

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt
Gastroenterologie, Nephrologie und Stoffwechselmedizin und dem
Institut für Physiologie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

**Strukturelle Veränderungen der Mikrozirkulation bei experimenteller
Urämie – Quantifizierung, Typisierung, Konsequenzen**

In-vivo Untersuchungen am *M. cremaster* bei Mäusen mit chronischer Niereninsuffizienz

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Hans-Ulrich Prommer
aus Hettigenbeuern

Datum der Promotion: 1. März 2019

Vorwort

Mit den Forschungsarbeiten über die Mikrozirkulation offenbarte sich mir eine faszinierende Schöpfung unserer Natur. Die Welt der kleinsten Blutgefäße erstreckt sich in jedem Organismus über eine nahezu unvorstellbare Dimension, befindet sich in einem ständigen Umbauprozess und ist trotz dieser Metamorphosen und Komplexität einzigartig organisiert und geregelt.

Über die Mikrozirkulation und ihre Mechanismen – insbesondere welche Rolle dieser Teil unseres Körpers bei Gesundheit und Krankheit spielt – weiß man bisher nur wenig. Diese Dissertation soll einen kleinen Schritt dazu beitragen, die Mikrozirkulation besser zu verstehen und möglicherweise neue Ansätze für Prävention, Diagnose und Therapie bei Krankheiten mit mikroangiopathischem Zusammenhang wie zum Beispiel der chronischen Niereninsuffizienz zu entwickeln.

Dr. Johannes Maurer und ich haben hierfür ein gemeinsames Tiermodell etabliert auf dessen Grundlage jeder von uns seine individuellen experimentellen Ergebnisse und wissenschaftliche Erkenntnisse abgeleitet und in separaten Dissertationen dargelegt haben. Teilumfänge dieser Ergebnisse haben wir in einer gemeinsamen Publikation mit dem Titel »Chronic kidney disease induces a systemic microangiopathy, tissue hypoxia and dysfunctional angiogenesis« im März 2018 veröffentlicht (siehe Publikationsverzeichnis).

Berlin im Juni 2018

Hans-Ulrich Prommer

| Inhaltsverzeichnis | Seite |
|--|--------------|
| 0. Zusammenfassung | 7 |
| 0.1 Abstrakt (Deutsch) | 7 |
| 0.2 Abstract (Englisch) | 9 |
| 1. Einleitung | 11 |
| 1.1 Mikrozirkulation | 11 |
| 1.1.1 Definition der Mikrozirkulation | 11 |
| 1.1.2 Physiologische Angioadaptation | 12 |
| 1.2 Dysfunktion der Mikrozirkulation | 14 |
| 1.2.1 Dysfunktion der Mikrozirkulation bei Sepsis | 15 |
| 1.2.2 Rarefizierung der Mikrozirkulation bei Urämie | 15 |
| 1.3 Ziele der vorliegenden Arbeit | 18 |
| | |
| 2. Material und Methoden | 19 |
| 2.1 Tiermodelle | 19 |
| 2.1.1 Versuchstiere | 19 |
| 2.1.2 Experimentelle Urämie durch Adenin-Gabe | 20 |
| 2.1.3 Experimentelle Urämie durch Nephrektomie | 20 |
| 2.2 <i>Musculus cremaster</i> | 21 |
| 2.2.1 Anatomie des <i>M. cremaster</i> | 21 |
| 2.2.2 Präparation des <i>M. cremaster</i> | 21 |
| 2.3 Versuchsaufbau der Intravitalmikroskopie | 22 |
| 2.4 Versuchsdurchführung | 23 |
| 2.4.1 Videoaufnahmen | 23 |
| 2.4.2 Asynchrone Doppelblitz-Aufnahmen | 24 |
| 2.5 Methoden der Versuchsauswertung | 25 |
| 2.5.1 Angioarchitektur | 25 |
| 2.5.2 Intervaskuläre Areale und Diffusionsdistanzen | 25 |
| 2.5.3 Blutströmungsgeschwindigkeit | 27 |
| 2.5.4 Leukozytenrollengeschwindigkeit | 27 |
| 2.5.5 Blutproben | 27 |
| 2.5.6 Statistische Verfahren | 28 |

| | |
|---|-----------|
| 3. Ergebnisse | 29 |
| 3.1 Experimentelle Urämie | 29 |
| 3.1.1 Harnstoff | 29 |
| 3.1.2 Kreatinin | 30 |
| 3.1.3 IL-6 | 31 |
| 3.1.4 Hämatokrit | 32 |
| 3.1.5 Körpergewicht | 34 |
| 3.1.6 Blutdruck | 35 |
| 3.2 Rarefizierung der Mikrozirkulation | 36 |
| 3.2.1 Ausmaß der Rarefizierung | 36 |
| 3.2.2 Kaliber und Rarefizierung | 41 |
| 3.2.3 Funktionelle Rarefizierung | 43 |
| 3.2.4 Einflussfaktoren auf die Rarefizierung | 46 |
| 3.2.4.1. Lineare Korrelation | 46 |
| 3.2.4.2. Multiregressionsanalyse | 47 |
| 3.2.5 Heterogenität der Rarefizierung | 48 |
| 3.2.5.1. Segmentlängen | 49 |
| 3.2.5.2. Modellierung der Segmentlängen-Dynamik | 50 |
| 3.3 Intervaskuläre Areale | 53 |
| 3.3.1 Diffusionsdistanzen im <i>Musculus cremaster</i> | 54 |
| 3.3.2 Diffusionsreichweiten von Sauerstoff im <i>Musculus cremaster</i> | 55 |
| 3.4 Hämodynamische Veränderungen | 57 |
| 3.4.1 Blutströmungsgeschwindigkeit | 57 |
| 3.4.2 Geschwindigkeit des Leukozytenrollens | 59 |
| 3.5 Modellierung der Beeinträchtigung der Sauerstoffaufnahme | 61 |
| 3.5.1 Strukturmodelle des Mikrogefäßsystems | 61 |
| 3.5.2 Konvektiver Sauerstofftransport | 62 |
| 3.5.3 Bilanzierung des konvektiven Sauerstofftransports | 62 |
| 3.5.4 Sauerstoffaufnahme | 64 |

| | |
|--|-----------|
| 4. Diskussion | 69 |
| 4.1 Eignen sich die Tiermodelle zur Induktion einer experimentellen Niereninsuffizienz? | 69 |
| 4.1.1 5/6-Nephrektomie induzierte eine milde, Adenin-Intoxikation eine starke Urämie | 69 |
| 4.1.2 Das Ausmaß der Urämie wurde am Anstieg des Retentionswerts Harnstoff beurteilt | 70 |
| 4.2 Welches Ausmaß und welche Abhängigkeiten zeigt die Rarefizierung? | 71 |
| 4.2.1 Mit inkrementellem Harnstoff-Anstieg um 100 mg/dL rarefizierten die Mikrogefäße um ca. 15% | 71 |
| 4.2.2 Die Mikroangiopathie war urämisch bedingt | 72 |
| 4.2.3 Rarefizierung erfolgte primär über strukturellen Abbau von Gefäßen | 75 |
| 4.3 Welche strukturellen Charakteristika weist die rarefizierte Mikrozirkulation auf? | 76 |
| 4.3.1 Gefäßabbau fand asymmetrisch primär bei Mikrogefäßen kleineren Kalibers statt | 76 |
| 4.3.2 Die räumliche Verteilung der Mikrogefäße war bei den Kontrollen bereits heterogen | 76 |
| 4.3.3 Durch fokale Rarefizierung nahm die Heterogenität der Gefäßverteilung zu | 78 |
| 4.4 Wie beeinträchtigt die Rarefizierung den Sauerstofftransport? | 79 |
| 4.4.1 Die Diffusionsdistanzen von Sauerstoff vergrößerten sich | 79 |
| 4.4.2 Die Perfusion des Muskels war reduziert | 80 |
| 4.4.3 Die $avDO_2$ der rarefizierten Mikrozirkulation war vermindert | 81 |
| 4.4.4 Der Hämatokrit war bei starker Urämie reduziert | 81 |
| 4.4.5 Die rarefizierte Mikrozirkulation transportierte durchschnittlich 25% bzw. 63% weniger O_2 in den Muskel | 82 |

| | |
|--|-----------|
| 5. Ausblick | 84 |
| 6. Publikationsverzeichnis | 85 |
| 7. Literaturverzeichnis | 86 |
| 8. Abkürzungsverzeichnis | 91 |
| 9. Lebenslauf | 92 |
| 10. Selbstständigkeitserklärung | 93 |
| 11. Danksagung | 95 |

0. Zusammenfassung

0.1 Abstrakt

Das Krankheitsbild der chronischen Niereninsuffizienz geht mit strukturellen und funktionellen Veränderungen der Mikrozirkulation einher. Urämie-assoziierte mikrovaskuläre Dysfunktionen wurden bereits in klinischen Studien sowie in Tiermodellen jeweils in Stromgebieten wie dem der Niere, dem Myokard, der Haut oder der Skelettmuskulatur nachgewiesen. Die Niereninsuffizienz-induzierte Dysfunktion der Mikrozirkulation wird zunehmend in einen ursächlichen Zusammenhang mit pathologischen Veränderungen der großen Gefäße, insbesondere des kardiovaskulären Systems gebracht. Speziell bei niereninsuffizienten Kindern und Jugendlichen ist das Langzeitüberleben mit kardiovaskulären Risiken assoziiert.

Um die Wechselwirkungen der Makro- und Mikroangiopathien besser zu verstehen und langfristig therapeutisch beeinflussen zu können, müssen die Mechanismen der Urämie-induzierten mikrovaskulären Dysfunktion noch besser durchdrungen werden. Ziel der vorliegenden Dissertation war deshalb die Untersuchung struktureller Veränderungen der Mikrozirkulation im Skelettmuskel (hier *M. cremaster*) bei Mäusen mit experimentell induzierter chronischer Niereninsuffizienz. Neu im Vergleich zu bisherigen Studien ist die Analyse der Mikrogefäße *in vivo* per Intravitalmikroskopie unter Einschluss funktionell hämodynamischer Parameter sowie der Berechnung der Sauerstoffaufnahme.

Bei 26 Mäusen vom Typ Balb/c wurde in zwei Tiermodellen (Adenin-Futterbeimengung sowie 5/6 Nephrektomie) experimentell eine chronische Niereninsuffizienz induziert. Die Mikrogefäße dünnten bei den Tieren im Adenin-Urämiemodell durchschnittlich um 36% bzw. 51% (mild und stark urämisch) und bei den Tieren im Nephrektomie-Urämiemodell (hier ausschließlich mild urämisch) um 36% aus. Das Ausmaß der Rarefizierung korrelierte mit dem Grad der Urämie. Mit Zunahme des Serum-Harnstoffs um je 100 mg/dL verringerte sich die Gefäßdichte der Mikrozirkulation bei den Tieren im Adenin-Urämiemodell durchschnittlich um 14,2% und bei den Tieren im Nephrektomie-Urämiemodell um 15,7%.

Die Rarefizierung erfolgte dabei nicht als homogene Gefäßausdünnung, sondern nach einem fokalen, Mottenfraß-ähnlichen Muster. Avaskuläre Areale im Muskelgewebe dehnten sich weiträumig aus. Zusammenhängende Gefäßsysteme wurden abgebaut. Andere Gewebsregionen wurden von der Rarefizierung scheinbar verschont. Einhergehend mit der

Ausdehnung der avaskulären Bereiche vergrößerten sich die Diffusionsdistanzen des Sauerstofftransports.

Durch die Rarefizierung wurde die Sauerstoffaufnahme vom konvektiven Bluttransportsystem in das Gewebe beeinträchtigt. In einem Modell wurde eine reduzierte Sauerstoffaufnahme von 25% bei mild urämischen Tieren und 63% bei stark urämischen Tieren berechnet. Treiber der Beeinträchtigung waren die im rarefizierten Muskelgewebe partiell verlangsamte Blutströmungsgeschwindigkeit, ein verminderter Hämatokrit sowie eine verminderte arteriovenöse Sauerstoffdifferenz.

Obwohl tierexperimentelle Daten nur mit Vorsicht auf die klinische Situation zu übertragen sind, sprechen die vorliegenden Daten dafür, dass die mikrovaskuläre Rarefizierung bei Patienten mit CKD von prognostischer Bedeutung ist. Klinischen Methoden zur Beurteilung der Mikrozirkulation bei CKD könnten in Zukunft größere Bedeutung erlangen – einerseits als Indikator für kardiovaskuläre Schäden, andererseits als Ausgangspunkt für klinische Studien zur Anwendung Angiogenese-fördernder Therapeutika.

0.2 Abstract

Chronic kidney disease (CKD) is associated with structural and functional alterations of the microvasculature. To date, uremia-induced microvascular alterations have been demonstrated in various clinical trials, and animal models in e.g. myocardial, renal and skeletal muscle tissues. In addition, the CKD-associated microvascular dysfunction is increasingly suspected to trigger pathological alterations of the macrovasculature, notably of the cardiovascular system. This is particularly an issue for the long-term survival rate of children and young adults with chronic kidney disease.

To better understand the interdependencies between macrovascular and microvascular pathologies, and their impact on CKD and associated complications, the mechanisms of the microvascular pathological alterations under uremic conditions need to be further explored. Hence, the intention of this thesis paper was the analysis of the rarefaction of the cremaster muscle microvasculature of mice suffering from experimentally induced CKD, and the impairment of oxygen uptake in the uremic muscle tissue. The innovative contribution of this approach compared to previous studies is an *in vivo* examination by intravital microscopy.

Experimental uremia was induced in two well established murine models of CKD, adenine feeding, and subtotal nephrectomy (n=26 mice in total). Rarefaction of the microvascular density in the range of 51% for severely uremic mice and 36% for mildly uremic mice could be observed. The degree of rarefaction correlated significantly with the degree of CKD i.e. the serum urea level. Per incremental increase of serum urea by 100 mg/dL, the microvascular density decreased by 14.2% for the adenine-fed mice, and by 15.7% for the nephrectomized mice, respectively.

The process of rarefaction did not follow a regular homogeneous pattern. In contrary, it seemed to develop as a focal, desertification-like dispersion of non-vascularized areas. Such focal areas arose through extinction of entire coherent microvessel systems while other adjacent neighboring tissue areas seemed unaffected by rarefaction. The extension of non-vascularized areas resulted in an increase of the oxygen diffusion distance.

Moreover, microvascular rarefaction impairs oxygen uptake from the convective oxygen transport system i.e. the microcirculation to the tissue. Modelling revealed a reduction of oxygen uptake of 25% for mildly uremic mice, and 63% for severely uremic mice. Main

drivers of the oxygen uptake impairment were the slower blood flow velocity that was observed in parts of the microcirculation, a lower hematocrit, and a smaller difference in arteriovenous oxygen saturation.

These insights define microvascular rarefaction and dysfunction as important therapeutic targets for future interventional studies in CKD patients.

1. Einleitung

1.1 Mikrozirkulation

1.1.1 Definition der Mikrozirkulation

Die Mikrozirkulation ist das Zugangsnetz des Blutsystems in die Gewebe und Organe für den konvektiven Transport von Sauerstoff, Nährstoffen, Elektrolyten, Immunzellen, Hormonen und anderen Stoffen sowie für die entsprechende Entsorgung von Metaboliten.

Die Mikrozirkulation umfasst die drei Gefäßtypen Arteriolen, Venolen und Kapillaren (Abbildung 1.1). Jeder Gefäßtyp hat sehr individuelle strukturelle und funktionelle Eigenschaften. Arteriolen sind mit glatter Muskulatur ausgestattet und regeln damit die Blutversorgung. Kapillaren haben sehr dünne Gefäßwände und sind für den Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe verantwortlich. Venolen führen Blut aus dem Gewebe ab und erfüllen wichtige Funktionen beim makromolekularen Stoffaustausch sowie bei der Immunabwehr (Tuma *et al.* 2008).

Eine einheitliche Definition der Mikrozirkulation anhand anatomischer Kriterien ist in der Fachliteratur bisher nicht gegeben. Ein kritischer Innendurchmesser, bis zu dem man Gefäße zur Mikrozirkulation zählt, wird von verschiedenen Autoren unterschiedlich angegeben: z.B. mit 200 μm (Chilian *et al.* 1989) oder mit 300 μm (Levy *et al.* 2001).

Eine Abgrenzung der Mikrozirkulation ist ferner anhand des Blutdruckniveaus im Gefäßsystem möglich. Die Mikrozirkulation beginnt demnach dort, wo im Blutkreislauf der Blutdruck über kurze Distanzen abfällt – mit dem Eintritt des Blutes in die Arteriolen (Chilian *et al.* 1989). Dort fallen 80% des kardial erzeugten Blutdrucks ab (Popel & Johnson 2005).

Anhand des rheologischen Parameters »Blutströmungsgeschwindigkeit« ist die Mikrozirkulation ebenfalls abgrenzbar. Das Blut strömt in den Mikrogefäßen sehr langsam. Die Blutströmungsgeschwindigkeit der Mikrozirkulation – ausgedrückt über die dimensionslose Reynolds-Zahl $N_R = dU\rho/\mu$ – liegt zwischen 10^{-1} und 10^{-3} (d entspricht dem Gefäßinnendurchmesser, U der mittleren Blutströmungsgeschwindigkeit, μ der Viskosität und ρ der Dichte) (Schmid-Schönbein 1999), während in typischen Gefäßen der Makrozirkulation mittlere Reynolds-Zahlen von 1500 bis 2000 (Aorta), 200 (größere Arterien), oder 20 (Endarterien) gemessen wurden (Craciunescu & Clegg 2001).

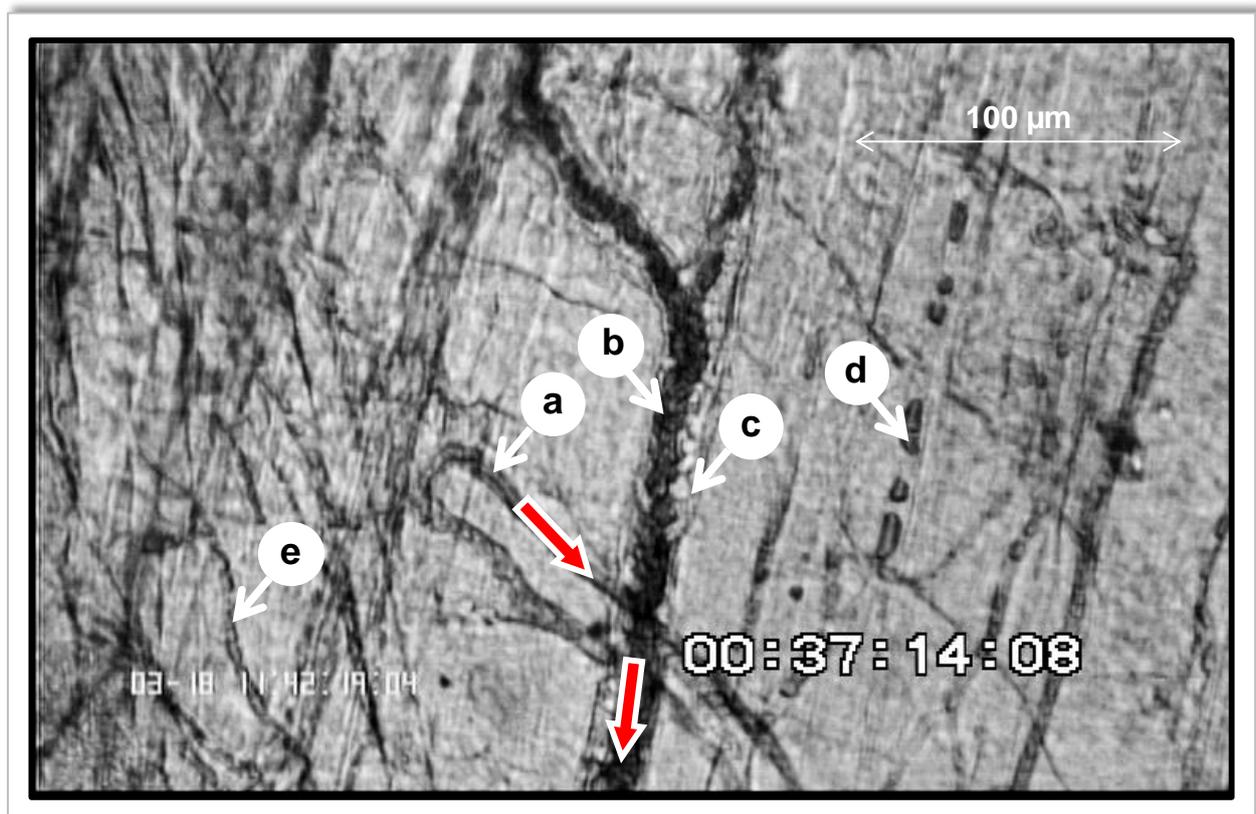


Abbildung 1.1: Intravitalmikroskopische Aufnahme der Mikrozirkulation des *M. cremaster der Maus*. Gesichtsfeld $350\ \mu\text{m} \times 250\ \mu\text{m}$, aufgenommen mit einer Vergrößerung $1,6 \times 20$. (a) Arteriell Gefäß mit ca. $8\ \mu\text{m}$ Innendurchmesser. Die Strömungsrichtung ist mit einem roten Pfeil angedeutet. (b) Venole mit ca. $14\ \mu\text{m}$ Innendurchmesser. (c) Leukozyten rollen entlang des Endothels der Venole. (d) Gefäß mit dauerhaft arretiertem Blutstrom, d.h. mit einer δ -Typ Perfusion (Kapitel 3.2.3). (e) Muskelfaser.

1.1.2 Physiologische Angioadaptation

Ein ausgewachsener Mensch hat zwischen 2×10^9 und 7×10^9 Blutgefäße mit einer Gesamtlänge von ca. 8000 Kilometern. Der allergrößte Anteil davon sind mikrovaskuläre Gefäße (Schmid-Schönbein 1999; Tuma *et al.* 2008). Angebot und Bedarf an Gasen und Nährstoffen im Gewebe ändern sich ständig, weshalb sich das Mikrogefäßnetzwerk physiologisch permanent diesen verändernden Anforderungen anpasst (Zakrzewicz *et al.* 2002; Pries & Secomb 2008). Diese Angioadaptation kann grob in eine morphologische versus topologische sowie in eine kurzfristige versus eine langfristige Angioadaptation differenziert werden.

Unter den morphologischen Strukturen eines Mikrogefäßnetzwerks werden in Publikationen die Merkmale eines Gefäßsegments, d.h. eines Gefäßabschnitts zwischen zwei benachbarten Bifurkationen, verstanden. Parameter, die die Morphologie beschreiben, sind

beispielsweise Segmentlänge, Gefäßdurchmesser, zelluläre Beschaffenheit der Gefäßwand oder der Bifurkationswinkel (Fenton & Zweifach 1981).

Die Topologie eines Gefäßnetzwerks beschreibt dagegen die übergeordnete räumliche Gefäßarchitektur. Parameter, die diese beschreiben sind beispielsweise Gefäßdichte, Bifurkationsdichte oder Gefäßwindungen (Van Pelt *et al.* 1992), oder die Generationsordnung, die die Symmetrie eines Gefäßnetzwerks charakterisiert (Pries *et al.* 1986). Im Folgenden wird auch – die beiden *Termini* Morphologie und Topologie integrierend – vereinfachend von der Struktur des Mikrogefäßnetzwerks gesprochen.

Zu den kurzfristigen Anpassungen der Mikrogefäße zählt die Variation des glattmuskulären Gefäßwandtonus und somit die Variation des Gefäßquerschnitts von Arteriolen. Faktoren, die den mikrovaskulären Tonus beeinflussen, sind hämodynamische Signale wie zirkumferentielle Wandspannung und Wandschubspannung, metabolische Signalmoleküle wie O₂, CO₂, NO, Laktat oder H⁺ oder neurohumorale Kaskaden. Akut verändern Gefäße dadurch funktionelle Parameter wie Strömungsgeschwindigkeit, arteriovenöses Druckgefälle, Hämatokrit oder Leukokrit aufgrund einer veränderten Phasenseparation an divergenten Bifurkationen (Pries *et al.* 2001).

Langfristig passen Mikrogefäßnetzwerke ihre Gefäßarchitektur an veränderte Anforderungen an. Diese Dynamik erfolgt über die Bildung neuer Gefäße (Angiogenese) den Umbau existierender Gefäße (Remodeling) oder die Elimination redundanter Gefäße (Rarefizierung) (Tuma *et al.* 2008).

Eine innovative Herangehensweise, um die Dynamik von Angiogenese, Remodeling und Rarefizierung besser zu verstehen, ist ihre mathematische Simulation. Da die Diffusionsreichweite von Sauerstoff im Gewebe limitiert ist, sollte die Architektur der Mikrogefäße so optimiert sein, dass der Sauerstoff mit effizientem Energieaufwand jede Gewebeeinheit zunächst per Konvektion und dann per Diffusion erreichen kann. Andere Metaboliten wie z.B. Glukose können deutlich längere Strecken diffundieren und stellen deshalb weniger Anforderungen an die Angioarchitektur der Mikrozirkulation (Pries & Secomb 2014).

Die bestimmenden Prinzipien, nach denen sich die Architektur eines Mikrogefäßsystems ausrichtet, sind die Minimierung des Energieaufwands für den konvektiven Stofftransport bei gleichzeitiger Minimierung der Diffusionsdistanzen. Ein engmaschiges Gefäßnetzwerk würde kurze Diffusionsdistanzen implizieren, der Energieaufwand für den konvektiven

Stofftransport und die Erhaltung der Gefäße wäre jedoch hoch. Ein weitmaschiges Netzwerk dagegen benötigt wenig Energie für die Konvektion bei allerdings langen Diffusionsstrecken. Ein effizientes Netzwerk integriert beide Anforderungen zu einem Optimum (Pries & Secomb 2014).

Bei der Optimierung von Gefäßnetzwerken aber auch pathophysiologisch spielt die Rarefizierung eine entscheidende Rolle. In der Mikrozirkulationsforschung wird mit Rarefizierung die Verringerung der Dichte von Blutgefäßen bezeichnet (Chen *et al.* 1981). Man unterscheidet dabei die funktionelle und die strukturelle Rarefizierung. Ein funktionell rarefiziertes Gefäß ist ein nicht perfundiertes Gefäß. Das Gefäß an sich ist aber weiterhin existent. Bei struktureller Rarefizierung ist das Gefäß tatsächlich abgebaut (Murfee & Schmid-Schönbein 2008).

1.2 Dysfunktion der Mikrozirkulation

Die Dynamik des Mikrogefäßtonus sowie Angiogenese, Remodeling und Rarefizierung sind Teilprozesse einer sensiblen Regulation. Gerät diese Regulation durch pathologische Einflüsse in einen instabilen Zustand, resultiert dies in einer Dysfunktion der Mikrozirkulation.

So kann beispielsweise eine Störung der endothelabhängigen Regulation von Vasodilatation und Vasokonstriktion zur Hyper- oder Hypotension führen (funktionelle Dysfunktion). Eine strukturelle Dysfunktion ist beispielsweise eine gestörte Angioarchitektur, die eine verminderte regionale Durchblutung bzw. eine regionale Gewebhypoxie zur Konsequenz haben kann (Thang *et al.* 2011). Im Folgenden werden an den Beispielen der Sepsis und der Niereninsuffizienz verschiedene Aspekte der mikrovaskulären Dysfunktion näher betrachtet.

1.2.1 Dysfunktion der Mikrozirkulation bei Sepsis

Gut erforscht ist die Dysfunktion der Mikrozirkulation im Rahmen des septischen Schocks. Die autoregulatorischen Mechanismen der Mikrozirkulation sind dabei erheblich gestört (Spronk *et al.* 2004). Charakteristisch ist eine Zunahme der Perfusionsheterogenität. Während in manchen Gewebsregionen die Perfusion deutlich gemindert ist oder gar zum Stillstand kommt, sind andere Regionen nahezu physiologisch durchblutet oder gar überperfundiert (Ince & Sinaasappel 1999; Ince 2005; De Backer *et al.* 1994).

Ursächlich ist die Beeinträchtigung der Stickstoffmonoxid-basierten Regulation der mikrozirkulären Perfusion durch eine heterogene Expression von iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase). Dadurch werden im einen Gewebeareal Gefäßdurchmesser durch überschießende NO-induzierte Vasodilatation zu weit gestellt, während in anderen Arealen mit NO Mangel diese zu eng sind.

Ausmaß und Heterogenität der mikrozirkulatorischen Dysfunktion korrelieren dabei mit dem Ausmaß des septischen Schocks. Diese pathologische Regulation der Gefäßdurchmesser führt zur Shunt-Bildung und trägt möglicherweise so zur Gewebehypoxie und letztlich zum Organversagen bei (Revelly *et al.* 1996).

1.2.2 Rarefizierung der Mikrozirkulation bei Urämie

Der Begriff »Urämie« bedeutet wörtlich übersetzt »Urin im Blut« und beschreibt den klinischen Zustand einer beeinträchtigten Nierenfunktion mit gestörter renaler Ausscheidung von Flüssigkeit, Elektrolyten, Hormonen oder Kataboliten. Zu den Kataboliten – auch harnpflichtige Substanzen genannt – zählen beispielsweise Harnstoff, Harnsäure oder Kreatinin. Die Niereninsuffizienz kann dabei als akute, chronische oder terminale Niereninsuffizienz in Erscheinung treten. Die chronische Niereninsuffizienz ist definiert als Zustand eines strukturellen oder funktionellen Nierenschadens oder einer Nierenleistung von 60% oder weniger ($GFR \leq 60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$) über einen Zeitraum von mindestens 3 Monaten. Bei einer Nierenleistung von $\leq 15\%$ spricht man von terminaler Niereninsuffizienz.

Ursachen von chronischer oder terminaler Niereninsuffizienz beim Erwachsenen sind beispielsweise die Krankheitsbilder diabetische Nephropathie, Nephrosklerose durch Hypertonie, Glomerulonephritis, interstitielle Nephritis oder polyzystische Nierenerkrankungen

oder auch systemische Erkrankungen wie Amyloidose oder die Granulomatose mit Polyangiitis. Bei Kindern sind angeborene Fehlbildungen der Nieren die häufigste Ursache (Beccherucci *et al.* 2016; Foris & Bhimji 2017).

Die Mikrozirkulationsforschung lieferte bisher zahlreiche Hinweise dafür, dass eine chronische Niereninsuffizienz mit strukturellen mikrovasalen Veränderungen sowie mit funktionellen Beeinträchtigungen von Endorganen assoziiert ist. Bohle *et al.* stellten bereits Mitte der 90er Jahre bei chronisch niereninsuffizienten Patienten eine postglomeruläre mikrovasale Ausdünnung im Nierenparenchym fest. Sie stützten sich dabei auf die Auswertungen von Nierenbiopsien (Bohle *et al.* 1996). Diese Resultate wurden später durch Tanaka und Nangaku in einer ähnlichen Studie bestätigt. Auch sie stellten im Nierenparenchym dieser Patientengruppe eine strukturell rarefizierte Mikrozirkulation fest. Diese ging funktionell mit einer verminderten glomerulären Filtrationsrate einher (Tanaka & Nangaku 2013).

