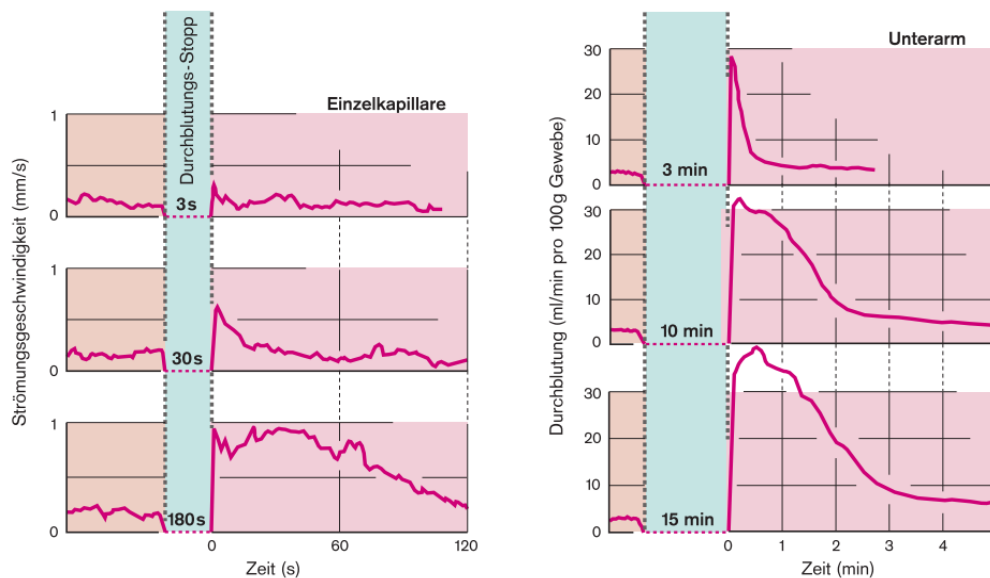


Abbildung 2: Ablaufform der RH – Ruhedurchblutung → Durchblutungs-Stopp → reaktive Hyperämie
Strömungsgeschwindigkeit in einer einzelnen Kapillare nach Durchblutungs-Stopp unterschiedlicher Dauer (links); Durchblutung des menschlichen Unterarms nach Unterbrechung durch Aufblasen einer Blutdruckmanschette am Oberarm (rechts). Mit steigender Ischämiedauer nehmen Dauer und Ausmaß der postokklusiven Mehrdurchblutung zu. (2)

Der Begriff der postokklusiven reaktive Hyperämie (PORH) hat sich für die Mehrdurchblutung nach arterieller Drosselung eingebürgert, es handelt sich dabei nicht nur um eine gesteigerte Blutfülle, sondern auch um ein erhöhtes Zeitvolumen (Blutfluss) und eine damit verbundene Vasodilatation. Die Beziehung zwischen Gefäßradius (r) und Blutfluss (Q) wird durch das Hagen-Poiseuille-Gesetz ersichtlich:

$$Q = \frac{\pi}{8 \cdot \eta} \cdot \frac{r^4 \cdot \Delta P}{l}$$

Der Blutfluss ist direkt proportional zur Druckdifferenz (ΔP) sowie zur 4. Potenz des Gefäßradius und indirekt proportional zur Viskosität (η) der strömenden Flüssigkeit wie auch zur Länge des Gefäßes (l). Bei gegebener Druckdifferenz wird der Blutfluss also vor allem vom Gefäßradius bestimmt und die glatte

Muskulatur erhält mit der Regulierung des Gefäßquerschnitts eine dominierende Bedeutung für die Regulation der Durchblutung. Diese Gesetzmäßigkeiten gelten aber nur für Newtonsche Flüssigkeiten und sind auf die Strömung des Blutes nur eingeschränkt anwendbar. Die Viskosität des Blutes ist im Gegensatz zu Newtonschen Flüssigkeiten keine konstante Materialeigenschaft, sondern ist von der Größe der einwirkenden Schubspannung (Scherspannung) abhängig (2).

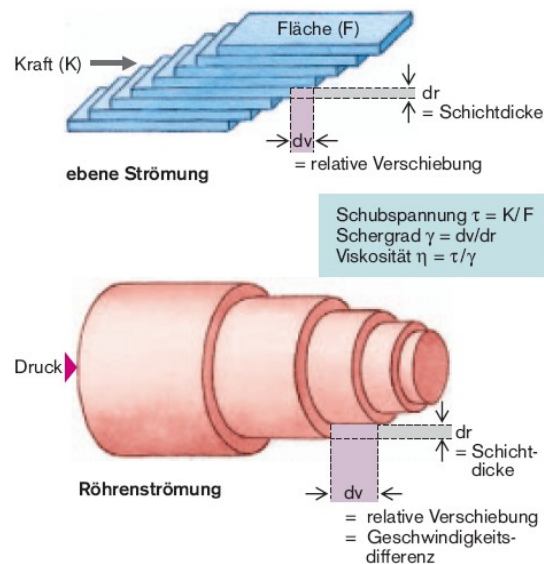


Abbildung 3: Definition der Schubspannung und des Schergrades in der ebenen Strömung (oben) bzw. der Röhrenströmung (unten) (2); Flüssigkeiten haben anhand ihrer Beschaffenheit eine bestimmte, temperaturabhängige innere Reibung oder Viskosität ($\eta \rightarrow$ Koeffizient der Viskosität); es besteht eine lineare Beziehung zwischen Schubspannung und Schergrad ($\tau = \eta \cdot \gamma$); bei Röhrenströmung wird zur Errechnung des Schergrades die Schichtdicke durch die radiale Koordinate eines zylindrischen Rohres ersetzt

Die Scherspannung (shearing stress) ist das Verhältnis zwischen der Fläche (F) der sich gegenseitig berührenden Schichten und der Kraft (K), die das Vorbeigleiten entgegen der Reibungskraft bewirkt (siehe Abb.3).

$$\tau = K/F = \eta \cdot \frac{dv}{dr}$$

Sie ist auch die in Längsrichtung auf die Gefäßwand wirkende Kraft pro Einheit der inneren Rohroberfläche. Ein erhöhter Blutfluss, welcher nach der Verschlussentfernung bei der RH erreicht wird, geht mit einer erhöhten Scherspannung einher, welche das Endothel zur Freisetzung vasoaktiver Substanzen stimulieren soll (3; 5-7) Zit. nach (4). Weitere Mechanismen, die Funktion des Endothels und Substanzen, welche bei der Durchblutungsregulation beteiligt sein sollen, werden in den folgenden Kapiteln (1.2, 1.3) besprochen.

1.1.2 Flow mediated dilatation

Da es aufgrund eines erhöhten Blutflusses im Gefäß zu einer Dilatation desselben kommt, bezeichnet man dies als „flußvermittelte Vasodilatation“. Dieses Phänomen ist im englischsprachigen Raum als „flow-mediated dilatation“ (FMD) bekannt. Diese Vasodilatation, welche mit der PORH einhergeht, lässt sich auf eine einfache, nichtinvasive Art an peripheren Gefäßen (z.B. a. brachialis, a. radialis) mittels eines Ultraschall-Systems messen und kann gleichzeitig als prognostischer Marker für die Beurteilung der Endothelfunktion und damit des Atheroskleroserisikos herangezogen werden (8).

Aufgrund vieler unterschiedlicher Studienergebnisse wird postuliert, dass bei der FMD unterschiedliche Mechanismen miteinander interagieren, wobei nach einigen Autoren Stickstoffmonoxid (NO) eine zentrale Rolle dabei einnehmen soll. Eine hypothetische Darstellung des FMD-Mechanismus siehe Abb. 4 (4).

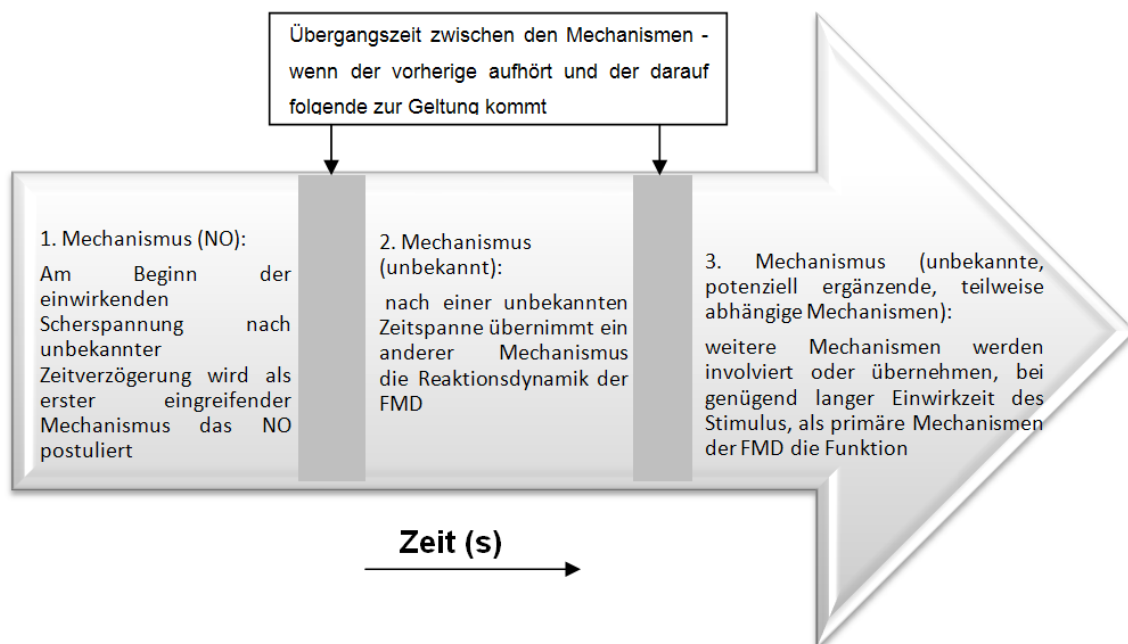


Abbildung 4: Hypothetische schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der an der FMD beteiligten Mechanismen; Bei längerem Einwirken der Scherspannung können die ursprünglich bei der FMD verantwortlichen Mechanismen in andere übergehen. Der zeitliche Ablauf dieser Vorgänge ist derzeit nicht bekannt, es ist auch unbekannt wie viele Mechanismen als Antwort auf einen Stimulus beteiligt sind. Modifiziert nach (4).

1.1.3 Endotheliale Dysfunktion

Das Endothel besteht aus einer Schicht von länglichen, platten Endothelzellen. Es ist die innerste Schicht der Gefäßwandung und bildet eine regulierbare Barriere zwischen Intravasalraum und Gefäßwand. Die Endothelzellen sezernieren

vasoaktive Substanzen, welche unter anderem die endotheliale Tonusmodulation vermitteln. Wenn es zu Unregelmäßigkeiten in der Ausscheidung dieser Substanzen und den darauffolgenden Regulationsmechanismen kommt, spricht man von einer Endotheldysfunktion (ED). Definitionsgemäß handelt es sich um ein gestörtes Gleichgewicht zwischen vasodilatatorisch und vasokonstriktorisch wirksamen Substanzen, die von den Endothelzellen produziert werden (9). Dabei kommt es zu einer verminderten vasodilatatorischen Reaktion der Gefäßwand auf einen endothelabhängigen Vasodilatator (z.B. Acetylcholin, Bradykinin) oder zu einer reduzierten flussvermittelten Vasodilatation im Rahmen einer PORH, die invasiv in den Herzkranzgefäßen durch Infusion endothelabhängiger Faktoren oder nichtinvasiv als FMD an den peripheren Gefäßen der Extremitäten bestimmt werden kann.

Das Endothel ist aber nicht nur an der Tonusmodulation der Gefäßwand, sondern auch grundsätzlich an der vaskulären Homöostase beteiligt (siehe Kap. 1.3). Eine gestörte Funktion des Endothels wird als Vorstufe der Atherosklerose angesehen und geht den ersten morphologisch sichtbaren Veränderungen der Gefäßwand voraus (10). Die ED ist aber auch in späten Stadien der koronaren Herzkrankheit (KHK) an der Entwicklung von kardiovaskulären Ereignissen beteiligt. Eine Dysfunktion des Endothels fördert unter anderem aufgrund seiner verringerten antientzündlichen und antioxidativen Eigenschaften sowie infolge seiner gesteigerten Vasokonstriktion die Destabilisierung und Erosion von atherosklerotischen Plaques (11).

In einigen Studien konnte der Zusammenhang zwischen endothelialer Dysfunktion und späten kardiovaskulären Ereignissen dargelegt werden (12-14).

Zusammenfassend führen demnach kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, erhöhtes LDL, Rauchen und Hypertonie zu einer ED, welche anhand einer gestörten vaskulären Homöostase neben einer reduzierten Vasodilatation auch prokoagulatorische und proinflammatorische Eigenschaften des Endothels sowie die Proliferation der Arterienwand fördert. Dadurch kommt es wiederum zur Entwicklung, Fortschreiten und klinischer Manifestation der Atherosklerose (siehe Abb. 5).

Anhand dessen dient die Messung der Endothelfunktion als wichtiger prognostischer Marker zur Einschätzung des kardiovaskulären Risikos sowie als hilfreiches Mittel zur weiteren Erforschung der Atherosklerose.

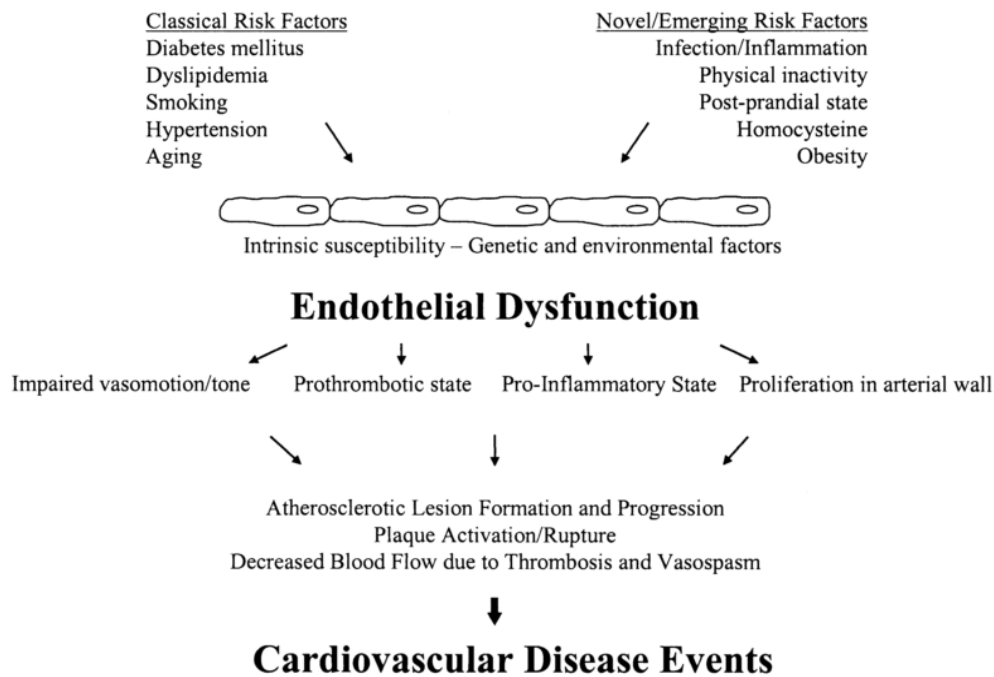


Abbildung 5: Die Rolle der ED in der Pathogenese von kardiovaskulären Ereignissen (15)

1.2 Regulation des Gefäßtonus

Die Kontrolle des arteriölen Gefäßwiderstandes unterliegt myogenen Mechanismen, neuronalen und hormonellen Signalen, lokal-chemischen Faktoren sowie vasoaktiven Substanzen, die vom Endothel selber sezerniert werden. Diese Mechanismen wirken nicht auf alle Abschnitte des Gefäßsystems im gleichen Ausmaß (2). Welche dieser Faktoren eine entscheidende Rolle bei der reaktiven Hyperämie spielen, wurde in vielen Studien diskutiert. In den folgenden Kapiteln werden die grundlegenden Mechanismen und Faktoren, welche den Gefäßwandtonus regulieren, besprochen.

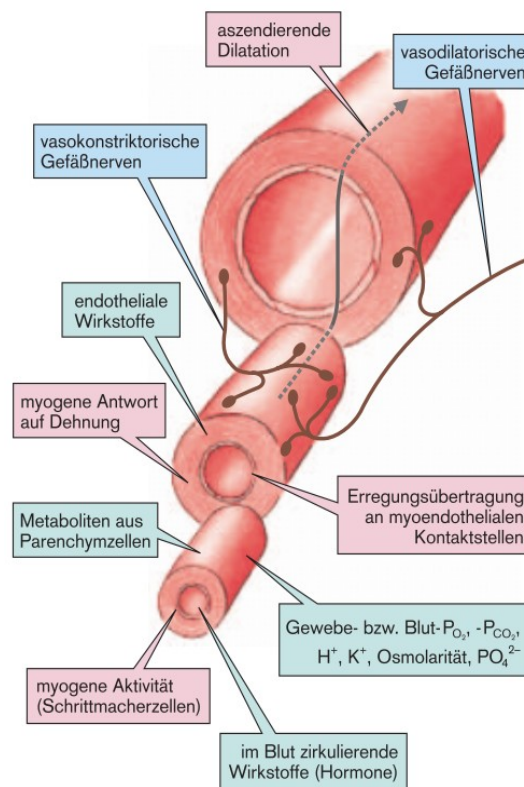


Abbildung 6: Schematische Übersicht – Regulationsmechanismen des Gefäßtonus in Widerstandsgefäßen (2)

1.2.1 Regulation des Gefäßwiderstandes durch myogene und metabolische Faktoren

In den frühen Arbeiten über die PORH wurden hauptsächlich myogene und metabolische Mechanismen als Möglichkeiten zur Regulation der Durchblutung in Betracht gezogen (16).

Unter dem myogenen Mechanismus versteht man die Fähigkeit der glatten Muskelzellen, ohne Beteiligung der Gefäßnerven, auf Änderungen des transmuralen Druckes zu reagieren. Auf die Erhöhung des Intravasaldruckes reagiert die glatte Muskulatur der Gefäßwand nach einer vorübergehenden passiven Zunahme des Gefäßradius mit einer aktiven Kontraktion und bei Senkung des Druckes mit einer Dilatation (17). Da es bei der RH zu einer Abnahme des Druckes im Gefäß distal der Okklusion kommt, ist eine Dilatation die Konsequenz daraus.

Zu den metabolischen bzw. lokal-chemischen Faktoren zählen Substanzen, welche durch einen gesteigerten Gewebsstoffwechsel entstanden sind und zu einer sog. metabolischen Dilatation führen. Sie zeigen vor allem an den kleinen präkapillären Arteriolen ihre Wirkung. Dazu gehören dilatierende Produkte des Energiestoffwechsels (ADP, AMP, Adenosin), eine veränderte Elektrolytzusammensetzung (K^+ , H^+ , Ca^{2+} -Ionen und Laktat), eine Änderung des Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdrucks ($\downarrow pO_2$ und $\uparrow pCO_2$ führen zu einer Dilatation) und die Steigerung der Gewebeosmolarität.

1.2.2 Durchblutungssteuerung durch das Nervensystem

Die meisten Arteriolen des Körperkreislaufs sind von Fasern des sympathischen Nervensystems innerviert, sie ziehen an den Gefäßwänden entlang und setzen an ihren Kontaktstellen (Synapsen) dort gespeicherte Neurotransmitter frei. Aus den Endigungen der postganglionären sympathischen Neurone wird Noradrenalin (NA) freigesetzt, welches eine Vasokonstriktion des Blutgefäßes durch Bindung an α_1 -adrenerge Rezeptoren in der vaskulären glatten Muskulatur bewirkt und damit eine Durchblutungsabnahme (2). In vitro und in vivo konnte aber auch gezeigt werden, dass NA hauptsächlich über α_2 -adrenerge Rezeptoren durch eine Stickstoffmonoxid (NO) - Freisetzung die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur bewirkt (18) zit. n. (19). Die Gabe des α_2 -Agonisten Clonidin verlängerte die Dauer

der RH, was durch die gleichzeitige Gabe des NO-Synthese Inhibitors L-NMMA verhindert wurde (20).

Die Mikrozirkulation der Haut ist unter starkem Einfluss des sympathischen Nervensystems über die α_1 - und α_2 - adrenergen Rezeptoren in den größeren Arteriolen und Venolen, wobei die α_2 - adrenergen Rezeptoren an den glatten Muskelzellen der präkapillären und terminalen Arteriolen dominieren (21-23) zit. n. (20), sich aber auch an den Endothelzellen der Gefäße befinden und anscheinend auch an der Reaktionsdynamik der PORH beteiligt sind.

Es gibt auch Hinweise für eine Beteiligung sensorischer Nerven an der RH in den Hautgefäßen (24) zit. n. (25).

1.2.3 Beeinflussung der Durchblutung durch Hormone

Das bei sympathischer Erregung aus dem Nebennierenmark ausgeschüttete gefäßaktive Catecholamin Adrenalin bindet bei hohen Konzentrationen wie Noradrenalin an α_1 -adrenerge Rezeptoren und aktiviert diese mit folgender Vasokonstriktion. Gleichzeitig bindet Adrenalin aber auch an β_2 –adrenerge Rezeptoren (diese befinden sich in der glatten Muskulatur der Arteriolen von Herz, Skelettmuskulatur und Leber), zu welchen es eine deutlich höhere Affinität besitzt und führt dort zu einer Vasodilatation. Die Wirkung von Adrenalin ist also stark dosisabhängig (2).

Eine vasokonstriktorische Wirkung auf die Widerstandsgefäße haben auch die Hormone Angiotensin II, ADH (antidiuretisches Hormon) und ANP (atriales natriuretisches Peptid), die hauptsächlich an der Blutvolumenregulation beteiligt sind.

Lokale (parakrine) Hormone – sog. Autakoide können nach mechanischen Reizen, Temperatureinwirkung oder entzündlichen Vorgängen lokal begrenzt die Durchblutung beeinflussen. Ihre Freisetzung erfolgt aus Zellen des Stützgewebes, Makrophagen und Parenchymzellen.

Hormone beeinflussen aber auch die NO-Produktion, indem sie über zwei unterschiedliche Mechanismen auf die endotheliale NO-Synthase (eNOS) eingreifen:

- Die Phosphorylierung der eNOS am Serin 1177

- Gesteigerte Gen-Expression

Beide Mechanismen führen zu einer gesteigerten eNOS-Aktivität und damit zur gesteigerten NO-Produktion (26).

Hormone, die auf diese Weise die eNOS modifizieren, sind Östrogene, Progesteron, Insulin und das Wachstumshormon (GH). Glucocortikoide und das Prolaktin wirken hingegen negativ auf die eNOS Aktivität.

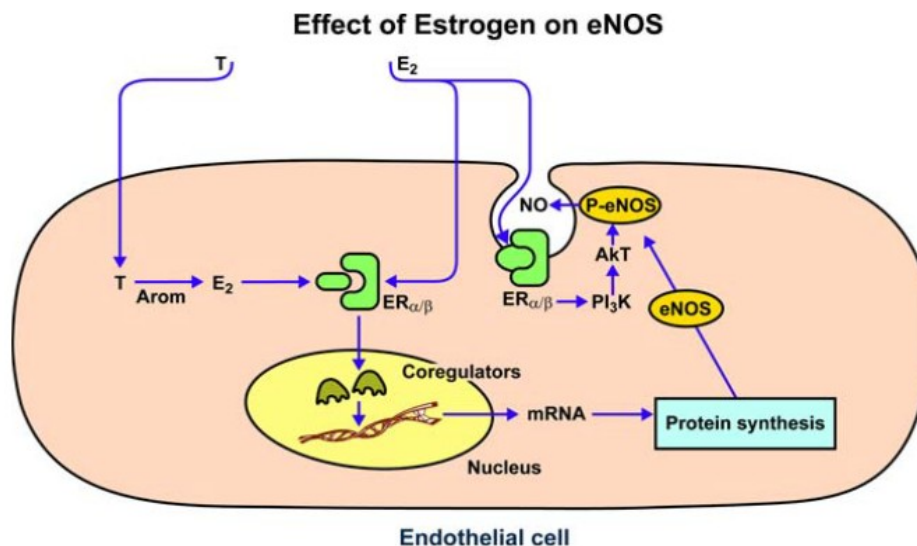


Abbildung 7: Die Östrogenwirkung (E_2) auf die eNOS-Aktivität – E_2 bindet an die α oder β Rezeptoren an der Zellmembran oder im Zytosol und beeinflusst dadurch die eNOS-Aktivität und damit NO-Ausschüttung über zwei unterschiedliche Signalkaskaden (26)

1.2.4 Beteiligung des Endothels an der lokalen Durchblutungsreaktion

Die Beteiligung des Endothels bei der Kontrolle des Gefäßwiderstandes ist seit den Arbeiten von Furchgott (27) wohl bekannt, in denen gezeigt wurde, dass ein intaktes Endothel für die Acetylcholin (ACH) vermittelte Vasodilatation notwendig sei und eine beschädigte Endothelschicht der Hasen-Aorta zu dem Verlust der ACH-vermittelten Vasodilatation führte. Dabei sollte eine endothel-medierte Substanz, die durch Diffusion zu der glatten Gefäßmuskulatur gelangt und damit die Dilatation des Gefäßes bewirkt, die entscheidende Rolle spielen. Furchgott nannte sie damals "endothelium-derived relaxing factor" (EDRF), der sich nachträglich als ident mit dem Stickstoffmonoxid (NO) erwies (28).

