

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie  
Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Der Einfluss von Simvastatin sowie  
verschiedenen Phosphodiesterase-Inhibitoren  
auf die Mikrozirkulation kritisch perfundierter  
muskulokutaner Lappenplastiken  
am atherosklerotischen Mausmodell.

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2017

von  
Tanja Lieselotte Schröder  
geb. am 19.12.1987 in Karlsruhe

Meiner Mutter in Dankbarkeit und  
meinem Vater in memoriam gewidmet.

---

# INHALTSVERZEICHNIS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>TABELLENVERZEICHNIS</b>   | <b>I</b>  |
| <b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>   | <b>I</b>  |
| <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>   | <b>II</b> |
| <b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 Zusammenfassung .....  | 1         |
| 1.2 Summary .....  | 3         |
| <b>2. EINLEITUNG</b>   | <b>6</b>  |
| 2.1 Atherosklerose .....   | 6         |
| 2.1.1 Atherogenese .....   | 6         |
| 2.1.2 Die ApoE-defiziente-Maus als <i>in vivo</i> -Atherosklerose-Modell ..... | 13        |
| 2.2 Plastische Chirurgie .....   | 13        |
| 2.2.1 Geschichte der Plastischen Chirurgie und der Lappenchirurgie .....       | 13        |
| 2.2.2 Ziele und Spektrum der Plastischen Chirurgie .....                       | 14        |
| 2.3 Lappenplastiken .....  | 15        |
| 2.3.1 Definition und Einteilung der Lappenplastiken .....                      | 15        |
| 2.3.2 Ischämie und Reperfusion .....   | 16        |
| 2.4 Präkonditionierung .....   | 17        |
| 2.4.1 Statine – Lipidsenkung und pleiotrope Effekte .....                      | 18        |
| 2.4.2 Die „second messenger“ cAMP und cGMP .....                               | 20        |
| 2.4.3 Phosphodiesterasen und ihre Inhibitoren .....                            | 21        |
| 2.5 Fragestellung .....  | 24        |
| <b>3. MATERIAL UND METHODIK</b>  | <b>26</b> |
| 3.1 Versuchstiere und Tierhaltung .....  | 26        |
| 3.2 Modell .....   | 26        |
| 3.2.1 Rückenhautkammermodell .....   | 26        |
| 3.2.2 Anästhesie .....   | 27        |
| 3.2.3 Vorbereitung .....   | 28        |

|                      |   |           |
|----------------------|---|-----------|
| 3.2.4                | Präkonditionierung .....                                | 28        |
| 3.2.5                | Operation .....   | 30        |
| 3.2.6                | Blutentnahme .....                                      | 34        |
| 3.2.7                | Versuchsprotokoll.....                                  | 34        |
| <b>3.3</b>           | <b>Untersuchungsmethoden.....</b>                       | <b>35</b> |
| 3.3.1                | Fluoreszenzfarbstoffe.....                              | 35        |
| 3.3.2                | Intravitale Fluoreszenzmikroskopie .....                | 36        |
| 3.3.3                | Analyse der Mikrozirkulation.....                       | 41        |
| 3.3.4                | Analyse der Blutwerte .....                             | 43        |
| <b>3.4</b>           | <b>Datenauswertung, -erfassung und Statistik.....</b>   | <b>44</b> |
| 3.4.1                | Datenauswertung .....                                   | 44        |
| 3.4.2                | Datenerfassung.....                                     | 44        |
| 3.4.3                | Statistische Bearbeitung.....                           | 44        |
| 3.4.4                | Graphische Darstellung.....                             | 44        |
| <b>4. ERGEBNISSE</b> |   | <b>45</b> |
| <b>4.1</b>           | <b>Simvastatin und Theophyllin.....</b>                 | <b>45</b> |
| 4.1.1                | Lipidwerte.....   | 45        |
| 4.1.2                | Nekrotische Gewebefläche .....                          | 46        |
| 4.1.3                | Arteriöläre Fließgeschwindigkeit (aVel) .....           | 47        |
| 4.1.4                | Arteriölärer Durchmesser (aDM) .....                    | 47        |
| 4.1.5                | Arteriölärer Blutfluss (aBF) .....                      | 48        |
| 4.1.6                | Venuläre Fließgeschwindigkeit (vVel).....               | 52        |
| 4.1.7                | Venulärer Durchmesser (vDM).....                        | 52        |
| 4.1.8                | Venulärer Blutfluss (vBF) .....                         | 52        |
| 4.1.9                | Kapillare Fließgeschwindigkeit (kVel) .....             | 58        |
| 4.1.10               | Kapillärer Durchmesser (kDM) .....                      | 58        |
| 4.1.11               | Kapillärer Blutfluss (kBF).....                         | 59        |
| 4.1.12               | Funktionelle Kapillardichte (FCD) .....                 | 63        |
| 4.1.13               | Apoptotischer Zelltod.....                              | 63        |
| <b>4.2</b>           | <b>Spezifische Inhibition der PDE 3, 4, und 5 .....</b> | <b>66</b> |
| 4.2.1                | Lipidwerte.....   | 66        |
| 4.2.2                | Nekrotische Gewebefläche .....                          | 67        |
| 4.2.3                | Arteriöläre Fließgeschwindigkeit (aVel) .....           | 68        |
| 4.2.4                | Arteriölärer Durchmesser (aDM) .....                    | 69        |
| 4.2.5                | Arteriölärer Blutfluss (aBF) .....                      | 69        |

---

|  |            |
|--|------------|
| 4.2.6 Venuläre Fließgeschwindigkeit (vVel).....          | 73         |
| 4.2.7 Venulärer Durchmesser (vDM).....                   | 73         |
| 4.2.8 Venulärer Blutfluss (vBF) .....                    | 74         |
| 4.2.9 Kapillare Fließgeschwindigkeit (kVel) .....        | 78         |
| 4.2.10 Kapillarer Durchmesser (kDM) .....                | 79         |
| 4.2.11 Kapillarer Blutfluss (kBF).....                   | 80         |
| 4.2.12 Funktionelle Kapillardichte (FCD).....            | 81         |
| 4.2.13 Apoptotischer Zelltod.....                        | 82         |
| <b>5. DISKUSSION</b>                                     | <b>85</b>  |
| <b>5.1 Diskussion des Modells und der Methoden .....</b> | <b>85</b>  |
| 5.1.1 Atherosklerotisches Mausmodell.....                | 85         |
| 5.1.2 Rückenhautkammermodell.....                        | 86         |
| 5.1.3 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie .....           | 88         |
| <b>5.2 Diskussion der Ergebnisse .....</b>               | <b>89</b>  |
| 5.2.1 Simvastatin und Theophyllin.....                   | 89         |
| 5.2.2 Spezifische Inhibition der PDE 3, 4 und 5.....     | 95         |
| <b>5.3 Schlussfolgerung und Ausblick.....</b>            | <b>104</b> |
| <b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b>                           | <b>108</b> |
| <b>7. DANKSAGUNG</b>                                     | <b>121</b> |
| <b>8. PUBLIKATIONEN</b>                                  | <b>122</b> |

---

## TABELLENVERZEICHNIS

- Tab. 1: Klassifikation atherosklerotischer Läsionen
- Tab. 2: Phosphodiesterasen mit ihren Substraten, Lokalisationen, Inhibitoren und Zielerkrankungen
- Tab. 3: Übersicht der erhobenen Messparameter
- Tab. 4: Kapillare Fließgeschwindigkeit Kontroll-, Cilostazol-, Rolipram-, Sildenafil-Gruppe
- Tab. 5: Kapillarer Durchmesser Kontroll-, Cilostazol-, Rolipram-, Sildenafil-Gruppe
- Tab. 6: Kapillarer Blutfluss Kontroll-, Cilostazol-, Rolipram-, Sildenafil-Gruppe

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1: Phasen der Bildung einer atherosklerotischen Plaque
- Abb. 2: Durchblutungsmuster der Gewebeschichten eines Lappen
- Abb. 3: Lipidsenkende und pleiotrope Effekte der Statine
- Abb. 4: Größe und Position des „random pattern flap“
- Abb. 5: Präparation des „random pattern flap“
- Abb. 6: Versuchsablauf
- Abb. 7: Prinzip der Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie
- Abb. 8: Aufbau des Intravitalmikroskops
- Abb. 9: Intravitalmikroskopische Bildgebung
- Abb. 10: Übergang von perfundierter zu nekrotischer Gewebefläche
- Abb. 11: Gesamtcholesterin Kontroll-, Simvastatin-, Theophyllin- und Wildtyp-Gruppe
- Abb. 12: Triglyceride Kontroll-, Simvastatin-, Theophyllin- und Wildtyp-Gruppe
- Abb. 13: Nekrotische Gewebefläche Kontroll-, Simvastatin-, Theophyllin-Gruppe
- Abb. 14: Arteriöle Fließgeschwindigkeit Kontroll-, Simvastatin-, Theophyllin-Gruppe
- Abb. 15: Arteriöler Durchmesser Kontroll-, Simvastatin-, Theophyllin-Gruppe
- Abb. 16: Arteriöler Blutfluss Kontroll-, Simvastatin-, Theophyllin-Gruppe
- Abb. 17: Venuläre Fließgeschwindigkeit Kontroll-, Simvastatin-, Theophyllin-Gruppe
- Abb. 18: Venulärer Durchmesser Kontroll-, Simvastatin-, Theophyllin-Gruppe
- Abb. 19: Beispielhafte intravitalmikroskopische Bilder eines arteriovenösen Bündels
- Abb. 20: Venulärer Blutfluss Kontroll-, Simvastatin-, Theophyllin-Gruppe
- Abb. 21: Kapillare Fließgeschwindigkeit Kontroll-, Simvastatin-, Theophyllin-Gruppe
- Abb. 22: Kapillarer Durchmesser Kontroll-, Simvastatin-, Theophyllin-Gruppe
- Abb. 23: Kapillarer Blutfluss Kontroll-, Simvastatin-, Theophyllin-Gruppe
- Abb. 24: Funktionelle Kapillardichte Kontroll-, Simvastatin-, Theophyllin-Gruppe

|          |   |
|----------|---|
| Abb. 25: | Anzahl apoptotischer Zellen Kontroll-, Simvastatin-, Theophyllin-Gruppe               |
| Abb. 26: | Gesamtcholesterin Kontroll-, Cilostazol-, Rolipram-, Sildenafil- und Wildtyp-Gruppe   |
| Abb. 27: | Triglyceride Kontroll-, Cilostazol-, Rolipram-, Sildenafil- und Wildtyp-Gruppe        |
| Abb. 28: | Nekrotische Gewebefläche Kontroll-, Cilostazol-, Rolipram-, Sildenafil-Gruppe         |
| Abb. 29: | Arteriöläre Fließgeschwindigkeit Kontroll-, Cilostazol-, Rolipram-, Sildenafil-Gruppe |
| Abb. 30: | Arteriölärer Durchmesser Kontroll-, Cilostazol-, Rolipram-, Sildenafil-Gruppe         |
| Abb. 31: | Arteriölärer Blutfluss Kontroll-, Cilostazol-, Rolipram-, Sildenafil-Gruppe           |
| Abb. 32: | Venuläre Fließgeschwindigkeit Kontroll-, Cilostazol-, Rolipram-, Sildenafil-Gruppe    |
| Abb. 33: | Venulärer Durchmesser Kontroll-, Cilostazol-, Rolipram-, Sildenafil-Gruppe            |
| Abb. 34: | Venulärer Blutfluss Kontroll-, Cilostazol-, Rolipram-, Sildenafil-Gruppe              |
| Abb. 35: | Funktionelle Kapillardichte Kontroll-, Cilostazol-, Rolipram-, Sildenafil-Gruppe      |
| Abb. 36: | Anzahl apoptotischer Zellen Kontroll-, Cilostazol-, Rolipram-, Sildenafil-Gruppe      |

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|                     |   |
|---------------------|---|
| $\alpha$            | alpha   |
| A.                  | Arteria, Arterie                                      |
| aBF                 | arteriölärer Blutfluss                                |
| aDM                 | arteriölärer Durchmesser                              |
| AHA                 | American Heart Association                            |
| AMP                 | Adenosinmonophosphat                                  |
| ApoE                | Apolipoprotein E                                      |
| ApoE <sup>-/-</sup> | Apolipoprotein E-defizient                            |
| art.                | arteriöläer   |
| ATP                 | Adenosintriphosphat                                   |
| AT-reich            | Adenin- und Thymin-reich                              |
| aVel                | arteriöläre Fließgeschwindigkeit, arteriolar velocity |
| Ca <sup>2+</sup>    | Calcium   |
| cAMP                | zyklisches Adenosinmonophosphat                       |
| CCD                 | charge coupled device                                 |
| CD                  | cluster of differentiation                            |
| cGMP                | zyklisches Guanosinmonophosphat                       |
| COPD                | chronisch obstruktive Lungenerkrankung                |
| CRP                 | C-reaktives Protein                                   |

---

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| d                             | Tag/e, day/s  |
| DNA                           | Desoxyribonukleinsäure                                    |
| eNOS                          | endotheliale NO-Synthase                                  |
| et al.                        | und andere, „et alii“ (m), „et aliae“ (f)                 |
| FCD                           | funktionelle Kapillardichte, functional capillary density |
| FITC                          | Fluoreszein-Isothiozyanat                                 |
| GMP                           | Guanosinmonophosphat                                      |
| GTP                           | Guanosintriphosphat                                       |
| h                             | Stunde/n, hour/s  |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Wasserstoffperoxid  |
| HDAC                          | Histon-Deacetylase  |
| HDL                           | high density lipoprotein                                  |
| HMG-CoA                       | 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A                      |
| ICAM                          | intercellular adhesion molecule                           |
| IDL                           | intermediate density lipoprotein                          |
| IL                            | Interleukin   |
| iNOS                          | induzierbare NO-Synthase                                  |
| I/R                           | Ischämie/Reperfusion                                      |
| IVM                           | Intravitalmikroskopie                                     |
| kap.                          | kapillar  |
| kBF                           | kapillarer Blutfluss                                      |
| kDM                           | kapillarer Durchmesser                                    |
| KG                            | Körpergewicht   |
| kVel                          | kapillare Fließgeschwindigkeit, capillary velocity        |
| LAD                           | left anterior descending coronary artery                  |
| LDL                           | low density lipoprotein                                   |
| LOX-1                         | lectin-like oxLDL-Rezeptor-1                              |
| LRP                           | LDL receptor related protein                              |
| MMP                           | Matrix-Metalloproteasen                                   |
| µm                            | Mikrometer  |
| n                             | Anzahl  |
| NaCl                          | Natriumchlorid  |
| NFκB                          | nuclear factor kappa B                                    |
| NO                            | Stickstoffmonoxid   |
| NOS                           | NO-Synthase   |
| oxLDL                         | oxidiertes low density lipoprotein                        |
| PAF                           | platelet-activating factor                                |

|              |  |
|--------------|--|
| pAVK         | periphere arterielle Verschlusskrankheit                     |
| PDE          | Phosphodiesterase  |
| PDGF         | platelet-derived growth factor                               |
| PK           | Proteinkinase  |
| pl           | Pikoliter  |
| ROS          | Reaktive Sauerstoffspezies                                   |
| SEM          | Standardfehler des Mittelwertes, standard error of the means |
| SMC          | glatte Muskelzelle/n, smooth muscle cell/s                   |
| 8-SPT        | 8-(p-Sulfophenyl-)Theophyllin                                |
| SR           | Scavenger-Rezeptor   |
| Tab.         | Tabelle  |
| TNF $\alpha$ | Tumornekrosefaktor-alpha                                     |
| vBF          | venulärer Blutfluss  |
| VCAM         | vascular cell adhesion molecule                              |
| vDM          | venulärer Durchmesser  |
| ven.         | venulär  |
| VLDL         | very low density lipoprotein                                 |
| vVel         | venuläre Fließgeschwindigkeit, venular velocity              |
| WTD          | Western-type diet  |
| %            | Prozent  |
| -/-          | defizient  |
| °C           | Grad Celsius   |

# 1. ZUSAMMENFASSUNG

## 1.1 Zusammenfassung

**Hintergrund:** In der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie ist die Defektdeckung mit Lappenplastiken ein häufig angewendetes Verfahren. Hierbei stellt die ischämiebedingte Mikrozirkulationsstörung mit nachfolgender Nekrose, vor allem des distalen Lappenanteils, nach wie vor ein ernstzunehmendes Problem dar, welches letztendlich zum partiellen oder totalen Lappenverlust führen kann. Neben der Sauerstoffminderversorgung spielen auch ischämieinduzierte Entzündung und endotheliale Dysfunktion eine entscheidende Rolle. Insbesondere Patienten mit Atherosklerose weisen Perfusionsstörungen auf, welche die Ischämie weiter fördern können. Das Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, welchen Einfluss eine medikamentöse Präkonditionierung auf die Mikrozirkulation und Nekroseentstehung in randomisiert perfundierten Lappenplastiken am atherosklerotischen Mausmodell hat. Als erste Substanz diente der Lipidsenker Simvastatin, welcher viele pleiotrope Effekte, wie die Verbesserung der endothelialen Dysfunktion und Plaquestabilisierung sowie eine anti-oxidative und anti-inflammatorische Wirkung, besitzt. Des Weiteren wurden vier verschiedene Phosphodiesterase-Inhibitoren – Theophyllin, Cilostazol, Rolipram und Sildenafil – eingesetzt. Durch die Beeinflussung von „second messenger“-Systemen werden zahlreiche zelluläre Effekte erzielt, unter anderem die Freisetzung von vasoaktiven Substanzen, Immunmodulation, Hemmung der Thrombozytenaggregation und verminderte Ausschüttung von Entzündungsmediatoren. Dies sind alles Wirkungen, die sowohl bei der Atherogenese als auch bei der Perfusion von kritisch ischämischen Lappenplastiken eine große Rolle spielen.

**Material und Methoden:** An Apolipoprotein E-defizienten Mäusen wurde ein randomisiert durchbluteter Haut-Muskellappen (15x11mm) gehoben und in einer chronischen Rückenhautkammer fixiert. An den Tagen 1, 3, 5, 7 und 10 nach Lappenhebung erfolgte die Analyse der Mikrozirkulation mittels repetitiver intravitaler Fluoreszenzmikroskopie. Durch Injektion von FITC-Dextran 150.000 vor jeder Intravitalmikroskopie bzw. topischer Auftragung von Bisbenzimid im Rahmen der Operation konnten die Ausdehnung der Gewebenekrose, funktionelle Kapillardichte, Durchmesser, Fließgeschwindigkeit und Blutfluss in Arteriolen, Venulen und Kapillaren sowie der apoptotische Zelltod jeweils im proximalen, zentralen und distalen Lappenanteil dargestellt werden. Die Auswertung der Daten erfolgte anschließend offline mit dem computergestützten Analysesystem CapImage®. Die Präkonditionierung mit Simvastatin und den Phosphodiesterase-Inhibitoren erfolgte erstmals 24 Stunden vor der Lappenhebung sowie an den folgenden vier Tagen; NaCl-

behandelte Tiere dienten als Kontrollgruppe. Zusätzlich wurden am Versuchsende die Gesamtcholesterin- sowie Triglycerid-Konzentrationen im Serum der Apolipoprotein E-defizienten Mäuse bestimmt und mit denen der Wildtyp-Mäuse verglichen.

**Ergebnisse:** Die Gesamtcholesterinkonzentration der Apolipoprotein E-defizienten Mäuse waren im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen signifikant um den Faktor 20 bis 25 erhöht ( $p < 0,001$ ). Zwischen Kontrollgruppen und Behandlungsgruppen Apolipoprotein E-defizienter Mäuse gab es keine signifikanten Unterschiede in den Gesamtcholesterinkonzentrationen. Bei den Triglyceriden waren die Unterschiede deutlich geringer ausgeprägt. Lediglich bei den mit Theophyllin vorbehandelten ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen fanden sich signifikant erhöhte Triglycerid-Werte gegenüber den mit Simvastatin- und NaCl-behandelten ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen ( $p < 0,05$ ) sowie gegenüber den Wildtyp-Mäusen ( $p < 0,001$ ).

Im ersten Versuchsabschnitt mit Simvastatin und dem unspezifischen Phosphodiesterase-Inhibitor Theophyllin zeigte sich nach Lappenhebung in der NaCl-behandelten Kontrollgruppe ein zunehmender Ausfall der kapillaren Perfusion mit Beeinträchtigung der Mikrozirkulation in allen Lappenanteilen. Schlussendlich führte dies zu einer Lappennekrose von  $61 \pm 9\%$ . Bei Simvastatin-behandelten Tieren fand sich insgesamt ein verbessertes Lappenüberleben ( $47 \pm 8\%$ ; Tag 10). Dies war jedoch nicht signifikant verschieden von dem der Kontrollgruppe. Eine konstante Verbesserung der Mikrozirkulation oder aber der Reduktion der Anzahl apoptotischer Zellen konnte nicht erreicht werden. Die mit Theophyllin präkonditionierten Tiere zeigten im proximalen und zentralen Lappenanteil bereits initial nach Lappenhebung eine im Vergleich zur Kontrollgruppe höhere Kapillardichte, welche über den gesamten Versuchszeitraum aufrechterhalten werden konnte (proximal  $101 \pm 34$  vs.  $24 \pm 10 \text{ cm/cm}^2$ ; zentral  $127 \pm 20$  vs.  $24 \pm 19 \text{ cm/cm}^2$ ; Tag 10,  $p < 0,05$ ). Entsprechend war auch die Mikrozirkulation deutlich und anhaltend verbessert. Dies resultierte schlussendlich in einer signifikant reduzierten Lappennekrose über den gesamten Beobachtungszeitraum von 10 Tagen ( $21 \pm 3\%$ ; Tag 10;  $p < 0,05$ ).

Im zweiten Versuchsteil mit spezifischer Hemmung der Phosphodiesterasen 3 (Cilostazol), 4 (Rolipram) und 5 (Sildenafil) wurde bei den Kontrolltieren – analog zu Versuchsabschnitt eins – ein zunehmender Ausfall der nutritiven Perfusion sowie eine unzureichende Mikrozirkulation in allen Anteilen des „random pattern flap“ beobachtet. Dieses Perfusionsversagen verursachte letztendlich eine Lappennekrose von  $65 \pm 6\%$ . Bei Cilostazol-behandelten Mäusen fand sich die stärkste Beeinträchtigung der Mikrozirkulation. Im zentralen und distalen Lappenanteil war ab Tag 7 die Perfusion sowohl in Arteriolen, aber auch in Venulen und Kapillaren komplett ausgefallen. Dementsprechend betrug die Nekrose schlussendlich  $76 \pm 6\%$  der Gesamtgewebefläche. Durch die Behandlung mit Rolipram konnte die arterioläre und venuläre Fließgeschwindigkeit im zentralen Anteil des Lappen verbessert

werden, die funktionelle Kapillardichte war jedoch über den gesamten Beobachtungszeitraum beeinträchtigt. Nichtsdestotrotz lag die nekrotische Gewebefläche an Tag 10 bei  $43\pm 12\%$ . Die mit Sildenafil präkonditionierten Tiere wiesen im proximalen und zentralen Anteil des Lappens gegenüber der Kontroll- sowie der Cilostazol-Gruppe erhöhte arterioläre und venuläre Fließgeschwindigkeiten und Blutflüsse auf. Auch die nutritive Perfusion war in diesen Lappenanteilen verbessert. Es entwickelte sich über den Versuchszeitraum eine Lappennekrose von  $41\pm 9\%$ , welche ab dem dritten Beobachtungstag gegenüber den mit Cilostazol behandelten Tieren signifikant geringer ausgeprägt war ( $p < 0,05$ ).

**Schlussfolgerung:** Die vorliegende Studie zeigt, dass eine medikamentöse Präkonditionierung das Ausmaß der Lappennekrose von „random pattern flaps“ im atherosklerotischen Mausmodell vermindern kann. Allerdings vermag Simvastatin trotz seiner vielen pleiotropen Effekte keine signifikante Verbesserung des Lappenüberlebens herbeizuführen. Die spezifische Inhibition der Phosphodiesterase 3 führte gar zu einer weiteren Verstärkung des Mikrozirkulationsschadens und der Lappennekrose. Die spezifische Hemmung der Phosphodiesterasen 4 und 5 konnte die Nekroseentstehung reduzieren, was den Einsatz unter klinischen Bedingungen erfolgversprechend scheinen lässt. Durch Theophyllin-Gabe konnten Mikrozirkulation und nutritive Perfusion anhaltend verbessert und somit die Nekroseentwicklung signifikant vermindert werden. Eine Präkonditionierung mit Theophyllin stellt somit einen möglichen nicht invasiven und kostengünstigen Ansatz dar, dem ischämiebedingten Lappenverlust bei Patienten mit manifester Atherosklerose im klinischen Alltag vorzubeugen.

## 1.2 Summary

**Background:** In plastic and reconstructive surgery the coverage of defects with flaps is an established and widely used method. Hereby, insufficient perfusion followed by necrosis, especially of distal flap areas, still represents a major problem, which may lead to partial or complete flap loss. In addition to an insufficient blood supply, inflammation and endothelial dysfunction play a crucial role in flap failure. This is of particular interest in patients with atherosclerosis, where the restriction of blood flow can promote ischemia and tissue injury. The aim of the present study was therefore to investigate in an atherosclerotic mouse model the effect of pharmacological preconditioning on the microcirculation and tissue necrosis in random pattern flaps. The first substance used was the lipid-lowering drug simvastatin, which has many pleiotropic activities, such as the improvement of endothelial dysfunction and plaque stabilization as well as the counteraction of oxidants and inflammatory mediators.

Furthermore, four different phosphodiesterase inhibitors – theophylline, cilostazol, rolipram and sildenafil – were used. By influencing second messenger systems, numerous cellular effects can be achieved, including the release of vasoactive substances, immunomodulation, inhibition of platelet aggregation and reduction of inflammatory mediator release. All reported effects play a major role in both atherogenesis and the perfusion of critically ischemic flaps.

**Methods:** A random pattern musculocutaneous flap (15x11mm) was elevated in apolipoprotein E-deficient mice and fixed into a dorsal skinfold chamber. Repetitive intravital fluorescence microscopy was performed at day 1, 3, 5, 7 and 10 after flap elevation in order to analyze the microcirculation. By injection of FITC-dextran 150.000 before each intravital microscopy or topical application of bisbenzimidazole during the operation, the area of tissue necrosis, functional capillary density, diameter and blood flow in arterioles, venules, and capillaries, as well as apoptotic cell death could be analyzed in the proximal, central and distal area of the flap. All parameters were analyzed offline, using the computer-assisted analysis system CapImage<sup>®</sup>. Simvastatin and the phosphodiesterase inhibitors were first administered 24 hours before flap elevation and on the following four days; animals receiving saline treatment served as controls. Furthermore serum total cholesterol- and triglyceride-concentrations of apolipoprotein E-deficient mouse were quantified on day 10 and compared to that of wild type mice.

**Results:** Serum total cholesterol levels were 20 to 25fold higher in apolipoprotein E-deficient mice compared to wild type mice ( $p < 0,001$ ). Between any group of treated and untreated Apo E-deficient mice there were no significant differences in cholesterol concentrations. The differences in triglyceride concentrations were found less pronounced. Solely Theophylline-treated ApoE<sup>-/-</sup>-mice showed significant higher triglyceride levels compared to that of simvastatin- and saline-treated ApoE<sup>-/-</sup>-mice ( $p < 0,05$ ), as well as to that of wild type mice ( $p < 0,001$ ).

In the first part of this study Simvastatin and the unselective phosphodiesterase-inhibitor theophylline were analyzed. In the saline-treated control animals a distinct decrease of functional capillary density was noted in each area of the flap. This resulted in a flap necrosis of  $61 \pm 9\%$ . Animals treated with simvastatin showed a slightly improved flap survival, which, however, was not significantly different to that of saline-treated controls ( $47 \pm 8\%$ ; day 10). A constant improvement of microcirculatory parameters or reduction of apoptotic cell death could not be achieved. In contrast, in mice treated with theophylline we observed a significant increase of functional capillary density in the proximal and central flap areas as early as one day after flap elevation, which could be maintained during the whole observation period (proximal  $101 \pm 34$  vs.  $24 \pm 10$  cm/cm<sup>2</sup>; central  $127 \pm 20$  vs.  $24 \pm 19$  cm/cm<sup>2</sup>; day 10,

$p < 0,05$ ). Consequently, tissue necrosis was significantly reduced at all days of the observation period ( $21 \pm 3\%$ ; day 10;  $p < 0,05$ ).

In the second part of the study we selectively inhibited the phosphodiesterases 3 (cilostazol), 4 (rolipram) and 5 (sildenafil). The flaps of saline-treated controls showed an increasing decline of nutritive perfusion and microcirculation in all parts of the random pattern flap. This perfusion failure resulted in a flap necrosis of  $65 \pm 6\%$ . In cilostazol-treated mice we observed the poorest microcirculation. In the central and distal flap areas there was a complete loss of perfusion in arterioles, venules and capillaries from day 7 on. As a result, tissue necrosis was  $76 \pm 6\%$  of the total flap surface. By treatment with rolipram arteriolar and venular velocity could be improved in the central part of the flap, however, functional capillary density was low. Accordingly tissue necrosis was  $43 \pm 12\%$  on day 10. The application of sildenafil caused an increased blood cell velocity and blood flow in arterioles and venules in the proximal and central part of the flap compared to controls and cilostazol-treated animals. Sildenafil further improved capillary perfusion and, finally, reduced flap necrosis to  $41 \pm 9\%$ . This was significantly lower from day 3 onwards compared to cilostazol-treated animals ( $p < 0,05$ ).

**Conclusion:** The present study shows that pharmacological pretreatment can prevent tissue necrosis in random pattern musculocutaneous flaps in atherosclerotic mice. However, Simvastatin, despite many pleiotropic effects, was not able to reduce necrosis in a significant manner. Of interest, specific inhibition of phosphodiesterase 3 leads to further aggravation of microcirculatory dysfunction and flap necrosis. In contrast, inhibition of phosphodiesterases 4 and 5 could slightly improve flap survival. Thus, the use of these drugs may be promising under clinical conditions. Finally, the unspecific phosphodiesterase-inhibitor theophylline is capable to maintain nutritive perfusion and hence significantly reduces flap necrosis. Therefore, theophylline may represent a non-invasive and cost-effective pretreatment strategy to improve survival of jeopardized flaps in patients with manifest atherosclerosis.

## 2. EINLEITUNG

In unserer zunehmend alternden Gesellschaft steigt die Inzidenz der Atherosklerose immer weiter an. Sie ist in nahezu jeder medizinischen Fachrichtung präsent und von großer klinischer Bedeutung. Auch in der plastischen Chirurgie spielt diese durchblutungsstörende Erkrankung eine große Rolle und ist eine Herausforderung bei der Defektdeckung mit Lappenplastiken, wo eine ausreichende Blutversorgung für das Überleben des Lappens unabdingbar ist.

### 2.1 Atherosklerose

Mittlerweile sind über 300 Risikofaktoren bekannt, welche mit der Atherosklerose und ihren organischen Manifestationen assoziiert sind [Vinereanu 2006]. Neben den unbeeinflussbaren Risikofaktoren Alter, männliches Geschlecht und genetische Prädisposition gibt es auch viele beeinflussbare Faktoren. Zu den klassischen beeinflussbaren Risikofaktoren gehören arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus, Dyslipidämie, Nikotinabusus und das Metabolische Syndrom. Aber auch Adipositas, Bewegungsmangel, Stress, Lipoprotein (a), Hyperurikämie, hormonelle Faktoren und Hyperhomocysteinämie spielen eine wichtige Rolle für die Entstehung der Atherosklerose [Bräsen, Niendorf 1997; Lan, Huang et al. 2013].

Zwei Erkrankungen, welche eine Manifestation der Atherosklerose darstellen, führten die deutsche Todesursachenstatistik im Jahre 2015 an: Chronisch ischämische Herzkrankheit und akuter Myokardinfarkt [Statistisches Bundesamt 2017]. Weitere häufige Organmanifestationen stellen die periphere arterielle Verschlusskrankheit und der Schlaganfall dar. Außerdem ist der plötzliche Herztod in den meisten Fällen mit einer schweren koronaren Atherosklerose assoziiert, welcher dann als erste und letzte Manifestation der Atherosklerose auftritt [Kannel, Thomas 1982; Spain, Bradess et al. 1960].

#### 2.1.1 Atherogenese

##### **Klassifikation der atherosklerotischen Läsionen**

Die Klassifikation der verschiedenen Stadien der Atherosklerose erfolgt nach histomorphologischen Gesichtspunkten nach Stary [Stary 1992; Stary 2000] bzw. der American Heart Association (AHA) [Stary, Chandler et al. 1994; Stary, Chandler et al. 1995] in acht verschiedene Läsionstypen (s. Tab. 1).

| Typ  | Bezeichnung                  | Histologische Merkmale   |
|------|------------------------------|--|
| I    | Initiale Läsion              | Ansammlung von intimalen Lipoproteinen, vermehrt Makrophagen (isolierte Schaumzellen)                |
| II   | „Fatty Streak“               | Typ I + Makrophagenakkumulation (Schaumzellbeete), Anreicherung intrazellulärer Lipide               |
| III  | Präatherom                   | Typ II + isolierte extrazelluläre Lipidpools   |
| IV   | Atherom                      | Typ III + konfluierende extrazelluläre Lipidpools (Atheromkern), strukturelle Intimaschäden          |
| V    | Fibroatherom                 | Typ IV + fibröse Kappe und Nekrosen im Kern  |
| VI   | Thrombohämorrhagische Läsion | (Typ V) + Erosion/ Fissur der fibrösen Kappe und/oder Hämorrhagie und/oder thrombotische Veränderung |
| VII  | Kalzifizierte Läsion         | Dominanz kalzifizierter nekrotischer Areale i.d.R. im Atheromkern                                    |
| VIII | Fibrotische Läsion           | Dominanz von zellarmem kollagenem Bindegewebe  |

**Tab. 1:** Klassifikation atherosklerotischer Läsionen nach Stary bzw. der AHA. Jeder Läsionstyp besitzt charakteristische histomorphologische Merkmale.

### **„Response to injury“-Theorie und endotheliale Dysfunktion**

Das derzeit akzeptierte pathophysiologische Modell der Entstehung der Atherosklerose stellt die „response to injury“-Theorie dar [Ross, Glomset et al. 1977; Ross 1986]. Nach dieser Theorie erfolgt durch toxische endogene oder exogene Mediatoren eine Schädigung der Endothelzellen, woraufhin als Reaktion eine Entzündung des Gefäßes entsteht. Hierbei wird das Gleichgewicht aus protektiven und pathogenen Faktoren innerhalb der Gefäßwand gestört. Auslösende Faktoren der Gefäßwandschädigung sind beispielsweise LDL, die Noxen im Tabakrauch, arterieller Hypertonus, oxidierte Glukosemoleküle, chronische Infektionen, erhöhtes Homozystein oder oxidativer Stress [Osterud, Bjorklid 2003; Ross 1999]. An der komplexen Pathophysiologie sind viele verschiedene Zelltypen beteiligt, unter anderem Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Monozyten, Thrombozyten und T-Lymphozyten [Osterud, Bjorklid 2003]. Primär betrifft die Entzündungsreaktion dabei die Intima, die innerste Wandschicht der Arterien, greift aber im weiteren Verlauf auf die Media, die mittlere Wandschicht, über.

Durch eine gesteigerte Permeabilität des Gefäßendothels und die erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen kommt es zur Extravasation von Lipoproteinen und – chemotaktisch verstärkt – von Entzündungszellen wie Monozyten und T-Zellen (s. Abb. 1 A) [Ross 1999]. In der intimalen Gefäßwand lagert sich das im Blut zirkulierende LDL-Cholesterin ab, das durch

oxidative Prozesse zu dem aggressiven oxidierten LDL (oxLDL) umgewandelt wird. Normalerweise wird dieses von den körpereigenen Antioxidantien neutralisiert, abtransportiert und kann keinen Schaden induzieren. Wenn die Konzentration von oxLDL allerdings zu hoch ist, ist die endogene antioxidative Kapazität nicht ausreichend zur kompletten Neutralisierung und das in der Gefäßwand verbleibende oxLDL entfaltet seine toxische Wirkung. Durch die LDL-Akkumulation werden Makrophagen angezogen, welche das oxLDL über Scavenger-Rezeptoren (SR-A und CD36) phagozytieren [Lusis 2000]. Da negative Feedback-Mechanismen fehlen, kommt es zur massiven oxLDL-Phagozytose und Anreicherung von Cholesterinestern in den Zellen. Die transformierten Makrophagen imponieren dann als Schaumzellen (foam cells) [Osterud, Bjorklid 2003; Silverstein, Li et al. 2010]. Die modifizierten Lipoproteine aktivieren die Endothelzellen, welche dann vermehrt Zelladhäsionsmoleküle exprimieren, wodurch es zur Leukozytenadhäsion kommt. Es existiert auch eine Hypothese, bei der in der oxidativen Modifizierung von LDL die eigentliche Ursache für die Initiierung des atherosklerotischen Geschehens gesehen wird. Bei dieser „Lipoprotein-induced-atherosclerosis-Hypothese“ spielt eine initiale metabolische, mechanische, entzündliche oder sonstige Schädigung der Endothelzellen keine Rolle [Witztum 1994].

Die oben genannten Noxen bewirken eine endotheliale Dysfunktion mit verminderter Freisetzung von vasodilatativ wirkendem Stickstoffmonoxid (NO). Das normalerweise in den Endothelzellen gebildete NO hemmt die Thrombozytenadhäsion, Angiogenese und die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen [Cornwell, Arnold et al. 1994; de Graaf, Banga et al. 1992; Gauthier, Scalia et al. 1995]. Außerdem reduziert Stickstoffmonoxid zytokinvermittelt die Expression von Adhäsionsmolekülen und inhibiert somit die Leukozyteninteraktion mit dem Gefäßendothel [Laufs 2003]. All dies sind antiatherogene Eigenschaften, die bei einer Verminderung von NO nicht mehr greifen können. Zu dieser Verminderung tragen verschiedene Mechanismen bei. Während der Entzündung entstandene reaktive Sauerstoffspezies (ROS) inaktivieren NO [Forgione, Leopold et al. 2000]. Die erhöhte Produktion der ROS führt ebenfalls zur verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen, zur Stimulation der Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen, zur Apoptoseinduktion in den Endothelzellen und zur Begünstigung vaskulärer Umbauprozesse durch die Synthese von Matrix-Metalloproteasen [Cai, Harrison 2000; Ross 1999]. Weiterhin wird durch reaktive Sauerstoffmetaboliten die Oxidation von LDL erleichtert und die oxLDL-Bindung am oxLDL-Rezeptor (LOX-1) führt zur Inaktivierung von NO [Cominacini, Rigoni et al. 2001]. Außerdem wird die endotheliale NO-Synthase aufgrund der Endothelschädigung vermindert gebildet und ist weniger aktiv, weshalb auch die Synthese von Stickstoffmonoxid reduziert ist [Cai, Harrison 2000].

---

Das C-reaktive Protein (CRP) ist ebenfalls in der Lage die NO-Bildung und -Aktivität zu inhibieren [Verma, Wang et al. 2002].

Es sind zahlreiche Mediatoren an der Atherogenese beteiligt. Beispielsweise erhöht das Zytokin TNF $\alpha$  (Tumornekrosefaktor-alpha) die Expression von proinflammatorischen, proapoptotischen, proliferativen und prokoagulatorischen Genen und führt zu einer Verminderung von NO [Kleinbongard, Heusch et al. 2010]. CRP führt über die erhöhte Synthese von Adhäsionsmolekülen und Zytokinen zu einer erhöhten Leukozyten-Endothelzell-Interaktion [Bisoendial, Kastelein et al. 2007]. Auch NF $\kappa$ B (nuclear factor kappa B) stimuliert die Bildung solcher Oberflächenrezeptoren [Brand, Page et al. 1996] und erhöht zusätzlich die Synthese von extrazellulären Molekülen wie Fibronectin [Chen, Khan et al. 2003]. Eine große Rolle spielen auch CD40 und der CD40-Ligand, die von Endothelzellen, Gefäßmuskelzellen und Makrophagen oxLDL-gesteuert synthetisiert werden. Sie wirken ebenfalls proatherogen und fördern die Plaque-Instabilität [Schönbeck, Libby 2001; Schönbeck, Gerdes et al. 2002].

Die durch Mediatoren angelockten Monozyten initiieren und unterhalten den Entzündungsprozess durch die Wechselwirkung mit anderen Zellen. Nach ihrer Umwandlung zu Makrophagen und Transformation zu Schaumzellen sind sie makroskopisch als „fatty streaks“ in der Arterienwand sichtbar (s. Abb. 1 B). Diese – noch reversiblen und asymptomatischen – „Schaumzellbeete“ mit intrazellulären Lipideinlagerungen entstehen meist schon ab einem Lebensalter von 20 Jahren [Joseph, Ackerman et al. 1993; Virmani, Robinowitz et al. 1987]. Zudem bestehen die „fatty streaks“ aus aktivierten T-Zellen, dendritischen Zellen, Mastzellen und glatten Muskelzellen. Schaumzellen produzieren zahlreiche Wachstumsfaktoren wie PDGF (platelet derived growth factor) und Entzündungsmediatoren wie Interleukine. Gleichzeitig werden die Lipoproteinpartikel auf der Makrophagenoberfläche als Antigen präsentiert und dadurch T-Zellen aktiviert, welche zur Proliferation und Chemokinproduktion angeregt werden [Ross 1999]. Durch diese Mechanismen wandern weitere Entzündungszellen und auch glatte Gefäßmuskelzellen in die initiale Läsion ein. Bei Persistenz der Risikofaktoren werden Entzündung und endotheliale Dysfunktion aufrechterhalten und es können komplexere Läsionen entstehen.

Die in die Intima eingewanderten glatten Muskelzellen und Myofibroblasten sind die Hauptproduzenten der extrazellulären Matrix und tragen entscheidend zum Wachstum der Läsion bei. Über einem nekrotischen Atheromkern aus apoptotischen Schaumzellen, Makrophagen und Myofibroblasten entsteht eine fibröse Kappe aus extrazellulärer Matrix und glatten Muskelzellen und die Plaque nimmt an Größe zu (s. Abb. 1 C). Der innere

Gefäßdurchmesser ist initial durch die zunehmende Stenosierung allerdings nicht verringert. Durch den sogenannten Glagov-Effekt kommt es bis zu einer Plaquegröße von 40% des Durchmessers zu einer Kompensation der Lumeneinengung durch Vasodilatation und damit zu keiner funktionellen Einschränkung [Glagov, Weisenberg et al. 1987]. Zunächst wird die Läsion durch ein Remodelling, also eine Neugliederung der Plaque, stabilisiert. Umso höher der Kollagenfasergehalt, umso dicker und stabiler ist die fibröse Kappe. Die Plaquekappe kann jedoch relativ zur Größe des Lipidkerns und der Masse an Entzündungszellen immer mehr ausdünnen. Man spricht dann von einer fortgeschrittenen, komplizierten Läsion oder auch von einer vulnerablen Plaque [Lusis 2000].

### **Vulnerable Plaque**

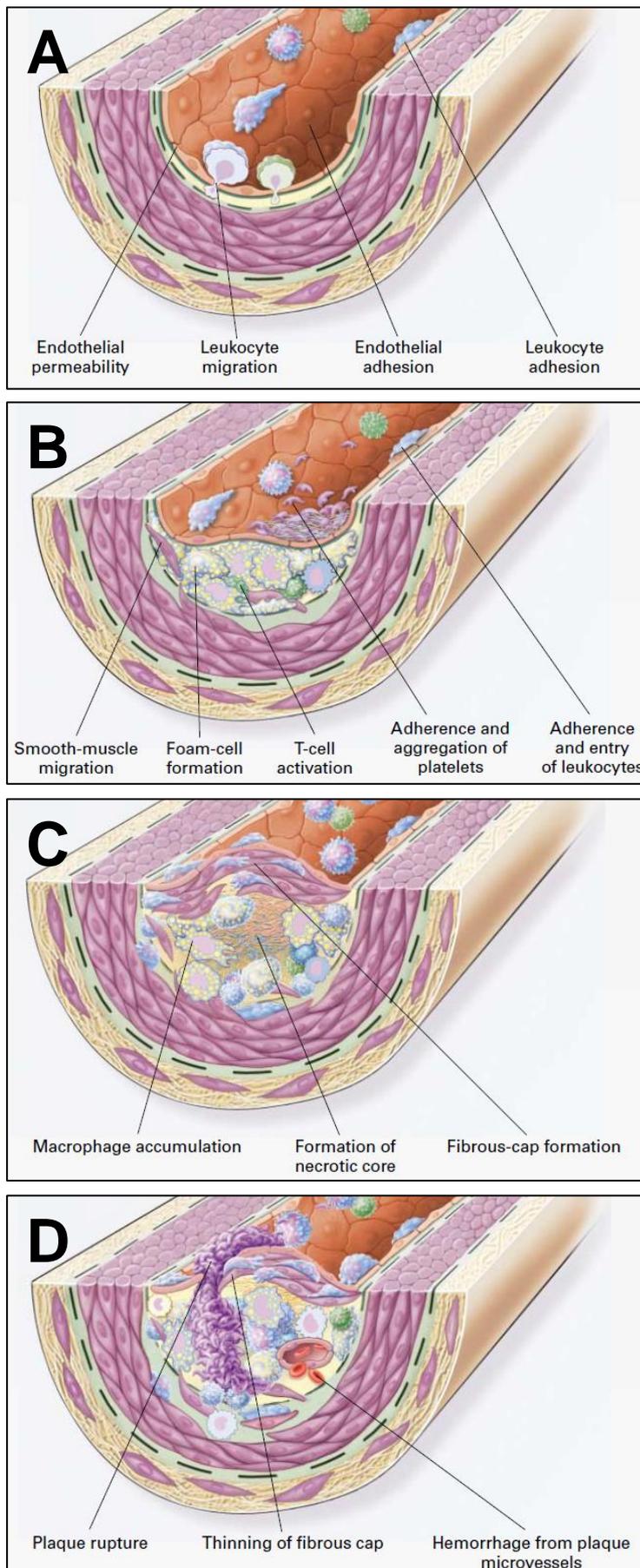
Naghavi und Kollegen definierten im Jahre 2003 die vulnerable Plaque wie folgt: „Alle Arten artherosklerotischer Plaques mit hoher Wahrscheinlichkeit thrombotischer Komplikationen und schnellem Wachstum werden als vulnerabel beschrieben“ [Naghavi, Libby et al. 2003]. Das Wachstum des Lipidkerns geht mit einer erhöhten Instabilität einher. In rupturierten Läsionen ist der Anteil an Lipiden und Makrophagen erhöht und gleichzeitig die Dicke der fibrösen Kappe vermindert [Felton, Crook et al. 1997].

Die entscheidende Rolle in der Pathophysiologie der vulnerablen Plaque haben die mononukleären Entzündungszellen. Diese bilden proteolytische Enzyme wie die Matrix-Metalloproteasen (MMP), welche extrazelluläre Matrixproteine abbauen [Galis, Sukhova et al. 1994]. Durch die Verringerung dieser festigenden Strukturen wird die Plaque vulnerabel und Faktoren wie hämodynamischer Stress begünstigen eine Ruptur. Durch Risse im Schulter- und damit im Wachstumsbereich der Plaque bekommen Matrixbestandteile wie Kollagen und thrombogenes Material aus der Läsion, v.a. der „tissue factor“ im Fettkern, Kontakt zum Blutstrom, weshalb sich Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren an die Läsion anlagern und die Gerinnungskaskade aktivieren. Es entsteht ein Thrombus, der schließlich zum Gefäßverschluss führt und damit beispielsweise zum Myokardinfarkt. Übereinstimmend haben klinische Studien gezeigt, dass bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom die Konzentrationen von MMP-2 und MMP-9 im peripheren Blut erhöht sind [Kai, Ikeda et al. 1998].

Auch die Neovaskularisation der atherosklerotischen Läsionen durch vasa vasorum fördert deren Progression [Ho-Tin-Noé, Michel 2011]. In vulnerablen und rupturierten Plaques finden sich vermehrt Mikrogefäße [Fleiner, Kummer et al. 2004; Moreno, Purushothaman et al. 2004]. Nach Ruptur dieser Gefäße kommt es zu Hämorrhagien innerhalb der Plaque und zu

einer Vergrößerung des nekrotischen Kerns mit Destabilisierung der Läsion (s. Abb. 1 D) [Kolodgie, Gold et al. 2003].

Eine Regression oder Änderung der Lipidzusammensetzung kann zum kalzifizierenden oder fibrotischen Umbau der Plaques führen. Kalzifizierende Läsionen haben eine mineralisierte Matrix im Atheromkern; sie führt zur Stenosierung des Gefäßes, aber die Gefahr der Plaqueruptur mit anschließender Thrombosierung ist weniger stark ausgeprägt. Die fibrotische Läsion zeigt am ehesten einen narbigen Ausheilungszustand nach einer Plaqueruptur. Es findet sich hauptsächlich zellarmes kollagenes Bindegewebe innerhalb der Läsion [Bräsen, Niendorf 1997; Stary 2000].



**Abb. 1:** Übersicht über die verschiedenen Phasen der Bildung einer atherosklerotischen Plaque [Abbildungen aus Ross 1999]:

**(A)** Endotheliale Dysfunktion: Eine erhöhte Endothelzell-Permeabilität und eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen führt zur Extravasation von Lipoproteinen und Entzündungszellen und zur Initiierung einer atherosklerotischen Läsion.

**(B)** "Fatty Streak": Die mit oxLDL beladenen Makrophagen imponieren als Schaumzellen. Außerdem kommt es zur T-Zell-Aktivierung, Thrombozytenadhäsion und -aggregation, Adhäsion und Einwanderung von Leukozyten und später zur Migration von SMC in die Läsion.

**(C)** Fortgeschrittene, komplizierte Läsion: Eine fibröse Kappe bedeckt den nekrotischen Kern aus Leukozyten, Lipiden und zugrunde gegangenen Schaumzellen. Die Plaque nimmt an Größe zu und stenosierte das Gefäßlumen.

**(D)** Unstabiler fibröser Plaque: Proteolytische Enzyme wie Matrix-Metalloproteasen bauen die Extrazellulärmatrix ab, die fibröse Kappe wird dünner. Durch Erosionen oder Risse im Schulterbereich kann eine Plaqueruptur mit anschließender Thrombosierung durch Aktivierung der Gerinnungskaskade entstehen. Durch Rupturen der vasa vasorum sind Hämorrhagien möglich.

## 2.1.2 Die ApoE-defiziente Maus als *in vivo*-Atherosklerose-Modell

1992 wurde erstmals ein *in vivo*-Atherosklerose-Modell an der Maus entwickelt [Plump, Smith et al. 1992; Zhang, Reddick et al. 1992]. Als *Background*-Stamm wurden hierzu C57/Black6-Mäuse verwendet, an denen ein „Knockout“ des Apolipoprotein E (ApoE<sup>-/-</sup>) vorgenommen wurde [Piedrahita, Zhang et al. 1992]. Durch ihre schnelle Fortpflanzung und eine reduzierte genetische Variabilität sind Mäuse sehr gut als *in vivo*-Modelle geeignet [Becker, Gottshall et al. 1996].

