

Aus der Klinik für Anästhesiologie
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. B. Zwißler



Etablierung eines humanen Modells zur Untersuchung des akuten
Ischämieschmerzes am Beispiel von Adenosin

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Florentina Joyce Freiberg
aus Berlin

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.- Doz. Dr. med. Philip Lang

Mitberichterstatter: Priv.- Doz. Dr. med. Alexander Becker
Prof. Dr. med. Bernhard Becker

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 25.07.2013

Für meine Großeltern

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	10
2. Grundlagen	13
2.1. Periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK)	13
2.1.1. Epidemiologie der pAVK	13
2.1.2. Ätiologie der pAVK	14
2.1.3. Einteilung und Lokalisation der pAVK	16
2.1.4. Diagnostik der pAVK	19
2.2. Ischämieschmerz	21
2.2.1. Ischämie	21
2.2.2. Schmerz	22
2.2.3. Schmerzfasern und Nozizeptoren	23
2.2.4. Aktivierung von Nozizeptoren	25
2.2.5. Entstehung des akuten Ischämieschmerzes	26
2.3. Adenosin	31
2.4. S-100B	39
2.5. Interleukin-6	42
3. Fragestellungen und Zielsetzung der Arbeit	45
4. Patienten und Methoden	46
4.1. Patienten	46
4.2. Methoden	48
4.2.1. Versuchsablauf	48

4.2.2.	Blutabnahme und Blutgasanalyse	50
4.2.3.	Adenosinbestimmung	50
4.2.4.	Bestimmung von S-100B	52
4.2.5.	Bestimmung von IL-6 und Laktat	53
4.2.6.	Blutdruckmessung am Arm und systolische Dopplerdruckmessung zur Berechnung des Ankle-Brachial Index (ABI)	54
4.3.	Statistik	55
4.3.1.	Computerprogramme, Datenbanken und Statistikberechnung	55
4.3.2.	Statistik	55
5.	Ergebnisse	56
5.1.	Basischarakteristika	56
5.2.	Klinische Ergebnisse	57
5.2.1.	Laufbandanalyse	57
5.2.2.	Schmerzen	57
5.2.3.	Hämodynamik	58
5.2.4.	Blutgasanalyse	60
5.3.	Laborexperimentelle Ergebnisse	69
5.3.1.	Adenosin und Inosin	69
5.3.2.	Bestimmung von S-100B, IL-6 und Laktat	76
6.	Diskussion	80
6.1.	Ischämiemodell	80
6.2.	Ischämieschmerz	82
6.3.	Adenosin und Inosin	83

6.4.	S-100B	86
6.5.	Interleukin-6	89
7.	Zusammenfassung	91
8.	Anhang	93
8.1.	Literaturverzeichnis	93
8.2.	Abbildungsverzeichnis	105
8.3.	Tabellenverzeichnis	106

Verwendete Abkürzungen:

A.	Arteria
ABI	Ankle-brachial Index
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BGA	Blutgasanalyse
CI	Claudicatio intermittens
d	Tag
D.m.	Diabetes mellitus
h	Stunde
HPLC	High-performance liquid chromatography
IL-6	Interleukin-6
IASP	International Association for the Study of Pain
kDA	kiloDalton
l	Liter
M	Molare Masse
m	Masse (kg)
m	männlich
mg	Milligramm
MP	Messpunkt
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NRS	Numerische Rating Skala
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PNP	Polyneuropathie
r	Korrelation

RAGE	receptor for advanced glycation endproducts
RR	Riva Rocci
s	Sekunde
SF	Standardfehler
t	Zeit
V.	Vena
VAS	Visuelle Analog Skala
w	weiblich

1. Einleitung

Die Verkalkung der Arterienwände ist eine Multisystemerkrankung mit vielen Manifestationsformen. Sie gilt als häufigste Todesursache in den westlichen Ländern [1].

Neben der koronaren Herzkrankheit stellt die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) eine Manifestationsform dar, die sich durch stenosierende oder okkludierende Veränderungen der Arterieninnenwände äußert. Die Folge ist eine Minderperfusion der durch die Arterien versorgten Extremität [2]. Der Prozess der arteriellen Minderversorgung eines Gewebes wird als Ischämie bezeichnet.

Bekannt ist, dass die ischämischen Veränderungen bei pAVK zu belastungsbedingten akuten Schmerzen und in fortgeschrittenen Krankheitsstadien zu chronischen Schmerzen in den Beinen führen können [3]. Die Folge kann eine beeinträchtigte Mobilität und Lebensqualität sein. Ein normaler Alltag ist für betroffene Personen häufig nicht mehr möglich.

Umfangreiche Daten existieren zu ätiologischen, diagnostischen und interventionell therapeutischen Aspekten der pAVK [4-16]. Die klinische Einteilung, der Schweregrad und die Diagnostik richten sich unter anderem nach dem subjektiven Schmerzempfinden der Patienten, wobei die Pathophysiologie der Schmerzentstehung weitestgehend ungeklärt bleibt [3]. Ein Zusammenhang zwischen Schmerzstärke und Ausprägungsgrad der pAVK ist bislang nicht hinreichend untersucht worden. Es ist wahrscheinlich, dass die Ischämie und ihre Folgen Ursache der Schmerzentstehung während körperlicher Belastung von pAVK Patienten ist [3]. Eine genaue Zuordnung der metabolischen Vorgänge während verschieden starken ischämischen Episoden und deren Korrelation zur Schmerzentstehung könnte die Diagnostik und

Therapie der pAVK erleichtern und Ansätze der Linderung von ischämisch bedingten Schmerzen liefern.

Eine besondere Rolle in der Pathophysiologie der Schmerzentstehung bei Ischämie könnte dem Purinnukleosid Adenosin zukommen. Es liegt als Molekül im menschlichen Körper vor und wird unter energieverbrauchenden, körperlich belastenden Prozessen kontinuierlich freigesetzt [17]. Daraus resultiert eine Erhöhung des interstitiellen Adenosinspiegels [18, 19]. Interessant ist es nun zu klären, welche Funktion erhöhte Adenosinspiegel einnehmen und welche Rolle diese in der Entstehung von ischämischen Schmerzen spielen. Adenosin wurden bereits gewebeprotective [20], wie auch schmerzauslösende und schmerzhemmende Eigenschaften zugeschrieben [21, 22]. Die genauen Zusammenhänge zwischen der Höhe des Adenosinspiegels, dem Grad der Belastung sowie deren Wirkung auf die Entstehung von Schmerzen sind jedoch nicht bekannt. Adenosin könnte im Rahmen des ischämischen Schmerzes als möglicher Parameter zur Erkennung von Schmerzstärke und Schwere der Ischämie dienen und eine Rolle bei der Genese von Muskelschmerzen spielen.

Ein Anstieg des Adenosinspiegels während körperlicher Belastung und gleichzeitiger Ischämie wurde bereits in Studien gezeigt [23]. Ob der Anstieg aufgrund der unter Belastung entstehenden Ischämie, der körperlichen Belastung alleine oder deren Kombination zu erklären ist, bleibt unklar. Fraglich ist, ob sich die Adenosinspiegel im Blutplasma von Patienten mit akuten Ischämieschmerzen bei pAVK am humanen Modell lokal in der jeweiligen Extremität unter Belastung ändern.

Ob es unter Belastung und Ischämie zu einer vermehrten Adenosinfreisetzung kommt als bei gleicher Belastung ohne Ischämie, ist bis dato nicht geklärt.

Weiterhin ist nicht bekannt, ob durch kurzzeitige akute Ischämien periphere Nerven geschädigt werden. Eine Beteiligung peripherer Nervenfasern bei pAVK Patienten mit chronischer Ischämie ist bereits wissenschaftlich belegt und eine neuropathische und nozizeptive Komponente der Ischämieschmerzen ist wahrscheinlich [24, 25]. Gegenwärtig gibt es keinen sicheren diagnostischen Laborparameter zur Erkennung von peripheren Nervenläsionen. Das Neuroprotein S-100B wurde bereits als erfolgreicher Marker zum Nachweis von traumatischen Hirnschädigungen untersucht [26-29]. Da S-100B auch peripher in Schwannschen Zellen vorhanden ist, könnte es Hinweise auf eine periphere Nervenschädigungen durch kurzzeitige akute Ischämie geben [29, 30] und zu deren Erkennung beitragen.

2. Grundlagen

2.1. Periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK)

Die pAVK ist eine chronische Verengung des Gefäßlumens peripherer Extremitätenarterien aufgrund stenosierender und okkludierender Veränderungen. Sie tritt häufig im Bereich der A. femoralis, aber auch an Iliacal- und Unterschenkelgefäßen auf [2].

2.1.1. Epidemiologie der pAVK

Die Angaben zur Prävalenz variieren je nach angewandter Methodik und Kohorte stark. Aus verschiedenen Studien lässt sich eine Gesamtprävalenz zwischen 3 und 10% ermitteln [16, 31-33]. Die Erkrankung zeigt mit fortschreitendem Alter eine zunehmende Häufigkeit von bis zu 20% bei über 70 jährigen Patienten. Der Erkrankungsbeginn bei Männern liegt im Durchschnitt 10 Jahre früher als der bei Frauen [7, 16].

Der Krankheitsverlauf ist in den meisten Fällen langsam progredient. Trotz höhergradiger Stenosen oder gar Verschlüssen peripherer Extremitätenarterien können Patienten durch die Ausbildung von Kollateralen symptomfrei bleiben [9]. Bis zu 80% der Patienten weisen aufgrund dieser Kollateralsysteme oder einer noch ausreichender Restdurchblutung einen asymptomatischen Krankheitsverlauf auf. Daher ist es wahrscheinlich, dass die Prävalenz der Erkrankung über den in Studien ermittelten Werten liegt und die pAVK eine zu selten diagnostizierte und vor allem in asymptomatischen Krankheitsstadien eine nicht ausreichend therapierte Erkrankung ist [4, 9, 16].

Große Populationsstudien haben gezeigt, dass die Häufigkeit der symptomatischen pAVK zwischen 2% bei 50-54 jährigen und bis zu 7% bei 70-74 jährigen Patienten liegt [9]. Weniger bekannt sind Prävalenzen zur kritischen Extremitätenischämie. Eine Studie ergab Häufigkeiten von

0,24% bei Frauen und 0,26% bei Männern, wobei sich bei beiden Geschlechtern wiederum ein Anstieg der Prävalenz im Alter zeigte [12].

2.1.2. Ätiologie der pAVK

Die pAVK ist eine Manifestationsform der systemischen Atherosklerose und geht gehäuft mit atherosklerotisch bedingter koronarer Herzkrankheit und zerebrovaskulären Erkrankungen einher [16].

Populationsstudien zeigten, dass die Hälfte aller Patienten mit pAVK an den Folgen einer koronaren Herzkrankheit stirbt, womit diese die Haupttodesursache darstellt. 10-20% sterben an den Folgen zerebrovaskulärer Zwischenfälle und 20-30% auf Grund nicht kardialer und nicht zerebraler Ursachen [7]. Die durchschnittliche 5-Jahres Morbidität und Mortalität bezogen auf alle Risikofaktoren beträgt ca. 30%, auf 10-Jahre bezogen liegt sie bei ca. 50% [10].

Die häufigste Ursache für die pAVK ist eine chronisch obliterierende Atherosklerose im Bereich der Intima der Arteriengefäßwände [9]. Seltener sind embolische Gefäßverschlüsse oder Vaskulitiden als Ursache zu finden [9, 34]. Risikofaktoren der Atherosklerose sind Nikotinabusus, Diabetes mellitus, ein arterieller Hypertonus und Fettstoffwechselstörungen. Insbesondere die Erhöhung des an Low-Density-Lipoproteine gebundenen Cholesterins führt zu einem erhöhten Atheroskleroserisiko. Ein Anstieg der High-Density-Lipoproteine, die vor allem am Rücktransport des Cholesterins in die Leber beteiligt sind, hat hingegen eine günstige Auswirkung auf die Progredienz der Atherosklerose [9]. Auch Übergewicht, Bewegungsmangel, Alter, erhöhte Spiegel von C-reaktivem Protein, renale Insuffizienz, familiäre Disposition und ein „Nicht-Kaukasischer Ursprung“ sind Risikofaktoren in der Krankheitsentstehung [13, 14]. Die Mehrzahl der Patienten mit

pAVK weisen mehr als einen dieser Risikofaktoren auf [6]. Die Häufigkeit, mit der diese Patienten gleichzeitig an anderen Manifestationsformen der Atherosklerose erkranken, erklärt sich unter anderem durch das Vorhandensein multipler Risikofaktoren [16]. Vor allem bei Patienten, die die Risikofaktoren Rauchen und Diabetes mellitus aufweisen, zeigt sich eine starke Krankheitsprogredienz [4, 11]. Folgeschäden des Diabetes mellitus sind Empfindungsstörungen und eine schlechtere Infektabwehr vor allem der unteren Extremität. Zusätzlich zeigen Patienten, die an pAVK und Diabetes mellitus erkrankt sind, gehäuft ausgeprägtere arterielle Gefäßstenosen. Die Gewebeschäden der Extremitäten sind häufig so schwer, dass Extremitätenamputationen die letzte Therapiemöglichkeit darstellen [11]. Da die Krankheitsfolgen und Komorbiditäten der pAVK schwere Auswirkungen auf den Patienten haben können, wäre es wichtig, frühzeitig mit einer Risikoreduktion zu beginnen. Diese Reduktion sollte daher einen hohen präventiven und therapeutischen Wert darstellen und bei allen Patienten mit einer pAVK in das Therapiekonzept eingeschlossen werden. Deswegen ist eine frühzeitige Diagnosestellung der pAVK wichtig. Aufgrund mangelnder Symptomatik ist sie bei asymptomatischem Krankheitsverlauf schwierig. Bereits in diesem Krankheitsstadium ist es aber essentiell der Progredienz der Erkrankung mit einer Reduktion der vorhandenen Risikofaktoren entgegenzuwirken und damit die weitere Ausprägung des Krankheitsbildes zu verhindern [16].

Die Pathophysiologie der pAVK weist myopathische Anteile auf. Pipinos et al. konzentrierten sich auf den Einfluss mitochondrialer Schäden während Ischämie und zeigten, dass es zu einer Verminderung der Muskelkraft kam, die nicht ausreichend durch einen verminderten Blutfluss und ein vermindertes Sauerstoffangebot zu erklären war.

Vermutet werden strukturelle Schäden an Skelettmuskelzellen, insbesondere im Bereich der Mitochondrien [35, 36].

2.1.3. Einteilung und Lokalisation der pAVK

Die Komplexität und Progressivität der Erkrankung machen eine genaue Einteilung der Krankheit notwendig. Die Einteilung in die verschiedenen Stadien erfolgt nach klinischen Kriterien (Rutherford oder Fontaine) und der Lokalisation der Gefäßobstruktion. In dieser Arbeit erfolgt die Klassifikation nach Fontaine. Die klinischen Stadien der pAVK wurden von Fontaine eingeteilt in die Stadien I-IV und werden mithilfe der Angabe der Schmerzentstehung des Patienten je nach Distanz der Gehstrecke klassifiziert [16].

Die neuere Klassifikation nach Rutherford gliedert die pAVK nach Schwere der Symptomatik in 4 Grade und 7 Kategorien und wird als Standard zur Einteilung der pAVK empfohlen [4]. Beide Klassifikationen sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

Tabelle 2.1: Klassifikation der pAVK nach Fontaine und Rutherford

Fontaine		Rutherford		
Stadium	Klinik	Grad	Kategorie	Klinik
I	Asymptomatisch	0	0	Asymptomatisch
IIa	Leichte Claudicatio schmerzfremie Gehstrecke > 200m	I	1	Leichte Claudicatio
IIb	moderate bis schwere Claudicatio schmerzfreie Gehstrecke < 200m	I	2	moderate CI
		I	3	schwere CI
III	Ruheschmerz	II	4	ischämischer Ruheschmerz
IV	Ruheschmerz + Trophische Störungen: Nekrose/Ulkus/Gangrän	III	5	fokaler ischämischer Defekt
		IV	6	großer ischämischer Defekt

Neunzig Prozent der ischämischen Verschlüsse sind in den unteren Extremitäten lokalisiert. Fünfunddreißig Prozent der Verschlüsse befinden sich im Bereich der Beckenarterien, 50% im Bereich der Oberschenkelarterien und 15% im Bereich der Unterschenkelarterien [2]. Nur 10% der ischämischen Verschlüsse bei pAVK befinden sich in den oberen Extremitäten [2].

Die asymptotische pAVK (Fontaine Stadium I) zeigt keine Anzeichen der CI und weist keinen Ruheschmerz und keine trophischen Störungen auf. Die Krankheitsfolgen und die Progredienz der Erkrankung sind jedoch unabhängig vom Auftreten der CI Symptome. Durch mangelnde Bewegung oder Bewegungsmöglichkeiten oder durch PNP (z.B. bei D.m.), kann es dazu kommen, dass Patienten keine Schmerzen verspüren, obgleich diagnostisch eine manifeste pAVK nachweisbar ist.

Das Leitsymptom der pAVK ist die CI (Fontaine Stadium II), beschrieben als Schmerzentstehung in der betroffenen Extremität während körperlicher Belastung [4]. Der Begriff stammt aus dem lateinischen und setzt sich zusammen aus den lateinischen Wörtern *claudicare* = hinken und *intermittere* = unterbrechen. So wurde die Krankheit auch Schaufensterkrankheit genannt, da der pAVK-Patient in gewissen Abständen inne halten musste und, um seine Krankheit zu verbergen, die Schaufenster betrachtete. Patienten im Fontaine Stadium II haben in Ruhe eine ausreichende Blutversorgung der Extremität und damit keinen Ruheschmerz. Unter körperlicher Belastung wird die Extremität unterversorgt. Es entstehen ischämische Schmerzen, die den Patienten dazu zwingen, stehen zu bleiben. Der Schmerz bei CI (im Stadium II) ist durch Bewegung reproduzierbar und klingt in Ruhe wieder ab. Die Folgen sind eingeschränkte Mobilität, Schwierigkeiten in der Bewältigung des Alltages und Belastung durch entstehende Schmerzen [16]. Hingegen ist in den Stadien der kritischen Ischämie (Fontaine Stadium III und IV) die Extremität bereits in Ruhe unzureichend mit Blut versorgt, sodass hier bereits in Ruhe Schmerzen bzw. im Verlauf Gewebedefekte entstehen können.

Die peripheren Pulse der betroffenen Extremitäten sind während und direkt nach körperlicher Belastung vermindert tastbar. Auch Hautblässe, Kältegefühl und Parästhesien können auftreten. Ein Viertel der Patienten mit CI haben einen progredienten Krankheitsverlauf, der in einem interventionellen Eingriff oder der Amputation der Extremität resultieren kann [4].

Kritische Extremitätenischämie (Fontaine Stadium III-IV) ist das Spätstadium der pAVK und ist im Vergleich zur CI weniger genau untersucht. Die schlechtere Studienlage ist vor allem durch mangelnde Fallzahlen und die hohe Mortalität der Patienten zu erklären, die zu

Schwierigkeiten in der längerfristigen Nachuntersuchung führt. Der Begriff kritische Extremitätenischämie umfasst Patienten, die an chronischen Ischämieschmerzen in Ruhe und/oder trophischen Störungen im Bereich des Ischämiegebietes leiden. Trophische Störungen können in Form von Nekrosen, Gangrän und Ulzera auftreten. Die hochgradigen Gefäßokklusionen bei kritischer Extremitätenischämie können eine ausgeprägte Hypoxämie distal des arteriellen Gefäßverschlusses und eine dekompensierte Durchblutungsstörung der Extremität bewirken [4, 16].

Der Schmerz tritt typischerweise nachts auf, kann aber in schwereren Fällen dauerhaft bestehen. Es handelt sich um einen chronischen Schmerz, der vom akuten Schmerz der Extremitätenischämie unter Belastung abzugrenzen ist. Die Prognose der kritischen Extremitätenischämie ist wesentlich schlechter als die der CI [11].

2.1.4. Diagnostik der pAVK

Die Primärdiagnostik umfasst die Anamnese, die körperliche Untersuchung, sowie technische Untersuchungen. Aufgrund des gehäufteten Auftretens mit weiteren atherosklerotischer Erkrankungen sollte ferner das gesamte kardiovaskuläre System untersucht werden [4]. Das Ziel ist die genaue Abgrenzung der pAVK gegenüber anderen Krankheiten mit ähnlicher Symptomatik, sowie die korrekte Stadieneinteilung.

Die Inspektion der Extremität kann Hinweise hinsichtlich trophischer Veränderungen ergeben und als Zeichen einer Minderversorgung können trockene oder glänzende Hautstellen auffallen [4]. Auch Veränderungen der Hautfarbe, der Hauttemperatur und der Nägel können auf Störungen der peripheren Extremitätenversorgung hinweisen [4].

Die beidseitige Erhebung des Pulsstatus der peripheren Arterien (A. femoralis, A. poplitea, A. tibialis posterior, A. dorsalis pedis) dient der Einschätzung der vorhandenen Restdurchblutung. Der erhobene Pulsstatus sollte jedoch nicht als absolut angesehen werden, sondern bei dem Verdacht einer pAVK sollte als Standard eine objektive Untersuchung erfolgen [16].

Als klinischer Standard der primär nicht invasiven, objektiven Diagnosestellung der pAVK hat sich der ABI erwiesen. Er dient zur Verifizierung eines klinischen Verdachts und ist die am häufigsten angewandte Methode sowohl in der Klinik als auch in Studien. Die Berechnung des ABI erfolgt durch beidseitige Messung des systolischen Blutdrucks mittels Dopplersonographie der A. brachialis, A. tibialis posterior sowie der A. dorsalis pedis. Dividiert wird der höchste systolische Wert der Arterien der unteren Extremität durch den höheren der zwei Werte der oberen Extremität.

Da durch atherosklerotische Verengungen oder Verschlüsse der systolische Druck postobstruktiv sinkt, sinkt auch der Quotient aus systolischem Druck der unteren und oberen Extremität, also der ABI. Normale ABI Werte sollten zwischen 0.90 und 1.3 liegen, da der systolische Knöcheldruck über dem systolischen Druck des Armes liegt [4]. Ein ABI von ≤ 0.90 in Ruhe ist Hinweis auf eine signifikante hämodynamische arterielle Obstruktion und hat eine bis zu 95%ige Spezifität und Sensitivität für eine pAVK [4, 9]. Je niedriger der ABI Wert ist, desto größer ist die hämodynamische Beeinträchtigung in der betroffenen Extremität. Der ABI dient somit der Diagnosesicherung einer pAVK und hilft asymptotische Verläufe der pAVK zu diagnostizieren [4]. Ferner zeigt er eine Tendenz des individuellen Risikos für ischämisch bedingte kardiovaskuläre Krankheiten an. Metaanalysen haben gezeigt, dass ein reduzierter ABI einen

unabhängigen Risikofaktor in der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen darstellt und stark mit der Mortalität der Patienten korreliert [4, 16].

Zur weiteren Diagnostik werden pAVK Patienten einer Laufbandanalyse unterzogen. Die Untersuchung erfasst die schmerzfreie Gehstrecke und den Zeitpunkt des Abbruchs der Laufbanduntersuchung aufgrund maximaler Schmerzentwicklung. Mittels der erfassten Gehstrecke können die Fontaine Stadien IIa oder IIb differenziert werden [4]. Die Messung des ABI im Anschluss an die Laufbanduntersuchung ergibt im Stadium II erniedrigte Werte.

Die Kombination der Diagnostik aus Anamnese, Ergebnissen der körperlichen Untersuchung, der Laufbanduntersuchung, der Berechnung des ABI und des Pulsstatus ergibt ein genaueres Bild der Krankheit und reicht meist zum Therapiebeginn aus. Bildgebende Verfahren kommen vor allem in der Planung von interventionellen Therapien zum Einsatz [4].

2.2. Ischämieschmerz

2.2.1. Ischämie

Ischämie ist eine arterielle Minderversorgung von Gewebe, die zu einer inadäquaten Sauerstoffversorgung führen kann [35]. Man unterscheidet zwischen einer relativen Ischämie bei unzureichender Blutversorgung und einer absoluten Ischämie bei vollständig unterbrochener Blutzufuhr. Die arterielle Minderversorgung ist meist Folge einer atherosklerotischen Verengung, die zu verminderten poststenotischen Drücken führt und eine Hypoxämie oder Anoxie des Gewebes bedingen kann [35, 37].

Durch Minderperfusion des poststenotischen Gewebes kommt es zu Defiziten in der Sauerstoff- und Substratversorgung bei gleichzeitig verminderter Entsorgung von Stoffwechselendprodukten [3].

Ischämie kann zu Veränderungen der Blutgase, des Säure-Basen-Haushaltes und der Elektrolytverteilung führen.