Seit diesen Erkenntnissen folgte eine Vielzahl weiterer Forschungen, in denen man die Funktion des Endothels, sowie des NO untersuchte und um die Identifizierung weiterer endothel-vermittelter Faktoren bemüht war. Gesucht

wurden auch die Mechanismen, die zur Freisetzung dieser Faktoren führen. Da es sich dabei um komplexe ineinander übergreifende Abläufe handelt, wird die Endothelfunktion im nächsten Kapitel genauer erläutert.

1.3 Funktion des Endothels

Die Funktion des Endothels begrenzt sich nicht nur auf die Aufrechterhaltung des Gefäßwandtonus. Seine Aufgabe besteht darin, die vaskuläre Homöostase aufrecht zu erhalten. Dazu gehören auch die Regulation der Hämostase und Fibrinolyse, die Entzündungsmodulation sowie die selektive Permeabilität der Gefäßwand. Dabei sind unterschiedliche Endotheliale Faktoren beteiligt (siehe Tab. 1).

Tabelle 1: Endotheliale Faktoren (15)

Partial List of Factors Elaborated and Regulated by the Endothelium to Maintain Vascular Homeostasis

Maintenance of vascular tone

- Nitric oxide
- Prostaglandins (prostacyclin [PGI₂], thromboxane A₂ [TxA₂])
- Endothelial hyperpolarizing factor (EDHF)
- Endothelin-1
- Angiotensin II
- C-type natriuretic peptide

Balancing blood fluidity and thrombosis

- Nitric oxide
- Tissue plasminogen activator (tPA)
- Heparins
- Thrombomodulin
- Prostaglandins
- Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)
- Tissue factor
- Von Willibrand's factor

Control of the vascular inflammatory process

- Monocyte chemotactic factor-1 (MCP-1)
- Adhesion molecule expression (VCAM-1, ICAM-1, selectins)
- Interleukins 1, 6, and 18
- Tumor necrosis factor (TNF- α)

ICAM-1 = intercellular adhesion molecule-1; VCAM-1 = vascular cell adhesion molecule 1

Diese Faktoren agieren auch als Wachstumsfaktoren, die eine proliferative Wirkung auf das Endothel ausüben. Der Funktionsverlust des Endothels mit

seinen multiplen Regulationsmechanismen ist entscheidend bei der Entstehung und Progression der Atherosklerose (29; 30).

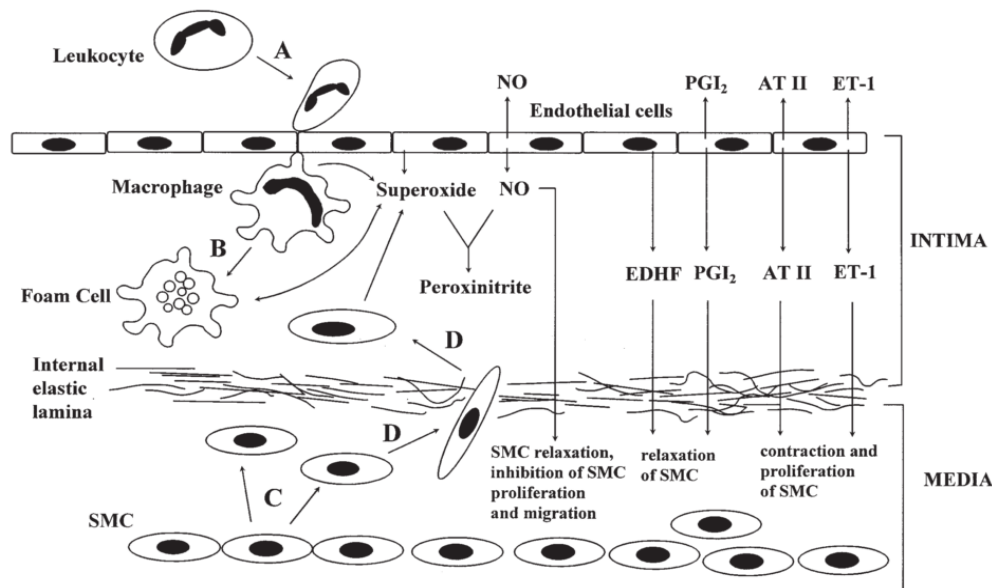


Abbildung 8: schematische Darstellung der endothelialen zellmedierten Regulation des Gefäßtonus (rechts) und Mechanismen der Atherogenese (links) – A, Rekrutierung und Infiltration durch Leukozyten; B, Anhäufung fetthaltiger Zellen (Schaumzellen); C, Proliferation glatter Muskelzellen; D, Migration glatter Muskelzellen (30)

Bei der RH sind Substanzen, die zur Aufrechterhaltung des Gefäßwandtonus dienen, entscheidend. Die wichtigsten vom Endothel sezernierten vasodilatatorischen Stoffe sind: Stickstoffmonoxid (NO), Prostacyclin (PGI₂) und der endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF), die bei der Erforschung der Mechanismen der RH und folglich der Endotheldysfunktion in den Vordergrund gerückt sind. Aber auch vasokonstriktorisch wirksame Substanzen wie das Endothelin (ET-1), das Thromboxan A₂ (TxA₂) und reaktive Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) werden in diesem Zusammenhang untersucht (31).

1.3.1 Stickstoffmonoxid (NO)

NO hat im menschlichen Organismus eine Reihe vielfältiger Funktionen. Zu seinen wichtigsten physiologischen Funktionen gehören die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur sowie die Hemmung der Thrombozytenaggregation. Die Synthese des NO erfolgt durch die NO-Synthasen (NOS), von welchen es gewebsspezifisch drei Isoformen gibt:

- die endotheliale (eNOS), siehe Abb.15
- die neuronale (nNOS) und
- die induzierbare (iNOS, kommt in Zellen des Immunsystems vor)

Die NOS synthetisieren NO aus der Aminosäure Arginin, wobei ein wichtiger Kofaktor - das Tetrahydrobiopterin (BH₄) dabei beteiligt ist.

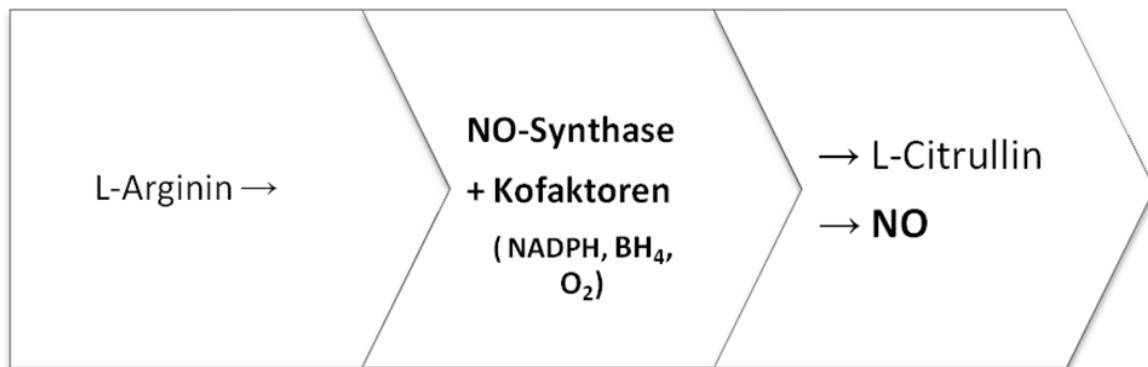
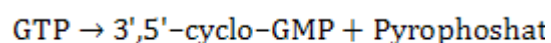


Abbildung 9: Synthese von NO

Das NO entfaltet seine physiologische Wirkung hauptsächlich über die Aktivierung der NO-sensitiven löslichen Guanylatcyclasen (GC). Diese GC bestehen aus verschiedenen Untereinheiten (α 1- oder α 2- und β 1), wobei das α 1 β 1 Dimer dominiert und in fast allen Geweben exprimiert ist. Die Aufgabe dieser GC ist es, zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) aus dem Guanosintriphosphat (GTP) zu bilden.



Dieses cGMP bindet dann in erster Linie an die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG), die die intrazelluläre Calcium-Konzentration reduziert, indem sie den Ca²⁺-Einstrom aus dem Extrazellularraum senkt, die Ca²⁺-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) hemmt und die Sensitivität der Myofilamente auf das Ca²⁺ verringert (Ca²⁺-Desensibilisierung). Die Senkung des intrazellulären Ca²⁺ führt zu einer Muskelrelaxation (32; 33).

1.3.1.1 Faktoren bei der NO-Freisetzung

Acetylcholin hat die Fähigkeit, die endothelabhängige NO-Produktion zu stimulieren, dies ist aber hauptsächlich von pharmakologischem Interesse, da cholinerge Neuronen die Blutgefäße nur im geringen Ausmaß innervieren.

Substanzen, die physiologischerweise im menschlichen Körper die endothelvermittelte NO-Freisetzung medieren, sind:

- Hormone (Katecholamine, Vasopressin, Aldosteron)
- Plasma-Bestandteile (Thrombin, Sphingosin-1-Phosphat)
- Produkte von Thrombozyten (Serotonin, Adenosindiphosphat – ADP)
- Autakoide (Histamin, Bradykinin, Prostaglandin E₄)

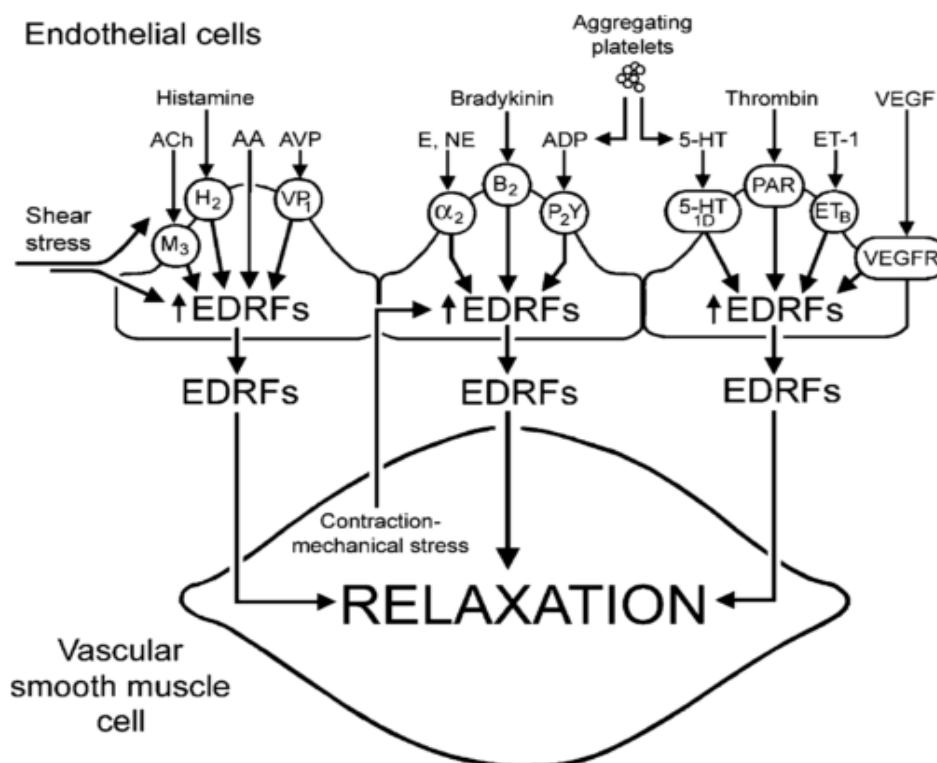


Abbildung 10: Mediatoren die über Aktivierung spezifischer Rezeptoren zur Freisetzung des EDRF (NO) führen; E epinephrine, AA arachidonic acid, Ach acetylcholine, ADP adenosine diphosphate, α alpha adrenergic receptor, AVP arginine vasopressin, B kinin receptor, ET endothelin, endothelin-receptor, H histaminergic receptor, 5-HT serotonin (5-hydroxytryptamine), serotoninergic receptor, M muscarinic receptor, NE norepinephrine, P purinergic receptor, T thrombin receptor, VEGF vascular endothelial growth factor, VP vasopressin receptor (34)

Außerdem sind auch physikalische Stimuli wie die Scherspannung, die auf die Gefäßwand wirkt, entscheidend an der NO-Freisetzung beteiligt (35).

1.3.1.2 NO-Freisetzung und RH

Die entscheidende Rolle des Endothels bei der PORH konnte im Tierversuch nachgewiesen werden (3; 36).

Da die akute RH zu einer Steigerung der laminären Scherspannung führt und die wiederum zu einer gesteigerten Aktivität der eNOS, sollte die FMD eine NO vermittelte Reaktion darstellen. Doch die Rolle des NO als zentraler Faktor der flussvermittelten Vasodilatation bleibt umstritten, da unterschiedliche Studien widersprüchliche Ergebnisse liefern (37; 38).

In einigen Studien konnte durch Einsatz des NOS-Inhibitors N^G-Monomethyl L-Arginin (L-NMMA) eine signifikante Einschränkung der FMD und damit die Beteiligung des NO als mediiierenden Faktor gezeigt werden (39-42).

In den Arbeiten von Engelke et al. (43), Wong et al. (25) und Pyke et al. (44) zeigte die Gabe von L-NMMA hingegen keine signifikante Veränderung im Verlauf der Dilatation und damit keine obligatorische Rolle des NO bei der PORH.

Im Allgemeinen könnte man zusammenfassen, dass zur Beurteilung der Funktion des NO bei der PORH noch weitere Untersuchungen erforderlich sind, dass dabei viele miteinander interagierende Mechanismen beteiligt sind, welche sich zum Teil überdecken und es dadurch noch komplexer gestalten, einen Einblick in diese Vorgänge zu erlangen. Es wird auch diskutiert, ob unterschiedliche Phänotypen des Endothels bewirken, dass kompensatorische Mechanismen bei der NO-Blockade in verschiedenem Ausmaß eingreifen können (44).

1.3.2 Prostacyclin

Prostaglandine gehören zu den Metaboliten der Arachidonsäure und entstehen durch die Wirkung der Prostaglandinsynthase, die aus den zwei Untereinheiten Cyclooxygenase (COX) und Peroxydase besteht.

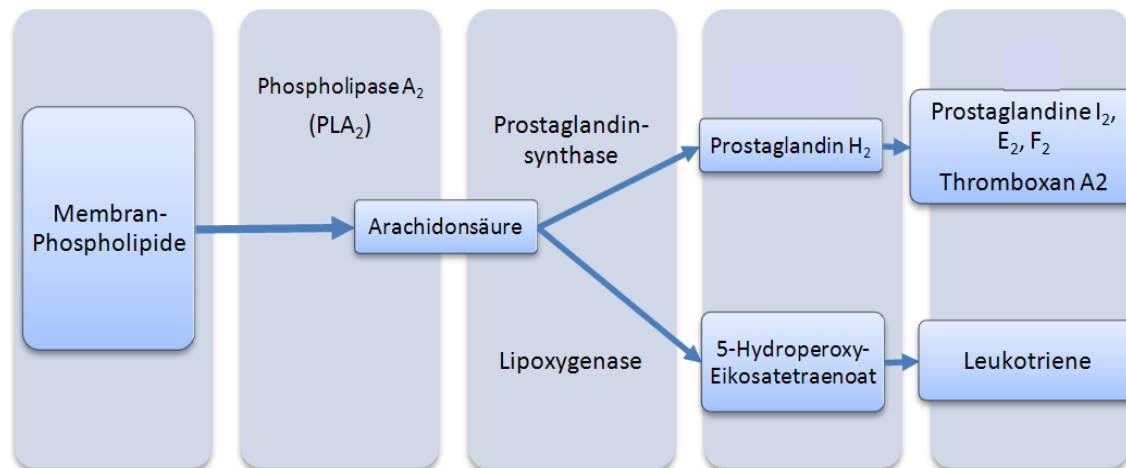


Abbildung 11: Die Biosynthese von Prostaglandinen; Modifiziert nach (32)

Die Prostagandine PGE_2 und das Prostacyclin (PGI_2), welche aus den Endothelzellen freigesetzt werden, hemmen die Thrombozytenaggregation und wirken stark vasodilatierend (2).

In welchem Umfang sie bei der physiologischen Durchblutungsregulation beteiligt sind, ist wie beim NO nur zum Teil bekannt. In einigen Studien konnte die Freisetzung von PGI_2 als Antwort auf Scherkräfte und damit ihre Beteiligung als Mediatoren bei der FMD gezeigt werden (7; 43; 45). Es gibt auch Hinweise, dass Prostagandine bei Patienten mit verminderter NO-Bioverfügbarkeit einen wichtigen kompensatorischen Mechanismus bei der Gefäßdilatation spielen (46; 47).

1.3.3 EDHF

Ein weiteres vasodilatatorisches Prinzip ist der „Endothelium-derived hyperpolarizing factor“ (EDHF). Der Begriff des EDHF wurde im Jahre 1987 definiert und beschreibt einen hypothetischen Faktor, der unabhängig von NO und PGI_2 für die Hyperpolarisation der Myozyten verantwortlich ist (48). Dabei handelt es sich nicht um eine definierte chemische Substanz, sondern es geht vielmehr um eine Folge zellulärer Reaktionen, welche im Endothel ihren Ausgang nehmen und letztendlich zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen führen. Die EDHF-Antwort wird durch einen Anstieg der endothelialen Ca^{2+} -Konzentration ausgelöst und wird danach über unterschiedliche Signalwege weitergeleitet (2). Der klassische Signalweg führt über Öffnung der Ca^{2+} -aktivierten Kaliumkanäle (K_{Ca}) IK_{Ca} und SK_{Ca} zu einer endothelialen Hyperpolarisation, wobei deren

Weiterleitung an die Myozyten über Anstieg der lokalen extrazellulären K^+ -Konzentration und über myoendotheliale Gap-Junctions erfolgt. [K_{Ca} werden nach ihrer Leitfähigkeit in große (BK_{Ca} -), mittlere (IK_{Ca} -) und kleine (SK_{Ca} -) Kanäle eingeteilt.]

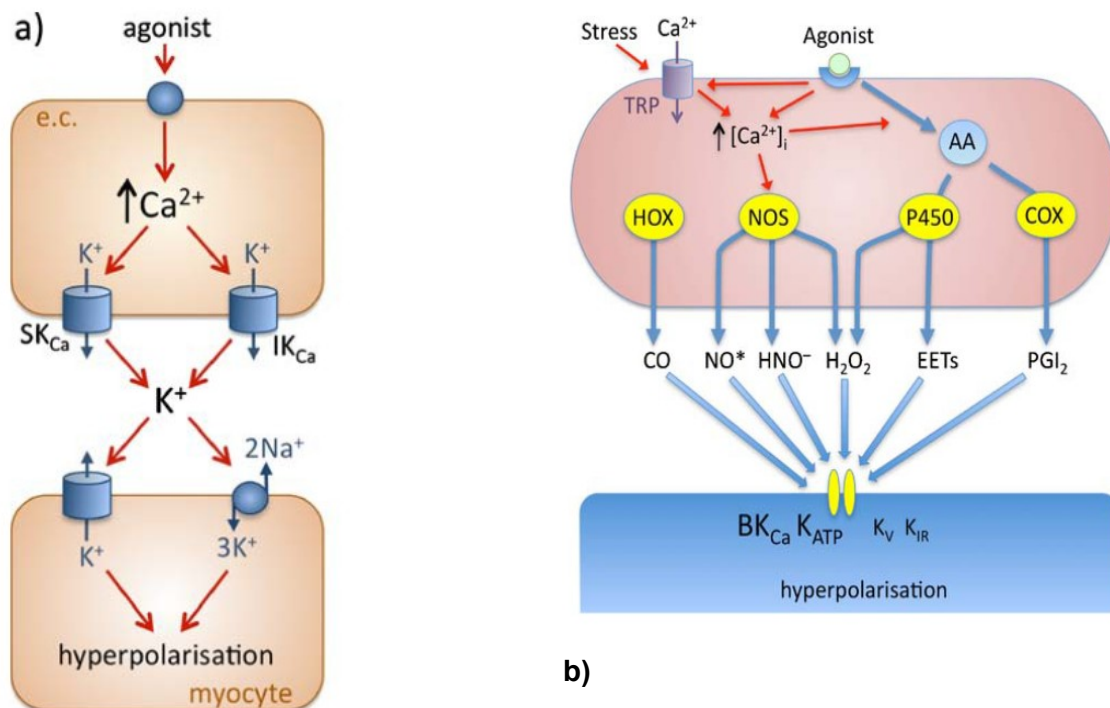


Abbildung 12: a) klassischer EDHF Signalweg; schematische Darstellung aus dem Jahr 1998 zeigt den postulierten K^+ Ausstrom von endothelialen SK_{Ca} und IK_{Ca} Kanälen sowie die Aktivierung der myozytischen K_{IR} und Na^+/K^+ -ATPasen. b) zweiter EDHF Signaltransduktionsweg; dessen Ursprung in EDHF liegt, welche myozytische BK_{Ca} und/oder K_{ATP} Kanäle aktivieren. Durch die Aktivierung von Rezeptoren werden Diacylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP_3) freigesetzt. Die Hydrolyse von DAG produziert Arachidonsäure (AA), welche Prostacyclin generiert (PGI_2 ; über Cyclooxygenase, COX) und Epoxyeicosatriensäuren (EETs; über Cytochrom P450 Epoxygenase). IP_3 , Abbau des Ca^{2+} Speichers und physikalische Faktoren (Dehnung) induzieren einen Ca^{2+} Einstrom über Kationenkanäle (TRP); der $[Ca^{2+}]_i$ Anstieg stimuliert die Phospholipase A_2 (Freisetzung der Arachidonsäure aus Membran-Phospholipiden) und die eNOS. In der folgenden Produktion von NO^* , HNO^- und EET wird auch O_2^- freigesetzt, aus welchem H_2O_2 entsteht. Rote Pfeile stehen für stimulierende Effekte. CO wird durch die Hämoxigenase (HOX) Rezeptor-unabhängig produziert (48).

Ein zweiter Signaltransduktionsweg verläuft hingegen nicht über eine Zellhyperpolarisation, sondern ist mit einer Ca^{2+} -abhängigen Freisetzung von Substanzen verbunden, die in Folge dessen BK_{Ca} - oder K_{ATP} - Kanäle aktivieren (siehe Abb. 12). Die Bedeutung der EDHF steigt mit kleinerem Gefäßdurchmesser (48; 49). Sie sind vermutlich wie die Prostaglandine als kompensatorische Mechanismen bei der NO-vermittelten Vasodilatation beteiligt, wie durch Gabe von Ouabain (einem Inhibitor der Na/K ATPase, welcher die Hyperpolarisation hemmt)

gezeigt werden konnte (50). In welchem Ausmaß die EDHF bei der RH beteiligt sind, ist teilweise schwer einzuschätzen, da es wenige geeignete Inhibitoren der EDHF-Signalwege gibt bzw. die zumeist verwendeten Inhibitoren in vivo toxisch sind (49).

1.3.4 Endothelium-derived contracting factors (EDCFs)

Die Endothelzellen können als Antwort auf physikalische Stimuli oder auf verschiedene Agonisten auch endothelabhängige Vasokonstriktoren produzieren - die s. g. „Endothelium-derived contracting factors“ (EDCFs). Dazu gehören hauptsächlich das Endothelin (ET1), vasokonstriktorische Prostaglandine und reaktive Sauerstoffspezies. Diese bewirken nicht nur eine Vasokonstriktion, sondern besitzen auch proatherogene sowie thrombogene Eigenschaften. Des Weiteren gehen viele pathologische Zustände, welche durch eine eingeschränkte Endothelfunktion charakterisiert sind, mit einer reduzierten biologischen Verfügbarkeit von NO und einer erhöhten Produktion von EDCF einher (51).

1.3.4.1 Vasokonstriktorische Prostaglandine

Neben dem vasodilatatorisch wirksamen Prostaglandinen PGE₂ und PGI₂ führt der Stoffwechsel der Arachidonsäure über die Synthese von PGH₂ (Vorstufe der PG siehe Abb. 11) auch zum vasokonstriktorisch wirksamen Thromboxan A₂ (TXA₂). TXA₂ wie auch das PGH₂ führen über TX-spezifische Rezeptoren zur Vasokonstriktion. Diese Wirkung wird aber unter normalen Umständen vom PGI₂, dem Hauptmetaboliten der Arachidonsäure, überdeckt (31). Es konnte aber gezeigt werden, dass unter Gabe des TP-Rezeptor Blockers S18886 eine Verbesserung der Endothelfunktion bei Patienten mit KHK erreicht wurde, was auf eine Beteiligung der vasokonstriktorischen Prostaglandine bei der endothelialen Dysfunktion rückschließen lässt (52).