Vergleichbare Beobachtung wurden in Tiermodellen gemacht. Ohashi *et al.* induzierten bei Ratten eine experimentelle Glomerulonephritis und diagnostizierten eine postglomeruläre kapillare Rarefizierung (Ohashi *et al.* 2000). Ähnliche Ergebnisse ergaben Versuche an Ratten mit experimenteller unilateraler Ureter-Obstruktion (Ohashi *et al.* 2002).

Kang *et al.* untersuchten die Expression von Angiogenese-Faktoren an subtotal nephrektomierten Ratten. In den ersten beiden postoperativen Wochen stellten sie im Nierenparenchym eine verstärkte VEGF-Expression einhergehend mit verstärkter Proliferation von peritubulären und glomerulären Endothelzellen fest. Erstaunlicherweise wurde ab der dritten Woche VEGF herunter- und der Angiogenese-Hemmer Thrombospondin 1 hochreguliert, was mit einer progressiven Ausdünnung der renalen Mikrozirkulation einherging (Kang *et al.* 2001). Vergleichbar beobachteten Zhu *et al.* an Schweinen mit experimenteller Nierenarterienstenose eine Ausdünnung der Mikrozirkulation in der Nierenrinde bei vermindert exprimierten VEGF und VEGFR-2 Proteinen (Zhu *et al.* 2004).

Pathologische Veränderungen der Mikrozirkulation unter urämischen Bedingungen wurden im Tiermodell nicht nur im renalen Mikrogefäßsystem nachgewiesen (Hansen-Smith *et al.* 1996; Iliescu *et al.* 2010; Ehling *et al.* 2016), sondern auch in mikrovasalen Stromgebieten anderer Organe wie im Myokard (Amann *et al.* 1992; Amann & Ritz 2000), Retina (Ooi *et al.* 2011) oder im *M. cremaster* (Chen *et al.* 1981; Flisinski *et al.* 2014).

Bisher wurden möglichen systemischen Veränderungen der Mikrozirkulation bei chronischer Niereninsuffizienz jedoch nur eine geringe Relevanz für diagnostische oder therapeutische Ansätze zugemessen. Dies ist umso bemerkenswerter, da schon frühzeitig eine mit der chronischen Niereninsuffizienz assoziierte massive Steigerung der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität beobachtet wurde.

Bereits in den frühen 1970er Jahren publizierten Lindner *et al.*, dass Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz unter Hämodialysebehandlung ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Mortalität aufwiesen (Lindner *et al.* 1974). Seitdem zeigten zahlreiche klinischen Studien, dass kardiovaskuläre Ereignisse die primäre Ursache für die Mortalität von niereninsuffizienten Patienten sind (Mathews *et al.* 2011). Insbesondere bei Kindern und Jugendlichen mit terminaler Niereninsuffizienz ist die kardiovaskuläre Komorbidität einer der kritischen Faktoren für das Langzeitüberleben. Bei Todesfällen von dialysepflichtigen Kindern und Jugendlichen im Jahr 2008 in den USA waren die Todesursachen in 22% der Fälle mit kardialen Endorganschäden assoziiert – in der Normalbevölkerung der gleichen Altersklasse waren es nur 3% (Mathews *et al.* 2011).

Das kardiovaskuläre Erkrankungsspektrum bei Niereninsuffizienten unterscheidet sich dabei gravierend von dem üblichen Arteriosklerose-assoziierten Phänotyp der Allgemeinbevölkerung (Massy & Drueke 2013). Es treten charakteristische Läsionen und Kalzifizierungen an großen arteriellen Gefäßen auf, wie zum Beispiel Intima-Verbreiterungen, Media-Kalzifizierungen von Nierenarterien oder Iliakalarterien (Ibels *et al.* 1979), oder Media-Kalzifizierungen von Koronararterien oder der Aorta (Edwards-Richards *et al.* 2014).

Gleichzeitig ist die hohe Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse bei dieser Patientengruppe nicht über die klassischen Risikofaktoren wie Rauchen, Hypertonie oder Stoffwechselstörungen allein zu erklären. Nicht-koronare Faktoren scheinen bei der Genese dieser kardialen Komplikationen eine wichtige Rolle zu spielen. Hier könnten funktionelle und strukturelle Veränderungen der Myokard-Mikrozirkulation, wie zum Beispiel eine abnormale Regulation von Vasodilatation oder Vasokonstriktion, oder eine abnormale Angioarchitektur der Mikrozirkulation weiterführende pathomechanistische Erklärungsmodelle sein (Amann & Ritz 2000).

1.3 Ziele der vorliegenden Arbeit

Nach heutiger Ansicht spielt die Dysfunktion der Mikrozirkulation bei chronischer Niereninsuffizienz möglicherweise eine zentrale Rolle bei der Ätiologie von Endorganschäden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die Rarefizierung der Mikrozirkulation bei Urämie intravitalmikroskopisch in zwei Tiermodellen zu untersuchen und strukturell und funktionell zu charakterisieren. Hierfür wurde der Skelettmuskel als untersuchtes Gewebe und der *M. cremaster* der Maus als Modell gewählt. Folgende Arbeitshypothese wurde als Grundlage dieser Dissertation formuliert:

Mit zunehmender experimentell induzierter Urämie findet eine fortschreitende Rarefizierung der Mikrozirkulation im Skelettmuskel statt. Diese strukturellen Veränderungen haben funktionelle Konsequenzen und beeinträchtigen die Sauerstoffversorgung des Gewebes.

Aus der Arbeitshypothese wurden vier Kernfragen abgeleitet:

- 1. Eignen sich die Tiermodelle zur Induktion einer experimentellen Niereninsuffizienz?**
- 2. Welches Ausmaß und welche Abhängigkeiten zeigt die Rarefizierung?**
- 3. Welche strukturellen Charakteristika weist die rarefizierte Mikrozirkulation auf?**
- 4. Wie beeinträchtigt die Rarefizierung den Sauerstofftransport?**

2. Material und Methoden

2.1 Tiermodelle

2.1.1 Versuchstiere

Insgesamt 39 Mäuse vom Typ Balb/c im Alter von ca. sechs Wochen und mit einem Gewicht zwischen 17 g und 25 g wurden für die intravitalmikroskopische *in vivo* Untersuchung der Mikrozirkulation des *M. cremaster* eingesetzt. Die Tiere wurden von der Firma Charles River GmbH bezogen und in der Experimentaltierhaltung der Charité-Universitätsmedizin Berlin unter Standardhaltungsbedingungen und unter Berücksichtigung der gesetzlichen und internen Anforderungen gehalten. Die Tierexperimente wurden durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin unter der Referenz-Nummer G 0396/10 vom 9. März 2011, genehmigt.

Zur Herbeiführung der experimentellen Urämie wurden zwei Tiermodelle angewendet. Von den 39 Mäusen wurden 27 Tiere in einem Adenin-Urämiemodell und 12 Tiere in einem Nephrektomie-Urämiemodell eingesetzt (Abbildung 2.1).

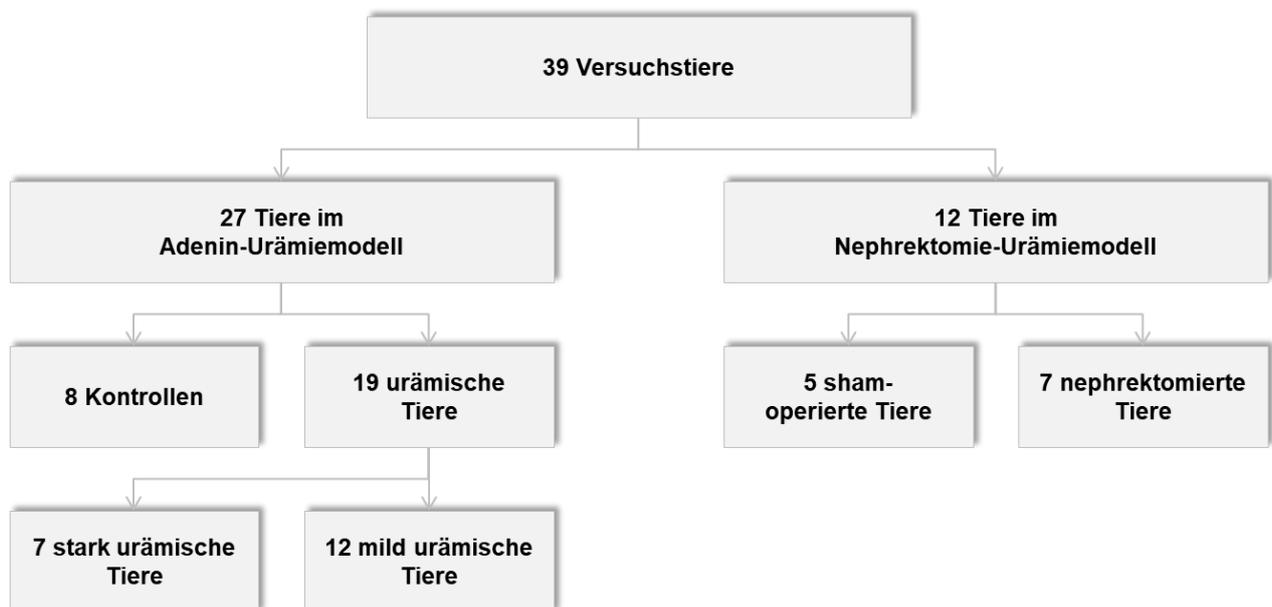


Abbildung 2.1: Übersicht der durchgeführten Tierversuche. Von den insgesamt 39 Mäusen wurden 27 Tiere dem Adenin-Urämiemodell und 12 Tiere dem Nephrektomie-Urämiemodell zugeordnet. Im Adenin-Urämiemodell erhielten 19 Tiere vier Wochen eine Futterbeimengung von 0,2% Adenin. Acht Tiere erhielten reguläres Futter. Im Nephrektomie-Urämiemodell wurden sieben Tiere einer subtotalen Nephrektomie unterzogen, fünf Tiere wurden sham-operiert.

2.1.2 Experimentelle Urämie durch Adenin-Gabe

Im Adenin-Urämiemodell wurden bei 19 Tieren über einen Zeitraum von vier Wochen 0,2% Adenin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) dem Standardfutter ROD18 (LASvendi GmbH, Soest) beigemischt. Acht Kontrollen erhielten das Standardfutter ROD18 ohne Beimischung. Nach vier Wochen erfolgte die intravitalmikroskopische Untersuchung des *M. cremaster*.

In Vorversuchen zur Adenin-Dosierung wurden einige Tiere zur Urämie-Induktion mit 0,15% und 0,25% Adenin-Futterbeimischung behandelt. Im Falle der 0,15% Futterbeimischung zeigten die Tiere keine der bekannten Symptome der Niereninsuffizienz, d.h. weder Gewichtsverlust noch erhöhte Serum-Harnstoff-Werte. Im Falle der 0,25% Futterbeimischung waren die Tiere bei erkennbarem Gewichtsverlust bereits nach wenigen Tagen sichtlich geschwächt. Die spätere Obduktion ergab Nekrosen an Organen wie z.B. Darm, inneren oder äußeren Geschlechtsorganen. Der Serum-Harnstoff war überdimensional erhöht. Beide Vorversuche wurden abgebrochen. Entsprechend wurde eine 0,2% Adenin-Dosis festgelegt, die von den Versuchstieren toleriert wurde.

2.1.3 Experimentelle Urämie durch Nephrektomie

Von den 12 Tieren im Nephrektomie-Urämiemodell wurde bei sieben eine 5/6 Nephrektomie durchgeführt: Hierfür wurden die Tiere 30 Minuten präoperativ mit Metamizol analgisiert (200 mg/kg p.o., MSD Animal Health GmbH, Luzern, Schweiz). Isofluran diente sowohl der Narkoseeinleitung (4%/LO₂, CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf) als auch der Narkoseaufrechterhaltung (2%/LO₂). Der Retroperitonealraum wurde chirurgisch geöffnet, die rechte Niere dargestellt und vollständig entnommen, der Zugang per Klammern wieder verschlossen und Tramal (10 mg/kg s.c., Grünenthal GmbH, Brunn, Österreich) zur Analgesie unmittelbar appliziert. Postoperativ erhielten die Tiere für drei Tage weiterhin Tramal (2,5 mg/100 mL Trinkwasser p.o.). Nach einer zweiwöchigen Erholungsphase wurde die linke Niere zu 2/3 unter vergleichbarem Prozedere entfernt. Die Tiere wurden täglich inspiziert und gewogen. Nach vier Monaten erfolgte die intravitalmikroskopische Untersuchung.

Fünf weitere Tiere wurden einer Sham-Operation bei identischer Analgesierung, Narkose, Öffnung des Retroperitonealraumes, Darstellung der Niere, Wundverschluss und postoperativer Medikation unterzogen.

2.2 *Musculus cremaster*

2.2.1 Anatomie des *M. cremaster*

Der *Musculus cremaster* ist ein Skelettmuskel, der sich aus dem *M. obliquus internus abdominis* und dem *M. transversus abdominis* des Unterbauchs abzweigt. Er steht in Verbindung mit der Fascia spermatica interna des Hodens, über die er den Hoden zur Körpermitte ziehen kann (Kremasterreflex). Dadurch wird die Temperatur des Hodens reguliert und somit die Spermienproduktion optimiert. Der *M. cremaster* ist aufgrund seiner dünnen Schichtdicke ein geeignetes Gewebe für die Untersuchung der Mikrozirkulation per Durchlicht-Mikroskopie.

Die arterielle Versorgung des *M. cremaster* erfolgt über die *A. cremasterica*, einem Ast der *A. epigastrica inferior*. Das venöse Blut des *M. cremaster* mündet in den *Plexus pampiniformis* und von dort in die *V. testicularis*. Innerviert wird der *M. cremaster* durch den *Ramus genitalis* des *N. genitofemoralis*.

2.2.2 Präparation des *M. cremaster*

Eine Stunde vor der intravitalmikroskopischen Untersuchung wurden die Mäuse mit Urethan i.p. (1.500 mg/kg, Pfizer GmbH, Berlin) und Ketamin i.m. (50 mg/kg, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim) anästhesiert und auf einer thermoregulierten Heizmatte (37° C Soll-Temperatur) auf einem speziellen Versuchstisch aus Acrylglas (29 cm x 28 cm) in Rückenlage fixiert. Um einer Atemwegsobstruktion vorzubeugen, wurde eine Tracheotomie durchgeführt. Über einen Jugularvenen-Katheter wurde 0,9%ige NaCl-Lösung dem Blutkreislauf zugeführt (0,1 bis 0,2 mL/h). Über einen weiteren Katheter mit Druckaufnehmer in der *A. carotis* wurden der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) sowie der Herzrhythmus während der intravitalmikroskopischen Untersuchung kontinuierlich gemessen. Während Präparation und intravitalmikroskopischer Untersuchung wurde die Narkose regelmäßig anhand des Zwischenzehreflexes geprüft und bedarfsgerecht Ketamin intraoperativ appliziert (25 mg/kg i.m.).

Das Skrotum der Tiere wurde mit einem Schnitt geöffnet, der *M. cremaster* dargestellt und Faszien und Bindegewebe vorsichtig entfernt. Auf einer Vorrichtung wurde der *M. cremaster* auf eine Fläche von ca. 1 cm² mit Fäden aufgespannt und mit Klarsichtfolie (Saran, SC Johnson, Racine, USA) vor Austrocknung geschützt. Nach der Untersuchung wurde das Tier mit Pentobarbital (250 mg/kg i.p., Arcana GmbH, Gütersloh) eingeschläfert.

2.3 Versuchsaufbau der Intravitalmikroskopie

Die präparierte Maus wurde mitsamt Versuchstisch unter dem Mikroskop fixiert. Der Tisch war mithilfe einer computergesteuerten Vorrichtung mikrometergenau in alle drei Raumrichtungen verschiebbar (Elasta Elektrotechnik AG, Bad Ragaz, Schweiz). Das Intravitalmikroskop war mit einer CCD-Kamera (Charge Coupled Device, CF 5/8 MX Kappa Optronics GmbH, Gleichen) ausgestattet (Abbildung 2.2).

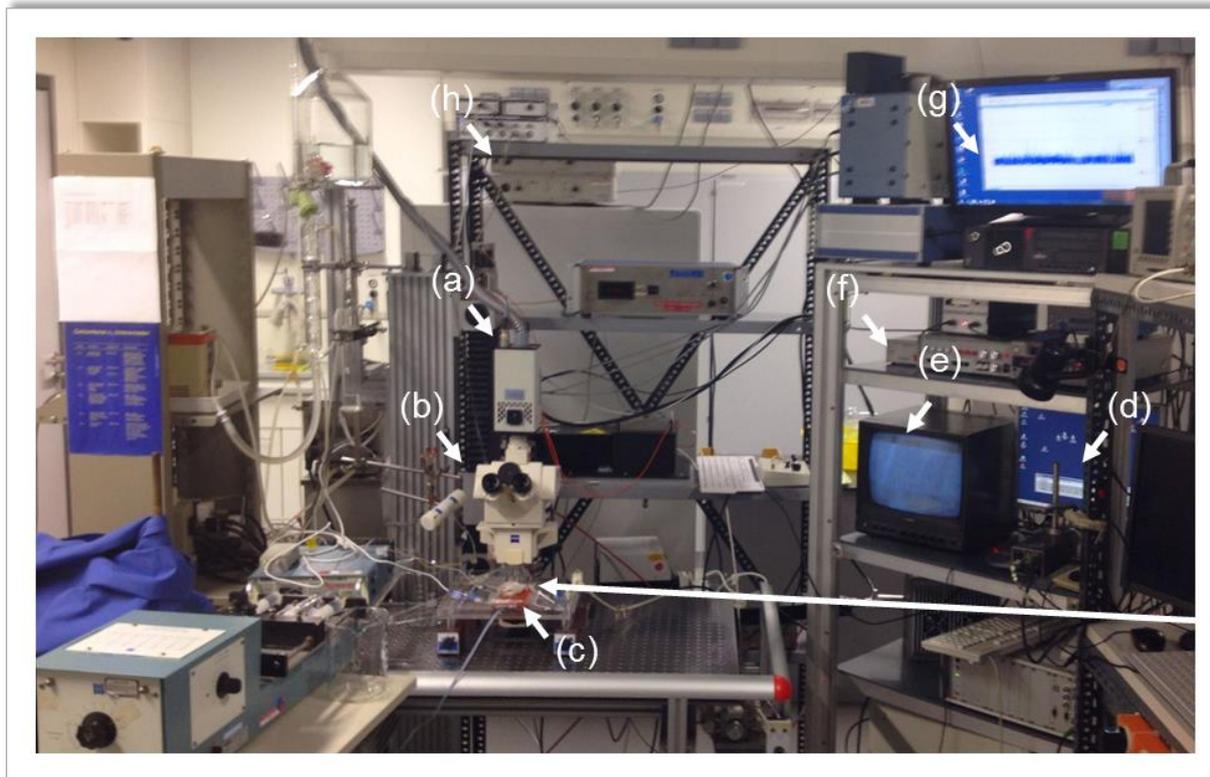


Abbildung 2.2: Versuchsaufbau für die Intravitalmikroskopie. (a) Till Vision Kamera (TillPhotonics GmbH, Gräfelfing) – konnte durch eine CCD Kamera ausgetauscht werden – siehe Kapitel 2.3 und 2.4.2), (b) Mikroskop, (c) Versuchstisch mit Versuchstier, (d) Steuerung der Mikroskopoptik, (e) VHS Monitor, (f) VHS Rekorder, (g) Blutdruck-Monitor, (h) Doppelblitz-Generator.

2.4 Versuchsdurchführung

2.4.1 Videoaufnahmen

Gefäßsysteme sind dreidimensionale Gebilde. Da der präparierte *M. cremaster* jedoch sehr dünn (ca. 200 μm gemessene mittlere Schichtdicke) und weitgehend transparent ist, konnte unter Durchlicht ein Großteil der räumlich angeordneten Mikrozirkulation in einem zweidimensionalen Projektionsbild erkannt werden. Entsprechend wurden zur Quantifizierung der Gefäßdichte nicht die Gefäßlängen pro Volumeneinheit, sondern die Gefäßlängen pro Projektionsfläche in der Einheit $\mu\text{m}/1.000 \mu\text{m}^2$ erfasst.

Ein initiales Gesichtsfeld wurde mit dem Intravitalmikroskop (Axiotech vario, Carl Zeiss, Jena) mit einem Wasserimmersionsobjektiv (Leitz, 20x / NA 0.17), Grünfilter zur Kontrastmittelverstärkung (Schott AG, Mainz), Xenon-Durchlicht und 1,6-facher Objektivpfad-Vergrößerung visualisiert (Abbildung 2.2). Ein Gesichtsfeld hatte die Größe von ca. 250 μm x 350 μm mit ca. 10% Überstand an den Außenrändern. Mit dem Videorekorder (DVCAM 64 PDV-64ME Sony, Japan) wurde eine einminütige Filmaufnahme der Mikrozirkulation auf Band in schwarz-weißem Format aufgezeichnet. Auf diesen Videosequenzen konnten Mikrogefäße und deren Blutströme bis hin zu Bewegungen einzelner Erythrozyten oder Leukozyten zumeist gut erkannt werden.

Nach der Aufzeichnung eines Gesichtsfeldes wurde der Mikroskopisch einschließlich Versuchstier so verschoben, dass das neue Gesichtsfeld unmittelbar an das vorherige anschloss. Dieses Prozedere wurde für alle neun Gesichtsfelder im Sinne einer 3 x 3 Matrix durchgeführt. Diese 3 x 3 Matrix ergab ein Cremaster-Areal. Ein Cremaster-Areal beinhaltet somit eine Projektionsfläche von ca. 750 μm x 1.050 μm (Abbildung 2.3). Pro Maus wurden bis zu fünf Cremaster-Areale, d.h. bis zu 45 Gesichtsfelder aufgezeichnet.

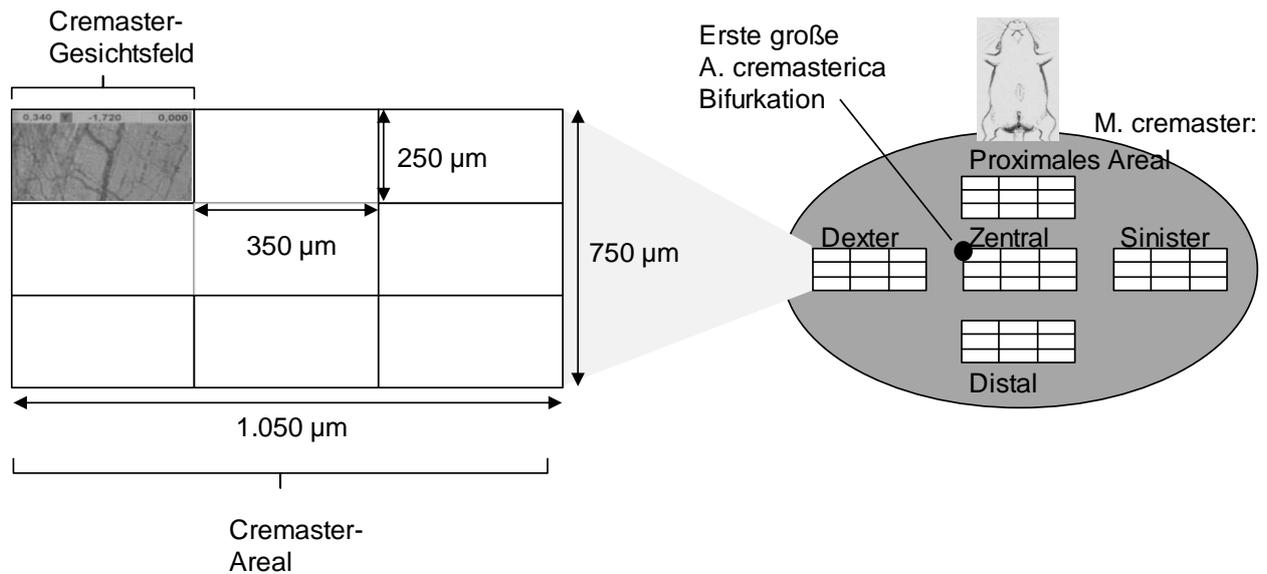


Abbildung 2.3: Systematik der Filmsequenz-Aufzeichnungen. Der *M. cremaster* der Maus wurde vom Hoden abpräpariert und auf einer Vorrichtung auf eine Größe von ca. 1 cm² aufgespannt. Die Mikrozirkulation von bis zu fünf Cremaster-Arealen à neun Gesichtsfeldern wurde aufgezeichnet. Das zentrale Cremaster-Areal wurde an der ersten großen Bifurkation der in den *M. cremaster* eintretenden *A. cremasterica* positioniert. Die weiteren vier Cremaster-Areale wurden in einer Kreuz-Formation unter einheitlichen horizontalen und vertikalen Abständen von 2.020 µm und 1.720 µm positioniert.

2.4.2 Asynchrone Doppelblitz-Aufnahmen

Um die Strömungsgeschwindigkeit der Erythrozyten zu erfassen, wurde die Blutströmung mit einem asynchronen Doppelblitz-System aufgenommen (Pries 1988). Eine CCD Kamera beleuchtet und registriert zunächst ein erstes Halbbild und nach einer Verzögerung von wenigen Millisekunden ein zweites Halbbild (Verzögerung von 5,5 ms bei niedrigen Blutströmungsgeschwindigkeiten bzw. 1,1 ms bei hohen Geschwindigkeiten). Durch diese Halbbildaufnahmen konnten die Positionsänderungen der in der Blutströmung befindlichen Erythrozyten registriert und über einen Algorithmus deren Strömungsgeschwindigkeiten berechnet werden. Die Blutströmung in einem Gefäß wurde deshalb für einen Zeitraum von ca. 10 Sekunden bei asynchroner Doppelblitz-Beleuchtung aufgenommen. Die Auswertungen der Doppelblitz-Aufnahmen werden im Kapitel 2.5.3 erläutert.

2.5 Methoden der Versuchsauswertung

2.5.1 Angioarchitektur

Die Videosequenz wurde auf einem Monitor (Panasonic Colour Video Monitor BT-H1450Y) wiedergegeben. Mit der hauseigenen Software »Vision 3D« wurde das aufgenommene Mikrogefäßsystem digital rekonstruiert (Abbildung 2.4). Längen und Durchmesser der Gefäße, Lokalisationen von Bifurkationen sowie die Ausrichtung der Blutströmung wurden numerisch erfasst. Die Daten wurden im Microsoft Editor aufbereitet und mit den Programmen Microsoft Excel 2010, Matlab 2008 (MathWorks, Natick, USA) sowie Sigmaplot 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, USA) visualisiert und ausgewertet.

2.5.2 Intervaskuläre Areale und Diffusionsdistanzen

Wird ein dreidimensionales Gefäßsystem auf eine zweidimensionale Fläche projiziert (Kapitel 2.4.1), entsteht das Bild eines wabenförmigen Netzwerks von Gefäßstrecken. Die Fläche innerhalb einer solchen von Gefäßen begrenzten Wabe wird im Folgenden als »intervaskuläres Areal« (IVA) bezeichnet (Abbildung 2.5-A).

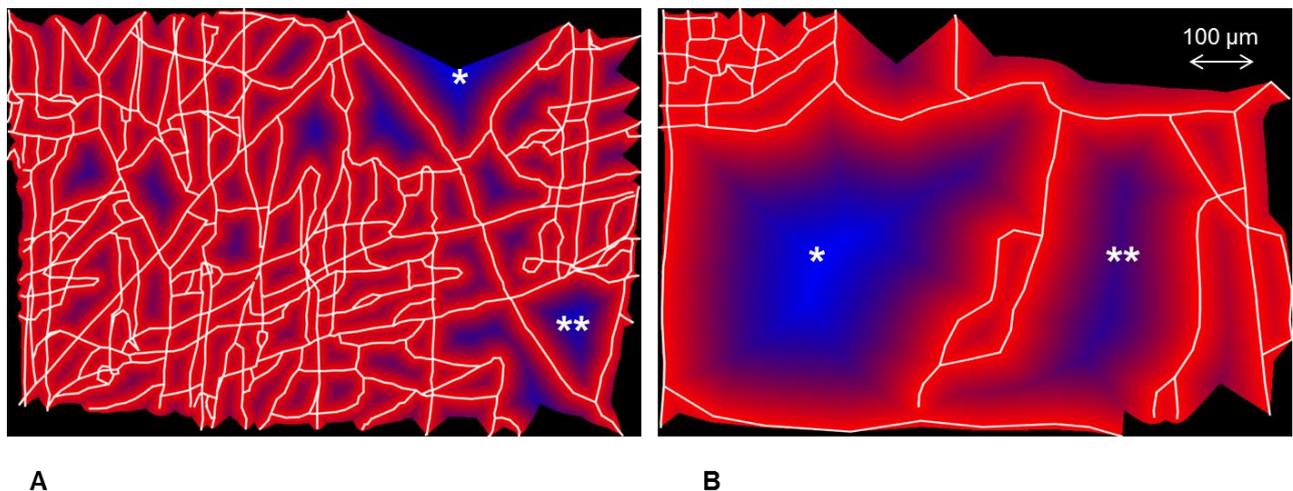


Abbildung 2.4: Digitale Rekonstruktion von Cremaster-Arealen. Die weißen Linien sind rekonstruierte Mikrogefäße, welche intervaskuläre Areale (IVA) umschließen. Die perivaskulären IVA-Bereiche sind rot gefärbt, die von den Gefäßen weiter distal gelegenen IVA-Bereiche sind blau gefärbt. **A** – Cremaster-Areal-Rekonstruktion einer Kontrolle: Serum-Harnstoff: 46 mg/dL, Gefäßdichte: 54 $\mu\text{m}/1.000 \mu\text{m}^2$. Das größte IVA (*) hat eine Projektionsfläche von 37.524 μm^2 , das zweitgrößte IVA (**) von 25.603 μm^2 . **B** – Cremaster-Areal-Rekonstruktion einer stark urämischen Maus: Serum-Harnstoff 450 mg/dL, Gefäßdichte: 12 $\mu\text{m}/1.000 \mu\text{m}^2$. Das größte IVA (*) hat eine Projektionsfläche von 314.252 μm^2 , das zweitgrößtes IVA (**) von 221.790 μm^2 .

Zur Berechnung seiner Größe wurde jedes IVA Mithilfe der Software Matlab 2008 (MathWorks, Natick, USA) virtuell in Pixelgrößen ($0,3 \mu\text{m} \times 0,3 \mu\text{m} = 0,09 \mu\text{m}^2$) unterteilt. Die Vergrößerungseinstellung des Mikroskops wurde dabei entsprechend berücksichtigt (Kapitel 2.4.1). Ein Pixel entsprach im Modell der kleinsten auflösbaren Gewebe-Einheit (KGE) des *M. cremaster* (Abbildung 2.5-B). Die IVA Größe errechnete sich somit aus der Anzahl der KGEs, multipliziert mit der KGE-Fläche ($0,09 \mu\text{m}^2$).

Weiterhin wurde von jeder KGE aus die Distanz zum nächstgelegenen Blutgefäß berechnet. Diese Distanz wird im Folgenden als Diffusionsdistanz (DD) bezeichnet (Abbildung 2.5-C). Die DD entspricht der Distanz, die z.B. Sauerstoff per Diffusion zurücklegen muss, um das Gewebe der KGE entsprechend zu versorgen.

