

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Nephrologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Rarefizierung der Mikrovaskulatur im Omentum chronisch
niereninsuffizienter Kinder

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dorothea Burkhardt

aus Berlin

Datum der Promotion: 08.12.2017

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Titelblatt: | 1 |
| 1 Zusammenfassung..... | 5 |
| 1.1 Abstrakt | 5 |
| 1.3 Abstract..... | 7 |
| 2 Einleitung..... | 9 |
| 2.1 Chronische Niereninsuffizienz | 9 |
| 2.1.1 Chronische Niereninsuffizienz im Kindesalter | 12 |
| 2.2 Kardiovaskuläre Erkrankungen und endotheliale Dysfunktion bei chronischer Niereninsuffizienz | 13 |
| 2.2.1 Kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität..... | 13 |
| 2.2.2 Endotheliale Dysfunktion | 14 |
| 2.3 Zielsetzung der Arbeit | 16 |
| 3 Material und Methoden | 18 |
| 3.1 Material..... | 18 |
| 3.1.1 Omentale Biopsien | 18 |
| 3.1.2 Geräte | 21 |
| 3.1.3 Verbrauchsmaterial | 21 |
| 3.1.4 Antikörper..... | 22 |
| 3.1.5 Chemikalien | 22 |
| 3.1.6 Puffer und Lösungen | 22 |
| 3.1.7 Konjugat | 23 |
| 3.1.8 Kits | 23 |
| 3.1.9 Eindeckmedium | 23 |
| 3.1.10 Software..... | 23 |
| 3.2 Methoden..... | 23 |
| 3.2.1 Gewebeentnahme und Aufbewahrung der Biopsien..... | 23 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.2.2 | Vorbereitung der Biopsien, Paraffineinbettung | 24 |
| 3.2.3 | Immunhistochemie | 25 |
| 3.2.4 | Auswertung der CD 31-Immunhistochemie | 32 |
| 3.2.5 | Auswertung der Apoptose- und Autophagie-Immunhistochemie | 34 |
| 3.2.6 | Auswertung der VEGF-Rezeptor 2-Immunhistochemie | 34 |
| 3.2.7 | Auswertung der ergänzenden immunhistochemischen Untersuchungen (VEGF-A, Podoplanin, Angiopoietin 1 und 2) | 34 |
| 3.2.8 | Statistik | 35 |
| 4 | Ergebnisse | 38 |
| 4.1 | Übersicht über die Studienpopulation | 38 |
| 4.1.1 | Erkrankungsspektrum der niereninsuffizienten Kinder | 42 |
| 4.1.2 | Erkrankungsspektrum der nierengesunden Kinder | 42 |
| 4.1.3 | Blutdruckwerte und antihypertensive Medikation | 45 |
| 4.2 | Kapillardichte | 47 |
| 4.2.1 | Reproduzierbarkeit der Messergebnisse | 49 |
| 4.2.2 | Korrelation der Kapillardichte mit klinischen und laborchemischen Parametern .. | 57 |
| 4.3 | VEGF-Rezeptoren | 71 |
| 4.3.1 | Intrazellulärer Anteil des VEGF-Rezeptor-2 | 72 |
| 4.3.2 | Extrazellulärer Anteil des VEGF-Rezeptor-2 | 73 |
| 4.4 | Apoptose und Autophagie | 74 |
| 4.5 | Ergänzende immunhistochemische Untersuchungen | 75 |
| 4.5.1 | Podoplanin | 75 |
| 4.5.2 | VEGF-A | 76 |
| 4.5.3 | Angiopoietin 1 und 2 | 77 |
| 5 | Diskussion | 80 |
| 5.1 | Studienpopulation | 80 |
| 5.2 | Methodik | 82 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 5.2.1 | Validität und Reproduzierbarkeit der Messmethode..... | 82 |
| 5.3 | Kapillardichte..... | 83 |
| 5.3.1 | Zusammenhang der Kapillardichte mit klinischen und laborchemischen Parametern | 89 |
| 5.4 | Potentielle Mechanismen der kapillären Rarefizierung | 94 |
| 5.4.1 | Apoptose und Autophagie | 94 |
| 5.4.2 | VEGF-Familie und Angiopoietine | 95 |
| 5.5 | Limitationen..... | 98 |
| 5.6 | Schlussfolgerung..... | 99 |
| 6 | Literaturverzeichnis..... | 100 |
| 7 | Eidesstattliche Versicherung | 114 |
| 8 | Lebenslauf | 115 |
| 9 | Publikationsliste..... | 118 |
| 10 | Anhang | 119 |
| 10.1 | Internationale Peritonealbiopsie-Studie bei Kindern | 119 |
| 10.1.1 | Anlage 1: Beispiel für Aufklärungsschrift für niereninsuffiziente Jugendliche ... | 119 |
| 10.1.2 | Anlage 2: Beispiel für Aufklärungsschrift für gesunde Jugendliche | 121 |

1 Zusammenfassung

1.1 Abstrakt

Hintergrund: Eine chronische Niereninsuffizienz geht mit einer exzessiven Zunahme an Morbidität und Mortalität einher. Insbesondere bei Kindern und jungen Erwachsenen mit einer Niereninsuffizienz seit dem Kindesalter ist die Lebenserwartung im Vergleich zu gesunden Gleichaltrigen deutlich eingeschränkt. Dies ist vor allem der Zunahme an kardiovaskulären Erkrankungen geschuldet. Zu einer frühen Manifestation kardiovaskulärer Erkrankungen zählt eine endotheliale Dysfunktion. Die Rolle der Mikrozirkulation als strukturelle Basis der endothelialen Funktion ist bisher in diesem Zusammenhang nur wenig untersucht worden.

In dieser Arbeit wurde die Kapillardichte im omentalen Gewebe terminal niereninsuffizienter Kinder untersucht, um die Bedeutung struktureller Veränderungen der Mikrozirkulation im Rahmen der chronischen Niereninsuffizienz im Kindesalter näher zu beleuchten.

Patienten und Methoden: Omentales Gewebe wurde von 32 gesunden Kindern im Alter von 0-18 Jahren während elektiver abdomineller Operationen entnommen, sowie von 23 gleichaltrigen terminal niereninsuffizienten Kinder zum Zeitpunkt der initialen Katheteranlage vor Beginn einer Peritonealdialysetherapie. Die Kapillaren wurden mit Hilfe der CD 31-Immunhistochemie dargestellt und mit einem Digitalmikroskop und einer Analyse-Software ausgewertet. Zur Identifizierung von Pathomechanismen möglicher Veränderungen der Kapillardichte bei chronischer Niereninsuffizienz wurden Apoptose- und Autophagie-Marker sowie der interne und externe Anteil des Vascular endothelial growth factor (VEGF)-Rezeptors 2 mit immunhistochemischen Methoden quantifiziert.

Ergebnisse: Es zeigte sich eine signifikant reduzierte Kapillardichte bei chronisch niereninsuffizienten Kindern im Vergleich zu gesunden gleichaltrigen Kindern. (mediane Kapillardichte bei den Kontrollen 0,95 % der Gesamtfläche vs. 0,61 % bei den niereninsuffizienten Kindern, $p= 0,0021$). Bei den niereninsuffizienten Kindern war die Kapillardichte invers mit den Kreatinin- und Harnstoffwerten korreliert (Kreatinin: $r= -0,57$, $p= 0,0286$; Harnstoff: $r= -0,54$, $p= 0,0479$). In der multivariaten Analyse waren die Größe und das Vorhandensein einer Niereninsuffizienz die einzigen signifikanten unabhängigen Prädiktoren der Kapillardichte und erklärten 42% der Varianz. Bei den niereninsuffizienten Kindern war die

Körpergröße der einzige signifikante unabhängige Prädiktor und konnte 66% der Varianz der Kapillardichte erklären.

Es zeigten sich weder Hinweise für Autophagie oder Apoptose bei den niereninsuffizienten Kindern, noch ließen sich Unterschiede des intra-oder extrazellulären Anteils des VEGF-Rezeptors 2 zwischen den beiden Gruppen erkennen.

Schlussfolgerung: In dieser Arbeit konnte eine signifikante Rarefizierung der Mikrovaskulatur im omentalen Gewebe chronisch terminal niereninsuffizienter Kinder nachgewiesen werden. Dies ist wahrscheinlich Ausdruck einer generalisierten mikrovaskulären Erkrankung und ein frühes Zeichen kardiovaskulärer Veränderungen bei chronischer Niereninsuffizienz. Eine Stimulierung der Angiogenese könnte einen zukünftigen therapeutischen Ansatz zur Verbesserung der Prognose bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz bieten.

1.3 Abstract

Background: Chronic kidney disease (CKD) is associated with a high cardiovascular morbidity and mortality. Especially children with end stage renal disease (ESDR) have a significantly diminished life expectancy compared to an aged-matched general population. One of the leading causes for death is cardiovascular disease. Endothelial dysfunction is an early manifestation of cardiovascular disease and can be seen even at early stages of CKD. However, only few studies have analyzed the morphology of the microcirculation, which provides the structural basis of the endothelial function.

To investigate the role of structural alterations of the microcirculation in pediatric ESRD, this study examined capillary density in omental biopsies.

Patients and Methods: Omental tissue was obtained from 32 healthy children (0-18 years) undergoing elective abdominal surgery and 23 age-matched cases with stage 5 CKD at the time of catheter insertion for initiation of peritoneal dialysis.

To examine capillary density, omental biopsies were stained with CD 31-antibody and evaluated manually by a digital microscope and analyzer software. To assess potential mechanism of structural changes of the microcirculation, quantitative immunohistochemistry was performed for markers of autophagy and apoptosis, and for abundance of the intra- and extracellular domains of the receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGFR2.

Results: Microvascular density in omental biopsies was significantly reduced in uremic children compared to healthy age-matched children. Median capillary surface area was 36% lower in CKD 5 (median surface area in controls 95% of total surface area vs. 0,61% in CKD, $p=0,0021$). In CKD, capillary density was also inversely correlated with serum creatinine and urea levels (creatinine $r=-0,57$, $p=0,0286$; urea $r=-0,54$, $p=0,0479$). In multivariate analysis, the presence of CKD and height were the only independent significant predictors of capillary density and explained 42% of the variability. For the CKD group, the only significant independent predictor was height and this variable explained 66% of the capillary density.

There was no evidence for autophagy or apoptosis in omental biopsies of CKD patients and no significant differences for the intra- or extracellular domain of the VEGF receptor 2 between both groups.

Conclusions: We found profound capillary rarefaction in omental biopsies of children with stage 5 CKD. Rarefaction of the microvasculature of the omentum could indicate generalized microvascular disease as an early systemic manifestation of CKD-induced cardiovascular disease. Stimulation of angiogenesis might be a future therapeutic target to improve the long-term outcome of children with CKD.

2 Einleitung

2.1 Chronische Niereninsuffizienz

Die chronische Nierenerkrankung ist wegen ihrer zunehmenden Inzidenz und Prävalenz und ihres ungünstigen klinischen Verlaufs (mit chronischer Progredienz, Dialysepflichtigkeit, zahlreichen Komorbiditäten und einer hohen Mortalität) weltweit von großer Bedeutung für das öffentliche Gesundheitssystem (Cirillo *et al.*, 2012). International definiert wird die chronische Nierenerkrankung (CKD, chronic kidney disease) laut KDIGO (Initiative Kidney Disease: Improving Global Outcomes) als eine Anomalität der Nierenstruktur oder Nierenfunktion, die länger als drei Monate anhält und von gesundheitlicher Relevanz ist (KDIGO, 2013). Zu den Zeichen einer Nierenschädigung gehören hiernach eine Albuminurie, Veränderungen des Urinsedimentes, tubuläre Störungen wie Elektrolytimbalancen, Veränderungen der Nierenstruktur (histologisch oder durch bildgebende Verfahren nachgewiesen) oder eine Nierentransplantation in der Vorgeschichte, unabhängig von einer Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate (Stadium I). Als weiteres wesentliches Kriterium einer höhergradigen chronischen Niereninsuffizienz wird eine Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate auf weniger als $60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ genannt, die länger als drei Monate besteht.

Die erste international anerkannte Definition der chronischen Nierenerkrankung wurde 2002 von der „National Kidney Foundations Kidney Disease Outcomes Quality Initiative“ (NF-KDOQI) verfasst (National-High-Blood-Pressure-Education-Program-Working-Group-on-High-Blood-Pressure-in-Children-and-Adolescents, 2004) und 2004 von der „Kidney Disease: Improving Global Outcomes“ (KDIGO) (Levey *et al.*, 2005) bestätigt. Durch die international verwendete gemeinsame Definition und Stadieneinteilung wurde die Implementierung klinisch-praktischer Leitlinien sowie der Vergleich zwischen verschiedenen Studien zur chronischen Niereninsuffizienz erstmals möglich, wodurch die wissenschaftliche Forschung auf diesem Gebiet einen wichtigen Fortschritt erreichte. Die Stadieneinteilung der chronischen Niereninsuffizienz erfolgt dabei auf der Basis der glomerulären Filtrationsrate in CKD-Stadium 1-5, s. Tabelle 1.

Tabelle 1: Stadieneinteilung der chronischen Niereninsuffizienz (Chronic Kidney Disease, CKD) nach der National Kidney Foundation in fünf Stadien anhand der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Eine CKD-Dauer über 3 Monate ist für die Diagnose notwendig.

| Stadium | Beschreibung | GFR (ml/min/1,73m ²) |
|---------|--|----------------------------------|
| 1 | Nierenschädigung mit normaler oder erhöhter GFR | ≥ 90 |
| 2 | Nierenschädigung mit milder Nierenfunktionseinschränkung | 60-89 |
| 3 | Nierenkrankheit mit moderater Nierenfunktionseinschränkung | 30-59 |
| 4 | Nierenkrankheit mit schwerer Nierenfunktionseinschränkung | 15-29 |
| 5 | Chronisches Nierenversagen | < 15 oder Dialyse |

In der 2013 veröffentlichten aktualisierten internationalen KDIGO Leitlinie (KDIGO, 2013), einer Revision der ursprünglichen NF-KDOQI Leitlinie, wurde die CKD-Stadieneinteilung anhand der GFR durch das Niveau der Albuminurie ergänzt, s. Abbildung 1. Damit sollte dem Ergebnis einer Metaanalyse des CKD Prognose Konsortiums Rechnung getragen werden, die einen Zusammenhang der GFR sowie dem Ausmaß der Albuminurie mit dem Risiko für Tod und Nierenversagen, unabhängig voneinander und von traditionellen kardiovaskulären Risikofaktoren, gezeigt hatte (Cirillo *et al.*, 2012).

Prognose von CKD nach GFR- und Albuminurie-Kategorien:
KDIGO 2012 (KDIGO, 2013; Inker *et al.*, 2014)

| Persistierende Albuminurie-Kategorien | | |
|---------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Beschreibung und Bereich | | |
| A1 | A2 | A3 |
| Normal bis mild erhöht | Moderat erhöht | Massiv erhöht |
| < 30 mg/g <3 mg/mmol | 30-300 mg/g 3-30 mg/mmol | > 300 mg/g > 30 mg/mmol |

| GFR-Kategorien (ml/min/1,73m ²) | G1 | Normal oder hoch | > 90 | | | |
|---|-----|-------------------------------|-------|--|--|--|
| | G2 | Leicht vermindert | 60-89 | | | |
| | G3a | Leicht bis moderat vermindert | 45-59 | | | |
| | G3b | Moderat bis stark vermindert | 30-44 | | | |
| | G4 | Stark vermindert | 15-29 | | | |
| | G5 | Nierenversagen | < 15 | | | |

Abbildung 1: Prognose der chronischen Nierenerkrankung (CKD) nach GFR- und Albuminurie-Kategorien: KDIGO 2012 (Inker *et al.*, 2014). Die Farben stellen Risikokategorien mit ähnlichem relativem Risiko bezüglich der CKD-Folgen dar. Grün: geringes Risiko (keine CKD, wenn keine anderen Zeichen einer Nierenschädigung vorhanden sind). Gelb: moderat erhöhtes Risiko. Orange: hohes Risiko. Rot: sehr hohes Risiko

Eine terminale Niereninsuffizienz (ESRD, endstage renal disease), definiert als eine Verringerung der GFR auf weniger als 15 ml/min/1,73 m² oder die Notwendigkeit einer Dialyse

(Eckardt *et al.*, 2009), lag Ende 2004 laut einer internationalen Untersuchung weltweit bei 1.783.000 Menschen und europaweit bei 473.000 Menschen vor; darüber hinaus zeigt sich eine Tendenz zur weiteren Zunahme (Grassmann *et al.*, 2005). Dass eine terminale Niereninsuffizienz trotz Behandlungsfortschritten nicht nur mit der Abnahme von Lebensqualität, sondern auch mit einer Zunahme der Gesamtmorbidität und –Mortalität verbunden ist, konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden (Henry *et al.*, 2002; Go *et al.*, 2004); bereits milde bis moderate Erhöhungen des Serumkreatinins – als Ausdruck eingeschränkter Nierenfunktion - sind mit einer Zunahme der Gesamtsterblichkeit verbunden (Go *et al.*, 2004).

Zu den häufigsten Ursachen der terminalen Niereninsuffizienz mit der Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie in Deutschland zählt mit 28% die diabetische Nephropathie, gefolgt von Glomerulonephritiden mit 19% (Frei & Schober-Halstenberg, 2008).

2.1.1 Chronische Niereninsuffizienz im Kindesalter

Die chronische Nierenerkrankung im Kindesalter ist eine gravierende progrediente Erkrankung mit im Prinzip schlechter Prognose wegen ihrer zahlreichen Auswirkungen auf Wachstum und Entwicklung, vorzeitigem Tod im Vergleich zu gesunden Gleichaltrigen und deutlich erhöhter Morbidität und Mortalität (Groothoff, 2005). Zur Definition der chronischen Nierenerkrankung im Kindesalter ist die internationale Definition der KDIGO der chronischen Niereninsuffizienz auch für Kinder meist anwendbar (Hogg *et al.*, 2003). Allerdings ist das Kriterium, dass Anomalien der Nierenstruktur oder Nierenfunktion über drei Monate bestehen müssen, für Säuglinge unter drei Monaten nicht anwendbar. Das Kriterium einer GFR unter 60 ml/min/1,73 m² ist ebenfalls für Kinder unter zwei Jahren nicht anwendbar und sollte durch den Vergleich mit altersentsprechenden Normwerten, wie auch bei der Bestimmung von Albuminurie und Elektrolytimbalancen, ersetzt werden (KDIGO, 2013).

Die Prävalenz einer terminalen Niereninsuffizienz mit der Notwendigkeit einer chronischen Nierenersatztherapie bei Kindern (0-18 Jahre) lag 2006 in Deutschland bei 57 pro Million der Altersgruppe (Frei & Schober-Halstenberg, 2008) und bewegte sich weltweit zwischen 18-100 pro Million der Altersgruppe mit einer Inzidenz von 9 pro Million der altersbezogenen Bevölkerung (Harambat *et al.*, 2012).

Die Ursachen der chronischen Niereninsuffizienz bei Kindern unterscheiden sich stark von den Ursachen bei Erwachsenen und verändern sich mit dem Lebensalter. Die häufigste Ursache der chronischen Nierenkrankheit sowie der terminalen Niereninsuffizienz bei Kindern sind

angeborene Störungen (CAKUT, congenital anomalies of the kidney and urinary tract), insbesondere bei jüngeren Kindern, gefolgt von Glomerulonephritiden und hereditären Nephropathien (Harambat *et al.*, 2012). Durch Fortschritte in der Behandlung während der letzten Jahrzehnte erlebt ein Großteil der niereninsuffizienten Kinder das Erwachsenenalter. Doch trotz dieser Fortschritte in der Nierenersatztherapie bleibt die Überlebensrate niereninsuffizienter Kinder 30-mal geringer als bei gesunden Gleichaltrigen (Harambat *et al.*, 2012). Bei jungen Erwachsenen, die an einer terminalen Niereninsuffizienz seit der Kindheit leiden, ist die Lebenserwartung deutlich eingeschränkt im Vergleich zur altersbezogenen gesunden Population (Mitsnefes, 2012).

2.2 Kardiovaskuläre Erkrankungen und endotheliale Dysfunktion bei chronischer Niereninsuffizienz

2.2.1 Kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität

Bereits vor 40 Jahren wurde erstmals ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen bei Patienten gefunden, die eine Nierenersatztherapie erhielten (Lindner *et al.*, 1974). In einem Review aus dem Jahr 2005 (Vanholder *et al.*, 2005), in dem 85 Studien aus der ganzen Welt untersucht und analysiert wurden, zeigte sich ein universeller Zusammenhang zwischen einer gestörten Nierenfunktion und einem erhöhten kardiovaskulären Risiko. Schon eine milde bis moderate Abnahme der Nierenfunktion ist mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität verbunden (Henry *et al.*, 2002; Sarnak *et al.*, 2003; Go *et al.*, 2004; Vanholder *et al.*, 2005; Herzog *et al.*, 2011). Diesen Erkenntnissen wurden in den Statements und Leitlinien verschiedener Gesellschaften wie der American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention (Sarnak *et al.*, 2003), der National Kidney Foundation-Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (NKF-KDOQI) (Inker *et al.*, 2014) und der Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure (Chobanian *et al.*, 2003) Rechnung getragen, indem sie Menschen mit chronischer Nierenerkrankung als Hochrisikogruppe für kardiovaskuläre Erkrankungen einstufen. Dabei ist für Menschen mit chronischer Nierenerkrankung die Wahrscheinlichkeit höher, durch kardiovaskuläre Ursachen zu versterben als eine terminale Niereninsuffizienz zu erleiden (Shulman *et al.*, 1989; Dennis, 2005), d.h. die kardiovaskuläre Komorbidität ist bereits in frühen Stadien der Niereninsuffizienz in vielen Fällen lebenslimitierend.

Insbesondere bei Kindern ist eine terminale Niereninsuffizienz mit einer exzessiven Zunahme der kardiovaskulären Mortalität verbunden mit einem ca. 700-fach erhöhten Risiko eines kardialen Todes im Vergleich mit gleichaltrigen gesunden Kindern (Lilien & Groothoff, 2009). Diese erhöhte kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität spiegelt sich auch in der Risikostratifizierung des Konsensus des American Heart Association Expert Panel wider, die Kinder mit chronischer Nierenerkrankung/terminaler Niereninsuffizienz in die Hochrisikogruppe für kardiovaskuläre Erkrankungen einteilt (Kavey *et al.*, 2007). So fanden sich bei Kindern mit terminaler Niereninsuffizienz (Civilibal *et al.*, 2006) und jungen Erwachsenen mit chronischer Nierenerkrankung seit dem Kindesalter (Groothoff *et al.*, 2002a; Oh *et al.*, 2002) bereits Veränderungen des kardiovaskulären Systems im Sinne einer kalzifizierenden Arteriopathie. Diese subklinischen Veränderungen beginnen schon früh im Krankheitsverlauf und nehmen bei fortschreitender Niereninsuffizienz zu (Shroff *et al.*, 2011). Zu diesen frühen Veränderungen gehören neben Gefäßveränderungen (Shroff *et al.*, 2008) auch eine systolische oder (häufiger) diastolische Dysfunktion (Mitsnefes *et al.*, 2004) und eine linksventrikuläre Hypertrophie (Mitsnefes, 2008), die bereits bei milder bis moderater chronischer Niereninsuffizienz nachweisbar sind. In einer niederländischen Kohorten-Studie zeigte sich eine 30-fach erhöhte Mortalität bei Patienten mit Nierenersatztherapie seit der Kindheit im Vergleich zu gesunden Gleichaltrigen, von der mehr als 40% eine kardiovaskuläre Ursache hatte (Groothoff *et al.*, 2002b). Auch Daten aus anderen Ländern wie der Australia and New Zealand Dialysis and Transplantat (ANZDATA) Registry (McDonald *et al.*, 2004) sowie dem United States Renal Data System (USRDS) (Chavers *et al.*, 2002; Parekh *et al.*, 2002) konnten zeigen, dass kardiovaskuläre Erkrankungen bei Kindern mit terminaler Niereninsuffizienz eine hohe Inzidenz haben und für einen Großteil der erhöhten Morbidität und Mortalität in dieser Patientengruppe verantwortlich sind.

2.2.2 Endotheliale Dysfunktion

Veränderungen der Mikro- und Makrozirkulation bei chronischer Niereninsuffizienz und ihr Einfluss auf die erhöhte kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität bei dieser Patientengruppe sind schon seit längerer Zeit Gegenstand wissenschaftlicher Forschung. Eine endotheliale Dysfunktion als Schlüsselement kardiovaskulärer Erkrankungen bei chronischer Nierenerkrankung (Fliser *et al.*, 2011) ist in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus gerückt. Eine Vielzahl von Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen gehen mit einer gestörten endothelialen Funktion einher, was dazu geführt hat, dass die endotheliale Dysfunktion als „ultimatives Risiko der Risikofaktoren“ (Bonetti *et al.*, 2003) betrachtet wird. Die

endotheliale Dysfunktion betrifft als systemische Störung neben den großen Arterien auch periphere Widerstandsgefäße und das Kapillarbett und gilt als unabhängiger Prädiktor für kardiovaskuläre Erkrankungen (Anderson *et al.*, 1995; Bonetti *et al.*, 2003). Bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung kann eine endotheliale Dysfunktion als klinisches Merkmal kardiovaskulärer Erkrankungen regelmäßig beobachtet werden. Sie ist bereits bei milder Niereninsuffizienz vorhanden (Thambyrajah *et al.*, 2000; Stam *et al.*, 2006) und ihr Ausmaß korreliert mit dem Schweregrad der Niereninsuffizienz (Ghiadoni *et al.*, 2004). Auch bei Kindern mit chronischer Niereninsuffizienz zeigt sich bereits früh eine endotheliale Dysfunktion (Lilien & Groothoff, 2009).