2.2.2. Schmerz

Die Internationale Gesellschaft zum Studium des Schmerzes (IASP) definiert Schmerz als „ein unangenehmes Sinnes- oder Gefühlserlebnis, dass mit tatsächlicher oder drohender Gewebeschädigung einhergeht oder von Patienten als solches beschrieben wird“. Schmerz ist demnach eine subjektive Empfindung [38]. Ein akutes Schmerzereignis ist ein Warnsignal und dient als Schutzfunktion für den Körper. Akuter Schmerz wird daher auch als physiologischer Schmerz bezeichnet, da der Körper adäquat auf Schmerzreize reagieren und sich vor weiteren Schäden schützen kann [39, 40].

Chronische Schmerzen stellen in unserer Bevölkerung ein häufiges Problem dar. Neben klassischen Ursachen der Schmerzgenese ist diese Pathologie im Sinne eines biopsychosozialen Schmerzerlebens mit diversen Kofaktoren zu verstehen. Dies kann zu einer dauerhaften Belastung des Patienten führen [40-42]. Im Gegensatz zum physiologischen akuten Schmerz bezeichnet man ihn als pathologischen Schmerz. Klinisch wird Schmerz als chronisch bezeichnet, wenn dieser über einen zu erwartenden Zeitraum anhält und sich unter einer adäquaten Schmerztherapie nicht vermindert [42]. Auch lässt er sich durch Vermeidung oder Verhaltensänderung des Patienten nicht reduzieren [43]. Oft ist chronischer Schmerz mit weiteren Schmerzkomponenten assoziiert. Hyperalgesie (Überempfindlichkeit auf

Schmerzreize) und Allodynie (Reaktion auf Reize, die normalerweise kein Schmerzempfinden auslösen) können hierbei Hinweise auf neuropathische Schmerzen geben [40]. Sie weisen auf eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber Schmerzreizen hin und können durch periphere oder zentralnervöse Sensibilisierung entstehen [44]. Ab welchem Zeitraum Schmerz als chronisch gilt, ist schwieriger zu ermitteln [42]. Zimmermann beschreibt Schmerzen dann als chronisch, wenn sie den Patienten in seiner Lebensweise zunehmend einschränken [43].

Nozizeption beschreibt die Aufnahme, Umwandlung und Weiterleitung von schmerzhaften Reizen, die zur Wahrnehmung von Schmerz führen kann [45]. Schmerzwahrnehmung kann auf allen Ebenen des Reiz-Leitungssystems moduliert werden, so dass ein individuelles Schmerzmuster entsteht [45]. Ein nozizeptiver Reiz wird an einer peripheren Nervenendigung bioelektrisch in Aktionspotentiale umgewandelt. Dieses entstandene elektrische Signal wird über ein Axon mit langsamer Leitungsgeschwindigkeit (A δ - und C- Fasern) an das Rückenmark weitergeleitet und im Hinterhorn der grauen Substanz synaptisch auf ein nachfolgendes 2. Neuron umgeschaltet. Der Impuls wird über die Medulla oblongata und den Thalamus bis in den Kortex weitergeleitet [39, 46]. Die Perzeption der Schmerzreize erfolgt im Gehirn und benötigt das Bewusstsein des Menschen [3].

2.2.3. Schmerzfasern und Nozizeptoren

Man unterscheidet zwischen zwei Arten nozizeptiver Nervenfasern.

A δ -Fasern der Gruppe III sind Afferenzen, die vor allem scharfe, stechende Wahrnehmungsqualitäten leiten. Sie sind von Myelinscheiden umgeben und haben einen Durchmesser von 2-6 μm und eine Reizleitungsgeschwindigkeit von 12-30 m/s [39, 40]. Eine

monosynaptische Umschaltung im Reflexbogen auf Rückenmarksebene ermöglicht eine sofortige muskuläre Antwort auf eine Schmerz sensation, z.B. eine Fluchtreaktion [40, 45, 47].

Unmyelinisierte C-Fasern der Gruppe IV sind polymodale Afferenzen, die zu einer dumpfen, unscharf zu lokalisierenden, brennenden Schmerzwahrnehmung führen. Sie haben einen Durchmesser von 0,4-1,2 μm und leiten mit einer Geschwindigkeit von 0,5-2 m/s. C-Fasern sind über ihre Rezeptoren unter anderem durch chemische Reize aktivierbar. Durch eine dauerhafte chemische Reizung sinkt die Reizschwelle der C-Fasern ab und die freien Nervenendigungen sensibilisieren. Nozizeptoren sind spezifische Sinneszellen, die auf den Körper wirkende noxische Reize aufnehmen und in Aktionspotentiale umwandeln können. Durch das Überschreiten von Schwellenwerten können sie zwischen schädigenden und harmlosen Reizen unterscheiden. Diese Reizinformation wird in Form ihrer Aktionspotentialfrequenzen an höher geschaltete Areale weitergeleitet und dort weiterverarbeitet [40, 48].

Nozizeptoren beginnen als freie Nervenendigungen und liegen als sensorische Endverzweigung in der Haut, im Muskel, im Bereich der viszerale Organe und Gelenke. Die typische Lokalisation der freien Nervenendigungen im Skelettmuskel sind die Wände der Arteriolen und das sie umgebende Bindegewebe. Kapillaren sind frei von Nervenendigungen [48, 49]. Nozizeptoren haben eine hohe Reizschwelle und reagieren direkt auf freigesetzte Stoffe/Reize oder indirekt über eine Senkung der Reizschwelle bzw. wenn eine Sensibilisierung des Nozizeptors durch freigesetzte Mediatoren eingetreten ist. Die Sensibilisierung von Nozizeptoren findet hauptsächlich in Bereichen von Gewebeschädigungen und Entzündungen statt [46, 48, 50]. Über Sensibilisierung aktivierte Nozizeptoren reagieren mit einer gesteigerten Entladungsfrequenz. Im Verlauf eines Schmerzgeschehens kommt es

somit nicht zu einer Adaptation an Schmerzreize, sondern zu einer vermehrten Reizantwort [45].

Gleichzeitig kommt es zu einer erhöhten Bereitstellung vorher inaktivierter Nozizeptoren. Dieses Phänomen ist unter der Theorie der „schlafenden Nozizeptoren“ bekannt. „Schlafende Nozizeptoren“ liegen in nicht-muskulären Geweben wie Bindegewebe, Gelenken etc. Diese Rezeptoren sind initial mechanoinsensitiv und reagieren nicht auf noxische Reize. Erst nach Aktivierung im Rahmen einer Sensibilisierung können sie zu einer weiteren Verstärkung der Schmerzweiterleitung und damit der Schmerzreaktion und des Schmerzempfindens führen. Neben der Sensibilisierung der Nozizeptoren durch freigesetzte Mediatoren zeigen die Nozizeptoren in der Muskulatur eine Sensibilisierung durch mechanische Reize [46, 48, 50].

A δ - und C-Fasern nehmen noxische Reize über mono- und polymodale Nozizeptoren auf, die mechanosensitiv [3, 48], thermosensitiv und chemosensitiv sein können [39]. Mense beschrieb eine Untergruppe von mechanosensitiven Muskelnozizeptoren, die speziell bei der Kontraktion der Skelettmuskulatur unter ischämischen Bedingungen aktiviert werden. Obwohl alle Nervenfasern der Muskulatur den gleichen biochemischen Bedingungen ausgesetzt sind, reagieren nur ein Teil dieser Rezeptoren unter ischämischen Bedingungen mit der Auslösung von Impulsen [48].

2.2.4. Aktivierung von Nozizeptoren

Die Erregung eines Nozizeptors erfolgt über die durch schädliche Reize ausgelöste Öffnung potentialgesteuerter Ionenkanäle. Durch den Ionenfluss depolarisiert die Zellmembran und es entsteht ein Aktionspotential [51]. Durch die bei Entzündungsprozessen entstehenden Metabolite kann die Erregbarkeit eines Nozizeptors erhöht werden und das Schwellenpotential der Zelle sinkt.

Folglich kommt es schon bei weniger starker Depolarisation der Zelle zum Auslösen von Aktionspotentialen [43, 48].

Nozizeptoren der Skelettmuskulatur reagieren vor allem auf chemische und mechanische Reize. Während einer Entzündung und Ischämie können algetisch wirkende Substanzen wie Bradykinin, Prostaglandin, KCl, Interleukin-6 (IL-6), Leukotriene, Histamin, Kalium-Ionen (K^+ -Ionen), ATP und Serotonin freigesetzt werden [43, 48].

Ein Absinken des pH-Wertes im Muskelgewebe, bzw. das Ansteigen von Wasserstoffionen kann zu einer Aktivierung von C-Fasern führen [48]. Mense beschreibt, dass Hypoxämie in der Muskulatur zu einer Sensibilisierung des Nozizeptors führt [48]. Während Ischämie treten viele dieser Veränderungen im Gewebe auf und könnten möglicherweise an der Schmerzentstehung teilhaben.

Neben Entzündungsmediatoren wirken die von peripheren Nervenendigungen und den Ganglien des Hinterhorns im Rückenmark sezernierten Neuropeptide pronozizeptiv. Die Neuropeptide Substanz P, Calcitonin gene-related peptide (CGRP) und Somatostatin sensibilisieren die Nozizeptoren und senken die Reizschwelle. Von den Ganglien im Hinterhorn werden sie in die Peripherie transportiert und zeigen hier ihre Wirkung. Dieser efferent sekretorischen Funktion der Nozizeptoren wird eine maßgebliche Beteiligung an der Entstehung der neurogenen Inflammationskaskade zugesprochen [48, 52].

2.2.5. Entstehung des akuten Ischämieschmerzes

Ischämieschmerz und Hypoxämieschmerz werden in der Literatur häufig gleichbedeutend verwendet, sind aber voneinander abzugrenzen.

Der Hypoxämieschmerz entsteht durch reine Sauerstoffminderversorgung eines Gewebes, wobei die Entstehung des akuten Ischämieschmerzes komplex ist und kontrovers diskutiert wird.

Wahrscheinlich handelt es sich um eine multifaktorielle Schmerzgenese. Einige Wege der Schmerzentstehung sind bereits bekannt, viele sind weiterhin ungeklärt. Ischämieschmerz tritt akut unter Belastung auf und ist im belastungsfreien Intervall rückläufig [53]. Er ist reproduzierbar und entsteht bei CI (Fontaine Typ II) ab einer Gehstrecke von ca. 200 m. Der akute Ischämieschmerz ist ein somatischer Tiefenschmerz, der von Nozizeptoren in viszeralen und nicht-viszeralen Geweben, z.B. Muskeln, Sehnen, Bändern und Bindegeweben aufgenommen wird. Er wird über A δ - und C-Fasern geleitet und ist meist vom Patienten nicht genau lokalisierbar [3].

Da die genaue Pathogenese der Schmerzentstehung nicht bekannt ist, existieren verschiedene Hypothesen.

Bekannt ist, dass Ischämie zu Erregungen im Bereich des Nozizeptors und der afferenten Nervenfasern führen kann, hauptsächlich über C-Fasern [48]. Muskuläre Belastung resultiert in einem Mehrbedarf an Substraten, Sauerstoff und der Entsorgung von Stoffwechselendprodukten. Vermutet wird, dass die Minderperfusion, die Minderversorgung und die verminderte Entsorgung zur Schmerzentstehung beitragen [3]. Aufgrund der verminderten Entsorgung steigen die unter Energie verbrauchender Muskelkontraktion entstehenden algetischen Stoffwechselendprodukte lokal an und fördern die Schmerzgenese [3] (siehe 2.2.4).

Wissenschaftlich belegt ist, dass das Missverhältnis zwischen belastungsbedingtem erhöhten Sauerstoffbedarf der Muskulatur und die gleichzeitige Minderperfusion in einer Hypoxämie des Gewebes resultiert. Unwahrscheinlich ist aber eine alleinige Schmerzentstehung durch Sauerstoffmangel, da bei reiner Ischämie des Muskels ohne muskuläre Belastung nur eine geringe Entstehung von Ischämieschmerzen gezeigt werden konnte [3, 48]. Im Gegensatz dazu

führt Ischämie bei gleichzeitiger muskulärer Belastung zu einer früheren Schmerzentstehung mit höherer Schmerzintensität. Es wäre also möglich, dass nozizeptive Nervenfasern eine gewisse Hypoxieresistenz aufweisen und unter zusätzlicher Ischämie vermehrt aktiviert werden [48].

Während Belastung kommt es bei pAVK-Patienten zu einem Laktatanstieg, der durch die unter anaeroben Verhältnissen arbeitende Glykolyse zu erklären ist [3]. Laktat als Auslöser von Ischämieschmerz konnte nicht gezeigt werden. Bekannt ist, dass Patienten mit McArdle Krankheit (Defekt eines Enzym und resultierendem Laktatmangel) ebenfalls Schmerzen bei CI entwickeln [3, 48]. Möglich ist, dass Laktat in Kombination mit anderen algetischen Stoffen einen schmerzauslösenden Effekt hat [3, 48]. Weiterhin ist bekannt, dass im anaeroben Gewebe der pH-Wert sinkt. Dieses entspricht einem Anstieg der extrazellulären H^+ -Ionen Konzentration. Rieger et al. vermuten, dass der Anstieg der H^+ -Ionen Konzentration wahrscheinlicher durch die Entsorgungsstörung, als durch den Mangel an Sauerstoff zu erklären ist. H^+ -Ionen können direkt Nozizeptoren aktivieren und Aktionspotentiale an den Axonen der Nervenendigungen auslösen [3, 54]. Die Senkung des pH-Wertes führt zusätzlich zu einer Verminderung der Schmerzschwelle am Axon. Die schmerzerregende H^+ -Ionen Konzentration liegt zwischen 10^{-6} M bis $10^{-6,5}$ M, dieses entspricht einem pH-Wert von 6,5-6,0 im Muskelgewebe. Ob der pH-Wert im Muskel unter Belastung und Ischämie auf diese Werte absinkt ist nicht sicher.

Weiterhin ist eine muskelmechanische Komponente des Ischämieschmerzes denkbar. Erklärbar wäre sie durch einen Muskeltetanus, entstehend durch eine extrazelluläre Akkumulation von Kalium und einer daraus entstehenden dauerhaften Depolarisation der Muskulatur [3]. Pathophysiologisch bekannt ist, dass zur Pufferung der

Azidose freie H^+ -Ionen im Austausch gegen K^+ -Ionen intrazellulär aufgenommen werden. Die Freisetzung der K^+ -Ionen in den Extrazellulärraum trägt zur Erhaltung des elektrochemischen Gleichgewichts bei. Eine Kaliumkonzentration von ≥ 20 mM/l wirkt lokal schmerzerregend [3].

Wahrscheinlich ist also, dass algetische Stoffwechselprodukte zur Auslösung von Ischämieschmerz beitragen und zu einer Sensibilisierung des Nozizeptors führen [3, 43, 48].

Eine Theorie befasst sich mit der Entstehung von Ischämieschmerz im Muskel durch chemische Reize, die hauptsächlich durch Mikrozirkulationsstörungen im Bereich der Arteriolen des Skelettmuskels hervorgerufen werden. Dies wurde durch die enge räumliche Beziehung zwischen Muskelnozizeptoren und Arteriolen erklärt [48, 49]. Die freien Nervenendigungen der Muskelnozizeptoren sind bis auf kleine Areale von Schwannschen Zellen umgeben. Es ist davon auszugehen, dass die freigelassenen Areale der Ort der Schmerzperzeption sind. Obwohl muskuläre Nozizeptoren starke Reize für ihre Aktivierung brauchen, reagieren sie auf noxische Reize vor dem Eintreten von Gewebeverletzungen [49].

Eine weitere Theorie ist eine muskelmechanische Schmerzgenese, die neben dem Muskeltetanus durch Kalium auch durch ATP-Mangel zu erklären ist. Zur Lösung der bei Muskelkontraktion entstehenden Aktin/Myosin Bindung wird ATP benötigt. Da dieses im minderversorgten Muskel nicht ausreichend vorhanden ist, kommt es zu einer anhaltenden Muskelstarre und zu einer Aktivierung von Mechanonozizeptoren aufgrund der so entstehenden Scherwirkung. Die Folge kann ein muskelmechanischer Schmerz sein [3].

Es ist denkbar, dass bei pAVK Patienten Schäden im Bereich der Kapillaren vorliegen. Während muskulärer Belastung (z.B. auf dem

Laufband) ist der transkapilläre Filtrationsdruck in den Gefäßen der Muskulatur erhöht. Durch die Kapillarschäden wäre eine erhöhte Volumenfiltration in das umliegende Gewebe und eine Druckerhöhung in der Muskelfaszienloge denkbar. Die Folge dessen wäre eine Schmerzentstehung durch Druck [3]. Diese sollte sich folglich im Bereich der engsten Faszienloge, also im Tibialis anterior Bereich zeigen. Der klassische CI Schmerz tritt aber im Bereich der Wade auf, so dass dieser Weg der Schmerzentstehung bei Ischämie eher unwahrscheinlich ist.

Durch eine Störung des sympathischen Nervensystems kommt es zu einer vermehrten poststenotischen Vasokonstriktion bei Patienten mit CI Schmerzen. Diese könnte zu einer Verstärkung der Minderperfusion und daraus resultierenden Komplikationen beitragen [37, 55].

Die aktuellen Theorien zur Entstehung von Ischämieschmerz ergeben noch kein endgültiges pathophysiologisches Konzept. Wahrscheinlich ist eine Zusammensetzung verschiedener Pathomechanismen die zur Genese der Schmerzentstehung beitragen. Durch den großen Einfluss chemischer Substrate auf die Aktivierung von Muskelnozizeptoren scheint vor allem die Entsorgungsstörung eine große Rolle zu spielen.

2.3. Adenosin

Adenosin ist ein im Organismus ubiquitär vorkommendes Purinnukleosid von extrem kurzer Halbwertszeit (ca. 1,5 sec) [56]. Es wird kontinuierlich sowohl intra- als auch extrazellulär über verschiedene Wege neu synthetisiert. Über zwei Wege entsteht Adenosin intrazellulär: der Hydrolyse von S-Adenosyl-Homocystein und der Dephosphorylierung von Adenosinmonophosphat (AMP) mit Hilfe des Enzyms 5'Nukleotidase. Der Abbau erfolgt über die Adenosin-Deaminase, die erneute Phosphorylierung zu AMP erfolgt über die Adenosin-Kinase [17]. Per Diffusion über bidirektionale Adenosintransporter hält sich ein Gleichgewicht zwischen intrazellulärem und extrazellulärem Raum. Adenosin aus dem extrazellulären Raum wird schnell in die Zelle zurück aufgenommen. [56-58] Siehe hierzu auch Abbildung 2.1: Intra- und extrazelluläre Synthese und Metabolismus von Adenosin

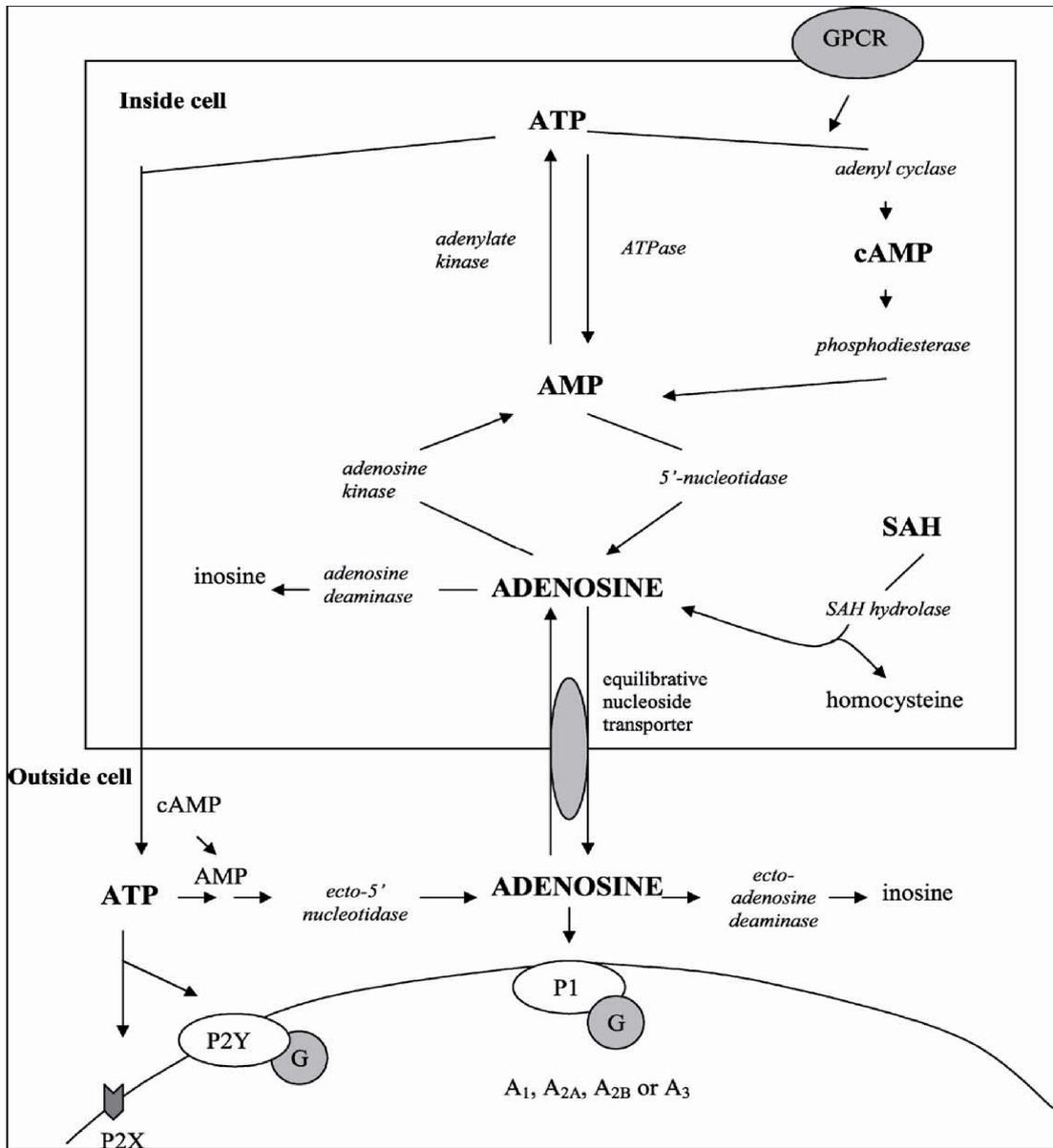


Abbildung 2.1: Intra- und extrazelluläre Synthese und Metabolismus von Adenosin [58]

Adenosin ist ein Molekül mit vielen Funktionen und Wirkungen im Körper, wovon einige bekannt, einige Gegenstand der Forschung, viele aber vermutlich noch unbekannt sind.

Adenosin wirkt als lokaler und systemischer Vasodilatator direkt nach seiner Freisetzung oder Applikation [59-61]. Die vasodilatatorische Wirkung des Adenosins scheint ein dosisabhängiger Prozess zu sein. Bei geringer bis mittlerer Anstrengung spielt Adenosin nur eine geringe Rolle bezüglich des Blutflusses und der Vasodilatation [62]. Es kann aber die Blutflussverteilung ändern, so dass stärker beanspruchte Areale der Muskulatur besser durchblutet werden. Nach höhergradiger Beanspruchung der Muskulatur sind deutliche vasodilatatorische Effekte erkennbar [63].

Des Weiteren werden Adenosin und seinen zugehörigen Rezeptoren immunsuppressive Wirkungen zugesprochen, die die weitere Verschlechterung von hypoxischen Gewebsverletzungen unterbinden. Dieses geschieht vor allem durch verminderte Freisetzung immunstimulierender Substanzen und verminderte Aktivierung immunmodulierender Zellen [20].

Unter muskulärer Belastung kommt es zu einem Anstieg des Adenosinspiegels intravasal und intramuskulär, wobei die Höhe des Adenosinspiegels mit dem Maß an körperlicher Anstrengung korreliert [18, 19]. Der Adenosinanstieg ist weiterhin potenzierbar durch experimentell induzierte Ischämie. Ein Adenosinanstieg während Ischämie ohne muskulärer Belastung konnte nur intravasal und nicht intramuskulär gezeigt werden, während Ischämie und muskuläre Belastung zu intravasalen und intramuskulären Adenosinanstiegen führen [62, 63].

