

Medizinische Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin  
dem Institut für Physiologie  
Direktor: Prof. Dr. A. R. Pries

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
Doctor rerum medicarum  
Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

Interaktion hämodynamischer und metabolischer  
Parameter bei Angiogenese und Angioadaptation

vorgelegt von  
Beata Styp-Rekowska  
aus Szczecin

Referent: Prof. Dr. A. R. Pries  
Korreferent 1: Prof. Dr. U. Kintscher  
Korreferent 2: Prof. Dr. M. Sperandio

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 19.03.2010

**Meinen Grossvätern**

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Abstract</b>	<b>5</b>
<b>2. Einleitung und Zielstellung</b>	<b>6</b>
<b>3. Methoden und Ergebnisse</b>	<b>10</b>
<b>3.1</b> Entwicklung und Validierung einer nichtinvasiven spektrophotometrischen Methode zur Messung und 2D Darstellung der Sauerstoffsättigung und des Hämatokrits (Styp-Rekowska et al. <i>Microcirculation</i> . 2007)	<b>10</b>
<b>3.2</b> Deformation und laterale Migration der Erythrozyten (Secomb et al. <i>Ann Biomed Eng</i> . 2007)	<b>14</b>
<b>3.3</b> Analyse der Genexpression in terminalen Gefäßnetzwerken/ Funktion von ADAMTS1 (Disassa et al. <i>Physiol Res</i> . 2008; ) (Hohberg et al. <i>J. of Cell. Physiology</i> . 2009; submitted)	<b>15</b>
<b>4. Diskussion</b>	<b>16</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>18</b>
<b>6. Summary</b>	<b>19</b>
Ausblick	
Literaturverzeichnis	
Erklärung an Eides Statt	
Erklärung über Anteil an Publikationen	
Verzeichnis eigener Publikationen, Abstrakts, Vorträge, Preise	
Lebenslauf	
Danksagung	

## 1. Abstract

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen mit einem Anteil von ca. 47% die häufigste Todesursache in Deutschland dar. Die Ursachen für diese Erkrankungen, wie Herzinfarkt, koronare Herzkrankheit oder periphere arterielle Verschlusskrankheit sind vielseitig und werden durch sogenannte kardiovaskuläre Risikofaktoren begünstigt. Dazu zählen unter anderem Bluthochdruck (Hypertension), erhöhter Cholesterinspiegel oder Diabetes. Pathologische Veränderungen führen unter anderem zu Einengungen der Gefäße (Atherosklerose) und endothelialer Dysfunktion mit gestörter Regulation des Gefäßtonus. Dies kann eine Sauerstoffminderversorgung und Funktions-einschränkung zur Folge haben. Daher ist es von grossem Interesse die vaskuläre Adaptationsprozesse und ihre Beziehung zur lokalen Sauerstoffversorgung und korrelierende Parameter qualitativ und quantitativ zu beschreiben. Zu diesem Zweck wurden in unserer Arbeitsgruppe experimentelle und analytische Techniken konzipiert und eingesetzt. So zum Beispiel die *in vivo* Bestimmung des Gefäßdurchmessers, der Blutgeschwindigkeit sowie mathematische Modelle für die Simulation vaskulärer Anpassungsreaktionen (Angioadaptation). In Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode zur Sauerstoffsättigung (**SO<sub>2</sub>**)- und Hämatokrit (**Hkt**)-Darstellung *in vivo* entwickelt und etabliert. Mit diesem Ansatz ist es möglich, 2D Bilder von **SO<sub>2</sub>** und **Hkt** unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen zu erstellen. So können chronische Veränderungen der Gewebsversorgung mit einer hohen räumlichen Auflösung (bis auf ~1µm) verfolgt und die ausgelösten vaskulären Anpassungsreaktionen analysiert werden.

## 2. Einleitung und Fragestellung

Das Herz-Kreislauf-System sichert für das Überleben eines Organismus essenzielle Grundlagen, wie die Versorgung von Geweben mit Sauerstoff und der Transport von Nährstoffen. Es wird als das erste funktionsfähige Organsystem gebildet und die Kontrollmechanismen der Gefäßbildung und -reifung variieren abhängig von dem Entwicklungsstadium<sup>1, 2</sup>. In der frühen embryonalen Phase, wird die Gefäßausbildung primär genetisch molekular kontrolliert. Während der sogenannten Vaskulogenese entstehen Blutgefäße *de novo* aus undifferenzierten mesodermalen Vorläuferzellen und bilden ein primitives Gefäßgeflecht. Basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) fördert Expression von vaskulärem Endothelial-Wachstumsfaktor (VEGF)-Rezeptor-2, welcher die Differenzierung der Vorläuferzellen zu Angioblasten und Endothelzellen steuert. Die Endothelzellen ihrerseits exprimieren den VEGF-Rezeptor-1, der die Bildung tubulärer Strukturen unterstützt, und tragen zur Formation des ersten Gefäßplexus bei<sup>1, 3, 4</sup>.

Der darauf folgende Prozess der Angiogenese beinhaltet die Remodelierung des Plexus zu einem vielschichtigen vaskulären Netzwerk mit arteriellen und venösen Ästen durch Vorgänge wie Kapillarsprossung (sprouting), Elimination von überflüssigen Gefäßen (pruning) oder Intussuszeption<sup>1, 5</sup>. Mit der Etablierung des Blutflusses werden die angiogenen und angioadaptiven Prozesse der Bildung und Ausdifferenzierung der Gefäße neben den molekularen auch durch hämodynamische (Wandschubspannung  $\tau$ , Wandspannung  $\sigma$ ) Stimuli beeinflusst<sup>1, 3, 6</sup>.

Ab diesem Zeitpunkt bestimmt ein komplexes Zusammenwirken molekularer, hämodynamischer und metabolischer Faktoren die Form des Gefäßnetzwerkes und den Gleichgewichtszustand als Anpassung an die funktionelle Anforderungen<sup>6, 7</sup>. In adulten Netzwerken sind vaskuläre Reaktionen auf diese Stimuli die Grundlage der strukturellen vaskulären Anpassung, der sog. Angioadaptation (Abb.1). Veränderungen in der Anzahl der Gefäße (Angiogenese), des Gefäßdurchmessers, der Wanddicke und der Länge (Remodelling) können sowohl unter physiologischen (z.B. Entwicklung, Wachstum) als auch unter pathophysiologischen Bedingungen (kardiovaskuläre Erkrankungen, malignes Wachstum) beobachtet werden.

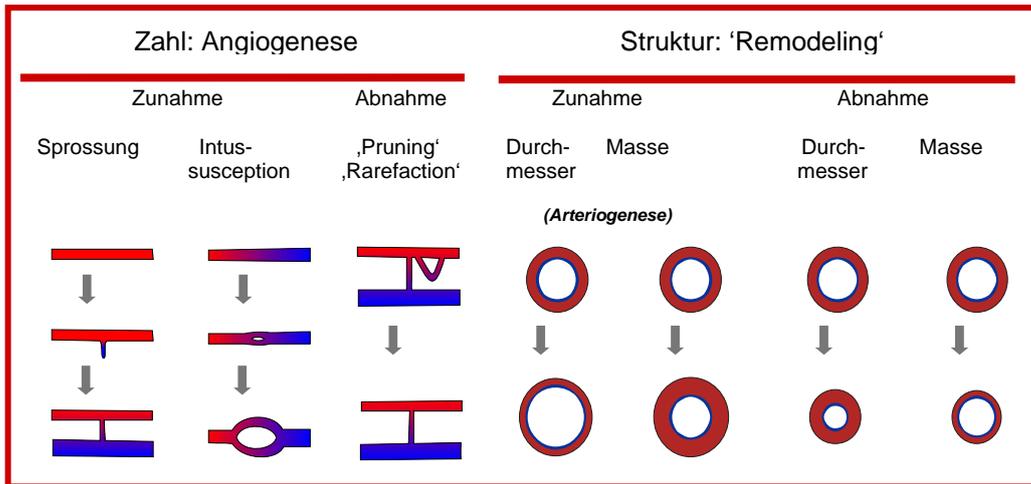


Abb.1 Konzept der Angioadaptation: Gefäß-Struktur und –Zahl unterliegen einer kontinuierlichen Anpassung an Hämodynamik und Gewebefunktion (nach Zakrzewicz et al. *News Physiol Sci*, 2002)

Um diese Zusammenhänge zu verdeutlichen wurde ein Model entwickelt (Abb.2), welches integrativ vaskuläre Reaktionen auf die Veränderungen der Hämodynamik und Metabolik darstellt.