Veränderungen der endothelialen Funktion und Struktur treten im Allgemeinen in der Mikrozirkulation (mikrovaskuläre Dysfunktion) frühzeitig auf, bevor sich Erkrankungen der großen Gefäße sowie Endorganschäden klinisch manifestieren (Musa *et al.*, 2014; Clough, 2015). Doch trotz dieser Erkenntnisse gibt es nur wenige Studien, die sich mit der Morphologie der Mikrozirkulation als strukturelle Basis der endothelialen Funktion beschäftigt haben. Insbesondere im Kindesalter findet man nur sehr wenige klinische Beobachtungen und keine systematischen Studien zu diesem Thema. Eine Studie aus dem Jahr 2014 von Edwards-Richards *et al.* untersuchte die Mikrozirkulation bei pädiatrischen Hämodialyse-Patienten anhand der Nagelbett-Mikroskopie und fand eine signifikante Abnahme der Kapillardichte im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Edwards-Richards *et al.*, 2014). Ähnliche Ergebnisse zeigten Studien von Erwachsenen mit chronischer Niereninsuffizienz und im Tiermodell der Urämie. So zeigte sich im Tiermodell der Urämie sowohl im Myokard (Törnig *et al.*, 1996; Amann *et al.*, 1997) als auch im Skelettmuskel (Flisiński *et al.*, 2008) eine signifikante Abnahme der Kapillardichte. Studien bei Erwachsenen mit fortgeschrittener chronischer Niereninsuffizienz konnten diese Ergebnisse auch für die periphere Mikrozirkulation mit Hilfe der Nagelbett-Mikroskopie bestätigen (Nissel *et al.*, 2009; Thang *et al.*, 2011). In einer postmortalen Studie war die Kapillardichte bei Dialysepatienten im Myokard um beinahe 50% reduziert im Vergleich zu normotensiven nierengesunden Kontrollen (Amann *et al.*, 1998). Zudem ist eine kapilläre Rarefizierung in der Niere ein typisches Merkmal einer chronisch fortschreitenden Niereninsuffizienz (Mayer, 2011) wie auch eines chronischen Transplantatversagens (Adair *et al.*, 2007). Ebenso fanden alle Studien zur retinalen Mikrozirkulation bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung einen Zusammenhang zwischen chronischer Nierenerkrankung und einer gestörten Mikrozirkulation (Baumann *et al.*, 2009; Sabanayagam *et al.*, 2009; Deva *et al.*, 2011; Ooi *et al.*, 2011). Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass eine gute Evidenz für

einen Zusammenhang von chronischer Nierenerkrankung mit einer Störung der lokalen Mikrozirkulation in zahlreichen ganz verschiedenen Organen besteht. Ob diese Veränderungen systemischer Natur sind und ob sich ähnliche Veränderungen auch bei Kindern finden, ist bis zum heutigen Zeitpunkt ungeklärt und sollte Gegenstand weiterer Forschung sein.

2.3 Zielsetzung der Arbeit

Es ist bekannt, dass eine chronische Nierenerkrankung mit einer exzessiv erhöhten kardiovaskulären Morbidität und Mortalität verbunden ist. Veränderungen der Makrozirkulation konnten bereits gezeigt werden. Störungen der Mikrozirkulation, insbesondere eine kapilläre Rarefizierung, könnten durch eine Unterversorgung der Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen zu Schäden an einzelnen Geweben oder ganzen Organen führen und somit zu der erhöhten Morbidität und Mortalität bei chronischer Niereninsuffizienz beitragen. Bisherige Studien zu Veränderungen der Mikrozirkulation stammen von Gefäßbereichen bei Erwachsenen, die leicht zugänglich sind, z.B. dem Kapillarbett der Retina oder der Haut, sowie von Tiermodellen. Die Frage, ob eine chronische Nierenerkrankung auch ohne den Einfluss einer Dialyse-Therapie zu einer Störung der Mikrozirkulation führt, ist insbesondere für das Kindesalter bisher nicht geklärt. Ebenfalls ungeklärt ist die Frage, ob Veränderungen der Mikrozirkulation auf bestimmte Gefäßgebiete begrenzt sind oder systemischer Natur sind.

Hypothese dieser Arbeit war, dass eine chronische Nierenerkrankung mit einer systemischen Störung der Mikrozirkulation verbunden ist, die den pathologischen Veränderungen der Makrozirkulation vorangeht. Um das Ausmaß der „urämischen Mikroangiopathie“ zu untersuchen, wurde die Kapillardichte von urämischen Kindern analysiert und mit gesunden gleichaltrigen Kindern verglichen. Dafür wurden omentale Gewebebiopsien untersucht, da dieses Gewebe gut vaskularisiert und im Rahmen abdomineller Operationen leicht erreichbar ist. Als Studienpopulation wurden Kinder (0-18 Jahre) mit chronisch terminaler Nierenerkrankung (CKD 5) gewählt, eine Population ohne Störfaktoren (confounders) wie Alter und andere zusätzliche Komorbiditäten (z.B. Diabetes, Nikotinabusus, etc.), die die Mikrozirkulation beeinflussen können. Die Gewebeentnahme erfolgte vor Beginn einer Peritonealdialyse-Therapie zu dem Zeitpunkt der initialen operativen Anlage eines Tenckhoff-Katheters, um einen Einfluss der Dialyse auf die Gefäße der Mikrozirkulation auszuschließen. Zur Untersuchung der Mikrozirkulation wurde die Methode der CD-31 Immunhistochemie mit dem monoklonalem Antikörper JC70 als endothelialer Marker von Gefäßzellen gewählt. Dieses stellt ein etabliertes Verfahren zur histologischen Aufarbeitung und Quantifizierung des mikrovaskulären

Gefäßbettes dar (Parums *et al.*, 1990; Orre *et al.*, 1998) mit guter Spezifität und Sensitivität (Kuzu *et al.*, 1992).

Bei den so gefärbten Gefäßen stand die Analyse der Kapillaren im Vordergrund, da sie aufgrund ihrer großen Gesamtfläche, den Hauptteil der Mikrovaskulatur darstellen. Bei der mikroskopischen Untersuchung des Gewebes wurden hierzu größere Gefäße mit nicht-kapillärer Struktur sorgfältig ausgeschlossen (s. 3.2.4.3). Da die Mikrovaskulatur als Sammelbegriff für ein Kontinuum von kleinsten Kapillaren bis hin zu Arteriolen und Venolen jedoch keiner einheitlichen Definition anhand anatomischer Kriterien unterliegt (Levy *et al.*, 2001) wird in dieser Arbeit deshalb vereinfachend der Begriff „Kapillaren“ für die Mikrozirkulation verwendet.

Folgende Fragestellungen sollten geklärt werden:

- Gibt es Unterschiede der Kapillardichte zwischen urämischen und nierengesunden Kindern?
- Sind Veränderungen der Kapillardichte mit Veränderungen von laborchemischen und klinischen Daten assoziiert?
- Kann ein Pathomechanismus etwaiger Veränderungen der Mikrozirkulation identifiziert werden (Apoptose, Autophagie, VEGF-Achse)?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Omentale Biopsien

3.1.1.1 Studienpopulation

Einschlusskriterium für die Kontrollgruppe war eine geplante elektive abdominelle Operation bei einem nierengesunden Kind im Alter von 0-18 Jahren.

Ausschlusskriterien waren eine eingeschränkte Nierenfunktion, maligne Neoplasien, Hyperinsulinismus, gutartige Gefäßneubildungen sowie die Vorbehandlung mit Chemotherapeutika und Kortikosteroiden.

Nach Identifizierung von potentiellen Studienteilnehmern anhand des OP Plans wurde zunächst nach Aufklärung der Teilnehmer und ihrer Erziehungsberechtigten durch einen Arzt die schriftliche Einwilligung der Eltern eingeholt. Maßgebend für die Möglichkeit einer Teilnahme von gesunden Kindern war dabei die Unschädlichkeit des Eingriffes, bei dem lediglich sehr geringe Anteile des Bauchfells (ca. 0,5-2cm³) und des Omentums (ca. 0,5-3cm³) für die Studie verwendet wurden (Aufklärungsschrift im Anhang, s. Anlage 1). Dabei erfolgte die Rekrutierung als Kontrollgruppe zu einer laufenden internationalen Studie der „International Pediatric Peritoneal Biopsy Study in Children“ zur morphologischen Charakteristik der peritonealen Membran und des Omentums (Schaefer *et al.*, 2016) im Zeitraum von Februar 2011 bis Mai 2013 aus der Klinik der Kinderchirurgie und Kinderurologie der Charité-Campus Virchow Klinikum sowie aus der Klinik für Kinderchirurgie und Urologie des Universitätsklinikums Heidelberg. Die Studienzentrale dieser Studie (Leiter: Prof. Claus Schmitt) ist die Universitäts-Kinderklinik Heidelberg mit dem International Pediatric Dialysis Network (IPDN). Die Studie wurde durch die zuständige Ethik-Kommissionen der medizinischen Fakultät Heidelberg (Zeichen: S-487/2010) und aller teilnehmenden Zentren genehmigt und unter www.clinicaltrials.gov (NCT01893710) registriert. Sie wird in allen Aspekten gemäß den ICH-GCP-Richtlinien und den nationalen gesetzlichen Bestimmungen auf Grundlage der Deklaration des Weltärztebundes von Helsinki durchgeführt. Die Entnahme von omentalem Gewebe erfolgte intraoperativ nach Eröffnung der Peritonealhöhle durch Teilexzision mit dem Skalpell. Danach

erfolgte die sofortige Verarbeitung der Proben nach einem standardisiertem Vorgehen (s. Abbildung 3).

Zu diesen nierengesunden Kindern (Kontroll-Population) wurden in einer Fall-Kontroll Studie (matched case control study) Kinder mit terminaler Niereninsuffizienz aus der Biobank der Internationalen Peritonealbiopsie Studie (IPPN) selektioniert, denen in etwa demselben Alter omentales Gewebe bei einer Tenckhoff-Katheteranlage zur initialen Dialyse entnommen worden war (Patientenpopulation). Es galten, bis auf die eingeschränkte Nierenfunktion, die gleichen Ausschlusskriterien wie für die gesunden Kontrollen (Aufklärungsschrift im Anhang, s. Anlage 2).

In Abbildung 2 ist die Rekrutierung schematisch zusammengefasst.

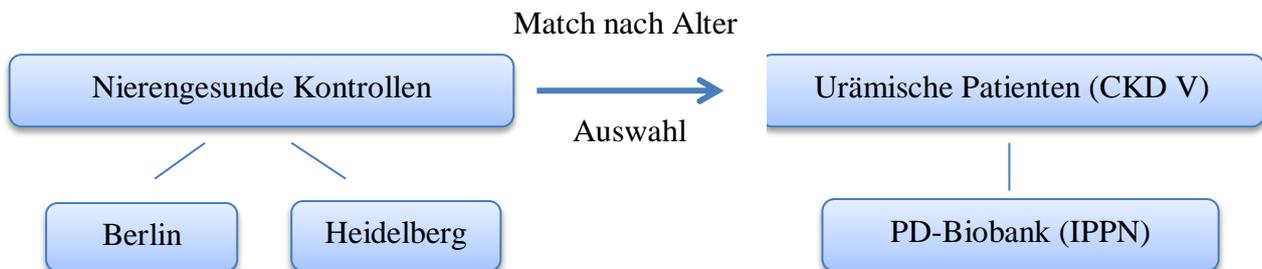


Abbildung 2: Rekrutierung der Studienteilnehmer

3.1.1.2 Erfasste klinische Parameter

Es wurden folgende Parameter anhand der medizinischen Akten, Arztbriefe oder PD-Datenbank (IPPN) erhoben:

- Geburtsdatum
- Alter zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme
- Geschlecht
- Diagnosen
- Operations-Datum
- Durchgeführte Operation zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme
- Voroperationen
- Medikamente
 - Kortikosteroidtherapie
 - Vorbehandlung mit Chemotherapeutika

- Antihypertensiva
- Gewicht
- Körpergröße
- Blutdruck
- Blutwerte (Blutentnahme vor der Gewebebiopsie)
 - Leukozyten
 - CRP
 - Hämoglobin
 - Kreatinin
 - Harnstoff
 - Bikarbonat
 - Kalium
 - Albumin
 - Phosphat

Bei den niereninsuffizienten Kindern wurden zusätzlich noch folgende Werte ermittelt:

- Glomeruläre Filtrationsrate nach Schwartz für Kinder > 1Jahr (Schwartz-Bedside) (Schwartz *et al.*, 2009):
(GFR [ml/min/1,73m²] = (0,413 x Körperlänge [cm])/ Kreatinin [mg/dl])
- Glomeruläre Filtrationsrate nach Schwartz für Kinder <1 Jahr (Reifgeborene) (Schwartz *et al.*, 1976) :
(GFR [ml/min/1,73m²] = 0,45x Körperlänge [cm]/ Kreatinin [mg/d])
- Calcium
- Parathormon

Für beide Gruppen wurde anhand der Körpergröße und dem Körpergewicht zusätzlich die Körperoberfläche (body surface area) (Mosteller, 1987) sowie der alters- und geschlechtsbezogene Body-Mass-Index Standardabweichungs-Score (BMI-SDS) nach Kromeyer-Hauschild (Kromeyer-Hauschild *et al.*, 2001) berechnet.

- BSA (body surface area [m²]) = $\sqrt{\frac{\text{Gewicht}[\text{kg}] \times \text{Länge}[\text{cm}]}{3600}}$
- BMI und BMI-SDS_{LMS} = ([BMI/M(t)]L(t)-1/(L(t)S(t))
 - BMI [kg/m²] = Körpergewicht [kg]/ Körpergröße [m]²

- M(t), L(t) und S(t) stellen die geschlechts- und altersentsprechenden Parameter der LMS-Methode nach Cole dar (Box-cox-power-Transformation (L), Median (M), Variationskoeffizienten (S)) (Cole *et al.*, 1998)
- Berechnung durch den von der Arbeitsgemeinschaft Adipositas im Kindes- und Jugendalter (AGA) auf der Homepage „my BMI 4 kids“ (<http://aga.adipositas-gesellschaft.de/mybmi4kids/>) zur Verfügung gestellten Rechner

3.1.2 Geräte

| | |
|--|---|
| Digitalmikroskop | Biorevo BZ-9000, Keyence, Mechelen, Belgien |
| Dampfgarer Typ 3216 | Braun, Kiefersfelden, Deutschland |
| Mikrotom (Rotationsmikrotom HM 325) | Thermo Scientific Microm™, Walldorf, Deutschland |
| Einbettungsautomat | Shandon Citadel 2000, Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, USA |
| Ofen/Trockenschrank TS 100 | Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland |
| Pipette Eppendorf Research®(100-1000µl+0,5-10µl) | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |

3.1.3 Verbrauchsmaterial

| | |
|--|--|
| Adhäsions-Objektträger SuperFrost®plus | R. Langenbrinck, Labor-und Medizintechnik Emmendingen, Deutschland |
| Einbettkassetten | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| Mikroskopische Deckgläser | R. Langenbrinck, Labor-und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland |
| Falcon® Konische Reagenzgläser (15ml) | Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland |
| Eppendorf Save-Lock Tubes (2ml) | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Färbeküvetten | VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland |

Pipettenspitzen Biosphere®Filter Tips Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland

3.1.4 Antikörper

Monoclonal Mouse Anti-Human CD 31, Clone JC70A Dako, Glostrup, Dänemark

Mouse monoclonal anti-KDR/VEGFR 2(LS-C122532) LifeSpan Biosciences Inc.,
Washington, USA

Rabbit polyclonal anti-VEGFR-2 (Flk-1, KDR) ZYTOMED®SYSTEMS,
Berlin, Deutschland

Cleaved Caspase-3 (Asp175) Antibody Cell Signaling Technology®,
Massachusetts, USA

LC3A/B (D3U4C) XP® Rabbit mAb Cell Signaling Technology®,
Massachusetts, USA

3.1.5 Chemikalien

Paraffin, Roti Plast® Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Ethanol Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Chloroquine diphosphate salt Sigma-Aldrich, Inc., Missouri, USA

Aceton Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

Neo Clear® Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

H₂O₂ Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

Meyer's Hematoxylin (Lillie's Modifikation) Dako, Glostrup, Dänemark

Milchpulver Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

3.1.6 Puffer und Lösungen

4% gepufferte Formalinlösung Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

TBS (Tris-Buffered Saline) Dako, Glostrup, Dänemark

HIER T-EDTA Buffer pH 9,0 ZYTOMED®SYSTEMS, Berlin, Deutschland

Citratpuffer (Target Retrieval solution) pH 6,0-6,2 Dako, Glostrup, Dänemark

| | |
|--|---|
| PBS (phosphate buffered saline) | Dako, Glostrup, Dänemark |
| Antibody Diluent with Background reducing components | Dako, Glostrup, Dänemark |
| TBST (Tris-Buffered Sialine with Tween 20) | Dako, Glostrup, Dänemark |
| BSA (Bovines Serum Albumin, Fraktion V) | Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland |

3.1.7 Konjugat

| | |
|---|--------------------------|
| REAL TM EnVision TM /HRP,Rabbit/Mouse (ENV) | Dako, Glostrup, Dänemark |
| Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/AP | Dako, Glostrup, Dänemark |
| Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunglobulins/AP | Dako, Glostrup, Dänemark |

3.1.8 Kits

| | |
|--|---------------------------------------|
| Vector®Nova Red Substrate kit for Peroxidase | Vector Laboratories, Kalifornien, USA |
| New Fuchsin Kit | ScyTek Laboratories, Utah, USA |
| Liquid Permanent Red | Dako, Glostrup, Dänemark |

3.1.9 Eindeckmedium

| | |
|---|-----------------------------------|
| Non-aqueous mounting medium Roti®-Mount | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
|---|-----------------------------------|

3.1.10 Software

| | |
|---|-----------------------------------|
| GraphPad PRISM TM Version 6.0 | GraphPad Software, San Diego, USA |
| IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0 | IBM Corp., Armonk, New York, USA |

3.2 Methoden

3.2.1 Gewebeentnahme und Aufbewahrung der Biopsien

Die Aufklärung der Eltern und Kinder fand am Vortag der Entnahme statt und beinhaltete das Ziel der Studie, den Ablauf der Entnahme und mögliche Risiken der omentalen Gewebeentnahme.

Es wurden gemäß der Standardprozedur der „International Pediatric Peritoneal Biopsy Study in Children“ (Abb. 3) bis zu drei omentale Gewebeproben mit der Zielgröße einer

Gewebsoberfläche von 1x1cm, mindestens jedoch 0,5x 0,5cm (Dicke nicht standardisierbar) entnommen. Bereits im OP-Saal wurde die Probe für die weitere Immunhistochemie in eine 4% formalin角度pufferte Lösung gegeben und bis zur weiteren Bearbeitung bei Raumtemperatur gelagert. Für weitere Analysen wurden ein Teil der Biopsien in flüssigen Stickstoff in ein transportables Stickstoffgefäß gegeben und nach dem Transport aus dem OP-Saal zur längerfristigen Aufbewahrung im Labor bei -80°C eingefroren. Ein anderer Teil wurde primär in 2,5ml RNAlater-zugesetzten Gefäßen für 24h-30d aufbewahrt und dann bei -20°C gelagert, s.a. Abbildung 3.

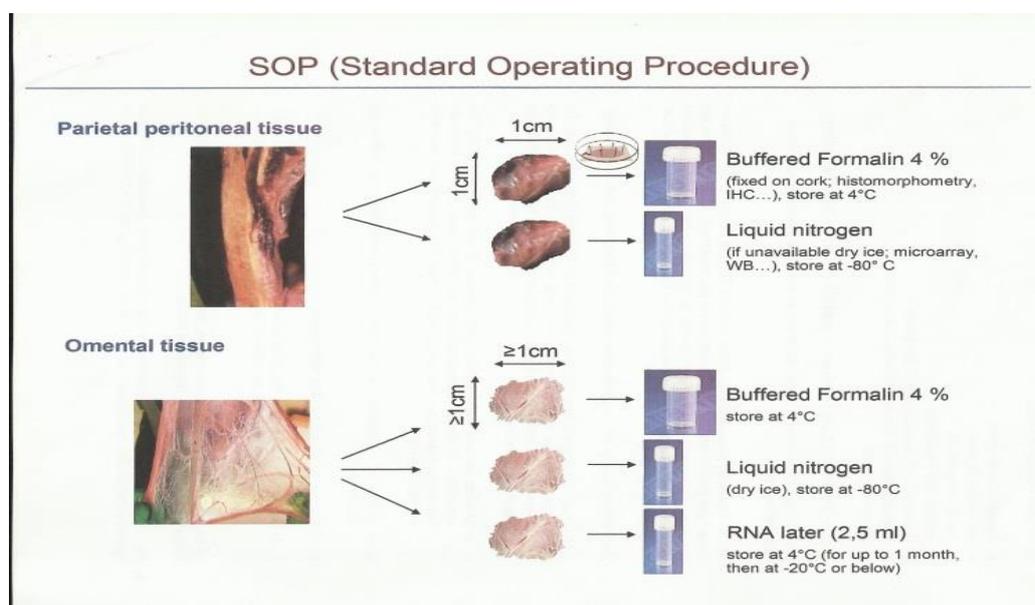


Abbildung 3: Schema der Gewebeentnahme (Peritoneum und Omentum) und der weiteren Aufbewahrung

3.2.2 Vorbereitung der Biopsien, Paraffineinbettung

Das Gewebe wurde aus der 4% gepufferten Formalinlösung für die Paraffineinbettung in Gewebekassetten platziert. Die weitere Verarbeitung erfolgte mittels eines Gewebeeinbettungsautomaten (Shandon Citadel 2000® von Thermo Fisher Scientific). Zunächst wurden die Proben zur Gewebeeinbettung durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert (40 Minuten H₂O, 1h30 70% Ethanol, 1h30 80% Ethanol, 1h30 95% Ethanol, 1h30 96% Ethanol, 2h 100% Ethanol, 45 Minuten 10% Aceton in 100% Ethanol). Anschließend wurde der Alkohol mit Neo-Clear® (Merck Millipore) als Xylol-Ersatz wieder entfernt (jeweils 2h Neo-Clear®). Die so vorbehandelten Gewebeproben wurden nun per Hand ausgegossen. Dazu wurde die

Gewebekassetten mit erwärmten flüssigen Paraffin (Roti Plast® von Roth, Schmelzpunkt 56°-58°C) vollständig gefüllt und die Proben bis zur Erhärtung bei 4°C gekühlt.

Es wurden Dünnschnitte der gekühlten Gewebeblöcke mit einer Schnittdicke von 3-8µm mit dem Mikrotom HM 325 (Rotationsmikrotom mit Blockkühlung, Scientific Microm™) angefertigt, diese in 45-50°C warmen Aqua dest.- Bad für 2 Minuten zur Glättung belassen und auf adhäsive Objektträger (R. Langenbrinck) aufgezogen.

3.2.3 Immunhistochemie

3.2.3.1 CD 31-Immunhistochemie

3.2.3.1.1 Vorbehandlung

Der Trocknungsprozess wurde durch Lagerung der Paraffin-Schnitte über Nacht im Ofen bei 60°C durchgeführt.

3.2.3.1.2 Entparaffinisierung und Rehydratasierung

Die Gewebeschnitte wurden nacheinander dreimal für jeweils 10 Minuten mit dem Xylol-Ersatz Neo-Clear® (Merck Millipore) und anschließend für 10 Minuten mit Aceton (Merck Millipore) behandelt. Daraufhin wurde für jeweils 1-2 Minuten eine absteigende Alkoholreihe verwendet (100% Ethanol → 95% → 80% → 70% → 50%). Abschließend wurden die Schnitte zweimal in Aqua dest. gespült.

3.2.3.1.3 Demaskierung

Die thermische Vorbehandlung zur hitzeinduzierten Epitopdemaskierung fand in einem T-EDTA Puffer mit einem pH-Wert von 9,0 („HIER T-EDTA Buffer pH 9,0“, ZYTOMED®SYSTEMS) im Dampfgerar statt. Dazu wurde eine gebrauchsfertige Arbeitslösung durch Verdünnung des T-EDTA Puffer-Konzentrats 1:10 mit Aqua dest. hergestellt und in eine Küvette gefüllt. Der Dampfgerar wurde nach Befüllung mit Aqua dest. 5 Minuten vorgeheizt und die Objektträger mit den Gewebeschnitten in die Küvette mit der Pufferlösung für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Küvette mit den Objektträgern in der Pufferlösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. Nach Abgießen der Arbeitslösung wurde eine Abkühlphase im Leitungswasserbad für 10 Minuten durchgeführt sowie die zweifache Spülung in Aqua dest.

3.2.3.1.4 Blockierung der endogenen Peroxidase

Die Inhibition der gewebeeigenen Peroxidase-Tätigkeit wurde durch Inkubation der Gewebeschnitte mit 3% H₂O₂ (Merck Millipore) (Arbeitslösung frisch angesetzt: 20 ml H₂O₂

und 180 ml Aqua dest.) für 10 Minuten durchgeführt. Daran schloss sich eine zweimalige Spülung in Aqua dest. sowie die zweimalige Spülung für jeweils 5 Minuten in TRIS- gepufferter Kochsalzlösung (TBS von Dako).