Die Umwandlung von Adenosin zurück in phosphorylierte Metabolite ist ein energieabhängiger Prozess über die Adenosin-Kinase. Durch die

Ischämie kommt es zu einer Hypoxämie-induzierten Inhibition der Adenosin-Kinase auf bis zu unter 10% [20]. Der Mangel führt zu einem massiven Anstieg an Adenosin in ischämischen Geweben. Eine weitere Folge der Ischämie ist die verminderte Produktion von Adenosintriphosphat (ATP), wodurch Adenosindiphosphat (ADP) und AMP akkumulieren, die über die oben genannten Enzyme zu Adenosin abgebaut werden [20]. Studien belegen sowohl schmerzauslösende als auch analgetische Wirkungen von Adenosin. Diese Wirkungen werden über spezifische Adenosinrezeptoren vermittelt.

Diese Rezeptoren sind nach ihrem Hauptagonisten Adenosin benannt. Adenosin besitzt sowohl erregende, als auch hemmende Wirkungen an der axonalen Membran der peripheren Nerven [57, 64].

Beschrieben sind hemmende hochaffine A1 und niedrigaffine A3 Rezeptoren sowie stimulierende hochaffine A2a und niedrigaffine A2b Rezeptoren [65]. Die Adenosinrezeptoren sind integrierte Membranproteine und wirken über G-Proteine, bestehend aus einer α -, einer β - und einer γ - Untereinheit. Über Gi/o Proteine wirken A1 und A3 Rezeptoren inhibitorisch und die Adenosinrezeptoren A2a und A2b über Gs-Proteine stimulierend auf die Adenylatzyklase. Die α -Untereinheit ist in inaktiver Form mit der β - und der γ -Untereinheit verbunden und hat ein Guanosindiphosphat gebunden. Durch Aktivierung wird das Guanosindiphosphat durch Guanosintriphosphat mittels „guanosine nucleoside exchange factor“ ausgetauscht, die β - und γ -Untereinheit dissoziieren von der α -Untereinheit. Der aktive α -Untereinheit-/Guanosintriphosphat Komplex aktiviert die Adenylatzyklase, welche ATP zu zyklischem AMP umwandelt. Das zyklische AMP aktiviert die Proteinkinase A, welche viele energiereiche Prozesse aktivieren oder inhibieren kann. Die Signalkaskade kann ebenfalls über den „second messenger“ Inositol-1,4,5-triphosphat weitergegeben werden. Der aktive

α -Untereinheit-/Guanosintriphosphat Komplex aktiviert die Phospholipase C, die Phosphatidylinositolbisphosphat in Inositol-1,4,5-triphosphat und Diazylglyzerol spaltet. Inositol-1,4,5-triphosphat führt über die Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen zur Aktivierung der Proteinkinase C, der eine ähnliche Funktion wie der Proteinkinase A zukommt.

Die Adenosinrezeptoren A1 und A3 wirken über Gi/o Proteine inhibitorisch auf die Adenylatzyklase und führen folglich zu einer verminderten Produktion von zyklischem AMP [17, 66]. In mehreren Studien wurden die antinozizeptiven Eigenschaften der A1 und A3 Rezeptoren auf peripherer und spinaler Ebene dargelegt [17, 57, 66-68]. Dem entgegen steht eine Studie, die gezeigt hat, dass Adenosin muskulären und kardialen Ischämieschmerz über A1 Rezeptoren vermittelt [69]. Eine andere Studie zeigte, dass über den Adenosin A3 Rezeptor ein pronozizeptiver Effekt durch die Freisetzung von Histamin aus Mastzellen und Serotonin vermittelt wird [66].

Die Adenosinrezeptoren A2a und A2b wirken über Gs-Proteine stimulierend auf die Adenylatzyklase und führen zu einer erhöhten Produktion von zyklischem AMP [17, 66]. Die Aktivierung von A2 Rezeptoren zeigt pronozizeptive und antiinflammatorische Effekte [17, 70, 71]. Die Downregulation proinflammatorischer Moleküle und die verminderte Aktivierung immunmodulierender Zellen führt zur Hemmung von Entzündungsprozessen in Arealen mit erhöhter Adenosinausschüttung [20, 66]. Auch der Aktivierung von Adenosin A3 Rezeptoren wurden antiinflammatorische Effekte zugesprochen [70]. Der vasodilatative Effekt des Adenosins scheint teilweise über A2 Rezeptor Aktivierung vermittelt zu sein [60]. Der Aufbau der Adenosinrezeptoren ist der Abbildung 2.2 zu entnehmen.

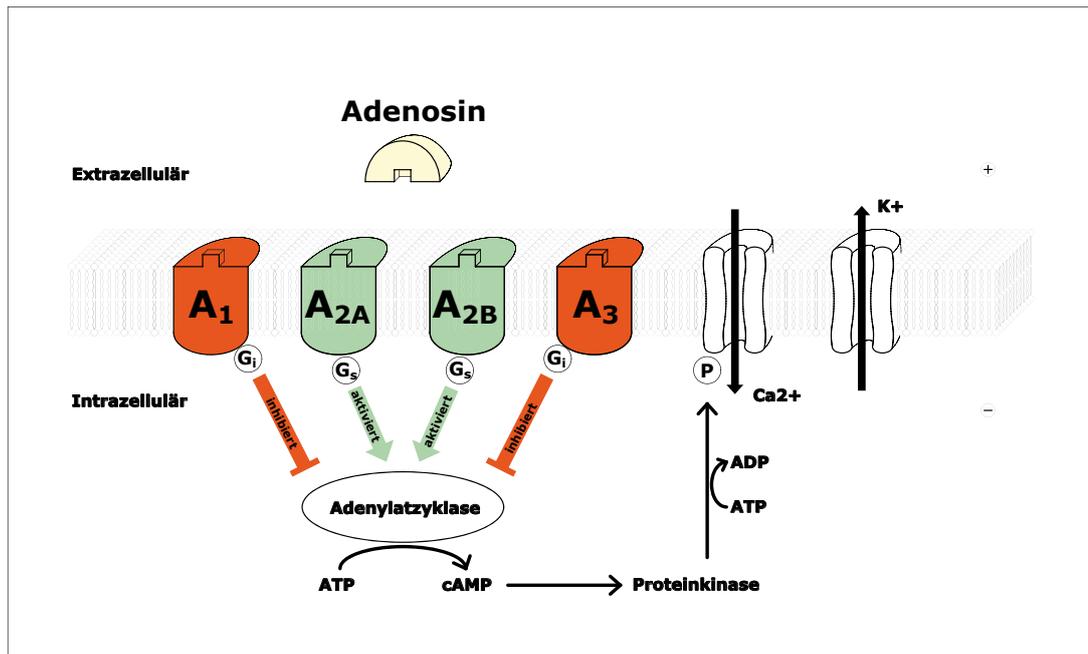


Abbildung 2.2: Adenosinrezeptor Bindung

Die Aktivierung von A₁ Rezeptoren über die Applikation niedrig konzentrierten Adenosins zeigte, dass es zu einer Linderung von neuropathischen Schmerzen, zu einer Erhöhung der Schmerzschwelle und einer Verminderung der Hyperalgesie kam [72-75]. Der perioperative Einsatz von Adenosin in niedriger Dosierung führte zu antinozizeptiven Effekten [76]. Adenosin senkt die Größe des Hyperalgesieareals bei experimentell induzierten Hautdefekten [77], vermindert inflammatorischen, neuropathischen und ischämischen Schmerz und reduziert Allodynie nach intravasaler oder intrathekaler Gabe [22, 72, 73, 78, 79]. Trotz der kurzen Halbwertszeit ist die Schmerzhemmung durch Adenosin von langer Wirksamkeit, was für eine zentrale Schmerzmodulation spricht [73]. Da die antinozizeptive Wirkung von Adenosin durch niedrige Dosen vermittelt zu sein scheint, stellt die intravenöse Applikation von Adenosin einen experimentellen Ansatz zur Behandlung neuropathischer Schmerzen dar [73, 75].

Die nozizeptive Wirkung von Adenosin erfolgt über A₂ Rezeptoraktivierung. Diese werden erst bei hohen Mengen Adenosin aktiviert. Es ist wahrscheinlich, dass die schmerzauslösenden Effekte von Adenosin vor allem in Regionen zustande kommen, wo Adenosinderivate nicht abtransportiert werden können, zum Beispiel während Ischämien des Skelettmuskels und des Herzens, sowie bei ausgeprägter Zellschädigung [21]. Es wurde gezeigt, dass Adenosin schmerzauslösende Effekte im Skelett- und Herzmuskel hat und Mediator des ischämischen Herzschmerzes ist [80, 81]. Die nozizeptive Wirkung ist sowohl bei lokaler [21] als auch intravasaler Applikation belegt [61, 80]. Die periphere Injektion von Adenosin führte zur Entstehung von Extremitätenschmerz [69]. Die intraarterielle Bolusgabe von Adenosin kann eine dosisabhängige Schmerzentstehung zur Folge haben [61]. Die Infusion des Adenosinantagonisten Theophyllin, führte zu einer Hemmung des ischämischen pektanginösen Schmerzes [82].

Wahrscheinlich ist, dass die Dosis-/Wirkungsbeziehung des Adenosins nicht alleine von der Menge des Adenosins abhängt, sondern auch durch die Anzahl an Rezeptoren reguliert wird [80].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Adenosin dosisabhängig schmerzmodulierende, antiinflammatorische und vasodilatative Eigenschaften besitzt.

Patienten im pAVK-Stadium II nach Fontaine leiden unter intermittierenden Muskelischämien (CI), wobei sie über starke Schmerzen klagen. Im Rahmen dieses Schmerzes könnte Adenosin durch seine unterschiedlichen Eigenschaften eine Schlüsselrolle spielen.

Ein therapeutischer Einsatz von Adenosin beim Ischämieschmerz von pAVK Patienten würde aufgrund seiner vasodilatierenden Eigenschaft nachvollziehbar sein, da dies zu einer verbesserten Perfusion des

Muskels führt. Zu bedenken ist aber, dass die vasodilatierende Wirkung des Adenosins von sehr kurzer Dauer ist.

Möglicherweise stellt Adenosin im Rahmen der CI eine Art Signalmolekül dar. Da unter geringerer Ischämie/Belastung weniger Adenosin freigesetzt wird, werden anfänglich vor allem A1 Rezeptoren mit antinozizeptiven Eigenschaften aktiviert, so dass die Patienten z.B. in Ruhe oder bei geringer Belastung keine Schmerzen verspüren. Ischämieschmerzen bei pAVK-Patienten wären durch die nozizeptive Wirkung aktivierter A2a und A2b Rezeptoren erklärbar. Der durch hohe Adenosinkonzentrationen ausgelöste Schmerz könnte somit einen Schutz für das hypoxisch/ischämische Gewebe darstellen, da der Patient stehen bleibt und die Bilanz zwischen Sauerstoff-Anforderung und -Versorgung des Muskels wiederhergestellt werden kann. Adenosin kann also ein Marker für die Schwere der Ischämie darstellen und ein Anstieg des Plasma-Adenosins und seiner Abbauprodukte wäre zu erwarten. Es wäre interessant zu wissen, ob Adenosinspiegel bei akuter Belastung mit der Schmerzstärke korrelieren.

Zusätzlich zeigt Adenosin antiinflammatorische und somit gewebeprotective Eigenschaften [20], die erstens einen weiteren Austritt von Adenosin durch voranschreitende Zellschädigung hemmen könnten und das bereits ischämische/hypoxische Gewebe vor Inflammation schützen kann.

Somit bedeutet die Aktivierung der unterschiedlichen Adenosinrezeptoren verschiedene für die pAVK relevante Funktionen.

Unklar bleibt, ob die nach Belastung bei pAVK-Patienten entstehenden erhöhten Adenosinspiegel [23] durch Belastung, Ischämie oder die Kombination daraus entstehen.

2.4. S-100B

S-100B ist ein saures Kalzium bindendes Protein von 21 kDA Größe. Es liegt als homodimeres Protein aus zwei β - Untereinheiten vor [26, 83-85]. S-100B ist ein nicht-ubiquitär im Körper vorkommendes, zellspezifisches Protein [83]. S100 Proteine befinden sich vor allem in zentralnervösen Geweben, extrazellulär und im Zytoplasma von Gliazellen und Schwannschen Zellen, sowie in peripheren Geweben in Melanozyten, Chondrozyten und Adipozyten [86, 87]. Sie entfalten ihre Wirkung überwiegend an Zellen des Immunsystems, Neuronen, Astrozyten, Mikroglia, sowie endothelialen und epithelialen Zellen [83]. Auch wurde S-100B in Melanomen sowie benignen und malignen peripheren Nervenscheidentumoren nachgewiesen [88].

Die Sekretion von S-100B im ZNS erfolgt insbesondere durch Astrozyten und Schwannsche Zellen [26, 83, 84, 87]. Belegt wurde die S-100B Sekretion im ZNS durch Tierversuche, die eine verringerte Expression von S-100B nach Nervenzellschädigung zeigten [89].

S-100B hat intra- und extrazellulär regulative Eigenschaften [83]. Diese Regulierung erfolgt in intakten Zellen zu großen Teilen über intrazellulär vermittelte Modulation eines Kalziumkanals bzw. der durchfließenden Kalziummenge [87]. Der Kalziumfluss über den Kanal konnte weiter gesteigert werden über die Bindung von S-100B an Gliazellen und Neurone [87]. Über Veränderungen in der Signaltransduktionskaskade des Kalziumkanals und des Kalziumflusses werden extrazellulär Zielproteine aktiviert und ihre Funktionen reguliert. Sie können dann lokal oder systemisch ihre Wirkungen ausüben [90].

Bei Zellschädigungen entstehen große Mengen S-100B, die in den Extrazellulärraum und in die Blutbahn gelangen [26]. Im Bereich des zentralen Nervensystems werden Zellen vor allem durch traumatische, ischämische oder hämorrhagische Ereignisse geschädigt. Bekannt ist,

dass S-100B nach ischämischen Hirninfarkten sowohl zentral wie auch peripher ansteigt, in dem es über die defekte Bluthirnschranke von zentral nach peripher gelangt. Am wahrscheinlichsten steigt die Konzentration durch die Freisetzung aus verletzten Astrozyten [84]. Die Höhe des peripheren S-100B scheint mit der Schwere der zentral neuronalen Schädigung und dem Langzeitoutcome der Patienten zu korrelieren [27-29]. Der Konzentrationsanstieg bei neurodegenerativen, inflammatorischen und psychiatrischen Krankheiten lässt sich durch vermehrte Freisetzung oder durch Apoptose von Astrozyten erklären [84].

Unabhängig der zentralen Schädigungen kann S-100B peripher systemisch aus verletzten Nerven, Nervenscheiden, Adipozyten usw. freigesetzt werden [29, 30], wodurch sich der periphere S-100B Anstieg, z.B. bei Polytrauma Patienten, nicht mehr alleine auf zentrale Schädigungen zurückführen lässt.

S-100B wird bereits im Klinikalltag eingesetzt. Die periphere Konzentration dient in der neurologischen Diagnostik als prädiktiver und diagnostischer Marker für zentral neuronale Schädigungen [26]. Zusätzlich zu oben genannten Krankheiten ist S-100B mit anderen Erkrankungen des zentralen Nervensystems wie Alzheimer, Down-Syndrom, Epilepsie und amyotropher Lateralsklerose assoziiert. S-100B kann zusätzlich als Tumormarker eingesetzt werden [87, 91, 92]. Es ist ein hoch sensitiver, aber wenig spezifischer Marker in der medizinischen Diagnostik [92]. Interessant ist, ob es im Bereich der Extremitätenischämie als Marker für Zellschädigungen an Nerven und Geweben eingesetzt werden könnte.

Die Funktionen von S-100B sind vielfältig, möglich ist eine dosisabhängige Wirkungsweise.

Tierversuche zeigten, dass in niedrigen, nanomolaren Konzentrationen durch S-100B das nervale Zellwachstum und die Differenzierung stimuliert, sowie das Überleben von Neuronen im Hinterhorn des Rückenmarks und von Schwannschen Zellen verbessert wird [83, 84]. Intrazellulär scheint es in physiologischen Konzentrationen protektive Funktion zu haben [84]. Innerhalb der Zelle reguliert es Protein-Phosphorylierungen, die Zytoskelettdynamik, Enzymaktivitäten und verändert die Expression von Transkriptionsfaktoren [83]. Ein therapeutischer Einsatz zur Regeneration von zentralen und peripheren Nervenläsionen wäre also denkbar.

Die protektive Funktion des S-100B scheint nach vermehrter Freisetzung in den extrazellulären Raum durch Sekretion, Zellverletzung oder Apoptose verloren zu gehen. Die extrazelluläre Konzentration liegt meist in höheren mikromolaren Bereichen. Diese Konzentrationen zeigen toxische Effekte, vor allem über Induktion der Zellapoptose und eine erhöhte Freisetzung und Expression von proinflammatorischen Zytokinen, wie z.B. IL-6 [83, 84, 93]. So werden Entzündungsprozesse und neuronale Schädigungen gefördert und weitere Mikroglia und Astrozyten aktiviert, die vermehrt S-100B sezernieren [27]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von S-100B in der Maus zur Exazerbation von Gehirnschäden und Gliose nach ischämischen Hirninfarkten führte [27].

Es besteht die Möglichkeit, dass die Funktionen des S-100B über den RAGE (receptor for advanced glycation endproducts) Rezeptor vermittelt werden. Diese Annahme gilt für die inflammatorischen Effekte [83].

Therapeutisch könnte die Gabe von Hemmstoffen des S-100B oder die Blockierung des RAGE Rezeptors das geschädigte Areal vor oben genannten Effekten schützen [27].

Ob durch akute Ischämien periphere Nerven geschädigt werden ist nicht bekannt. Hinweise dafür ergibt eine Studie, die mittels quantitativ sensorischer Testung an Patienten mit moderater pAVK eine partielle Deafferenzierung für A β -, A δ - und C-Fasern bei Patienten mit reduzierter Wahrnehmung sowie eine pAVK-assoziierte periphere Neuropathie nachwies [25]. Zu diesem Zweck soll im Rahmen der vorliegenden Untersuchung das Protein S-100B bestimmt werden, welches in der Diagnostik von ischämischen und traumatischen Schädigungen des ZNS bereits mit Erfolg eingesetzt wird [92]. Ein Anstieg von S-100B könnte Hinweise auf eine periphere neuronale Schädigung durch akute Ischämien geben.

2.5. Interleukin-6

Die pAVK stellt eine Manifestationsform der Atherosklerose dar. Es ist wissenschaftlich erwiesen, dass sie mit systemischer Inflammation assoziiert ist [94]. Entzündungsprozesse und Entzündungsmarker haben progressive Effekte auf das Voranschreiten der Krankheit. Der Entzündungsgrad bei pAVK-Patienten korreliert mit dem klinischen Outcome [95, 96].

IL-6 wird im klinischen Alltag als Marker für die akute Entzündungsantwort eingesetzt und weist bei Erhöhung auf wahrscheinliche Plaqueinstabilitäten hin. Zusätzlich korreliert es mit atherosklerotischen Risikofaktoren [52, 97-100].

Es ist ein lösliches Polypeptid, das als einsträngiges Protein von 21-28 kD vorliegt [101]. Es wird in Fibroblasten, Endothelzellen, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, aktivierten T-Lymphozyten und vielen weiteren Zellen produziert [96, 101]. Die Leber synthetisiert IL-6, wodurch es die Produktion von Akute-Phase-Proteinen wie Antitrypsin,

Fibrinogen, C-reaktivem Protein, Komplementfaktor C3 und vielen weiteren Mediatoren anregt [95, 101].

Auch durch virale Infektionen, Lipopolysaccharide und viele andere Zytokine und Prozesse wird IL-6 aktiviert und exprimiert. Auch eine aktivierte Proteinkinase C scheint die Expression von IL-6 zu erhöhen [101].

IL-6 werden pro- und antiinflammatorische Effekte zugesprochen. Es hat regulierende Funktionen in der humoralen Immunantwort, der Hämatopoese von Stammzellen im Knochenmark und der Entstehung von Entzündungen [101]. Es bewirkt die B-Lymphozyten Differenzierung, die Produktion monoklonaler Antikörper und aktiviert T-Lymphozyten [101]. Die Freisetzung von adrenocorticotropem Hormon (ACTH) aus der Hypophyse kann durch IL-6 aktiviert werden [101]. Auch scheint es Fieber zu induzieren. Ihm werden ähnliche Effekte wie dem „nerve growth factor“ zugesprochen und es erhöht dessen Freisetzung [101]. Am Nerven stimuliert IL-6 neben der Immunantwort auch die Gewebereparatur [101].

IL-6 stellt einen der meist erforschten Entzündungsmarker der pAVK dar [96]. Bei pAVK-Patienten sind inflammatorische Marker, unter anderem IL-6, bereits in Ruhe erhöht [94, 95, 102]. Erklärbar ist dies durch inflammatorische Prozesse im Bereich der atherosklerotisch veränderten Gefäße [94]. Ein weiterer Anstieg von Entzündungsmarkern könnte unter zusätzlicher Belastung erwartet werden. Verschiedene Studien zeigten jedoch unterschiedliche Ergebnisse in der Veränderung der IL-6-Spiegel nach akuter Belastung. Andreozzi et al. konnten direkt nach akuter Laufbandbelastung bei Patienten mit moderater CI einen Anstieg von IL-6 zeigen. Die IL-6-Spiegel sanken nach einer 15 min. Ruhephase bei gesunden Probanden und Patienten mit moderater CI wieder ab, blieben aber bei Patienten mit schwerer CI konstant erhöht [102]. In

geringerem Ausmaß zeigte sich dieser Anstieg auch in gesunden Probanden. Es ist davon auszugehen, dass aufgrund vermehrter Endothel- und Gewebeschäden bei schwerer CI vermehrt Entzündungsmediatoren freigesetzt werden [102]. Auch Signorelli et al. konnten einen Anstieg von IL-6 nach akuter Laufbandbelastung in Patienten mit CI und gesunden Probanden zeigen, wobei der Anstieg bei Patienten mit CI ausgeprägter war [94]. Im Gegensatz dazu zeigten Fiotti et al. einen statistisch signifikanten Abfall von IL-6 direkt nach akuter Laufbandbelastung und nach 4 Stunden Ruhephase bei gesunden Probanden und Patienten mit moderater CI [95, 96].

3. Fragestellungen und Zielsetzung der Arbeit

Folgende Fragestellungen und Ziele zum akuten Ischämieschmerz bei Patienten im pAVK Stadium II sollen in dieser Arbeit untersucht werden:

Ziel:

Die Etablierung eines Modells zur Entstehung des akuten Ischämieschmerzes am Menschen.

Fragestellungen:

1. Verändern sich Adenosinspiegel während akuter Ischämie bei pAVK-Patienten im Fontaine Stadium II?
2. Korreliert ein eventueller Anstieg des Adenosinspiegels mit der Schmerzentstehung während akuter Ischämie?

Folgende Nebenfragestellungen sollen betrachtet werden:

1. Zeigen sich nach kurzzeitiger akuter Ischämie als Hinweis auf eine periphere Nervenschädigung erhöhte S-100B Werte und könnte S-100B somit als Marker für periphere Nervenläsionen dienen?
2. Lässt sich nach kurzzeitiger akuter Ischämie eine Inflammationsreaktion nachweisen?

4. Patienten und Methoden

4.1. Patienten

Für die Studie wurden elf Patienten (drei Frauen, acht Männer, Alter 65 ± 2 Jahre (MW \pm SF)) rekrutiert, die ambulant oder stationär im Gefäßzentrum des Klinikums der Universität München – Campus Innenstadt in Behandlung waren und unter einer Claudicatio intermittens litten. Die Diagnosestellung der CI erfolgt durch das Gefäßzentrum (Leitung Herr Prof. Dr. U. Hoffmann), es wurden alle relevanten angiologischen Parameter (Anamnese, allg. internistische Untersuchung inkl. Pulsstatus, ABI, segmentale Oszillographie, ggf. Bildgebung (Duplex, Angiographie)) dokumentiert. In einem von elf Patienten konnten aufgrund fehlerhafter Probenverarbeitung für Adenosin und Inosin keine validen Werte ermittelt werden.

Einschlusskriterien:

- Patienten mit Claudicatio intermittens (pAVK II nach Fontaine)
 - die eine einseitige Obstruktion im Bereich der iliaco-femoropoplitealen Achse aufweisen
 - die für eine Katheterintervention vorgesehen sind
- Einwilligungsfähigkeit
- Alter > 40 Jahre

Ausschlusskriterien:

- Schmerzen sonstiger Genese
- Diabetische PNP
- Beinvenenthrombose

Die Patienten erteilten ihr schriftliches Einverständnis mindestens 24 Stunden vor Studienbeginn. Dabei wurden die Patienten über Risiken und Nebenwirkungen, sowie das Ziel der Studie aufgeklärt. Die Patienten erhielten keine Aufwandsentschädigung. Eine Patientenversicherung wurde abgeschlossen. Der Studie wurde die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Ludwigs-Maximilians-Universität München, Marchioninstr. 15, 81377 München, bescheinigt.