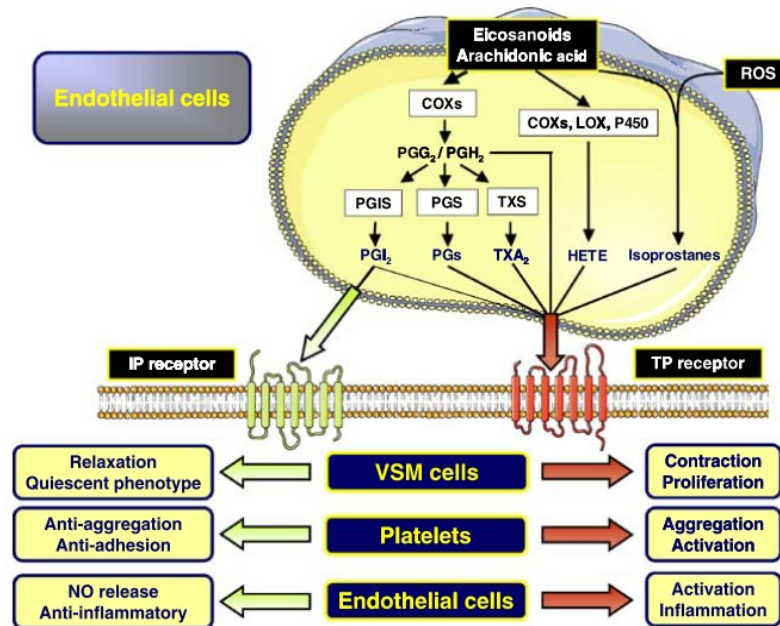


Abbildung 13: Beteiligung der Prostaglandin-spezifischen Rezeptoren (TP und IP) bei der vaskulären Dysfunktion. Prostaglandine binden an spezifische 7-Transmembrandomänen, G-Protein gekoppelte – Rezeptoren, von welchen es 5 Subtypen gibt (zwei davon sind TP und IP). Die Stimulation der TP Rezeptoren führt zur Thrombozytenaggregation, Konstriktion der glatten Muskelzellen wie auch zur verstärkten Expression von Adhäsions-Molekülen, was wiederum zur vermehrten Adhäsion und Infiltration von Monozyten bzw. Makrophagen führt. Hauptsächlich das TXA₂ bindet an den TP-Rezeptor, aber auch das PGH₂ sowie andere Prostaglandine können den Rezeptor aktivieren. Im Gegensatz dazu bindet das PGI₂ an den IP-Rezeptor, welcher die entgegengesetzte Wirkung auf die Muskelzellen, Thrombozyten und Endothelzellen ausübt (53).

1.3.4.2 *ROS (Reactive oxygen species)*

Die Zellen des Endothels sezernieren auch reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) – das sind freie Radikale wie z.B. das Superoxid-Anion (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das Hydroxylradikal (OH) und die hypochlorige Säure (HOCl) die durch die Aktivität von zellulären Enzymen entstehen. Der vaskuläre oxidative Stress mit einer gesteigerten Produktion von ROS, dessen Ursache in dem Ungleichgewicht zwischen endogenen prooxidativen (wie die NADPH-Oxidase, Xanthinoxidase, mitochondriale Elektronentransportkette) und antioxidativen (wie die Superoxid-Dismutase, Glutathionperoxidase, Hämoxygenase, Katalase) Enzymen liegt, trägt zur Entstehung der endothelialen Dysfunktion bei, indem er die Menge des bioaktiven NO reduziert. Dies erfolgt durch die schnelle oxidative Inaktivierung des NO durch das Superoxid-Anion, es gibt aber auch Hinweise, dass ROS die eNOS verändern, die dadurch ein dysfunktionales Superoxid-generierendes Enzym wird und zusätzlich zur Entstehung von oxidativen Stress beiträgt.

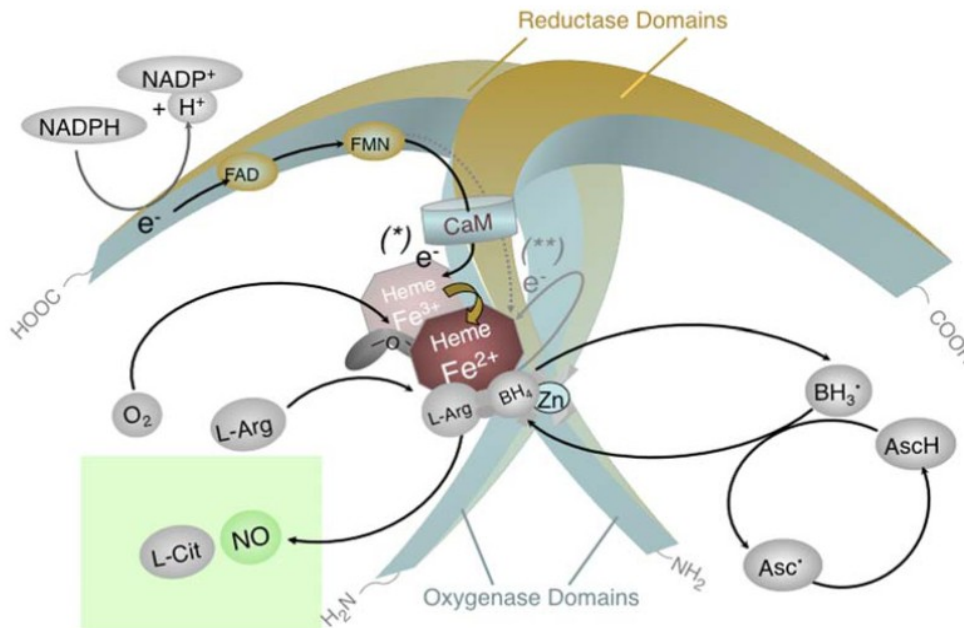


Abbildung 14: Schematische Darstellung der endothelialen NO-Synthase. Die eNOS ist ein homodimeres Enzym, wobei jede Untereinheit aus einer Reduktase- und einer Oxygenase-Domäne besteht. NADPH liefert die Elektronen (e^-) für die eNOS und befindet sich an der Reduktasedomäne. Der Elektronen-Transfer von der Reduktase-Domäne (*) ermöglicht dem Häm-Eisen (Fe^{3+}) O_2 zu binden und Fe^{2+} zu bilden, welches wiederum ein zweites Elektron vom BH_4 (oder alternativ von der Reduktase-Domäne) empfangen kann (**). Dieses aktiviert Sauerstoff und katalysiert die Hydroxylierung von L-Arginin. Die oxidierte Spezies aus BH_4 ist das Trihydrobiopterin Radikal (BH_3^\bullet), welches von der eNOS (Elektronentransfer von Flavinen) selber oder aber durch die L-Ascorbinsäure in das BH_4 umgewandelt werden kann. Die Regulation erfolgt durch das Calmodulin (CaM) welches in Abhängigkeit von Ca^{2+} die Geschwindigkeit des Elektronentransfers an der Reduktasedomäne vom NADPH zum Flavin beeinflusst wie auch von der Reduktase-Domäne zum Häm-Zentrum in der Oxygenase-Domäne (AscH ascorbic acid, Asc ascorbate radical) (54).

Hämodynamische Faktoren wie die Wandschubspannung sind hingegen ein Stimulus (neben einer erhöhten intrazellulären Ca^{2+} Konzentration) zur gesteigerten Aktivierung der eNOS. Dies erfolgt durch Phosphorylierung der Aminosäuren Serin (Ser), Threonin (Thr) und Tyrosin des Enzyms. Die Phosphorylierung (durch Proteinkinasen) am Ser 1177 und am Thr 495 der humanen eNOS-Sequenz führte zu den deutlichsten Unterschieden in der Enzymfunktion (54).

Die Mechanismen, welche den genauen Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und der darauf folgenden Endotheldysfunktion sowie Atherogenese darstellen, sind derzeit nur hypothetisch erfasst (Abb. 15).

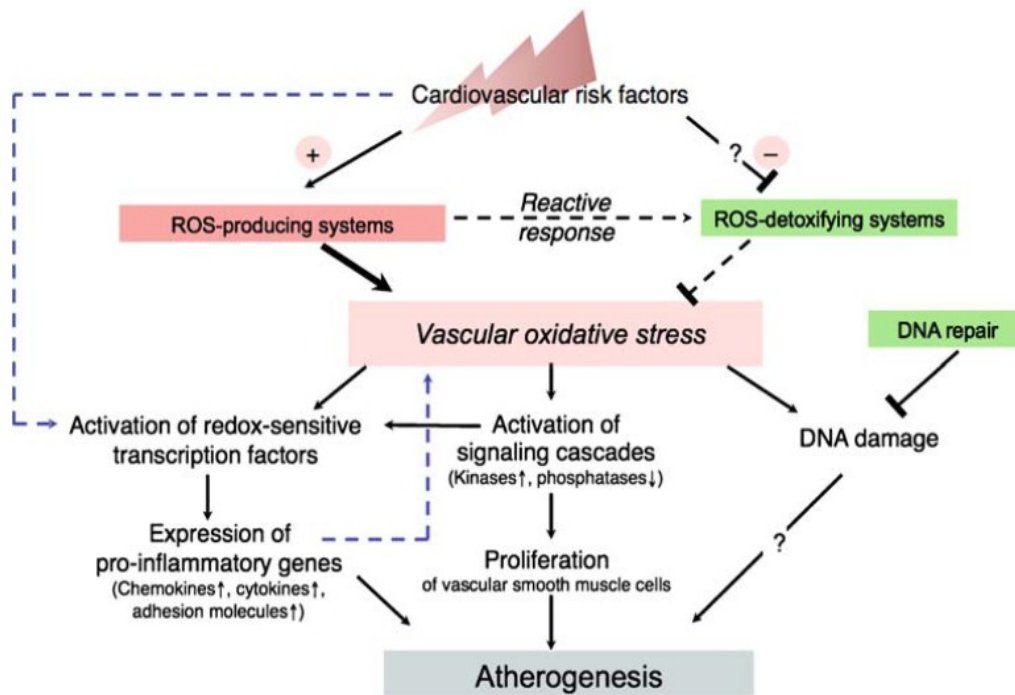


Abbildung 15: Hypothetische Darstellung – oxidativer Stress als Ursache der Atherogenese; viele Mechanismen bleiben unbekannt; eine alternative Möglichkeit, wobei die Entzündung den primären Prozess der Atherogenese darstellt, ist mit blauer Strichlinie dargestellt (54).

1.3.4.3 Endothelin-1

Endotheline sind Peptidhormone, die hauptsächlich von Endothelzellen produziert werden. Es wurden drei Isoformen identifiziert (Endothelin-1, -2 und -3), die die gleiche Anzahl von 21 Aminosäuren besitzen.

Das Endothelin-1 ist die stärkste derzeit bekannte vasokonstriktorische Substanz, welche ihre Wirkung über spezifische Rezeptoren ETA (glatte Muskelzellen) und ETB (Endothel, glatte Muskelzellen) entfaltet. Die Rezeptoren an der glatten Muskulatur führen zu einer Kontraktion, wohingegen die am Endothel lokalisierten ETB-Rezeptoren eine Relaxation der Gefäßwand bewirken. Die Erhaltung dieses durch das endothelin-vermittelte Gleichgewicht spielt eine wichtige Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen (51).

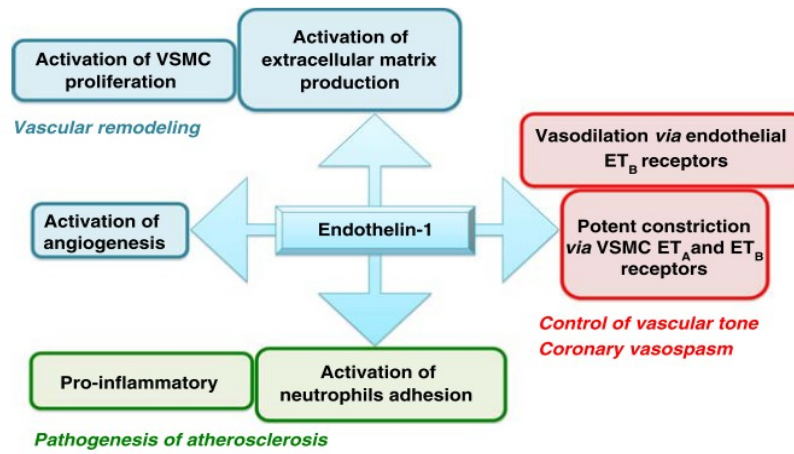


Abbildung 16: Multiple Funktionen des Endothelin-1 (55)

1.4 Diagnostik der Endothelfunktion

1.4.1 Dysfunktion des Endothels als prognostischer Faktor zur kardiovaskulären Risikoeinschätzung

Wie schon im ersten Kapitel (1.1.3) erwähnt, kann die Dysfunktion des Endothels als prognostischer Faktor zur kardiovaskulären Risikoeinschätzung herangezogen werden. In einigen Studien konnte der Zusammenhang zwischen koronarer Endotheldysfunktion und einer ungünstigen kardiovaskulären Langzeitprognose gezeigt werden (12-14).

Auch invasive Studien an der A. brachialis zeigten, dass die Erfassung der Endothelfunktion in peripheren Gefäßen als prognostischer Marker zur Bestimmung des kardiovaskulären Risikos herangezogen werden kann (56; 57). Desweiteren zeigten sich auch nichtinvasive, ultraschall-basierende Verfahren zur prognostischen Einschätzung kardiovaskulärer Ereignisse als geeignet (58; 59).

Aufgrund dieser Studienergebnisse stellt sich nun die Frage, welche Methoden zur Evaluierung der Endothelfunktion am besten geeignet sind. Dabei ist aber nicht nur eine genaue Einschätzung der Endothelfunktion gefordert, sondern auch ein wenn möglich nicht-invasives, verlässliches, klinisch anwendbares und kostengünstiges Verfahren mit guter Reproduzierbarkeit. Deanfield et al (60) zeigte einen Überblick derzeit angewandter Verfahren, wobei sich keines als Screening zur kardiovaskulären Risikoeinschätzung in der klinischen Praxis behaupten konnte (siehe Tab. 2).

Tabelle 2: Methoden zur Messung der Endothelfunktion im Vergleich (60)

Methods for Clinical Assessment of Endothelial Function						
Technique (Outcome Measure)	Noninvasive	Repeatable	Reproducible*	Reflects Biology	Reversible	Predicts Outcome†
Cardiac catheterization (change in diameter, change in coronary blood flow)	–	–	+/-	+	+	+
Venous occlusion plethysmography (change in forearm blood flow)	–	+/-	+/-	+	+	+
Ultrasound FMD (change in brachial artery diameter)	+	+	+/-	+	+	+‡
PWA (change in augmentation index)	+	+	+/-	+	–	–
PCA (change in reflective index)	+	+	+/-	+	–	–
PAT (change in pulse amplitude)	+	+	+/-	+	–	–

+ indicates supportive evidence in literature; –, insufficient evidence; FMD, flow-mediated dilatation; PWA, pulse wave analysis; PCA, pulse contour analysis; and PAT, pulse amplitude tonometry.

*Reproducibility of PWA, PCA, and PAT has been less extensively investigated than FMD.

†Studies that link PWA, PCA, and PAT to outcome have not yet been reported.

‡FMD is currently the standard for noninvasive assessment of conduit artery endothelial function because there is considerable clinical trial experience, validation, a firm link to biology, and association with cardiovascular events.

1.4.2 Möglichkeiten zur Erfassung der Endothelfunktion – bisher herangezogene Messgrößen

Zur Erfassung der Endothelfunktion werden unterschiedliche Verfahren angewendet. Dabei wird entweder die vasomotorische Reaktion des Endothels, die durch vasodilatatorisch wirksame Substanzen wie auch durch physikalische Stimuli herbeigeführt wird, anhand von invasiven oder nichtinvasiven Methoden gemessen (siehe Tab.3). Die zweite Möglichkeit über den Zustand des Endothels Auskunft zu gewinnen besteht darin, periphere Marker im Blut zu messen, welche mit Fortschreiten eines entzündlichen Vorganges bzw. mit der Atherosklerose in Verbindung stehen (11).

Tabelle 3: Methods for measuring endothelial function (61)

Technique	Method
Invasive	Intra-arterial ACh or endothelin infusion and strain gauge plethysmography (or high resolution ultrasound) Intravascular US studies of epicardial coronary arteries
Noninvasive	US FMD of the brachial artery Flow-mediated MRI Pulse wave analysis (PWA) applanation tonometry with inhaled salbutamol (B2 agonist for global endothelial NO release) Pulse contour analysis (PCA) digital photoplethysmography with inhaled salbutamol (B2 agonist for global endothelial NO release)
Microvascular	Laser Doppler skin flowmetry Digital pulse amplitude tonometry (PAT)

Abbreviations: FMD, flow-mediated dilation; MRI, magnetic resonance imaging; NO, nitric oxide; US, ultra sound.

1.4.2.1 Intrakoronare Gabe von Acetylcholin

Die paradoxe Vasokonstriktion des Endothels als Reaktion auf die intrakoronare Gabe von Acetylcholin (ACH) wurde von Ludmer et al. erstmals beschrieben. ACH bindet an muskarinerge Rezeptoren und führt infolge dessen zur eNOS-Aktivierung und NO-Bildung mit nachfolgender Vasodilatation. Bei Verlust der funktionellen Integrität des Endothels kommt es durch die verminderte NO-Wirkung und durch die direkt vasokonstriktorische Komponente des ACH auf die glatte Muskulatur zur Vasokonstriktion (62). Der ACH-Test wird zur Beurteilung

der Endothelfunktion herangezogen, dabei wird nach intrakoronarer Gabe von ACH in steigender Dosierung die Änderung des Gefäßdurchmessers mit quantitativer Angiographie, an den kleinen Gefäßen mit einem Doppler-Flussdraht gemessen. Die ACH-Methode ist invasiv, relativ aufwändig und bei Patienten möglich, wo die Indikation zur Koronarangiographie besteht.

1.4.2.2 Magnetresonanztomographie

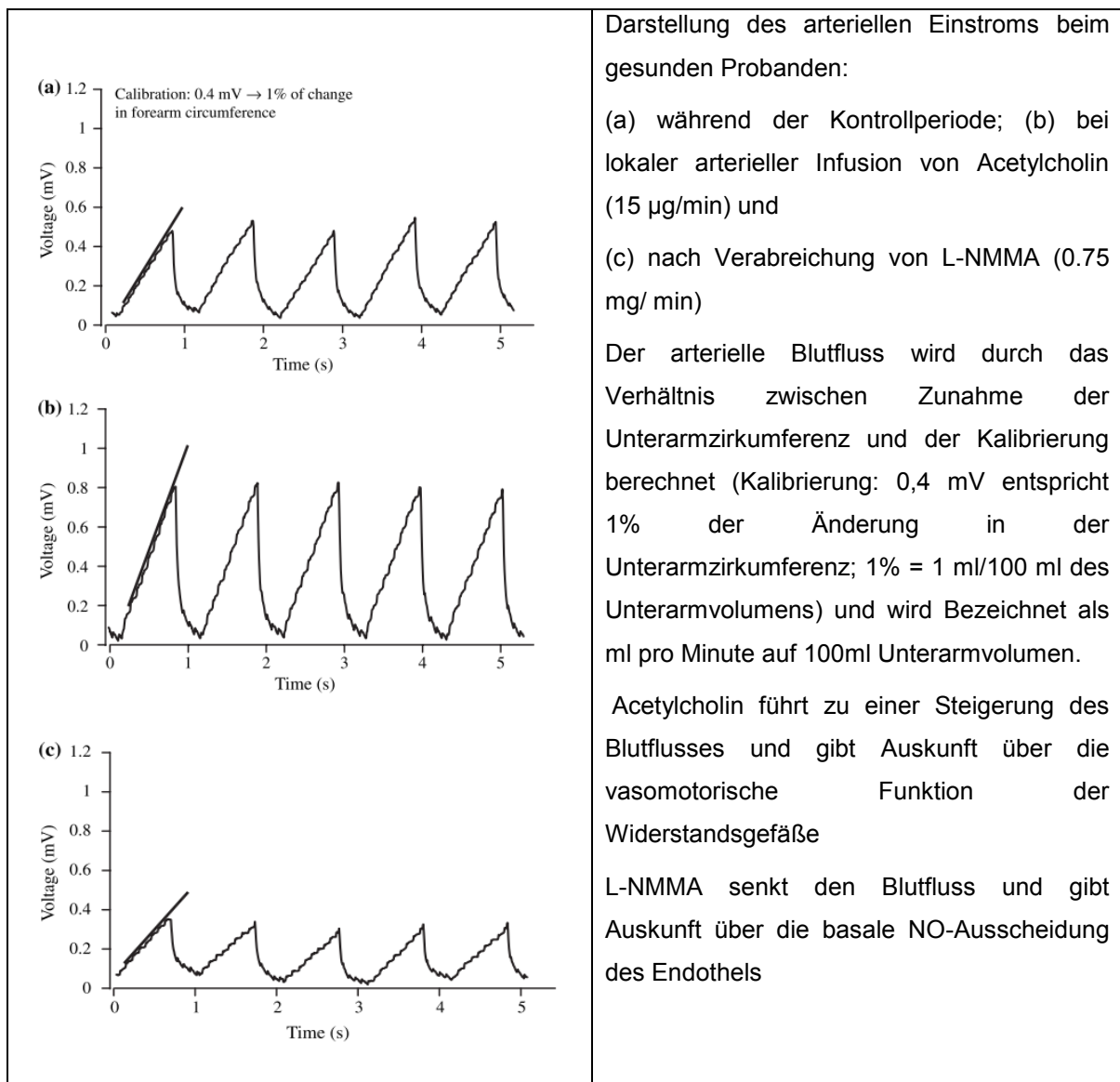
Nichtinvasive Methoden am Herzen sind die kontrastmittelverstärkte Perfusions-MRT (engl. dynamic contrast-enhanced MRI, DCE-MRI) und die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) mit intravenöser Gabe von Adenosin oder Dipyridamol. Die MRT ist im Vergleich zum Ultraschall weniger Benutzer-abhängig, sie ist aber teuer, mit eingeschränkter Verfügbarkeit und hat die üblichen Nachteile einer MR-basierenden Technik (61; 63).

1.4.2.3 Venöse Verschluss-Plethysmographie

Die venöse Verschlussplethysmographie (gr. Plethysmos – Vermehrung, Vergrößerung) ist eine der ältesten nicht-invasiven Techniken zur Messung der arteriellen Durchblutung an den Extremitäten. Bei dieser Methode wird das Prinzip der Verdrängung angewendet. Anfangs wurde dabei die Extremität in eine mit Wasser gefüllte rigide Hülle gesteckt und die jeweils verdrängte Wassermenge entsprach dabei der Volumenzunahme der Extremität; heute werden dafür metallhaltige Dehnungsstreifen verwendet. Das sind dünne Silikonschläuche, die mit Quecksilber oder anderen leitenden Legierungen (z.B. Gallium, Indium) gefüllt sind. Diese Metalle ermöglichen eine Messung kleinster Längenänderungen, da sie eine fixe Beziehung zwischen Länge und elektrischem Widerstand aufweisen.

Das Grundprinzip der plethysmographischen Messung besteht darin, dass Staudrücke, welche 60-70 mmHg unter dem systolischen Blutdruck liegen, den venösen Rückfluss unterbinden, aber dagegen den arteriellen Einstrom nur unwesentlich reduzieren. Dadurch führt der arterielle Einstrom mit jedem Herzschlag zu einer Volumenzunahme der Extremität, welche über die Dehnungsmessstreifen gemessen wird (64; 65). Die Blutflusssteigerung am Unterarm kann nach verabreichen verschiedener vasoaktiver Medikamente nach Kanülierung der A. brachialis gemessen werden – dabei ist die Methode semi-invasiv und reflektiert die Funktion der Widerstandsgefäße (siehe Abb. 17).

Abbildung 17: Messung der Zunahme des Unterarmumfangs durch die Verschlussplethysmographie (63)



Zur Messung der RH wird ein suprasystolischer Blutdruck angelegt und für die Dauer der Ischämiezeit (3-15 min) belassen. Danach wird dieser Druck abgelassen und die Manschette wird 5-mal im Abstand von 15 Sekunden (die angegebenen Zeitintervalle variieren von Gerät zu Gerät zwischen 10-30 s) für 5 Sekunden auf 60mmHg aufgeblasen. Während der kurzen Phasen ist es möglich, den arteriellen Einstrom zu messen, da nur der venöse Strom unterbrochen wird.

Eine Vielzahl von Studien wurde mit dieser Methode in den siebziger und achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts publiziert, bei klinischen Fragestellungen ist sie jedoch von der Farbduplexsonographie bei der Messung der Ruhedurchblutung und RH verdrängt worden (65).

1.4.2.4 Flussabhängige Dilatation (FMD) der a. brachialis

Im Jahre 1992 wurde von Celermajer et al. (8) eine nichtinvasive Methode zur Erfassung der Endothelfunktion beschrieben. Dabei wurde die flussvermittelte Vasodilatation (FMD) der a. brachialis (auch die a. radialis und a. femoralis sind dafür geeignet) nach RH mittels hochauflösenden Ultraschalls beurteilt. Desweiteren konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen koronarer und peripherer endothelialer Funktion festgestellt werden (66; 67). Aber auch die klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren gehen mit einer Störung der peripheren Endothelfunktion einher. Daraus lässt sich folgern, dass diese Methode aufgrund der relativ einfachen Durchführung und ihres nichtinvasiven Charakters ein großes Potential zur Früherkennung der Atherosklerose bzw. der koronarer Herzkrankheit darstellt. Doch die fehlende Standardisierung dieses Tests und eine Vielzahl von Faktoren welche die FMD beeinflussen (siehe Tab. 4) stellen ein Problem dar.

Tabelle 4

Einige Faktoren, die Einfluss auf die FMD nehmen:

Arterien Durchmesser

Alter

Geschlecht (Menstruationszyklus)

Position der Blutdruckmanschette

Okklusionszeit

Körperliche Aktivität

Tageszeit

Temperatur

Medikamente, Vitamine

Koffein, Nikotin

Nahrungsaufnahme

Corretti et al. publizierte erstmals Richtlinien zur Messung der FMD an der a. brachialis (68). Es folgten mehrere Studien, in denen unterschiedliche technische Aspekte der Messung verglichen und Vorschläge zur Vereinheitlichung des Messverfahrens vorgestellt wurden (4; 9; 69; 70).