Eine besonders enge Korrelation besteht zwischen dem Funktionszustand der Gewebe und den versorgenden Mikrozirkulationsgefäßen: nur wenn ein angemessenes Sauerstoffangebot durch den Blutkreislauf bereitgestellt wird, kann die für die Strukturerhaltung und Funktionen der Zellen benötigte Energie durch den aeroben Stoffwechsel gewonnen werden. Vice versa werden Durchblutung, Gefäß-neubildung und -wachstum durch eine Vielzahl vasoaktiver Faktoren beeinflusst, die in Abhängigkeit von lokaler Sauerstoffverfügbarkeit und Stoffwechsellage der Gewebe gebildet werden.

Das Hauptziel dieser Arbeit war die Vertiefung unserer Kenntnisse über die Bedeutung und Interaktionen metabolischer, hämodynamischer und rheologischer Parameter für die Adaptation von Gefäßnetzwerke. Besonderes Augenmerk galt der Metabolik mit dem Fokus auf der Sauerstoffversorgung. Daraus ergab sich die Notwendigkeit das Sauerstoff-angebot und -verteilung qualitativ und quantitativ hochauflösend darzustellen.

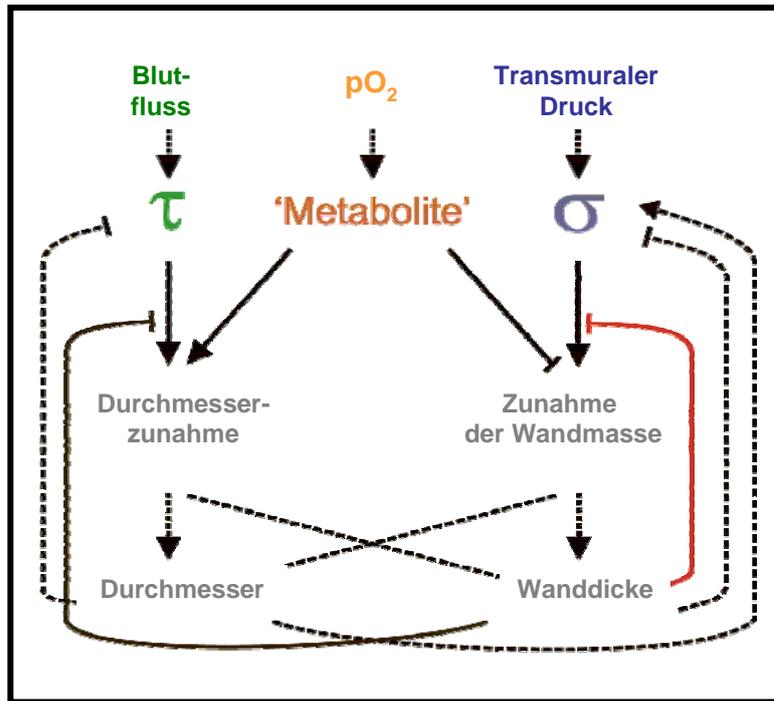


Abb.2 Integratives Model angioadaptiver Prozesse: Steigerung des Blutflusses und/oder der Wandschubspannung ( $\tau$ ) führt zu einer Durchmesservergrößerung (links); Erhöhung des transmuralen Druckes und/oder der Wandspannung ( $\sigma$ ) bewirkt die Verdickung der Wandmasse; metabolische Faktoren, u.a. das Sauerstoffangebot verursachen die Erhöhung des Gefäßdurchmessers bei gleichzeitiger Abnahme der Wanddicke (gestrichelte Linien: physikalische Zusammenhänge; durchgezogene Linien: biologische Reaktionen; nach Pries et al. *Hypertension*,2005).

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Messverfahren zur Untersuchung der Sauerstoffkonzentration publiziert. Direkte Messungen des Sauerstoffpartialdrucks können u.a. mittels polarographischen Mikroelektroden oder dem Phosphoreszenz-Auslöschungsverfahren (phosphorescence quenching) durchgeführt werden. Vorteil dieser Methoden ist, dass sie eine Bestimmung des Sauerstoffpartialdrucks sowohl in Gefäßen als auch im extravasalen Gewebe erlauben. Als nachteilig jedoch ist die Tatsache zu bewerten, dass es sich um teilweise invasive oder auch sauerstoffverbrauchende Verfahren handelt. Diesbezüglich stellen spektrophotometrische Messverfahren, welche auf den spezifischen Absorptionseigenschaften von Oxy- und Desoxy-Hämoglobin beruhen, eine gute Alternative dar. Sie sind nicht invasiv und ermöglichen im Prinzip eine hochauflösende mehrdimensionale Darstellung von intravaskulären Sauerstoffsättigungen. Allerdings gibt es bisher kaum Verfahren die 2D Bilder liefern und die erreichte Auflösung in Bezug auf Sauerstoffsättigung und räumliche Verteilung ist nicht zufriedenstellend. Aus diesem Grund wurde ein Verfahren entwickelt und etabliert, das ermöglicht Sauerstoffsättigungsprofile in den Mikrogefäßen *in vivo* zweidimensionell zu erstellen und zu analysieren. Das Verfahren

kann auf experimentelle Modelle wie Mesenterium der Ratte, Rückenhautkammer der Maus, Dottersackgefäße im Hühnerembryo, Mauslunge angewendet werden.

Des Weiteren wurde ein Computermodell erstellt mithilfe dessen rheologische Parameter, in diesem Fall die Deformierung und die radiale Migration der Erythrozyten, beschrieben werden können. Theoretische Modelle tragen durch die quantitative Beschreibung involvierter Mechanismen und Erfassung komplexer Beziehungen zwischen der Steuerung auf der Mikrozirkulationsebene und metabolischer Leistung und Perfusion im ganzen Gewebe zu einem besseren Verständnis der Blutflussregulation und der Adaptationvorgänge bei.

Hämodynamische und metabolische Interaktionen und Stimuli entfalten ihre Wirkung für die Angioadaptation durch Modifikation der Genexpression. Die Muster aktivierter Gene und produzierter Proteine bestimmen hierbei spezifische mikrovaskuläre Reaktionen. Daher wurde zusätzlich als drittes Projekt die Expression einiger für die Angioadaptation relevanter Gene in einzelnen Mikrogefäßen aus Rattenmesenterien sowie aus humanen Nabelschnurvenen isolierten Zellen analysiert.