4.2. Methoden

4.2.1. Versuchsablauf

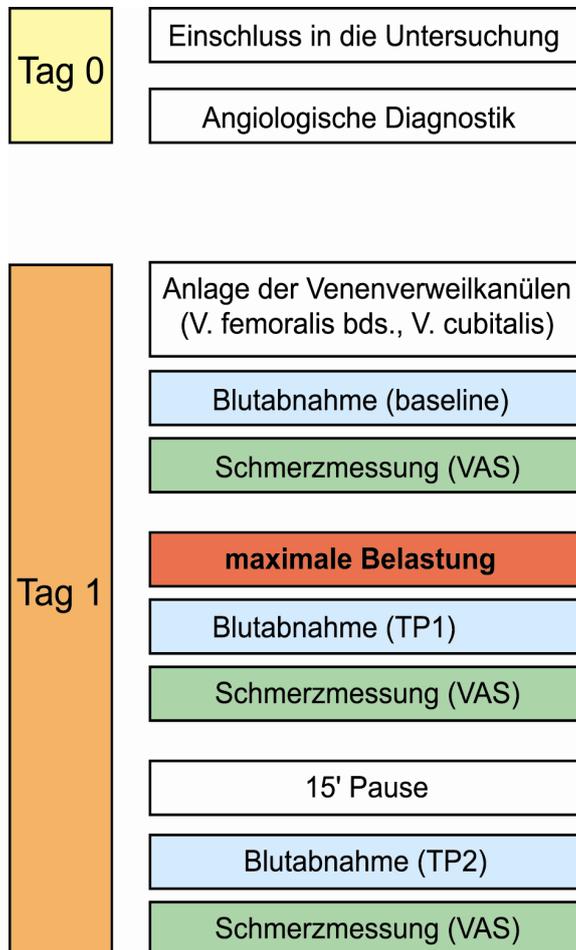


Abbildung 4.1: Versuchsablauf

Die Patienten wurden ambulant oder stationär aufgenommen. Vor Beginn des Versuchsablaufes musste eine mindestens einstündige liegende Ruhe eingehalten werden, um Veränderungen durch vorherige Belastungen auszuschließen. In die rechte und linke V. femoralis und in die V. cubitalis wurden unter sterilen Bedingungen Venenverweilkanülen eingebracht.

Die erste Blutabnahme für den Ausgangswert erfolgte am ruhenden Patienten an allen drei Venenverweilkanülen. Gleichzeitig erfolgte die Messung der Dopplerdrücke an der A. tibialis posterior rechts und links, der A. dorsalis pedis rechts und links, wie auch der Blutdruck am Arm.

Nach der Ausgangsuntersuchung wurden die Patienten auf dem Laufband (Fa. Woodway, Serie PPS 43^{MED}, Weil am Rhein, Deutschland) bei einer 12%igen Steigung und 3,2 km/h Gehgeschwindigkeit belastet. Gemessen wurden die Zeit und die Gehstrecke bis zum ersten Auftreten von Schmerzen, sowie die Zeit und die Gehstrecke bis zum Abbruch des Laufes.

Die Patienten wurden gebeten zu laufen, bis der Schmerz nicht mehr tolerierbar war. Direkt im Anschluss erfolgte die zweite Blutabnahme aus allen drei Venenverweilkanülen. In 5-minütigen Abständen wurden die Dopplerdrücke und der Blutdruck (s.o.) gemessen

Nach Erreichen der Ausgangsdopplerdrücke an den Beinen und des Blutdruckwertes am Arm erfolgte die dritte Blutabnahme (nach ca. 20 Minuten).

Die Patienten gaben ihre aktuellen Schmerzen vor, direkt nach Ende der Laufbandbelastung und nach Wiedererreichen der Ausgangswerte an. Der Schmerz wurde mittels Numerischer Rating Skala (NRS) von 0 bis 10 Punkten beurteilt, wobei die Angabe von 0 keinen Schmerzen entspricht, die Angabe von 10 die maximal vorstellbaren Schmerzen angibt.

Nach Beendigung der Untersuchung wurden die Venenverweilkanülen entfernt und der Patient zur Überwachung auf die Station zurückgeführt.

4.2.2. Blutabnahme und Blutgasanalyse

Die Blutabnahme erfolgte über Venenverweilkanülen in der rechten und linken V. femoralis und in der V. cubitalis der rechten oder linken Armbeuge. Die Blutabnahme aus den beiden V. femoralis ist notwendig um unterscheiden zu können, ob eventuelle Veränderungen der untersuchten Parameter durch die Belastung oder durch die Ischämie entstanden sind. Eine zeitnahe Blutentnahme nach Laufbandbelastung war aufgrund der sehr kurzen Halbwertszeit von Adenosin essentiell und wurde durch die Anlage von Venenverweilkanülen ermöglicht.

Die Blutgasanalyse erfolgte mit dem Blutgasanalysator ABL 700 (Brønshøj, Dänemark).

4.2.3. Adenosinbestimmung

Die Blutabnahme erfolgte mit einer 5 ml Spritze, die zu 2,5 ml mit Vollblut gefüllt wurde. Dieses wurde direkt im Anschluss an die Blutabnahme mit der zuvor aufgetauten und auf Eis gelagerten Stopplösung 1:1 (2,5 ml Vollblut und 2,5 ml Stopplösung) zusammengegeben und geschüttelt, um einer weiteren Entstehung oder einem Abbau von Adenosin entgegen zu wirken. Die Stopplösung wurde erstellt nach der von Ontyd et al. vorgeschrieben [103]

Zusammensetzung aus (mmol/l):

Dipyridamol	0,2
NaCl	154,0
KCl	5,6
NaHCO ₃	5,9
Glukose	5,6
CaCl ₂	2,15
Na ₂ HPO ₄	0,82
Na ₂ H ₂ PO ₄	0,17

Die Suspension wurde sofort bei 4°C mit 3000 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten zentrifugiert. Vom Überstand wurden 2 ml in ein Eppendorfgefäß abpipetiert und 100 µl Perchloressigsäure hinzugegeben. Die Suspension wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Die weitere Bestimmung der Adenosinkonzentration und seiner Abbauprodukte Inosin, Xanthin und Hypoxanthin erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (dual column switching high-affinity performance/reversed-phase High-performance liquid chromatography (HPLC)) im Labor der Klinik für Anästhesiologie (Frau PD. Dr. Dr. S. Kreth). [104-106]. HPLC ist eine Methode der Flüssigkeits-Chromatographie, mit der man Substanzen trennen und quantifizieren kann. Die Trennung beruht dabei auf der unterschiedlichen Verteilung zwischen zwei Phasen, einer mobilen und einer stationären Phase. Die Trennung läuft unter hohem Druck ab. Als stationäre Phase wurde in Säule I ein mit Nitrophenylboronic Säure beschichtetes Silicagel verwendet. Unter Zugabe von Puffer (0,1 M Ammoniumphosphat, pH 8,3) erfolgte die Kalibrierung auf Ventilposition „Load“ für 2 Minuten. Anschließend wurde 20-100 µl der o.g. Suspension aus Stopplösung und Vollblut hinzugegeben. Die Säule I wurde daraufhin erneut für 2 Minuten mit Puffer gewaschen. Während dieser Zeit wurden die Ribonukleoside selektiv in der HPLC-Säule getrennt. Die Muster-Matrix wurde daraufhin entfernt. Nach dem Trennungsschritt wurde die Ventilposition auf „Inject“ gestellt. Damit werden die Säule I und II in Serie geschaltet. Die Gruppen-spezifisch gebundenen Ribonukleoside der Säule I wurden mittels saurem Lösungspuffer (Ammonium formate 0,15 M, pH 3,5) in einer Flüssigkeitsmenge von 700 µl gelöst und auf einer reversed-phase C₁₈ Säule konzentriert. Mit demselben Lösungspuffer erfolgte auch die

analytische Trennung. Das Ventil wurde dann zurück auf „Load“ gestellt. Das Herauslösen der Substanzen in der Säule II erfolgte mittels ansteigender Menge an organischem Modifikator in der mobilen Phase [105].

4.2.4. Bestimmung von S-100B

Die im Zentrallabor gemessenen S-100B-Serumspiegel wurden mit Elecsys® S-100B Immunoassay (Roche Diagnostics, Penzberg Deutschland) bestimmt. Diese schnelle Untersuchungsmethode kann die β -Kette des S100 Proteins selektiv erkennen und somit S-100A (S100 $\alpha\beta$) und S-100B (S100 $\beta\beta$) getrennt bestimmen. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 0,005–0,01 ng/mL [15]. Das Elecsys® S-100B Immunoassay beruht auf einem Sandwichprinzip. Die Laufzeit des Assays betrug 18 Minuten bei 37°C. Im ersten Inkubationsschritt kommt es zu einem Sandwich-Komplex der Antigen Probe (20 μ L) mit einem biotinyliertem monoklonalen (Maus) S100-spezifischen Antikörper und einem mit einem Rutheniumkomplex gekennzeichneten monoklonalen (Maus) S100-spezifischen Antikörper. In einem zweiten Schritt wurden Streptavidin-beschichtete Mikropartikel hinzugegeben und inkubiert. Dabei bildeten die Antikörper mit den Antigenen der Probe einen Sandwich-Komplex via Interaktion zwischen Biotin und Streptavidin. Das Reaktionsgemisch wurde dann in die Messzelle überführt.

Die elektrochemilumineszente Messzelle des Assays hat eine Flusskammer die drei Hauptaufgaben erfüllt:

1. Die erste Funktion war die Separation der gebundenen und nicht gebundenen Substanzen. Die mit Immunkomplexen beladenen Streptavidin-gecoateten Mikropartikel wurden mit Hilfe eines Magneten an die Oberfläche der Elektrode gezogen

und verbleiben hier temporär. Nicht gebundene Komponenten und restliches Probenmaterial wurde dann mit ProCell Systempuffer von der Messzelle entfernt.

2. Die zweite Aufgabe war die Generation der Elektrochemilumineszenz. Die Applikation einer definierten Ladungsmenge induzierte elektrochemilumineszente Reaktionen und resultierte in Lichtemissionen, die direkt mit Hilfe eines Photomultiplizierers gemessen werden. Der Photomultiplier maß das Signal in **Relative Light Units (RLU)**.
3. Am Ende der elektrochemilumineszenten Reaktion wurden die Mikropartikel mit der Messzellreinigungslösung (CleanCell) entfernt. Die Messzelle konnte dann für eine erneute Messung genutzt werden [107].

4.2.5. Bestimmung von IL-6 und Laktat

Die Bestimmung von IL-6 und Laktat erfolgte im Zentrallabor des Klinikums der Universität München - Campus Innenstadt.

Die Bestimmung von IL-6 erfolgte mit COBAS® IL6 Elecsys 2010 (GNR 511, 512) (Roche Diagnostics Mannheim, Deutschland). Die Bestimmung beruht auf dem Sandwichprinzip. Die Gesamtdauer des Tests betrug 18 Minuten. Wie bereits für S100B beschrieben erfolgte in einem ersten Schritt die Inkubation von 30 µL Probe mit biotinylierten monoklonalen IL-6-spezifischen Antikörpern. In einem zweiten Schritt werden monoklonale, mit Ruthenium-Komplexen markierte IL-6-spezifische Antikörper sowie Streptavidin-beschichtete Mikropartikel hinzugegeben und inkubiert. Die weiteren Schritte erfolgen wie für S100B beschrieben (4.2.4). Die Ergebnisse wurden anhand einer Kalibrationskurve ermittelt und durch eine 2-Punkt-Kalibration und eine

über den Reagenzbarcode mitgelieferte Masterkurve gerätespezifisch generiert. Gemessen wurde Serum, entnommen mit Standard-Probenentnahmeröhrchen [108].

Die Bestimmung von Laktat erfolgte mit COBAS® INTEGRA 800 Test, Lactate Gen.2 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland). Dabei handelt es sich um einen enzymatischen Farbstest, bei dem das spezifische Enzym Lactatoxidase zu Pyruvat oxidierte. Das dort gebildete Wasserstoffperoxid wurde mit Peroxidase zu einem Farbstoff umgesetzt. Die Intensität der gebildeten Farbe ist direkt proportional zur L-Lactatkonzentration. Sie wurde durch Messung der Extinktionszunahme bei 552 nm bestimmt. Untersucht wurde Plasma (Natrium-Fluorid/Kalium-Oxalat- und Natrium-Fluorid/Natrium-Heparinplasma), welches innerhalb von 15 Minuten nach Probenentnahme zentrifugiert wurde [109].

4.2.6. Blutdruckmessung am Arm und systolische Dopplerdruckmessung zur Berechnung des Ankle-Brachial Index (ABI)

Die Blutdruckmessung am Arm erfolgte indirekt nach Riva Rocci (RR) mittels Auskultation der Korotkow-Geräusche. Die Blutdruckmessung erfolgte im Liegen mit dem Arm auf Herzhöhe und leicht gebeugtem Ellbogen. Gemessen wurden die systolischen und diastolischen Werte angegeben in mmHg.

Die Messung des ABI erfolgt durch Anlage der Blutdruckmanschette direkt über dem Knöchel und einer Dopplermessung der systolischen Drücke der A. dorsalis pedis und der A. tibialis posterior der rechten und linken distalen Extremität mittels dem Doppler logidop 6 (Fa. Elcat, Wolfratshausen, Deutschland). Die Werte sind angegeben in mmHg.

4.3. Statistik

4.3.1. Computerprogramme, Datenbanken und Statistikberechnung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel 2011 (Microsoft Corporation, USA) und SPSS 14.0 (SPSS Inc., USA).

Die Literatursuche geschah über die MEDLINE-Datenbank

(*National Library of Medicine*) unter der Adresse <http://www.ncbi.nlm.gov/PubMed/>. Die Erstellung des Literaturverzeichnisses erfolgte mit dem Endnote X.4 (Thompson Reuters, USA).

4.3.2. Statistik

Die Signifikanzen zwischen den Messpunkten und Zeitpunkten für die BGA, Adenosin und seiner Abbauprodukte, S-100B, IL-6 sowie Laktat wurden mittels Mixed Effect Modellen ausgewertet. P-Werte von $\leq 0,05$ waren statistisch signifikant. Die Hämodynamik- und Laufbandergebnisse sind als Mittelwerte (MF) \pm Standardfehler (SF) angegeben.

5. Ergebnisse

5.1. Basischarakteristika

Die Basischarakteristika beziehen sich auf den Zustand der Patienten bei Einschluss in die Studie. In der folgenden Tabelle sind die wichtigsten Patientendaten, die Risikofaktoren der pAVK und das untersuchte pAVK Stadium des Indexbeines dargestellt.

Tabelle 5.1 Basischarakteristika der Patienten

Basischarakteristika	Patienten (MW \pm SF)
Anzahl (n)	11
Alter (Jahre)	65 \pm 2
Geschlecht m/w	8/3
Diabetes mellitus ja/nein	2/11
Hypertonus ja/nein	8/3
Nikotinabusus ja/nein	6/5
Hyperlipidämie ja/nein	6/5
pAVK Stadium IIa/IIb	2/9

5.2. Klinische Ergebnisse

5.2.1. Laufbandanalyse

Um eine akute Ischämie in der betroffenen Extremität zu induzieren und diese mit dem Schmerzniveau zu korrelieren gingen die Patienten bis zu ihrer maximalen Belastbarkeit auf einem Laufband. Bei subjektiv angegebenen, nicht mehr aushaltbaren Schmerzen in der betroffenen Extremität wurde das Gehen abgebrochen. Gemessen wurde die Gehstrecke bis zum Schmerzauftritt (Meter), die Gesamtgehstrecke (Meter), und die Zeit bis zum Schmerzauftritt und zum Abbruch des Laufes (Sekunden). Dies zeigte die folgenden Ergebnisse:

Tabelle 5.2 Laufbandparameter

Laufbandparameter (MW ± SF)	
Gehstrecke bis zum Schmerzauftritt (Meter)	74 ± 11
Gesamtgehstrecke (Meter)	263 ± 43
Zeit bis zum Schmerzauftritt (Sekunden)	92 ± 13
Zeit bis zum Abbruch des Laufes (Sekunden)	301 ± 50

5.2.2. Schmerzen

Die Patienten gaben ihre aktuellen Schmerzen anhand der NRS von 0 bis 10 an. Zum Zeitpunkt 0 waren die angegebenen Schmerzen der Patienten 0 (MW). Während der Ischämie (Zeitpunkt 1) waren die Schmerzen 9,0 ± 0,3 (MW ± SF) und nach Normalisierung der Hämodynamik (Zeitpunkt 2) 0,1 ± 0,1 (MW ± SF).

5.2.3. Hämodynamik

Zur Beurteilung der Hämodynamik wurden mittels Dopplersonographie die Knöcheldrücke der A. tibialis posterior und der A. dorsalis pedis gemessen. Nach Riva Rocci wurde der systolische und diastolische Blutdruck am Arm gemessen. Daraus lies sich der ABI berechnen. Die Werte sind der unten folgenden Tabelle zu entnehmen (Tabelle 5.3).

Tabelle 5.3 Hämodynamik

Hämodynamik (MW ± SF)			
Abnahmestelle	Zeitpunkt 0	Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 2
Ankle-brachial-Index			
Indexbein	0,74 ± 0,09	0,13 ± 0,05	0,78 ± 0,05
Kontrollbein	1,08 ± 0,03	0,84 ± 0,05	1,00 ± 0,04
Dopplersonographie (mmHg)			
A. tibialis posterior			
Indexbein	101 ± 10	26 ± 9	101 ± 8
Kontrollbein	148 ± 7	133 ± 10	129 ± 4
Dopplersonographie (mmHg)			
A. dorsalis pedis			
Indexbein	80 ± 15	4 ± 2	65 ± 15
Kontrollbein	112 ± 18	97 ± 22	102 ± 17
Blutdruck (mmHg) Arm			
Systolisch	142 ± 5/	165 ± 5/	135 ± 5/
Diastolisch	79 ± 2	78 ± 3	77 ± 3

Der ABI des Indexbeines fiel von physiologischen Werten vor der Belastung auf pathologische Werte nach der Belastung ab und erholte sich nach der Ruhephase auf die Ausgangswerte. Am Kontrollbein fiel der ABI vom Ausgangswert vor der Belastung im Vergleich zu nach der maximalen Belastung nur minimal ab und blieb im physiologischen Bereich. Die minimale Absenkung des ABI am Kontrollbein direkt nach Belastung erholte sich nach der Ruhephase. Die Unterschiede sind für Zeitpunkte, Messpunkte und die Interaktion aus Zeit- und Messpunkten signifikant ($p \leq 0,0001$). Eine Ischämie im Indexbein konnte somit nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.3 und in Abbildung 5.1 dargestellt.

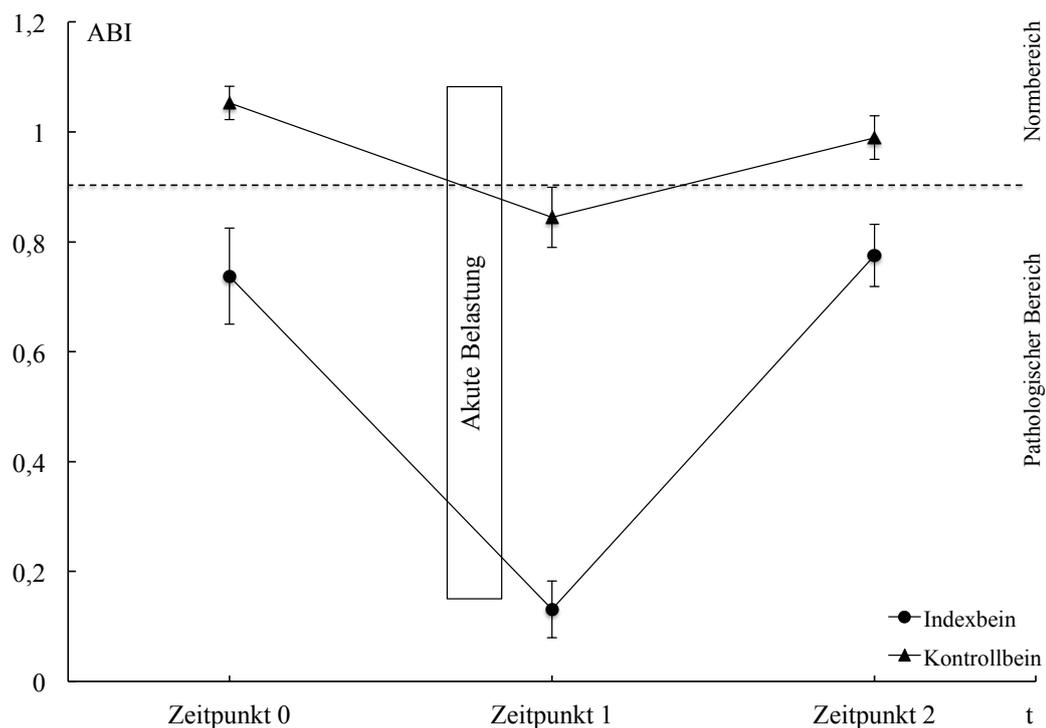


Abbildung 5.1 ABI, $p \leq 0,0001$ für Zeitpunkte, Messpunkte und die Interaktion aus Zeit- und Messpunkten

Bereits in Ruhe zeigten die gemessenen Drücke der A. tibialis posterior und der A. dorsalis pedis am Indexbein niedrigere Werte als am Kontrollbein und fielen nach maximaler Belastung stark ab. Die Werte näherten sich nach der Ruhephase den Ausgangswerten an. Im Gegensatz dazu war der Abfall der gemessenen Drücke direkt nach maximaler Belastung am Kontrollbein deutlich geringer als am Indexbein, wobei sich auch hier die Werte nach der Ruhephase ihren Ausgangswerten annäherten. Eine Ischämie im Indexbein konnte somit, wie bereits mit dem ABI, nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 5.3 dargestellt.

5.2.4. Blutgasanalyse

Zur Überprüfung, ob sich durch die Belastung im Indexbein ischämische Verhältnisse entwickeln, wurde an den jeweiligen Messzeitpunkten eine Blutgasanalyse durchgeführt. In den folgenden untersuchten Parametern konnten deutliche Unterschiede zwischen den Messzeitpunkten gezeigt werden.

Der PO_2 (mmHg) sank während maximaler Belastung am Indexbein stark ab und erreichte nach der Ruhephase nahezu seinen Ausgangswert. Im Unterschied dazu zeigte sich am Kontrollbein ein nur minimaler Abfall des PO_2 während maximaler Ischämie, welcher nach der Ruhephase nahezu seinen Ausgangswert erreichte. Am Arm stieg der PO_2 an und erreichte nach der Ruhephase nahezu seinen Ausgangswert. Die physiologischen Verhältnisse vor der maximalen Belastung konnten somit nach der Belastung an allen Messpunkten wiederhergestellt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.4, Tabelle 5.5 und Abbildung 5.2 illustriert.

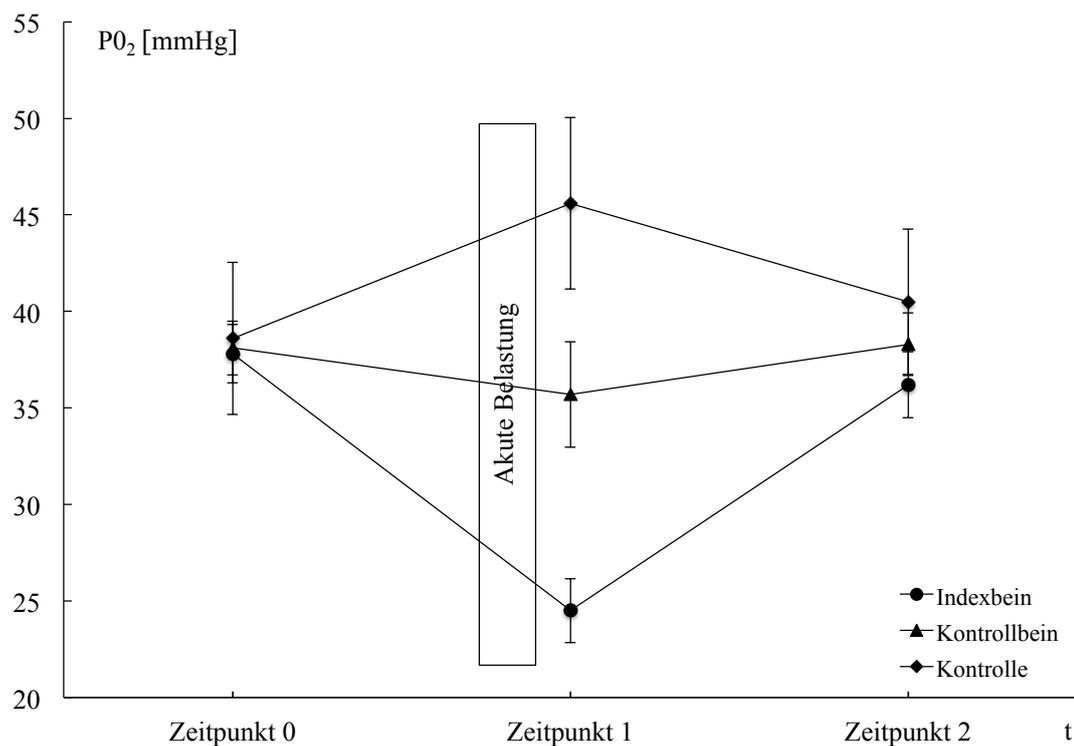


Abbildung 5.2 PO_2 , $p = 0,2665$ für die Zeitpunkte, $p = 0,0003$ für die Messpunkte, $p = 0,0021$ für die Interaktion aus Mess- und Zeitpunkt

Der PCO_2 zeigte am Index- und Kontrollbein während maximaler Belastung einen Anstieg und erreichte nach der Ruhephase nahezu seine Ausgangswerte. Der stärkste Anstieg wurde am Indexbein gefunden. Am Arm zeigte sich ein minimaler Abfall. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.4, Tabelle 5.5 und Abbildung 5.3 dargestellt.