3.2.3.1.5 Primärantikörper

Der konzentrierte Primärantikörper, ein monoklonaler Maus-Antikörper („Dako Monoclonal Mouse Anti-Human CD 31(PECAM-1), Clone JC70A“) wurde in einer Verdünnung 1:20 mit einer Pufferlösung („Dako Antibody Diluent with Background Reducing component“) angesetzt. Die mitgeführten Negativkontrollen wurden im TBS-Puffer belassen. Die Gewebeschnitte wurden nun für 35 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Objektträger zweimal für jeweils 5 Minuten in TBS-Puffer gespült. Die nachfolgenden Schritte wurden nun wieder mit allen Gewebeschnitten inklusive Negativkontrollen durchgeführt.

3.2.3.1.6 Link mit Sekundärantikörper

Die Objektträger wurden mit „Dako REAL™EnVision™/HRP, Rabbit/Mouse (Env)“ bedeckt, einem peroxidasekonjugierten Polymer, an das sekundäre Antikörper (Kaninchen-/Maus-Immunglobuline) gekoppelt sind. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Dann wurden die Gewebeschnitte für 2-3 Minuten zur Reduktion der Hintergrundfärbung in TRIS-gepufferter Salzlösung mit Tween, pH 7,6 („Dako TBST Tris buffered sialine with Tween 20“), gespült sowie zweimal in TBS für jeweils 5 Minuten.

3.2.3.1.7 Entwicklung/Visualisierung

Das Substratchromogen Vector®NovaRED™ („Vector®NovaRED™ Substrate Kit for Peroxidase“, Vector Laboratories) wurde auf die Objektträger gebracht und die Gewebeschnitte bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach einer Entwicklungszeit von 25 Minuten erfolgte die zweimalige Spülung in Aqua dest., um überschüssiges Entwicklungssubstrat zu entfernen und den Reaktionsprozess zu beenden. Das entstandene Reaktionsprodukt stellte sich rot dar.

3.2.3.1.8 Zellkern-Gegenfärbung

Für die Gegenfärbung (nukleäre Blaufärbung) wurden die Objektträger für 10 Sekunden in einer Hämatoxylin-Lösung nach Meyer, pH 7,2-7,6 („Dako Mayer´s Hämatoxylin (Lillie´s Modification) Histological Staining Reagent“) gebracht. Nach der Färbung wurden die

Gewebeschnitte zweimal in Aqua dest. gespült und für 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut.

3.2.3.1.9 Eindecken

Vor Eindecken der Objektträger wurde die Gewebeschnitte mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (50% →70%→80%→95%→100% Ethanol) dehydriert. Dann wurden die Objektträger für 2 Minuten in Neo-Clear® gebracht, bevor sie mit Roti®-Mount Eindeckmedium („Roti®-Mount Xylol-und toluolfreies Eindeckmedium für die Mikroskopie“, Carl Roth) und einem Deckglas blasenfrei eingedeckt wurden.

3.2.3.2 Apoptose

Vorbehandlung, Entparaffinisierung und Rehydratasierung erfolgten analog der CD 31-Immunhistochemie (s. 3.2.3.1.1 und 3.2.3.1.2).

Für die Epitop-Demaskierung wurden die Objektträger in einem Citratpuffer pH 6,1 („Target Retrieval solution“, Dako) für 10 Minuten in einem Dampfgerat inkubiert, 15 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt und anschließend zweifach in Aqua dest. für jeweils 5 Minuten gespült.

Die Blockierung unspezifischer Bindungen wurde durch eine dreimalige Spülung in TBS für 5 Minuten eingeleitet. Nun wurden die Objektträger für 30 Minuten in eine Lösung, bestehend aus 2% Milchpulver gelöst in TBST (0,1%) („Tris buffered saline with Tween 20“, Dako), gebracht. Darauffolgend schloss sich eine zweimalige Spülung in TBST für 5 Minuten sowie eine 5 minütige Spülung in TBS an.

Der Primärantikörper, ein polyklonaler Caspase-3-Antikörper („Cleaved Caspase-3 (Asp175)“, Cell Signaling Technology®), wurde in einer Verdünnung 1:300 mit einer Pufferlösung („Antibody Diluent with Background Reducing component“, Dako) angesetzt, auf die Objektträger gebracht und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger dreimal in TBST gespült sowie 5 Minuten in TBS-Puffer.

Der Sekundärantikörper, ein polyklonales enzymkonjugiertes Anti-Kaninchen-Immunglobulin („Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunglobulins/AP“, Dako), wurde 1:40 mit der Pufferlösung („Antibody Diluent with Background Reducing component“, Dako) angesetzt. Nach Benetzung der Gewebeschnitte mit dem Sekundärantikörper wurden diese für 30 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert. Abgeschlossen wurde dieser Schritt durch zweimalige Spülung der Gewebeschnitte in TBS für 5 Minuten.

Zur Visualisierung wurden die Objektträger mit dem nach Herstellerangaben frisch angesetzten permanenten roten Substrat-Chromogen-System („Liquid Permanent Red“, Dako) bedeckt und für 10-20 Minuten inkubiert. Dieser Prozess wurde durch Spülung in Aqua dest. beendet.

Die Zellkern-Gegenfärbung (s. 3.2.3.1.8) und das Eindecken der Objektträger erfolgte entsprechend der CD 31-Immunhistochemie (s.3.2.3.1.9).

Als Positiv-Kontrolle wurden aortale Gewebeschnitte von 5/6 nephrektomierten und mit Calcium behandelten Ratten aus einer früheren Versuchsreihe der eigenen Arbeitsgruppe (Hecht *et al.*, 2016) genutzt.

3.2.3.3 Autophagie

Vorbehandlung, Entparaffinisierung und Rehydratasierung wurden entsprechend der Schritte bei der CD 31-Immunhistochemie (s. 3.2.3.1.1 und 3.2.3.1.2) durchgeführt.

Die Epitop-Demaskierung erfolgte durch Inkubation der Objektträger in einem Citratpuffer pH 6,1 („Target Retrieval solution“, Dako) für 15 Minuten in einem Dampfgerät. Die 30 minütige Abkühlphase teilte sich in eine 15 minütige Abkühlung bei Raumtemperatur, sowie einer 15 minütigen Phase in einem Wasserbad. Anschließend erfolgte eine Spülung der Objektträger für 5 Minuten in Aqua dest.

Die Blockierung der endogenen Peroxidase-Tätigkeit wurde mit frisch angesetzter 3%-igen H₂O₂-Lösung (s. 3.2.3.1.4) durchgeführt. Nach Spülung für 5 Minuten in Aqua dest., wurden die Gewebeschnitte zweimal in TBS sowie einmal in TBST für jeweils 5 Minuten gespült.

Unspezifische Proteinbindungsstellen wurden durch 30 minütige Inkubation der Objektträger in 2% BSA (Lösung: „Bovines Serum Albumin“, Merck Millipore gelöst in TBST, Dako) bei Raumtemperatur gesättigt, um eine Reduktion der Hintergrundfärbung zu erreichen.

Der primäre Antikörper, ein monoklonaler Antikörper gegen die Leichtketten Isoformen 3A und 3B („LC3A/B (D3U4C) XP® Rabbit mAb“, Cell Signaling Technology®), einer Untereinheit des Mikrotubulus-assoziierten Proteins 1A und 1B, wurde in einer Verdünnung 1:1000 angesetzt und die Gewebeschnitte nach Benetzung mit dem Antikörper bei 4°C über Nacht inkubiert. Der sekundäre Antikörper, ein polyklonales enzymkonjugiertes Anti-Kaninchen-Immunglobulin („Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunglobulins/AP“, Dako), wurde in einer Verdünnung von 1:100 angesetzt und die Gewebeschnitte hiermit für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer

feuchten Kammer inkubiert. Nun folgte eine jeweils 5 minütige Spülung, einmal in TBST sowie zweimal in TBS.

Die Visualisierung mit Substratchromogen Vector®NovaRED™ („Vector®NovaRED™ Substrate Kit for Peroxidase“, Vector Laboratories) (s. 3.2.3.1.7) wurde nach einer Entwicklungszeit von 5-15 Minuten beendet. Die Zellkerngegenfärbung (s. 3.2.3.1.8) und das Eindecken der Objektträger (s. 3.2.3.1.9) erfolgten entsprechend dem bei der CD 31-Immunhistochemie beschriebenen Vorgehen.

Als Positiv-Kontrolle wurden Paraffinschnitte von HeLa (human epithelial carcinoma cell line)-Zellen genutzt, die laut Herstellerempfehlung mit 50µM Chloroquin („Chloroquine diphosphate salt“, Sigma-Aldrich, Inc.) über Nacht vorbehandelt wurden.

3.2.3.4 VEGF-R-II Immunhistochemie

3.2.3.4.1 Intrazellulärer Anteil des VEGF-Rezeptor-2: VEG Fr-2 (Flk-1)

Die Vorbehandlung, Entparaffinisierung und Rehydratisierung erfolgte auch hier wie bei der CD 31-Immunhistochemie beschrieben (s. 3.2.3.1.1 und 3.2.3.1.2).

Bei dem nun folgenden Schritt der Demaskierung wurden, abweichend zur CD 31-Immunhistochemie, die Objektträger in einen Citratpuffer pH 6,0 („Target Retrieval solution“, Dako) für 10 Minuten in einem Dampfgerät inkubiert. Es folgte eine Abkühlphase für 20 Minuten bei Raumtemperatur sowie die zweimalige Spülung der Objektträger in Aqua dest.

Die Blockierung der endogenen Peroxidase wurde entsprechend der CD 31-Immunhistochemie mit 3% H₂O₂ durchgeführt (s. 3.2.3.1.4).

Der konzentrierte Primärantikörper „Rabbit anti-VEGFR-2(Flk-1,KDR)“ (Zytomed Systems), ein polyklonaler Kaninchen Antikörper gegen den C-Terminus des humanen Flk-1/KDR/VEGF-Rezeptor 2, wurde mit einer Pufferlösung („Dako Antibody Diluent with Background Reducing component“) im Verhältnis 1:60 angesetzt und die Gewebeschnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Die mitgeführten Negativkontrollen wurden im TBS-Puffer belassen. Anschließend wurden die Gewebeschnitte dreimal in TBS-Puffer gespült. Die nachfolgenden Schritte wurden nun wieder mit allen Gewebeschnitten inklusive Negativkontrollen durchgeführt.

Als Konjugat wurde „Dako Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/AP“ verwendet, ein alkalischer Phosphatase-konjugierter sekundärer Antikörper, in einer Verdünnung 1:100. Nach

Benetzung der Gewebeschnitte mit dem Konjugat wurden diese für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend dreimal in TBS gespült.

Die Visualisierung erfolgte durch Inkubation der Gewebeschnitte mit dem Substratchromogen Vector®NovaRED™ (‘‘Vector®NovaRED™ Substrate Kit for Peroxidase‘‘, Vector Laboratories) für 10-20 Minuten in einer feuchten Kammer und wurde durch zweimalige Spülung in Aqua dest. beendet. Das entstandene Reaktionsprodukt stellte sich rot dar.

Die Zellkernfärbung wurde entsprechend der CD 31-Immunhistochemie (s. 3.2.3.1.8) mit Hämatoxylin-Lösung nach Meyer, pH 7,2-7,6 (‘‘Dako Mayer’s Hematoxylin (Lillie’s Modification) Histological Staining Reagent‘‘) für 30 Sekunden durchgeführt mit nachfolgender Bläuung der Zellkerne durch ein fünfminütiges Leitungswasserbad.

Abschließend wurden die Gewebeschnitte mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Roti®-Mount Eindeckmedium (‘‘Roti®-Mount Xylo- und toluolfreies Eindeckmedium für die Mikroskopie‘‘, Carl Roth) und einem Deckglas blasenfrei eingedeckt (s. 3.2.3.1.9).

3.2.3.4.2 Extrazellulärer Anteil des VEGF-Rezeptor-2: Anti-KDR/VEGF-R-II Immunhistochemie (LS-C122532)

Nach Trocknung der Gewebeschnitte über Nacht im Ofen bei 60°C wurde zur Entparaffinisierung und Rehydratasierung der Gewebeschnitte die Objektträger dreimal für 5 Minuten in Neo-Clear®, für 15 Minuten in Aceton und nachfolgend in eine absteigenden Alkohol-Reihe (100% Ethanol→95%→80%→70%→50%) gebracht. Nun wurden die Gewebeschnitte zweimal für 5 Minuten in Aqua dest. gespült.

Die hitzeinduzierte Demaskierung wurde durch eine zehnminütige Inkubation der Objektträger in einem Citratpuffer (‘‘Dako Target Retrieval solution‘‘) pH 6,1 im Dampfgerar durchgeführt. Es schloss sich eine Abkühlphase bei Raumtemperatur von 20 Minuten, eine Spülung der Objektträger für 5 Minuten in Aqua dest. sowie die dreimalige Spülung in TBS und einmal in TRIS-gepufferter Salzlösung mit Tween, pH 7,6 (Dako) an.

Zur Reduktion der Hintergrundfärbungen durch Sättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen wurden die Objektträger bei Raumtemperatur für 30 Minuten in 2% BSA (Lösung: ‘‘Bovines Serum Albumin‘‘, Merck Millipore gelöst in TBS, Dako) gebracht. Es folgte die einmalige Spülung mit TBS für 5 Minuten.

Der primäre Antikörper „Anti-KDR/VEGFR2 Antibody (Extracellular Domain LS-C122532)“ (LifeSpan BioSciences, Inc.), ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen die extrazelluläre humane VEGF-Rezeptor-II Domäne, wurde in einer Verdünnung 1:100 mit der Pufferlösung („Dako Antibody Diluent with Background Reducing component“) angesetzt. Die Gewebeschnitte wurden bei 4°C über Nacht mit dem Antikörper inkubiert.

Nach erfolgter Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Objektträger für 15 Minuten bei Raumtemperatur erwärmt, bevor sie dreimal in TBS sowie einmal in TBST für jeweils 5 Minuten gespült wurden. Nun wurde der Sekundärantikörper „Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/AP“ (Dako) in einer Verdünnung 1:50 angesetzt und die Gewebeschnitte mit diesem für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die dreimalige Spülung in TBS sowie einmal in TBST für jeweils 5 Minuten.

Zur Visualisierung der gebundenen Antikörper wurden die Gewebeschnitte für 10-25 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Chromogen „New Fuchsin Kit“ (ScyTek Laboratories) inkubiert. Durch nachfolgende Spülung der Objektträger in TBS stellte sich das Chromogen intensiv rot dar. Der Färbeprozess wurde durch Spülung der Gewebeschnitte in Aqua dest. beendet.

Die Zellkernfärbung wurde wie oben (s. 3.2.3.1.8) mit Hämatoxylin-Lösung nach Meyer, pH 7,2-7,6 für 40 Sekunden durchgeführt.

Nach Bläuung der Zellkerne durch ein fünfminütiges Leitungswasserbad wurden die Gewebeschnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit Roti®-Mount Eindeckmedium („Roti®-Mount Xylol- und toluolfreies Eindeckmedium für die Mikroskopie“, Carl Roth) und einem Deckglas blasenfrei eingedeckt (s. 3.2.3.1.9).

3.2.3.5 Ergänzende immunhistochemische Untersuchungen

Durch die kooperierende Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. C. P. Schmitt (Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Heidelberg) wurden im Rahmen einer gemeinsamen Publikation zu diesem Thema (Burkhardt *et al.*, 2016) ergänzende immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt und die Ergebnisse zur Verfügung gestellt. Zur Vollständigkeit der eigenen Arbeit werden diese Untersuchungen nun im Folgenden erwähnt.

3.2.3.5.1 Podoplanin, VEGF-A, Angiopoietin 1 und 2

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden nach den üblichen Standardmethoden an Formalin-fixierten Gewebeschnitten entsprechend den Herstellerempfehlungen durchgeführt.

Dies beinhaltete eine Entparaffinisierung und Rehydratasierung sowie eine Blockierung der endogenen Peroxidase in 3%-H₂O₂ und eine Hitze-induzierte Antigen-Demaskierung in einem Dampfdrucktopf unter Verwendung eines Citratpuffers ("Target Retrieval Buffer", Dako). Zur Darstellung der Lymphgefäße wurde der monoklonale Antikörper Podoplanin D2-40 ("Monoclonal Mouse Anti-Human Podoplanin Clone D2-40", Dako, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:50 verwendet. Die immunhistochemische Analyse von VEGF-A erfolgte mit einem polyklonalen Antikörper (Abcam, Cambridge, UK) in einer Verdünnung 1:1000, Angiopoietin 1 mit einem polyklonalen Antikörper (Sigma Aldrich, Missouri, USA) in einer Verdünnung 1:50 und Angiopoietin 2 mit einem polyklonalen Antikörper (Thermo Fisher, Rockford, USA) in einer Verdünnung 1:200. Die Gewebeschnitte wurden für jeweils eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper inkubiert. Nach Verwendung des Immunoperoxidase System ABC Reagenz ("VECTASTAIN® ABC KIT", Vector Laboratories, Kalifornien, USA) wurden die Gewebeschnitte mit einem biotinylierten Sekundärantikörper (Vector Laboratories) für 30 Minuten inkubiert. Zur Darstellung wurde 3,3'-Diaminobenzidin-tetra-hydrochlorid (DAB) gewählt. Die Zellkernfärbung wurde mit Hämatoxylin-Eosin (HE) durchgeführt. Als Negativ-Kontrollen wurden Gewebeschnitte ohne Applikation des Primärantikörpers mitgeführt.

3.2.4 Auswertung der CD 31-Immunhistochemie

3.2.4.1 Aufnahme der Bilder

Die Quantifizierung der Kapillaren in den Gewebeschnitten erfolgte mit Hilfe des Digitalmikroskops BZ-9000 und Analyzer Software®-II (Keyence). In einem ersten Schritt wurde die Gewebeschnitte auf eine homogene Farbdarstellung der CD 31-markierten Gefäße überprüft. Die so selektionierten Schnitte wurden nach erfolgtem Weißabgleich der Kamera mit einem Objektiv mit 4facher Vergrößerung im Farbbildmodus bei einer Belichtungszeit von 1/350s aufgenommen ("Auto Range Photo"). Durch Benutzung der Z-Synchronisierungsfunktion ("z-sync") konnten Unterschiede der Gewebedicke automatisch korrigiert werden, indem die zugehörige Z-Achsen Position gespeichert wurde und der betreffende Ausschnitt voll fokussiert blieb. Für die Analyse der Schnitte wurde ein hochauflösendes Gesamtbild des omentalen Gewebes mittels der Bildzusammensetzungsfunktion ("Merge") erzeugt. Dafür wurden bis zu 9 Positionen markiert, innerhalb derer Grenzen sich das Gesamtgewebe befand. Um ungleichmäßige Kontraste der Teilbilder zu vermeiden, wurde die

Schattenentfernungsfunktion (“using image for correction”) benutzt. Aus bis zu maximal 1200 Teilbildern wurde so das Gesamtbild für die weitere Analyse zusammengesetzt.

3.2.4.2 Festlegung des Gesamtgewebes

Das Bild wurde mit der „Hybrid-Zell-Zähl“ (“Hybrid Cell Count“) - Funktion analysiert. Der erste Schritt bestand in der Festlegung des zu untersuchenden Gesamtgewebes (“Single Extraction“) über die Extraktion unterschiedlicher Helligkeitsbereiche (“Brightness“). Das omentale Gewebe, das durch die Hämatoxylin-Färbung eine bläuliche Färbung angenommen hatte, konnte auf diese Weise bestimmt werden. Als Helligkeitsschwelle wurde ein Bereich von 150-169 eingestellt. Unter der Option „Einstellung des extrahierten Gewebes“ (“Adjust Extracted Area“) wurde mit Hilfe verschiedener Korrekturoptionen (“Remove Unwanted Areas”, “Fine Edit”, “Select On Image”) die vorher ausgewählte Fläche optimiert, indem Artefakte entfernt sowie Gewebelücken aufgefüllt wurden (“Fill Cracks”).

3.2.4.3 Festlegung der CD 31 markierten Kapillaren

Zur Bestimmung der CD 31 markierten Fläche wurde die Option Farbextraktion (“Hue”) gewählt. Dann wurden in einem vergrößerten Bild (“Zoom”) bis zu 20 Farbwerte in unterschiedlichen Bereichen des Gewebeschnittes markiert (“Add Area”), die in die weitere Analyse einbezogen werden sollten. Dies ermöglichte die weitgehend vollständige Erfassung der rötlich angefärbten Bereiche, die durch die CD 31-Immunhistochemie detektiert worden waren. Unter der Option „Einstellung des Gewebes“ (“Adjust Extracted Area”) wurden Artefakte ausgeschlossen (“Remove Unwanted Areas”) und Farblücken aufgefüllt (“Fill Cracks”). Da der CD 31-Antikörper Endothelzellen bzw. Gefäße jeder Größe detektiert, wurden die markierten Bereiche hinsichtlich Gefäßgröße und Wandaufbau kontrolliert. Gefäße, die aufgrund ihrer Morphologie klar als Arterie, Vene oder Arteriole identifiziert werden konnten, wurden von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Um Unterschiede in der Auswahl der Gefäße zu minimieren, wurden in einem ersten Durchgang alle Gewebeschnitte durch den gleichen Untersucher analysiert. Pro Patient wurden nach oben genannten Analyseverfahren jeweils drei Schnitte ausgewertet (165 Gewebeschnitte) und, zur Reduktion zufälliger Messfehler, der arithmetische Mittelwert pro Patient gebildet.

Zur Bestimmung der Intraobserver Variabilität wurden in einem zweiten Durchgang 18 Gewebeschnitte (10,9% der gesamten ausgewerteten Schnitte) noch einmal verblindet, nach dem gleichen Schema ausgewertet, sowie, zur Bestimmung der Interobserver Variabilität, ebenfalls verblindet, von einem zweiten Untersucher analysiert.

Die gemessenen Ergebnisse beinhalteten die Fläche des Gesamtgewebes, die Kapillarfläche, sowie den prozentualen Anteil der CD 31 markierten Kapillarfläche am Gesamtgewebe.

Zur Prüfung der Validität der oben genannten Messmethode wurde die Kapillardichte zusätzlich mit einer vollautomatisierten Messmethode durch eine kooperierende Arbeitsgruppe (Prof. Dr. med. C. P. Schmitt, Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Heidelberg) quantitativ bestimmt. Dafür wurde an einer Stichprobe von 30 Gewebeschnitten, davon 13 Kontrollen und 17 niereninsuffiziente Kinder, die Kapillardichte, d.h. die kapilläre endotheliale Fläche bezogen auf die Gesamtfläche, mit „Aperio Precision Image Analysis Software (Aperio® Technologies, Inc. Vista, CA, USA) bestimmt und die Ergebnisse beider Analyseverfahren miteinander verglichen.

3.2.5 Auswertung der Apoptose- und Autophagie-Immunhistochemie

Die Analyse der Apoptose (Caspase-3)- und Autophagie (LC3A/B) -Immunhistochemie erfolgte nach dem oben beschriebenen Vorgehen der CD 31-Auswertung (s. 3.2.4). Für die immunhistochemische Darstellung der Autophagie und Apoptose wurden jeweils Gewebeschnitte von 20 Kindern ausgewählt, altersgematcht 10 aus jeder Gruppe (niereninsuffizient vs. nierengesund).

3.2.6 Auswertung der VEGF-Rezeptor 2-Immunhistochemie

Die quantitative Auswertung der VEGF-Rezeptor-2-Dichte erfolgte analog zur CD 31-Auswertung mit Hilfe des Digitalmikroskops BZ-9000 und Analyzer Software®-II (Keyence). Die einzelnen Schritte setzten sich, wie oben beschrieben, aus folgenden Einzelschritten zusammen: 1. Aufnahme des Bildes, 2. Festlegung des Gesamtgewebes, 3. Festlegung der immunhistochemisch markierten VEGF-R-2-Fläche und Berechnung der prozentualen VEGF-R-2-Dichte bezogen auf die Gesamtfläche. Nach diesem Schema wurden insgesamt 20 Gewebeschnitte aus beiden Gruppen ausgewertet, indem 10 etwa gleichaltrige Studienteilnehmer aus der Gruppe der nierengesunden Kontrollen und 10 aus der Gruppe niereninsuffizienter Patienten miteinander verglichen wurden. Hierbei wurde auch auf eine ausgeglichene und homogene Auswahl der Altersklassen aus beiden Gruppen geachtet.

3.2.7 Auswertung der ergänzenden immunhistochemischen Untersuchungen (VEGF-A, Podoplanin, Angiopoietin 1 und 2)

Die quantitative Analyse der ergänzenden immunhistochemischen Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. C. P. Schmitt (Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin,

Universitätsklinikum Heidelberg) wurde mit „Aperio Image Analysis Software (Aperio® Technologies, Inc., Vista, Kalifornien, USA) und der Bildbetrachtungssoftware „Image Scope“ Version 11 (Image Scope, v11.2.0.780, Aperio® Technologies, Inc., Vista, Kalifornien, USA) durchgeführt. Hierfür wurde der Anteil der positiven Pixel pro eingescanntem Objektträger quantifiziert, nachdem die immunhistochemischen Färbungen mit dem Algorithmus „Aperio Positive Pixel Count Algorithm“ (Version 9) evaluiert worden waren. Dafür wurde für jede spezifische immunhistochemische Färbung der Intensitätsbereich für schwache, mittlere und starke Signale validiert, ebenso wie der Bereich für negative Pixel. Die Ergebnisse wurden als Verhältnis der positiven Pixel bezogen auf die Gesamtzahl an Pixel dargestellt und als Positivität bzw. Positiv-Ratio bezeichnet. Die nach diesem Algorithmus ausgewerteten Gewebeschnitte umfassten für die VEGF-A Immunhistochemie 31 Kinder der in dieser Arbeit untersuchten Stichprobe (11 Kontrollen und 20 urämische Patienten), für Podoplanin 13 Kinder (3 Kontrollen und 10 urämische Patienten), 15 Kinder für Angiopoetin 1 (6 Kontrollen und 9 urämische Patienten) und für die Angiopoetin 2 Immunhistochemie 16 Kinder (6 Kontrollen und 10 urämische Patienten).