### **3. Methoden und Ergebnisse**

#### **3.1. Entwicklung und Validierung einer nichtinvasiven spektrophotometrischen Methode zur Messung und 2D Darstellung der Sauerstoffsättigung und des Hämatokrits. (Publikation 1)**

##### **3.1.1 Referenzspektren**

Das entwickelte spektrophotometrische Verfahren basiert auf der Annahme, dass im zirkulierenden Blut beide Hämoglobinformen (Oxy- und Desoxyhämoglobin) vorkommen und im Sinne einer linearen Mischung das beobachtete Absorptionsspektrum des Blutes bestimmen. Dadurch ist es möglich die aktuelle Sauerstoffsättigung ( $SO_2$ ) des Hämoglobins (Hb) über die Ermittlung der Menge von oxygeniertem bzw. nicht oxygeniertem Hb durch Vergleich mit Referenzspektren für 0%  $SO_2$  und 100%  $SO_2$  zu errechnen. Es wurden mehrere Sätze von Absorptionsspektren verglichen: für gelöstes Hämoglobin, erstellt im Photometer und Erythrozytensuspension, untersucht mikroskopisch durch Perfusion von Glaskapillaren mit unterschiedlichen Durchmessern. Die Absorption der Erythrozytensuspension war deutlich höher als die der homogenen Flüssigkeit, dafür aber zeigte die Absorptionkurve eine relativ niedrige Modulation im Verlauf, besonders in den größeren Glaskapillaren. Es zeigte sich, dass für die Analyse experimenteller Daten *in vivo* am besten die mit Erythrozytensuspension erstellten Referenzen geeignet sind.

##### **3.1.2 Validierung der Mess- und Analyseparameter**

Die Auswirkungen der benutzten Anzahl von Wellenlängen, der Größe des untersuchten Areals, sowie der Belichtungszeitdauer auf die Genauigkeit der  $SO_2$ -Werte wurden systematisch überprüft. Mit steigender Belichtungszeit und Größe des analysierten Bereiches nahm die Variabilität der Ergebnisse deutlich ab. Die Anzahl benutzter Wellenlängen hatte dagegen einen geringeren Einfluss auf die Resultate.

##### **3.1.3 Saturation of Oxygen Analysis Program (SOAP).**

Für eine typische  $SO_2$  Analyse wurden von einem mikroskopierte Gesichtsfeld jeweils 50 oder 76 Aufnahmen mit kontinuierlich ansteigender Wellenlänge (2nm pro Bild) im Spektralbereich von 500nm (480nm) bis 580nm (630nm) gemacht. Aufgenommene Lichtintensitätswerte wurden mit einer Auflösung von 12 Bit (=4095 diskrete Werte)

digitalisiert. Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte mittels einer Software (SOAP, eigene Entwicklung, Programmierplattform Delphi, Borland, USA). Hier wird für jedes Bildpixel von jedem einzelnen Bild eines Gesichtsfeldes die optische Dichte errechnet. In das Programm ist ein Fourier-Algorithmus integriert, der die durch die Atmung oder die Muskelkontraktionen verursachte Bewegung zwischen einzelnen Bildern korrigiert.. Ausgehend von diesen Datensätzen und unter Berücksichtigung der physikalischen Einfluss- und Störvariablen wie Streuung und Siebeffekt können die intravasalen Konzentrationsverhältnisse von Oxyhämoglobin und Desoxyhämoglobin durch 'linear mixing' bestimmt werden. Zur bildlichen Darstellung der Ergebnisse werden den unterschiedlichen Sauerstoffsättigungswerten verschiedene Farben einer Farbskala zugeordnet.

#### **3.1.4 Etablierung der Methode in verschiedenen Modellen.**

Drei verschiedene Modelle konnten zur Überprüfung der Methode benutzt werden: das Mesenterium der Ratte, die Rückenhautkammer der Maus und der Dottersackgefäßplexus im Hühnerembryo. Hierbei wurden neben der  $SO_2$  Analyse funktionale Messungen von Blutgeschwindigkeit und Gefäßdurchmesser durchgeführt. Im folgenden sind einige nicht publizierte Beispiele gezeigt. In Abbildung 3 ist ein Ausschnitt eines in der Rückenhautkammer analysierten Gefäßnetzwerkes zu sehen. Dabei wurden die einzeln aufgenommenen, benachbarten Gesichtsfelder anhand von Übersichtsaufnahmen zusammengefügt. Aufgrund der Unterschiede in der Morphologie, der Blutflussgeschwindigkeit sowie der Sauerstoffsättigung des Blutes kann klar zwischen Arteriolen, Venolen und Kapillaren unterschieden werden. Kennzeichnend für die Arteriole ist eine nahezu homogene Verteilung von annähernd vollständig sauerstoffgesättigtem Blut. Darüber hinaus ist ein longitudinaler Geschwindigkeitsgradient in der Arteriole festzustellen, mit höheren Fließgeschwindigkeiten des Blutes stromaufwärts, und mit geringeren Geschwindigkeitswerten stromabwärts. Mit zunehmender Annäherung an das Kapillarbett verlangsamt sich die Fließgeschwindigkeit durch abgehende, kleinere Gefäße.

Die Venolen weisen in Relation zu Arteriolen eine eher inhomogene Verteilung der Sauerstoffsättigung auf. Anders als in der Arteriole können in der untersuchten Venole radiale Sauerstoffsättigungsgradienten (Abb. 4A) beobachtet werden, die in longitudinaler Verlaufsrichtung über längere Strecken (bis zu 1mm) erhalten bleiben.

Die inhomogene Sauerstoffsättigung des Blutes innerhalb der Venole stellt sich bildlich als Sauerstoffsättigungsprofil (``Streamlines``) dar. Diese erscheinen in ihrer radialen Ausdehnung zum Teil scharf begrenzt.

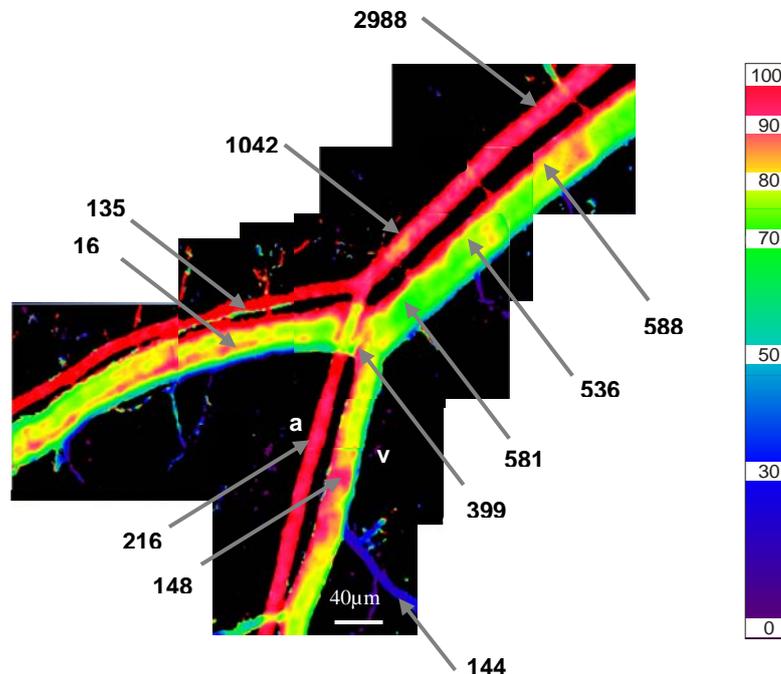


Abb.3: Gefäßnetzwerk in der Rückenmarkskammer einer Maus (10fache Vergrößerung). Die Auswertung erfolgte mithilfe des SOAP Software. Die grauen Pfeile geben die Blutflussgeschwindigkeit an ( $\mu\text{m/s}$ ). Die Farbleiste gibt die Sauerstoffsättigung in % an. a = Arteriole, v = Venole

Charakteristisch für den Verlauf des radialen Gradienten ist, dass die ``Streamlines``, welche die höchste Sauerstoffsättigung aufweisen, typischerweise an der Venolenwand liegen, die sich in direkter Nachbarschaft zur Arteriole befindet (Abb. 4B). Dabei weist das Blut dieser Strömungsbereichen ähnlich hohe Sättigungswerte wie das Hämoglobin der Arteriole auf. Die Sättigungswerte nehmen zur gegenüberliegenden Seite hin deutlich ab.