Die Messung selbst verläuft folgendermaßen: die Arterie wird über der Ellenbeuge longitudinal mit hochauflösendem Ultraschall (10-14 MHz) im B-Mode-Bild dargestellt (siehe Abb.18).

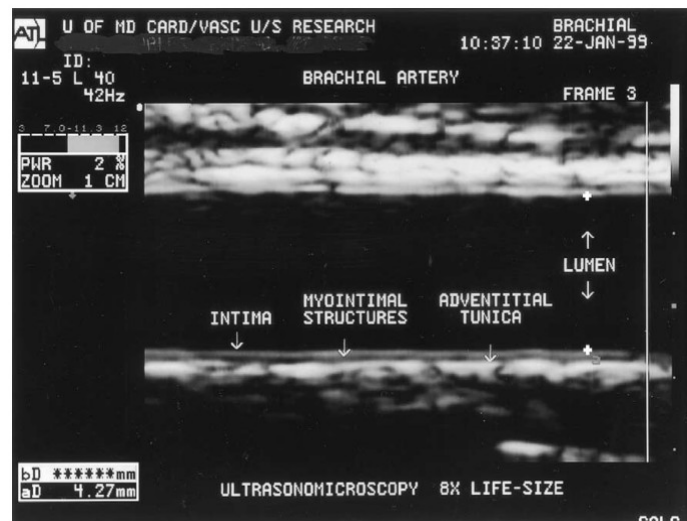


Abbildung 18: US-Bild der A. brachialis (longitudinal) 8x Vergrößert, Transducer-Frequenz 11 MHz, Kennzeichnung anatomischer Strukturen (68)

Die Positionierung der Blutdruckmanschette kann am Oberarm oder am Unterarm bzw. distal des US-Kopfes erfolgen. Es folgt eine suprasystolische Stauung (meist 5 min) mit nachfolgender RH und der damit verbundenen Steigerung des arteriellen Durchmessers. Die FMD errechnet sich danach, indem der Ausgangsdurchmesser mit dem Durchmesser während der RH verglichen wird.

$$FMD(\%) = \frac{(\text{Hyperämiedurchmesser} - \text{Ausgangsdurchmesser})}{\text{Ausgangsdurchmesser}} \times 100$$

Obwohl die Bestimmung der FMD eine vom Ablauf her einfach durchzuführende Untersuchung darstellt, ist sie derzeit für den routinemäßigen klinischen Gebrauch unzureichend validiert (71).

1.4.2.5 Plethysmographie

Bei dieser nichtinvasiven Methode zur Erfassung der peripheren mikrovaskulären Funktion werden Volumenschwankungen des Fingers im Rahmen der RH gemessen. Diese Volumenschwankungen können aufgrund geringer Druckunterschiede durch die periphere arterielle Tonometrie (PAT) anhand einer pneumatischen Fingersonde oder durch die optische Plethysmographie (OPG)

mittels unterschiedlicher Absorption infraroten Lichtes im Gewebe gemessen werden.

Die PAT wurde kürzlich in einigen Studien als prädiktive Methode zur kardiovaskulären Risikoeinschätzung untersucht (72-75). Die endotheliale Funktion wurde dabei durch den RH-PAT (reactive hyperemia peripheral arterial tonometry) Index ermittelt. Dieser wurde in den meisten Studien durch ein 1-Minuten-Intervall beginnend eine Minute nach Aufmachen der Blutdruckmanschette dividiert durch ein 3,5 Minuten-Intervall vor Staubeinbruch (baseline) errechnet. Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen niedrigem RH-PAT-Index und Endotheldysfunktion (73) sowie mit späten kardiovaskulären Ereignissen (74) gezeigt werden. Matsuzawa et al. zeigte eine signifikante Korrelation zwischen niedrigem RH-PAT-Index und ischämischer Herzkrankheit bei Frauen und Kuvin et al. verglich die PAT mit dem US der Brachialisarterie, wobei ein moderater, aber dennoch signifikanter Zusammenhang zwischen der FMD(%) und dem RH-PAT-Index bestand. Die PAT ist aber im Vergleich mit dem US technisch deutlich weniger aufwendig, kostengünstiger, benötigt geringe Messerfahrung und da das PAT-Signal durch einen automatischen Algorithmus analysiert wird besteht im Vergleich zur FMD-Messung praktisch keine Benutzer-Variabilität.

In unserem Versuch haben wir zur Erfassung der vaskulären Mikrozirkulation die OPG angewendet. Das Prinzip der OPG wird in der medizinischen Technik bei der Pulsoxymetrie, der vaskulären Diagnostik sowie bei der optischen akralen Druckmessung verwendet. Die OPG-Technologie benötigt nur wenige optisch-elektronische Komponenten: eine Lichtquelle zur Durchleuchtung des Gewebes und einen Photodetektor zur Messung kleiner Änderungen in der Lichtintensität, herbeigeführt durch den Perfusionsunterschied. Zur Durchleuchtung dient Licht mit roter oder naher infraroter Wellenlänge, wobei bei der Messung der Pulswellen Licht mit einer Wellenlänge von 805 nm verwendet wird, da dieses Licht in der Nähe des isosbestischen Punktes der Hämoglobin-/ Oxyhämoglobin-Absorptionskurven liegt und dadurch die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins einen unwesentlichen Einfluss auf das Signal haben soll. Das infrarote Licht dringt durch die Haut in das Gewebe ein und wird in Abhängigkeit der Blutfülle der

durchleuchteten Gewebsschichten reflektiert (siehe Abb. 19) und vom Photodetektor registriert (65; 76).

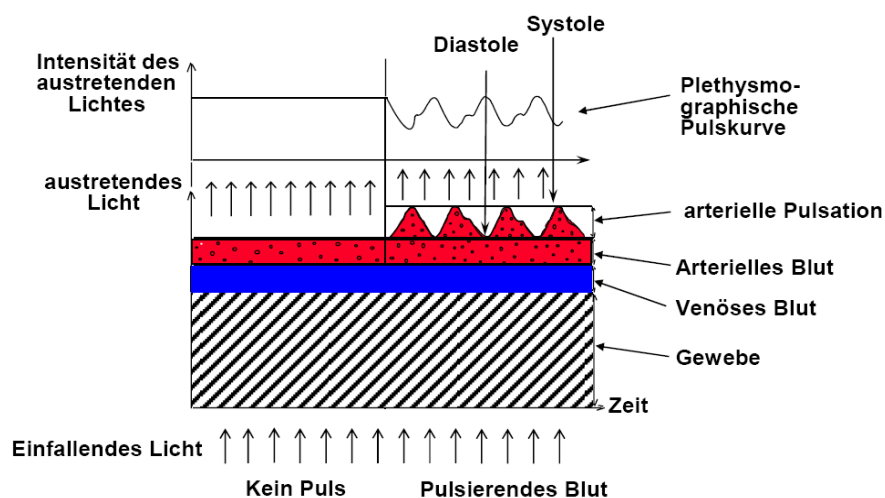


Abbildung 19: Prinzip der OPG – die Veränderung der Lichtabsorption erfolgt infolge der Veränderung des lokalen Blutvolumens durch die arterielle Pulsation (77)

Auch mit der OPG wurde in Studien die hämodynamische Funktion des Endothels auf verschiedene Vasodilatoren untersucht (78; 79) zit. n. (76).

Um Aussagen über die vasodilatatorische Reaktion bei der RH zu gewinnen, wird bei der OPG wie auch bei der PAT die Höhe der Pulswellenamplituden (PWA) während RH mit den Amplituden während der normalen Durchblutungsphase vor Staubeginn verglichen (siehe Abb. 20).

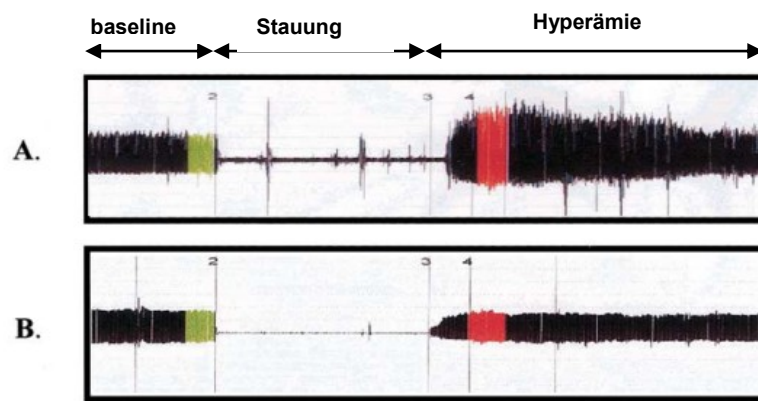


Abbildung 20: Aufnahmen der PWA mit PAT während der normalen Durchblutungsphase – baseline (grün), während der Stauung über dem systolischen Blutdruckwert und während Hyperämie (rot); A/ gesunder Proband ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren; B/ Proband mit KHK mit deutlich geringerem Amplitudenanstieg während RH; Modifiziert nach (72)

1.4.2.6 Laser-Doppler-Flowmetrie

Die Laser-Doppler-Flowmetrie (LDF) stellt eine weitere Methode zur Erfassung der mikrovaskulären Funktion dar und beruht auf dem Prinzip des Doppler-Effekts. Das ins Gewebe eingestrahlte Laserlicht, das bei der LDF verwendet wird, ist ein monochromatisches Licht einer definierten Wellenlänge und verändert seine Richtung, wenn es auf unbewegte Strukturen trifft, seine Frequenz bleibt dabei unverändert. Zu einer Frequenzverschiebung kommt es, wenn es auf sich bewegende Strukturen bzw. Blutteilchen trifft (Dopplerverschiebung). Dabei ist die Frequenzänderung von der Geschwindigkeit der sich bewegenden Zellen (im wesentlichen Erythrozyten) abhängig. Die Änderung der Amplitude und der Frequenz des Dopplersignals stellt also in vereinfachter Weise die Funktion der Geschwindigkeit und der Konzentration der Erythrozyten dar. Die Eindringtiefe des Laserlichts ist abhängig von den Eigenschaften des Gewebes wie Struktur und Dichte des Kapillarnetzes, Pigmentation, Oxygenierung sowie von der Wellenlänge und dem Abstand des Senders vom Empfänger der Laser-Doppler-Probe. Sie beträgt bei einer Wellenlänge von 780 nm und einem 0,25 mm Sender-Empfänger Abstand etwa 0,5 - 1 mm. Die Messung beschränkt sich dadurch auf die Mikrozirkulation mit den subpapillären Gefäßnetz und den, in die Bindegewebspapillen ziehenden, Blutkapillaren (80).

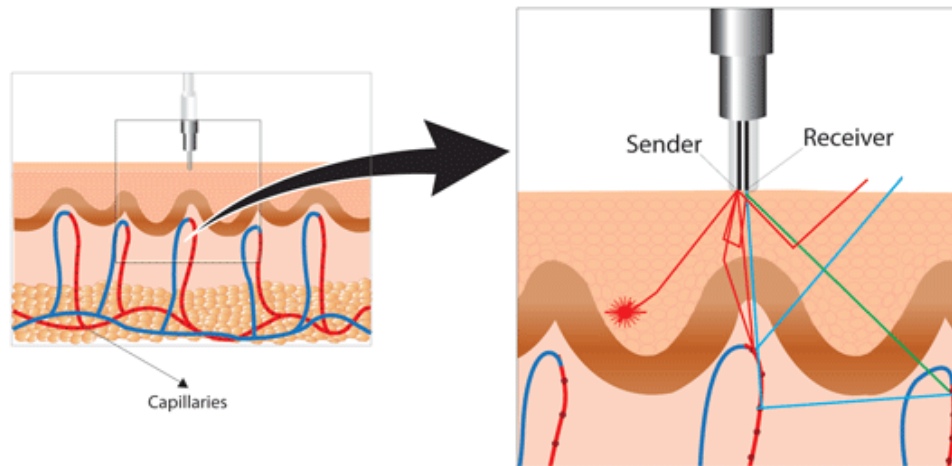


Abbildung 21: Messprinzip der LDF: monochromatisches Licht einer bestimmten Wellenlänge verändert seine Frequenz wenn es auf sichbewegende Strukturen trifft und wird vom Empfänger (Receiver) aufgenommen (80).

Auch bei fehlender Perfusion wird ein Dopplersignal gemessen, das auf die Brown'sche Molekularbewegung zurückzuführen ist. Der biologische Nullpunkt (biological zero) wird bei Stagnation der Perfusion, also während arterieller Stauung, erreicht. Der Fluss wird in relativen arbiträren Einheiten - „arbitrary units“ (AU) angegeben. Eine Angabe der absoluten Flussgrößen ist nicht möglich, da die Gefäßarchitektur, der lokale Hämatokrit, der Hämoglobingehalt, die Epidermisdicke und die exakte Eindringtiefe im Messbereich unbekannt sind (81). Der Hauptgrund für eine relativ schlechte Reproduzierbarkeit der LDF liegt in der Dichte des Kapillarnetzes, welche von einer Hautregion zur anderen variieren kann und daher zu signifikanten Unterschieden im Blutfluss führen kann (82).

1.5 Ziel der Diplomarbeit

Wie man der Literatur entnehmen kann, ist das Verfahren der PORH zur Auslösung der FMD, die als diagnostische Kenngröße der endothelialen Funktion gilt, gut etabliert.

Als klassische diagnostische Methode zur Erfassung der FMD gilt der mittels bildgebendem Ultraschalls bestimmte Durchmesser der a. brachialis.

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit soll die PORH, die implizit Informationen über die FMD enthält, näher untersucht werden, wobei die Wertigkeit und Praktikabilität zweier Messverfahren, der optischen Plethysmographie (OPG) und der Laser-Doppler-Flowmessung (LDF), überprüft werden sollen.

Da es sich bei der PORH um einen dynamischen Prozess handelt, sollen im Gegensatz zu den bisher angewandten Auswerteprozessen, die meist prozentuelle Änderungen von Kenngrößen (z.B. Durchmesser der a. brachialis) heranziehen, dynamische Charakterisierungsverfahren herangezogen werden.

Die beobachteten Zeitverläufe der PORH weisen beträchtliche Ähnlichkeit mit Blutspiegelkurven der Pharmakokinetik auf, da bei der Freisetzung und Verteilung vasodilatatorischer Substanzen Diffusions- und kinetische Prozesse ebenfalls eine wichtige Rolle spielen.

Daher ist es naheliegend, zur Auswertung der Kinetik der PORH-Reaktion, Methoden der Pharmakokinetik (PK) heranzuziehen.

Zur Auswertung der experimentell mittels beider zur Verfügung stehender Methoden erhobenen PORH-Reaktionen werden zwei Modellansätze der PK eingesetzt:

- Kompartiment-Ansatz („compartmental model“)
- Non-Kompartiment-Ansatz („non compartmental model“)

Die Parameter der jeweiligen Modellansätze sollen auf Basis der experimentellen Daten über Verfahren der Modell-Identifikation ermittelt und zueinander in Beziehung gesetzt werden.

Die Diplomarbeit soll dabei ausschließlich die grundlegende Eignung der verwendeten Methoden zur Signalerfassung und –auswertung überprüfen und keineswegs diagnostische Richtlinien erarbeiten („feasibility study“).

2 Material und Methoden

2.1 Versuchs-Kollektiv

An der Studie haben 20 gesunde Versuchspersonen, Studenten und Mitarbeiter am Institut, im Alter von 21- 62 Jahren teilgenommen, davon waren 8 weiblich und 12 männlich. Das mittlere Alter betrug 32,75 Jahre. Alle Personen wurden mittels Fragebogen nach Konsumverhalten bei Nikotin und Alkohol, nach dem Vorbestehen von Herz-Kreislaufkrankungen und deren familiärer Prädisposition befragt um mögliche Einflussfaktoren auf die PORH zu erfassen. Bei Frauen wurde auch der Zeitpunkt der letzten Regelblutung erhoben.

Insgesamt 18 Probanden waren Nichtraucher, keiner von ihnen nahm kreislaufstimulierende Medikamente ein oder hatte eine familiäre Vorbelastung in Bezug auf Herz-Kreislaufkrankungen.

Tabelle 5: Charakteristika der Probanden

	Mittelwert	Standardabw.
Geschlecht (m/w)	12/8	
Alter	32,75	12,18
Syst. RR	122,35	15,57
Diastol. RR	69,2	12,18
HFR	67,95	11,31
Größe (m)	1,75	0,12
BMI	23,02	2,47
Raucher/Nichtraucher	2/18	

2.2 Experimentelle Randbedingungen

Der Versuch wurde bei einer Raumtemperatur zwischen 23-25°C durchgeführt. Der Messbeginn erfolgte nach einer ca. 15 Minuten dauernden Akklimatisierungszeit der Probanden. Gemessen wurde in aufrechter, sitzender

Position am jeweils linken Arm, der am Tisch abgestützt war. Die Probanden wurden aufgefordert, sich während der Messung nicht zu bewegen, um Bewegungsartefakte zu vermeiden.

Am rechten Arm wurden, vor und nach dem PORH-Messprotokoll, der Blutdruck und die Herzfrequenz mit einem digitalen Blutdruckmonitor Critikon DINAMAP® 1846SX (ELSG, Deutschland) erfasst.

Am linken Arm wurde der Laser Doppler- Fluss (LDF) und das optische Plethysmographie – (OPG) -Signal gemessen. Dazu wurde die Sonde des LDF-Systems mittels doppelseitigen Kleberings am Unterarm, ungefähr 10-15 cm proximal des Handgelenks und der Sensor (Clip) für die Plethysmographie am Mittelfinger angebracht. Danach wurde die Blutdruckmanschette am Oberarm, mit dem unteren Manschettenrand ca. 2-3 cm oberhalb der Ellenbeuge, angelegt. Die Lagerung der zu vermessenen Hand erfolgte jeweils auf Herzniveau (siehe Abb. 22).

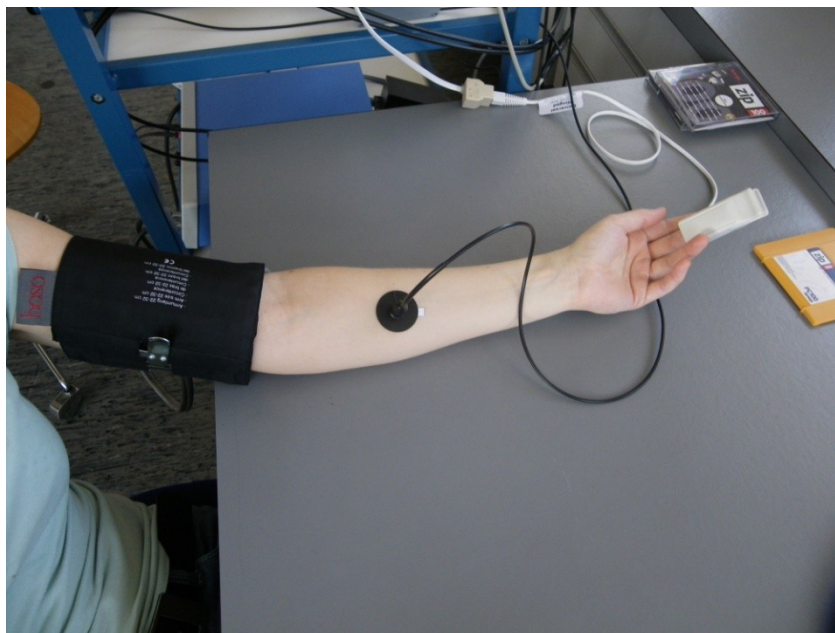


Abbildung 22: Messaufbau

Der Versuchsablauf bestand aus einer Vorlaufzeit zur Erfassung der Ruhedurchblutung (die erste Minute wurde jeweils aufgezeichnet), danach wurde die Blutdruckmanschette auf 50mmHg über dem davor gemessenen systolischen Blutdruckwert aufgeblasen. Es folgte die 10 Minuten dauernde arterielle

Okklusion, anschließend erfolgte das Ablassen der Blutdruckmanschette mit der darauf folgende PORH bzw. Nachlaufzeit (siehe Abb.23).

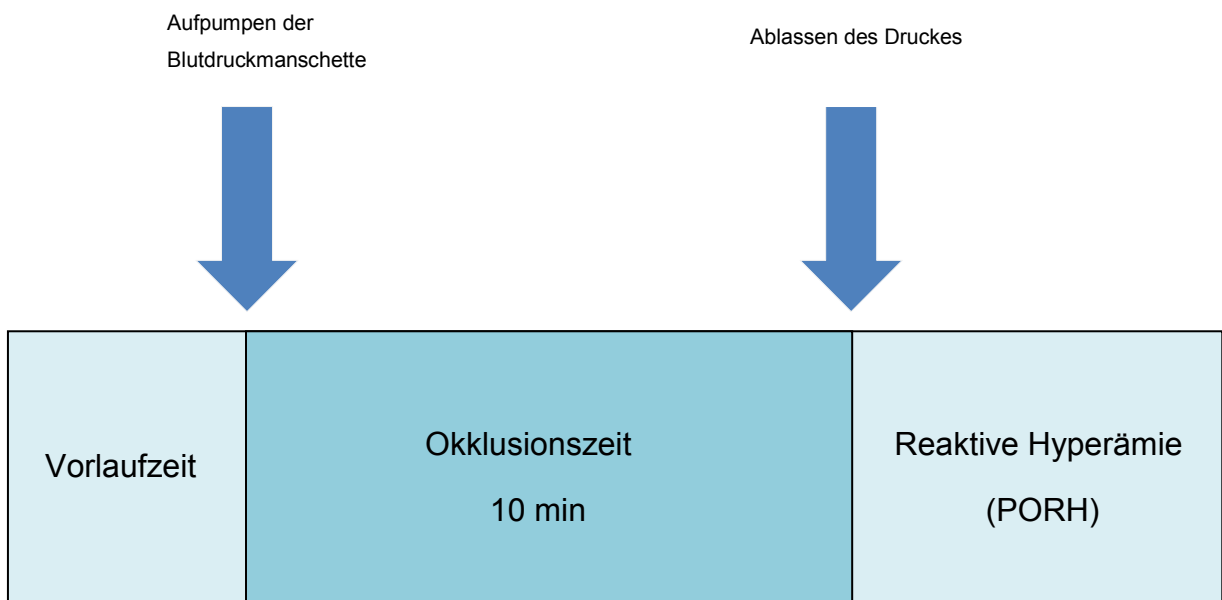


Abbildung 23: Versuchsablauf

2.3 Verwendete Messgeräte/-Systeme

Die Messung der Perfusion erfolgte mittels des PeriFlux® System 5000 (PERIMED®, Schweden), welches anhand der „Dopplershift“ des eingestrahlten Laserlichts die Strömungsgeschwindigkeit des Blutes in den Hautgefäßen angibt.

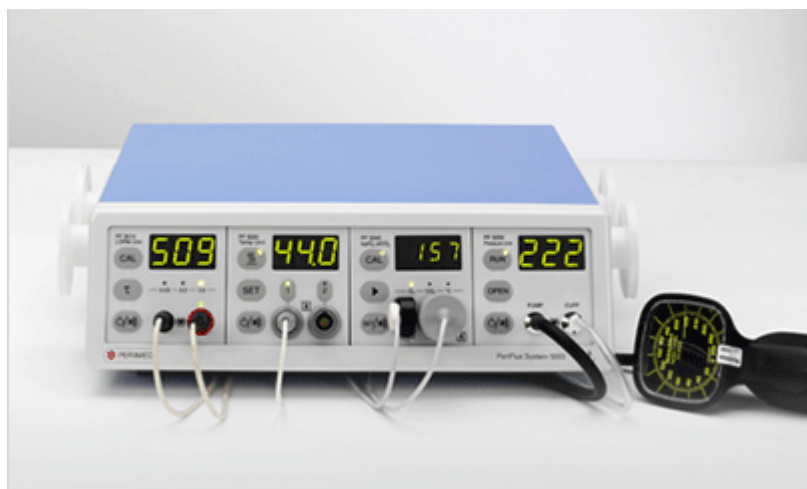


Abbildung 24: Periflux System 5000 (83)

Die Messung der plethysmografischen Signale („Volumenpulse“) erfolgte mittels eines modifizierten Oximetersensors (Eigenanfertigung, siehe Abb. 25), dabei wurde das veränderte Lichtsignal des infraroten Lichtes einer Luminiszenzdiode, das infolge der veränderten Menge an Blut im Gewebe während der Pulsation entstand, durch einen Photodetektor erfasst. Der Photodetektor wandelt das Licht in elektrischen Strom und ein Transimpedanzverstärker wandelt den Eingangsstrom in eine proportionale Ausgangsspannung.



Abbildung 25: Oximetersensor

Aus den Pulssignalen erfolgte die Berechnung des gleitenden Effektivwerts (quadratischen Mittelwerts) nach folgender Beziehung:

$$QMW(t) = \sqrt{\frac{1}{\tau} \int_0^{\tau} u^2(\xi) \cdot e^{-\frac{t-\xi}{\tau}} d\xi}$$

Die Erfassung des Kompressionsdrucks erfolgte mittels einer Blutdruck-Pumpvorrichtung mit Manometer, diese war an das Periflux 5000 System angeschlossen, in dem über einen elektronischen Druckwandler der Manschettendruck erfasst wurde.