3.2.8 Statistik

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe der GraphPad PRISM™ (Version 6.0) Software und IBM® SPSS® Statistics for Windows (Version 23.0) durchgeführt. Aufgrund der Gruppengröße wurden nicht-parametrische zweiseitige Testverfahren benutzt, da nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte.

Als statistisch signifikant wurden Testergebnisse gewertet, bei denen bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 5\%$ der p-Wert $< 0,05$ war.

Zur Untersuchung von Unterschieden in der Kapillardichte, VEGF-Rezeptor 2-Dichte und Unterschieden hinsichtlich der anthropometrischen Daten zwischen den urämischen und nierengesunden Kindern (Kontrollen) wurde der nicht-parametrische Test für unverbundene Stichproben, U-Test nach Mann und Whitney, verwendet, der die Verteilung von Rängen zwischen zwei Gruppen untersucht. Zusätzlich wurde die VEGF-Rezeptor 2/CD 31-Ratio für den intra- und extrazellulären Anteil des VEGF-Rezeptors 2 bestimmt und mit Hilfe des U-Testes nach Mann und Whitney auf Unterschiede zwischen den urämischen Kindern und der Kontrollgruppe hin untersucht. Zusammenhänge der patientenspezifischen Parameter mit der

Kapillardichte wurden mit einer Korrelationsanalyse nach Spearman, einem Rangkorrelationskoeffizient r , der weder eine Normalverteilung noch eine lineare Beziehung voraussetzt, analysiert. Konfidenzintervalle für den Korrelationskoeffizienten nach Spearman wurden bei einer Stichprobengröße $n > 10$ angegeben (Weiß, 2013). Zudem wurden Zusammenhänge der einzelnen Parameter mit der Kapillardichte durch ein lineares Regressionsmodell betrachtet. Für Parameter, die eine signifikante Korrelation mit der Kapillardichte zeigten, wurde zusätzlich in einem multiplen linearen Regressionsmodell die Vorhersagekraft dieser Prädiktoren auf die Kapillardichte analysiert. Hierfür wurde ein rückwärts gerichtetes lineares Regressionsmodell verwendet. Hierbei wird nach Einschluss der Prädiktoren sequenziell die unabhängige Variable ausgeschlossen, die die kleinste Teilkorrelation mit der abhängigen Variablen hat und somit die geringste Vorhersagekraft für die abhängige Variable. Dieser Vorgang wird abgebrochen, sobald der Ausschluss einer unabhängigen Variable (Prädiktor) zu einer signifikanten Änderung der erklärten Varianz führen würde (Wahrscheinlichkeit von F-Wert für Ausschluss $\geq 0,100$).

Die Variabilität der Untersuchungsergebnisse zwischen zwei Untersuchern (Interobserver Variabilität) sowie eines Untersuchers zu zwei Zeitpunkten (Intraobserver Variabilität) wurde mit Hilfe der Bland-Altman Methode (Bland & Altman, 1986) überprüft. Bei dieser Methode wird die Differenz der beiden Messungen gegen den Mittelwert beider Messungen aufgetragen. Dabei gilt der Mittelwert der beiden Messungen als beste Annäherung an den unbekanntem „wahren“ Wert. Es stellt damit eine graphische Methode dar, die durchschnittliche Übereinstimmung sowie die Streuung der einzelnen Messwertdifferenzen abzubilden und so eine Aussage über quantitative Unterschiede zweier Messungen bzw. den Grad ihrer Übereinstimmung zu liefern. Zusätzlich wurde für die Bestimmung der Intra- und Interobserver Variabilität das prozentuale Mittel der Differenz beider Messdurchgänge nach folgender Formel errechnet: $\frac{1.Messung - 2.Messung}{1.Messung} \times 100$, sowie in einer Korrelationsanalyse nach Spearman und einem linearen Regressionsmodell miteinander verglichen.

Der Methodenvergleich der eigenen Auswertungsmethode mit der vollautomatisierten Bildanalyse durch eine kooperierende Arbeitsgruppe (BioQuant, Heidelberg) erfolgte mit Hilfe der Bland-Altman Methode (Bland & Altman, 1986), s.o.

3.2.8.1 Graphische Darstellung

Die graphische Darstellung der Gruppenunterschiede zwischen den Kontrollen und den nierengesunden Kindern, die wie oben beschrieben mit Hilfe des U-Tests nach Mann und

Whitney untersucht wurden, erfolgte als Box-and-Whiskers-Plot. In dieser Darstellung umfasst die Box die 25.-75. Perzentile und der Median ist als Linie in der Mitte der Box gezeigt. Die Antenne (whiskers) reicht von den geringsten bis zu den höchsten Werten (Min-to-Max-Einstellung). Zur besseren Vergleichbarkeit wurden diese Einstellungen bei allen Box-and-Whiskers-Plots gewählt.

4 Ergebnisse

4.1 Übersicht über die Studienpopulation

Nierengesunde Kinder wurden in der Klinik der Kinderchirurgie und der Klinik der Kinderurologie der Charité-Campus Virchow Klinikum sowie in der Klinik für Kinderchirurgie und Urologie des Universitätsklinikums Heidelberg in dem Zeitraum vom 29.09.2012-28.05.2013 rekrutiert. Es konnten insgesamt 41 nierengesunde Kinder mit elektiver abdomineller Operation eingeschlossen werden. Davon stammten 27 aus der Klinik der Kinderchirurgie und der Klinik der Kinderurologie der Charité-Campus Virchow Klinikum und 15 Kinder aus der Klinik für Kinderchirurgie und Urologie des Universitätsklinikums Heidelberg. Nach erneuter Prüfung bezüglich der Ausschlusskriterien (s.o.) mussten 9 Kinder ausgeschlossen werden. Die häufigste Ausschlussursache waren maligne Neoplasien in der Anamnese (7/9). Eine Übersicht gibt Abbildung 4.



Ausschlussursache (Anzahl):

- Nephroblastom (n= 3)
- Maligner Keimzelltumor (n=1)
- Hyperinsulinismus (n=1)
- Neuroblastom (n=2)
- Intraabominelles kavernoöses Lymphangiom (n=1)
- Retroperitonealer Tumor (n=1)

Abbildung 4: Selektion der gesunden Kontrollen

Zu den 32 nierengesunden Kindern wurden 24 gleichaltrige Kinder aus der Biobank der Internationalen Peritonealbiopsie Studie mit terminaler Niereninsuffizienz selektiert. Ein Patient musste aufgrund einer Vorbehandlung mit Kortikosteroiden und einem Zytostatikum aus der weiteren Analyse ausgenommen werden, so dass insgesamt 23 omentale Proben urämischer Patienten zur weiteren Untersuchung zur Verfügung standen (s. Abbildung 5).



Abbildung 5: Selektion der niereninsuffizienten Kinder

Knapp 40% (9/23) der urämischen Patienten stammte aus Deutschland (Heidelberg). Zweithäufigstes Ursprungsland war mit 17% (4/23) Spanien (Barcelona), gefolgt von Litauen (Vilnius), Ungarn (Budapest), Italien (Mailand und Genua) und Frankreich (Lyon), aus denen jeweils 7% (2/23) der niereninsuffizienten Kinder stammten. Aus den USA (Kansas City) und der Türkei (Adana) wurde jeweils ein Patient aus der Biobank selektioniert. Insgesamt war der überwiegende Anteil der urämischen Patienten mit 65% (15/23) kaukasischer Abstammung. 22% (5/23) der Patienten waren arabischer Volkszugehörigkeit und bei 13% (3/23) fehlten Angaben zur Ethnizität.

In Tabelle 2 ist eine Übersicht der untersuchten Kinder bezüglich ihres Geschlechts, Alters und der anthropometrischen Daten dargestellt.

Ergebnisse

Tabelle 2: Übersicht über die Studienpopulation. Die prozentuale Häufigkeitsverteilung wurde für die Variablen Stichprobe, Geschlecht und Alter angegeben (%).

| | Gesamt | Nierengesunde Kinder (Kontrollen) | Niereninsuffiziente Kinder | p-Wert |
|---|-------------------|--|---------------------------------------|---------------|
| Anzahl der untersuchten Kinder | 55 | 32 (58%) Berlin: 19 (60%) Heidelberg: 13 (41%) | 23 (42%) | |
| Geschlecht | | | | |
| männlich | 30 (55%) | 14 (44%) | 16 (70%) | p = 0,0987 |
| weiblich | 25 (45%) | 18 (56%) | 7 (30%) | |
| Alter (Jahre) | | | | |
| 0-2 | 19 (35%) | 13 (41%) | 6 (26%) | p = 0,4953 |
| 3-6 | 11 (20%) | 6 (19%) | 5 (22%) | |
| 7-12 | 15 (27%) | 8 (25%) | 7 (30%) | |
| 13-18 | 10 (18%) | 5 (16%) | 5 (22%) | |
| Median | 5,2 | 4,37 ^{ns} | 7 ^{ns} | |
| Mittelwert Alter (±SD) | 6,7 (±5,7) | 6,2 (±5,7) | 7,3 (±5,7) | |
| Gewicht (kg) | | | | |
| Min | 2,35 | 3 | 2,35 | p = 0,6579 |
| Max | 92 | 92 | 53 | |
| Median | 17,3 | 15 ^{ns} | 22 ^{ns} | |
| Mittelwert Gewicht (±SD) | 22,37 (±18,61) | 22,5 (±20,77) | 22,03 (±14,41) | |
| Größe (cm) | | | | |
| Min | 50,5 | 52 | 50,5 | p = 0,5263 |
| Max | 171 | 171 | 170 | |
| Median | 102,5 | 95 ^{ns} | 108 ^{ns} | |
| Mittelwert Größe (±SD) | 104,9 (±35,78) | 102,5 (±37,15) | 108,6 (±34,35) | |
| BMI | | | | |
| Min | 11,07 | 11,07 | 13,7 | p = 0,8217 |
| Max | 31,46 | 31,46 | 20,4 | |
| Median | 16,67 | 16,65 ^{ns} | 17,1 ^{ns} | |
| Mittelwert BMI (±SD) | 17,31 (±3,95) | 17,61 (±5,12) | 16,94 (±1,86) | |

| | Gesamt | Nierengesunde Kinder (Kontrollen) | Niereninsuffiziente Kinder | p-Wert |
|-----------------------------|------------------|--|---------------------------------------|---------------|
| BMI-SDS | | | | |
| Min | -4,41 | -4,41 | -1,78 | p = 0,9301 |
| Max | 2,58 | 2,58 | 1,70 | |
| Median | -0,34 | -0,34 ^{ns} | -0,34 ^{ns} | |
| Mittelwert BMI-SDS (±SD) | -0,28 (±1,41) | -0,27 (±1,68) | -0,27 (±1,06) | |
| BSA (m²) | | | | |
| Min | 0,18 | 0,21 | 0,18 | p = 0,5508 |
| Max | 2,09 | 2,09 | 1,58 | |
| Median | 0,69 | 0,62 ^{ns} | 0,82 ^{ns} | |
| Mittelwert BSA (±SD) | 0,78 (±0,46) | 0,77 (±0,51) | 0,8 (±0,4) | |

^{ns} Mann Whitney Test: Kontrollgruppe vs. niereninsuffiziente Kinder p>0,05

Wie in Tabelle 2 zu sehen ist, bestand insgesamt ein ausgewogenes Geschlechterverhältnis. In der Gruppe der urämischen Kinder war der Anteil der Jungen mit knapp 70% jedoch deutlich führend. Die Altersverteilung zwischen den Kontrollen und den niereninsuffizienten Kindern war bis auf die Altersgruppe der 0-2-jährigen homogen. Diese war bei den nierengesunden Kindern mit 41% am stärksten vertreten. Da in dem Entnahmezeitraum die Anzahl der Kinder zwischen 0-2 Jahren in der Biobank nur begrenzt vertreten waren, konnten zu den 13 Kontrollen dieser Altersgruppe nur 6 niereninsuffiziente Kinder rekrutiert werden. Hieraus leitet sich auch die Differenz in der Anzahl der urämischen und nierengesunden Kontrollen ab (23 vs. 32 Kinder). Das durchschnittliche Alter (Mittelwert) lag bei den nierengesunden Kontrollen bei 6,2 (±5,7), bei den niereninsuffizienten bei 7,3 (±5,7) und in der gesamten untersuchten Population im Durchschnitt bei 6,7 (±5,7). Hinsichtlich der anthropometrischen Daten zeigten sich in keinem der Parameter statistisch signifikante Unterschiede zwischen den niereninsuffizienten Kindern und der Kontrollgruppe (p>0,05). Ein Trend war nur in Bezug auf die BMI-Mittelwerte zwischen den beiden Gruppen zu erkennen, mit einem höheren BMI bei den nierengesunden Kindern (Mittelwert): Kontrollgruppe 17,61 (±5,12) vs. 16,94 (±1,87) in der CKD-Gruppe, erreichte aber keine statistische Signifikanz. Jedoch zeigte sich bei dem alters- und geschlechtsbezogenem Body-Mass-Index Standardabweichungs-Score (BMI-SDS) kein

Unterschied zwischen den Gruppen (Mittelwert (Mean): Kontrollgruppe -0,27 ($\pm 1,68$) vs. -0,27 ($\pm 1,06$) CKD-Gruppe).

4.1.1 Erkrankungsspektrum der niereninsuffizienten Kinder

Tabelle 3 zeigt die zugrundeliegenden Erkrankungen der chronischen Niereninsuffizienz. An erster Stelle mit fast 90 % liegen die angeborenen Erkrankungen und hierunter vor allem die Obstruktionen der ableitenden Harnwege sowie Nierenfehlbildungen.

Tabelle 3: Grunderkrankungen der niereninsuffizienten Kinder

| Diagnosen | Anzahl (n) | Prozentualer Anteil (%) |
|--|---|--|
| Angeborene Erkrankungen | 20 | 87 |
| <ul style="list-style-type: none"> • Obstruktive Uropathie <ul style="list-style-type: none"> ▪ Urethralklappen • Nierenhypoplasie/Nierendysplasie • Syndromale Erkrankungen mit Nierenbeteiligung <ul style="list-style-type: none"> ▪ Bardet-Biedl-Syndrom ▪ Joubert-Syndrom • Multizystisch-dysplastische Nierenerkrankung • Methylmalonazidämie mit Nephropathie • Kongenitales nephrotisches Syndrom | <ul style="list-style-type: none"> 8 ▪ 6 6 2 ▪ 1 ▪ 1 2 1 1 | <ul style="list-style-type: none"> 40 ▪ 75 30 10 ▪ 50 ▪ 50 10 5 5 |
| Erworbene Erkrankungen | 3 | 13 |
| <ul style="list-style-type: none"> • Glomerulonephritiden <ul style="list-style-type: none"> ▪ MPGN Typ 2 ▪ IgA-Nephropathie • Tubulopathien | <ul style="list-style-type: none"> 2 ▪ 1 ▪ 1 1 | <ul style="list-style-type: none"> 66,7 ▪ 50 ▪ 50 33,3 |

4.1.2 Erkrankungsspektrum der nierengesunden Kinder

In Tabelle 4 sind die Erkrankungen der nierengesunden Kontrollen aufgeführt, die zur Krankenhausaufnahme und Operation Anlass gaben.

Tabelle 4: Erkrankungen der nierengesunden Kinder

| Diagnosen | Anzahl (n) gesamt | Prozentualer Anteil (%) | Berlin (n) | Heidelberg (n) |
|---|----------------------|----------------------------|---------------|-------------------|
| Angeborene Fehlbildungen | 18 | 56,3 | 16 | 2 |
| • Anorektale Fehlbildungen | 13 | 72,2 | 11 | 2 |
| ▪ Komplexe Fehlbildungssyndrome | ▪ 10 | ▪ 76,9 | 9 | 1 |
| ▪ Morbus Hirschsprung | ▪ 3 | ▪ 23,1 | 2 | 1 |
| • Blasenekstrophie | 4 | 22,2 | 4 | 0 |
| • Ösophagusatresie | 1 | 5,6 | 1 | 0 |
| Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes | 11 | 34,4 | 2 | 9 |
| • Gastroösophagealer Reflux | 8 | 72,8 | 1 | 7 |
| • Cholezystolithiasis | 2 | 18,2 | 1 | 1 |
| • Hypertrophe Pylorusstenose | 1 | 9,1 | 0 | 1 |
| Sonstige Erkrankungen | 3 | 9,4 | 1 | 2 |
| • Sichelzellanämie | 2 | 66,7 | 1 | 1 |
| • Turner Syndrom | 1 | 33,3 | 0 | 1 |

Wie der Tabelle 4 zu entnehmen ist, nahmen die angeborenen Fehlbildungen auch bei den nierengesunden Kontrollen mit fast 60% die erste Stelle des Erkrankungsspektrums ein. Im Gegensatz zu den niereninsuffizienten Kindern machten bei den Kontrollen aber vor allem die anorektalen Fehlbildungen mit 72,2% den Hauptteil aus und nur ein geringer Anteil (22%) waren Fehlbildungen der ableitenden Harnwege. 85% der Kinder mit anorektalen Fehlbildungen, und dabei vor allem die Kinder mit komplexen anorektalen Fehlbildungen, stammten aus Berlin. Bei den Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes, wie der gastroösophageale Refluxkrankheit, kamen hingegen über 80% der Kinder aus der Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Heidelberg.

Wie bereits in Abschnitt 3.2.1 erwähnt, wurde die omentale Gewebeentnahme bei den nierengesunden Kontrollen während elektiver abdomineller Operationen durchgeführt. Eine Übersicht dieser Eingriffe gibt Tabelle 5.

Tabelle 5: Durchgeführte Operationen bei den nierengesunden Kindern

| Durchgeführte Operationen | Anzahl (n) gesamt | Prozentualer Anteil (%) | Berlin (n) | Heidelberg (n) |
|--|----------------------|----------------------------|------------------|-------------------|
| Eingriffe am oberen Gastrointestinaltrakt | 12 | 37,5 | 3 | 9 |
| <ul style="list-style-type: none"> • Funduplicatio/Hemifundoplikatio • Cholezystektomie • Ösophagusrekonstruktion/ Magenhochzug • Pylorotomie | 8 2 1 1 | 66,7 16,7 8,3 8,3 | 1 1 1 0 | 7 1 0 1 |
| Eingriffe am unteren Gastrointestinaltrakt | 10 | 31,3 | 8 | 2 |
| <ul style="list-style-type: none"> • Rückverlagerung Enterostoma • Kolektomie/Hemikolektomie • Laparoskopische Durchzugsoperation • Anlage Enterostoma | 5 3 1 1 | 50 30 10 10 | 5 2 0 1 | 0 1 1 0 |

| Durchgeführte Operationen | Anzahl (n) gesamt | Prozentualer Anteil (%) | Berlin (n) | Heidelberg (n) |
|---|----------------------|----------------------------|------------|-------------------|
| Eingriffe an den ableitenden Harnwegen | 7 | 21,9 | 7 | 0 |
| <ul style="list-style-type: none"> • Harnblasenaugmentation <ul style="list-style-type: none"> ▪ Mit Anlage Vesikostomie/ Ureterzystoneostomie • Harnblasenhalsplastik <ul style="list-style-type: none"> ▪ Mit Anlage Vesikostomie/ Ureterzystoneostomie | 5 | 71,4 | 5 | 0 |
| | 2 | 28,6 | 2 | 0 |
| | 1 | 50 | | |
| Sonstige Eingriffe | 3 | 9,4 | 1 | 2 |
| <ul style="list-style-type: none"> • Splenektomie | 2 | 66,7 | 1 | 1 |
| Diagnostische Laparoskopie | 1 | 33,3 | 0 | 1 |

An erster Stelle der durchgeführten Operationen standen Eingriffe am oberen Gastrointestinaltrakt mit knapp 40%, gefolgt von Eingriffen am unteren Gastrointestinaltrakt (31,3%) sowie Operationen der ableitenden Harnwege (21,9%). 75% der Operationen am oberen Gastrointestinaltrakt wurden an dem Universitätsklinikum Heidelberg durchgeführt. Eingriffe am unteren Gastrointestinaltrakt sowie an den ableitenden Harnwegen hingegen wurden hauptsächlich an der Charité-Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

4.1.3 Blutdruckwerte und antihypertensive Medikation

Die Blutdruckwerte der nierengesunden Kontrollen befanden sich im altersentsprechenden Normbereich und keines der Kinder hatte einen behandlungsbedürftigen arteriellen Hypertonus. Ein Kind wurde aufgrund eines angeborenen Herzfehlers mit einem Betablocker (Carvedilol) behandelt. In Tabelle 6 sind nicht standardisierte Einzelmessungen nach Altersgruppen gezeigt mit den entsprechenden Normbereichen (<90.Perzentile).

Tabelle 6: Blutdruckwerte der Kontrollgruppe nach Altersgruppen (n=17)

| Alter | Blutdruckwerte [mmHg] | | Altersentsprechender Normbereich (<90. Perzentile bei Tagesmessung) | |
|----------------------------|---------------------------------|----------------------------------|--|---|
| | Systolisch Min-Max (Mean) | Diastolisch Min-Max (Mean) | Systolisch [mmHg] Jungen/Mädchen | Diastolisch [mmHg] Jungen/Mädchen |
| 0-2 Jahre (n=8)* | 80-104 (91,3) | 36-64 (50,6) | <94/97 (1J.) – <106/105(2Jahre) | <49/52 (1J.) – <59/61(2Jahre) |
| 3-5 Jahre (n=2)** | 96-100 (98) | 51-67 (59) | <106/105 (3,5J.) – <109/110 (5,5Jahre) | <66/67 (3,5J.) – <69/70 (5,5Jahre) |
| 6-9 Jahre (n=2)** | 103-110 (106,5) | 60-78 (69) | <107/107 (6,5J.) – <115/117 (9,5Jahre) | <68/69 (6,5J.)- <72/72 (9,5Jahre) |
| 10-15 Jahre (n=2)** | 116-117 (116,5) | 57-74 (65,5) | <112/113 (10,5J.) – <135/126 (15,5Jahre) | <71/71 (10,5J.) – <80/78 (15,5Jahre) |
| 16-17 Jahre (n=3)** | 110-149 (129,3) | 64-84 (75) | <131/124 (16,5J.) - <141/127(17,5Jahre) | <79/78 (16,5J.) - <83/81 (17,5Jahre) |

* Referenzwerte für altersentsprechenden Normbereich 0-2 Jahre nach: National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Children and Adolescents, 2004, The fourth report on the diagnosis, evaluation, and treatment of high blood pressure in children and adolescents (National-High-Blood-Pressure-Education-Program-Working-Group-on-High-Blood-Pressure-in-Children-and-Adolescents, 2004)

** Referenzwerte für altersentsprechenden Normbereich 3-17 Jahre nach: Neuhauser, 2013, Referenzperzentile für anthropometrische Maßzahlen und Blutdruck aus der Studie zur Gesundheit von Kindern und Jugendlichen in Deutschland (KiGGS) 2003-2006 (Neuhauser *et al.*, 2011; Neuhauser, 2013)

In der Gruppe der niereninsuffizienten Kinder wurden vier Kinder antihypertensiv behandelt, bei fünf Kindern fehlten die Angaben bezüglich einer antihypertensiven Medikation, die restlichen 14 Kinder hatten keine behandlungspflichtige Hypertonie. Die Hälfte der antihypertensiv behandelten Kinder (2/4) erhielt eine Monotherapie mit einem Calciumkanalblocker, die andere Hälfte (2/4) erhielt eine Dreifachkombination blutdrucksenkender Medikamente. Ein Calciumkanalblocker und ein β -Blocker waren in beiden Fällen Bestandteil der Therapie, die in einem Fall mit einem ACE-Hemmer/AT₁-Rezeptor-Antagonisten und in dem anderen Fall mit einem Diuretikum ergänzt wurde.

4.2 Kapillardichte

In Abbildung 6 sind beispielhaft zwei Gewebeschnitte mit CD 31 immunhistochemisch markierter endothelialer Fläche zur Darstellung der Gefäße nierengesunder und urämischer Kinder gegenübergestellt.