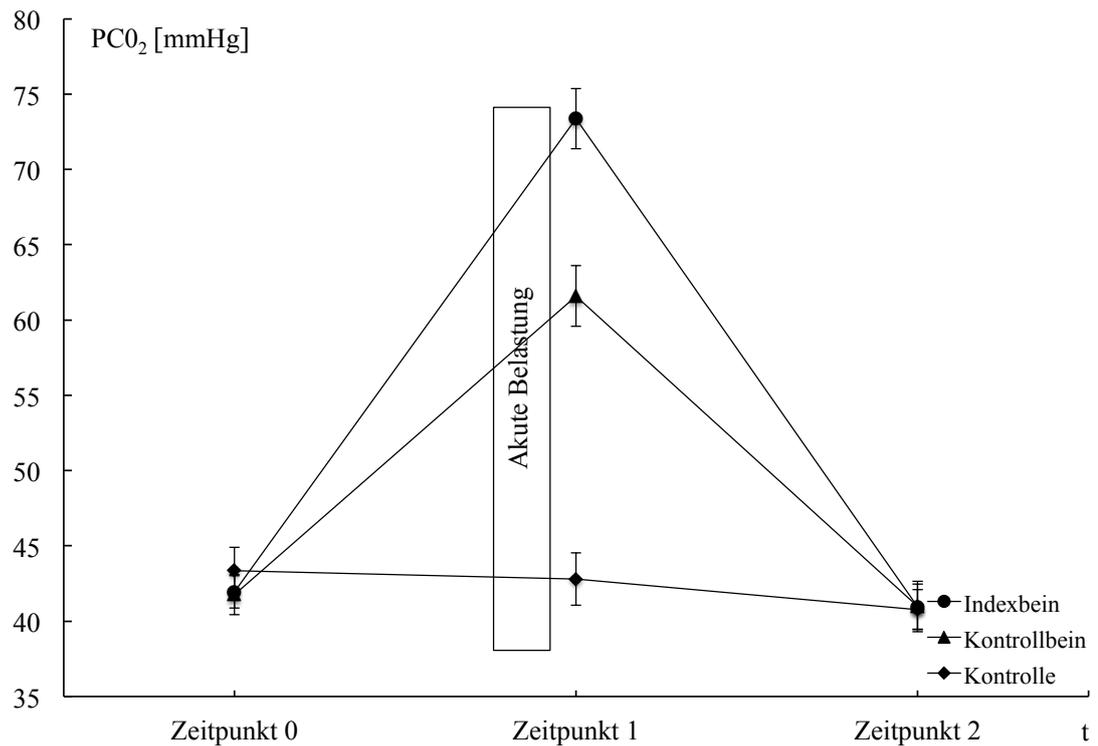


Abbildung 5.3 PCO_2 , $p < 0,0001$ für Zeitpunkte, Messpunkte und die Interaktion aus Zeit- und Messpunkten

Der pH sank nach maximaler Belastung an allen drei Abnahmeorten. Der ausgeprägteste Abfall zeigte sich am Indexbein. Nach der Ruhephase wurden an allen drei Abnahmepunkten nahezu die Ausgangswerte erreicht. Die Ergebnisse sind illustriert in Tabelle 5.4, Tabelle 5.5 und in Abbildung 5.4.

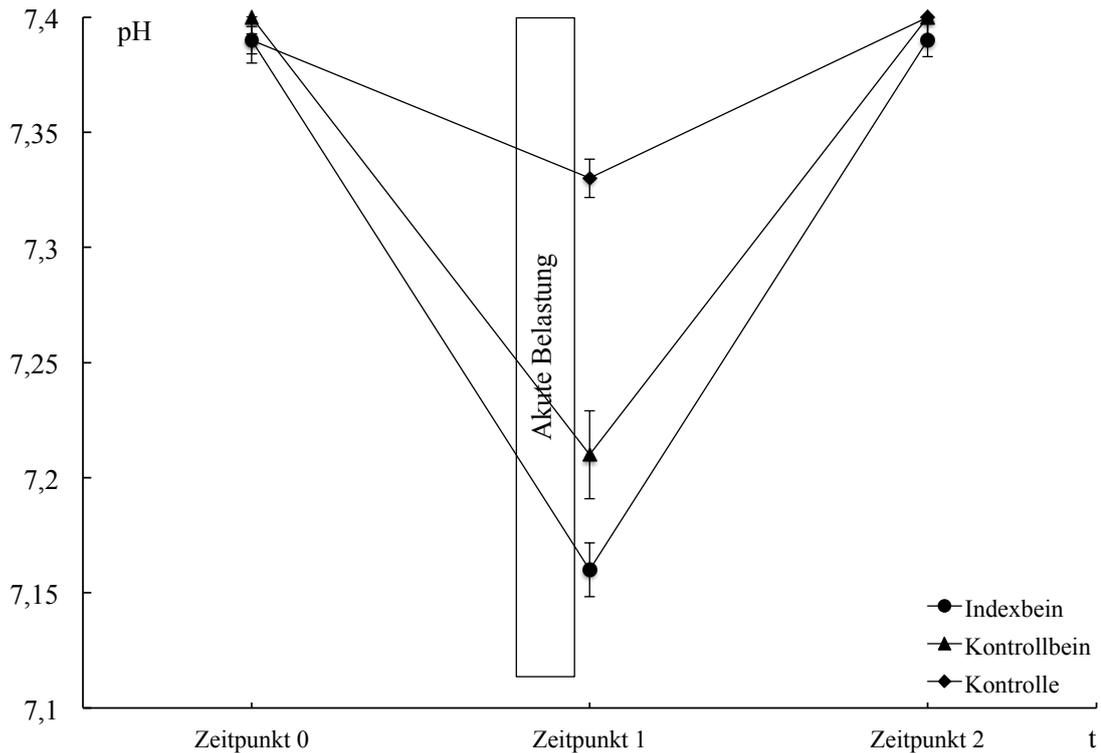


Abbildung 5.4 pH, $p < 0,0001$ für Zeitpunkte, Messpunkte und die Interaktion aus Zeit- und Messpunkten

Passend dazu zeigten sich ein Abfall der Sauerstoffsättigung (%) am Index- und Kontrollbein nach maximaler Belastung, die nach der Ruhephase ebenfalls nahezu die vorherigen Ausgangswerte erreichte. Der stärkste Abfall wurde am Indexbein gefunden. In der Kontrolle zeigte sich ein kurz nach Belastung auftretender minimaler Anstieg der Sauerstoffsättigung (%). Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.4, Tabelle 5.5 und Abbildung 5.5 dargestellt.

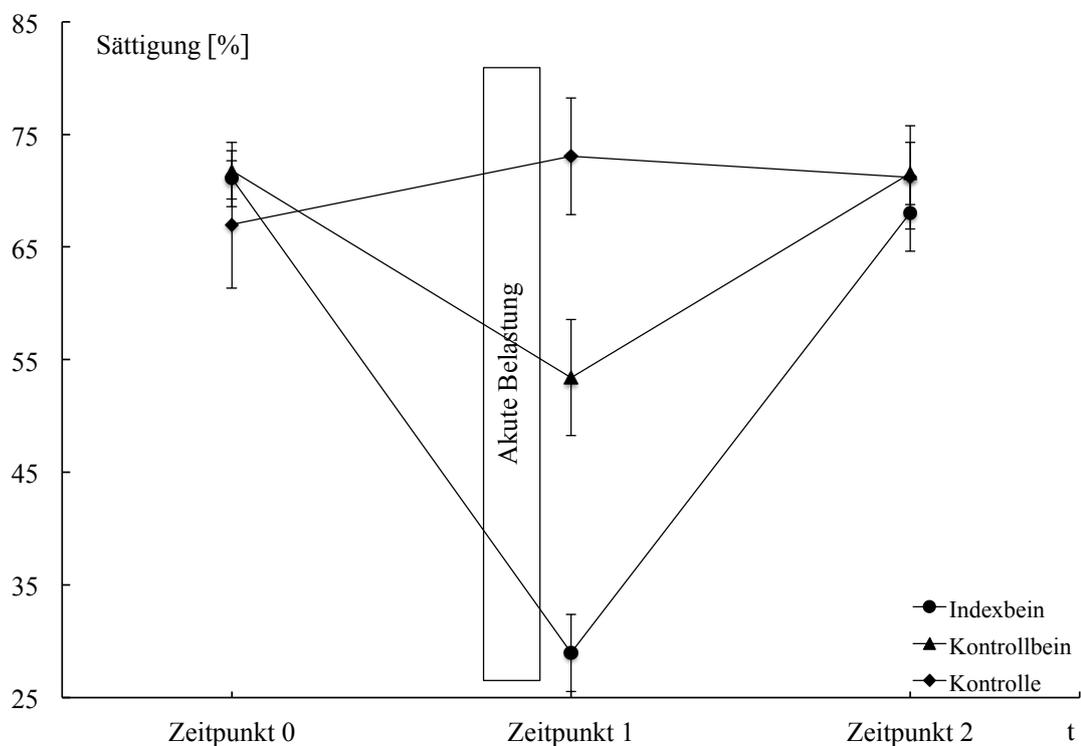


Abbildung 5.5 Sättigung, $p < 0,0001$ für Zeitpunkte, Messpunkte und die Interaktion aus Zeit- und Messpunkten

Der Base Excess sank an allen Abnahmepunkten nach maximaler Belastung ab und erreichte nach der Ruhephase nahezu seine Ausgangswerte. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.4 und Abbildung 5.6 dargestellt.

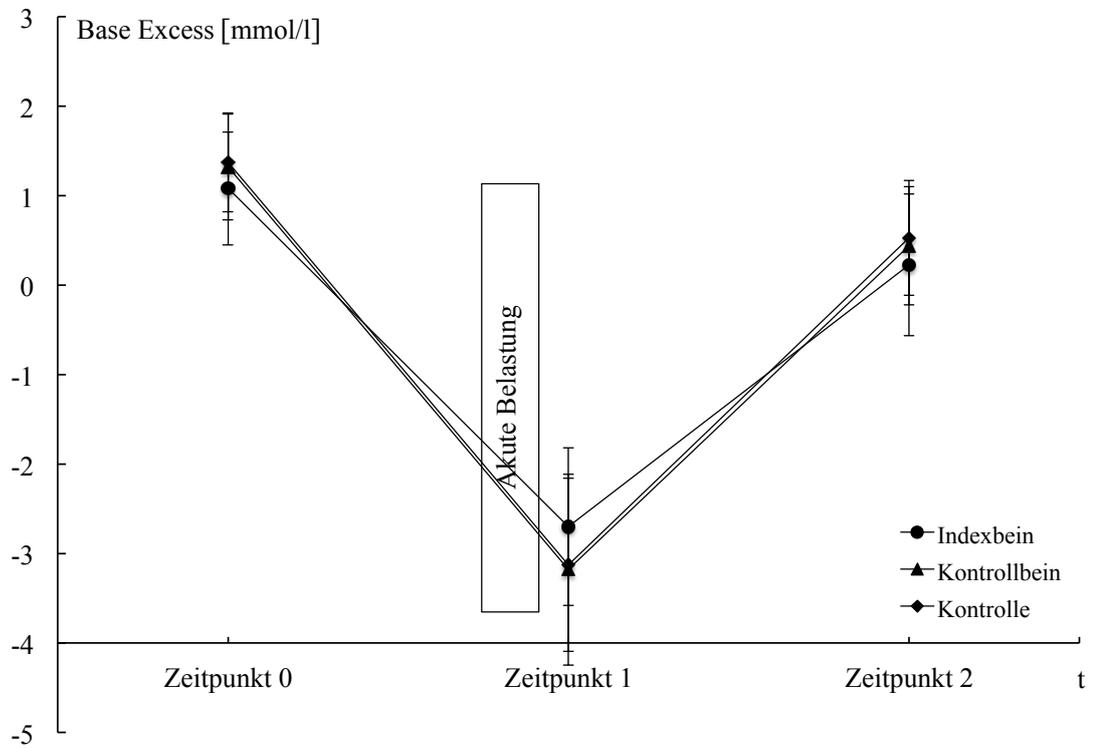


Abbildung 5.6 Base Excess, $p < 0,0001$ für die Zeitpunkte, $p = 0,94$ für die Messpunkte und $0,85$ für die Interaktion aus Zeit- und Messpunkten

Das HCO_3^- (mmol/l) sank an allen Abnahmepunkten nach maximaler Belastung ab und erreichte nach der Ruhephase nahezu seine Ausgangswerte. Der stärkste Abfall wurde am Indexbein gefunden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.4, Tabelle 5.5 und Abbildung 5.7 illustriert.

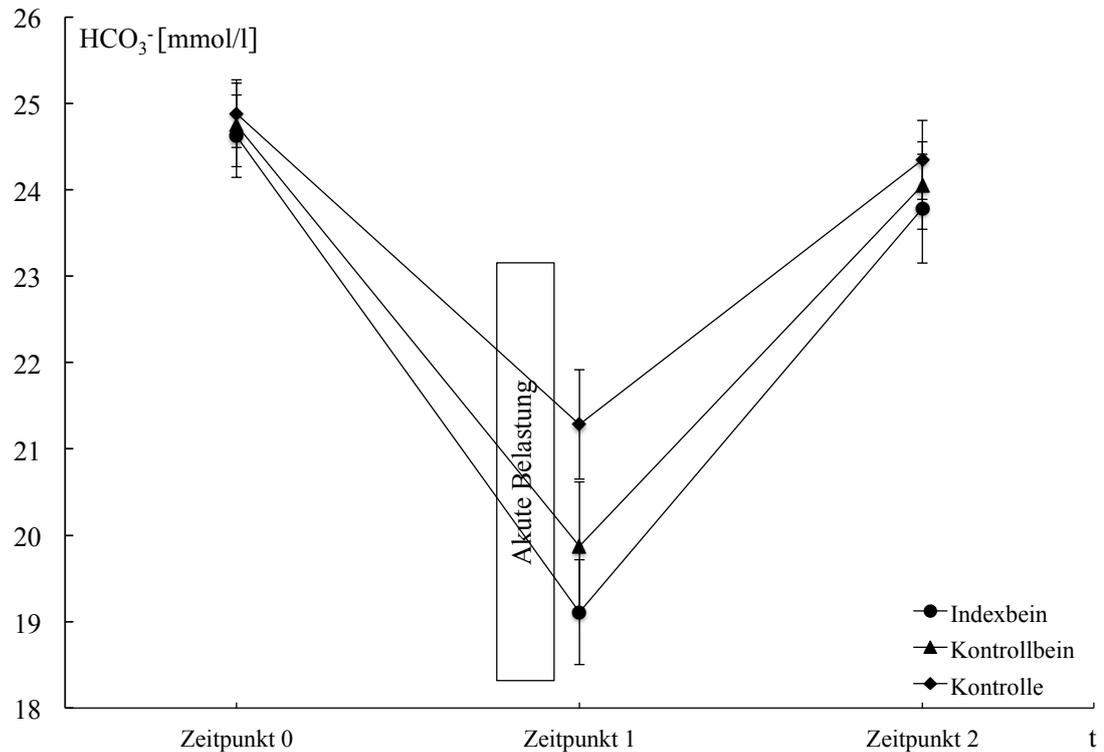


Abbildung 5.7 HCO_3^- , $p < 0,0001$ für die Zeitpunkte, $p = 0,0029$ für die Messpunkte und $0,0751$ für die Interaktion aus Zeit- und Messpunkten

Die folgenden Tabellen zeigen die Ergebnisse der Blutgasanalyse:

Tabelle 5.4 Blutgasanalyse Angaben in MW ± SF

Blutgasanalyse (MW ± SF)			
Abnahmeort	Zeitpunkt 0	Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 2
PO₂ [mmHg]			
Indexbein	37,8 ± 1,5	24,5 ± 1,7	36,2 ± 1,7
Kontrollbein	38,1 ± 1,5	35,7 ± 2,9	38,3 ± 1,7
Kontrolle	38,6 ± 3,9	45,6 ± 4,4	40,5 ± 3,8
PCO₂ [mmHg]			
Indexbein	42,0 ± 1,1	73,4 ± 2,0	41,0 ± 1,5
Kontrollbein	41,8 ± 1,4	61,6 ± 2,1	41,0 ± 1,8
Kontrolle	43,3 ± 1,6	42,8 ± 1,7	40,8 ± 1,3
pH			
Indexbein	7,39 ± 0,01	7,16 ± 0,01	7,39 ± 0,01
Kontrollbein	7,40 ± 0,01	7,21 ± 0,02	7,40 ± 0,01
Kontrolle	7,39 ± 0,01	7,33 ± 0,01	7,40 ± 0,01
Sättigung [%]			
Indexbein	71 ± 2,5	29 ± 3,4	68 ± 3,4
Kontrollbein	72 ± 2,6	53 ± 5,4	72 ± 2,9
Kontrolle	67 ± 5,6	73 ± 5,2	71 ± 4,6
Base Excess [mmol/l]			
Indexbein	1,1 ± 0,6	-2,7 ± 0,9	0,2 ± 0,8
Kontrollbein	1,3 ± 0,6	-3,2 ± 1,1	0,4 ± 0,7
Kontrolle	1,4 ± 0,6	-3,1 ± 1,0	0,5 ± 0,6
HCO₃⁻ [mmol/l]			
Indexbein	24,6 ± 0,5	19,1 ± 0,6	23,8 ± 0,6
Kontrollbein	24,8 ± 0,5	19,9 ± 0,8	24,1 ± 0,5
Kontrolle	24,9 ± 0,4	21,3 ± 0,6	24,3 ± 0,5

Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der p-Wert Analyse:

Tabelle 5.5 Statistische Analyse: p-Werte der Blutgasanalyse

Statistische Analyse: p-Werte der Blutgasanalyse			
	Zeit	Ort	Interaktion aus Zeit und Ort
PO ₂ [mmHg]	0,2665	0,0003	0,0021
PCO ₂ [mmHg]	<0,0001	<0,0001	<0,0001
pH	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Sättigung [%]	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Base Excess [mmol/l]	<0,0001	0,94	0,85
HCO ₃ ⁻ [mmol/l]	<0,0001	0,0029	0,0751

Die Ergebnisse der statistischen Analyse der Blutgase ergaben signifikante Änderungen im Vergleich der Zeitpunkte des PCO₂, des pH, der Sättigung, des Base Excess und des HCO₃⁻. Im Vergleich der Messpunkte ergaben sich signifikante Änderungen des PO₂, des PCO₂, des pH, der Sättigung und des HCO₃⁻. Auch in der Interaktion aus Mess- und Zeitpunkten fanden sich signifikante Änderungen des PO₂, des PCO₂, des pH und der Sättigung.

5.3. Laborexperimentelle Ergebnisse

5.3.1. Adenosin und Inosin

Die Ergebnisse der HPLC Messung für Adenosin ergaben am Indexbein einen Abfall der Werte vor und nach maximaler Belastung bis hin zur Ruhephase. Am Kontrollbein zeigte sich ein Abfall des Wertes nach maximaler Belastung. Nach der Ruhephase wurde der Ausgangswert nahezu erreicht. Die Kontrolle zeigte einen Anstieg der Werte nach maximaler Belastung bis hin zur Ruhephase. Die Unterschiede zeigten sich für Zeit-, Messpunkt und Interaktion aus Zeit- und Messpunkt nicht signifikant. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 5.6, Tabelle 5.7 und der Abbildung 5.8 illustriert.

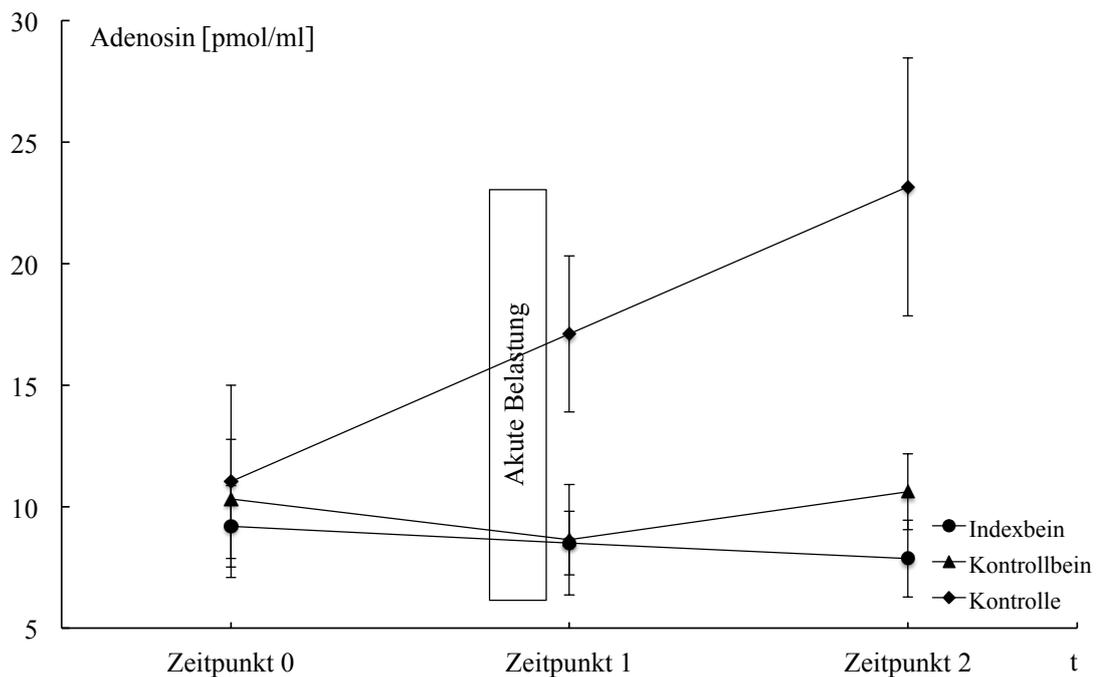


Abbildung 5.8 Adenosin, $p = 0,2430$ für die Zeitpunkte, $p = 0,6063$ für die Messpunkte und $0,0939$ für die Interaktion aus Zeit- und Messpunkten

Die Ergebnisse der HPLC Messung für Inosin ergaben am Indexbein einen Anstieg der Werte nach maximaler Belastung, die nach der Ruhephase wieder abfielen. Am Kontrollbein stiegen die Werte nach maximaler Belastung bis hin zum Zeitpunkt nach der Ruhephase an. Die Kontrolle zeigte einen Anstieg der Werte nach maximaler Belastung, die nach der Ruhephase stark abfielen. Die Unterschiede zeigten sich für die Zeitpunkte, nicht jedoch für den Ort und die Interaktion aus Zeit und Ort signifikant. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.6, Tabelle 5.7 und Abbildung 5.9 dargestellt.