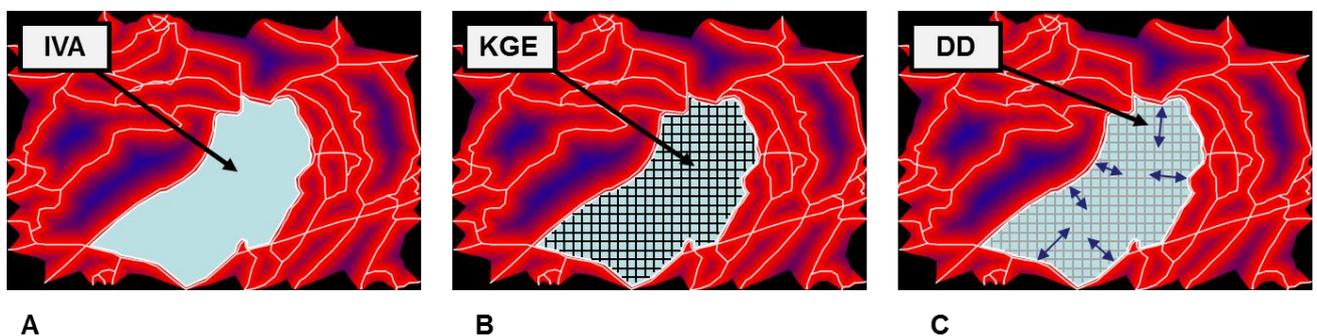


Abbildung 2.5: Prinzip der Diffusionsdistanz-Quantifizierung. **A** – IVA, Intervaskuläres Areal: Eine von rekonstruierten Gefäßen umgebene Projektionsfläche. **B** – KGE, Kleinste Gewebeeinheit: Flächeneinheiten der Größe $0,3 \mu\text{m} \times 0,3 \mu\text{m}$. **C** – DD, Diffusionsdistanzen: Abstand von einer KGE zur nächstgelegenen Kontaktstelle mit einem Blutgefäß.

Da es sich bei den untersuchten Mikrogefäßen zumeist um Kapillaren handelt (Tabelle 3.3) wird in diesem Schema nicht zwischen arteriellen und venösen Gefäßen unterschieden. Auch kann davon ausgegangen werden, dass der entsorgende Diffusionsstrom – im Wesentlichen die Diffusion von Kohlendioxid – aufgrund der fast zehnfach höheren Diffusionskapazität von Kohlendioxid im Vergleich zu Sauerstoff keine bedeutende Restriktion bei der metabolischen Gewebeversorgung darstellt.

2.5.3 Blutströmungsgeschwindigkeit

Die Blutströmungsgeschwindigkeit wurde durch Auswertung der asynchronen Doppelblitz-Aufnahmen mit einer vom Institut für Physiologie der Charité-Universitätsmedizin entwickelten Software berechnet (Pries 1988). Die Software kann – auf dem Prinzip der räumlichen Korrelationsanalyse basierend – die Verschiebung von Lichtintensitäts-Paaren zwischen definierten Fixpunkten erfassen. Der Blutstrom wird an zwei definierten Zeitpunkten jeweils per Blitzlicht beleuchtet (Kapitel 2.4.2). Erythrozyten absorbieren und brechen dabei das Licht. In jeder Beleuchtungsphase entsteht so ein individuelles Brechungsmuster, das mit dem Blutstrom wandert. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Brechungsmuster wird erfasst und daraus die Strömungsgeschwindigkeit berechnet. Schwankungen im Blutstrom durch z.B. Pulsation werden numerisch geglättet.

2.5.4 Leukozytenrollengeschwindigkeit

Für die Ermittlung der Geschwindigkeit von rollenden Leukozyten an der luminalen Venolenwand wurde deren zurückgelegte Wegstrecke mit der Software Vision 3D erfasst und diese durch die dafür benötigte Zeit dividiert.

2.5.5 Blutproben

Nach der intravitalmikroskopischen Untersuchung wurden Blutproben durch Exsanguination entnommen. Diese wurden zentrifugiert und das Serum an das Labor (Labor Berlin Charité Vivantes GmbH, Berlin) weitergeleitet. Das Labor ermittelte die Blutwerte Harnstoff und Kreatinin. Weiterhin wurde der IL-6 Blutwert per ELISA-Test bestimmt (BioLegend Inc. San Diego CA, USA). Aufgrund logistischer und kapazitiver Gründe wurden jedoch nicht immer alle Blutwerte durch das Labor bestimmt. Deshalb sind im Folgenden in einigen Fällen die genannten Fallzahlen kleiner als die Anzahl der eingesetzten Tiere.

2.5.6 Statistische Verfahren

Numerische Parameter werden angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung. Für statistische Auswertungen wurden die Programme IBM SPSS Version 23 sowie GraphPad Prism 5.01 benutzt. Für die grafische Darstellung von Variablen werden zum Teil Kastengrafiken (englisch: Boxplots) verwendet (z.B. Abbildung 3.1). Die Antennen (englisch Whiskers) der Kastengrafiken stellen den Standardfehler der Variablen dar.

Signifikanzen wurden per Wilcoxon-Mann-Whitney oder Kruskal-Wallis Test errechnet. Dabei wurde für die Feststellung einer statistischen Signifikanz ein Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ festgelegt. Um den Fehler der Alpha-Kumulierung bei multiplen Parametervergleichen zu neutralisieren, wurde eine Korrektur nach der Holm-Bonferroni Methode angewendet. Korrelationen zwischen Variablen wurden per Spearman Korrelation bewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Experimentelle Urämie

Die Induktion der experimentellen Urämie erfolgte in zwei unterschiedlichen Modellen: Adenin-Urämiemodell und Nephrektomie-Urämiemodell. Das Ausmaß der erzielten Urämie wurde dabei anhand des Retentionsparameters »Serum-Harnstoff« bewertet. Neben weiteren wichtigen Parametern der Urämie im Serum (Kreatinin, IL-6, Hämatokrit) standen auch das Körpergewicht und der Blutdruck der Versuchstiere wegen ihrer möglichen Auswirkungen auf die Rarefizierung des Mikrogefäßsystems unter Beobachtung (Flisinski *et al.* 2008). Die Analysen dieser Parameter werden im Folgenden dargestellt.

3.1.1 Harnstoff

Der Serum-Harnstoff von gesunden Mäusen wird in der Literatur mit $47,4 \pm 20,4$ mg/dL ($n=30$) angegeben (Zur 2005). Im Adenin-Urämiemodell wurde der Serum-Harnstoff der Kontrollen ($n=8$) mit $52,5 \pm 20,2$ mg/dL gemessen. Die Werte der Kontrollen sind gegenüber den Daten von Zur nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,76$).

Der Serum-Harnstoff der experimentell urämischen Tiere im Adenin-Urämiemodell ($n=19$) betrug 224 ± 137 mg/dL und war gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht ($p < 0,001$).

Bei den sham-operierten Tieren des Nephrektomie-Urämiemodells ($n=5$) wurde ein Serum-Harnstoff von 41 ± 10 mg/dL gemessen. Die 5/6 nephrektomierten Tiere ($n=7$) hatten einen Serum-Harnstoff von 122 ± 78 mg/dL. Auch in diesem Fall war der Unterschied signifikant ($p < 0,001$).

Drei der sieben nephrektomierten Mäuse hatten einen relativ hohen Serum-Harnstoffwert erreicht (209 ± 46 mg/dL, $p=0,036$). Die anderen vier nephrektomierten Tiere hatten dagegen einen nur gering erhöhten Serum-Harnstoffwert ($59 \pm 2,2$ mg/dL). Bei beiden Untergruppen war der Serum-Harnstoff gegenüber der Sham-Gruppe jedoch signifikant erhöht ($p=0,048$ bzw. $p=0,016$). Im Mittel hatten die sieben nephrektomierten Tiere einen Serum-Harnstoff von 122 ± 84 mg/dL ($p=0,0025$) (Abbildung 3.1).

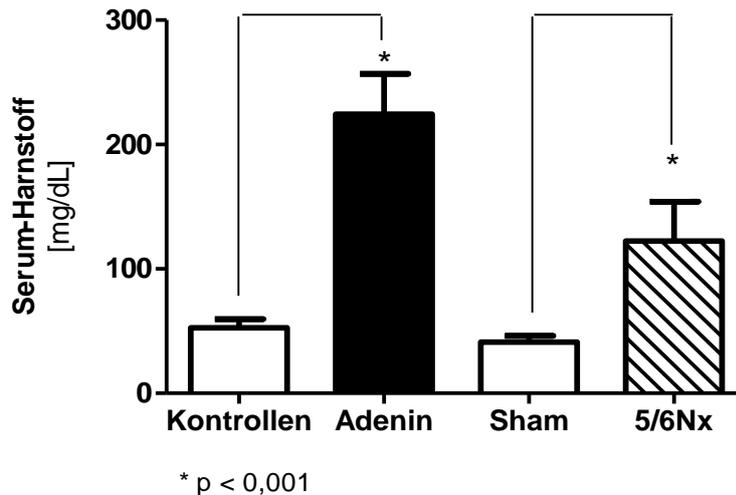


Abbildung 3.1: Harnstoff im Serum. Blutproben wurden den Versuchstieren nach intravitalmikroskopischer Untersuchung durch Exsanguination entnommen und der Harnstoff im Serum bestimmt. Die Abbildung zeigt die Serum-Harnstoffwerte der Tiere des Adenin-Urämie-modells, d.h. Kontrollen (n=8) und Adenin-intoxizierte Tiere (n=19) sowie der Tiere des Nephrektomie-Urämie-modells, d.h. sham-operierte Tiere (n=5) und Tiere mit subtotaler Nephrektomie (n=7).

Im Folgenden werden die Begriffe »milde Urämie« für urämische Mäuse mit einem Serum-Harnstoffwert < 250 mg/dL sowie »starke Urämie« für Tiere mit einem Harnstoffwert \geq 250 mg/dL verwendet.

Im Adenin-Urämie-modell erlitten von den insgesamt 19 intoxizierten Tieren 12 Tiere eine milde Urämie, 7 Tiere erlitten eine starke Urämie. Im Nephrektomie-Urämie-modell erlitten alle sieben nephrektomierten Mäuse eine milde Urämie. Eine starke Urämie konnte durch Nephrektomie bei keinem Tier erreicht werden.

3.1.2 Kreatinin

Das Serum-Kreatinin lag bei den Tieren der Kontrollgruppe des Adenin-Urämie-modells (n=4) bei $0,18 \pm 0,02$ mg/dL. In der Literatur wird ein Kreatinin-Wert bei gesunden männlichen Mäusen (n=30) von $0,22 \pm 0,19$ mg/dL angegeben (Zur 2005).

Im Vergleich zur Kontrollgruppe war das Kreatinin bei den mild urämischen Tieren (n=6) nicht signifikant erhöht ($0,23 \pm 0,10$ mg/dL, p=0,25). Das Serum-Kreatinin der stark urämischen Tiere (n=7) war im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht ($0,67 \pm 0,34$ mg/dL, p=0,033).

Im Nephrektomie-Urämiemodell lag das Serum-Kreatinin der sham-operierten Tiere (n=5) bei $0,15 \pm 0,03$ mg/dL. Bei den nephrektomierten Tieren (n=7) lag das Serum-Kreatinin bei $0,98 \pm 1,08$ mg/dL (Abbildung 3.2). Aufgrund der großen Standardabweichung war der Unterschied dieser Gruppe im Vergleich zur Gruppe der sham-operierten Tiere statistisch nicht signifikant ($p=0,087$).

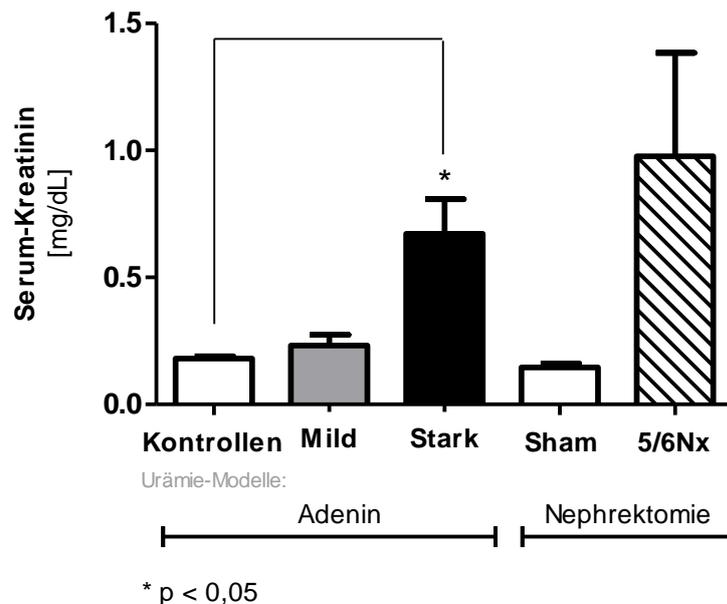


Abbildung 3.2: Kreatinin im Serum. Die Kreatinin-Blutwerte wurden im Labor aus dem Blutserum bestimmt, das nach der intravitalmikroskopischen Untersuchung entnommen wurde. Die Abbildung zeigt die Kreatinin-Werte für die Tiere im Adenin-Urämiemodell d.h. Kontrollen (n=4), mild urämische Tiere (n=6) und stark urämische Tiere (n=7) sowie für die Tiere im Nephrektomie-Urämiemodell d.h. sham-operierte Tiere (n=5) und Tiere mit subtotaler Nephrektomie (n=7).

3.1.3 Interleukin-6

Bei Kontrollen des Adenin-Urämiemodells (n=5) wurde ein Serum-IL-6 von 516 ± 232 pg/mL gemessen. Der IL-6 Spiegel der mild urämischen Tiere (n=6) betrug 900 ± 251 pg/mL. Der IL-6 Spiegel der stark urämischen Tiere (n=7) lag bei 1.199 ± 261 pg/mL. Gegenüber den Kontrollen war der IL-6 Spiegel sowohl der mild urämischen Tiere ($p=0,032$) als auch der der stark urämischen Tiere ($p=0,005$) signifikant erhöht.

Im Nephrektomie-Urämiemodell war bei den sham-operierten Mäusen (n=4) der IL-6 Spiegel 593 ± 662 pg/mL. Die 5/6 nephrektomierten Tiere (n=7) hatten einen IL-6 Serumwert

von 767 ± 595 pg/mL. Der IL-6 Unterschied zwischen sham-operierten und nephrektomierten Tieren war statistisch nicht signifikant ($p=0,79$) (Abbildung 3.3).

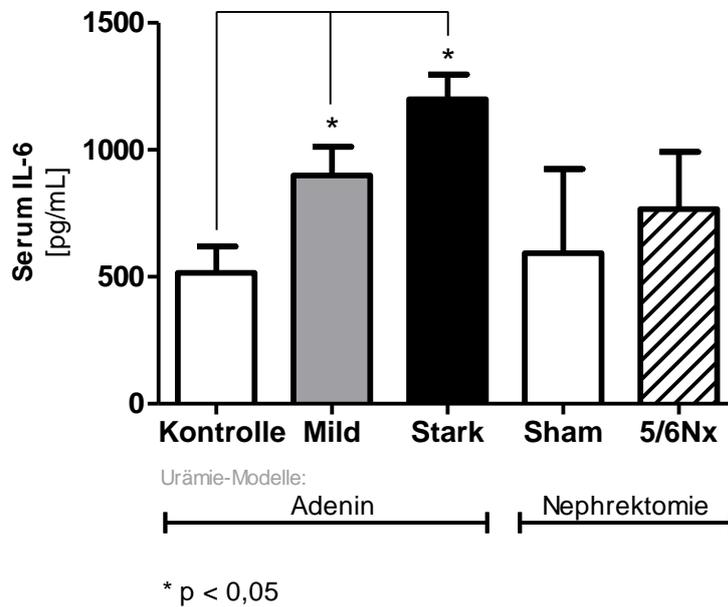


Abbildung 3.3: Interleukin-6 im Serum. IL-6 wurde im Labor aus den Blutproben bestimmt, die nach der intravitalmikroskopischen Untersuchung den Tieren entnommen wurden: Kontrollen ($n=5$), mild urämische Tiere ($n=6$), stark urämische Tiere ($n=7$), sham-operierte Tiere ($n=4$) sowie Tiere mit subtotaler Nephrektomie ($n=7$).

Die gemessenen Serum-IL-6 Einzelwerte aller Vergleichsgruppen korrelierten signifikant mit den korrespondierenden Harnstoff-Werten ($r=0,47$; $p=0,012$).

3.1.4 Hämatokrit

Der mikrovaskuläre Hämatokrit wurde in durchströmten Arterien der Mikrozirkulation in einem Parallelversuch von Maurer per Absorptionsspektrometer gemessen und ausgewertet (Maurer 2018).

Der mikrovaskuläre Hämatokrit der Kontrollen im Adenin-Urämiemodell ($n=8$) lag bei $0,440 \pm 0,043$, der der mild urämischen Tiere ($n=12$) bei $0,442 \pm 0,050$ und der der stark urämischen Tiere ($n=7$) bei $0,355 \pm 0,064$ (Abbildung 3.4). Die Hämatokrit-Differenz zwischen Kontrollen und mild urämischen Tieren war nicht signifikant ($p=0,67$). Der Unterschied zwischen Kontrollen und stark urämischen Tieren war dagegen signifikant ($p=0,005$).

Im Nephrektomie-Modell lag der Hämatokrit der sham-operierten Tiere (n=5) bei $0,438 \pm 0,030$ und der der nephrektomierten Tiere (n=7) bei $0,429 \pm 0,049$. Ein signifikanter Unterschied bestand nicht ($p=0,79$).

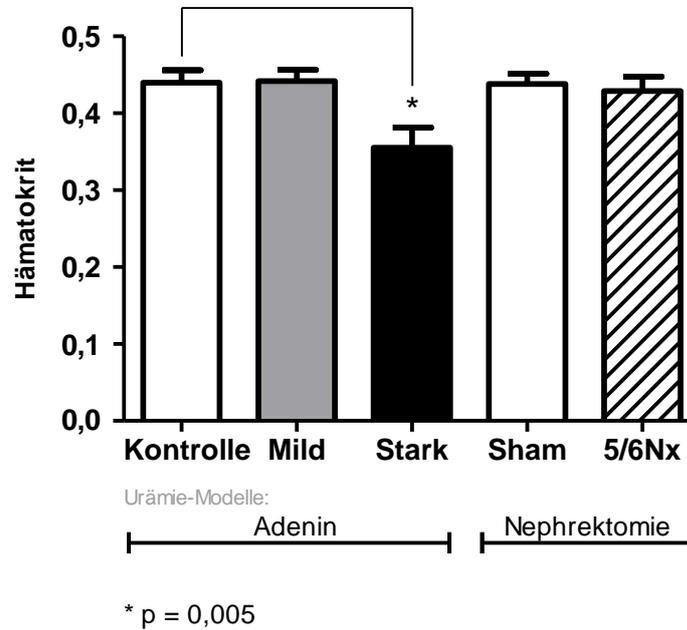


Abbildung 3.4: Hämatokrit. Die Hämatokrit-Werte sind Vergleichsgruppen zugeordnet: Kontrollen (n=8), mild urämische Tiere (n=12), stark urämische Tiere (n=7), sham-operierte Tiere (n=5) sowie subtotal nephrektomierte Tiere (n=7).

Der Hämatokrit der Tiere korrelierte negativ mit dem Serum-Harnstoff ($r=-0,42$; $p=0,008$). Eine lineare Korrelation ergibt den Zusammenhang zwischen Hämatokrit und Serum-Harnstoff mit: $\text{Hämatokrit [\%]} = 44,2\% - 0,015 [\text{dL/mg}] \times \text{Serum-Harnstoff [\text{mg/dL}]}$ (Abbildung 3.5).

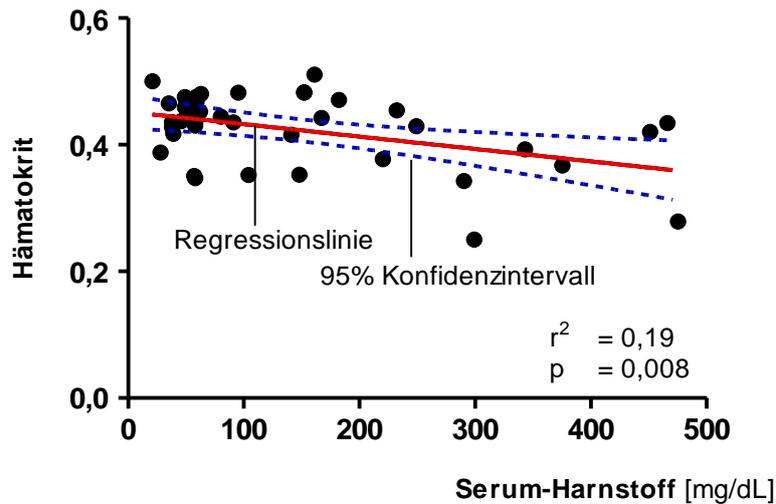


Abbildung 3.5: Hämatokrit in Abhängigkeit vom Serum-Harnstoff. Die Hämatokrit-Werte der Versuchstiere aller Vergleichsgruppen (n=39) (Abbildung 3.4) sind dargestellt über dem Serum-Harnstoff der postoperativ entnommenen Blutproben (Abbildung 3.1).

3.1.5 Körpergewicht

Die Adenin-intoxikierten Tiere verloren während der vierwöchigen Phase der Urämie-Entwicklung an Gewicht (Tabelle 3.1). Dagegen nahmen die nephrektomierten Tiere während ihrer viermonatigen Phase der Urämie-Entwicklung ebenso wie die Kontrollen und sham-operierten Tiere an Gewicht zu.

Tabelle 3.1: Veränderung des Körpergewichts der Versuchstiere. Das Gewicht der Mäuse wurde zu Beginn der Urämie-Entwicklung unmittelbar vor der Adenin-Intoxikation bzw. vor der ersten Nephrektomie-Operation erfasst. Das Endgewicht wurde vor der intravitalmikroskopischen Untersuchung bestimmt.

| | Adenin-Urämiemodell | | | Nephrektomie-Urämiemodell | |
|---|---------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| | Kontrollen (n=8) | Mild urämische Tiere (n=12) | Stark urämische Tiere (n=7) | Sham- operierte Tiere (n=5) | 5/6 Nephrektomie Tiere (n=7) |
| Gewicht zu Beginn der Urämie-Entwicklung | 22,4 ± 0,9 g | 21,9 ± 3,4 g | 23,6 ± 1,2 g | 22,3 ± 1,4 g | 23,2 ± 0,7 g |
| Gewicht am Tag der Intravitalmikroskopie | 23,9 ± 0,5 g | 21,4 ± 4,4 g | 19,1 ± 4,4 g | 27,0 ± 1,5 g | 26,5 ± 2,2 g |
| Gewichtsveränderung | + 9% | - 2% | - 19% | + 21% | + 14% |

Der relative Gewichtsverlust der Tiere korrelierte signifikant negativ mit dem Serum-Harnstoff sowohl im Adenin-Urämiemodell ($r=-0,72$, $p=0,0006$) als auch im Nephrektomie-Urämiemodell ($r=-0,94$; $p<0,0001$).

3.1.6 Blutdruck

Tiere des Adenin-Urämiemodells mit starker Urämie ($n=7$) hatten im Vergleich zu Kontrollen ($n=5$) einen statistisch signifikant erhöhten mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) ($79,1\pm 2,7$ mmHg versus $73,1\pm 2,8$ mmHg, $p=0,005$). MAP Unterschiede zwischen allen anderen Vergleichsgruppen waren statistisch nicht signifikant: Mild urämische Tiere ($n=12$) hatten einen MAP von $76,0\pm 2,6$ mmHg ($p=0,070$), sham-operierte ($n=5$) und nephrektomierte Tiere ($n=7$) hatten einen MAP von $72,8\pm 2,3$ mmHg und $77,0\pm 4,8$ mmHg, $p=0,15$).

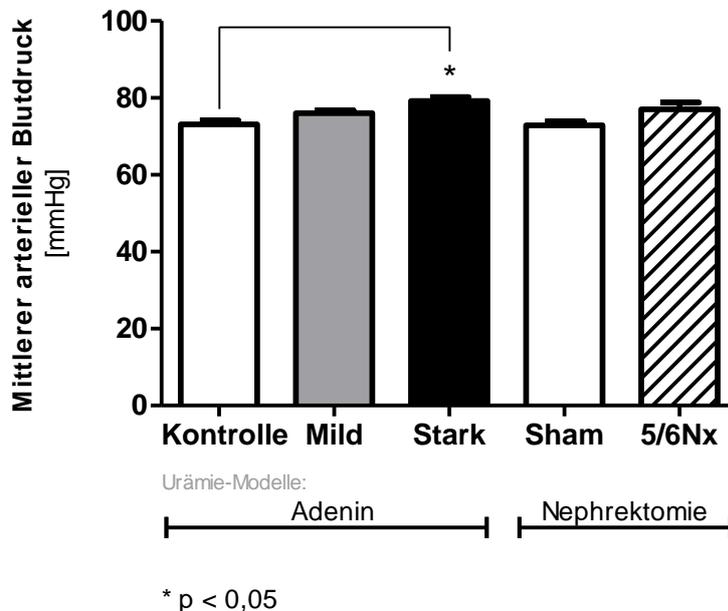


Abbildung 3.6: Mittlerer arterieller Blutdruck. Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) der Tiere wurde über einen Katheter in der Arteria carotis unmittelbar nach Präparation des *M. cremaster* vor und während der intravitalmikroskopischen Untersuchung kontinuierlich gemessen. Der in der Abbildung 3.6 dargestellte MAP entspricht dem MAP zu Beginn der intravitalmikroskopischen Untersuchung.

Der MAP war nach der ca. zwei- bis dreistündigen intravitalmikroskopischen Untersuchung um $14\%\pm 4\%$ abgefallen. Unterschiede im MAP-Abfall zwischen den Vergleichsgruppen waren statistisch nicht signifikant.

3.2 Rarefizierung der Mikrozirkulation

Im Folgenden werden unter dem Begriff Rarefizierung sowohl die strukturelle als auch die funktionelle Rarefizierung subsummiert. Eine differenzierte Betrachtung von struktureller und funktioneller Rarefizierung erfolgt im Kapitel 3.2.3.

3.2.1 Ausmaß der Rarefizierung

Im Adenin-Urämiemodell wiesen die Kontrollen (n=8) eine Mikrogefäßdichte im *M. cremaster* von $40,7 \pm 8,0 \mu\text{m}/1.000 \mu\text{m}^2$ auf. Die mild urämischen Tiere zeigten eine signifikant reduzierte Gefäßdichte von $25,9 \pm 6,3 \mu\text{m}/1.000 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,0001$) und die stark urämischen Tiere von $19,9 \pm 9,3 \mu\text{m}/1.000 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,0001$). Die mittlere Reduktion der Gefäßdichte betrug 36% bzw. 51%.

Im Nephrektomie-Urämiemodell wurde bei den sham-operierten Tieren (n=5) eine Gefäßdichte von $44,6 \pm 8,9 \mu\text{m}/1.000 \mu\text{m}^2$ gemessen. 5/6 nephrektomierte Tiere (n=7) hatten eine signifikant geringere Gefäßdichte von $29,7 \pm 6,8 \mu\text{m}/1.000 \mu\text{m}^2$ ($p < 0,0001$), was einer mittleren Reduktion von 36% entspricht (Abbildung 3.7).

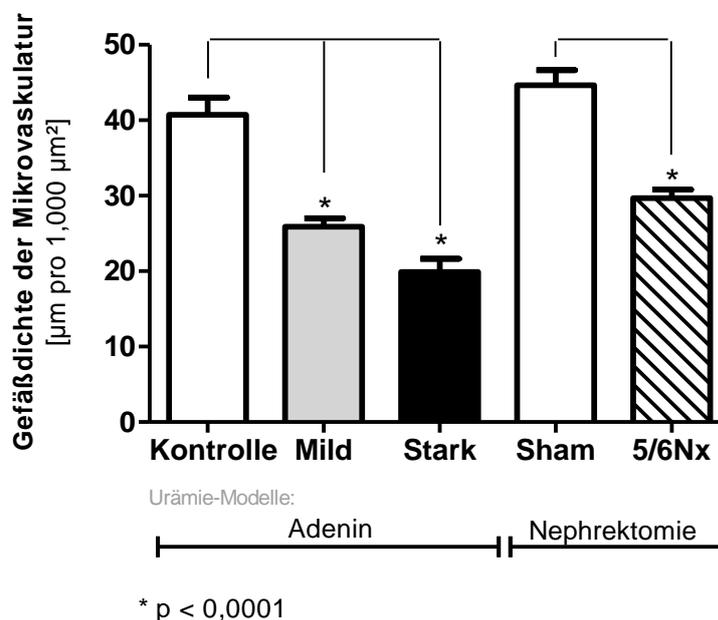


Abbildung 3.7: Dichte der Mikrozirkulation. Von der mittleren Schichtdicke des *M. cremaster* (ca. $200 \mu\text{m}$) konnten mit einer Fokusebene von ca. der Hälfte der Schichtdicke (ca. $100 \mu\text{m}$) die Mikrozirkulation intravitalmikroskopisch dargestellt werden. Von den Mikrogefäßen dieses Ausschnitts wurde ein Projektionsbild erstellt. Das Projektionsbild

wurde per Videokamera aufgenommen und die Mikrogefäße digital rekonstruiert. Die kumulative Länge aller Gefäße wurde ermittelt und auf die Größe der Projektionsfläche bezogen. Der so erhaltene Parameter »Gefäßdichte« hat die Einheit [$\mu\text{m}/1.000 \mu\text{m}^2$]. Dargestellt ist die mittlere Gefäßdichte je Vergleichsgruppe: Kontrollen ($n=8$), Adenin intoxizierte mild ($n=12$) und stark urämische Tiere ($n=7$), sham-operierte Tiere ($n=5$) sowie subtotal nephrektomierte Tiere ($n=7$).