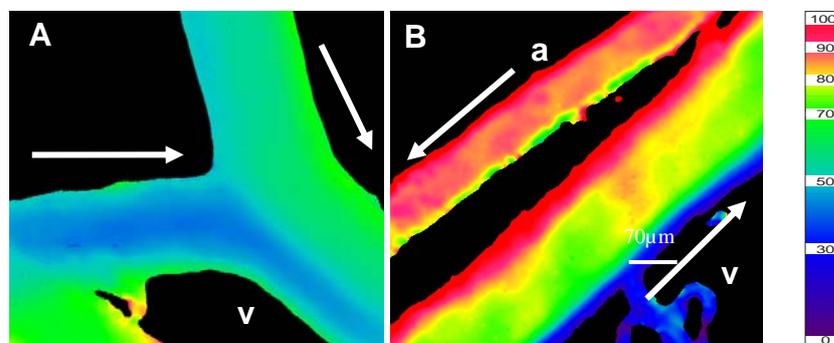


Abb.4: Gefäße in einer Rückenmarkskammer (20fache Vergrößerung). A: konvergierende Bifurkation einer Venole. B: ein Beispiel für einen radialen Gradienten der Sättigungswerte. Weisse Pfeile geben die Blutflussrichtung an. Die Farbleiste gibt die Sauerstoffsättigung in % an. a = Arteriole, v = Venole

Um die vaskuläre Adaptation und Remodellierung zu untersuchen wurden lokale Laser-Mikrogefäßokklusionen durchgeführt. Die Aufnahmen erfolgten unmittelbar nach der Okklusion. So konnte überprüft werden wie schnell sich die Sauerstoffverteilung ändert. In Abbildung 5B sieht man die Verteilung 5 min nach einer venösen Okklusion. Die Unterbindung des Blutflusses führt zur Erhöhung der Sättigungswerte in der Venole durch die Diffusion von der parallel verlaufenden Arteriole.

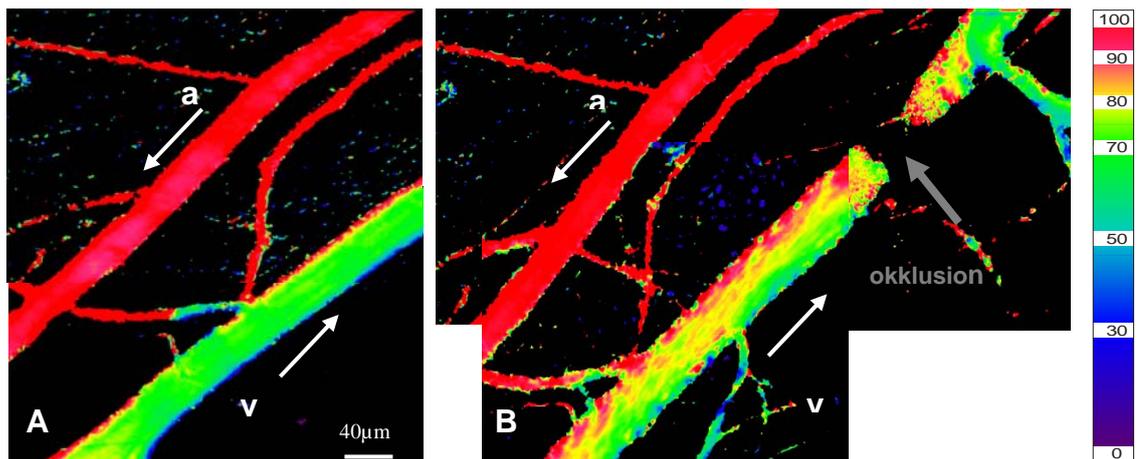


Abb.5: Lokale Okklusion in der Rückenmarkkammer mittels eines YAG-Lasers (10fache Vergrößerung). A: vor Okklusion. B: 5 min nach Okklusion. Die weißen Pfeile geben die Blutflussgeschwindigkeit an ( $\mu\text{m/s}$ ). Die Farbleiste gibt die Sauerstoffsättigung in % an. a = Arteriole, v = Venole

Ein besonders interessantes Model stellt der Hühnerembryo dar. Hier wurden mehrere Gefäße im Dottersack eines 72h alten Embryos vor und nach einer Ligation der Vitellinarterie aufgenommen. Unter normalen physiologischen Bedingungen ist die  $\text{SO}_2$  in den Venolen höher (ca. um 15%) als in den Arteriolen. Nach Ligation einer Vitellinarterie bilden sich kollaterale Gefäße aus mit ähnlichen  $\text{SO}_2$ -Werten wie in Arteriolen. Demnach spielt der Sauerstoff für die Ausbildung Kollateralen eine geringe bis keine Rolle, die treibende Kraft ist der Blutfluss.

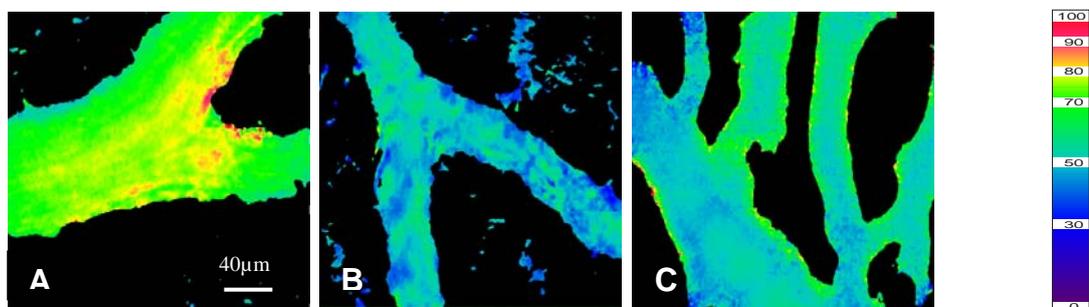


Abb.6: Venole (A) und Arteriole (B) im Dottergefäßnetzwerk eines 3 Tage alten Hühnerembryo (10fache Vergrößerung).  $\text{SO}_2$  ist deutlich niedriger in der Arteriole. C: kollaterale Arteriolen, die Sauerstoffsättigung steigt unwesentlich. Die Farbleiste gibt die Sauerstoffsättigung in % an

### 3.2 Deformation und laterale Migration der Erythrozyten. (Publikation 2)

Basierend auf den experimentellen Daten wurde das mathematische Modell entwickelt, welches das zu erwartende biomechanische Verhalten der roten Blutzellen unter wechselnden Bedingungen vorhersagt. Simulation der Bewegung im Fluss mit einfacher Scherrate und hoher Viskosität zeigte ein Phänomen welches als "tank-treading" beschrieben wurde. Hier bleiben die Form und die Orientierung der Zellen zeitlich konstant, jedoch bewegt sich die sie umgebende Membran wie die Kette eines Raupenfahrzeuges um die eingeschlossene Flüssigkeit. Auf diese Weise wird eine transverse Bewegung erzeugt. Ein wesentlicher Punkt der mit dieser Methode analysiert wurde ist die radiale Dislokation von der Wand in die Strömungsmitte nach einer Bifurkation. Durch die Strömungsverteilung gelangen viele Zellen in Kontakt zu Endotheloberfläche in der Nähe des Strömungsteilers. Von dieser Position erreichen sie innerhalb von 50ms nach 60µm langer Distanz die Mittelachse. Diese Ergebnisse zeigen eine sehr hohe Übereinstimmung mit den *in vivo* Beobachtungen.

