

Aus dem Institut für Physiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Strukturelle und hämodynamische Analyse von  
Mikrogefäßnetzwerken der Chorioallantoismembran des Huhns**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Martin Maibier

aus Berlin

Datum der Promotion:  
22.09.2017

## Inhaltsverzeichnis

1. Abstract in deutscher Sprache .....	3
2. Abstract in englischer Sprache .....	4
3. Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung .....	5
4. Ausführliche Anteilserklärung.....	6
5. Auszug aus der Journal Summary List.....	7
6. Originalpublikation .....	8
7. Lebenslauf .....	23
8. Publikationsliste .....	25
9. Danksagung.....	26

## 1. Abstract in deutscher Sprache

**Einführung:** Die Chorioallantoismembran (CAM) des Huhns ist ein weitläufig verwendetes in vivo - Modell. In dieser Arbeit werden CAM - Gefäßbäume strukturell, hämodynamisch und in Bezug auf die Gültigkeit von Murrays Vorhersagen analysiert.

**Methodik:** Mittels Videomikroskopie wurden CAM - Mikrogefäßnetzwerke in Hühnerembryonen des Entwicklungsstadiums 40 nach Hamburger - Hamilton aufgenommen. Unter Aussparung der jeweiligen Kapillarnetze erfolgte daraufhin die digitale Rekonstruktion von drei Mikrogefäßnetzwerken mit je ~3800, 580 und 480 Gefäßsegmenten. Neben Gefäßdurchmessern ( $D$ ) sowie Segmentlängen wurden Generationszahlen und die Bifurkationsindizes von Gefäßbifurkationen bestimmt. In ausgewählten Gefäßen wurden außerdem Blutströmungsgeschwindigkeiten ( $v$ ) und Hämatokritwerte gemessen. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass in der CAM bereits von präterminalen Gefäßen Kapillaren abzweigen, wurden  $v$ , Volumenfluss ( $Q$ ), Wandschubspannung ( $\tau$ ) und Druck in allen Gefäßsegmenten des großen Mikrogefäßnetzwerkes mathematisch simuliert. **Ergebnisse:** Die Generationszahlen der jeweiligen terminalen Venole und Arteriole einzelner arteriovenöser Pfade sind negativ korreliert. Dies führt zu einer geringen Variabilität der totalen topologischen und morphologischen Pfadlängen. In Arterien verhält sich die Blutströmungsgeschwindigkeit proportional zum Gefäßdurchmesser ( $v \propto D^{1,03}$  gemessen,  $v \propto D^{0,93}$  simuliert), was zu einem annähernd konstanten  $\tau$ -Niveau führt ( $\tau \propto D^{0,05}$ ). Venöse Gefäßbäume weisen leicht höhere Exponenten auf ( $v \propto D^{1,3}$ ,  $\tau \propto D^{0,38}$ ). Die Bifurkationsindizes an divergenten und konvergenten Gefäßbifurkationen betragen  $2,05 \pm 1,13$  und  $1,97 \pm 0,95$  (MW  $\pm$  SAW) im Gegensatz zu dem nach Murray zu erwartenden Wert von 3. **Schlussfolgerungen:** In Übereinstimmung mit den Vorhersagen von Murray ist das  $\tau$ -Niveau in arteriellen und (näherungsweise) in venösen Gefäßbäumen konstant, vereinbar mit einer wandschubspannungsgesteuerten vaskulären Adaptation. Arterielle und venöse Gefäßbäume sind interdigitierend angeordnet, was Pfadlängen homogenisiert, und zeigen ferner präterminale Kapillarabzweigungen. Diese Eigenschaften können ursächlich für die hohe Effizienz des Sauerstoffaustausches in der CAM während des schnellen Embryonalwachstums sein.