ApoE ist Bestandteil der Lipoproteinpartikel VLDL („very low density lipoprotein“), IDL („intermediate density lipoprotein“) und einiger HDL-Unterformen („high density lipoprotein“) sowie von Chylomikronen und spielt beim Transport und der Verteilung der Lipide eine wichtige Rolle [Mahley 1988]. Als Ligand des LDL-Rezeptors und des LRP („LDL receptor-related protein“) ermöglicht ApoE die Endozytose von Chylomikronen-Remnants und LDL in die Leber [Beisiegel, Weber et al. 1989; Ishibashi, Herz et al. 1994].

ApoE-defiziente Mäuse zeigen bereits unter normaler Fütterung gegenüber Kontrolltieren ohne ApoE-Knockout deutlich erhöhte Cholesterin-, Triglycerid-, VLDL- und LDL-Spiegel im Blut und entwickeln infolgedessen spontan atherosklerotische Läsionen [Plump, Smith et al. 1992]. Um die Hypercholesterinämie zusätzlich zu verstärken und damit die Bildung und Progression der Atherosklerose zu beschleunigen, kann die Ernährung der Tiere mit einer cholesterin- und fettreichen „Western-type-diet“ erfolgen [Plump, Smith et al. 1992].

Hierbei können alle Phasen der Atheroskleroseentwicklung nachgewiesen werden [Nakashima, Plump et al. 1994]. Unter der „Western-type-diet“ sind bereits nach drei bis vier Wochen Intima-Läsionen und Fetteinlagerungen mit Schaumzellbildung in den großen Gefäßen und nach sechs bis zehn Wochen definierte fibröse Kappen sichtbar [Johnson, Carson et al. 2005]. Auch Komplikationen wie Kalzifikationen, Thrombosen und spontane Plaquerupturen sind in diesem Modell nachweisbar [Nakashima, Plump et al. 1994; Williams, Johnson et al. 2002].

## 2.2 Plastische Chirurgie

### 2.2.1 Geschichte der Plastischen Chirurgie und der Lappenchirurgie

Die Anfänge der Plastischen Chirurgie reichen bis weit in die vorchristliche Zeit zurück. Schon im Jahre 1200 vor Christus sind in Indien zahlreiche Nasenrekonstruktionen durch einen Schwenklappen aus der Stirn belegt und auch an den Mumien des alten Ägypten wurden korrigierende, chirurgische Eingriffe nachgewiesen.

Um 1450 führte der sizilianische Wundarzt Branca die „indische Methode“ zur Nasenrekonstruktion mit einem Stirnlappen durch, die durch seinen Sohn Antonio

weiterentwickelt wurde („italienische Methode“). Dieser verwendete hierzu einen gestielten Oberarmklappen (Distanzklappen), aus dem er eine neue Nase formte. Gasparo Tagliacozzi veröffentlichte im Jahre 1597 sein Buch „De curtorum chirurgia per insitionem“ und beschrieb darin als Erster ausführlich die bis dahin geheim gehaltenen Operationstechniken inklusive zahlreicher Abbildungen [Dragu, Jeffries et al. 2008; Keil1978].

Aufgrund der fehlenden Kenntnisse der mikrozirkulatorischen Gefäßversorgung von Haut und Muskulatur waren die Rekonstruktionen lange Zeit auf Hauttransplantate und Lappenplastiken mit zufälligem Gefäßmuster („random pattern flaps“) beschränkt. Erst gegen Ende des 19. Jahrhunderts wurden nach einer Veröffentlichung von Carl Manchot über „Die Hautarterien des menschlichen Körpers“ (1889) neue Lappentechniken beschrieben und mit der Entwicklung mikrochirurgischer Techniken konnten in der Mitte des 20. Jahrhunderts erstmals auch freie Lappen transponiert werden.

Der von Pierre-Joseph Desault geprägte Begriff „plastique“ wurde 1838 von Eduard Zeis in seinem „Handbuch der plastischen Chirurgie“ erstmals in Deutschland publik gemacht [Zeis 1838]. Am 1. Oktober 1993 wurde die Plastische Chirurgie schließlich von der Deutschen Ärztekammer als eigenständige Disziplin anerkannt.

## **2.2.2 Ziele und Spektrum der Plastischen Chirurgie**

Ursula Schmidt-Tintemann formulierte 1970 die Aufgabenstellung der Plastischen Chirurgie mit folgendem Satz: „Die plastische Chirurgie hat als Ziel die Wiederherstellung von gestörter äußerer Form und Funktion, um damit eine Verbesserung der subjektiven Situation der Patienten zu erreichen.“ [Schmidt-Tintemann 1970]. Somit ist das Ziel sowohl die Funktion, aber auch die Ästhetik des betroffenen Bereiches wiederherzustellen bzw. zu bewahren. Dies spielt in der heutigen Zeit eine große Rolle, denn durch die moderne Medizin werden Fehlbildungen, Verletzungen und Erkrankungen behandelt, die zum Teil zu Funktionseinschränkungen im betroffenen Gebiet, hypertrophen Narben, offenen Wunden oder Fehlbildungen führen. Dies stellt für die Betroffenen sowohl eine physische, als auch psychische Belastung dar. Die moderne Plastische Chirurgie versucht diese Beeinträchtigungen zu beheben oder zumindest zu vermindern.

Als Strukturmodell der Deutschen Gesellschaft der plastischen, rekonstruktiven und ästhetischen Chirurgie (DGPRÄC) hat sich das Vier-Säulen-Modell – bestehend aus Rekonstruktiver Chirurgie, Handchirurgie, Ästhetischer Chirurgie und Verbrennungschirurgie – bewährt. Die Grundlage dieses Modells bildet die Forschung, welche die Voraussetzung für die Zukunft und wissenschaftliche Weiterentwicklung dieses Fachgebietes darstellt.

## 2.3 Lappenplastiken

### 2.3.1 Definition und Einteilung der Lappenplastiken

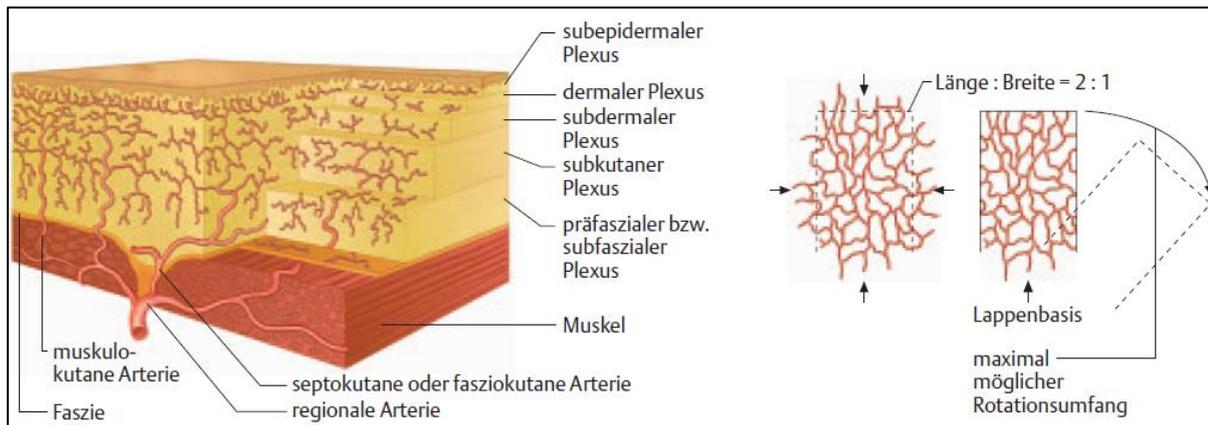
Ein Lappen ist ein Gewebestück – bestehend aus Haut, Subkutangewebe und eventuell auch weiterem Gewebe wie Muskulatur oder Knochen – der, im Gegensatz zu einem Hauttransplantat, eine eigene Gefäßversorgung besitzt. Nach der rekonstruktiven Stufenleiter werden Lappenplastiken eingesetzt, falls weder ein primärer Wundverschluss, noch ein Hauttransplantat erfolgsversprechend sind [Dragu, Jeffries et al. 2008].

Die Einteilung der Lappenplastiken erfolgt nach verschiedenen Gesichtspunkten [Vogt 2011]:

- a) Nach der Entfernung zum Defekt in lokale, regionale, Fern- und freie Lappen.
- b) Nach der Gewebeszusammensetzung des Lappens in kutane, fasziokutane, myokutane, osteokutane oder osteomyokutane Lappen.
- c) Nach der Methode der Gewebeübertragung, beispielsweise durch Verschiebung, Dehnung, Transposition, Rotation oder auch Fernlappenplastiken.
- d) Nach der zugrundeliegenden Blutversorgung in axial durchblutete Lappen („axial pattern flaps“) und Lappen mit zufallsverteilter Durchblutung („random pattern flaps“).

Beim „axial pattern flap“ erfolgt die Perfusion über eine definierte Gefäßachse. Hierdurch muss kein bestimmtes Längen-Breiten-Verhältnis eingehalten werden, allerdings muss die territoriale Gefäßversorgung beachtet werden. Durch die Möglichkeit der mikrochirurgischen Anastomosierung mit Gefäßen im Empfängerareal können diese Lappen auch frei transplantiert werden.

Der „random pattern flap“ besitzt keinen definierten Gefäßstiel, somit erfolgt die Perfusion willkürlich und ausschließlich von der Lappenbasis aus. Deshalb muss in der Regel ein Längen-Breiten-Verhältnis von 2:1 – an der sehr gut durchbluteten Gesichtshaut von 3:1 – eingehalten werden, um eine Nekrose des Lappens zu verhindern. Die Durchblutung erfolgt über den dermalen und subdermalen Gefäßplexus, dessen Kapillaren wiederum über Perforatoren aus dem fasziokutanen oder muskulokutanen Bereich versorgt werden (s. Abb. 2) [Hirner, Weise 2004].



**Abb. 2:** Schematische Darstellung des Durchblutungsmusters der verschiedenen Gewebeschichten (linkes Bild) sowie eines randomisierten Haut-Subkutis-Lappens (rechtes Bild): Die Perfusion des randomisiert durchbluteten Lappens erfolgt über den dermalen und subdermalen Gefäßplexus ausschließlich von der Basis her, weshalb im Allgemeinen ein Längen-Breiten-Verhältnis von 2:1 eingehalten werden muss [Abbildung aus Hirner, Weise 2004].

### 2.3.2 Ischämie und Reperfusion

Ischämie ist die pathologische Minderdurchblutung eines Gewebes infolge fehlender oder unzureichender arterieller Zufuhr von Blut. Das komplette Fehlen der arteriellen Blutzufuhr wird dabei als absolute Ischämie bezeichnet, während ein unzureichender Blutfluss im Vergleich zum Bedarf des jeweiligen Gewebes als relative Ischämie bezeichnet wird.

Bei der Präparation eines „random pattern flap“ besteht zwangsläufig die Gefahr einer relativen und chronisch persistierenden Ischämie. Bei der Hebung dieses willkürlich durchbluteten Lappens werden die von lateral zuführenden Gefäße durchtrennt und die Perfusion ist nur noch über die Lappenbasis gewährleistet. Hierdurch kann vor allem im distalen Anteil des Lappens eine Minderdurchblutung entstehen, die bei Überschreitung der Ischämietoleranz zu hypoxischen Gewebeschäden führt. Diese Minderversorgung mit Sauerstoff spielt neben der Entzündung, der Bildung von ROS, der endothelialen Dysfunktion mit erhöhtem lokalen Gefäßwiderstand und der Thrombenbildung [Wennmalm 1994] eine entscheidende Rolle bei der Nekroseentstehung und kann letztendlich zum partiellen oder totalen Lappenverlust führen [Harder, Amon et al. 2005].

Durch eine anhaltende Hypoxie verändert sich der Zellstoffwechsel im betroffenen Gewebe. Die Energiebereitstellung wird vom effizienten aeroben Zellstoffwechsel auf die deutlich ineffizientere anaerobe Glykolyse umgestellt, wodurch sich vermehrt saure Metabolite ansammeln und weniger energiereiche Substrate zur Verfügung stehen – eine intrazelluläre Azidose entsteht. Die Bereitstellung von energiereichen Substraten, allen voran Adenosintriphosphat (ATP), ist also stark vermindert und die Natrium-Kalium-ATPase versagt, was in der Folge zur Erhöhung der intrazellulären Natrium- und Calcium-

Konzentration führt [Wang, Baynosa et al. 2011]. Das Membranpotential kann nicht mehr aufrechterhalten werden und die gestörte Membrankapillarität führt zum Einstrom von Natrium- und Chloridionen in die Zelle, denen passiv freies Wasser folgt. Es entwickelt sich ein intrazelluläres Ödem und eine Schwellung der Endothelzellen [Leaf 1973; Clemens, McDonagh et al. 1985; Menger, Steiner et al. 1992].

Außerdem wird durch die Ausschüttung von proapoptotischen Mediatoren die Apoptose der betroffenen Zellen aktiviert und die Depolarisation des Membranpotentials führt zusätzlich zur Depletion von ATP, wodurch über einen noch nicht vollständig geklärten Mechanismus die Zellnekrose induziert wird [Wang, Baynosa et al. 2011].

Durch Reperfusion, d.h. der Wiederherstellung der Durchblutung mit in der Folge Normalisierung der Stoffwechsellage, kann dieser Vorgang potentiell rückgängig gemacht und die Zelle in ihren ursprünglichen Zustand zurückversetzt werden.

Allerdings kann es trotz vorhandener Reperfusion auch zu einer Verstärkung der Schädigung des betroffenen Gewebes kommen („reflow paradox“). Dies ist unter anderem bedingt durch die Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten, welche die Zellmembranen schädigen und neutrophile Granulozyten aktivieren. Zusätzlich werden chemotaktisch wirkende Zytokine und potente Mediatoren wie Leukotriene und PAF (platelet-activating factor) freigesetzt. Dies führt zum Verlust der endothelialen Integrität, zu einer erhöhten Membranpermeabilität, zur Ödembildung und zur Zellschädigung [Menger, Pelikan et al. 1992; Menger, Vollmar 1994].

In manchen Fällen ist eine Reperfusion nicht mehr möglich, weil das Gewebe und die Mikrozirkulation bereits zu stark beeinträchtigt wurden. Dies wird als primäres Perfusionsversagen oder „no reflow“ bezeichnet. Hier spielen diverse Mechanismen eine Rolle, vor allem eine Endothelzellschwellung und Hämokonzentration mit konsekutiver Erhöhung des Gefäßwiderstandes [Menger, Steiner et al. 1992].

## **2.4 Präkonditionierung**

Partielle und totale Lappennekrosen stellen ein großes Problem bei der Defektdeckung mit Lappenplastiken dar und führen häufig zu zahlreichen Folgeoperationen für den Patienten.

Es gibt viele Ansätze zur Reduktion der Nekrosebildung, die im Laufe der Jahrzehnte entwickelt wurden. Eine Möglichkeit der Präkonditionierung stellt das bereits 1974 beschriebene Prinzip des „surgical delay“ dar. Hierbei wird der Lappen in mehreren Schritten gehoben und somit das Auftreten einer Nekrose, vor allem im distalen Anteil verringert [Reinisch 1974; Dragu, Jeffries et al. 2008].

Murry entwickelte 1986 eine weitere Methode. Er fand heraus, dass das repetitive Verschließen von afferenten Gefäßen am Myokard mit den daraus folgenden kurzzeitigen Ischämien zu einer erhöhten Ischämietoleranz des Gewebes führt [Murry, Jennings et al. 1986]. In den folgenden Jahren konnte dieser Effekt auch an vielen anderen Organen, wie zum Beispiel an Gehirn [Glazier, O'Rourke et al. 1994], Muskel [Pang, Yang et al. 1995], Darm [Hotter, Closa et al. 1996] und Leber [Peralta, Closa et al. 1996] nachgewiesen werden. Küntscher zeigte, dass dieser Effekt ebenfalls auftritt, wenn nicht das betroffene Gewebe selbst, sondern ein weiter entferntes Gewebe dieser kurzen Ischämie ausgesetzt wird [Küntscher, Kastell et al. 2002; Küntscher, Schirmbeck et al. 2002].

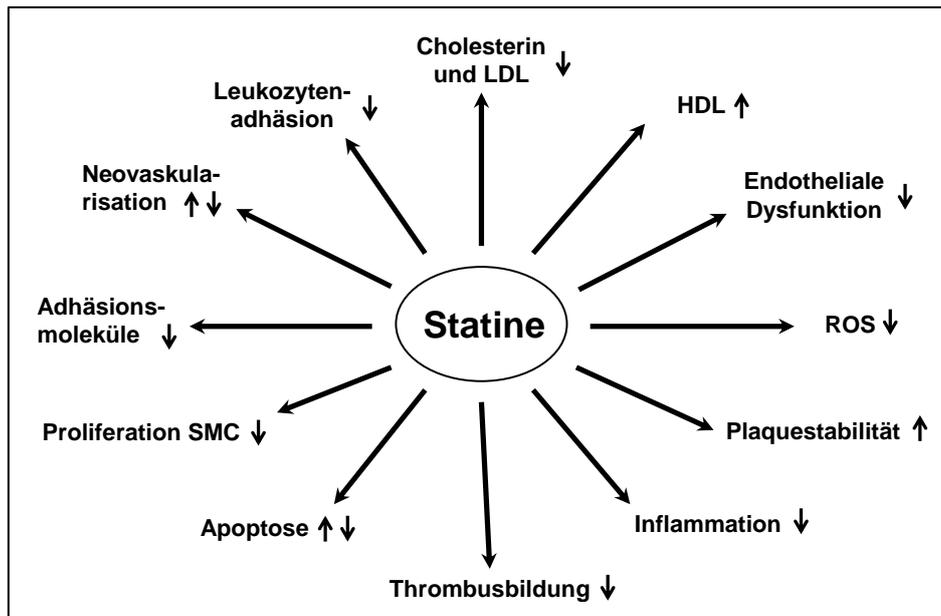
Auch eine präoperative Hypo- oder Hyperthermie, im Sinne eines supraphysiologischen Stresses, kann einem ischämischen Gewebeschaden entgegenwirken [Donski, Franklin et al. 1980; Koenig, Lohner et al. 1992].

Ein weiterer Schwerpunkt der Forschung liegt auf der pharmakologischen Präkonditionierung, welche über die Vorteile einer einfachen und wenig invasiven Applikation verfügt. Hier wurden bereits zahlreiche Substanzen untersucht, unter anderem Wachstumsfaktoren, anti-inflammatorische und anti-oxidative Substanzen, Immunsuppressiva und Vasodilatoren [Harder, Amon et al. 2008]. In der folgenden Arbeit liegt das Augenmerk auf der Präkonditionierung mit Statinen und verschiedenen Phosphodiesterase-Inhibitoren.

#### **2.4.1 Statine – Lipidsenkung und pleiotrope Effekte**

Statine, die kompetitiven Inhibitoren der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase), wurden in den 70er Jahren entdeckt und revolutionierten durch ihre lipidsenkenden Eigenschaften die Therapie der Hypercholesterinämie als wichtigen Risikofaktor der Atherosklerose [Jain, Ridker 2005]. Die HMG-CoA-Reduktase katalysiert einen wichtigen Schritt in der Cholesterinbiosynthese, durch dessen Hemmung in den Hepatozyten vermindert Cholesterin produziert wird. Statine bewirken eine Reduktion des Plasma-Cholesterinspiegels um etwa 30-50% und führen zu einer vermehrten Expression von LDL-Rezeptoren in der Leber mit Abnahme des LDL- und Zunahme des HDL-Cholesterins im Serum [Liao, Laufs 2005; Maron, Fazio et al. 2000]. Bei Patienten mit erhöhtem Serumcholesterol kann durch die Gabe von Statinen die kardiovaskuläre Mortalität gesenkt werden, wie in verschiedenen Studien gezeigt wurde [Maron, Fazio et al. 2000], beispielsweise in der 4S-Studie [Pedersen, Kjekshus et al. 2004]. Aber auch bei Patienten mit normalem Cholesterinspiegel im Serum konnte die Mortalität durch kardiovaskuläre Ereignisse durch Statingabe gesenkt werden [Heart Protection Study Collaborative Group 2002].

Zusätzlich zu den lipidsenkenden Eigenschaften sind zahlreiche pleiotrope Effekte der HMG-CoA-Reduktasehemmer beschrieben, die ebenfalls vasoprotektiv wirken (s. Abb. 3).



**Abb. 3:** Übersicht über die lipidsenkenden und pleiotropen Effekte der Statintherapie. Teilweise bewirken Statine dosisabhängig unterschiedliche Effekte (↑↓).

Hierzu gehört die Verbesserung der endothelialen Dysfunktion, die einen frühen Marker der Atherosklerose darstellt und auch bei der Entstehung und Unterhaltung der Ischämie mit möglicher nachfolgender Lappennekrose eine große Rolle spielt. Diese Verbesserung wird unter anderem bedingt durch eine Expressions- und Aktivitätssteigerung der endothelialen NO-Synthase und damit einer erhöhten Bioverfügbarkeit von vasodilatierendem Stickstoffmonoxid [Laufs, La Fata et al. 1998; Liao, Laufs 2005]. NO kann die Gefäßwände leicht überwinden und in die angrenzenden Gefäßmuskelzellen diffundieren. Durch die erhöhte Produktion von Stickstoffmonoxid wird unter anderem eine Vasodilatation sowie eine Reduktion der Thrombozytenaggregation vermittelt [Laufs 2003; Liao, Laufs 2005].

Statine vermindern die Produktion von reaktiven Sauerstoffmetaboliten, sie besitzen also anti-oxidative Eigenschaften [Liao, Laufs 2005]. ROS spielen ebenfalls in der Pathogenese der Atherosklerose eine Rolle und stellen einen wesentlichen Faktor des „reflow-paradox“ bei der Reperfusion von ischämischen Lappenplastiken dar.

Einige HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, darunter auch Simvastatin, tragen durch den Umbau der Extrazellulärmatrix atherosklerotischer Läsionen und durch eine Reduktion der Aktivität von Matrix-Metalloproteasen auch zur Plaquestabilisierung bei [Koh 2000; Liao, Laufs 2005]. Weiterhin konnte eine direkt anti-inflammatorische Wirkung der Statine nachgewiesen werden, was sich auch durch eine Reduktion der Plasmakonzentration von C-reaktivem Protein in vivo und in vitro zeigte [Kleemann, Verschuren et al. 2004].

Außerdem sind als pleiotrope Effekte ein Einfluss auf die Thrombozytenfunktion, anti- und pro-apoptotische Wirkungen, die Inhibition der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen

(smooth muscle cells, SMC), eine Reduktion der Synthese von Adhäsionsmolekülen, eine Verminderung der Leukozytenadhäsion und Effekte auf die Neovaskularisation beschrieben (s. Abb. 3) [Bonetti, Lerman et al. 2002; Liao, Laufs 2005].

#### **2.4.2 Die „second messenger“ cAMP und cGMP**

Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) wurde im Jahre 1957 von Earl Wilburg Sutherland als einer der ersten zellulären Botenstoffe entdeckt [Butcher, Sutherland 1962; Rall, Sutherland 1958]. Nach der Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors, beispielsweise durch Hormone oder Neurotransmitter, wird die membranständige Adenylatzyklase aktiviert [Hanoune, Pouille et al. 1997]. Diese wandelt zelluläres Adenosintriphosphat zu dem sekundären Botenstoff cAMP um. Zyklisches Adenosinmonophosphat reguliert verschiedene Effektorproteine und aktiviert die Proteinkinase Typ A (PKA) [Tao, Salas et al. 1970; Walsh, Perkins et al. 1968] sowie die Guaninnukleotidaustauschfaktoren Epac 1 und Epac 2 [Bos 2003]. Die Proteinkinase A phosphoryliert verschiedene zelluläre Proteine und vermittelt somit eine Vielzahl zellulärer Effekte. Ein erhöhter cAMP-Spiegel bewirkt beispielweise durch Phosphorylierung der Myosin-Leichtketten-Kinase eine Relaxation der glatten Muskulatur, Verbesserung der Endothelzell-Barriere und Erhöhung der Synthese und Ausschüttung von vasoaktiven Substanzen [Maurice 2011; Rigor, Shen et al. 2012].

Die Deaktivierung von cAMP erfolgt über die Hydrolyse durch zyklische Nukleotid-Phosphodiesterasen (PDE) zu AMP. Die Konzentration von cAMP in der Zelle wird somit durch das Gleichgewicht zwischen Aktivität von Adenylatzyklase und Phosphodiesterasen bestimmt [McKnight 1991; Beavo, Conti et al. 1994]. Bei Hemmung der PDE steht somit vermehrt cAMP zur Verfügung und die oben beschriebenen Effekte können verstärkt ablaufen.

Zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) ist ebenfalls ein „second messenger“ und entfaltet die meisten seiner zellulären Wirkungen über die cGMP-abhängige Proteinkinase G (PKG). cGMP entsteht aus GTP mit Hilfe der Guanylatzyklase [Hardman, Sutherland 1969]. Diese kommt einerseits membranständig vor und wird durch die Hormone atriales natriuretisches Peptid (ANP) und brain natriuretisches Peptid (BNP) stimuliert [Waldman Rapoport et al. 1984; Winkquist, Faison et al. 1984]. Andererseits existiert auch eine lösliche Guanylatzyklase, welche durch Stickstoffmonoxid aktiviert wird [Bugha, Gold et al. 1989; Ignarro, Bugha et al. 1987; Waldman, Murad 1988].

Zu den Wirkungen von cGMP gehört unter anderem die Relaxation der glatten Muskulatur durch ein vermindertes Angebot an  $\text{Ca}^{2+}$  und die Herabsetzung der Sensitivität des

kontraktilen Apparates gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$  [Carvajal, Germain et al. 2000; Lucas, Pitari et al. 2000]. Außerdem spielt zyklisches Guanosinmonophosphat eine wichtige Rolle bei der Regulation des Insulinspiegels, der Phototransduktion und der Inhibition der Thrombozytenaktivierung [Lucas, Pitari et al. 2000] und ist ein potenter NO-Donator.

Analog zum Abbau von cAMP, wird cGMP ebenfalls durch Phosphodiesterasen zu GMP hydrolysiert [Beavo, Conti et al. 1994]. Eine Inhibition der PDE bewirkt also eine cGMP-Erhöhung und damit die oben genannten Effekte.

### 2.4.3 Phosphodiesterasen und ihre Inhibitoren

Phosphodiesterasen hydrolysieren die beiden „second messenger“ cAMP und cGMP, welche – wie oben beschrieben – eine sehr wichtige Rolle bei vielen intrazellulären Signalwegen spielen. Sie werden in elf verschiedene Familien eingeteilt, welche wiederum über verschiedene Isoenzyme verfügen. Einige dieser PDE-Familien können beide Substrate abbauen (PDE 1, 2, 3, 10, 11), während andere cAMP- (PDE 4, 7, 8) bzw. cGMP-spezifisch (PDE 5, 6, 9) sind [de Ninno 2012] (s. Tab. 2).

Phosphodiesterasen stellen ein beliebtes Target für die pharmakologische Beeinflussung des cAMP- und cGMP-Signalweges dar. Kurz nach ihrer Entdeckung wurden bereits die ersten unspezifischen Inhibitoren der PDE beschrieben, nämlich Koffein, Theophyllin und Theobromin [Butcher, Sutherland 1962; Sutherland, Rall 1958]. Mittlerweile sind zahlreiche spezifische Inhibitoren der PDE-Isoenzyme bekannt, die bei verschiedenen Erkrankungen eingesetzt werden oder aktuell noch Gegenstand der Forschung sind (s. Tab. 2).

Durch die von ihnen vermittelten Effekte im Sinne einer anti-inflammatorischen, vasodilatativen, anti-thrombotischen, anti-oxidativen, lipidsenkenden oder anti-apoptischen Wirkung stellen sie Substanzen dar, die potentiell die Perfusion von Lappenplastiken verbessern und so einem Lappenverlust vorbeugen können. Zudem wirken diese Substanzen anti-atherogen und können somit der Entstehung der Atherosklerose entgegenwirken bzw. ihre weitere Progression vermindern. Für die vorliegende Arbeit wurden die PDE-Inhibitoren Theophyllin, Cilostazol, Rolipram und Sildenafil ausgewählt, um ihren Einfluss auf muskulokutane Lappenplastiken am atherosklerotischen Mausmodell zu untersuchen.

| PDE | Substrat    | Hauptlokalisation  | Inhibitoren   | Zielerkrankung   |
|-----|-------------|--|---|--|
| 1   | cAMP < cGMP | Gehirn, glatte Muskulatur, Herz  | Vincopectin, IC86340  | Cerebrovaskuläre Erkrankungen, Herzhypertrophie              |
| 2   | cAMP = cGMP | Herz, Endothelzellen, Thrombozyten, Nebenniere, Gehirn                               | EHNA und Analoga  | Gedächtnisleistungen, Endothelpermeabilität bei Entzündungen |
| 3   | cAMP > cGMP | Thrombozyten, Herz, glatte Muskulatur, Corpus cavernosum, Fettgewebe                 | <u>Cilostazol</u> , Milrinon, Vesnarinon, Anagrelide              | pAVK, Herzerkrankungen, Atemwegserkrankungen, Fertilität     |
| 4   | cAMP        | Lunge, Herz, glatte Muskulatur, Gehirn, Entzündungs- und Immunzellen                 | <u>Rolipram</u> , Roflumilast, Zardaverin                         | COPD, Asthma, Allergien                                      |
| 5   | cGMP        | Glatte Muskulatur, Thrombozyten, Corpus cavernosum, Kleinhirn                        | <u>Sildenafil</u> , Vardenafil, Tadalafil, Zaprinast, Dipyridamol | Erektile Dysfunktion, ischämische Herzerkrankungen           |
| 6   | cGMP        | Retina   | Sildenafil, Zaprinast, Dipyridamol                                | keine  |
| 7   | cAMP        | Skelettmuskulatur, T- und B-Zellen, Herz, Gehirn                                     | BRL 50481, IC242, Dipyridamol                                     | Entzündung, Osteoporose                                      |
| 8   | cAMP        | Immunzellen, Leber, Niere, Hoden, Schilddrüse, Auge, Skelettmuskulatur, Ovar, Gehirn | Zaprinast   | keine  |
| 9   | cGMP        | Gehirn, Niere, Leber, Lunge, Hoden, Skelettmuskulatur, Herz, Darm                    | BAY 73-6691   | Alzheimer-Erkrankung   |
| 10  | cAMP > cGMP | Gehirn, Hoden  | keine   | keine  |
| 11  | cAMP = cGMP | Prostata, Hoden, Skelettmuskulatur, Niere, Leber, Hypophyse, Speicheldrüsen          | keine   | keine  |

**Tab. 2:** Übersicht über die Familie der Phosphodiesterasen mit ihren jeweiligen Substraten, Hauptlokalisationen, Beispielen für Inhibitoren und möglichen Zielerkrankungen [nach Gresele, Momi et al. 2011; Omori, Kotera 2006]. Die hervorgehobenen Inhibitoren Cilostazol, Rolipram und Sildenafil sind Gegenstand dieser Arbeit.

### **Theophyllin als unspezifischer PDE-Inhibitor**

Theophyllin gehört zur Gruppe der Methylxanthine und wird seit vielen Jahrzehnten bei der Behandlung von Asthma bronchiale und anderen Atemwegserkrankungen eingesetzt. Die molekularen Wirkmechanismen von Theophyllin sind vielfältig. Neben der Wirkung als unspezifischer PDE-Inhibitor mit nachfolgender Erhöhung von cAMP, wird die unselektive Blockade von Adenosinrezeptoren mit einer verminderten Freisetzung von Entzündungsmediatoren für seine Wirkungen mit hauptverantwortlich gemacht. Zusätzlich sind Mechanismen wie zum Beispiel eine Kalziummobilisation, Stimulation der endogenen Katecholaminausschüttung, Induktion der Histon-Deacetylase(HDAC)-Aktivität sowie Effekte auf Transkriptionsebene und auf das Zellüberleben beschrieben [Barnes 2003; Barnes 2013; Ito, Lim et al. 2002; Spina 2003]. In Bezug auf den Einsatz bei Atemwegserkrankungen spielen vor allem die bronchodilatatorischen, anti-inflammatorischen und immunmodulierenden Eigenschaften von Theophyllin eine große Rolle [Karow, Lang-Roth 2012; Banner, Page 1995; Persson 1986]. Außerdem hemmt Theophyllin die Thrombozytenaggregation [Ardlie, Glew et al. 1967] und führt zu einer zentralnervösen Stimulation [Choi, Shamim et al. 1988; Karow, Lang-Roth 2012]. Durch seine kardiale Stimulation mit positiv chrono- und inotroper Wirkung [Karow, Lang-Roth 2012; Riksen, Smits et al. 2011] führt es zu einer verstärkten Organdurchblutung.

### **Cilostazol als Inhibitor der PDE 3**

Cilostazol ist in Deutschland zur Behandlung von Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit im Stadium II nach Fontaine zugelassen. Die Hauptwirkungen des spezifischen PDE 3-Inhibitors sind eine Hemmung der Thrombozytenaggregation, -adhäsion und -sekretion sowie eine Vasodilatation von glatten Gefäßmuskelzellen [Schör 2002]. Hierbei führt synergistisch zur Inhibition der PDE 3 die Hemmung des Adenosin-Uptakes zu einer Potenzierung der Erhöhung der cAMP-Spiegel [Liu, Shakur et al. 2001]. Außerdem wirkt Cilostazol anti-inflammatorisch, anti-oxidativ, anti-apoptotisch, anti-proliferativ und hat einen positiven Effekt auf den Lipidstoffwechsel [da Rosa, Baroni et al. 2006; Wang, Elam et al. 2003].

### **Rolipram als Inhibitor der PDE 4**

Die Phosphodiesterase 4 ist vor allem in Entzündungszellen wie Mastzellen und eosinophilen Granulozyten lokalisiert, aber auch in glatten Muskelzellen, Herz und Lunge. Ihre Inhibition durch Rolipram führt über das vermehrte Angebot an cAMP zu einer anti-inflammatorischen Wirkung und zur Vasodilatation der glatten Gefäßmuskulatur [Dyke, Montana et al. 2002; Karow, Lang-Roth 2012]. Außerdem wirkt es bronchodilatatorisch und besitzt neuromodulatorische Fähigkeiten [Torphy 1998]. Verschiedene PDE 4-Inhibitoren

wurden beispielsweise zur Behandlung von Asthma, chronisch obstruktiver Lungenerkrankung, Multipler Sklerose und Rheumatoider Arthritis getestet, doch aufgrund der hohen Nebenwirkungen ist ihr therapeutischer Nutzen eingeschränkt. Bisher ist auf dem deutschen Markt nur ein PDE 4-Hemmer zugelassen, nämlich Roflumilast zur Behandlung der COPD [Dyke, Montana 2002].

### **Sildenafil als Inhibitor der PDE 5**

Sildenafil zeigt eine hohe Selektivität gegenüber der Phosphodiesterase 5, welche cGMP-selektiv ist. Der Einsatz dieses PDE 5-Hemmers führt somit zu einer erhöhten Konzentration von cGMP und daraus folgend zur erhöhten Verfügbarkeit von NO vorwiegend in glatten Gefäßmuskelzellen mit nachfolgender Vasodilatation [Chrysan, Chrysan 2012; Karow, Lang-Roth 2012; Liu, Peyton et al. 2012]. Zudem vermindert Sildenafil die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen [Liu, Peyton et al. 2012] und verbessert die endotheliale Funktion [Kukreja, Ockaili 2004; Kukreja 2007]. Zugelassen ist Sildenafil zur Behandlung der erektilen Dysfunktion und der pulmonalen arteriellen Hypertonie.

## **2.5 Fragestellung**

In der vorliegenden tierexperimentellen Studie sollte untersucht werden, ob die Mikrozirkulation und Nekroseentwicklung von randomisiert durchbluteten muskulokutanen Lappenplastiken am atherosklerotischen Mausmodell durch medikamentöse Präkonditionierung positiv beeinflusst werden kann.

Hierzu wurden an ApoE-Knockout-Mäusen „random pattern flaps“ gehoben, in einem Rückenhautkammermodell fixiert und innerhalb der folgenden zehn Tage repetitiv intravitalmikroskopische Untersuchungen und am letzten Tag der Versuchsreihe zusätzlich eine Untersuchung der Cholesterin- und Triglyceridwerte im Serum durchgeführt.

Jede Versuchsgruppe wurde mit einer anderen Substanz über fünf Tage präkonditioniert. Als erste Substanz wurde Simvastatin verwendet und untersucht, inwiefern die lipidsenkenden und zahlreichen pleiotropen Effekte einen Einfluss auf das Überleben des kritisch perfundierten Haut-Muskellappen haben. Auch bei der Gabe des unspezifischen Phosphodiesterase-Inhibitors Theophyllin sowie den spezifischen PDE-Hemmern Cilostazol (PDE 3-Inhibitor), Rolipram (PDE 4-Inhibitor) und Sildenafil (PDE 5-Inhibitor) sollte ein möglicher Einfluss auf das Lappenüberleben analysiert werden.

Durch die Auswertung von nekrotischer Gewebefläche, mikrozirkulatorischen Parametern, der Anzahl apoptotischer Zellen in den einzelnen Lappenanteilen sowie der Lipidwerte sollten insbesondere folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Kann durch den Einsatz von Simvastatin oder der beschriebenen PDE-Inhibitoren eine Reduktion der Lappennekrose bzw. eine Verbesserung des Lappenüberlebens erreicht werden?
2. Beeinflusst der Einsatz von Simvastatin oder der beschriebenen PDE-Inhibitoren die funktionelle Kapillardichte in den jeweiligen Lappenanteilen?
3. Beeinflusst der Einsatz von Simvastatin oder der beschriebenen PDE-Inhibitoren den Durchmesser, die Fließgeschwindigkeit oder den Blutfluss in Kapillaren, Arteriolen und/oder Venulen in den jeweiligen Lappenanteilen?
4. Beeinflusst der Einsatz von Simvastatin oder der beschriebenen PDE-Inhibitoren die Anzahl der apoptotischen Zellen in den jeweiligen Lappenanteilen?
5. Beeinflusst der Einsatz von Simvastatin oder der beschriebenen PDE-Inhibitoren die Cholesterin- und/oder Triglyceridwerte im Serum der Versuchstiere?

### **3. MATERIAL UND METHODIK**

#### **3.1 Versuchstiere und Tierhaltung**

Sämtliche Tierversuche wurden unter Einhaltung der Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Eine Genehmigung vonseiten der saarländischen Landesbehörde lag vor.

Als Versuchstiere dienten Apolipoprotein E Knockout-Mäuse (ApoE<sup>-/-</sup>) aus der hauseigenen Zucht des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie (Universität des Saarlandes, Homburg, Deutschland). Die Tiere hatten ein mittleres Gewicht von 28,6±0,4g und ein durchschnittliches Alter von 4,8±0,3 Monaten. Nach Absetzen von der Mutter wurde begonnen, die Tiere mit einem Spezialfutter (ssniff® Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) nach Art einer „Western-type diet“ [Plump, Smith et al. 1992] zu füttern. Die Zusammensetzung dieses Futters bestand aus 20,85% Rohfett, 19,5% Casein sowie 1,25% Cholesterin. Diese Diät wurde mindestens vier Wochen vor Start des jeweiligen Versuchszeitraums begonnen und bis zum Ende der Versuche fortgesetzt.

Die Tierhaltung erfolgte ab Beginn der Versuche in Einzelkäfigen, hierbei wurde stets eine Temperatur von 22-24°C, eine relative Luftfeuchtigkeit von 60-65% sowie ein 12-Stunden Tag- und Nacht-Zyklus gewährleistet. Über den gesamten Versuchszeitraum hatten die Tiere freien Zugang zu Trinkwasser ad libitum sowie zu dem oben genannten Spezialfutter.

Für die Blutentnahme wurden zusätzlich 15 C57BL/6-Mäuse verwendet, welche dem Wildtyp der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus entsprechen. Diese waren im Durchschnitt 4,8±0,6 Monate alt und hatten ein durchschnittliches Gewicht von 30,9±0,7g. Die Tiere hatten freien Zugang zu Standardlaborfutter (3,3% Rohfett) (ssniff® Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) sowie Trinkwasser ad libitum. Die Tierhaltung erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie bei den ApoE-defizienten Tieren.

#### **3.2 Modell**

##### **3.2.1 Rückenhautkammermodell**

Das Anbringen einer chronischen Rückenhautkammer stellt ein etabliertes System dar und ermöglicht die repetitive intravitalmikroskopische Analyse verschiedener mikrozirkulatorischer Parameter über einen Zeitraum von mehreren Tagen. Zunächst wurde das Modell der Rückenhautkammer von Endrich und Kollegen am Syrischen Goldhamster beschrieben [Endrich, Asaishi et al. 1980], bevor es auf die Maus übertragen wurde. Für die hier beschriebenen Versuche diente eine leicht modifizierte Rückenhautkammer an der

ApoE<sup>-/-</sup>-Maus als Modell, welche Kutis, subkutanen Gewebe sowie quergestreifte Muskulatur enthält [Harder, Amon et al. 2004; Lehr, Leunig et al. 1993]. Nach intravenöser Verabreichung von Fluorochromen kann mittels Fluoreszenz-Auflicht-Mikroskopie das Fließverhalten der korpuskulären Blutbestandteile quantitativ beurteilt werden.

### **3.2.2 Anästhesie**

Alle Versuchsabläufe wurden in allgemeiner intraperitonealer Anästhesie durchgeführt, d.h. sowohl die Rasur und Enthaarung der Tiere, als auch die Lappenpräparation mit Anbringen der Rückenhautkammer sowie die wiederholten intravitalmikroskopischen Untersuchungen. Das Anästhetikum wurde aus einer Mischung von 75mg/kg Körpergewicht (KG) Ketaminhydrochlorid (Ursotamin<sup>®</sup>, Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland) und 15mg/kg KG Xylazinhydrochlorid (Rompun<sup>®</sup> 2%, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) hergestellt. Pro 10g Körpergewicht wurden 0,1ml des Anästhetikums intraperitoneal verabreicht und somit eine ausreichende Analgesie und Muskelrelaxation gewährleistet. Die durchschnittliche Narkosedauer betrug 30-40 Minuten, bei Bedarf wurde bei vorzeitigem Erwachen der Tiere 0,05-0,1ml des Anästhetikums nachinjiziert. Zum Ausgleich des Flüssigkeitsverlustes erfolgte am Ende jeder Narkose eine subkutane Injektion von 0,3ml einer 37°C warmen isotonen Natriumchlorid-Lösung (NaCl 0,9%, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Die wiederholten Injektionen der Narkose wurden von den Tieren gut toleriert, sie zeigten keinerlei Veränderungen ihrer Schlaf-, Fress- und Putzgewohnheiten.

Zwei der Behandlungssubstanzen wurden intragastral verabreicht, weshalb die Tiere hierzu in eine Isofluran-Kurzarkose gelegt wurden. Die Medikamentenapplikation wurde mit Hilfe einer metallischen Schlundsonde durchgeführt, die direkt in den Magen vorgeschoben wurde. Bei der Inhalationsarkose mit Isofluran (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) wurde ein Verdampfer (Vapor 19.3, Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland) verwendet, über den 3% Isofluran mit einem Sauerstofffluss von 6l/min in die Narkosebox geleitet wurden.

Isofluran wirkt gut hypnotisch und muskelrelaxierend, ist gut steuerbar und weist eine nur sehr geringe Metabolisierungsrate (0,2%) im Körper auf. Der Blut-Gas-Verteilungskoeffizient bei der Maus beträgt 1,4 und der MAC(minimale alveoläre Konzentration)-Wert 1,3, was sich in einer schnellen Anflutung und einer kurzen Aufwachphase widerspiegelt [Erhardt, Henke et al. 2011]. Die Tiere zeigten keinerlei Beeinträchtigung durch die Inhalationsarkose, sie waren bereits wenige Minuten nach der Narkose wieder in der Lage zu laufen, zu fressen und zu trinken.

### 3.2.3 Vorbereitung

Die Vorbereitung der Tiere erfolgte jeweils etwa 48 Stunden vor der Lappenhebung. Hierzu wurden die Tiere – wie oben beschrieben – mittels intraperitonealer Injektion anästhesiert. Es erfolgte die Haarentfernung mit einer elektrischen Tierschermaschine (Isis GT420, Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland). Anschließend wurde eine Enthaarungscreme (elca<sup>®</sup>med, Asid Bonz GmbH, Herrenberg, Deutschland) zweimal für ca. zehn Minuten aufgetragen, um eine vollständige Enthaarung zu gewährleisten. Die Enthaarungscreme wurde schließlich mit warmem Wasser abgespült und die Haut der Tiere trockengerieben. Während der Rasur und bis zu ihrem Erwachen wurden die Mäuse vor einer Infrarot-Wärmelampe (Sanitas, Hans Dinslage GmbH, Uttenweiler, Deutschland) platziert, um einen Wärmeverlust zu vermeiden.

### 3.2.4 Präkonditionierung

Die Präkonditionierung der Tiere mit den jeweiligen Behandlungssubstanzen wurde erstmals ca. 24 Stunden vor der Lappenhebung durchgeführt. 30 Minuten vor der Operation erfolgte die zweite Medikamentengabe, im Folgenden einmal täglich an den Tagen eins bis drei postoperativ (s. Abb. 6). Dieses Verabreichungsschema galt für alle Versuchsgruppen auf die gleiche Weise.

Die verschiedenen Gruppen setzten sich aus einer NaCl-behandelten Kontrollgruppe, einer mit einem Statin behandelten Gruppe sowie vier Gruppen zusammen, die mit unterschiedlichen Phosphodiesterase-Inhibitoren behandelt wurden.

Hierbei wurden vier der Substanzen – NaCl, Simvastatin, Rolipram und Theophyllin – intraperitoneal injiziert. Die beiden Medikamente Sildenafil und Cilostazol wurden intragastral mit Hilfe einer Schlundsonde verabreicht. Hierzu wurden die Tiere wie oben beschrieben in eine Isofluran-Kurznaarkose gelegt.

#### **NaCl 0,9%**

NaCl 0,9% (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) ist eine isotone kristalline Lösung. Insgesamt wurden 18 Tiere mit NaCl 0,9% behandelt und auf zwei Sham-Gruppen mit je neun Tieren aufgeteilt. Isotone Natriumchlorid-Lösung hat keinen Einfluss auf die Lappendurchblutung und ist daher zur Behandlung der Kontrollgruppe gut geeignet. Den Tieren wurde über fünf Tage lang, begonnen 24 Stunden präoperativ, je 0,2ml der NaCl-Lösung intraperitoneal gespritzt.

**Simvastatin**

Simvastatin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) ist ein 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktasehemmer. Durch die kompetitive Hemmung des Enzyms kommt es zur Reduzierung der Cholesterinbiosynthese mit kompensatorischer Zunahme der LDL-Rezeptoren und daraus folgend zu einer Abnahme des Plasma-LDL-Spiegels. Außerdem besitzen Statine vielfältige pleiotrope Effekte. Unter anderem werden die endotheliale Funktion verbessert, oxidativer Stress sowie die thrombogene Aktivität reduziert und die Plaquestabilität verbessert [Karow, Lang-Roth 2012; Laufs 2003; Liao, Laufs 2005]. Acht Tiere erhielten je 5mg/kg KG Simvastatin intraperitoneal über fünf Tage ab dem ersten Tag präoperativ.

**Theophyllin**

Theophyllin (Euphyllong® i.v. 200, Nycomed Germany Holding GmbH, Konstanz, Deutschland) zählt zu den Methylxanthinen. Es ist ein unselektiver Inhibitor der Phosphodiesterasen, bewirkt aber auch eine Blockade von Adenosin-Rezeptoren, wirkt auf Transkriptionsebene oder stimuliert die endogene Katecholamin- und Calciumfreisetzung [Barnes 2003, Barnes 2013; Ito, Lim et al. 2002; Spina 2003]. So führt Theophyllin unter anderem zur verstärkten Organdurchblutung, Hemmung der Thrombozytenaggregation, wirkt anti-inflammatorisch und immunmodulierend [Ardlie, Glew et al. 1967; Banner, Page 1995; Karow, Lang-Roth 2012; Persson 1986; Riksen, Smits et al. 2011]. Theophyllin wurde insgesamt sieben Tieren mit einer Konzentration von 6mg/kg KG intraperitoneal injiziert.

**Cilostazol**

Cilostazol (Pletal, Otsuka Pharmaceutical Europe, Frankfurt a.M., Deutschland) wurde als selektiver Phosphodiesterase 3-Hemmer eingesetzt. Cilostazol wirkt über eine Erhöhung der cAMP-Konzentration beispielsweise anti-thrombotisch, vasodilatatorisch, anti-inflammatorisch, anti-oxidativ und anti-proliferativ [da Rosa, Baroni et al. 2006; Schör 2002; Wang, Elam et al.]. Es wurden elf Tiere mit Cilostazol behandelt, wobei jeweils 30mg/kg KG intragastral verabreicht wurden.

**Rolipram**

Rolipram (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) ist ein selektiver Hemmstoff der Phosphodiesterase 4. Über eine cAMP-Erhöhung führt Rolipram zu einer anti-inflammatorischen Wirkung und Vasodilatation, wirkt bronchodilatatorisch und besitzt neuromodulatorische Aktivitäten [Dyke, Montana et al. 2002; Karow, Lang-Roth 2012; Torphy 1998]. In dieser Medikamentengruppe wurden neun Tiere mit 8mg/kg KG Rolipram intraperitoneal behandelt.

### **Sildenafil**

Sildenafil (Viagra<sup>®</sup>, Pfizer Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland) ist ein Inhibitor der cGMP-spezifischen Phosphodiesterase 5. Die PDE 5 befindet sich unter anderem in der glatten Muskulatur von Gefäßen. Die Inhibition dieses Enzyms führt über eine Erhöhung von cGMP zur Relaxation der glatten Muskulatur und damit zur Vasodilatation [Chrysan, Chrysan 2012; Karow, Lang-Roth 2012; Liu, Peyton et al. 2012] und führt zudem zur Verbesserung der endothelialen Funktion [Kukreja, Ockaili 2004; Kukreja 2007]. Elf Mäuse erhielten Sildenafil in einer Konzentration von 5mg/kg KG intragastral.

### **3.2.5 Operation**

Die Präparation des „random pattern flap“ und das Anbringen der chronischen Rückenhautkammer erfolgten bei allen Versuchstieren auf die gleiche, standardisierte Art und Weise.

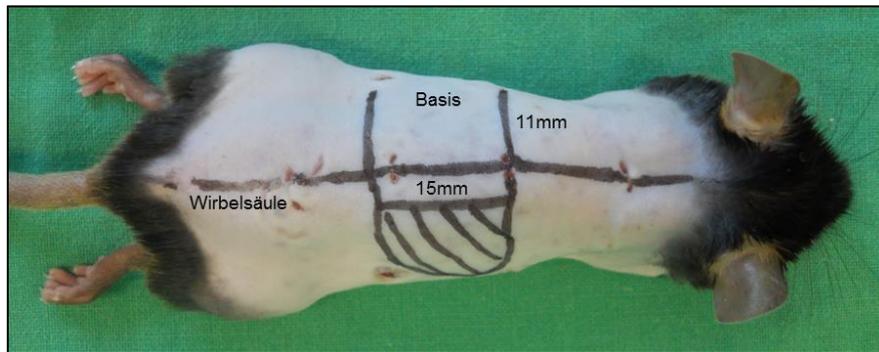
Am Operationstag wurden die bereits enthaarten Tiere wie oben beschrieben anästhesiert. Um einen Wärmeverlust zu vermeiden, befanden sich die Tiere während der gesamten Operationsdauer auf einer Wärmeunterlage (ThermoLux<sup>®</sup>, Witte+Sutor GmbH, Murrhardt, Deutschland).