Kapillardichte im Omentum:

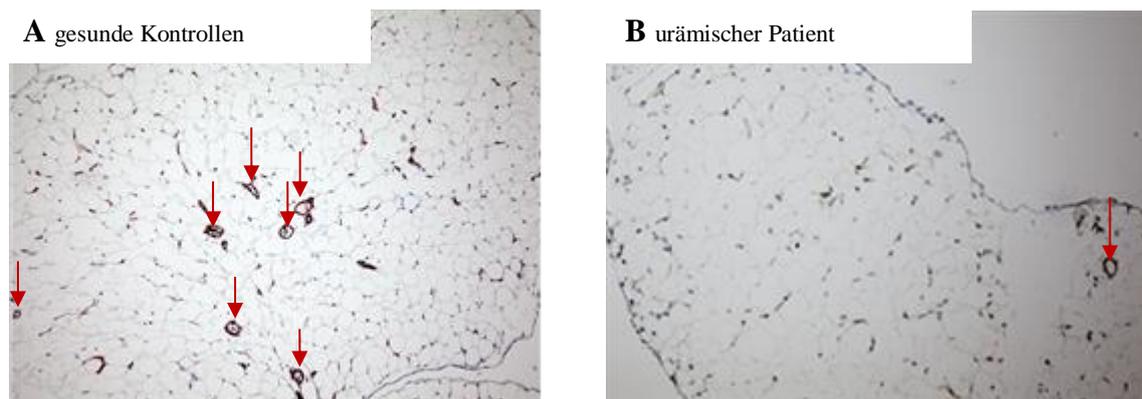


Abbildung 6: CD 31-IHC markierte Gefäße (rote Pfeile) in omentalen Gewebeschnitten (Objektiv mit 10facher Vergrößerung). **A** zeigt einen Gewebeschnitt von einer nierengesunden Kontrolle, **B** von einem urämischen Patienten

Die quantitative Messung der CD 31 markierten Kapillaren in den omentalen Gewebeschnitten zeigte eine signifikante Reduzierung der Kapillardichte bei urämischen Kindern. So lag der Median der Kapillardichte der nierengesunden Kontrollen bei 0,95 % (der Gesamtfläche) gegenüber 0,61 % bei den niereninsuffizienten Kindern ($p^{**}=0,0021$), entsprechend einer Reduktion um 35,7% . Bezüglich der Mittelwerte fand sich sogar eine Reduktion der Kapillardichte um 48% bei den niereninsuffizienten Kindern (Mittelwert nierengesunde Kontrolle= 1,31, Mittelwert niereninsuffiziente Kinder= 0,68). In Abbildung 7 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.

Vergleich der Kapillardichte

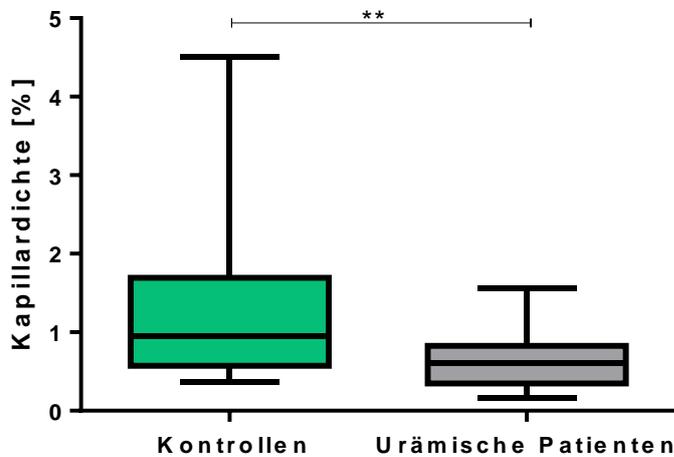


Abbildung 7: Vergleich der Kapillardichte im omentalen Gewebe nierengesunder und niereninsuffizienter Kinder. Die Kapillardichte bei niereninsuffizienten Kindern ist signifikant reduziert. Dargestellt als Box&Whiskers Plot mit Median. Mann-Whitney Test: Median Kontrollen= 0,95% (der Gesamtfläche), Median niereninsuffiziente Gruppe=0,61%, $p^{**}=0,0021$, $n=55$

In einer weiteren Analyse wurde die Kapillardichte in beiden Gruppen unter Ausschluss der antihypertensiv behandelten Kinder untersucht, um einen möglichen Einfluss der Hypertonie bzw. der blutdrucksenkenden Therapie auf die Kapillardichte auszuschließen. In Abbildung 8 sind die Ergebnisse dargestellt. Es zeigte sich weiterhin eine hochsignifikante Reduzierung der Kapillardichte bei Niereninsuffizienz entsprechend einer Reduktion um 52% bezüglich der Median-Werte (Mann-Whitney Test: Kontrollen Median = 0,95%, niereninsuffiziente Kinder Median = 0,46%, $p^{***}= 0,0007$, $n= 51$) und um 53,6% bezogen auf die Mittelwerte (Mean) (Mittelwert nierengesunde Kontrolle= 1,31, Mittelwert niereninsuffiziente Kinder= 0,61).

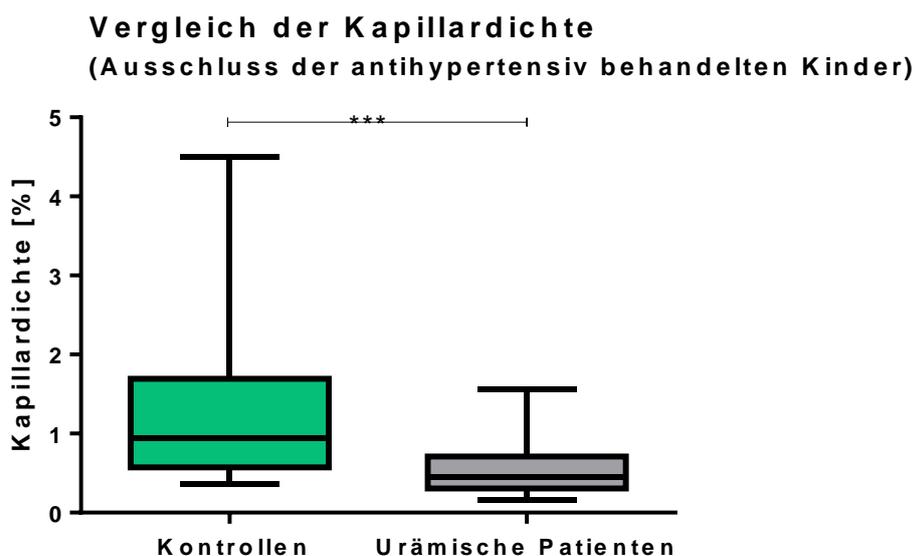


Abbildung 8: Vergleich der Kapillardichte im omentalen Gewebe nierengesunder und niereninsuffizienter Kinder. Kinder mit antihypertensiver Medikation wurden aus der Auswertung ausgeschlossen. Die Kapillardichte bei niereninsuffizienten Kindern war signifikant reduziert. Dargestellt als Box&Whiskers Plot mit Median. Mann-Whitney Test: Median Kontrollen= 0,95% (der Gesamtfläche), Median niereninsuffiziente Gruppe=0,46% (der Gesamtfläche), $p^{***}=0,0007$, $n=51$

4.2.1 Reproduzierbarkeit der Messergebnisse

Die Zuverlässigkeit der Kapillardichte-Messung wurde durch die Bestimmung der Intra- und Intervariabilität der Messergebnisse überprüft. Die Ergebnisse der beiden Messdurchgänge wurden als prozentuale Mittel der Differenz ($\frac{1.Messung-2.Messung}{1.Messung} \times 100$) und graphisch mit der Bland-Altman Methode dargestellt und verglichen. Zusätzlich wurde in einer Korrelationsanalyse und einem linearen Regressionsmodell der Grad der Übereinstimmung geprüft.

4.2.1.1 Intraobserver-Variabilität

Die Intraobserver-Variabilität, d.h. das Maß der Übereinstimmung der Ergebnisse bei wiederholter Messung durch den gleichen Untersucher, wurde bei einer Stichprobe von knapp 11% (18 Gewebeschnitte) der gesamten ausgewerteten Schnitte bestimmt. Hierfür wurden die Stichprobe in einem zweiten Durchgang verblindet durch den gleichen Untersucher ausgewertet.

Betrachtet man die Ergebnisse beider Messvorgänge, s. Tabelle 7, hinsichtlich des Mittelwertes (1.Messung= 0,93 vs. 2.Messung= 0,92), Standardabweichung (1.Messung= 0,69 vs. 2.Messung= 0,69) und Standardfehler des Mittelwertes (1.Messung= 0,16 vs. 2.Messung= 0,16)

sieht man, dass die Werte in beiden Durchgängen vergleichbar waren. Eine etwas größere Abweichung war nur bei den Median-Werten zu beobachten (1.Messung= 0,56 vs. 2.Messung= 0,66).

Tabelle 7: Intraobserver-Variabilität. Vergleich der Ergebnisse zweier Messdurchgänge durch den gleichen Untersucher.

| Anzahl der verglichenen Schnitte (n) = 18 | 1.Messung | 2.Messung |
|---|-----------|-----------|
| Minimum | 0,21 | 0,29 |
| 25% Perzentile | 0,45 | 0,42 |
| Median | 0,56 | 0,66 |
| 75% Perzentile | 1,23 | 1,25 |
| Maximum | 2,71 | 2,78 |
| Mittelwert (Mean) | 0,93 | 0,92 |
| SD-Abweichung | 0,69 | 0,69 |
| SD-Fehler von Mittelwert (Mean) | 0,16 | 0,16 |

Das prozentuale Mittel der Differenz zeigte eine Abweichung der Messergebnisse im arithmetischen Mittel (Mean) von 12,96% bei einem 95%-Konfidenzintervall von 7,68-18,23 und einem Median von 12,16%. In einer Korrelationsanalyse nach Spearman, s. Abbildung 9, fand sich ein hochsignifikanter Zusammenhang der beiden Messvorgänge ($r= 0,96$, $p^{****}<0,0001$) mit einer nahezu linearen Abhängigkeit (Regressionsgerade $y = 0,9831 * X + 0,006471$, $p^{****}<0,0001$).

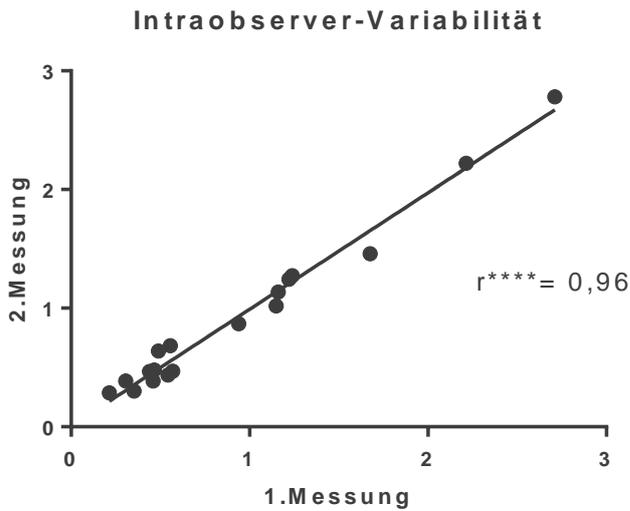


Abbildung 9: Korrelationsanalyse der Intraobserver-Variabilität. Es zeigt sich eine starke Übereinstimmung der Messergebnisse des 1.und 2.Messdurchgangs durch den gleichen Untersucher. Gezeigt sind der Korrelationskoeffizient nach Spearman $r = 0,96$, $p^{****} < 0,0001$ (95%-Konfidenzintervall 0,9 bis 0,99, $n=18$) und die lineare Regressionsgerade $y=0,9831 \cdot X+0,006471$, $p^{****} < 0,0001$.

Für die Überprüfung der Variabilität gilt jedoch die graphische Darstellung als Bland-Altman-Diagramm als Methode der Wahl. Mit dieser Darstellung (Abbildung 10) ließ sich eine gute Übereinstimmung beider Messdurchgänge mit nur geringer Schwankungsbreite der Abweichungen und geringer Verzerrung (Bias= 0,01, Standardabweichung vom Bias= 0,1, 95%-Übereinstimmungsgrenze von -0,18 bis 0,2) nachweisen.

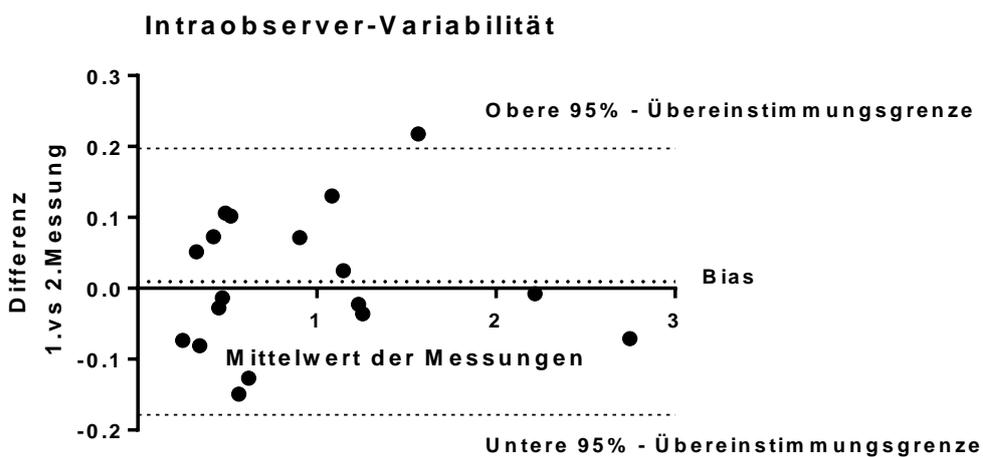


Abbildung 10: Bland-Altman-Diagramm der Intraobserver-Variabilität. Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung beider Messdurchgänge. Bias=0,01, Standardabweichung Bias=0,1, 95%-Übereinstimmungsgrenze (gestrichelte Linie) von -0,18 bis 0,2.

4.2.1.2 Interobserver-Variabilität

Die Interobserver-Variabilität, d.h. die Abhängigkeit der Ergebnisse vom Untersucher, wurde an einer Stichprobe von 10% (17 Gewebeschnitte) der gesamten ausgewerteten Schnitte geprüft. Dies erfolgte durch eine verblindete Auswertung der Gewebeschnitte durch einen zweiten Untersucher und die Ergebnisse bzw. die Abweichungen der beiden Messungen wurden analog der Intraobserver-Variabilität verglichen.

In Tabelle 8 sind die Ergebnisse der beiden Messdurchgänge zusammengefasst. Die Unterschiede bei den Mittelwerten (1.Messung= 0,95 vs. 2.Messung= 0,94), der Standardabweichung (1.Messung= 0,71 vs. 2.Messung= 0,67) und Standardfehler des Mittelwertes (1.Messung= 0,17 vs. 2.Messung= 0,16) zeigten nur geringe Abweichungen dieser Werte zwischen den beiden Messdurchgängen. Eine stärkere Abweichung war wie bei der Intraobserver-Variabilität bei den Median-Werten zu beobachten (1.Messung= 0,57 vs. 2.Messung= 0,68).

Tabelle 8: Interobserver-Variabilität. Vergleich der Ergebnisse einer zweiten Messung durch einen anderen Untersucher.

| Anzahl der verglichenen Schnitte (n) = 17 | 1.Messung | 2.Messung |
|---|-----------|-----------|
| Minimum | 0,21 | 0,22 |
| 25% Perzentile | 0,45 | 0,38 |
| Median | 0,57 | 0,68 |
| 75% Perzentile | 1,23 | 1,31 |
| Maximum | 2,71 | 2,56 |
| Mittelwert (Mean) | 0,95 | 0,94 |
| SD-Abweichung | 0,71 | 0,67 |
| SD-Fehler von Mittelwert (Mean) | 0,17 | 0,16 |

Die mittlere prozentuale Abweichung der beiden Messdurchgänge ist in Abbildung 11 dargestellt und zeigte eine Abweichung im Mittel (Mean) von 14,67% bei einem Konfidenzintervall von 7,22-22,12 und einem Median von 9,68. Die Unterschiede von Mittelwert und Median (14,67 vs. 9,68) begründeten sich in dem Vorhandensein eines Ausreißers, wie auch in der graphischen Darstellung (Abbildung 11) erkennbar ist. So lag das prozentuale Mittel der Differenz bei diesem Ausreißer bei 56%, das heißt einer mehr als dreifach so hohen Abweichung als der durchschnittlichen Abweichung der Messungen. In der Annahme, dass dieser Extremwert in einem Messfehler begründet lag, wurde er in der weiteren Analyse nicht mehr berücksichtigt.

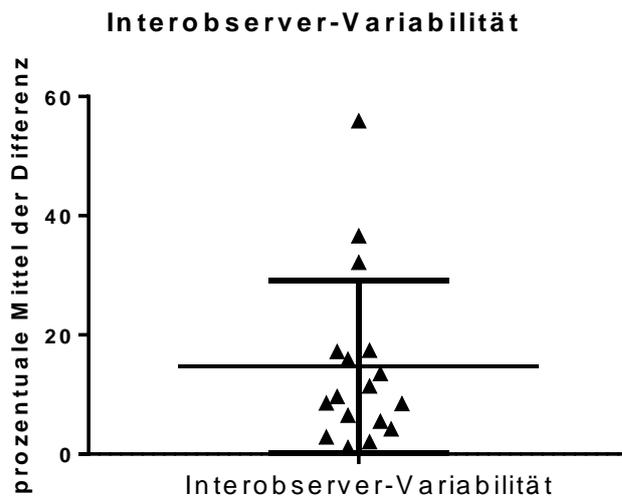


Abbildung 11: Darstellung der Interobserver-Variabilität als prozentuale Mittel der Differenz der 1. und 2.Messung durch einen zweiten Untersucher $(1.Messung-2.Messung)/(1.Messung) \times 100$. Mean 14,67, Standardabweichung 14,49, 95%-Konfidenzintervall 7,22-22,12, Median 9,68, $n=17$.

In der Korrelationsanalyse nach Spearman, s. Abbildung 12, zeigte sich eine hochsignifikante positive Korrelation der Ergebnisse beider Messvorgänge ($r = 0,94$, $p^{****} < 0,0001$).

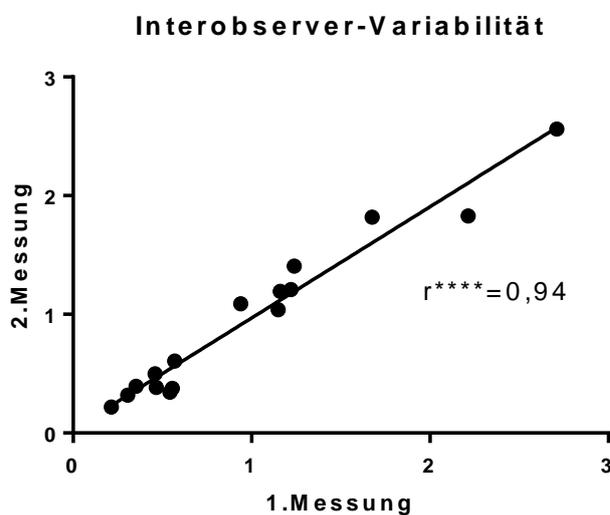


Abbildung 12: Korrelationsanalyse der Interobserver-Variabilität. Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung der Messergebnisse eines 2.Messdurchgangs durch einen zweiten Untersucher mit den Ergebnissen des 1.Messdurchgangs. Gezeigt sind der Korrelationskoeffizient nach Spearman $r = 0,94$, $p^{****} < 0,0001$ (95%-Konfidenzintervall 0,84 bis 0,98, $n=16$) und die lineare Regressionsgerade $y=0,9378 \cdot X+0,03080$, $p^{****} < 0,0001$.

Die Darstellung als Bland-Altman-Diagramm in Abbildung 13 veranschaulicht graphisch die Übereinstimmung der Ergebnisse beider Untersucher. Die Streuung der Messwertdifferenzen (95%-Übereinstimmungsgrenze von -0,26 bis 0,32) und eine Verzerrung (Bias) von 0,03 (Standardabweichung vom Bias= 0,15) erbrachten eine gute Übereinstimmung, die nur geringfügig schlechter als die der Intraobserver-Variabilität (s.o.) war.

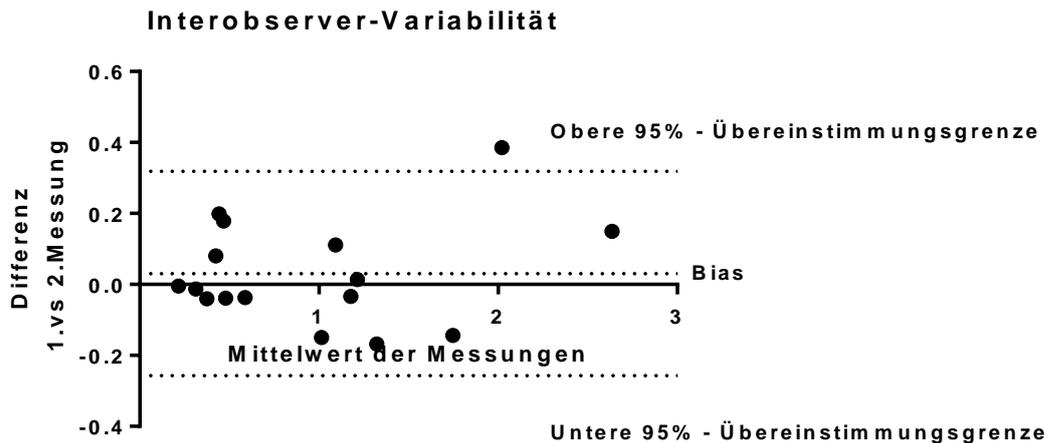


Abbildung 13: Bland-Altman-Diagramm der Interobserver-Variabilität. Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung beider Messdurchgänge. Bias=0,03, Standardabweichung Bias=0,15, 95%-Übereinstimmungsgrenze (gestrichelte Linie) von -0,26 bis 0,32.

4.2.1.3 Validität der Messmethode

Die Validität der verwendeten Messmethode wurde zusätzlich durch einen Methodenvergleich mit einer vollautomatisierten Bildanalyse (Aperio® Precision Image Analysis Software) an einer Stichprobe von 30 der 55 Kinder überprüft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 gezeigt.

**vollautomatisierte Bildanalyse
(Aperio® Precision Image Analysis Software)**

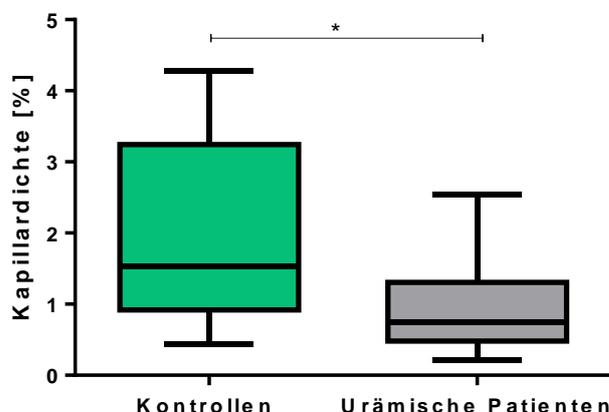


Abbildung 14: Kapillardichte (kapilläre endotheliale Fläche/Gesamtfläche) nierengesunder Kontrollen und urämischer Patienten, ausgewertet mit vollautomatisierter Bildanalyse (Aperio® Precision Image Analysis Software) durch eine kooperierende Arbeitsgruppe (Prof. Dr. med. C. P. Schmitt, Zentrum für Kinder-und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Heidelberg). Die Kapillardichte bei niereninsuffizienten Kindern ist signifikant reduziert. Dargestellt als Box&Whiskers Plot mit Median.

Mann-Whitney Test: Median Kontrollen= 1,53% (der Gesamtfläche), Median niereninsuffiziente Kinder=0,75% (der Gesamtfläche), $p^*=0,0216$, $n=30$

Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, fanden sich auch bei der vollautomatisierten Messmethode eine signifikante Rarefizierung der Kapillardichte bei niereninsuffizienten Kindern. So lag die Kapillardichte bei der Kontrollgruppe im Median bei 1,53% (der Gesamtfläche), bei den niereninsuffizienten Kindern hingegen nur bei 0,75% (der Gesamtfläche) ($p^*= 0,0216$), entsprechend einer Reduktion um 51%. Auch hinsichtlich der Mittelwerte (Mean) zeigte sich eine Reduktion der Kapillardichte um 51% (Mittelwert Kontrollgruppe= 1,94, Mittelwert niereninsuffiziente Kinder= 0,95).

Im Vergleich der beiden Messmethoden mit Hilfe der Bland-Altman Methode, wie in Abbildung 15 gezeigt, sieht man dass die Differenz der beiden Messmethoden mit dem Mittelwert der Messungen ansteigt. Das heißt, bei zunehmender Kapillardichte erhöhte sich die Variabilität der Differenzen der beiden Auswertungsverfahren. Die durchschnittliche Verzerrung (Bias) lag bei -0,58 ($SD\pm 0,99$) und die 95%-Übereinstimmungsgrenzen bei -2,52 bis 1,35.

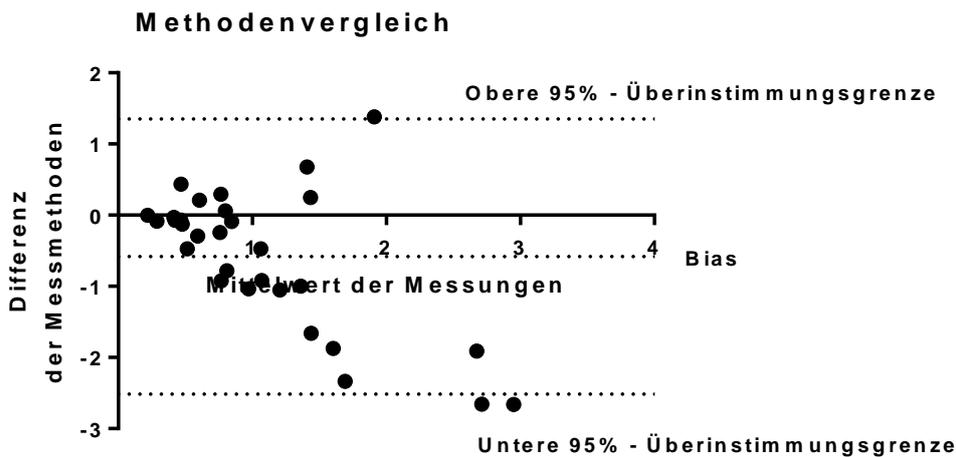


Abbildung 15: Methodenvergleich der eigenen Auswertungsmethode mit dem Digitalmikroskops BZ-9000 und Analyzer Software®-II und der vollautomatisierten Bildanalyse (Aperio® Precision Image Analysis Software). Man sieht eine zunehmende Variabilität der Differenzen bei steigender Messwerthöhe bzw. bei ansteigenden Mittelwerten. Bias= - 0,58, Standardabweichung Bias=0,99, 95%-Übereinstimmungsgrenze (gestrichelte Linie) von -2,52 bis 1,35.