2.4 Methoden zur Datenerfassung

Das Drucksignal, das OPG-Signal und das LDF-Signal wurden einem PC-gestützten Datenerfassungssystem (siehe Abb. 26) mit integriertem Analog-Digital-Konverter zugeführt. Das Datenerfassungssystem ermöglichte die Digitalisierung der Daten, die Datenvorverarbeitung sowie die Datenspeicherung (siehe Abb. 27).

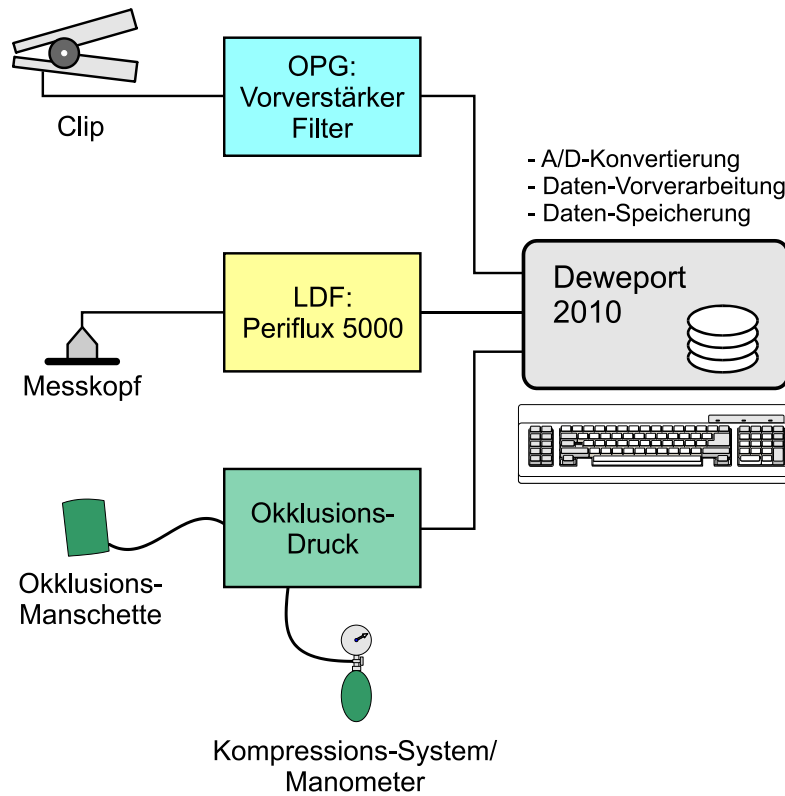


Abbildung 26: Prinzip der Datenerfassung



Abbildung 27: PC-gestütztes Datenerfassungssystem

Auf dem Datenerfassungssystem war eine graphische Software (DASyLab, National Instruments) installiert, in der ein Programmmodul zur Datenerfassung und Speicherung realisiert wurde (siehe Abb. 28).

Die Daten wurden mit einer Abtastrate von 200 Hz digitalisiert.

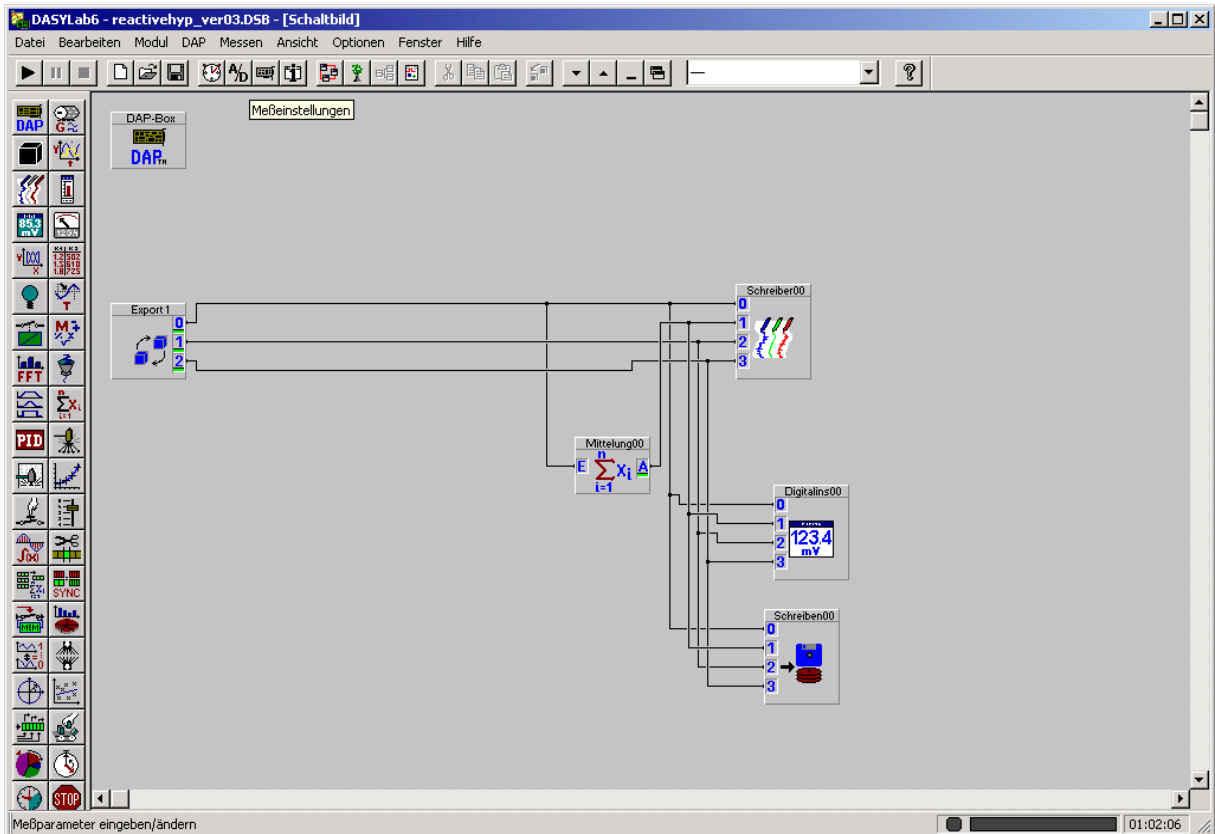


Abbildung 28: Grafische Software – Schaltbild zur Datenerfassung und -speicherung

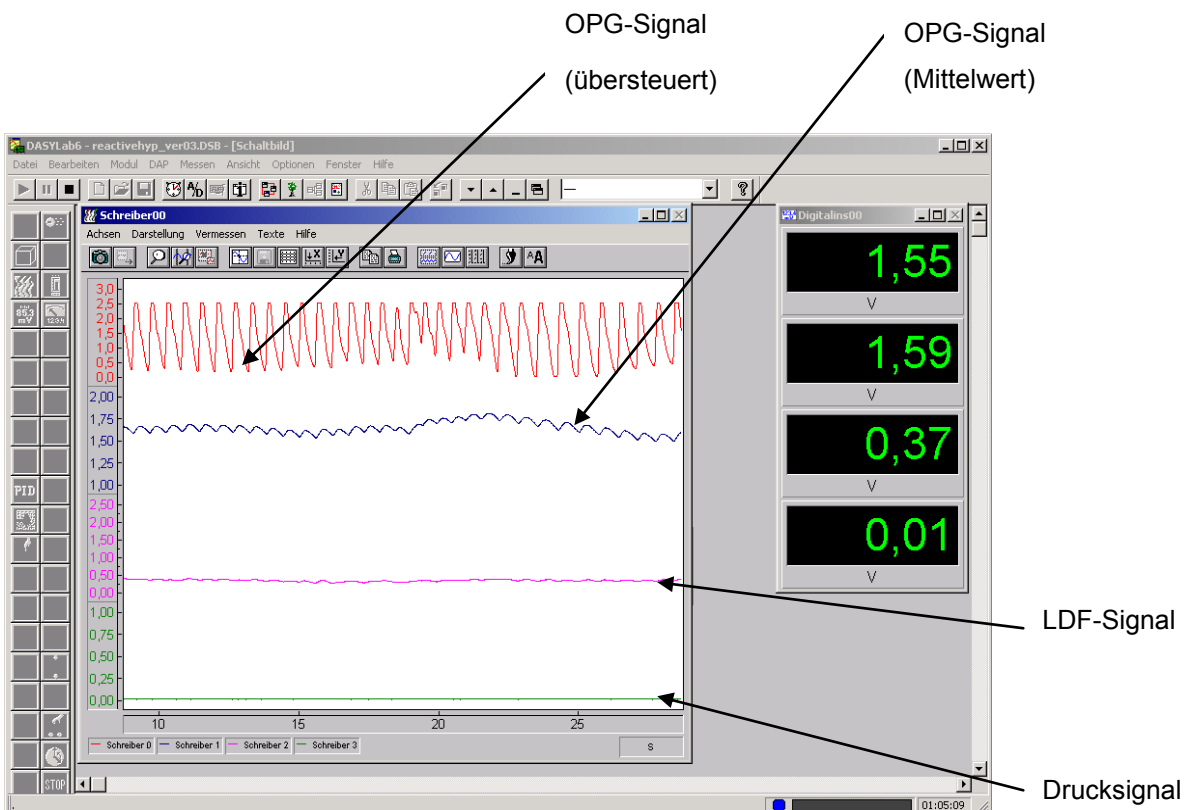


Abbildung 29: Digitale Erfassung der Signale und Anzeige

Die kontinuierlich anfallenden Daten wurden am Datenerfassungs-System abgespeichert. Diskontinuierlich anfallende Daten wurden handschriftlich festgehalten, danach ins Office Excel- (Microsoft, USA) übertragen und dort ausgewertet und analysiert.

Vor der Auswertung der Zeitsignale von OPG und LDF wurde eine Datenvorverarbeitung eingeschoben.

Diese bestand aus einer Reduktion der Datenpunkte auf ein äquidistantes Zeitraster von einer Sekunde und einer Glättung der Daten über Bildung eines gleitenden Mittelwerts über jeweils 10 Datenpunkte. Die Vorverarbeitung wurde mittels der Software „Flexpro“ (Scientific solutions, CH) durchgeführt.

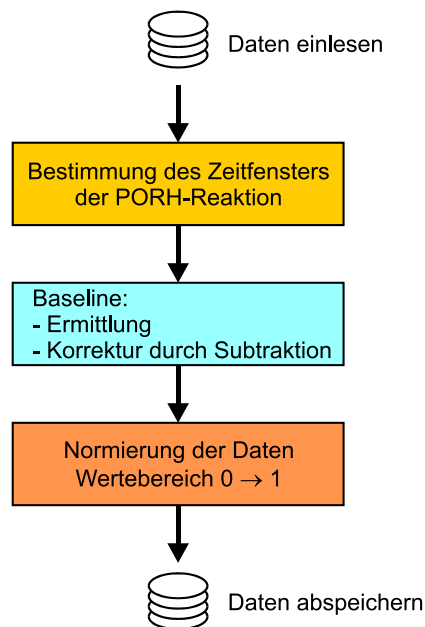


Abbildung 30: Ablauf der Daten-Vorverarbeitung

2.5 Bestimmung der Parameter bei PORH

Als Vorlage zur Errechnung der grundlegenden Parameter zur Quantifizierung der PORH, wurde bei der OPG, wie schon in der Einleitung (siehe Kap. 1.4.2.5) beschrieben, der RH-PAT-Index ermittelt und analog dazu, bei der LDF, der prozentuelle Anteil der hyperämischen Reaktion.

Auch bei unseren Daten versuchten wir die prozentuellen Änderungen der PORH-Parameter zu charakterisieren. Dabei wurde bei der LDF der prozentuelle Anteil der hyperämischen Reaktion ($PORH_{\%}$) anhand folgender Formel errechnet (84):

$$PORH_{\%} = \frac{PORH_{peak} - \text{Mittelwert der Ruhedurchblutung}}{\text{Mittelwert der Ruhedurchblutung}} \times 100$$

$PORH_{peak}$ stellt dabei die Amplitude des maximalen Durchflussanstiegs während der PORH und „mean baseline perfusion flux“ den Mittelwert der Ruhedurchblutung (baseline), errechnet aus einer Minute Vorlaufzeit, dar.

In analoger Weise wurde auch bei der OPG der prozentuelle Anteil der PORH errechnet.

Die Ergebnisse sollten zum direkten Vergleich beider Methoden dienen und eine Aussage über deren Reproduzierbarkeit liefern.

2.6 Normierung der Daten vor Modellanpassung

Aus den im Flexpro-Programm gefilterten Daten wurde in weitere Folge ein Zeitfenster, das die gesamte PORH-Reaktion umfasste, ausgewählt. Als Zeitbeginn wurde das Öffnen der Blutdruckmanschette festgelegt und der Mittelwert der Okklusionszeit wurde bei jedem Datensatz subtrahiert. Die Normierung erfolgte, indem die Daten durch den jeweils maximalen Wert der hyperämischen Reaktion, geteilt wurden.

$$\text{Normierte Daten} = \frac{\text{OPG- bzw. LDF-Signal} - \text{Mittelwert der Okklusionszeit}}{\text{maximaler OPG bzw. LDF-Wert}}$$

Die erhaltenen Daten wurden in dieser Form zur pharmakokinetischen Datenanalyse weitergeführt.

2.7 Datenanalyse/Signalanalyse

Die weitere Bearbeitung der Daten erfolgte mittels zweier Programme zur pharmakokinetischen (PK) Datenanalyse über einen „compartmental“- (Kompartiment-Modell, CM) wie auch einen „non-compartmental“- (Nicht-Kompartiment-Modell) Ansatz. Die PK Parameter des Nicht-Kompartiment-Modells (non-compartment-model, NCM) wurden mittels PKsolver, einem frei zugänglichem „Add-in“ Programm für Microsoft Excel, errechnet (85). Die PK

Parameter des Zwei-Kompartiment-Modells wurden mittels MATLAB (MathWorks, USA) über nichtlineare Regression ermittelt.

2.7.1 Kompartiment-Modell

Der Kurvenverlauf einzelner Messungen beider Messmethoden zeigte während der PORH einen annähernd biexponentiellen Verlauf (siehe Abb. 38 und 39). Dieser Verlauf ist in pharmakokinetischer Hinsicht für das Zwei-Kompartiment-Modell nach Injektion einer Substanz ins Kompartiment 1 charakteristisch. Es folgte die Überlegung aus unseren Daten, die aus den Messungen hervorgegangen sind, PK Parameter anhand dieses Kompartiment-Modells zu errechnen. Die Kurvenverläufe unserer Messungen sollten dabei die Plasmakonzentrationen einer hypothetischen Substanz bzw. von NO, da dieses primär den Mechanismus der PORH vermitteln sollte, darstellen. Die Annahme eines CM nach Injektion einer Substanz ins Kompartiment 1 begründete sich in physiologischer Hinsicht dadurch, dass die vasodilatierenden Substanzen in den Endothelzellen gebildet werden, ins Blutplasma gelangen und danach über unterschiedliche Wege abgebaut werden. Dabei stellen die Endothelzellen und das Blutplasma zwei unterschiedliche Kompartimente dar (Abb. 29).

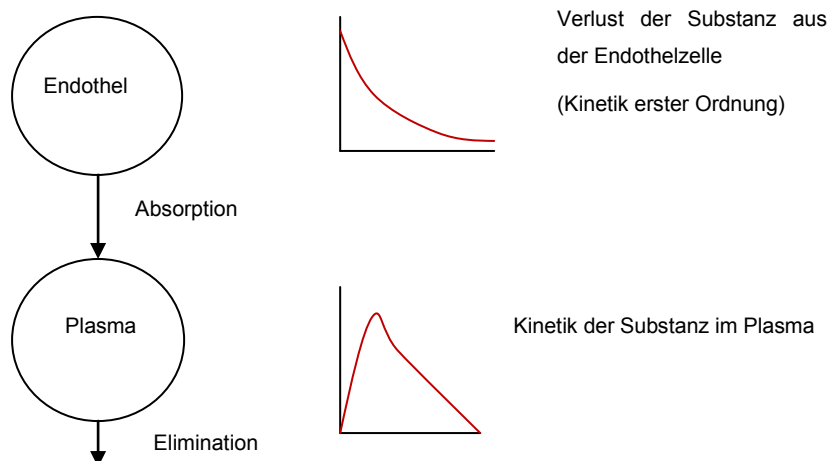


Abbildung 31: Schematische Darstellung des Kompartiment-Modells, mit Darstellung des Substanzverlustes aus der Zelle als Exponentialfunktion und des Zeitverlaufs der Plasmakonzentration als eine Differenz zweier Exponentialfunktionen (Absorptions- und Eliminationsrate) → bi-exponentieller Verlauf. Modifiziert nach (86)

Bei der Kinetik erster Ordnung ist die Änderungsgeschwindigkeit der Plasmakonzentration $dC(t)/dt$ direkt proportional der jeweils vorhandenen Konzentration $C(t)$.

$$\frac{dC(t)}{dt} = -k \cdot C(t)$$

Dabei ist k die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung und gibt die Substanzmenge an, die pro Zeiteinheit abgebaut wird (Eliminationskonstante). Nach Integration der Formel erhält man eine Exponentialfunktion (Konzentration zum Zeitpunkt t):

$$C(t) = C_0 \cdot e^{-k \cdot t}$$

In halblogarithmischer Darstellung ergibt die Kinetik erster Ordnung eine Gerade mit der Steigung $-k$ und dem Interzept auf der Ordinate bei $\ln C_0$.

$$\ln C(t) = \ln C_0 - k \cdot t$$

Die biologische Halbwertszeit ($t_{1/2}$) ist die Zeit, die benötigt wird um die Substanz auf die Hälfte ihres ursprünglichen Wertes zu reduzieren und ist umgekehrt proportional zur Geschwindigkeitskonstante ($t_{1/2} = \ln 2/k$).

In unserem Fall zeigen die Kurvenverläufe einen biexponentiellen Verlauf. Dabei handelt es sich um eine Differenz zweier Exponentialfunktionen multipliziert mit einer Konstante. Die Bateman-Funktion ist die mathematische Beziehung, die dieses vereinfachte Modell der Absorption/Invasion und Elimination, in Abhängigkeit von der Zeit beschreibt.

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

$C_p(t)$	Plasmakonzentration
V_d	Verteilungsvolumen
D	Dosis
F	Fraktion der verabreichten Dosis, die resorbiert wird
k_a	Absorptions-/ Invasionskonstante
k_e	Eliminationskonstante

Die Berechnung der Modellparameter erfolgte im MATLAB-Programm, dabei wurde die Bateman-Funktion an den Kurvenverlauf unserer Messungen über nichtlineare Regression angepasst.

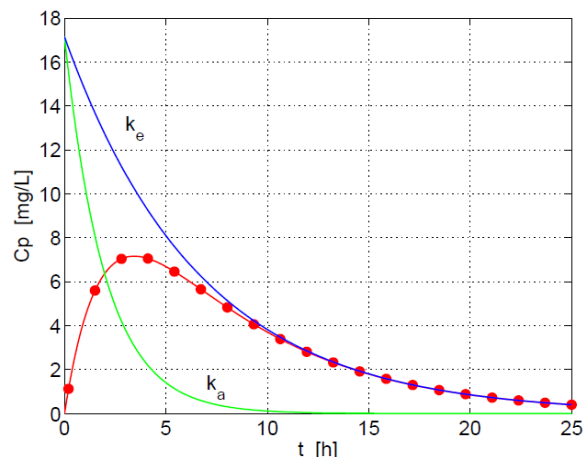


Abbildung 32: Bateman-Funktion (89)

2.7.2 Nicht-Kompartiment-Modell

Als zweiter Ansatz erfolgte die Analyse der Daten im NCM. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass keine Zuordnung zu einer bestimmten Kompartiment-Modell-Struktur nötig ist. Die Bezeichnung als „modellunabhängig“ ist dabei dennoch irreführend, da es sich auch beim NCM im Grunde um ein definiertes Modell mit einer bestimmten Struktur handelt (siehe Abb. 33). Vorteilhaft ist das NCM hauptsächlich deshalb, da eine beliebige Anzahl von Substanzrezirkulationen („recirculations“) mit unterschiedlichen nichtzentralen Speichern erfolgen kann, ohne diese einer spezifischen physiologischen Struktur zuordnen zu müssen (87).

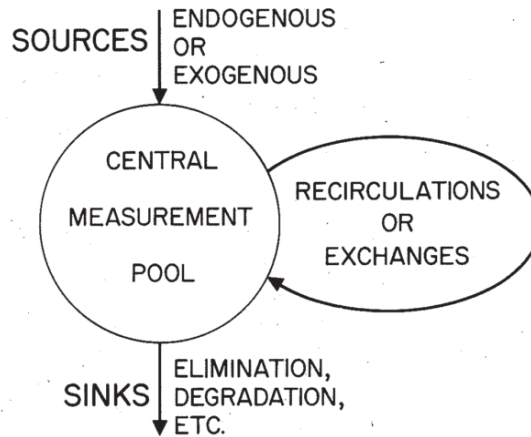


Abbildung 33: Schematische Darstellung des NCM (87)

Bei dem NCM wird zur Bestimmung der kinetischen Parameter die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) mittels der Trapezregel errechnet.

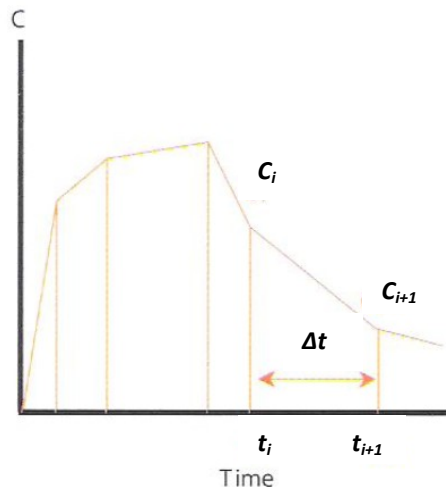


Abbildung 34: Grafische Darstellung der Trapezregel. $AUC_{\Delta t}$ ist die Fläche unter der Kurve zwischen t_i und t_{i+1} , C_i und C_{i+1} sind die korrespondierenden Plasmakonzentrationen und Δt ist das Zeitintervall. (86)

Für diese Berechnung der AUC (AUC-t) von 0 bis t_{last} (Zeitpunkt der letzten Messung) gilt folgende Beziehung:

$$AUC_0^{t_{last}} = \sum_{i=1}^n \frac{C_i + C_{i+1}}{2} \cdot \Delta t$$

Für die Berechnung der eigentlichen AUC (AUC-inf) ist dabei die Extrapolation der Kurve, von der letzten Messung (t_{last}) bis ins Unendliche ($t=\infty$), nötig.

$$AUC_{t_{last}}^{\infty} = \int_{t_{last}}^{\infty} C_{last} \cdot e^{-\lambda_z(t-t_{last})} dt = C_{last} \left[\frac{e^{-\lambda_z(t-t_{last})}}{-\lambda_z} \right]_{t_{last}}^{\infty} = C_{last} \left[0 - \frac{1}{-\lambda_z} \right] = \frac{C_{last}}{\lambda_z}$$

$$AUC_{inf} = AUC_0^{\infty} = AUC_0^{t_{last}} + AUC_{t_{last}}^{\infty}$$

C_{last} und λ_z sind die letzte gemessene Plasmakonzentration und der terminale Abfall (terminal slope) in einer halblogarithmischen Darstellung. λ_z entspricht der Eliminationskonstante (k_e) im CM.

Diese werden über lineare Regression aus den logarithmierten Konzentrationsdaten bestimmt (siehe Abb. 35).

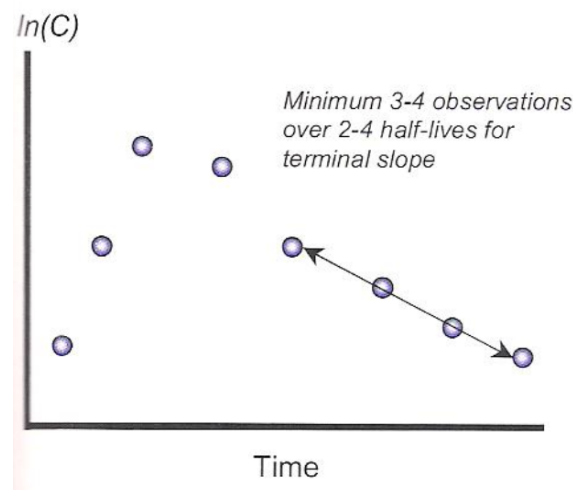


Abbildung 35: Halblogarithmische Darstellung zur Schätzung von λ_z – die terminalen Datenpunkte in log-linearer Regression (86)

Die HWZ stellt, wie im CM, den Quotient aus dem natürlichen Logarithmus von 2 und λ_z dar.

$$HWZ = \frac{\ln 2}{\lambda_z}$$

Alle zuvor beschriebenen PK-Parameter wurden mittels des Add-In Programms „PKSolver“ für Microsoft Excel ermittelt.

2.8 Statistische Auswertung/ Gegenüberstellung

Die statistische Analyse wurde mit dem Softwarepaket MedCalc (MedCalc Software, Mariakerke/B) durchgeführt. Als Testverfahren wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummentest für gepaarte

Stichproben angewandt. Im Vergleich standen die Pharmakokinetik-Parameter (des CM sowie des NCM), die mittels LDF und OPG gemessen wurden. Dabei wurden die Invasionskonstanten (k_a), die Eliminationskonstanten (k_e) sowie die Halbwertszeiten (HWZ), die aus den Messungen mit der LDF hervorgegangen sind, mit denen der OPG verglichen.