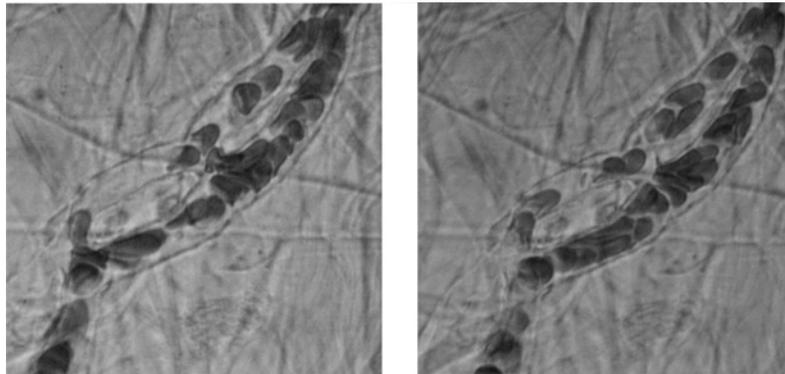


Abb.7: Erythrozyten Deformation in den mesenterialen Mikrogefäßen (100fache Vergrößerung).

### **3.3 Analyse der Genexpression in terminalen Gefäßnetzwerken/Funktion von ADAMTS-1. (Publikation 3 und 4)**

Arterien und Venen werden in unterschiedlichem Maße von hämodynamischen und metabolischen Faktoren beeinflusst. Diese Tatsache äussert sich in jeweils charakteristischen Genexpressionsprofilen sowie angioadaptiven Reaktionen. Vier ausgewählte, für die Angioadaptation relevante, Gene wurden analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von VEGF-A, TIE2 und ANG2 in den Arterien signifikant höher ist als in den Venen. Die Expression von ADAMTS-1 ist unter normalen physiologischen Bedingungen in beiden Gefäßarten gleich. Weitere Untersuchungen zeigten, dass eine Steigerung der Wandschubspannung (Kegel-Platte-Experimente) innerhalb von 8h zur vermehrten Genexpression von ADAMTS-1 führt und bis 48h auf einem hohen Niveau anhält. Durch Anhalten der Kegel-Rotation simulierte Gefäßokklusion verursachte eine Verminderung der Expression, nach ca. 4h sank sie auf das Kontrollniveau herab. Unter hypoxischen Bedingungen konnte ADAMTS-1 kaum detektiert werden, erhöhter  $pO_2$  steigerte zusätzlich den Effekt von vermehrter Schubspannung.

#### 4. Diskussion

Das Hauptziel der vorgelegten Arbeit war es, ein nichtinvasives zweidimensionales Verfahren zur Bestimmung von Sauerstoffsättigung ( $SO_2$ ) und Hämatokrit in den Mikrogefäßen zu entwickeln. Die in Publikation 1 vorgestellte Methode erfüllt diese Voraussetzungen und kann in der Intravitalmikroskopie für unterschiedliche Modelle eingesetzt werden. Ein Algorithmus für automatische Segmentation erkennt alle Gefäßarten (Bereiche, die Hämoglobin enthalten) und kann sie sehr gut vom Hintergrund (Bereiche ohne Hämoglobin) unterscheiden. Die zweidimensionalen  $SO_2$ -Bilder zeigen deutliche Differenzen in der Oxygenierung zwischen Arteriolen, Venolen und Kapillaren, ebenso wie die prozentuale Abnahme des  $SO_2$ -Wertes entlang der arteriellen Gefäße. Die Hämatokritwerte bleiben konstant in den Abschnitten zwischen den Bifurkationen, weisen aber beträchtliche Abweichungen von Gefäßsegment zu Gefäßsegment auf.

In Wandnähe sind die bestimmten  $SO_2$ - und Hämatokrit-Werte instabil. Dies wird wahrscheinlich durch eine geringere Menge an roten Blutzellen und den optischen Einfluss des angrenzenden Gewebes verursacht. Die Fließeigenschaften und die radiale Verteilung der roten Blutzellen spielen dabei eine entscheidende Rolle. Intravaskulär ist die Distribution des Hämatokrits nicht homogen, sondern höher in der Mitte und niedriger an der Wand, so dass dort eine zellfreie Zone entsteht. Diese Zone trägt wesentlich zu der Regulation des Strömungswiderstandes und der Variabilität des Viskositätswertes in den Gefäßen, abhängig von deren Volumina, bei. Die Reduktion des Hämatokrits in Wandnähe entsteht aufgrund der Neigung der Erythrozyten zur lateralen Migration (quer zum Blutstrom) in die Mitte der Gefäße. Dieses Phänomen führt zu einer ungleichen Verteilung der Blutzellen an divergierenden Bifurkationen (Publikation 2), so steigt der Hämatokritwert in den Abzweigungen mit höherem Blutfluss an. Auf diese Weise entsteht durch das biomechanische Verhalten der roten Blutzellen eine heterogene  $O_2$ -Verteilung in der Mikrozirkulation. Die Kenntnisse über dieses Verhalten und die Konsequenzen daraus können mithilfe des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten mathematischen Modells vertieft werden. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Regulation der vaskulären Reaktionen auf metabolische und hämodynamische Stimuli (u.a.  $SO_2$  und Wandschubspannung). Hierfür ist die Genexpression einiger für die Angioadaptation relevanten Gene untersucht worden (Publikation 3 und 4). Der Befund, dass die Expression von VEGF-A, TIE2 und ANG2

im normalen physiologischen Zustand in den Arterien höher ist als in den Venen korreliert mit den unterschiedlichen Bedingungen denen Arterien und Venen bezüglich Metabolik und Hämodynamik ausgesetzt sind. Auch ADAMTS-1 wird durch die Schubspannung moduliert. Allerdings führen schon relativ niedrige Scherkräfte (ab  $6\text{dyn/cm}^2$ ) zur Induktion der Expression, daher detektieren wir gleich hohe Expression in Arterien und Venen. Die differentielle Genexpression in den Arterien und Venen trägt also unter physiologischen aber auch unter pathophysiologischen Bedingungen zur angioadaptiven Steuerung bei.

Betrachtet man die komplexen Interaktionen zwischen den genetischen, metabolischen und hämodynamischen Faktoren, so wird klar, dass nur integrative Herangehensweisen, auf allen Ebenen, weiteren Fortschritt in der Erforschung der Angioadaptation gewährleisten können.

## 5. Zusammenfassung

Die strukturelle Adaptation der Gefäßbetten ist mit funktioneller Anpassung, bedingt durch Interaktionen rheologischer, metabolischer, hämodynamischer und molekularer Faktoren, assoziiert. Infolgedessen wachsen Gefäße oder werden zurückgebildet, was eine sich ständig ändernde Sauerstoffverteilung zur Folge hat. Aufgrund der engen Beziehung zwischen dem Sauerstoffangebot und der Angioadaptation, ist die Bestimmung lokaler Sauerstoffkonzentration von sehr großer Bedeutung. Um die lokale Sauerstoffsättigung ( $SO_2$ ) messen zu können, wurde eine nichtinvasive multispektrale Methode entwickelt. Dieses Verfahren macht sich die Unterschiede in den Absorptionscharakteristika zwischen Oxy- und Desoxyhämoglobin für die Messung von  $SO_2$  und Hämatokrit während Intravitalmikroskopie zunutze. Die Sauerstoffsättigung und der Hämatokrit wird zweidimensional kartiert, die Kalkulation der Werte und die Erstellung der Bilder erfolgt mithilfe einer Software, die speziell zu diesem Zweck entwickelt wurde (**S**aturation of **O**xygen **A**nalysis **P**rogram=**SOAP**). Weiterhin wurde ein mathematisches Modell ausgearbeitet, das die Flusseigenschaften der roten Blutzellen beschreibt. Eine Analyse ausgewählter, für die Angioadaptation relevanter, Gene wurde durchgeführt.