In der Gegenüberstellung der Ergebnisse, der mit beiden Methoden gemessenen Biopsieproben (n=30), s. Abbildung 16, sieht man, dass der Median bei der Auswertung mit dem Digitalmikroskop BZ-9000 und Analyzer Software®-II bei 0,65% (der Gesamtfläche), bei dem Analyseverfahren mit Aperio® Precision Image Analysis Software hingegen bei 1,14% (der Gesamtfläche) lag (p**= 0,0197, n= 30).

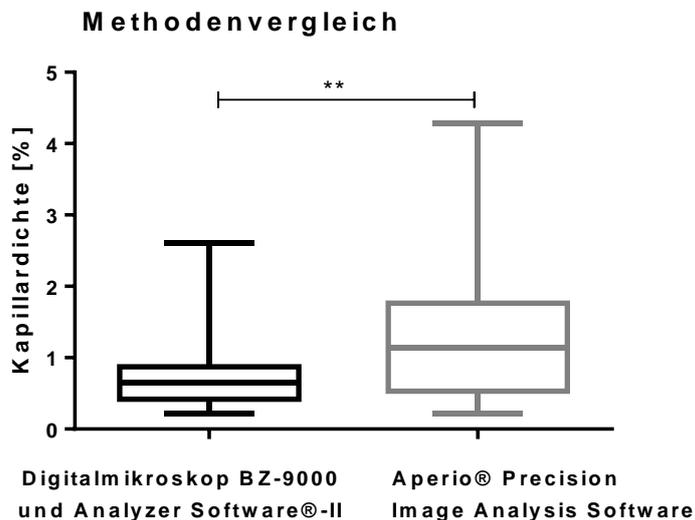


Abbildung 16: Methodenvergleich der Auswertungsmethode mit dem Digitalmikroskop BZ-9000 und Analyzer Software®-II und dem Analyseverfahren mit Aperio® Precision Image Analysis Software. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied der beiden Auswertungsverfahren bezüglich der Medianwerte. Dargestellt als als Box&Whiskers Plot mit Median.

Mann-Whitney Test Digitalmikroskop BZ-9000: Median= 0,65% (der Gesamtfläche), Aperio® Precision Image Analysis Software: Median= 1,14% (der Gesamtfläche), p**=0,0197, n=30

4.2.2 Korrelation der Kapillardichte mit klinischen und laborchemischen Parametern

4.2.2.1 Korrelation der Kapillardichte mit dem Alter

Das Alter zeigte in beiden Gruppen eine signifikante inverse Korrelation mit der Kapillardichte. So war die Kapillardichte bei jüngeren Kindern am höchsten und nahm mit zunehmendem Alter ab, s.a. Abbildung 17 (Korrelationskoeffizient nach Spearman, nierengesunde Kontrollen: $r = -0,61$, $p = 0,0002$, urämische Gruppe: $r = -0,88$, $p < 0,0001$).

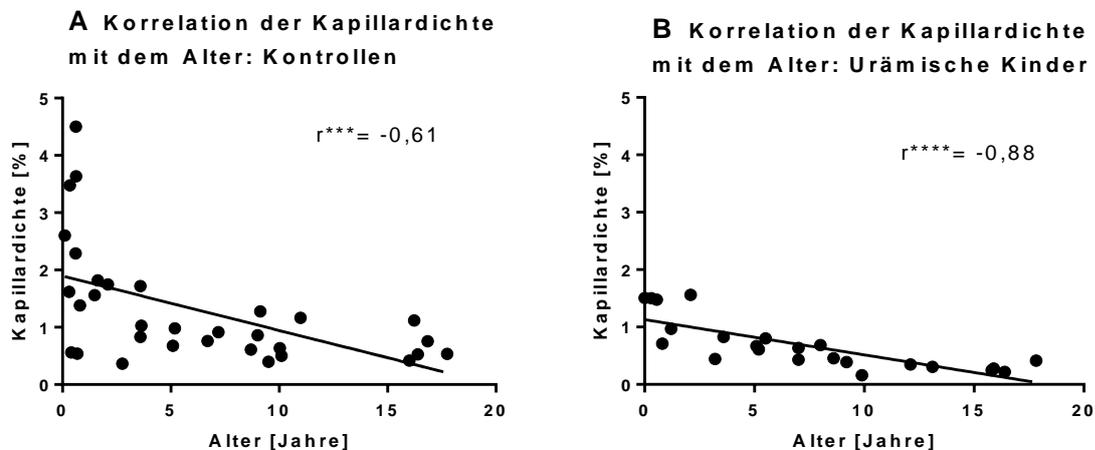


Abbildung 17: Inverse Korrelation der Kapillardichte mit dem Alter, gezeigt sind die lineare Regressionsgerade und der Korrelationskoeffizient nach Spearman. Signifikante inverse Korrelation in beiden Gruppen.

A Nierengesunde Kontrollen, $r = -0,61$, $p^{***} = 0,0002$, 95%-Konfidenzintervall $-0,79$ bis $-0,32$, $n = 32$.

Regressionsgerade $y = -0,09513 \cdot X + 1,895$, $p^{***} = 0,0015$

B Urämische Patienten, $r = -0,88$, $p^{****} < 0,0001$, 95%-Konfidenzintervall $-0,95$ bis $-0,73$, $n = 23$.

Regressionsgerade $y = -0,06136 \cdot X + 1,129$, $p^{***} < 0,0001$

4.2.2.2 Korrelation der Kapillardichte mit anthropometrischen Parametern

Auch in der Korrelationsanalyse der Körperoberfläche (BSA: body surface area), dem Gewicht und der Körperlänge zeigte sich ein signifikanter gegensinniger Zusammenhang mit der Kapillardichte in beiden Gruppen, vergleiche Abbildung 18-Abbildung 20 (nierengesunde Kontrollen BSA: $r = -0,65$, $p^{***} = 0,0003$, 95%-Konfidenzintervall $-0,83$ bis $-0,34$, $n = 26$; Körperlänge $r = -0,63$, $p^{***} = 0,0005$, 95%-Konfidenzintervall $-0,82$ bis $-0,31$, $n = 26$; Körpergewicht $r = -0,65$, $p^{****} < 0,0001$, 95%-Konfidenzintervall $-0,82$ bis $-0,37$, $n = 31$. Urämische Gruppe BSA: $r = -0,76$, $p^{***} < 0,0007$, 95%-Konfidenzintervall $-0,91$ bis $-0,42$, $n = 17$; Körperlänge $r = -0,75$, $p^{***} = 0,0007$, 95%-Konfidenzintervall $-0,91$ bis $-0,42$, $n = 17$; Körpergewicht $r = -0,76$, $p^{***} = 0,0007$, 95%-Konfidenzintervall $-0,91$ bis $-0,42$, $n = 17$).

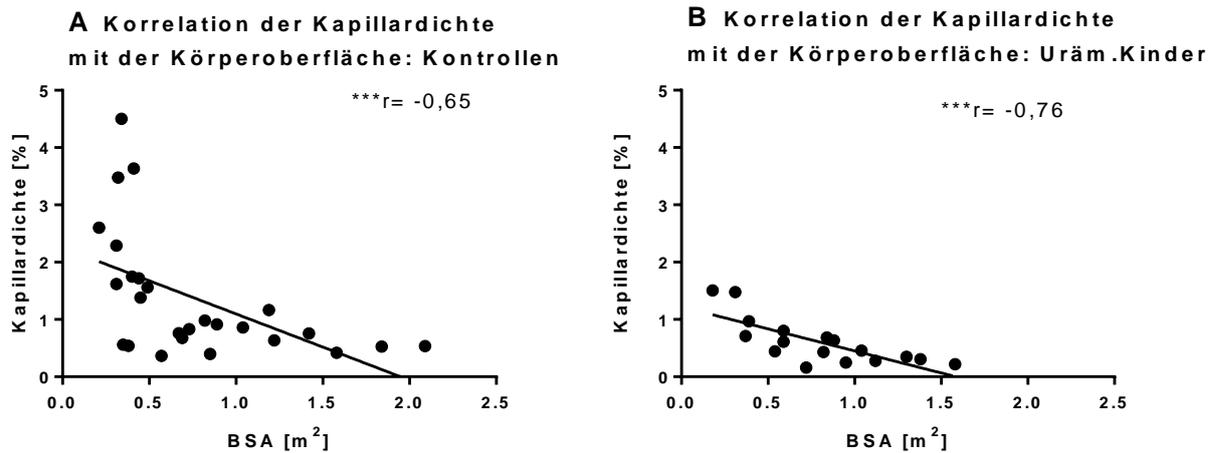


Abbildung 18: : Korrelationsanalyse der Körperoberfläche (BSA) mit der Kapillardichte. Gezeigt sind die lineare Regressionsgerade und der Korrelationskoeffizient nach Spearman. Signifikante inverse Korrelation in beiden Gruppen.
A Nierengesunde Kontrollen: $r = -0,65$, $p^{***} = 0,0003$, 95%-Konfidenzintervall $-0,83$ bis $-0,34$, $n=26$.
 Regressionsgerade $y = -0,2473 \cdot X + 1,107$, $p^{**} = 0,0049$
B Urämische Patienten, $r = -0,76$, $p^{***} < 0,0007$, 95%-Konfidenzintervall $-0,91$ bis $-0,42$, $n=17$.
 Regressionsgerade $y = -0,7694 \cdot X + 1,220$, $p^{***} = 0,0004$

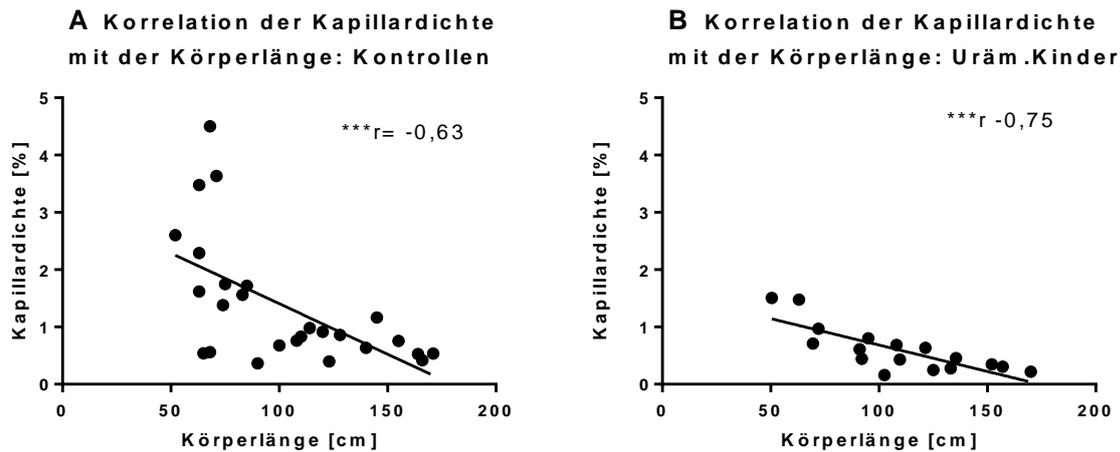


Abbildung 19: Korrelationsanalyse der Körperlänge mit der Kapillardichte. Gezeigt sind die lineare Regressionsgerade und der Korrelationskoeffizient nach Spearman. Signifikante inverse Korrelation in beiden Gruppen.
A Nierengesunde Kontrollen: $r = -0,63$, $p^{***} = 0,0005$, 95%-Konfidenzintervall $-0,82$ bis $-0,31$, $n=26$.
 Regressionsgerade $y = -0,01765 \cdot X + 3,172$, $p^{**} = 0,0014$
B Urämische Patienten, $r = -0,75$, $p^{***} = 0,0007$, 95%-Konfidenzintervall $-0,91$ bis $-0,42$, $n=17$.
 Regressionsgerade $y = -0,009225 \cdot X + 1,607$, $p^{***} = 0,0002$

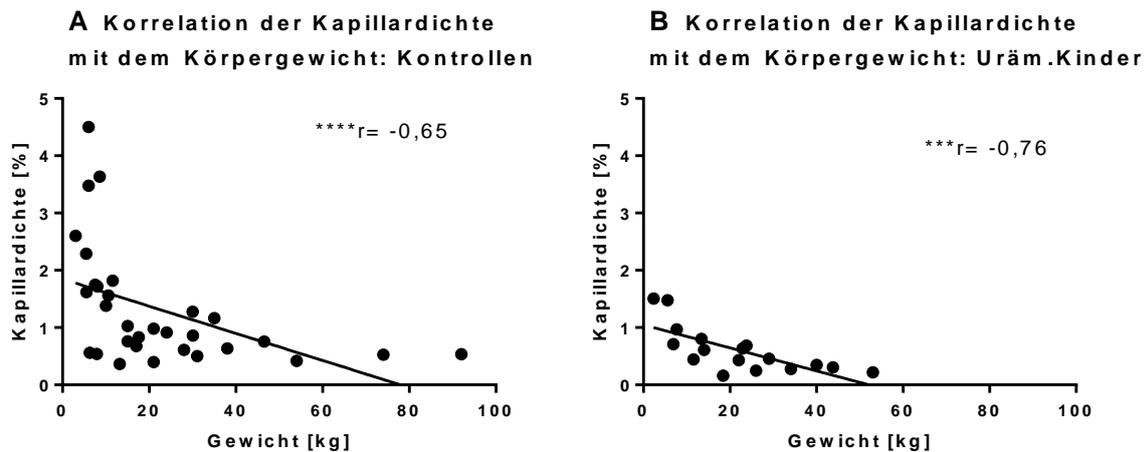


Abbildung 20: Korrelationsanalyse des Körpergewichts mit der Kapillardichte. Gezeigt sind die lineare Regressionsgerade und der Korrelationskoeffizient nach Spearman. Signifikante inverse Korrelation in beiden Gruppen.
A Nierengesunde Kontrollen: $r = -0,65$, $p^{****} < 0,0001$, 95%-Konfidenzintervall $-0,82$ bis $-0,37$, $n=31$.
 Regressionsgerade $y = -0,02367 \cdot X + 1,846$, $p^{**} = 0,0068$
B Urämische Patienten, $r = -0,76$, $p^{***} = 0,0007$, 95%-Konfidenzintervall $-0,91$ bis $-0,42$, $n=17$.
 Regressionsgerade $y = -0,02009 \cdot X + 1,047$, $p^{**} = 0,0011$

Der Body-Mass-Index (BMI) zeigte nur bei den gesunden Kontrollen eine signifikante inverse Korrelation mit der Kapillardichte (Korrelationskoeffizient nach Spearman, nierengesunde Kontrollen nierengesunde Kontrollen: $r = -0,51$, $p^* = 0,0386$, 95%-Konfidenzintervall $-0,80$ bis $-0,02$, $n= 17$). Bei den niereninsuffizienten Kindern zeigte sich hingegen kein signifikanter Zusammenhang, s. Abbildung 21. Für den BMI-SDS (alters- und geschlechtsbezogener Body-Mass-Index Standardabweichungs-Score nach Kromeyer-Hauschild) (Kromeyer-Hauschild *et al.*, 2001) zeigte sich weder bei der Kontrollgruppe noch bei den niereninsuffizienten Kindern eine signifikante Korrelation mit der Kapillardichte, s. Abbildung 22.

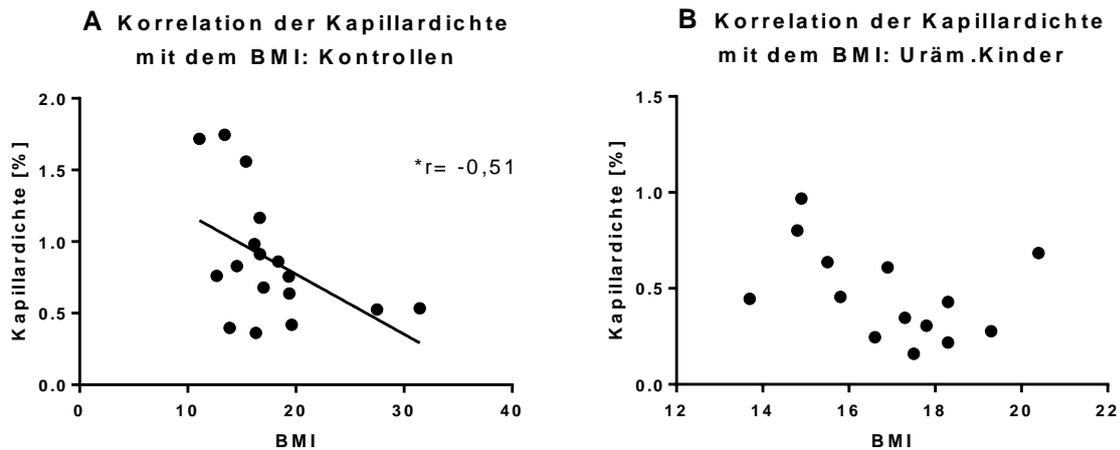


Abbildung 21: Korrelationsanalyse des Body-Mass-Index (BMI) mit der Kapillardichte nierengesunder und urämischer Kinder. Gezeigt ist der Korrelationskoeffizient nach Spearman. Es fand sich ein signifikanter inverser Zusammenhang des BMI mit der Kapillardichte bei den gesunden Kindern, jedoch nicht bei den niereninsuffizienten Kindern.

A nierengesunde Kontrollen: $r = -0,51$, $p^* = 0,0386$, 95%-Konfidenzintervall $-0,8$ bis $-0,02$, $n = 17$

B Uräm.Kinder: $r = -0,46$, $p^{ns} = 0,0994$, 95%-Konfidenzintervall $-0,8$ bis $0,11$, $n = 14$

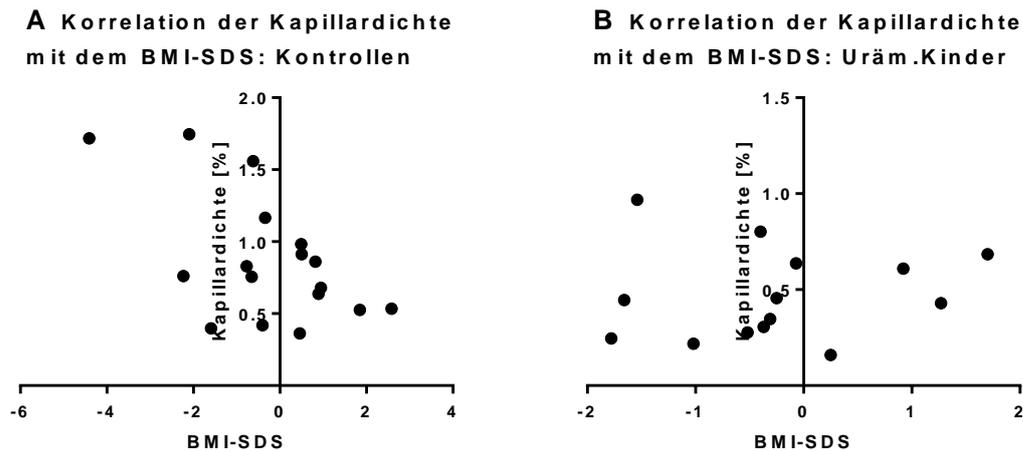


Abbildung 22: Korrelationsanalyse des alters- und geschlechtsbezogenen Body-Mass-Index Standardabweichungs-Score (BMI-SDS) nach Kromeyer-Hauschild mit der Kapillardichte nierengesunder und urämischer Kinder. Gezeigt ist der Korrelationskoeffizient nach Spearman. Es fand sich in beiden Gruppen kein signifikanter Zusammenhang mit der Kapillardichte.

A nierengesunde Kontrollen: $r = -0,38$, $p^{ns} = 0,1387$, 95%-Konfidenzintervall $-0,73$ bis $0,14$, $n = 17$

B Uräm. Kinder: $r = 0,19$, $p^{ns} = 0,5121$, 95%-Konfidenzintervall $-0,39$ bis $0,67$, $n = 14$

4.2.2.3 Korrelation der Kapillardichte mit Blutdruckwerten

Die Prüfung einer Assoziation der Blutdruckwerte mit der Kapillardichte ergab in beiden Gruppen keine signifikante Korrelation, weder für die systolischen noch für die diastolischen Werte (s. Abbildung 23). Die verwendeten Blutdruckwerte stammten von nicht standardisierten Einzelmessungen.

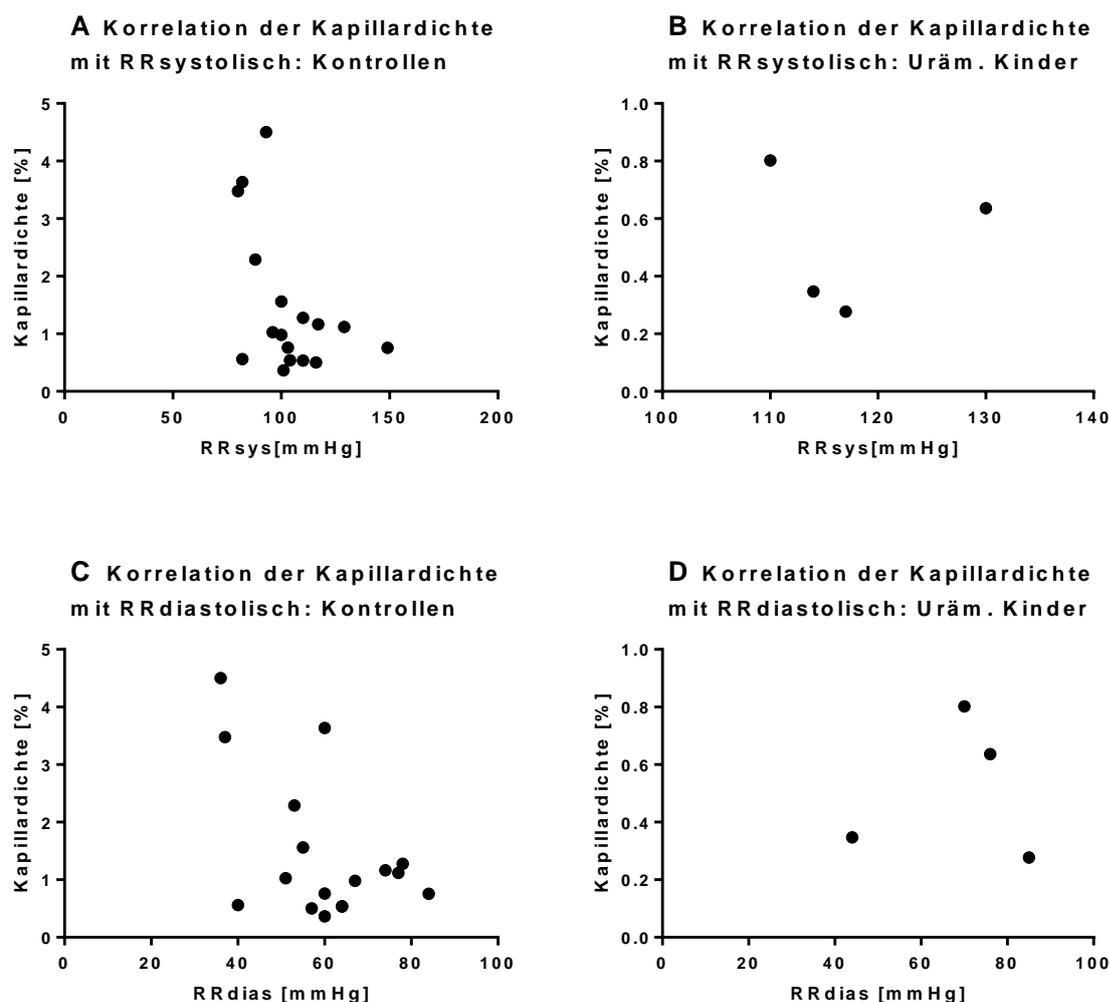


Abbildung 23: Korrelationsanalyse systolischer und diastolischer Blutdruckwerte (nicht-standardisierten Einzelmessungen) mit der Kapillardichte nierengesunder und urämischer Kinder. Gezeigt ist der Korrelationskoeffizient nach Spearman. Es fand sich in beiden Gruppen kein signifikanter Zusammenhang mit der Kapillardichte.

Systolischer Blutdruck:

A nierengesunde Kontrollen: $r = -0,47$, $p^{ns} = 0,0569$, 95%-Konfidenzintervall $-0,78$ bis $0,03$, $n = 17$

B Uräm.Kinder: $r = -0,4$, $p^{ns} = 0,75$, $n = 4$

Diastolischer Blutdruck:

C nierengesunde Kontrollen: $r = -0,29$, $p^{ns} = 0,2486$, 95%-Konfidenzintervall $-0,69$ bis $0,23$, $n = 17$

D Uräm.Kinder: $r = -0,4$, $p^{ns} = 0,75$, $n = 4$

4.2.2.4 Korrelation der Kapillardichte mit laborchemischen Parametern

In einer Korrelationsanalyse wurden in der Gruppe der urämischen Kinder erfasste laborchemische Parameter auf einen Zusammenhang mit der Kapillardichte geprüft. Es ergab sich eine signifikante negative Korrelation mit den Hämoglobinwerten ($r = -0,57$, $p^* = 0,0351$, 95%-Konfidenzintervall $-0,85$ bis $-0,04$ $n = 14$), s.a. Abbildung 24.