Vor Beginn der Operation wurde der Rücken der Mäuse mit einem Hautdesinfektionsmittel (Softasept<sup>®</sup> N, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) desinfiziert, um das Infektionsrisiko der zu untersuchenden Kammer zu minimieren.

Zunächst wurden die Tiere vor einer Kaltlichtlampe positioniert, eine doppelagige Hautfalte angehoben und unter Gegenlicht kontrolliert, ob die von lateral zuführenden Gefäße parallel verliefen. Diese entsprachen Ästen der Arteria thoracica lateralis (lateral thoracic artery, LTA) und der tiefen Arteria circumflexa iliaca (deep circumflex iliac artery, DCIA). Anschließend wurden jeweils zwei bis drei Millimeter lateral dieser Gefäße zwei Haltenähte angebracht und die Maus hiermit an einem Metallbalken fixiert.

Nun wurde der hintere, dem späteren Lappen zugewandte Teil des Titanrahmens vorübergehend an der Rückenhautfalte durch zwei Haltenähte fixiert. Es erfolgte die Perforation der Haut mit einer spitzen Schere an den Positionen der schon zuvor am Titanrahmen angebrachten zwei Schrauben. Die entstandenen Löcher dienten später zur erneuten Fixierung der Rückenhautkammer. Danach wurde die Maus vom Metallbalken gelöst und der Titanrahmen komplett entfernt.

Im nächsten Schritt wurde die Maus horizontal positioniert und die Begrenzungen des Lappens mit einem Permanentmarker (Faber-Castell, Stein, Deutschland) eingezeichnet. Hierzu wurde zunächst die Wirbelsäule des Tieres markiert und der Flap links lateral hiervon



**Abb. 4:** Darstellung der Größe und Position des „random pattern flap“ an der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus.

ingezeichnet. Die Maße des randomisiert durchbluteten Hautmuskellappens betragen 15mm in der Breite und 11mm in der Länge (s. Abb. 4).

Zur kontralateralen Seite hin wurde eine Kennzeichnung von ca. 2mm vorgenommen, die durch einen Halbkreis ergänzt wurde (s. Abb. 5 A). Dieses zusätzliche Gewebe wurde entfernt, um die Rückseite des Lappens später untersuchen zu können.

Anschließend erfolgte die Lappenhebung durch Inzision an den zuvor eingezeichneten Lappengrenzen. Dabei wurde die gesamte von lateral zuführende Blutversorgung unterbrochen, d.h. sowohl der Ast der Arteria thoracica lateralis, als auch der Ast der tiefen Arteria circumflexa iliaca durchtrennt. Somit wurde die Perfusion des „random pattern flap“ ausschließlich über die von der Basis zuführenden Gefäße gewährleistet (s. Abb. 5 B).

Während der restlichen Operationszeit wurde das Gewebe wiederholt mit NaCl 0,9% (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) befeuchtet, um ein Austrocknen zu verhindern.

Die verbleibende Hautschicht, die Epidermis, subkutanes Fettgewebe und quergestreifte Muskulatur enthielt, sowie die links und rechts verbliebenen Hautfalten wurden durch Nähte am hinteren Teil des Titanrahmens fixiert (s. Abb. 5 C). Hierzu diente ein 4-0 Vicryl Faden (Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland).

Im nächsten Schritt wurden die lateralen Seiten des präparierten Lappens mit je zwei Einzelknopfnähten mit einem nicht resorbierbaren 6-0 Prolene Faden (Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) an die umgebende Haut zurückgenäht (s. Abb. 5 D). Hierdurch wurden Adhäsionen oder ein Zusammenziehen des Lappens verhindert und der spätere sichere Verschluss der Kammer gewährleistet. Danach erfolgte unter einem Operationsmikroskop (Leica M651, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) in 16facher-Vergrößerung die mikrochirurgische Entfernung der Gallertschicht („loose areolar tissue“), um eine uneingeschränkte Sicht auf Muskel- und Hautgewebe zu erhalten.

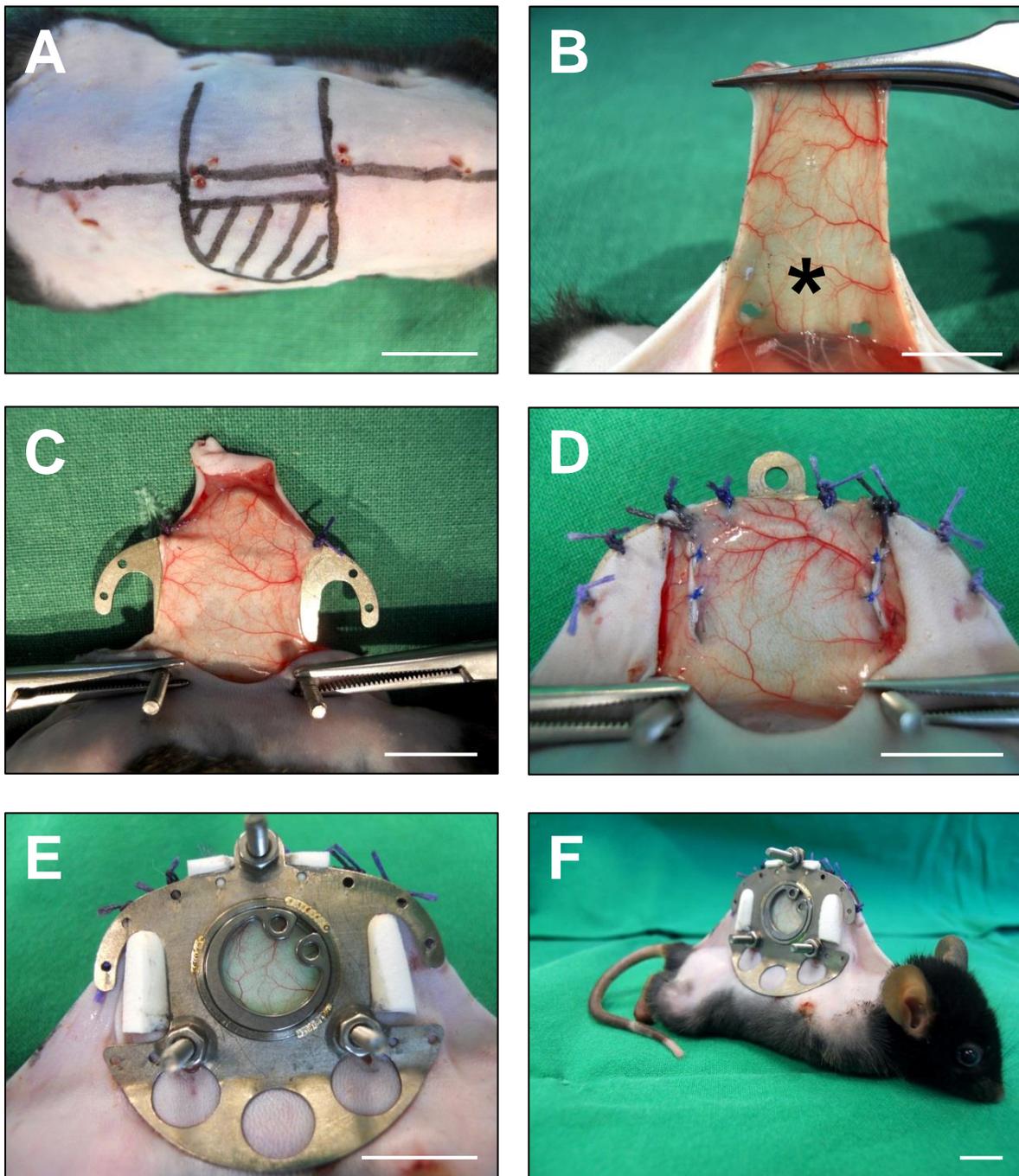
Da das zur Visualisierung der Apoptosen notwendige Bisbenzimid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) topisch aufgetragen werden muss, wurden nun ein bis zwei

Tropfen dieses Fluoreszenzfarbstoffes auf den Lappen aufgebracht und nach ca. zwei Minuten Einwirkzeit der überschüssige Farbstoff mit NaCl 0,9% wieder abgespült. Durch diese Aufbringung im Rahmen der Operation war es an den Tagen der Intravitalmikroskopie nicht mehr nötig das Deckglas zum Aufbringen von Bisbenzimid zu entfernen und eine mechanisch induzierte Gewebsentzündung konnte vermieden werden.

Im folgenden Schritt wurde der vordere Teil des Titanrahmens mit dem bereits an der Maus fixierten hinteren Teil über drei Schrauben verbunden und ein Deckglas luftdicht auf das Beobachtungsfenster aufgebracht, das durch die einwirkenden Adhäsionskräfte Kontakt zum zu untersuchenden Lappen hatte. Zur Sicherheit wurde ein Sprengring befestigt, der jedoch vor jeder Mikroskopie wieder entfernt wurde.

Um eine noch bessere Abdichtung zu gewährleisten und das kritisch perfundierte Gewebe zu schonen, wurde zwischen den beiden Kammerteilen vor deren Verschluss Schaumstoff eingebracht, sowohl lateral, als auch an der Spitze der Kammer (s. Abb. 5 E).

Bis zu ihrem Erwachen wurden die Mäuse vor einer Rotlichtlampe (Sanitas, Hans Dinslage GmbH, Uttenweiler, Deutschland) platziert. Um den Flüssigkeitsverlust während der Narkose auszugleichen, wurde den Versuchstieren 0,3ml NaCl 0,9% (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) subkutan injiziert. Die Tiere zeigten im Verlauf des Versuchszeitraums keine Veränderung ihrer Schlaf-, Putz- und Fressgewohnheiten und tolerierten die Präparation und das Tragen der Rückenhautkammer (Gewicht 3,4g) (s. Abb. 5 F) sowie die wiederholten intravitalmikroskopischen Untersuchungen gut.



**Abb. 5:** Schrittweise Darstellung der Präparation des „random pattern flap“ und Anbringen der Rückenhautkammer. Der Maßstab entspricht jeweils 1cm. (A) Eingezeichneter Lappen auf der Rückenhaut der Maus (Breite 15 mm; Länge 11 mm) mit Extension von 2 mm zur kontralateralen Seite. Das überschüssige Gewebe (schraffierte Fläche) wurde später entfernt, um die Rückseite des Lappens untersuchen zu können. (B) Lappenhebung des randomisiert durchbluteten Hautmuskellappens. Die Blutversorgung erfolgt ausschließlich von der Basis her (\*). (C) Einnähen des Lappens auf der Kammerrückseite. (D) Wiedereinnähen in die umgebende Rückenhaut um Adhäsionen zu verhindern und die Dichtigkeit zu gewährleisten. (E) Vollständig befestigte Rückenhautkammer inklusive Deckglas und Sprengring sowie Schaumstoff lateral und an der Spitze des Titanrahmens. (F) Maus mit Rückenhautkammer nach der Lappenpräparation.

### 3.2.6 Blutentnahme

Am letzten Tag des jeweiligen Versuchszeitraums erfolgte eine Blutentnahme, um den Triglycerid- und Gesamtcholesteringehalt im Serum der Versuchstiere zu bestimmen.

Hierzu wurden die Tiere nach Beendigung der letzten intravitalmikroskopischen Untersuchung und Entfernung der Rückenhautkammer auf dem Rücken platziert. Nach Reevaluation der Narkosetiefe und ggf. Nachinjizieren des Anästhetikums erfolgte eine mediane Laparotomie und die Präparation durch das Peritoneum bis hin zur Vena cava caudalis. Diese wurde auf Höhe des Zuflusses der linken Nierenvene punktiert und ca. 0,6-0,8ml Blut in eine zuvor mit Heparin-Natrium (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) gespülte Spritze aspiriert.

Nach der Blutentnahme wurde den Tieren eine Überdosis Pentobarbital (Narcoren®, Merial GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) injiziert und sie so euthanasiert.

Das Vollblut wurde in ein Serumröhrchen überführt und dieses anschließend 2-3min in einer Zentrifuge (Hettich Universal 30 RF, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland) zentrifugiert, um das Serum von den korpuskulären Bestandteilen zu trennen. Das Serum wurde daraufhin in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 bis -85°C tiefgefroren (Sanyo, Ewald Innovationstechnik GmbH, Bad Nenndorf, Deutschland).

### 3.2.7 Versuchsprotokoll

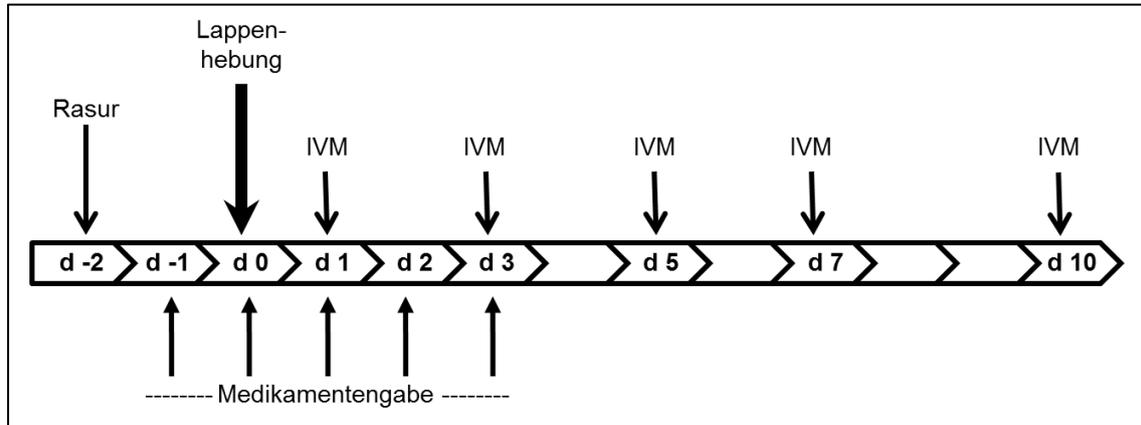
Insgesamt wurden 64 Apolipoprotein E Knockout-Mäuse operiert und mikroskopiert. Diese wurden in sieben unterschiedliche Gruppen eingeteilt:

|                                |              |      |
|--------------------------------|--------------|------|
| 1) Kontrollgruppe (NaCl 0,9%): | 0,2ml/d      | n=9  |
| 2) Simvastatin-Gruppe:         | 5mg/kg KG*d  | n=8  |
| 3) Theophyllin-Gruppe:         | 6mg/kg KG*d  | n=7  |
| 4) Kontrollgruppe (NaCl 0,9%): | 0,2ml/d      | n=9  |
| 5) Cilostazol-Gruppe:          | 30mg/kg KG*d | n=11 |
| 6) Rolipram-Gruppe:            | 8mg/kg KG*d  | n=9  |
| 7) Sildenafil-Gruppe:          | 5mg/kg KG*d  | n=11 |

Die Rasur der Tiere erfolgte zwei Tage präoperativ, die Medikamentengabe erstmals einen Tag vor der Lappenhebung, sowie an den vier darauffolgenden Tagen.

Die erste intravitalmikroskopische Untersuchung fand ca. 24 Stunden nach der Lappenhebung statt. Im Folgenden wurden die Tiere an den Tagen drei, fünf, sieben und zehn nach dem gleichen Schema mikroskopiert (s. Abb. 6).

Nach der letzten intravitalmikroskopischen Untersuchung an Tag zehn wurde den Tieren Blut entnommen und sie anschließend mit einer Überdosis Pentobarbital (Narcoren®, Merial GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) euthanasiert.



**Abb. 6:** Versuchsablauf. An Tag 0 erfolgte die Lappenhebung, zwei Tage zuvor die Rasur der Tiere. Die intravitalmikroskopischen Untersuchungen (IVM) wurden an den Tagen 1, 3, 5, 7 und 10 durchgeführt. Die Konditionierung mit den jeweiligen Medikamenten erfolgte ca. 24 h und 30 min vor der Lappenhebung sowie an den Tagen 1, 2 und 3.

### 3.3 Untersuchungsmethoden

#### 3.3.1 Fluoreszenzfarbstoffe

##### FITC-Dextran 150.000

Fluoreszein-Isothiozyanat-Dextran 150.000 (FITC-Dextran, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) ist ein Dextran mit dem Molekulargewicht von 150.000 Dalton, an das der Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszein-Isothiozyanat gekoppelt ist. Unter physiologischen Bedingungen, also bei einer intakten Gefäßpermeabilität, kann aufgrund des hohen Molekulargewichts keine Extravasation stattfinden. Somit dient das Fluorochrom einer Kontrastverstärkung in den Blutgefäßen. FITC-Dextran hat ein Exzitationsmaximum von 490nm und eine Emissionswellenlänge von 520nm. Es wird renal sowie hepatisch metabolisiert und eliminiert. Direkt vor jeder Intravitalmikroskopie wurde den Tieren je 0,05ml des 5%igen Farbstoffes intravenös in den retrobulbären Venenplexus injiziert.

##### Bisbenzimid H 33342

Der Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid H 33342 (Hoechst®, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) bindet bevorzugt an AT-reiche Sequenzen der DNA ohne zu

interkalieren. Mit Hilfe dieses Farbstoffes können somit Zellkerne und Chromatin an lebenden Zellen direkt markiert werden. Im Rahmen der Apoptose kommt es zur Fragmentierung, Margination und Kondensation des Chromatins der betroffenen Zellen. Aufgrund dieser typischen Kernstrukturen war es möglich mit Hilfe des spezifisch an zelluläre DNA bindenden Bisbenzimid die Anzahl der Apoptosen an den Tagen eins, drei und fünf quantitativ zu erfassen. Die Applikation von ca. 0,05ml des Farbstoffes erfolgte topisch am Tag der Lappenpräparation und musste nicht wiederholt werden.

### **3.3.2 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie**

#### **Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie**

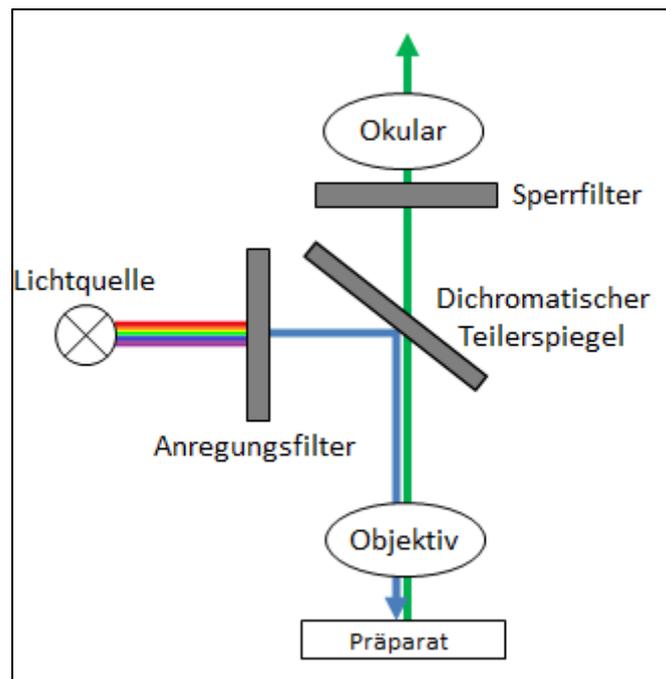
Das Prinzip der intravitale Fluoreszenzmikroskopie beruht auf der Eigenschaft der verwendeten Fluorochrome (Fluoreszein-Isothiozyanat und Bisbenzimid H 33342) nach Anregung durch Licht mit einer bestimmten Wellenlänge selbst Lichtquanten zu emittieren.

Zur Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie in Auflichttechnik bedarf es einer speziellen Anordnung dreier Filter, die exakt aufeinander abgestimmt sein müssen und sicherstellen, dass nur die emittierten Lichtquanten der Fluoreszenzfarbstoffe beobachtet werden.

Die Lichtquelle – eine 100 Watt HBO-Quecksilberdampf Lampe – hat ein bestimmtes Emissionsspektrum, welches sie aussendet. Nach dieser Lampe ist ein Anregungsfilter platziert, welcher den passenden Wellenlängenbereich isoliert, der zur Anregung des entsprechenden Fluorochroms benötigt wird.

Durch einen dichromatischen Teilerspiegel wird das Anregungslicht anschließend zum Präparat hin reflektiert, während das Fluoreszenzlicht durchgelassen wird. Somit können Anregungs- und Emissionslicht exakt voneinander getrennt werden.

Mittels eines Sperrfilters wird schließlich aus dem verbliebenen Wellenlängenspektrum nur der Anteil durchgelassen, welcher für den verwendeten Fluoreszenzfarbstoff spezifisch ist (s. Abb. 7).



**Abb. 7:** Prinzip der Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie. Nach der Lichtquelle sind drei Filter platziert, welche dafür sorgen, dass nur das von den Fluorochromen emittierte Licht sichtbar wird.

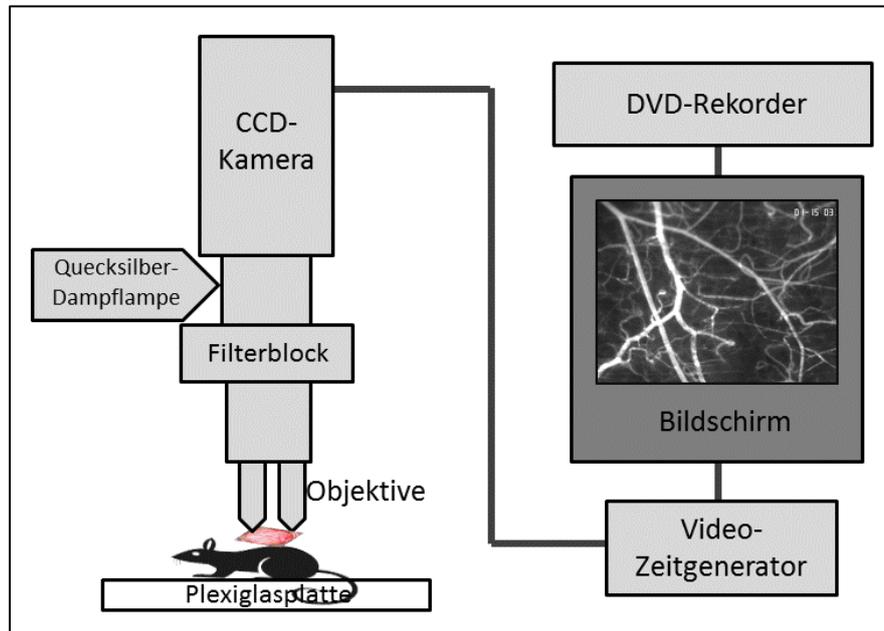
### Ausstattung

Die Durchführung der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie (IVM) erfolgte in Auflichttechnik mittels eines Zeiss-Axiotech-Mikroskops (Zeiss, Oberkochen, Deutschland), das mit einer 100 Watt HBO-Quecksilberdampfampe ausgestattet war.

Zur mikrozirkulatorischen Analyse nach Injektion von FITC-Dextran wurde ein Filter für blaues Licht (Anregungswellenlänge 450-490nm, Emissionswellenlänge >520nm) in den Strahlengang eingebracht. Für die Übersichtsaufnahmen wurde ein 4x Objektiv verwendet (Olympus UPlan Apo 4x/0,16, Olympus Corporation, Tokio, Japan). Zur Aufnahme der arteriovenösen Bündel sowie Kapillarfelder kam ein 20x Objektiv (Zeiss Plan-Neofluar 20x/0,50, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) zum Einsatz. Zur Darstellung des apoptotischen Zelltodes wurde ein 63x Wasserimmersionsobjektiv (Zeiss Achroplan 63x/0,90wPH3, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) verwendet und ein Filter für ultraviolettes Licht (Anregungswellenlänge 330-390nm, Emissionswellenlänge >430nm) in den Strahlengang eingebracht.

Die Aufnahme der IVM-Bilder erfolgte mit einer hochempfindlichen CCD (charge coupled device)- Videokamera (FK 6990-IQ, Pieper GmbH, Schwerte, Deutschland) und wurde über einen Bildschirm (PVM 1442 QM, Sony Corporation, Tokio, Japan) an ein DVD-Rekorder (Samsung HR 775, Samsung Electronics GmbH, Schwalbach im Taunus, Deutschland) übermittelt und aufgezeichnet. Durch einen zwischen Bildschirm und Videokamera

geschalteten Video-Zeitgenerator (VTG 33, FOR-A Company Ltd., Tokio, Japan) konnte die entsprechende Tiernummer sowie der Tag der Versuchsreihe auf dem Bildschirm eingeblendet und mit aufgenommen werden (s. Abb. 8).



**Abb. 8:** Schematischer Aufbau des Intravitalmikroskops. Die Maus wurde auf einer Plexiglasplatte fixiert, es wurden verschiedene Filterblöcke und Objektive verwendet. Das von den Fluorochromen emittierte Licht wurde mit einer CCD-Kamera aufgenommen und über einen Zeitgenerator an den Bildschirm übermittelt, der an einen DVD-Rekorder angeschlossen war.

### Ablauf der intravitalmikroskopischen Untersuchung

Jede Intravitalmikroskopie wurde unter den gleichen, standardisierten Bedingungen durchgeführt. Sie fand bei einer konstanten Temperatur von ca. 23°C in einem abgedunkelten Raum statt. Die Tiere wurden anästhesiert und auf einer Plexiglasplatte fixiert, um ein planes Aufliegen der Kammer zu gewährleisten. Der Sprengring wurde entfernt, damit das gesamte Gewebe durch das Beobachtungsfenster der Kammer analysiert werden konnte. Anschließend erfolgte die Injektion von 0,05ml FITC-Dextran in den retrobulbären Venenplexus zur Kontrastverstärkung der Blutgefäße. Bisbenzimid wurde den Mäusen nicht erneut appliziert, um eine Schädigung des Lappengewebes beim lokalen Auftragen des Farbstoffes zu verhindern.

Das Gewebe innerhalb des runden Beobachtungsfensters wurde in drei gleich große Anteile eingeteilt – einen proximalen, einen zentralen und einen distalen Lappenanteil.

Im Filter für blaues Licht wurde zunächst das komplette Gewebe systematisch mit dem 4x Objektiv abgefahren und jedes Gesichtsfeld für einige Sekunden auf DVD aufgenommen. Mit

diesen Aufnahmen erfolgte später die Auswertung der perfundierten bzw. nekrotischen Gewebefläche (s. Abb. 9 A).

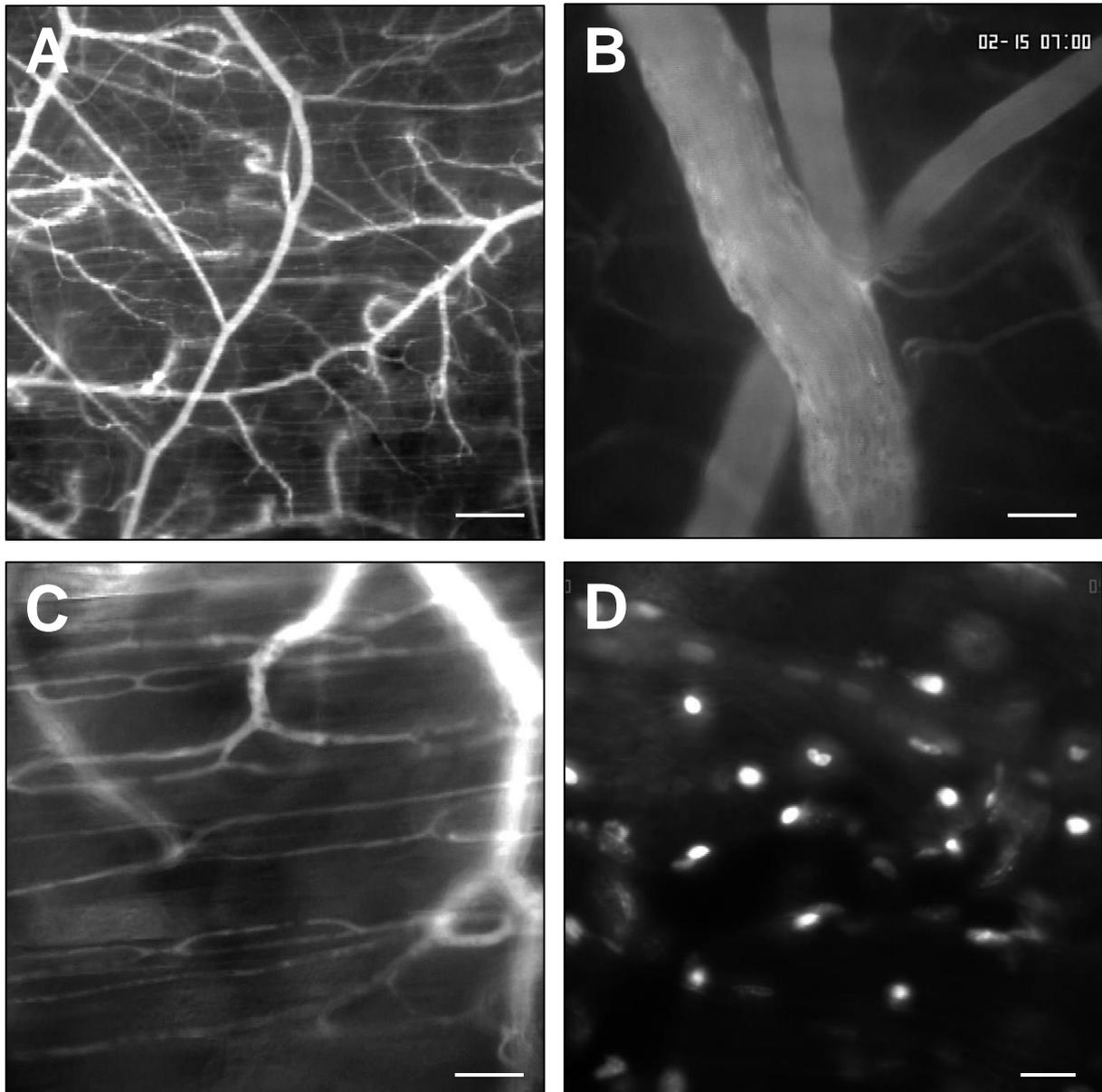
Daran anschließend wurde im proximalen Anteil des Beobachtungsfensters ein arteriovenöses Bündel der zweiten oder dritten Generation mit einem leicht wiedererkennbaren Verzweigungsmunster aufgesucht. Dieses wurde für 20 Sekunden im 20x Objektiv aufgenommen und ein Videoausdruck angefertigt, um das Bündel an den folgenden Tagen der intravitalmikroskopischen Untersuchungen eindeutig wieder auffinden zu können. Später erfolgte offline aus diesen Aufnahmen die Messung der venulären und arteriolären Erythrozytenfließgeschwindigkeit sowie des jeweiligen Gefäßdurchmessers (s. Abb. 9 B).

Im nächsten Schritt wurden direkt um das Gefäßbündel herum zufällig drei Kapillarfelder ausgewählt und im 20x Objektiv für mindestens 30 Sekunden aufgenommen. Die Position der Kapillarfelder bezogen auf das arteriovenöse Bündel wurde auf einem Auswertungsbogen markiert, um über den gesamten Versuchszeitraum immer die gleichen Kapillarfelder zu analysieren. Aus diesen Aufnahmen erfolgte die Bestimmung von funktioneller Kapillardichte, Durchmesser und Fließgeschwindigkeit der Kapillaren (s. Abb. 9 C).

In Analogie zu den eben beschriebenen Aufnahmen am proximalen Lappenanteil wurden die Aufnahmen nach dem gleichen Schema für den zentralen und distalen Lappenanteil wiederholt.

Abschließend wurden unter Verwendung des Filters für ultraviolettes Licht mittels 63x Wasserimmersionsobjektiv die apoptischen Zellen aufgenommen. Durch das Aufbringen von Bisbenzimid im Rahmen der Lappenpräparation wurden die charakteristischen Zeichen des programmierten Zelltodes – Kondensation, Fragmentation und Margination – sichtbar. Pro Lappenanteil wurden hierbei drei Gesichtsfelder zufällig ausgewählt, durchfokussiert und dabei aufgezeichnet (s. Abb. 9 D).

Die Auswertung erfolgte zeitlich unabhängig von der Mikroskopie offline mit Hilfe eines computergestützten Bild-Analysesystems (CapImage<sup>®</sup>, Dr. Zeintl Software, Heidelberg, Deutschland).

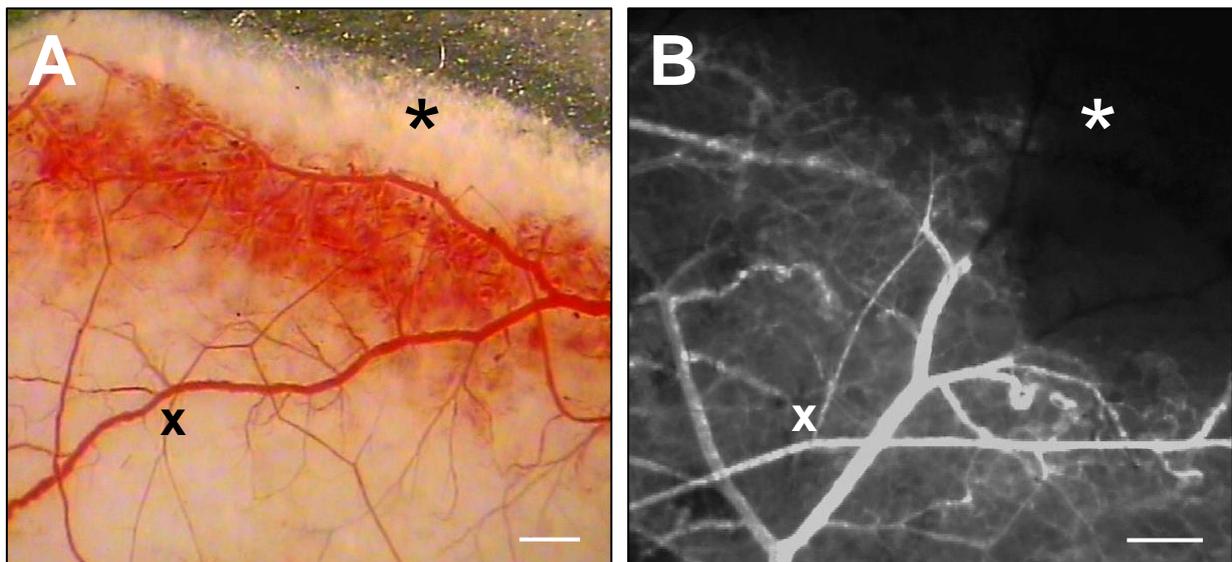


**Abb. 9:** Intravitalmikroskopische Bildgebung. (A) Übersichtsaufnahme im 4x Objektiv zur Auswertung der perfundierten Fläche; Maßstab = 250 $\mu$ m. (B) Arteriovenöses Bündel im 20x Objektiv zur Bestimmung von Erythrozytenfließgeschwindigkeit, Gefäßdurchmesser und Blutfluss in Arteriolen und Venulen; Maßstab = 50 $\mu$ m. (C) Kapillarfeld im 20x Objektiv zur Auswertung von Erythrozytenfließgeschwindigkeit, Gefäßdurchmesser und Blutfluss in den Kapillaren sowie funktioneller Kapillardichte; Maßstab = 50 $\mu$ m. (D) Darstellung der apoptotischen Zellen mit Hilfe des 63x Wasserimmersionsobjektives, Maßstab = 10 $\mu$ m.

### 3.3.3 Analyse der Mikrozirkulation

#### Nekrotische Gewebefläche

Der Anteil der nicht mehr durchbluteten Fläche, d.h. der Nekrose, wurde in Prozent der Gesamtgewebefläche angegeben. Hierzu wurden die noch perfundierten Anteile des Lappens des jeweiligen Gesichtsfeldes durch Umrandung markiert und die Fläche bestimmt. Die Flächen all dieser Areale wurden addiert und von der Gesamtfläche des Beobachtungsfensters subtrahiert. Die erhaltenen Werte entsprachen der nicht durchbluteten Gewebefläche bezogen auf die Gesamtgewebefläche (s. Abb. 10).



**Abb. 10:** Übergang von perfundierter (x) zu nicht durchbluteter (\*) Gewebefläche; Maßstab = 250µm. (A) Darstellung in 32facher Vergrößerung mit typischem Übergangsbereich aus hyperämischer Zone und „falx lunatica“. (B) Übersichtsaufnahme im 4x Objektiv bei der intravitalmikroskopischen Darstellung nach Gabe von FITC-Dextran.

#### Gefäßdurchmesser

Der Durchmesser der jeweiligen Gefäße, d.h. Arteriolen, Venulen und Kapillaren, wurde in µm angegeben. Hierzu wurden am stehenden Bild jeweils zwei auf einer senkrechten Linie zur Gefäßwand gegenüberliegende Punkte ausgewählt und deren Abstand bestimmt. Nach einer Wiederholung von sechs bis acht Mal errechnete der Computer das arithmetische Mittel, welches dem durchschnittlichen Gefäßdurchmesser entsprach.

#### Erythrozytenfließgeschwindigkeit

Die Erythrozytenfließgeschwindigkeit (red blood cell velocity, RBCV) wurde in mm/s angegeben. Zur Auswertung wurde die „line shift“ - Methode angewandt. Hierzu wurden die Gefäße zunächst mit einer Messlinie mittig und horizontal zum Gefäßverlauf markiert.

Anschließend wurden durch den Computer über einen Zeitraum von zehn Sekunden Helligkeitsunterschiede registriert und nach Ablauf der zehn Sekunden ein Raster mit Linien unterschiedlicher Helligkeit (verschiedene Grauwerte) angezeigt, das sog. Line-Shift-Diagramm. Hierbei entsprach jede schräge Linie im Diagramm einem Erythrozyten, welcher sich während der Aufnahmezeit entlang der Messlinie bewegt hat. Die Steigung dieser Linien entsprach der Erythrozytenfließgeschwindigkeit in Millimeter pro Sekunde.

### **Volumetrischer Blutfluss**

Der volumetrische Blutfluss wurde für Arteriolen, Venulen und Kapillaren errechnet und in  $\mu\text{l/s}$  angegeben. Hierzu wurde die Gleichung von Gross und Aroesty, die von einer zylindrischen Gefäßform ausgeht, verwendet. Die erhobenen Parameter von Fließgeschwindigkeit ( $V$ ) und Gefäßdurchmesser bzw. Gefäßquerschnitt ( $\pi \cdot r^2$ ) wurden in die Gleichung  $Q = V \cdot \pi \cdot r^2$  integriert und so der individuelle Blutfluss ( $Q$ ) bestimmt.

### **Funktionelle Kapillardichte**

Die funktionelle Kapillardichte (functional capillary density, FCD) wurde in der Einheit  $\text{cm}/\text{cm}^2$  angegeben und entsprach der Länge der mit Erythrozyten perfundierten Kapillaren pro Beobachtungsfeld. Zur Errechnung wurden im proximalen, zentralen und distalen Lappenanteil am ersten Tag der Intravitalmikroskopie jeweils drei Kapillarfelder um das arteriovenöse Bündel herum zufällig ausgewählt, welche über den gesamten Versuchszeitraum beobachtet wurden. Während einer laufenden Aufnahmesequenz wurden die Kapillaren offline mittels CaplImage-Software der Länge nach markiert und der Computer errechnete anschließend die Gesamtlänge pro Gesichtsfeld. Diese entsprach der funktionellen Kapillardichte.

### **Apoptotischer Zelltod**

Die Anzahl der apoptotischen Zellen pro Beobachtungsfenster wurde in  $\text{n}/\text{mm}^2$  angegeben. Die Auszählung der Apoptosen erfolgte am stehenden Bild in jeweils drei Beobachtungsfeldern des proximalen, zentralen und distalen Lappenanteils. Die apoptotischen Zellen konnten durch die charakteristischen morphologischen Veränderungen der Zellkerne, z.B. Kondensation und Fragmentation des Chromatins, identifiziert werden und erschienen als intensiv mit Bisbenzimid angefärbte und helleuchtende Punkte.

**Übersicht der erhobenen Messparameter**

| Messparameter                                   | Einheit                 |
|---|-------------------------|
| Nekrotische Gewebefläche                        | % der Gesamtfläche      |
| Gefäßdurchmesser art./ven./kap.                 | $\mu\text{m}$           |
| Erythrozytenfließgeschwindigkeit art./ven./kap. | mm/s                    |
| Volumetrischer Blutfluss art./ven./kap.         | pl/s                    |
| Funktionelle Kapillardichte                     | $\text{cm}/\text{cm}^2$ |
| Apoptotischer Zelltod                           | $\text{n}/\text{mm}^2$  |

**Tab. 3:** Übersicht über die während der Intravitalmikroskopie erhobenen Messparameter und deren Einheiten

**3.3.4 Analyse der Blutwerte**

Die Analyse der Blutwerte erfolgte im Zentrallabor des Universitätsklinikum des Saarlandes. Sowohl Gesamtcholesterin als auch Triglyceride wurden mit Hilfe eines enzymatischen colorimetrischen Tests (F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz) an einem modularen Analysegerät (Cobas<sup>®</sup> 8000, F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz) bestimmt. Die Angabe der Konzentration im Serum erfolgte in mg/dl.

Das Testprinzip der Cholesterinbestimmung folgte der CHOD-PAP-Methode, einem enzymatischen in-vitro Test. Ein großer Teil des Gesamtcholesterins liegt verestert vor. Dieser Anteil wurde zunächst durch eine Cholesterinesterase in freies Cholesterin und Fettsäuren gespalten. Durch die Cholesterinoxidase (CHOD) wurde anschließend das freie Cholesterin unter Sauerstoffverbrauch oxidiert, wobei Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) entstand. Aus  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 4-Aminophenazon (PAP) und Phenol entstand nun in einer Peroxidase-katalysierten Reaktion ein roter Farbstoff. Dessen Farbintensität wurde photometrisch bestimmt und war direkt proportional zur Konzentration des Gesamtcholesterins [F. Hoffmann-La Roche AG 2011].

Zur Bestimmung der Triglyceridkonzentration im Serum der Mäuse wurde die GPO-PAP-Methode angewandt. Im ersten Schritt wurden dabei die Triglyceride durch die Lipoproteinlipase zu Glycerin hydrolysiert. Das entstandene freie Glycerin wurde zunächst durch eine Glycerokinase in  $\alpha$ -Glycerophosphat umgewandelt und anschließend durch die Glycerophosphatoxidase (GPO) zu Dihydroxyacetonphosphat oxidiert, wobei Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) entstand. In Analogie zur Cholesterinbestimmung entstand in einer Peroxidase-katalysierten Reaktion aus  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 4-Aminophenazon (PAP) und 4-Chlorphenol ein roter Farbstoff, dessen photometrisch bestimmte Intensität direkt proportional zur Triglyceridkonzentration war [F. Hoffmann-La Roche AG 2012].

## **3.4 Datenauswertung, -erfassung und Statistik**

### **3.4.1 Datenauswertung**

Zur Auswertung der während der Intravitalmikroskopie auf DVD festgehaltenen Daten wurde ein computergestütztes Auswertungssystem mit dem Programm CapImage<sup>®</sup> (Dr. Zeintl Software, Heidelberg, Deutschland) verwendet [Klyscz, Jünger et al. 1997]. Hierbei wurden die aufgenommenen Bilder von einem DVD-Rekorder über einen analogen oder einen digitalen Framegrabber (Bildfangschaltung) eingelesen und mit Hilfe der CapImage<sup>®</sup> Software ausgewertet. Dies ermöglichte eine von der Mikroskopie zeitlich unabhängige Auswertung der Daten.

### **3.4.2 Datenerfassung**

Die Datenerfassung erfolgte sowohl während den intravitalmikroskopischen Untersuchungen, als auch während der offline Datenauswertung am CapImage<sup>®</sup>-System auf eigens dafür angefertigten Erfassungsbögen. Die Daten wurden anschließend in ein Tabellenkalkulationsprogramm (Excel, Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) übertragen und in digitaler Form gespeichert. Die Angabe sämtlicher Werte erfolgte als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes (Mittelwert  $\pm$  SEM).

### **3.4.3 Statistische Bearbeitung**

Die Berechnung sämtlicher statistischer Signifikanzen erfolgte mit dem Programm Sigma Plot (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland). Zum Vergleich der einzelnen Behandlungsgruppen untereinander sowie mit der Kontrollgruppe zu verschiedenen Zeitpunkten kam bei vorliegender Normalverteilung die „one way analysis of variance for multiple comparisons“ (ANOVA) zum Einsatz. Als post-hoc-Test wurde der Student-Newman-Keuls-Test (SNK-Test) verwendet, der eine Korrektur des  $\alpha$ -Fehlers entsprechend Bonferroni beinhaltet. Als statistisches Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von  $<0,05$  definiert.

### **3.4.4 Graphische Darstellung**

Zur graphischen Darstellung der erhobenen Daten wurde ebenfalls das Programm Sigma Plot (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) verwendet. Alle Werte wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (Mittelwert  $\pm$  SEM) angegeben.

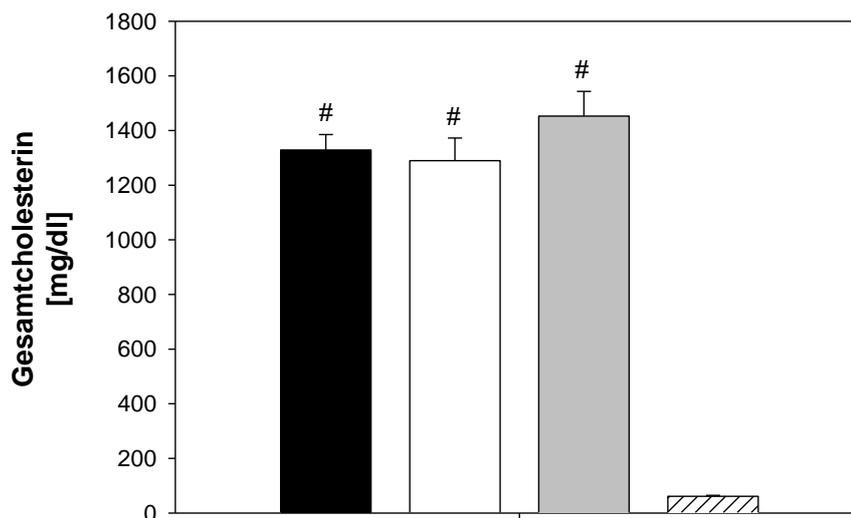
## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 Simvastatin und Theophyllin

#### 4.1.1 Lipidwerte

##### Gesamtcholesterin

Unabhängig von der Art der medikamentösen Vorbehandlung wiesen alle ApoE-defizienten Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen ein signifikant erhöhtes Gesamtcholesterin auf ( $p < 0,001$ ). Die Cholesterinwerte betragen bei den C57BL/6-Mäusen im Mittel  $61,4 \pm 3,6$  mg/dl, während die Konzentrationen bei den ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen 21- bis 24-fach höher lagen. Zwischen den einzelnen Gruppen ApoE-defizienter Tiere, welche mit Simvastatin ( $1289,7 \pm 82,7$  mg/dl), Theophyllin ( $1452,5 \pm 90,6$  mg/dl) und NaCl ( $1328,7 \pm 56,7$  mg/dl) präkonditioniert wurden, bestanden keine signifikanten Unterschiede (s. Abb. 11).

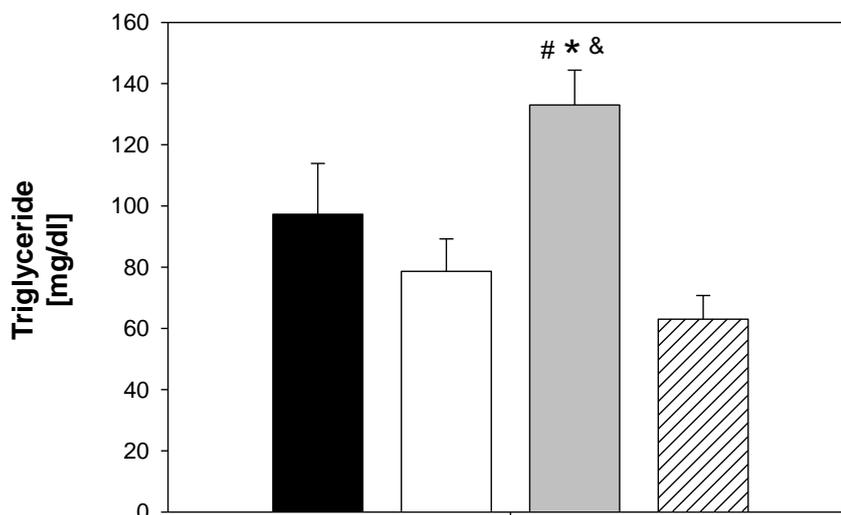


**Abb. 11:** Gesamtcholesterin-Konzentrationen in mg/dl an Tag 10 der Versuchsreihe im Serum von ApoE-Knockout-Mäusen nach Präkonditionierung mit NaCl (schwarzer Balken), Simvastatin (weißer Balken) und Theophyllin (grauer Balken) sowie von unbehandelten C57BL/6-Mäusen (gestreifter Balken). Mittelwert  $\pm$  SEM, # $p < 0,001$  vs. C57BL/6.

##### Triglyceride

Bei der mit Theophyllin behandelten Gruppe ApoE-defizienter Tiere ( $133,0 \pm 11,4$  mg/dl) bestand im Vergleich zu unbehandelten C57BL/6-Mäusen ( $63,0 \pm 7,8$  mg/dl) sowie zu den mit NaCl ( $97,3 \pm 16,6$  mg/dl) und Simvastatin ( $78,6 \pm 10,6$  mg/dl) präkonditionierten Mäusen ein signifikanter Unterschied in den Triglycerid-Konzentrationen ( $p < 0,05$ ). Die Wildtyp-Mäuse

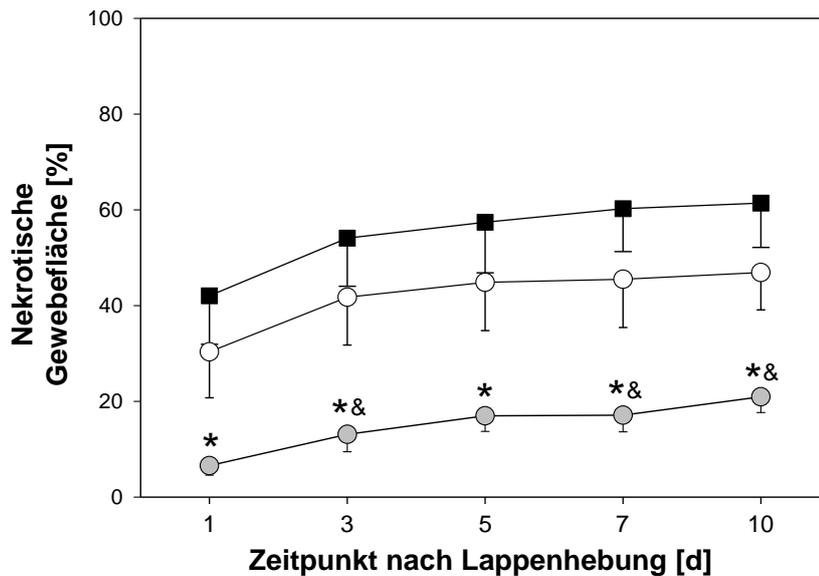
wiesen insgesamt die geringsten Triglycerid-Konzentrationen auf, allerdings waren die Unterschiede zu den mit Simvastatin und NaCl behandelten Gruppen nicht signifikant verschieden (s. Abb. 12).