## 2. Abstract in englischer Sprache

**„Introduction:** The chick chorioallantoic membrane (CAM) is extensively used as an *in vivo* model. Here, structure and hemodynamics of CAM vessel trees were analyzed and compared with predictions of Murray’s law. **Methods:** CAM microvascular networks of Hamburger - Hamilton stage 40 chick embryos were scanned by videomicroscopy. Three networks with ~3800, 580 and 480 segments were digitally reconstructed, neglecting the capillary mesh. Vessel diameters ( $D$ ) and segment lengths were measured, and generation numbers and junctional exponents at bifurcations were derived. In selected vessels, flow velocities ( $v$ ) and hematocrit were measured. Hemodynamic simulations, incorporating the branching of capillaries from preterminal vessels, were used to estimate  $v$ , volume flow ( $Q$ ), shear stress ( $\tau$ ) and pressure for all segments of the largest network. **Results:** For individual arteriovenous flow pathways, terminal arterial and venous generation numbers are negatively correlated, leading to low variability of total topological and morphological pathway lengths. Arteriolar velocity is proportional to diameter ( $v \propto D^{1.03}$  measured,  $v \propto D^{0.93}$  modeling), giving nearly uniform  $\tau$  levels ( $\tau \propto D^{0.05}$ ). Venular trees exhibit slightly higher exponents ( $v \propto D^{1.3}$ ,  $\tau \propto D^{0.38}$ ). Junctional exponents at divergent and convergent bifurcations were  $2.05 \pm 1.13$  and  $1.97 \pm 0.95$  (mean  $\pm$  SD) in contrast to the value 3 predicted by Murray’s law. **Conclusions:** In accordance with Murray’s law,  $\tau$  levels are (nearly) maintained in CAM arterial (venular) trees, suggesting vascular adaptation to shear stress. Arterial and venous trees show an interdigitating arrangement providing homogeneous flow pathway properties and have preterminal capillary branches. These properties may facilitate efficient oxygen exchange in the CAM during rapid embryonic growth.”

### Anmerkung:

Das Abstract in englischer Sprache stellt ein Zitat des Abstracts der folgenden Originalpublikation dar: Maibier M, Reglin B, Nitzsche B, Xiang W, Rong WW, Hoffmann B, Djonov V, Secomb TW, and Pries AR. Structure and hemodynamics of vascular networks in the chorioallantoic membrane of the chicken. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 311 (4): H913-H926, 2016, Oct 1. doi: 10.1152/ajpheart.00786.2015.

Das American Journal of Physiology - als ein Journal der American Physiological Society (APS) - erlaubt Autoren die Verwendung ihrer Publikationsinhalte zur (Wieder-)Veröffentlichung im Rahmen einer Dissertation. In Auszügen sei diesbezüglich auf die Darstellungen der APS zu Urheber- und Autorenrechten verwiesen, die auf der Homepage der APS vollständig einsehbar sind (<http://www.the-aps.org/mm/Publications/Info-For-Authors/Copyright>): „Authors may republish parts of their final-published version articles (e.g., figures, tables), without charge and without requesting permission, provided that full acknowledgement of the source is given in the new work. [...] APS permits whole published articles to be reproduced without charge in dissertations and posted to thesis repositories. Full citation is required.”

Eine ausführliche Anteilserklärung des Doktoranden an der oben genannten Publikation ist unter Punkt 4, Seite 6, zu finden.

### **3. Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung**

„Ich, Martin Maibier, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Strukturelle und hämodynamische Analyse von Mikrogefäßnetzwerken der Chorioallantoismembran des Huhns“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben ist.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

---

Datum

---

Unterschrift

## 4. Ausführliche Anteilserklärung

Publikation: Maibier M, Reglin B, Nitzsche B, Xiang W, Rong WW, Hoffmann B, Djonov V, Secomb TW, and Pries AR. Structure and hemodynamics of vascular networks in the chorioallantoic membrane of the chicken. Am J Physiol Heart Circ Physiol 311 (4): H913-H926, 2016, Oct 1. doi: 10.1152/ajpheart.00786.2015.

Unter Mitwirkung der oben genannten Co - Autoren und federführender Regie durch Herrn Prof. Dr. Axel R. Pries war ich, Martin Maibier, beteiligt an der:

- Konzeption der vorliegenden Studie
- Durchführung der laborexperimentellen Arbeiten: Dies betrifft die Gesamtheit der dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimente mit Ausnahme der elektronenmikroskopischen Aufnahmen der CAM, die freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Valentin Djonov zur Verfügung gestellt wurden. Insbesondere oblagen die Etablierung des ex ovo - CAM - Modells sowie die intravitalmikroskopischen Arbeiten samt Messung der Blutströmungsgeschwindigkeiten, Hämatokritwerte und Sauerstoffsättigungen meiner Verantwortung. Validationsmessungen der Blutströmungsgeschwindigkeiten erfolgten durch Frau Dr. Bianca Nitzsche. Frau Weiwei Xiang lieferte intravitalmikroskopische Aufnahmen zur Rekonstruktion der kleinen CAM - Netzwerke („minor networks“).
- Analyse der erhobenen Daten: Die umfassende Rekonstruktion aller CAM - Mikrogefäßnetzwerke sowie deren strukturelle Auswertung stellten einen wesentlichen Teil meiner Aufgabenbereiche dar. Die hämodynamischen Analysen wurden in Kooperation mit Frau Dr. Bettina Reglin durchgeführt.
- Interpretation der Ergebnisse: Diese erfolgte in enger Zusammenarbeit mit den Co - Autoren, insbesondere mit Herrn Prof. Dr. Axel R. Pries und Frau Dr. Bettina Reglin.
- Erstellung der Abbildungen
- Konzeption und Revision des Manuskriptes: Die Verfassung des ersten Manuskriptes befand sich in meiner alleinigen Verantwortung. Die weiteren Überarbeitungen wurden in Abstimmung mit den Co - Autoren durchgeführt.

