

Diplomarbeit

**Analyse der Netzhautgefäße vor und nach
individualisierter Shear Rate Therapie**

eingereicht von

Michael Kruger

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor(in) der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitäts-Augenklinik

Unter der Anleitung von

Priv. Doz. Dr. Gerald Seidel

OA Dr. Eva Buschmann

**In Kooperation mit der Hochschulklinik für Angiologie der
Medizinischen Hochschule Brandenburg**

Graz, 26.07.2019

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, 26.07.2019

Michael Kruger eh

Zusammenfassung:

Einleitung: Die externe Gegenpulsationstherapie (ECP) ist ein Verfahren das zur nicht-invasiven Therapie der Koronaren Herzkrankheit entwickelt wurde. Durch Zunahme des intra-arteriellen Druckes (durch das pulssynchrone Aufblasen von Manschetten im Bereich der unteren Extremität) verbessert es die Koronarperfusion und senkt die Nachlast. In der Langezeitanwendung soll die Endothelfunktion verbessert und myokardiale Kollateralisierung induziert werden. Mittlerweile gilt das Verfahren der ECP als überholt und nebenwirkungsbehaftet (Lungenödeme, Arrhythmien, Hämaturie, Hämatome und transischämische Attacken). In dem weiterentwickelten Verfahren, der individualisierten Shear Rate Therapie (ISRT/Herzhose), wird die Therapie unter geringer Druckanwendung anhand der simultan gemessenen Shear-Rate im arteriellen System gesteuert. (1–3) Durch Erhöhung der Schubspannung (Scherspannung; Tangentialspannung, engl. Shear rate) im Gefäßstromgebiet wird das Gefäßendothel durch Mechanosensoren aktiviert und endo-, als exokrine Reaktionen des Endothels induziert. Das Endothel ist der Hauptangriffspunkt für degenerative Prozesse im Gefäßsystem. Als die wesentlichen Stressoren sind eine diabetische Stoffwechsellaage, Nikotinabusus und eine hypertensive Kreislaufregulation zu nennen.

Im Rahmen dieser Arbeit wird als proof of concept trial erstmals die Hypothese untersucht ob eine Kurzzeit ISRT- Therapie einen hämodynamischen Effekt auf die auf die Strombahn der Netzhautgefäße hat. Als Kollektive werden altersgematchte gesunden ProbandInnen, Typ-1 DiabetikerInnen und RaucherInnen untersucht. Diese Diplomarbeit beschreibt den Studienaufbau und bisherige Zwischenergebnisse.

Methoden: Zum Zeitpunkt der Zwischenanalyse wurde eine Kontrollgruppe aus 22 gesunden ProbandInnen, sowie zwei Testgruppen, bestehend aus 14 RauchernInnen und 11 Typ-I DiabetikerInnen im Alter von 21 bis 35 Jahren untersucht. Deren endothelvermittelte Gefäßerweiterung wurde jeweils vor und nach 40-minütiger externer Gegenpulsationstherapie mittels Retinal Vessel Analyzer (Flickerlichtstimulation) und Angiodefender (Flow Mediated Dilatation) untersucht.

Ergebnisse: Die Veränderungen, die nach der ISRT-Therapie beobachtet wurden, wiesen für alle Gruppen keine statistische Signifikanz auf ($p < 0,05$). Bei der Kontrollgruppe kam es nach der ISRT-Therapie zu einem relativen Anstieg der arteriellen Flickerantwort um $20,0 \pm$

85,0%. Bei den Venolen blieb die Flickerantwort unverändert ($0,0 \pm 52,0\%$). Die FMD steigerte sich um $32,9 (\pm 31,6)\%$. Bei den RaucherInnen kam es nach der ISRT-Therapie zu einer tendenziell verstärkten Flickerantwort der Arteriolen und Venolen ($100,0 \pm 135,0\%$ und $18,4 \pm 79,6\%$, respektive). In der FMD-Messung kam es bei RaucherInnen hingegen zu einer geringen, physiologisch bedeutsamen, Abnahme der Gefäßreaktion um $-4,0 (\pm 27,8)\%$. DiabetikerInnen zeigten nach der ISRT-Therapie eine tendenziell verstärkte Flickerantwort der Arteriolen um $34,5 \pm 96,6\%$. Die Venolen verhielten sich annähernd unverändert ($+4,9 \pm 41,5\%$). In der FMD Messung zeigte sich eine geringe, physiologisch unbedeutsame, Abnahme von $2,6 \pm 61,0\%$.

Konklusion: Wir konnten erstmals zeigen, dass bei Gesunden, bei Typ I DiabetikerInnen und bei RaucherInnen durch die Anwendung der ISRT eine Zunahme der endothelvermittelten Gefäßerweiterung am Augenhintergrund erzielt werden kann. Nach ISRT kam es bei allen Gruppen zu einer tendenziellen Verbesserung der endothelvermittelten Gefäßerweiterung. Dieser Effekt war bei RaucherInnen am stärksten ausgeprägt und bei der gesunden Vergleichsgruppe am geringsten. Die Auswirkung auf ProbandInnen mit stärker ausgeprägten Endothelschäden der Netzhautgefäße sowie der Effekt einer mehrzeitigen Anwendung der ISRT könnte Untersuchungsgegenstand weiterführender Studien sein. Alle Studienteilnehmer tolerierten die ISRT Therapie ohne Nebenwirkungen.

Abstract:

Objective: External counterpulsation (ECP) is a procedure for non-invasive treatment of coronary heart disease. The presumed mechanism of action is that an increase of intra-arterial pressure because of puls-synchronous inflation of braces around the lower extremities leads to increase coronary perfusion and decreased after load. In long term use it improves endothelial function and myocardial collateralization. Today the original external counterpulsation procedure with its high pneumatic pressures is outdated because of potential side effects such as pulmonary edema, arrhythmias, hematuria, and transischemic attacks. This problem was solved by its successor called individualized shear rate therapy (ISRT), which uses lower pressures guided by real time shear rate measurements in the arterial vascular system. It measures the maximal acceleration of the arterial flow curve via relative peak slope index and adjusts the pneumatic pressure in the braces accordingly. (1–3) The continuous increase of the shear rate within a vessel activates mechano-sensory receptors and induces endocrine and exocrine stimuli within the endothelium. The endothelium is a pivotal point in vascular damage from diabetes, smoking, and arterial hypertension. In the stage of endothelial dysfunction such damage is reversible; irreversible damage occurs when arteriosclerosis manifests. The primary therapeutic approach to endothelial dysfunction is to increase the intravascular shear rate via increasing blood flow velocity acceleration, for example by cardiovascular training.

This study explores as proof of concept the hypothesis that ISRT has a hemodynamic effect on the retinal vasculature. We compare age-matched healthy subjects, typ-1 diabetics, and smokers. This thesis describes the study setting and our current preliminary results.

Methods: At the time of the preliminary evaluation examinations were performed on a control group of 22 healthy subjects as well as two test groups of 14 smokers and 11 subjects with type-I Diabetes at the age of 21 to 35 years. Their endothelial mediated vasodilation was tested in each case before and after a 40-minute ISRT. Tests were performed with the Retinal Vessel Analyzer (flicker-response) and Angiodefender (flow mediated dilation).

Results: Changes found after ISRT-Therapy showed no statistical significance in all groups ($p < 0,05$). For the control group a relative increase in arterial flicker response of $20,0 \pm 85,0\%$ was observed. The venous vessel response did not change ($0,0 \pm 52,0\%$). FMD measurements increased by $32,9 \pm 31,6\%$ after ISRT therapy. Smokers showed by trend an increase in arterial ($100,0 \pm 135,0\%$) and venous ($18,4 \pm 79,6\%$) response. FMD declined, clinically

insignificant, by $4,0 \pm 27,8\%$ after ISRT therapy. In type-I diabetics an increase in arterial response by $34,5 \pm 96,6\%$ was observed. Venous response and FMD remained nearly unchanged ($+4,9 \pm 41,5\%$ and $2,6 \pm 61,0\%$, respectively).

Conclusion: This is the first report evaluating the endothelium mediated retinal vessel dilatation after ISRT in healthy subjects, typ I diabetics, and smokers. After External Counterpulsation Therapy there was a trend towards increased arterial endothelial mediated vasodilation. This effect was most pronounced in smokers and weakest in healthy controls. Our data warrants further examination on a potential longer lasting effect of multiple ISRT sessions and on the effect of ISRT in patients with more severely damaged retinal vascular. All subjects tolerated the ISRT well.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung:	I
Abstract:	III
Abbildungsverzeichnis:	VII
Tabellenverzeichnis:	VIII
1. Einleitung:	1
1.1. Endotheliale Funktion und Dysfunktion	2
1.2. Netzhautversorgung und Autoregulation:	4
1.3. Risikofaktoren:	6
1.3.1. Rauchen:	6
1.3.2. Diabetes:	8
1.4. Therapiemethoden und Untersuchungen:	11
1.4.1. Individualisierte Shear Rate Therapie (ISRT) – Herzhose:	11
1.4.2. Retinal Vessel Analyzer (RVA):	14
1.4.3. Flussvermittelte Gefäßerweiterung (FMD) - Everist Angiodefender:	16
2. Methoden:	18
2.1. Vorbereitungen:	18
2.2. Literaturrecherche:	18
2.3. ProbandInnen:	19
2.3.1. Ein- und Ausschlusskriterien:	19
2.3.2. Rekrutierung:	19
2.4. Studienablauf:	21
2.4.1. Fragebogen:	23
2.4.2. Augendruckmessung:.....	23
2.4.3. Mydriatische Augentropfen:	23
2.4.4. Optische Kohärenztomographie:	23
2.4.5. RVA:.....	24
2.4.6. FMD:.....	28
2.4.7. ISRT:	30
2.4.8. Post-ISRT Untersuchungen:	32
2.4.9. Datenerfassung und Statistik	32
3. Ergebnisse:	33
3.1. Systemische und lokale Endothelfunktion vor und nach ISRT	34
3.1.1 Kontrollgruppe:	34
3.1.2 RaucherInnen:	35
3.1.3 DiabetikerInnen:.....	36

4. Diskussion:	39
4.1. Zusammenfassung:	40
Literaturverzeichnis:	41

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: ISRT - Herzhose Therapieanordnung	13
Abbildung 2: Schematische Darstellung der ISRT	13
Abbildung 3: Retinal Vessel Analyzer Untersuchungsanordnung.....	15
Abbildung 4: Everist Angiodefender. Untersuchungseinheit.....	17
Abbildung 5: Auflistung der Untersuchungen mit Reihenfolge und Untersuchungsdauer.....	22
Abbildung 3a: Retinal-Vessel-Analyzer Versuchsanordnung.....	25
Abbildung 6: Retinal Vessel Analyzer Untersuchungsinterface	26
Abbildung 7: Nachträgliche RVA Auswertung	26
Abbildung 8: Auswertung der arteriellen Gefäßdurchmesser.....	27
Abbildung 9: Venöse Gefäßdurchmesser im Untersuchungsverlauf	27
Abbildung 10: Phasen der FMD Messung mittels Angiodefender	29
Abbildung 11: Angiodefender Untersuchungsinterface.....	29
Abbildung 1a: ISRT – Herzhose Therapieeinheit.....	31
Abbildung 12: Abbildung des Herzhose Therapie-Interface	31
Abbildung 13: Ultraschallmonitoring während der ISRT	32
Abbildung 14: Untersuchungsergebnisse Flickerantwort und flussvermittelte Dilatation:	38

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Charakteristika der ausgewerteten Kontroll- und Versuchsgruppen.....	33
Tabelle 2: Untersuchungsergebnisse Flickerantwort und flussvermittelte Dilatation im Retinal Vessel Analyzer (RVA) und in der Flow Mediated Dilatation (FMD):.....	37

1. Einleitung:

Kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Tabakkonsum, Diabetes Mellitus und arterielle Hypertonie führen zu einer progredienten Schädigung der Blutgefäße, dies führt in weiterer Folge zu einer Minderperfusion der von diesen Gefäßen abhängigen Geweben. (6–8) Da die Gefäße der Netzhaut eine Endstrombahn darstellen, ist diese besonders empfindlich für eine solche Schädigung. Folge davon kann letztendlich die Einschränkung des Visus, bis hin zur kompletten Erblindung sein. (9,10)

Die einzelnen Schichten unserer Gefäße werden durch Noxen in unterschiedlichem Ausmaß geschädigt. In vielen Fällen ist das Endothel, die innerste unserer Gefäßschichten, frühzeitig betroffen. Das Endothel vermittelt Funktionen wie die Regulation des Gefäßdurchmessers, der Gefäßpermeabilität, der adhäsiven Eigenschaften gegenüber Thrombozyten und der Migration von Leukozyten. Bezeichnet wird die Einschränkung oder der Verlust dieser Eigenschaften allgemein als „endotheliale Dysfunktion“. (11) Zeichen einer endothelialen Dysfunktion können in fortgeschrittenen Stadien funduskopisch erkannt werden. Diese sind unter anderem intraretinale Blutungen, Cotton-Wool-Herde und Ödeme. (12)

Werden die zugrundeliegenden Faktoren nicht rechtzeitig erkannt und behandelt, sind die therapeutischen Maßnahmen meist darauf beschränkt Schadensbegrenzung zu betreiben. Beispiele hierfür sind intravitreale Anti-VEGF Injektionen oder Laser-Koagulation hyperpermeabler Gefäßneubildungen. (13)

Aber auch vor dem Auftreten erster Symptome kann eine sich entwickelnde endotheliale Dysfunktion diagnostisch erfasst werden. Dies kann systemisch mittels Flow Mediated Dilation (FMD) oder direkt an der Netzhaut mittels Retinal Vessel Analyzer (RVA) erfolgen. Beide Methoden geben Aufschluss über die Integrität der Gefäße anhand ihrer Fähigkeit sich auf einen gesetzten Reiz hin zu erweitern. (11)

Ein neuer Therapieansatz, der Entstehung und den Folgen der Endothelialen Dysfunktion entgegenzuwirken ist die individualisierte Shear Rate Therapie (ISRT). Die ISRT führt über Elektrokardiogramm (EKG) getriggerte, pulssynchrone Inflation von Druckmanschetten an den unteren Extremitäten zu einer Beschleunigung der diastolischen Pulsdruckkurve und Augmentation des diastolischen Mitteldruckes. Durch die Summation dieser Mechanismen werden das Herz als auch die intraabdominalen Organe besser perfundiert. Die ISRT. Die ISRT ist derzeit zur Behandlung bei koronarer Herzkrankheit in Verwendung. (14) Das Ziel

dieser Arbeit ist es den Einfluss der ISRT auf die Endothelfunktion mittels FMD systemisch und mittels RVA am Auge zu charakterisieren.

1.1. Endotheliale Funktion und Dysfunktion

Als einschichtige Auskleidung unserer Gefäße bildet das Endothel die innerste Schicht und direkte Kontaktfläche zur Blutbahn. Die Beschaffenheit der Gefäße muss diesen funktionellen Herausforderungen entsprechen.

Endothelzellen sind durch Tight Junctions fest miteinander verbunden und stellen eine dichte Barriere dar. Diese weist je nach Bedarf des umliegenden Gewebes ein gewisses Maß an selektiver Permeabilität durch transzellulären Transport, Poren oder Fenestrations auf. Basal ist das Endothel über Fokalkontakte mit der darunterliegenden Subendothelialschicht verbunden, so dass die Zellen in der Lage sind den stetigen Scherkräften des vorbeiströmenden Blutes standzuhalten.

In der Interaktion mit anderen Zellen und Molekülen aus dem Blut spielen Glykolipide und Glykoproteine eine zentrale Rolle. Diese bilden die sogenannte Glykokalix, eine dichte, negativ geladene Schicht an der Endotheloberfläche. Sie vermittelt welche Blutbestandteile auf parazellulärem Weg in den Subendothelialraum perfundieren dürfen, welche Stoffe durch Adhäsion mit ihm in Verbindung treten, durch Endozytose in die Endothelzellen aufgenommen werden, oder via Exozytose in das Gefäßlumen sezerniert werden. (11,15,16)

Die Adhäsion von Thrombozyten und die Ausbildung von intravasalen Blutgerinnseln beeinflusst das Endothel durch die Sekretion von Prostacyclin und von Willebrand-Faktor. (17) Über Selektin an der Zelloberfläche vermittelt es die Adhäsion und Migration von Leukozyten in die Gefäßwand sowie das umliegende Gewebe und nimmt dadurch Einfluss auf die Entstehung entzündlicher Prozesse. (18)

Das Schlüsselmolekül für viele Endothel-vermittelte Vorgänge stellt Stickstoffmonoxid (NO) dar. Es sorgt für eine Dilatation der Gefäße und für ein antiinflammatorisches Milieu, wirkt antiproliferativ, antimigrativ und antithrombotisch. Hauptsächlich wird dieses über die endotheliale Isoform der NO-Synthetase (eNOS), aus L-Arginin gebildet. (19) Aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit, und guten Gewebegängigkeit entfaltet es seine Wirkung hauptsächlich lokal. Wesentlich ist nicht nur die Menge an synthetisiertem NO, sondern auch dessen Bioverfügbarkeit. Stimuliert wird die NO-Synthese durch Reize wie die vom Blut ausgeübten Scherkräfte und die Cytokine Bradykinin, Adenosin, VEGF und Serotonin. (11,20)

NO führt über eine Tonusminderung der Intima-Muskelzellen zu Gefäßerweiterung, vermehrter Perfusion und einem erhöhten Nährstoffangebot, welches die Netzhaut erreicht.

Dies geschieht der aktuellen Stoffwechsellage angepasst. Die Dilatation von Gefäßen kann auch NO unabhängig von Prostacyclin, Kininen und EDHF (Endothelial derived Hyperpolarizing Factor) vermittelt werden, diese spielt jedoch nur eine untergeordnete Rolle. Direkte Gegenspieler in Bezug auf die Gefäßweitenregulation sind Endothelin, Prostanoiden (PGH₂ und TXA₂), sowie Angiotensin-II (AT₂), welches über das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) an der Endotheloberfläche aus dessen Vorstufe gebildet wird. (21–23)

Mit steigendem Alter wird das Endothel in seiner Funktion zunehmend eingeschränkt, wenn eine Dysbalance zwischen protektiven und schädigenden Einflüssen entsteht. Beispiele für solche Faktoren sind Schadstoffe aus Tabakrauch, verstärkte Glykosilierung bei Diabetes, inflammatorische Prozesse und die Steigerung von Scherkräften durch Hypertonie. (24–26) Als direktes Bindeglied zwischen Körper und im Blut befindlichen Schadstoffen, ist das Endothel einer kontinuierlichen Belastung ausgesetzt, die bereits in der Kindheit beginnt, meist jedoch erst im mittleren Lebensalter klinisch bemerkbar wird. Hierbei werden fast sämtliche Funktionsbereiche des Endothels in Mitleidenschaft gezogen. Man spricht von „Endothelialer Dysfunktion“ (ED) oder „Endothelialer Aktivierung“. (11)

Als temporärer Schutzmechanismus des Körpers konzipiert, führt der permanente Anstieg von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), Zytokinen und Chemokinen, sowie die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen und die gesteigerte Leukozytenmigration zur chronischen Entzündung und Schädigung des Endothels.