**Abb. 12:** Triglycerid-Konzentrationen in mg/dl an Tag 10 der Versuchsreihe im Serum von ApoE-Knockout-Mäusen nach Präkonditionierung mit NaCl (schwarzer Balken), Simvastatin (weißer Balken) und Theophyllin (grauer Balken) sowie von unbehandelten C57BL/6-Mäusen (gestreifter Balken). Mittelwert  $\pm$  SEM, # $p < 0,001$  vs. C57BL/6, \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle, & $p < 0,05$  vs. Simvastatin.

#### 4.1.2 Nekrotische Gewebefläche

In der Kontrollgruppe zeigte sich bereits initial ein Perfusionsausfall von 42% der Gesamtgewebefläche, welcher bei anhaltender Ischämie über den Versuchszeitraum von 10 Tagen bis auf 61% zunahm. Auch die mit Simvastatin vorbehandelten Tiere zeigten einen zunehmenden mikrovaskulären Perfusionsausfall, der mit 30% an Tag 1 und 47% an Tag 10 jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe geringer ausfiel. Bei den mit Theophyllin präkonditionierten Mäusen zeigte sich bei einer Lappennekrose von nur 7% an Tag 1 bereits initial eine signifikante Reduktion gegenüber der Kontrollgruppe, welche über den gesamten Beobachtungszeitraum von 10 Tagen aufrechterhalten werden konnte. An Tag 10 betrug die nekrotische Gewebefläche in der Theophyllin-Gruppe lediglich 21%. Theophyllin führte damit gegenüber den mit Simvastatin behandelten Tieren zu einem signifikant geringeren Perfusionsausfall an den Tagen 3, 7 und 10 (s. Abb. 13).



**Abb. 13:** Nekrose in % der Gesamtgewebefläche nach Vorbehandlung mit Theophyllin (graue Kreise), Simvastatin (weiße Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (schwarze Quadrate) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung. Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle, & $p < 0,05$  vs. Simvastatin.

#### 4.1.3 Arteriöläre Fließgeschwindigkeit (aVel)

Die arteriöläre Erythrozytenfließgeschwindigkeit zeigte bei den mit Theophyllin vorbehandelten Tieren in allen Lappenanteilen die höchsten Werte, während sie in der Kontrollgruppe insgesamt am geringsten war.

Im proximalen Lappenanteil gab es innerhalb der Versuchsgruppen keine wesentlichen Unterschiede, lediglich an Tag 7 bestand eine signifikante Erhöhung der aVel der mit Theophyllin behandelten Mäuse gegenüber der Kontrollgruppe (s. Abb. 14 A).

Im zentralen Lappenanteil fand sich in der Theophyllin-Gruppe ab dem 3. Tag eine signifikant höhere aVel gegenüber der Kontrollgruppe. Ab Tag 7 führte auch Simvastatin zu einer signifikant erhöhten arteriölären Erythrozytenfließgeschwindigkeit (s. Abb. 14 B).

Im distalen Lappenanteil zeigte sich an den Tagen 3 bis 5 eine höhere aVel in der Theophyllin-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe, in welcher die arteriöläre Fließgeschwindigkeit über den gesamten Beobachtungszeitraum sehr gering war (s. Abb. 14 C).

#### 4.1.4 Arteriölärer Durchmesser (aDM)

Bei allen Versuchsgruppen fand sich über den Versuchszeitraum von 10 Tagen eine arteriöläre Dilatation, zum Teil nach vorübergehender Konstriktion an den Tagen 3 und 5.

Im proximalen Lappenanteil waren die arteriölen Durchmesser zwischen den einzelnen Gruppen nicht signifikant verschieden (s. Abb. 15 A).

Im zentralen Lappenanteil ergaben sich signifikante Unterschiede in den aDM lediglich an Tag 10. Hier war der arteriöle Durchmesser der Theophyllin-Gruppe signifikant geringer als der aDM der Kontrollgruppe (s. Abb. 15 B).

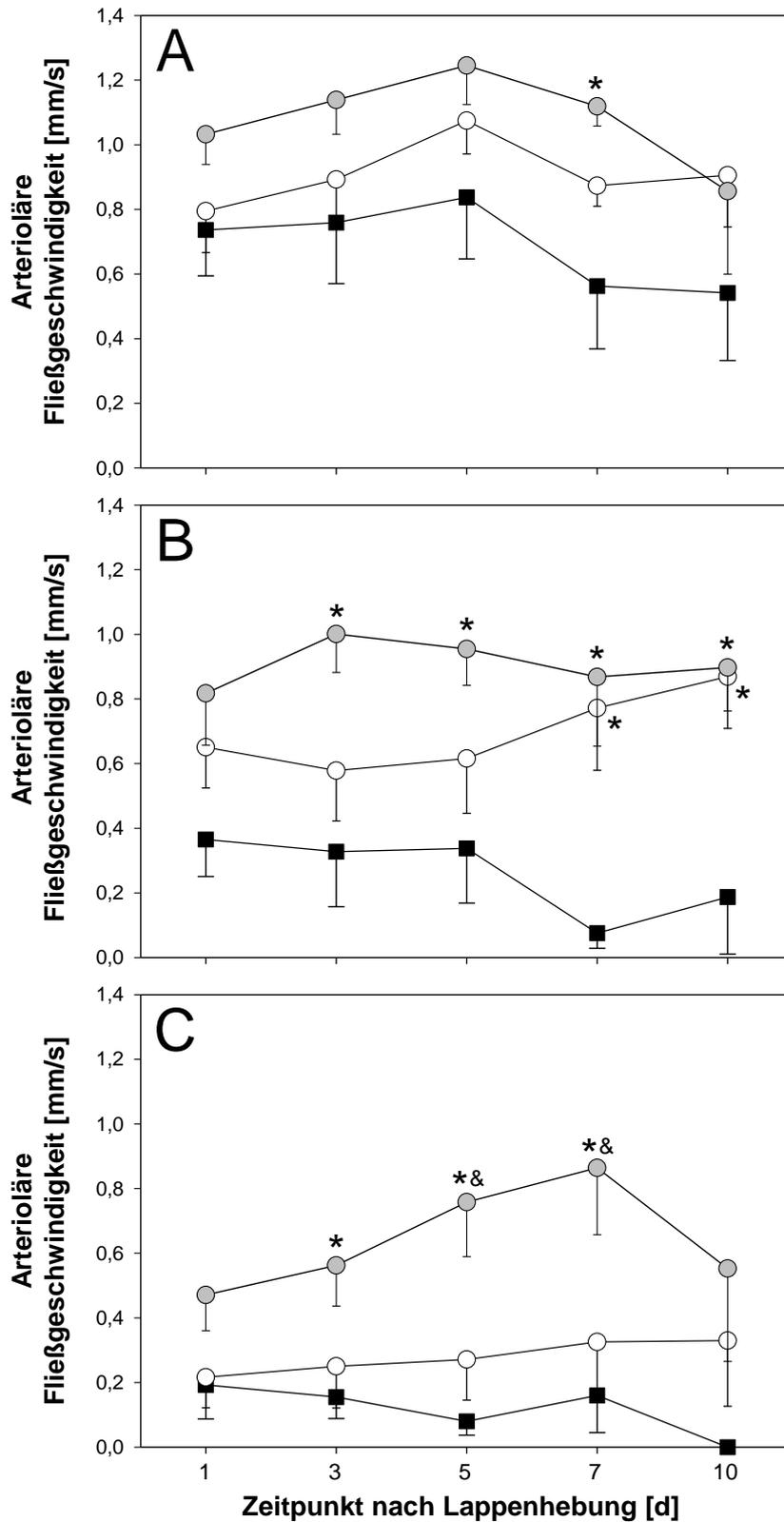
Im distalen Lappenanteil bestand eine signifikante arteriöle Vasokonstriktion an den Tagen 3 und 10 bei den mit Theophyllin sowie mit Simvastatin präkonditionierten Tieren gegenüber den mit NaCl behandelten Mäusen (s. Abb. 15 C).

#### **4.1.5 Arteriöler Blutfluss (aBF)**

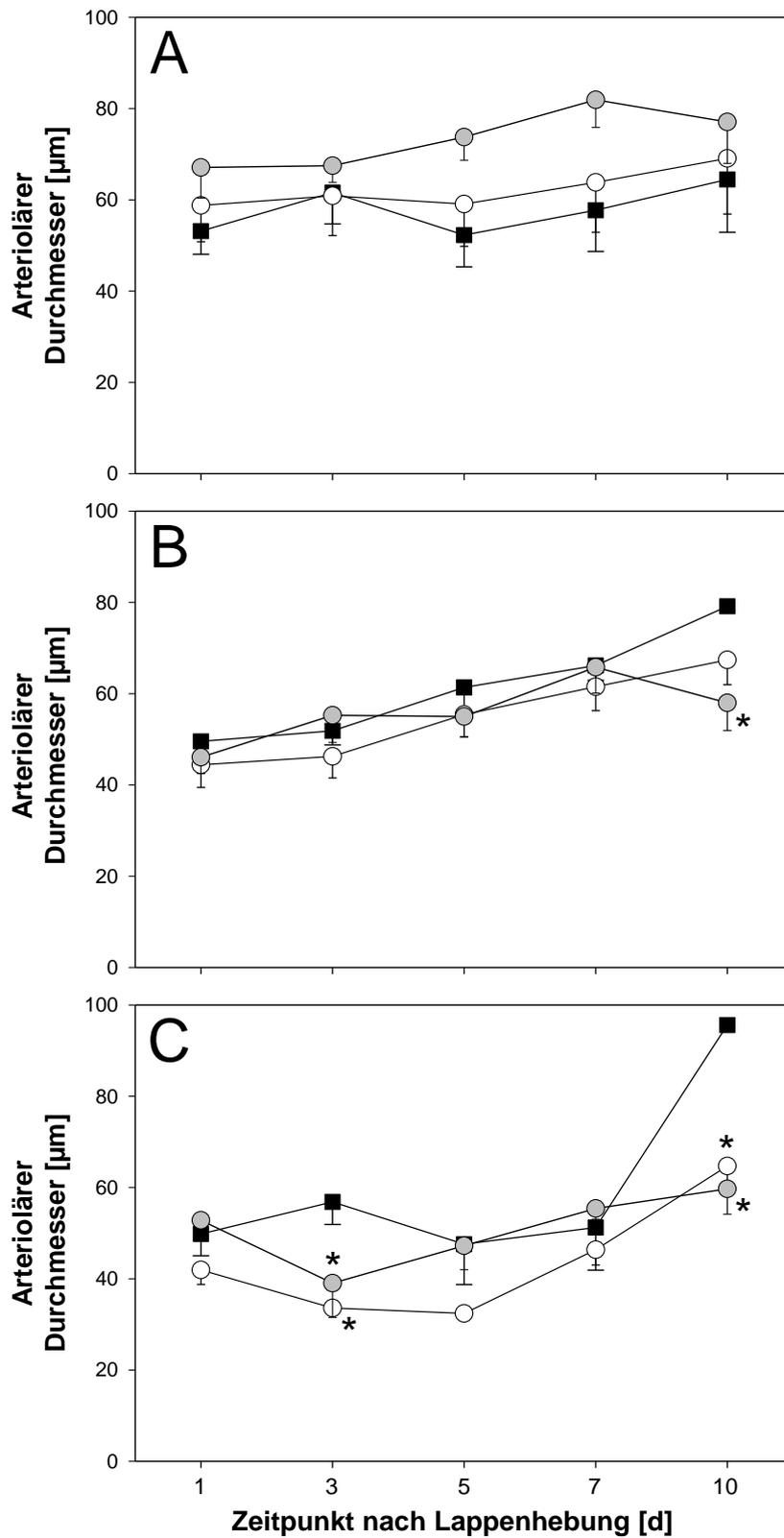
Im proximalen Lappenanteil verlangsamte sich der arteriöle Blutfluss bei der Kontrollgruppe zunehmend, während er in den Behandlungsgruppen zunahm. In der mit Simvastatin behandelten Gruppe war der aBF im Vergleich zur Kontrollgruppe an den Tagen 5 und 7 signifikant erhöht. Die mit Theophyllin behandelten Tiere wiesen den höchsten arteriölen Blutfluss auf, signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe bestanden ebenfalls an den Tagen 5 und 7 (s. Abb. 16 A).

Im zentralen Lappenanteil gab es zwischen den Gruppen keine großen Unterschiede für den aBF, wobei auch hier die Theophyllin-Gruppe insgesamt die höchsten aBF-Werte zeigte (s. Abb. 16 B).

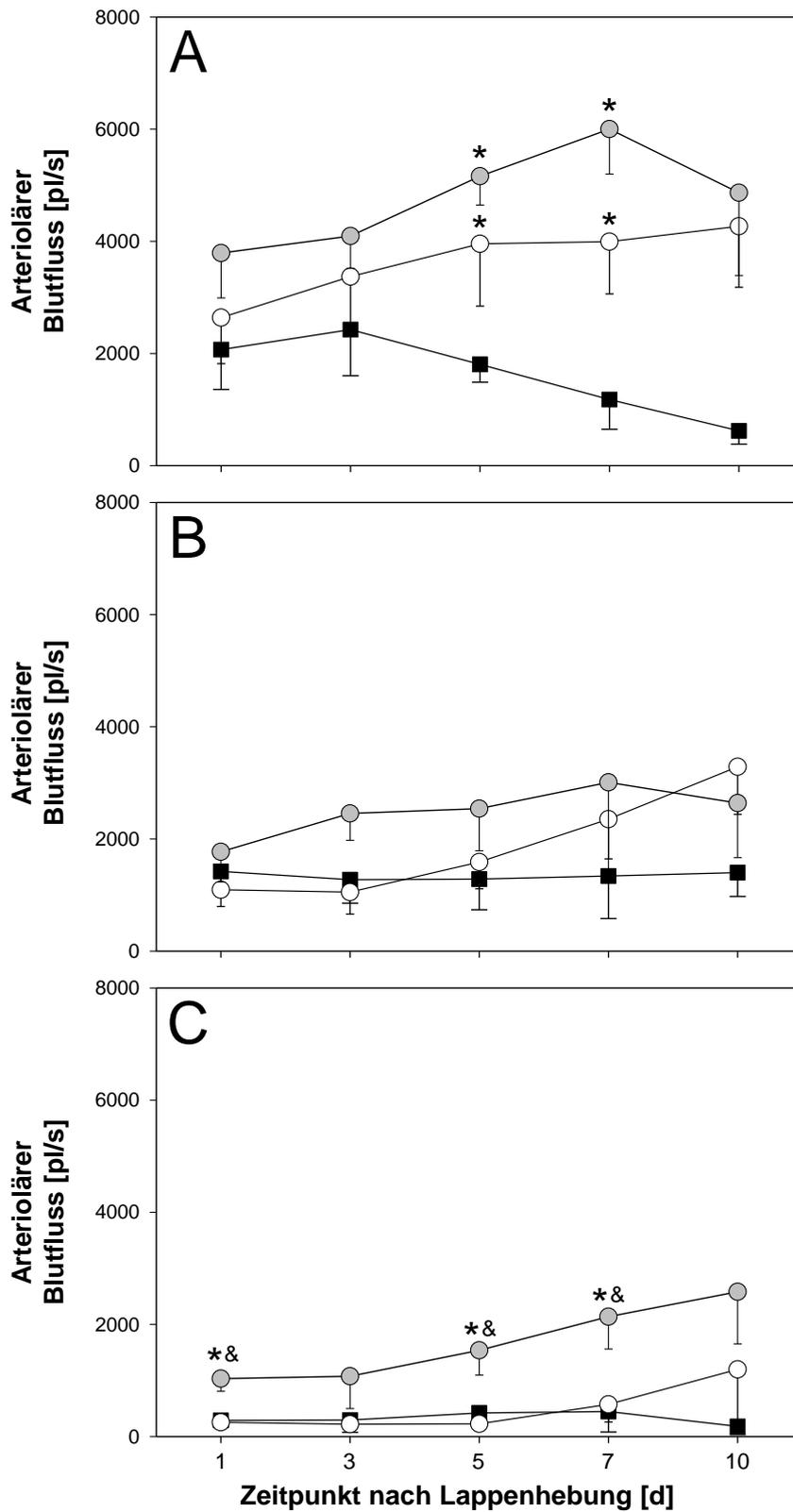
Im distalen Lappenanteil sistierte der arteriöle Blutfluss bei den mit NaCl sowie Simvastatin präkonditionierten Mäusen fast vollständig, während sich bei den mit Theophyllin behandelten Tieren eine zunehmende Steigerung des aBF fand. An den Tagen 1, 5 und 7 bestand damit ein signifikant höherer aBF im Vergleich zur Kontroll- sowie Simvastatin-Gruppe (s. Abb. 16 C).



**Abb. 14:** Arteriöläre Fließgeschwindigkeit in mm/s nach Vorbehandlung mit Theophyllin (graue Kreise), Simvastatin (weiße Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (schwarze Quadrate) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenanteil. Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle, & $p < 0,05$  vs. Simvastatin.



**Abb. 15:** Arteriöler Durchmesser in  $\mu\text{m}$  nach Vorbehandlung mit Theophyllin (graue Kreise), Simvastatin (weiße Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (schwarze Quadrate) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenanteil. Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle.



**Abb. 16:** Arteriolarer Blutfluss in pl/s nach Vorbehandlung mit Theophyllin (graue Kreise), Simvastatin (weiße Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (schwarze Quadrate) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenanteil. Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle, & $p < 0,05$  vs. Simvastatin.

#### 4.1.6 Venuläre Fließgeschwindigkeit (vVel)

Im proximalen Lappenanteil gab es keine Unterschiede in den venulären Fließgeschwindigkeiten der einzelnen Versuchsgruppen. Lediglich an Tag 10 war die vVel der mit Theophyllin präkonditionierten Tiere gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht (s. Abb. 17 A).

Im zentralen Lappenanteil war die Fließgeschwindigkeit in den Venulen der Theophyllin-Gruppe insgesamt am höchsten und an Tag 10 gegenüber den mit NaCl und Simvastatin behandelten Mäusen signifikant erhöht (s. Abb. 17 B).

Im distalen Lappenanteil des muskulokutanen Lappens bestand an Tag 5 der Versuchsreihe ein signifikanter Unterschied der Theophyllin- gegenüber der Kontroll- sowie Simvastatin-Gruppe, bei welchen die Fließgeschwindigkeiten deutlich geringer waren (s. Abb. 17 C).

#### 4.1.7 Venulärer Durchmesser (vDM)

Im proximalen Lappenanteil war der venuläre Durchmesser bei den mit Theophyllin behandelten Tieren über den gesamten Versuchszeitraum am größten. Ab dem 5. Tag war er gegenüber der Kontrollgruppe und an Tag 10 zusätzlich gegenüber der Simvastatin-Gruppe signifikant erhöht. Die Simvastatin-Gruppe zeigte an Tag 10 gegenüber der Kontrolle ebenfalls eine signifikante venuläre Dilatation (s. Abb. 18 A).

Im zentralen Lappenanteil des muskulokutanen Lappen kam es über die Beobachtungszeit von 10 Tagen zu einer starken venulären Dilatation in der Theophyllin-Gruppe, welche am 10. Tag 160% des Ausgangswertes erreichte. Ab dem 5. Tag war diese gegenüber den mit NaCl sowie Simvastatin präkonditionierten Tieren statistisch signifikant (s. Abb. 18 B und Abb. 19).

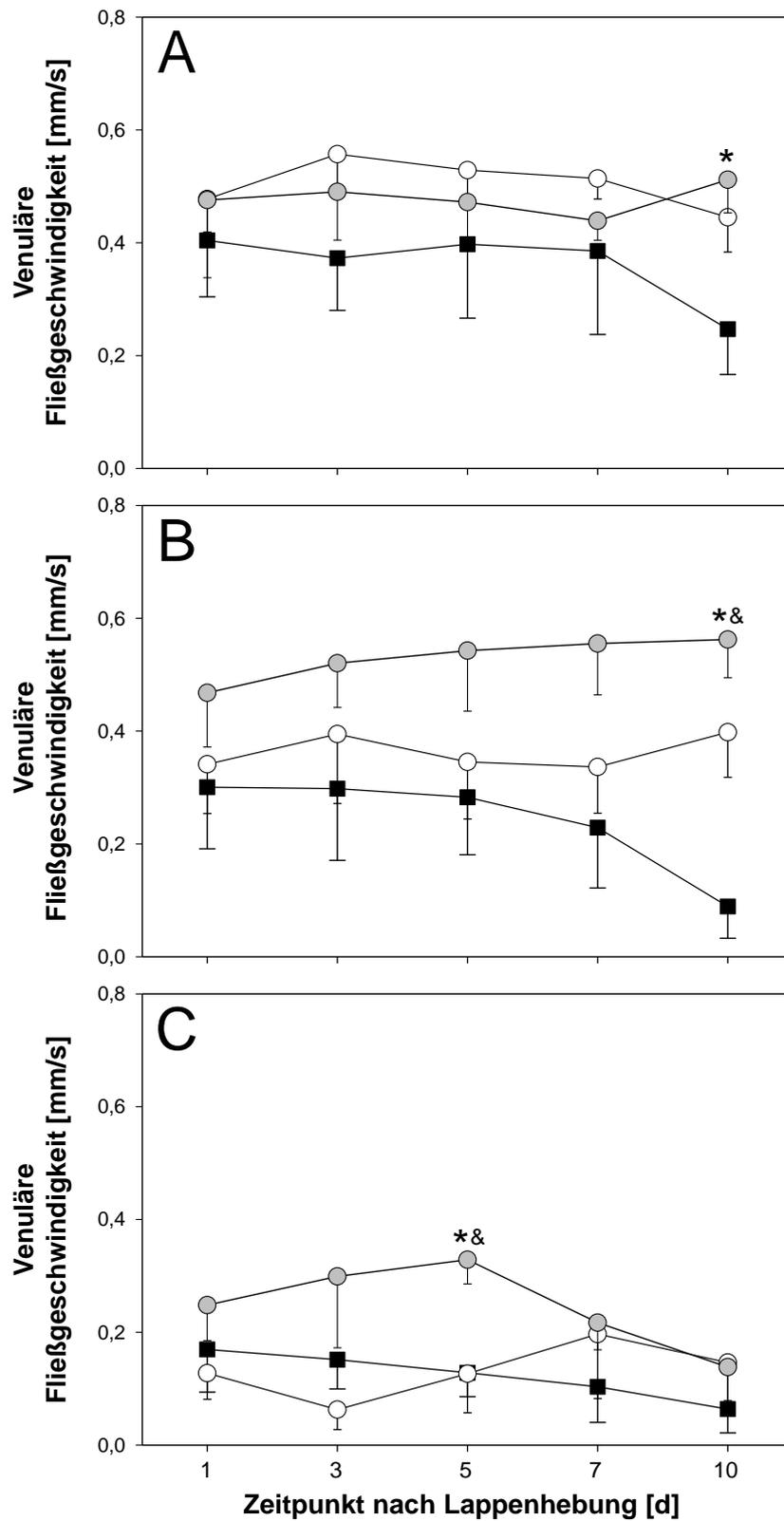
Im distalen Lappenanteil konnte keine venuläre Dilatation oder Konstriktion einer einzelnen Gruppe gegenüber den anderen Versuchsgruppen beobachtet werden (s. Abb. 18 C).

#### 4.1.8 Venulärer Blutfluss (vBF)

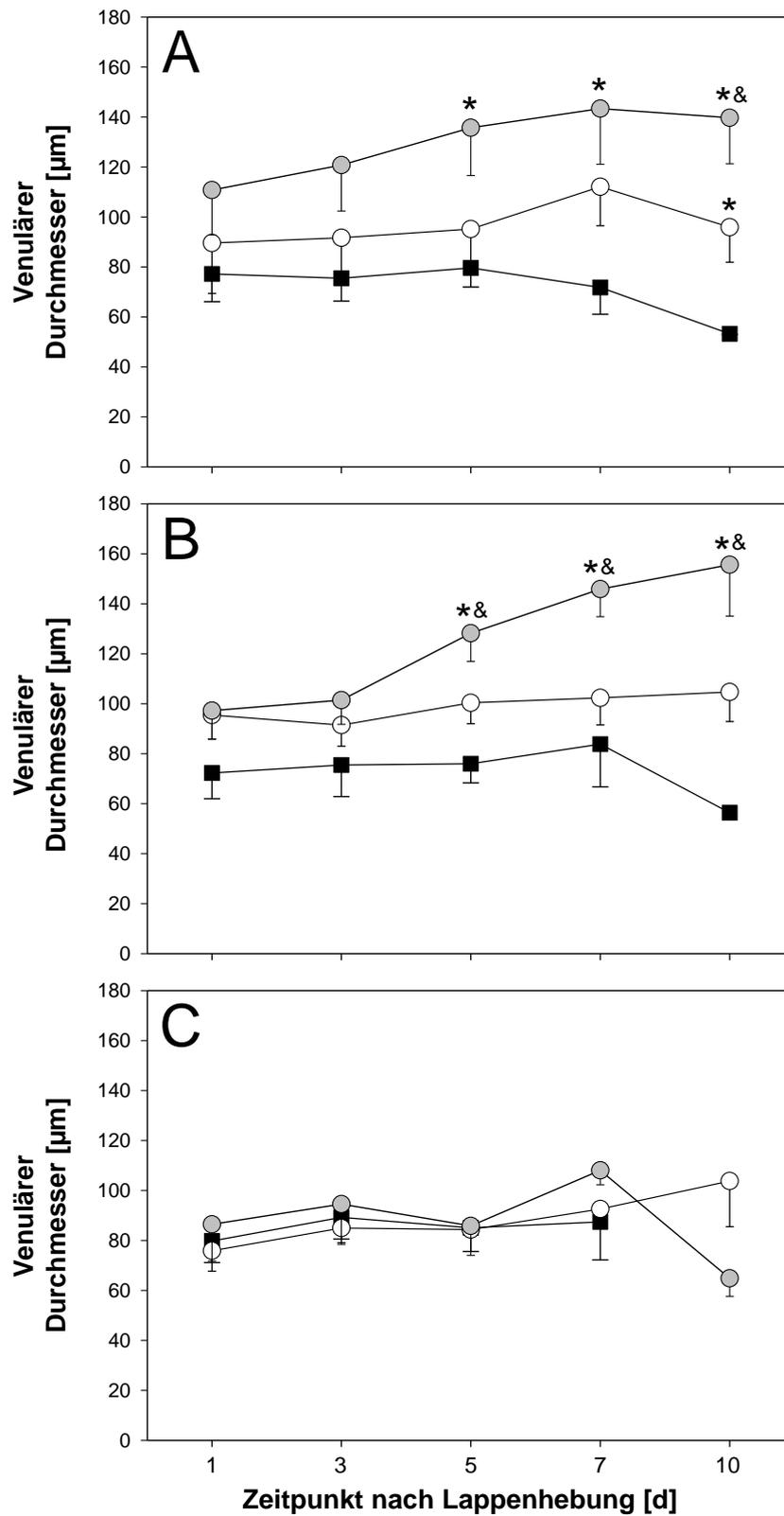
Im proximalen Lappenanteil des muskulokutanen Lappen war der venuläre Blutfluss bei den mit Theophyllin präkonditionierten Tieren über den gesamten Beobachtungszeitraum am größten. An den Tagen 3 und 10 bestand eine signifikante Erhöhung gegenüber den mit NaCl behandelten Mäusen, an Tag 10 zusätzlich gegenüber der Simvastatin-Gruppe. Der vBF der Simvastatin-Gruppe entsprach bis Tag 7 weitestgehend dem vBF der Kontrollgruppe. Am 10. Tag sank der Blutfluss in der Kontrollgruppe jedoch abrupt, während er in der Simvastatin-Gruppe aufrechterhalten werden konnte. Daher bestand hier ein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen (s. Abb. 20 A).

Im zentralen Lappenanteil war der venuläre Blutfluss bei den Kontrolltieren sowie den mit Simvastatin behandelten Tieren insgesamt niedrig. Im Gegensatz dazu stieg bei den mit Theophyllin präkonditionierten Mäusen der vBF kontinuierlich an und betrug an Tag 10 schließlich knapp das 60fache des venulären Blutflusses der Kontrollgruppe. Eine statistisch signifikante Erhöhung bestand sowohl gegenüber der Kontrollgruppe als auch gegenüber der Simvastatin-Gruppe (s. Abb. 20 B).

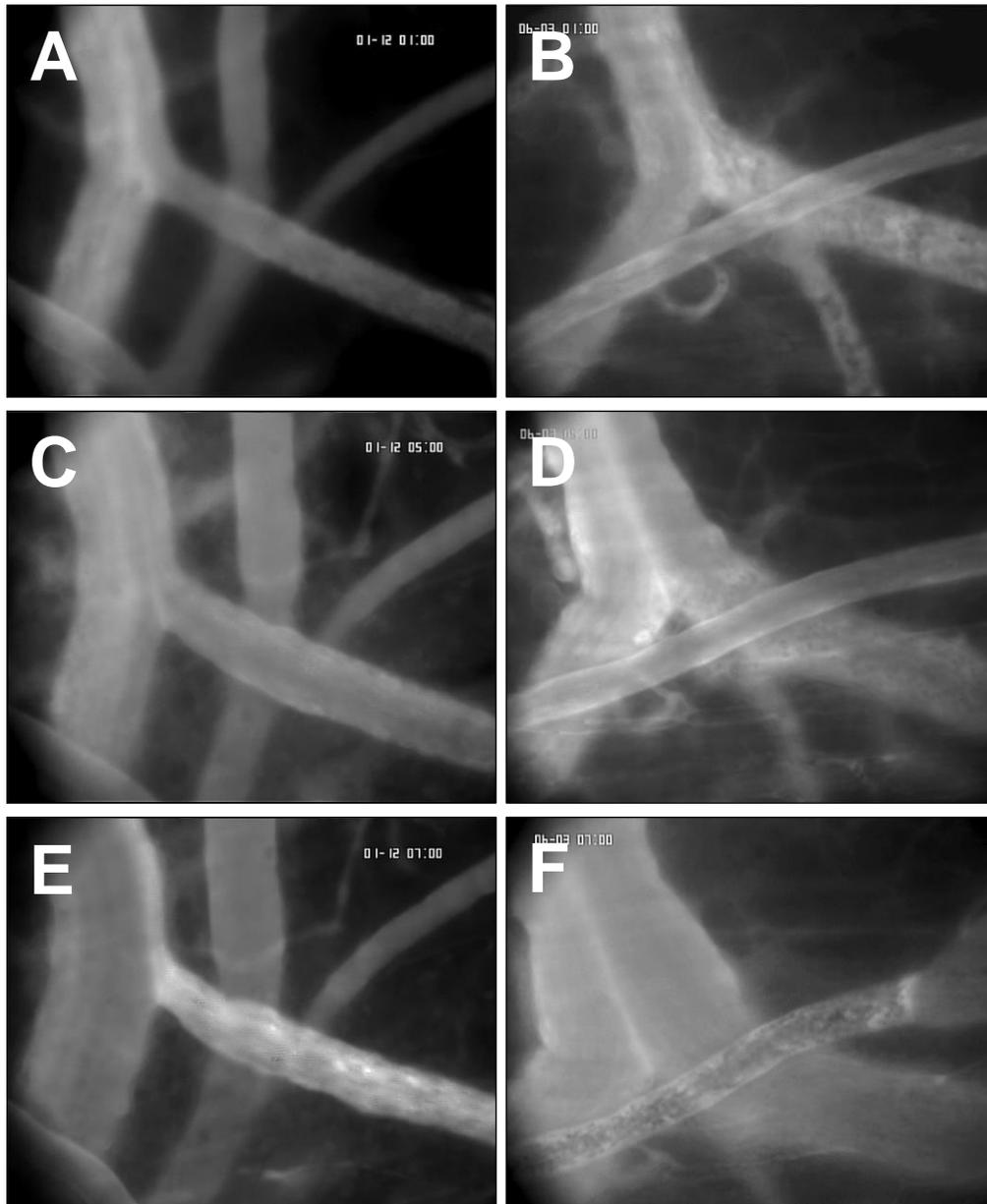
Im distalen Lappenanteil war der Blutfluss in den Venulen an allen Tagen und in allen Gruppen sehr gering. Signifikante Unterschiede konnten hier keine verzeichnet werden (s. Abb. 20 C).



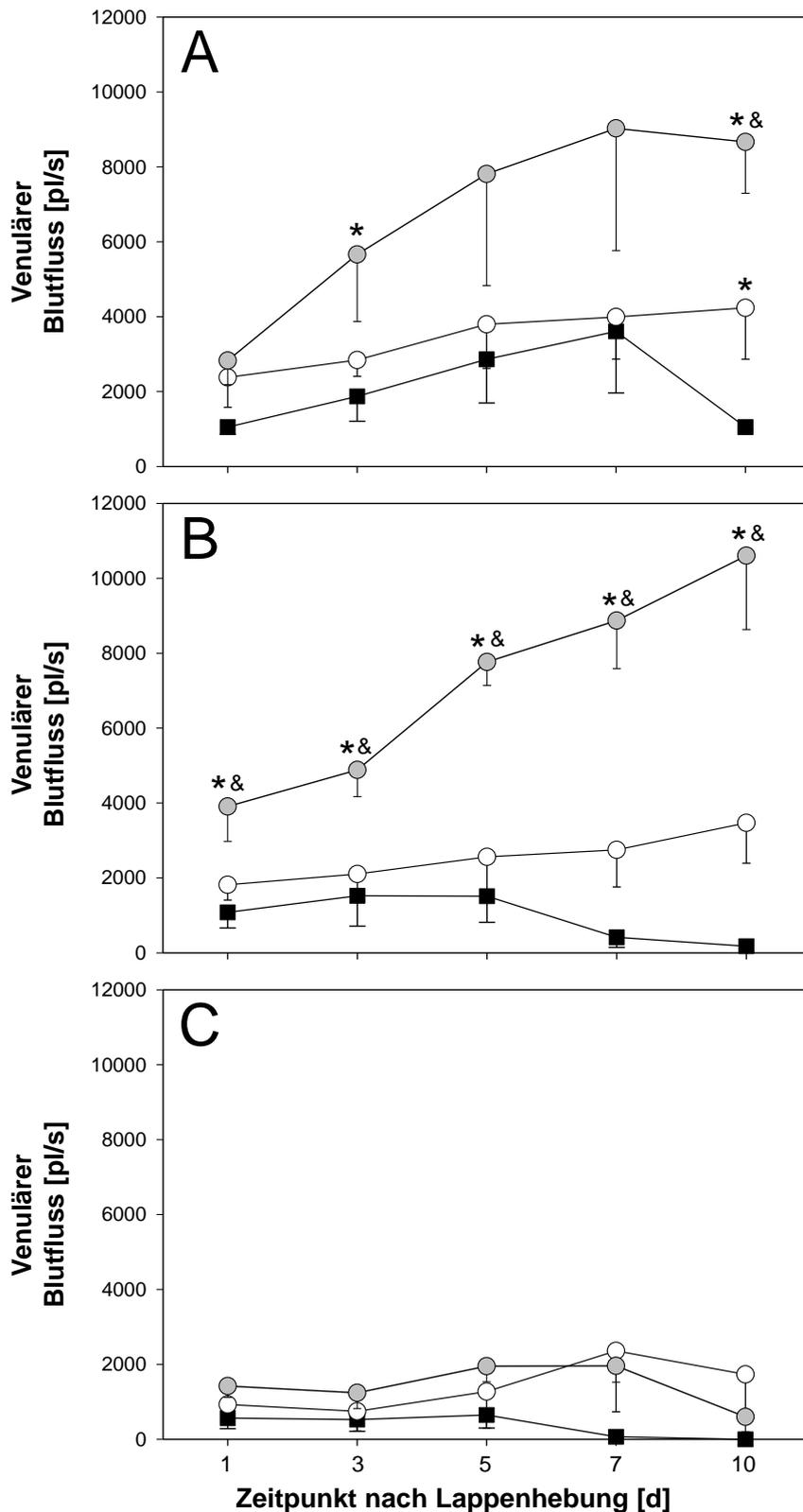
**Abb. 17:** Venuläre Fließgeschwindigkeit in mm/s nach Vorbehandlung mit Theophyllin (graue Kreise), Simvastatin (weiße Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (schwarze Quadrate) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenanteil. Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle, & $p < 0,05$  vs. Simvastatin.



**Abb. 18:** Venulärer Durchmesser in  $\mu\text{m}$  nach Vorbehandlung mit Theophyllin (graue Kreise), Simvastatin (weiße Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (schwarze Quadrate) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenanteil. Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle, & $p < 0,05$  vs. Simvastatin.



**Abb. 19:** Beispielhafte intravitalmikroskopische Bilder eines arteriovenösen Bündels im zentralen Lappenanteil 1 (A, B), 5 (C, D) und 7 (E, F) Tage nach Lappenhebung bei den mit NaCl (A, C, E) und Theophyllin (B, D, F) präkonditionierten Tieren. An Tag 1 nahezu identische venuläre Durchmesser in der Kontroll- (A) sowie Theophyllin-Gruppe (B). An den Tagen 5 und 7 deutliche venuläre Dilatation in der Theophyllin-Gruppe (D, F) gegenüber der Kontrollgruppe (C, E).



**Abb. 20:** Venulärer Blutfluss in pl/s nach Vorbehandlung mit Theophyllin (graue Kreise), Simvastatin (weiße Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (schwarze Quadrate) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenanteil. Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle, & $p < 0,05$  vs. Simvastatin.

#### 4.1.9 Kapillare Fließgeschwindigkeit (kVel)

Im proximalen Lappenanteil war die kapillare Fließgeschwindigkeit bei den Kontrolltieren am niedrigsten und in der Theophyllin-Gruppe am höchsten. Die deutlichsten Unterschiede fanden sich an Tag 5. Hier war die kVel sowohl bei den mit Theophyllin als auch bei den mit Simvastatin behandelten Mäusen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht (s. Abb. 21 A).

Im zentralen Lappenanteil zeigte sich am 10. Tag eine signifikante Erhöhung der Fließgeschwindigkeit in den Kapillaren der Theophyllin- und Simvastatin-Gruppe gegenüber der Kontrolle, bei der die kVel über den gesamten Versuchszeitraum am geringsten war (s. Abb. 21 B).

Im distalen Lappenanteil war die kapillare Fließgeschwindigkeit bei den mit Theophyllin präkonditionierten Tieren an Tag 7 gegenüber der Kontroll- sowie der Simvastatin-Gruppe signifikant erhöht. Bei der Kontrollgruppe konnte an Tag 10 kein kapillarer Fluss mehr gemessen werden, da keine kapillare Durchblutung des distalen Lappenanteils mehr bestand (s. Abb. 21 C).

#### 4.1.10 Kapillarer Durchmesser (kDM)

In allen Lappenanteilen war der kapillare Durchmesser bei den mit Simvastatin behandelten Tieren über den gesamten Beobachtungszeitraum am geringsten.

Im proximalen Lappenanteil des „random pattern flap“ waren die kDM der Theophyllin- und Kontrollgruppe vergleichbar. An den Tagen 1 und 10 bestand in der Theophyllin-Gruppe eine signifikante kapillare Dilatation gegenüber der Simvastatin-Gruppe. Die mit Simvastatin behandelten Mäuse zeigten hingegen eine signifikante kapillare Konstriktion gegenüber der Kontrolle an den Tagen 1 und 5 (s. Abb. 22 A).

Im zentralen Lappenanteil waren die Durchmesser der Kapillaren bei den mit Theophyllin präkonditionierten Tieren an Tag 1 sowie 7 gegenüber der Simvastatin-Gruppe signifikant erhöht. Im Gegensatz dazu fand sich in der Simvastatin-Gruppe eine signifikante kapillare Konstriktion gegenüber der Kontrollgruppe bis einschließlich Tag 7 (s. Abb. 22 B).

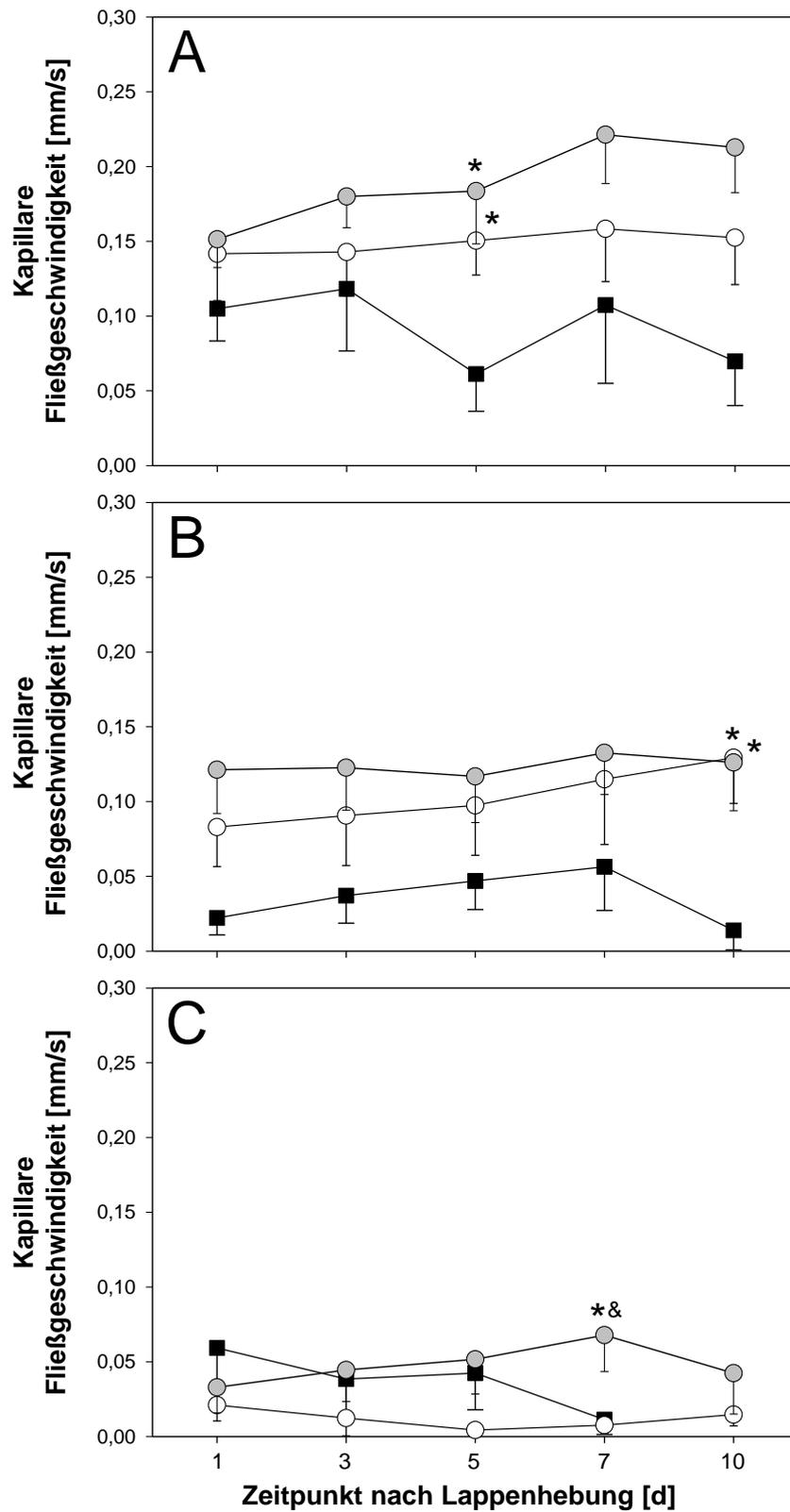
Im distalen Lappenanteil waren die größten Unterschiede in den kDM der einzelnen Gruppen zu beobachten. Auch hier hatte die Simvastatin-Gruppe die geringsten kapillaren Durchmesser, welche an den Tagen 3 und 5 gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erniedrigt waren. Bei den mit Theophyllin präkonditionierten Tieren war der Durchmesser der Kapillaren an Tag 3 gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erniedrigt sowie an den Tagen 5 bis 10 gegenüber der Simvastatin-Gruppe signifikant erhöht. Bei den Kontrolltieren gab es an Tag 10 wiederum keine kapillare Perfusion mehr, weshalb kein kDM bestimmt werden konnte (s. Abb. 22 C).

#### **4.1.11 Kapillarer Blutfluss (kBF)**

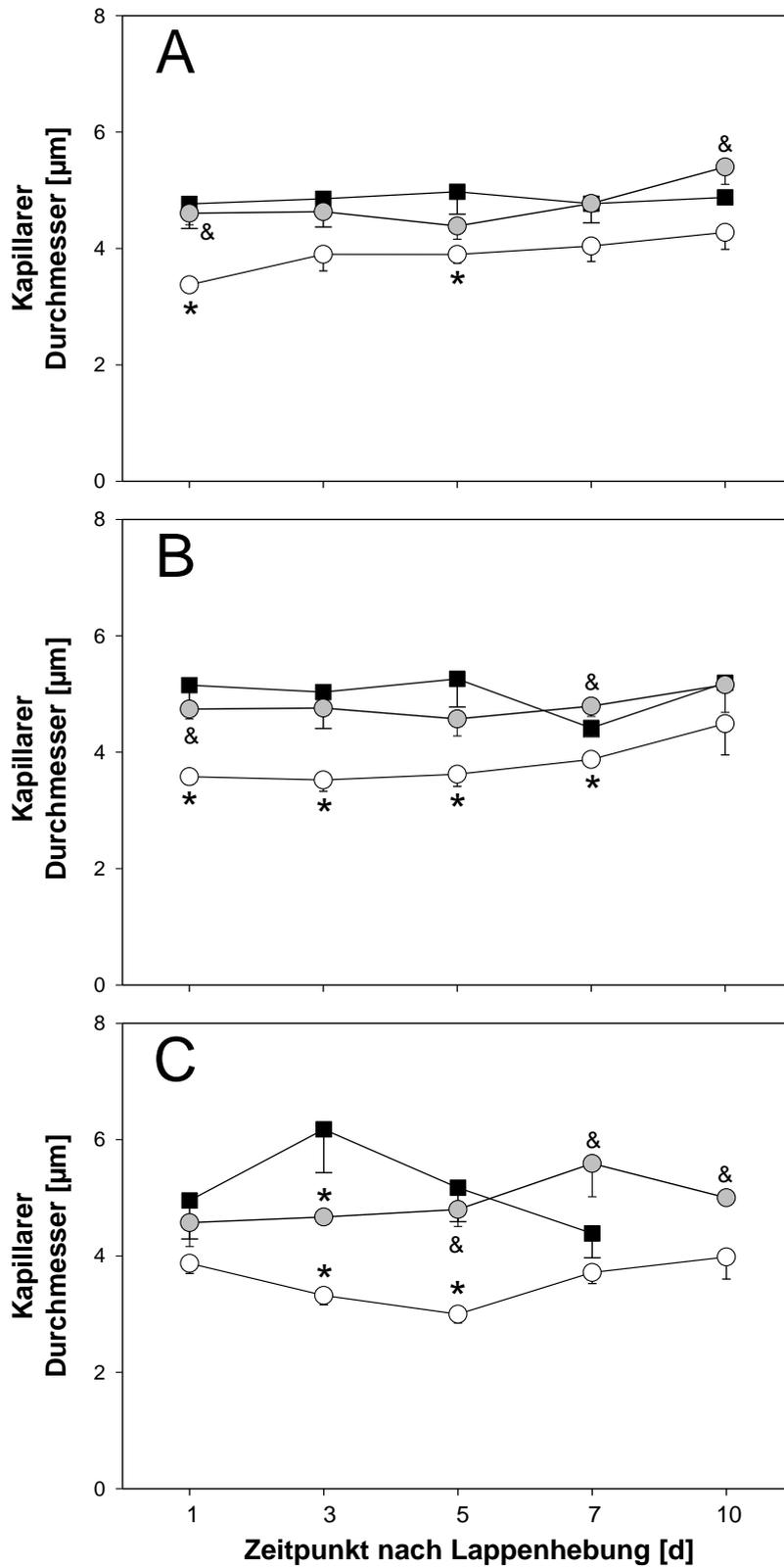
Im proximalen Lappenanteil gab es beim kapillaren Blutfluss keine wesentlichen Unterschiede. Lediglich an Tag 10 bestand in der Theophyllin-Gruppe eine signifikante Erhöhung gegenüber der Kontroll- sowie Simvastatin-Gruppe (s. Abb. 23 A).

Im zentralen Lappenanteil zeigten die mit Theophyllin vorbehandelten Mäuse insgesamt den höchsten kBF. An den Tagen 3 und 10 war er gegenüber der Kontrollgruppe und an Tag 3 zusätzlich gegenüber der Simvastatin-Gruppe signifikant erhöht. Bei den mit Simvastatin präkonditionierten Tieren kam es zu einer allmählichen Zunahme des kapillaren Blutflusses über den Versuchszeitraum, wohingegen bei dem kBF der Kontrollgruppe insgesamt eine Abnahme zu verzeichnen war. Dies resultierte an Tag 10 in einer signifikanten Erhöhung des kBF in der Simvastatin- gegenüber der Kontrollgruppe (s. Abb. 23 B).