Je Versuchstier wurden die Gefäßdichten von bis zu fünf Cremaster-Arealen ermittelt. Die Gefäßdichten der Areale wurden gegenüber dem Serum-Harnstoff der Maus abgetragen (Abbildung 3.8)

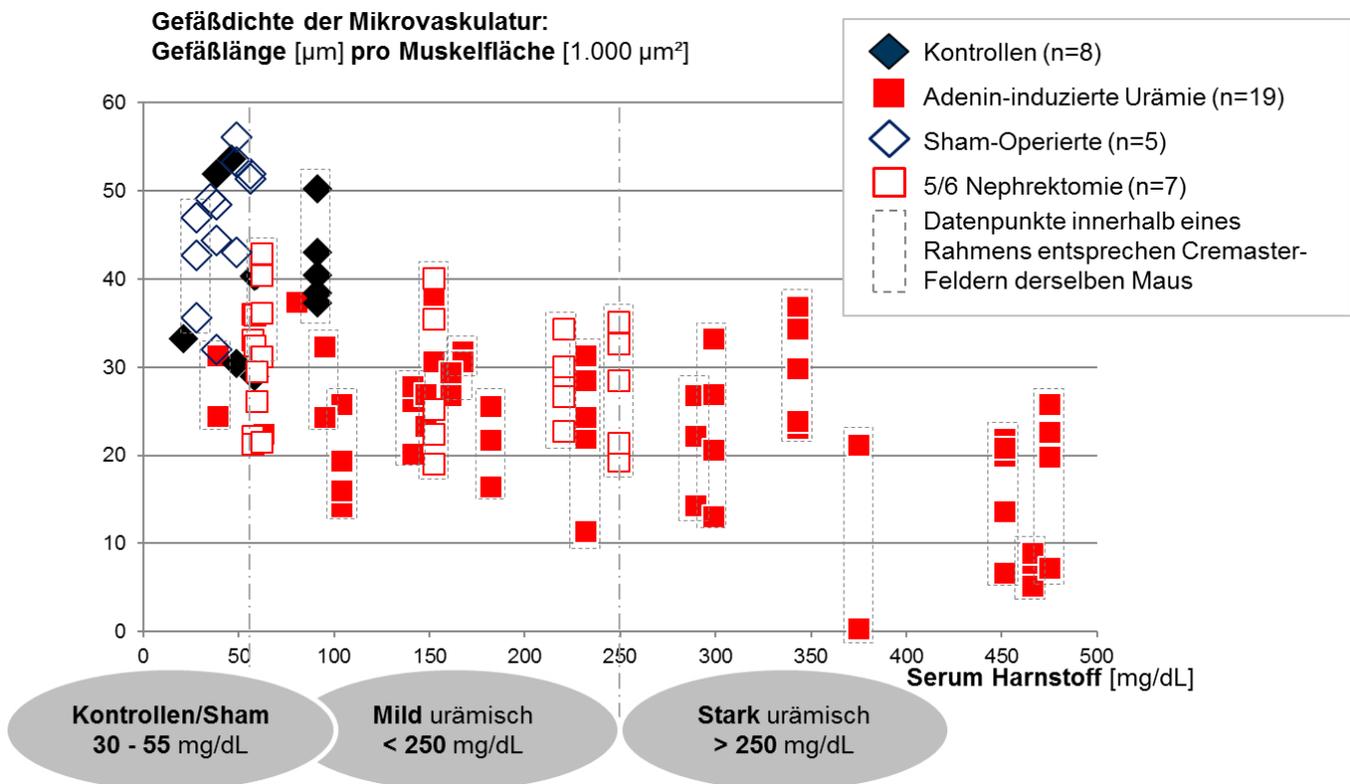


Abbildung 3.8: Gefäßdichte in Abhängigkeit vom Serum-Harnstoff. Der y-Wert eines Datenpunkts entspricht der Gefäßdichte eines Cremaster-Areals (ca. $1.050 \mu\text{m} \times 750 \mu\text{m}$). Der x-Wert eines Datenpunkts entspricht dem Serum-Harnstoffwert des Versuchstieres zum Zeitpunkt der intravitalmikroskopischen Untersuchung. Bei den meisten Tieren konnten die Gefäßdichten mehrerer, bis zu fünf Cremaster-Areale ermittelt werden. Die Datenpunkte innerhalb einer Säule (mit gestrichelter Linie umgeben) entsprechen deshalb den Gefäßdichten verschiedener Cremaster-Areale derselben Maus.

Die Korrelation zwischen Gefäßdicke und Serum-Harnstoff wurde im relevanten Messbereich als linear angenommen und anhand einer univariablen linearen Regression analysiert (Abbildung 3.9).

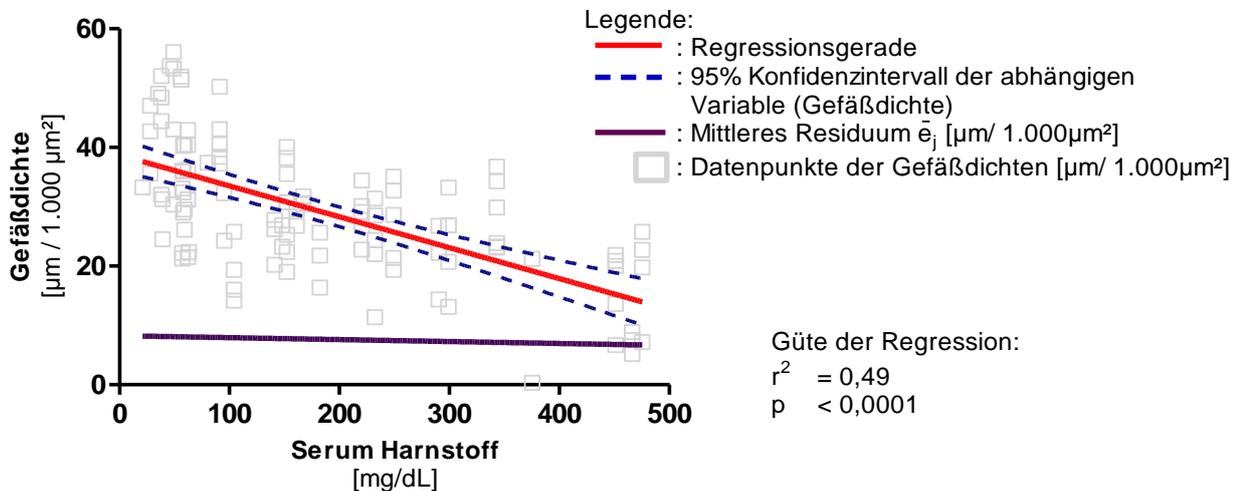


Abbildung 3.9: Univariable lineare Regression. Die univariable lineare Regression prognostiziert die abhängige Zielvariable y_i (hier: Gefäßdicke) als Funktion einer unabhängigen Einflussvariablen x_i (hier: Serum-Harnstoff) anhand einer geschätzten Regressionsgeraden. Der Zusammenhang zwischen Zielvariable und Einflussvariable ist gegeben durch $y_i = \beta_0 + \beta_1 x_i + e_i$. Die Regressionsgerade wird durch die Teilgleichung $y_i = \beta_0 + \beta_1 x_i$ beschrieben. e_i ist der Vorhersagefehler (auch Residuum genannt). Die Parameter der Regressionsgeraden β_0 und β_1 wurden nach dem Prinzip der kleinsten Quadrate d.h. durch Minimierung der quadrierten Residuen ermittelt. Das mittlere Residuum \bar{e}_j ist hier das arithmetische Mittel aller Residuen-Beträge $|e_i|$ mit $i \leq j$.

Bei einer Zunahme des Harnstoffs um je 100 mg/dL verringerte sich die Gefäßdicke der Mikrozirkulation der Tiere des Adenin-Urämie-modells ($n=27$) um $14,2\% \pm 7,2\%$ und bei den Tieren des Nephrektomie-Urämie-modells ($n=12$) um $15,7\% \pm 7,0\%$. Bei den vier am stärksten urämischen Versuchstieren mit Serum-Harnstoff über 350 mg/dL war die mikrovasale Gefäßdicke mit $14 \mu\text{m} / 1.000\mu\text{m}^2$ gegenüber den Kontrollen mit $41 \mu\text{m} / 1.000\mu\text{m}^2$ um ca. 66% reduziert.

Die negative Korrelation zwischen Gefäßdicke und Serum-Harnstoff war signifikant für die Tiere des Adenin-Modells ($r=-0,60$ $p<0,0001$), für die Tiere des Nephrektomie-Modells ($r=-0,37$ $p<0,01$) als auch für beide Modelle integriert ($r=-0,70$ $p<0,0001$) (Abbildung 3.9). Der Mittelwert der Residuen e_j nahm mit zunehmendem Serum-Harnstoff-Wert ab (Abbildung 3.9). Bei einem Serum-Harnstoff-Wert von ca. 49 mg/dL lag das mittlere Residuum

bei ca. $8,1 \mu\text{m} / 1.000 \mu\text{m}^2$. Beim Serum-Harnstoff von 475 mg/dL betrug das mittlere Residuum $7,1 \mu\text{m} / 1.000 \mu\text{m}^2$.

Zur Analyse der Variabilität der Gefäßdichten werden an dieser Stelle neben dem mittleren Residuum zwei weitere Variationsparameter eingeführt: individuelle Streuung und gruppenspezifische Streuung. Die individuelle Streuung ist die Variabilität der Gefäßdichten innerhalb des *M. cremasters* desselben Tieres. Diese Streuungsart wurde für diejenigen Tiere berechnet, bei denen mindestens drei Cremaster-Areale ausgewertet werden konnten. Die gruppenspezifische Streuung ist die Streuung der Gefäßdichten aller Cremaster-Areale der der Vergleichsgruppe zugehörigen Tiere.

Die mittleren Standardabweichungen der individuellen Streuungen von Kontrollen, mild und stark urämischen Tieren waren $5,5$; $5,6$ und $5,3 \mu\text{m} / 1.000 \mu\text{m}^2$. Diese Standardabweichungen quantifizieren die Streuungen der Variablen »Gefäßdichte« unabhängig der Größe des Mittelwerts, um den die Variable streut.

Für die Berücksichtigung des Mittelwerts wurde als relatives Streuungsmaß der Variationskoeffizient eingeführt. Der Variationskoeffizient ist definiert als die Standardabweichung einer Variablen dividiert durch ihren Erwartungswert. Der Erwartungswert einer Messreihe entspricht ihrem Mittelwert, weshalb im Folgenden der Variationskoeffizient anhand des Mittelwerts berechnet wird. Die Variationskoeffizienten der individuellen Streuungen waren $12,8\%$, $18,7\%$ und $27,4\%$ für die drei Vergleichsgruppen Kontrollen, mild urämische und stark urämische Tiere (Tabelle 3.2).

Die Standardabweichungen der gruppenspezifischen Streuungen für Kontrollen, mild und stark urämische Tiere betragen $7,8$, $6,2$ und $9,1 \mu\text{m} / 1.000 \mu\text{m}^2$. Die korrespondierenden Variationskoeffizienten waren $17,9\%$, $24,1\%$ und $45,9\%$ (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Streuungen der Gefäßdichten. Die individuelle Streuung der Gefäßdichten entspricht der Streuung der Cremaster-Areal-Gefäßdichten eines Tieres. Der in der Tabelle angegebene Wert ist der Mittelwert. Die gruppenspezifische Streuung ist die Streuung aller Cremaster-Areal-Gefäßdichten innerhalb der Vergleichsgruppe. Je Streuungsart sind dargestellt: Standardabweichung, Mittelwert sowie der Variationskoeffizient (Quotient aus Standardabweichung und Mittelwert). Vergleichsgruppen waren Kontrollen inklusive der sham-operierten Tiere, mild urämische Tiere inklusive der subtotal nephrektomierten Tiere sowie die stark urämischen Tiere.

| | | Kontrollen inklusive sham-operierte Tiere | Mild urämische Tiere inklusive 5/6 nephrektomierte Tiere | Stark urämische Tiere |
|------------------------------------|------------------------------|--|--|---|
| Individuelle Streuung | Standardabweichung | 5,5 $\mu\text{m} / 1.000 \mu\text{m}^2$ (n=4) | 5,0 $\mu\text{m} / 1.000 \mu\text{m}^2$ (n=11) | 5,3 $\mu\text{m} / 1.000 \mu\text{m}^2$ (n=6) |
| | Mittelwert | 44,0 $\mu\text{m} / 1.000 \mu\text{m}^2$ | 26,7 $\mu\text{m} / 1.000 \mu\text{m}^2$ | 19,3 $\mu\text{m} / 1.000 \mu\text{m}^2$ |
| | Variationskoeffizient | 12,5 % (n=4) | 18,7 % (n=11) | 27,4 % (n=6) |
| Gruppenspezifische Streuung | Standardabweichung | 7,8 $\mu\text{m} / 1.000 \mu\text{m}^2$ (n=13) | 6,2 $\mu\text{m} / 1.000 \mu\text{m}^2$ (n=19) | 9,1 $\mu\text{m} / 1.000 \mu\text{m}^2$ (n=7) |
| | Mittelwert | 43,6 $\mu\text{m} / 1.000 \mu\text{m}^2$ | 25,7 $\mu\text{m} / 1.000 \mu\text{m}^2$ | 19,8 $\mu\text{m} / 1.000 \mu\text{m}^2$ |
| | Variationskoeffizient | 17,9 % (n=13) | 24,1 % (n=19) | 45,9 % (n=7) |

Die Standardabweichung der individuellen Streuung der Kontrollen (absolutes Streuungsmaß) war größer als die der mild oder der stark urämischen Tiere. Der Variationskoeffizient (relatives Streuungsmaß) stieg bei der individuellen Streuung mit der Progression der Urämie an (Abbildung 3.10).

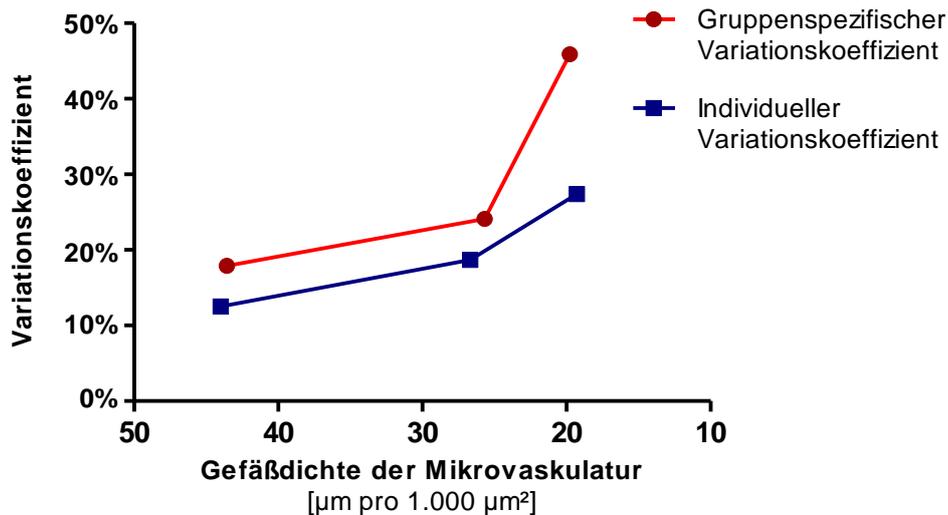


Abbildung 3.10: Variationskoeffizient. Gruppenspezifischer und individueller Variationskoeffizient (Tabelle 3.2) sind dargestellt in Abhängigkeit der mikrovaskulären Gefäßdichte (absteigende Skalierung). Mit Ausdünnung der Gefäßdichte nimmt der Variationskoeffizient und damit die relative Streuung der Gefäßdichte zu.

3.2.2 Kaliber und Rarefizierung

Für den Innendurchmesser der Blutgefäße wird üblicherweise der Begriff »Kaliber« verwendet. Bei den Tieren des Adenin-Urämiemodells wurde jedes erfasste Segment (Gefäßabschnitt zwischen zwei benachbarten Bifurkationen) einer von sechs Kaliberklassen zugeteilt: $\leq 8 \mu\text{m}$, $>8 \text{ bis } \leq 16 \mu\text{m}$, $>16 \text{ bis } \leq 32 \mu\text{m}$, $>32 \text{ bis } \leq 64 \mu\text{m}$, $>64 \text{ bis } \leq 128 \mu\text{m}$ oder $>128 \mu\text{m}$.

Bei den Kontrollen hatten 44% der Gefäßlängen im *M. cremaster* der Maus ein Kaliber kleiner als $8 \mu\text{m}$. 34% der Gefäßlängen hatten ein Kaliber zwischen 8 und $16 \mu\text{m}$, 14% ein Kaliber zwischen 16 und $32 \mu\text{m}$, 7% zwischen 32 und $64 \mu\text{m}$, 1,3% zwischen 64 und $128 \mu\text{m}$ und 0,3% der erfassten Gefäßlängen hatten ein Kaliber größer als $128 \mu\text{m}$.

Diese Einteilung erlaubte es, die Rarefizierung je nach Kaliberklasse auszuwerten und auf statistische Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe zu testen (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Rarefizierung nach Kaliberklassen. Im Adenin-Urämiemodell wurden die erfassten Segmentlängen sechs Kaliberklassen zugeordnet, die für diese Arbeit definiert wurden. Es konnten somit Kaliber-spezifische Rarefizierungsanalysen durchgeführt werden. Der Kaliber-Anteil ist der prozentuale Anteil der Segmentlängen der jeweiligen Kaliberklasse an der gesamten Gefäßlänge der Gruppe. Die Rarefizierung je Kaliberklasse ist die Differenz zwischen der Segmentlänge der Kaliberklasse und der der relevanten Kontrollen.

| Kontrollen (n=8) | | Mild urämische Tiere (n=12) | | Stark urämische Tiere (n=7) | |
|---|-----------|---|-----------|---|-----------|
| Gefäß-Dichte [µm / mm ²] | Statistik | Gefäß-Dichte [µm / mm ²] | Statistik | Gefäß-Dichte [µm / mm ²] | Statistik |

Kaliber-Klassen: **Kaliber-Klassen mit starker Rarefizierung:**

| Kaliber-Klasse | Kontrollen | Statistik | Mild urämische Tiere | Statistik | Stark urämische Tiere | Statistik |
|-------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|--|-------------------------|--|
| < 8 µm | 18.000 ± 8.505 | 44% Kaliber- Anteil | 11.783 ± 3.914 | 45% Kaliber- Anteil | 8.080 ± 2.870 | 41% Kaliber- Anteil |
| | | | | -35% Rarefizierung p=0,0409 zu Kontrolle | | -55% Rarefizierung p=0,0289 zu Kontrolle |
| 8 - 16 µm | 13.849 ± 4.179 | 34% Kaliber- Anteil | 8.386 ± 2.686 | 32% Kaliber- Anteil | 6.874 ± 2.966 | 35% Kaliber- Anteil |
| | | | | -39% Rarefizierung p=0,0186 | | -50% Rarefizierung p=0,0140 |
| 16 - 32 µm | 5.513 ± 1.423 | 14% Kaliber- Anteil | 3.181 ± 1.065 | 12% Kaliber- Anteil | 2.621 ± 1.178 | 13% Kaliber- Anteil |
| | | | | -42% Rarefizierung p=0,0078 | | -52% Rarefizierung p=0,0022 |
| 32 - 64 µm | 2.687 ± 783 | 7% Kaliber- Anteil | 1.927 ± 1.202 | 7% Kaliber- Anteil | 1.686 ± 673 | 8% Kaliber- Anteil |
| | | | | -28% Rarefizierung p=0,0491 | | -37% Rarefizierung p=0,0289 |

Kaliber-Klassen mit geringer Rarefizierung:

| Kaliber-Klasse | Kontrollen | Statistik | Mild urämische Tiere | Statistik | Stark urämische Tiere | Statistik |
|--------------------|---------------------|-----------------------------|----------------------|---------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| 64 - 128 µm | 537 ± 294 | 1,3% Kaliber- Anteil | 522 ± 224 | 2% Kaliber- Anteil | 520 ± 155 | 3% Kaliber- Anteil |
| | | | | -3% Rarefizierung p=0,8471 | | -3% Rarefizierung p=0,6943 |
| > 128 µm | 117 ± 84 | 0,3% Kaliber- Anteil | 102 ± 16 | 0,4% Kaliber- Anteil | 119 ± 90 | 0,6% Kaliber- Anteil |
| | | | | -13% Rarefizierung p=0,8169 | | +2% Rarefizierung p=1,0000 |

Bei den Kontrollen und den mild urämischen Tieren hatten 98% der Mikrogefäßsegmente ein Kaliber kleiner als 64 μm . Bei den stark urämischen Tieren waren es 96%. Die Rarefizierung war in diesen Kaliberklassen (bis 64 μm) signifikant (Abbildung 3.11). Sie lag zwischen 28% bis 45% bei den mild urämischen Tieren ($p=0,0078$ bis $0,049$) und 37% bis 55% bei den stark urämischen Tieren ($p=0,0022$ bis $0,029$).

Im Gegensatz dazu war die Rarefizierung der Segmente mit $> 64 \mu\text{m}$ Innendurchmesser nicht signifikant (Abbildung 3.11). Sie lag zwischen 3% bis 13% bei den mild urämischen Tieren ($p=0,82$ bis $0,85$) und höchstens 3% bei den stark urämischen Tieren ($p=0,69$ bis $1,0$).

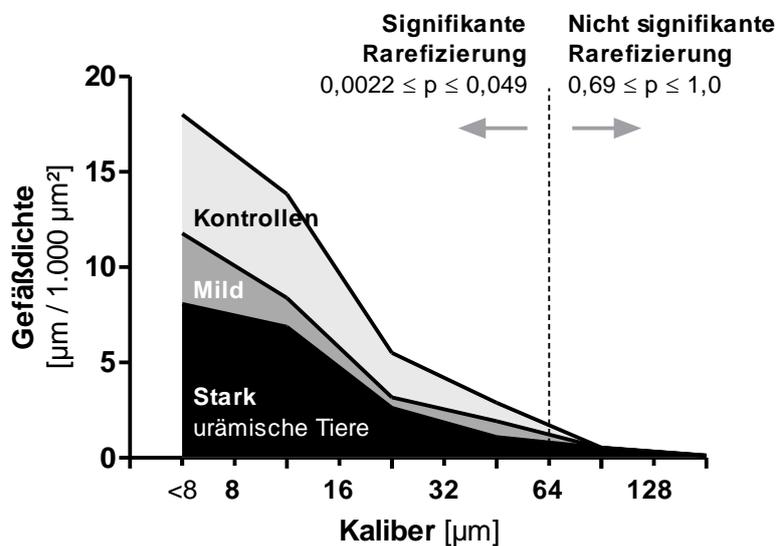


Abbildung 3.11: Verteilung der Gefäßdichten differenziert nach Kaliber. Die Gefäßdichten von Kontrollen, mild und stark urämischen Tiere sind dargestellt in Abhängigkeit ihrer Kaliber. Bis zur Kalibergrenze von 64 μm ist die Ausdünnung der Gefäßdichten bei zunehmender Urämie deutlich zu erkennen. Bei Gefäßen mit einem Kaliber über 64 μm ist die Rarefizierung von urämischen Gefäßnetzen gegenüber denen der Kontrollen nicht mehr signifikant (Tabelle 3.3).

3.2.3 Funktionelle Rarefizierung

Funktionell rarefiziert ist ein Gefäß dann, wenn es dauerhaft nicht mehr durchströmt wird. Bei struktureller Rarefizierung ist das Gefäß abgebaut (Murfee & Schmid-Schonbein 2008).

Bei der *in vivo* Analyse wurden einminütige Filmaufnahmen der Mikrozirkulation im *M. cremaster* angefertigt. Während dieser Aufnahmezeit wurden einige Gefäße zeitweise nicht

perfundiert, phasenweise wurden sie jedoch reperfundiert. Um diese Dynamik besser zu erfassen, wurden für diese Arbeit vier Typen der Perfusionsdynamik definiert und die digital rekonstruierten Gefäße entsprechend zugeordnet.

Typ- α Gefäße sind digital rekonstruierte Gefäßlängen, die während der einminütigen Aufnahmedauer kontinuierlich, ohne Unterbrechung von Blut durchströmt wurden. Bei Typ- β Gefäßen stoppte während der Aufnahmezeit die Blutströmung mindestens einmal für maximal 10 Sekunden. Bei Typ- γ Gefäßen stoppte die Durchblutung mindestens einmal für mehr als 10 Sekunden. Und Typ- δ Gefäße waren entweder dauerhaft Erythrozyten-leer oder es befanden sich in den Gefäßen einzelne Erythrozyten ohne zielgerichtete Fortbewegung (Abbildung 1.1-C; Abbildung 3.12).

Gefäße, die während der Filmaufnahme auch nur kurzzeitig zielgerichtet von Erythrozyten durchströmt wurden, wurden als intakte Gefäße registriert und somit nicht dem Rarefizierungsanteil zugerechnet. Nur Typ- δ Gefäße wurden als funktionell rarefiziert gewertet.

Gefäße der Typen β , γ und δ waren ausschließlich in den Kaliberklassen bis 32 μm zu finden. Die großen Gefäße mit Kaliber über 32 μm waren allesamt Typ- α Gefäße, d.h. kontinuierlich von Blut durchströmt – unabhängig von der experimentellen Gruppe.

Funktionell rarefizierte Typ- δ Gefäße wurden nur in der kleinsten Kaliberklasse ($< 8 \mu\text{m}$ Innendurchmesser) beobachtet. Der Anteil der Typ- δ Gefäße war dabei sehr gering (1,6% bzw. 4,3% bei mild und stark urämischen Tieren im Vergleich zu 0,4% bei den Kontrollen) (Tabelle 3.4).

Da auch bei den Kontrollen Typ- δ Gefäße beobachtet wurden, wurde die funktionelle Rarefizierung als die Differenz der Typ- δ Gefäßlängen zwischen Kontrollen und urämischen Gruppen quantifiziert. Die funktionelle Rarefizierung betrug somit 1,2% bei mild urämischen und 3,9% bei stark urämischen Tieren.

Tabelle 3.4: Funktionelle Rarefizierung. Für die Vergleichsgruppen des Adenin-Urämie-modells wurden die Gefäße eingeteilt in Typ- α Gefäße (während der Filmaufnahme der Mikrozirkulation kontinuierlich durchströmt), Typ- β Gefäße (maximal 10 Sekunden nicht perfundiert), Typ- γ Gefäße (länger als 10 Sekunden nicht perfundiert) sowie Typ- δ Gefäße (dauerhaft nicht perfundiert). Unter der Überschrift »Länge« ist die Gesamtlänge des jeweiligen Gefäßtyps für die gesamte Vergleichsgruppe angegeben. Unter der Überschrift »Anteil« ist der Längenanteil des Gefäßtyps an der Gesamtgefäßlänge der Vergleichsgruppe angegeben. Das Signifikanzniveau p bewertet den Unterschied der prozentualen Gefäßtypen-Verteilungen der urämischen Vergleichsgruppen gegenüber Kontrollen.

| Kaliber-Klasse | | Kontrollen (n=8) | | Mild urämische Tiere (n=12) | | | Stark urämische Tiere (n=7) | | |
|-------------------------|--------------------------------|---------------------|---------------------|--------------------------------|---------------------|-------|--------------------------------|----------------------|--------|
| | | Länge [μ m] | Anteil [%] | Länge [μ m] | Anteil [%] | p | Länge [μ m] | Anteil [%] | p |
| < 8 μ m | Alle Gefäße der Kaliber-Klasse | 18.000 | 100% | 11.783 | 100% | | 8.080 | 100% | |
| | α -Typ Gefäße | 16.002 | 88,9% \pm 5,1% | 9.226 | 78,3% \pm 7,9% | 0,007 | 5.026 | 62,2% \pm 10,8% | 0,0003 |
| | β -Typ Gefäße | 1.548 | 8,6% \pm 7,2% | 1.673 | 14,2% \pm 6,4% | 0,123 | 1.794 | 22,2% \pm 5,4% | 0,006 |
| | γ -Typ Gefäße | 378 | 2,1% \pm 1,7% | 695 | 5,9% \pm 2,7% | 0,008 | 913 | 11,3% \pm 7,8% | 0,043 |
| | δ -Typ Gefäß | 72 | 0,4% \pm 3,1% | 189 | 1,6% \pm 2,3% | 0,617 | 347 | 4,3% \pm 3,2% | 0,949 |
| 8 bis 16 μ m | Alle Gefäße der Kaliber-Klasse | 13.849 | 100% | 8.386 | 100% | | 6.874 | 100% | |
| | α -Typ Gefäße | 13.101 | 94,6% \pm 6,4% | 8.042 | 95,9% \pm 4,6% | 0,452 | 6.042 | 87,9% \pm 6,9% | 0,131 |
| | β -Typ Gefäße | 748 | 5,4% \pm 6,4% | 344 | 4,1% \pm 4,8% | 0,372 | 687 | 10,0% \pm 6,4% | 0,296 |
| | γ -Typ Gefäße | - | - | - | - | - | 144 | 2,1% \pm 1,1% | - |
| | δ -Typ Gefäß | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 16 bis 32 μ m | Alle Gefäße der Kaliber-Klasse | 5.513 | 100% | 3.181 | 100% | | 2.621 | 100% | |
| | α -Typ Gefäße | 5.171 | 93,8% \pm 5,6% | 2.990 | 94,0% \pm 7,3% | 1,000 | 2.128 | 81,2% \pm 8,2% | 0,173 |
| | β -Typ Gefäße | 342 | 6,2% \pm 5,6% | 191 | 6,0% \pm 7,3% | 1,000 | 349 | 13,3% \pm 6,4% | 0,072 |
| | γ -Typ Gefäße | - | - | - | - | - | 144 | 5,5% \pm 4,0% | - |
| | δ -Typ Gefäß | - | - | - | - | - | - | - | - |

3.2.4 Einflussfaktoren auf die Rarefizierung

3.2.4.1 Lineare Korrelation

In einem multiplen Parametervergleich wurden die Korrelationen zwischen der Veränderung der Gefäßdichte (Abbildung 3.7) und den Parametern Serum-Harnstoff (Abbildung 3.1), Hämatokrit (Abbildung 3.4), IL-6 (Abbildung 3.3), MAP (Abbildung 3.6) sowie der Veränderung des Körpergewichts (Tabelle 3.1) getestet. Zur Neutralisierung des Fehlers der Alpha-Kumulation wurden die jeweiligen Signifikanzniveaus p per Bonferroni Methode auf ein adjustiertes Signifikanzniveau p_{Bf} korrigiert (Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5: Korrelationsanalyse von Gefäßdichte-assoziierten Variablen. Der Korrelationskoeffizient r ist ein Maß, mit dem die Stärke einer linearen Pearson-Korrelation zwischen zwei Variablen angegeben wird. Das Signifikanzniveau p gibt die Wahrscheinlichkeit an, ein solches Stichprobenergebnis oder ein extremeres zu erhalten, wenn die Nullhypothese (d.h. kein Unterschied) wahr ist. p_{Bf} ist das nach Bonferroni adjustierte Signifikanzniveau. Die Bonferroni-Adjustierung neutralisiert die Alphafehler-Kumulation (Fehler erster Art), die durch multiples Testen in derselben Stichprobe entstehen würde. Die nach der Bonferroni als »not tested« ausgewiesenen Signifikanzniveaus sind als nicht signifikant zu interpretieren.

| | Serum Harnstoff [mg/dL] | Hämatokrit [%] | IL-6 im Serum [pg/mL] | Mittlerer art. Blutdruck [mmHg] | Veränderung Körpergewicht [%] |
|---|--|--|---|---|---|
| Gefäßdichte der Mikrovaskulatur [$\mu\text{m}/1.000 \mu\text{m}^2$] | $r = -0,70$ $p < 0,0001$ $p_{Bf} < 0,0014$ | $r = 0,30$ $p = 0,067$ p_{Bf} not tested | $r = -0,43$ $p = 0,02$ p_{Bf} not tested | $r = -0,48$ $p = 0,002$ $p_{Bf} < 0,024$ | $r = 0,67$ $p < 0,0001$ $p_{Bf} < 0,0015$ |
| Serum Harnstoff [mg/dL] | | $r = -0,42$ $p = 0,008$ $p_{Bf} < 0,088$ | $r = 0,45$ $p = 0,012$ p_{Bf} not tested | $r = 0,50$ $p = 0,001$ $p_{Bf} < 0,013$ | $r = -0,33$ $p = 0,039$ p_{Bf} not tested |
| Hämatokrit [%] | | | $r = -0,25$ $p = 0,209$ p_{Bf} not tested | $r = -0,36$ $p = 0,026$ p_{Bf} not tested | $r = 0,23$ $p = 0,157$ p_{Bf} not tested |
| IL-6 im Serum [pg/mL] | | | | $r = 0,05$ $p = 0,818$ p_{Bf} not tested | $r = -0,41$ $p = 0,030$ p_{Bf} not tested |
| Mittlerer art. Blutdruck [mmHg] | | | | | $r = -0,33$ $p = 0,039$ p_{Bf} not tested |

Die Gefäßdichte der Mikrozirkulation im *M. cremaster* korrelierte am stärksten und signifikant negativ mit dem Serum-Harnstoff ($r=-0,70$; $p_{Bf}<0,0014$). Es bestanden signifikante Korrelationen zwischen der Gefäßdichte und MAP ($r=-0,48$; $p_{Bf}=0,024$) sowie der Veränderung des Körpergewichts ($r=0,67$; $p_{Bf}<0,0015$). Weiterhin korrelierte der Serum-Harnstoff signifikant negativ mit dem Hämatokriten ($r=-0,42$; $p_{Bf}<0,088$) sowie positiv mit dem MAP ($r=0,50$; $p_{Bf}<0,013$). Andere Interdependenzen unter den Parametern Gefäßdichte, Harnstoff, Hämatokrit, IL-6 oder MAP waren nach der Bonferroni Adjustierung nicht signifikant.