Durch die oben genannten Risikofaktoren entstehen in der Gefäßwand eine geringere Menge an protektive Sauerstoffspezies in Form von NO und vermehrt schädliche Sauerstoffradikale (ROS). Letztere inhibieren einerseits die Synthese und verringern die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonooxyd (NO), andererseits bewirken sie in der Gegenwart von Superoxiddismutase einen Anstieg von Wasserstoffperoxid (H₂O₂), welches durch ungehinderte Diffusion im Endothel und dem umliegenden Gewebe ein proinflammatorisches „aktiviertes“ Milieu entstehen lässt. (24,27)

Durch anhaltende Schädigung tritt so eine raschere Zellalterung, ein Verlust der Barriereintegrität, sowie eine Störung der Gefäßweitenregulation und chronische Entzündungsprozesse auf. Dies ist der Ausgangspunkt für die Entstehung von arteriosklerotischen Prozessen, arterieller Hypertonie und intravasalen Gerinnseln, die wiederum zu einer weiteren Verschlechterung der Gefäßsituation und hypoxischen Schädigung des von diesen Gefäßen abhängigen Gewebes führt.

Der menschliche Körper kann eine stattgefundenen Endothelschädigungen teilweise kompensieren. Das Endothel verfügt neben der eingeschränkten Fähigkeit zur lokalen

Zellteilung auch über die Möglichkeit zur Rekrutierung von Progenitorzellen aus dem zirkulierenden Blut. (28,29) Reichen die körpereigenen Ressourcen nicht aus, so kann durch externes Einwirken Einfluss auf die Gefäßbeschaffenheit und Funktion genommen werden. Die wichtigste Maßnahme ist die Reduktion der klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren durch Nikotinkarenz, adäquate Ernährung und gegebenenfalls das medikamentöse Management von Blutdruck, Lipidstoffwechsel und Blutzucker. Weiters sind pharmakologische Therapieansätze in Form von ACE-Hemmern, AT1-Blockern, B-Blockern, Calciumkanal-Blockern, Phosphodiesterase-5-Hemmer und antioxidativen Wirkstoffen mit bisher geringem Erfolg im Einsatz. (30)

Sport und Bewegungstherapie regen auf humoralem Weg und über Scherkraft-induzierte NO Freisetzung die Gefäßperfusion und Reparaturmechanismen des Endothels an. (31,32) Die externe Gegenpulsationstherapie (ISRT) simuliert diesen Effekt (Mehr dazu unter Punkt 1.4.1).

1.2. Netzhautversorgung und Autoregulation:

Wie die meisten Gewebestrukturen und Organe ist auch die menschliche Netzhaut zu ihrer Versorgung großteils von direkter Durchblutung abhängig. Die inneren Schichten der Netzhaut (Membrana Limitans Interna bis zum Stratum Nucleare externum) werden von den retinalen Kapillaren versorgt, welche aus der A. Centralis Retinae stammen. Die äußeren Schichten bis hin zum retinalen Pigmentepithel sind auf die Diffusion aus der gefäßreichen Lamina Choriocapillaris der Aderhaut angewiesen. Die Nährstoffzufuhr über das Kammerwasser spielt für die Versorgung der Hornhaut und der Linse eine wesentliche Rolle, ist für die Netzhautversorgung aber vernachlässigbar. (12,33,34)

Die Autoregulation der okulären Durchblutung sorgt für einen weitgehend konstanten Perfusionsdruck und passt diesen den metabolischen Bedürfnissen an. Auch bei einem verhältnismäßig starken Anstieg des systemischen arteriellen Blutdruckes, etwa durch körperliche Belastung, kann so für weitgehend gleichbleibende Perfusions-, Druck- und Temperaturverhältnisse im Auge gesorgt werden. (31,32,35,36) Das okuläre Gefäßsystem reagiert anders auf externe Stimuli als jene des systemischen oder zerebralen Kreislaufes. (37) Selbst innerhalb der okulären Gefäße zeigen sich Unterschiede zwischen der Lamina Choroidocapillaris und dem retinalen Gefäßsystem. Funktionell können die Autoregulationsmechanismen zusätzlich in eine statische und dynamische Form unterteilt werden. (34,36)

Dynamische und statische Autoregulation:

Die statische Gefäßweiten- und Widerstandsregulation dient der langfristigen Anpassung an veränderte Kreislaufbedingungen. Sie reagiert mit einer Latenz von mehreren Minuten auf Veränderungen und wird sowohl lokal, metabolisch, neuronal als auch myogen vermittelt. Bei der dynamischen Regulation finden Anpassungen hingegen größtenteils auf neuronalem Weg, innerhalb weniger Sekunden statt.

Retinale und choroidale Autoregulation:

Der Blutfluss in der Retina erscheint verhältnismäßig gering, was jedoch durch eine hohe Sauerstoffextraktionsrate ausgeglichen wird. (33) Der Austausch höhermolekularer Botenstoffe ist hier aufgrund der von den Endothelzellen gebildeten Blut-Retina-Schranke nur begrenzt möglich. In ihrer Anpassung sind die retinalen Gefäße deshalb hauptsächlich auf lokale Faktoren wie pH-Wert, O₂-, CO₂-, NO-Konzentration sowie auf die neurovaskuläre Koppelung zwischen den Gefäßen und der Retina selbst angewiesen. (23,33,34,38)

Die Choroidea ist durch einen hohen Blutfluss, jedoch geringe Sauerstoffextraktionsraten gekennzeichnet. Vermutet wird deshalb, dass dieses Gefäßsystem neben dem Nährstofftransport auch als Thermoregulationsmedium und Volumenpuffer fungiert. Auch morphologisch bestehen Unterschiede zwischen choroidalen und retinalen Gefäßen. Die Fenestrierung des choroidalen Endothels macht selbiges durchlässig für Moleküle, welche die Blut-Retina-Schranke des retinalen Endothels nicht überwinden können. Somit spielt die choroidale Gefäßversorgung nicht nur beim An- und Abtransport von Stoffwechselprodukten eine zentrale Rolle. Hier ist es möglich, dass neben den sympathischen Einflüssen und lokalen Mediatoren auch andere Botenstoffe die Intima-Muskelzellen erreichen und Einfluss auf die Gefäßregulation nehmen. (34)

Verlieren die Gefäße der Retina im Zuge endothelialer Dysfunktion ihre Fähigkeit zur Autoregulation führt dies zu Minderperfusion, Mikroaneurysmen, Degeneration, Neovaskularisation sowie zu gestörter Gefäßintegrität, Permeabilität und erhöhtem intraokularem Druck (IOP). Diese Vorgänge gehen auf weiter Strecke symptomlos vonstatten, sind jedoch der Ausgangspunkt für okuläre Pathologien wie diabetische Retinopathie, Makuladegeneration und Glaukom; Erkrankungen, die in Industrienationen zu den häufigsten Ursachen für Erblindung zählen. (39–41)

Der Retinal Vessel Analyzer hat sich als verlässliche Methode erwiesen, um eine Schädigung der retinalen Gefäße frühzeitig und nicht-invasiv beurteilen zu können. (42)

1.3. Risikofaktoren:

1.3.1. Rauchen:

Das Rauchen von Zigaretten ist als maßgeblicher Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen bekannt. Bereits Mitte des 20. Jahrhunderts wurde in ersten Studien der Zusammenhang zwischen Tabakkonsum und Gefäßerkrankungen gezeigt. (43)

Laut WHO ist Rauchen ursächlich für rund 10% der Herz-Kreislauf Erkrankungen in der westlichen Welt. (44) Trotzdem sind die genauen pathophysiologischen Schädigungsmechanismen, die dahinter stecken auf Grund ihrer Komplexität noch weitgehend unbekannt. Über 4000 verschiedene chemische Verbindungen sind in Zigarettenrauch enthalten. Teilweise schädigen diese den Organismus direkt, teilweise unterliegen sie erst Verstoffwechslungsprozessen bevor sie ihre schädliche Wirkung entfalten. Weiters hängt das Maß der Schädigung von den individuellen Rauchgewohnheiten, der konsumierten Menge an Tabak, der Tabakmarke, sowie der zugrundeliegenden Genetik einzelner Individuen ab. (7)

Neben den makroskopisch und mikroskopisch sichtbaren Läsionen, welche durch den Tabakkonsum an unseren Gefäßen entstehen, wurden in den 90er Jahren auch erste funktionelle Auswirkungen untersucht. Hierbei hat sich die Fluss-medierte Dilatation (FMD) der Gefäße als aussagekräftige Untersuchung erwiesen. Diese weist bereits vor dem Auftreten erster klinischer Symptome auf eine eingeschränkte Gefäßfunktionalität hin, kann nicht-invasiv ermittelt werden und korreliert sowohl bei Rauchern als auch bei Passivrauchern direkt mit dem Grad der Rauchexposition. (45,46) Des Weiteren ist die Einschränkung der Fluss-medierten Dilatation ein größtenteils reversibler Prozess, was ihn auch für die Beurteilung des Erfolges von Raucherentwöhnungs-Therapien eignet. (47,48)

Die Schädigung und der daraus resultierende Funktionsverlust sind einerseits Folgen direkter zytotoxischer Wirkungen der im Tabak enthaltenen Chemikalien. Diese induzieren Autophagie, Apoptose und Nekrose der Endothelzellen. (7) Andererseits sind dies Folgen der bereits im Kapitel 1.1. erwähnten Verringerung der NO-Konzentration und Bioverfügbarkeit, sowie des Anstieges oxidativer Spezies aus der mitochondrialen Atmungskette und Entzündungszellen. Die gesteigerte Menge und Aktivität letzterer resultiert aus einer Aktivierung und Modulation unseres Immunsystems die durch das Rauchen verursacht wird. Bei RaucherInnen kann eine signifikante Zunahme an neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, Monozyten und Lymphozyten, sowie proinflammatorischer Zytokine und C-reaktiven Proteins beobachtet werden. (49,50) Neben der erhöhten Anzahl an

Entzündungszellen kommt es zu einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen und verringerten Integrität der endothelialen Barrierefunktion, was zur verstärkten Migration in die Gefäßwände führt. (51,52) Die Auswirkung von Rauchen auf das Immunsystem ist allerdings komplex und neben seiner pro-inflammatorischen Wirkungen hat Rauchen auch eine immunsupremmierende Komponente. (53)

Eine weitere Beobachtung, die bei Rauchern gemacht werden konnte, ist die sowohl quantitative als auch qualitative Veränderung des Lipidprofils. Im Serum von RaucherInnen konnte ein erhöhtes Gesamtcholesterin, Triglyceride, sowie Low Density und Very Low Density Lipoprotein (LDL und VLDL) nachgewiesen werden, welche das Risiko für die Entstehung von Atherosklerose erhöhen. Lipide mit protektiven Eigenschaften wie High Density Lipoprotein (HDL) und Apolipoprotein-1 waren hingegen verringert. (54,55) Werden die Lipide aufgrund der erhöhten Anzahl an oxidativen Spezies zusätzlich quantitativ verändert, führt dies zu einer vermehrten Aufnahme durch Makrophagen, sowie einer Ausbildung von Schaumzellen und Lipiddisposition in den Gefäßwänden. (56) Dies sind Prozesse, die eine essentielle Rolle in der Entstehung von arteriosklerotischen Gefäßveränderungen spielen.

Rauchen verursacht die Ausbildung arterieller Plaques und Verkalkungen, zunehmende Proliferation vaskulärer Muskelzellen sowie eine gestörte Regulation dieser über das NO-System. Resultat daraus sind eine Erhöhung des systemischen arteriellen Blutdruckes und dadurch weitere Endothelschädigungen. (57,58)

Unser Gerinnungssystem steht direkt unter dem Einfluss der im Tabak enthaltenen Chemikalien. Die Aktivierung von Thrombozyten und der Gerinnungskaskade, sowie eine Einschränkung der Fibrinolyse haben die Entstehung intravasaler Gerinnsel und Minderperfusion zur Folge. (59,60)

Auch in der Augenheilkunde spielen die genannten Gefäßveränderungen eine wichtige Rolle. Beim Fundus Arteriosclerosus und Fundus Hypertonicus kommt es durch eben diese zur Einengung und dem Verschluss von Kapillaren oder dem Verlust der endothelialen Barrierefunktion. Morphologisch sind retinale Blutungen, Cotton-Wool-Herde, Netzhautödeme und Papillenschwellungen das Korrelat zu den klinisch auftretenden Sehstörungen und der Visusverschlechterung, die dadurch entsteht.

1.3.2. Diabetes:

Diabetes Mellitus ist in Industrienationen eine häufige Erkrankung, die in Form der diabetischen Retinopathie zu den führenden Ursachen für Erblindung zählt. (13) Im Zuge der Erkrankung kommt es zu mikro- und makrovaskulären Läsionen, die zu einer Schädigung von Endorganen führen. (8) Wie bei der Gefäßschädigung durch andere Kardiovaskuläre Risikofaktoren spielt auch bei Diabetes Mellitus die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion eine zentrale Rolle.

Die genaue Entstehung der diabetischen Gefäßschädigung ist noch nicht zur Gänze verstanden, da diese multifaktoriell bedingt ist. Bei Diabetes Typ-I stellt Hyperglykämie die wichtigste Entstehungsursache dar. (8) Dies gilt auch für Diabetes Typ-II, der Schädigungsprozess ist jedoch aufgrund der häufigen Vergesellschaftung mit anderen Risikofaktoren wie Adipositas und dem Metabolischen Syndrom noch komplexer. (61) Da nicht diabetische erstgradige Verwandte von Typ-II Diabetikern ebenfalls erhöhte Marker für Endothelschädigung und verringerter Endothelfunktion aufweisen, ist eine genetische Komponente nicht auszuschließen. (62)

Zuckermoleküle spielen eine entscheidende Rolle bei der Signaltransduktion zwischen Zellen und Molekülen. Chronische Hyperglykämie führt zu einer nichtenzymatischen Glykosilierung und damit Veränderung dieser Zuckermoleküle. Es entstehen sogenannte AGEs (Advanced Glycosilation Endproducts). (8) Werden Proteine, Lipide und Makromoleküle auf diese Weise modifiziert, stört dies physiologische Prozesse in der Molekül- und Zellinteraktion. Diese Vorgänge lassen in Kombination mit dem gestörten Insulinstoffwechsel, bei Diabetes Mellitus ein Milieu entstehen, welches unser Gefäßendothel schädigt. (63,64)

Wie bei Rauchern, spielt Stickstoffmonoxid (NO) auch bei der diabetisch bedingten endothelialen Dysfunktion eine zentrale Rolle. Hohe Blutzucker und Fettsäurespiegel inhibieren dessen Synthese durch die endotheliale NO-Synthetase und NADPH Oxidase. (8,65) Dieser Prozess wird unter anderem über die Proteinkinase C Beta vermittelt. (66) Werden die Synthese und Bioverfügbarkeit von NO und dessen Co-Faktoren beeinträchtigt, lässt dies ein proinflammatorisches Milieu entstehen und schränkt NO-vermittelte Gefäßfunktionen ein. (61)

Erhöhte Konzentrationen proinflammatorischer Sauerstoffspezies, Cytokine und Transkriptionsfaktoren wie TNF α (Tumornekrosefaktor-alpha) und NF- κ B (Nuclear Factor-kappa B) lassen sich im Serum von Diabetikern bestimmen. (67) Die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen wie cICAM-1 (cellular intercellular adhesion molecule-1) und cVCAM-1 (cellular vascular cell adhesion molecule -1) fördern die Migration von Lymphozyten in die Gefäßwand und damit weitere inflammatorische Prozesse. (68) Dies verursacht eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Verstopfung von Kapillaren und die Entstehung von mikrovaskulären Ödemen. Inflammation begünstigt auch die Entstehung arteriosklerotischer Plaques. Dies wird bei Diabetes zusätzlich durch Hyperglykämie und die Einlagerung glykierter Lipide in die Gefäßwand begünstigt. Neben der Neigung zur Arteriosklerose besteht bei endothelialer Dysfunktion zusätzlich ein erhöhtes Risiko für thrombotische Gefäßverschlüsse und sekundäre Blutungen. Während die antithrombotische Wirkung von NO eingeschränkt wird, steigen die Spiegel prothrombotischer Stoffe wie PAI-1 (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor), E-Selectin, Typ-IV Kollagen und vWF (van Willebrand Faktor) an. (8)

Auch Insulin selbst greift in den NO Stoffwechsel ein. Während Insulin in normalen Konzentrationen die NO Synthese und Vasodilatation fördert, wird durch Insulinresistenz, zu niedrige oder zu hohe Insulinspiegel ein gegenteiliger Effekt erzielt. (69) Treten im Rahmen des Diabetes Mellitus Typ-II hohe Insulinwerte auf, fördert dies die ungewollte Proliferation vulnerabler und hyperpermeabler Gefäße sowie das Wachstum und die Konstriktion von Intimamuskulazellen. (8) Ein erhöhter Gefäßtonus und verringerte Vasodilatation sind die Folge. Das Endothel von Netzhautgefäßen reagiert besonders sensibel auf diese insulinvermittelten Veränderungen. (70)

Nachweisen kann man die Einschränkung der Gefäßfunktion bei Diabetes Mellitus nicht nur durch erhöhte Werte von Serummarkern. Auch funktionelle Tests geben Aufschluss über den Zustand von Gefäßen. Bei der Flickerlicht Stimulation mittels RVA (Retinal Vessel Analyzer) und der Bestimmung der FMD (Flow Mediated Dilation) kann die Funktion von Gefäßen an der Netzhaut und im systemischen Kreislauf qualitativ respektive beurteilt werden. (71–74) Gemessen wird dabei die Fähigkeit der Gefäße, sich auf einen gezielt gesetzten Reiz hin zu erweitern. In beiden Tests zeigen Diabetiker Einschränkungen. (71,73,75)

Morphologisch können die Gefäßveränderungen mit Hilfe von Ultraschalluntersuchungen sichtbar gemacht werden. Die Verdickung der Gefäßwände und Ablagerungen sind jedoch erst in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung sichtbar. (76) Ähnliches gilt für die funduskopische Untersuchung, Fluoreszenzangiografie und OCT (optische Kohärenztomografie) der Netzhaut im Rahmen der diabetischen Retinopathie.