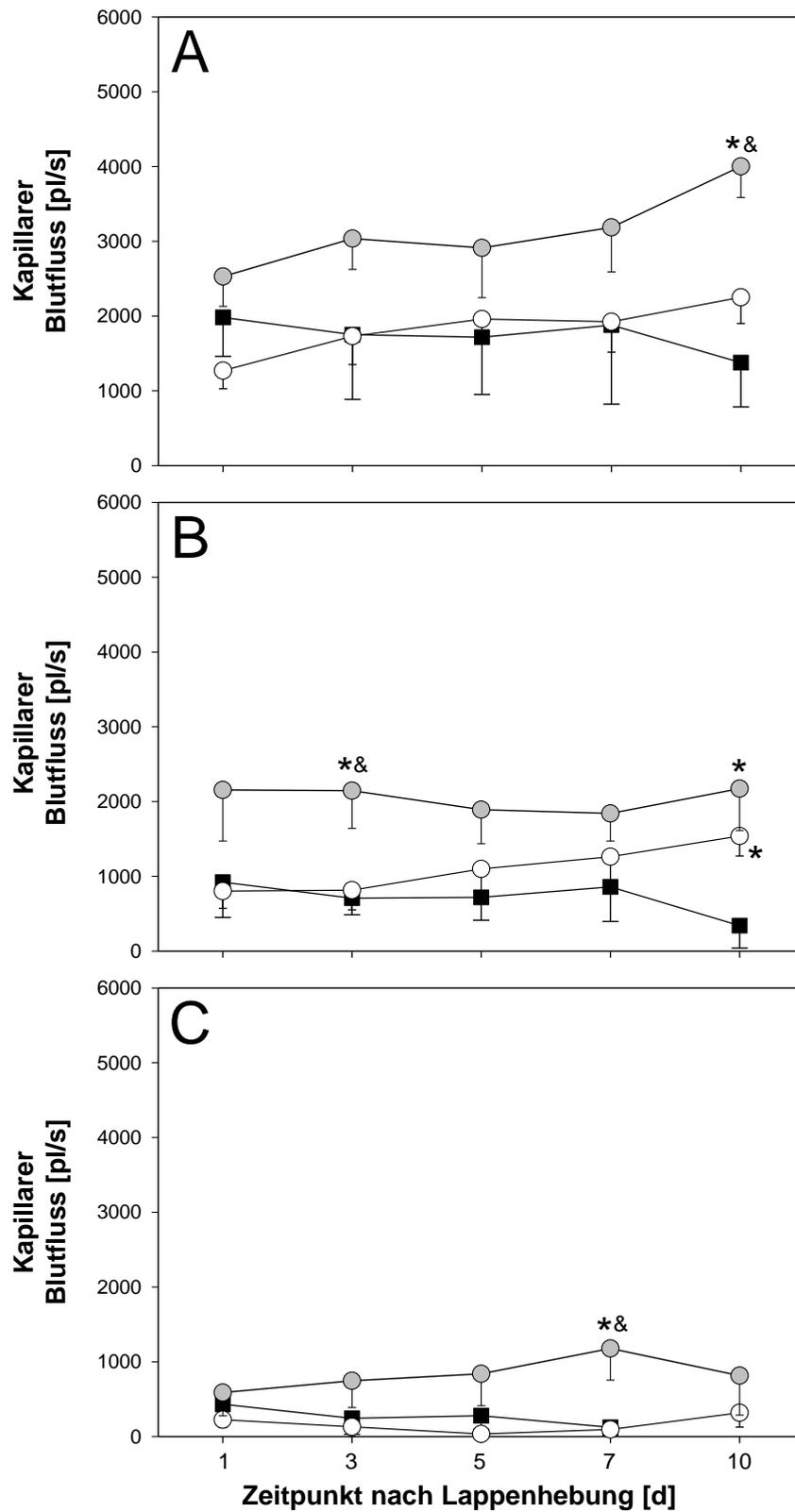
Im distalen Lappenanteil war der Blutfluss ebenfalls in den Kapillaren der Theophyllin-Gruppe am höchsten. An Tag 7 war er signifikant sowohl gegenüber der Kontroll- als auch gegenüber der Simvastatin-Gruppe erhöht. Bei diesen Gruppen sistierte der kapillare Blutfluss nahezu vollständig. An Tag 10 war er in der Kontrollgruppe nicht mehr messbar, da keinerlei kapillare Perfusion mehr bestand (s. Abb. 23 C).



**Abb. 21:** Kapillare Fließgeschwindigkeit in mm/s nach Vorbehandlung mit Theophyllin (graue Kreise), Simvastatin (weiße Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (schwarze Quadrate) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenanteil. Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle, & $p < 0,05$  vs. Simvastatin.



**Abb. 22:** Kapillarer Durchmesser in µm nach Vorbehandlung mit Theophyllin (graue Kreise), Simvastatin (weiße Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (schwarze Quadrate) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenanteil. Mittelwert ± SEM, \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle, & $p < 0,05$  vs. Simvastatin.



**Abb. 23:** Kapillarer Blutfluss in pl/s nach Vorbehandlung mit Theophyllin (graue Kreise), Simvastatin (weiße Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (schwarze Quadrate) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenanteil. Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle, <sup>&</sup> $p < 0,05$  vs. Simvastatin.

#### 4.1.12 Funktionelle Kapillardichte (FCD)

In allen Lappenanteilen zeigte sich in der Theophyllin-Gruppe die höchste funktionelle Kapillardichte als Maß für die nutritive Perfusion.

Im proximalen Lappenanteil sank die FCD in allen Behandlungsgruppen über den Versuchszeitraum. Die Kontrollgruppe zeigte insgesamt die niedrigste funktionelle Kapillardichte. Die mit Theophyllin präkonditionierten Tiere hatten bereits initial eine bessere FCD, an den Tagen 3, 5 und 10 war diese dann signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht, an Tag 3 zusätzlich gegenüber der Simvastatin-Gruppe. An Tag 10 zeigte die Simvastatin-Gruppe ebenfalls eine statistisch signifikante Erhöhung der FCD gegenüber der Kontrolle (s. Abb. 24 A).

Im zentralen Lappenanteil zeigte die funktionelle Kapillardichte die größte Spannweite zwischen den einzelnen Gruppen. An den Tagen 1 bis 7 war die FCD bei den mit NaCl und Simvastatin behandelten Tieren nahezu identisch, wobei sie an Tag 10 in der Simvastatin-Gruppe anstieg, während sie in der Kontrolle weiter sank. In der Theophyllin-Gruppe war die funktionelle Kapillardichte an allen Tagen deutlich höher als bei den anderen beiden Gruppen. Eine statistische Signifikanz bestand an den Tagen 3, 5 und 10 gegenüber der Kontroll- sowie Simvastatin-Gruppe (s. Abb. 24 B).

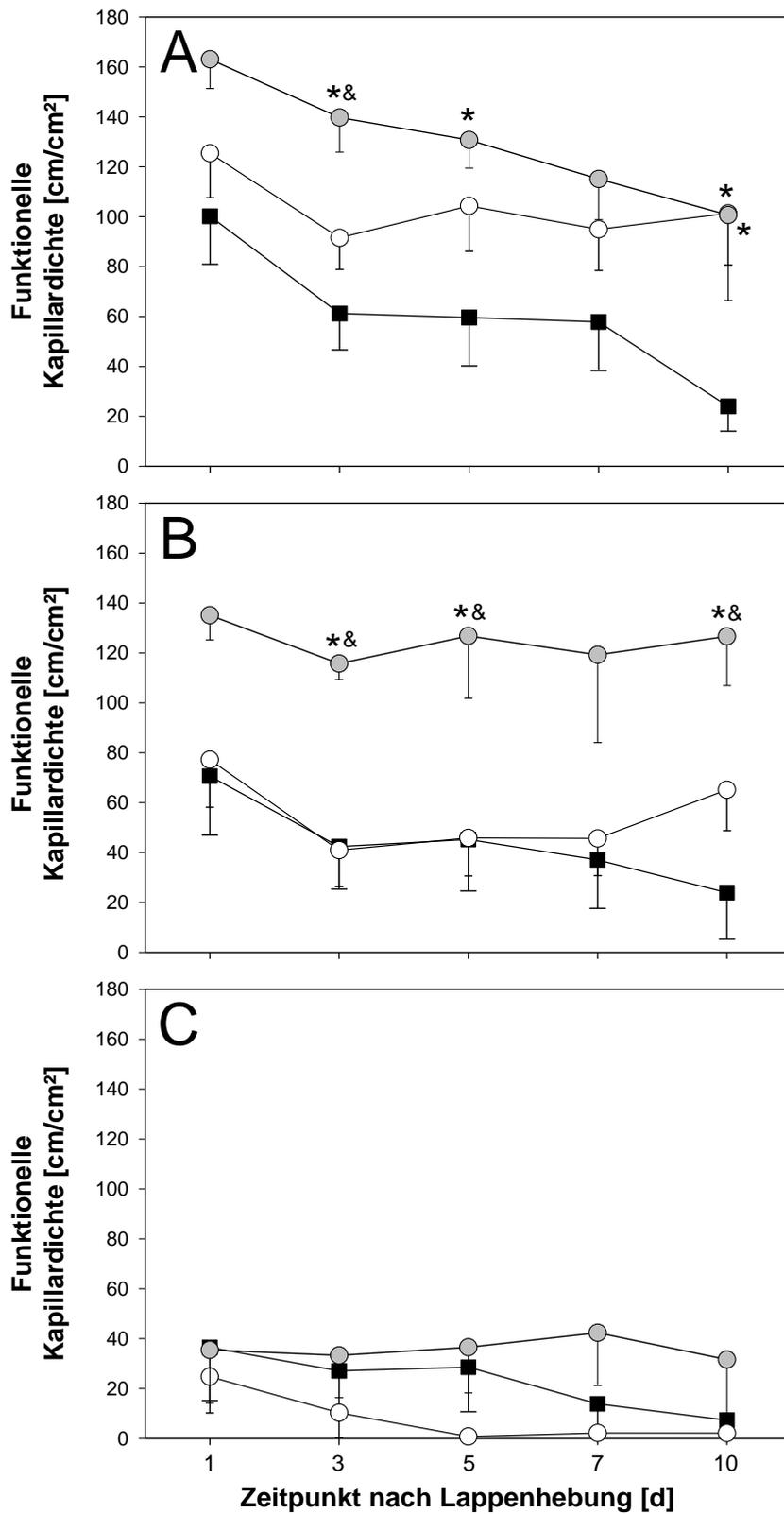
Im distalen Lappenanteil war die FCD bei allen Versuchsgruppen insgesamt gering. Statistisch signifikante Unterschiede konnten nicht verzeichnet werden (s. Abb. 24 C).

#### 4.1.13 Apoptotischer Zelltod

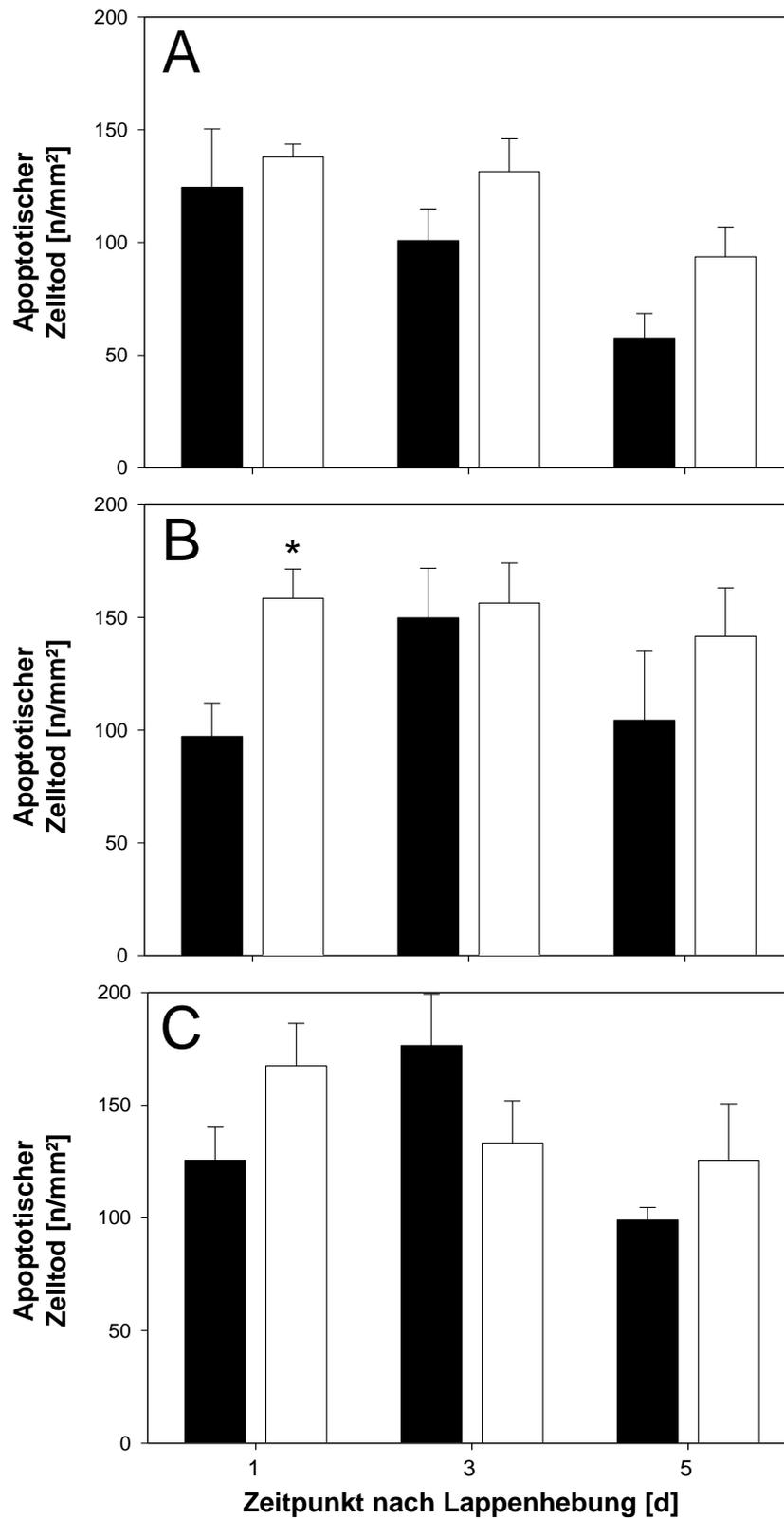
Im proximalen Lappenanteil zeigten sich bei der Anzahl der apoptotischen Zellen pro mm<sup>2</sup> Gewebe zwischen den mit NaCl und Simvastatin behandelten Tieren keine signifikanten Unterschiede, auch wenn die Anzahl apoptotischer Zellen in der Simvastatin-Gruppe insgesamt etwas höher lag (s. Abb. 25 A).

Im zentralen Lappenanteil war die Anzahl der apoptischen Zellen in der Simvastatin-Gruppe an Tag 1 signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. An den Tagen 3 und 5 bestanden keine wesentlichen Unterschiede (s. Abb. 25 B).

Im distalen Lappenanteil bestanden zwischen der Kontrolle und den mit Simvastatin präkonditionierten Mäusen keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl apoptotischer Zellen (s. Abb. 25 C).



**Abb. 24:** Funktionelle Kapillardichte in  $\text{cm}/\text{cm}^2$  nach Vorbehandlung mit Theophyllin (graue Kreise), Simvastatin (weiße Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (schwarze Quadrate) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenanteil. Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle, & $p < 0,05$  vs. Simvastatin.



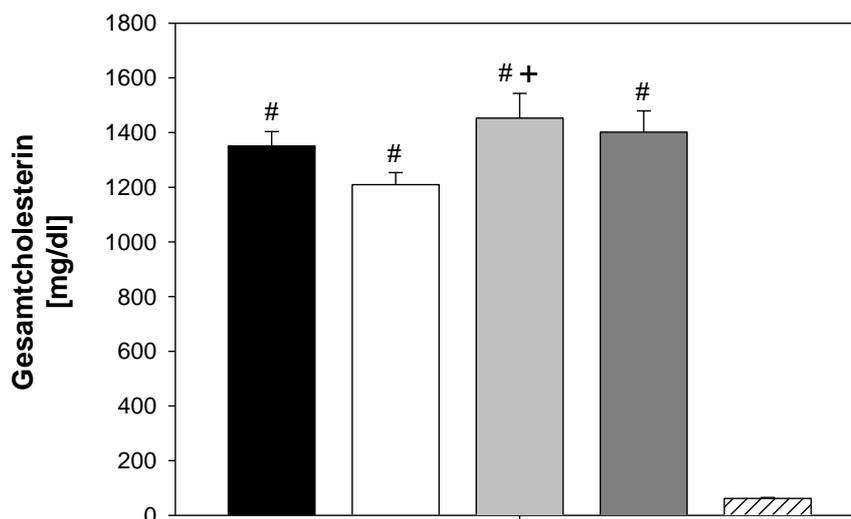
**Abb. 25:** Anzahl apoptotischer Zellen pro mm<sup>2</sup> Gewebe nach Vorbehandlung mit Simvastatin (weiße Balken) sowie nach NaCl-Behandlung (schwarze Balken) 1, 3 und 5 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenanteil. Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

## 4.2 Spezifische Inhibition der PDE 3, 4 und 5

### 4.2.1 Lipidwerte

#### Gesamtcholesterin

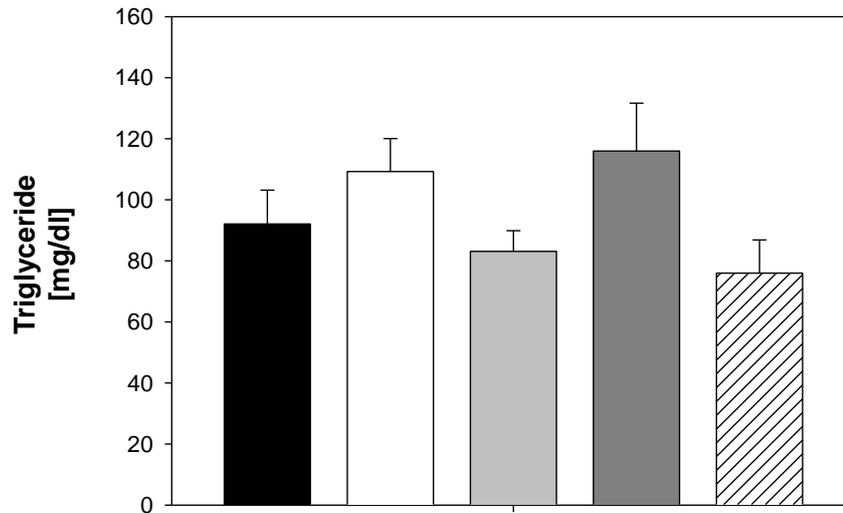
In Abbildung 26 sind die Gesamtcholesterin-Konzentrationen im Serum der mit Cilostazol, Rolipram, Sildenafil und NaCl behandelten ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu unbehandelten Wildtyp-Mäusen dargestellt. Alle Gruppen ApoE-defizienter Tiere wiesen – unabhängig von der Art der medikamentösen Vorbehandlung – ein im Vergleich zu den C57BL/6-Mäusen 20- bis 25-fach und damit signifikant erhöhtes Gesamtcholesterin auf ( $p < 0,001$ ). Die Rolipram-Gruppe wies zudem gegenüber der Cilostazol-Gruppe ein signifikant erhöhtes Gesamtcholesterin auf. Zwischen den restlichen Gruppen der ApoE-defizienten Tiere konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (s. Abb. 26).



**Abb. 26:** Gesamtcholesterin-Konzentrationen in mg/dl an Tag 10 der Versuchsreihe im Serum von ApoE-Knockout-Mäusen nach Präkonditionierung mit NaCl (schwarzer Balken), Cilostazol (weißer Balken), Rolipram (hellgrauer Balken) und Sildenafil (dunkelgrauer Balken) sowie von C57BL/6-Mäusen (gestreifter Balken). Mittelwert  $\pm$  SEM, # $p < 0,001$  vs. C57BL/6, + $p < 0,05$  vs. Cilostazol.

#### Triglyceride

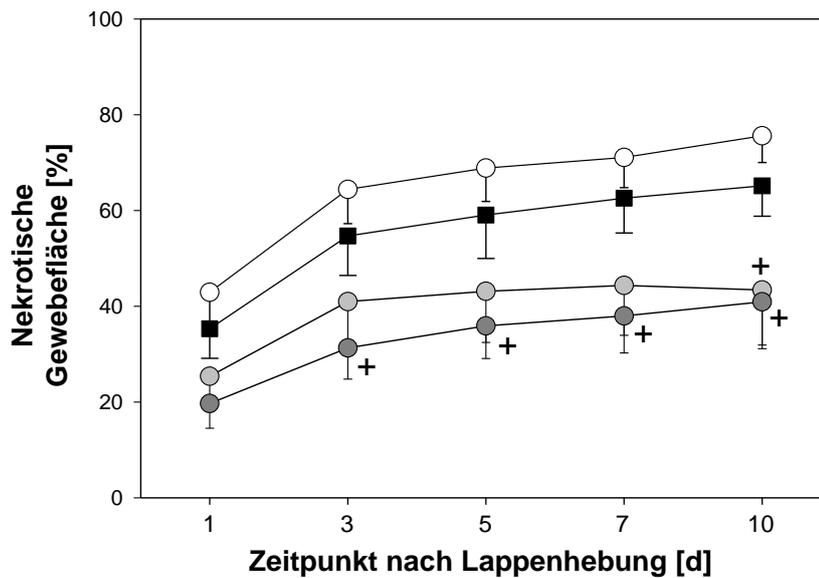
Bei den Triglyceridwerten im Mäuseserum wiesen die C57BL/6-Mäuse mit  $76,0 \pm 10,9$  mg/dl die geringsten Konzentrationen auf. Dem gegenüber wiesen die mit Sildenafil ( $116,0 \pm 15,7$  mg/dl) sowie Cilostazol ( $109,3 \pm 10,8$  mg/dl) behandelten Mäuse die höchsten Triglycerid-Konzentrationen auf. Signifikante Unterschiede waren jedoch nicht erkennbar (s. Abb. 27).



**Abb. 27:** Triglycerid-Konzentrationen in mg/dl an Tag 10 der Versuchsreihe im Serum von ApoE-Knockout-Mäusen nach Präkonditionierung mit NaCl (schwarzer Balken), Cilostazol (weißer Balken), Rolipram (hellgrauer Balken) und Sildenafil (dunkelgrauer Balken) sowie von C57BL/6-Mäusen (gestreifter Balken). Mittelwert  $\pm$  SEM.

#### 4.2.2 Nekrotische Gewebefläche

In allen Versuchsgruppen zeigte sich aufgrund der persistierenden Ischämie ein zunehmender Perfusionsausfall über den Versuchszeitraum von 10 Tagen. In der Kontrollgruppe lag initial eine Nekrose von 35% der Gesamtgewebefläche vor, welche bis auf 65% an Tag 10 zunahm. Die mit Cilostazol präkonditionierten Tiere zeigten eine noch etwas höhere Nekroserate von 43% an Tag 1 und 76% an Tag 10. In der Rolipram-Gruppe lag der mikrovaskuläre Perfusionsausfall initial bei 25% und am letzten Versuchstag bei 43% der Gesamtgewebefläche. An Tag 10 bestand damit eine signifikante Verringerung der Nekrose gegenüber der Cilostazol-Gruppe. Die mit Sildenafil behandelten Mäuse zeigten das beste Lappenüberleben. An Tag 1 bestand eine nekrotische Gewebefläche von 20%, welche schließlich bis zu Tag 10 auf 41% zunahm. Ab dem 3. Tag war der Perfusionsausfall gegenüber der Cilostazol-Gruppe signifikant geringer ausgeprägt (s. Abb. 28).



**Abb. 28:** Nekrose in % der Gesamtgewebefläche nach Vorbehandlung mit Cilostazol (weiße Kreise), Rolipram (hellgraue Kreise) und Sildenafil (dunkelgraue Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (schwarze Quadrate) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung. Mittelwert  $\pm$  SEM, <sup>+</sup> $p < 0,05$  vs. Cilostazol.

#### 4.2.3 Arteriöläre Fließgeschwindigkeit (aVel)

Im proximalen Lappenanteil nahm die arteriöläre Erythrozytenfließgeschwindigkeit bei allen Versuchsgruppen über den Beobachtungszeitraum leicht ab. Bei den mit Sildenafil präkonditionierten Tieren war sie insgesamt am höchsten, allerdings bestanden keine signifikanten Unterschiede (s. Abb. 29 A).

Im zentralen Lappenanteil zeigten die Sildenafil- und die Rolipram-Gruppe gegenüber den mit NaCl und Cilostazol behandelten Mäusen eine deutlich erhöhte aVel, welche an den Tagen 3 und 5 statistisch signifikant war. Die Fließgeschwindigkeit in den Arteriolen der Kontrollgruppe war bereits initial deutlich niedriger und blieb auf diesem Niveau. Bei den mit Cilostazol vorbehandelten Tieren konnte ab Tag 7 keine aVel mehr gemessen werden, da der zentrale Lappenanteil kaum mehr perfundiert wurde (s. Abb. 29 B).

Im distalen Lappenanteil war die arteriöläre Fließgeschwindigkeit in allen Gruppen sehr gering. In der Cilostazol-Gruppe konnte wiederum ab dem 7. Tag aufgrund mangelnder Perfusion keine aVel mehr bestimmt werden (s. Abb. 29 C).

#### 4.2.4 Arteriöler Durchmesser (aDM)

Im proximalen Lappenanteil waren die arteriölen Durchmesser bis einschließlich des 7. Tages in allen Versuchsgruppen nahezu identisch. Lediglich an Tag 10 konnte eine arteriöle Vasokonstriktion bei den mit Cilostazol sowie Sildenafil behandelten Tieren beobachtet werden. Der aDM der Sildenafil-Gruppe war an Tag 10 gegenüber der Kontroll- sowie Rolipram-Gruppe signifikant erniedrigt (s. Abb. 30 A).

Im zentralen Lappenanteil kam es in allen Gruppen zu einer leichten Zunahme der arteriölen Durchmesser. Bei den mit Cilostazol präkonditionierten Tieren konnte ab dem 7. Tag kein aDM mehr bestimmt werden, da keine Durchblutung dieses Lappenanteiles mehr stattfand. An Tag 5 bestand eine signifikante arteriöle Konstriktion gegenüber der Kontrollgruppe (s. Abb. 30 B).

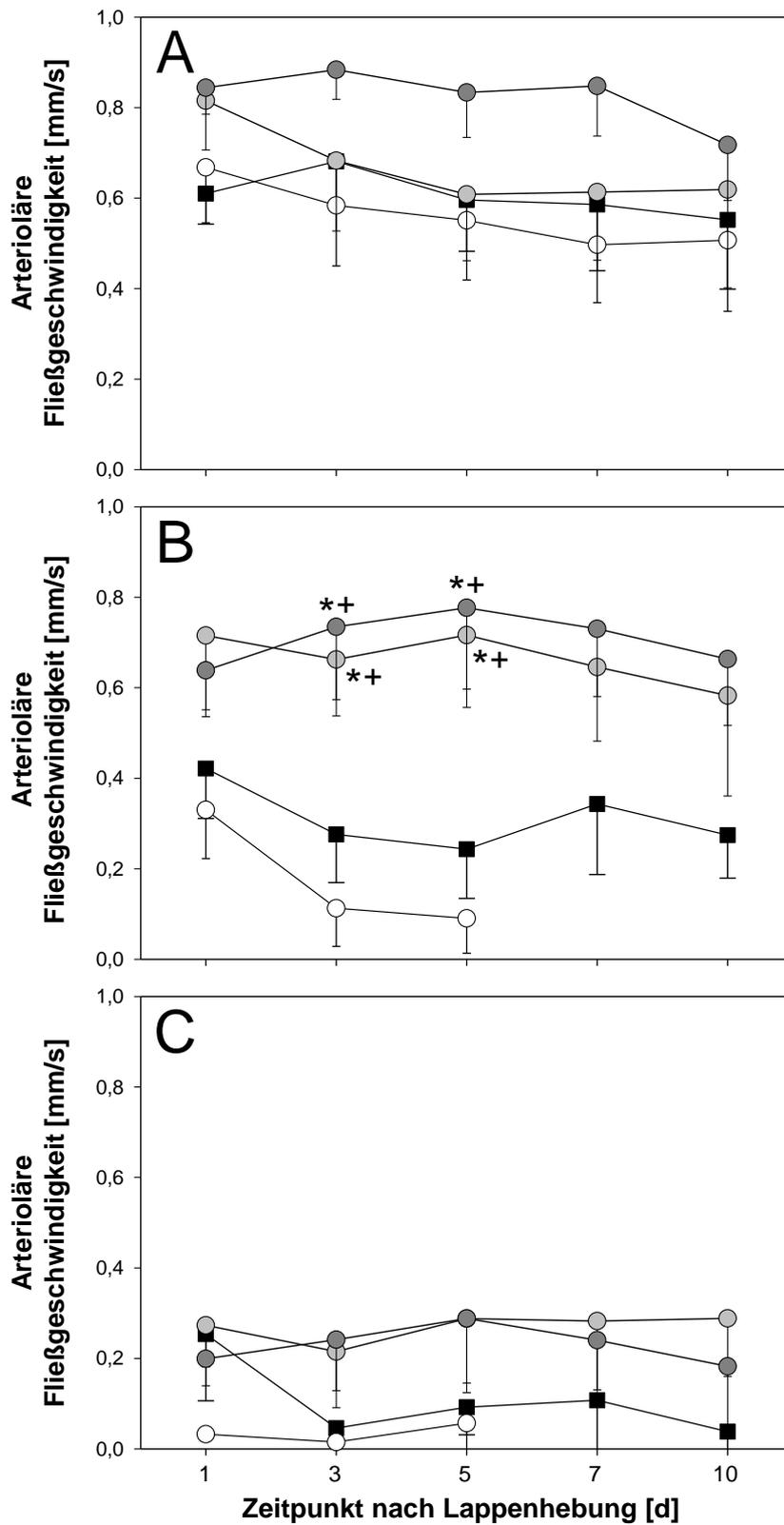
Im distalen Lappenanteil zeigten die mit Sildenafil und Rolipram behandelten Tiere eine diskret zunehmende arteriöle Dilatation. In der Kontrollgruppe konnte am 3. Tag eine starke Zunahme des aDM beobachtet werden, welcher ab dem 5. Tag aber schon wieder nahe dem Ausgangswert war. In der Cilostazol-Gruppe hingegen gab es an Tag 3 eine Reduktion des aDM, der an Tag 5 wieder anstieg. Ab dem 7. Tag war hier kein Durchmesser mehr bestimmbar. Gegenüber der Kontrollgruppe bestand ein signifikant erniedrigter aDM an den Tagen 3 und 5. Bei den mit Rolipram vorbehandelten Tieren gab es an Tag 3 eine signifikante arteriöle Konstriktion gegenüber der Kontrolle sowie eine Dilatation gegenüber der Cilostazol-Gruppe. Analog bei den mit Sildenafil präkonditionierten Mäusen, welche zusätzlich an 10 Tag eine signifikante Erhöhung des aDM gegenüber der Kontroll- und Rolipram-Gruppe zeigten (s. Abb. 30 C).

#### 4.2.5 Arteriöler Blutfluss (aBF)

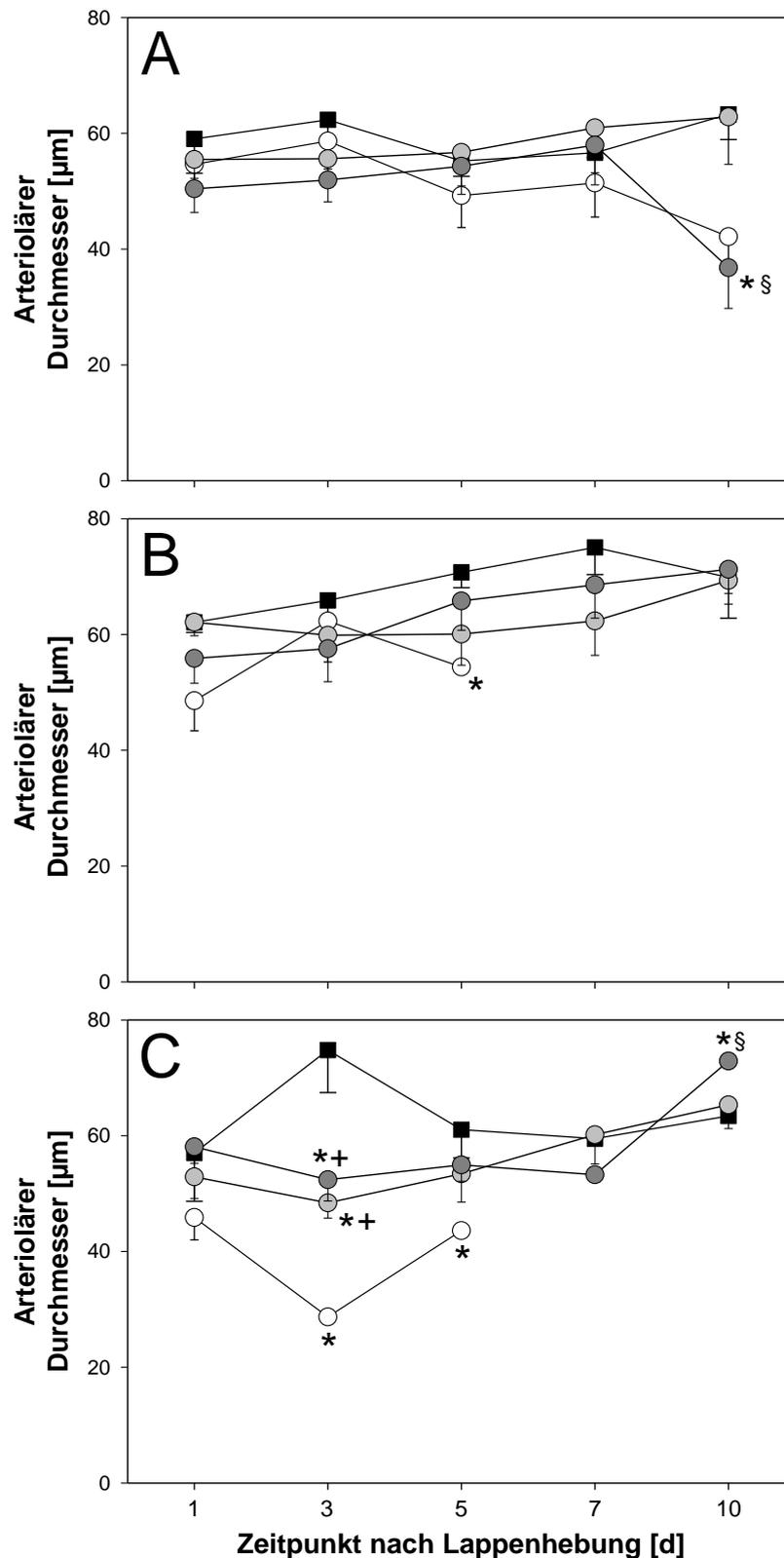
Im proximalen Lappenanteil konnten keine signifikanten Unterschiede im arteriölen Blutfluss zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen festgestellt werden (s. Abb. 31 A).

Im zentralen Lappenanteil war der arteriöle Blutfluss in der Kontrollgruppe über den gesamten Versuchszeitraum recht konstant. Bei den mit Cilostazol präkonditionierten Tieren sank der Blutfluss in den Arteriolen jedoch deutlich und ab dem 7. Tag bestand keine Perfusion der Arteriolen mehr. Der aBF in der Sildenafil- und Rolipram-Gruppe lag deutlich höher, an den Tagen 3 und 5 bestand ein signifikant erhöhter arteriöler Blutfluss gegenüber der Cilostazol-Gruppe (s. Abb. 31 B).

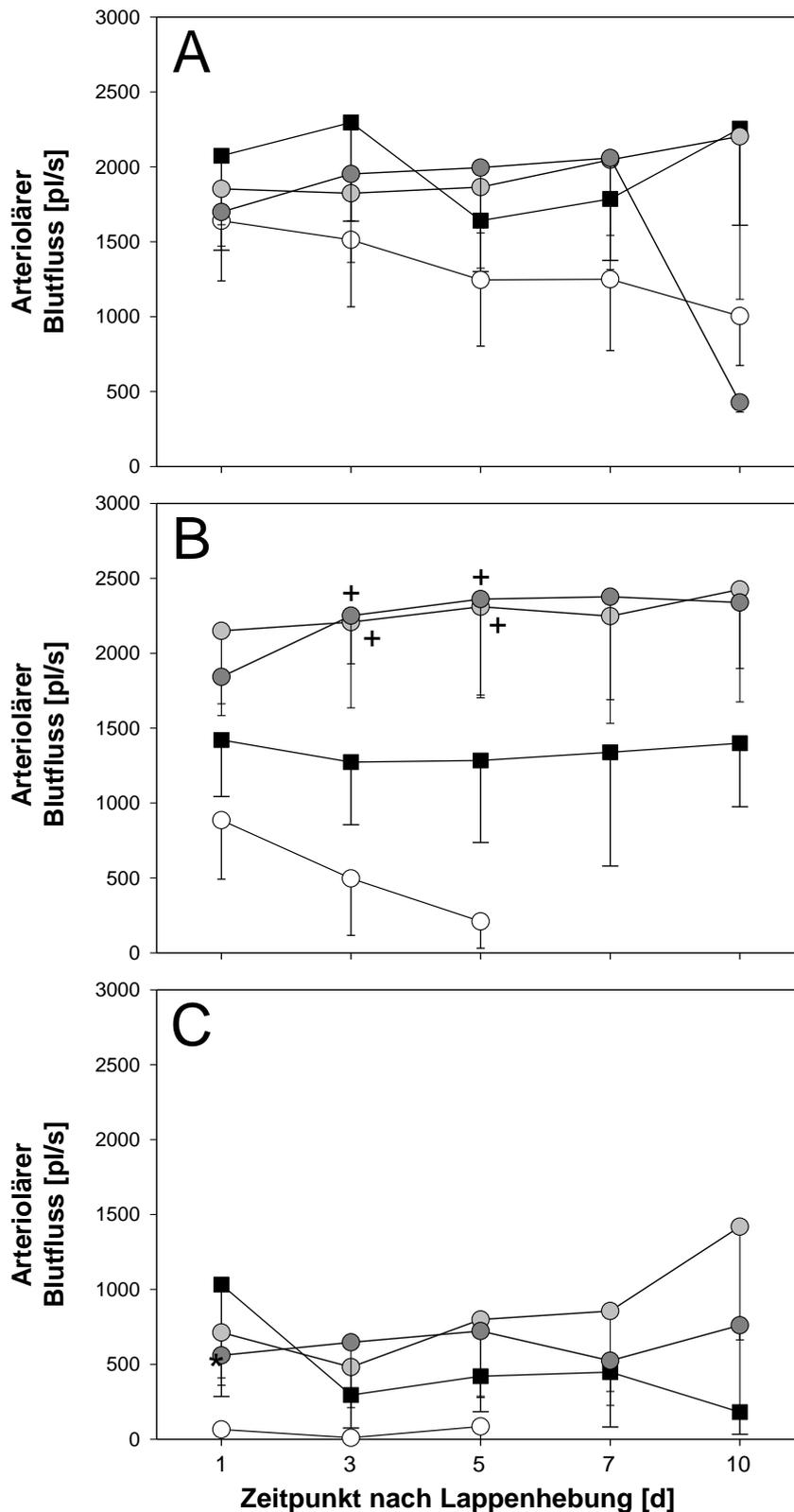
Im distalen Lappenanteil war der arteriöle Blutfluss insgesamt sehr niedrig, statistisch signifikante Unterschiede bestanden keine. In der Cilostazol-Gruppe konnte wiederum nur bis Tag 5 ein aBF gemessen werden (s. Abb. 31 C).



**Abb. 29:** Arterioliäre Fließgeschwindigkeit in mm/s nach Vorbehandlung mit Cilostazol (weiße Kreise), Rolipram (hellgraue Kreise) und Sildenafil (dunkelgraue Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (schwarze Quadrate) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenanteil. Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle, + $p < 0,05$  vs. Cilostazol.



**Abb. 30:** Arteriöler Durchmesser in  $\mu\text{m}$  nach Vorbehandlung mit Cilostazol (weiße Kreise), Rolipram (hellgraue Kreise) und Sildenafil (dunkelgraue Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (schwarze Quadrate) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenanteil. Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle, + $p < 0,05$  vs. Cilostazol, § $p < 0,05$  vs. Rolipram.



**Abb. 31:** Arteriölärer Blutfluss in pl/s nach Vorbehandlung mit Cilostazol (weiße Kreise), Rolipram (hellgraue Kreise) und Sildenafil (dunkelgraue Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (schwarze Quadrate) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenanteil. Mittelwert  $\pm$  SEM,  $^+p < 0,05$  vs. Cilostazol.

#### 4.2.6 Venuläre Fließgeschwindigkeit (vVel)

Im proximalen Lappenanteil war die venuläre Fließgeschwindigkeit in der Sildenafil-Gruppe am höchsten und konnte über den kompletten Versuchszeitraum aufrechterhalten werden. Die vVel der mit Rolipram präkonditionierten Tiere war an Tag 1 noch etwas höher, allerdings kam es zu einem starken Abfall bis zu Tag 10 mit dem geringsten Wert aller Gruppen. Die vVel der Cilostazol- sowie Kontrollgruppe war bereits initial reduziert (s. Abb. 32 A).

Im zentralen Lappenanteil waren die Fließgeschwindigkeiten in den Venulen der Sildenafil- und Rolipram-Gruppe am höchsten und an Tag 5 gegenüber den mit Cilostazol behandelten Tieren signifikant erhöht. Bei letzteren sank die vVel bis zu Tag 5 gegen Null, ab dem 7. Tag konnte keine Perfusion in den Venulen mehr beobachtet werden. In der Kontrollgruppe sank die venuläre Fließgeschwindigkeit zunächst bis zum 5. Tag ab, um danach wieder kontinuierlich anzusteigen (s. Abb. 32 B).

Im distalen Lappenanteil war die Fließgeschwindigkeit in den Venulen bei allen Tieren sehr niedrig. Wesentliche Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen konnten nicht festgestellt werden (s. Abb. 32 C).

#### 4.2.7 Venulärer Durchmesser (vDM)

Im proximalen Lappenanteil stieg der venuläre Durchmesser in allen Versuchsgruppen leicht an. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen waren nicht erkennbar (s. Abb. 33 A).

Im zentralen Lappenanteil waren die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ebenfalls gering. Lediglich an Tag 5 zeigte sich eine signifikante venuläre Vasokonstriktion der mit Sildenafil und Rolipram vorbehandelten Tiere gegenüber der Cilostazol-Gruppe. Bei diesen Tieren konnte ab Tag 7 kein venulärer Durchmesser mehr bestimmt werden, da in diesem Lappenanteil keine venuläre Perfusion mehr stattfand (s. Abb. 33 B).

Im distalen Lappenanteil konnte ebenfalls ab dem 7. Tag bei den mit Cilostazol präkonditionierten Tieren aufgrund mangelnder Perfusion kein venulärer Durchmesser mehr bestimmt werden. Der vDM in der Rolipram-Gruppe nahm über den Versuchszeitraum leicht zu, an den Tagen 7 und 10 bestand jedoch eine signifikante Vasokonstriktion gegenüber der Kontroll-Gruppe. Die mit Sildenafil behandelten Mäuse hatten über den gesamten Versuchszeitraum den geringsten venulären Durchmesser. Ab dem 3. Tag war der Unterschied signifikant zur Kontrollgruppe, an den Tagen 3 und 5 zur Cilostazol-Gruppe und an den Tagen 3, 5 und 10 zusätzlich noch zur Rolipram-Gruppe (s. Abb. 33 C).

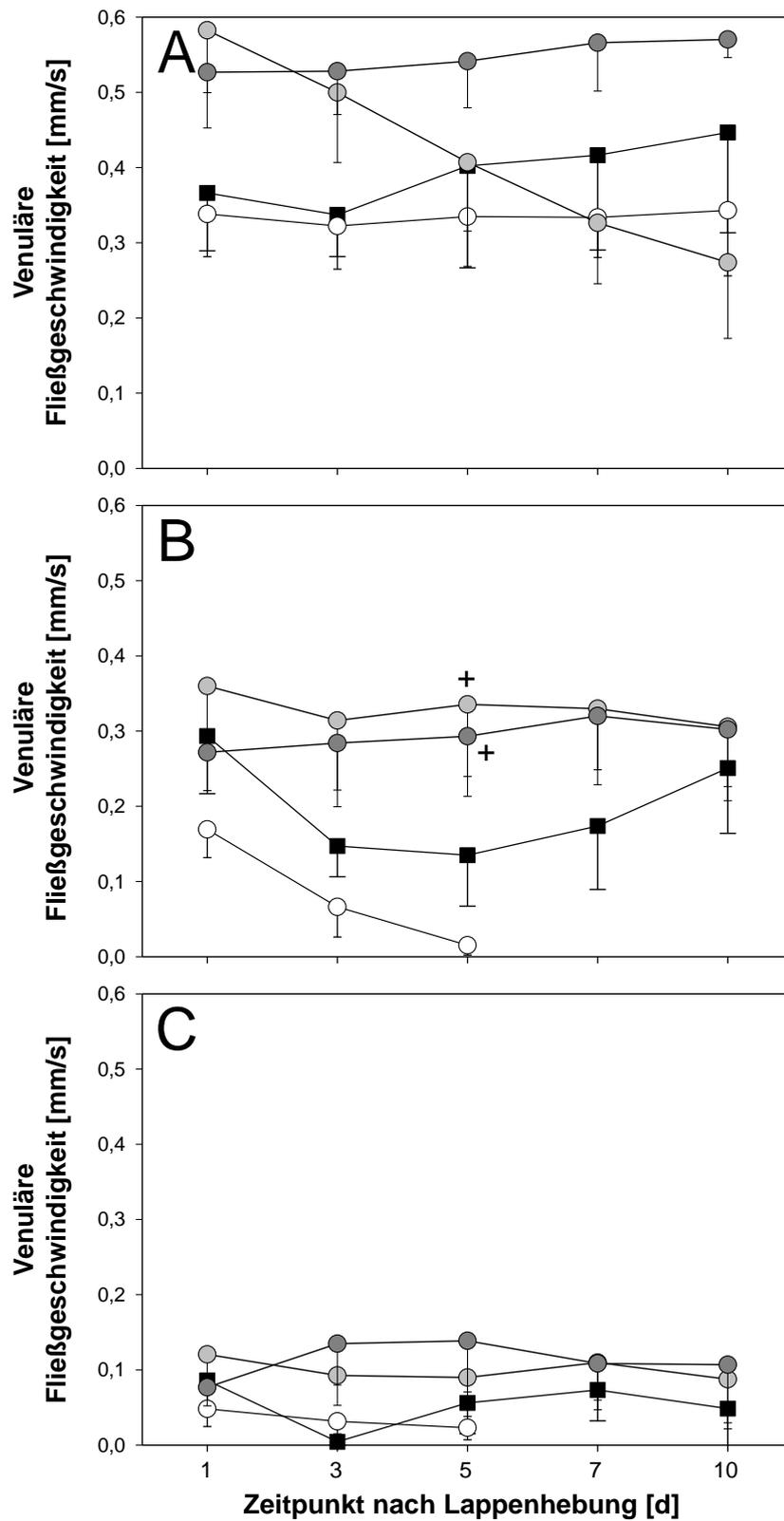
---

#### 4.2.8 Venulärer Blutfluss (vBF)

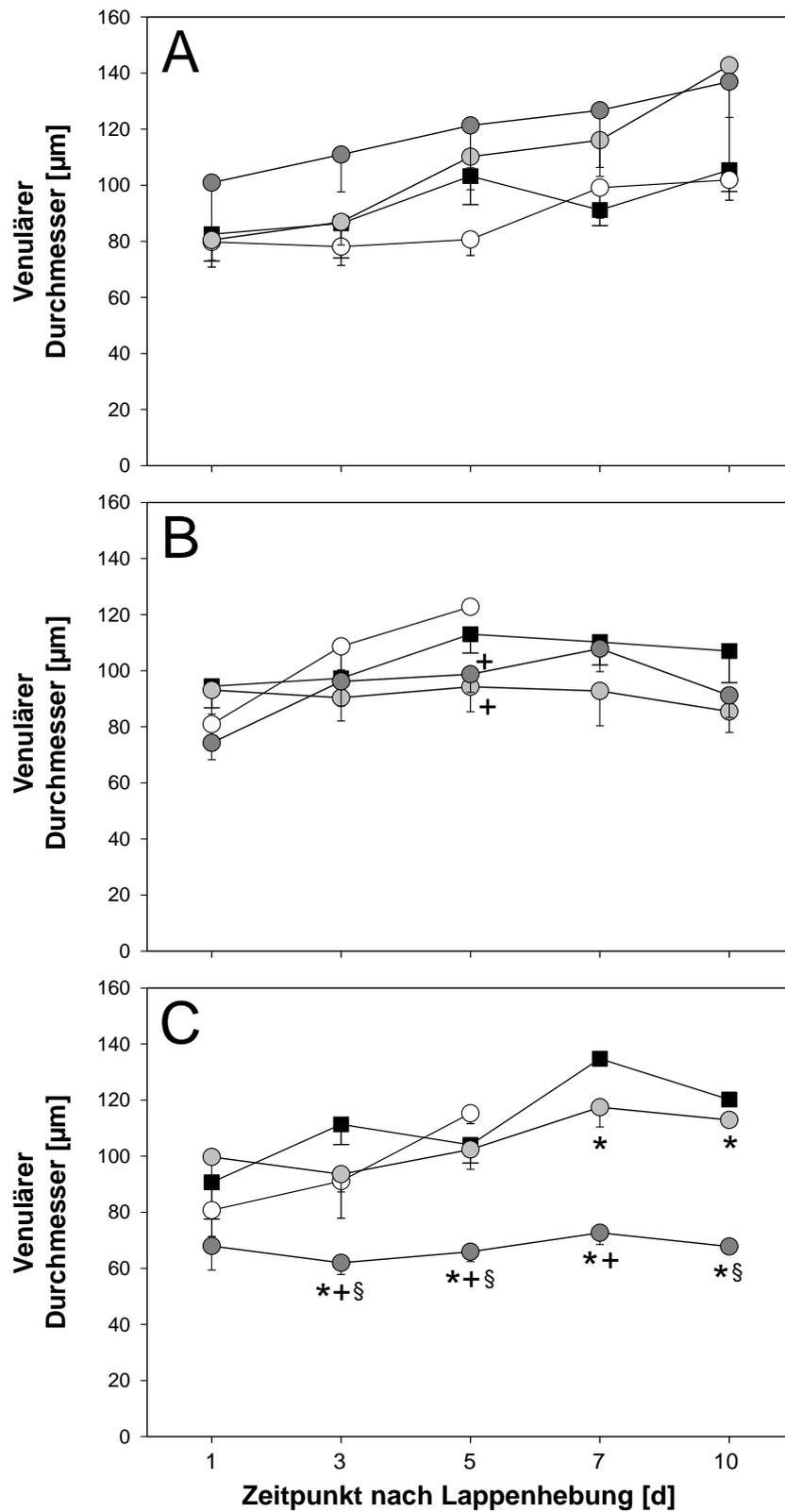
Im proximalen Lappenanteil war der Blutfluss bei den mit Sildenafil präkonditionierten Tieren am höchsten. An den Tagen 1 bis 5 war er gegenüber den mit Cilostazol behandelten Tieren signifikant erhöht und zusätzlich an den Tagen 3 und 5 gegenüber der Kontrollgruppe. Weitere signifikanten Unterschiede bestanden nicht (s. Abb. 34 A).

Im zentralen Lappenanteil waren zwischen den einzelnen Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede des venulären Blutflusses zu beobachten. Der vBF in der Sildenafil- sowie Rolipram-Gruppe stieg bis einschließlich zum 7. Tag der Versuchsreihe leicht an und sank am 10. Tag wieder ab. In der Kontrolle zeigte sich primär ein Abfall des vBF bis zu Tag 5, danach war ein Anstieg zu verzeichnen. In der Cilostazol-Gruppe sank der Blutfluss in den Venulen bis zum 5. Tag gegen Null, an den folgenden Beobachtungstagen konnte kein vBF mehr gemessen werden (s. Abb. 34 B).