## 6. Summary

The structural adaptation of vascular beds is associated with functional alignment caused by the interaction of hemorheology, metabolics, hemodynamics and gene expression. In consequence, vessels grow or degenerate, resulting in an altered oxygen distribution in vascular networks. Because of the close connection between oxygen availability and angioadaptation, the local oxygen saturation in microvessels is of prime importance for intravital studies in terminal vascular beds. In order to obtain vital status of tissues at the local level a non invasive multispectral approach was developed. This method based on differences in absorption spectra between oxygenated and deoxygenated haemoglobin and allows oxygen saturation ( $SO_2$ ) and hematocrit measurement during trans- and epi-illumination intravital microscopy. The  $SO_2$  and hematocrit values as 2D map of area under investigation could be calculated using for this purpose developed analysis software (SOAP). This technique allows generation of intravascular  $SO_2$  and hematocrit images for all vessels in a microscopic field of view *in vivo* in different tissues and under different conditions. Furthermore a two-dimensional computer simulation to predict trajectories of single red blood cells was developed, since rheological behaviour of erythrocytes influence oxygen distribution. Supplementary an analysis angioadaptation related genes VEGFA, TIE2, ANG2 and ADAMTS was carried out.

## **Ausblick**

Seit der Veröffentlichung der vorgestellten Publikationen wurden zu dem übergreifenden Thema: „Interaktion hämodynamischer und metabolischer Parameter bei Angiogenese und Angioadaptation“, basierend auf den im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methoden, weitere Projekte durchgeführt.

Folgende Publikationen dieser Arbeiten sind in Vorbereitung:

1. B. Styp-Rekowska et al. **Gradients of oxygen saturation: Inhomogeneous distribution at the level of microcirculation.**
2. A. Tabuchi and B. Styp-Rekowska et al. **2D-mapping of oxygen uptake in the lung.**
3. H. Habazettl et al. **A shear cone device to apply realistic pulsatile shear profiles to cultured cells**
4. I. Buschmann and A. R. Pries et al. **Flow driven arteriogenesis: morphology, mechanism and molecules.**

## Literaturliste

- (1) Zakrzewicz A, Secomb TW, Pries AR. Angioadaptation: keeping the vascular system in shape. *News Physiol Sci* 2002 October;17:197-201.
- (2) Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000 September 14;407(6801):242-8.
- (3) Ie NF, Fleury V, Pries A, Corvol P, Eichmann A, Reneman RS. Control of arterial branching morphogenesis in embryogenesis: go with the flow. *Cardiovasc Res* 2005 February 15;65(3):619-28.
- (4) Ie NF, Klein C, Tintu A, Pries A, Buschmann I. Neural guidance molecules, tip cells, and mechanical factors in vascular development. *Cardiovasc Res* 2008 May 1;78(2):232-41.
- (5) Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000 April;6(4):389-95.
- (6) Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. Design principles of vascular beds. *Circ Res* 1995 November;77(5):1017-23.
- (7) Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. Relationship between structural and hemodynamic heterogeneity in microvascular networks. *Am J Physiol* 1996 February;270(2 Pt 2):H545-H553.
- (8) Skalak TC, Price RJ. The role of mechanical stresses in microvascular remodeling. *Microcirculation* 1996 June;3(2):143-65.
- (9) Pries AR, Secomb TW. Microvascular adaptation--regulation, coordination and function. *Z Kardiol* 2000;89 Suppl 9:IX/117-IX/120.
- (10) Pries AR, Reglin B, Secomb TW. Structural adaptation of microvascular networks: functional roles of adaptive responses. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001 September;281(3):H1015-H1025.
- (11) Pries AR, Reglin B, Secomb TW. Remodeling of blood vessels: responses of diameter and wall thickness to hemodynamic and metabolic stimuli. *Hypertension* 2005 October;46(4):725-31.
- (12) Tsai AG, Johnson PC, Intaglietta M. Oxygen gradients in the microcirculation. *Physiol Rev* 2003 July;83(3):933-63.
- (13) Pittman RN, Duling BR. Oxygen sensitivity of vascular smooth muscle. I. In vitro studies. *Microvasc Res* 1973 September;6(2):202-11.
- (14) Pittman RN. Oxygen transport and exchange in the microcirculation. *Microcirculation* 2005 January;12(1):59-70.

- (15) Duling BR, Damon DN, Donaldson SR, Pittman RN. A computerized system for densitometric analysis of the microcirculation. *J Appl Physiol* 1983 August;55(2):642-51.
- (16) Torres F, I, Terner J, Pittman RN, Proffitt E, Ward KR. Measurement of hemoglobin oxygen saturation using Raman microspectroscopy and 532-nm excitation. *J Appl Physiol* 2008 June;104(6):1809-17.
- (17) Pries AR, Kanzow G, Gaehtgens P. Microphotometric determination of hematocrit in small vessels. *Am J Physiol* 1983 July;245(1):H167-H177.
- (18) Pries AR. Differential spectrophotometry for the determination of oxygen saturation and hematocrit in microvessels. *Microvasc Res* 1985 September;30(2):249-50.
- (19) Pittman RN, Duling BR. A new method for the measurement of percent oxyhemoglobin. *J Appl Physiol* 1975 February;38(2):315-20.
- (20) Pittman RN, Duling BR. Measurement of percent oxyhemoglobin in the microvasculature. *J Appl Physiol* 1975 February;38(2):321-7.
- (21) Pittman RN. In vivo photometric analysis of hemoglobin. *Ann Biomed Eng* 1986;14(2):119-37.
- (22) Pittman RN, Golub AS, Popel AS, Zheng L. Interpretation of phosphorescence quenching measurements made in the presence of oxygen gradients. *Adv Exp Med Biol* 1998;454:375-83.
- (23) Lipowsky HH, Usami S, Chien S, Pittman RN. Hematocrit determination in small bowel bore tubes from optical density measurements under white light illumination. *Microvasc Res* 1980 July;20(1):51-70.
- (24) Kanzow G, Pries AR, Gaehtgens P. Analysis of the hematocrit distribution in the mesenteric microcirculation. *Int J Microcirc Clin Exp* 1982;1(1):67-79.
- (25) Golub AS, Pittman RN. PO<sub>2</sub> measurements in the microcirculation using phosphorescence quenching microscopy at high magnification. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008 June;294(6):H2905-H2916.
- (26) Ellsworth ML, Pittman RN. Videodensitometric determination of oxyhemoglobin saturation (SO<sub>2</sub>) in muscle capillaries. *Adv Exp Med Biol* 1986;200:1-11.
- (27) Ellis CG, Ellsworth ML, Pittman RN. Determination of red blood cell oxygenation in vivo by dual video densitometric image analysis. *Am J Physiol* 1990 April;258(4 Pt 2):H1216-H1223.
- (28) ABE T. [POLAROGRAPHIC OXYGEN MEASUREMENT IN THE CEREBRAL TISSUE.]. *Tohoku Igaku Zasshi* 1963 April;67:445-58.
- (29) McGuire BJ, Secomb TW. A theoretical model for oxygen transport in skeletal muscle under conditions of high oxygen demand. *J Appl Physiol* 2001 November;91(5):2255-65.