Kapillarverschlüsse, Netzhautödeme und Blutungen, Neovaskularisationen, Aneurysmen und Exsudate sind erst dann zu erkennen, wenn bereits eine strukturelle Schädigung vorliegt. (77)

Um den Folgen der endothelialen Schädigung entgegenzuwirken sind derzeit unterschiedlichste medikamentöse und interventionelle Therapien in Erprobung und Anwendung. Neben einer Lebensstilanpassung und Insulintherapie, brachte der Einsatz von Antioxidantien und Arginin keinen Erfolg. Orale Antidiabetika, Insulinsensitizer, Lipidsenker Antihypertensiva und ACE-Hemmer sind effektiv. Die Zahl der gefäßassoziierte Komorbiditäten bei Diabetes ist jedoch auch unter Therapie noch immer deutlich erhöht.(70,78) Rund 90% aller Diabetiker leiden nach 20 Jahren unter diabetischer Retinopathie. Aus diesem Grund ist es in der Augenheilkunde noch immer nötig, eine Vielzahl an Diabetikern mittels retinaler Laserkoagulation und intravitrealen antiVEGF-(Vascular Endothelial growth Factor) und Steroidinjektionen zu behandeln. (77)

Physische Aktivität in Form Sport und Bewegungstherapie fördern eine Verbesserung der diabetischen Stoffwechsellage und eine Steigerung der Insulinsensitivität. (61) Die Gefäßfunktion wird hierbei humoral und über Scherkraft-induzierte NO Freisetzung gefördert. Es erfolgt eine transiente Perfusionssteigerung und Anregung endothelialer Reparaturmechanismen. (31,32) Durch eine Simulation dieser Effekte mittels ISRT (Enhanced Extracorporeal Counterpulsation Therapy) könnte ein positiver Beitrag zur Vermeidung von Spätkomplikationen bei Diabetes geleistet werden. (79–81)

1.4. Therapiemethoden und Untersuchungen:

1.4.1. Individualisierte Shear Rate Therapie (ISRT) – Herzhose:

Die individualisierte Shear Rate Therapie (ISRT) ist eine nicht-invasive Maßnahme zur Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen. Über eine pneumatische Kompression der unteren Extremitäten, kommt es über Mechanotransduktoren zu einer zu einer humoralen Stimulation des Gefäßendothels und zu einer Verbesserung des diastolischen Blutflusses und der Perfusion der Herzkranzgefäße und der intraabdominellen Organe sowie der zerebrovaskulären Strombahn. (82) Die ISRT wird im klinischen Alltag auch als Herzhose® bezeichnet.

In dem weiter entwickelten Verfahren, der individualisierter Shear Rate Therapie (ISRT), wird die Therapie unter Anwendung von geringen Drucken anhand der simultan gemessenen Shear-Rate im arteriellen System gesteuert. Hierzu wird patienten-individuell die maximale Beschleunigung der arteriellen Flußkurve mittels RPSI (relative peak slope index) bestimmt und darauf das Druckprofil in den externen Manschetten angepasst Die Weiterentwicklung dieser Methode, die ISRT (Enhanced External Counterpulsation Therapy) funktioniert nach einem ähnlichen Prinzip.

Abbildung 1. zeigt die Versuchsanordnung der ISRT in unserem Setting. Eine EKG synchronisierte, diastolische und serielle Inflation von distal nach proximal verursacht die hämodynamische Wirkung. Die zeitliche Abfolge des Aufblasens und Ablassens der Manschetten wird in Abbildung 2. verdeutlicht. Mit der ISRT werden wesentlich geringere Inflationsdrücke benötigt und es kann eine schnellere und gezieltere Inflation bewerkstelligt werden als bei der regulären externen Gegenpulsationstherapie. (83,84) Zusätzlich zum geringeren Nebenwirkungsprofil hat die externe Gegenpulsation gegenüber ihren Vorgängern auch den Vorteil nicht nur zentral wirksam zu sein. Die periphere Kompression wirkt sich auf das gesamte Gefäßsystem hämodynamisch aus und regt die Gefäße durch die mechanische Einwirkung und neurohumorale Stimulation an. Dies ermöglicht auch den Einsatz zur Durchblutungsförderung von Organen, wie dem Hirn oder dem Auge. (85–89)

Der Mechanismus hinter der durchblutungsfördernden Wirkung der ISRT ist noch nicht zur Gänze verstanden. Vermutet wird ein Zusammenspiel aus mehreren Faktoren. Einerseits verursacht die externe Kompression eine direkte Steigerung der diastolischen Blutflussgeschwindigkeit (Acceleration) als auch einen Anstieg des arteriellen Mitteldruckes; in Summe wird hierdurch eine a) verlängerte Perfusionphase ermöglicht und des Weiteren insbesondere durch die b) erhöhten Scherraten das Kollaterale Flussbett rekrutiert und aktiviert (aktives Remodelling präexistenter Arteriolen zu funktionellen Arterien (90))

Zusammenfassend führt die mechanische Stimulation zu einem Effekt, der jenem von physikalischer Aktivität in Form von Sport oder Bewegungstherapien ähnelt. (82)

werden diese auf neurohumoraler Ebene stimuliert. Dabei werden Wachstumsfaktoren und gefäßprotektive, antioxidative, antiinflammatorische und gefäßdilatierende Stoffe wie Stickstoffmonoxid (NO) freigesetzt. (79,91) Dies fördert körpereigene Reparaturmechanismen in Form von endothelialen Progenitorzellen, welche im Blut zirkulieren. (92) Der Blutspiegel gefäßkonstringierender Faktoren wie Endothelin und Proinflammatorischer Moleküle wie TNF- α , CRP, VCAM und lipid peroxidation Marker-8 konnten durch die ISRT Therapie gesenkt werden. (79,91) Funktionell können systemisch, kardial, zerebral und okulär positive Effekte nachgewiesen werden. (80,81) Die systemische Auswirkung wird anhand der Flow medierten Vasodilatation (FMD) beurteilt, dabei wird nach mehrminütiger pneumatischer Okklusion der Extremitätengefäße die reaktive Vasodilatation gemessen. Die Fähigkeit zur Vasodilatation gibt indirekten Aufschluss über die Funktionsfähigkeit des Gefäßendothels. Im Versuch konnte eine Verbesserung der FMD nach Externer Gegenpulsationstherapie gezeigt werden. (79,91) Bei DiabetikerInnen führt ISRT außerdem zu einer Verringerung an AGEs (Advanced glycosilation endproducts) und proinflammatorischen Zytokinen (VCAM und Prostaglandinen). Postprandiale Blutzuckerspiegel und HbA1c Langzeitwerte sind unter ISRT-Therapie stabiler. (80,81)

Am Auge sind positive Auswirkungen der externen Gegenpulsationstherapie nur bei ischämischer Stoffwechsellage zu beobachten. Bei gesunden ProbandInnen konnten bisher nur ein sehr geringer Effekt nachgewiesen werden. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die okulären Autoregulationsmechanismen bei bereits adäquater Durchblutung einen weiteren Anstieg der Perfusion verhindern. Bei arteriosklerotisch veränderten Gefäßen, Gefäßverschlüssen, Diabetikern und Rauchern ist mittels Scanning-Laserdoppler-Flowmetrie eine Verbesserung der mittleren Durchblutung, bei sinkendem Augeninnendruck zu erkennen. (85–87) Eine Verbesserung der Durchblutung des Ramus-Anostomoticus konnte ebenfalls gezeigt werden. (93) Hinsichtlich der Auswirkung auf okuläre Gefäßneubildungen konnten bisher keine Auswirkungen beobachtet werden. Diese Studie soll dazu beitragen den funktionellen Einfluss der externen Gegenpulsationstherapie auf die Netzhautgefäße von Rauchern und Diabetikern mittels Retinal Vessel Analyzer genauer zu beleuchten.



Abbildung 1: ISRT - Herzlose Therapieanordnung

Untersuchungsliege mit pneumatischen Manschetten an den unteren Extremitäten. Diese werden EKG-getriggert in der diastolischen Phase von Distal nach Proximal befüllt und zu Beginn der Systole Entlüftet.

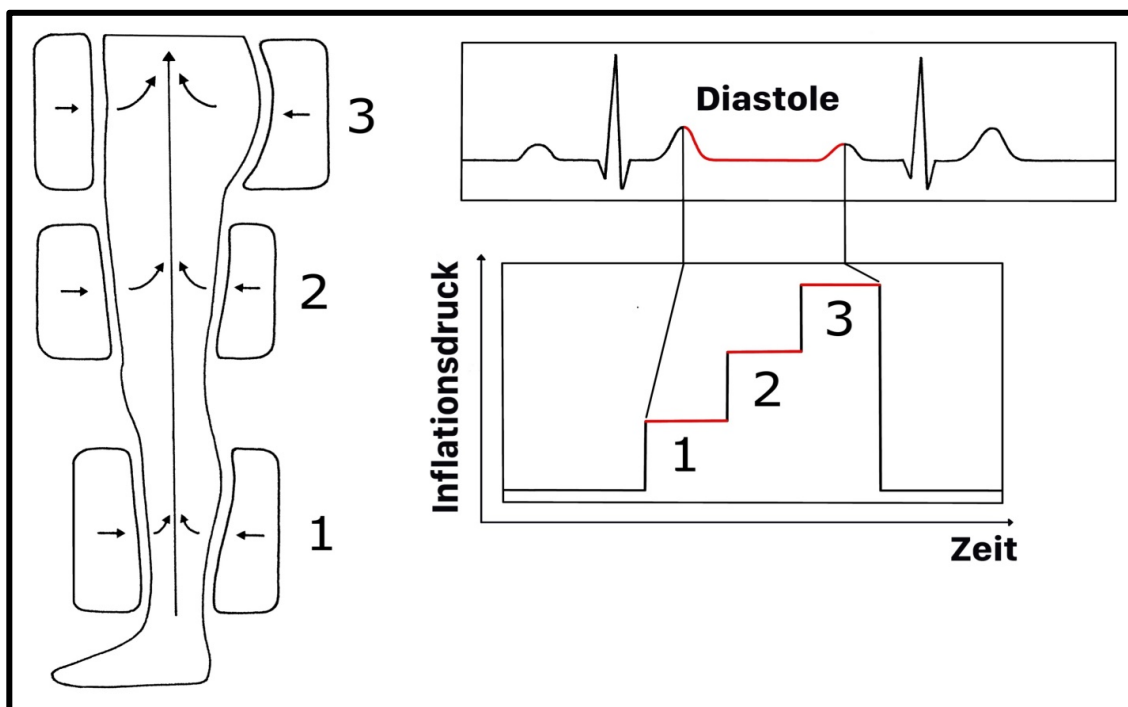


Abbildung 2: Schematische Darstellung der ISRT

Pneumatischen Manschetten und deren Positionierung. Dargestellt ist der zeitliche Zusammenhang zwischen EKG (Diastole) und den einzelnen Inflationsphasen (1-3) von Distal nach Proximal.

1.4.2. Retinal Vessel Analyzer (RVA):

Der Imedos Retinal Vessel Analyzer ist eine nicht-invasive Methode zur kontinuierlichen, dynamischen Analyse retinaler Gefäßparameter. Es handelt sich dabei um eine modifizierte Zeiss FF450 Funduskamera (Zeiss Medical, Jena, Deutschland), welche mit einer Computereinheit zur Datenverarbeitung, Speicherung und Auswertung verbunden ist. Abbildung 3. zeigt den Retinal Vessel Analyzer in unserer Versuchsanordnung.

Der Retinal Vessel Analyzer verfügt über eine Halogen-Lichtquelle mit Grünlichtfilter, welche die Netzhaut durch die Pupille beleuchtet. Das grüne Licht mit einer Wellenlänge von 400-620nm eignet sich gut zur Analyse der Netzhautgefäße. (94,95) Dieses wird von den Erythrozyten in den Blutgefäßen großteils adsorbiert, während die restliche Netzhaut dieses reflektiert. Das entstehende Helligkeitsprofil wird über die CCD Funduskamera erfasst und digital nachbearbeitet. Dies ist notwendig, um den Einfluss störender Artefakte, wie Reflektionen an Gefäßoberflächen oder Schatten-Effekte, möglichst gering zu halten. (95,96) Die Analyse eines oder mehrerer Gefäße kann in Echtzeit (online) oder nachträglich anhand des aufgezeichneten Videomaterials, an einem oder mehreren arteriellen oder venösen Gefäßen, durchgeführt werden. Möglich ist dies bei Gefäßabschnitten mit einem Durchmesser von 90-200µm, auf eine maximale Länge von 3mm, einer Räumlichen Auflösung von 1µm und einer zeitlichen Auflösung von 25ms. (96) Auf diese Weise wird eine kontinuierliche Messung der Gefäßdurchmesser (D) ausgewählter Gefäßabschnitte durchgeführt. Indirekt kann gemäß Hagen-Poiseuille auch Rückschluss auf andere Gefäßparameter wie etwa den Blutfluss (BF) oder den Gefäßwiderstand (R) gezogen werden. $BF=PP/R$ wobei gilt: $R=\eta L/2\pi r^4$ PP(Perfusionsdruck), η (Viskositätskoeffizient), L(Länge), r(Radius). (97) Weiters ist es möglich, die Netzhautgefäße durch Flickern des Untersuchungslichtes mit einer Frequenz von 2 - 64Hz gezielt zu stimulieren und so eine reaktive Gefäßdilatation hervorzurufen. (98) Der genaue Zusammenhang zwischen Flickerstimulation und Vasodilatation ist noch nicht zur Gänze verstanden und wird als neurovaskuläre Koppelung beschrieben. (99,100) Das Ausmaß der Gefäßdilatation gibt indirekten Aufschluss über den Zustand und die Funktionsfähigkeit des Endothels, welches für die Regulation der Gefäßweite hauptverantwortlich ist. Liegt eine Schädigung des Endothels vor, wie etwa im Rahmen von Diabetes Mellitus, arterieller Hypertension oder Tabakkonsum fällt die Antwort auf den gesetzten Flickerreiz entsprechend schwächer aus. (71,75) Die verminderte Reaktion am Auge bei diesen ProbandInnen korreliert mit den Gefäßanalysen mittels FMD (Flow Mediated Dilation). (101)

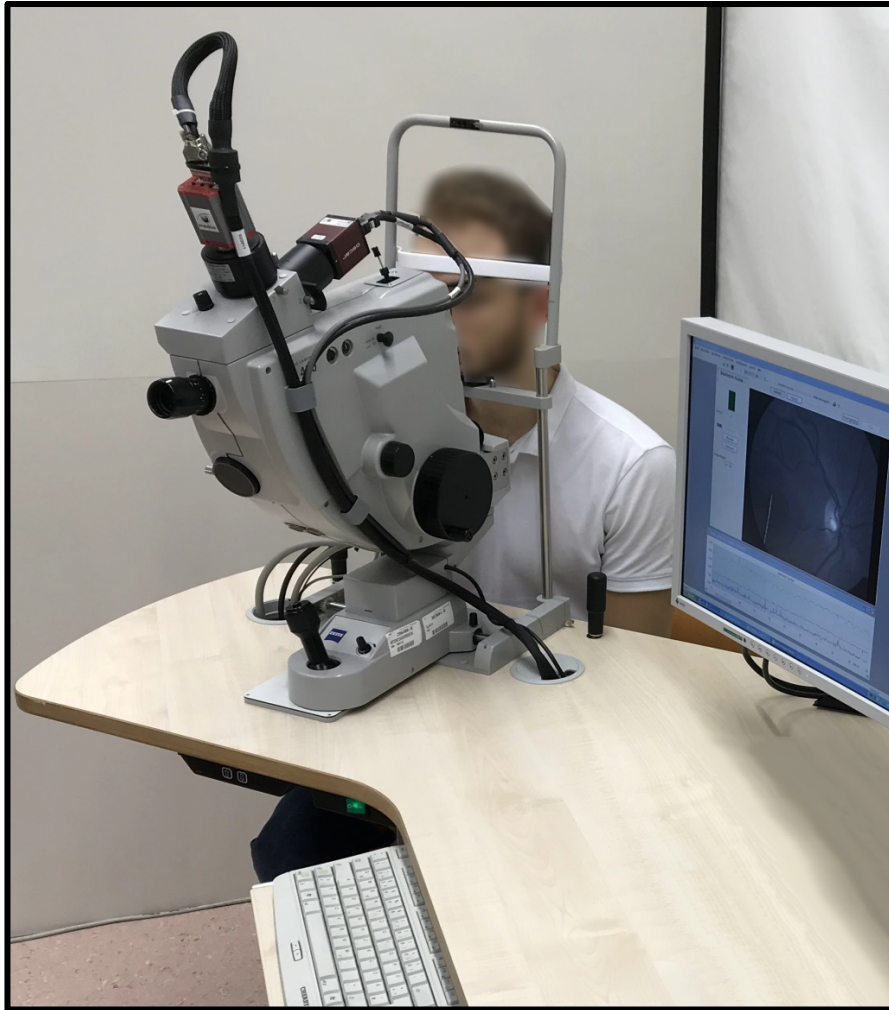


Abbildung 3: Retinal Vessel Analyzer Untersuchungsanordnung

Die modifizierte Zeiss FF450 Funduskamera macht eine funktionelle Beurteilung des retinalen Gefäßendothels möglich. Erfasst wir dabei die reaktive Gefäßerweiterung nach Flickerlichtstimulation.

1.4.3. Flussvermittelte Gefäßerweiterung (FMD) - Everist Angiodefender:

Die Bestimmung der flussvermittelten Vasodilatation (FMD) ist eine nicht-invasive Methode zur funktionellen Beurteilung der systemischen Endothelfunktion. Hierfür wird die reaktive Gefäßerweiterung am Oberarm, nach mehrminütiger pneumatischer Kompression der oberen Extremität erfasst.

Im Jahr 1992 wurden erste Studien über die flussvermittelten Vasodilatation zur Bestimmung der Endothelfunktion beziehungsweise endothelialen Dysfunktion veröffentlicht. (45) Die Messung wird mittels hochauflösenden Ultraschalles der Brachialarterie vor und nach fünfminütiger Okklusion mittels einer handelsüblichen Blutdruckmanschette (220mmHg) durchgeführt. Diese Methode gilt auch heute noch als Goldstandard der FMD Bestimmung. Durch die Okklusion der Oberarmgefäße kommt es nach Deflation der Blutdruckmanschette zu einer reaktiven Hyperämie welche im Ultraschall quantitativ beurteilt werden kann. (BAUI, Brachial Artery Ultrasound Imaging) Ausgelöst wird die reaktive Gefäßerweiterung durch eine Zunahme der Scherkräfte, welche durch den verstärkten Blutfluss zustande kommt. Über Scherkraft-empfindliche K⁺-Kanäle kommt es sekundär auch zu einem verstärkten Ca²⁺ Einstrom und damit zur Aktivierung der endothelialen NO-Synthetase (eNOS). Das von ihr gebildete NO (Stickstoffmonoxid) ist für die endothelvermittelte reaktive Gefäßerweiterung verantwortlich. (102,103) Bei jungen gesunden ProbandInnen findet sich in der Regel eine flussvermittelte Vasodilatation von über 10%. Eine geringe flussvermittelte Vasodilatation deutet auf eine Störung der NO-vermittelten endothelialen Funktionen hin. Alle klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren wie Dyslipidämie, Rauchen, arterielle Hypertension, Diabetes und hohes Alter verursachen eine solche Abnahme der flussvermittelten Dilatation.