---

Unterschrift, Datum und Stempel des  
betreuenden Hochschullehrers

---

Unterschrift des Doktoranden

## 5. Auszug aus der Journal Summary List

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title (linked to journal information)	ISSN	JCR Data <sup>i)</sup>						Eigenfactor <sup>®</sup> Metrics <sup>j)</sup>	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor <sup>®</sup> Score	Article Influence <sup>®</sup> Score
<input type="checkbox"/>	1	<a href="#">CIRCULATION</a>	0009-7322	155582	17.202	16.252	4.364	368	>10.0	0.26920	6.833
<input type="checkbox"/>	2	<a href="#">CIRC RES</a>	0009-7330	47491	11.551	11.218	4.084	237	8.9	0.08503	4.174
<input type="checkbox"/>	3	<a href="#">HYPERTENSION</a>	0194-911X	34532	6.350	6.860	1.745	310	8.7	0.05529	2.228
<input type="checkbox"/>	4	<a href="#">ARTERIOSCL THROM VAS</a>	1079-5642	32993	5.969	6.225	1.544	298	8.7	0.05696	2.141
<input type="checkbox"/>	5	<a href="#">STROKE</a>	0039-2499	57427	5.787	6.308	1.320	556	8.8	0.09772	2.217
<input type="checkbox"/>	6	<a href="#">J THROMB HAEMOST</a>	1538-7933	15844	5.565	5.720	1.046	280	6.1	0.04208	2.114
<input type="checkbox"/>	7	<a href="#">CURR OPIN LIPIDOL</a>	0957-9672	3953	5.336	5.150	0.746	71	7.3	0.00813	1.752
<input type="checkbox"/>	8	<a href="#">THROMB HAEMOSTASIS</a>	0340-6245	16829	5.255	4.781	1.659	249	7.9	0.03131	1.599
<input type="checkbox"/>	9	<a href="#">J HYPERTENS</a>	0263-6352	15665	5.062	4.293	1.218	271	7.9	0.02755	1.346
<input type="checkbox"/>	10	<a href="#">J STROKE</a>	2287-6391	244	4.795		0.886	35	1.8	0.00099	
<input type="checkbox"/>	11	<a href="#">ANGIOGENESIS</a>	0969-6970	2341	4.301	4.527	0.474	38	5.7	0.00553	1.395
<input type="checkbox"/>	12	<a href="#">ATHEROSCLEROSIS</a>	0021-9150	22038	3.942	4.000	0.866	492	6.3	0.04461	1.189
<input type="checkbox"/>	13	<a href="#">SEMIN THROMB HEMOST</a>	0094-6176	3400	3.505	3.198	1.560	100	6.0	0.00687	0.937
<input type="checkbox"/>	14	<a href="#">J VASC SURG</a>	0741-5214	21773	3.454	3.260	0.709	413	7.8	0.03898	1.048
<input type="checkbox"/>	15	<a href="#">CEREBROVASC DIS</a>	1015-9770	5518	3.359	3.330	0.558	77	6.7	0.01230	1.167
<input type="checkbox"/>	16	<a href="#">ATHEROSCLEROSIS SUPP</a>	1567-5688	717	3.356	3.953	0.404	47	9.1	0.00109	1.129
<input checked="" type="checkbox"/>	17	<a href="#">AM J PHYSIOL-HEART C</a>	0363-6135	30695	3.324	3.579	0.718	373	9.8	0.03680	1.151
<input type="checkbox"/>	18	<a href="#">CURR OPIN NEPHROL HY</a>	1062-4821	3078	3.232	3.278	0.747	83	6.3	0.00751	1.152

ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup> am 12.10.2016, Rang 17 von 63 Journals in der Kategorie "PERIPHERAL VASCULAR DISEASE".

## 6. Originalpublikation

Es folgt ein Druckexemplar folgender Originalpublikation:

Maibier M, Reglin B, Nitzsche B, Xiang W, Rong WW, Hoffmann B, Djonov V, Secomb TW, and Pries AR. Structure and hemodynamics of vascular networks in the chorioallantoic membrane of the chicken. Am J Physiol Heart Circ Physiol 311 (4): H913-H926, 2016, Oct 1.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00786.2015>

Es handelt sich hierbei um eine ungeteilte Erstautorenschaft.

