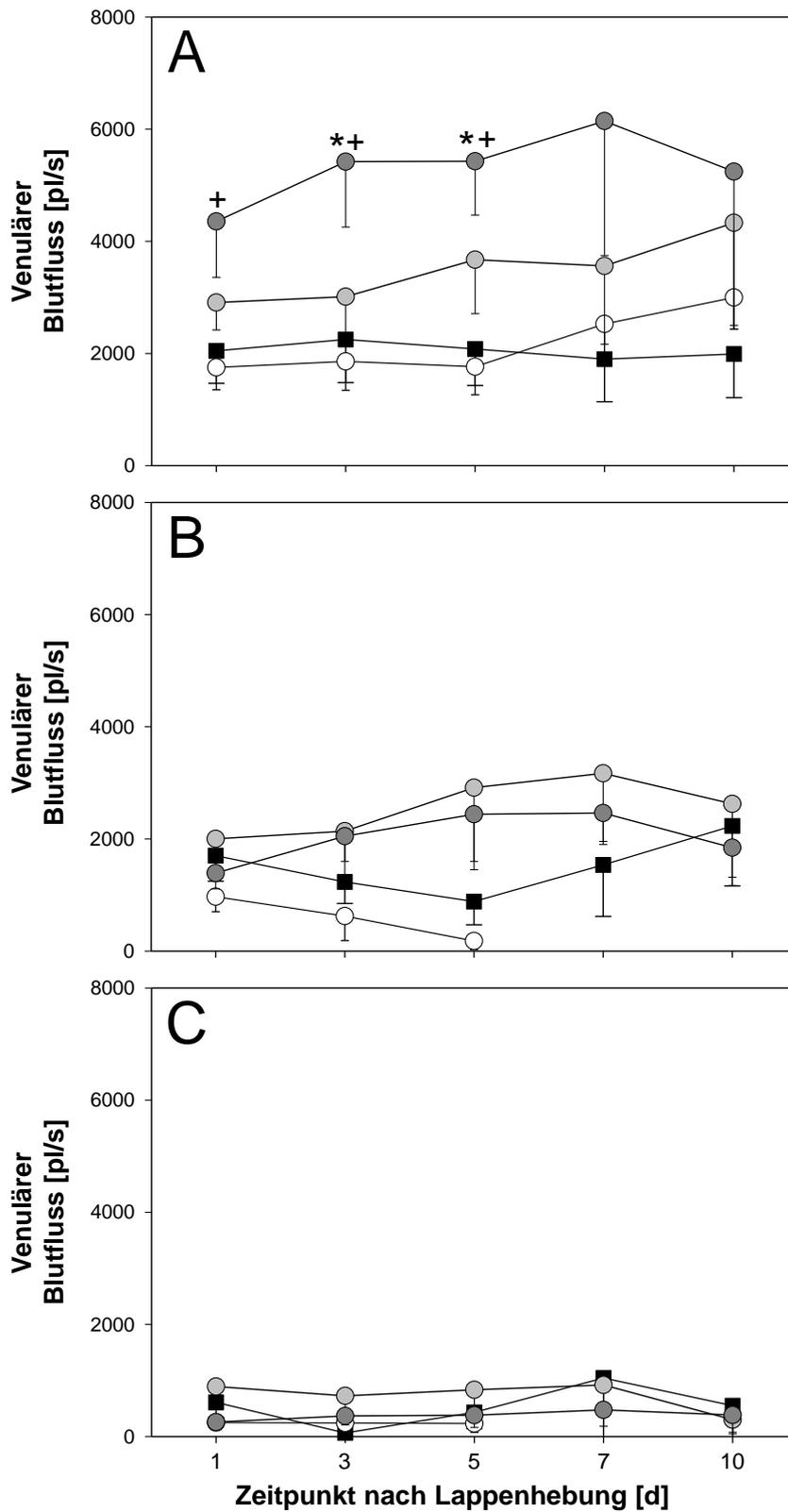
Im distalen Lappenanteil war der venuläre Blutfluss in allen Gruppen sehr gering. Wesentliche Änderungen oder Unterschiede konnten nicht beobachtet werden (s. Abb. 34 C).



**Abb. 32:** Venuläre Fließgeschwindigkeit in mm/s nach Vorbehandlung mit Cilostazol (weiße Kreise), Rolipram (hellgraue Kreise) und Sildenafil (dunkelgraue Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (schwarze Quadrate) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenanteil. Mittelwert  $\pm$  SEM,  $^+p < 0,05$  vs. Cilostazol.



**Abb. 33:** Venulärer Durchmesser in  $\mu\text{m}$  nach Vorbehandlung mit Cilostazol (weiße Kreise), Rolipram (hellgraue Kreise) und Sildenafil (dunkelgraue Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (schwarze Quadrate) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenanteil. Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle, + $p < 0,05$  vs. Cilostazol, § $p < 0,05$  vs. Rolipram.



**Abb. 34:** Venulärer Blutfluss in pI/s nach Vorbehandlung mit Cilostazol (weiße Kreise), Rolipram (hellgraue Kreise) und Sildenafil (dunkelgraue Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (schwarze Quadrate) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenanteil. Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle, + $p < 0,05$  vs. Cilostazol.

#### 4.2.9 Kapillare Fließgeschwindigkeit (kVel)

Im proximalen Lappenanteil war die kapillare Fließgeschwindigkeit bei den mit Rolipram präkonditionierten Mäusen am geringsten und an den Tagen 1 und 3 gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erniedrigt. In der Cilostazol-Gruppe war die kVel ebenfalls sehr gering und ab dem 7. Tag nicht mehr messbar. Die mit Sildenafil vorbehandelten Tiere zeigten die höchste kapillare Fließgeschwindigkeit, welche an den Tagen 1 bis 5 gegenüber der Cilostazol- sowie an den Tagen 1 bis 7 gegenüber der Rolipram-Gruppe signifikant erhöht war. Am 10. Tag kam es zu einem sehr deutlichen Abfall der kVel.

Im zentralen Lappenanteil waren die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen geringer. Ein statistisch signifikanter Unterschied bestand lediglich an Tag 5 bei der Sildenafil-Gruppe, bei welcher die kVel gegenüber der Cilostazol-Gruppe erhöht war. Bei den mit Cilostazol behandelten Tieren konnte die kapillare Fließgeschwindigkeit nur bis einschließlich des 5. Tages bestimmt werden.

Im distalen Lappenanteil war die Fließgeschwindigkeit in den Kapillaren bei allen Tieren sehr gering. Nur an Tag 3 bestand eine signifikant erhöhte kVel in der Sildenafil-Gruppe gegenüber den mit Cilostazol behandelten Tieren, bei welchen wiederum ab Tag 7 keine kapillare Perfusion mehr zu finden war (s. Tab. 4).

| Gruppe     | Lappen-<br>anteil | Tag 1                   | Tag 3                   | Tag 5                   | Tag 7                  | Tag 10    |
|------------|-------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-----------|
| Kontrolle  |                   | 0,12±0,02               | 0,11±0,03               | 0,10±0,04               | 0,09±0,03              | 0,11±0,03 |
| Cilostazol | proximal          | 0,07±0,03               | 0,05±0,03               | 0,05±0,01               | 0,00±0,00              | 0,00±0,00 |
| Rolipram   |                   | 0,03±0,02*              | 0,03±0,02*              | 0,05±0,03               | 0,04±0,03              | 0,02±0,01 |
| Sildenafil |                   | 0,14±0,01 <sup>+§</sup> | 0,15±0,02 <sup>+§</sup> | 0,15±0,02 <sup>+§</sup> | 0,15±0,03 <sup>§</sup> | 0,06±0,03 |
| Kontrolle  |                   | 0,09±0,04               | 0,11±0,04               | 0,07±0,03               | 0,061±0,03             | 0,08±0,03 |
| Cilostazol | zentral           | 0,05±0,02               | 0,02±0,02               | 0,01±0,01               | 0,000±0,00             | 0,00±0,00 |
| Rolipram   |                   | 0,05±0,02               | 0,03±0,03               | 0,05±0,03               | 0,055±0,03             | 0,05±0,03 |
| Sildenafil |                   | 0,11±0,00               | 0,11±0,02               | 0,10±0,02 <sup>+</sup>  | 0,099±0,02             | 0,08±0,02 |
| Kontrolle  |                   | 0,02±0,01               | 0,03±0,02               | 0,03±0,02               | 0,01±0,01              | 0,02±0,02 |
| Cilostazol | distal            | 0,01±0,01               | 0,00±0,00               | 0,01±0,01               | 0,00±0,00              | 0,00±0,00 |
| Rolipram   |                   | 0,03±0,01               | 0,01±0,01               | 0,01±0,01               | 0,00±0,00              | 0,00±0,00 |
| Sildenafil |                   | 0,05±0,02               | 0,07±0,03 <sup>+</sup>  | 0,06±0,03               | 0,05±0,02              | 0,03±0,02 |

**Tab. 4:** Kapillare Fließgeschwindigkeit in mm/s nach Vorbehandlung mit Cilostazol, Rolipram und Sildenafil sowie nach NaCl-Behandlung 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen, zentralen und distalen Lappenanteil. Mittelwert ± SEM, \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle, <sup>+</sup> $p < 0,05$  vs. Cilostazol, <sup>§</sup> $p < 0,05$  vs. Rolipram.

#### 4.2.10 Kapillarer Durchmesser (kDM)

Im proximalen Lappenanteil waren die kapillaren Durchmesser in der Cilostazol-Gruppe an Tag 5 gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht. Ab Tag 7 waren sie, ebenso wie im zentralen und distalen Anteil, nicht mehr messbar. Bei den mit Sildenafil behandelten Mäusen zeigte sich an den Tagen 1 und 5 ein signifikant geringerer kDM gegenüber der Cilostazol- und an den Tagen 7 und 10 gegenüber der Kontrollgruppe. Gegenüber der Rolipram-Gruppe war der kDM an den Tagen 1, 3, 7 und 10 signifikant erhöht. Bei den mit Rolipram präkonditionierten Mäusen waren die kDM am geringsten und an den Tagen 1, 3, 7 und 10 gegenüber der Kontrolle sowie an den Tagen 1 bis 5 gegenüber der Cilostazol-Gruppe signifikant erniedrigt.

Im zentralen Lappenanteil waren die kDM in der Rolipram-Gruppe ebenfalls am geringsten und an allen Tagen gegenüber der Kontrolle sowie an den Tagen 1 bis 5 gegenüber der Cilostazol-Gruppe signifikant erniedrigt. Bei den mit Sildenafil präkonditionierten Tieren zeigte sich eine signifikante kapillare Vasokonstriktion gegenüber der Kontroll- und Cilostazol-Gruppe an Tag 3 und eine Vasodilatation gegenüber der Rolipram-Gruppe an allen Beobachtungstagen.

Im distalen Lappenanteil bestand bei den mit Cilostazol vorbehandelten Tieren eine kapillare Konstriktion gegen die Kontrolle an Tag 5, an den Tagen 3, 7 und 10 bestand keinerlei kapillare Perfusion. Die kDM in der Rolipram-Gruppe waren an Tag 7 signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht, an den restlichen Tagen bestand eine signifikante kapillare Konstriktion gegenüber der Kontrollgruppe. An den Tagen 1 und 5 war diese Reduktion des kDM zudem gegenüber der Cilostazol-Gruppe signifikant. Bei den mit Sildenafil präkonditionierten Tieren bestand ab dem 3. Tag ein gegenüber der Kontrollgruppe sowie an Tag 5 gegenüber der Cilostazol-Gruppe signifikant erniedrigter kapillarer Durchmesser. Zudem bestanden in der Sildenafil-Gruppe an allen Tagen signifikante Unterschiede gegenüber der Rolipram-Gruppe. An Tag 7 bestand eine kapillare Konstriktion, an den anderen Tagen eine kapillare Dilatation (s. Tab. 5).

| Gruppe     | Lappenanteil | Tag 1                   | Tag 3                   | Tag 5                   | Tag 7                   | Tag 10                  |
|------------|--------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Kontrolle  |              | 4,84±0,31               | 4,98±0,32               | 5,08±0,30               | 5,12±0,29               | 5,12±0,20               |
| Cilostazol | proximal     | 5,26±0,22               | 5,33±0,43               | 6,37±0,15*              |                         |                         |
| Rolipram   |              | 3,40±0,37* <sup>+</sup> | 3,12±0,08* <sup>+</sup> | 4,47±0,52 <sup>+</sup>  | 3,89±0,11*              | 3,23±0,00*              |
| Sildenafil |              | 4,35±0,11 <sup>§</sup>  | 4,51±0,17 <sup>§</sup>  | 4,84±0,27 <sup>+</sup>  | 4,55±0,15 <sup>§</sup>  | 3,53±0,00* <sup>§</sup> |
| Kontrolle  |              | 5,30±0,36               | 5,49±0,31               | 5,69±0,31               | 5,67±0,22               | 5,56±0,31               |
| Cilostazol | zentral      | 5,03±0,27               | 5,73±0,20               | 5,37±0,00               |                         |                         |
| Rolipram   |              | 3,59±0,37* <sup>+</sup> | 2,85±0,23* <sup>+</sup> | 3,76±0,25* <sup>+</sup> | 3,45±0,19*              | 3,12±0,03*              |
| Sildenafil |              | 4,42±0,15 <sup>§</sup>  | 4,48±0,20* <sup>§</sup> | 4,92±0,27 <sup>§</sup>  | 5,53±0,47 <sup>§</sup>  | 5,35±0,56 <sup>§</sup>  |
| Kontrolle  |              | 5,54±0,57               | 6,93±0,05               | 7,34±0,10               | 6,34±0,00               | 6,62±0,00               |
| Cilostazol | distal       | 5,20±0,00               |                         | 5,69±0,00*              |                         |                         |
| Rolipram   |              | 3,72±0,16* <sup>+</sup> | 1,78±0,00*              | 2,65±0,31* <sup>+</sup> | 7,60±0,00*              | 2,10±0,00*              |
| Sildenafil |              | 4,67±0,16 <sup>§</sup>  | 5,02±0,07* <sup>§</sup> | 4,98±0,19* <sup>§</sup> | 5,02±0,25* <sup>§</sup> | 4,12±0,37* <sup>§</sup> |

**Tab. 5:** Kapillarer Durchmesser in  $\mu\text{m}$  nach Vorbehandlung mit Cilostazol, Rolipram und Sildenafil sowie nach NaCl-Behandlung 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen zentralen und distalen Lappenanteil. Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle, <sup>+</sup> $p < 0,05$  vs. Cilostazol, <sup>§</sup> $p < 0,05$  vs. Rolipram.

#### 4.2.11 Kapillarer Blutfluss (kBF)

Im proximalen Lappenanteil konnten beim kapillaren Blutfluss keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen verzeichnet werden. Insgesamt war der kBF jedoch bei den mit Cilostazol und Rolipram vorbehandelten Tieren am niedrigsten. In der Cilostazol-Gruppe war der kBF nur bis zum 5. Tag bestimmbar. In der Sildenafil-Gruppe stieg der kapillare Blutfluss zunächst an, fiel an Tag 10 allerdings wieder stark ab.

Im zentralen Lappenanteil war der Blutfluss in den Kapillaren der mit Sildenafil präkonditionierten Tiere am höchsten, an den Tagen 3 und 5 war er gegenüber den mit Cilostazol behandelten Tieren signifikant erhöht. In der Rolipram-Gruppe kam es am 3. Tag zunächst zu einem Abfall des kapillaren Blutflusses, der an Tag 5 jedoch wieder deutlich anstieg und an diesem Tag gegenüber der Cilostazol-Gruppe signifikant erhöht war. In dieser Gruppe war wiederum aufgrund mangelnder kapillarer Perfusion ab dem 7. Tag kein kBF mehr beobachtbar.

Im distalen Lappenanteil gab es lediglich an Tag 3 eine signifikante Erhöhung des kapillaren Blutflusses der Sildenafil-Gruppe gegenüber allen anderen Gruppen. Auch hier fand bei den mit Cilostazol vorbehandelten Mäusen ab dem 7. Tag keine kapillare Perfusion mehr statt (s. Tab. 6).

| Gruppe     | Lappenanteil | Tag 1    | Tag 3                   | Tag 5                 | Tag 7    | Tag 10   |
|------------|--------------|----------|-------------------------|-----------------------|----------|----------|
| Kontrolle  |              | 2355±801 | 2468±912                | 2125±1151             | 2269±736 | 1763±756 |
| Cilostazol | proximal     | 959±405  | 1045±479                | 885±341               | 0±0      | 0±0      |
| Rolipram   |              | 1100±522 | 994±499                 | 979±643               | 974±602  | 645±510  |
| Sildenafil |              | 1986±124 | 2334±183                | 2815±184              | 2639±346 | 601±314  |
| Kontrolle  |              | 1231±397 | 1064±446                | 879±472               | 847±439  | 610±339  |
| Cilostazol | zentral      | 960±356  | 548±417                 | 130±118               | 0±0      | 0±0      |
| Rolipram   |              | 1595±590 | 633±426                 | 1882±690 <sup>+</sup> | 1533±618 | 1067±584 |
| Sildenafil |              | 1645±153 | 2106±410 <sup>+</sup>   | 1976±542 <sup>+</sup> | 1932±456 | 1364±219 |
| Kontrolle  |              | 634±315  | 237±209                 | 454±428               | 449±449  | 562±562  |
| Cilostazol | distal       | 140±140  | 0±0                     | 202±202               | 0±0      | 0±0      |
| Rolipram   |              | 992±566  | 198±198                 | 589±404               | 844±844  | 300±281  |
| Sildenafil |              | 1196±346 | 1535±511 <sup>**§</sup> | 1316±623              | 973±449  | 428±249  |

**Tab. 6:** Kapillarer Blutfluss in pl/s nach Vorbehandlung mit Cilostazol, Rolipram und Sildenafil sowie nach NaCl-Behandlung 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen, zentralen und distalen Lappenanteil. Mittelwert ± SEM, <sup>\*</sup>p<0,05 vs. Kontrolle, <sup>+</sup>p<0,05 vs. Cilostazol, <sup>§</sup>p<0,05 vs. Rolipram.

#### 4.2.12 Funktionelle Kapillardichte (FCD)

Im proximalen Lappenanteil zeigten sich bei der funktionellen Kapillardichte große Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Die FCD der mit Rolipram sowie Cilostazol vorbehandelten Tiere war sehr gering und ab Tag 7 waren in der Cilostazol-Gruppe keine perfundierten Kapillaren mehr vorhanden. Eine signifikante Erniedrigung der Kapillardichte gegenüber der Kontrollgruppe bestand an den Tagen 1 bis 3 in der Cilostazol-Gruppe und an den Tagen 1 bis 7 in der Rolipram-Gruppe. Die mit Sildenafil behandelten Mäuse besaßen die größte funktionelle Kapillardichte. An allen Tagen bestand eine statistische Signifikanz gegenüber der Rolipram-Gruppe und an den Tagen 1 bis 3 zusätzlich gegenüber der Cilostazol-Gruppe (s. Abb. 35 A).

Im zentralen Lappenanteil gab es ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Auch hier zeigten die mit Rolipram und Cilostazol behandelten Tiere die geringste FCD. Am höchsten war die Kapillardichte wiederum in der Sildenafil-Gruppe, welche an den Tagen 1 bis 3 gegenüber den mit Rolipram und Cilostazol präkonditionierten Tieren signifikant erhöht war (s. Abb. 35 B).

Im distalen Lappenanteil waren die Unterschiede deutlich geringer ausgeprägt. Zwar war hier in der Rolipram- und Cilostazol-Gruppe die FCD ebenfalls am geringsten und in der

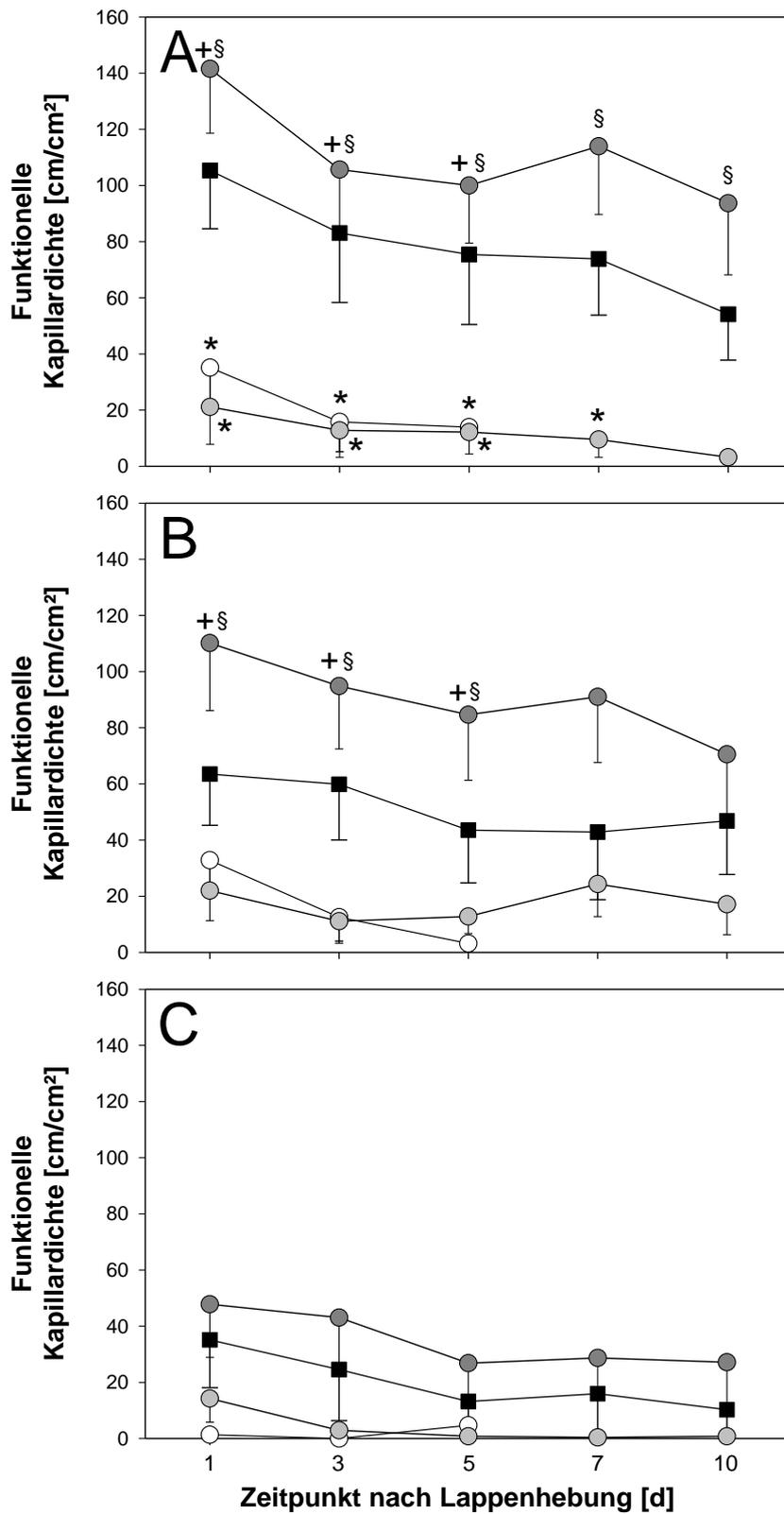
Sildenafil-Gruppe am höchsten, signifikante Unterschiede konnten allerdings nicht beobachtet werden (s. Abb. 35 C).

#### **4.2.13 Apoptotischer Zelltod**

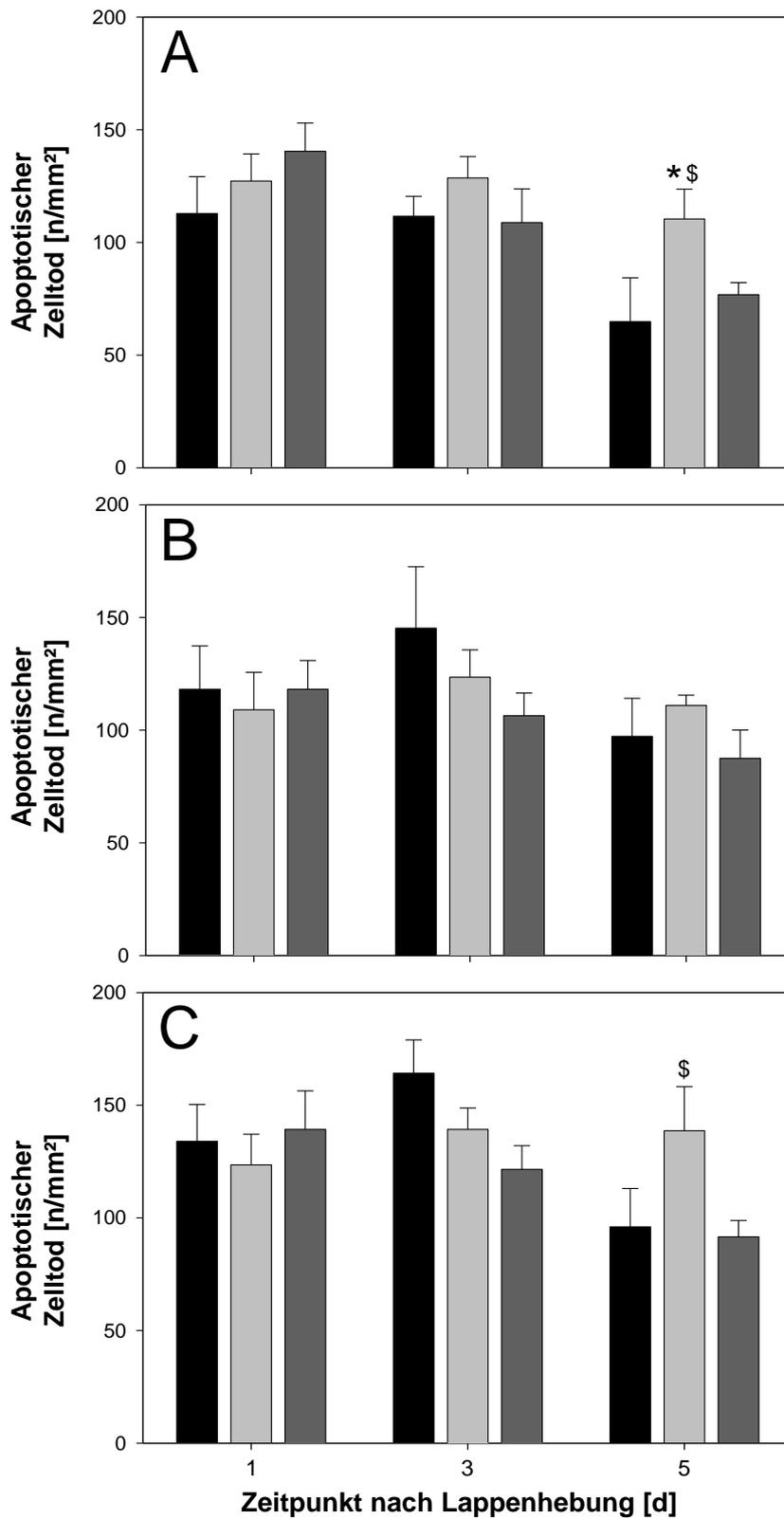
Im proximalen Lappenanteil war die Anzahl der apoptotischen Zellen pro mm<sup>2</sup> Gewebe an den Tagen 1 und 3 bei allen Beobachtungsgruppen vergleichbar. An Tag 5 war die Anzahl apoptotischer Zellen in der Rolipram-Gruppe signifikant höher als bei den mit NaCl sowie Sildenafil behandelten Tieren (s. Abb. 36 A).

Im zentralen Lappenanteil gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit NaCl, Rolipram und Sildenafil vorbehandelten Tieren (s. Abb. 36 B).

Im distalen Lappenanteil gab es am 1. und 3. Tag keine wesentliche Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. An Tag 5 zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Anzahl apoptotischer Zellen in der Rolipram-Gruppe gegenüber den mit Sildenafil präkonditionierten Mäusen (s. Abb. 36 C).



**Abb. 35:** Funktionelle Kapillardichte in cm/cm<sup>2</sup> nach Vorbehandlung mit Cilostazol (weiße Kreise), Rolipram (hellgraue Kreise) und Sildenafil (dunkelgraue Kreise) sowie nach NaCl-Behandlung (schwarze Quadrate) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenanteil. Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle, + $p < 0,05$  vs. Cilostazol, § $p < 0,05$  vs. Rolipram.



**Abb. 36:** Anzahl apoptotischer Zellen pro mm<sup>2</sup> Gewebe nach Vorbehandlung mit Rolipram (hellgraue Balken) und Sildenafil (dunkelgraue Balken) sowie nach NaCl-Behandlung (schwarze Balken) 1, 3 und 5 Tage nach Lappenhebung jeweils im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Lappenanteil. Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle, \$ $p < 0,05$  vs. Sildenafil.

## 5. DISKUSSION

### 5.1 Diskussion des Modells und der Methoden

#### 5.1.1 Atherosklerotisches Mausmodell

„Knockout“-Mäuse entstehen durch eine gezielte Geninaktivierung mittels homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen. Sie stellen genetisch präzise definierte Kleintiermodelle dar, welche es ermöglichen Krankheiten, exogene und endogene Einflussfaktoren sowie mögliche pharmakologische Konzepte *in vivo* zu untersuchen. Sie weisen zusätzlich die Vorteile einer großen Verfügbarkeit und Reproduzierbarkeit auf. Die ApoE<sup>-/-</sup>-Maus war das erste gentechnisch hergestellte murine Atherosklerose-Modell [Plump, Smith et al. 1992; Zhang, Reddick et al. 1992], bevor in den folgenden Jahren einige weitere, wie beispielsweise die LDL-Rezeptor-Knockout-Maus und verschiedene Doppel-Knockout-Mäuse entwickelt wurden [Xiangdong, Yuanwu et al. 2011]. Bei der ApoE-defizienten-Maus erfolgt die Atheroskleroseentwicklung spontan, kann jedoch durch Ernährung mit einer cholesterinreichen „Western-type-diet“ beschleunigt und forciert werden.

Die Plaquemorphologie dieses murinen Atherosklerosemodells ist weitestgehend mit der des Menschen vergleichbar. Trotzdem muss die direkte Übertragung auf den Menschen immer kritisch hinterfragt werden, da trotz der potentiellen Übertragbarkeit einige pathophysiologische Unterschiede vorhanden sind.

In ApoE-Knockout-Mäusen können alle – auch beim Menschen vorkommenden – Phasen atherosklerotischer Läsionen beobachtet werden und auch atherosklerotische Komplikationen wie Rupturen und Thrombosen sind nachweisbar [Nakashima, Plump et al. 1994; Williams, Johnson et al. 2002]. Doch gerade diese Komplikationen treten am Mausmodell seltener auf und weichen morphologisch von denen in humanen Läsionen ab. Die Beschreibung, Definition und Interpretation der murinen Plaques ist deshalb umstritten [Falk, Schwartz et al. 2007; Jackson, Bennett et al. 2007; Schwartz, Galis et al. 2007].

Die Prädilektionsstellen der Atherosklerose im Modell der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus entsprechen ebenfalls vorwiegend denen des Menschen. Beispielsweise sind die Aortenwurzel, die konvexe Seite des Aortenbogens, die Abzweigungen der A. brachiocephalica und der A. carotis communis dextra aufgrund von Strömungsunregelmäßigkeiten früh betroffen, wobei im Verlauf auch in vielen weiteren Gefäßen atherosklerotische Läsionen gefunden werden können [Nakashima, Plump et al. 1994].

Die Ursache für die Atheroskleroseentwicklung bei der ApoE-defizienten Maus ist eine Veränderung im Fettstoffwechsel. Obwohl Mäuse und Menschen die gleichen Enzyme und Rezeptoren für den Lipidtransport besitzen, unterscheiden sich die murinen und humanen

Lipidprofile in ihrer Zusammensetzung. Der Gesamtcholesterinspiegel liegt bei nicht gentechnisch veränderten Mäusen deutlich niedriger als beim Menschen und das vorherrschende Lipoprotein ist im Gegensatz zum Menschen das HDL [Camus, Chapman et al. 1983]. Durch den Knockout des ApoE-Gens kommt es zur Steigerung des LDL- und des Cholesterinspiegels, es entsteht also zunächst ein Hyperlipoproteinämiemodell. Die erreichten Lipidkonzentrationen sind nun deutlich höher als bei Menschen mit einer nicht familiären Hypercholesterinämie.

Aus den an Tag 10 der Versuchsreihe abgenommenen Blutproben wurden die Gesamtcholesterin- und Triglyceridwerte im Serum der ApoE-defizienten Mäuse im Vergleich zum Wildtyp im Sinne einer Phänotypisierung bestimmt. Die Cholesterin-Konzentrationen waren – unabhängig von der Art der Präkonditionierung – in allen ApoE<sup>-/-</sup>-Gruppen im Vergleich zu den C57BL/6-Wildtyp-Mäusen um den Faktor 20 bis 25 erhöht. Die gemessenen mittleren Konzentrationen von etwa 62mg/dl für die Wildtyp-Tiere sowie von ca. 1209-1521mg/dl für die ApoE<sup>-/-</sup>-Tiere sind weitestgehend mit denen in der Literatur beschriebenen Werten vergleichbar. Für Wildtyp-Mäuse, welche wie in dieser Studie ein Standardfutter erhielten, werden Mittelwerte zwischen 60-86mg/dl angegeben [Plump, Smith et al. 1992; Zhang, Reddick et al. 1992], während bei den mit einer „Western type diet“ gefütterten ApoE-defizienten Tieren die Werte im Mittel bei 1821mg/dl liegen [Plump, Smith et al. 1992]. Bei den Triglycerid-Konzentrationen werden in der Literatur Werte von 64-73mg/dl für Wildtyp-Tiere mit Standardfutter und von ca. 107mg/dl für ApoE-defiziente Tiere mit WTD angegeben [Plump, Smith et al. 1992; Zhang, Reddick et al. 1992]. Somit sind auch diese Triglycerid-Werte mit unseren Beobachtungen vergleichbar, bei denen für Wildtyp-Tiere Werte von ca. 69mg/dl und für die ApoE-Knockout-Mäuse zwischen 83-133mg/dl gemessen wurden. Die Phänotypisierung zeigt also eine erfolgreiche Reproduktion des Modells der ApoE-defizienten Maus und stellt die Voraussetzung für Rückschlüsse auf die Übertragbarkeit der Ergebnisse dar.

### 5.1.2 Rückenhautkammermodell

Für die Untersuchungen diente das seit vielen Jahren etablierte Modell der chronischen Rückenhautkammer an der Maus [Lehr, Leunig et al. 1993]. Dieses Modell wurde mit einem randomisiert durchbluteten Hautlappen kombiniert, welcher unter Mitnahme des Panniculus carnosus gehoben wurde [Harder, Amon et al. 2004] und ermöglichte die repetitive Analyse mikrozirkulatorischer Parameter unter chronischer Ischämie mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie. Es war somit möglich, definierte Abschnitte des Haut-Muskellappens über einen Zeitraum von 10 Tagen zu beobachten, ohne dass eine erneute Intervention oder Manipulation am Lappengewebe notwendig war oder die Versuchstiere in

ihren Lebensgewohnheiten wesentlich eingeschränkt waren. Bestimmte Gefäßbündel wurden am ersten Beobachtungstag definiert und konnten über den gesamten Versuchszeitraum zuverlässig wieder aufgefunden und untersucht werden. Dies ermöglichte eine sehr genaue Analyse der Entwicklung der chronischen Ischämie als klinisch realistische Situation. Das ist ein Vorteil gegenüber den vielfältigen Akut-Modellen, welche eine Beobachtung der Mikrozirkulation nur über einige Stunden zulassen. Ein weiterer Vorteil lag darin, dass das zu untersuchende Gewebe nur für kurze Zeit der Raumluft und Temperaturschwankungen ausgesetzt, danach rasch in der Rückenhautkammer fixiert und anschließend kaum noch manipuliert wurde. Bei den Akut-Modellen kann beispielsweise durch Atemexkursionen oder Peristaltik die Beobachtung erschwert oder aber bei der Untersuchung ex situ das Gewebe durch die Exposition gegenüber Raumluft, Licht und Temperatur unphysiologisch verändert werden [Meßmer, Krombach 1998].

Das Länge-Breite-Verhältnis des „random pattern flap“ von 11x15mm wurde so gewählt, dass sich über einen Versuchszeitraum von 10 Tagen bei mit NaCl behandelten Wildtyp-Mäusen eine Lappennekrose von etwa 50% entwickelte. Bei den ApoE-defizienten Tieren lag die Nekroserate nach 10 Tagen entsprechend höher, nämlich bei 61-65% der Gesamtgewebefläche. Bei der Analyse der mit den verschiedenen Substanzen präkonditionierten Versuchsgruppen konnte nun entweder eine Verminderung oder Zunahme der Nekrose festgestellt und zusätzlich viele weitere mikrozirkulatorische Parameter bestimmt werden.

Die verwendeten Substanzen wurden den Versuchstieren intraperitoneal oder intragastral verabreicht und konnten somit systemisch wirken. Dies ermöglichte es, die Medikamente im Sinne einer Präkonditionierung bereits vor der eigentlichen Lappenpräparation das erste Mal zu applizieren. Gleichzeitig war eine regelmäßige wiederholte Gabe der jeweiligen Substanz möglich. Da in der rekonstruktiven Chirurgie Operationen zur Defektdeckung in der Regel elektive Eingriffe darstellen, ist die Möglichkeit der Präkonditionierung zur Verbesserung des Lappen-Outcome und Reduktion der Lappennekrose ein interessanter und wünschenswerter therapeutischer Ansatz. Bei einer lokalen Injektion in den Lappenstiel wäre dies nicht möglich gewesen. Jede weitere Applikation wäre durch die fest angebrachte Rückenhautkammer technisch aufwändig und mit einer Manipulation am kritisch perfundierten Lappengewebe verbunden gewesen.

Das beschriebene Modell des „random pattern flap“ in der chronischen Rückenhautkammer stellt eine gute Basis dar, um die klinisch relevanten Probleme bei der Verwendung von Lappenplastiken nachzustellen, deren pathophysiologische Ursachen zu untersuchen und mögliche therapeutische Strategien zu entwickeln.

### 5.1.3 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie diente als direkte Untersuchungsmethode von physiologischen und pathologischen Veränderungen der Mikrohämodynamik. Hierdurch konnten beispielsweise Perfusion, Dilatation oder Konstriktion in Arteriolen, Venulen und Kapillaren dargestellt und das Ausmaß der Nekroseentwicklung untersucht werden. Voraussetzung für diese Darstellung ist die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, welche nach Anregung durch Licht einer bestimmten Wellenlänge selbst Lichtquanten emittieren. Verwendet wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Fluoreszein-Isothiozyanat gebunden an hochmolekulares Dextran zur Anfärbung des Plasmas und damit indirekten Beobachtung von Erythrozyten sowie Bisbenzimid zur Anfärbung apoptotischer Zellen *in vivo*. Bisbenzimid wurde dabei nur einmalig während der Lappenpräparation lokal aufgetragen, um eine weitere Manipulation am Lappengewebe zu vermeiden und somit eine mechanisch bedingte Gewebsentzündung und die damit einhergehenden Verfälschungen der erhobenen Daten zu verhindern. Potenziell ist die Induktion phototoxischer Effekte und damit die Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse bei der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen möglich [Steinbauer, Harris et al. 2000]. Deshalb sollte die Dosis der Fluorochrome möglichst gering und die Belichtungszeit des Gewebes so kurz als möglich gehalten werden, was beides in der aktuellen Studie erfolgte. Da sowohl FITC-Dextran als auch Bisbenzimid zu den sehr häufig in experimentellen Studien verwendeten Farbstoffen zählen, ist die Vergleichbarkeit zu anderen Studien gegeben.

Durch das konsequente Einhalten eines Zeitfensters von mindestens 24 Stunden zwischen Operation und der ersten intravitalmikroskopischen Untersuchung war es möglich eine ausreichende Bildqualität zu gewährleisten, da sich das nach der Präparation durch das Weichteiltrauma entstandene Gewebeödem nach etwa 24 Stunden weitestgehend erholt hatte. Bereits einen Tag nach der Lappenhebung war die erreichte Bildqualität im Allgemeinen gut, allerdings bestand an Tag 10 der Versuchsreihe gelegentlich durch das ischämieinduzierte Ödem eine im Vergleich zum Versuchsbeginn nur mäßige Bildqualität.

Die offline-Auswertung der aufgenommenen Videosequenzen erfolgte mittels eines computergestützten Analysesystems (CapImage<sup>®</sup>), was eine zeitlich unabhängige, digitalisierte und wesentlich rationellere Quantifizierung der untersuchten Parameter ermöglichte. Das zur Auswertung notwendige konstant hohe Signalverhalten stellte kein Problem dar und die Beeinflussung durch Bewegungsartefakte wurde minimiert, da eine Fixierung der Versuchstiere während der intravitalmikroskopischen Untersuchung erfolgte.

---

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

### 5.2.1 Simvastatin und Theophyllin

Alle ApoE-defizienten Tiere dieser Versuchsgruppen sowie die Tiere der Kontrollgruppe zeigten einen signifikant erhöhten Serum-Cholesterinspiegel im Vergleich zu Wildtyp-Tieren und bestätigten damit die erfolgreiche Reproduktion des Modells der Apolipoprotein E-Knockout-Maus. Die nahezu gleich hohen Gesamtcholesterin-Konzentrationen zwischen den mit Simvastatin und Theophyllin präkonditionierten sowie mit NaCl behandelten ApoE-defizienten Tieren lassen den Schluss zu, dass die vorliegenden Veränderungen der Mikrozirkulation und der nekrotischen Gewebefläche nicht allein auf einer Veränderung der Plasmalipide beruhen, sondern zusätzlich andere Ursachen haben.

Im Fall der Statine entspricht dies den publizierten Daten. In vorangegangenen Studien konnte belegt werden, dass Statine in ApoE-Knockout-Mäusen nicht zur Senkung des Gesamtcholesterols führen bzw. bei längerer Behandlung sogar einen Anstieg bewirken können [Bea, Blessing et al. 2002; Sparrow, Burton et al. 2001]. Selbst bei einer länger andauernden Substitution von Simvastatin über einen Zeitraum von 6 Wochen konnte weder eine Senkung des Gesamtcholesterins noch ein Abfall der Triglycerid-Konzentrationen im Serum von ApoE-Knockout-Mäusen beobachtet werden – unabhängig von der Höhe der verabreichten Dosis [Sparrow, Burton et al. 2001]. Im Gegensatz zur LDL-Rezeptor-Knockout-Maus, bei welcher HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren eine Cholesterinsenkung bewirken konnten [Eussen, Rempelberg et al. 2011; Bisgaier, Essenburg et al. 1997], beruhen die beobachteten Effekte hier somit ausschließlich auf den pleiotropen Mechanismen der Statine.

Auch bei den mit Theophyllin behandelten Tieren können die erzielten Effekte nicht auf die Verbesserung des Lipidstoffwechsels zurückgeführt werden, da auch hier keine Senkung der Serum-Cholesterinwerte beobachtet werden konnte. Vielmehr zeigten sich in dieser Gruppe die höchsten Triglycerid-Konzentrationen. An Ratten wurden nach achtwöchiger Gabe von Theophyllin erhöhte Serumcholesterin-Werte bei Erniedrigung der Serumtriglycerid-Spiegel beobachtet, zusätzlich kam es zu erniedrigten hepatischen Lipid- und Calciumwerten [Tobin, Friend et al. 1976]. Bei Kindern mit Asthma bronchiale, welche eine Langzeitbehandlung mit Theophyllin erhielten, führte die Therapie zu signifikant erhöhten Cholesterin-, LDL- sowie Triglycerid-Werten, welche potentiell das Risiko erhöhen später eine Atherosklerose zu entwickeln [Uzuner, Karaman et al. 2002]. Daten über die Wirkung von Theophyllin auf die Serumlipidwerte an der ApoE-defizienten Maus wurden bisher nicht publiziert, so dass eine Erhöhung der Lipidlevel an ApoE-Knockout-Mäusen unter länger andauernder Theophyllin-Behandlung nur vermutet werden kann, da es bereits nach 5 Tagen zu einer deutlichen

---

Erhöhung der TAG-Konzentrationen kam. Was die Ursache dieser Erhöhung ist, konnte trotz intensiver Recherche nicht eruiert werden.

Der wichtigste und aussagekräftigste Parameter zur Überprüfung der Effektivität unserer Präkonditionierung ist die Veränderung der nekrotischen Gewebefläche. Simvastatin führte ebenso wie in der Kontrollgruppe aufgrund der chronischen Ischämie innerhalb des Modells zu einem zunehmenden Perfusionsausfall über den Versuchszeitraum von 10 Tagen. Insgesamt war dieser Perfusionsausfall jedoch geringer ausgeprägt als in der Kontrollgruppe. In C57BL/6-Mäusen konnte nach Präparation eines „random pattern flap“ – in analoger Weise zu der hier angewandten Methodik – nach Simvastatingabe ein signifikant verbessertes Lappenüberleben beobachtet werden. Durch die Präkonditionierung mit Simvastatin wurde in diesen Tieren die entzündliche Antwort in den kritisch perfundierten Lappenanteilen verringert, der apoptotische Zelltod reduziert, die kapillare Perfusion aufrecht erhalten und es konnte eine Neubildung von funktionellen Gefäßstrukturen erreicht werden [Mörsdorf, Bächle et al. 2009]. Am McFarlane-Flap der Ratte untersuchten Uygur et al. die dosisabhängige Wirkung von Simvastatin auf das Lappenüberleben. Dieses konnte bei Gabe von 5mg/kg KG\*d, der selben Dosis welche wir in unserer Studie verwendeten, signifikant verbessert werden und der Blutfluss wurde im Gegensatz zur Kontrollgruppe aufrechterhalten [Uygur, Noyan et al. 2009].

An der ApoE-Knockout-Maus konnte eine statistisch signifikante Protektion des kritisch perfundierten Lappen jedoch nicht erreicht werden. Dies hängt vor allem damit zusammen, dass Durchmesser, Fließgeschwindigkeiten und Blutfluss weder in Arteriolen, noch Venulen oder Kapillaren im Vergleich zur Kontrollgruppe ausreichend erhöht werden konnten. Betrachtet man den kritisch perfundierten zentralen Anteil des Lappen war die arterioläre Fließgeschwindigkeit lediglich an den Tagen 7 und 10 signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Andere, wesentliche signifikante Unterschiede bezüglich Arteriolen und Venulen bestanden keine. Zu diesem späten Zeitpunkt im Versuch ist die Nekrose jedoch in der Regel schon etabliert und kann nicht mehr durch eine verbesserte Mikroperfusion rückgängig gemacht werden. Im Bereich der Kapillaren kam es überdies zur Vasokonstriktion in allen Lappenanteilen, vor allem bis zu Tag 5 der Versuchsreihe. Die funktionelle Kapillardichte, als Maß für die nutritive Perfusion, war im proximalen Lappenanteil gegenüber der Kontrollgruppe leicht erhöht, was die Erklärung dafür sein könnte, dass das Lappenüberleben in den mit Simvastatin behandelten Tieren verbessert war.

Auch der apoptotische Zelltod konnte durch Gabe von Simvastatin nicht verringert werden, tendenziell waren in dieser Gruppe sogar mehr apoptotische Zellen pro Fläche sichtbar. Auch in LDL-Rezeptor-Knockout-Mäusen bewirkte die Gabe von Simvastatin eine Zunahme der Anzahl apoptotischer Zellen nach Angioplastie der A. carotis [Chen, Fukutomi et al.

2002] und führte zusätzlich zu einer geringeren Leukozytenakkumulation. Interessanterweise kam es in dieser Studie zu keinem Anstieg der Plasmalipidwerte, die Effekte sind somit ebenfalls unabhängig von einer Lipidsenkung [Chen, Fukutomi et al. 2002].

Warum genau in C57BL/6-Mäusen – dem Wildtyp der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus – durch perioperative Gabe von Simvastatin die kapillare Perfusion aufrecht erhalten und die Apoptoserate verringert werden konnte, dies aber in den ApoE-Knockout-Tieren nur mäßig gelang, bleibt unklar. Bei der Präparation des „random pattern flap“ entsteht zwangsläufig eine relative Ischämie, welche bei Überschreitung der Ischämietoleranz zu irreversiblen hypoxischen Gewebeschäden führt. Für die Untersuchung von Ischämie-/Reperfusionsschäden existieren viele verschiedene Modelle, und der Einsatz von Simvastatin zum potentiellen Schutz des ischämischen Gewebes wurde vielfach untersucht. Van den Heuvel et al. untersuchten retrospektiv ob eine bereits bestehende Medikation mit Statinen die Komplikationsrate nach DIEP (Deep Inferior Epigastric Perforator Free Flap)-Lappenplastik beim Menschen senkt. Diese freie Lappenplastik wird intraoperativ einer etwa 60-minütigen Ischämie ausgesetzt und führt in 5-10% der Fälle zum (partiellen) Lappenverlust. Eine vorbestehende Hausmedikation mit HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren führte jedoch nicht zu einer Verringerung der I/R-induzierten Komplikationen [van den Heuvel, Bast et al. 2012].

Im Gegensatz hierzu führte die präoperative Gabe von Simvastatin (orale oder subkutane Gabe) an einem Ischämie-/Reperfusionmodell am Rückenmark der Ratte zu einem verbesserten neurologischen Outcome und zu einer höheren Anzahl intakter Motoneurone im Vergleich zu Kontrolltieren ohne Simvastatingabe [Hwang, Hang et al. 2013; Saito, Tsuchida et al. 2011]. Auch beim akuten Lungenversagen, verursacht durch einen bilateralen I/R-Schaden am Hinterfuß der Ratte bzw. vorübergehende Okklusion der A. mesenterica superior, weist Simvastatin einen positiven Effekt auf. Eine Präkonditionierung mit 10mg/kg KG\*d Simvastatin führte zur Verbesserung der Sauerstoffsättigung, reduzierte die Ausbildung eines Lungenödems und verringerte die Neutrophilen-Infiltration und den Myeloperoxidase-Spiegel in der Lunge [Pirat, Zeyneloglu et al. 2006; Sun, Wang et al. 2007]. Beim intestinalen Ischämie-/Reperfusionsschaden an der Ratte führte Simvastatin zur Downregulation des Serum-TNF $\alpha$ - und Malondialdehyd-Spiegels im Gewebe und wirkte somit anti-inflammatorisch. Zusätzlich waren die Spiegel der zellulären anti-oxidativen Enzyme Glutathion-Peroxidase und Superoxid-Dismutase signifikant höher als in der Kontrollgruppe [Hajipour, Somi et al. 2009]. Auch in der Skelettmuskulatur wirkte Simvastatin anti-inflammatorisch. Hier wurde die durch Ischämie/Reperfusion induzierte Myeloperoxidase-Aktivität und Neutrophilen-Infiltration im postischämischen Skelettmuskel der Ratte gehemmt [Cowled, Khanna et al. 2007]. Am Kaninchenherz bewirkte Simvastatin sowohl bei normalem als auch erhöhtem Cholesterinspiegel eine Reduktion der Infarktgröße

über eine vermehrte Produktion von NO bzw. eine Verminderung von oxidativem und nitrosativem Stress [Bao, Ushikoshi et al. 2009; Iliodromitis, Andreadou et al. 2010].