Ein Schwachpunkt der FMD Bestimmung ist die große Abhängigkeit der Ergebnisse von Untersuchungstechnik und verwendeten Geräten. (104) Aus diesem Grund wurde von Everist der Angiodefender entwickelt. (Siehe Abbildung 4) Das Gerät arbeitet fast vollkommen autonom und soll so zu einer Reduktion der benutzerabhängigen Fehler führen. Anstatt eines hochauflösenden Ultraschalles verwendet der Angiodefender dieselbe Blutdruckmanschette, welche auch zur Okklusion verwendet wird, um damit die Pulscurve der Brachialarterie aufzuzeichnen. Anhand dieser soll die flussvermittelte Dilatation vom Gerät errechnet werden. Zurzeit steht nur eine beschränkte Anzahl an validen Studiendaten zum Vergleich dieser Technik mit der ultraschallbasierten FMD Messung zur Verfügung. (105,106)



Abbildung 4: Everist Angiodefender. Untersuchungseinheit

Die Blutdruckmanschette wird für eine mehrminütige Okklusion der Oberarmgefäße verwendet. Nach Verringerung des Inflationsdruckes wird mit ihrer Hilfe die endothelvermittelte reaktive Hyperämie anhand des Blutdruckprofils bestimmt.

2. Methoden:

Die Durchführung der Studie erfolgte gemäß den Standards of Good Scientific Practice und wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz genehmigt.

2.1. Vorbereitungen:

Die Planungsarbeiten zur Studie haben im Juli 2017 begonnen. Dabei wurde das vorläufige Studienthema „Untersuchung der Netzhautgefäße vor und nach individualisierter Shear Rate Therapie“, das Studiendesign und der Zeitplan vorläufig festgelegt. Das ursprüngliche Studiendesign umfasste je 10 ProbandInnen aus den Subgruppen gesunde NichtraucherInnen, gesunde RaucherInnen und Typ-I DiabetikerInnen, die vor und nach individualisierter Shear Rate Therapie mittels RVA (Retinal Vessel Analyzer) und Angiodefender (Flow vermittelte Vasodilatation) untersucht werden sollten. Die Fallzahlanalyse ergab eine erforderliche Anzahl von 19 ProbandInnen pro Gruppe um die gewünschte statistische Power (power von 0.8, $p = 0.025$ bei einseitigem T Test, 2 drop outs pro Gruppe angenommen) zu erzielen. Abgesehen von den RVA und FMD Messungen wurden Messungen des Augendruckes, einer OCT-Untersuchung (Optische Kohärenztomografie) und Angio-OCT-Untersuchung vor und nach dem ursprünglichen Versuchsablauf geplant. Der Antrag an die Ethikkommission der Medizinischen Universität wurde im November 2017 eingereicht und genehmigt. (EK-Nummer: 30-056 ex 17/18) Die Studie wurde im MUG-Thesis Portal der Medizinischen Universität Graz eingetragen.

2.2. Literaturrecherche:

Um einen Überblick über das Themengebiet zu erhalten wurden in erster Linie die Suchmaschine Google und Pubmed verwendet. Die wichtigsten verwendeten Suchbegriffe waren: RVA, Retinal Vessel Analyzer, EECP, Enhanced External Counterpulsation Therapy, External Counterpulsation Therapy, ISRT, Individualized Shear Rate Therapy, FMD, Flow Mediated Dilation, Angiodefender, Endothelium, Vasodilation, Cardiovascular Risk Factors, DM, Diabetes Mellitus, Diabetes Mellitus Type-I, Smoking. Die Suche der angeführten Begriffe und deren Kombination wurde bewusst in englischer Sprache durchgeführt, da es im deutschsprachigen Raum nur wenig Literatur zu den spezifischeren Fragestellungen gibt. Als Verweis zu weiterführender Literatur wurden auch die Literaturverzeichnisse der bereits gesichteten Papers verwendet. Der Zugang zu den einzelnen Papers wurde über das Bibliotheksportal der Medizinischen Universität Graz ermöglicht. Die Verwaltung der gesichteten und gesammelten Literatur erfolgte mittels Mendeley.

2.3. ProbandInnen:

2.3.1. Ein- und Ausschlusskriterien:

Die Kontrollgruppe bestand aus ProbandInnen ohne kardiovaskulären Risikofaktoren oder Erkrankungen. Diese wurden mit ProbandInnen verglichen, bei welchen ein aktueller Nikotinkonsum oder Typ-I Diabetiker bestand. Das Alter der ProbandInnen wurde mit 18 bis 40 Jahren festgelegt um altersbedingte Gefäßveränderungen weitgehend als zusätzlichen Störfaktor ausschließen zu können. Für PatientInnen unter 18 Jahren sind Therapieeinheiten mit der ISRT nicht zugelassen. Es wurden sowohl Männer als auch Frauen als ProbandInnen herangezogen, da nach aktuellem Wissensstand keine der verwendeten Therapie- oder Untersuchungsmethoden geschlechtsspezifische Unterschiede aufweist.

Nicht in die Studie aufgenommen wurden ProbandInnen mit:

- Bestehenden kardiovaskulären oder hämatologischen Erkrankungen
- Medikamentöser blutdrucksenkender Therapie
- Vorgegangenen ophthalmologischen oder kardiovaskulären Operationen
- Medikamentöser Therapie ophthalmologischer Erkrankungen
- Epilepsie
- Schwangerschaft
- Unverträglichkeiten gegen Topicamid, Oxybuprocainhydrochlorid oder Na-Flourescin.

2.3.2. Rekrutierung:

Das Anwerben von ProbandInnen erfolgte initial aus dem Umfeld der Untersucher. Weiters wurde die Studie mittels Social-Media und Aushängen im Bereich der Medizinischen Universität und des LKH Univ. Klinikum Graz beworben. ProbandInnen aus der Testgruppe „RaucherInnen“ wurden speziell durch Aushänge in den Raucherbereichen des LKH Univ. Klinikum Graz aufmerksam gemacht. Typ-I DiabetikerInnen wurden gezielt über die Phoenix Datenbank des LKH Univ. Klinikum Graz kontaktiert. Dadurch wurde der Zugang zu einer großen Anzahl an DiabetikerInnen ermöglicht, die sich bereits im Vorfeld einverstanden erklärt hatten, für Studien kontaktiert zu werden. Die Kontaktaufnahme mit ProbandInnen, die über Aushänge aufmerksam gemacht wurden erfolgte ausschließliche per Mail. Der Erstkontakt zu den Diabetikern aus der Phoenix-Datenbank wurden telefonisch hergestellt, der weitere Informationsaustausch erfolgte auch hier per Mail. Die meisten ProbandInnen wurden folglich aus dem universitären oder krankenhausnahen Umfeld rekrutiert.

Per Mail erfolgte eine weitere Information der ProbandInnen bezüglich dem Nutzen der Studie, verwendete Therapie- und Untersuchungsmethoden, sowie zu erwartende gesundheitliche Auswirkungen. Weiters wurden die ProbandInnen über Ein- und Ausschlusskriterien informiert. ProbandInnen bekamen eine Aufwandsentschädigung von 30 Euro. Ein noch detaillierterer Informationsbogen, sowie der Aufklärungsbogen wurden im Anhang an die Mail versendet, um den ProbandInnen die Möglichkeit zu geben, sich bereits vorab umfangreich zu informieren.

Im Vorfeld der Studie wurden die ProbandInnen gebeten folgendes zu beachten:

- Am Tag der Untersuchung vorab keinen Kaffee, Grünen oder Schwarzen Tee zu konsumieren. Wegen möglicher Auswirkung auf das Herz-Kreislaufsystem und die Durchblutung.
- Im Vorfeld der Untersuchung drei Stunden lang keinen Tabak zu konsumieren. Wegen möglicher Auswirkung auf das Herz-Kreislaufsystem und die Durchblutung.
- Ab dem Vorabend der Untersuchung keinen Sport auszuüben. Wegen möglicher Auswirkung auf das Herz-Kreislaufsystem und die Durchblutung.
- Mit öffentlichen Verkehrsmitteln zur Untersuchung anzureisen. Die Anreise mittels Fahrrades hätte Auswirkung auf das Herz-Kreislaufsystem und die Durchblutung. Des Weiteren ist nach dem Applizieren mydriatisch wirksamer Augentropfen ist die Inbetriebnahme von Straßenverkehrsmitteln nicht erlaubt.
- Während der Untersuchung keine Kontaktlinsen zu tragen. Diese stören bei der Applikation der mydriatischen Augentropfen und der appliationstonometrischen Augendruckmessung
- Sportbekleidung zur Untersuchung mitzubringen. Dies erleichtert das Anbringen der Blutdruckmanschetten im Rahmen der ISRT-Therapie und FMD-Messung.

2.4. Studienablauf:

Im Zuge der Studie wurden mit den ProbandInnen folgende Stationen in dieser Reihenfolge durchlaufen:

- Erheben von studienrelevanten Daten und Führung eines Aufklärungsgesprächs
- Messung des Augeninnendruckes
- Eintropfen des zu untersuchenden Auges mit mydriatischen Augentropfen
- OCT und Angio-OCT Untersuchung
- Retinal Vessel Analyzer Untersuchung
- FMD Messung
- ISRT Therapieeinheit
- Retinal Vessel Analyzer Untersuchung
- FMD Messung
- OCT und Angio-OCT Untersuchung
- Messung des Augeninnendruckes

Die Untersuchungen der ProbandInnen fanden alle auf der Augenklinik des LKH Univ. Klin. Graz statt. Alle Untersuchungsgeräte wurden bereits im Vorfeld der Untersuchungsdurchläufe vorbereitet, um Verzögerungen zwischen den einzelnen Untersuchungen zu vermeiden.

Innerhalb der Augenklinik wurde versucht weitere Gehstrecken und Stiegen Steigen zwischen den einzelnen Untersuchungsstationen zu vermeiden, um für die Untersuchungen einen Gefäß- und Kreislaufzustand zu erzielen, der dem Ruhezustand möglichst entspricht.

Abbildung 5. zeigt den Versuchsablauf und die Untersuchungsdauer. Im ersten Schritt wurde mit den ProbandInnen noch einmal der Aufklärungsbogen besprochen, offene Fragen seitens der ProbandInnen geklärt, und deren schriftliches Einverständnis zur Untersuchung eingeholt. Des Weiteren wurden diese gebeten, einen Fragebogen auszufüllen um detaillierte Daten zur Charakterisierung der Versuchsgruppen zu erhalten. Genauere Informationen zu den einzelnen Untersuchungsschritten erhielten die ProbandInnen aus Anschauungsgründen noch einmal direkt an den Untersuchungsgeräten. Das bessere Verständnis der PatientInnen ist ausschlaggebend für die Compliance während den einzelnen Untersuchungsschritten.

Als erste Untersuchung wurde eine applationstonometrische Augendruckmessung gewählt, danach wurden Mydriatika eingetroft. Im Anschluss wurde eine OCT- und Angio-OCT-Aufnahme (Optische Kohärenztomografie) angefertigt. Die eigentliche Versuchsanordnung begann mit dem RVA (Retinal Vessel Analyzer), gefolgt von der FMD-Messung (Flow Mediated Dilation) mittels Angiodefender.

Der Angiodefender wurde als letzte Baseline-Untersuchung durchgeführt, um den ProbandInnen während den vorangehenden Untersuchungen eine möglichst lange Ruhephase ohne körperliche Belastung zu gewähren. Dies ermöglicht einen Herzkreislauf- und Gefäß Zustand zu erfassen, der weitestgehend dem Ruhezustand entspricht. Nachdem alle Baseline-Daten als Referenz erhoben wurden, fand die einmalige ISRT-Therapieeinheit (Individualisierte Shear Rate Therapy) mittels der Herz hose statt. Direkt nach der ISRT-Therapie wurde die Untersuchung mittels RVA erneut durchgeführt, um auch kurzzeitig auftretende Veränderungen erfassen zu können. Die restlichen Untersuchungen werden in umgekehrter Startreihfolge ebenfalls ein zweites Mal durchlaufen.

Zeit	→													
min.	15	5	20	5	5	10	20	45	10	20	5	5	5	170
Aufklärung/Fragebogen	Augendruck	Eintropfen	OCT	Angio-OCT	RVA	Angiodefender	Herzhose	RVA	Angiodefender	Angio-OCT	OCT	Augendruck		

Abbildung 5: Auflistung der Untersuchungen mit Reihenfolge und Untersuchungsdauer

2.4.1. Fragebogen:

Die ProbandInnen wurden vor den Untersuchungen gebeten Angaben zu ihrem Alter, Rauchverhalten, Sportlicher Tätigkeit, HbA1C (letzter erhobener Laborwert), Medikamentenunverträglichkeiten, Allergien und Fehlsichtigkeit zu machen. Untersucht wurde jeweils das Auge mit der geringsten Ametropie (gemessen am sphärischem Äquivalent).

Alle Daten wurden anonymisiert erhoben und lediglich für die laufende Untersuchung, sowie zur Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Kontroll- und Versuchsgruppen verwendet.

2.4.2. Augendruckmessung:

Die Messung des Augendruckes erfolgte mittels Applanationstonometrie an der Spaltlampe. Die Augen wurden dafür mit Thilorbin Augentropfen eingetropt (Oxybuprocainhydrochlorid 4mg/ml + Fluorescein Natrium 0,8mg/ml).

2.4.3. Mydriatische Augentropfen:

Um eine Mydriasis der Pupillen zu bewirken wurde Agepha Mydriaticum (Topicamid) verwendet. Bis zur vollen Wirkung der Augentropfen wurde eine Wartezeit von rund 20 Minuten anberaumt. In der Wartezeit hatten die ProbandInnen die Möglichkeit sich die Sportbekleidung für die ISRT-Therapie und FMD-Messung anzulegen, um Unterbrechungen im späteren Untersuchungsablauf zu vermeiden.

2.4.4. Optische Kohärenztomographie:

Um einen Überblick über die Netzhaut- und Gefäßbeschaffenheit zu gewinnen, wurden im Vorfeld der eigentlichen Versuchsanordnung eine optische Kohärenztomographie (Spectralis Heidelberg Engineering) im Enhanced depth Imaging Modus durchgeführt. Gefolgt von einer Optischen Gefäß-Kohärenztomografie (Angiovue Optovue Inc.) mittels 3,0mm Makula-Scan und 4,5mm Papillen-Scan. Die dabei gewonnenen Untersuchungsdaten wurden zusätzlich für die Fragestellung „Choroidal Volume Measurements with Optical Coherence Tomography Before and After External Counterpulsation“ ausgewertet.

2.4.5. RVA:

Zur funktionellen Beurteilung des retinalen Gefäßendothels wurde der RVA (Imedos Retinal Vessel Analyzer; siehe Einleitung Kapitel 1.4.2) verwendet. Vor der Messung wurden die Probandinnen mit dem Gerät vertraut gemacht und alle Schritte wurden im Detail noch einmal erklärt, da die Messung mittels RVA störungsanfällig ist und ein hohes Maß an Mitarbeit seitens der ProbandInnen abverlangt. Durchgeführt wurde die Untersuchung mittels einem Untersuchungslicht im Grünspektrum. Für die Untersuchungsdauer wurde ein Durchlauf mit 180 Sekunden gewählt (60 Sekunden Pre-Flicker Untersuchung, 60 Sekunden Flickerstimulation und 60 Sekunden Post-Flicker Untersuchung). Als Frequenz für die Flickerstimulation wurden die standardmäßig voreingestellten 12,5Hz gewählt. Vor der Untersuchung wurden die ProbandInnen mit Augenklappen am nicht zu untersuchenden Auge ausgestattet. Dies erleichtert es den ProbandInnen das Target in der Funduskamera mit dem Untersuchungsauge zu fixieren. Nachdem die ProbandInnen vor dem RVA positioniert wurden, fand eine grobe Einstellung der Kamera statt. Anschließend wurde das Untersuchungslicht in seiner Helligkeit langsam gesteigert. Eine zu helle Anfangseinstellung des Untersuchungslichtes, wird von den meisten ProbandInnen als unangenehm empfunden und erschwert die Untersuchung. Zum Untersuchungszeitpunkt ist eine ausreichende Mydriasis des zu untersuchenden Auges, sowie das Abdunkeln der Untersuchungsräumlichkeiten notwendig. Ist dies nicht der Fall, muss eine wesentlich hellere Einstellung des Untersuchungslichtes gewählt werden, um Aufnahmen in einer ausreichenden Qualität zu erhalten. Dies tolerieren die meisten ProbandInnen nur schlecht. Bei zu heller Einstellung führt dies zu häufigem Blinzeln und es fällt den ProbandInnen schwer, den Blick ruhig auf das Target (Nadel) zu fokussieren. Dies ist notwendig um ausgewählte Netzhautabschnitte während der Untersuchung möglichst störungsfrei im Blick behalten zu können. Sobald eine passende Helligkeitsstufe erreicht war, wurde die endgültige Schärfereinstellung vorgenommen.

Zu Beginn der Untersuchung wurde am Untersuchungsmonitor ein Template ausgewählt, in welchem sich die zu untersuchenden Gefäße befinden sollten. Die einzelnen Gefäße wurden im darauffolgenden Schritt mittels Zielmarkierung ausgewählt. (Abb. 6) Der RVA verfolgt die markierten Gefäße während der Untersuchung automatisch. Anhand der Markierungen ist es während der Aufnahme des Weiteren ersichtlich, ob eine ausreichende Aufnahmequalität gegeben ist, und ob der RVA die ausgewählten Gefäße kontinuierlich verfolgt. Verliert der RVA die Gefäße aus dem Fokus, können bei laufender Untersuchung die Helligkeit und/oder Schärfe neu angepasst werden.