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

3 Ergebnisse

3.1 Beispiele von Einzelergebnissen

Die folgenden Diagramme sind Beispiele einzelner Messungen mittels LDF und OPG. An beiden Beispielen ist der Ruheblutfluss (baseline), die Phase der Okklusion (occlusion) und die Phase nach der Stauung (postocclusion) gut erkennbar (Abb. 34 und 35).

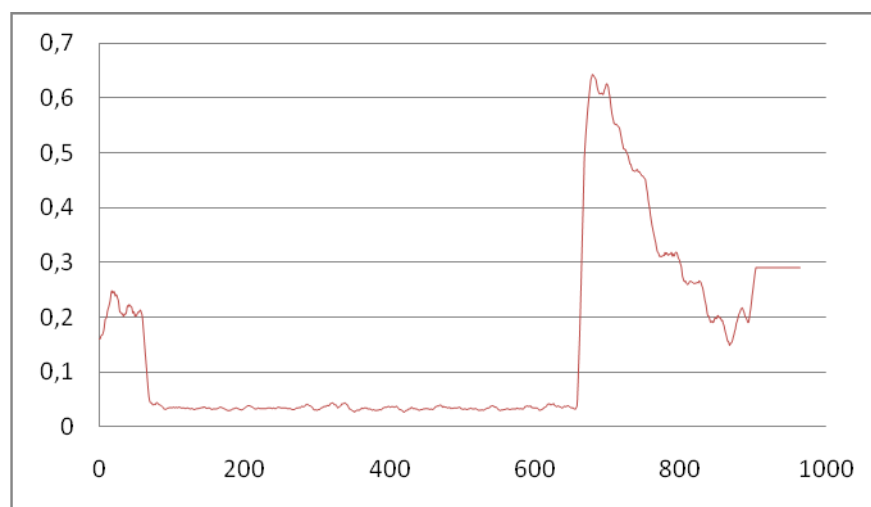


Abbildung 36: Messung mittels LDF (Abszissenachse – Zeit in Sekunden, Ordinatenachse – Spannung in Volt)

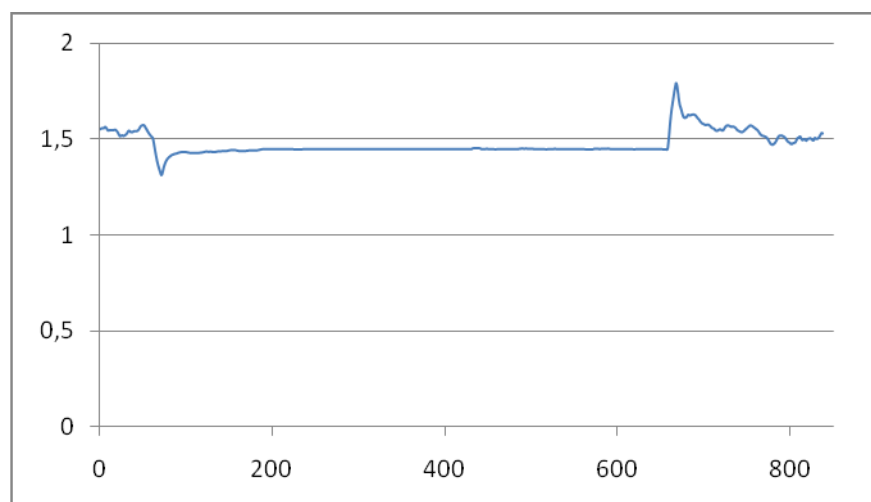


Abbildung 37: Messung mittels OPG (Abszissenachse – Zeit in Sekunden, Ordinatenachse – Spannung in Volt)

In den Abbildungen 36 und 37 sind Beispiele der normierten Daten vor der Modellanpassung dargestellt.

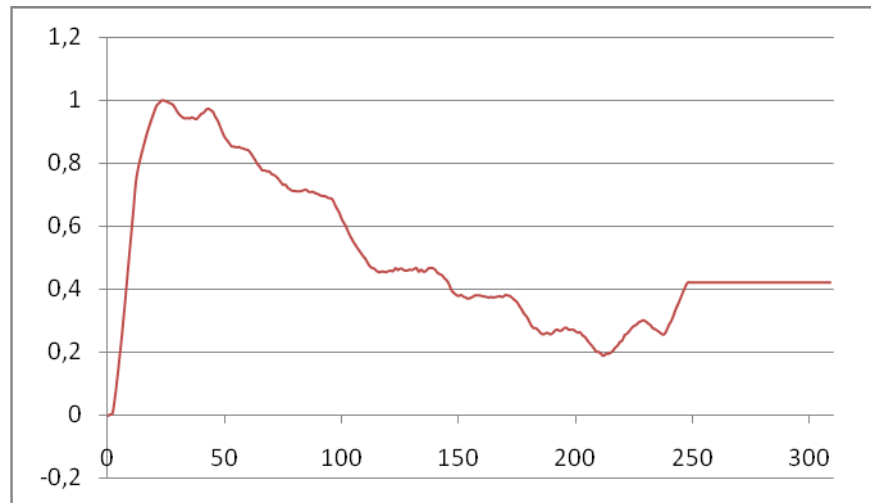


Abbildung 38: LDF – normiert

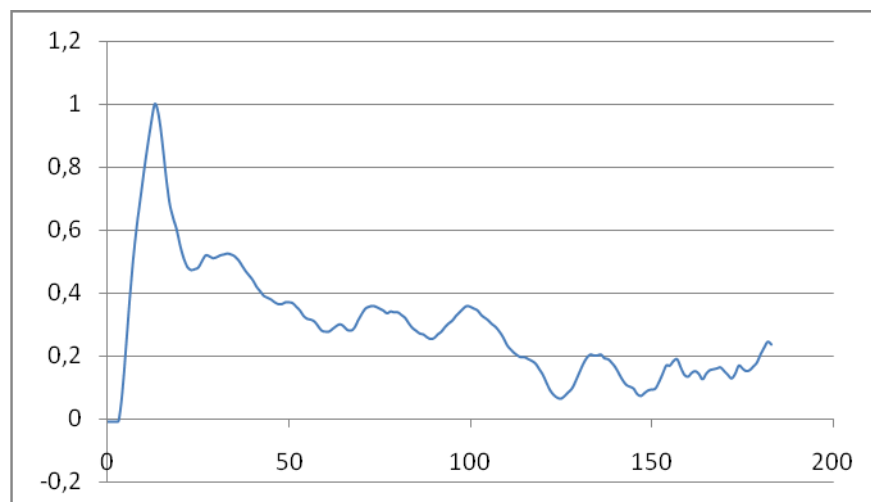


Abbildung 39: OPG – normiert

3.2 Gruppenergebnisse

3.2.1 Parameter der PORH

Die folgenden Tabellen (Tab. 6 und 7) stellen die zusammengefassten numerischen Werte einzelner Messungen (Beispiele siehe Abb. 36 und 37) dar. Unter „baseline“ ist der Mittelwert des Ruheblutflusses angegeben, errechnet aus einer Minute Vorlaufzeit. $PORH_{peak}$ kennzeichnet bei der LDF die Amplitude des maximalen Durchflussesanstiegs. Bei der OPG ist unter OPG_RH der Mittelwert, der aus einer Minute nach Öffnen der Blutdruckmanschette (postocclusion) errechnet wurde, angegeben. Der prozentuelle Anteil der hyperämischen Reaktion ($PORH_{\%}$) wurde anhand der Formel, wie schon im Kap. 2.5 beschrieben, errechnet.

Bei beiden Messmethoden ist die Zeit vom Öffnen der Manschette bis zum Erreichen des maximalen Durchflussesanstiegs angegeben (t_{max}).

<i>ID</i>	<i>baseline</i>	<i>PORH_{peak}</i>	<i>PORH_%</i>	<i>T_{max} [s]</i>
LDF_1	0,21	0,642	205,14	23
LDF_2	0,21	0,5	137,83	27
LDF_3	0,09	0,506	432,17	32
LDF_4	0,15	0,4842	217,75	40
LDF_5	0,22	0,5	118,67	42
LDF_6	0,07	0,556	699,02	50
LDF_7	0,15	1,192	661,81	31
LDF_8	0,24	0,899	273,4	37
LDF_9	0,13	0,654	376,76	29
LDF_10	0,14	0,78	428,05	53
LDF_11	0,16	0,884	435,07	21
LDF_12	0,45	0,596	31,36	62
LDF_13	0,09	0,643	619,78	37
LDF_14	0,06	0,422	516,58	18
LDF_15	0,05	0,586	966,13	35
LDF_16	0,13	0,538	305,36	36
LDF_17	0,19	0,85	351,2	31
LDF_18	0,13	0,671	412,39	22
LDF_19	0,13	0,585	339,43	20
LDF_20	0,24	0,637	163,57	74
MW	0,165	0,656	384,57	36
Median	0,145	0,6165	363,98	33,5
STABW	0,088	0,184	227,25	14,55

Tabelle 6: Parameter der LDF (Ruhedurchblutung – „baseline“ bzw. „mean baseline perfusion flux“, $PORH_{peak}$ – Amplitude des maximalen Durchflussesanstiegs, t_{max} – Zeit vom Ablassen des Manschettendrucks bis zum Erreichen von $PORH_{peak}$, $PORH_{\%}$ – prozentueller Anteil der hyperämischen Reaktion)

ID	baseline	OPG_RH	PORH%_OPG	T _{max} [s]
OPG_1	1,46	1,545	5,82	40
OPG_2	1,46	1,553	6,37	13
OPG_3	1,54	1,556	1,04	32
OPG_4	1,54	1,603	4,09	13
OPG_5	1,5	1,609	7,27	30
OPG_6	1,43	1,543	7,9	50
OPG_7	1,32	1,391	5,38	27
OPG_8	1,66	1,723	3,79	24
OPG_9	1,51	1,61	6,62	132
OPG_10	1,5	1,571	4,73	13
OPG_11	1,55	1,601	3,29	13
OPG_12	1,47	1,567	6,6	37
OPG_13	1,48	1,599	8,04	36
OPG_14	1,54	1,699	10,32	29
OPG_15	1,51	1,646	9,01	35
OPG_16	1,49	1,588	6,58	13
OPG_17	1,53	1,647	7,65	33
OPG_18	1,49	1,568	5,23	13
OPG_19	1,47	1,579	7,42	13
OPG_20	1,56	1,579	1,22	24
MW	1,5	1,59	5,59	31
Median	1,5	1,5835	6,47	28
STABW	0,064	0,067	2,41	26,269

Tabelle 7: Parameter der OPG (baseline - Ruhedurchblutung, OPG_RH – Mittelwert aus einer Minute PORH, t_{max} - Zeit vom Ablassen des Manschettendrucks bis zum Erreichen der Amplitude des maximalen Durchflusses, PORH%_OPG - prozentueller Anteil der hyperämischen Reaktion)

3.2.2 Ergebnisse der pharmakokinetischen Datenanalyse im Kompartiment- und im Nicht-Kompartiment-Modell

3.2.2.1 „Compartmental model“- Ansatz

Nach PK Datenanalyse wurden anhand des 2-Kompartiment-Modells folgende Parameter errechnet (siehe Tab. 8 und 9). Dargestellt sind die Invasionskonstante (k_a), die Eliminationskonstante (k_e), die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve vom Anfang bis Ende der Messung (AUC_m), die Fläche unter der Kurve von Anfang der Messung (t=0) bis zum Zeitpunkt t=∞ (AUC, „area under the curve“) sowie die Halbwertszeit (t_{1/2}). Die Berechnung aller dargestellten Daten wurde im Kap. 2.7.1 erläutert. Einige Datensätze zeigten starke Artefakte und konnten im CM nicht regelrecht angepasst werden oder lieferten fehlerhafte Ergebnisse.

<i>ID</i>	<i>k_a [1/s]</i>	<i>k_e [1/s]</i>	<i>AUC_m</i>	<i>AUC</i>	<i>t_{1/2} [s]</i>
LDF1	0,1328	0,0082	119,79	148,54	84,53
LDF2	(0,1287)	(0,0056)	(157,93)	(217,73)	(123,77)
LDF3	(0,0700)	(0,0136)	(90,78)	(108,38)	(50,96)
LDF4	0,1143	0,0097	106,19	131,96	71,46
LDF5	0,0929	0,0037	191,95	330,59	187,34
LDF6	(0,0324)	(0,0164)	(101,02)	(110,13)	(42,26)
LDF7	0,0341	0,0135	107,72	125,5	51,34
LDF8	0,0573	0,0069	130,96	168,12	100,45
LDF9	(0,0502)	(0,0101)	(121,99)	(146,69)	(68,63)
LDF10	0,0516	0,0048	141,18	256,82	144,41
LDF11	0,0697	0,0283	58,33	61,24	24,49
LDF12	(0,0409)	(0,9087)	(0,21)	(0,20)	(0,76)
LDF13	0,0584	0,0092	118,17	135,76	75,34
LDF14	0,1008	0,0196	59,77	66,95	35,36
LDF15	0,0309	0,0309	74,19	81,16	22,43
LDF16	0,0293	0,0293	72,08	81,57	23,66
LDF17	0,0806	0,0088	119,54	137,87	78,77
LDF18	fehlerhaft	0,0111	85,34	99,75	62,44
LDF19	0,1548	0,0086	103,41	132,66	80,6
LDF20	fehlerhaft		(133,34)		(20,69)
MW	0,0775	0,0138	106,33	139,89	74,474
Median	0,0697	0,00945	106,96	132,31	73,4
STABW	0,03985	0,009348	35,924	74,02	46,796

Tabelle 8: PK Parameter des CM – LDF (k_a - Invasionskonstante, k_e – Eliminationskonstante, AUC_m - Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve von Anfang bis Ende der Messung, AUC – Fläche unter der der Konzentrations-Zeit-Kurve von Anfang der Messung bis ins Unendliche, $t_{1/2}$ - Halbwertszeit; die eingeklammerten Ergebnisse wurden nicht statistisch analysiert)

ID	k_a [1/s]	k_e [1/s]	AUCm	AUC	$t_{1/2}$ [s]
OPG1	0,2202	0,0023	(170,42)	(337,26)	(301,37)
OPG2	(0,3888)	(0,0198)	(53,27)	(53,73)	(35,01)
OPG3	(0,2108)	(0,0032)	(87,07)	(200,82)	(216,61)
OPG4	(0,7942)	0,0118	53,71	61,34	58,74
OPG5	0,1568	0,0119	59,69	63,44	58,25
OPG6	(0,1555)	(0,3153)	(4,07)	(4,05)	(2,2)
OPG7	0,0396	0,0396	44,66	44,94	17,5
OPG8	0,1527	0,0048	115,54	172,27	144,41
OPG9	(0,0175)	(1,1620)	(1,32)	(1,36)	(0,6)
OPG10	0,1609	0,0186	48,43	50,19	37,27
OPG11	0,2120	0,0085	61,24	95,09	81,55
OPG12	(0,1030)	(0,0053)	(105,69)	(154,92)	(130,78)
OPG13	0,0527	0,0227	70,29	70,81	30,54
OPG14	0,1066	0,0092	67,92	104,17	75,34
OPG15	0,0665	0,0140	68,08	85,07	49,51
OPG16	0,1519	0,0315	33,81	34,62	22,0
OPG17	0,0597	0,0084	99,66	117,19	82,52
OPG18	0,1984	0,0200	39,86	41,13	34,66
OPG19	0,2286	0,0578	22,87	22,85	11,99
OPG20			fehlerhaft		(61,34)
MW	0,139	0,0187	60,44	74,09	54,175
Median	0,153	0,013	59,69	63,44	49,511
STABW	0,06742	0,01526	25,44	40,765	36,0395

Tabelle 9: PK Parameter des CM – OPG (k_a - Invasionskonstante, k_e – Eliminationskonstante, AUCm - Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve von Anfang bis Ende der Messung, AUC – Fläche unter der der Konzentrations-Zeit-Kurve von Anfang der Messung bis ins Unendliche, $t_{1/2}$ - Halbwertszeit; die eingeklammerten Ergebnisse wurden nicht statistisch analysiert)

3.2.2.2 “Non-compartmental model” - Ansatz

Die Errechnung vergleichbarer PK Parameter anhand eines NCM ergab folgende Ergebnisse. Die Messungen der LDF und OPG sind getrennt dargestellt (Tab. 9 und 10). Wie schon im CM wurden gemessen: die AUC vom Zeitbeginn ($t=0$) bis Ende der Messung (AUC-t), die AUC vom Zeitpunkt $t=0$ bis $t=\infty$ (AUC-inf), die Eliminationskonstante (λ_z) sowie die Halbwertszeit ($t_{1/2}$).

ID	AUC-t	AUC-inf	λ_z [1/s]	$t_{1/2}$ [s]
LDF_1	117,73	149,40	0,008	86,57
LDF_2	141,53	168,56	0,017	(40,08)
LDF_3	90,94	107,48	0,0143	(48,48)
LDF_4	104,8	140,49	0,009	76,86
LDF_5	166,96	192,12	0,023	29,96
LDF_6	100,57	118,25	0,012	(58,82)
LDF_7	106,49	136,45	0,0101	68,73
LDF_8	120,44	179,69	0,006	113,64
LDF_9	121,24	151,195	0,009	(74,41)
LDF_10	140,52	255,12	0,0049	141,8
LDF_11	57,92	65,18	0,0182	38,0
LDF_12	156,1	189,38	0,0221	(31,3)
LDF_13	108,52	137,54	0,0087	79,94
LDF_14	59,15	70,63	0,0162	42,84
LDF_15	72,32	78,15	0,0236	29,38
LDF_16	71,21	89,54	0,0166	41,79
LDF_17	110,98	121,17	0,0188	36,8
LDF_18	84,94	113,39	0,0073	95,16
LDF_19	103,24	136,83	0,0088	79,05
LDF_20	141,47	206,12	0,0079	(88,1)
MW	108,85	140,33	0,0131	68,61
Median	107,5	137,18	0,0109	72,792
STABW	30,732	48,551	0,00597	34,061

Tabelle 10: PK Parameter der LDF im NCM (λ_z – Eliminationskonstante, AUC-t - Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve von Anfang bis Ende der Messung, AUC-inf – Fläche unter der der Konzentrations-Zeit-Kurve von Anfang der Messung bis ins Unendliche, $t_{1/2}$ - Halbwertszeit; die eingeklammerten Ergebnisse wurden nicht statistisch analysiert)

ID	AUC-t	AUC-inf	λ_z [1/s]	$t_{1/2}$ [s]
OPG_1	119,07	122,64	0,08065	8,59
OPG_2	49,77	56,33	0,017	(40,21)
OPG_3	86,47	732,63	0,00098	(708,2)
OPG_4	54,71	79,58	0,0096	72,55
OPG_5	56,14	76,78	0,0095	73,086
OPG_6	116,69	123,07	0,0491	(14,11)
OPG_7	45,27	45,88	0,1508	4,6
OPG_8	102,16	192,23	0,0051	135,08
OPG_9	105,91	207,42	0,0072	(96,36)
OPG_10	48,73	57,91	0,0158	43,83
OPG_11	60,73	68,296	0,0233	29,7
OPG_12	98,23	107,96	0,0376	(18,45)
OPG_13	72,57	72,58	0,4577	1,51
OPG_14	67,34	71,87	0,0675	10,27
OPG_15	66,39	72,97	0,0266	26,1
OPG_16	34,47	34,64	0,1353	5,12
OPG_17	93,18	97,27	0,0402	17,25
OPG_18	39,88	39,89	1,3259	0,52
OPG_19	30,08	30,08	1,0795	0,64
OPG_20	95,42	98,2	0,0481	(14,42)
MW	72,16	119,41	0,1794	30,633
Median	66,86	74,87	0,0389	13,76
STABW	27,9518	151,7385	0,3664	38,954

Tabelle 11: PK Parameter der OPG im NCM (λ_z – Eliminationskonstante, AUC-t - Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve von Anfang bis Ende der Messung, AUC-inf – Fläche unter der der Konzentrations-Zeit-Kurve von Anfang der Messung bis ins Unendliche, $t_{1/2}$ - Halbwertszeit; die eingeklammerten Ergebnisse wurden nicht statistisch analysiert)

3.3 Statistische Analyse

Nach Erhebung der Daten erfolgte die statistische Analyse der PK Parameter, die aus den Messungen der LDF und der OPG hervorgegangen sind. Dabei wurden die errechneten Parameter beider Messmethoden miteinander verglichen, aber auch die Ergebnisse der PK Datenanalyse des CM mit denen aus dem NCM. Aufgrund einiger, wie schon zuvor erwähnter, fehlerhafter Ergebnisse im CM wie auch im NCM, konnten nicht alle Messergebnisse der statistischen Analyse zugeführt werden. Dadurch beschränkte sich die statistische Auswertung auf einen kleineren Stichprobenumfang als ursprünglich festgelegt.

3.3.1 Box-Whiskers-Plot

Der Box-Whiskers-Plot geht auf Tukey (1977) zurück. Er zeigt eine graphisch-statistische Auswertung der Messgröße.

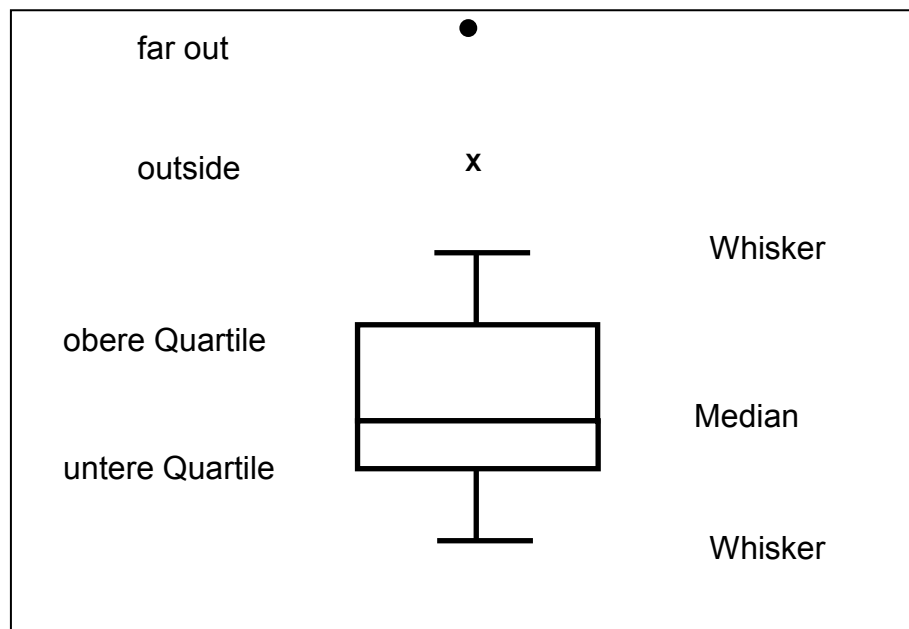


Abbildung 40: Beschreibung eines Box-Whiskers-Plots

Aus dem Box-Whiskers-Plot kann man nachfolgende Erkenntnisse herauslesen:

- **untere oder erste Quartile:** Die untere oder auch erste Quartile beschreibt jenen Wert, unter dem 25% der betrachteten Werte liegen und 75% darüber.
- **obere oder dritte Quartile:** Die obere oder auch dritte Quartile beschreibt jenen Wert, unter dem 75% der betrachteten Werte liegen und 25% darüber.
- **Median:** Der Median ist jener Wert, unter dem 50% der betrachteten Fälle liegen und 50% darüber.
- **Interquartilabstand:** Er errechnet sich aus der Differenz der oberen (dritten) Quartile zur unteren (ersten) Quartile. Im Diagramm stellt dieser Wert das Rechteck zwischen der oberen und unteren Quartile dar und wird durch die Mediane geteilt.

- **outside-Werte:** Als outside-Werte bezeichnet man jene Werte, die größer als die obere Quartile plus dem 1,5-fachen Interquartilabstand sind oder aber jene, die kleiner als die untere Quartile minus dem 1,5-fachen Interquartilabstand sind. Die Darstellung im Diagramm erfolgt als Kreuz, sofern die Formatierung nicht anders gewählt wird.
- **far out-Werte:** Als far out-Werte bezeichnet man jene Werte, die größer als die obere Quartile plus dem 3-fachen Interquartilabstand sind oder aber jene, die kleiner als die untere Quartile minus dem 3-fachen Interquartilabstand sind. Die Darstellung im Diagramm erfolgt als Kreis, sofern die Formatierung nicht anders gewählt wird.