3.2.4.2 Multiregressionsanalyse

In einer Multiregressionsanalyse wurde der Zusammenhang der abhängigen Variablen »Gefäßdichte« (Kriterium) mit den fünf unabhängigen Variablen (Prädiktoren) »Serum-Harnstoff«, »Hämatokrit«, »Veränderung des Körpergewichts«, »IL-6« sowie »MAP« untersucht (Tabelle 3.6).

Als Verfahren der Variablenselektion wurde die Rückwärtsselektion angewendet: Zunächst wurde das vollständige Modell mit allen unabhängigen Variablen eingestellt. Dann wurden schrittweise diejenigen Variablen entfernt, die zum geringsten Rückgang des Bestimmtheitsmaßes r^2 führten. Dieses Verfahren wurde an der Stelle abgebrochen, an der sich das Bestimmtheitsmaß signifikant verkleinerte. So konnte die Regressionsanalyse diejenigen unabhängigen Variablen identifizieren, die mit der abhängigen Variable »Gefäßdichte« assoziiert waren und jene ausgeschlossen werden, die keinen Zusammenhang mit der abhängigen Variablen hatten.

Tabelle 3.6: Multiregressionsanalyse von Gefäßdichte-assoziierten Variablen. Die Multiregressionsanalyse betrachtet den Zusammenhang zwischen der abhängigen Variable (Kriterium) »Gefäßdichte« (Abbildung 3.7) und mehreren (hier fünf) unabhängigen Variablen (Prädiktoren) »Serum-Harnstoff« (Abbildung 3.1), »Gewichtsverlust« (Tabelle 3.1), »IL-6 im Serum« (Abbildung 3.3) und »MAP« (Abbildung 3.6). Der Regressionskoeffizient β ist dabei ein Maß für die Stärke der Assoziation zwischen der unabhängigen und der abhängigen Variablen.

| Kriterium: | | |
|---|----------------|---------|
| Gefäßdichte [$\mu\text{m}/1.000 \mu\text{m}^2$] | | |
| | β | p |
| Prädiktoren: | | |
| Serum Harnstoff [mg/dL] | -0.058 + 0.011 | <0.0001 |
| Ausgeschlossene Variablen: | | |
| Hämatokrit [%] | 0.002 | 0.990 |
| Gewichtsverlust [%] | 0.285 | 0.220 |
| IL-6 im Serum [pg/mL] | -0.123 | 0.157 |
| Mittlerer art. Blutdruck [mmHg] | 0.197 | 0.245 |

Die Multiregressionsanalyse ergab, dass nur der Serum-Harnstoff ein unabhängiger Prädiktor der mikrovaskulären Gefäßdichte war ($p < 0,0001$). Die anderen Parameter, die zuvor in einer unilateralen Regression mit der Gefäßdichte signifikant korrelierten (Hämatokrit, Gewichtsverlust, IL-6, MAP), wurden durch die rückwärtige Variablenselektion der Multiregressionsanalyse ausgeschlossen.

3.2.5 Heterogenität der Rarefizierung

Bereits bei der mikroskopischen Betrachtung der Mikrogefäße fiel auf, dass unterschiedliche Cremaster-Areale eines Tieres sehr unterschiedliche Gefäßdichten haben konnten. Es kam vor, dass ein Cremaster-Areal einer urämischen Maus eine nahezu physiologische Gefäßdichte hatte, während benachbarte Cremaster-Areale desselben Tieres eine sehr ausgeprägte Rarefizierung mit bis hin zum völligen Gefäß-Defizit aufwiesen (Abbildung 3.12).

Zum Beispiel hatte ein stark urämisches Tier mit einem Serum-Harnstoff von 375 mg/dL in einem $804.000 \mu\text{m}^2$ großen Cremaster-Areal eine physiologische Gefäßdichte von

21 $\mu\text{m}/1.000 \mu\text{m}^2$ (Abbildung 3.12-A) und in einem benachbarten Cremaster-Areal (2,02 mm entfernt) eine Gefäßdichte von nur ca. 0,3 $\mu\text{m}/1.000 \mu\text{m}^2$ (Abbildung 3.12-B).

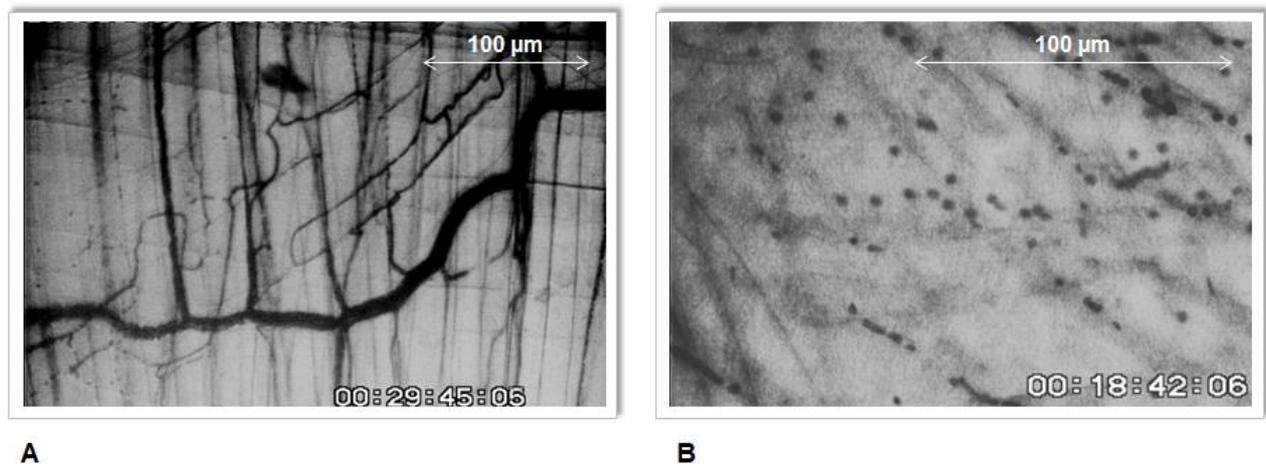


Abbildung 3.12: Momentaufnahmen der Mikrozirkulation. A – Cremaster-Gesichtsfeld mit Vaskularisierungsdichte (21 $\mu\text{m}/1.000 \mu\text{m}^2$). Das Gesichtsfeld hat eine Größe von ca. 350 $\mu\text{m} \times 250 \mu\text{m}$ (Vergrößerung 20 x 1,6). Die Aufnahme erfolgte unter Anwendung eines Grünfilters zur Kontrastverstärkung (Schott AG, Mainz). **B** – Vergrößerter Auszug eines Cremaster-Gesichtsfelds mit einer Größe von ca. 175 $\mu\text{m} \times 125 \mu\text{m}$ unter Anwendung des gleichen Lichtfilters. Das Areal ist avaskulär. Sichtbar sind einige der selten beobachteten, nicht perfundierte d.h. funktionell rarefizierte Typ δ Mikrogefäße (Kapitel 3.2.3). In ihnen befinden sich Erythrozyten ohne zielgerichtete Fortbewegung.

3.2.5.1 Segmentlängen

Ein Segment ist der Gefäßabschnitt zwischen zwei benachbarten Bifurkationen (Kapitel 3.2.2). Im Folgenden werden die Veränderungen der Segmentlängen bei Rarefizierung analysiert, da diese Dynamik Hinweise auf die Entwicklung der Rarefizierung bzw. ihre Typologie geben kann (Kapitel 3.2.5.2).

Die mittlere Segmentlänge der Kontrollen (n=8) im Adenin-Urämiemodell betrug $116,7 \pm 27,9 \mu\text{m}$ bei einer mittleren Gefäßdichte von $40,7 \pm 8,0 \mu\text{m}/1.000 \mu\text{m}^2$ (Abbildung 3.13).

Bei den mild urämischen Tieren (n=12) betrug die mittlere Segmentlänge $120,2 \pm 22,7 \mu\text{m}$ bei einer mittleren Gefäßdichte von $25,9 \pm 6,2 \mu\text{m}/1.000 \mu\text{m}^2$ (Abbildung 3.13). Bei den stark urämischen Tieren (n=7) war die mittlere Segmentlänge $133,7 \pm 23,9 \mu\text{m}$ und die Gefäßdichte $19,9 \pm 9,1 \mu\text{m}/1.000 \mu\text{m}^2$ (Abbildung 3.13).

Mit zunehmender Urämie nahm somit die Gefäßdichte ab (jeweils $p < 0,0001$), die mittlere Segmentlänge blieb jedoch unverändert ($p = 0,51$ zwischen Kontrollen und mild urämischen Tieren; $p = 0,011$ zwischen Kontrollen und stark urämischen Tieren).

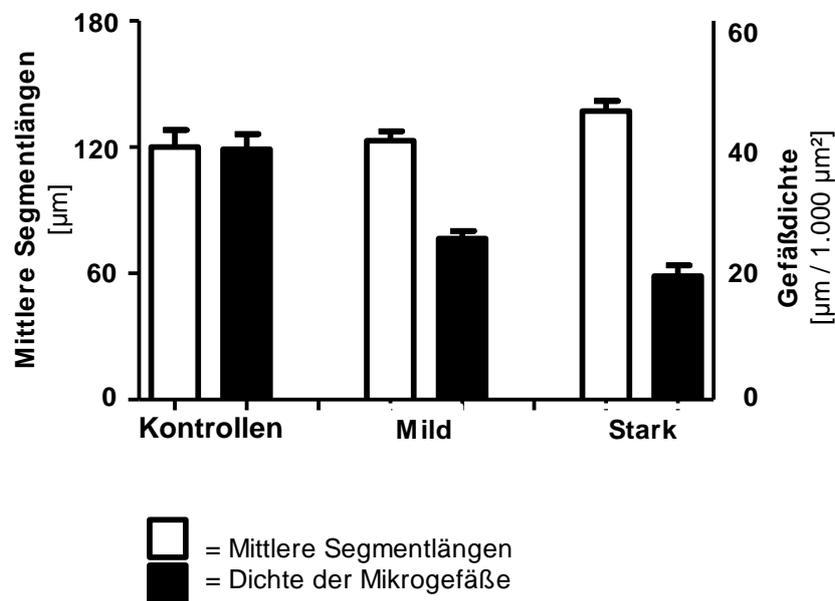


Abbildung 3.13: Mittlere Segmentlänge und Gefäßdichte. Die mittlere Segmentlänge ist der durchschnittliche Abstand zwischen zwei Bifurkationen. Die Gefäßdichte ist die kumulative Gefäßlänge der Mikrogefäße bezogen auf die entsprechende Projektionsfläche des *M. cremaster*.

3.2.5.2 Modellierung der Segmentlängen-Dynamik

Anhand einer Modellierung wird im Folgenden ermittelt, wie sich der Parameter »mittlere Segmentlänge« eines Gefäßsystems bei idealisierten Szenarien der Rarefizierung verändert.

Die Simulation geht von einem Basismodell mit zwei strikt symmetrisch verzweigten Gefäßbäumen mit 184 arteriovenösen Segmenten aus. Ein Gefäßbaum besteht aus neun Gefäßhierarchien (vier arterielle, eine kapillare und vier venöse Gefäßebenen) (Abbildung 3.14-A). Das Gefäßsystem ist charakterisiert durch eine minimale Generationsordnung.

Die Generationsordnung ist ein Parameter, der Aufschluss über die Symmetrie eines Gefäßnetzwerks gibt. Er ist abhängig von der Segmentanzahl des Netzwerks. Je kleiner die Generationsordnung bei gegebener Segmentzahl, desto symmetrischer ist das Netzwerk (Pries *et al.* 1986).

Es wurden zwei idealisierte Szenarien der Rarefizierung simuliert: Eine homogene Rarefizierung auf der Hierarchieebene der Kapillaren (Abbildung 3.14-B) sowie eine heterogene Rarefizierung eines Gefäßsteilsystems (Abbildung 3.14-C).

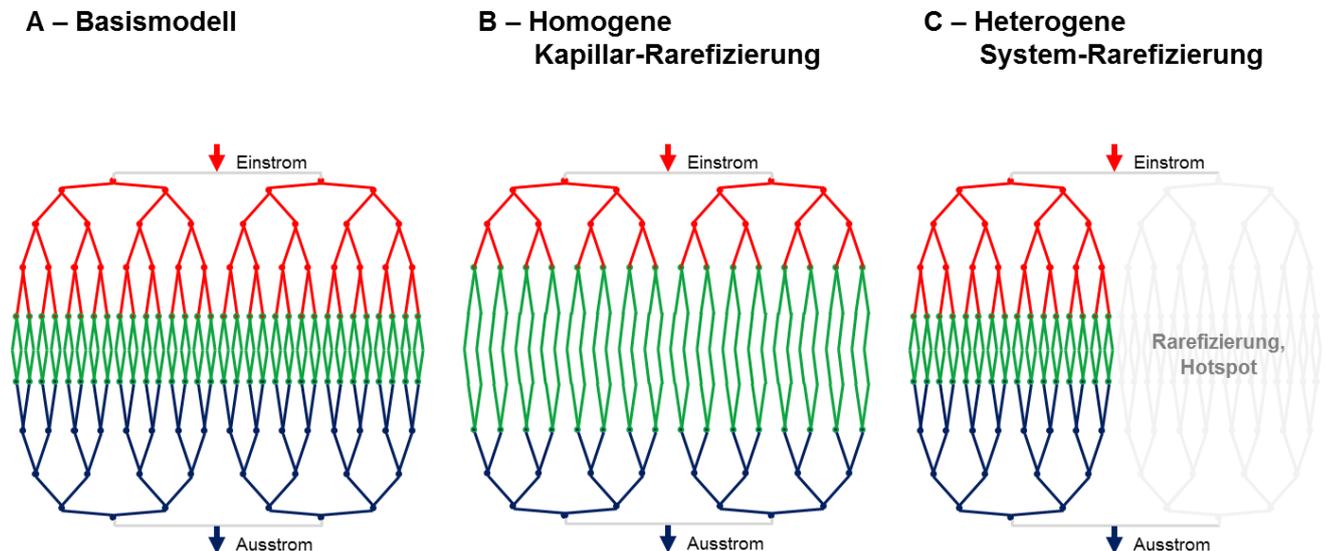


Abbildung 3.14: Stereotypische Rarefizierungsmodelle. Rot dargestellt sind die arteriellen Mikrogefäße, grün die Kapillaren und blau die venösen Mikrogefäße. **A – Basismodell:** Baumartig aufgebautes, strikt symmetrisches Gefäßnetzmodell. **B – Homogene Kapillar-Rarefizierung:** Jedes zweite Kapillargefäß ist eliminiert. **C – Heterogene System-Rarefizierung:** Einer von zwei Gefäßbäumen ist als Ganzes eliminiert.

Im Falle der homogenen Kapillar-Rarefizierung (Abbildung 3.14-B) würde jede zweite Kapillare eliminiert. Im Gesamtsystem wären somit 35% der Gefäßlängen eliminiert. Die Anzahl der Segmente wäre 88 bei 60 Bifurkationen. Die mittlere Segmentlänge wäre im Vergleich zum Basismodell um den Faktor 1,73 verlängert (Tabelle 3.7).

Bei der heterogenen System-Rarefizierung (Abbildung 3.14-C) würde der rechte Gefäßbaum als Ganzes abgetragen – d.h. 50% der Gefäße wären eliminiert. Die Anzahl der Segmente wäre damit im Vergleich zum Basismodell um die Hälfte auf 92 reduziert, ebenso wie die Anzahl der Bifurkationen, die 62 betragen würde. Die mittlere Segmentlänge wäre im Vergleich zum Basismodell nicht verlängert (Tabelle 3.7).

Eine größere Veränderung der mittleren Segmentlänge deutet eher auf eine homogene Rarefizierung hin. Je kleiner die Veränderung der mittleren Segmentlänge, desto eher fand eine heterogene Rarefizierung zusammenhängender Gefäßsysteme statt.

Im Adenin-Urämiemodell war – im Vergleich zu den Kontrollen (n=8) – die mittlere Segmentlänge der mild urämischen Tiere (n=12) um 3% verlängert und die der stark urämischen Tiere (n=7) um 15% verlängert. Beide dieser Größenordnungen liegen näher am Modell-Szenario der heterogenen System-Rarefizierung als an dem der homogenen Kapillar-Rarefizierung.

Tabelle 3.7: Veränderungen der Gefäßnetzwerkstruktur: Vergleich Modell versus Experiment. Im Vergleich zum Basismodell (Abbildung 3.13-A) verändern sich die Parameter »Anzahl der Segmente« und »Anzahl der Bifurkationen« sowohl bei der homogenen Kapillar-Rarefizierung (Abbildung 3.13-B) als auch bei der heterogenen System-Rarefizierung (Abbildung 3.14-C). Die »mittlere Segmentlänge« verändert sich dagegen nur bei der homogenen Kapillar-Rarefizierung. Die modellierte Dynamik der mittleren Segmentlänge wird mit den am *M. cremaster* der Mäuse experimentell gemessenen Segmentlängen verglichen (rot umrandet).

| | Modellierung | | | Experimentelle Messungen | | |
|--|--------------|------------------------|----------------------|--------------------------|---------------------|---------------------|
| | Basismodell | Kapillar Rarefizierung | System Rarefizierung | Kontrollen (n=8) | Milde Urämie (n=12) | Starke Urämie (n=7) |
| Anzahl der Segmente | 184 | 88 | 92 | n.a. | n.a. | n.a. |
| Anzahl der Bifurkationen | 124 | 60 | 62 | n.a. | n.a. | n.a. |
| Ausmaß der Rarefizierung | n.a. | 35% | 50% | n.a. | 36% | 51% |
| Mittlere Länge der Segmente | n.a. | n.a. | n.a. | 116 µm | 120 µm | 133 µm |
| Segmentlänge relativ zum Basismodell bzw. Kontrollen | 100% | 173% | 100% | 100% | 103% | 115% |

3.3 Intervaskuläre Areale

Der Begriff »Intervaskuläres Areal« (IVA) wurde zuvor als eine von Gefäßen eingegrenzte Projektionsfläche eines Gefäßnetzwerks definiert (Kapitel 2.5.2). In der Vergleichsgruppe der Kontrollen (n=8) betrug die mittlere IVA-Fläche $4.004 \pm 925 \mu\text{m}^2$, die mittlere Diffusionsdistanz war $11,0 \pm 1,8 \mu\text{m}$. Bei den mild urämischen Tieren war die mittlere IVA-Fläche $10.542 \pm 3.166 \mu\text{m}^2$ ($p=0,0003$ im Vergleich zur Kontrollgruppe) und die mittlere Diffusionsdistanz $14,8 \pm 2,1 \mu\text{m}$ ($p=0,005$). Bei den stark urämischen Tieren war die mittlere IVA-Fläche $17.869 \pm 5.356 \mu\text{m}^2$ ($p=0,0006$) und die mittlere Diffusionsdistanz $23,0 \pm 3,0 \mu\text{m}$ ($p=0,002$). Die Rarefizierung der Mikrozirkulation des *M. cremaster* geht demnach mit einer ausgeprägten Verlängerung von Diffusionsdistanzen bzw. einer Vergrößerung der IVA einher (Tabelle 3.8).

Tabelle 3.8: Mittlere IVA-Flächen und mittlere Diffusionsdistanz DD. Die Flächen der IVA wurden anhand der digital rekonstruierten Gefäßnetz-Projektionsbilder mit der Software Matlab 2008 berechnet. Für die Ermittlung der Diffusionsdistanzen wurde für jede kleinste Gewebeeinheit KGE der Abstand zur nächstgelegenen Kontaktstelle mit einem Blutgefäß berechnet.

| | Kontrollen (n=8) | Mild urämische Tiere (n=12) | Stark urämische Tiere (n=7) |
|-----------------------------------|--|---|---|
| Mittlere IVA Projektionsfläche | 4.004 μm^2 $\pm 925 \mu\text{m}^2$ | 10.542 μm^2 $\pm 3.166 \mu\text{m}^2$ | 17.869 μm^2 $\pm 5.356 \mu\text{m}^2$ |
| Mittlere DD Diffusionsstrecke | 11,0 μm $\pm 1,8 \mu\text{m}$ | 14,8 μm $\pm 2,1 \mu\text{m}$ | 23,0 μm $\pm 3,0 \mu\text{m}$ |

3.3.1 Diffusionsdistanzen im *M. cremaster*

Da eine kleinste Gewebeeinheit (KGE) approximativ ein infinitesimales Flächenelement darstellt, können die ermittelten Diffusionsdistanzen DD in eine stetige Verteilungskurve übertragen werden. Hierfür wurden die Daten der Tiere des Adenin-Urämiemodells mit Kontrollen (n=8), mild urämischen Tieren (n=12) und stark urämischen Tieren (n=7) verwendet (Abbildung 3.15).

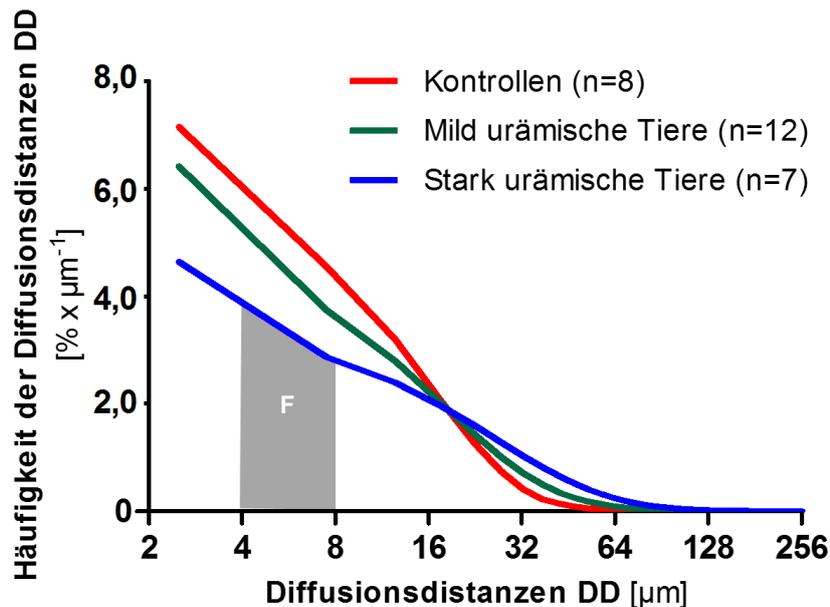


Abbildung 3.15: Verteilungskurven der Diffusionsdistanzen DD. Stetige Verteilung der Diffusionsdistanzen DD für die drei Vergleichsgruppen des Adenin-Urämiemodells Kontrollen, mild urämische und stark urämische Tiere. Das Integral über eine der Verteilungskurven entspricht der Häufigkeit, mit der die im Integrationsbereich befindlichen Diffusionsdistanzen auftreten. Der Begriff Integral kann in diesem Zusammenhang vereinfacht als Fläche unter der Kurve – im englischen Sprachgebrauch auch als AUC, d.h. Area under the Curve – ersetzt werden. Die Y-Achse der Verteilungskurve stellt die Häufigkeit der Diffusionsdistanzen in der Einheit [% pro μm] dar. Beispielsweise stellt die Fläche F die Häufigkeit dar, mit der die Diffusionsdistanzen zwischen $4 \mu\text{m}$ und $8 \mu\text{m}$ bei den stark urämischen Tieren vorkommen. Die Fläche F berechnet sich als Grundstrecke mal mittlere Höhe. Die Grundstrecke beträgt $8 \mu\text{m} - 4 \mu\text{m} = 4 \mu\text{m}$. Die mittlere Höhe der Fläche F beträgt ca. $3,4\% / \mu\text{m}$. Somit ergibt sich für $F = 3,4\% / \mu\text{m} \times 4 \mu\text{m} = 13,6\%$. KGEs mit Diffusionsdistanzen zwischen $4 \mu\text{m}$ und $8 \mu\text{m}$ zum nächstgelegenen Gefäß kommen bei stark urämischen Mäusen demnach mit der Häufigkeit 13,6% vor. Somit müsste die Fläche F 13,6% der Gesamtfläche unter der Verteilungskurve der stark urämischen Tiere darstellen. Tatsächlich erscheint F jedoch einen größeren Anteil auszumachen. Dieser täuschende Eindruck erklärt sich durch die logarithmische Skalierung der X-Achse.

Mit progredienter Rarefizierung vergrößerten sich die IVAs und somit erwartungsgemäß die Diffusionsdistanzen. Für kurze Diffusionsdistanzen im Bereich von 0 bis 12,5 µm war der Wert der integrierten Fläche unter der Verteilungskurve der Kontrollen 74,5%. Das heißt, dass bei den Kontrollen 74,5% aller Diffusionsdistanzen im *M. cremaster* 12,5 µm oder kürzer waren. Bei den mild urämischen Tieren lagen nur 49,5% der Diffusionsdistanzen im Bereich 0 bis 12,5 µm. Bei den stark urämischen Tieren waren es nur 34,0%.

Entsprechend umgekehrt waren die Verhältnisse bei den langen Diffusionsdistanzen ≥ 50 µm: 0,8% der Diffusionstrecken der Kontrollen waren 50 µm oder länger. Bei den mild urämischen Tieren waren es 3,9% und bei den stark urämischen Tieren 11,2%. Im mild urämischen *M. cremaster* war der Anteil der langen Diffusionsdistanzen (≥ 50 µm) demnach um das 5-fache und im stark urämischen um das 14-fache größer als bei den Kontrollen.

3.3.2 Diffusionsreichweiten von Sauerstoff im *M. cremaster*

Betrachtet man das Schema der intervaskulären Areale IVA (Abbildung 2.5-A), muss der Sauerstoff vom peripheren Gefäßring bis in das Zentrum des IVA diffundieren, um dort zum Beispiel die Mitochondrien zu versorgen.

Die längste Strecke, die Sauerstoff per Diffusion im Gewebe zurücklegen kann, wird im Folgenden als maximale Diffusionsreichweite (DR_{\max}) bezeichnet. DR_{\max} ist vor allem wegen der schlechten Wasserlöslichkeit von Sauerstoff limitiert. Der Löslichkeitskoeffizient α liegt bei ca. 3×10^{-5} cm³ O₂/ (cm³ Gewebe x mmHg) (Pries & Secomb 2014). Eine Approximation für DR_{\max} ist gegeben durch die Gleichung (Secomb *et al.* 1993):

$$DR_{\max} = \sqrt{2D\alpha \frac{p_0}{M}}$$

Dabei ist DR_{\max} in der Einheit [cm], der Diffusionskoeffizient D in der Einheit [cm²/min], der Löslichkeitskoeffizient α in der Einheit [cm³ O₂/ (cm³ Gewebe x mmHg)], der Sauerstoffpartialdruck p_0 am Beginn der Diffusionsstrecke in der Einheit [mmHg] und die Sauerstoff-Verbrauchsrate M in der Einheit [cm³O₂/(cm³ x min)] ausgewiesen.

Für die Berechnung von DR_{\max} im murinen *M. cremaster* wurden aus Literaturangaben folgende Werte entnommen: $D\alpha = 10^{-9}$ [cm³ O₂/ (cm x min x mmHg)] (Pries & Secomb

2009), $M = 0,0079 \text{ [cm}^3 \text{ O}_2/ (\text{cm}^3 \times \text{min})]$ (Johnson *et al.* 2005). Der Sauerstoffpartialdruck p_0 an der Kapillarwand wurde auf Basis der in einem Parallelversuch ermittelten Sauerstoffsättigung in den arteriellen und venösen Gefäßen des *M. cremaster* (Maurer, 2018) sowie unter Anwendung der Sauerstoffbindungskurve ermittelt. Für die Tiere der Kontrollgruppe, der mild sowie der stark urämischen Tiere des Adenin-Urämie Modells wurden damit p_0 Werte von 27,0 mmHg, 19,3 mmHg und 10,7 mmHg ermittelt.

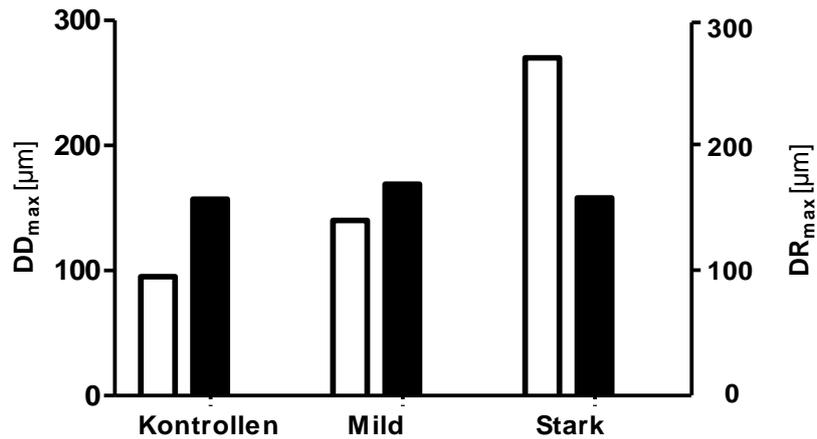
Zu berücksichtigen gilt, dass die Sauerstoff-Verbrauchsrate im Gewebe des *M. cremaster* mit Progression der Urämie bzw. Rarefizierung sinkt (Abbildungen 3.25 und 3.26). Die Modellierung des Sauerstoff-Verbrauchs im *M. cremaster* der Maus (Kapitel 3.5.4) ergab eine Sauerstoff-Verbrauchsrate M von $0,0079 \text{ cm}^3 \text{ O}_2/ (\text{cm}^3 \times \text{min})$, $0,0049 \text{ cm}^3 \text{ O}_2/ (\text{cm}^3 \times \text{min})$ und $0,0031 \text{ cm}^3 \text{ O}_2/ (\text{cm}^3 \times \text{min})$ für die Kontrollen, die mild sowie stark urämischen Tiere.

Unter Anwendung dieser Eingangsgrößen errechnen sich die Werte DR_{\max} für Kontrollen, mild und stark urämische Tiere des Adenin-Urämie Modells mit $157 \mu\text{m}$, $169 \mu\text{m}$ und $158 \mu\text{m}$ respektive.

Zum Vergleich, für Gewebe generell – nicht *M. cremaster* spezifisch – wurden durch Pries und Secomb auf Grundlage der aufgezeigten Approximationsgleichung maximale Sauerstoff-Diffusionsreichweiten von 20 bis $200 \mu\text{m}$ berechnet (Pries & Secomb 2014).