An der ApoE-Knockout-Maus wurde die Beeinflussung eines Ischämie-/Reperfusionsschaden durch Statine bisher noch nicht untersucht. Die zuvor aufgeführten Studien an der Ratte bedienten sich meist einer medikamentösen Präkonditionierung bis zu fünf Tage vor der Intervention und Weitergabe des Medikaments bis zum Versuchsende. Dies ist durchaus mit der Methodik unserer Studie vergleichbar, welche sich ebenso einer kurzfristigen Gabe bediente und keine chronische Medikamentenwirkung untersuchte. Insgesamt lässt sich im Hinblick auf die diversen Ischämie-/Reperfusionsschäden – welche vor allem an Ratten, aber auch Kaninchen und Mäusen getestet wurden – sagen, dass durch die Gabe von Statinen der I/R-Schaden in den meisten Studien reduziert werden konnte und sich gleichzeitig eine anti-inflammatorische und anti-oxidative Wirkung zeigte.

Die anti-inflammatorische Wirkung von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren konnte bereits mehrfach an der ApoE-defizienten Maus aufgezeigt werden. Eine viertägige Gabe von Atorvastatin führte in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen zu einer signifikant geringeren Makrophagen-Infiltration nach Verletzung der A.carotis als Indikator der Plaque-Stabilisierung [Larmann, Frenzel et al. 2013]. Auch Monetti et al. konnten die anti-inflammatorische Wirkung von Statinen in ApoE-Knockout-Mäusen bestätigen. Rosuvastatin reduzierte die Expression der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 in Aortenklappe und Aorta ascendens, die Makrophagen-Akkumulation und die Expression von Tissue Factor als potentesten prothrombotischen Mediator [Monetti, Canavesi et al. 2007]. Die Gabe von Fluvastatin führte zur Prävention der Ruptur atherosklerotischer Plaques in ApoE-defizienten Mäusen infolge einer Reduktion der inflammatorischen Antwort, einschließlich Leukozyteninfiltration, Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen und MMP-9-Expression [Nakamura, Sasaki et al. 2009]. Die anti-inflammatorischen Wirkungen von Simvastatin, welche wie gerade beschrieben auch schon an ApoE-Knockout-Mäusen nachgewiesen wurden, stellen einen möglichen Erklärungsansatz dar, warum der HMG-CoA-Inhibitor in unserer Studie gegenüber der Kontrollgruppe ein verbessertes Lappenüberleben zeigte.

Bei den mit Theophyllin präkonditionierten Tieren wurde das Lappenüberleben mit Abstand am meisten verbessert. Über den gesamten Beobachtungszeitraum von 10 Tagen war die Lappennekrose gegenüber der Kontrollgruppe – mit 21±3% gegenüber 61±9% an Tag 10 – signifikant reduziert ( $p < 0,05$ ). Der Hauptgrund hierfür liegt sicherlich in einer deutlich verbesserten nutritiven Perfusion. Die funktionelle Kapillardichte war im proximalen und zentralen Lappenanteil bereits initial deutlich erhöht und insbesondere im kritisch perfundierten zentralen Anteil konnte das hohe Niveau der Kapillardichte über den gesamten Versuchszeitraum aufrechterhalten werden ( $p < 0,05$ , Tag 10). Während die Kontrollgruppe

konstante venuläre Durchmesser zeigte, führte die Präkonditionierung mit Theophyllin zu einer signifikanten venulären Vasodilatation im proximalen und vor allem im zentralen Lappenanteil. Durch den hierdurch verbesserten Blutabfluss konnte eine Stase im Lappengewebe verhindert werden. Die arteriolären Durchmesser zeigten kaum eine Veränderung, allerdings war die arterioläre Fließgeschwindigkeit im zentralen und distalen Lappenanteil deutlich erhöht. Somit war auch der erforderliche Blutfluss in den Lappen gewährleistet.

Die Anzahl von Publikationen zu den Effekten einer Präkonditionierung mit Theophyllin bei Ischämie-/Reperfusionsschäden ist gering und sehr uneinheitlich. Die meisten Publikationen wurden Mitte der 80er bis Mitte der 90er Jahre veröffentlicht. In den letzten 20 Jahren sank die Zahl der Publikationen kontinuierlich, sicherlich nicht zuletzt weil Theophyllin eine geringe therapeutische Breite besitzt und nach Entwicklung neuerer Medikamente heutzutage in der Therapie des Asthma bronchiale und der COPD nur noch ein Reservemedikament darstellt. Die Wirkmechanismen von Theophyllin sind vielfältig und das exakte Zusammenspiel der einzelnen Mechanismen bis heute unklar. Barnes hatte 2013 folgende Wirkmechanismen von Theophyllin zusammengefasst: unselektive Inhibition der Phosphodiesterasen, Antagonismus an Adenosin-Rezeptoren, Stimulation der Ausschüttung von IL-10, Effekte auf Transkriptionsebene und auf das Zellüberleben sowie Aktivierung der Histon-Deacetylase [Barnes 2013]. Das Zusammenspiel all dieser Mechanismen führt zu den bereits beschriebenen Wirkungen von Theophyllin, also Hemmung der Thrombozytenaggregation, Hemmung der Entzündungsreaktion, zentralnervösen und kardialen Stimulation sowie Dilatation der Bronchien [Ardlie, Glew et al. 1967; Choi, Shamim et al. 1988; Riksen, Smits et al. 2011; Spina 2003]. Welcher dieser Wirkmechanismen nun für die Verbesserung der Mikrozirkulation in unserem Modell verantwortlich ist, kann im Rahmen dieses Versuches nicht differenziert werden, hierzu würde es weiterer Untersuchungen bedürfen.

Die Wirkung von Adenosin auf verschiedene Ischämie-/Reperfusionsschäden wurde recht häufig am Tiermodell und hier vor allem in Bezug auf die Myokardischämie untersucht. Die Mehrzahl der Autoren konnte einen positiven Effekt von Adenosin auf die Ischämieentwicklung bzw. deren Folgen beobachten. Demzufolge konnten für Adenosin-Rezeptor-Antagonisten meist keine schützenden Effekte nachgewiesen werden, vielmehr wurden teilweise sogar negative Folgen aufgezeigt. Hierbei wurde meist 8-(p-Sulfophenyl)-Theophyllin (8-SPT) verwendet, welches eine höhere Selektivität für den A1-Rezeptor zeigt als das von uns verwendete Theophyllin. An einem in-vivo-Modell des akuten Myokardinfarktes am Kaninchen durch einen vorübergehenden Verschluss der linken Koronararterie führte eine Präkonditionierung mittels 10-minütigem Verschluss der A. renalis mit anschließender Reperfusion zur Verringerung der Infarktgröße. Diese Protektion wurde

durch Gabe von 8-(p-Sulfophenyl)-Theophyllin aufgehoben. Auch an Kontrolltieren ohne Präkonditionierung konnte die Infarktgröße durch 8-SPT nicht vermindert werden [Pell, Baxter et al. 1998]. Ogawa zeigte ebenfalls, dass die positiven Effekte von Adenosin auf I/R-Schäden an Kaninchenherzen durch 8-SPT aufgehoben werden [Ogawa, Miura et al. 1996]. An Hundeherzen wurde eine 90-minütige Ischämie durch Okklusion der LAD und anschließender Reperfusion mit oder ohne Präkonditionierung durch wiederholten Verschluss der LAD durchgeführt. Durch die Präkonditionierung kam es zur signifikanten Reduktion der Infarktgröße, welche durch 8-(p-Sulfophenyl)-Theophyllin jedoch teilweise wieder aufgehoben wurde [Hoshida, Kuzuya et al. 1994]. Auch bei der Postkonditionierung nach I/R-Schaden an isolierten Rattenherzen wurde die Protektion durch 8-SPT als Adenosin-Rezeptor-Antagonist verhindert [Penna, Mancardi et al. 2009]. Yildiz et al. konnten an einem Modell an der isolierten Rattenlunge zeigen, dass eine Vorbehandlung mit Theophyllin die protektiven Effekte der Präkonditionierung durch Ischämie/Reperfusion oder Adenosin-Gabe wieder aufhebt [Yildiz, Demiryürek et al. 2007]. Die Wirkung von Theophyllin wurde auch an einem Ischämiemodell am Gehirn von Ratten untersucht. 5 Tage nach der cerebralen Ischämie zeigten Tiere, welche mit Theophyllin vorbehandelt wurden, eine signifikante Erhöhung der Anzahl toter Neurone. Im Gegensatz hierzu gab es bei mit Adenosin behandelten Ratten signifikant weniger Ischämieschäden als in der korrespondierenden Kontrollgruppe [Zhou, Meno et al. 1994]. Eldaif et al. untersuchten den Einfluss des Adenosin-Rezeptor-Antagonismus am renalen I/R-Schaden an einem Rattenmodell. Postkonditionierung verbesserte in diesem Modell die Nierenfunktion (Reduktion von Kreatinin und Harnstoff-Stickstoff im Blut) und reduzierte die Apoptoserate. 8-SPT führte zu einer Umkehr dieser schützenden Effekte [Eldaif, Deneve et al. 2010]. Die beschriebenen Studien hatten sich alle als Ziel gesetzt, den Einfluss von Adenosin auf verschiedene Ischämie-/Reperfusionsschäden zu untersuchen. Insgesamt wurden die durch Prä- oder Postkonditionierung erzeugten protektiven Effekte durch Adenosin-Rezeptor-Antagonisten egalisiert, wobei hierzu meist 8-(p-Sulfophenyl)-Theophyllin mit einer relativ hohen Selektivität für den A1-Rezeptor verwendet wurde. Vor diesem Hintergrund ist es unwahrscheinlich, dass die in unserer Studie beobachteten positiven Effekte von Theophyllin auf die Durchblutung von kritisch perfundierten Lappenplastiken auf einer Inhibition von Adenosin-Rezeptoren, insbesondere des A1-Rezeptors, beruhen.

Weitere Studien beziehen sich vor allem auf die molekularen Effekte von Theophyllin in verschiedenen experimentellen Situationen. Theophyllin verbessert dosisabhängig die Lungenfunktion der Rattenlunge nach 6 Stunden hypothermer Aufbewahrung im Sinne einer verbesserten Compliance und eines erniedrigten Widerstandes der Lungengefäße [Featherstone, Kelly et al. 1999] und vermindert die intermediären Produkte der Lipidperoxidation [Bostanci, Toker et al. 2003]. Ogawa et al. konnten aufzeigen, dass

Theophyllin dosisabhängig die LPS (Lipopolysaccharid)-induzierte NO-Produktion in kultivierten Astrozyten verstärkt. Dies geschieht wahrscheinlich über die Aktivierung von NFκB und der induzierbaren NO-Synthase, zusätzlich ist die Aktivierung der Proteinkinase A durch PDE-Inhibition an den Effekten beteiligt [Ogawa, Takano et al. 2014]. Beim Ischämie-/Reperfusionsschaden am Dünndarm der Ratte führte Theophyllin zur Reduktion der DNA-Fragmentation und geringeren Caspase-3-Aktivität [Genesca, Sola et al. 2002]. Nach experimenteller orthotoper Nieren-Transplantation am Rattenmodell wirkte sich die Theophyllin-Gabe positiv auf die Nierenfunktion aus. An Tag 5 bestand eine Erhöhung der glomerulären Filtrationsrate auf das Doppelte. Hierbei hatte Theophyllin keinen Einfluss auf Zytokin- und Erythropoetin-Serumspiegel oder die Infiltration des Transplantates mit Monozyten, Makrophagen und T-Zellen [Grenz, Baier et al. 2006]. Badosa et al. zeigten, dass Theophyllin bei einer Pankreas-Transplantation an der Ratte mit kalter Ischämiezeit die Zunahme von Nitriten und Nitraten, Myeloperoxidase-Aktivität, Lipoperoxidations-Level und die Neutrophilen-Rekrutierung im Pankreas vermindert [Badosa, Sola et al. 2001]. Theophyllin zeigt also durchaus positive Effekte bezüglich eines Ischämie-/Reperfusionsschadens an verschiedenen Organen oder Geweben. Welcher Mechanismus bzw. die Kombination welcher Wirkmechanismen letztendlich zur Protektion der Mikrozirkulation und damit auch zum verbesserten Lappenüberleben in unserem Modell beigetragen hat, kann anhand unserer Studie leider nicht genau abgegrenzt werden. Sicher ist aber, dass durch eine Präkonditionierung mit Theophyllin die Mikrozirkulation anhaltend verbessert und somit die Entstehung einer Gewebenekrose deutlich vermindert wurde.

### 5.2.2 Spezifische Inhibition der PDE 3, 4 und 5

Alle ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse, welche mit den unterschiedlichen spezifischen Inhibitoren der Phosphodiesterase behandelt wurden, sowie die Kontrollgruppe wiesen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen signifikant erhöhte Serum-Cholesterinwerte auf. Die mit Rolipram behandelten ApoE-defizienten Tiere wiesen zudem ein signifikant erhöhtes Gesamtcholesterin im Vergleich zu mit Cilostazol behandelten ApoE<sup>-/-</sup>-Tieren auf. Zwischen den restlichen Gruppen ApoE-defizienter Tiere bestanden keine wesentlichen Unterschiede, sowohl in Bezug auf die Gesamtcholesterin- als auch auf die Triglycerid-Konzentrationen. Die Differenzen in der Nekroseentwicklung als Endpunkt unserer Studie müssen somit auf anderen Ursachen als einer Veränderung der Plasmalipide beruhen.

Die Wirkungen des PDE 3-Inhibitors Cilostazol auf das Lipidprofil wurden bereits vielfach untersucht. An der LDL-Rezeptor-Knockout-Maus konnte keine Senkung des Gesamtcholesterins beobachtet werden, allerdings fand sich eine signifikante Erhöhung des HDL-Spiegels im Plasma [Yoshikawa, Mitani et al. 2008]. Diese Erhöhung des HDL konnte

auch an ApoE-defizienten Mäusen nach 4-wöchiger Cilostazol-Gabe beobachtet werden [Takase, Hashimoto et al. 2007]. In männlichen Ratten führte die spezifische Hemmung der PDE 3 zur Reduktion der Triglyceride, während die Cholesterinwerte kaum beeinflusst wurden und auch am diabetischen Rattenmodell, wo primär höhere TAG und Cholesterinkonzentrationen vorlagen, konnte eine Senkung der Triglyceride aufgezeigt werden, allerdings nur bei Hochdosierung von 100 mg/kg KG [Tani, Uehara et al. 2000]. An einem Kaninchenmodell, bei welchem die Tiere mit einer cholesterinreichen Diät gefüttert wurden, kam es zum Anstieg von Cholesterin, TAG und Phospholipiden im Serum, welcher durch die Gabe von Cilostazol deutlich vermindert werden konnte [Ito, Uehara et al. 2012]. Auch am Menschen wurde der Einfluss von Cilostazol auf den Lipidstoffwechsel bereits untersucht. Eine randomisierte Studie mit Typ 2-Diabetikern zeigte eine Senkung von Triglyceriden und Cholesterin sowie eine Erhöhung von HDL in der Cilostazol-Gruppe im Vergleich zu mit Aspirin behandelten Patienten, 1 und 2 Jahre nach Therapiebeginn [Katakami, Kim et al. 2010]. In Patienten mit Claudicatio intermittens kam es nach 12 Wochen Behandlung mit Cilostazol zu einer Reduktion der Triglyceride um 15 % sowie zu einer Steigerung des HDL um 10% des Ausgangswertes versus Placebo [Elam, Hackman et al. 1998]. Insgesamt zeigen die meisten Studien eine Reduktion der Triglyceride und eine Erhöhung des HDL durch Cilostazol. Die Literatur bezüglich einer Cholesterinsenkung hingegen ist äußerst uneinheitlich. In unserem Modell an der ApoE-defizienten Maus konnten wir keine signifikante Reduktion der Cholesterin- oder Triglycerid-Konzentrationen im Serum beobachten. Allerdings erfolgte die Medikamentengabe über einen kürzeren Zeitraum und in einer geringeren Dosierung als in den meisten anderen Studien. So können wir allerdings sicher sein, dass die Beeinflussung der mikrozirkulatorischen Parameter durch veränderte Lipidwerte ausgeschlossen ist.

Bisher liegen keine Untersuchungen zu den Auswirkungen von Rolipram auf den Lipidstoffwechsel vor. In unserer Studie waren die Cholesterinwerte im Serum der mit Rolipram präkonditionierten ApoE<sup>-/-</sup>-Tiere im Vergleich zu Wildtyp-Tieren um den Faktor 25 erhöht, es zeigte sich somit auch hier die erfolgreiche Reproduktion des Modells der ApoE-defizienten Maus. Zu den mit NaCl-behandelten ApoE-Knockout-Mäusen bestanden keine signifikanten Unterschiede und auch bei den Triglycerid-Konzentrationen konnten solche nicht beobachtet werden. Eine Beeinflussung der Ergebnisse durch Veränderungen im Lipidprofil ist somit ausgeschlossen. Warum die Gesamtcholesterin-Konzentration der Rolipram- gegenüber der Cilostazol-Gruppe signifikant erhöht war, konnte trotz intensiver Literaturrecherche nicht eruiert werden.

In einer Studie von Balarini et al. wurden ApoE-defiziente Mäuse, welche wie in unserer Studie ebenfalls mit einer „Western-type-diet“ gefüttert wurden, über 3 Wochen mit Sildenafil behandelt und unter anderem die Auswirkungen auf den Lipidstoffwechsel dieser Tiere

untersucht. Die ApoE-Knockout-Mäuse wiesen erwartungsgemäß deutlich höhere Gesamtcholesterin- und Triglyceridwerte auf wie der Wildtyp, eine Behandlung mit Sildenafil brachte jedoch keine weitere Änderung der Lipidwerte mit sich [Balarini, Leal et al. 2014]. Rodrigues et al. konnten diese Ergebnisse bestätigen, auch in ihrer Studie ergab sich durch Sildenafil-Gabe keine signifikante Änderung in den Lipidwerten von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen [Rodrigues, Campagnaro et al. 2013]. Diese Beobachtungen konnten wir in unserer Studie ebenfalls bestätigen. Hier waren die Cholesterin- und Triglycerid-Konzentrationen im Mäuseserum gegenüber Wildtyp-Tieren signifikant erhöht, gegenüber der Kontrollgruppe ApoE-defizienter Tiere gab es jedoch keine signifikanten Unterschiede. Auch bei Kaninchen, welche mit einer fettreichen Diät gefüttert wurden, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in Cholesterin-, TAG-, LDL- und HDL-Konzentrationen nach 6-wöchiger Gabe von 5mg/kg KG\*d Sildenafil, der gleichen Dosierung, welche wir in unserer Studie verwendeten [Erden, Korgali et al. 2014].

Die mit Cilostazol als spezifischem Phosphodiesterase 3-Hemmer präkonditionierten Tiere wiesen das schlechteste Lappenüberleben der gesamten Studie auf und entwickelten aufgrund einer massiv eingeschränkten Perfusion eine Nekrose von knapp 76% der Gesamtgewebefläche. Ab dem 7. Tag konnte in Arteriolen und Venulen im zentralen und distalen Lappenanteil keinerlei Perfusion mehr nachgewiesen werden. Bei den kapillären Gefäßen betraf dies auch den proximalen Lappenanteil, hier kam die bereits von Beginn an schlechte nutritive Perfusion ab Tag 7 vollständig zum Erliegen. Zusätzlich entwickelten sich bei den mit Cilostazol behandelten Mäusen häufiger Ödeme und Einblutungen.

Frühere Studien haben schon mehrfach gezeigt, dass Cilostazol durchaus einen protektiven Effekt auf die Bildung atherosklerotischer Läsionen haben kann. An ApoE-Knockout-Mäusen führte Cilostazol nach 4-wöchiger Gabe zur dosisabhängigen Reduktion atherosklerotischer Läsionen und verminderte die Expression von VCAM-1 sowie die Monozyten/Makrophagen-Akkumulation in der Aortenwurzel. Allerdings betrug die verwendete Dosis in dieser Studie das bis zu 10fache unserer Medikamtendosierung [Takase, Hashimoto et al. 2007]. Auch in LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen, welche mit einer cholesterinreichen Diät gefüttert wurden, reduzierte Cilostazol die Bildung atherosklerotischer Läsionen mit reduzierter Makrophagen-Akkumulation sowie reduzierter Expression von Adhäsionsmolekülen [Lee, Oh et al. 2005, Yoshikawa, Mitani et al. 2008].

Eine randomisierte Studie an Diabetes-Patienten mit Verdacht auf eine periphere arterielle Verschlusskrankheit, welche über einen Beobachtungszeitraum von 2 Jahren mit Cilostazol behandelt wurden, zeigte eine Verringerung der Intima-Media-Dicke der A. carotis communis als Marker für kardiovaskuläre Ereignisse im Vergleich zu mit Aspirin behandelten Patienten [Katakami, Kim et al. 2010]. Bei in vitro-Versuchen führte Cilostazol cAMP- und PKA-

unabhängig zur Inhibition der Aufnahme von acetyliertem und oxidiertem LDL in peritoneale Maus-Makrophagen und zur Reduktion der Schaumzellenbildung [Okutsu, Yoshikawa et al. 2009]. Die Progression atherosklerotischer Läsionen im Verlauf der Versuchsreihe wurde in unserem Modell nicht gesondert betrachtet. Aufgrund der vorliegenden Studien, welche eine Regression dieser Veränderungen zeigten, wäre eine durch die Verminderung atherosklerotischer Plaques verbesserte Durchblutung der Lappenplastik und damit eine Steigerung des Lappenüberleben zu erwarten gewesen, was in unserem Modell jedoch nicht bestätigt werden konnte.

Auch der Einfluss des spezifischen PDE3-Inhibitors auf Ischämie-/Reperfusionsschäden – welches unser Modell des „random pattern flap“ ebenso darstellt – wurde bereits wiederholt an verschiedenen Organen untersucht. An Kaninchenherzen, welche einer Ischämie durch Okklusion der Koronararterien und anschließender Reperfusion ausgesetzt wurden, konnte eine Präkonditionierung mit Cilostazol die Infarktgröße reduzieren [Bai, Muqier et al. 2011; Fukusawa, Nishida et al. 2008] und führte zur schnelleren Erholung der kontraktile Funktion. Dieser Effekt wurde durch direkte Aktivierung mitochondrialer Calcium-aktivierter Kalium-Kanäle und nicht durch eine Vasodilatation ausgelöst [Fukusawa, Nishida et al. 2008]. Bai et al. beobachteten nach Cilostazol-Gabe erhöhte Adenosin- und NO-Level während der Ischämie sowie eine erniedrigte Superoxid-Produktion [Bai, Muqier et al. 2011]. An einem Ischämiemodell am Gehirn von C57BL/6-Mäusen führte die Vorbehandlung mit Cilostazol zu einer signifikanten Reduktion der Mortalitätsrate und verbesserte das neurologische Outcome im Sinne einer besseren motorischen Funktion 7 Tage nach Induktion der Ischämie. Der spezifische PDE3-Hemmer verminderte die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen (P-Selektin und intrazelluläres Adhäsions-Molekül-1) und verhinderte die Thrombozyten- und Leukozyten-Aggregation in Mikrogefäßen in der akuten Phase im Anschluss an den cerebralen Ischämie-/Reperfusionsschaden [Hase, Okamoto et al. 2012]. Auch Fukuoka et al. haben an einem ähnlichen Tiermodell eines cerebralen I/R-Schaden an C57BL/6-Mäusen nachgewiesen, dass Cilostazol sowohl die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion als auch die Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion 3 und 6 Stunden nach Reperfusion inhibiert [Fukuoka, Hayashi et al. 2014]. Nach 45-minütigem ischämischen Rückenmarkschaden an der Ratte durch Abklemmen der Aorta abdominalis zeigten mit Cilostazol behandelte Tiere ein besseres neurologisches Outcome und verringerten oxidativen Stress [Sahin, Onan et al. 2011].

An der Niere zeigte Cilostazol ebenfalls protektive Funktionen. In einer Studie von Ragab et al. wurden Ratten 14 Tage mit 50 oder 100mg/kg KG\*d Cilostazol präkonditioniert, bevor ein Ischämie-/Reperfusionsschaden an der Niere induziert wurde. Tiere, welche Cilostazol erhielten, zeigten eine signifikante Protektion gegen den I/R-induzierten Nierenschaden, d.h. erniedrigte Serumlevel von Kreatinin und Cystatin C [Ragab, Abdallah et al. 2014].

---

In Kaninchen, welche einer 7-stündigen Ischämie durch Okklusion der A. femoralis mit anschließender Reperfusion über 2 Stunden ausgesetzt wurden, konnte der Anstieg des Kompartimentdruckes durch Cilostazol-Gabe 10min vor der Operation deutlich vermindert werden, während er in der Kontrollgruppe stark anstieg. Dieser Effekt scheint jedoch unabhängig vom oxidativem Metabolismus des Skelettmuskels zu sein und es gab auch keine Unterschiede in der Entwicklung eines Gewebeödems [Hakaim, Cunningham et al. 1999].

Allerdings gibt es auch einige Studien, welche die oben beschriebenen protektiven Effekte auf Ischämie-/Reperfusionsschäden nicht bestätigen konnten. An Ratten wurde ein muskulärer I/R-Schaden durch 4-stündige Okklusion der linken A. iliaca communis induziert und anschließend eine Reperfusion von 1 Stunde Dauer durchgeführt. Eine Cilostazol-Gabe mit oder ohne zusätzliche Präkonditionierung zeigte keinerlei positiven Effekte, während die alleinige Präkonditionierung durch vorherige 10-minütige Ischämie mit 10-minütiger Reperfusion die Anzahl der Myozyten-Nekrosen reduzieren konnte [Frias Neto, Koike et al. 2014]. Um den Effekt von Cilostazol nach Ischämie von Niere und Skelettmuskel zu untersuchen, wurde an Ratten ein I/R-Schaden durch zeitweiligen Verschluss der Aorta abdominalis hervorgerufen. Anschließend wurden linke Niere und Skelettmuskulatur am Hinterlauf entnommen und histologisch untersucht. Hierbei konnte kein protektiver Effekt von Cilostazol auf Nekrose, Ödem, inflammatorische Infiltrate und Apoptose nachgewiesen werden [Moreira Neto, Souza Júnior et al. 2012].

Die Literatur im Hinblick auf die Wirkung von Cilostazol auf Ischämie-/Reperfusionsschäden ist also nicht einheitlich. In der Mehrzahl der publizierten Studien waren die Effekte jedoch meist positiv. In unserem Modell des „random pattern flap“ konnten wir allerdings keine Verbesserung der Mikrozirkulation und damit keine Verhinderung der Nekroseentstehung durch spezifische Inhibition der Phosphodiesterase 3 mit Cilostazol aufzeigen. Vielmehr wurden die mikrozirkulatorischen Parameter von Beginn an durch Cilostazol-Präkonditionierung anhaltend verschlechtert und das Lappenüberleben war gar geringer im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Bei den mit Rolipram – als spezifischer PDE4-Inhibitor – präkonditionierten Tieren war die Nekroserate insgesamt deutlich geringer ausgeprägt als in der Kontrollgruppe, allerdings war der Unterschied statistisch nicht signifikant. Der arterioläre Blutfluss und die arterioläre Fließgeschwindigkeit im „random pattern flap“ waren im zentralen, also kritisch perfundierten Lappenanteil, deutlich höher als in der Kontrolle, hier könnte die Ursache für das bessere Lappenüberleben liegen. Denn die funktionelle Kapillardichte als Maß für die nutritive Perfusion war bei den mit Rolipram behandelten Tieren in allen Lappenanteilen sehr gering. Auffällig war zudem, dass sich am ersten Tag in den proximalen Venulen die höchste

Fließgeschwindigkeit aller Versuchsgruppen fand, die anschließend allerdings kontinuierlich bis unter das Niveau der Kontrollgruppe abfiel.

In einer in-vitro-Studie zeigten Lin et al., dass Rolipram einen positiven Effekt auf die Atherosklerose haben kann. Die Gabe von Rolipram erhöhte den Cholesterolefflux aus humanen und murinen Makrophagen und könnte somit auch zur Freisetzung von Cholesterolefflux aus atherosklerotischen Läsionen führen [Lin, Bornfeldt 2002]. Um den Einfluss von Rolipram auf die subkutane Entzündungsantwort und Entwicklung von intraperitonealen Adhäsionen in vivo zu untersuchen wurden Balb/c-Mäusen zwei Polyether-Polyurethanschwämme intraperitoneal und subkutan implantiert. Rolipram verringerte die Akkumulation von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen und reduzierte die Konzentration proinflammatorischer Zytokine im intraperitonealen Implantat. Außerdem wurde die Fibrosierung des Implantats vermindert [Mendes, Rocha et al. 2009]. In humanen Aorten-Endothelzellen führte Rolipram konzentrationsabhängig zur erhöhten NO-Produktion [Hashimoto, Miyakoda et al. 2006]. Die Inhibition der Phosphodiesterase 4 durch Rolipram vermag also die Durchblutung infolge einer Vasodilatation zu steigern, wirkt anti-inflammatorisch und erhöht den Cholesterolefflux.

Der Einfluss von Rolipram auf Ischämie-/Reperfusionsschäden diverser Organe ist schon vielfach untersucht worden. An einem Modell der isoliert perfundierten Rattenlunge reduzierte Rolipram die I/R-induziert erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität und somit auch die Ödembildung [Barnard, Seibert et al. 1994]. Auch Bleiweis et al. untersuchten die Wirkung von Rolipram auf einen Ischämie-/Reperfusionsschaden an der Rattenlunge. Hierzu wurde an Ratten ein Herzstillstand herbeigeführt und die Lunge anschließend in situ entweder mit 100% Sauerstoff ventiliert oder nicht ventiliert. Nach 30 bis 60 Minuten wurde die Lunge reseziert und reperfundiert. An den Lungen, welche mit einer Rolipramhaltigen Reperfusionslösung reperfundiert wurden, aber in situ zuvor nicht ventiliert wurden, konnte der I/R-Schaden reduziert werden. Der kapillare Filtrationskoeffizient war niedriger und es kam zu einer signifikanten cAMP-Erhöhung [Bleiweis, Jones et al. 1999].

An C57BL/6-Mäusen wurde ein ischämischer Schlaganfall durch Okklusion der A. cerebri media über 2 Stunden erzeugt und bei Beginn der anschließenden Reperfusion Rolipram in einer Dosis von 2 oder 10 mg/kg KG verabreicht. Tiere, welche 10 mg/kg KG Rolipram erhielten, zeigten einen Tag nach dem I/R-Schaden eine signifikante Reduktion des Infarktareals von über 50% gegenüber der Kontrollgruppe und ein deutlich verbessertes neurologisches Outcome. Die geringere Dosierung von 2 mg/kg KG vermochte diese Effekte nicht zu induzieren. Als Ursachen für diese Protektion wurden eine Stabilisierung der Blut-Hirn-Schranke, eine Reduktion des vaskulären Hirnödems sowie anti-inflammatorische, anti-thrombotische und anti-apoptotische Effekte von Rolipram aufgezeigt [Kraft, Schwarz et al. 2013].

Durch Abklemmen des Truncus coeliacus wurde eine gastrale Ischämie an der Ratte induziert. Der I/R-Schaden rief hämorrhagische Läsionen und einen Anstieg von TNF-alpha als proinflammatorisches Zytokin sowie die Erhöhung der Myeloperoxidase-Aktivität in der Magenmukosa hervor. Diese Effekte konnten durch Rolipram dosisabhängig inhibiert werden [Kyoj, Kitazawa et al. 2004].

Bei einem akuten I/R-Schaden an der Rattenniere führte Rolipram zur Reduktion des oxidativen Gewebeschaden. Bei Applikation erst 30 min nach der Ischämieinduktion waren zusätzlich die tubuläre Nekrose und Apoptoserate geringer ausgeprägt [Mammadov, Aridogan et al. 2012]. Auch an C57BL/6-Mäusen wurde der renale Ischämie-/Reperfusionsschaden bereits untersucht. Okusa et al. zeigten, dass der durch den I/R-Schaden bedingte Anstieg von Kreatinin und Myeloperoxidase-Aktivität durch Rolipram-Gabe 5 Stunden vor Ischämieinduktion dosisabhängig reduziert werden kann [Okusa, Linden et al. 2001].

Souza et al. untersuchten nach intestinaler Ischämie/Reperfusion an der Ratte sowohl lokale, als auch pulmonale Schäden und welchen Einfluss die Inhibition der PDE4 hierauf hat. Auch in dieser Studie wirkte sich die Gabe von Rolipram positiv aus. Bei milder Ischämie/Reperfusion unterdrückte es dosisabhängig den intestinalen und pulmonalen Anstieg der vaskulären Permeabilität und das Recruitment von neutrophilen Granulozyten. Beim schweren I/R-Schaden konnte Rolipram partiell die vaskuläre Permeabilität senken und das Neutrophilen-Recruitment sowie intestinale Blutungen partiell vermindern. Außerdem inhibierte Rolipram teilweise die Bildung von TNF- $\alpha$  [Souza, Cassali et al. 2001].

Insgesamt zeigten die Studien, dass Rolipram einen protektiven Effekt bei Ischämie-/Reperfusionsschäden hat. Dies konnten wir in unserer Studie ebenfalls bestätigen, denn Rolipram senkte die Lappennekrose an Tag 10 von 65% in der Kontrollgruppe auf 43% in der Rolipram-Gruppe.

Von den spezifischen PDE-Inhibitoren zeigte Sildenafil als Inhibitor der Phosphodiesterase 5 die größte Protektion des „random pattern flap“. Ab dem 3. Beobachtungstag zeigte sich eine signifikant reduzierte Lappennekrose gegenüber der Kontrollgruppe (41% vs. 65% an Tag 10,  $p < 0,05$ ). Die Fließgeschwindigkeiten in Arteriolen und Venulen waren bei den mit Sildenafil präkonditionierten Tieren insgesamt am höchsten. Vor allem aber war die funktionelle Kapillardichte im proximalen wie auch im kritisch perfundierten zentralen Lappenanteil über den gesamten Versuchszeitraum am höchsten.

Es gibt einige Studien, welche die positiven Effekte von Sildenafil auf die endotheliale Funktion beschreiben. Balarini et al. konnten an ApoE-Knockout-Mäusen, welche mit einer Western type diet gefüttert wurden, zeigen, dass eine 3-wöchige Sildenafil-Gabe die endotheliale Funktion am Aortenring verbessert und auch die Ablagerung atherosklerotischer Plaques in der Aorta um 40% verringert [Balarini, Leal et al. 2013]. Zusätzlich verringert die

Sildenafil-Gabe die Superoxid-Anion-Spiegel in mononukleären Zellen und reduziert die DNA-Fragmentation in mononukleären Zellen sowie Leberzellen in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen [Rodrigues, Campagnaro et al. 2013]. Das verbesserte Lappenüberleben in unserer Studie kann also durchaus auch auf Veränderungen auf molekularer Ebene beruhen, welche in unserer Studie jedoch nicht gesondert betrachtet wurden.

Die Wirkungen von Sildenafil auf Lappenplastiken wurden bisher vor allem am McFarlane-Flap der Ratte untersucht. Sarifakioglu et al. beobachteten an diesem Modell ein dosisabhängig verbessertes Lappenüberleben nach oraler Sildenafil-Gabe. Das beste Lappenüberleben zeigte sich bei einer Dosierung von 2x10mg/kg KG\*d Sildenafil [Sarifakioglu, Gokrem et al. 2004]. Eine Gabe von 9mg/kg KG des PDE-5-Inhibitors intraperitoneal führte zu einer Reduktion der Lappennekrose über den gesamten Beobachtungszeitraum von 7 Tagen, wobei dieser Unterschied an den Tagen 1 und 3 signifikant war [Hart, Baur et al. 2006]. Dies sind allerdings Dosierungen, die deutlich höher waren als unsere Gabe von 5mg/kg KG\*d. Auch Tsai et al. konnten diese Ergebnisse bestätigen. Eine intraperitoneale Sildenafil-Injektion von 10mg/kg KG verringerte die Fläche von avaskulärem Gewebe sowie die Stase im McFarlane Flap an den Tagen 3 und 7, Veränderungen in der Gefäßdicke konnten nicht nachgewiesen werden [Tsai, Ayubi et al. 2008]. Auch an Schweinen wurden positive Effekte durch Inhibition der Phosphodiesterase 5 nach freiem Transfer eines myokutanen Lappens beobachtet. Nach Transfer des M. latissimus dorsi wurden die Tiere 6 Stunden nach Revaskularisation mit Sildenafil als single-dose-Gabe behandelt. 7 Stunden später zeigte sich ein signifikant erniedrigter Pulsatilitätsindex, das Fließvolumen sowie die systolische Fließgeschwindigkeit waren erhöht und das diastolische Fließmuster wurde schneller wiederhergestellt [Gravvanis, Papalois et al. 2011].

Der Einfluss von Sildenafil auf Ischämie-/Reperfusionsschäden wurde bereits vielfach in vivo untersucht, zumeist an Maus- oder Rattenmodellen. An der ApoE<sup>-/-</sup>-Maus wurde durch Verschluss der A. femoralis eine Ischämie des Hinterfußes hervorgerufen. Eine orale Gabe von 40mg/kg KG Sildenafil verbesserte die Wiederherstellung des Blutflusses, erhöhte die Kapillardichte und reduzierte den oxidativen Stress im ischämischen Muskel 7 Tage nach Ischämie-Induktion. Zusätzlich kam es zur verstärkten Aktivierung von Angiogenese-fördernden Signalwegen mit Erhöhung der Anzahl sowie der angiogenen Aktivität von endothelialen Progenitorzellen [Dussault, Maingrette et al. 2009]. Eine weitere Arbeitsgruppe stellte fest, dass eine Sildenafil-Gabe im Ischämiemodell am Hinterfuß der Maus zur signifikanten Erhöhung von vaskulärer Perfusion, Blutfluss und Gefäßdicke führt, während in nicht ischämischen Hinterfüßen keine Verbesserung dieser Parameter stattfindet. Diese Effekte werden über einen Proteinkinase G-abhängigen Mechanismus induziert und sind unabhängig von einer Erhöhung der NO-Produktion oder der Aktivität der NO-Synthase

[Senthilkumar, Smith et al. 2007]. An der Ratte wurde ein I/R-Schaden durch 120-minütiges Abklemmen der infrarenalen Aorta ausgelöst und bei Beginn der Reperfusionphase 1mg/kg KG Sildenafil infundiert. Bei den mit Sildenafil behandelten Tieren waren die Malondialdehyd-Level als Marker für oxidativen Stress signifikant reduziert [Aksu, Yüksel et al. 2015].

Salloum et al. untersuchten die Wirkung von Sildenafil auf einen I/R-Schaden an Mausherzen, an welchen durch Ligatur der LAD ein Myokardinfarkt ausgelöst wurde. Sildenafil verbesserte die Überlebensrate der Tiere, verringerte die Infarktgröße, verbesserte die linksventrikuläre Funktion, führte zu einem Rückgang der kardialen Hypertrophie und einer Verringerung des pulmonalen Ödems sowie zu einer Verringerung der Apoptoserate. Außerdem kam es zu einer signifikanten Zunahme sowohl der endothelialen als auch der induzierbaren NOS 24 Stunden nach der Ischämie [Salloum, Abbate et al. 2008]. An isoliert perfundierten Mausherzen führte die Gabe von 0,1µM Sildenafil PKG-abhängig während den ersten 10min der Reperfusion zur Infarktprotektion, eine längere Sildenafil-Behandlung erhöhte die Protektion nicht [Madhani, Hall et al. 2010].

Beim renalen Ischämie-/Reperfusionsschaden an der Ratte zeigte sich nach oraler Gabe des PDE5-Inhibitors Sildenafil eine bessere Nierenfunktion und histopathologisch weniger Zellnekrosen 24 Stunden nach Reperfusion [Medeiros, Neto et al. 2010]. Nach 60-minütiger renaler Ischämie mit anschließender 90-minütiger Reperfusion an der Rattenniere führte die Präkonditionierung mit Sildenafil zu einem niedrigeren Malondialdehyd-Level. Gleichzeitig konnte eine Verminderung sowohl der induzierbaren als auch der endothelialen NOS, von Apoptosen und p53-positiven Zellen beobachtet werden [Kücük, Yucel et al. 2012].

An der Rattenlunge wurde Sildenafil in einer Dosierung von 10mg/kg KG durch Lavage appliziert, 3 Stunden bevor eine 2-stündige Ischämie durch Okklusion der linksseitigen Pulmonalarterien und -venen sowie des Bronchus durchgeführt wurde. Anschließend erfolgte eine 2-stündige Reperfusion. Sildenafil verminderte die Bildung von proapoptotischen Faktoren und reduzierte die Wet-to-dry-ratio, die zellulären Apoptosen sowie die Gewebsschädigung [Shih, Cheng et al. 2013]. Eine orale Präkonditionierung mit Sildenafil schützt die Rattenlunge vor einem Ischämie-/Reperfusionsschaden und verbessert die pulmonale Funktion. Sildenafil reduziert die inflammatorische Infiltration und vermindert die Schädigung der pulmonalen Ultrastruktur der Parenchymzellen. Gleichzeitig werden Surfactant-Produktion und -Sekretion aufrechterhalten und die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies sowie die Ödembildung verringert. Als Mechanismus hierfür könnte laut Liu et al. eine Verhinderung des Abfalls der cGMP-Spiegel und die Inhibition der NO-Synthese verantwortlich sein [Liu, Fang 2012].

Auf Leberschäden an der Ratte, welche durch einen intestinalen I/R-Schaden verursacht wurden, hatte die präoperative Gabe von Sildenafil ebenfalls einen positiven Effekt. Die Konzentrationen von Leberenzymen sowie die intestinalen und hepatischen Malondialdehyd-

Level als Marker für oxidativen Stress waren erniedrigt, der intestinale Schaden wurde reduziert und es zeigten sich erhöhte eNOS- und PCNA (proliferating cell nuclear antigen)-Aktivitäten im Lebergewebe [Inan, Kizilay et al. 2013].

Auch am Menschen wurde der Einfluss von Sildenafil auf einen Ischämie-/Reperfusionsschaden untersucht. In einer randomisiert kontrollierten Studie an gesunden Probanden wurden 50mg Sildenafil pro Tag über 7 Tage transdermal appliziert und die Auswirkung auf die Fluss-vermittelte Vasodilatation der A. radialis nach 15-minütiger Ischämie mit anschließender 15-minütiger Reperfusion des Unterarmes durch eine Blutdruckmanschette untersucht. Durch Sildenafil wurde die Abschwächung der Fluss-vermittelten Vasodilatation sowohl in der akuten als auch in der chronischen Phase deutlich vermindert. Sildenafil führt also zu einer kontinuierlichen Protektion vor endothelialer Dysfunktion nach einem I/R-Schaden [McLaughlin, Lytvyn et al. 2014].

Auch ohne zusätzlichen Ischämie-/Reperfusionsschaden vermag Sildenafil die endotheliale Funktion bei Typ2-Diabetikern zu verbessern. Ihnen wurden über 10 Wochen 50mg Sildenafil pro Tag verabreicht und die endotheliale Funktion anhand der Fluss-vermittelten Dilatation der A. brachialis objektiviert. Patienten, welche Sildenafil erhielten, zeigten eine signifikante Verbesserung dieses Parameters [Deyoung, Chung et al. 2012].

Crysanth untersuchte mit seiner Arbeitsgruppe ob die Behandlung mit Sildenafil in Patienten mit erektiler Dysfunktion sicher ist, selbst wenn diese multiple Komorbiditäten aufweisen. Er kam zu dem Schluss, dass Sildenafil in diesem Patientengut effektiv, sicher und gut toleriert ist, auch bei gleichzeitiger Therapie der Komorbiditäten wie koronarer Herzkrankheit, Herzinsuffizienz, arterieller Hypertonie und Diabetes mellitus, mit der Ausnahme einer Nitrat-Therapie [Crysanth, Crysanth 2012]. Dies ist ein bedeutendes Ergebnis, da Patienten mit Atherosklerose ebenfalls häufig genau diese Komorbiditäten aufweisen und eine medikamentöse Kombinationstherapie bezüglich Wechselwirkungen und Nebenwirkungen gut überlegt sein sollte.

### **5.3 Schlussfolgerung und Ausblick**

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen der von uns durchgeführten Studie schließen, dass die Inhibition von verschiedenen Phosphodiesterasen sowie der HMG-CoA-Reduktase bei der Ischämieentwicklung im atherosklerotischen Mausmodell eine bedeutende Rolle spielt. Durch Hebung des „random pattern flap“ entsteht eine chronische Ischämie, welche zur Entstehung einer deutlichen Gewebenekrose in den ApoE-defizienten Kontrolltieren führt. Unsere Studie hat gezeigt, dass eine medikamentöse Vorbehandlung von atherosklerotischen Mäusen die drohende Lappennekrose beeinflussen kann. Meistens handelt es sich bei Eingriffen in der rekonstruktiven Chirurgie um Elektivoperationen. Der

Zeitrahmen würde also auch im klinischen Alltag im Vorfeld der geplanten Lappenplastik eine systemische oder lokale Präkonditionierung zulassen, um die nutritive Perfusion anhaltend zu fördern und somit das Lappenüberleben zu verbessern respektive die Lappennekrose postoperativ zu reduzieren. Sicherlich kann das hier vorliegende Versuchsprotokoll nicht ohne weiteres von der Maus auf den Menschen übertragen werden. Im Großen und Ganzen bietet das Modell jedoch eine suffiziente Grundlage um zu entscheiden, welche Medikamente einen erfolgsversprechenden Ansatz zur Lappenkonditionierung bei Patienten mit Atherosklerose bieten.

Durch den Einsatz von Simvastatin konnte die Gewebenekrose reduziert werden, auch wenn die Unterschiede nicht signifikant waren. Die Tatsache, dass Simvastatin jedoch keine signifikante Senkung der Serumlipidwerte verursachte, beweist, dass es einen anderen Entstehungsmechanismus hierfür geben muss. Auch die Unterschiede in der Mikrozirkulation in Arteriolen, Venulen und Kapillaren waren zu gering, um die Verbesserung des Lappenüberlebens hinreichend zu erklären. Der Einfluss auf anti-inflammatorische Faktoren oder anti-oxidative Enzyme wurde in unserer Studie nicht untersucht, stellt jedoch einen möglichen Erklärungsansatz dar. Denn auch in den meisten Studien, welche einen positiven Einfluss von Simvastatin auf Ischämie-/Reperfusionsschäden nachwiesen, werden die anti-inflammatorischen und anti-oxidativen Eigenschaften von Simvastatin für diese protektive Wirkung verantwortlich gemacht. Um diese in unserem Modell ebenfalls nachzuweisen wären beispielsweise eine Bestimmung von Neutrophilen-Infiltration und -Aktivität sowie die Quantifizierung von anti-oxidativen Enzymen wie der Superoxid-Dismutase in den nekrotischen sowie vitalen Lappenarealen denkbar. Die klinische Verträglichkeit von Simvastatin ist in der Regel gut und viele Patienten mit Folgeerkrankungen der Atherosklerose nehmen Simvastatin als Cholesterinsenker täglich ein. Eine retrospektive Analyse bei bereits erfolgten Lappenplastiken wäre also durchaus vorstellbar, auch wenn die Vergleichbarkeit des Patientenkollektives in Bezug auf Vorerkrankungen, Medikamenteneinnahme und individuellen Faktoren gewahrt werden muss.

Eine Präkonditionierung mit Theophyllin stellt den interessantesten Zukunftsaspekt dieser Studie dar. Denn in unserem Modell wurde die entstehende Lappennekrose nach Theophyllin-Gabe über den gesamten Beobachtungszeitraum gegenüber der Kontrollgruppe signifikant reduziert. Verantwortlich hierfür ist eine deutlich verbesserte venöse Drainage des „random pattern flap“ bei erhaltenem zuführendem Blutfluss sowie vor allem die signifikant erhöhte funktionelle Kapillardichte. Die nutritive Perfusion des Lappengewebes konnte also aufrechterhalten und somit die Nekroseentstehung vermindert werden. Früher war die Gabe von Theophyllin bei Patienten mit Asthma bronchiale oder COPD weit verbreitet, ist aber heutzutage meist nur noch Drittlinientherapie. Die Pharmakokinetik von Theophyllin ist individuell verschieden und gerade bei Patienten mit einer zusätzlichen Herzerkrankung

sollte Theophyllin mit Bedacht eingesetzt werden. Trotzdem wäre eine Präkonditionierung mit Theophyllin – unter der Voraussetzung, dass entsprechende Kontrollen des Medikamentenspiegels im Blut durchgeführt werden – im klinischen Alltag durchaus vertretbar. Dementsprechend stellt die Präkonditionierung mit Theophyllin einen interessanten Ansatz auch bei Patienten mit Atherosklerose dar, welche eine operative Versorgung mittels Lappenplastik benötigen.

Im Gegensatz zu dieser positiven Entwicklung der Lappenplastiken zeigte die Präkonditionierung mittels Cilostazol, dem spezifischen Inhibitor der Phosphodiesterase 3, sogar deutliche Nachteile. Da hier ab dem 7. Tag der Versuchsreihe im distalen und zentralen Lappenanteil keinerlei arteriöler Blutzufuhr sowie keine venöse Drainage mehr stattfand und die kapillare Perfusion sogar im gesamten Lappen zum Erliegen kam, entwickelte sich eine Lappennekrose von durchschnittlich 76% der Gesamtgewebefläche, also gut 10% mehr als in der unbehandelten Kontrollgruppe. Zudem wurde nach Nutzen-Risiko-Analyse die Indikation für die Gabe von Cilostazol bei Patienten mit pAVK weiter eingeschränkt und stellt mittlerweile nur noch eine second-line-Therapie dar. Eine Gabe von Cilostazol bei Patienten mit Atherosklerose, welche eine plastische Deckung mittels Lappenplastiken erhalten, sollte also kritisch hinterfragt werden und gegebenenfalls rechtzeitig Behandlungsalternativen der pAVK außerhalb der Cilostazol-Gabe in Betracht gezogen werden.

Der spezifische PDE4-Inhibitor Rolipram hingegen konnte das Lappenüberleben verbessern, auch wenn die Unterschiede zur Kontrollgruppe nicht signifikant waren. Rolipram führte zu einem besseren arteriölen Blutfluss und konnte hierdurch die Nekroseentstehung trotz niedriger kapillarer Perfusion vermindern. Rolipram selbst stellt einen rein experimentellen Wirkstoff dar und ist für die Nutzung am Menschen bislang nicht zugelassen. Ein zugelassener Phosphodiesterase-4-Inhibitor ist Roflumilast, welcher bei Patienten mit schwerer COPD eingesetzt wird. Die empfohlene Tagesdosis liegt allerdings deutlich unter der von uns verwendeten Dosis, so dass hier erst weitere Versuche mit diesem Wirkstoff in anderen Dosierungen nötig wären, um die Wirkungen des PDE4-Hemmers auf den „random pattern flap“ zunächst im atherosklerotischen Mausmodell noch einmal genauer zu betrachten, bevor eine mögliche Übertragbarkeit auf den Menschen diskutiert werden kann.

Sildenafil, als spezifischer Inhibitor der PDE5, stellt ebenfalls einen vielversprechenden Ansatz dar, um Lappenplastiken in der rekonstruktiven Chirurgie an Patienten mit Atherosklerose erfolgreich zu präkonditionieren. In unserer Studie konnte durch Sildenafil ein signifikant besseres Lappenüberleben ab dem 3. Beobachtungstag erreicht werden. Dies ist auf eine verbesserte Mikroperfusion zurückzuführen, denn die Blutzufuhr sowie venöse Drainage des Lappen konnten aufrechterhalten werden und die funktionelle Kapillardichte war gegenüber der Kontrollgruppe deutlich erhöht. Für eine systemische Gabe am

Menschen ist die Dosierung aus unserem Versuchsprotokoll zu hoch, hier wäre in einem nächsten Schritt die Präkonditionierung mit unterschiedlichen Dosierungen sinnvoll. Ebenfalls ist eine lokale Gabe des PDE5-Inhibitors denkbar. Interessant wäre zudem eine Untersuchung des systemischen Blutdrucks der Versuchstiere, da Sildenafil sowohl eine Hypo- als auch Hypertension hervorrufen kann, was wiederum Einfluss auf die Lappenperfusion haben könnte.