3.3.2 Gegenüberstellung von LDF und OPG

	<i>N</i>	<i>Mean</i>	<i>SD</i>	<i>Median</i>	<i>Normal Distr.</i>
ka_LDF	13	0,0775	0,03985	0,0697	0,4995
ka_OPG	13	0,139	0,06742	0,153	0,4268
ke_LDF	14	0,0138	0,009348	0,00945	0,1869
ke_OPG	14	0,0187	0,01526	0,0130	0,0118
t$\frac{1}{2}$NCM_LDF	14	68,610	34,0610	72,792	0,4831
t$\frac{1}{2}$NCM_OPG	14	30,633	38,9538	13,760	0,0032
t$\frac{1}{2}$CM_LDF	14	74,474	46,7963	73,400	0,0664
t$\frac{1}{2}$CM_OPG	13	54,175	36,0395	49,511	0,0351

Tabelle 12: Statistik – Zusammenfassung der Ergebnisse (ka_LDF/ka_OPG – Invasionskonstanten gemessen mit LDF bzw. OPG, ke_LDF/ke_OPG – Eliminationskonstanten gemessen mit LDF bzw. OPG, t $\frac{1}{2}$ CM_LDF/t $\frac{1}{2}$ CM_OPG – Halbwertszeit im „compartmental“-Modell, t $\frac{1}{2}$ NCM_LDF/t $\frac{1}{2}$ NCM_OPG – Halbwertszeit im „Non compartmental“ Modell)

3.3.2.1 Vergleich der Absorptions-/ Invasionskonstanten

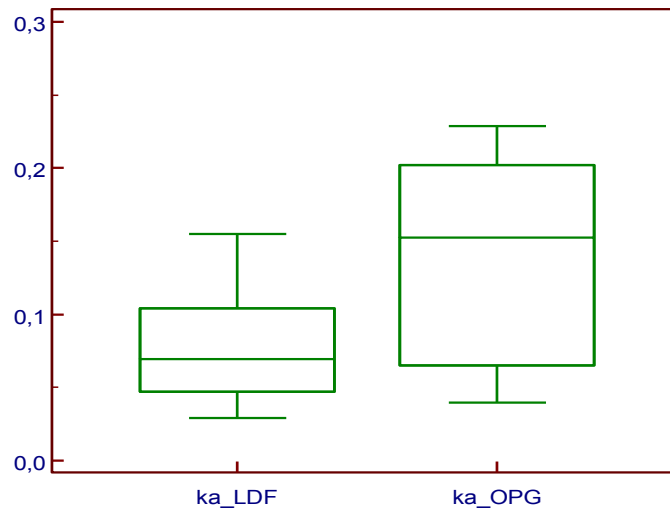


Abbildung 41: Boxplot – k_a im Vergleich (Einheit: 1/s)

Verglichen wurden die k_a , welche mit der LDF und mit der OPG gemessen und anhand der 2-Kompartiment-Analyse ermittelt wurden. Der Mittelwert gemessen mit der LDF ergab 0,07443 mit einer Standardabweichung von 0,03999, die Messungen der OPG ergaben einen Mittelwert von 0,1340 mit einer Standardabweichung von 0,06791. Es zeigte sich ein statistisch signifikantes Ergebnis im Wilcoxon-Rangsummentest ($p = 0,0068$) (Abb. 38).

Zusammengefasst zeigten die Messungen der LDF und OPG mit nachfolgender PK Datenanalyse, ausgedrückt als Mittelwert, Median und Standardabweichung, folgende Ergebnisse: (dargestellt in Tab. 12). In der Tabelle ist ebenfalls ersichtlich, dass beim Test auf Normalverteilung diese häufig abgelehnt wurde, sodass verteilungsfreie statistische Methoden notwendig waren, so zum Paarvergleich der Wilcoxon-Rangsummentest.

3.3.2.2 Vergleich der Eliminationskonstanten

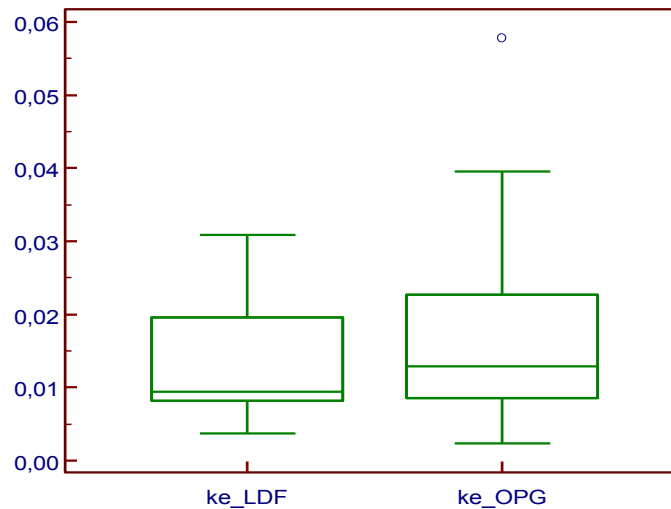


Abbildung 42: Boxplot – k_e im Vergleich (Einheit: 1/s)

Die aus dem Kompartiment-Modell ermittelten k_e ergaben vergleichbare Mittelwerte (LDF: $0,01376 \pm 0,0093$; OPG: $0,01865 \pm 0,015$). Die k_e beider Methoden zeigten im Wilcoxon-Test kein statistisch signifikantes Testergebnis ($p = 0,4631$).

3.3.2.3 Vergleich der Halbwertszeiten

Die HWZ wurde anhand der Eliminationskonstante (k_e) nach der Gleichung: $HWZ = \ln 2 / k_e$ errechnet. Daher zeigt auch die HWZ im Kompartiment-Modell, wie die k_e , kein statistisch signifikantes Testergebnis im Wilcoxon-Test ($p = 0,3396$).

3.3.2.4 Vergleich der Halbwertszeiten (NCM)

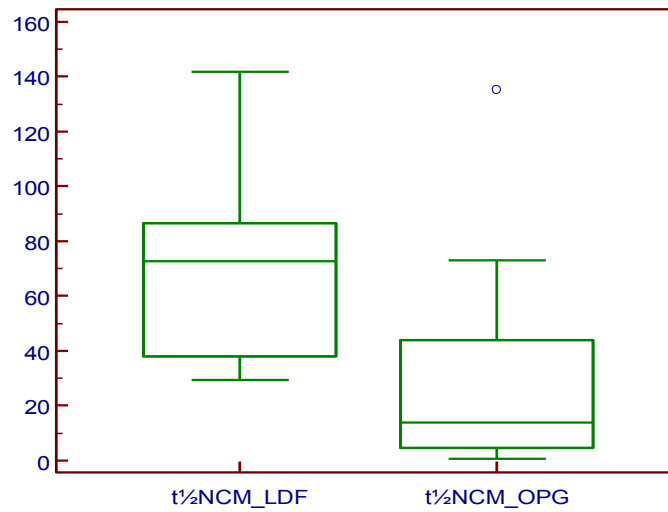


Abbildung 43: Boxplot – HWZ im NCM (Einheit: Sekunden)

Im NCM dagegen zeigten die HWZ ein statistisch signifikantes im Wilcoxon-Test ($p = 0,0107$).

3.3.3 Gegenüberstellung Kompartment- und Nicht-Kompartment-Modell

3.3.3.1 Halbwertszeit bei Messungen der LDF

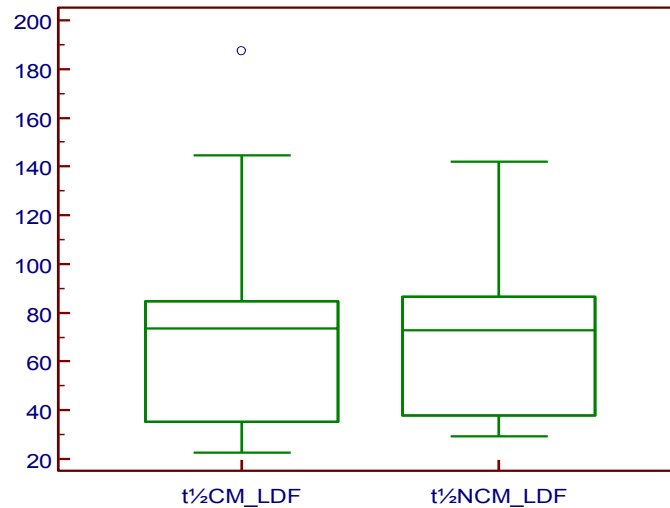


Abbildung 44: Boxplot– HWZ im CM und NCM (Messung:LDF, Einheit: Sekunden)

Die anhand der Messungen mittels LDF erhobene HWZ aus der PK Datenanalyse, ergab in beiden PK-Modellen (CM und NCM) folgende Ergebnisse. Im CM Modell betrug der Mittelwert $74,4736 \pm 46,7963$, im NCM $68,6098 \pm 34,0610$. Der Vergleich beider Werte zeigte im Wilcoxon-Test ($p = 0,1937$) kein statistisch signifikantes Testergebnis.

3.3.3.2 Halbwertszeit bei Messungen der OPG

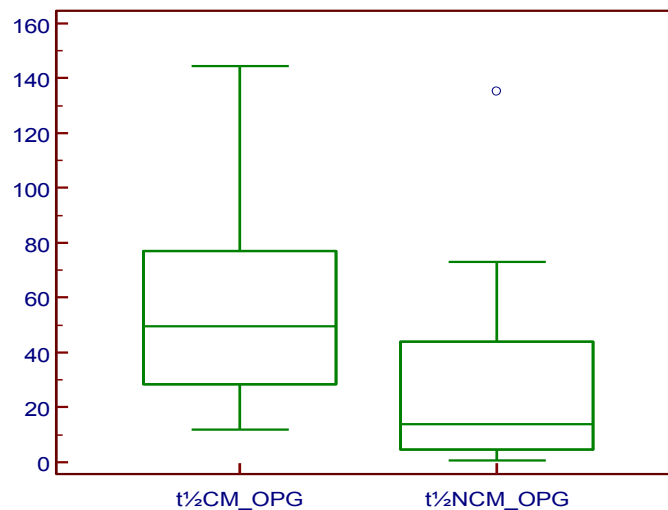


Abbildung 45: Boxplot – HWZ im CM und NCM (Messung: OPG, Einheit: Sekunden)

Der Vergleich der HWZ, die mittels OPG ermittelt wurden, ergab dagegen im CM einen Mittelwert von $54,1747 \pm 36,0395$ und im NCM $32,3278 \pm 40,0033$. Der Wilcoxon-Test ($p = 0,0171$) zeigte statistisch signifikante Testergebnisse.

Tabelle 13: Ergebnisse der statistischen Auswertung – Wilcoxon Test (Sammeltabelle); k_a_LDF/k_a_OPG – Invasionskonstanten gemessen mit LDF bzw. OPG, k_e_LDF/k_e_OPG – Eliminationskonstanten gemessen mit LDF bzw. OPG, $t_{1/2}CM_LDF/t_{1/2}CM_OPG$ – Halbwertszeit im „compartmental“-Modell, $t_{1/2}NCM_LDF/t_{1/2}NCM_OPG$ – Halbwertszeit im „Non compartmental“ Modell, sample size – Stichprobenumfang, two tailed probability – zweiseitige Irrtumswahrscheinlichkeit

Sample 1	Sample 2	Sample size	Two tailed probability
ka_LDF	ka_OPG	12	P=0,0068
ke_LDF	ke_OPG	14	P=0,4631
t _{1/2} CM_LDF	t _{1/2} CM_OPG	13	P=0,3396
t _{1/2} NCM_LDF	t _{1/2} NCM_OPG	14	P=0,0107
t _{1/2} CM_LDF	t _{1/2} NCM_LDF	14	P=0,1937
t _{1/2} CM_OPG	t _{1/2} NCM_OPG	13	P=0,0171

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Fragestellung

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems stehen in Europa an erster Stelle der Todesursachen, atherosklerotische Gefäßveränderungen bilden dabei häufig den Ausgangspunkt des pathologischen Geschehens. Daher ist die frühzeitige Diagnostik einer gestörten Endothelfunktion zur Risikoabschätzung und zur Einleitung präventiver Maßnahmen von hoher Bedeutung.

Die dazu eingesetzten diagnostischen Instrumente müssen dabei neben den erforderlichen Qualitätskriterien wie Objektivität, Reliabilität und Validität auch strenge ökonomische Kriterien erfüllen, um an breiter Basis eingesetzt zu werden. Zu den ökonomischen Aspekten zählen sowohl die Investitionskosten für die Geräte-Einrichtung als auch die Kosten für den laufenden Betrieb, an denen wiederum vor allem die Personalkosten einen wesentlichen Anteil ausmachen. Daher ist es notwendig, eine rasche Durchführung der Untersuchung (geringe Vorbereitungszeit des Patienten, kurze Untersuchungsdauer) und auch eine rasche und komfortable Auswertung und Dokumentation der Untersuchungsergebnisse zu garantieren. Weiters ist eine Delegation der Untersuchung an fachkundiges ärztliches Hilfspersonal wünschenswert.

Die für unsere Fragestellung eingesetzten Verfahren der Biomesstechnik, OPG und LDF, sind klinisch für andere Fragestellungen bereits etabliert und haben sich aufgrund ihrer Einfachheit in der Praxis bewährt. Gegenüber dem üblicherweise zur Untersuchung der FMD eingesetzten bildgebenden Ultraschallverfahren haben diese Methoden den Vorteil geringerer Anschaffungskosten und der einfacheren Anwendung auch durch ärztliches Hilfspersonal und einer automatisierten Auswertung.

Die Provokation einer PORH durch suprasystolischen Stau mittels einer Blutdruckmanschette am Oberarm ist einfach durchzuführen und triggert eine Vielzahl von biochemischen Prozessen, die für die Endothelfunktion relevant sind. Da der Ablauf der PORH einen dynamischen Prozess darstellt, ist es naheliegend, dynamische Modelle, die neben der Amplitude der Reaktion auch deren Zeitverlauf betrachten, zur Analyse und Charakterisierung im Sinne einer „modellorientierten Diagnostik“ heranzuziehen.

Als strukturelle Modellansätze liegen aufgrund der physiologisch-biochemischen Prozessabläufe pharmakokinetische Modelle nahe, die mittels PC-gestützter mathematischer Verfahren identifiziert werden können.

Aus allen genannten Gründen ist eine Untersuchung der PORH mittels nichtinvasiver Methoden (OPG, LDF) und die nachfolgende Analyse der Reaktion über pharmakokinetische Modellansätze sinnvoll und erfolgversprechend.

4.2 Diskussion der Methodik

Der Schwerpunkt der Arbeit liegt im methodischen Bereich, der Untersuchung der Eignung von Methoden zur Erfassung und nachfolgenden computergestützten Auswertung der PORH, daher liegen überwiegend methodische Aspekte im Fokus der Betrachtungen.

Während das LDF-System ein kommerziell gefertigtes System darstellte, wurde für die Erfassung des Plethysmogramms eine Eigenentwicklung herangezogen. Ein kommerziell erhältlicher Oximeterclip wurde modifiziert, indem anstelle der ursprünglich zwei LEDs (IR und sichtbar) eine einzige leistungsstarke IR-LED eingebaut wurde. Über einen Verstärker, eine Anpassungsschaltung und ein elektronisches Filter wurde das Signal zur Datenerfassung weitergeführt. Der Investitionsaufwand liegt beim OPG-System deutlich niedriger als beim LDF-System.

Da der Messkopf des LDF-Systems nur ein geringes Gewicht hatte und außerdem mittels Doppelkleberingen an der Haut befestigt war, zeigte dieser nur geringe Anfälligkeit für Bewegungsartefakte. Im Gegensatz dazu besaß der Oximeter-Clip ein höheres Eigengewicht und war außerdem nur über Federkraft am Finger befestigt, sodass geringe Fingerbewegungen bereits starke Bewegungsartefakte auslösten.

Im Rahmen der Datenvorverarbeitung wurde aus dem OPG-Signal, das als pulssynchrones Volumensignal („Volumenpuls“) vorlag, der gleitende Effektivwert (quadratische Mittelwert) berechnet. Die Wahl für diese Berechnung – und nicht für die Auswertung der peak-to-peak Werte (der „Volumenpuls-Amplituden“) - lag in der höheren Robustheit dieser Vorgangsweise begründet. Der gleitende Effektivwert, der ein Maß für die Leistung oder Energie des Signals darstellt und

natürlich vom Spitzenwert abhängt, wird über mehrere Datenpunkte gemittelt, sodass der Einfluss einzelner Ausreißer minimiert wird.

Aus den abgespeicherten Signalen wurden off-line die PORH-Bereiche als „region of interest“ ausgewählt und die Daten einer Vorfilterung sowie Normierung unterzogen. Diese Prozeduren erfolgten zur Elimination einzelner bewegungsbedingter „Ausreißer“ und um für die nachfolgenden Analysen standardisierte Daten zur Verfügung stellen zu können. Danach wurden einfache Kenngrößen wie die Zeitpunkte des Auftretens des Signal-Maximums etc. berechnet.

Für die Analyse der Dynamik der Reaktion wurden sowohl ein Kompartment- als auch ein Nichtkompartment-Ansatz verwendet. Der Kompartment-Ansatz verwendete als Struktur ein 2-Kompartment-Modell mit einer impulsförmigen Anregung im ersten Kompartiment und linearen Ansätzen für die Absorption/Invasion bzw. die Elimination. Die Lösung der entsprechenden Differentialgleichungen ergibt die bekannte „Bateman-Funktion“. Diese Funktion wurde über eine nichtlineare Regression an die experimentellen Datenpunkte angepasst. Die Kurvenanpassung über eine nichtlineare Regressions-Prozedur besitzt einen „ausgleichenden Effekt“, da die Summe der quadratischen Abweichungen über zahlreiche Datenpunkte als Kriterium verwendet wird, sodass eine Anpassung mit hoher Robustheit resultiert. Bei dieser Vorgangsweise wird sozusagen stets eine Betrachtung der Reaktion in ihrer Gesamtheit vorgenommen.

Die Anpassung von „Nicht-Kompartment-Ansätzen“ über das EXCEL-Add-In „PKsolver“ weist nur eine reduzierte Robustheit auf, da vor allem die Schätzung der Eliminationskonstanten über eine logarithmische Regression aus nur wenigen Datenpunkten erfolgt, die im terminalen Teil der Reaktionskurve liegen. Messfehler gerade in diesem Bereich wirken sich damit überproportional auf die Bestimmung der Eliminations-Konstanten aus.

4.3 *Diskussion der Ergebnisse*

Die erzielten Ergebnisse lassen gut sicherbare Schlüsse sowohl auf die praktische Eignung der eingesetzten modellorientierten Diagnosemethoden als auch auf die zugrunde liegenden physiologischen Mechanismen der PORH zu.

Die Modellidentifikation mittels der beiden Strukturansätze (Kompartiment- bzw. Nicht-Kompartiment-Ansatz) lieferten – abgesehen von einigen Ergebniskurven, bei denen aus Gründen der Datenqualität keine reliable Identifikation erreicht werden konnte – durchaus interpretierbare Ergebnisse für die Absorptions- bzw. Eliminations-Konstanten.

Die statistische Prüfung der kinetischen Parameter, berechnet aus dem Kompartiment-Ansatz, mittels des Wilcoxon-Tests für gepaarte Differenzen ergab statistisch signifikante Unterschiede in den Absorptions/Invasions-Konstanten zwischen OPG und LDF-Verfahren, die Eliminations-Konstanten zeigten keine statistisch sicherbaren Unterschiede. Die Ermittlung der Eliminations-Konstanten (bzw. der daraus berechenbaren Eliminations-Halbwertszeit) aus dem Nicht-Kompartiment-Ansatz stimmen größenordnungsmäßig mit den Parametern aus dem Kompartiment-Ansatz überein, brachten jedoch statistisch sicherbare Unterschiede zu den Parametern aus dem Kompartiment-Ansatz. Dies ist sicherlich durch die mangelnde Robustheit (Einbeziehung nur weniger Datenpunkte für die Berechnung) dieses Verfahrens zu erklären.

Die unterschiedlichen Absorptions/Invasions-Parameter lassen sich unschwer über die Messorte bzw. das in die Messung einbezogene Integrationsvolumen interpretieren.

Wie in Abbildung 46 zu sehen, erfasst die klassische Bestimmung der FMD über bildgebenden Ultraschall ein großes Blutgefäß (typ. a. brachialis). Die LDF-Messung bezieht ihr Signal aus einem relativ großen Integrationsgebiet der Mikrozirkulation, die von dem zuführenden Gefäß versorgt wird. Die OPG-Methode wiederum erfasst Volumenänderungen in kleineren Gefäßen (typ. Fingerarterien). Aufgrund dieser Unterschiede im Messort, in den zur Messung herangezogenen Kreislaufarealen und dem in die Messung einbezogenen Integrationsvolumen sind Unterschiede im dynamischen Verhalten der Reaktion zu erwarten.

Bei den festgestellten Unterschieden zwischen den Absorptions/Invasions-Konstanten von OPG- bzw. LDF-Methode, wobei die Konstanten für das OPG-Verfahren kleiner als jene für das LDF-Verfahren waren, kann dies unschwer auf die relativ rasche Detektion der Flussänderungen (und damit Volumenänderungen) in den Fingerarterien mittels der OPG-Methode zurückgeführt werden, während die LDF-Methode erst die verzögert einsetzende Flusszunahme in der Mikrozirkulation registriert.

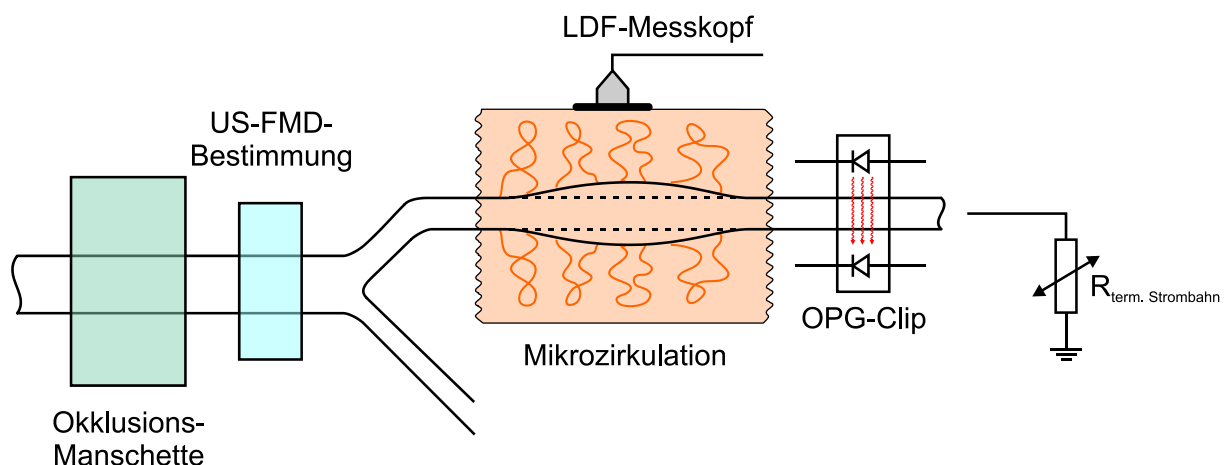


Abbildung 46: Schema der Messorte unterschiedlicher Verfahren zur Registrierung der PORH-Reaktion

Für die physiologische Interpretation des Kompartiment-Ansatzes zur Charakterisierung der PORH (der Kompartiment-Ansatz ist wahrscheinlich der für die Systemidentifikation günstigere) wird auf die folgende Abbildung 47 verwiesen.

Wie bereits beschrieben, besteht das 2-Kompartiment-Modell aus einem „Aktivierungs-Kompartiment“ (Kompartiment 1) und dem Kompartiment 2, das die Mikrozirkulation im Versorgungsbereich der durch die Manschette okkludierten Arterie beschreibt. In Kompartiment 1 erfolgt die Aktivierung der PORH-Reaktion durch das rasche Aufheben des suprasystolischen Staus. Dieses Aufheben führt, aufgrund des durch die metabolische Autoregulation niedrigen Strömungswiderstandes zu einem hohen Blutfluss, der auch den NO-Mechanismus triggert. Dieser Effekt wird mit der Zeitkonstante k_a auf das Kompartiment 2 übertragen. Durch den angestiegenen Blutfluss wird in diesem Kompartiment die metabolische Situation einer relativen Hypooxygenierung wieder

reduziert und charakterisiert durch die Zeitkonstante k_e der Zustand vor Okklusion wieder hergestellt.

Die Zeitkonstante k_a charakterisiert demnach vorwiegend die „Aktivierungsphase“ der PORH-Reaktion, die Zeitkonstante k_e die Wiederherstellung des Ausgangszustandes vor Okklusion (Restitutionsphase).

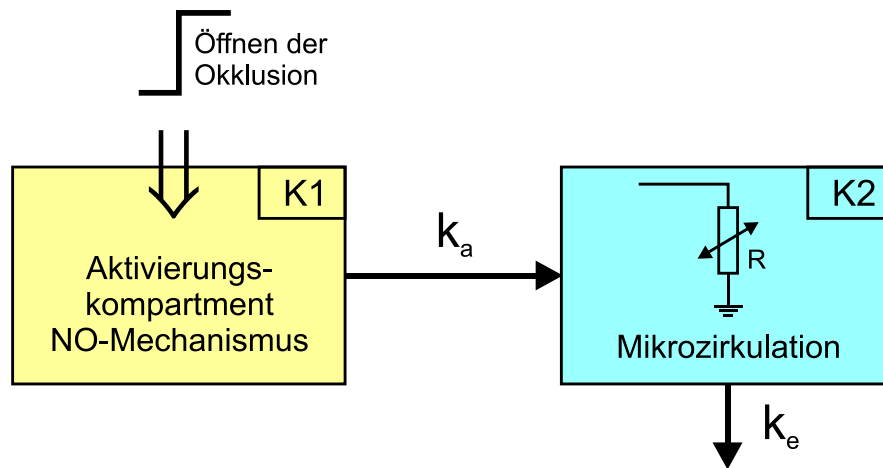


Abbildung 47: Blockdiagramm und Zuordnung des Zwei-Kompartiment-Modells

Vergleicht man mittels einer Simulation die Zeitfunktionen für die PORH-Reaktion ermittelt sowohl mittels OPG- als auch LDF-Verfahrens, so ergibt sich unter Verwendung der jeweiligen Gruppenmittelwerte für die kinetischen Parameter folgendes Bild (siehe Abbildung 48).