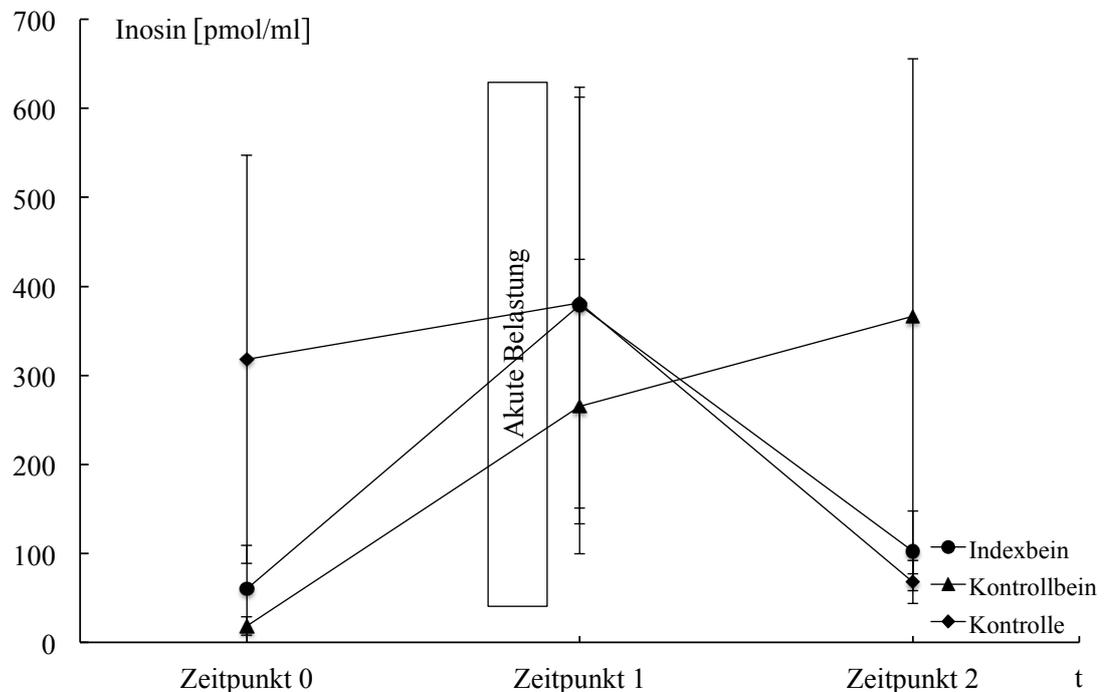


Abbildung 5.9 Inosin, $p = 0,0114$ für die Zeitpunkte, $p = 0,1637$ für die Messpunkte und $0,8857$ für die Interaktion aus Zeit- und Messpunkten

Tabelle 5.6 Adenosin und Inosin Messung

Adenosin und Inosin Messung (MW±SF)			
Abnahmestelle	Zeitpunkt 0	Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 2
Adenosin [pmol/ml]			
Indexbein	9,18 ± 1,8	8,50 ± 1,4	7,86 ± 1,7
Kontrollbein	10,31 ± 2,6	8,63 ± 2,4	10,60 ± 1,6
Kontrolle	11,03 ± 4,1	17,10 ± 3,4	23,15 ± 5,6
Inosin [pmol/ml]			
Indexbein	60,19 ± 51,5	378,53 ± 257,4	102,69 ± 46,9
Kontrollbein	18,45 ± 10,9	265,09 ± 173,6	366,47 ± 320,0
Kontrolle	318,03 ± 240,4	381,65 ± 242,0	67,78 ± 25,5

Tabelle 5.7 Statistische Analyse: p-Werte der Adenosin und Inosin Messung

Statistische Analyse: p-Werte der Adenosin und Inosin Messung			
	Zeit	Ort	Interaktion aus Zeit und Ort
Adenosin [pmol/ml]	0,2430	0,6063	0,0939
Inosin [pmol/ml]	0,0114	0,1637	0,8857

In der statistischen Analyse der Adenosin- und Inosin-Messung ergaben sich keine Signifikanzen zwischen Zeit- und Messpunkten, sowie der Interaktion aus Zeit- und Messpunkt. Lediglich die Änderung der gemessenen Inosin-Werte zwischen den Zeitpunkten war signifikant.

Die Ergebnisse der HPLC Messung zeigten insbesondere für Inosin eine große Streubreite. Die Individualverläufe der Adenosin- und Inosinmessung sind daher noch einmal gesondert in Tabelle 5.8 und Tabelle 5.9, sowie in Abbildung 5.10 und Abbildung 5.11 dargestellt. Aufgrund fehlerhafter Probenverarbeitung konnten für Patient 8 keine validen Werte für Adenosin und Inosin ermittelt werden.

Tabelle 5.8 Adenosin

Adenosin Messung [pmol/ml]			
Abnahmestelle	Zeitpunkt 0	Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 2
<i><u>Indexbein</u></i>			
Patient 1	9,673	9,451	9,548
Patient 2	14,771	11,232	11,554
Patient 3	9,956	9,528	11,867
Patient 4	6,56	9,493	5,927
Patient 5	11,287	10,231	10,183
Patient 6	20,072	18,354	18,379
Patient 7	5,296	5,069	1,923
Patient 9	4,209	3,775	3,142
Patient 10	5,704	6,41	4,86
Patient 11	3,475	1,114	15,492
<i><u>Kontrollbein</u></i>			
Patient 1	12,233	10,048	8,655
Patient 2	22,037	9,389	14,008
Patient 3	11,294	10,083	11,402
Patient 4	8,156	6,174	6,43
Patient 5	11,911	9,821	8,697
Patient 6	26,195	27,119	20,502
Patient 7	1,566	1,396	10,787
Patient 9	4,07	1,583	3,696
Patient 10	4,538	6,972	6,388
Patient 11	1,883	4,059	1,125
<i><u>Kontrolle</u></i>			
Patient 1	11,223	29,798	14,721
Patient 2	8,809	23,265	54,417
Patient 3	11,814	12,981	24,738
Patient 4	5,1	9,876	17,841
Patient 5	46,521	23,827	25,922
Patient 6	0	14,928	12,979
Patient 7	6,284	2,196	7,323
Patient 9	4,75	35,635	52,938
Patient 10	12,379	11,687	18,368
Patient 11	3,433	6,809	2,291

Tabelle 5.9 Inosin

Inosin Messung [pmol/ml]			
Abnahmestelle	Zeitpunkt 0	Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 2
<i><u>Indexbein</u></i>			
Patient 1	17,177	33,763	47,782
Patient 2	8,824	112,623	2403,768
Patient 3	2,911	11,819	29,732
Patient 4	9,151	523,912	657,721
Patient 5	1,089	11,801	10,857
Patient 6	5,629	36,879	47,43
Patient 7	3,583	222,696	50,647
Patient 9	6,829	2583,876	427,982
Patient 10	5,316	54,567	21,766
Patient 11	5,909	42,285	21,938
<i><u>Kontrollbein</u></i>			
Patient 1	5,045	31,637	42,393
Patient 2	9,133	831,717	1082,721
Patient 3	3,052	17,155	30,786
Patient 4	1,923	813,707	2342,967
Patient 5	0,833	19,735	14,522
Patient 6	2,655	15,708	48,708
Patient 7	3,689	20,917	20,996
Patient 9	7,391	1648,251	2918,736
Patient 10	6,172	62,141	30,028
Patient 11	6,176	14,981	31,141
<i><u>Kontrolle</u></i>			
Patient 1	2,699	18,509	23,267
Patient 2	5,804	244,314	167,161
Patient 3	1,561	96,694	27,307
Patient 4	1,733	323,178	139,748
Patient 5		11,303	15,664
Patient 6	2,514	16,055	27,865
Patient 7	3,495	10,599	9,973
Patient 9	7,131	248,389	231,959
Patient 10	5,883	16,967	13,032
Patient 11	11,495	11,129	21,785

5. Ergebnisse

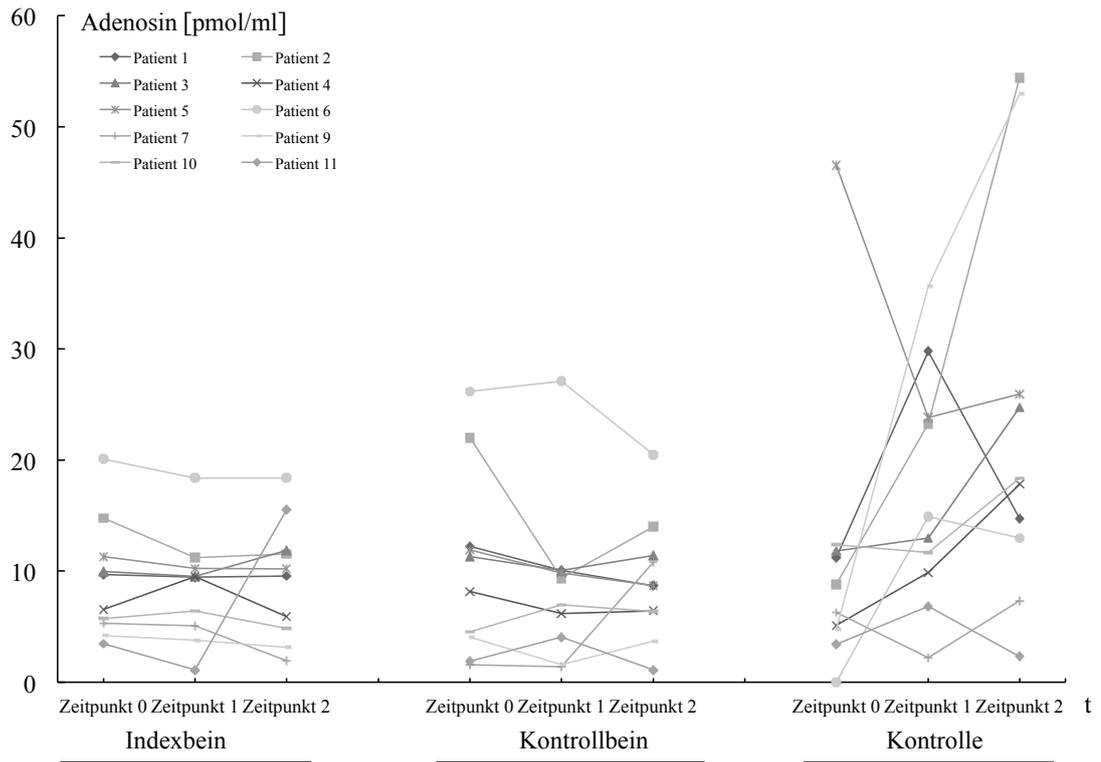


Abbildung 5.10 Individualverläufe der mittels HPLC gemessenen Adenosin Werte

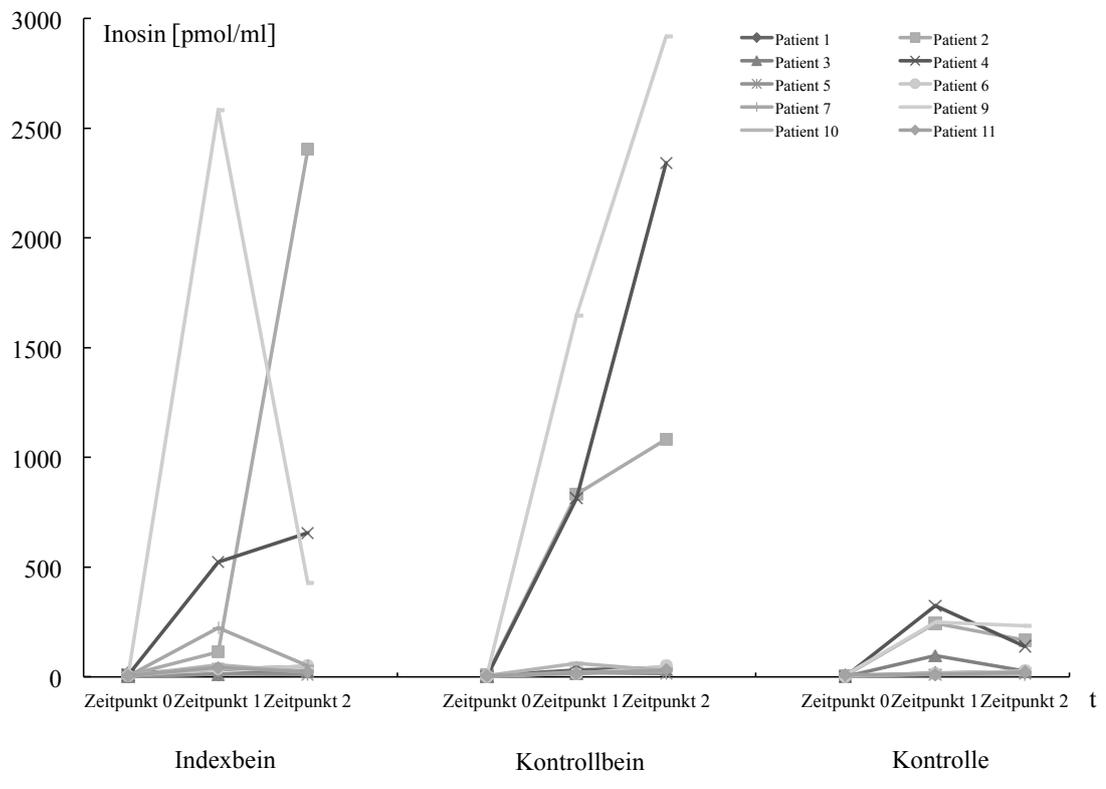


Abbildung 5.11 Individualverläufe der mittels HPLS gemessenen Inosin Werte

Des Weiteren sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob der Anstieg des Adenosinspiegels mit der Schmerzentstehung korreliert.

Die Untersuchung ergab, dass ein früherer Abbruch der Belastung mit einer höheren Schmerzintensität korrelierte ($r = -0,7$). Eine direkte Korrelation zwischen dem Anstieg des Adenosinspiegels am Indexbein und der Schmerzentstehung konnte nicht gezeigt werden (akute Belastung $r = 0,3$, Erholungsphase $r = 0,3$). Auch eine direkte Korrelation zwischen einem stärkeren Anstieg von Adenosin am Indexbein und der Zeit bis zum Abbruch der Belastung zeigte sich nicht ($r = -0,2$).

5.3.2. Bestimmung von S-100B, IL-6 und Laktat

S-100B zeigte am Indexbein die höchsten Werte vor Belastung, die nach maximaler Belastung bis nach der Ruhephase abfielen. Am Kontrollbein wie auch am Arm stiegen die S-100B Werte nach maximaler Belastung leicht an und fielen nach der Ruhephase unter ihre Ausgangswerte ab. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.10, Tabelle 5.11 und Abbildung 5.12 dargestellt.

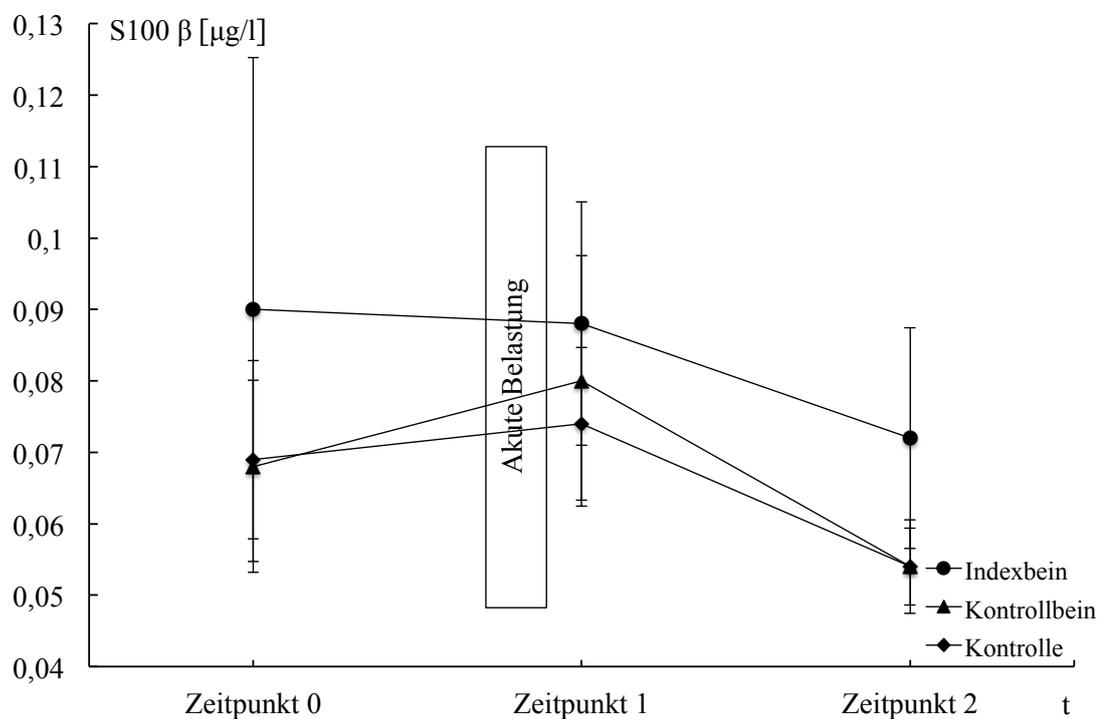


Abbildung 5.12 S-100B, $p = 0,0007$ für die Zeitpunkte, $p = 0,1790$ für die Messpunkte und $0,8689$ für die Interaktion aus Zeit- und Messpunkten

IL-6 (pg/ml) zeigte am Indexbein die höchsten Ausgangswerte und stieg nach maximaler Belastung leicht an und nach der Ruhephase wieder ab. Am Kontrollbein und Kontrollarm stiegen die IL-6 Werte bis nach der Ruhephase kontinuierlich an, wobei ein stärkerer Anstieg in der Kontrolle gesehen wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.10, Tabelle 5.11 und Abbildung 5.13 illustriert.

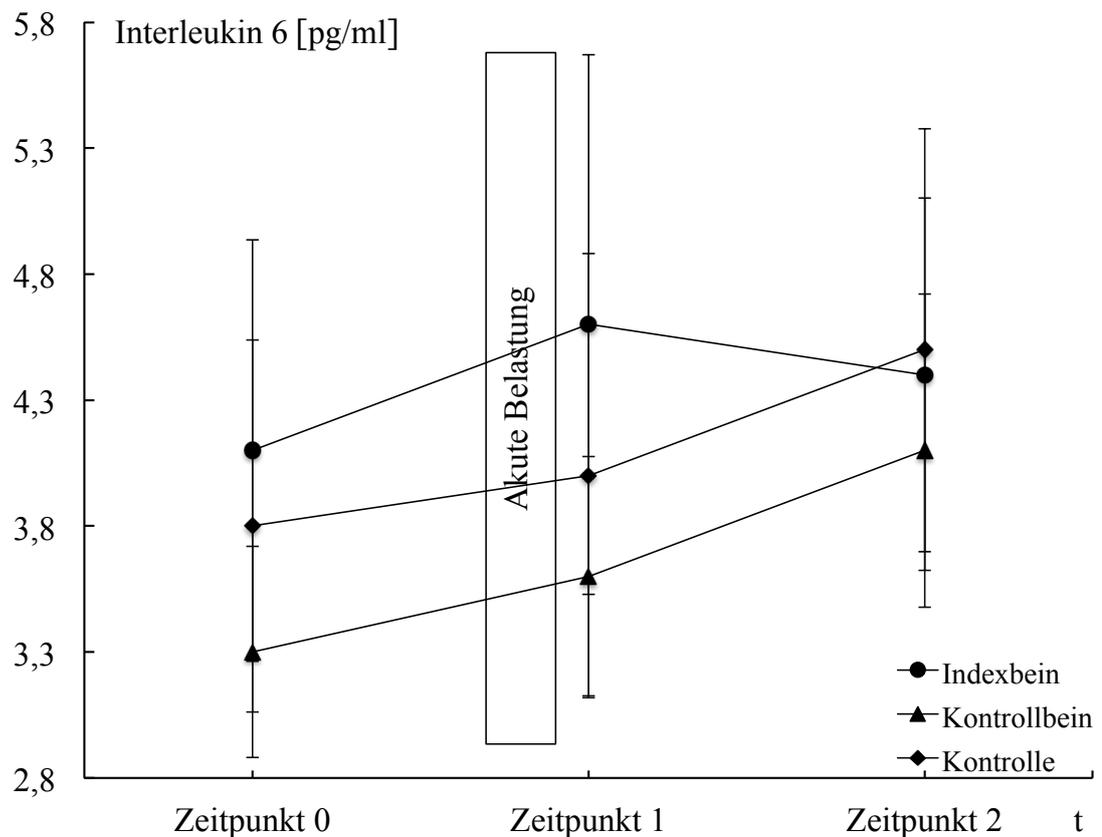


Abbildung 5.13 IL-6, $p = 0,2926$ für die Zeitpunkte, $p = 0,6391$ für die Messpunkte und $0,8874$ für die Interaktion aus Zeit- und Messpunkten

Laktat (mmol/l) stieg an allen Abnahmepunkten nach maximaler Belastung an und erreichte nach der Ruhephase seine Ausgangswerte. Der stärkste Anstieg wurde am Indexbein gefunden. Am Kontrollarm zeigte sich die geringste Veränderung. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.10, Tabelle 5.11 und Abbildung 5.14 zu entnehmen.

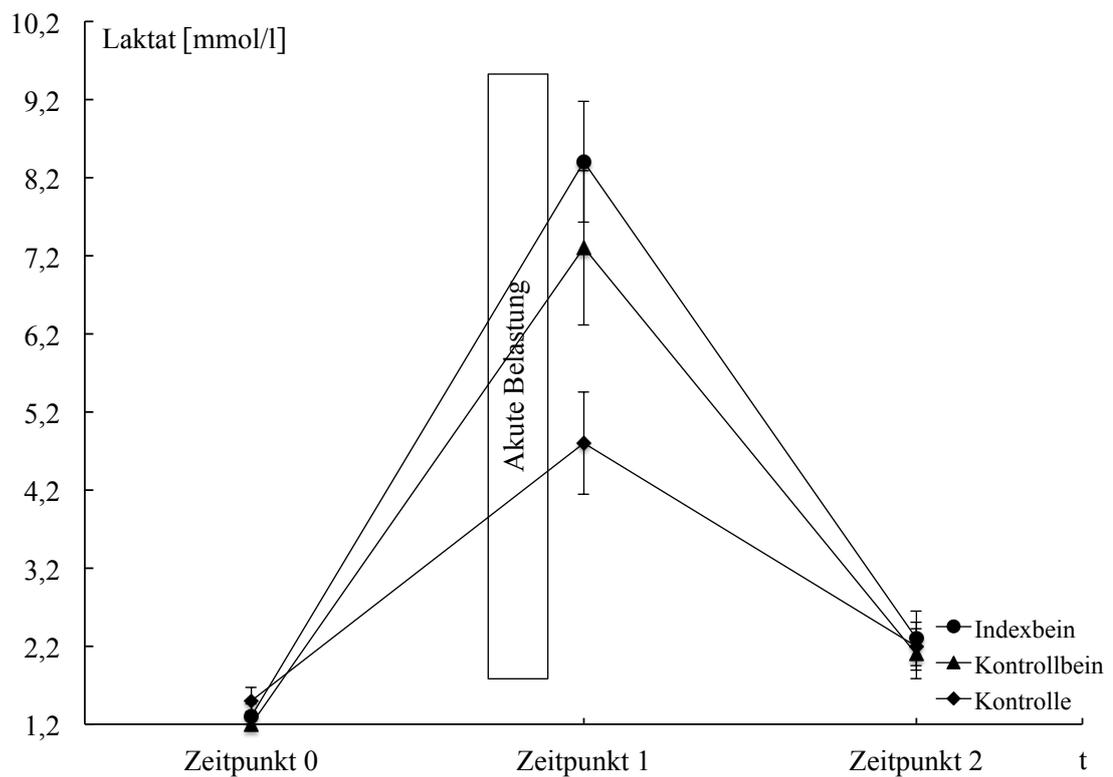


Abbildung 5.14 Laktat, $p < 0,0001$ für die Zeitpunkte, $p = 0,0485$ für die Messpunkte und $p < 0,0001$ für die Interaktion aus Zeit- und Messpunkten

Tabelle 5.10 Experimentelle Messung Zentrallabor

Experimentelle Messungen Zentrallabor (MW \pm SF)			
	Zeitpunkt 0	Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 2
Abnahmestelle			
S-100B [$\mu\text{g/l}$]			
Indexbein	0,090 \pm 0,04	0,088 \pm 0,02	0,072 \pm 0,02
Kontrollbein	0,068 \pm 0,02	0,080 \pm 0,02	0,054 \pm 0,01
Kontrolle	0,069 \pm 0,1	0,074 \pm 0,1	0,054 \pm 0,0
IL-6 [pg/ml]			
Indexbein	4,1 \pm 0,8	4,6 \pm 1,1	4,4 \pm 0,7
Kontrollbein	3,3 \pm 0,4	3,6 \pm 0,5	4,1 \pm 0,7
Kontrolle	3,8 \pm 0,7	4,0 \pm 0,9	4,5 \pm 0,9
Laktat [mmol/l]			
Indexbein	1,3 \pm 0,2	8,4 \pm 0,8	2,3 \pm 0,4
Kontrollbein	1,2 \pm 0,2	7,3 \pm 1,1	2,1 \pm 0,4
Kontrolle	1,5 \pm 0,2	4,8 \pm 0,7	2,2 \pm 0,3

Tabelle 5.11 Statistische Analyse: p-Werte der experimentellen Messung im Zentrallabor

Statistische Analyse: p-Werte der experimentellen Messung im Zentrallabor			
	Zeit	Ort	Interaktion aus Zeit und Ort
S-100B [$\mu\text{g/l}$]	0,0007	0,1790	0,8689
IL-6 [pg/ml]	0,2926	0,6391	0,8874
Laktat [mmol/l]	<0,0001	0,0485	<0,0001

In der statistischen Analyse der S-100B Messung zeigte sich ein signifikanter Unterschied für die Zeitpunkte. Ein signifikanter Unterschied für die Abnahmeorte und die Interaktion aus Zeit und Ort konnte nicht gefunden werden. IL-6 zeigte keine signifikanten Unterschiede für die Zeit- und Messpunkte. Für Laktat ergaben sich statistisch signifikante Änderungen zwischen Zeit- und Messpunkten, sowie der Interaktion aus Zeit- und Messpunkt.