- (30) Parthimos D, Osterloh K, Pries AR, Griffith TM. Deterministic nonlinear characteristics of in vivo blood flow velocity and arteriolar diameter fluctuations. *Phys Med Biol* 2004 May 7;49(9):1789-802.
- (31) Pries AR, Reglin B, Secomb TW. Structural response of microcirculatory networks to changes in demand: information transfer by shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003 June;284(6):H2204-H2212.
- (32) Pries AR, Secomb TW. Modeling structural adaptation of microcirculation. *Microcirculation* 2008 November;15(8):753-64.
- (33) Pries AR, Cornelissen AJ, Sloot AA et al. Structural adaptation and heterogeneity of normal and tumor microvascular networks. *PLoS Comput Biol* 2009 May;5(5):e1000394.
- (34) Secomb TW, Skalak R. A two-dimensional model for capillary flow of an asymmetric cell. *Microvasc Res* 1982 September;24(2):194-203.
- (35) Secomb TW. Mechanics of blood flow in the microcirculation. *Symp Soc Exp Biol* 1995;49:305-21.
- (36) Secomb TW, Pries AR. Information transfer in microvascular networks. *Microcirculation* 2002 October;9(5):377-87.
- (37) Secomb TW, Hsu R, Pries AR. Blood flow and red blood cell deformation in nonuniform capillaries: effects of the endothelial surface layer. *Microcirculation* 2002 July;9(3):189-96.
- (38) Secomb TW, Styp-Rekowska B, Pries AR. Two-dimensional simulation of red blood cell deformation and lateral migration in microvessels. *Ann Biomed Eng* 2007 May;35(5):755-65.
- (39) Secomb TW, Beard DA, Frisbee JC, Smith NP, Pries AR. The role of theoretical modeling in microcirculation research. *Microcirculation* 2008 November;15(8):693-8.
- (40) Secomb TW. Theoretical models for regulation of blood flow. *Microcirculation* 2008 November;15(8):765-75.
- (41) Skalak R. Theoretical models of capillary flow. *Blood Cells* 1982;8(1):147-52.
- (42) Skalak R. Theoretical modeling of fluid transport through endothelial junctions. *Adv Exp Med Biol* 1988;242:9-16.
- (43) Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003 June;9(6):653-60.
- (44) Da Silva-Azevedo L, Baum O, Zakrzewicz A, Pries AR. Vascular endothelial growth factor is expressed in endothelial cells isolated from skeletal muscles of nitric oxide synthase knockout mice during prazosin-induced angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 October 11;297(5):1270-6.

- (45) Unthank JL, Nixon JC, Burkhart HM, Fath SW, Dalsing MC. Early collateral and microvascular adaptations to intestinal artery occlusion in rat. *Am J Physiol* 1996 September;271(3 Pt 2):H914-H923.

## **Erklärung an Eides Statt**

Ich, Beata Styp-Rekowska, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Interaktion hämodynamischer und metabolischer Parameter bei Angiogenese und Angioadaptation“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift

8. 09. 2009

## Erklärung über Anteil an Publikationen

1. Beata Styp-Rekowska et al.: An Imaging Spectroscopy Approach for measurement of oxygen saturation and hematocrit during intravital microscopy. *Microcirculation* 2007 (80%)

IF: 3.5

2. Timothy W. Secomb, Beata Styp-Rekowska and Axel R. Pries: Two-Dimensional simulation of red blood cell deformation and lateral migration in microvessels. *Annals of Biomedical Engineering* 2007 (30%)

IF: 2.6

3. Mecha Disassa N., Beata Styp-Rekowska et al.: Differential expression of VEGFA, TIE2, and ANG2 but not ADAMTS1 in rat mesenteric microvascular arteries and veins. *Physiological Research* 2008 (40%)

IF: 2.3

4. Hohberg et al.: Expression of ADAMTS1 in endothelial cells is induced by shear stress and suppressed in sprouting capillaries. *J. Of Cell. Physiology*. 2009; eingereicht (10%)

IF: 4.3

## **BEATA STYP-REKOWSKA**

---

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Publikationen

---

1. **Beata Styp-Rekowska** et al.: An Imaging Spectroscopy Approach for measurement of oxygen saturation and hematocrit during intravital microscopy. *Microcirculation* 2007
2. Timothy W. Secomb, **Beata Styp-Rekowska** and Axel R. Pries: Two-Dimensional simulation of red blood cell deformation and lateral migration in microvessels. *Annals of Biomedical Engineering* 2007
3. Mecha Disassa N., **Beata Styp-Rekowska** et al.: Differential expression of VEGFA, TIE2, and ANG2 but not ADAMTS1 in rat mesenteric microvascular arteries and veins. *Physiological Research* 2008
4. Hohberg et al.: Connecting the regulation of angiogenesis to shear stress: A possible new role for ADAMTS1 *J. Of Cell. Physiology*. 2009; submitted

## Abstracts

---

### 2003

1. Hinz B, Disassa NM, **Styp-Rekowska B**, Pries AR: Laser-induced vessel occlusion with a standard YAG laser. Annual Meeting of German Society for Microcirculation and Vascular Biology, Munich, Germany, 2003. *Journal of Vascular Research* 2004; 41 (Suppl. 1):117

### 2004

1. **Styp-Rekowska B**, Reglin B, Disassa NM, Hinz B, Pries AR: A multispectral approach for oxygen saturation measurement during intravital microscopy. 83<sup>th</sup> Meeting of German Physiologic Society, Leipzig, Germany 2004. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, Vol. 447 (Suppl. 1):107
2. Disassa NM, **Styp-Rekowska B**, Zakrzewicz A, Hinz B, Pries AR: Quantitative analysis of endothelial specific gene expression in rat mesenteric microvessels. 83<sup>th</sup> Meeting of German Physiologic Society, Leipzig, Germany 2004. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, Vol. 447 (Suppl. 1):108
3. **Styp-Rekowska B**, Cornelissen AJM, Reglin B, Disassa NM, Hinz B, Pries AR: Measurement of oxygen saturation in mesenteric microvessels during intravital microscopy using a multispectral imaging system. 23<sup>th</sup> ECM Lissabon, Portugal 2004. *Journal of Vascular Research* 2004; 41 (Suppl. 2):24
4. Cornelissen AJM, **Styp-Rekowska B**, Sloot A, Secomb TW, Eichhorn M, Pries AR: Failing angioadaptation in tumor microcirculation. 23<sup>th</sup> ECM Lissabon, Portugal 2004. *Journal of Vascular Research* 2004; 41 (Suppl. 2):53
5. Hinz B, Disassa NM, **Styp-Rekowska B**, Pries AR: Adaptation of vascular diameter after microvascular occlusion in ear of the hairless mouse. Annual Meeting of German Society for Microcirculation and Vascular Biology, Berlin, Germany, 2004. *Journal of Vascular Research* 2004; 41:472

### 2005

1. **Styp-Rekowska B**, Disassa NM, Reglin B, Hinz B, Cornelissen AJM, Gossrau R, Pries AR: Approach for the analysis of short-term reactions of microvessel networks after vascular occlusion. 84<sup>th</sup> Meeting of German Physiologic Society, Göttingen, Germany 2005, *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, Vol. 449 (Suppl. 1):71
2. Zakrzewicz A, Bongrazio M, Knöchel J, **Styp-Rekowska B**, Da Silva-Azevedo L, Pries AR: Expression regulation of sprouting inhibitor ADAMTS-1 in vitro allows to predict its expression in the microcirculation

of the rat mesentery. Annual Meeting of German Society for Microcirculation and Vascular Biology, Rostock, Germany, 2005. Journal of Vascular Research 2006; 43:54