Insgesamt lässt sich aus den Ergebnissen schließen, dass eine Präkonditionierung vor Hebung einer Lappenplastik auch bei atherosklerotischen Patienten einen aussichtsreichen Zukunftsaspekt darstellt. Die Atherosklerose ist eine systemische Krankheit und stellt die plastische und rekonstruktive Chirurgie vor neue Herausforderungen. Denn das Patientenkollektiv ist in der Regel älter und leidet oft unter diversen zusätzlichen medizinischen Problemen. Sowohl die Anatomie als auch die Physiologie der Arterien sind verändert und somit ist auch die Tendenz zur Thrombosebildung erhöht. Die Anforderungen an den Chirurgen verlangen deshalb neben einer hervorragenden mikrochirurgischen Technik bereits im Vorfeld eine sorgsame Selektion des Empfänger-Gefäßes. Von Vorteil ist auch eine Auswahl von Lappen, welche eine möglichst konstante Anatomie mit einem großen vaskulären Stiel aufweisen [Chen, Coskunfirat et al. 2006]. Die Beachtung dieser Empfehlungen zusammen mit den Erkenntnissen aus unserer Studie, welche zeigen, dass eine medikamentöse Präkonditionierung einen günstigen Einfluss auf chronisch-ischämisches Lappengewebe haben kann, ergeben einen positiven Ausblick in die Zukunft der rekonstruktiven Chirurgie.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Aksu V, Yüksel V, Chousein S, Taştekin E, İçcan Ş, Sağıroğlu G, Canbaz S, Sunar H (2015) *The effects of sildenafil and n-acetylcysteine on ischemia and reperfusion injury in gastrocnemius muscle and femoral artery endothelium.* Vascular 23:21-30
2. Ardlie NG, Glew G, Schultz BG, Schwartz CJ (1967) *Inhibition and reversal of platelet aggregation by methylxanthines.* Thromb Diath Haemorrh 18:670–3.
3. Bai Y, Muqier, Murakami H, Iwasa M, Sumi S, Yamada Y, Ushikoshi H, Aoyama T, Nishigaki K, Takemura G, Uno B, Minatoguchi S (2011) *Cilostazol protects the heart against ischaemia reperfusion injury in a rabbit model of myocardial infarction: focus on adenosine, nitric oxide and mitochondrial ATP-sensitive potassium channels.* Clin Exp Pharmacol Physiol 38:658-65
4. Balarini CM, Leal MA, Gomes IB, Pereira TM, Gava AL, Meyrelles SS, Vasquez EC (2013) *Sildenafil restores endothelial function in the apolipoprotein E knockout mouse.* J Transl Med 11:3
5. Banner KH, Page CP (1995) *Theophylline and selective phosphodiesterase inhibitors as anti-inflammatory drugs in the treatment of bronchial asthma.* Eur Respir J 8:996-1000
6. Bao N, Ushikoshi H, Kobayashi H, Yasuda S, Kawamura I, Iwasa M, Yamaki T, Sumi S, Nagashima K, Aoyama T, Kawasaki M, Nishigaki K, Takemura G, Minatoguchi S (2009) *Simvastatin reduces myocardial infarct size via increased nitric oxide production in normocholesterolemic rabbits.* J Cardiol 53:102-7
7. Barnard JW, Seibert AF, Prasad VR, Smart DA, Strada SJ, Taylor AE, Thompson WJ (1994) *Reversal of pulmonary capillary ischemia-reperfusion injury by rolipram, a cAMP phosphodiesterase inhibitor.* J Appl Physiol (1985) 77:774-81
8. Barnes PJ (2003) *Theophylline New Perspectives for an Old drug.* Am J Respir Crit Care Med 167:813-818
9. Barnes PJ (2013) *Theophylline.* Am J Respir Crit Care Med 188:901-6
10. Bea F, Blessing E, Bennett B, Levitz M, Wallace EP, Rosenfeld ME (2002) *Simvastatin promotes atherosclerotic plaque stability in apoE-deficient mice independently of lipid lowering.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 22:1832-7
11. Beavo JA, Conti M, Heaslip RJ (1994) *Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterases.* Mol Pharmacol 46:399-405
12. Becker KD, Gottshall KR, Chien KR (1996) *Strategies for studying cardiovascular phenotypes in genetically manipulated mice.* Hypertension 27:495-501
13. Beisiegel U, Weber W, Ihrke G, Herz J, Stanley KK (1989) *The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein.* Nature 341:162-4
14. Bisgaier CL, Essenburg AD, Auerbach BJ, Pape ME, Sekerke CS, Gee A, Wölle S, Newton RS (1997) *Attenuation of plasma low density lipoprotein cholesterol by select 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in mice devoid of low density lipoprotein receptors.* J Lipid Res 38:2502-15
15. Bisioendial RJ, Kastelein JJ, Stroes ES (2007) *C-reactive protein and atherogenesis: from fatty streak to clinical event.* Atherosclerosis 195:e10-8
16. Bleiweis MS, Jones DR, Hoffmann SC, Becker RM, Egan TM (1999) *Reduced ischemia-reperfusion injury with rolipram in rat cadaver lung donors: effect of cyclic adenosine monophosphate.* Ann Thorac Surg 67:194-9

17. Bonetti PO, Lerman LO, Napoli C, Lerman A (2002) *Statin effects beyond lipid lowering – are they clinically relevant?* Eur Heart J 24:225-248
18. Bos JL (2003) *Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research.* Nat Rev Mol Cell Biol 4:733-8
19. Bostanci K, Toker A, Bayrak Y, Dilege S, Aykac-Toker G, Senturk M, Tugrul M (2003) *Dose-related effects of theophylline added to modified Euro-Collins solution used for hypothermic preservation of lung.* J Cardiothorac Vasc Anesth 17:721-4
20. Bräsen JH, Niendorf A (1997) *Atherosklerose. Formale Pathogenese, Klassifikation und funktionelle Bedeutung.* Pathologe 18:218-27
21. Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, Page M, Kaltschmidt C, Baeuerle PA, Neumeier D (1996) *Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion.* J Clin Invest 97:1715-22
22. Buga GM, Gold ME, Wood KS, Chaudhuri G, Ignarro LJ (1989) *Endothelium-derived nitric oxide relaxes nonvascular smooth muscle.* Eur J Pharmacol 161:61-72.
23. Butcher RW, Sutherland EW (1962) *Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine.* J Biol Chem 237:1244-1250
24. Cai H, Harrison DG (2000) *Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress.* Circ Res 87:840-4
25. Camus MC, Chapman MJ, Forgez P, Laplaud PM (1983) *Distribution and characterization of the serum lipoproteins and apoproteins in the mouse, Mus musculus.* J Lipid Res 24:1210-28
26. Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP (2000) *Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation.* J Cell Physiol 184:409-20
27. Chen HC, Coskunfirat OK, Ozkan O, Mardini S, Cigna E, Salgado CJ, Spanio S (2006) *Guidelines for the optimization of microsurgery in atherosclerotic patients.* Microsurgery 26:356-62
28. Chen S, Khan ZA, Cukiernik M, Chakrabarti S (2003) *Differential activation of NF-kappa B and AP-1 in increased fibronectin synthesis in target organs of diabetic complications.* Am J Physiol Endocrinol Metab 284:E1089-97
29. Chen Z, Fukutomi T, Zago AC, Ehlers R, Detmers PA, Wright SD, Rogers C, Simon DI (2002) *Simvastatin reduces neointimal thickening in low-density lipoprotein receptor-deficient mice after experimental angioplasty without changing plasma lipids.* Circulation 106:20-3
30. Choi OH, Shamim MT, Padgett WL, Daly JW (1988) *Caffeine and theophylline analogues: correlation of behavioral effects with activity as adenosine receptor antagonists and as phosphodiesterase inhibitors.* Life Sci 43: 387-98
31. Chrysant SG, Chrysant GS (2012) *The pleiotropic effects of phosphodiesterase 5 inhibitors on function and safety in patients with cardiovascular disease and hypertension.* J Clin Hypertens (Greenwich) 14:644-9
32. Clemens MG, McDonagh PF, Chaudry IH, Baue AE (1985) *Hepatic microcirculatory failure after ischemia an reperfusion: improvement with ATP-MgCl<sub>2</sub> treatment.* Am J Physiol Heart Circ Physiol 248:H804-H811
33. Cominacini L, Rigoni A, Pasini AF, Garbin U, Davoli A, Campagnola M, Pastorino AM, Lo Cascio V, Sawamura T (2001) *The binding of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) to ox-LDL receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells through an increased production of superoxide.* J Biol Chem 276:13750-5

34. Cornwell TL, Arnold E, Boerth NJ, Lincoln TM (1994) *Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP.* Am J Physiol 267:C1405-13
35. Cowled PA, Khanna A, Laws PE, Field JB, Varelias A, Fitridge RA (2007) *Statins inhibit neutrophil infiltration in skeletal muscle reperfusion injury.* J Surg Res 141:267-76
36. da Rosa MP, Baroni GV, Portal VL (2006) *Cilostazol, a phosphodiesterase III inhibitor: future perspectives in atherosclerosis.* Arg Bras Cardiol 87:e222-6
37. de Graaf JC, Banga JD, Moncada S, Palmer RM, de Groot PG, Sixma JJ (1992) *Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions.* Circulation 85:2284-90
38. de Ninno MP (2012) *Future directions in phosphodiesterase drug discovery.* BMCL Digest 22:6794-6800
39. Deyoung L, Chung E, Kovac JR, Romano W, Brock GB (2012) *Daily use of sildenafil improves endothelial function in men with type 2 diabetes.* J Androl 33:176-80
40. Donski PK, Franklin JD, Hurley JV, O'Brien BM (1980) *The effects of cooling on experimental free flap survival.* Br J Plast Surg 33:353-60
41. Dragu A, Jeffries J, Bach AD, Horch RE (2008) *Prinzipien der Lappenplastiken: Eine Übersicht.* CHAZ 9:59-66
42. Dussault S, Maingrette F, Ménard C, Michaud SE, Haddad P, Groleau J, Turgeon J, Perez G, Rivard A (2009) *Sildenafil increases endothelial progenitor cell function and improves ischemia-induced neovascularization in hypercholesterolemic apolipoprotein E-deficient mice.* Hypertension 54:1043-9
43. Dyke HJ, Montana JG (2002) *Update in the therapeutic potential of PDE4 inhibitors.* Expert Opin Investig Drugs 11:1-13
44. Elam MB, Heckman J, Crouse JR, Hunninghake DB, Herd JA, Davidson M, Gordon IL, Bortey EB, Forbes WP (1998) *Effect of the novel antiplatelet agent cilostazol on plasma lipoproteins in patients with intermittent claudication.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 18:1942-7
45. Eldaif SM, Deneve JA, Wang NP, Jiang R, Mosunjac M, Mutrie CJ, Guyton RA, Zhao ZQ, Vinten-Johansen J (2010) *Attenuation of renal ischemia-reperfusion injury by postconditioning involves adenosine receptor and protein kinase C activation.* Transpl Int 23:217-26
46. Endrich B, Asaishi K, Götz A, Messmer K (1980) *Technical report -- a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters.* Res Exp Med 177:125-134
47. Erden Y, Korgali E, Dundar G, Ayan S, Gokce G, Yildirim S, Gultekin EY (2014) *In-vitro effects of PDE5 inhibitor and statin treatment on the contractile responses of experimental MetS rabbit's cavernous smooth muscle.* Arch Ital Urol Androl 86:33-8
48. Erhardt W, Henke J, Haberstroh J, Baumgartner C, Tacke S (2011) *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier.* Schattauer GmbH, Stuttgart
49. Eussen SR, Rempelberg CJ, Andersson KE, Klungel OH, Hellstrand P, Oste R, van Kranen H, Garssen J (2011) *Simultaneous intake of oat bran and atorvastatin reduces their efficacy to lower lipid levels and atherosclerosis in LDLr<sup>-/-</sup> mice.* Pharmacol Res 64:36-43
50. Falk E, Schwartz SM, Galis ZS, Rosenfeld ME (2007) *Putative murine models of plaque rupture.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 27:969-72
51. Featherstone RL, Kelly FJ, Chambers DJ (1999) *Theophylline improves functional recovery of isolated rat lungs after hypothermic preservation.* Ann Thorac Surg 67:798-803
52. Felton CV, Crook D, Davies MJ, Oliver MF (1997) *Relation of plaque lipid composition and morphology to the stability of human aortic plaques.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 17:1337-45

53. F. Hoffmann-La Roche AG (2011) *Packungsbeilage CHOL Cholesterin CHOD-PAP*. Basel
54. F. Hoffmann-La Roche AG (2012) *Packungsbeilage TG Triglyceride GPO-PAP*. Basel
55. Fleiner M, Kummer M, Mirlacher M, Sauter G, Cathomas G, Krapf R, Biedermann BC (2004) *Arterial neovascularization and inflammation in vulnerable patients: early and late signs of symptomatic atherosclerosis*. Circulation 110:2843-50
56. Forgione MA, Leopold JA, Loscalzo J (2000) *Roles of endothelial dysfunction in coronary artery disease*. Curr Opin Cardiol 15:409-15
57. Frias Neto CA, Koike MK, Saad KR, Saad PF, Montero EF (2014) *Effects of ischemic preconditioning and cilostazol on muscle ischemia-reperfusion injury in rats*. Acta Cir Bras 3:17-21
58. Fukasawa M, Nishida H, Sato T, Miyazaki M, Nakaya H (2008) *6-[4-(1-Cyclohexyl-1H-tetrazol-5-yl)butoxy]-3,4-dihydro-2-(1H)quinolinone (cilostazol), a phosphodiesterase type 3 inhibitor, reduces infarct size via activation of mitochondrial Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in rabbit hearts*. J Pharmacol Exp Ther 326:100-4
59. Fukuoka T, Hayashi T, Hirayama M, Maruyama H, Tanahashi N (2014) *Cilostazol inhibits leukocyte-endothelial cell interactions in murine microvessels after transient bilateral common carotid artery occlusion*. Brain Res 1543:173-8
60. Fukuoka T, Hayashi T, Hirayama M, Maruyama H, Tanahashi N (2014) *Cilostazol inhibits platelet-endothelial cell interaction in murine microvessels after transient bilateral common carotid artery occlusion*. J Stroke Cerebrovasc Dis 23:1056-61
61. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P (1994) *Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques*. J Clin Invest 94:2493-503
62. Gauthier TW, Scalia R, Murohara T, Guo JP, Lefer AM (1995) *Nitric oxide protects against leukocyte-endothelium interactions in the early stages of hypercholesterolemia*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 15:1652-9
63. Genescà M, Sola A, Miquel R, Pi F, Xaus C, Alfaro V, Hotter G (2002) *Role of changes in tissular nucleotides on the development of apoptosis during ischemia/reperfusion in rat small bowel*. Am J Pathol 161:1839-47
64. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ (1987) *Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries*. N Engl J Med 316:1371-5
65. Glazier SS, O'Rourke DM, Graham DI, Welsh FA (1994) *Induction of Ischemic Tolerance Following Brief Focal Ischemia in Rat Brain*. J Cereb Blood Flow Metab 14:545-553
66. Gravvanis A, Papalois A, Delikonstantinou I, Pentilas N, Zogogiannis I, Tsoutsos D, Karakitsos D (2011) *Changes in arterial blood flow of free flaps after the administration of sildenafil in swine*. Microsurgery 31:465-71
67. Grenz A1, Baier D, Petroktistis F, Wehrmann M, Köhle C, Schenk M, Sessler M, Gleiter CH, Fandrich F, Osswald H (2006) *Theophylline improves early allograft function in rat kidney transplantation*. J Pharmacol Exp Ther 317:473-9
68. Gresele P, Momi S, Falcinelli E (2011) *Anti-platelet therapy: phosphodiesterase inhibitors*. Br J Clin Pharmacol 72:634-46
69. Hajipour B, Somi MH, Saberifar F, Hemmati MR, Asl NA, Moein A, Vatankhah AM, Nourazar AR, Nasirizade MR (2009) *Simvastatin attenuates intestinal ischemia/reperfusion induced injury in rat*. Folia Morphol (Warsz) 68:156-62

70. Hakaim AG, Cunningham L, White JL, Hoover K (1999) *Selective type III phosphodiesterase inhibition prevents elevated compartment pressure after ischemia/reperfusion injury.* J Trauma 46:869-72
71. Hanoune J, Pouille Y, Tzavara E, Shen T, Lipskaya L, Miyamoto N, Suzuki Y, Defer N (1997) *Adenylyl cyclases: structure, regulation and function in an enzyme superfamily.* Mol Cell Endocrinol 128:179-94
72. Harder Y, Amon M, Erni D, Menger MD (2004) *Evolution of ischemic tissue injury in a random pattern flap: a new mouse model using intravital microscopy.* J Surg Res 121:197-205
73. Harder Y, Amon M, Georgi M, Banic A, Erni D, Menger MD (2005) *Evolution of a "falx lunatica" in demarcation of critically ischemic myocutaneous tissue.* Am J Physiol Heart Circ Physiol 288:H1224-32
74. Harder Y, Amon M, Laschke MW, Schramm R, Rücker M, Wettstein R, Bastiaanse J, Frick A, Machens HG, Küntscher M, Germann G, Vollmar B, Erni D, Menger MD (2008) *An old dream revitalised: preconditioning strategies to protect surgical flaps from critical ischaemia and ischaemia-reperfusion injury.* J Plast Reconstr Aesthet Surg 61:503-11
75. Hardman JG, Sutherland EW (1969) *Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate.* J Biol Chem 244:6363-70
76. Hase Y, Okamoto Y, Fujita Y, Kitamura A, Nakabayashi H, Ito H, Maki T, Washida K, Takahashi R, Ihara M (2012) *Cilostazol, a phosphodiesterase inhibitor, prevents no-reflow and hemorrhage in mice with focal cerebral ischemia.* Exp Neurol 233:523-33
77. Hashimoto A, Miyakoda G, Hirose Y, Mori T (2006) *Activation of endothelial nitric oxide synthase by cilostazol via a cAMP/protein kinase A- and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent mechanism.* Atherosclerosis 189:350-7
78. Hart K, Baur D, Hodam J, Lesoon-Wood L, Parham M, Keith K, Vazquez R, Ager E, Pizarro J (2006) *Short- and long-term effects of sildenafil on skin flap survival in rats.* Laryngoscope 116:522-8
79. Heart Protection Study Collaborative Group (2002) *MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial.* Lancet 360:7-22.
80. Hirner A, Weise K (2004) *Chirurgie – Schnitt für Schnitt.* Thieme, Stuttgart
81. Hoshida S, Kuzuya T, Nishida M, Yamashita N, Oe H, Hori M, Kamada T, Tada M (1994) *Adenosine blockade during reperfusion reverses the infarct limiting effect in preconditioned canine hearts.* Cardiovasc Res 28:1083-8
82. Ho-Tin-Noé B, Michel JB (2011) *Initiation of angiogenesis in atherosclerosis: smooth muscle cells as mediators of the angiogenic response to atheroma formation.* Trends Cardiovasc Med 21:183-7
83. Hotter G, Closa D, Prados M, Fernandez-Cruz L, Prats N, Gelpi E, Rosello-Catafau J (1996) *Intestinal preconditioning is mediated by a transient increase in nitric oxide.* Biochem Biophys Res Commun 222:27-32.
84. Hwang J, Han JI, Han S (2013) *Effect of pretreatment with simvastatin on spinal cord ischemia-reperfusion injury in rats.* J Cardiothorac Vasc Anesth 27:79-85
85. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G (1987) *Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide.* Proc Natl Acad Sci U S A 84:9265-9
86. Iliodromitis EK, Andreadou I, Prokavas E, Zoga A, Farmakis D, Fotopoulou T, Ioannidis K, Paraskevaidis IA, Kremastinos DT (2010) *Simvastatin in contrast to postconditioning reduces*

- infarct size in hyperlipidemic rabbits: possible role of oxidative/nitrosative stress attenuation.* Basic Res Cardiol 105:193-203
87. Inan M, Uz YH, Kizilay G, Topcu-Tarlacalisir Y, Sapmaz-Metin M, Akpolat M, Aydogdu N (2013) *Protective effect of sildenafil on liver injury induced by intestinal ischemia/reperfusion.* J Pediatr Surg 48:1707-15
88. Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL, Brown MS (1994) *The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins.* Proc Natl Acad Sci U S A 91: 4431-5
89. Ito H, Uehara K, Matsumoto Y, Hashimoto A, Nagano C, Niimi M, Miyakoda G, Nagano K (2012) *Cilostazol inhibits accumulation of triglyceride in aorta and platelet aggregation in cholesterol-fed rabbits.* PLoS One 7:e39374
90. Ito K, Lim S, Caramori G, Cosio B, Chung KF, Adcock IM, Barnes PJ (2002) *A molecular mechanism of action of theophylline: Induction of histone deacetylase activity to decrease inflammatory gene expression.* Proc Natl Acad Sci U S A 99:8921-6
91. Jackson CL, Bennett MR, Biessen EA, Johnson JL, Krams R (2007) *Assessment of unstable atherosclerosis in mice.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 27:714-20
92. Jain MK, Ridker PM (2005) *Anti-inflammatory effects of statins: clinical evidence and basic mechanisms.* Nat Rev Drug Discov 4:977-987
93. Johnson J, Carson K, Williams H, Karanam S, Newby A, Angelini G, George S, Jackson C (2005) *Plaque rupture after short periods of fat feeding in the apolipoprotein E-knockout mouse: model characterization and effects of pravastatin treatment.* Circulation 111:1422-30
94. Joseph A, Ackerman D, Talley JD, Johnstone J, Kupersmith J (1993) *Manifestations of coronary atherosclerosis in young trauma victims – an autopsy study.* J Am Coll Cardiol 22:459-67
95. Kai H, Ikeda H, Yasukawa H, Kai M, Seki Y, Kuwahara F, Ueno T, Sugi K, Imaizumi T (1998) *Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes.* J Am Coll Cardiol 32:368-72
96. Kannel WB, Thomas HE Jr (1982) *Sudden coronary death: the Framingham Study.* Ann N Y Acad Sci 382:3-21
97. Karow T (ed), Lang-Roth R (2012) *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie.* Pulheim
98. Katakami N, Kim YS, Kawamori R, Yamasaki Y (2010) *The phosphodiesterase inhibitor cilostazol induces regression of carotid atherosclerosis in subjects with type 2 diabetes mellitus: principal results of the Diabetic Atherosclerosis Prevention by Cilostazol (DAPC) study: a randomized trial.* Circulation 121:2584-91
99. Keil G (1978) *The history of plastic surgery.* Laryngol Rhinol Otol (Stuttg) 57:581-91
100. Kleemann R, Verschuren L, de Rooij B-J, Lindeman J, de Maat MM, Szalai J, Princen HMG, Kooistra T (2004) *Evidence for anti-inflammatory activity of statins and PPAR $\alpha$  activators in human C-reactive protein transgenic mice in vivo and in cultured human hepatocytes in vitro.* Blood 103:4188-4194
101. Kleinbongard P, Heusch G, Schulz R (2010) *TNF $\alpha$  in atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion and heart failure.* Pharmacol Ther 127:295-314
102. Klyscz, T, Jünger M, Jung F, Zeintl H (1997). *[Cap image--a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy].* Biomed Tech (Berl) 42:168-75

103. Koenig WJ, Lohner RA, Perdrizet GA, Lohner ME, Schweitzer RT, Lewis VL Jr. (1992) *Improving acute skin-flap survival through stress conditioning using heat shock and recovery.* Plast Reconstr Surg 90:659-64
104. Koh KK (2000) *Effects of statins on vascular wall: vasomotor function, inflammation, and plaque stability.* Cardiovasc Res 47:648-657
105. Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, Fowler DR, Kruth HS, Weber DK, Farb A, Guerrero LJ, Hayase M, Kutys R, Narula J, Finn AV, Virmani R (2003) *Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma.* N Engl J Med 349:2316-25
106. Kraft P, Schwarz T, Göb E, Heydenreich N, Brede M, Meuth SG, Kleinschnitz C (2013) *The phosphodiesterase-4 inhibitor rolipram protects from ischemic stroke in mice by reducing blood-brain-barrier damage, inflammation and thrombosis.* Exp Neurol 247:80-90
107. Küçük A, Yucel M, Erkasap N, Tosun M, Koken T, Ozkurt M, Erkasap S (2012) *The effects of PDE5 inhibitory drugs on renal ischemia/reperfusion injury in rats.* Mol Biol Rep 39:9775-82
108. Küntscher MV, Kastell T, Sauerbier M, Nobiling R, Gebhard MM, Germann G (2002) *Acute remote ischemic preconditioning on a rat cremasteric muscle flap model.* Microsurgery 22:221-226
109. Küntscher MV, Schirmbeck EU, Menke H, Klar E, Gebhard MM, Germann G (2002) *Ischemic preconditioning by brief extremity ischemia before flap ischemia in a rat model.* Plast Reconstr Surg 109:2398-404
110. Kukreja RC, Ockaili R, Salloum F, Yin C, Hawkins J, Das A, Xi L (2004) *Cardioprotection with phosphodiesterase-5 inhibition – a novel preconditioning strategy.* J Mol Cell Cardiol 36:165-73
111. Kukreja RC (2007) *Cardiovascular protection with sildenafil following chronic inhibition of nitric oxide synthase.* Br J Pharmacol 150:538-40
112. Kyoj T, Kitazawa S, Tajima K, Zhang X, Ukai Y (2004) *Phosphodiesterase type IV inhibitors prevent ischemia-reperfusion-induced gastric injury in rats.* J Pharmacol Sci 95:321-8
113. Lan TH, Huang XQ, Tan HM (2013) *Vascular fibrosis in atherosclerosis.* Cardiovasc Pathol DOI 10.1016/j.carpath.2013.01.003
114. Larmann J, Frenzel T, Schmitz M, Hahnenkamp A, Demmer P, Immenschuh S, Tietge UJ, Bremer C, Theilmeier G (2013) *In vivo fluorescence-mediated tomography imaging demonstrates atorvastatin-mediated reduction of lesion macrophages in ApoE<sup>-/-</sup> mice.* Anesthesiology 119:129-41
115. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK (1998) *Upregulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by HMG CoA Reductase Inhibitors.* Circulation 97:1129-35
116. Laufs U (2003) *Beyond lipid-lowering: effects of statins on endothelial nitric oxide.* Eur J Clin Pharmacol 58:719-31
117. Leaf A (1973) *Cell Swelling: A Factor in Ischemic Tissue Injury.* Circulation 48:455-458
118. Lee JH, Oh GT, Park SY, Choi JH, Park JG, Kim CD, Lee WS, Rhim BY, Shin YW, Hong KW (2005) *Cilostazol reduces atherosclerosis by inhibition of superoxide and tumor necrosis factor-alpha formation in low-density lipoprotein receptor-null mice fed high cholesterol.* J Pharmacol Exp Ther 313:502-9
119. Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K (1993) *Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice.* Am J Pathol 143:1055-1062
120. Liao JK, Laufs U (2005) *Pleiotropic Effects of Statins.* Annu Rev Pharmacol Toxicol 45:89-118
121. Lin G, Bornfeldt KE (2002) *Cyclic AMP-specific phosphodiesterase 4 inhibitors promote ABCA1 expression and cholesterol efflux.* Biochem Biophys Res Commun 290:663-9

122. Liu XM, Peyton KJ, Wang X, Durante W (2012) *Sildenafil stimulates the expression of gaseous monoxide-generating enzymes in vascular smooth muscle cells via distinct signaling pathways*. Biochem Pharmacol 84:1045-54
123. Liu Y, Shakur Y, Yoshitake M, Kambayashi Ji J (2001) *Cilostazol (pletal): a dual inhibitor of cyclic nucleotide phosphodiesterase type 3 and adenosine uptake*. Cardiovasc Drug Rev 19:369-86
124. Liu Z, Fang L (2012) *Phosphodiesterase-5 inhibitor and rat lung ischemia-reperfusion injury*. Asian Cardiovasc Thorac Ann 20:42-7
125. Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA (2000) *Guanylyl Cyclases and Signaling by Cyclic GMP*. Pharmacol Rev 52:375-413
126. Lusis AJ (2000) *Atherosclerosis*. Nature 407:233-41
127. Madhani M, Hall AR, Cuello F, Charles RL, Burgoyne JR, Fuller W, Hobbs AJ, Shattock MJ, Eaton P (2010) *Phospholemmann Ser69 phosphorylation contributes to sildenafil-induced cardioprotection against reperfusion injury*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 299:H827-36
128. Mahley RW (1988) *Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology*. Science 240:622-30
129. Mammadov E, Aridogan IA, Izol V, Acikalin A, Abat D, Tuli A, Bayazit Y (2012) *Protective effects of phosphodiesterase-4-specific inhibitor rolipram on acute ischemia-reperfusion injury in rat kidney*. Urology 80:1390.e1-6
130. Maron DJ, Fazio S, Linton MF (2000) *Current perspectives on statins*. Circulation 101:207-13
131. Maurice DH (2011) *Subcellular signaling in the endothelium: cyclic nucleotides take their place*. Curr Opin Pharmacol 11:656-64
132. McKnight GS (1991) *Cyclic AMP second messenger systems*. Curr Opin Cell Biol 3:213-7
133. McLaughlin K, Lytvyn Y, Luca MC, Liuni A, Gori T, Parker JD (2014) *Repeated daily dosing with sildenafil provides sustained protection from endothelial dysfunction caused by ischemia and reperfusion: a human in vivo study*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 307:H888-94
134. Medeiros PJ, Villarim Neto A, Lima FP, Azevedo IM, Leão LR, Medeiros AC (2010) *Effect of sildenafil in renal ischemia/reperfusion injury in rats*. Acta Cir Bras 25:490-5
135. Mendes JB, Rocha MA, Araújo FA, Moura SA, Ferreira MA, Andrade SP (2009) *Differential effects of rolipram on chronic subcutaneous inflammatory angiogenesis and on peritoneal adhesion in mice*. Microvasc Res 78:265-71
136. Menger MD, Pelikan S, Steiner D, Messmer K (1992) *Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox"*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 263:H1901-H1906
137. Menger MD, Steiner D, Messmer K (1992) *Microvascular ischaemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "no reflow"*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 263:H1892-H1900
138. Menger MD, Vollmar B (1994) *In vivo analysis of microvascular reperfusion injury in striated muscle and skin*. Microsurgery 15:383-9
139. Meßmer K, Krombach F (1998) *Mikrozirkulationsforschung in der experimentellen Chirurgie*. Chirurg 69:333-338
140. Mörsdorf P, Bächle A, Amon M, Schramm R, Rezaeian F, Vollmar B, Harder Y, Menger MD (2009) *Simvastatin vermindert die ischämiebedingte Entzündung und stimuliert die Neovaskularisierung in kritisch durchbluteten Lappen*. Chirurgisches Forum, Springer, Heidelberg, 38:281-283

141. Monetti M, Canavesi M, Camera M, Parente R, Paoletti R, Tremoli E, Corsini A, Bellosta S (2007) *Rosuvastatin displays anti-atherothrombotic and anti-inflammatory properties in apoE-deficient mice.* Pharmacol Res 55:441-9
142. Moreira Neto AA, Souza Júnior SS, Capelozzi VL, Parra-Cuentas ER, Schmidt Júnior AF, Francisco Neto A, Rodrigues OR (2012) *Effects of cilostazol in kidney and skeletal striated muscle of Wistar rats submitted to acute ischemia and reperfusion of hind limbs.* Acta Cir Bras 27:783-8
143. Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster V, Echeverri D, Trusczyńska H, Sharma SK, Badimon JJ, O'Connor WN (2004) *Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability.* Circulation 110:2032-8
144. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA (1986) *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium.* Circulation 74:1124-1136
145. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, Badimon JJ, Stefanadis C, Moreno P, Pasterkamp G et al. (2003) *From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I.* Circulation 108:1664-72
146. Nakamura K, Sasaki T, Cheng XW, Iguchi A, Sato K, Kuzuya M (2009) *Statin prevents plaque disruption in apoE-knockout mouse model through pleiotropic effect on acute inflammation.* Atherosclerosis 206:355-61
147. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R (1994) *ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree.* Arterioscler Thromb 14:133-40
148. Ogawa T, Miura T, Shimamoto K, Iimura O (1996) *Activation of adenosine receptors before ischemia enhances tolerance against myocardial stunning in the rabbit heart.* J Am Coll Cardiol 27:225-33
149. Ogawa M, Takano K, Kawabe K, Moriyama M, Ihara H, Nakamura Y (2014) *Theophylline potentiates lipopolysaccharide-induced NO production in cultured astrocytes.* Neurochem Res 39:107-16
150. Okusa MD, Linden J, Huang L, Rosin DL, Smith DF, Sullivan G (2001) *Enhanced protection from renal ischemia-reperfusion [correction of ischemia:reperfusion] injury with A(2A)-adenosine receptor activation and PDE 4 inhibition.* Kidney Int 59:2114-25
151. Okutsu R, Yoshikawa T, Nagasawa M, Hirose Y, Takase H, Mitani K, Okada K, Miyakoda G, Yabuuchi Y (2009) *Cilostazol inhibits modified low-density lipoprotein uptake and foam cell formation in mouse peritoneal macrophages.* Atherosclerosis 204:405-11
152. Omori K, Kotera J (2006) *Overview of PDEs and Their Regulation.* Circ Res 100:309-327
153. Osterud B, Bjorklid E (2003) *Role of Monocytes in Atherogenesis.* Physiol Rev 83:1069-1112
154. Pang CY, Yang RZ, Zhong A, Xu N, Boyd B, Forrest CR (1995) *Acute ischaemic preconditioning protects against skeletal muscle infarction in the pig.* Cardiovasc Res 29:782-8
155. Pedersen TR, Kjekshus J, Berg K, Haghfelt T, Faergeman O, Faergeman G, Pyörälä K, Miettinen T, Wilhelmsen L, Olsson AG, Wedel H; Scandinavian Simvastatin Survival Study Group (2004) *Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S).* 1994. Atheroscler Suppl 5:81-7
156. Pell TJ, Baxter GF, Yellon DM, Drew GM (1998) *Renal ischemia preconditions myocardium: role of adenosine receptors and ATP-sensitive potassium channels.* Am J Physiol 275:H1542-7
157. Penna C, Mancardi D, Tullio F, Pagliaro P (2009) *Intermittent adenosine at the beginning of reperfusion does not trigger cardioprotection.* J Surg Res 153:231-8

158. Peralta C, Closa D, Hotter G, Gelpi E, Prats N, Rosello-Catafau J (1996) *Liver ischemic preconditioning is mediated by the inhibitory action of nitric oxide on endothelin.* Biochem Biophys Res Commun 229:264-70
159. Persson CG (1986) *Overview of effects of theophylline.* J Allergy Clin Immunol 78:780-7
160. Piedrahita JA, Zhang SH, Hagaman JR, Oliver PM, Maeda N (1992) *Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells.* Proc Natl Acad Sci USA 89:4471-4475
161. Pirat A, Zeyneloglu P, Aldemir D, Yücel M, Ozen O, Candan S, Arslan G (2007) *Pretreatment with simvastatin reduces lung injury related to intestinal ischemia-reperfusion in rats.* Anesth Analg 102:225-32
162. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL (1992) *Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells.* Cell 71:343-353
163. Ragab D, Abdallah DM, El-Abhar HS (2014) *Cilostazol renoprotective effect: modulation of PPAR-γ, NGAL, KIM-1 and IL-18 underlies its novel effect in a model of ischemia-reperfusion.* PLoS One 9:e95313
164. Rall TW, Sutherland EW (1958) *Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles.* J Biol Chem 232:1065-1076
165. Reinisch JF (1974) *The pathophysiology of skin flap circulation. The delay phenomenon.* Plast Reconstr Surg 54:585-98
166. Rigor RR, Shen Q, Pivetti CD, Wu MH, Yuan SY (2012) *Myosin Light Chain Kinase Signaling in Endothelial Barrier Dysfunction.* Med Res Rev DOI:10.1002/med.21270
167. Riksen NP, Smits P, Rongen GA (2011) *The cardiovascular effects of methylxanthines.* Handb Exp Pharmacol 200:413-37
168. Rodrigues BP, Campagnaro BP, Balarini CM, Pereira TM, Meyrelles SS, Vasquez EC (2013) *Sildenafil ameliorates biomarkers of genotoxicity in an experimental model of spontaneous atherosclerosis.* Lipids Health Dis 12:128
169. Ross R, Glomset J, Harker L (1977) *Response to injury and atherogenesis.* Am J Pathol 86:675-84
170. Ross R (1986) *The pathogenesis of atherosclerosis – an update.* N Engl J Med 314:288-500
171. Ross R (1999) *Atherosclerosis – an inflammatory disease.* N Engl J Med 340:115-26
172. Sahin MA, Onan B, Guler A, Oztas E, Uysal B, Arslan S, Demirkilic U, Tatar H (2011) *Cilostazol, a type III phosphodiesterase inhibitor, reduces ischemia/reperfusion-induced spinal cord injury.* Heart Surg Forum 14:E171-7
173. Saito T, Tsuchida M, Umehara S, Kohno T, Yamamoto H, Hayashi J (2011) *Reduction of spinal cord ischemia/reperfusion injury with simvastatin in rats.* Anesth Analg 113:565-71
174. Salloum FN, Abbate A, Das A, Houser JE, Mudrick CA, Qureshi IZ, Hoke NN, Roy SK, Brown WR, Prabhakar S, Kukreja RC (2008) *Sildenafil (Viagra) attenuates ischemic cardiomyopathy and improves left ventricular function in mice.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 294:H1398-406
175. Sarifakioglu N, Gokrem S, Ates L, Akbuga UB, Aslan G (2004) *The influence of sildenafil on random skin flap survival in rats: an experimental study.* Br J Plast Surg 57:769-72
176. Schmidt-Tintemann U (1970) *Grundzüge der plastischen Chirurgie.* Urban & Schwarzenberg, München
177. Schönbeck U, Libby P (2001) *CD40 signaling and plaque instability.* Circ Res 89:1092-103

178. Schönbeck U, Gerdes N, Varo N, Reynolds RS, Horton DB, Bavendiek U, Robbie L, Ganz P, Kinlay S, Libby P (2002) *Oxidized low-density lipoprotein augments and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors limit CD40 and CD40L expression in human vascular cells.* Circulation 106:2888-93
179. Schrör K (2002) *The pharmacology of cilostazol.* Diabetes Obes Metab 4:S14-19
180. Schwartz SM, Galis ZS, Rosenfeld ME, Falk E (2007) *Plaque rupture in humans and mice.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 27:705-13
181. Silverstein RL, Li W, Park YM, Rahaman SO (2010) *Mechanisms of cell signaling by the scavenger receptor CD36: implications in atherosclerosis and thrombosis.* Trans Am Clin Climatol Assoc 121:206-20
182. Senthilkumar A, Smith RD, Khitha J, Arora N, Veerareddy S, Langston W, Chidlow JH Jr, Barlow SC, Teng X, Patel RP, Lefer DJ, Kevil CG (2007) *Sildenafil promotes ischemia-induced angiogenesis through a PKG-dependent pathway.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 27:1947-54
183. Shih PK, Cheng CM, Li HP, Huang MF, Chiu CW, Chen JX, Chen NW, Chou SH (2013) *Pretreatment with sildenafil alleviates early lung ischemia-reperfusion injury in a rat model.* J Surg Res 185:e77-83
184. Souza DG, Cassali GD, Poole S, Teixeira MM (2001) *Effects of inhibition of PDE4 and TNF-alpha on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury.* Br J Pharmacol 134:985-94
185. Spain DM, Bradess VA, Mohr C (1960) *Coronary atherosclerosis as a cause of unexpected and unexplained death. An autopsy study from 1949-1959.* JAMA 174:384-8
186. Sparrow CP, Burton CA, Hernandez M, Mundt S, Hassing H, Patel S, Rosa R, Hermanowski-Vosatka A, Wang PR, Zhang D, Peterson L, Detmers PA, Chao YS, Wright SD (2001) *Simvastatin has anti-inflammatory and antiatherosclerotic activities independent of plasma cholesterol lowering.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 21:115-21
187. Spina D (2003) *Theophylline and PDE4 inhibitors in asthma.* Curr Opin Pulm Med 9:57-64
188. Stary HC (1992) *Composition and classification of human atherosclerotic lesions.* Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 421:277-90
189. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW (1994) *A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association.* Arterioscler Thromb 14:840-56
190. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW (1995) *A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 15:1512-31
191. Stary HC (2000) *Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update.* Arterioscler Thromb Vasc Biol 20:1177-8
192. Statistisches Bundesamt (2017) *Gesundheit. Todesursachen in Deutschland 2015. Fachserie 12, Reihe 4.* Wiesbaden
193. Steinbauer M, Harris AG, Abels C, Messmer K (2000) *Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model.* Langenbecks Arch Surg 385:290-8

194. Sun XF, Wang LL, Wang JK, Yang J, Zhao H, Wu BY, Wang YF, Wang L (2006) *Effects of simvastatin on lung injury induced by ischaemia-reperfusion of the hind limbs in rats.* J Int Med Res 35:523-33
195. Sutherland EW, Rall TW (1958) *Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles.* J Biol Chem 232:1077-91
196. Takase H, Hashimoto A, Okutsu R, Hirose Y, Ito H, Imaizumi T, Miyakoda G, Mori T (2007) *Anti-atherosclerotic effect of cilostazol in apolipoprotein-E knockout mice.* Arzneimittelforschung 57:185-91
197. Tani T, Uehara K, Sudo T, Marukawa K, Yasuda Y, Kimura Y (2000) *Cilostazol, a selective type III phosphodiesterase inhibitor, decreases triglyceride and increases HDL cholesterol levels by increasing lipoprotein lipase activity in rats.* Atherosclerosis 152:299-305
198. Tao M, Salas ML, Lipmann F (1970) *Mechanism of activation by adenosine 3':5'-cyclic monophosphate of a protein phosphokinase from rabbit reticulocytes.* Proc Natl Acad Sci U S A 67:408-14
199. Tobin RB, Friend B, Berdanier CD, Mehlman MA, DeVore V (1976) *Metabolic responses of rats to chronic theophylline ingestion.* J Toxicol Environ Health 2:361-9
200. Torphy TJ (1998) *Phosphodiesterase isozymes: molecular targets for novel antiasthma agents.* Am J Respir Crit Care Med 157:351-70
201. Tsai JW, Ayubi FS, Hart KL, Baur DA, Parham MA, Moon JK, Vazquez R, Chasen AB, Zhang Z, Pizarro JM (2008) *Evaluation of the effect of sildenafil and vascular endothelium growth factor combination treatment on skin flap survival in rats.* Aesthetic Plast Surg 32:624-31
202. Uygur F, Noyan N, Hahaolu A (2010) *The effect of simvastatin on the survival of ischaemic skin flap: An experimental study in rats.* J Plast Reconstr Aesthet Surg 63:1723-32
203. Uzunera N, Karamanb Ö, Saydamc N, Günerd G (2002) *Lipoprotein profile in long term theophylline administration in children with asthma.* Allergol et Immunopathol 30:79-84
204. Van den Heuvel MG, Bast A, Ambergen AW, van der Hulst RR (2012) *The Effect of Statins and Other Cardiovascular Medication on Ischemia-Reperfusion Damage in a Human DIEP Flap Model: Theoretical and Epidemiological Considerations.* J Transplant 2012:504081
205. Verma S, Wang CH, Li SH, Dumont AS, Fedak PW, Badiwala MV, Dhillon B, Weisel RD, Li RK, Mickle DA, Stewart DJ (2002) *A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis.* Circulation 106:913-9
206. Vinereanu D (2006) *Risk factors for atherosclerotic disease: present and future.* Herz 31:5-24
207. Virmani R, Robinowitz M, Geer JC, Breslin PP, Beyer JC, McAllister HA (1987) *Coronary artery atherosclerosis revisited in Korean war combat casualties.* Arch Pathol Lab Med 111:972-6
208. Vogt PM (2011) *Praxis der Plastischen Chirurgie.* Springer, Berlin Heidelberg
209. Waldman SA, Rapoport RM, Murad F (1984) *Atrial natriuretic factor selectively activates particulate guanylate cyclase and elevates cyclic GMP in rat tissues.* J Biol Chem 259:14332-4
210. Waldman SA, Murad F (1988) *Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate cyclase-cyclic GMP system.* J Cardiovasc Pharmacol 5:S115-8
211. Walsh DA, Perkins JP, Krebs EG (1968) *An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle.* J Biol Chem 243:3763-5
212. Wang T, Elam MB, Forbes WP, Zhong J, Nakajima K (2003) *Reduction of remnant lipoprotein cholesterol concentrations by cilostazol in patients with intermittent claudication.* Atherosclerosis 171:337-42

- 
213. Wang WZ, Baynosa RC, Zamboni WA (2011) *Update on Ischemia-Reperfusion Injury for the Plastic Surgeon: 2011*. Plast Reconstr Surg 128:685e-92e
214. Wennmalm A (1994) *Endothelial nitric oxide and cardiovascular disease*. J Intern Med 235:317-27
215. Williams H, Johnson JL, Carson KG, Jackson CL (2002) *Characteristics of intact and ruptured atherosclerotic plaques in brachiocephalic arteries of apolipoprotein E knockout mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 22:788-92
216. Winquist RJ, Faison EP, Waldman SA, Schwartz K, Murad F, Rapoport RM (1984) *Atrial natriuretic factor elicits an endothelium-independent relaxation and activates particulate guanylate cyclase in vascular smooth muscle*. Proc Natl Acad Sci U S A 81:7661-4
217. Witztum JL (1994) *The oxidation hypothesis of atherosclerosis*. Lancet 344:793-5
218. Xiangdong L, Yuanwu L, Hua Z, Liming R, Qiuyan L, Ning L (2011) *Animal models for the atherosclerosis research: a review*. Protein Cell 2:189-201
219. Yildiz G, Demiryürek AT, Gümüsel B, Lipton H (2007) *Ischemic preconditioning modulates ischemia-reperfusion injury in the rat lung: role of adenosine receptors*. Eur J Pharmacol 556:144-50
220. Yoshikawa T, Mitani K, Kotosai K, Nozako M, Miyakoda G, Yabuuchi Y (2008) *Antiatherogenic effects of cilostazol and probucol alone, and in combination in low density lipoprotein receptor-deficient mice fed with a high fat diet*. Horm Metab Res 40:473-8
221. Zeis E (1838) *Handbuch der plastischen Chirurgie*. Reimer, Berlin
222. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N (1992) *Spontaneous Hypercholesterolemia and Arterial Lesions in Mice Lacking Apolipoprotein E*. Science 258:468-71
223. Zhou JG1, Meno JR, Hsu SS, Winn HR (1994) *Effects of theophylline and cyclohexyladenosine on brain injury following normo- and hyperglycemic ischemia: a histopathologic study in the rat*. J Cereb Blood Flow Metab 14:166-73

## 7. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen Menschen bedanken, die mich während der Zeit der Erstellung dieser Dissertation unterstützt und somit wesentlich zum Erfolg meiner Arbeit beigetragen haben.

An ersten Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Michael D. Menger für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit meine Arbeit in seinem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie in Homburg/Saar durchführen zu dürfen. Durch konstruktive Diskussionen und seine vielen wertvollen Anregungen zur Verbesserung meiner Arbeit hat er maßgeblich zum Gelingen dieser beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. med. Philipp Mörsdorf für die geduldige Einarbeitung in die mikrochirurgischen Techniken, die intravitale Fluoreszenzmikroskopie sowie die Datenauswertung. Gerade in der schwierigen Anfangszeit war er bei Problemen und meinen schier unendlichen Fragen jederzeit ein zuverlässiger Ansprechpartner. Zudem stand er mir beim Einreichen und Fertigstellen meiner ersten wissenschaftlichen Vorträge mit Rat und Tat beiseite.

Janine Becker danke ich für ihre Hilfe bei den alltäglichen organisatorischen Fragen wie Medikamenten- und Materialbestellungen. Stellvertretend für das Team der Tierhaltung möchte ich mich bei Elisabeth Gluding und Chantal Enderlin bedanken, die dafür Sorge trugen, dass die Versuchstiere zu jeder Zeit optimal versorgt waren. Frau Sand-Hill sowie Frau Meng danke ich für die Bestimmung der Blutlipidwerte und Informationen zu den Analysetechniken im Zentrallabor des Universitätsklinikums des Saarlandes.

Mein weiterer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden – insbesondere meiner lieben Freundin Esther – für ihre moralische Unterstützung während der gesamten Zeit der Versuche und des Schreibens. Ihnen danke ich für die vielen hilfreichen Anmerkungen und vor allem dafür, dass sie mir auch in den Zeiten der überstrapazierten Nerven mit Rat und Tat beiseite standen und mir immer wieder die nötige Motivation gegeben haben diese Arbeit fertig zu stellen.

Allen Mitdoktoranden sowie Mitarbeitern des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie danke ich dafür, dass sie mir stets hilfsbereit und durch interessante Diskussionen zur Seite standen. Durch sie wurde die Arbeitszeit nie langweilig, so dass ich auch in den schwierigeren Zeiten, in welchen meine Frustrationstoleranz hart auf die Probe gestellt wurde, immer wieder gerne ins Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie zurückkehrte.

---

## 8. PUBLIKATIONEN

### Zitierfähige Kongressbeiträge

T.L. Schröder, P. Mörsdorf, T. Pohlemann, M.D. Menger, J.H. Holstein

*“Theophyllin improves nutritive perfusion and reduces tissue necrosis in critically perfused musculocutaneous flaps in atherosclerotic mice”*

131. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, März 2014, Berlin  
Langenbecks Arch Surg (2014) 399:371–413

P.Mörsdorf, T.L. Schröder, T.Pohlemann, M.D. Menger, J.H. Holstein

*„Die Inhibition der Phosphodiesterase 5, jedoch nicht der Phosphodiesterase 3, reduziert die Gewebenekrose in kritisch perfundierten muskulokutanen Lappen am atherosklerotischen Mausmodell“*

Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU), Oktober 2014, Berlin  
German Medical Science GMS Publishing House, 2014, DocGR17-1091  
doi: 10.3205/14dkou517, urn:nbn:de:0183-14dkou5171

### Nicht zitierfähige Kongressbeiträge

T.L. Schröder, P. Mörsdorf, T. Pohlemann, M.D. Menger, J.H. Holstein

*„Theophyllin verbessert die nutritive Perfusion und reduziert die Gewebenekrose in kritisch perfundierten muskulokutanen Lappen am atherosklerotischen Mausmodell“*

17. Chirurgische Forschungstage, Oktober 2013, Frankfurt/Main &

22. Wissenschaftliche Jahrestagung der Saarländischen Chirurgenvereinigung e.V.,  
Januar 2014, Saarbrücken