Bei ausreichender Aufnahmequalität ist es möglich die Videoaufnahmen nach der Untersuchung erneut auszuwerten. (Abbildung 7) Im Zuge der Studie wurden je drei arterielle und venöse Gefäße simultan ausgewertet. Dies bietet gegenüber der Auswertung einzelner Gefäße den Vorteil, dass Messungenauigkeiten aufgrund punktuell schlechter Aufnahmequalität ausgeglichen werden können. Sobald ein verwertbares Diagramm der Gefäßdurchmesser im Verlauf des Untersuchungszeitraumes vorlag, wurde dieses an vier manuell festgelegten Zeitpunkten ausgewertet. (Abbildung 8)

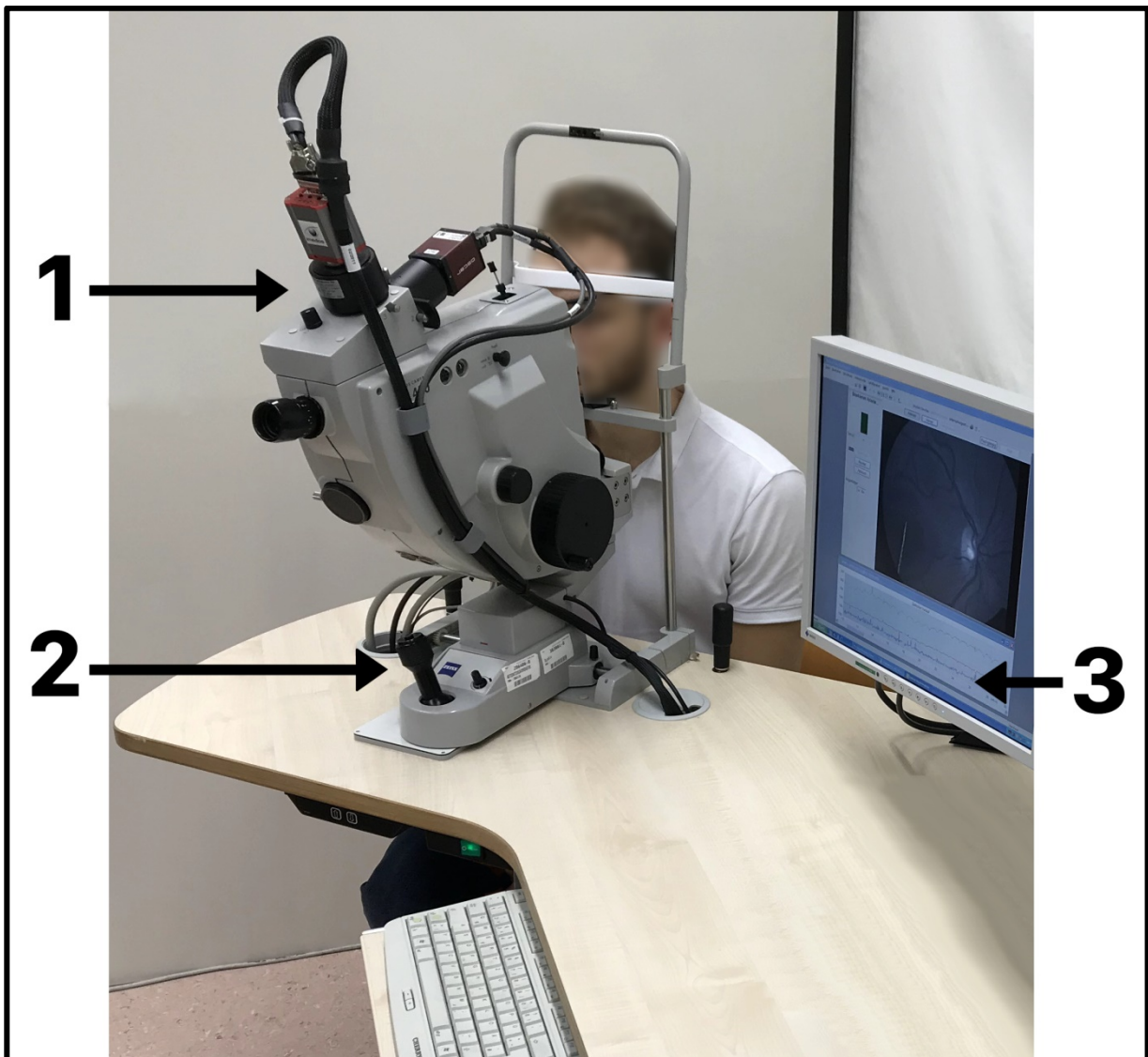


Abbildung 3a: Retinal Vessel Analyzer Versuchsanordnung

- 1) CCD-Kamera
- 2) Bedienelemente (Kameraposition und Helligkeit)
- 3) Monitor mit Untersuchungsinterface und Datenauswertung

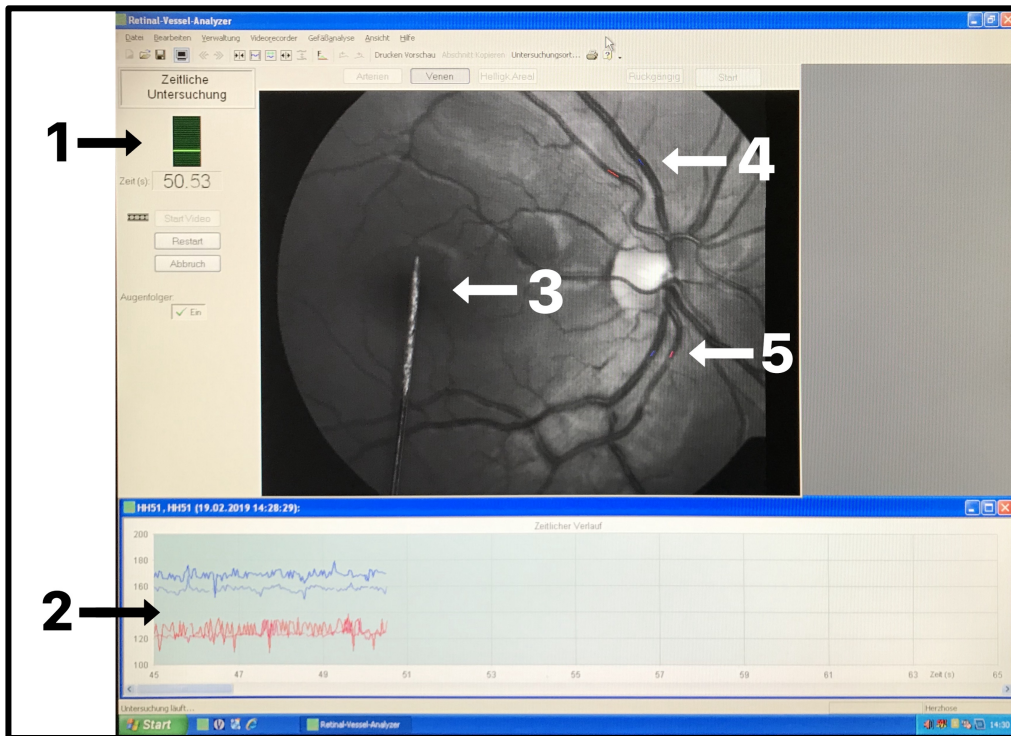


Abbildung 6: Retinal Vessel Analyzer Untersuchungsinterface

- 1) Helligkeitsanzeige
- 2) Auswertung der Gefäßdurchmesser
- 3) Makula und Fixierte Nadel (Target)
- 4) Gefäßmarkierungen (zart rot für Arterien; blau für Venen)
- 5) Gefäßmarkierungen (zart rot für Arterien; blau für Venen)

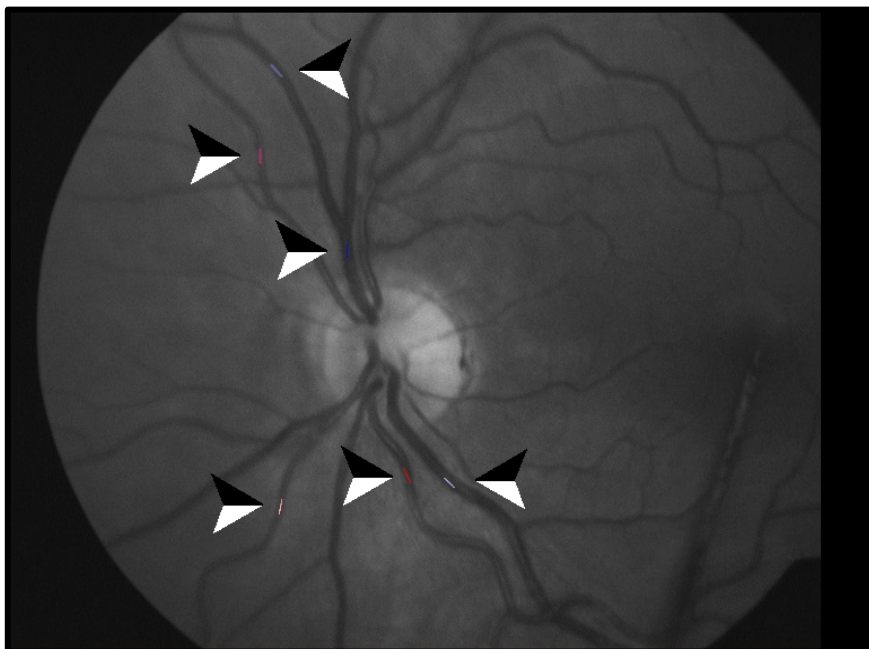


Abbildung 7: Nachträgliche RVA Auswertung

Anhand des Videomaterials können die Untersuchungen nachträglich erneut ausgewertet werden. Bei ausreichender Aufnahmequalität können mehrere Gefäße gleichzeitig ausgewertet werden. (arterielle Gefäße in rot dargestellt, venöse in blau)

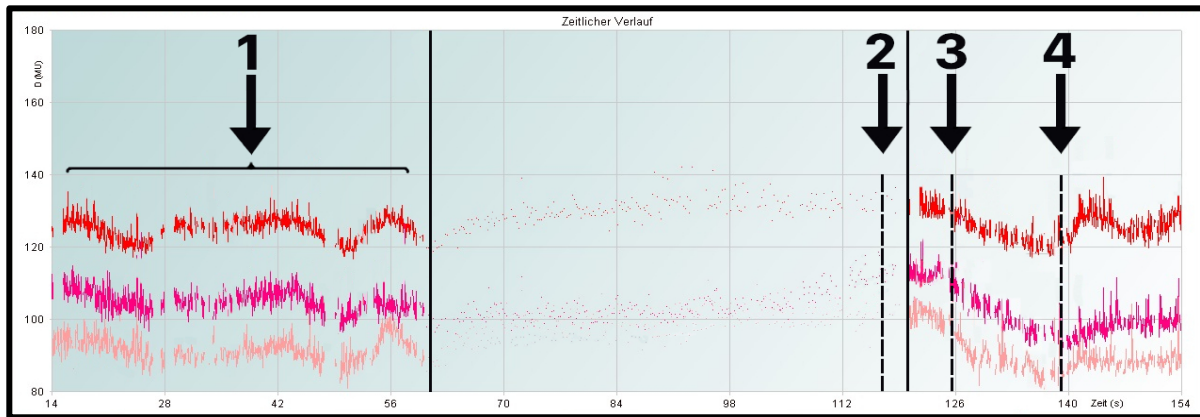


Abbildung 8: Auswertung der arteriellen Gefäßdurchmesser

In dieser Abbildung werden die Gefäßdurchmesser von 3 Arterien über den zeitlichen Verlauf der Untersuchung gezeigt. Markiert sind die vier ausgewählten Untersuchungsabschnitte

- 1) Mittelwert der Pre-Flicker Phase (Dient als Referenzwert)
- 2) Messung am Ende der Flicker Phase (Stärkste Gefäßerweiterung)
- 3) Messung 5 Sekunden Post-Flicker (anhaltende Gefäßerweiterung)
- 4) Messung 30 Sekunden Post-Flicker (Reaktive Gefäßkonstriktion)

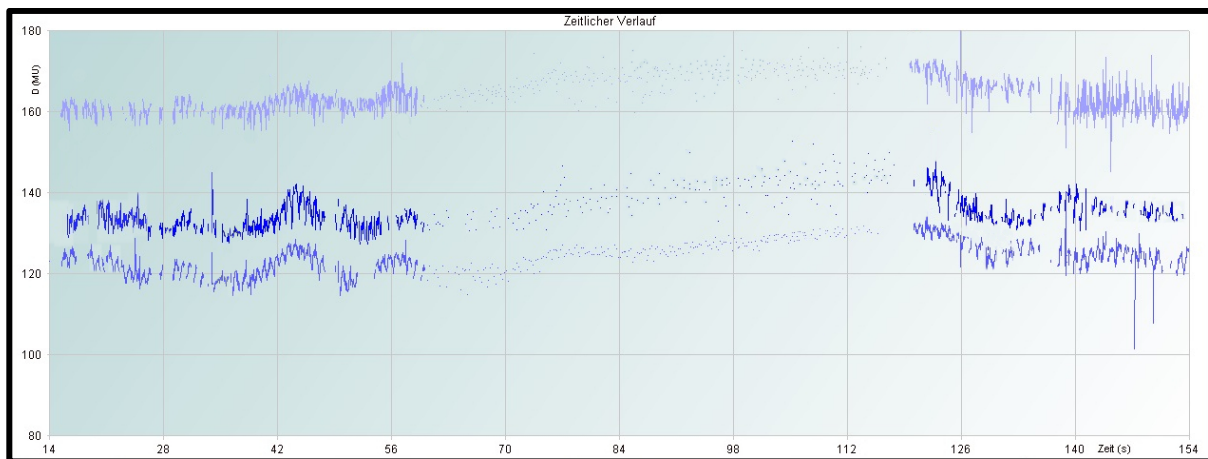


Abbildung 9: Venöse Gefäßdurchmesser im Untersuchungsverlauf

Darstellung der Gefäßdurchmesser in μm auf der X-Achse und Zeit in Sekunden auf der Y-Achse. Die durchgehenden Linien entsprechen dem Untersuchungsverlauf vor und nach der Flickerstimulation, die Punktwolke dazwischen entspricht der Flickerphase

2.4.6. FMD:

Zur Erfassung der Endothelfunktion der Gefäße des Körperkreislaufes wurde die FMD (Flussvermittelte Vasodilatation) mittels Angiodefender erhoben.

Bei der Erhebung des Ruhezustandes ist es notwendig, dass die ProbandInnen vor der Untersuchung möglichst wenig körperliche Belastung erfahren. Die FMD-Messungen wurden bei normalem Raumlicht und unter Ausschluss von akustischen Störfaktoren, in einem ruhigen Raum durchgeführt. Des Weiteren wurden die ProbandInnenen gebeten sich während der Untersuchung möglichst wenig zu bewegen und zu sprechen. Der Angiodefender verlangt lediglich die Eingabe der wesentlichsten untersuchungsbezogenen Daten (Alter und Geschlecht), sowie die Auswahl der altersentsprechenden Blutdruckmanschette (Erwachsene). Angelegt wurde die Blutdruckmanschette stets am nicht-dominanten Arm. Nach dem Start wurden den ProbandInnen noch einmal in Ruhe die einzelnen Untersuchungsphasen des Angiodefender erklärt. Abbildung 10 den zeitlichen Verlauf der Angiodefender Messung. Die gesamte Untersuchung nimmt rund 20 Minuten in Anspruch. Abbildung 11 zeigt das Inference des Gerätes während einer Messung.

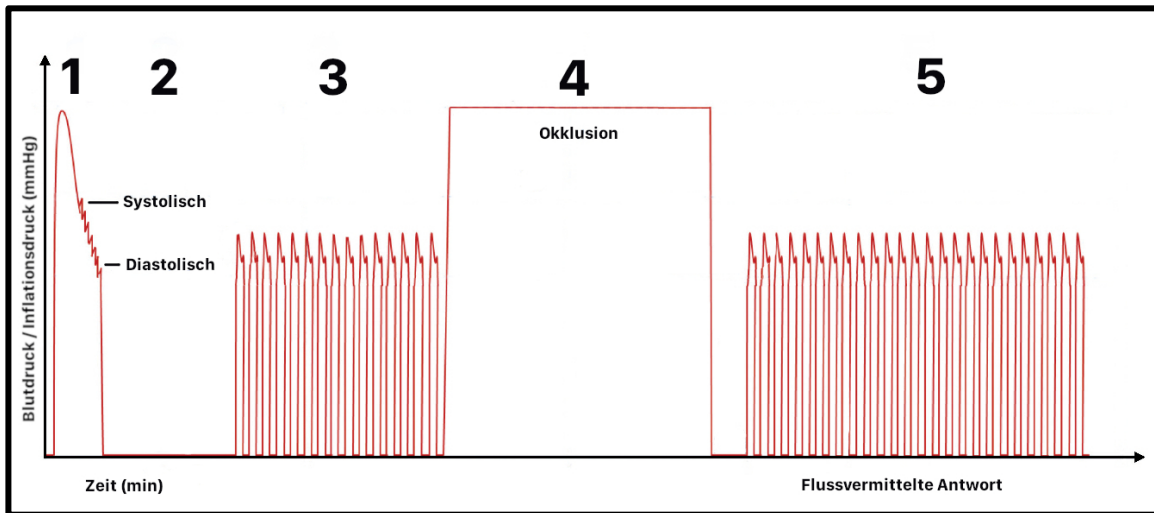


Abbildung 10: Phasen der FMD Messung mittels Angiodefender

Der Angiodefender durchläuft das Untersuchungsprotokoll mit allen Phasen, inklusive Auswertung selbstständig.

- 1) Messung des Ruhepulses sowie des systolischen und diastolischen Blutdruckes,
- 2) Ruhephase
- 3) Präokklusionsphase (Wiederholte kurze Inflationen zur Ermittlung des Gefäßstatus)
- 4) Okklusionsphase (fünf Minuten)
- 5) Ermittlung der Flussvermittelten Antwort (Wiederholte kurze Inflationen)

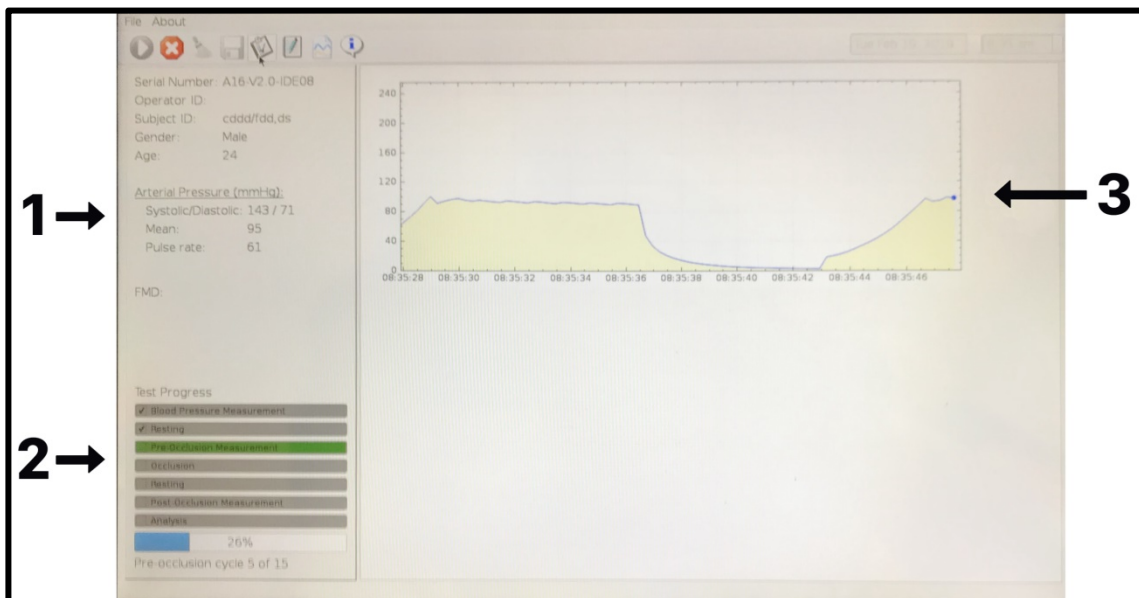


Abbildung 11: Angiodefender Untersuchungsinterface.