## **7. Lebenslauf**

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





## 8. Publikationsliste

### PEER-REVIEWED ARTICLES

- (1) Maibier M, Reglin B, Nitzsche B, Xiang W, Rong WW, Hoffmann B, Djonov V, Secomb TW, and Pries AR. Structure and hemodynamics of vascular networks in the chorioallantoic membrane of the chicken. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 311 (4): H913-H926, 2016, Oct 1. doi: 10.1152/ajpheart.00786.2015.
- (2) Smith AF, Nitzsche B, Maibier M, Pries AR, and Secomb TW. Microvascular Hemodynamics in the Chick Chorioallantoic Membrane. *Microcirculation*, 2016, Aug 10. doi: 10.1111/micc.12301. [Epub ahead of print]

### POSTER PRESENTATIONS

- (1) Maibier M, Nitzsche B, Reglin B, Höpfner M, Secomb TW, Pries AR. Gap junction blockage in chorioallantoic membrane networks. *Experimental Biology*, Boston, April 2013.
- (2) Maibier M, Nitzsche B, Reglin B, Höpfner M, Secomb TW, Pries AR. Topology, angioarchitecture and hemodynamics of chick chorioallantoic vascular networks. *Experimental Biology*, Boston, April 2013.
- (3) Maibier M, Nitzsche B, Reglin B, Xiang W, Secomb TW, Höpfner M, Pries AR. Structure and hemodynamics in the chick chorioallantoic membrane: Murray's law revisited. *Frontiers in CardioVascular Biology*, Barcelona, July 2014.
- (4) Nitzsche B, Bintig W, Maibier M, Höpfner M, Reglin B, Pries AR. Rescue of gap junction function restores blood flow in chicken chorioallantoic membrane vessel networks. *10th World Congress for Microcirculation*, Kyoto, September 2015.
- (5) Xiang W, Reglin B, Rong W, Nitzsche B, Maibier M, Ruggeri A, Guimarães P, T. Secomb TW, Pries AR. Early adaptation of pre-existing arteriolar collateral after acute microocclusion: an in vivo study in chick chorioallantoic membrane. *Experimental Biology*, San Diego, April 2016.
- (6) "Emerging angiogenesis" in the chick chorioallantoic membrane. An in vivo study. Rong WW, Reglin B, Xiang W, Nitzsche B, Maibier M, Pries AR. *Frontiers in CardioVascular Biology*, Florence, July 2016.

## 9. Danksagung

Mein außerordentlicher Dank geht an Axel Pries für das mir entgegengebrachte Vertrauen, die exzellente fachliche Betreuung und die fortwährende, persönliche Förderung bei der Entstehung dieser Arbeit. Seine wissenschaftliche Begeisterung, Hingabe und Kreativität stellten und stellen eine große Inspiration für mich dar. Ohne Zweifel war die enge Zusammenarbeit mit ihm und die Fertigstellung dieser Arbeit als Ganzes ein prägendes Moment meiner fachlichen und persönlichen Entwicklung.

Herausragender Dank geht auch an Bettina Reglin, ohne deren weitreichende Expertise, Ideenreichtum und Akribie diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Für ihre unermüdliche Geduld und anhaltende Motivation in unzähligen fachlichen und außerfachlichen Gesprächen möchte ich mich herzlich bedanken.

Bianca Nitzsche gilt mein Dank für die Unterstützung bei den intravitalmikroskopischen Geschwindigkeitsmessungen sowie bei der Erstellung des Manuskriptes. Weiwei Xiang gebührt mein Dank für die intravitalmikroskopischen Aufnahmen der „minor networks“. Michael Höpfner danke ich für die Teilhabe an seiner umfangreichen wissenschaftlichen Erfahrung. Björn Hoffmann möchte ich meinen Dank für seine stete Mithilfe bei der Lösung verschiedener methodischer und technischer Unwägbarkeiten aussprechen. Timothy Secomb bin ich dankbar für die präzise Durchsicht und Verbesserung meiner Arbeit. Prof. Dr. Valentin Djonov danke ich für die Bereitstellung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Chorioallantoismembran. Den Mitarbeitern des Institutes für Physiologie, insbesondere Kristina Lisec, Laura Michalick, Janine Berkholz, Weronika Kuzyniak und Sebastian Bock sei für das herzliche Miteinander inner- und außerhalb des Instituts für Physiologie gedankt. Der Studienstiftung des deutschen Volkes danke ich für die finanzielle und persönliche Unterstützung während der Entstehung dieser Arbeit. Nicht zuletzt danke ich Freunden und Familie, die mich auf dem Weg zur Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.