6. Diskussion

Ziel dieser Studie war die Etablierung eines Modells zur Untersuchung von akuten Ischämieschmerzen am Menschen.

In dem hier entwickelten Versuchsmodell konnte am pAVK erkrankten Bein der untersuchten Patienten eine akute Ischämie unter Belastung erzeugt werden. Diese Ischämie zeigte sich nicht am kontralateralen Bein.

Ebenfalls entstand unter akuter Belastung Ischämieschmerz im pAVK erkrankten Bein.

Desweiteren wurde der Frage nachgegangen, ob sich Adenosinspiegel und die seines Abbauproduktes Inosin bei Patienten mit akuter Ischämie ändern und diese zum weiteren Verständnis und zur Quantifizierung von Ischämieschmerzen beitragen können.

Ein Anstieg lokaler Adenosinspiegel im erkrankten Bein zeigte sich nicht. Es zeigte sich allerdings ein Anstieg der systemischen Adenosinspiegel.

6.1. Ischämiemodell

In diesem Patientenmodell sollte durch eine Laufbandbelastung eine Ischämie in dem von pAVK betroffenen Indexbein erzeugt werden. Unter zu Hilfenahme einer BGA, Laktat und der hämodynamischen Untersuchungen wurde die Entstehung ischämischer Verhältnisse zum jeweiligen Messpunkt untersucht. Im Vergleich zum Indexbein sollten am Kontrollbein diese ischämischen Verhältnisse nicht entstehen.

Die Zielparameter sollten simultan an verschiedenen Orten (Indexbein, Kontrollbein, Arm) eines Patienten gemessen werden, um einen direkten Vergleich zu ermöglichen. Dieses wurde erreicht, indem den Patienten je eine Verweilkanüle in die rechte und linke V. femoralis und eine

Verweilkanüle in die V. cubitalis gelegt wurde. Somit sollte die lokale Konzentration der zu messenden Parameter vor systemischer Durchmischung gemessen werden. Die Kontrolle am Arm entspricht einem systemischen Wert. Die Venenverweilkanülen wurden für die gesamte Dauer der Untersuchung belassen um die zeitnahe Blutabnahme direkt nach der Laufbandbelastung gewährleisten zu können. Dies war vor allem unter Berücksichtigung der kurzen Halbwertszeit von Adenosin wichtig [56]. Die Unterschiede der gemessenen BGA Werte und des Laktats zwischen den Messpunkten zeigten, dass eine Ischämie erzeugt werden konnte. Die Werte sind den Tabellen 5.4 und Tabelle 5.10 zu entnehmen.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben kommt es unter einer Belastung bei Patienten mit pAVK zu einem Abfall des ABI-Wertes an der untersuchten Extremität. Dieser Wert zeigt eine Minderdurchblutung in der betroffenen Extremität an mit einer daraus folgenden poststenotischen Minderperfusion [4]. Ein signifikanter Abfall des ABI ($p \leq 0,0001$) konnte während akuter Belastung am pAVK-erkrankten Indexbein gezeigt werden (Tabelle 5.3, Abbildung 5.1). Auch wenn der ABI während der Belastung am Kontrollbein ebenfalls auf marginal pathologische Werte abfiel ($0,84 \pm 0,05$, MW \pm SF) (Normwerte 0,9 - 1,3), war diese Veränderung im Vergleich zum Indexbein nur minimal ($0,13 \pm 0,05$, MW \pm SF) [4]. Da sich bereits im Ruhezustand (Zeitpunkt 0) pathologische ABI Werte am Indexbein zeigten, sprach dieses für eine signifikante arterielle Stenose. Eine poststenotische Minderperfusion am Indexbein wurde somit während akuter Belastung auf dem Laufband erreicht, siehe hierfür Tabelle 5.3 und Abbildung 5.1 [4].

Die Ergebnisse der BGA zeigten im Vergleich zwischen Ruhezustand und akuter Belastung die größten Veränderungen im pAVK erkrankten Indexbein, siehe hierfür Tabelle 5.4.

Die Blutgase PO_2 , PCO_2 , Sättigung, HCO_3^- , wie auch der pH zeigten signifikante Unterschiede zwischen den Zeit- und Messpunkten (Tabelle 5.4). Auch die gemessenen Laktatwerte zeigten während akuter Laufbandbelastung die größten Veränderungen im Indexbein (siehe Tabelle 5.8). Die hier gefundenen Veränderungen der BGA und des Laktats während akuter Belastung am pAVK-erkrankten Indexbein entsprechen den vorbeschriebenen Veränderungen durch akute Ischämie [3, 35].

Die Ergebnisse dieses Patientenmodelles am pAVK-erkrankten Indexbein belegen somit die bei akuter Ischämie entstehende Minderperfusion des poststenotischen Gewebes mit den daraus folgenden Defiziten in der Sauerstoff- und Substratversorgung bei gleichzeitig verminderter Entsorgung von Stoffwechselendprodukten [3]. Wie zu erwarten, wurden diese Veränderungen am Kontrollbein nicht gefunden. Auch in der Kontrolluntersuchung am Arm waren diese Veränderungen nicht zu sehen.

6.2. Ischämieschmerz

Die Entstehung von Ischämieschmerzen sollte durch die Belastung des Patienten bis zum maximal aushaltbaren Schmerz erzeugt werden. Es handelte sich hierbei um die subjektive Angabe durch den Patienten. Der Lauf wurde in allen Fällen nur aufgrund der entstandenen maximalen Schmerzen im Indexbein unterbrochen und nicht aufgrund anderer Ursachen wie z.B. thorakalen Schmerzen, Luftnot, geringe Fitness o.ä. Demnach kann man in allen Fällen davon ausgehen, dass es zu starken, nicht aushaltbaren Schmerzen in der betroffenen Extremität aufgrund der zugrundeliegenden pAVK kam. Der hierbei entstandene Schmerz lässt auf eine relevante CI rückschließen.

6.3. Adenosin und Inosin

Zu untersuchen war die Hypothese, ob sich die Adenosinspiegel und die seines Abbauproduktes Inosin im Plasma von Patienten mit akuten Ischämieschmerzen am humanen Modell bei Patienten mit CI unter Belastung verändern.

Diese Veränderungen waren an den unteren Extremitäten nur minimal, siehe hierfür Tabelle 5.6 und Abbildung 5.8. Die Unterschiede der gemessenen Adenosinspiegel waren für die Zeit ($p = 0,2430$), den Ort ($p = 0,6063$) wie auch für die Interaktion aus Zeit und Ort ($p = 0,0939$) nicht signifikant. Ein Anstieg des Adenosinspiegels im Plasma am Indexbein zeigte sich nicht. Lediglich am Kontrollarm konnte ein Anstieg des Adenosinspiegels vom Ruhezustand, zur akuten Belastung bis hin zur Erholungsphase gezeigt werden.

Intravasale Anstiege von Adenosin unter muskulärer Belastung wurden bereits gezeigt. Ebenso, dass die Höhe des Adenosinspiegels mit dem Maß an körperlicher Anstrengung korreliert [18, 19].

Costa et al. zeigten, dass durch eine experimentell induzierte Ischämie der Adenosinanstieg weiterhin potenziierbar war [18].

Dieses Ergebnis differiert von den Ergebnissen der vorliegenden Studie. Obwohl am pAVK erkrankten Indexbein eine akute Ischämie nachweisbar war, zeigte sich kein Anstieg der Adenosinfreisetzung. Dieses könnte sich durch den Studienaufbau erklären:

Im Gegensatz zu den durchgeführten Vorstudien von Costa et al. und Langberg et al. wurde dieses Versuchsmodell an Patienten durchgeführt, die an einer einseitigen pAVK erkrankt waren [18, 19]. Es ist daher möglich, dass am erkrankten Patienten eine Adenosinfreisetzung nicht in gleicher Weise wie bei einem gesunden Probanden stattfindet. Es ist denkbar, dass durch die bereits längerfristig bestehenden ischämischen

Veränderungen in der Extremität Unterschiede im Metabolismus und der Synthese von Adenosin bestehen, die in einem experimentell induzierten ischämischen Gewebe eines gesunden Probanden nicht vorhanden sind.

Um dies zu erklären, wurden die Individualverläufe der Patienten noch einmal genauer betrachtet und der Adenosinstoffwechsel während Hypoxie/Ischämie genauer beleuchtet.

Unter Betrachtung der Individualverläufe zeigten sich deutlich unterschiedliche Verläufe in den Adenosin- und Inosinmessungen der Patienten zwei, vier, und neun im Vergleich mit den restlichen Patienten. In der Adenosinmessung zeigte sich am Arm nach Belastung ein deutlicher Anstieg bei Patient zwei und Patient neun. Die restlichen Patienten zeigten nur geringe Veränderungen. Die Adenosinmessung am Index- und Kontrollbein zeigte bei allen Patienten nur geringe Veränderungen (Tabelle 5.8, Abbildung 5.10).

In der Inosinmessung zeigten sich am Kontrollarm geringere Änderungen in den Individualverläufen als bei Adenosin. Die Inosinmessung ergab am Index- und Kontrollbein einen ausgeprägten Anstieg von Inosin nach akuter Belastung bei den Patienten zwei, vier und neun (Tabelle 5.9, Abbildung 5.11). Zusammenfassend zeigen daher die Patienten zwei, vier und neun deutlich unterschiedliche Messergebnisse im Vergleich mit den übrigen Patienten.

Während muskulärer Belastung bei pAVK kommt es zu einer Minderperfusion der durch die Arterien versorgten Extremität [2]. Während Hypoxie und muskulärer Belastung wird mehr Adenosin in den extrazellulären Raum freigesetzt. Dies geschieht im extrazellulären Raum unter anderem über den Abbau von ATP zu AMP über die Ecto-Apyrase (CD39) und von AMP zu Adenosin über die Ecto-5'Nukleotidase [110, 111]. Zusätzlich wurde gezeigt, dass Hypoxie zu einer transkriptionellen Induktion, Translation und Aktivierung dieser

extrazellulären Enzyme führen, die für den Abbau von ATP zu AMP und zu Adenosin verantwortlich sind [112, 113]. Es wäre also denkbar, dass es bei den Patienten zwei, vier und neun eine höhere Anzahl und Aktivität von CD39 und CD73 gab. Dadurch könnte es zu einer schnelleren Freisetzung von Adenosin aus dem Abbau von ATP zu AMP gekommen sein. Folglich könnte dies auch zu einem schnelleren Abbau von Adenosin zu Inosin geführt haben, was die sehr hohen Inosinwerte der Patienten erklären könnte. Da sich die Inosinwerte am Arm nicht erhöht zeigten, hier jedoch sehr hohe Adenosinwerte gemessen wurden, könnte dies für einen schnelleren Abbau in den Beinen als im Arm bei diesen Patienten sprechen. Dies könnte mit der gesteigerten Muskelaktivität der Beine und der daraus entstehenden Hypoxie zu erklären sein.

Über bidirektionale Adenosintransporter hält sich ein Gleichgewicht zwischen intrazellulärem und extrazellulärem Raum. Adenosin aus dem extrazellulären Raum wird schnell in die Zelle zurück aufgenommen [114] und intrazellulär weiter verstoffwechselt [115-117].

Diese bidirektionalen Adenosintransporter befinden sich unter anderem im Gefäßendothel, Epithelien, Erythrozyten und Entzündungszellen [118]. Es wäre also denkbar, dass im pAVK erkrankten Bein die Kontaktzeit mit den Erythrozyten im Blutkompartiment durch die Entsorgungsstörung länger ist als im Kontrollbein oder Arm. Dadurch könnte von den Erythrozyten mehr Adenosin aufgenommen worden sein ehe der Ort der Blutentnahme erreicht wurde.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass während Hypoxie die Transkription der bidirektionalen Adenosintransporter unterdrückt wird [119, 120]. Der Transport von Adenosin in das venöse Blutkompartiment könnte somit bei Gewebe mit eingeschränkter Durchblutung (das Indexbein) verlangsamt sein, was den weiteren Abbau bis hin zur

Harnsäure im interstitiellen Raum begünstigen würde [121]. Dies könnte einen geringeren Adenosinanstieg im Indexbein erklären.

Es bleibt zu berücksichtigen, dass die Inosinwerte an allen Mess- und Zeitpunkten eine sehr große Streubreite innerhalb des Patientengutes zeigten. Um diese Streubreite zu verringern und um zu erklären, ob sich erhöhte Adenosinspiegel nach Belastung von pAVK-Patienten im Fontaine Stadium II durch eine reine Belastung, Ischämie oder einer Kombination daraus ergeben, werden größere Fallzahlen benötigt. Eine Fallzahlschätzung ergab, dass, um eine Adenosindifferenz am Indexbein zwischen der Ruhephase und der akuten Belastung zu sehen, eine Fallzahl von 62 Patienten notwendig gewesen wäre.

Auch aus dem Vergleich der Adenosin- und Inosinwerte am Kontrollbein und der Kontrolle lässt sich kein eindeutiges pathophysiologisches Korrelat zuordnen.

In Übereinstimmung mit den vorliegenden Studien zeigte sich ein systemischer Anstieg von Adenosin durch akute Belastung, der sich bis zur Ruhephase weiterhin fortsetzte. Lokale Anstiege der Adenosinspiegel während akuter Ischämie am Patientenmodell konnten im Gegensatz zu durchgeführten Vorstudien mit gesunden Probanden nicht gezeigt werden. Eine Veränderung des Adenosinmetabolismus am kranken Patienten im Vergleich zum gesunden Probanden ist daher zu prüfen.

6.4. S-100B

Als Nebenfragestellung sollte betrachtet werden, ob sich nach kurzzeitiger akuter Ischämie Hinweise auf eine periphere Nervenschädigung im Sinne von erhöhten S-100B Werte finden lassen und S-100B somit als Marker für periphere Nervenläsionen dienen könnte. S-100B Werte $<0,100 \mu\text{g/l}$ gelten als physiologisch. Sie deuten

auf eine geringe Wahrscheinlichkeit zerebrovaskulärer Veränderungen oder zentraler Folgeschäden hin [122]. Weiterführende Studien zeigten, dass der Referenzwert physiologischer S-100B Werte weiter unter dem in diesem Labor angewandten Referenzwert von 0,100 µg/l liegt [122, 123]. In dieser Studie zeigten sich während der Ruhephase bei 2 von 11 und während akuter Belastung nur bei 3 von 11 Patienten S-100B Werte außerhalb des oberen Referenzbereiches.

Denkbar wäre, dass der hier angewandte Referenzwert für periphere Nervenläsionen im Gegensatz zu zentralen Störungen auf Grund der geringeren Nervenfaserdichte zu hoch liegt und somit nicht in der Lage ist, periphere Nervenläsionen zu detektieren. Dies wurde bereits in Vorstudien postuliert [122, 123]. Referenzwerte von S-100B für periphere Nervenläsionen existieren aktuell nicht. Eine durch S-100B nachweisbare Nervenschädigung am Indexbein wie auch am Kontrollbein und in der Kontrolle konnte hier nicht gezeigt werden (siehe Tabelle 5.8).

Ein weiterer Aspekt der Nachweisbarkeit von S-100B ist die zeitliche Komponente. Biberthaler et al. zeigten in einer Studie nach schweren Schädelhirn-Traumata signifikant erhöhte S-100B Werte. Im Gegensatz zu der hier durchgeführten Studie erfolgte die Blutentnahme jedoch nicht direkt nach dem Trauma, sondern erst 116 ± 18.8 Minuten nach dem Trauma [122]. Anderson et al. konnten jedoch bereits intraoperativ und direkt postoperativ nach Koronararterienbypass erhöhte S-100B Werte nachweisen [122, 123]. Dies legt nahe, dass eine zeitnahe Freisetzung von S-100B aus den geschädigten Geweben erfolgte. Die Schwere der Gewebeverletzung eines Koronararterienbypasses und eines schweren Schädelhirn-Traumas sind jedoch nur sehr eingeschränkt mit der einer akuten Ischämie nach Belastung zu vergleichen.

Studien zeigten weiterhin, dass S-100B peripher nicht nur aus Schwannschen Zellen, sondern auch aus Muskel- und Fettzellen freigesetzt wurde [123, 124]. Selbst ein Anstieg des S-100B Proteins im Indexbein durch Ischämie wäre demzufolge nicht sicher einer Nervenläsion zuzuordnen gewesen, sondern hätte auch durch das Zugrundegehen anderer Gewebestrukturen, wie z.B. Muskelzellen erklärt werden können.

Weitere Studien zur Etablierung eines Referenzwertes für periphere Nervenschädigungen und Richtlinien zur zeitlichen Detektierbarkeit von S-100B wären sinnvoll.

6.5. Interleukin-6

Als weiterer Nebenzielparameter wurde IL-6 untersucht. IL-6 gilt als Marker einer Inflammationsreaktion. Es konnte nachgewiesen werden, dass er unter akuter Belastung bei Patienten mit pAVK zusätzlich ansteigt [94, 102].

In dieser Studie zeigte sich lediglich bei einem von elf Patienten ein IL-6 Wert außerhalb des Normwertes von <9 pg/ml. Bei diesem Patienten zeigte sich dieser Wert aber nicht nur am Indexbein, sondern auch in der Kontrolle. Weiterhin fanden sich erhöhte Werte zu allen drei Zeitpunkten. Daher handelte es sich bei diesem Patienten am ehesten nicht um eine durch Belastung ausgelöste lokale Inflammation, sondern einen systemischen Inflammationsprozess. In den restlichen zehn Patienten zeigte sich kein Anstieg von IL-6 auf Werte außerhalb des Referenzbereiches. Im Vergleich zu der Studie von Andreozzi et al. und Signorelli et al. konnte auch in dieser Studie ein ähnlicher Verlauf der IL-6 Spiegel mit einem Anstieg nach Belastung und einem Abfall nach der Ruhephase gezeigt werden, der jedoch nicht statistisch signifikant ist [94, 102]. Ein Abfall von IL-6 nach akuter Laufbandbelastung und nach 4 Stunden Ruhephase bei gesunden Probanden und Patienten mit moderater CI wie von Fiotti et al. beschrieben zeigte sich in der hier durchgeführten Studie nicht [95, 96].

Obwohl ein ähnlicher Versuchsaufbau vorlag mit zeitnahe Blutentnahme nach Laufbandbelastung und einer maximalen Belastung konnten die Ergebnisse der genannten Studien nicht reproduziert werden. Der Unterschied zwischen dieser und den vorliegenden Studien könnte darin liegen, dass es sich in dieser Studie um Patienten mit ausschließlich einseitiger pAVK im Stadium II handelte. In den vorliegenden Studien wurden Patienten betrachtet die unter moderater bis schwerer pAVK litten, die sich nicht nur auf eine Extremität

beschränkte. Das sich somit bei beidseitiger und/oder schwererer pAVK ein stärkerer Anstieg von IL-6 als in dieser Studie zeigte wäre vorstellbar.

7. Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war die Entwicklung eines standardisierten Protokolls zur Untersuchung des akuten Ischämieschmerzes. Dies wurde an Patienten mit einer einseitigen pAVK durchgeführt. Die pAVK beruht auf einer chronischen Verengung des Gefäßlumens peripherer Extremitätenarterien aufgrund stenosierender und okkludierender Veränderungen, die stadienabhängig unter Belastung zu einer akuten Ischämie mit daraus resultierendem akutem Ischämieschmerz führen kann.

Desweiteren sollte untersucht werden, ob sich Adenosinspiegel und die seines Abbauproduktes Inosin bei Patienten mit akuter Ischämie ändern und diese zum weiteren Verständnis und zur Quantifizierung von Ischämieschmerzen beitragen können.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit stellte die Untersuchung der S-100B Werte als Hinweis auf eine periphere Nervenschädigung dar, sowie die Untersuchung des Inflammationsmarkes IL-6.

Bei vorliegender Untersuchung handelte es sich um eine Pilotstudie. Es war erforderlich, die in die Studie einzuschließenden Patienten stark zu selektieren um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Weitere Studien sind somit notwendig um eine genaue Differenzierung der Ergebnisse zu ermöglichen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass am pAVK-erkrankten Indexbein im Gegensatz zum Kontrollbein eine akute Ischämie mit daraus entstehender Minderperfusion des poststenotischen Gewebes entstand. Das hier entwickelte standardisierte Protokoll am Menschen eignet sich zur Untersuchung des akuten Ischämieschmerzes.

Ein systemischer Anstieg der Adenosinspiegel durch akute Belastung konnte, wie bereits in Studien vorbeschrieben, gezeigt werden. Im

Gegensatz dazu ließen sich die vorbeschriebenen lokalen Anstiege der Adenosinspiegel während akuter Ischämie nicht reproduzieren. Dies könnte zur Ursache haben, dass das hier angewandte Modell an pAVK Patienten im Gegensatz zu gesunden Probanden in den Vorstudien durchgeführt wurde. Eine Veränderung des Adenosinmetabolismus am kranken Patienten im Vergleich zum gesunden Probanden ist daher denkbar und in weitergehenden Studien zu prüfen.

Bislang liegen keine Referenzwerte für S100B bei peripheren Nervenläsionen vor. Pathologische S100B Werte konnten nicht detektiert werden. Eine Festlegung von Referenzwerten für Läsionen des peripheren Nervensystems wäre sinnvoll.

Anstiege des Entzündungsparameter IL-6 während akuter Belastung konnten nicht gezeigt werden.

Zusammenfassend wurde ein Modell zur Entstehung einer akuten Ischämie am Menschen entwickelt und es konnten neue Erkenntnisse zur Veränderung von Adenosinspiegeln bei pAVK Patienten gefunden werden.

8. Anhang

8.1. Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt, *Todesursachen in Deutschland 2010*. Gesundheit. Wiesbaden 2011. **Fachserie 12** Reihe 4: S.1.
2. Lasek, R., *pAVK*. Arzneiverordnung in der Praxis, 2004. **3. Auflage 2004**: p. 5-5.
3. Rieger, H. and A. Scheffler, *Pain in chronic peripheral arterial occlusive disease. Pathogenesis and therapy*. Internist (Berl.), 1999. **40**(2): p. 133-139.
4. Abul-Khoudoud, O., *Diagnosis and risk assessment of lower extremity peripheral arterial disease*. J Endovasc. Ther., 2006. **13 Suppl 2**: p. II10-II18.
5. Bhatt, D.L., et al., *International prevalence, recognition, and treatment of cardiovascular risk factors in outpatients with atherothrombosis*. JAMA, 2006. **295**(2): p. 180-189.
6. Bodikova, S. and L. Flak, *Ischemic disease of lower extremities--risk factors and ultrasound diagnostic*. Bratisl.Lek.Listy., 2007. **108**(2): p. 89-92.
7. Chochola, M. and A. Linhart, *[Epidemiology of ischemic diseases of the lower extremities]*. Cas.Lek.Cesk., 2006. **145**(5): p. 368-370.
8. Diehm, C., et al., *[Drug therapy of arterial occlusive disease]*. Internist (Berl.), 2000. **41**(12): p. 1416-1422.
9. Garcia, L.A., *Epidemiology and pathophysiology of lower extremity peripheral arterial disease*. J Endovasc. Ther., 2006. **13 Suppl 2**: p. II3-II9.
10. Gottsater, A., *Managing risk factors for atherosclerosis in critical limb ischaemia*. Eur.J Vasc.Endovasc.Surg., 2006. **32**(5): p. 478-483.