- 1) Blutdruck und Pulserfassung
- 2) Aktueller Untersuchungsstatus und Anzeige der Restdauer
- 3) Echtzeiterfassung des Inflationsdruckes

2.4.7. ISRT:

Die 40-minütige ISRT-Therapie (Individualisierte Shear Rate Therapie) mittels Herzhose stellte das zentrale Element der durchgeführten Versuchsanordnung dar.

Die ProbandInnen wurden vorab mit dem Gerät vertraut gemacht. Die Herzhose verfügt über einen Simulationsmodus, der im subtherapeutischen Bereich arbeitet. Nach dem Platznehmen auf der Untersuchungsliege der Herzhose, wurden die pneumatischen Manschetten der drei Druckstufen an Unterschenkel, Oberschenkel und Gesäß von distal nach proximal angelegt. Des Weiteren wurden die ProbandInnen mit EKG Elektroden versehen. Es wurden je zwei Elektroden links infraclaviculär, rechts infraclaviculär und am linken Unterbauch angebracht. Ein Satz Elektroden diente der EKG-Erfassung durch die Herzhose, der zweite Satz Elektroden wurde für die EKG-Erfassung des Philips HD 11XE Ultraschallgerätes genutzt, mit welchem die ProbandInnen während der Therapieeinheit monitorisiert wurden. Peripher wurden die Pulscurve und die Sauerstoffsättigung mittels eines Pulsoxymetrie-Sensors erfasst. Das EKG, die Sauerstoffsättigung, Plethysmografie-Kurve und der aktuelle Inflationsdruck können während der Untersuchung in Echtzeit vom Monitor der Herzhose abgelesen werden. Anhand des laufenden Elektrokardiogrammes muss auch eine manuelle Auswahl der Inflationsphase erfolgen. Diese wurde jeweils vom Peak der T-Welle bis kurz vor Beginn der folgenden P-Welle (Diastole) festgelegt. (Siehe Abbildung 12.2) Der angewandte Inflationsdruck der Herzhose wurde kontinuierlich gesteigert, um die ProbandInnen daran zu gewöhnen. In Ruhe und im Zuge jeder Drucksteigerung von 40mmHg wurde von den ProbandInnen mittels Ultraschall eine Aufnahme der Durchblutungsverhältnisse in der rechten Arteria Carotis Communis angefertigt. Die Aufnahmen wurden im PW-Modus nativ und als Trace-Aufnahme angefertigt. Verwendet wurde dafür ein L12-3 Schallkopf. (Siehe Abb. 14) Nach dem Durchlaufen der Druckstufen 40mmHg, 80mmHg und 120mmHg, wurde die Herzhose-Therapie für eine Dauer von 40 Minuten bei einem Inflationsdruck von 160mmHg angewandt. Während der Therapieeinheit ist keine aktive Mitarbeit der ProbandInnen gefordert. Diese sollten sich während der Untersuchung möglichst wenig bewegen, da dies zu einer Störung des EKG-Signals führt, welches die Inflations- und Deflationsphasen der Herzhose auslöst. Das Auftreten von Bewegungsartefakten lässt sich jedoch nicht zur Gänze vermeiden, da es auch durch die Inflation der pneumatischen Manschetten dazu kommt. Im Laufe der Herzhose-Therapie wurde die Pupillenweite der ProbandInnen kontrolliert. Für die nachfolgende RVA-Messung muss, bei zu geringer Pupillenweite, gegebenenfalls erneut mit Mydriaticum eingetropfelt werden.



Abbildung 1a: ISRT - Herzhose Therapieeinheit

- 1) Display
- 2) EKG-Elektroden
- 3) Pulsoxmetrie-Sensor
- 4-6) Pneumatische Druckmanschetten

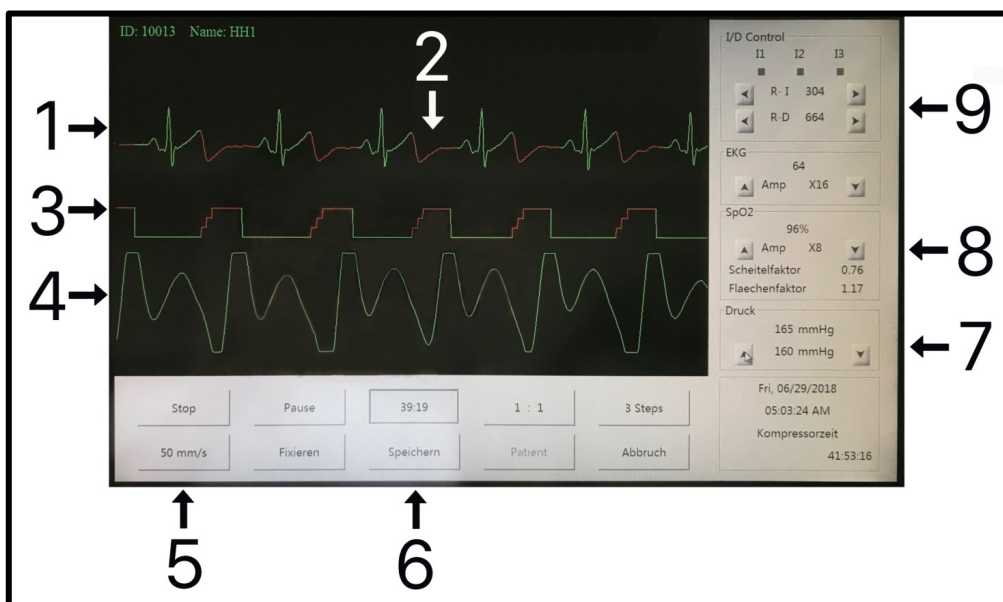


Abbildung 12: Abbildung des Herzhose Therapie-Interface

- 1) Elektrokardiogramm
- 2) Diastole (Inflationsphase in Rot)
- 3) Druckstufen
- 4) Fingerplethysmografie (Pulskurve)
- 5) EKG Darstellungsmodus
- 6) Verbleibende Therapiedauer
- 7) Ausgewählter Inflationsdruck
- 8) Periphere O₂-Sättigung
- 9) Auswahlelement für Diastole

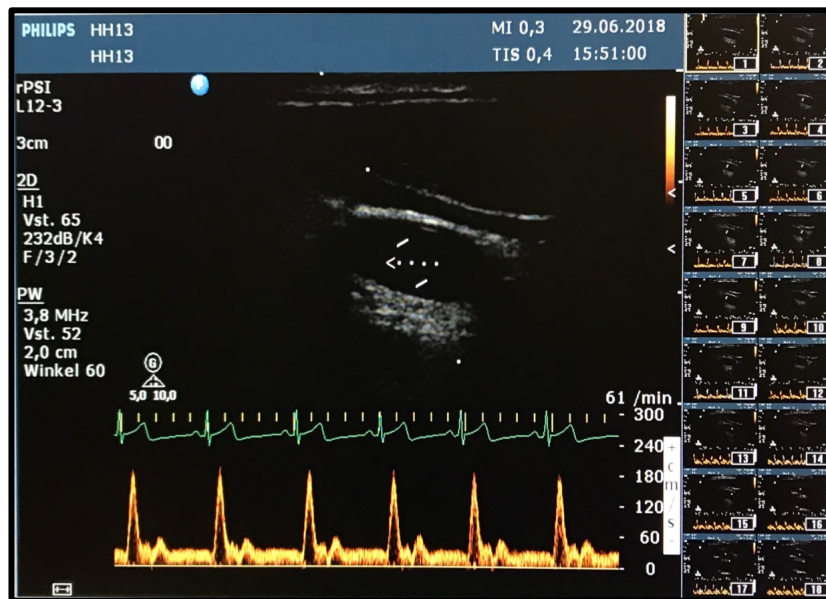


Abbildung 13: Ultraschallmonitoring während der ISRT

Zur Monitorisierung der ProbandInnen während der Herzhose-Therapie wurden zusätzlich Gefäßultraschall Aufnahmen der Arteria Carotis Communis angefertigt.

2.4.8. Post-ISRT Untersuchungen:

Nach der Therapieeinheit mittels Herzhose wurden alle vorangegangenen Untersuchungen in umgekehrter Reihenfolge wiederholt. Begonnen wurde mit der RVA-Untersuchung, um auch kurzzeitige Veränderungen an den Netzhautgefäßen verzögerungsfrei erfassen zu können. Die Durchführung der Untersuchung erfolgte exakt nach demselben Schema wie vor der Herzhose-Einheit.

2.4.9. Datenerfassung und Statistik

Die Daten aller ProbandInnen wurden anonymisiert erfasst. Der Export der Daten von den einzelnen Untersuchungsgeräten erfolgte umgehend nach den Untersuchungsduchläufen, um die Daten der einzelnen an der Studie beteiligten Untersucher immer auf direktem Weg zusammenzuführen und einen möglichen Verlust an Daten zu vermeiden. Alle folgend angeführten Werte sind, wenn nicht anders angegeben, als Mittelwert (\pm Standardabweichung) angegeben. Die Testung auf Normalverteilung erfolgte mittels Kolmogorov-Smirnov Test und Shapiro-Wilk Test. Alle normalverteilten Werte wurden mittels T-Test für verbundene Stichproben ausgewertet. Bei zweiseitiger Testung wurde ein p-Wert unter 0.05 als statistisch signifikant gewertet. Weil noch nicht alle ProbandInnen bis zur Beendigung der Diplomarbeit eingeschlossen werden konnten, handelt es sich um eine Zwischenauswertung insofern wurde auch kein Verfahren zur Korrektur für multiples Testen verwendet (siehe Punkt 2.1 – Fallzahlanalyse).

3. Ergebnisse:

Es wurden insgesamt 42 ProbandInnen untersucht. Die Kontrollgruppe mit gesunden ProbandInnen umfasste 22 Personen, die Testgruppe mit RaucherInnen 14 und jene mit Typ-I DiabetikerInnen 11 ProbandInnen. Auf Grund nicht auswertbarer Messdaten, mussten drei Gesunde, ein Raucher und ein Diabetiker von der Auswertung ausgeschlossen werden. Damit ergibt sich eine Anzahl von 19 Gesunden, 13 Rauchern und 10 DiabetikerInnen, die ausgewertet werden konnten. Die demographischen Daten der drei Gruppen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Die Kontrollgruppe mit gesunden ProbandInnen bestand aus 5 Frauen und 14 Männern im Alter von 21 bis 34 Jahren. Das durchschnittliche Alter betrug 24 Jahre. Bei 10 der ProbandInnen lag eine Myopie vor. Untersucht wurde jeweils das Auge mit dem geringeren Refraktionsfehler.

Die Testgruppe mit rauchenden ProbandInnen umfasste 3 Frauen und 10 Männer im Alter von 21 bis 35 Jahren. Das durchschnittliche Alter betrug 25 Jahre. Untersucht wurden RaucherInnen mit einem Tabakkonsum von 2 bis 10 Packyears. Der Durchschnitt betrug 5 Packyears. Bei 5 ProbandInnen dieser Gruppe lag eine Myopie vor.

Die Testgruppe mit Typ-I Diabetikern umfasst 6 Frauen und 4 Männer im Alter von 21 bis 30 Jahren. Das durchschnittliche Alter beträgt 24 Jahre. Die untersuchten Diabetiker hatten im Durchschnitt einen HbA1c-Wert von 7,0%. Bei 7 ProbandInnen lag eine Myopie vor.

	Nichtrauchend	Rauchend	Diabetes Mellitus Typ-I
Gesamtzahl	19	13	10
Frauen	5	3	6
Männer	14	10	4
F:M (%)	26 : 74	23 : 77	60 : 40
Alter	Ø 24 (21 bis 34)	Ø 25 (21 bis 35)	Ø 24 (21 bis 30)
Packyears	-	Ø 5 (2 bis 10)	-
HbA1c (%)	-	-	Ø 7,0 (6,1 bis 8,5)
Refraktion	10 ametropen ProbandInnen ⚭ 53% der ProbandInnen Ø -2,6 dpt (-0,5 bis -6,0 dpt)	5 ametropen ProbandInnen ⚭ 38% der ProbandInnen Ø -1,9 dpt (-0,5 bis -3,5 dpt)	7 ametropen ProbandInnen ⚭ 70% der ProbandInnen Ø -1,5 dpt (-0,75 bis -2,5 dpt)

Tabelle 1: Charakteristika der ausgewerteten Kontroll- und Versuchsgruppen

3.1. Systemische und lokale Endothelfunktion vor und nach ISRT

Die Daten wurden in IBM SPSS mittels Kolmogorov-Smirnov Test und Shapiro-Wilk Test auf ihre Verteilung geprüft. Die Datensätze aller Gruppen wiesen eine signifikante Normalverteilung auf. Des Weiteren wurden die Daten, welche vor der Herzhose-Therapie erhoben wurden mit jenen nach der Herzhose-Anwendung verglichen. Hierfür wurde der T-Test für verbundene Stichproben gewählt.

Tabelle 2 fasst die RVA- und FMD-Ergebnisse aller Gruppen zusammen.

3.1.1 Kontrollgruppe:

Bei der Kontrollgruppe kam es nach der ISRT Therapie zu einer leichten Zunahme der Flickerantwort der Arteriolen im RVA-Versuch und der Arterien in der FMD-Messung. Bei den venösen Gefäßen zeigte sich keine Veränderung.

Die Flickerantwort bei der Baseline-Untersuchung zeigte eine arterielle Gefäßerweiterung von durchschnittlich $123,2(\pm 15,0)\mu\text{m}$ prä Flicker auf $128,1(\pm 15,1)\mu\text{m}$ post Flicker. Dies entsprach einer Gefäßerweiterung von $4,0(\pm 2,0)\%$ unter Flickerstimulation ($p < 0,05$).

Nach der ISRT Einheit mittels Herzhose zeigte sich eine arterielle Gefäßerweiterung von durchschnittlich $123,6(\pm 13,8)\mu\text{m}$ prä Flicker auf $125,5(\pm 14,3)\mu\text{m}$. Dies entsprach einer Gefäßerweiterung von $4,8(\pm 3,5)\%$.

Nach der ISRT wurde eine nicht signifikante, absolute Steigerung der arteriellen Flickerantwort im Vergleich zu vor der Herzhose um $0,8(\pm 3,4)\%$ beobachtet ($p > 0,05$). Dies entsprach einer relativen Zunahme der Flickerantwort um $20,0 (\pm 85,0)\%$.

Bei den venösen Gefäßen wurde im Zuge der Baseline-Untersuchung eine Erweiterung durch Flickerstimulation von durchschnittlich $142,5(\pm 21,0)\mu\text{m}$ auf $149,6(\pm 21,0)\mu\text{m}$ beobachtet. Dies entsprach einer Gefäßerweiterung von $5,0(\pm 2,2)\%$ ($p < 0,05$).

Nach der ISRT konnte eine Gefäßerweiterung von $145,0(\pm 19,4)\mu\text{m}$ auf $152,2(\pm 19,4)\mu\text{m}$ beobachtet werden. Dies entsprach einer Gefäßerweiterung von $5,0(\pm 2,3)\%$. Nach der ISRT wurde eine unveränderte Gefäßreaktion beobachtet.

Bei der Untersuchung mittels Angiodefender konnte in der Baseline-Untersuchung eine flussvermittelte Vasodilatation (FMD) von $7,3(\pm 1,9)\%$ gemessen werden. Nach der ISRT mittels Herz hose wurde eine FMD von $9,7(\pm 2,9)\%$ ermittelt. Dies entsprach einer absoluten Zunahme von $2,4(\pm 2,3)\%$ bzw. relativen Zunahme von $32,9 (\pm 31,6)\%$ ohne statistische Signifikanz ($p > 0,05$)

3.1.2 RaucherInnen:

Bei den RaucherInnen kam es nach der ISRT zu einer Erweiterung der arteriellen und venösen Gefäße im RVA-Versuch. In der FMD-Messung kam es hingegen zu einer geringen Abnahme.

Die Flickerantwort bei der Baseline-Untersuchung zeigte eine arterielle Gefäßerweiterung von durchschnittlich $119,0(\pm 26,5)\mu\text{m}$ prä Flicker auf $121,4(\pm 27,6)\mu\text{m}$ post Flicker. Dies entsprach einer Gefäßerweiterung von $2,0(\pm 2,7)\%$ unter Flickerstimulation. ($p < 0,05$)

Nach der ISRT zeigte sich eine arterielle Gefäßerweiterung von durchschnittlich $139,1(\pm 29,0)\mu\text{m}$ prä Flicker auf $144,7(\pm 29,5)\mu\text{m}$ Dies entsprach einer Gefäßerweiterung von $4,0(\pm 2,4)\%$.

Nach der ISRT wurde eine nicht signifikante, absolute Steigerung der arteriellen Flickerantwort um $2,0(\pm 2,7)\%$ beobachtet. Dies entsprach einer relativen Zunahme der Flickerantwort um $100,0 \pm 135,0\%$. ($p > 0,05$)

Bei den venösen Gefäßen wurde im Zuge der Baseline-Untersuchung eine Erweiterung durch Flickerstimulation von durchschnittlich $153,3(\pm 30,2)\mu\text{m}$ auf $160,8(\pm 30,0)\mu\text{m}$ beobachtet. Dies entsprach einer Gefäßerweiterung von $4,9(\pm 3,4)\%$. ($p < 0,05$)

Nach ISRT konnte eine Gefäßerweiterung von $151,9(\pm 30,3)\mu\text{m}$ auf $160,8(\pm 31,8)\mu\text{m}$ beobachtet werden. Dies entsprach einer Gefäßerweiterung von $5,8(\pm 3,2)\%$.

Nach der ISRT wurde eine nicht signifikante, absolute Steigerung der venösen Flickerantwort um $0,9(\pm 3,9)\%$ beobachtet. Dies entsprach einer relativen Zunahme der Flickerantwort um $18,4 \pm 80,0\%$. ($p > 0,05$)

Bei der Untersuchung mittels Angiodefender konnte in der Baseline-Untersuchung eine flussvermittelte Vasodilatation (FMD) von $10,0(\pm 2,5)\%$ gemessen werden. Nach der ISRT wurde eine FMD von $9,6(\pm 2,0)\%$ ermittelt. Dies entsprach einer absoluten Abnahme von $0,4(\pm 2,9)\%$ bzw. einer relativen Abnahme von $4,0(\pm 27,8)\%$ ohne statistische Signifikanz. ($p > 0,05$)

3.1.3 DiabetikerInnen:

Die Flickerantwort bei der Baseline-Untersuchung zeigte eine arterielle Gefäßerweiterung von durchschnittlich $128,4(\pm 9,5)\mu\text{m}$ prä Flicker auf $132,0(\pm 9,4)\mu\text{m}$ post Flicker. Dies entsprach einer Gefäßerweiterung von $2,9(\pm 1,7)\%$ unter Flickerstimulation. ($p < 0,05$)

Nach der ISRT zeigte sich eine arterielle Gefäßerweiterung von durchschnittlich $120,5(\pm 14,8)\mu\text{m}$ prä Flicker auf $125,1(\pm 15,9)\mu\text{m}$ Dies entsprach einer Gefäßerweiterung von $3,9(\pm 2,0)\%$.