Bei den Kontrollen und mild urämischen Tieren ist DD_{\max} kleiner als DR_{\max} (Abbildung 3.16). D.h. dass bei diesen Tieren der Sauerstoff per Diffusion jede kleinste Gewebeeinheit KGE im Gewebe erreichen kann.

Bei den stark urämischen Tieren ist hingegen DD_{\max} mit $270 \mu\text{m}$ größer als DR_{\max} mit $158 \mu\text{m}$ (Abbildung 3.16). Im stark urämischen *M. cremaster* gibt es demnach Gewebebereiche, die von der Sauerstoffversorgung völlig abgeschnitten sind. Solche Gewebebereiche werden im Folgenden als »absolute Hypoxie zonen« bezeichnet. Das Integral unter der Kurve »stark urämische Tiere« (Abbildung 3.15) innerhalb der Integrationsgrenzen DR_{\max} $158 \mu\text{m}$ und DD_{\max} $270 \mu\text{m}$ ergibt 4,3%. Somit liegen im stark urämischen *M. cremaster* 4,3% der KGEs jenseits von DR_{\max} , d.h. in einer absoluten Hypoxiezone.



- = DD_{max} : Maximale Diffusionsdistanz zwischen KGE und Gefäß
- = DR_{max} : Maximale Diffusionsreichweite, die O_2 per Diffusion im *Musculus cremaster* zurücklegen kann

Abbildung 3.16: Maximale Diffusionsdistanz DD_{max} versus maximale Diffusionsreichweite DR_{max} . DD_{max} ist die längste gemessene Distanz zwischen einer kleinsten Gewebeeinheit KGE und ihrer nächstgelegenen Kontaktstelle mit einem Blutgefäß. DR_{max} ist die berechnete maximale Reichweite, die Sauerstoff im Gewebe des *M. cremaster* der Maus diffundieren kann.

3.4 Hämodynamische Veränderungen

3.4.1 Blutströmungsgeschwindigkeit

Die Blutströmungsgeschwindigkeit V_B entspricht der Strömungsgeschwindigkeit der Erythrozyten auf der zentralen Strömungsachse des Blutgefäßes. Die gemessenen V_B -Werte in den Mikrogefäßen des *M. cremaster* stiegen erwartungsgemäß mit zunehmendem Gefäßdurchmesser an. Um festzustellen, ob Urämie einen Einfluss auf V_B – unabhängig vom Gefäßdurchmesser – hat, wurde V_B bei Kontrollen ($n=4$) und stark urämischen Tieren ($n=5$) des Adenin-Urämie-modells in fünf diskreten Kaliberklassen gemessen (Abbildung 3.17).

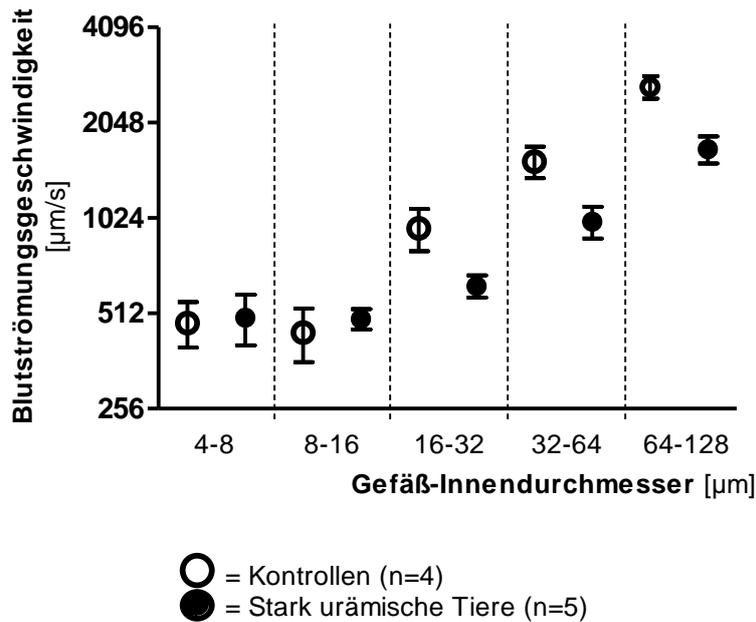


Abbildung 3.17: Blutströmungsgeschwindigkeit. Geschwindigkeit der Erythrozyten auf der zentralen, in Strömungsrichtung gelegenen Achse der Blutgefäße unterschiedlicher Kaliberklassen. Dargestellt sind die Werte von zwei Vergleichsgruppen des Adenin-Urämie-modells (Kontrollen und stark urämische Tiere). Die runden Symbole entsprechen dem Mittelwert der Blutströmungsgeschwindigkeit. Die Antennen (Whiskers) stellen den Standardfehler der Variablen dar.

In Gefäßen mit kleinem Durchmesser (4 bis 8 µm bzw. 8 bis 16 µm) war V_B der stark urämischen Tiere gegenüber den Kontrollen nicht signifikant verschieden ($p=0,71$ bzw. $p=0,78$).

Ab einem Gefäßdurchmesser von 16 µm waren die V_B -Werte jedoch signifikant unterschiedlich. In Gefäßen mit einem Kaliber von 16 µm bis 32 µm lag die mittlere V_B der Kontrollen bei 949 ± 501 µm/s und die der stark urämischen Tiere bei 624 ± 393 µm/s – im Mittel um 34% niedriger als bei den Kontrollen ($p=0,027$).

In Gefäßen der Kaliberklasse 32 bis 64 µm wurden eine V_B von 1.544 ± 705 µm/s bei den Kontrollen und 997 ± 668 µm/s bei den stark urämischen Tieren gemessen. Die Differenz der Mittelwerte war 35% ($p=0,024$). Bei den großen Gefäßen vom Kaliber 64 bis 128 µm wurden V_B -Werte bei Kontrollen und stark urämischen Tieren von 2.655 ± 990 µm/s und 1.687 ± 1.067 µm/s (36% Differenz) gemessen ($p=0,001$).

Um auszuschließen, dass ein Blutdruckabfall ausschlaggebend für eine Veränderung von V_B ist, wurden während der intravitalmikroskopischen Untersuchung der MAP im Fünfminutenabstand gemessenen. Diese Messergebnisse sind in Kapitel 3.1.6 dargestellt.

Die gemessene Blutströmungsgeschwindigkeit der Mikrozirkulation des *M. cremaster* der Maus in der Einheit [$\mu\text{m/s}$] kann in ihrer Abhängigkeit vom Gefäßdurchmesser D in der Einheit [μm] in einer Näherungsgleichung für die Vergleichsgruppen des Adenin-Urämie-modells (Kontrollen, mild und stark urämische Tiere) angegeben werden:

$$V_{B \text{ Kontrollen}} = 321 \times e^{0,0231 \times D}$$

$$V_{B \text{ mild urämisch}} = 290 \times e^{0,0202 \times D}$$

$$V_{B \text{ stark urämisch}} = 212 \times e^{0,0117 \times D}$$

3.4.2 Geschwindigkeit des Leukozytenrollens

Das Rollen von Leukozyten entlang der Gefäßwände von Venen und die Diapedese der Leukozyten in das Gewebe ist ein integraler Prozess der Inflammationsreaktion. Je stärker die Inflammation ausgeprägt ist, desto niedriger ist die Geschwindigkeit des Leukozytenrollens und desto höher ist die Diapedese-Frequenz (Sperandio *et al.* 2006).

Einen großen Einfluss auf die Geschwindigkeit des Leukozytenrollens hat die Blutströmungsgeschwindigkeit. Je schneller die Blutströmung, desto schneller rollen die Leukozyten. Dieses Phänomen wurde in dieser Arbeit beobachtet und ist auch in der Literatur entsprechend publiziert (Sperandio *et al.* 2006).

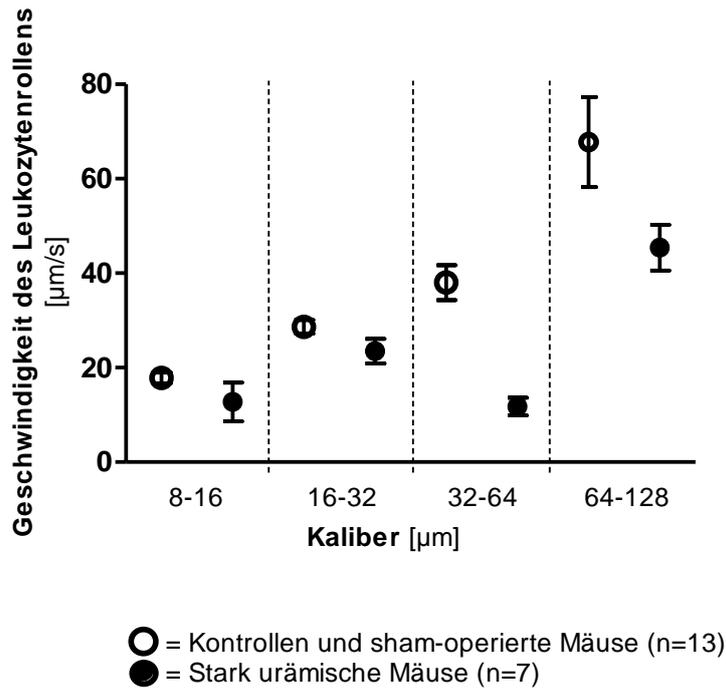


Abbildung 3.18: Leukozytenrollengeschwindigkeit. Dargestellt sind die Geschwindigkeiten von Leukozyten, mit der sie an der Wand der venösen Gefäße entlangrollen – differenziert nach Kaliberklassen. Die runden Symbole entsprechen dem Mittelwert der Geschwindigkeit. Die Antennen (Whiskers) stellen den Standardfehler der Variablen dar.

In den Venen des *M. cremaster* vom Kaliber 8 bis 16 µm wurde bei Kontrollen und sham-operierten Tieren (n=13) eine mittlere Leukozytenrollengeschwindigkeit von $17,8 \pm 2,7$ µm/s gemessen. In der gleichen Kaliberklasse lag die Geschwindigkeit bei den stark urämischen Tieren (n=7) bei $12,8 \pm 8,2$ µm/s (Abbildung 3.18). Der Unterschied war statistisch nicht signifikant ($r=0,45$; $p=0,19$).

In den anderen Kaliberklassen (16 bis 32 µm, 32 bis 64 µm und 64 bis 128 µm) wurden Leukozytenrollengeschwindigkeiten von $28,7 \pm 3,4$ µm/s (Kontrollen und Sham) versus $23,5 \pm 8,3$ µm/s (stark urämisch) ($p=0,14$), $38,0 \pm 11,7$ µm/s (Kontrollen und Sham) versus $11,8 \pm 5,5$ µm/s (stark urämisch) ($p < 0,0001$); $67,8 \pm 28,7$ µm/s (Kontrollen und Sham) versus $45,4 \pm 15,2$ µm/s (stark urämisch) ($p=0,086$) respektive gemessen. Bis auf die Kaliberklasse 32 bis 64 µm sind die Unterschiede zwischen Kontrollen und sham-operierten Tieren versus stark urämischen Tieren nicht signifikant (Abbildung 3.18).

Eine Veränderung der Leukozytenrollengeschwindigkeit bei Urämie konnte somit nicht nachgewiesen werden.

3.5 Modellierung der Beeinträchtigung der Sauerstoffaufnahme

3.5.1 Strukturmodelle des Mikrogefäßsystems

In der Fachliteratur werden Mikrogefäßsysteme zumeist baumartig (Abbildung 3.19-A) oder netzartig (Abbildung 3.19-B) modelliert.

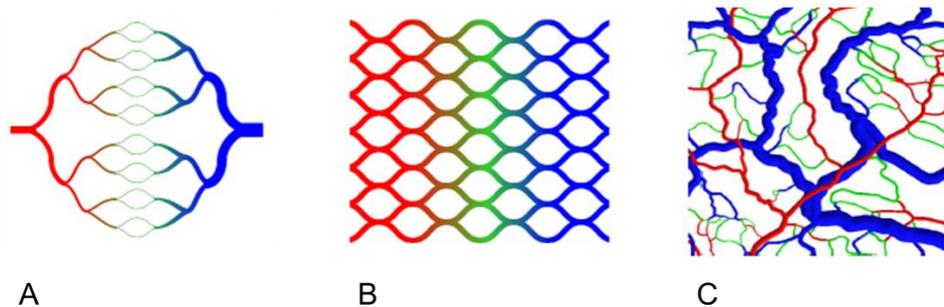


Abbildung 3.19: Strukturmodelle des Mikrogefäßsystems. A – Baumartiges Modell. B – Netzartiges Modell. C – Unregelmäßiges Modell (Pries & Secomb 2014).

Jedoch entsprechen weder die Baum- noch die Netz-Struktur der realen Angioarchitektur. Die Netzstruktur hat den Vorteil der Feinmaschigkeit und damit der großen kapillären Austauschfläche. Sie ist aber hinsichtlich ihres Energieaufwands für die Aufrechterhaltung der Blutströmung ineffizient.

Die Baumstruktur ist energieeffizienter, hat aber den Nachteil kleinerer Kapillarzonen, was längere Diffusionsdistanzen bedeutet. Um beiden Anforderungen gerecht zu werden, d.h. sowohl möglichst energieeffiziente Konvektion als auch möglichst kurze Diffusionsdistanzen zu gewährleisten, koexistieren im realen Gewebe beide Netzprinzipien in Form von heterogenen, komplexen Gebilden (Abbildung 3.19-C) (Pries & Secomb 2014).

Für die Modellierung der Sauerstoffaufnahme ins Gewebe wird im Folgenden ein baumartiges Netzmodell verwendet, da sich dieses für eine Bilanzierung des Sauerstoffs innerhalb definierter Bilanzgrenzen (Kapitel 3.5.3) und damit für die Modellierung der Sauerstoffaufnahme (Kapitel 3.5.4) gut eignet.

3.5.2 Konvektiver Sauerstofftransport

Der Sauerstoff, der von in einem Blutgefäß konvektiv pro Zeiteinheit transportiert wird (Q_{O_2}) ist eine Funktion der Blutströmung Q_{Blut} und der Sauerstoffkonzentration im Blut c_{O_2} .

$$Q_{O_2} = Q_{Blut} \times c_{O_2}$$

Die Menge an Sauerstoff im Blut ist zum einen der an Hämoglobin gebundene Sauerstoff und zum anderen der im Blut gelöste Sauerstoff. Der an Hämoglobin gebundene Sauerstoff ist ein Produkt der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins (S_a), des Hämoglobingehalts Hb und der Hüfner-Zahl. Der im Blut gelöste Sauerstoff berechnet sich aus dem Produkt des Sauerstoffpartialdrucks p_a und der Löslichkeitskonstanten α mit der Einheit [$\text{cm}^3 \text{O}_2 / (\text{cm}^3 \text{Gewebe} \times \text{mmHg})$].

$$c_{O_2} = S_a \times Hb \times \text{Hüfner} + p_a \times \alpha$$

Der im Blut gelöste Sauerstoffanteil ist im Verhältnis zu dem am Hämoglobin gebundenen Anteil sehr gering. Zur Vereinfachung der Modellierung wird er im Folgenden ignoriert. Weiterhin geht das Modell von einem stationären Zustand aus, d.h. alle partiellen Ableitungen nach der Zeit sind null. Entsprechend berechnet sich der konvektive Sauerstofftransport in einem Gefäß über einen Gefäßquerschnitt mit:

$$Q_{O_2} = V_{Blut} (\frac{1}{2}D)^2 \pi \times Hb \times \text{Hüfner} \times S_a$$

3.5.3 Bilanzierung des konvektiven Sauerstofftransports

Das in dieser Arbeit verwendete Modell ist ein baumartig, symmetrisch aufgebautes Gefäßsystem mit einem singulären blutzuführenden arteriellen Gefäß und einem singulären, ableitenden, venösen Gefäß (Abbildung 3.20).

Die Sauerstoffaufnahme ist definiert als die Menge an Sauerstoff, die pro Zeiteinheit vom konvektiven Transportsystem über die endotheliale Austauschfläche in das umliegende Gewebe übertritt (Raichle *et al.* 2001).

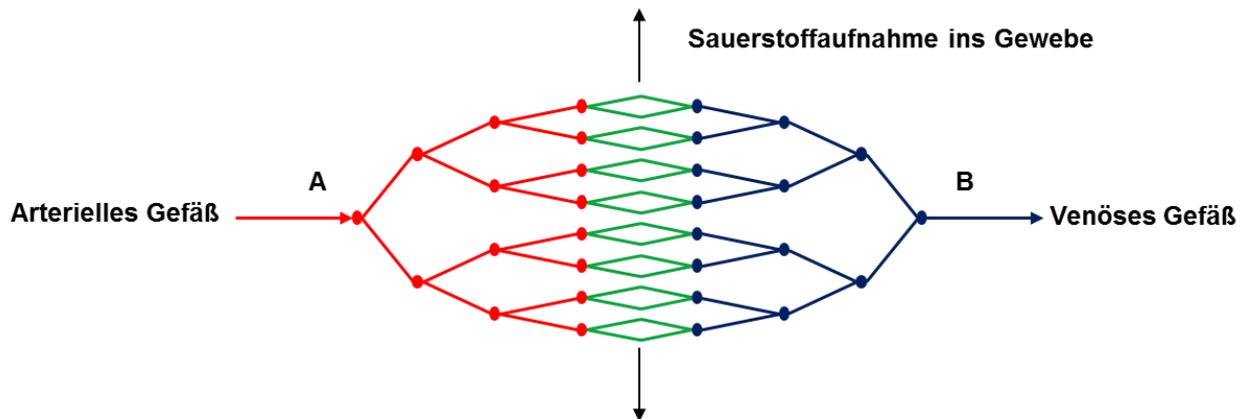


Abbildung 3.20: Baumartiges Strukturmodell. Regelmäßiges, symmetrisches Modell eines Mikrogefäßsystems mit drei arteriellen Gefäß-Hierarchieebenen (rot), einer kapillären (grün) sowie drei venösen Gefäß-Hierarchieebenen (blau).

Die Sauerstoffaufnahme $Q_{O_2 \text{ Aufnahme}}$ kann in diesem Fall anhand einer Stoffbilanz physikalisch formuliert werden.

$$Q_{O_2 \text{ Aufnahme}} = Q_{O_2 \text{ Am Punkt A}} - Q_{O_2 \text{ Am Punkt B}}$$

Unter der Annahme, dass Durchmesser, Strömungsgeschwindigkeit und Hb-Gehalt an den Punkten A und B nicht verschieden sind, sondern nur die Sauerstoffsättigungen des Hämoglobins – d.h. die arteriovenöse Differenz $avDO_2$ – sich dort unterscheiden, ergibt sich für die Sauerstoffaufnahme:

$$Q_{O_2 \text{ Aufnahme}} = V_{\text{Blut}} \times \left(\frac{1}{2} D\right)^2 \pi \times Hb \times H_{\text{üfner}} \times avDO_2$$

Einhergehend mit der Rarefizierung verändert sich in der urämischen Mikrozirkulation die Blutströmungsgeschwindigkeit (Abbildung 3.17), der Hämatokrit (Abbildung 3.4) sowie die arteriovenöse Differenz der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins (Maurer 2018). Unter der Annahme, dass sich der Hämatokrit approximativ proportional zum Hämoglobingehalt verhält, ist im vorliegenden Modell (Abbildung 3.20) die prozentuale Veränderung der Sauerstoffaufnahme linear von der Variation dreier Einflussgrößen auf den konvektiven Sauerstofftransport abhängig:

$$(1 - \Delta Q_{O_2 \text{ Aufnahme}}) = (1 - \Delta V_{\text{Blut}}) \times (1 - \Delta Hkt) \times (1 - \Delta avDO_2)$$

3.5.4 Sauerstoffaufnahme

Im Modell wurde zwischen den Bilanzgrenzen A und B der Sauerstoff bilanziert (Abbildung 3.21). Die Beeinträchtigung der Sauerstoffaufnahme wurde über diese Stoffbilanz anhand von drei direkten Einflussparametern auf den konvektiven Sauerstofftransport (Blutflussgeschwindigkeit, Hämatokrit und $avDO_2$) berechnet. Die in die Stoffbilanz eingestellten prozentualen Variation dieser direkten Einflussparameter resultierten rechnerisch in einer prozentualen Veränderung der Sauerstoffaufnahme bei urämischen Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die Veränderung der Gefäßdichte ist in dieser Berechnung keine direkte physikalische Einflussgröße, da die Bilanzgrenzen (A und B) auf Gefäßen der Kaliberklasse 64 bis 128 μm , definiert wurden, diese Kaliberklasse im urämischen Gewebe nicht signifikant rarefiziert (Tabelle 3.3) und somit die Sauerstoffbilanz innerhalb dieser Bilanzgrenzen als eine Bilanz für den gesamten *M. cremaster* betrachtet werden kann. Der Einfluss Rarefizierung auf die Sauerstoffaufnahme wird indirekt über die oben genannten drei physikalischen Einflussgrößen repräsentiert – z.B. über die bei Rarefizierung stellenweise verlangsamte Blutströmungsgeschwindigkeit (Abbildung 3.17).

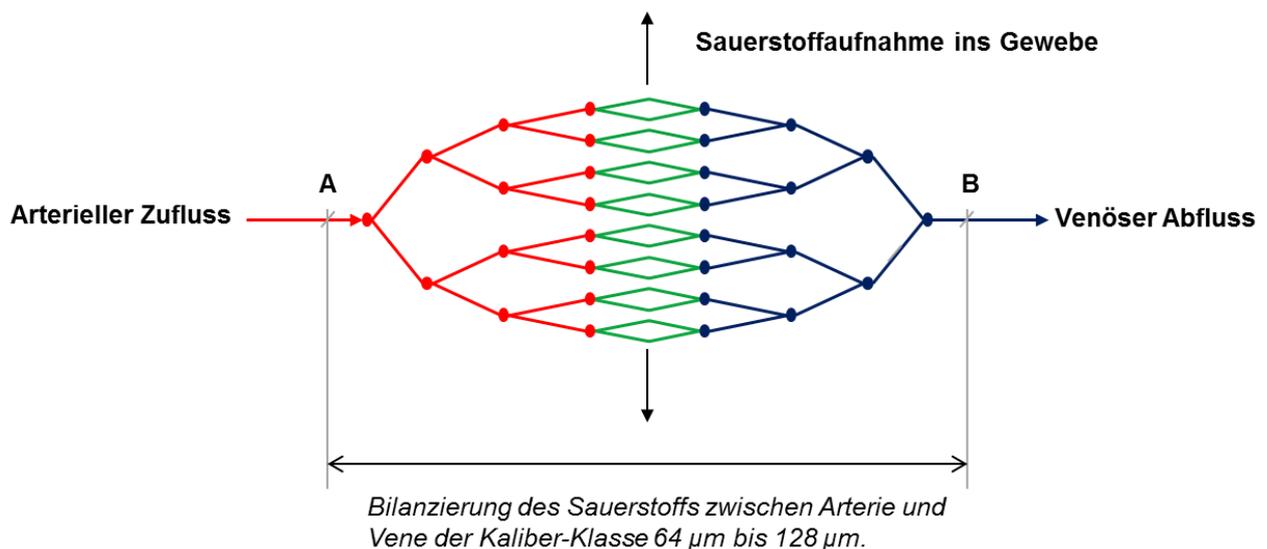


Abbildung 3.21: Prinzip der Sauerstoff-Bilanzierung zwischen dem singulären arteriellen Zufluss (Punkt A) und dem korrespondierenden venösen Abfluss (Punkt B) im idealisierten Gefäßmodell. Prinzipdarstellung und Farbcodierung des Gefäßnetzwerks entsprechen denen in Abbildung 3.20.

An den Punkten A und B haben die Gefäße jeweils ein Kaliber zwischen 64 und 128 μm . In der Modellrechnung wird als Innendurchmesser der Mittelwert von 97 μm verwendet. Damit ergibt sich dort eine Querschnittsfläche von 7.238 μm^2 .

Die mittlere Blutströmungsgeschwindigkeit wurde auf der zentralen Längsachse von Blutgefäßen in der Kaliberklasse 64 bis 128 μm für die Vergleichsgruppe der Kontrollen mit 2.655 $\mu\text{m/s}$ gemessen. Die Umrechnung der Blutströmungsgeschwindigkeit auf der zentralen Längsachse des Blutgefäßes $V_{Blut\ zentral}$ in eine mittlere Geschwindigkeit $V_{Blut\ mittel}$ (durchschnittliche Strömungsgeschwindigkeit über den gesamten Gefäßquerschnitt) erfolgte nach einer Approximationsgleichung in Abhängigkeit von Hämatokrit und Gefäßdurchmesser [μm] (Pries & Secomb 2005):

$$\frac{V_{Blut\ mittel}}{V_{Blut\ zentral}} = Hkt + (1 - Hkt) \times (1 + 1,7 e^{-0,415 \times D} - 0,6 e^{-0,011 \times D})$$

Die mittlere Strömungsgeschwindigkeit der Kontrollen ist somit 2.344 $\mu\text{m/s}$ und die der mild und stark urämische Tiere 2.051 $\mu\text{m/s}$ bzw. 1.460 $\mu\text{m/s}$ respektive.

Aus der mittleren Blutströmungsgeschwindigkeit und dem Gefäßquerschnitt berechnet sich die Blutströmung (Tabelle 3.9). In einem Parallelversuch wurden durch Maurer die Mittelwerte für Hämatokrit und $av\text{DO}_2$ in der relevanten Kaliberklasse ermittelt (Maurer 2018). Daraus leitet sich der konvektive Sauerstofftransport an den Punkten A und B und aus deren Differenz die Sauerstoffaufnahme zwischen den Punkten A und B ab (Tabelle 3.9).

Tabelle 3.9: Berechnung der Sauerstoffaufnahme zwischen dem arteriellen Zufluss (Punkt A) und dem venösen Abfluss (Punkt B) im Gefäßmodell (Abbildung 3.21).

| | Ort im Modell | Kontrollen (n=8) | Mild urämische Tiere (n=12) | Stark urämische Tiere (n=7) | Quelle |
|----------------------------------|---------------|-----------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------|
| Mittlerer Gefäßquerschnitt | A sowie B | 7.238 µm ² | | | Prämisse |
| Blutfluss | A sowie B | 17,0 µl/s | 14,8 µl/s | 10,6 µl/s | Messung |
| Hämatokrit | A sowie B | 44,0% | 44,2% | 35,0% | Messung |
| avDO ₂ | A minus B | 20,6% | 18,0% | 15,0% | Messung |
| Arterieller O ₂ Fluss | A | 2,38 µl/s | 2,17 µl/s | 1,22 µl/s | Berechnung |
| Venöser O ₂ Fluss | B | 1,81 µl/s | 1,74 µl/s | 1,01 µl/s | Berechnung |
| O ₂ Extraktion | A bis B | 0,57 µl/s | 0,43 µl/s | 0,21 µl/s | Berechnung |
| Relativ zu Kontrollen | | 100% | 75% | 37% | Berechnung |

Die Sauerstoffaufnahme ins Gewebe war in dieser Modellrechnung bei milder Urämie auf 75% (-25%) und bei starker Urämie auf 37% (-63%) reduziert.

Um die individuellen Beiträge der drei direktem Einflussgrößen – (1) Δ Blutströmung, (2) Δ Hämatokrit und (3) Δ avDO₂ – zu der Sauerstoffaufnahme zu ermitteln, wurde eine Produkt-Summations-Transformation angewendet. Für einen beliebigen Wert A gilt:

$$A - A \prod_{i=1}^n X_i = \sum_{i=1}^n (1 - X_i) A k \quad \text{mit } k = \frac{1 - \prod X_i}{n - \sum X_i}$$

Anhand dieser mathematischen Logik lässt sich die 63%ige Verminderung der Sauerstoffaufnahme im stark urämischen Gewebe (Tabelle 3.9) additiv darstellen. Dabei sind 27 Prozentpunkte der verminderten Blutströmung zuzuschreiben, 13 Prozentpunkte dem verminderten Hämatokriten und 23 Prozentpunkte der verminderten avDO₂ (Abbildung 3.22).

Johnson *et al.* haben einen Sauerstoffverbrauch im *M. cremaster* der Ratte von $0,0079 \text{ cm}^3\text{O}_2/\text{cm}^3\text{Gewebe}/\text{min}$ ermittelt (Johnson *et al.* 2005). Diesen Wert auf das murine Modell übertragen, ergeben die drei Effekte eine kumulative Reduktion der Sauerstoffaufnahme von $0,0079$ auf $0,0029 \text{ cm}^3\text{O}_2/\text{cm}^3\text{Gewebe}/\text{min}$ im stark urämischen Gewebe (Abbildung 3.22) sowie eine Reduktion von $0,0079$ auf $0,0059 \text{ cm}^3\text{O}_2/\text{cm}^3\text{Gewebe}/\text{min}$ im mild urämischen Gewebe (Abbildung 3.23).

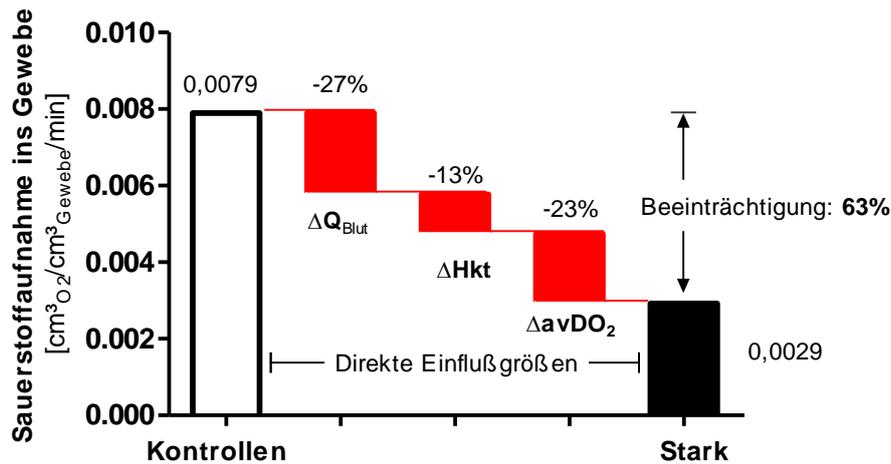


Abbildung 3.22: Beeinträchtigung der Sauerstoffaufnahme im stark urämischen *M. cremaster*. Die Grafik stellt die kalkulierte Sauerstoffaufnahme aus einem Mikrogefäßmodell (Abbildung 3.21) einer Kontrolle (weißer Balken) und einer stark urämischen Maus (schwarzer Balken) dar. Anhand von drei direkten Einflussgrößen lässt sich die Beeinträchtigung der Sauerstoffaufnahme im stark urämischen Modell gegenüber den Kontrollen quantifizieren: Verlangsamter Blutfluss in der stark urämischen Mikrozirkulation ΔQ_{Blut} , reduzierter Hämatokrit ΔHkt sowie geringere Differenz der Sauerstoffsättigung ΔavDO_2 . Die Effekte dieser drei Einflussgrößen auf die Sauerstoffaufnahme wurden quantifiziert und sind in Form der roten, absteigenden Balken illustriert. Insgesamt ist die Sauerstoffaufnahme im stark urämischen Gewebe im Vergleich zu den Kontrollen um 63% verringert.