Vergleich OPG - LDF

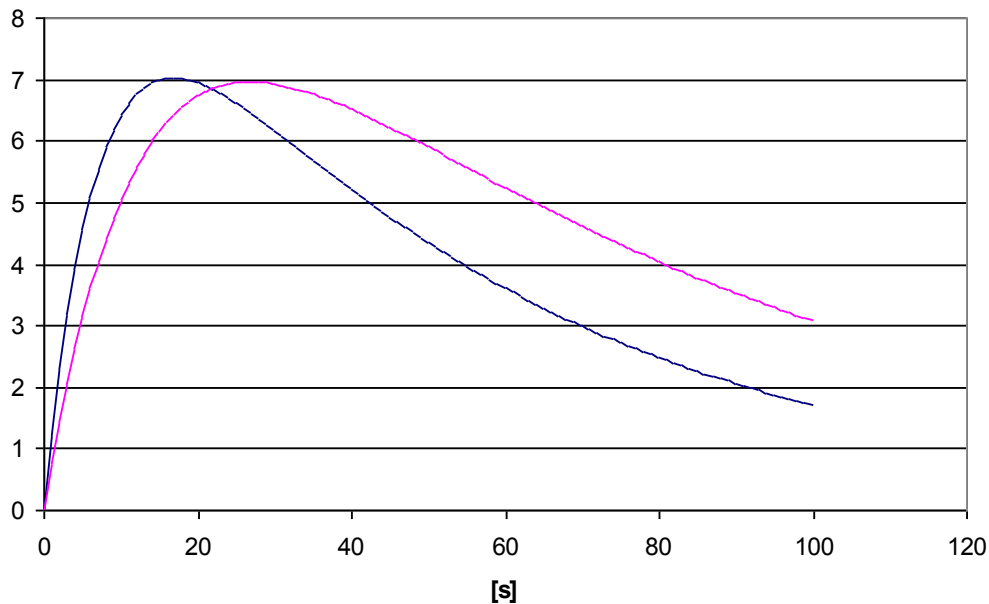


Abbildung 48: Vergleich der PORH-Reaktion erhoben mittels OPG bzw. LDF (Simulation basierend auf den Mittelwerten)

Das bedeutet, dass bei Normierung beider Zeitfunktionen auf gleiche Amplitude die mittels OPG erfasste Reaktion deutlich rascher ansteigt, als die mittels LDF registrierte. Dementsprechend wird auch das Reaktionsmaximum beim OPG früher erreicht als beim LDF. Die Wiederherstellung des Ausgangswerts erfolgt mit annähernd gleicher Zeitkonstante.

Zur Abklärung der möglichen Mechanismen haben wir aus der Literatur (88) Zeitfunktionen der NO-Freisetzung bei Aorten und Pulmonalarterien von Ratten ebenfalls über das 2-Kompartiment-Modell identifiziert und die kinetischen Parameter k_a und k_e bestimmt. Die Simulation der Zeitverläufe der NO-Freisetzung und der OPG-PORH-Reaktion wird in Abbildung 49 einander gegenübergestellt.

Man kann deutlich sehen, dass die NO-Kinetik deutlich rascher verläuft als die PORH-Kinetik, erhoben mittels OPG. Dies deutet darauf hin, dass die NO-Freisetzung und die dadurch bedingte Gefäß-Dilatation nur eine intermediäre Rolle im komplexen Ablauf der PORH-Reaktion spielt.

Vergleich OPG - NO

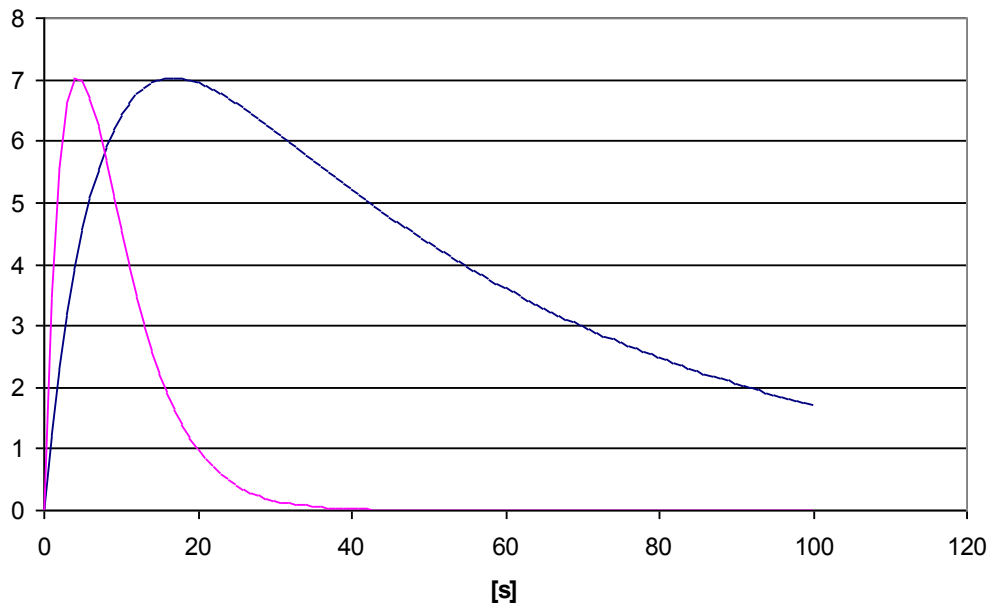


Abbildung 49: Vergleich der Kinetik der NO-Freisetzung mit der PORH-Reaktion erhoben mittels OPG (Simulation)

Die gesamte PORH-Reaktion dürfte nach unseren Befunden wie in Abbildung 50 gezeigt ablaufen:

Nach Öffnung der Okklusionsmanschette tritt ein rasch ansteigender deutlich über Ruhenniveau hinausgehender Fluss-Anstieg auf, der durch den über die metabolische Autoregulation bei Sauerstoff-Mangel stark reduzierten Strömungswiderstand des betroffenen Gefäßgebiets verursacht ist.

Dieser Strömungsanstieg triggert den NO-Mechanismus, der zu einer Gefäßdilataion führt und damit die Strömung nochmals erhöht (positive Rückkopplung).

Die nunmehr auftretende Hyperperfusion normalisiert die metabolische Situation in der Mikrozirkulation und der Strömungswiderstand sinkt wiederum ab und erreicht nach einiger Zeit wieder das Ausgangsniveau vor der Okklusion.

Die sogenannte „Aktivierungsphase“ kann über den Kinetik-Parameter k_a (Absorptions/Invasions-Konstante), die Rückführung der Perfusion auf das Ausgangsniveau, die sogenannte „Restitutionsphase“, durch den Kinetik-Parameter k_e (Eliminations-Konstante) charakterisiert werden.

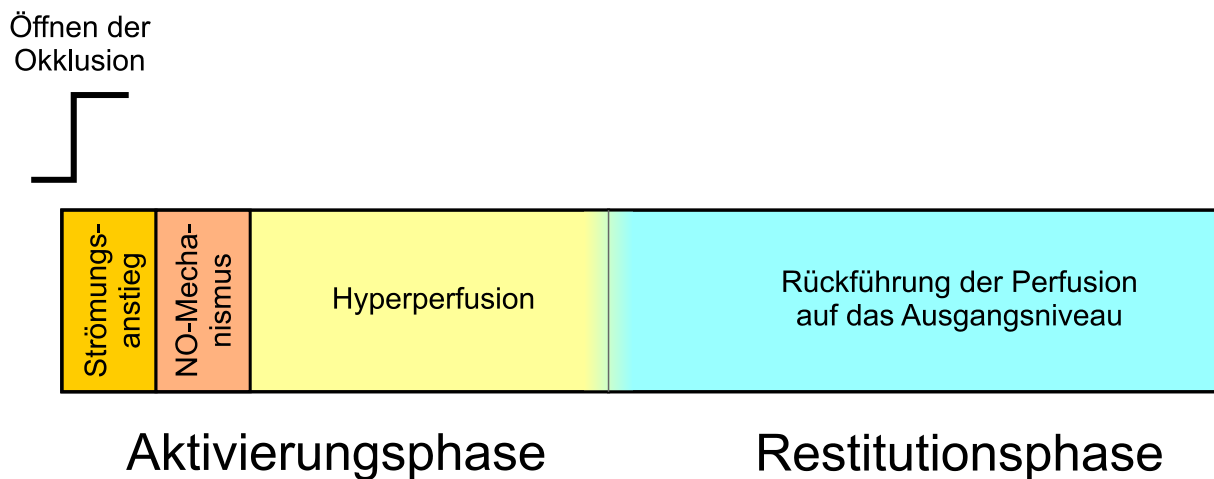


Abbildung 50: Schema des Ablaufs und der Phasengliederung der PORH-Reaktion

5 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Die Erfassung und Analyse der PORH, wie in der vorliegenden Arbeit vorgestellt, sind ein praktikables Verfahren zur Beurteilung der Endothelfunktion.

Der apparative Aufwand – verglichen mit der Erfassung der FMD mittels bildgebendem Ultraschall – ist relativ gering, die Quantifizierung der Reaktion über pharmakokinetische Modelle (Kompartiment-Modelle) ist mittels einfacher Software-Unterstützung (Standardverfahren der nichtlinearen Regression) un schwer zu erreichen.

Bei der Signalerfassung zeigte die LDF-Methode im Vergleich zum OPG Vorteile hinsichtlich der Störempfindlichkeit. Eine Modifikation bzw. Optimierung des OPG-Clip-Aufnehmers und eine Überarbeitung der Signal-Vorverarbeitung (Verstärker, Filter etc.) kann jedoch sicherlich eine Verbesserung bringen.

Man kann daher die Schlussfolgerung ziehen, dass die vorgestellten methodischen Ansätze zur Charakterisierung der PORH mittels Signalerfassung über LDF bzw. OPG und Signalauswertung über Anpassung der Parameter eines Kompartiment-Modells einen diagnostisch aussagekräftigen, ökonomisch günstigen und klinisch praktikablen Weg zur quantitativen Beurteilung der Endothelfunktion darstellen.

Literaturverzeichnis

1. Silverthorn DU. Physiologie. 4th ed. München: Pearson Education; 2009. pp. 723-726.
2. Klinke R, Silbernagl S. Lehrbuch der Physiologie. 5th ed. Stuttgart: Thieme; 2005. pp. 184-220.
3. Pohl U, Holtz J, Busse R, Bassenge E. Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. Hypertension. 1986 Jan ;8(1):37-44.
4. Pyke KE, Tschakovsky ME. The relationship between shear stress and flow-mediated dilatation: implications for the assessment of endothelial function. The Journal of physiology. 2005 Oct ;568(Pt 2):357-69.
5. Smiesko V, Kozík J, Dolezel S. Role of endothelium in the control of arterial diameter by blood flow. Blood vessels. 1985 Jan ;22(5):247-51.
6. Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. The American journal of physiology. 1986 Jun ;250(6 Pt 2):H1145-9.
7. Koller A, Sun D, Kaley G. Role of shear stress and endothelial prostaglandins in flow- and viscosity-induced dilation of arterioles in vitro. Circulation research. 1993 Jun ;72(6):1276-84.
8. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. Lancet. 1992 Nov ;340(8828):1111-5.
9. Deanfield J, Donald A, Ferri C, Giannattasio C, Halcox J, Halligan S, et al. Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. Journal of hypertension. 2005 Jan ;23(1):7-17.
10. Ross R. Atherosclerosis -- An Inflammatory Disease. New England Journal of Medicine. 1999 Jan ;340(2):115-126.
11. Lerman A, Zeiher AM. Endothelial function: cardiac events. Circulation. 2005 Jan ;111(3):363-8.
12. Halcox JPJ. Prognostic Value of Coronary Vascular Endothelial Dysfunction. Circulation. 2002 Jul ;106(6):653-658.
13. Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. Circulation. 2000 Apr ;101(16):1899-906.
14. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR, Lerman A. Long-Term Follow-Up of Patients With Mild Coronary Artery Disease and Endothelial Dysfunction. Circulation. 2000 ;101(9):948-954.
15. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. Journal of the American College of Cardiology. 2003 Oct ;42(7):1149-60.
16. Golenhofen K, Hildebrandt G. Die Reaktion der menschlichen Muskelgefäße auf Durchblutungs-drosselung [Reaction of human muscle blood vessels on throttling of circulation.]. Pflügers Archiv : European journal of physiology. 1957 Jan ;264(5):492-512.

17. Bayliss WM. On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *The Journal of physiology*. 1902 May ;28(3):220-31.
18. Bockman CS, Gonzalez-Cabrera I, Abel PW. Alpha-2 adrenoceptor subtype causing nitric oxide-mediated vascular relaxation in rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1996 Sep ;278(3):1235-43.
19. Bruck H, Gössl M, Spitthöver R, Schäfers RF, Wenzel ÅR, Kohnle M, et al. The nitric oxide synthase inhibitor L-NMMA potentiates noradrenaline-induced vasoconstriction : effects of the alpha 2 -receptor antagonist yohimbine. *Journal of Hypertension*. 2001 ;19(5):907-911.
20. Cankar K, Finderle Z, Strucl M. The effect of -adrenoceptor agonists and L-NMMA on cutaneous postocclusive reactive hyperemia. *Microvascular research*. 2009 ;77(2):198-203.
21. Faber JE. Effect of local tissue cooling on microvascular smooth muscle and postjunctional alpha 2-adrenoceptors. *The American journal of physiology*. 1988 Jul ;255(1 Pt 2):H121-30.
22. Coffman JD, Cohen RA. Role of alpha-adrenoceptor subtypes mediating sympathetic vasoconstriction in human digits. *European journal of clinical investigation*. 1988 Jun ;18(3):309-13.
23. Willette RN, Hieble JP, Sauermelch CF. The role of alpha adrenoceptor subtypes in sympathetic control of the acral-cutaneous microcirculation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1991 Mar ;256(2):599-605.
24. Larkin SW, Williams TJ. Evidence for sensory nerve involvement in cutaneous reactive hyperemia in humans. *Circulation research*. 1993 Jul ;73(1):147-54.
25. Wong BJ, Wilkins BW, Holowatz L a, Minson CT. Nitric oxide synthase inhibition does not alter the reactive hyperemic response in the cutaneous circulation. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*. 2003 Aug ;95(2):504-10.
26. Duckles SP, Miller VM. Hormonal modulation of endothelial NO production. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*. 2010 May ;459(6):841-51.
27. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980 Nov ;288(5789):373-6.
28. Ignarro LJ. Endothelium-Derived Relaxing Factor Produced and Released from Artery and Vein is Nitric Oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1987 Dec ;84(24):9265-9269.
29. Quyyumi AA. Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease. *The American journal of medicine*. 1998 Jul ;105(1A):32S-39S.
30. Toborek M, Kaiser S. Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. *Basic research in cardiology*. 1999 Oct ;94(5):295-314.
31. Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1999 Jan ;31(1):61-74.
32. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. *Biochemie und Pathobiochemie*. 8th ed. Heidelberg: Springer; 2006.
33. Gao Y. The multiple actions of NO. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*. 2010 May ;459(6):829-39.

34. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EHC, Feletou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta physiologica (Oxford, England)*. 2009 Jun ;196(2):193-222.
35. Davis ME, Cai H, Drummond GR, Harrison DG. Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase expression through c-Src by divergent signaling pathways. *Circulation research*. 2001 Nov ;89(11):1073-80.
36. Koller A, Kaley G. Role of endothelium in reactive dilation of skeletal muscle arterioles. *The American journal of physiology*. 1990 Nov ;259(5 Pt 2):H1313-6.
37. Green D. Point: Flow-mediated dilation does reflect nitric oxide-mediated endothelial function. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*. 2005 Sep ;99(3):1233-4; discussion 1237-8.
38. Tschakovsky ME, Pyke KE. Counterpoint: Flow-mediated dilation does not reflect nitric oxide-mediated endothelial function. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*. 2005 Sep ;99(3):1235-7; discussion 1237-8.
39. Tagawa T, Imaizumi T, Endo T, Shiramoto M, Harasawa Y, Takeshita A. Role of nitric oxide in reactive hyperemia in human forearm vessels. *Circulation*. 1994 Nov ;90(5):2285-2290.
40. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, et al. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*. 1995 Mar ;91(5):1314-9.
41. Dakak N, Husain S, Mulcahy D, Andrews NP, Panza JA, Waclawiw M, et al. Contribution of Nitric Oxide to Reactive Hyperemia : Impact of Endothelial Dysfunction. *Hypertension*. 1998 ;32(1):9-15.
42. Mullen MJ, Kharbanda RK, Cross J, Donald AE, Taylor M, Vallance P, et al. Heterogenous Nature of Flow-Mediated Dilatation in Human Conduit Arteries In Vivo : Relevance to Endothelial Dysfunction in Hypercholesterolemia. *Circ. Res*. 2001 ;88(2):145-151.
43. Engelke KA, Halliwill JR, Proctor DN, Dietz NM, Joyner MJ. Contribution of nitric oxide and prostaglandins to reactive hyperemia in the human forearm. *J Appl Physiol*. 1996 Oct ;81(4):1807-1814.
44. Pyke K, Green DJ, Weisbrod C, Best M, Dembo L, O'Driscoll G, et al. Nitric oxide is not obligatory for radial artery flow-mediated dilation following release of 5 or 10 min distal occlusion. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2010 Jan ;298(1):H119-26.
45. Okahara K, Sun B, Kambayashi J. Up regulation of prostacyclin synthesis-related gene expression by shear stress in vascular endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1998 Dec ;18(12):1922-6.
46. Bulut D, Liaghat S, Hanefeld C, Koll R, Miebach T, Mügge A. Selective cyclo-oxygenase-2 inhibition with parecoxib acutely impairs endothelium-dependent vasodilatation in patients with essential hypertension. *Journal of hypertension*. 2003 Sep ;21(9):1663-7.
47. Szerafin T, Erdei N, Fülöp T, Pasztor ET, Edes I, Koller A, et al. Increased cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin-mediated dilation in coronary arterioles of patients with diabetes mellitus. *Circulation research*. 2006 Sep ;99(5):e12-7.
48. Edwards G, Féletou M, Weston AH. Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: a synopsis. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2010 Apr ;863-879.

49. Bellien J, Thuillez C, Joannides R. Contribution of endothelium-derived hyperpolarizing factors to the regulation of vascular tone in humans. *Fundamental & clinical pharmacology*. 2008 Aug ;22(4):363-77.
50. Taddei S, Ghiadoni L, Viridis A, Buralli S, Salvetti A. Vasodilation to bradykinin is mediated by an ouabain-sensitive pathway as a compensatory mechanism for impaired nitric oxide availability in essential hypertensive patients. *Circulation*. 1999 Sep ;100(13):1400-5.
51. Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S. Human endothelial dysfunction: EDCFs. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*. 2010 May ;459(6):1015-23.
52. Belhassen L, Pelle G, Dubois-Rande J-L, Adnot S. Improved endothelial function by the thromboxane A2 receptor antagonist S 18886 in patients with coronary artery disease treated with aspirin. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003 Apr ;41(7):1198-204.
53. Félétou M, Huang Y, Vanhoutte PM. Vasoconstrictor prostanoids. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*. 2010 May ;459(6):941-50.
54. Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*. 2010 May ;459(6):923-39.
55. Thorin E, Webb DJ. Endothelium-derived endothelin-1. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*. 2010 May ;459(6):951-8.
56. Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, et al. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation*. 2001 Jul ;104(2):191-6.
57. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T. Endothelial Dysfunction, Oxidative Stress, and Risk of Cardiovascular Events in Patients With Coronary Artery Disease. *Circulation*. 2001 Nov ;104(22):2673-2678.
58. Neunteufl T, Heher S, Katzenschlager R, Wöfl G, Kostner K, Maurer G, et al. Late prognostic value of flow-mediated dilation in the brachial artery of patients with chest pain. *The American journal of cardiology*. 2000 Jul ;86(2):207-10.
59. Gokce N. Predictive value of noninvasively determined endothelial dysfunction for long-term cardiovascular events in patients with peripheral vascular disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003 May ;41(10):1769-1775.
60. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*. 2007 Mar ;115(10):1285-95.
61. Al-Qaisi M, Kharbanda RK, Mittal TK, Donald AE. Measurement of endothelial function and its clinical utility for cardiovascular risk. *Vascular health and risk management*. 2008 Jan ;4(3):647-52.
62. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *The New England journal of medicine*. 1986 Oct ;315(17):1046-51.
63. Joannides R, Bellien J, Thuillez C. Clinical methods for the evaluation of endothelial function-- a focus on resistance arteries. *Fundamental & clinical pharmacology*. 2006 Jun ;20(3):311-20.

-
64. WHITNEY RJ. The measurement of volume changes in human limbs. *The Journal of physiology*. 1953 Jul ;121(1):1-27.
 65. Kröger K, Gröchenig E. *Nicht invasive Diagnostik angiologischer Krankheitsbilder*. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag; 2007.
 66. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangé D, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *Journal of the American College of Cardiology*. 1995 Nov ;26(5):1235-41.
 67. Takase B, Uehata A, Akima T, Nagai T, Nishioka T, Hamabe A, et al. Endothelium-dependent flow-mediated vasodilation in coronary and brachial arteries in suspected coronary artery disease. *The American journal of cardiology*. 1998 Dec ;82(12):1535-9, A7-8.
 68. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, et al. 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. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002 ;39(2):257-265.
 69. Bots ML, Westerink J, Rabelink TJ, Koning EJP de. Assessment of flow-mediated vasodilatation (FMD) of the brachial artery: effects of technical aspects of the FMD measurement on the FMD response. *European heart journal*. 2005 Feb ;26(4):363-8.
 70. Harris RA, Nishiyama SK, Wray DW, Richardson RS. Ultrasound assessment of flow-mediated dilation. *Hypertension*. 2010 May ;55(5):1075-85.
 71. Frick M, Neunteufl T, Schwarzacher SP, Wascher TC, Weidinger F. Flußvermittelte Vasodilatation (FMD) der Arteria brachialis: Methodik und klinischer Stellenwert. *Journal für Kardiologie*. 2002 ;9(10):439-444.
 72. Kuvin J, Patel A, Sliney K, Pandian N, Sheffy J. Assessment of peripheral vascular endothelial function with finger arterial pulse wave amplitude. *American Heart Journal*. 2003 Jul ;146(1):168-174.
 73. Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes DR, Kuvin JT, Lerman A. Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004 Dec ;44(11):2137-41.
 74. Rubinshtein R, Kuvin JT, Soffler M, Lennon RJ, Lavi S, Nelson RE, et al. Assessment of endothelial function by non-invasive peripheral arterial tonometry predicts late cardiovascular adverse events. *European heart journal*. 2010 May ;31(9):1142-8.
 75. Matsuzawa Y, Sugiyama S, Sugamura K, Nozaki T, Ohba K, Konishi M, et al. Digital assessment of endothelial function and ischemic heart disease in women. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010 Apr ;55(16):1688-96.
 76. Allen J. *Photoplethysmography and its application in clinical physiological measurement*. Physiological measurement. 2007 Mar ;28(3):R1-39.
 77. Kaltenegger A (ACUTRONIC MSG. *Pulsoxymetrie & die Bedeutung der plethysmographischen Pulswelle* [Internet]. [cited 2010 Aug 26] Available from: <http://www.acutronic-ms.at/>

-
78. Lund F. Digital pulse plethysmography (DPG) in studies of the hemodynamic response to nitrates--a survey of recording methods and principles of analysis. *Acta pharmacologica et toxicologica*. 1986 Jan ;59 Suppl 679-96.
 79. Chowienczyk PJ, Kelly RP, MacCallum H, Millasseau SC, Andersson TL, Gosling RG, et al. Photoplethysmographic assessment of pulse wave reflection: blunted response to endothelium-dependent beta2-adrenergic vasodilation in type II diabetes mellitus. *Journal of the American College of Cardiology*. 1999 Dec ;34(7):2007-14.
 80. Perimed Theory Support [Internet]. [cited 2011 Jan 30] Available from: <http://www.perimed-instruments.com/support/theory/laser-doppler>
 81. Cracowski J-L, Minson CT, Salvat-Melis M, Halliwill JR. Methodological issues in the assessment of skin microvascular endothelial function in humans. *Trends in pharmacological sciences*. 2006 Sep ;27(9):503-8.
 82. Salerud EG, Nilsson GE. Integrating probe for tissue laser Doppler flowmeters. *Medical & biological engineering & computing*. 1986 Jul ;24(4):415-9.
 83. PeriFlux System 5000 [Internet]. [cited 2011 Jan 30] Available from: <http://www.perimed-instruments.com/instruments/laser-doppler-monitors/periflux-system-5000>
 84. Yvonne-Tee GB, Rasool AHG, Halim AS, Rahman ARA. Reproducibility of different laser Doppler fluximetry parameters of postocclusive reactive hyperemia in human forearm skin. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 52(2):286-92.
 85. Zhang Y, Huo M, Zhou J, Xie S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Computer methods and programs in biomedicine*. 2010 Sep ;99(3):306-314.
 86. Gabrielsson J, Weiner D. *Pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis*. 4th ed. Stockholm: Apotekarsocieteten; 2007.
 87. DiStefano JJ. Noncompartmental vs. compartmental analysis: some bases for choice. *The American journal of physiology*. 1982 Jul ;243(1):R1-6.
 88. Tschudi MR, Barton M, Bersinger NA, Moreau P, Cosentino F, Noll G, et al. Effect of age on kinetics of nitric oxide release in rat aorta and pulmonary artery. *The Journal of clinical investigation*. 1996 Aug ;98(4):899-905.
 89. Karch R. *Pharmakokinetische Modelle*. Skriptum zur Vorlesung [Internet]. *Integration The Vlsi Journal*. 2003 ;(1):1-56.[cited 2011 Mar 6] Available from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Pharmakokinetische+Modelle#1>