Korrelation der Kapillardichte mit dem Hämoglobinwert: Uräm.Kinder

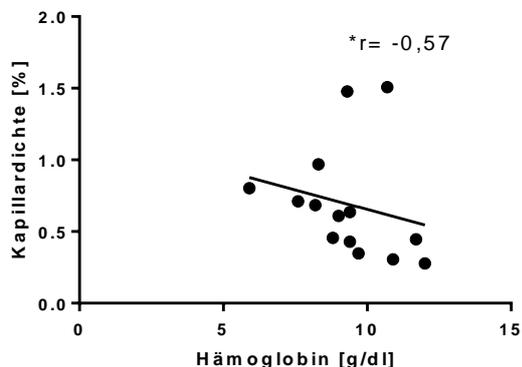
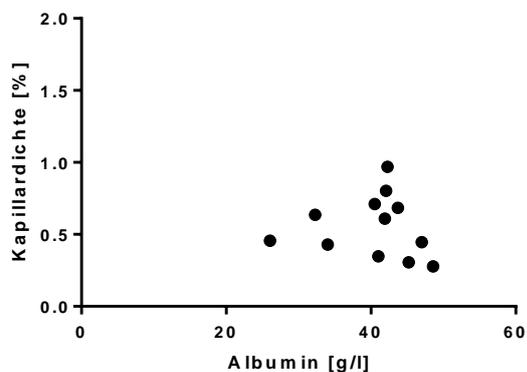


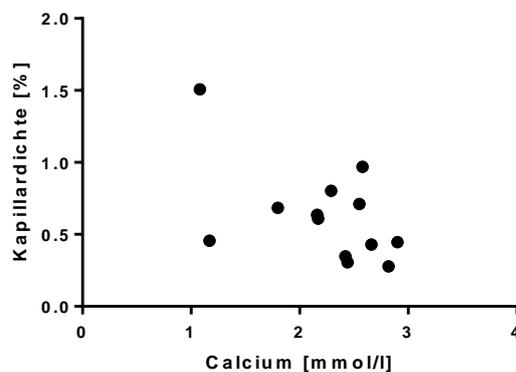
Abbildung 24: : Korrelationsanalyse der Hämoglobinwerte mit der Kapillardichte bei der niereninsuffizienten Gruppe. Gezeigt sind der Korrelationskoeffizient nach Spearman und die lineare Regressionsgerade. Es zeigte sich ein signifikanter inverser Zusammenhang mit der Kapillardichte: $r = -0,57$, $p^* = 0,0351$, 95%-Konfidenzintervall $-0,85$ bis $-0,04$, $n = 14$. Regressionsgerade $y = -0,05448 * X + 1,199$, $p^{ns} = 0,4359$

Bei den Albumin-, Calcium-, Phosphat-, Parathormon- und Bikarbonat Werten zeigte sich hingegen kein signifikanter Zusammenhang mit der Kapillardichte, s.a. Abbildung 25.

A Korrelation der Kapillardichte mit Albumin: Uräm.Kinder



B Korrelation der Kapillardichte mit Calcium: Uräm.Kinder



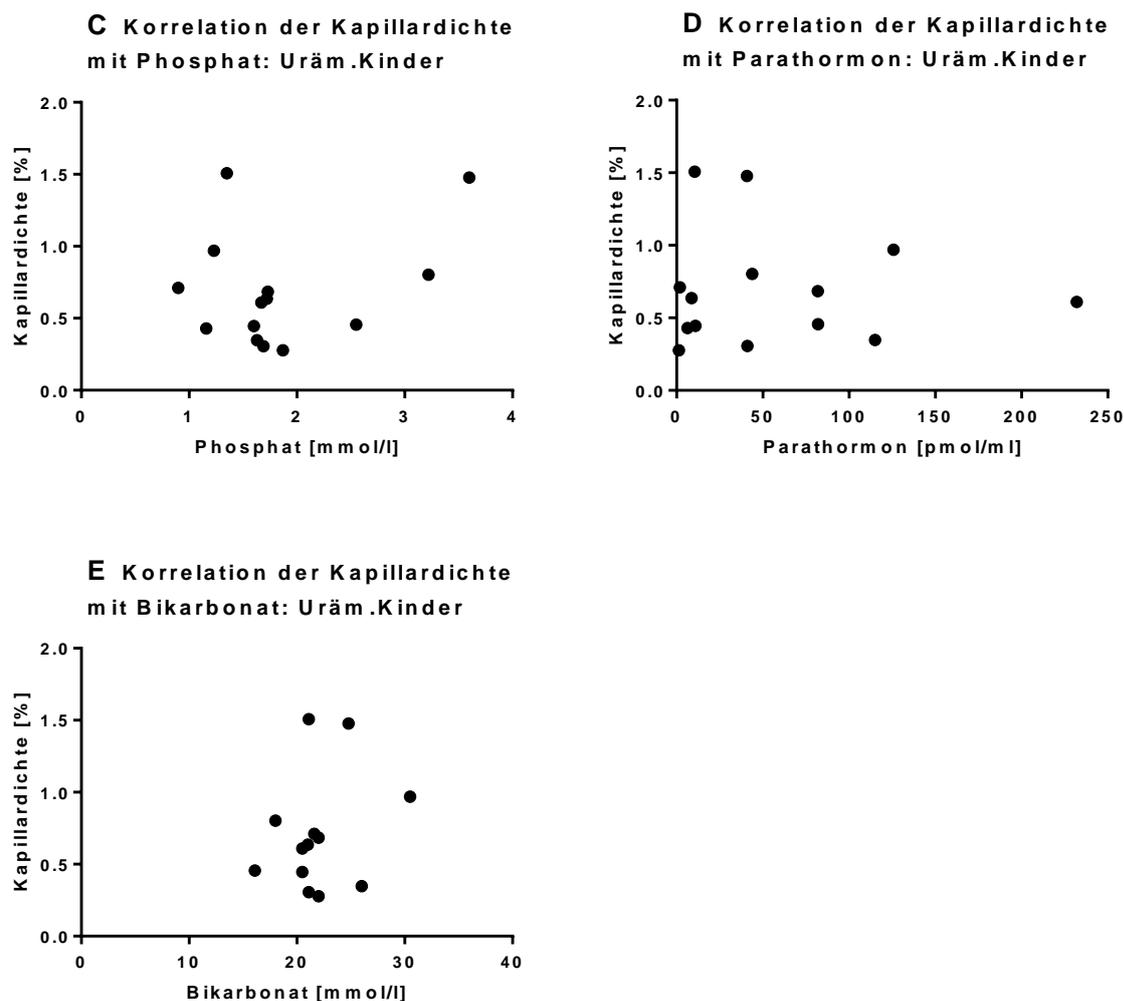


Abbildung 25: Korrelationsanalyse laborchemischer Parameter mit der Kapillardichte bei den niereninsuffizienten Kindern. Gezeigt ist der Korrelationskoeffizient nach Spearman. Es fand sich kein signifikanter Zusammenhang mit der Kapillardichte.

A Albumin: $r = -0,24$, $p^{ns}=0,4434$, 95%-Konfidenzintervall $-0,73$ bis $0,4$, $n=12$

B Calcium: $r = -0,46$, $p^{ns}=0,1150$, 95%-Konfidenzintervall $-0,81$ bis $0,14$, $n=13$

C Phosphat: $r = 0,002$, $p^{ns}>0,9999$, 95%-Konfidenzintervall $-0,54$ bis $0,54$, $n=14$

D Parathormon (PTH): $r = 0,13$, $p^{ns}=0,6595$, 95%-Konfidenzintervall $-0,44$ bis $0,63$, $n=14$

E Bikarbonat: $r = 0,13$, $p^{ns}=0,6646$, 95%-Konfidenzintervall $-0,47$ bis $0,65$, $n=13$

Bei beiden Gruppen wurden laborchemische Parameter der Inflammation, Leukozyten und C-reaktives Protein, auf eine Korrelation mit der Kapillardichte untersucht. Es fand sich weder in der Gruppe der niereninsuffizienten Kinder noch in der Gruppe der nierengesunden Kinder ein signifikanter Zusammenhang mit der Kapillardichte, s.a. Abbildung 26.

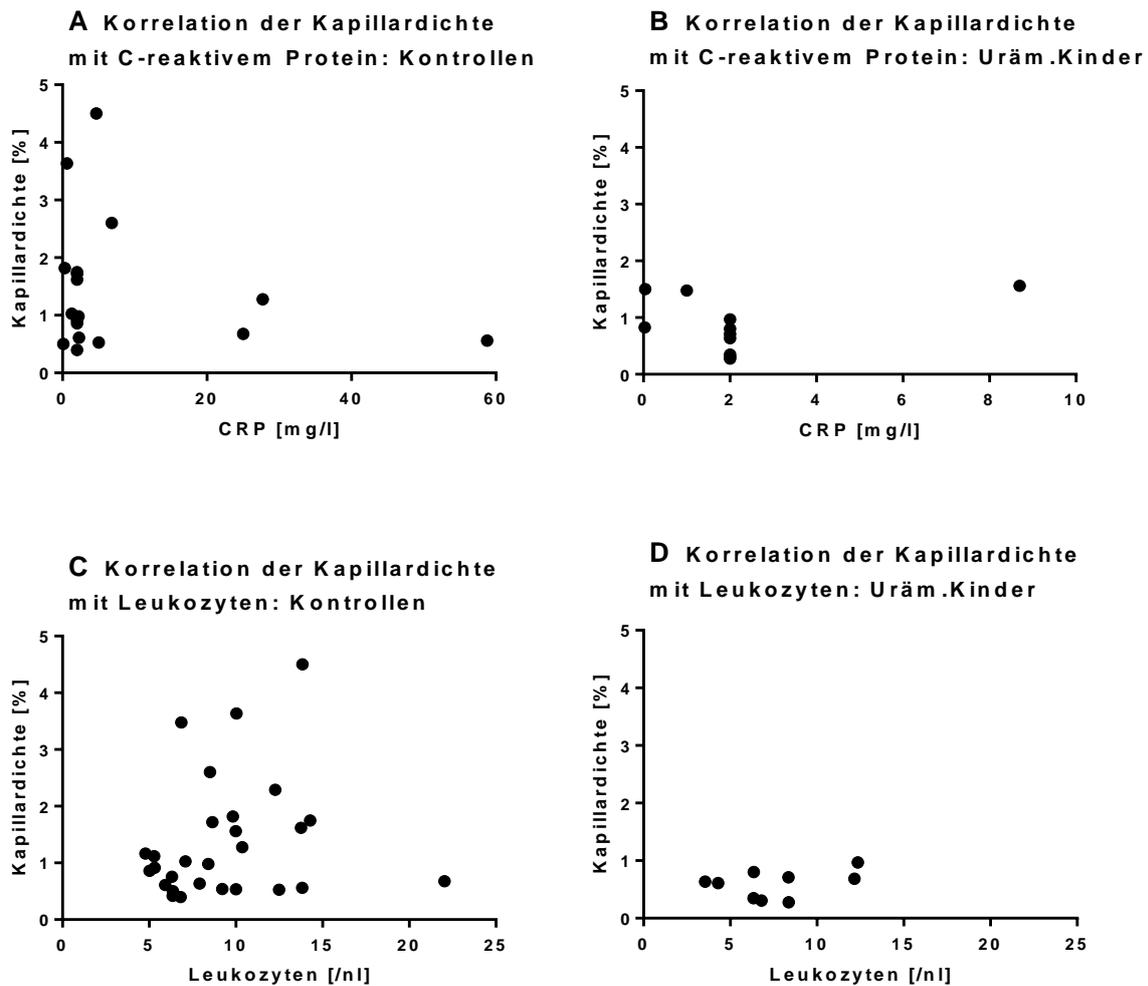


Abbildung 26: : Korrelationsanalyse laborchemischer Parameter der Inflammation mit der Kapillardichte bei gesunden und niereninsuffizienten Kindern. Gezeigt ist der Korrelationskoeffizient nach Spearman. Es zeigte sich in beiden Gruppen kein signifikanter Zusammenhang mit der Kapillardichte.

A C-reaktives Protein: nierengesunde Kontrollen: $r = -0,12$, $p^{\text{ns}}=0,6239$, 95%-Konfidenzintervall $-0,57$ bis $0,38$, $n=18$

B C-reaktives Protein: niereninsuffiziente Kinder: $r = -0,19$, $p^{\text{ns}}=0,3179$, 95%-Konfidenzintervall $-0,72$ bis $0,48$, $n=11$

C Leukozyten: nierengesunde Kontrollen: $r = 0,28$, $p^{\text{ns}}=0,1536$, 95%-Konfidenzintervall $-0,12$ bis $0,6$, $n=28$

D Leukozyten: niereninsuffiziente Kinder: $r = 0,28$, $p^{\text{ns}}=0,4630$, $n=9$

4.2.2.5 Korrelation der Kapillardichte mit Parametern der Nierenfunktion bei chronischer Niereninsuffizienz

Zur Prüfung, ob ein Zusammenhang der Kapillardichte mit klinischen oder laborchemischen Parametern der Nierenfunktion besteht, wurde eine Korrelationsanalyse mit der glomerulären Filtrationsrate (GFR) nach Schwartz, den Kreatinin- und Harnstoffwerten bei der urämischen Gruppe durchgeführt. Es fand sich eine signifikante inverse Korrelation mit den Kreatinin- ($r = -0,57$, $p^* = 0,0286$, 95%-Konfidenzintervall $-0,84$ bis $-0,07$, $n = 15$) und Harnstoff- Werten ($r = -0,54$, $p^* = 0,0479$, 95%-Konfidenzintervall $-0,84$ bis $0,00$, $n = 14$), hingegen war der

Zusammenhang bei der GFR nicht signifikant ($r = -0,25$, $p^{ns} = 0,3504$, 95%-Konfidenzintervall -0,54 bis 0,51, $n = 16$), s.a. Abbildung 27.

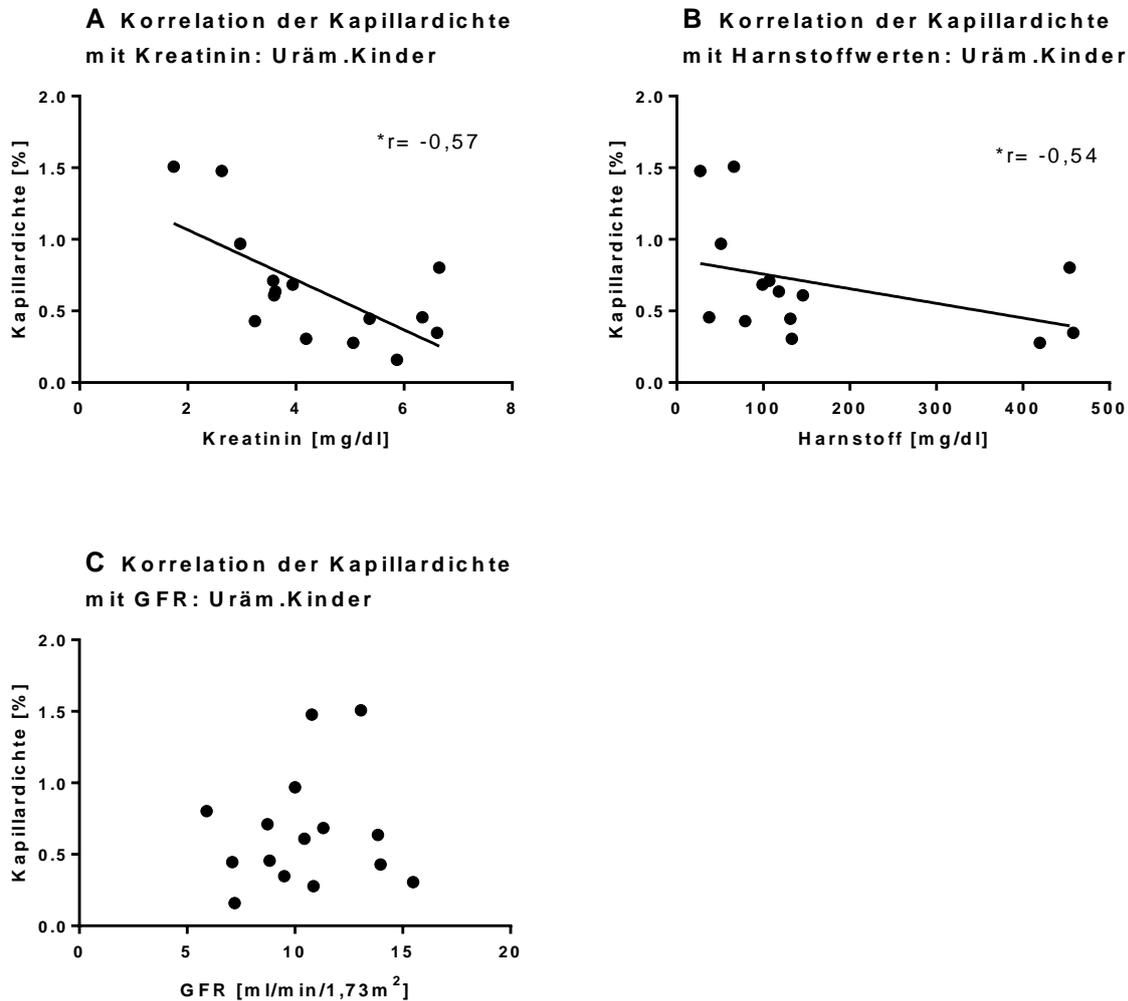


Abbildung 27: Korrelationsanalyse klinischer und laborchemischer Parameter der Nierenfunktion mit der Kapillardichte bei den niereninsuffizienten Kindern. Gezeigt sind der Korrelationskoeffizient nach Spearman und die lineare Regressionsgerade. Signifikante inverse Korrelation der Kapillardichte mit Kreatinin- und Harnstoffwerten, jedoch kein signifikanter Zusammenhang bei der glomerulären Filtrationsrate (GFR).

A Kreatinin: $r = -0,57$, $p^* = 0,0286$, 95%-Konfidenzintervall -0,84 bis -0,07, $n = 15$.

Lineare Regressionsgerade $y = -0,1746 \cdot X + 1,416$, $p^{**} = 0,0068$

B Harnstoff: $r = -0,54$, $p^* = 0,0479$, 95%-Konfidenzintervall -0,84 bis 0,00, $n = 14$.

Lineare Regressionsgerade $y = -0,002184 \cdot X + 0,8592$, $p^{ns} = 0,1537$

C GFR (glomeruläre Filtrationsrate): $r = -0,25$, $p^{ns} = 0,3504$, 95%-Konfidenzintervall -0,54 bis 0,51, $n = 16$.

4.2.2.6 Korrelation der vollautomatisiert (Aperio®) gemessenen Kapillardichte mit klinischen und laborchemischen Parametern

Die bei einer Stichprobe von 30 der 55 Kinder vollautomatisiert gemessene Kapillardichte mit Aperio® Precision Image Analysis Software wurde auf ihren Zusammenhang mit klinischen und

Ergebnisse

laborchemischen Parametern geprüft. Es zeigte sich in beiden Gruppen, s. Tabelle 9 (Kontrollen) und Tabelle 10 (niereninsuffiziente Kinder), für keinen der Parameter eine signifikante Korrelation mit der Kapillardichte.

Tabelle 9: Korrelationsanalyse klinischer und laborchemischer Parameter mit der vollautomatisiert (Aperio® Precision Image Analysis Software) gemessenen Kapillardichte bei nierengesunden Kontrollen.

| | | Kapillardichte vollautomatisierte Bildanalyse (Aperio® Precision Image Analysis Software) |
|---|-------------------------------|---|
| Alter | Korrelation nach Spearman (r) | -0,28 |
| | 95%-Konfidenzintervall* | -0,73 bis 0,34 |
| | Signifikanz (2-seitig) (p) | 0,3554 |
| | n | 13 |
| BSA (body surface area) | Korrelation nach Spearman (r) | -0,27 |
| | 95%-Konfidenzintervall | -0,74 bis 0,38 |
| | Signifikanz (2-seitig) (p) | 0,4042 |
| | n | 12 |
| Gewicht | Korrelation nach Spearman (r) | -0,19 |
| | 95%-Konfidenzintervall | -0,68 bis 0,42 |
| | Signifikanz (2-seitig) (p) | 0,5293 |
| | n | 13 |
| Größe | Korrelation nach Spearman (r) | -0,36 |
| | 95%-Konfidenzintervall | -0,78 bis 0,29 |
| | Signifikanz (2-seitig) (p) | 0,2560 |
| | n | 12 |
| Hämoglobin | Korrelation nach Spearman (r) | -0,35 |
| | 95%-Konfidenzintervall | -0,77 bis 0,26 |
| | Signifikanz (2-seitig) (p) | 0,2288 |
| | n | 13 |
| CRP (C-reaktives Protein) | Korrelation nach Spearman (r) | 0,06 |
| | Signifikanz (2-seitig) (p) | 0,8690 |
| | n | 10 |
| Leukozyten | Korrelation nach Spearman (r) | 0,3 |
| | 95%-Konfidenzintervall | -0,38 bis 0,77 |
| | Signifikanz (2-seitig) (p) | 0,3713 |
| | n | 11 |
| BMI-SDS (Body-Mass-Index Standardabweichungs-Score) | Korrelation nach Spearman (r) | 0,22 |
| | Signifikanz (2-seitig) (p) | 0,5809 |
| | n | 9 |

*95%-Konfidenzintervall nur angegeben, wenn Stichprobe >10

Ergebnisse

Tabelle 10: Korrelationsanalyse klinischer und laborchemischer Parameter mit der vollautomatisiert (Aperio® Precision Image Analysis Software) gemessenen Kapillardichte bei niereninsuffizienten Kindern

| | | Kapillardichte vollautomatisierte Bildanalyse (Aperio® Precision Image Analysis Software) |
|---|-------------------------------|--|
| Alter | Korrelation nach Spearman (r) | -0,43 |
| | 95%-Konfidenzintervall* | -0,76 bis 0,07 |
| | Signifikanz (2-seitig) (p) | 0,081 |
| | n | 17 |
| BSA (body surface area) | Korrelation nach Spearman (r) | -0,08 |
| | 95%-Konfidenzintervall | -0,64 bis 0,53 |
| | Signifikanz (2-seitig) (p) | 0,7940 |
| | n | 12 |
| Gewicht | Korrelation nach Spearman (r) | -0,11 |
| | 95%-Konfidenzintervall | -0,66 bis 0,51 |
| | Signifikanz (2-seitig) (p) | 0,7202 |
| | n | 12 |
| Größe | Korrelation nach Spearman (r) | -0,09 |
| | 95%-Konfidenzintervall | -0,64 bis 0,53 |
| | Signifikanz (2-seitig) (p) | 0,7782 |
| | n | 12 |
| Harnstoff | Korrelation nach Spearman (r) | 0,36 |
| | Signifikanz (2-seitig) (p) | 0,3063 |
| | n | 10 |
| Kreatinin | Korrelation nach Spearman (r) | 0,36 |
| | Signifikanz (2-seitig) (p) | 0,2988 |
| | n | 10 |
| Hämoglobin | Korrelation nach Spearman (r) | 0,05 |
| | Signifikanz (2-seitig) (p) | 0,9005 |
| | n | 10 |
| GFR (glomeruläre Filtrationsrate) | Korrelation nach Spearman (r) | -0,08 |
| | Signifikanz (2-seitig) (p) | 0,8182 |
| | n | 10 |
| Blutdruck (systolisch) | Korrelation nach Spearman (r) | -0,5 |
| | Signifikanz (2-seitig) (p) | > 0,9999 |
| | n | 3 |
| Blutdruck (diastolisch) | Korrelation nach Spearman (r) | -1,0 |
| | Signifikanz (2-seitig) (p) | 0,3333 |
| | n | 3 |
| Albumin | Korrelation nach Spearman (r) | -0,18 |
| | Signifikanz (2-seitig) (p) | 0,5996 |
| | n | 10 |
| Calcium | Korrelation nach Spearman (r) | -0,34 |
| | Signifikanz (2-seitig) (p) | 0,3241 |
| | n | 10 |

Ergebnisse

| | | Kapillardichte vollautomatisierte Bildanalyse (Aperio® Precision Image Analysis Software) |
|---|-------------------------------|--|
| Inorgan. Phosphat | Korrelation nach Spearman (r) | 0,38 |
| | Signifikanz (2-seitig) (p) | 0,2818 |
| | n | 10 |
| Parathormon | Korrelation nach Spearman (r) | 0,55 |
| | Signifikanz (2-seitig) (p) | 0,1062 |
| | n | 10 |
| Bikarbonat | Korrelation nach Spearman (r) | -0,66 |
| | Signifikanz (2-seitig) (p) | 0,0544 |
| | n | 9 |
| CRP (C-reaktives Protein) | Korrelation nach Spearman (r) | 0,13 |
| | Signifikanz (2-seitig) (p) | > 0,9999 |
| | n | 7 |
| Leukozyten | Korrelation nach Spearman (r) | -0,71 |
| | Signifikanz (2-seitig) (p) | 0,0881 |
| | n | 7 |
| BMI-SDS (Body-Mass-Index Standardabweichungs-Score) | Korrelation nach Spearman (r) | 0,23 |
| | 95%-Konfidenzintervall | -0,45 bis 0,74 |
| | Signifikanz (2-seitig) (p) | 0,5034 |
| | n | 11 |

*95%-Konfidenzintervall nur angegeben, wenn Stichprobe >10

4.2.2.7 Prädiktoren der Kapillardichte

In einer multiplen linearen Regressionsanalyse wurde der Zusammenhang der Kapillardichte als abhängige Variable mit mehreren unabhängigen Variablen überprüft, um die Vorhersagekraft einzelner Parameter auf die Kapillardichte zu beurteilen.