Im mild urämischen Gewebe lässt sich die 25%ige Verminderung der Sauerstoffaufnahme (Tabelle 3.9) zu 14 Prozentpunkten der verlangsamten Blutströmung zuschreiben und zu 11 Prozentpunkten der verminderten $avDO_2$ (Abbildung 3.23). Der Hämatokrit war bei Tieren mit milder Urämie im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht vermindert (Abbildung 3.4), weshalb er hier keinen Einfluss auf die Sauerstoffaufnahme hat.

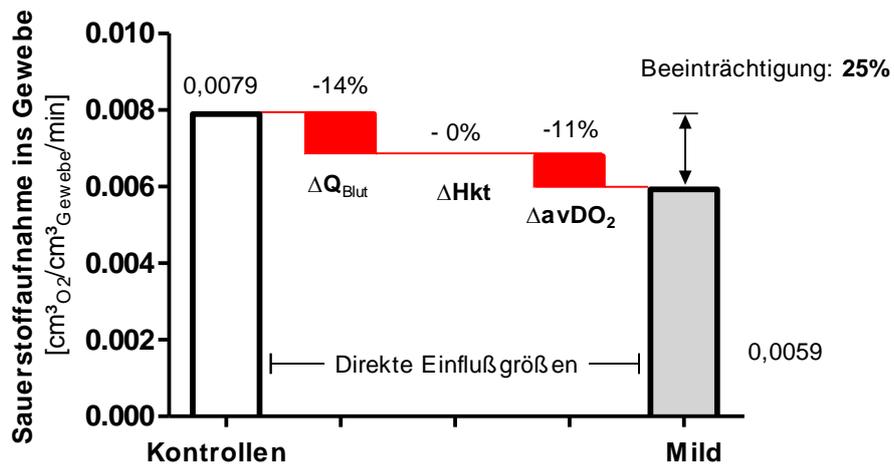


Abbildung 3.23: Beeinträchtigung der Sauerstoffaufnahme im mild urämischen *M. cremaster*. Dargestellt ist die im Modell berechnete Sauerstoffaufnahme einer Kontrolle (weißer Balken) im Vergleich zu der einer mild urämischen Maus (grauer Balken) analog Abbildung 3.22. Die Sauerstoffaufnahme im mild urämischen Gewebe ist im Vergleich zu den Kontrollen um 25% verringert.

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Mikrozirkulation bei Urämie *in vivo* am *M. cremaster* der Maus intravitalmikroskopisch zu untersuchen und vier Kernfragen hinsichtlich der Eignung der Tiermodelle, Ausmaß und struktureller Charakteristika der Gefäßausdünnung sowie der Beeinträchtigung der Sauerstoffversorgung zu beantworten (Kapitel 1.3).

4.1 Eignen sich die Tiermodelle zur Induktion einer experimentellen Niereninsuffizienz?

4.1.1 5/6-Nephrektomie induzierte eine milde, Adenin-Intoxikation eine starke Urämie

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Tiermodelle zum Hervorrufen einer experimentellen Niereninsuffizienz angewendet: Subtotale Nephrektomie und Adenin-Intoxikation. Beide Tiermodelle sind in der Mikrozirkulationsforschung international etabliert (Leelahavanichkul *et al.* 2010; Shobeiri *et al.* 2010; Santana *et al.* 2013; Ferrari *et al.* 2014).

Mit der Verwendung unterschiedlicher Tiermodelle sollte geprüft bzw. ausgeschlossen werden, dass die urämische Mikroangiopathie durch Pathomechanismen eines Tiermodells maßgeblich beeinflusst wird. So ist beispielsweise publiziert, dass das Adenin-Urämie-Modell mit einer systemischen Inflammation einhergeht. Die Inflammation wird kausal mit der Mikroangiopathie in Verbindung gebracht. Eine ausschlaggebende systematische Inflammation ist beim Nephrektomie-Modell nicht bekannt.

Sowohl per subtotaler Nephrektomie als auch per Adenin-Futterbeimengung konnte eine Niereninsuffizienz experimentell induziert werden. Im Vergleich beider Modelle war das Ausmaß der Niereninsuffizienz im Adenin-Modell stärker ausgeprägt. Hier wurden sowohl milde als auch stark urämische Zustände erreicht. Im Nephrektomie-Modell konnte bei drei von sieben Tieren eine nur milde Urämie erzielt werden. Vier subtotal nephrektomierte Versuchstiere zeigten keine pathologisch erhöhten Serum-Harnstoff-Werte.

Ähnliche Erfahrungen mit diesen beiden Urämie-Modellen wurden von anderen Autoren publiziert. Santana *et al.* konnten bei 10 Mäusen nach sechswöchiger Fütterung mit einem 0,2%igen Adenin-Futteranteil eine Erhöhung des Serum-Harnstoffs von $46,0 \pm 3,3$ mg/dL (Kontrollen) auf $286,8 \pm 10,2$ mg/dL erzielen (Santana *et al.* 2013). Vergleichbare Ergebnisse publizierten Shobeiri *et al.* (Shobeiri *et al.* 2010) oder Ferrari *et al.* (Ferrari *et al.* 2014)

mit der Adenin-Intoxikation von Wistar Ratten. Von einer schwächeren Ausprägung der experimentellen Niereninsuffizienz nach subtotaler Nephrektomie berichten Leelahavanichkul *et al.* In ihrem Fall zeigten C57BL/6 Mäuse in der sechsten postoperativen Woche weder Anzeichen einer chronischen Niereninsuffizienz, noch Anzeichen einer Hypertension (Leelahavanichkul *et al.* 2010). Mäuse scheinen demnach ausgesprochen resistent gegenüber einer experimentellen subtotalen Nephrektomie zu sein. Die beiden Tiermodelle werden hinsichtlich Ausprägung von Rarefizierung und Inflammation in den folgenden, jeweiligen Kapiteln dieser Diskussion weiter verglichen.

4.1.2 Das Ausmaß der Urämie wurde am Anstieg des Retentionswerts Harnstoff beurteilt

Das Ausmaß der Niereninsuffizienz wurde anhand des Retentionswertes Serum-Harnstoff quantifiziert. Serum-Harnstoff und Gefäßdichte korrelierten innerhalb eines Korridors approximativ linear innerhalb des Messbereichs (Abbildung 3.8).

Als möglichen, alternativen Retentionswert zur Beurteilung des Urämie-Ausmaßes wurde neben dem Serum-Harnstoff auch das Serum-Kreatinin bestimmt. Das Serum-Kreatinin war allerdings nur bei den stark urämischen Versuchstieren im Adenin-Modell gegenüber den Kontrollen signifikant um den Faktor 3,7 erhöht. Bei den mild urämischen Tieren (Adenin- und Nephrektomie-Modell) konnte kein signifikant erhöhter Kreatinin-Wert bestimmt werden (Abbildung 3.2).

Der Literatur kann entnommen werden, dass bei Nagern auch in anderen Fällen das Serum-Kreatinin, erst nach einer zeitlichen Verzögerung bzw. erst nach Eintreten einer ausgeprägten Urämie anstieg (Tamura *et al.* 2009). Vergleichbar ist aus der humanmedizinischen Diagnostik ist bekannt, dass das Kreatinin erst bei einem Verlust von circa 50% der Nierenfiltrationsleistung ansteigt. Möglicherweise ist ein vergleichbarer Kreatinin-blinder Bereich auch bei Mäusen vorhanden, was ein Erklärungsansatz für den verzögerten Anstieg sein könnte.

Der Kreatinin-Blutwert ist somit kein entscheidender Parameter in der Argumentation dieser Dissertation, weshalb die nicht signifikante Kreatinin-Erhöhung mit der oben ausgeführten Analyse hingenommen werden kann. Der Serum-Harnstoff bildet das Ausmaß der Urämie im Tiermodell der urämischen Maus wesentlich besser und zuverlässiger ab, als das Serum-Kreatinin (Puri *et al.* 2010).

4.2 Welches Ausmaß und welche Abhängigkeiten zeigt die Rarefizierung?

4.2.1 Mit inkrementellem Harnstoff-Anstieg um 100 mg/dL rarefizierten die Mikrogefäße um ca. 15%

In Abhängigkeit zum Serum-Harnstoff ging die Urämie mit einer erheblichen Ausdünnung der mikrovaskulären Gefäßdichte im *M. cremaster* einher (Abbildung 3.8; Abbildung 3.9). Bei einem inkrementellen Anstieg des Serum-Harnstoffs um 100 mg/dL verringerte sich die Gefäßdichte um jeweils ca. 15%. Die Gefäßdichte der Mikrozirkulation des *M. cremaster* war somit bei den Tieren mit milder Urämie um durchschnittlich 36% (Adenin- und auch Nephrektomie-Tiermodell) und bei denen mit starker Urämie um 51% reduziert. Bei den vier am stärksten urämischen Tieren (Serum-Harnstoff >350 mg/dL) waren die Mikrogefäßlängen im Muskel gar um ca. zwei Drittel reduziert (Abbildung 3.8).

Es bestand eine signifikante Dosis-Wirkung-Beziehung zwischen dem Serum-Harnstoff und der mikrovasalen Gefäßdichte. Diese Beziehung war signifikant sowohl bei individueller Analyse der Tiermodelle (Adenin-Fütterung und subtotale Nephrektomie) als auch bei integrierter Analyse beider Modelle (Abbildung 3.9).

Die Größenordnungen der hier ermittelten Rarefizierung entsprechen den Angaben in vergleichbaren Publikationen. Chen *et al.* analysierten zum Beispiel die Rarefizierung im *M. cremaster* von spontan hypertensiven Ratten ebenfalls per Intravitalmikroskopie. Ihre Methodik unterschied sich zur vorliegenden Dissertation jedoch darin, dass sie eine Hypertensions-induzierte Rarefizierung untersuchten, während die vorliegende Dissertation die Urämie-induzierte Mikroangiopathie erforschte. Chen *et al.* differenzierten die Gefäße des *M. cremaster* hierarchisch: Ein Gefäß 1. Ordnung war die *A. cremasterica*, Gefäße 2. bis 4. Ordnung waren Abzweigungen der jeweils übergeordneten Gefäße und bei Gefäßen 5. Ordnung handelte es sich um Kapillaren. Die Größenordnung der Gefäß-Rarefizierung gaben sie bei Gefäßen 3. Ordnung mit 59% an, bei Gefäßen 4. Ordnung mit 71% und bei Kapillaren mit 58% (Chen *et al.* 1981).

Auch in tierexperimentellen Urämie-Modellen wurden derartige Größenordnungen der Rarefizierung festgestellt. Ehling *et al.* untersuchten per Mikro-Computertomographie die

renale Mikrozirkulation von niereninsuffizienten Mäusen. Bei progressiver Niereninsuffizienz war das Mikrogefäßsystem im frühen Stadium um 20% und im späteren Stadium um 61% ausgedünnt (Ehling *et al.* 2016).

In einer Patientenstudie wurde die Kapillardichte der Haut (Nagelfalz) bei chronisch niereninsuffizienten Patienten untersucht. Die Kontrollgruppe wies eine Kapillardichte von 56 Kapillaren pro mm² Nagelfalz-Querschnitt auf, während die niereninsuffizienten Patienten mit 42 Kapillaren pro mm² eine um 25% geringere Kapillardichte zeigten (Thang *et al.* 2011). Ähnliche Dimensionen der Gefäßausdünnung im Nagelfalz publizierten Edwards-Richard *et al.* bei dialysepflichtigen Kindern und Jugendlichen (Edwards-Richards *et al.* 2014).

Die Gefäßausdünnung im Nagelfalz war ungefähr um die Hälfte geringer als die im Tiermodell im *M. cremaster*. Jedoch ist in Tiermodellen die Niereninsuffizienz deutlich ausgeprägter als in Patientenstudien.

Die hier vorgelegten Untersuchungen zeigen erstmals, dass der Schweregrad der Urämie mit dem Ausmaß der Rarefizierung eng korreliert. Demnach sind Vergleiche von mittleren Gefäßausdünnungen zwischen Studien, in denen die Urämie unterschiedlich stark ausgeprägt war, mit Vorsicht zu bewerten.

4.2.2 Die Mikroangiopathie war urämisch bedingt

Wegen ihrer möglichen Auswirkungen auf die Rarefizierung des Mikrogefäßsystems standen neben dem Serum-Harnstoff auch die Laborwerte Hämatokrit und IL-6 sowie Blutdruck und Körpergewicht der Versuchstiere unter Beobachtung. Die Serum-IL-6 Werte von Kontrollen und sham-operierten Tieren lagen mit 516 pg/mL bzw. 767 pg/mL deutlich oberhalb des erwarteten physiologischen Bereichs. Bei Mäusen liegt der physiologische IL-6 Wert deutlich unterhalb der labortechnischen Messgrenze (Kovacs *et al.* 2014). Im vorliegenden Fall war die Messgrenze des beauftragten Labors 50 pg/mL.

Mild und stark urämische Tiere des Adenin-Urämie Modells wiesen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöhte IL-6 Werte auf. Der IL-6-Laborwert der nephrektomierten Tiere war gegenüber dem der sham-operierten Tiere nicht signifikant erhöht (Abbildung 3.3). Die Signifikanz-Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen entsprach den initia-

len Erwartungen, da mit der Adenin-Intoxikation eine starke systemische Entzündungsreaktion einhergeht, während die Inflammation bei Nephrektomie eine untergeordnete Rolle spielt (Tamura *et al.* 2009; Santana *et al.* 2013).

Die überhöhten Werte der Kontrollen und sham-operierten Tiere könnten dadurch erklärbar sein, dass die Blutproben nach Präparation des *M. cremaster* und nach zwei- bis dreistündiger intravitalmikroskopischer Untersuchung postoperativ per Exsanguination entnommen wurden. Sowohl die Präparation des Muskels als auch das Prozedere der Intravitalmikroskopie waren mit erheblichen Traumen und Inflammationsreaktionen verbunden. Da IL-6 bereits nach ca. 30 Minuten ansteigt, war der Laborparameter von Kontrollen und sham-operierten Tieren möglicherweise erhöht.

In wieweit der postoperativ gemessene IL-6 nun durch das operative Trauma verfälscht ist, konnte abschließend nicht beantwortet werden. Ein IL-6 Wert einer präoperativ entnommenen Blutprobe hätte möglicherweise mehr Aufschluss ergeben. Da für die Bestimmung eine kritische Mindestmenge an Serum notwendig gewesen wäre, wurde aus tierethischen Gründen von einer Blutentnahme präoperativ an der vitalen Maus abgesehen.

Eine systemische Inflammation im Adenin-Modell bzw. ein Ausschluss einer systemischen Inflammation im Nephrektomie-Modell konnten anhand des IL-6 Laborwertes somit nicht sicher bestätigt werden.

Ein alternativer Ansatz zum Nachweis einer systemischen Inflammation war die Analyse der Leukozytenrollengeschwindigkeit. In den Videosequenzen konnte in venösen Gefäßen das Rollen von Leukozyten entlang des Endothels beobachtet und die Geschwindigkeit des Rollens bestimmt werden. Die initiale Hypothese war, dass im Adenin-Urämie-Modell eine vermutete systemische Inflammation mit einer verlangsamten Leukozytenrollengeschwindigkeit einhergeht.

Die Leukozytenrollengeschwindigkeit war bei urämischen Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe jedoch nicht signifikant verschieden (Abbildung 3.18). Bestimmend für die Geschwindigkeit des Leukozytenrollens war in erster Linie die Blutströmungsgeschwindigkeit, die wiederum vom Gefäßkaliber abhängig war. Obwohl jedoch die Blutströmungsgeschwindigkeit bei Urämie teilweise signifikant vermindert war (Abbildung 3.17), war die Leukozytenrollengeschwindigkeit bei Urämie nicht signifikant vermindert (Abbildung 3.18).

Grund hierfür könnte die breite Streuung der Leukozytenrollengeschwindigkeit bei mehreren Messungen in einem Gefäß gewesen sein. In den Videosequenzen konnte beobachtet werden, wie rollende Leukozyten oft mehrere Sekunden an einer Endothelstelle verharrten, bevor sie dann einige Mikrometer stromabwärts am Endothel rollten. Die Dauer des Verharrens hatte somit einen maßgeblichen rechnerischen Einfluss auf die Leukozytenrollengeschwindigkeit. Durch diese starke Streuung war ein signifikanter Unterschied der Leukozytenrollengeschwindigkeit zwischen den Vergleichsgruppen rechnerisch nicht gegeben. Die oben genannte Hypothese, dass die Leukozytenrollengeschwindigkeit negativ mit dem Inflammationsstatus und somit mit der Ausprägung der Urämie korrelierte, konnte somit nicht bestätigt werden.

Im Adenin-Modell nahmen die Versuchstiere innerhalb von vier Wochen 2% (mild urämisch) bzw. 19% (stark urämisch) an Körpergewicht ab. Im Nephrektomie-Modell nahmen die sham-operierten und nephrektomierten Tiere 21% bzw. 14% an Körpergewicht zu (Tabelle 3.1).

Lineare Korrelationsanalysen in einem multiplen Parametervergleich ergaben, dass Serum-Harnstoff und Gewichtsverlust der Tiere mit der Ausdünnung der Gefäßdichte korrelierten. Weitere lineare Korrelationen zwischen Gefäßdichte, Blutdruck, Serum-Harnstoff und Hämatokrit waren ebenfalls signifikant (Tabelle 3.5).

Aufgrund der Korrelation zwischen Gefäßdichte und Gewichtsverlust wurde die Hypothese getestet, ob für die Ausdünnung der Mikrozirkulation primär eine Kachexie ursächlich sein könnte. Hierfür wurden über einer Multiregressionsanalyse die Prädiktoren der Gefäßdichte ermittelt. Dabei stellte sich der Serum-Harnstoff als der unabhängige, primäre Prädiktor der mikrovaskulären Gefäßdichte heraus (Tabelle 3.6). Die Kachexie-Hypothese konnte somit verworfen werden.

Aufgrund der signifikanten linearen Korrelation zwischen Blutdruck und Gefäßdichte (Tabelle 3.5) wurde eine zweite Hypothese getestet, ob die Hypertension ursächlich für die Mikroangiopathie der Tiere sein könnte. Das Hypertensionsmodell ist ein gängiges Tiermodell in der Mikrozirkulationsforschung (Hansen-Smith *et al.* 1996). Die Hypertensions-Hypothese wurde letztlich verworfen, weil zum einen in der oben genannten Multiregressionsanalyse der MAP sich nicht als primärer Prädiktor der Gefäßdichte herausstellte (Tabelle 3.6), und zum anderen, weil in der Gegenüberstellung der Vergleichsgruppen der

MAP zwischen Kontrollen und stark urämischen Tieren zwar signifikant unterschiedlich war, alle anderen Vergleichsgruppen jedoch keinen signifikanten MAP-Unterschied zeigten (Abbildung 3.6).

Aufgrund der Falsifizierungen der Kachexie-Hypothese und der Hypertensions-Hypothese konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei der experimentellen Mikroangiopathie um eine urämische Mikroangiopathie handelte.

4.2.3 Rarefizierung erfolgte primär über strukturellen Abbau von Gefäßen

Das Ausmaß der funktionellen Rarefizierung (Gefäß-Stillegung) war im Verhältnis zur strukturellen Rarefizierung (Gefäß-Abbau) sehr gering (Tabelle 3.4). Die Videosequenzen der Mikrozirkulation ermöglichten erstmals eine Quantifizierung der funktionellen Rarefizierung unter Berücksichtigung physiologischer Perfusionspausen. Als funktionell rarefizierte Gefäße wurden nur Gefäße anerkannt, die zu keinem Zeitpunkt der einminütigen Filmaufnahme zielgerichtet von Erythrozyten durchströmt wurden (hier als Typ- δ Gefäße bezeichnet; Kapitel 3.2.3). Der Anteil der funktionellen Rarefizierung war mit 1,2% bzw. 3,9% (milde bzw. starke Urämie) vergleichsweise gering (Tabelle 3.4).

In der Literatur werden dagegen deutlich größere funktionell rarefizierte Ausmaße in anderen mikrovaskulären Stromgebieten angegeben. In einer Patientenstudie zur Untersuchung mikrovaskulärer Veränderungen in der Haut bei Hypertension geben Cheng *et al.* beispielsweise funktionell rarefizierte Gefäßanteile von 7,5% in der Kontrollgruppe und 16,9% in der Vergleichsgruppe der Hypertensiven an (Cheng *et al.* 2008).

In den hier untersuchten Videosequenzen konnte man regelmäßig beobachten, wie Mikrogefäße im Rahmen der physiologischen Perfusionsregulation über eine längere Zeitspanne (wenige Sekunden bis Minuten) nicht perfundiert wurden, und dann plötzlich eine reguläre Blutströmung einsetzte. Große Anteile solcher Gefäße vom Typ β oder γ waren dabei gesunde, nicht rarefizierte Gefäße (Tabelle 3.4). Hätte man nur eine Momentaufnahme dieser Gefäße während ihrer Perfusionspause zur Verfügung, bestünde das Risiko, diese Gefäße fälschlicherweise als funktionell-rarefiziert zu deklarieren.

4.3 Welche strukturellen Charakteristika weist die rarefizierte Mikrozirkulation auf?

4.3.1 Gefäßabbau fand asymmetrisch primär bei Mikrogefäßen kleineren Kalibers statt

Die mikroangiopathische Gefäßausdünnung fand asymmetrisch, ausschließlich auf der Ebene der kleinkalibrigen Gefäße (Kaliber $<64\ \mu\text{m}$) statt. Bei Mikrogefäßen größeren Kalibers wurde keine signifikante Rarefizierung gemessen (Tabelle 3.3; Abbildung 3.11).

Ehling *et al.* beobachteten in Mausmodellen vergleichbar eine asymmetrische, Kaliberspezifische Rarefizierung der Mikrozirkulation. Sie ermittelten die Bifurkationsdichte der renalen Mikrozirkulation in den Arteriae segmentales, Arteriae interlobares, Arteriae arcuatae, Arteriae interlobulares sowie in den afferenten Arteriolen (Reihenfolge in absteigender Kalibergröße). Die Bifurkationsdichte der großen Arterien war bei den niereninsuffizienten Tieren nicht beeinträchtigt, die der kleinen Gefäße war dagegen stark vermindert (Ehling *et al.* 2016).

Vergleichbare Ergebnisse stellten Chen *et al.* mit ihrem Tiermodell der Hypertensions-induzierte Rarefizierung bei Ratten fest. Sie identifizierten signifikante Rarefizierungen bei Gefäßen kleineren Kalibers (3. bis 5. Ordnung), aber nicht bei Gefäßen größeren Kalibers (1. und 2. Ordnung) (Chen *et al.* 1981).

4.3.2 Die räumliche Verteilung der Mikrogefäße war bei den Kontrollen bereits heterogen

Die Gefäßdichten sowohl von benachbarten Cremaster-Arealen derselben Maus, als auch die von Cremaster-Arealen verschiedener Tiere derselben Vergleichsgruppe konnten sehr unterschiedlich sein – d.h. sie streuten sehr stark (Abbildung 3.8). Diese Streuung war als absolute Streuung (Standardabweichung der Gefäßdichte) bei Kontrollen, mild/sham und stark urämischen Tieren nahezu identisch. Einhergehend mit der Rarefizierung konnte also keine Zunahme der absoluten Streuung beobachtet werden (Abbildung 3.8).

Diese Beobachtung widerlegte die initiale Erwartung, dass ein mikrovasales Gefäßnetzwerk zwar komplex und irregulär war, aber eine relativ homogene Gefäßdichte in seinem Stromgebiet aufwies (Abbildung 3.19-C) und dass erst die Rarefizierung und damit die mikrovaskuläre Dysfunktion eine Heterogenität der Gefäßdichten verursachten. Bereits die

physiologische Mikrozirkulation der Kontrollen zeigte eine starke Heterogenität hinsichtlich ihrer räumlichen Verteilung der Gefäße.

Eine Erklärung dieser physiologischen Heterogenität könnte der lokal unterschiedlich Bedarf an Sauerstoff oder Nährstoffen im Muskelgewebe sein. Eine weitere mögliche Erklärung lässt sich aus den Erkenntnissen von Pries und Secomb ableiten (Kapitel 1.1.2): Die Topologie des mikrovasalen Gefäßnetzwerks richtet sich im Rahmen der physiologischen Angioadaptation anhand der Kriterien (1) Minimierung des Energieaufwandes für Konvektion, bei gleichzeitiger (2) Minimierung der O₂-Diffusionsstrecken aus (Pries & Secomb 2008; Pries & Secomb 2014). Die Heterogenität der physiologischen Mikrozirkulation könnte demnach auch über örtlich unterschiedliche Rahmenbedingungen für Konvektion oder Diffusion im Muskelgewebe erklärbar sein.

Jedoch nahm die relative Streuung der Gefäßdichte mit dem Rarefizierungsmaß stark zu (Abbildung 3.10). Die relative Streuung berücksichtigt den Mittelwert der Variablen und wird ausgedrückt über den Variationskoeffizienten: Standardabweichung einer Variablen dividiert durch ihren Erwartungswert bzw. Mittelwertwert. Zum Beispiel ist die Standardabweichung der Variablen 95, 102 und 103 (Mittelwert 100) die gleiche Standardabweichung wie die der Variablen 5, 12 und 13 um den Mittelwert 10. Jedoch ist der Variationskoeffizient der zweiten Variablen deutlich höher als der der ersten.

Ein Anstieg des Variationskoeffizienten im Zuge der Rarefizierung beschreibt somit statistisch eine Zunahme der Heterogenität, die im nächsten Kapitel diskutiert wird.

4.3.3 Durch fokale Rarefizierung nahm die Heterogenität der Gefäßverteilung zu

In den Videosequenzen konnte bei urämischen Tieren eine deutliche Erweiterung der intervaskulären Areale (IVAs) beobachtet werden (Abbildung 2.4). Im Zuge der Gefäßausdünnung vergrößerten sich diese nicht-perfundierten Bereiche erheblich, während benachbarte Gewebsregionen – selbst bei starker Urämie – ihre nahezu physiologische mikrovasale Dichte beibehielten.

Die mit der Rarefizierung einhergehende Veränderung der mittleren Segmentlänge zeigte sich als geeigneter Indikator dafür, ob eine Gefäßausdünnung gleichmäßig im Gewebe oder Mottenfraß-ähnlich im Rahmen einer Elimination großräumiger Gefäßareale stattfand (Abbildung 3.14). Im *M. cremaster* wurde ein nur geringer Anstieg der mittleren Gefäßlänge gemessen, was tendenziell für die heterogene Form der Rarefizierung sprach (Tabelle 3.7).

Diese Beobachtungen decken sich mit publizierten Ergebnissen von Hansen-Smith *et al.*, die sie mit hypertensiven Ratten nach subtotaler Nephrektomie und Salz-Intoxikation erzielten. Die Autoren berichteten über ähnliche heterogene und fokale Rarefizierungsmuster bei gleichzeitiger Dysfunktion der Tonus-Regelung der glatten Mikrogefäßmuskulatur (Hansen-Smith *et al.* 1996).

Der Abbau eines Mikrogefäßes müsste, dem Mottenfraß-Prinzip entsprechend, mit dem Abbau benachbarter bzw. übergeordneter Mikrogefäße in Verbindung stehen. So wären die IVA-Ausbreitungen erklärbar. Dieser Mechanismus entspricht in der Sprache der Regelungstechnik einer positiven Rückkopplung. Im physiologischen Zustand ist der Regelkreis durch eine negative Rückkopplung gekennzeichnet. Der Regelkreis ist stabil. Eine unterkritische Vaskularisierung in einer Muskelregion führt dabei zur Angiogenese bzw. zur Angioadaptation im Rahmen eines balancierten Wechselspiels zwischen Angiogenese-Faktoren und Angiogenese-Inhibitoren.

Bei urämischer Mikroangiopathie könnte dieser stabile Regelmechanismus zu einem Zeitpunkt instabil werden. Die Destabilisierung könnte durch eine irreversible Gleichgewichtsverschiebung von Angiogenese-Faktoren hin zu Angiogenese-Inhibitoren entstehen (Kang *et al.* 2001).

Korn und Augustin publizierten, dass bei der Angioadaptation die drei Mechanismen Migration, Umstrukturierung und Apoptose von Endothelzellen im Vordergrund des Gefäßumbaus stehen, während bei der Extinktion von Gefäßsystemen die Apoptose der Endothelzellen die dominierende Rolle spielt (Korn & Augustin 2015). Eine pathologische Rarefizierung könnte also die Apoptose weiterer Endothelzellen stimulieren und so die angesprochene positive Rückkopplung bewirken.

Lang *et al.* beobachteten ein solches Phänomen in der Mikrozirkulation der Retina. Bei der dortigen Rarefizierung induzierten Makrophagen die Apoptose in einem initialen Endothelbereich. Die dadurch ausgelöste marginale Vasokonstriktion und Blutflussstauung führte dann lawinenartig zu Apoptosen benachbarter Endothelzellen, was eine Welle der Gefäßausdünnung nach sich zog (Lang *et al.* 1994).

Welche Mechanismen für die Urämie-induzierten großflächigen IVAs im *M. cremaster* der Maus ursächlich sind, sollte Gegenstand weiterer Forschungstätigkeiten sein.

4.4 Wie beeinträchtigt die Rarefizierung den Sauerstofftransport?

4.4.1 Die Diffusionsdistanzen von Sauerstoff vergrößerten sich

In den stark erweiterten IVAs waren die Diffusionsdistanzen, die der Sauerstoff für die Versorgung des Gewebes zurücklegen muss, deutlich verlängert (Abbildung 3.15). Im Mittel war der Anteil der langen Diffusionsdistanzen (>50 µm) im mild urämischen Muskel um das 5-fache und im stark urämischen um das 14-fache erhöht. Etwa 4,3% des Muskelgewebes befanden sich im stark urämischen Tier außerhalb einer berechneten Diffusionsreichweite (Abbildung 3.16) und waren somit von der Sauerstoffversorgung abgeschnitten.

Die Heterogenität der Gefäßdichte, die in der gesunden Mikrozirkulation eine physiologische Rolle spielen könnte, nimmt mit Manifestation der urämischen Mikroangiopathie womöglich überschießende Ausmaße an. Dies resultiert in einer suboptimal ausgerichteten Angioarchitektur und mikrovaskulären Dysfunktion (Kapitel 1.2) und damit in der Beeinträchtigung des Sauerstofftransports.

4.4.2 Die Perfusion des Muskels war reduziert

In Mikrogefäßen größeren Kalibers ($>16 \mu\text{m}$) war die Blutströmungsgeschwindigkeit sowohl in der mild, als auch in der stark urämischen Mikrozirkulation im Vergleich zu den Kontrollen vermindert. In den Blutbahnen kleineren Kalibers ($\leq 16 \mu\text{m}$) war die Strömungsgeschwindigkeit dagegen nicht verringert (Abbildung 3.17).

Nissel *et al.* untersuchten die Blutströmungsgeschwindigkeit in mikrovaskulären Gefäßen der Haut (Nagelfalz) bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz. Unter Ruhebedingungen war die mittlere Strömungsgeschwindigkeit bei den Nierenpatienten um 24% gegenüber den Kontrollen reduziert. Spitzengeschwindigkeiten waren sogar um 40% reduziert (Nissel *et al.* 2009). Allerdings wurde dies nicht Kaliber-spezifisch berechnet.