Nach der ISRT wurde eine nicht signifikante, absolute Steigerung der arteriellen Flickerantwort um $1,0(\pm 2,8)\%$ beobachtet. Dies entsprach einer relativen Zunahme der Flickerantwort um $34,5 \pm 96,6\%$. ($p > 0,05$)

Bei den venösen Gefäßen wurde im Zuge der Baseline-Untersuchung eine Erweiterung durch Flickerstimulation von durchschnittlich $143,5,2(\pm 18,8)\mu\text{m}$ auf $149,3(\pm 20,1)\mu\text{m}$ beobachtet. Dies entsprach einer Gefäßerweiterung von $4,1(\pm 2,5)\%$. ($p < 0,05$)

Nach der ISRT konnte eine Gefäßerweiterung von $139,5(\pm 18,2)\mu\text{m}$ auf $145,5(\pm 18,8)\mu\text{m}$ beobachtet werden. Dies entsprach einer Gefäßerweiterung von $4,3(\pm 1,2)\%$.

Nach der ISRT wurde eine nicht signifikante, absolute Steigerung der venösen Flickerantwort um $0,2(\pm 1,7)\%$ beobachtet. Dies entsprach einer relativen Zunahme der Flickerantwort um $4,9 \pm 41,5\%$. ($p > 0,05$)

Bei der Untersuchung mittels Angiodefender konnte in der Baseline-Untersuchung eine flussvermittelte Vasodilatation (FMD) von $11,5(\pm 6,8)\%$ gemessen werden. Nach der ISRT wurde eine FMD von $11,2(\pm 4,6)\%$ ermittelt. Dies entsprach einer absoluten Abnahme von $0,3(\pm 7,0)\%$ bzw. einer relativen Abnahme von $2,6(\pm 61,0)\%$ ohne statistische Signifikanz. ($p > 0,05$)

			Gefäßdurchmesser vor Stimulation (μm)	Gefäßdurchmesser nach Stimulation (μm)	Steigerung (%)
Referenzgruppe	Vor Herzhose	RVA-Arteriell	123,2(\pm 15,0)	128,1(\pm 15,1)	4,0(\pm 2,0)%
		RVA-Venös	142,5(\pm 21,0)	149,6(\pm 21,0)	5,0(\pm 2,2)%
		FMD			7,3(\pm 1,9)%
	Nach Herzhose	RVA-Arteriell	123,6(\pm 13,8)	125,5(\pm 14,3)	4,8(\pm 3,5)%
		RVA-Venös	145,0(\pm 19,4)	152,2(\pm 19,4)	5,0(\pm 2,3)%
		FMD			9,7(\pm 2,9)%
	Differenz	RVA-Arteriell			0,8(\pm 3,4)%
		RVA-Venös			0,0(\pm 2,6)%
		FMD			2,4(\pm 2,3)%
Raucher	Vor Herzhose	RVA-Arteriell	119,0(\pm 26,5)	121,4(\pm 27,6)	2,0(\pm 2,7)%
		RVA-Venös	153,3(\pm 30,2)	160,8(\pm 30,0)	4,9(\pm 3,4)%
		FMD			10,0(\pm 2,5)%
	Nach Herzhose	RVA-Arteriell	139,1(\pm 29,0)	144,7(\pm 29,5)	4,0(\pm 2,4)%
		RVA-Venös	151,9(\pm 30,3)	160,8(\pm 31,8)	5,8(\pm 3,2)%
		FMD			9,6(\pm 2,0)%
	Differenz	RVA-Arteriell			2,0(\pm 2,7)%
		RVA-Venös			0,9(\pm 3,9)%
		FMD			-0,4(\pm 2,9)%
Diabetiker	Vor Herzhose	RVA-Arteriell	128,4(\pm 9,5)	132(\pm 9,4)	2,9(\pm 1,7)%
		RVA-Venös	143,5(\pm 18,8)	149,3(\pm 20,1)	4,1(\pm 2,5)%
		FMD			11,5(\pm 6,8)%
	Nach Herzhose	RVA-Arteriell	120,5(\pm 14,8)	125,1(\pm 15,9)	3,9(\pm 2,0)%
		RVA-Venös	139,5(\pm 18,2)	145,5(\pm 18,8)	4,3(\pm 1,2)%
		FMD			11,2(\pm 4,6)%
	Differenz	RVA-Arteriell			1,0(\pm 2,8)%
		RVA-Venös			0,2(\pm 1,7)%
		FMD			-0,3(\pm 7,0)%

Tabelle 2: Untersuchungsergebnisse Flickerantwort und flussvermittelte Dilatation im Retinal Vessel Analyzer (RVA) und in der Flow Mediated Dilatation (FMD):
 Vergleich der Kontrollgruppe mit den Versuchsgruppen (RaucherInnen und Typ-I DiabetikerInnen). Untersucht wurde die endothelvermittelte systemische und lokale Erweiterung der Netzhautgefäße , vor und nach der Herzhose-Therapie.

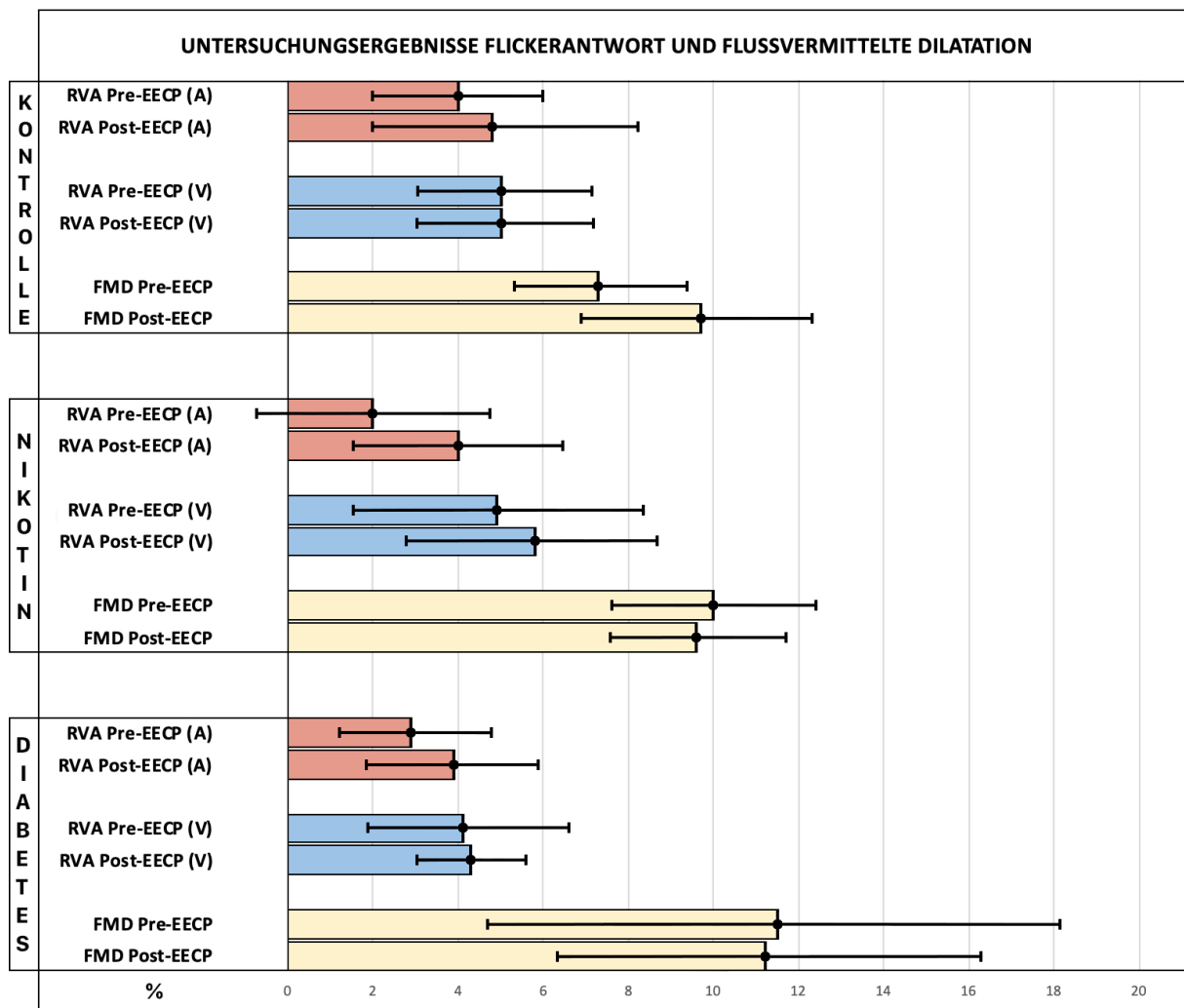


Abbildung 14: Untersuchungsergebnisse Flickerantwort und flussvermittelte Dilatation: Grafische Darstellung der Untersuchungsergebnisse (%). Vergleich der Kontrollgruppe mit den Versuchsgruppen (RaucherInnen und Typ-I DiabetikerInnen). Untersucht wurde die endothelvermittelte systemische und lokale Erweiterung der Netzhautgefäße, vor und nach der Herzchase-Therapie. Besonders bei den arteriellen Gefäßen sieht man einen nicht statistisch signifikanten Trend zu einer verstärkten Fleickerantwort nach externer Gegenpulsationstherapie (EECP) im Retinal Vessel Analyzer (RVA). In der Flow Mediated Dilatation (FMD) zeigen sich schwankende Ergebnisse mit hoher Varianz.

4. Diskussion:

In unserer Zwischenauswertung zeigte sich ein Trend zur Zunahme der arteriellen Flickerantwort der Netzhautgefäße nach der ISRT.

Diese Zunahme war tendenziell bei Rauchern am stärksten und bei der Vergleichsgruppe am geringsten ausgeprägt. Insgesamt wiesen alle Gruppen gute Endothelfunktion auf. Dies kann auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass alle ProbandInnen zum Untersuchungszeitpunkt unter 35 Jahre alt waren und neben dem Rauchen beziehungsweise Typ-I Diabetes keine weiteren relevanten kardiovaskulären Risikofaktoren bekannt waren.

Bei der Kontrollgruppe mit gesunden ProbandInnen ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren zeigten sich relativ gute Baseline-Wert und die ISRT führte zu einer sehr geringen Zunahme der endothelvermittelten Gefäßerweiterung. Die ohnehin schon gute Vasodilatation der Netzhautgefäße lässt sich folglich durch zusätzliche Stimulation nicht wesentlich weiter verbessern. Ähnliche Ergebnisse konnten bei Untersuchungen der Durchblutung des Gehirns nach ISRT gefunden werden. Junge gesunde ProbandInnen zeigten im Gegensatz zu Patientin mit Carotisstenose keine Durchblutungssteigerung. (2,107)

Bei den Testgruppen zeigten sich geringfügig schlechtere Baseline Werte in der RVA-Untersuchung. Die Zunahme der endothelvermittelten Gefäßerweiterung nach der ISRT fiel jedoch tendenziell stärker aus als bei der Kontrollgruppe. Die schlechteren Baseline-Werte sind vermutlich auf den kardiovaskulären Risikofaktor Tabakkonsum und Diabetes Mellitus zurückzuführen. (47,101) Die verstärkte Zunahme der endothelvermittelten Gefäßerweiterung dürfte dadurch bedingt sein, dass Gewebe bei subklinischer endothelialer Dysfunktion besser auf Stimulation zur verbesserten Perfusion ansprechen. Bei bereits optimaler Gefäßsituation verhindern die Autoregulationsmechanismen der Netzhautgefäße hingegen einen weiteren Anstieg der Durchblutung. (85)

Bei der Angiodefender-Messung der Testgruppen zeigten sich bessere Baseline Werte als bei der Kontrollgruppe. Nach der ISRT-Therapie kam es dafür zu einer Abnahme der Werte. Dies entspricht nicht den erwarteten Ergebnissen. Anzumerken ist jedoch, dass die erhobenen FMD-Daten einer überaus großen Streuung unterliegen. (siehe Tabelle 2) Des Weiteren kam es im Laufe der Untersuchungen immer wieder zu Ausfällen des Angiodefenders, was

erneute Messungen und in diesen Fällen eine Abweichung vom festgelegten Studienprotokoll zur Folge hatte. Die Verlässlichkeit der Erhobenen Angiodefender-Daten steht damit in Frage.

Bei der Interpretation unserer Ergebnisse müssen zudem folgende Überlegungen in Betracht gezogen werden: Bei den vorliegenden Ergebnissen handelt es sich um eine Zwischenauswertung. Die geringe Anzahl untersuchter ProbandInnen kann eine Erklärung für die fehlende statistische Signifikanz der doch deutlich, vor allem bei den zwei Testgruppen, steigenden arteriellen Flickerantworten nach ISRT sein. Weiters wurde zum Ausschluss von möglichen Einflussfaktoren wie arterieller Hypertension und Medikamenten ein insgesamt sehr gesundes Versuchskollektiv mit kurzer Rauchexposition und kurzer Diabetesdauer untersucht. Mögliche Unterschiede in der EECF Antwort könnten bei ausgeprägter Endothelschädigung stärker ausfallen.

4.1. Zusammenfassung:

Wir konnten erstmals zeigen dass die Anwendung der ISRT mittels RVA Analyse einen hämodynamischen Effekt auf den Augenhintergrund hat. Ob diese Beobachtung eine Signifikanz in der Endothelantwort der retinalen Arteriolen erreicht oder nicht, ist erst nach Abschluss des Gesamtkollektives zu beantworten. Die ISRT wurde bei allen Studienteilnehmern gut und ohne Nebenwirkungen toleriert.

Im Fokus stehen nun zukünftige Studien mit PatientInnen mit stärker ausgeprägter Endothelschädigung, wie zum Beispiel bei diabetischer Retinopathie oder vermuteter okulärer Minderperfusion bei Normotensionsglaukom, da in diesem Kollektiv ein klinischer Benefit der ISRT zu vermuten ist. Diese Fragen, sowie der Effekt einer sonst üblichen ambulanten ISRT Langzeitanwendung auf den Augenhintergrund bleiben noch zu beantworten.

Literaturverzeichnis:

1. Buschmann EE, Li L, Brix M, Zietzer A, Hillmeister P, Busjahn A, et al. A novel computer-aided diagnostic approach for detecting peripheral arterial disease in patients with diabetes. Duesbery NS, editor. *PLoS One*. 2018 Jun 21;13(6):e0199374.
2. Buschmann EE, Hillmeister P, Bondke Persson A, Liebeskind DS, Schlich L, Kamenzky R, et al. Short-term external counterpulsation augments cerebral blood flow and tissue oxygenation in chronic cerebrovascular occlusive disease. *Eur J Neurol*. 2018 Nov;25(11):1326–32.
3. Buschmann I, Pries A, Styp-Rekowska B, Hillmeister P, Loufrani L, Henrion D, et al. Pulsatile shear and Gja5 modulate arterial identity and remodeling events during flow-driven arteriogenesis. *Development*. 2010 Jul 1;137(13):2187–96.
4. Yang B, Wu S, Wu X, Li MB, Zhu W, Guan Y, et al. Effect of Shunting of Collateral Flow into the Venous System on Arteriogenesis and Angiogenesis in Rabbit Hind Limb. *ACTA Histochem Cytochem*. 2013 Feb 28;46(1):1–10.
5. Hillmeister P, Buschmann I, Bondke Persson A. Listen to your physiologist! *Acta Physiol (Oxf)*. 2019 Apr 2;225(4):e13265.
6. Castelli WP. Epidemiology of coronary heart disease: the Framingham study. *Am J Med*. 1984 Feb 27;76(2A):4–12.
7. Messner B, Bernhard D. Smoking and Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014 Mar;34(3):509–15.
8. Hadi HAR, Suwaidi J Al. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vasc Health Risk Manag*. 2007;3(6):853–76.
9. Shah AR, Gardner TW. Diabetic retinopathy: research to clinical practice. *Clin diabetes Endocrinol*. 2017;3:9.
10. NICHOLLS J V. THE FUNDUS OCULI IN HYPERTENSION AND ARTERIOSCLEROSIS. *Can Med Assoc J*. 1964 Feb 29;90(9):581–8.
11. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial Function and Dysfunction. *Circulation*. 2007 Mar 13;115(10):1285–95.
12. Lang G. *Augenheilkunde*, 5. Auflage. Stuttgart. 2014;235–44.
13. Stewart MW. Treatment of diabetic retinopathy: Recent advances and unresolved challenges. *World J Diabetes*. 2016 Aug 25;7(16):333–41.
14. Raza A, Steinberg K, Tartaglia J, Frishman WH, Gupta T. Enhanced External Counterpulsation Therapy. *Cardiol Rev*. 2016 Aug;25(2):1.
15. Lüllmann-Rauch R. *Taschenlehrbuch Histologie* 4. Auflage. Stuttgart. 2012;257–60.

16. Hartmann M. Zytologie, Histologie und Mikroskopische Anatomie: Licht- und elektronenmikroskopischer Bildatlas 5. Auflage. Graz. 2011;63.
17. Moncada S, Higgs EA, Vane JR. Human arterial and venous tissues generate prostacyclin (prostaglandin x), a potent inhibitor of platelet aggregation. *Lancet* (London, England). 1977 Jan 1;1(8001):18–20.
18. Furie B, Furie BC. The molecular basis of platelet and endothelial cell interaction with neutrophils and monocytes: role of P-selectin and the P-selectin ligand, PSGL-1. *Thromb Haemost.* 1995 Jul;74(1):224–7.
19. Epstein FH, Moncada S, Higgs A. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. *N Engl J Med.* 1993 Dec 30;329(27):2002–12.
20. Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res.* 1996 Nov;79(5):984–91.
21. Kinlay S, Behrendt D, Wainstein M, Beltrame J, Fang JC, Creager MA, et al. Role of endothelin-1 in the active constriction of human atherosclerotic coronary arteries. *Circulation.* 2001 Sep 4;104(10):1114–8.
22. Saye JA, Singer HA, Peach MJ. Role of endothelium in conversion of angiotensin I to angiotensin II in rabbit aorta. *Hypertens (Dallas, Tex 1979).* 6(2 Pt 1):216–21.
23. Haefliger IO, Flammer J, Lüscher TF. Nitric oxide and endothelin-1 are important regulators of human ophthalmic artery. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1992 Jun;33(7):2340–3.
24. Hansson GK. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *N Engl J Med.* 2005 Apr 21;352(16):1685–95.
25. Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol.* 1994 Nov 15;24(6):1468–74.
26. Dharmashankar K, Widlansky ME. Vascular endothelial function and hypertension: insights and directions. *Curr Hypertens Rep.* 2010 Dec;12(6):448–55.
27. Rhee SG. CELL SIGNALING: H₂O₂, a Necessary Evil for Cell Signaling. *Science* (80-). 2006 Jun 30;312(5782):1882–3.
28. Woywodt A, Bahlmann FH, De Groot K, Haller H, Haubitz M. Circulating endothelial cells: life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer. *Nephrol Dial Transplant.* 2002 Oct;17(10):1728–30.
29. Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jürgens K, et al. Physical Training Increases Endothelial Progenitor Cells, Inhibits Neointima Formation, and Enhances Angiogenesis. *Circulation.* 2004 Jan 20;109(2):220–6.