3. Disassa NM, Hinz B, **Styp-Rekowska B**, Da Silva-Azevedo L, Zakrzewicz A, Pries AR: Quantitative analysis of microvascular gene expression related to different cell layers in vessel wall. Annual Meeting of German Society for Microcirculation and Vascular Biology, Rostock, Germany, 2005. Journal of Vascular Research 2006; 43:53

#### 2006

1. **Styp-Rekowska B**, Reglin B, Disassa NM, Pries AR: Multispectral imaging of haemoglobin saturation and hematocrit. Joint Meeting of the German Physiologic Society and the Federation of European Physiologic Societies, Munich, Germany, 2006. Acta Physiol. 186 (Suppl. 1):70

2. Pries AR, **Styp-Rekowska B**, Disassa NM, Hinz B, Secomb TW: Endothelial surface layer and vascular flow resistance. Joint Meeting of the German Physiologic Society and the Federation of European Physiologic Societies, Munich, Germany, 2006. Acta Physiol. 186 (Suppl. 1): 203

3. Disassa NM, Hinz B, **Styp-Rekowska B**, Zakrzewicz A, Pries AR : Quantitative analysis of microvascular gene expression using real time duplex RT-PCR. Joint Meeting of the German Physiologic Society and the Federation of European Physiologic Societies, Munich, Germany, 2006. Acta Physiol. 186 (Suppl. 1): 257

4. Hinkeldey M, Ulm L, Pries AR., Cornelissen A, **Styp-Rekowska B**, Secomb TW: Tumor microcirculation and vascular adaptation. Joint Meeting of the German Physiologic Society and the Federation of European Physiologic Societies, Munich Germany, 2006. Acta Physiol. 186 (Suppl. 1): 195

5. **Styp-Rekowska B**, Reglin B, Disassa NM, Secomb TW, Pries AR: Measurement of hemoglobin saturation and hematocrit by a multispectral imaging approach. Experimental Biology, San Francisco, USA, 2006. Faseb Journal 2006; 20(5): LB17

6. Zakrzewicz A, Bongrazio M, Knöchel J, Da Silva-Azevedo L, **Styp-Rekowska B**, Hinz B, Pries AR: METH-1 as sprouting inhibitor of physiologically perfused blood vessels. Experimental Biology, San Francisco, USA, 2006. Faseb Journal 2006; 20(4): A712-713

7. Ulm L, Hinkeldey M, Cornelissen A, **Styp-Rekowska B**, Secomb TW, Pries AR: Heterogeneity of tumor microcirculation explained by changed vascular adaptation. BACR/BMS Special conference, Cirencester, UK, 2006.; Angiogenesis 2006; 9(1): 21

8. Ulm L, Hinkeldey M, Cornelissen A, **Styp-Rekowska B**, Reglin B, Secomb TW, Pries AR: Altered structural vascular adaptation in tumor microvascular networks. 24<sup>th</sup> European Conference of Microcirculation, Amsterdam, Netherlands, 2006; Journal of Vascular Research 2006; 43(Suppl 1):43

9. **Styp-Rekowska B**, Ulm L, Reglin B, Secomb TW, Pries AR: Oxygen saturation in microvessels in situ: intravascular and arteriovenous diffusion. Annual Meeting of German Society for Microcirculation and Vascular Biology, Munich, Germany, 2006; Journal of Vascular Research 2006; 43(6):573

#### 2007

1. **Styp-Rekowska B**, Reglin B, Secomb TW, Pries AR: Intra- and intervascular gradients of oxygen saturation: inhomogeneous distribution of oxygen in the microcirculation. 86<sup>th</sup> Meeting of German Physiologic Society, Hannover, Germany 2007. Acta Physiol. 189 (Suppl. 653): 153

2. **Styp-Rekowska B**, Secomb TW, Pries AR: Gradients of oxygen saturation in microvessels: effects of convection and diffusion. 8<sup>th</sup> World Congress for Microcirculation, Milwaukee, USA 2007. Microcirculation 14(4-5): 488

3. Tabuchi A, **Styp-Rekowska B**, Pries AR, Kuebler WM: Imaging of oxygen saturation in murine pulmonary microcirculation. 8<sup>th</sup> World Congress for Microcirculation, Milwaukee, USA 2007. Microcirculation 14(4-5): 477

4. **Styp-Rekowska B**, Tabuchi A, Le Noble F, Pries AR: Hemodynamic patterning of developing vasculature in zebrafish. Joint Meeting of the Society for Microcirculation and Vascular Biology and the 6th International Symposium on the Biology of Endothelial Cells, Heidelberg, Germany 2007

5. Tabuchi A, **Styp-Rekowska B**, Pries AR, Kuebler WM: Mapping of oxygen saturation in murine lung during intravital microscopy. Joint Meeting of the Society for Microcirculation and Vascular Biology and the 6th International Symposium on the Biology of Endothelial Cells, Heidelberg, Germany 2007

#### 2008

1. **Styp-Rekowska B**, Tabuchi A, Le Noble F, Pries AR: Importance of hemodynamic patterns for vascular phenotype during embryonal development. 87<sup>th</sup> Meeting of German Physiologic Society, Koeln, Germany 2007. Acta Physiol. 192 (Suppl. 663): 80

2. Tabuchi A, **Styp-Rekowska B**, Pries AR, Kuebler WM: Imaging of oxygen saturation in murine pulmonary microcirculation. 87<sup>th</sup> Meeting of German Physiologic Society, Koeln, Germany 2007. Acta Physiol. 192 (Suppl. 663): 91

3. **Styp-Rekowska B**, Tabuchi A, Le Noble F, Pries AR: Hemodynamic patterns and vascular differentiation in embryonal development. Experimental Biology, San Diego, USA, 2008. FASEB Journal 2008; 22:746.15

4. **Styp-Rekowska B**, Tabuchi A, Kuebler WM, Pries AR: Mapping of oxygen saturation in murine lung during intravital microscopy. Experimental Biology, San Diego, USA, 2008. FASEB Journal 2008; 22:1141.9

5. Pries AR, **Styp-Rekowska B**, Tabuchi A: Mapping of oxygen saturation during intravital microscopy. 25<sup>th</sup> European Conference of Microcirculation, Budapest, Hungary, 2008

6. **Styp-Rekowska B**, Secomb TW, Pries AR: Oxygen gradients in the microcirculation: inhomogeneous distribution resulting from convection and diffusion. 25<sup>th</sup> European Conference of Microcirculation, Budapest, Hungary, 2008

#### 2009

1. **Styp-Rekowska B**, Secomb TW, Pries AR: Dynamics of structural adaptation after vascular occlusion. Experimental Biology, New Orleans, USA, 2009. FASEB Journal 2009; 23:592.16

---

## **Danksagung**

Für meine Doktorarbeit schulde ich sehr vielen Menschen einen herzlichen Dank. Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. A. R. Pries bedanken, denn er brachte mir sehr viel Geduld entgegen und sorgte mit wertvollen Ratschlägen für das Gelingen der Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Instituts für Physiologie, die mir mit ihren Erfahrungen immer tatkräftig zur Seite standen.

Ein großer Dank geht an meine Kollegen, die mich nicht nur tatkräftig unterstützt haben, sondern mich stets aufbauten und für die erforderliche Abwechslung sorgten.