Dagegen kann bei den von Ehling *et al.* untersuchten, asymmetrisch rarefizierten Mikrogefäßsystemen davon ausgegangen werden, dass – dem Prinzip der Massenerhaltung folgend – die Blutströmungsgeschwindigkeit in den kaum rarefizierten großen Arterien sich im Zuge der Rarefizierung der kleineren Gefäße verlangsamte (Ehling *et al.* 2016).

Das Ohm'schen Gesetz der Elektrotechnik $I = U / R$ (I entspricht der Stromstärke, U der Spannung und R dem Widerstand) kann näherungsweise auf die mikrovasale Blutströmung angewendet werden: die Blutströmungsgeschwindigkeit verhält sich annähernd proportional zu der Blutdruckdifferenz und antiproportional zum Strömungswiderstand. Die verlangsamte Blutströmungsgeschwindigkeit ließe sich demnach entweder über einen verminderten Blutdruck oder über einen erhöhten Strömungswiderstand erklären.

Ein verminderter Blutdruck konnte ausgeschlossen werden: mild urämische Tiere zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen verminderten MAP; stark urämische Tiere hatten gar einen erhöhten MAP (Abbildung 3.6). Verbleibt also ein erhöhter mikrovaskulärer Strömungswiderstand als Ursache für die beeinträchtigte Blutströmungsgeschwindigkeit. Da die Gefäßausdünnung vorwiegend auf der Ebene der kleinkalibrigen Mikrogefäße ($<64 \mu\text{m}$) stattfand (Abbildung 3.11), erhöhte sich der Gefäßwiderstand auf dieser Gefäßebene, was die Strömungsgeschwindigkeit in den übergeordneten Gefäßen verringerte.

Die verringerte Blutströmungsgeschwindigkeit bedeutet eine verringerte Perfusion des *M. cremaster*. Weniger Blut pro Zeiteinheit durchströmte den urämischen Muskel. Nimmt man

nun an, dass die urämische Mikroangiopathie mit einer systemischen Rarefizierung einherging (Maurer 2018), erhöhte sich systemisch der Strömungswiderstand in Endorganen und es verschlechterte sich vermutlich auch systemisch die mikrovasale Perfusion.

4.4.3 Die avDO₂ der rarefizierten Mikrozirkulation war vermindert

Die mikrovaskuläre Rarefizierung ist ein komplexer Vorgang, bei dem in kurzen Zeitspannen möglicherweise (extrapoliert) mehrere tausend Kilometer arterielle, venöse und kapillare Gefäßstrecken in einem Organismus ab- oder umgebaut werden (Kapitel 1.1.2). Bei diesem Umbauprozess entstehen vermutlich zahlreiche funktionelle arteriovenöse Shunts; möglicherweise akzidentell (Ince & Sinaasappel 1999; Ince 2005) oder zweckbestimmt (Schmid-Schönbein 1999, Ostergaard *et al.* 2015).

Funktionelle Shunts entstehen in einem Gefäßsystem auf verschiedene Art: (1) Durch anatomische Kurzschlüsse von arteriellen und venösen Gefäßen, (2) durch unmittelbare Nachbarschaft von arteriellen und venösen Gefäßen und dadurch kurzschlussartigen Sauerstoffaustausch per Diffusion, oder (3) durch dysfunktionale, nicht bedarfsgerecht geregelte Perfusion von Kapillaren (Kapitel 1.2.1; Ince & Sinaasappel 1999; Ince 2005).

Es ist bekannt, dass Shunts die avDO₂ in einem Gefäßsystem reduzieren. Das verstärkte Aufkommen von Shunts im Zuge der Rarefizierung ist möglicherweise für die Beeinträchtigung der avDO₂ in der urämischen Mikrozirkulation ausschlaggebend (Maurer 2018).

4.4.4 Der Hämatokrit war bei starker Urämie reduziert

Bei Versuchstieren mit starker Urämie wurde ein verminderter Hämatokrit gemessen (Abbildung 3.4). Die damit einhergehende Anämie ist ein typisches Symptom der chronischen Niereninsuffizienz und wird vor allem auf einen Mangel an Erythropoietin (EPO) zurückgeführt. Sie zählt somit zu den kardiovaskulären Risikofaktoren der chronischen Niereninsuffizienz. Bei genetisch veränderten Mäusen mit einem EPO Knock-out Gen stellten sich Urämie-ähnliche Manifestationen einschließlich einer Hypoxie des renalen Parenchyms ein (Fu *et al.* 2016). Im Zusammenhang dieser Arbeit ist der verminderte Hämatokrit bzw. die Anämie somit ein wichtiger Faktor im Hinblick auf eine Verminderung des konvektiven Sauerstofftransports.

Darüber hinaus hat EPO eine zytoprotektive und eine immunmodulatorische Wirkung, weshalb ein EPO-Mangel möglicherweise eine proinflammatorische Rolle bei der urämischen Mikroangiopathie spielen (Cohen & Hörl, 2012).

4.4.5 Die rarefizierte Mikrozirkulation transportierte durchschnittlich 25% bzw. 63% weniger O₂ in den Muskel

Die Sauerstoffaufnahme aus dem konvektiven Transportsystem der Mikrozirkulation in das Muskelgewebe war bei mild urämischen Tieren um 25% und bei stark urämischen um 63% reduziert (Tabelle 3.9). Die im Zuge der Rarefizierung verminderte Blutströmungsgeschwindigkeit (Abbildung 3.17) sowie der gleichzeitig verminderte arteriovenöse O₂-Partialdruckgradient (Maurer 2018) hatten in der Berechnung den größten Einfluss auf die Beeinträchtigung der Sauerstoffaufnahme (Abbildung 3.22; Abbildung 3.23). Die verlangsamte Blutströmungsgeschwindigkeit beeinträchtigte die Sauerstoffaufnahme in den Muskel um 14% bei milder bzw. um 27% bei starker Urämie (Abbildung 3.22; Abbildung 3.23). Die avDO₂-Verringerung beeinträchtigte die Sauerstoffaufnahme in den Muskel zusätzlich um 11% (milde Urämie) bzw. um 23% (starke Urämie) (Abbildung 3.22; Abbildung 3.23). Der ausschließlich bei starker Urämie verminderte Hämatokrit (Abbildung 3.4) verursachte eine weitere Beeinträchtigung Sauerstoffaufnahme von 13% (Abbildung 3.22).

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass die experimentelle urämische Mikroangiopathie mit einer erheblichen Beeinträchtigung des Sauerstofftransports in den Muskel einhergeht. Gleichzeitig konnte auch gezeigt werden, dass die Rarefizierung der Mikrozirkulation die Sauerstoffversorgung des Muskels nicht homogen beeinträchtigte, sondern sich überproportional in fokalen, Mottenfraß-ähnlich rarefizierten Geweberegionen auswirkte. Andere Geweberegionen verblieben physiologisch vaskularisiert und somit möglicherweise physiologisch oxygeniert.

Die oben genannten Daten (bis zu 51% Gefäßrarefizierung (Abbildung 3.7); bis zu 63% reduzierte Sauerstoffaufnahme (Abbildung 3.22); 4,3% absolute Hypoxiezonen (Kapitel 3.3.2)) sind Durchschnittswerte. Es muss folglich davon ausgegangen werden, dass in den Geweberegionen mit überproportionaler Rarefizierung diese Parameter und die daraus resultierende Hypoxie lokal deutlich stärker ausgeprägt waren, als es die Durchschnittswerte zum Ausdruck bringen.

Die hier ermittelten Daten basieren auf tierexperimentellen Messungen und mathematischen Modellen. Sie sind somit nicht ohne weiteres auf humane Pathomechanismen übertragbar. Dennoch existieren Parallelen zwischen den hier dargestellten Ergebnissen und Studien mit dialysepflichtigen Patienten. Bei dieser Patientengruppe wurde eine vergleichbare Mikroangiopathie und Dysfunktion der Sauerstoffaufnahme nachgewiesen, obwohl eine physiologische Hämoglobin-Konzentration vorlag (Marrades *et al.* 1996; Sala *et al.* 2001).

In der Mikrozirkulationsforschung wird in zahlreichen Publikationen angenommen, dass die urämische Mikroangiopathie sich systemisch in anderen Stromgebieten wie z.B. Herz (Amann *et al.* 2000, Maurer 2018) oder Niere (Ehling *et al.* 2016; Fu *et al.* 2016) auswirkt und bei Endorganschäden eine maßgebliche Rolle spielt. Fu *et al.* publizierten, dass die chronische Niereninsuffizienz eng mit einer chronischen Hypoxie im Nierenparenchym verbunden ist. Die renale Hypoxie aktiviert Leukozyten über vom ischämischen Endothel sezernierte Zytokine oder direkt über eine Leukozyten-eigene Hypoxie-Sensorik. Dies führt zu einer chronischen Inflammation. Hypoxie und Inflammation stimulieren epitheliale Apoptose-Mechanismen und die renale Fibrose. Die renale Gewebehypoxie ist demnach ein maßgeblicher Faktor auf der gemeinsamen Endstrecke hin zur terminalen Niereninsuffizienz (Fu *et al.* 2016).

5. Ausblick

Die vorliegende Arbeit charakterisiert strukturelle und funktionelle Veränderungen der Mikrozirkulation im *M. cremaster* der Maus unter urämischen Bedingungen. Die *in vivo* Analysen zeigten substantielle Ausdünnungen der Mikrogefäße und damit einhergehend eine Beeinträchtigung der Sauerstoffversorgung des Gewebes.

Neuartig im Vergleich zu bisherigen Untersuchungen war u.a. die Beobachtung einer stark ausgeprägten, mit der Rarefizierung zunehmenden Heterogenität der Gefäßlandschaft. Man darf annehmen, dass die Kombination von Heterogenität und Rarefizierung zu lokalen Hypoxiezonen führt.

Unter der Annahme, dass sich die hier im *M. cremaster* dargestellte urämische Mikroangiopathie auch in Stromgebieten anderer Endorgane wie beispielsweise Herz, Niere oder Gehirn vergleichbar ausbildet, ist dort die mikrovasale Perfusion bei chronischer Niereninsuffizienz möglicherweise ähnlich beeinträchtigt. Zwischen CKD-assoziierten Endorganschäden wie kardiovaskulärer Insuffizienz, Atherosklerose, Hypertension oder Diabetes und urämische Mikroangiopathie besteht wahrscheinlich eine maßgebende Kausalität. Diese Zusammenhänge sind jedoch noch weitgehend unerforscht.

Mit einem besseren Verständnis dieser Pathomechanismen könnte man womöglich die frühzeitig einsetzende mikrovaskuläre Rarefizierung als einen diagnostischen Indikator für beispielsweise kardiovaskuläre oder renale Schädigungen bei chronisch niereninsuffizienten Patienten verwenden und neue Zielgrößen für die Prävention von Endorganschäden definieren. Eine denkbare therapeutische Stoßrichtung könnte die Stabilisierung der renalen oder kardialen Oxygenierung durch Blockade des Hypoxie-Inflamations-Stoffwechselwegs bei dieser Patientengruppe sein.

6. Publikationsverzeichnis

Prommer, H. U., J. Maurer, K. von Websky, C. Freise, K. Sommer, H. Nasser, R. Samapati, B. Reglin, P. Guimaraes, A. R. Pries and U. Querfeld (2018). "Chronic kidney disease induces a systemic microangiopathy, tissue hypoxia and dysfunctional angiogenesis." Sci Rep **8**(1): 5317.

7. Literaturverzeichnis

Amann, K. and E. Ritz (2000). "Microvascular disease--the Cinderella of uraemic heart disease." Nephrol Dial Transplant **15**(10): 1493-1503.

Amann, K., G. Wiest, G. Zimmer, N. Gretz, E. Ritz and G. Mall (1992). "Reduced capillary density in the myocardium of uremic rats--a stereological study." Kidney Int **42**(5): 1079-1085.

Becherucci, F., R. M. Roperto, M. Materassi and P. Romagnani (2016). "Chronic kidney disease in children." Clin Kidney J **9**(4): 583-591

Bohle, A., S. Mackensen-Haen and M. Wehrmann (1996). "Significance of postglomerular capillaries in the pathogenesis of chronic renal failure." Kidney Blood Press Res **19**(3-4): 191-195.

Chen, H., R. L. Prewitt and R. F. Dowell (1981). "Microvascular rarefaction in spontaneously hypertensive rat cremaster muscle." Am J Physiol **241**(3): H306-310.

Cheng, C., J. J. Diamond and B. Falkner (2008). "Functional capillary rarefaction in mild blood pressure elevation." Clin Transl Sci **1**(1): 75-79.

Chilian, W. M., S. M. Layne, E. C. Klausner, C. L. Eastham and M. L. Marcus (1989). "Redistribution of coronary microvascular resistance produced by dipyridamole." Am J Physiol **256**(2 Pt 2): H383-390.

Cohen, G. and W. H. Horl (2012). "Immune dysfunction in uremia - an update." Toxins (Basel) **4**(11): 962-990.

Craciunescu, O. I. and S. T. Clegg (2001). "Pulsatile blood flow effects on temperature distribution and heat transfer in rigid vessels." J Biomech Eng **123**(5): 500-505.

De Backer, D., J. J. Moraine, J. Berre, R. J. Kahn and J. L. Vincent (1994). "Effects of dobutamine on oxygen consumption in septic patients. Direct versus indirect determinations." Am J Respir Crit Care Med **150**(1): 95-100.

Edwards-Richards, A., M. DeFreitas, C. P. Katsoufis, W. Seeherunvong, N. Sasaki, M. Freundlich, G. Zilleruelo and C. L. Abitbol (2014). "Capillary rarefaction: an early marker of microvascular disease in young hemodialysis patients." Clin Kidney J **7**(6): 569-574.

Ehling, J., J. Babickova, F. Gremse, B. M. Klinkhammer, S. Baetke, R. Knuechel, F. Kiessling, J. Floege, T. Lammers and P. Boor (2016). "Quantitative Micro-Computed Tomography Imaging of Vascular Dysfunction in Progressive Kidney Diseases." J Am Soc Nephrol **27**(2): 520-532.

Fenton and Zweifach (1981). "Microcirculatory model relating geometrical variation to changes in pressure and flow rate." Annals of Biomedical Engineering **9**(4): 303-321.

Ferrari, G. O., J. C. Ferreira, R. T. Cavallari, K. R. Neves, L. M. dos Reis, W. V. Dominguez, E. C. Oliveira, F. G. Graciolli, J. Passlick-Deetjen, V. Jorgetti and R. M. Moyses (2014). "Mineral bone disorder in chronic kidney disease: head-to-head comparison of the 5/6 nephrectomy and adenine models." BMC Nephrol **15**: 69.

Flisinski, M., A. Brymora, G. Elminowska-Wenda, J. Bogucka, K. Walasik, A. Stefanska, G. Odrowaz-Sypniewska and J. Manitius (2008). "Influence of different stages of experimental chronic kidney disease on rats locomotor and postural skeletal muscles microcirculation." Ren Fail **30**(4): 443-451.

Foris, L. A. and S. S. Bhimji (2017). Uremia. StatPearls. Treasure Island (FL).

Fu, Q., S. P. Colgan and C. S. Shelley (2016). "Hypoxia: The Force that Drives Chronic Kidney Disease." Clin Med Res **14**(1): 15-39.

Hansen-Smith, F. M., L. W. Morris, A. S. Greene and J. H. Lombard (1996). "Rapid microvessel rarefaction with elevated salt intake and reduced renal mass hypertension in rats." Circ Res **79**(2): 324-330.

Hlushchuk, R., M. Ehrbar, P. Reichmuth, N. Heinemann, B. Styp-Rekowska, R. Escher, O. Baum, P. Lienemann, A. Makanya, E. Keshet and V. Djonov (2011). "Decrease in VEGF expression induces intussusceptive vascular pruning." Arterioscler Thromb Vasc Biol **31**(12): 2836-2844.

Ibels, L. S., A. C. Alfrey, W. E. Huffer, P. W. Craswell, J. T. Anderson and R. Weil, 3rd (1979). "Arterial calcification and pathology in uremic patients undergoing dialysis." Am J Med **66**(5): 790-796.

Iliescu, R., S. R. Fernandez, S. Kelsen, C. Maric and A. R. Chade (2010). "Role of renal microcirculation in experimental renovascular disease." Nephrol Dial Transplant **25**(4): 1079-1087.

Ince, C. (2005). "The microcirculation is the motor of sepsis." Crit Care **9 Suppl 4**: S13-19.

Ince, C. and M. Sinaasappel (1999). "Microcirculatory oxygenation and shunting in sepsis and shock." Crit Care Med **27**(7): 1369-1377.

Johnson, P. C., K. Vandegriff, A. G. Tsai and M. Intaglietta (2005). "Effect of acute hypoxia on microcirculatory and tissue oxygen levels in rat cremaster muscle." J Appl Physiol (1985) **98**(4): 1177-1184.

Kang, D. H., A. H. Joly, S. W. Oh, C. Hugo, D. Kerjaschki, K. L. Gordon, M. Mazzali, J. A. Jefferson, J. Hughes, K. M. Madsen, G. F. Schreiner and R. J. Johnson (2001). "Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: I. Potential role of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1." J Am Soc Nephrol **12**(7): 1434-1447.

Korn, C. and H. G. Augustin (2015). "Mechanisms of Vessel Pruning and Regression." Dev Cell **34**(1): 5-17.

Kovacs, R., A. Czudar, L. Horvath, L. Szakacs, L. Majoros and J. Konya (2014). "Serum interleukin-6 levels in murine models of *Candida albicans* infection." Acta Microbiol Immunol Hung **61**(1): 61-69.

Lang, R., M. Lustig, F. Francois, M. Sellinger and H. Plesken (1994). "Apoptosis during macrophage-dependent ocular tissue remodelling." Development **120**(12): 3395-3403.

Leelahavanichkul, A., Q. Yan, X. Hu, C. Eisner, Y. Huang, R. Chen, D. Mizel, H. Zhou, E. C. Wright, J. B. Kopp, J. Schnermann, P. S. Yuen and R. A. Star (2010). "Angiotensin II overcomes strain-dependent resistance of rapid CKD progression in a new remnant kidney mouse model." Kidney Int **78**(11): 1136-1153.

Levy, B. I., G. Ambrosio, A. R. Pries and H. A. Struijker-Boudier (2001). "Microcirculation in hypertension: a new target for treatment?" Circulation **104**(6): 735-740.

Lindner, A., B. Charra, D. J. Sherrard and B. H. Scribner (1974). "Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis." N Engl J Med **290**(13): 697-701.

Marrades, R. M., J. Alonso, J. Roca, J. M. Gonzalez de Suso, J. M. Campistol, J. A. Barbera, O. Diaz, J. V. Torregrosa, J. R. Masclans, R. Rodriguez-Roisin and P. D. Wagner (1996). "Cellular bioenergetics after erythropoietin therapy in chronic renal failure." J Clin Invest **97**(9): 2101-2110.

Massy, Z. A. and T. B. Drueke (2013). "Vascular calcification." Curr Opin Nephrol Hypertens **22**(4): 405-412.

Mathews, Miniño, Osterman, Strobino and Guyer (2011). Annual Summary of Vital Statistics: 2008, American Academy of Pediatrics. **121**.

Maurer, J. (2018). Renal Injury Induces Systemic Microvascular Functional Impairment. Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doctor medicinae (Dr. med.), Charité-Universitätsmedizin Berlin.

Murfee, W. L. and G. W. Schmid-Schonbein (2008). "Chapter 12. Structure of microvascular networks in genetic hypertension." Methods Enzymol **444**: 271-284.

Nissel, R., D. C. Fischer, A. Puhlmann, B. Holdt-Lehmann, A. Mitzner, M. Petzsch, T. Korber, M. Tiess, R. Schmidt and D. Haffner (2009). "Short-term growth hormone treatment and microcirculation: effects in patients with chronic kidney disease." Microvasc Res **78**(2): 246-252.

Ohashi, R., H. Kitamura and N. Yamanaka (2000). "Peritubular capillary injury during the progression of experimental glomerulonephritis in rats." J Am Soc Nephrol **11**(1): 47-56.

Ohashi, R., A. Shimizu, Y. Masuda, H. Kitamura, M. Ishizaki, Y. Sugisaki and N. Yamanaka (2002). "Peritubular capillary regression during the progression of experimental obstructive nephropathy." J Am Soc Nephrol **13**(7): 1795-1805.

Ooi, Q. L., F. K. Tow, R. Deva, M. A. Alias, R. Kawasaki, T. Y. Wong, N. Mohamad, D. Colville, A. Hutchinson and J. Savige (2011). "The microvasculature in chronic kidney disease." Clin J Am Soc Nephrol **6**(8): 1872-1878.

Ostergaard, L., A. Granfeldt, N. Secher, A. Tietze, N. K. Iversen, M. S. Jensen, K. K. Andersen, K. Nagenthiraja, P. Gutierrez-Lizardi, K. Mouridsen, S. N. Jespersen and E. K. Tonnesen (2015). "Microcirculatory dysfunction and tissue oxygenation in critical illness." Acta Anaesthesiol Scand **59**(10): 1246-1259.

- Popel, A. S. and P. C. Johnson (2005). "Microcirculation and Hemorheology." Annu Rev Fluid Mech **37**: 43-69.
- Pries, A. R. (1988). "A versatile video image analysis system for microcirculatory research." Int J Microcirc Clin Exp **7**(4): 327-345.
- Pries, A. R., K. Ley and P. Gaehtgens (1986). "Generalization of the Fahraeus principle for microvessel networks." Am J Physiol **251**(6 Pt 2): H1324-1332.
- Pries, A. R., B. Reglin and T. W. Secomb (2001). "Structural adaptation of microvascular networks: functional roles of adaptive responses." Am J Physiol Heart Circ Physiol **281**(3): H1015-1025.
- Pries, A. R. and T. W. Secomb (2005). "Microvascular blood viscosity in vivo and the endothelial surface layer." Am J Physiol Heart Circ Physiol **289**(6): H2657-2664.
- Pries, A. R. and T. W. Secomb (2008). Blood Flow in Microvascular Networks. Handbook of Physiology: Microcirculation. R. F. Tuma, W. N. Duran and K. Ley. Amsterdam, Elsevier: 3-36.
- Pries, A. R. and T. W. Secomb (2008). "Modeling structural adaptation of microcirculation." Microcirculation **15**(8): 753-764.
- Pries, A. R. and T. W. Secomb (2009). "Origins of heterogeneity in tissue perfusion and metabolism." Cardiovasc Res **81**(2): 328-335.
- Pries, A. R. and T. W. Secomb (2014). "Making microvascular networks work: angiogenesis, remodeling, and pruning." Physiology (Bethesda) **29**(6): 446-455.
- Puri, T. S., M. I. Shakaib, A. Chang, L. Mathew, O. Olayinka, A. W. Minto, M. Sarav, B. K. Hack and R. J. Quigg (2010). "Chronic kidney disease induced in mice by reversible unilateral ureteral obstruction is dependent on genetic background." Am J Physiol Renal Physiol **298**(4): F1024-1032.
- Raichle, M. E., A. M. MacLeod, A. Z. Snyder, W. J. Powers, D. A. Gusnard and G. L. Shulman (2001). "A default mode of brain function." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(2): 676-682.
- Revelly, J. P., T. Ayuse, N. Brienza, H. E. Fessler and J. L. Robotham (1996). "Endotoxic shock alters distribution of blood flow within the intestinal wall." Crit Care Med **24**(8): 1345-1351.
- Sala, E., E. A. Noyszewski, J. M. Campistol, R. M. Marrades, S. Dreha, J. V. Torregrossa, J. S. Beers, P. D. Wagner and J. Roca (2001). "Impaired muscle oxygen transfer in patients with chronic renal failure." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **280**(4): R1240-1248.
- Santana, A. C., S. Degaspari, S. Catanozi, H. Delle, L. de Sa Lima, C. Silva, P. Blanco, K. Solez, C. Scavone and I. L. Noronha (2013). "Thalidomide suppresses inflammation in adenine-induced CKD with uraemia in mice." Nephrol Dial Transplant **28**(5): 1140-1149.

Schmid-Schonbein, G. W. (1999). "Biomechanics of microcirculatory blood perfusion." Annu Rev Biomed Eng **1**: 73-102.

Secomb, T. W., R. Hsu, M. W. Dewhirst, B. Klitzman and J. F. Gross (1993). "Analysis of oxygen transport to tumor tissue by microvascular networks." Int J Radiat Oncol Biol Phys **25**(3): 481-489.

Shobeiri, N., M. A. Adams and R. M. Holden (2010). "Vascular calcification in animal models of CKD: A review." Am J Nephrol **31**(6): 471-481.

Sperandio, M., J. Pickard, S. Unnikrishnan, S. T. Acton and K. Ley (2006). "Analysis of leukocyte rolling in vivo and in vitro." Methods Enzymol **416**: 346-371.

Spronk, P. E., D. F. Zandstra and C. Ince (2004). "Bench-to-bedside review: Sepsis is a disease of the microcirculation." Critical Care National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine: 462–468.

Tamura, M., R. Aizawa, M. Hori and H. Ozaki (2009). "Progressive renal dysfunction and macrophage infiltration in interstitial fibrosis in an adenine-induced tubulointerstitial nephritis mouse model." Histochem Cell Biol **131**(4): 483-490.

Tanaka, T. and M. Nangaku (2013). "Angiogenesis and hypoxia in the kidney." Nat Rev Nephrol **9**(4): 211-222.

Thang, O. H., E. H. Serne, M. P. Grooteman, Y. M. Smulders, P. M. ter Wee, G. J. Tangelder and M. J. Nube (2011). "Capillary rarefaction in advanced chronic kidney disease is associated with high phosphorus and bicarbonate levels." Nephrol Dial Transplant **26**(11): 3529-3536.

Thomas, Ansorg, Arndt and Barlage (2005). Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik.

Tuma, R. F., W. N. Durán and K. Ley (2008). Handbook of Physiology: Microcirculation.

Van Pelt, J., H. B. Uylings, R. W. Verwer, R. J. Pentney and M. J. Woldenberg (1992). "Tree asymmetry--a sensitive and practical measure for binary topological trees." Bull Math Biol **54**(5): 759-784.

Zakrzewicz, A., T. W. Secomb and A. R. Pries (2002). "Angioadaptation: keeping the vascular system in shape." News Physiol Sci **17**: 197-201.

Zhu, X. Y., A. R. Chade, M. Rodriguez-Porcel, M. D. Bentley, E. L. Ritman, A. Lerman and L. O. Lerman (2004). "Cortical microvascular remodeling in the stenotic kidney: role of increased oxidative stress." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(10): 1854-1859.

Zur, B. (2005). Laborchemische Referenzbereiche für Wistarratten und C57BL/6-Mäuse Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Germany.

8. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|---|
| AUC | Area under the Curve |
| avDO ₂ | Arteriovenöse Differenz des Sauerstoffpartialdrucks |
| Balb/c | Baggs Albino Laboratory Bred/c |
| BUN | Blood urea nitrogen |
| C57BL/6 | C57 Black 6 |
| CAM | Chick Chorioallantoic Membrane |
| CKD | Chronic Kidney Disease |
| DD | Diffusionsdistanz |
| DR | Diffusionsreichweite |
| ELISA | Enzyme-linked Immunosorbent Assay |
| EPO | Erythropoetin |
| Flk-1 | Fetal Liver Kinase 1 |
| Hb | Hämoglobin |
| IL | Interleukin |
| iNOS | Indicible Nitric Oxide Synthase |
| IVA | Intervaskuläres Areal |
| KG | Körpergewicht |
| KGE | Kleinste Gewebeeinheit |
| MAP | Mean Arterial Pressure |
| MCH | Mean Corpuscular Hemoglobin |
| ROD18 | Rodan Diet 18 |
| V _B | Blutströmungsgeschwindigkeit |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |
| VEGFR-2 | Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 |
| VHS | Video Home System |

9. Lebenslauf

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

10. Selbstständigkeitserklärung

Erklärung an Eides Statt

Ich, Hans-Ulrich Prommer, geboren am (aus Datenschutzgründen hier nicht aufgeführt), versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema »Strukturelle Veränderungen der Mikrozirkulation bei experimenteller Urämie – Quantifizierung, Typisierung, Konsequenzen. In-vivo Untersuchungen am *M. cremaster* bei Mäusen mit chronischer Niereninsuffizienz« 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) 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 Publikation zu dieser Dissertation (siehe Publikationsverzeichnis) entspricht dem, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit meinem Betreuer und Doktorvater Prof. Axel Radlach Pries, angegeben ist. Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Hans-Ulrich Prommer

Berlin, den 7. Juni 2018

Anteilserklärung

Teilumfänge der hier dargelegten Ergebnisse wurden vorab im März 2018 unter dem Titel »Chronic kidney disease induces a systemic microangiopathy, tissue hypoxia and dysfunctional angiogenesis« veröffentlicht (siehe Publikationsverzeichnis): Autoren: Prommer, H. U., J. Maurer, K. von Websky, C. Freise, K. Sommer, H. Nasser, R. Samapati, B. Reglin, P. Guimaraes, A. R. Pries, U. Querfeld (Hans-Ulrich Prommer und Dr. Johannes Maurer sind Erstautoren, alle anderen genannten Autoren sind Co-Autoren); Zeitschrift: Scientific Reports, Nature Publishing Group.

Hans- Hans-Ulrich Prommer hat an dieser Publikation folgende Anteile:

- Aus seinen Auswertungen sind die Grafiken Figure 1 A-C, Figure 2 A-F, Figure 3 A-G, Figure 4 C, D sowie Tabelle 1 entstanden.
- Die Kapitel »Abstract«, »Introduction«, »Discussion« und »Methods« sowie im Kapitel »Results« das Unterkapitel »Two experimental procedures generate CKD/uremia of different severity« wurden etwa in gleichen Anteilen durch die Erstautoren verfasst – unterstützt durch Prof. Querfeld.
- Im Kapitel »Results« hat Hans-Ulrich Prommer maßgeblich folgende Unterkapitel verfasst:
 - »CKD promotes microvascular rarefaction in a dose-dependent manner«
 - »CKD induces a heterogeneous rarefaction pattern«
 - »Loss of coherent vessel system is the predominant mechanism of rarefaction in CKD«
 - »Microvascular rarefaction results in increased diffusion distances impairing oxygen supply«
 - »Blood flow velocity and leucocyte rolling velocity in CKD« (Anteil blood flow velocity)
 - »CKD diminishes convective oxygen transport«
- Das Kapitel »Supplementary material« wurde ebenfalls maßgeblich durch Hans-Ulrich Prommer verfasst.

11. Danksagung

Ein herzliches Dankeschön gilt den Freunden und Mitarbeitern aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Gastroenterologie, Nephrologie und Stoffwechselmedizin (vormals Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Nephrologie) und dem Institut für Physiologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben: Dr. Claudia Abramjuk, Prof. Dr. Christian Freise, Pedro Guimaraes, Prof. Dr. Helmut Habazettl, Prof. Dr. Michael Höpfner, Dr. Johannes Maurer, Hamoud Nasser, Dr. Bianca Nietzsche, Sylvia Plog, Dr. Bettina Reglin, Dr. Rudi Sampati, Kerstin Sommer und Dr. Karoline von Websky. Ganz besonders danke ich Prof. Dr. Axel Radlach Pries sowie Prof. Dr. Uwe Querfeld für die interessante Themenstellung und die Möglichkeit dieser Dissertation.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich auf dem Weg durch das Studium begleitet hat.