30. Su JB. Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment. *World J Cardiol.* 2015 Nov 26;7(11):719–41.
31. Iester M, Torre PG, Bricola G, Bagnis A, Calabria G. Retinal Blood Flow Autoregulation after Dynamic Exercise in Healthy Young Subjects. *Ophthalmologica.* 2007;221(3):180–5.
32. Rueddel T, Kneser M, Tost F. Impact of exercise on retinal microvascular regulation measured by dynamic vessel analysis in healthy individuals. *Clin Physiol Funct Imaging.* 2012 Mar;32(2):158–61.
33. Luo X, Shen Y, Jiang M, Lou X, Shen Y. Ocular Blood Flow Autoregulation Mechanisms and Methods. *J Ophthalmol.* 2015;2015:1–7.
34. Delaey C, van de Voorde J. Regulatory Mechanisms in the Retinal and Choroidal Circulation. *Ophthalmic Res.* 2000;32(6):249–56.
35. Flammer J, Mozaffarieh M. Autoregulation, a balancing act between supply and demand. *Can J Ophthalmol.* 2008 Jun;43(3):317–21.
36. Riva CE, Grunwald JE, Petrig BL. Autoregulation of human retinal blood flow. An investigation with laser Doppler velocimetry. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1986 Dec;27(12):1706–12.
37. Kolodjaschna J, Berisha F, Lung S, Schima H, Polska E, Schmetterer L. Comparison of the Autoregulatory Mechanisms between Middle Cerebral Artery and Ophthalmic Artery after Thigh Cuff Deflation in Healthy Subjects. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 2005 Feb 1;46(2):636.
38. Haefliger IO, Meyer P, Flammer J, Lüscher TF. The vascular endothelium as a regulator of the ocular circulation: a new concept in ophthalmology? *Surv Ophthalmol.* 39(2):123–32.
39. Weiss J, Fränkl SA, Flammer J, Grieshaber MC, Hollo G, Teuchner B, et al. No difference in genotype frequencies of polymorphisms of the nitric oxide pathway between Caucasian normal and high tension glaucoma patients. *Mol Vis.* 2012;18:2174–81.
40. Shoshani Y, Harris A, Shoja MM, Arieli Y, Ehrlich R, Primus S, et al. Impaired ocular blood flow regulation in patients with open-angle glaucoma and diabetes. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2012 Sep;40(7):697–705.
41. Flammer J, Orgül S, Costa VP, Orzalesi N, Kriegelstein GK, Serra LM, et al. The impact of ocular blood flow in glaucoma. *Prog Retin Eye Res.* 2002 Jul;21(4):359–93.
42. Lim M, Sasongko MB, Ikram MK, Lamoureux E, Wang JJ, Wong TY, et al. Systemic Associations of Dynamic Retinal Vessel Analysis: A Review of Current Literature. *Microcirculation.* 2013 Apr;20(3):257–68.

43. Hammond EC, Horn D. Smoking and death rates: report on forty-four months of follow-up of 187,783 men. 2. Death rates by cause. *J Am Med Assoc.* 1958 Mar 15;166(11):1294–308.
44. Mortality Attributable To Tobacco. *World Heal Organ [Internet]*. 2012; Available from:
http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44815/9789241564434_eng.pdf;jsessionid=CD738D32938A3FDC55F653643DC91813?sequence=1 (16.11.2018 09:24)
45. 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 (London, England)*. 1992 Nov 7;340(8828):1111–5.
46. Celermajer DS, Adams MR, Clarkson P, Robinson J, McCredie R, Donald A, et al. Passive Smoking and Impaired Endothelium-Dependent Arterial Dilatation in Healthy Young Adults. *N Engl J Med.* 1996 Jan 18;334(3):150–5.
47. Johnson HM, Gossett LK, Piper ME, Aeschlimann SE, Korcarz CE, Baker TB, et al. Effects of Smoking and Smoking Cessation on Endothelial Function. *J Am Coll Cardiol.* 2010 May 4;55(18):1988–95.
48. Otsuka R, Watanabe H, Hirata K, Tokai K, Muro T, Yoshiyama M, et al. Acute effects of passive smoking on the coronary circulation in healthy young adults. *JAMA.* 2001 Jul 25;286(4):436–41.
49. Lavi S, Prasad A, Yang EH, Mathew V, Simari RD, Rihal CS, et al. Smoking Is Associated With Epicardial Coronary Endothelial Dysfunction and Elevated White Blood Cell Count in Patients With Chest Pain and Early Coronary Artery Disease. *Circulation.* 2007 May 22;115(20):2621–7.
50. Barbieri SS, Zacchi E, Amadio P, Gianellini S, Mussoni L, Weksler BB, et al. Cytokines present in smokers' serum interact with smoke components to enhance endothelial dysfunction. *Cardiovasc Res.* 2011 Jun 1;90(3):475–83.
51. Cavusoglu Y, Timuralp B, Us T, Akgün Y, Kudaiberdieva G, Gorenek B, et al. Cigarette Smoking Increases Plasma Concentrations of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Patients with Coronary Artery Disease. *Angiology.* 2004 Jul 6;55(4):397–402.
52. Barbieri SS, Ruggiero L, Tremoli E, Weksler BB. Suppressing PTEN Activity by Tobacco Smoke Plus Interleukin-1 β Modulates Dissociation of VE-Cadherin/ β -Catenin Complexes in Endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Apr;28(4):732–8.
53. Lee J, Taneja V, Vassallo R. Cigarette Smoking and Inflammation. *J Dent Res.* 2012 Feb 29;91(2):142–9.
54. Freedman DS, Srinivasan SR, Shear CL, Hunter SM, Croft JB, Webber LS, et al.

- Cigarette smoking initiation and longitudinal changes in serum lipids and lipoproteins in early adulthood: the Bogalusa Heart Study. *Am J Epidemiol.* 1986 Aug;124(2):207–19.
55. Nakamura K, Barzi F, Huxley R, Lam T-H, Suh I, Woo J, et al. Does cigarette smoking exacerbate the effect of total cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol on the risk of cardiovascular diseases? *Heart.* 2009 Jun 1;95(11):909–16.
 56. Ross R. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. Epstein FH, editor. *N Engl J Med.* 1999 Jan 14;340(2):115–26.
 57. Becker CG, Hajjar DP, Hefton JM. Tobacco constituents are mitogenic for arterial smooth-muscle cells. *Am J Pathol.* 1985 Jul;120(1):1–5.
 58. Primates P, Falaschetti E, Gupta S, Marmot MG, Poulter NR. Association between smoking and blood pressure: evidence from the health survey for England. *Hypertens (Dallas, Tex 1979).* 2001 Feb;37(2):187–93.
 59. Csordas A, Bernhard D. The biology behind the atherothrombotic effects of cigarette smoke. *Nat Rev Cardiol.* 2013 Apr 5;10(4):219–30.
 60. Barua RS, Ambrose JA. Mechanisms of Coronary Thrombosis in Cigarette Smoke Exposure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013 Jul;33(7):1460–7.
 61. Tabit CE, Chung WB, Hamburg NM, Vita JA. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: Molecular mechanisms and clinical implications. *Rev Endocr Metab Disord.* 2010 Mar 26;11(1):61–74.
 62. Balletshofer BM, Rittig K, Enderle MD, Volk A, Maerker E, Jacob S, et al. Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulin resistance. *Circulation.* 2000 Apr 18;101(15):1780–4.
 63. Aanderud S, Krane H, Nordøy A. Influence of glucose, insulin and sera from diabetic patients on the prostacyclin synthesis in vitro in cultured human endothelial cells. *Diabetologia.* 1985 Sep;28(9):641–4.
 64. Arbogast BW, Lee GM, Raymond TL. In vitro injury of porcine aortic endothelial cells by very-low-density lipoproteins from diabetic rat serum. *Diabetes.* 1982 Jul;31(7):593–9.
 65. Elliott TG, Cockcroft JR, Groop PH, Viberti GC, Ritter JM. Inhibition of nitric oxide synthesis in forearm vasculature of insulin-dependent diabetic patients: blunted vasoconstriction in patients with microalbuminuria. *Clin Sci (Lond).* 1993 Dec;85(6):687–93.
 66. Tesfamariam B, Brown ML, Cohen RA. Elevated glucose impairs endothelium-dependent relaxation by activating protein kinase C. *J Clin Invest.* 1991 May

- 1;87(5):1643–8.
67. Festa A, D'Agostino R, Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation*. 2000 Jul 4;102(1):42–7.
 68. Keaney JF, Massaro JM, Larson MG, Vasan RS, Wilson PW., Lipinska I, et al. Heritability and correlates of intercellular adhesion molecule-1 in the Framingham Offspring Study. *J Am Coll Cardiol*. 2004 Jul 7;44(1):168–73.
 69. Steinberg HO, Brechtel G, Johnson A, Fineberg N, Baron AD. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J Clin Invest*. 1994 Sep;94(3):1172–9.
 70. Calles-Escandon J, Cipolla M. Diabetes and Endothelial Dysfunction: A Clinical Perspective. *Endocr Rev*. 2001 Feb;22(1):36–52.
 71. Mandecka A, Dawczynski J, Blum M, Muller N, Kloos C, Wolf G, et al. Influence of Flickering Light on the Retinal Vessels in Diabetic Patients. *Diabetes Care*. 2007 Dec 1;30(12):3048–52.
 72. Lott MEJ, Slocomb JE, Shivkumar V, Smith B, Quillen D, Gabbay RA, et al. Impaired retinal vasodilator responses in prediabetes and type 2 diabetes. *Acta Ophthalmol*. 2013 Sep;91(6):e462–9.
 73. Kawano H, Motoyama T, Hirashima O, Hirai N, Miyao Y, Sakamoto T, et al. Hyperglycemia rapidly suppresses flow-mediated endothelium-dependent vasodilation of brachial artery. *J Am Coll Cardiol*. 1999 Jul;34(1):146–54.
 74. Clarkson P, Celermajer DS, Donald AE, Sampson M, Sorensen KE, Adams M, et al. Impaired vascular reactivity in insulin-dependent diabetes mellitus is related to disease duration and low density lipoprotein cholesterol levels. *J Am Coll Cardiol*. 1996 Sep;28(3):573–9.
 75. Pemp B, Garhofer G, Weigert G, Karl K, Resch H, Wolzt M, et al. Reduced Retinal Vessel Response to Flicker Stimulation but Not to Exogenous Nitric Oxide in Type 1 Diabetes. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2009 Sep 1;50(9):4029.
 76. Gómez-Marcos MA, Recio-Rodríguez JI, Rodríguez-Sánchez E, Patino-Alonso MC, Magallón-Botaya R, Martínez-Vizcaino V, et al. Carotid Intima-Media Thickness in Diabetics and Hypertensive Patients. *Rev Española Cardiol (English Ed)*. 2011 Jul 1;64(7):622–5.
 77. G L. *Augenheilkunde*, 5. Auflage. Stuttgart. 2014;235–8.
 78. Buse JB, Ginsberg HN, Bakris GL, Clark NG, Costa F, Eckel R, et al. Primary Prevention of Cardiovascular Diseases in People With Diabetes Mellitus: A scientific statement from the American Heart Association and the American Diabetes

- Association. *Diabetes Care*. 2007 Jan 1;30(1):162–72.
79. Gurovich AN, Braith RW. Enhanced external counterpulsation creates acute blood flow patterns responsible for improved flow-mediated dilation in humans. *Hypertens Res*. 2013 Apr 18;36(4):297–305.
 80. Sardina PD, Martin JS, Avery JC, Braith RW. Enhanced external counterpulsation (EECP) improves biomarkers of glycemic control in patients with non-insulin-dependent type II diabetes mellitus for up to 3 months following treatment. *Acta Diabetol*. 2016 Oct 14;53(5):745–52.
 81. Sardina PD, Martin JS, Dzieza WK, Braith RW. Enhanced external counterpulsation (EECP) decreases advanced glycation end products and proinflammatory cytokines in patients with non-insulin-dependent type II diabetes mellitus for up to 6 months following treatment. *Acta Diabetol*. 2016 Oct 9;53(5):753–60.
 82. Feldman AM. Enhanced external counterpulsation: Mechanism of action. *Clin Cardiol*. 2002 Dec;25(S2):11–5.
 83. Zheng ZS, Yu LQ, Cai SR, Kambic H, Li TM, Ma H, et al. New sequential external counterpulsation for the treatment of acute myocardial infarction. *Artif Organs* [Internet]. 1984 Nov [cited 2019 Jan 19];8(4):470–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6508602>
 84. Lawson WE, Hui JC, Soroff HS, Zheng ZS, Kayden DS, Sasvary D, et al. Efficacy of enhanced external counterpulsation in the treatment of angina pectoris. *Am J Cardiol* [Internet]. 1992 Oct 1 [cited 2019 Jan 19];70(9):859–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1529937>
 85. Werner D, Michelson G, Harazny J, Michalk F, Voigt JU, Daniel WG. Changes in ocular blood flow velocities during external counterpulsation in healthy volunteers and patients with atherosclerosis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* [Internet]. 2001 Aug [cited 2019 Jan 19];239(8):599–602. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11585316>
 86. Zhu W, Liao R, Chen Y, Liu L, Zhang Y. Effect of enhanced extracorporeal counterpulsation in patients with non-arteritic anterior ischaemic optic neuropathy. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* [Internet]. 2015 Jan 10 [cited 2019 Jan 19];253(1):127–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25301396>
 87. Werner D, Michalk F, Harazny J, Hugo C, Daniel WG, Michelson G. Accelerated reperfusion of poorly perfused retinal areas in central retinal artery occlusion and branch retinal artery occlusion after a short treatment with enhanced external counterpulsation. *Retina* [Internet]. 2004 Aug [cited 2019 Jan 19];24(4):541–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15300074>

88. Liu JY, Xiong L, Stinear CM, Leung H, Leung TW, Wong KSL. External counterpulsation enhances neuroplasticity to promote stroke recovery. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 2018 May 29 [cited 2019 Jan 19];jnnp-2018-318185. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29844246>
89. Xiong L, Lin W, Han J, Chen X, Leung T, Soo Y, et al. Enhancing cerebral perfusion with external counterpulsation after ischaemic stroke: how long does it last? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 2016 May [cited 2019 Jan 19];87(5):531–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25934015>
90. KANTROWITZ A. Experimental augmentation of coronary flow by retardation of the arterial pressure pulse. *Surgery* [Internet]. 1953 Oct [cited 2019 Jan 19];34(4):678–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13102153>
91. Braith RW, Conti CR, Nichols WW, Choi CY, Khuddus MA, Beck DT, et al. Enhanced External Counterpulsation Improves Peripheral Artery Flow-Mediated Dilation in Patients With Chronic Angina. *Circulation* [Internet]. 2010 Oct 19 [cited 2019 Jan 19];122(16):1612–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20921442>
92. Barsheshet A, Hod H, Shechter M, Sharabani-Yosef O, Rosenthal E, Barbash IM, et al. The Effects of External Counter Pulsation Therapy on Circulating Endothelial Progenitor Cells in Patients with Angina Pectoris. *Cardiology* [Internet]. 2008 [cited 2019 Jan 19];110(3):160–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18057883>
93. YANG Y, ZHANG H, YAN Y, GUI Y. Clinical study in patients with ocular ischemic diseases treated with enhanced external counterpulsation combined with drugs. *Mol Med Rep* [Internet]. 2013 Jun [cited 2019 Jan 19];7(6):1845–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23625058>
94. Kotliar KE, Vilser W, Nagel E, Lanzl IM. Retinal vessel reaction in response to chromatic flickering light. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2004 May 10;242(5):377–92.
95. Garhofer G, Bek T, Boehm AG, Gherghel D, Grunwald J, Jeppesen P, et al. Use of the retinal vessel analyzer in ocular blood flow research. *Acta Ophthalmol*. 2010 Nov;88(7):717–22.
96. Seifertl BU, Vilser W. Retinal Vessel Analyzer (RVA)--design and function. *Biomed Tech (Berl)*. 2002;47 Suppl 1:678–81.
97. Pournaras CJ, Riva CE. Retinal Blood Flow Evaluation. *Ophthalmologica*. 2013;229(2):61–74.
98. Polak K, Schmetterer L, Riva CE. Influence of flicker frequency on flicker-induced

- changes of retinal vessel diameter. *Invest Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 2002 Aug [cited 2019 Feb 17];43(8):2721–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12147608>
99. Falsini B, Riva CE, Logean E. Flicker-evoked changes in human optic nerve blood flow: relationship with retinal neural activity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002 Jul;43(7):2309–16.
 100. Formaz F, Riva CE, Geiser M. Diffuse luminance flicker increases retinal vessel diameter in humans. *Curr Eye Res*. 1997 Dec;16(12):1252–7.
 101. Pemp B, Weigert G, Karl K, Petzl U, Wolzt M, Schmetterer L, et al. Correlation of Flicker-Induced and Flow-Mediated Vasodilatation in Patients With Endothelial Dysfunction and Healthy Volunteers. *Diabetes Care*. 2009 Aug 1;32(8):1536–41.
 102. Vogel RA. Measurement of endothelial function by brachial artery flow-mediated vasodilation. *Am J Cardiol*. 2001 Jul 19;88(2A):31E-34E.
 103. Moens AL, Goovaerts I, Claeys MJ, Vrints CJ. Flow-Mediated Vasodilation. *Chest*. 2005 Jun;127(6):2254–63.
 104. Peretz A, Leotta DF, Sullivan JH, Trenga CA, Sands FN, Aulet MR, et al. Flow mediated dilation of the brachial artery: an investigation of methods requiring further standardization. *BMC Cardiovasc Disord*. 2007 Dec 21;7(1):11.
 105. Lenehan PF, Officer CM, Genomics E. ANGIODEFENDER : Clinical validation studies. 2013;84:2–4. Available from: https://angiodefender.com/wp-content/uploads/sites/2/2018/06/AngioDefender_Clinical_Validation.pdf 17.02.1019 16:07
 106. Everist Angiodefender. 2015;4–7. Available from: <https://everisthealth.com/images/content/AD-White-Paper.pdf> 17.02.1019 16:10
 107. Jungehuelsing GJ, Liman TG, Brunecker P, Ebel A, Endres M, Buschmann I, et al. Does External Counterpulsation Augment Mean Cerebral Blood Flow in the Healthy Brain? Effects of External Counterpulsation on Middle Cerebral Artery Flow Velocity and Cerebrovascular Regulatory Response in Healthy Subjects. *Cerebrovasc Dis*. 2010;30(6):612–7.