11. Hiatt, W.R., S. Goto, and A.J. Comerota, *Cilostazol and the Management of Vascular Disease*. Atherosclerosis supplements, 2005. **6**(4).
12. Jensen, S.A., L.J. Vatten, and H.O. Myhre, *The prevalence of chronic critical lower limb ischaemia in a population of 20,000 subjects 40-69 years of age*. Eur.J Vasc.Endovasc.Surg., 2006. **32**(1): p. 60-65.
13. Lumsden, A.B. and T.W. Rice, *Medical management of peripheral arterial disease: a therapeutic algorithm*. J Endovasc.Ther., 2006. **13 Suppl 2**: p. II19-II29.
14. Muntner, P., et al., *Relationship between HbA1c level and peripheral arterial disease*. Diabetes Care, 2005. **28**(8): p. 1981-1987.
15. Mussack, T., et al., *Rapid measurement of S-100B serum protein levels by Elecsys S100 immunoassay in patients undergoing carotid artery stenting or endarterectomy*. Clinical biochemistry, 2006. **39**(4): p. 349-56.
16. Norgren, L., et al., *Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II)*. J Vasc.Surg., 2007. **45 Suppl S**: p. S5-67.
17. Fredholm, B.B., et al., *International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors*. Pharmacol.Rev., 2001. **53**(4): p. 527-552.
18. Costa, F., et al., *Estimation of skeletal muscle interstitial adenosine during forearm dynamic exercise in humans*. Hypertension, 2000. **35**(5): p. 1124-1128.
19. Langberg, H., et al., *Exercise-induced increase in interstitial bradykinin and adenosine concentrations in skeletal muscle and peritendinous tissue in humans*. J Physiol, 2002. **542**(Pt 3): p. 977-983.
20. Sitkovsky, M.V., et al., *Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and*

- adenosine A2A receptors*. *Annu.Rev.Immunol*, 2004. **22**: p. 657-682.
21. Bleehen, T. and C.A. Keele, *Observations on the algogenic actions of adenosine compounds on the human blister base preparation*. *Pain*, 1977. **3**(4): p. 367-377.
 22. Rae, C.P., et al., *Analgesic effect of adenosine on ischaemic pain in human volunteers*. *Br.J Anaesth.*, 1999. **82**(3): p. 427-428.
 23. Laghi, P.F., et al., *Pharmacological preconditioning of ischaemia*. *Clin Hemorheol.Microcirc.*, 1997. **17**(1): p. 73-84.
 24. Ruger, L.J., et al., *Characteristics of chronic ischemic pain in patients with peripheral arterial disease*. *Pain*, 2008. **139**(1): p. 201-8.
 25. Lang, P.M., et al., *Sensory neuropathy and signs of central sensitization in patients with peripheral arterial disease*. *Pain*, 2006. **124**(1-2): p. 190-200.
 26. Beaudeau, J., L. Dequen, and M. Foglietti, *[Pathophysiologic aspects of S-100beta protein: a new biological marker of brain pathology]*. *Ann Biol.Clin (Paris.)*, 1999. **57**(3): p. 261-272.
 27. Mori, T., et al., *Overexpression of human S100B exacerbates brain damage and periinfarct gliosis after permanent focal ischemia*. *Stroke*, 2008. **39**(7): p. 2114-2121.
 28. Tanaka, Y., et al., *Serum S100B is a useful surrogate marker for long-term outcomes in photochemically-induced thrombotic stroke rat models*. *Life Sci*, 2007. **81**(8): p. 657-663.
 29. Tanaka, Y., et al., *Relationship between cerebrospinal and peripheral S100B levels after focal cerebral ischemia in rats*. *Neurosci.Lett.*, 2008. **436**(1): p. 40-43.
 30. Mielck, F., et al., *Cerebral inflammatory response during and after cardiac surgery*. *Eur.J Anaesthesiol.*, 2005. **22**(5): p. 347-352.

31. Criqui, M.H., et al., *The prevalence of peripheral arterial disease in a defined population*. *Circulation*, 1985. **71**(3): p. 510-5.
32. Hiatt, W.R., S. Hoag, and R.F. Hamman, *Effect of diagnostic criteria on the prevalence of peripheral arterial disease. The San Luis Valley Diabetes Study*. *Circulation*, 1995. **91**(5): p. 1472-9.
33. Selvin, E. and T.P. Erlinger, *Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000*. *Circulation*, 2004. **110**(6): p. 738-43.
34. Kullo, I.J., et al., *Leveraging informatics for genetic studies: use of the electronic medical record to enable a genome-wide association study of peripheral arterial disease*. *Journal of the American Medical Informatics Association : JAMIA*, 2010. **17**(5): p. 568-74.
35. Pipinos, I.I., et al., *Basic science review: the myopathy of peripheral arterial occlusive disease: part 2. Oxidative stress, neuropathy, and shift in muscle fiber type*. *Vasc.Endovascular Surg.*, 2008. **42**(2): p. 101-112.
36. Pipinos, I.I., et al., *The myopathy of peripheral arterial occlusive disease: part 1. Functional and histomorphological changes and evidence for mitochondrial dysfunction*. *Vasc.Endovascular Surg.*, 2007. **41**(6): p. 481-489.
37. Maier and Gleim, *Ischämieschmerz*, in *Lehrbuch der Schmerztherapie*, Zenz and Jurna, Editors. 2001: Stuttgart. p. 770-771.
38. Merskey, H., *Logic, truth and language in concepts of pain*. *Qual.Life Res*, 1994. **3 Suppl 1**: p. S69-S76.
39. Brune, K., A. Beyer, and M. Schäfer, *Schmerz: Pathophysiologie-Pharmakologie- Therapie*2001, Berlin, Heidelberg: Springer.
40. Millan, M.J., *The induction of pain: an integrative review*. *Prog.Neurobiol.*, 1999. **57**(1): p. 1-164.

41. Markenson, J.A., *Mechanisms of chronic pain*. Am J Med, 1996. **101**(1A): p. 6S-18S.
42. Tunks, E.R., J. Crook, and R. Weir, *Epidemiology of chronic pain with psychological comorbidity: prevalence, risk, course, and prognosis*. Can.J Psychiatry, 2008. **53**(4): p. 224-234.
43. Zimmermann, M., *Physiologie von Nozizeption und Schmerz*, in *Schmerzpsychotherapie*, H. Krüner, et al., Editors. 2007: Heidelberg. p. 28-29.
44. Arendt-Nielsen, L., S. Mense, and T. Graven-Nielsen, *[Assessment of muscle pain and hyperalgesia. Experimental and clinical findings]*. Schmerz, 2003. **17**(6): p. 445-449.
45. Riedel, W. and G. Neeck, *Nociception, pain, and antinociception: current concepts*. Z Rheumatol, 2001. **60**(6): p. 404-415.
46. Schaible, H.G., *Pathophysiology of pain*. Orthopade., 2007. **36**(1): p. 8, 10-8, 16.
47. Lloyd, D.P., C.C. Hunt, and A.K. McIntyre, *Transmission in fractionated monosynaptic spinal reflex systems*. J Gen.Physiol, 1955. **38**(3): p. 307-317.
48. Mense, S., *Nociception from skeletal muscle in relation to clinical muscle pain*. Pain, 1993. **54**(3): p. 241-289.
49. Mense, S.S., *[Functional neuroanatomy for pain stimuli. Reception, transmission, and processing]*. Schmerz, 2004. **18**(3): p. 225-237.
50. Bendtsen, L., R. Jensen, and J. Olesen, *Qualitatively altered nociception in chronic myofascial pain*. Pain, 1996. **65**(2-3): p. 259-264.
51. Silbernagel and Despopoulos, *Nerv und Muskel, Arbeit*, in *Taschenatlas der Physiologie*, Silbernagel and Despopoulos, Editors. 2002, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. p. 44-47.

52. Biasucci, L.M., et al., *Increasing levels of interleukin (IL)-1Ra and IL-6 during the first 2 days of hospitalization in unstable angina are associated with increased risk of in-hospital coronary events*. *Circulation*, 1999. **99**(16): p. 2079-2084.
53. Halperin, J.L., *Evaluation of patients with peripheral vascular disease*. *Thromb.Res*, 2002. **106**(6): p. V303-V311.
54. McMahon, S.B., D.L.H. Bennett, and S. Bevan, *Inflammatory mediators and modulators of pain*, in *Textbook of Pain* 2006, Elsevier Churchill Livingstone. p. 49-72.
55. Rooke, T.W., L.H. Hollier, and P.J. Osmundson, *The influence of sympathetic nerves on transcutaneous oxygen tension in normal and ischemic lower extremities*. *Angiology.*, 1987. **38**(5): p. 400-410.
56. Moser, G.H., J. Schrader, and A. Deussen, *Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood*. *Am J Physiol*, 1989. **256**(4 Pt 1): p. C799-C806.
57. Sawynok, J., *Adenosine and ATP receptors*. *Handb.Exp.Pharmacol.*, 2007(177): p. 309-328.
58. Sawynok, J. and X.J. Liu, *Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain*. *Prog.Neurobiol.*, 2003. **69**(5): p. 313-340.
59. Edlund, A., A. Sollevi, and B. Linde, *Haemodynamic and metabolic effects of infused adenosine in man*. *Clin Sci (Lond.)*, 1990. **79**(2): p. 131-138.
60. Sollevi, A., *Cardiovascular effects of adenosine in man; possible clinical implications*. *Prog.Neurobiol.*, 1986. **27**(4): p. 319-349.
61. Sylven, C., et al., *Adenosine injection into the brachial artery produces ischaemia like pain or discomfort in the forearm*. *Cardiovasc.Res*, 1988. **22**(9): p. 674-678.
62. Heinonen, I., et al., *Role of adenosine in regulating the heterogeneity of skeletal muscle blood flow during exercise in humans*. *J Appl.Physiol*, 2007. **103**(6): p. 2042-2048.

63. Radegran, G. and J.A. Calbet, *Role of adenosine in exercise-induced human skeletal muscle vasodilatation*. Acta Physiol Scand., 2001. **171**(2): p. 177-185.
64. Lang, P.M., et al., *Activation of adenosine and P2Y receptors by ATP in human peripheral nerve*. Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol., 2002. **366**(5): p. 449-457.
65. Olah, M.E. and G.L. Stiles, *Adenosine receptor subtypes: characterization and therapeutic regulation*. Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol., 1995. **35**: p. 581-606.
66. Sawynok, J., *Adenosine receptor activation and nociception*. Eur.J Pharmacol., 1998. **347**(1): p. 1-11.
67. Segerdahl, M., et al., *Peroperative adenosine infusion reduces the requirements for isoflurane and postoperative analgesics*. Anesth Analg, 1995. **80**(6): p. 1145-1149.
68. Reeve, A.J. and A.H. Dickenson, *The roles of spinal adenosine receptors in the control of acute and more persistent nociceptive responses of dorsal horn neurones in the anaesthetized rat*. Br.J Pharmacol., 1995. **116**(4): p. 2221-2228.
69. Gaspardone, A., et al., *Muscular and cardiac adenosine-induced pain is mediated by A1 receptors*. J Am Coll.Cardiol., 1995. **25**(1): p. 251-257.
70. Salvatore, C.A., et al., *Disruption of the A(3) adenosine receptor gene in mice and its effect on stimulated inflammatory cells*. J Biol.Chem., 2000. **275**(6): p. 4429-4434.
71. Sitkovsky, M.V., *Use of the A(2A) adenosine receptor as a physiological immunosuppressor and to engineer inflammation in vivo*. Biochem Pharmacol., 2003. **65**(4): p. 493-501.
72. Gyllenhammar, E. and L.O. Nordfors, *Systemic adenosine infusions alleviated neuropathic pain*. Pain, 2001. **94**(1): p. 121-122.
73. Lynch, M.E., A.J. Clark, and J. Sawynok, *Intravenous adenosine alleviates neuropathic pain: a double blind placebo controlled*

- crossover trial using an enriched enrolment design.* Pain, 2003. **103**(1-2): p. 111-117.
74. Sollevi, A., et al., *Systemic adenosine infusion: a new treatment modality to alleviate neuropathic pain.* Pain, 1995. **61**(1): p. 155-158.
75. Belfrage, M., et al., *Systemic adenosine infusion alleviates spontaneous and stimulus evoked pain in patients with peripheral neuropathic pain.* Anesth.Analg., 1995. **81**(4): p. 713-717.
76. Sollevi, A., *Adenosine infusion during isoflurane-nitrous oxide anaesthesia: indications of perioperative analgesic effect.* Acta Anaesthesiol.Scand., 1992. **36**(6): p. 595-599.
77. Segerdahl, M., et al., *Systemic adenosine attenuates touch evoked allodynia induced by mustard oil in humans.* Neuroreport, 1995. **6**(5): p. 753-756.
78. Rane, K., et al., *Intrathecal adenosine administration: a phase I clinical safety study in healthy volunteers, with additional evaluation of its influence on sensory thresholds and experimental pain.* Anesthesiology, 1998. **89**(5): p. 1108-1115.
79. Segerdahl, M., A. Ekblom, and A. Sollevi, *The influence of adenosine, ketamine, and morphine on experimentally induced ischemic pain in healthy volunteers.* Anesth Analg, 1994. **79**(4): p. 787-791.
80. Crea, F. and A. Gaspardone, *New look to an old symptom: angina pectoris.* Circulation, 1997. **96**(10): p. 3766-3773.
81. Sylven, C., *Angina pectoris-like pain provoked by intravenous infusion of adenosine.* Br.Med J (Clin Res Ed.), 1986. **293**(6556): p. 1240.
82. Crea, F., et al., *Role of adenosine in pathogenesis of anginal pain.* Circulation, 1990. **81**(1): p. 164-172.
83. Donato, R., *Intracellular and extracellular roles of S100 proteins.* Microsc.Res Tech., 2003. **60**(6): p. 540-551.

84. Rothermundt, M., et al., *S100B in brain damage and neurodegeneration*. Microsc.Res Tech., 2003. **60**(6): p. 614-632.
85. Shang, X., H. Cheng, and R. Zhou, *Chromosomal mapping, differential origin and evolution of the S100 gene family*. Genet.Sel.Evol., 2008. **40**(4): p. 449-464.
86. Hayashi, A., et al., *Treatment modality affects allograft-derived Schwann cell phenotype and myelinating capacity*. Exp.Neurol., 2008. **212**(2): p. 324-336.
87. Schafer, B.W. and C.W. Heizmann, *The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology*. Trends Biochem Sci, 1996. **21**(4): p. 134-140.
88. Nonaka, D., L. Chiriboga, and B.P. Rubin, *Differential expression of S100 protein subtypes in malignant melanoma, and benign and malignant peripheral nerve sheath tumors*. J Cutan.Pathol., 2008.
89. Hayashi, A., et al., *A double-transgenic mouse used to track migrating Schwann cells and regenerating axons following engraftment of injured nerves*. Exp.Neurol., 2007. **207**(1): p. 128-138.
90. Zimmer, D.B., et al., *The S100 protein family: history, function, and expression*. Brain Res Bull., 1995. **37**(4): p. 417-429.
91. Heizmann, C.W., G. Fritz, and B.W. Schafer, *S100 proteins: structure, functions and pathology*. Front.Biosci., 2002. **7**: p. d1356-d1368.
92. Mussack, T., et al., *Significance of Elecsys S100 immunoassay for real-time assessment of traumatic brain damage in multiple trauma patients*. Clin Chem.Lab.Med, 2006. **44**(9): p. 1140-1145.
93. Li, Y., et al., *S100beta induction of the proinflammatory cytokine interleukin-6 in neurons*. J Neurochem., 2000. **74**(1): p. 143-150.
94. Signorelli, S.S., et al., *High circulating levels of cytokines (IL-6 and TNFalpha), adhesion molecules (VCAM-1 and ICAM-1) and selectins in patients with peripheral arterial disease at rest and after a treadmill test*. Vasc.Med, 2003. **8**(1): p. 15-19.

95. Fiotti, N., et al., *Atherosclerosis and inflammation. Patterns of cytokine regulation in patients with peripheral arterial disease.* *Atherosclerosis*, 1999. **145**(1): p. 51-60.
96. Signorelli, S.S., et al., *Proinflammatory circulating molecules in peripheral arterial disease.* *Int J Mol.Med*, 2007. **20**(3): p. 279-286.
97. Corrado, E., et al., *Relationship between endothelial dysfunction, intima media thickness and cardiovascular risk factors in asymptomatic subjects.* *Int Angiol.*, 2005. **24**(1): p. 52-58.
98. Liuzzo, G., et al., *Enhanced inflammatory response to coronary angioplasty in patients with severe unstable angina.* *Circulation*, 1998. **98**(22): p. 2370-2376.
99. Shah, P.K., *Plaque disruption and thrombosis: potential role of inflammation and infection.* *Cardiol.Rev.*, 2000. **8**(1): p. 31-39.
100. Biasucci, L.M., et al., *Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina.* *Circulation*, 1996. **94**(5): p. 874-877.
101. Van Snick, J., *Interleukin-6: an overview.* *Annu.Rev.Immunol*, 1990. **8**: p. 253-278.
102. Andreozzi, G.M., et al., *Circulating levels of cytokines (IL-6 and IL-1beta) in patients with intermittent claudication, at rest, after maximal exercise treadmill test and during restore phase. Could they be progression markers of the disease?* *Int Angiol.*, 2007. **26**(3): p. 245-252.
103. Ontyd, J. and J. Schrader, *Measurement of adenosine, inosine, and hypoxanthine in human plasma.* *Journal of chromatography*, 1984. **307**(2): p. 404-9.
104. Kreth, S., et al., *Reduced ligand affinity leads to an impaired function of the adenosine A2A receptor of human granulocytes in sepsis.* *Journal of cellular and molecular medicine*, 2009. **13**(5): p. 985-94.
105. Hagemeyer, E., et al., *On-line high-performance liquid affinity chromatography-high-performance liquid chromatography*

- analysis of monomeric ribonucleoside compounds in biological fluids*. Journal of chromatography, 1983. **282**: p. 663-9.
106. Kaufmann, I., et al., *Effects of adenosine on functions of polymorphonuclear leukocytes from patients with septic shock*. Shock, 2007. **27**(1): p. 25-31.
107. Product Information, *Elecsys® S100, Elecsys 1010/2010 Systems, Modular Analytics E170*, Roche Diagnostics GmbH, Februar 2005.
108. Product Information *COBAS® IL6 Elecsys 2010 (GNR 511, 512)*, Roche Diagnostics GmbH, 2012.
109. Product Information *Cobas® Integra 400/700/800, Lactate Gen.2*, Roche Diagnostics GmbH, 2007.
110. Fredholm, B.B., *Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair*. Cell death and differentiation, 2007. **14**(7): p. 1315-23.
111. Linden, J., *Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection*. Annual review of pharmacology and toxicology, 2001. **41**: p. 775-87.
112. Eltzschig, H.K., et al., *Central role of Sp1-regulated CD39 in hypoxia/ischemia protection*. Blood, 2009. **113**(1): p. 224-32.
113. Synnestvedt, K., et al., *Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia*. The Journal of clinical investigation, 2002. **110**(7): p. 993-1002.
114. Loffler, M., et al., *Physiological roles of vascular nucleoside transporters*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2007. **27**(5): p. 1004-13.
115. Morote-Garcia, J.C., et al., *HIF-1-dependent repression of adenosine kinase attenuates hypoxia-induced vascular leak*. Blood, 2008. **111**(12): p. 5571-80.

116. Eltzschig, H.K., et al., *Endothelial catabolism of extracellular adenosine during hypoxia: the role of surface adenosine deaminase and CD26*. *Blood*, 2006. **108**(5): p. 1602-10.
117. Van Linden, A. and H.K. Eltzschig, *Role of pulmonary adenosine during hypoxia: extracellular generation, signaling and metabolism by surface adenosine deaminase/CD26*. *Expert opinion on biological therapy*, 2007. **7**(9): p. 1437-47.
118. Eltzschig, H.K., *Adenosine: an old drug newly discovered*. *Anesthesiology*, 2009. **111**(4): p. 904-15.
119. Eltzschig, H.K., et al., *HIF-1-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter (ENT) in hypoxia*. *The Journal of experimental medicine*, 2005. **202**(11): p. 1493-505.
120. Morote-Garcia, J.C., et al., *Hypoxia-inducible factor-dependent repression of equilibrative nucleoside transporter 2 attenuates mucosal inflammation during intestinal hypoxia*. *Gastroenterology*, 2009. **136**(2): p. 607-18.
121. Horton, R.H., et al., *Biochemie*. 2008. Pearson Studium: München. p. 765.
122. Biberthaler, P., et al., *Evaluation of S-100b as a specific marker for neuronal damage due to minor head trauma*. *World J Surg*, 2001. **25**(1): p. 93-7.
123. Anderson, R.E., et al., *Increase in serum S100A1-B and S100BB during cardiac surgery arises from extracerebral sources*. *Ann Thorac Surg*, 2001. **71**(5): p. 1512-7.
124. Pham, N., et al., *Extracranial sources of S100B do not affect serum levels*. *PLoS One*. **5**(9).

8.2. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 2.1: Intra- und extrazelluläre Synthese und Metabolismus von Adenosin [58]</i>	32
<i>Abbildung 2.2: Adenosinrezeptor Bindung</i>	36
<i>Abbildung 4.1: Versuchsablauf</i>	48
<i>Abbildung 5.1 ABI</i>	59
<i>Abbildung 5.2 PO₂</i>	61
<i>Abbildung 5.3 PCO₂</i>	62
<i>Abbildung 5.4 pH</i>	63
<i>Abbildung 5.5 Sättigung</i>	64
<i>Abbildung 5.6 Base Excess</i>	65
<i>Abbildung 5.7 HCO₃⁻</i>	66
<i>Abbildung 5.8 Adenosin</i>	69
<i>Abbildung 5.9 Inosin</i>	70
<i>Abbildung 5.10 Individualverläufe Adenosin Werte</i>	74
<i>Abbildung 5.11 Individualverläufe Inosin Werte</i>	74
<i>Abbildung 5.12 S-100B</i>	76
<i>Abbildung 5.13 IL-6</i>	77
<i>Abbildung 5.14 Laktat</i>	78

8.3. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 2.1: Klassifikation der pAVK nach Fontaine und Rutherford</i>	17
<i>Tabelle 5.1 Basischarakteristika der Patienten</i>	56
<i>Tabelle 5.2 Laufbandparameter</i>	57
<i>Tabelle 5.3 Hämodynamik</i>	58
<i>Tabelle 5.4 Blutgasanalyse Angaben in MW ± SF</i>	67
<i>Tabelle 5.5 Statistische Analyse: p-Werte der Blutgasanalyse</i>	68
<i>Tabelle 5.6 Adenosin und Inosin Messung</i>	71
<i>Tabelle 5.7 Statistische Analyse: p-Werte der Adenosin und Inosin Messung</i>	71
<i>Tabelle 5.8 Adenosin</i>	72
<i>Tabelle 5.9 Inosin</i>	73
<i>Tabelle 5.10 Experimentelle Messung Zentrallabor</i>	79
<i>Tabelle 5.11 Statistische Analyse: p-Werte der experimentellen Messung im Zentrallabor</i>	79

Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer PD Dr. med. Philip Lang. Mit Geduld und Verständnis führte er mich an wissenschaftlich–exaktes Denken heran und gaben mir richtungsweisende Impulse für die klinisch-experimentelle Arbeit. Unter seiner Anleitung und konstruktiver Kritik lernte ich wissenschaftliches Arbeiten, von der Durchführung und Auswertung der Experimente bis hin zur kritischen Interpretation, Diskussion und Präsentation der Ergebnisse.

Herrn PD Dr. med. Philip Lang und Dr. med. Thomas Abahji möchte ich zudem herzlich für die sehr engagierte und differenzierte Korrektur dieser Arbeit danken.

Ich danke Herrn PD Dr. med. Dominik Irnich, Leiter der Interdisziplinären Schmerzambulanz der Ludwig-Maximilians-Universität München. Durch die Aufnahme und Integration in seine Abteilung ermöglichte er mir die Arbeit in kooperativer und motivierender Atmosphäre. Insbesondere danke ich Herrn Dr. med. Fleckenstein, Frau Dr. med. Bittersohl und den Mitarbeitern des Sekretariates für die Unterstützung in der Vorbereitung und während den Versuchen.

Desweiteren möchte ich mich bei Herr Prof. Dr. med. Ulrich Hoffmann, Leiter der Angiologie- Interdisziplinäres Gefäßzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München, seinen Mitarbeitern und im speziellen bei Herr Dr. med. Thomas Abahji für die Rekrutierung, fachliche Unterstützung und Betreuung der Patienten bedanken.

Herr Prof. Dr. med. Manfred Thiel und Frau PD Dr. Dr. Simone Kreht danke ich für das Wissen und die Unterstützung in der Bestimmung von Adenosin.

Ich danke Herr Dr. med. MPH Alexander Crispin für die Unterstützung in der statistischen Auswertung.

Außerdem möchte ich den medizinisch technischen Angestellten der genutzten Labore danken. Ihre Unterstützung und Hilfe haben maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Zuletzt möchte ich meiner Mutter, Simone Freiberg, meinen Großeltern Frida und Kurt Dietschi und meinen engen persönlichen Freunden, Catalina Meßmer und Carlos Wilkening für die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit danken.