4.2.2.7.1 Prädiktoren der Kapillardichte bei niereninsuffizienten und gesunden Kindern

In einem ersten Schritt wurden anthropometrische Parameter der Kontrollen und niereninsuffizienten Kinder sowie die Gruppenzugehörigkeit (niereninsuffiziente Kinder vs. Kontrollen) auf ihre Vorhersagekraft auf die Kapillardichte getestet, s. Tabelle 11 und Tabelle 12. Dieses Modell erklärte 42% (korrigiertes $R^2 = 0,419$) der Varianz der Kapillardichte.

Tabelle 11: Modellzusammenfassung der multiplen linearen Regression anhand anthropometrischer Daten und Gruppenzugehörigkeit (niereninsuffiziente Kinder vs. Kontrollen). Das Modell 4 kann 42% der Varianz (korrigiertes $R^2=0,419$) der Kapillardichte erklären.

| Modellzusammenfassung | | | | |
|---|-------------------|-----------|------------------------|------------------------------|
| Modell | R | R-Quadrat | Korrigiertes R-Quadrat | Standardfehler des Schätzers |
| 1 | ,676 ^a | ,457 | ,384 | ,75560 |
| 2 | ,676 ^b | ,457 | ,400 | ,74569 |
| 3 | ,676 ^c | ,457 | ,415 | ,73631 |
| 4 | ,669 ^d | ,447 | ,419 | ,73359 |
| a. Einflußvariablen : (Konstante), Gruppe, Gewicht, Alter, Größe, BSA | | | | |
| b. Einflußvariablen : (Konstante), Gruppe, Gewicht, Alter, Größe | | | | |
| c. Einflußvariablen : (Konstante), Gruppe, Gewicht, Größe | | | | |
| d. Einflußvariablen : (Konstante), Gruppe, Größe | | | | |

Die Größe (Körperhöhe/Körperlänge) und die Gruppenzugehörigkeit zeigten in diesem Modell (Modell 4) die beste Vorhersagekraft für die Kapillardichte (Größe: Beta -0,55, $p= 0,000$; Gruppenzugehörigkeit: Beta -0,34, $p=0,006$) auf hohem Signifikanzniveau. Sie erklärten innerhalb dieses Modells 55% (Größe) bzw. 34% (Gruppenzugehörigkeit) der Varianz.

Tabelle 12: Multiple lineare Regressionsanalyse. Zusammenhang der Kapillardichte mit anthropometrischen Daten und der Gruppenzugehörigkeit (niereninsuffizient vs. Kontrolle). Die Größe und Gruppenzugehörigkeit zeigten die beste Vorhersagekraft für die Kapillardichte (Größe: Beta -0,55, p=0,000; Gruppenzugehörigkeit: -0,34, p=0,006).

| Koeffizienten ^a | | | | | | |
|----------------------------|-------------|-------------------------------------|----------------|-----------------------|--------|-------|
| Modell | | Nicht standardisierte Koeffizienten | | Standardisierte | T | Sig. |
| | | Regressions- koeffizient B | Standardfehler | Koeffizienten Beta | | |
| 1 | (Konstante) | 3,635 | 1,371 | | 2,652 | ,012 |
| | Alter | -,009 | ,068 | -,056 | -,139 | ,890 |
| | Größe | -,014 | ,051 | -,536 | -,281 | ,780 |
| | Gewicht | ,025 | ,121 | ,503 | ,206 | ,838 |
| | BSA | -,889 | 8,808 | -,428 | -,101 | ,920 |
| | Gruppe | -,615 | ,257 | -,316 | -2,394 | ,022 |
| | 2 | (Konstante) | 3,744 | ,833 | | 4,493 |
| | Alter | -,010 | ,066 | -,062 | -,158 | ,875 |
| | Größe | -,019 | ,011 | -,723 | -1,777 | ,084 |
| | Gewicht | ,013 | ,015 | ,258 | ,837 | ,408 |
| | Gruppe | -,613 | ,253 | -,315 | -2,424 | ,020 |
| 3 | (Konstante) | 3,837 | ,582 | | 6,590 | ,000 |
| | Größe | -,021 | ,008 | -,768 | -2,645 | ,012 |
| | Gewicht | ,012 | ,014 | ,243 | ,840 | ,406 |
| | Gruppe | -,626 | ,236 | -,322 | -2,656 | ,011 |
| 4 | (Konstante) | 3,535 | ,456 | | 7,752 | ,000 |
| | Größe | -,015 | ,003 | -,545 | -4,620 | ,000 |
| | Gruppe | -,668 | ,230 | -,343 | -2,909 | ,006 |

a. Abhängige Variable: Kapillardichte

4.2.2.7.2 Prädiktoren der Kapillardichte bei niereninsuffizienten Kindern

Als zweiter Schritt wurden anthropometrische und laborchemische Parameter innerhalb der Gruppe der niereninsuffizienten Kinder auf ihre Vorhersagekraft auf die Kapillardichte überprüft. Dabei stellte sich die Größe als bester Prädiktor der Kapillardichte bei niereninsuffizienten Kindern heraus (Größe: Beta -0,83, p= 0,000), s. Tabelle 13 und Tabelle 14. Mit Hilfe dieses Modells konnte 66% (korrigiertes $R^2 = 0,66$) der Varianz der Kapillardichte bei niereninsuffizienten Kindern erklärt werden, s. Tabelle 13.

Tabelle 13: Modellzusammenfassung der multiplen linearen Regression anhand der Größe, den Harnstoff- und Kreatininwerten bei den niereninsuffizienten Kindern. Das Modell 3 konnte 66% der Varianz (korrigiertes $R^2=0,662$) der Kapillardichte erklären.

| Modellzusammenfassung | | | | |
|--|-------------------------------|-----------|------------------------|------------------------------|
| Modell | R | R-Quadrat | Korrigiertes R-Quadrat | Standardfehler des Schätzers |
| | Gruppe = 2,00 (ausgewählt) | | | |
| 1 | ,842 ^a | ,710 | ,622 | ,24139 |
| 2 | ,842 ^b | ,708 | ,655 | ,23072 |
| 3 | ,830 ^c | ,688 | ,662 | ,22824 |
| a. Einflußvariablen : (Konstante), Harnstoff, Größe, Kreatinin | | | | |
| b. Einflußvariablen : (Konstante), Größe, Kreatinin | | | | |
| c. Einflußvariablen : (Konstante), Größe | | | | |

Tabelle 14: Multiple lineare Regressionsanalyse. Vorhersagekraft der Größe, Harnstoff- und Kreatininwerte für die Kapillardichte bei niereninsuffizienten Kindern. Die Größe zeigte die beste Vorhersagekraft für die Kapillardichte (Größe: Beta -0,83, $p=0,000$).

| Koeffizienten ^{a,b} | | | | | | |
|--|-------------|-------------------------------------|----------------|-------------------------------|--------|------|
| Modell | | Nicht standardisierte Koeffizienten | | Standardisierte Koeffizienten | T | Sig. |
| | | Regressionskoeffizient B | Standardfehler | Beta | | |
| 1 | (Konstante) | 1,776 | ,240 | | 7,388 | ,000 |
| | Kreatinin | -,055 | ,069 | -,216 | -,799 | ,443 |
| | Größe | -,008 | ,003 | -,715 | -3,251 | ,009 |
| | Harnstoff | ,000 | ,001 | ,051 | ,221 | ,829 |
| 2 | (Konstante) | 1,760 | ,219 | | 8,050 | ,000 |
| | Kreatinin | -,046 | ,054 | -,181 | -,862 | ,407 |
| | Größe | -,008 | ,002 | -,715 | -3,401 | ,006 |
| 3 | (Konstante) | 1,702 | ,206 | | 8,268 | ,000 |
| | Größe | -,010 | ,002 | -,830 | -5,149 | ,000 |
| a. Abhängige Variable: Kapillardichte | | | | | | |
| b. Ausschließliche Auswahl von Fällen, bei denen Gruppe = 2,00 | | | | | | |

4.3 VEGF-Rezeptoren

Die immunhistochemische Detektion der VEGF-Rezeptor-2-Dichte in den omentalen Gewebeschnitten erfolgte mit zwei unterschiedlichen Antikörpern, s. 3.2.3.4. Die Zielstruktur

des „rabbit anti-VEGFR-2“ (Dako, Glostrup, Dänemark) ist der zytoplasmatisch gelegene C-Terminus des VEGF-R-2. Der Antikörper „Mouse monoclonal anti-KDR/VEGFR 2 (LS-C122532)“ (LifeSpan Biosciences, Inc, Washington,USA) hat hingegen die extrazelluläre Domäne des VEGF-R-2 als Zielstruktur.

4.3.1 Intrazellulärer Anteil des VEGF-Rezeptor-2

In der quantitativen Auswertung der VEGF-Rezeptor-2-Dichte mit dem Antikörper gegen das C-terminale Epitop des Rezeptors zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe der niereninsuffizienten Kinder, s. Abbildung 28 .

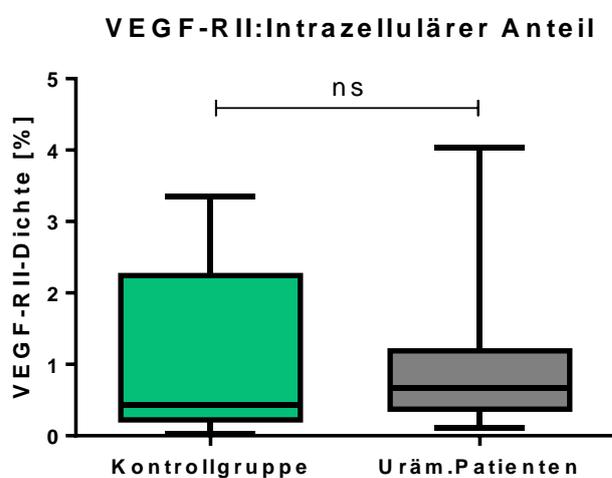


Abbildung 28: Vergleich des intrazellulären Anteils des VEGF-Rezeptor-2 im omentalen Gewebe nierengesunder und niereninsuffizienter Kinder. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Dargestellt als Box&Whiskers Plot mit Median.
Mann-Whitney Test: Median Kontrollen= 0,43% (der Gesamtfläche), Median niereninsuffiziente Gruppe=0,67% (der Gesamtfläche), $p^{ns}=0,6182$, $n=20$

Die Verteilung des intrazellulären Anteils des VEGF-Rezeptors 2 bezogen auf die Kapillardichte wurde mit Hilfe der VEGF-Rezeptor 2/CD 31-Ratio untersucht. Es zeigten sich diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede zwischen den urämischen und nierengesunden Kindern, s. Abbildung 29.

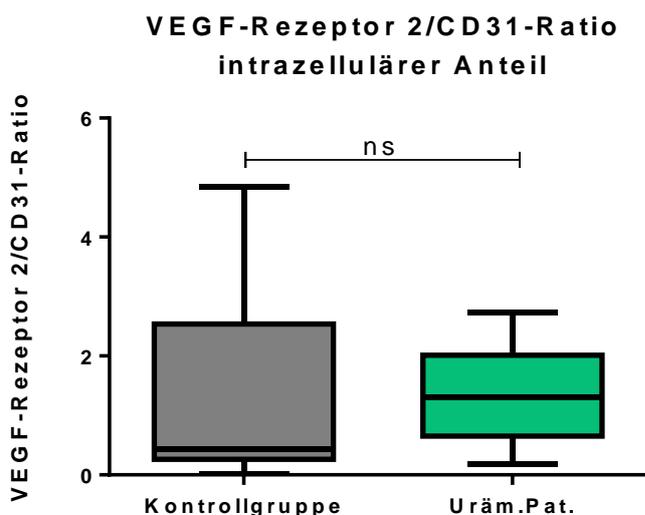


Abbildung 29: Vergleich der VEGF-Rezeptor 2/CD 31-Ratio für den intrazellulären Anteil des VEGF-Rezeptors 2 im omentalen Gewebe nierengesunder und niereninsuffizienter Kinder. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Dargestellt als Box&Whiskers Plot mit Median.
Mann-Whitney Test: Median Kontrollen= 0,44% (der Gesamtfläche), Median niereninsuffiziente Gruppe=1,31% (der Gesamtfläche), $p^{ns}=0,4727$, $n=20$

4.3.2 Extrazellulärer Anteil des VEGF-Rezeptor-2

Die Analyse des immunhistochemisch markierten extrazellulären Anteils des VEGF-Rezeptor-2 zeigte ebenso wie die Analyse des intrazellulären Anteils keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den urämischen Patienten, s. Abbildung 30.

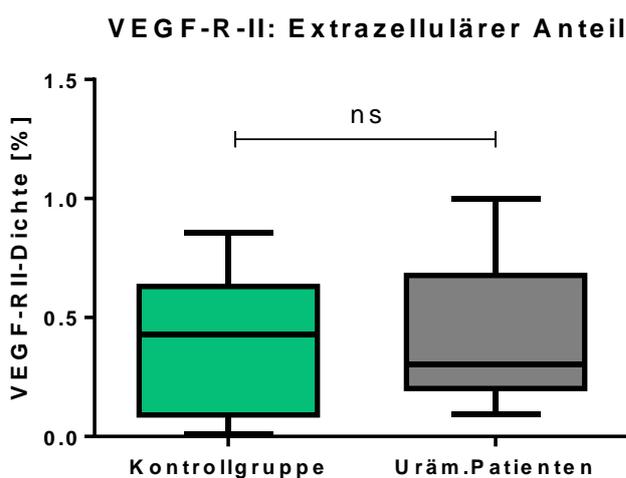


Abbildung 30: Vergleich des extrazellulären Anteils des VEGF-Rezeptor-2 im omentalen Gewebe nierengesunder und niereninsuffizienter Kinder. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Dargestellt als Box&Whiskers Plot mit Median.
Mann-Whitney Test: Median Kontrollen= 0,43% (der Gesamtfläche), Median uräm.Patienten= 0,3% (der Gesamtfläche), $p^{ns}=0,7796$, $n=20$

Auch in der VEGF-Rezeptor 2/CD 31-Ratio für den extrazellulären Anteil des VEGF-Rezeptors 2 fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen, s. Abbildung 31.

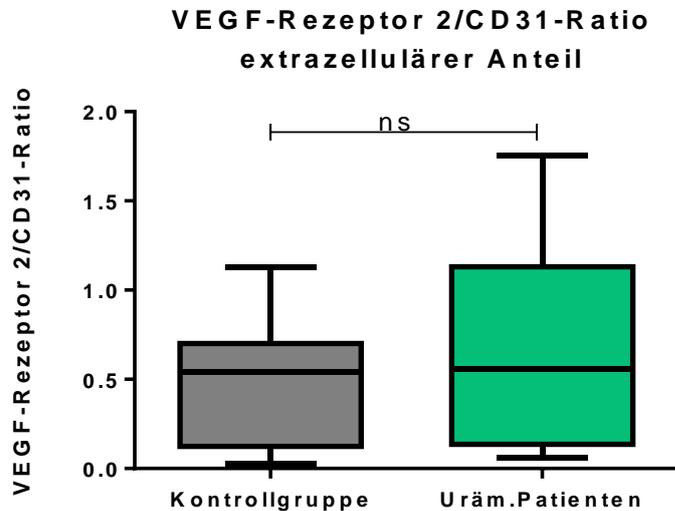


Abbildung 31: Vergleich der VEGF-Rezeptor 2/CD 31-Ratio für den extrazellulären Anteil des VEGF-Rezeptors 2 im omentalen Gewebe nierengesunder und niereninsuffizienter Kinder. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Dargestellt als Box&Whiskers Plot mit Median.
Mann-Whitney Test: Median Kontrollen=0,54, Median niereninsuffiziente Gruppe=0,56, $p^{ns}=0,5678$, $n=20$

4.4 Apoptose und Autophagie

Die immunhistochemische Untersuchung des Omentums zeigte keinen Anhalt für Apoptose oder Autophagie, weder bei der Kontrollgruppe noch bei den chronisch niereninsuffizienten Kindern, s. Abbildung 32.

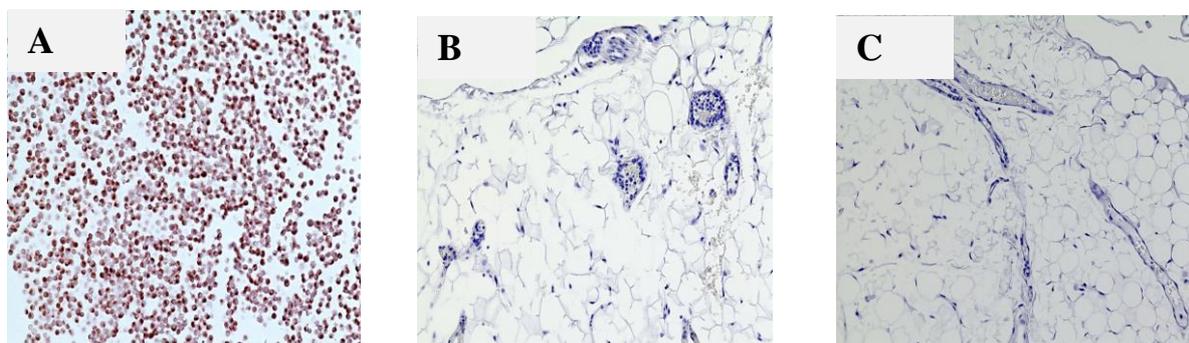


Abbildung 32 : Autophagie-Immunhistochemie mit dem Antikörper LC3A/B, 20fache Vergrößerung. Es zeigt sich in beiden Gruppen kein Hinweis für Autophagie.
A Positiv-Kontrolle (HeLa-Zellen) B Kontrollgruppe C niereninsuffiziente Kinder

Auch in der immunhistochemischen Analyse der Apoptose (Caspase-3-Antikörper) zeigte sich kein Hinweis für Apoptose im Omentum, s. Abbildung 33 (B). Als Positiv-Kontrolle dienten aortale Gewebeschnitte von 5/6 nephrektomierten und mit Calcium behandelten Ratten aus einer anderen Versuchsreihe der Arbeitsgruppe (Hecht *et al.*, 2016). Hier war eine deutliche Apoptose zu erkennen, s. Abbildung 33 (A).

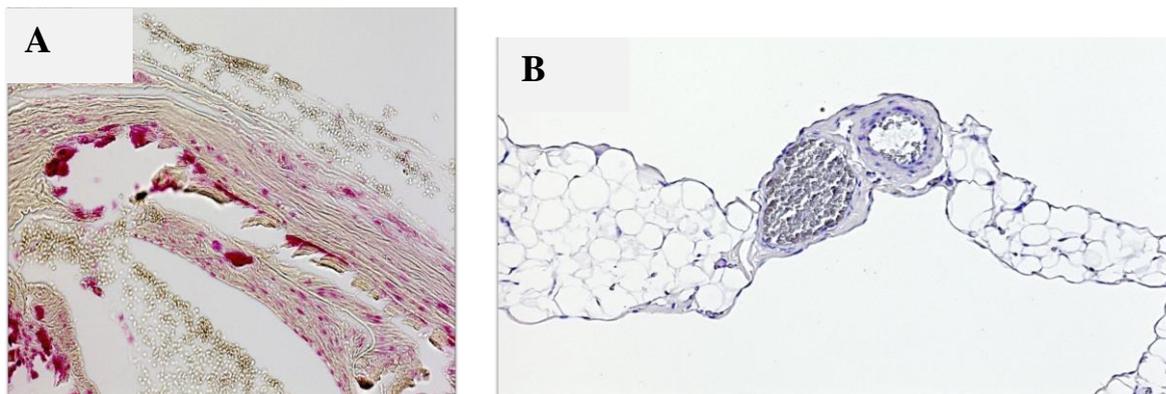


Abbildung 33: Apoptose-Immunhistochemie mit einem Caspase-3-Antikörper, 20fache Vergrößerung. Es zeigte sich kein Hinweis für Apoptose im Omentum niereninsuffizienter Kinder.

A Positivkontrolle, Ratten-Aorta von einer 5/6 nephrektomierten Ratte nach Calciumgabe aus einem anderen Versuch der Arbeitsgruppe mit deutlich zu erkennender Apoptose.

B Niereninsuffiziente Kinder, es zeigte sich kein Hinweis für Apoptose im Omentum.

4.5 Ergänzende immunhistochemische Untersuchungen

Ergänzend wurden von einer kooperierenden Arbeitsgruppe (Prof. Dr. med. C. P. Schmitt, Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Heidelberg) immunhistochemische Analysen von Podoplanin sowie von den an der Angiogeneseregulation beteiligten Proteinen VEGF-A, Angiopoietin 1 und 2 durchgeführt, um mögliche Mechanismen der kapillären Rarefizierung näher zu untersuchen.

4.5.1 Podoplanin

Zur Darstellung der Lymphkapillaren im Omentum wurde eine immunhistochemische Analyse der Gewebeschnitte mit einem Podoplanin-Antikörper (D2-40) durchgeführt. Da Podoplanin im Endothel von Lymphkapillaren nicht jedoch im Endothel von Blutgefäßen exprimiert wird, erlaubt diese immunhistochemische Methode den selektiven Nachweis von Lymphkapillaren. Es zeigte sich insgesamt nur eine geringe Anzahl Podoplanin positiver Bereiche, entsprechend einer geringen Anzahl von Lymphkapillaren im omentalem Gewebe. Auch fanden sich keine

Unterschiede in der Anzahl der Lymphkapillaren zwischen der Kontrollgruppe und den niereninsuffizienten Kindern (s. Abbildung 34).

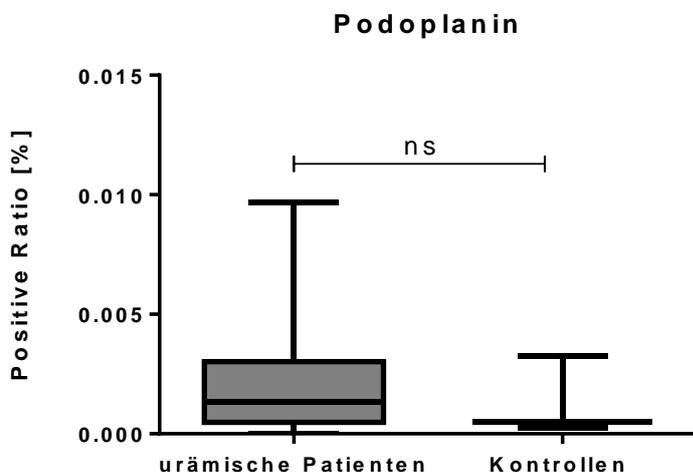


Abbildung 34: Vergleich der Lymphkapillaren (Podoplanin positiver Bereiche) im omentalen Gewebe nierengesunder und niereninsuffizienter Kinder. Es zeigte sich insgesamt nur eine geringe Anzahl Podoplanin positiver Bereiche, entsprechend einer geringen Anzahl von Lymphkapillaren im omentalem Gewebe. Auch fanden sich keine Unterschiede in der Anzahl der Lymphkapillaren zwischen der Kontrollgruppe und den niereninsuffizienten Kindern. Dargestellt als Box&Whiskers Plot mit Median. Daten der Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. C. P. Schmitt, Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Heidelberg.

Mann-Whitney Test: Median Kontrollen= 0,00% (der Gesamtfläche), Median uräm.Patienten= 0,00% (der Gesamtfläche), $p^{ns}=0,4965$, $n=13$ (3 Kontrollen und 10 uräm. Patienten).

4.5.2 VEGF-A

In der immunhistochemischen Analyse von VEGF-A zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den niereninsuffizienten und gesunden Kindern (s. Abbildung 35).

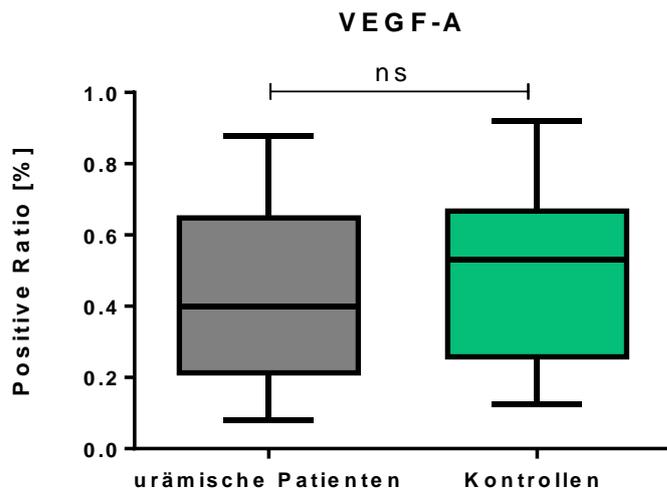


Abbildung 35: Vergleich der VEGF-A Dichte (Positiv-Ratio) im omentalen Gewebe nierengesunder und niereninsuffizienter Kinder. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Dargestellt als Box&Whiskers Plot mit Median. Daten der Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. C. P. Schmitt, Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Heidelberg.

Mann-Whitney Test: Median Kontrollen= 0,53% (der Gesamtfläche), Median uräm.Patienten= 0,4% (der Gesamtfläche), $p^{\text{ns}}=0,8189$, $n=31$ (11 Kontrollen und 20 uräm. Patienten).

4.5.3 Angiotensin 1 und 2

Auch in der Angiotensin 1-Expression zeigten sich in der immunhistochemischen Analyse keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den niereninsuffizienten Kindern ($p=0,3694$), s. Abbildung 36.

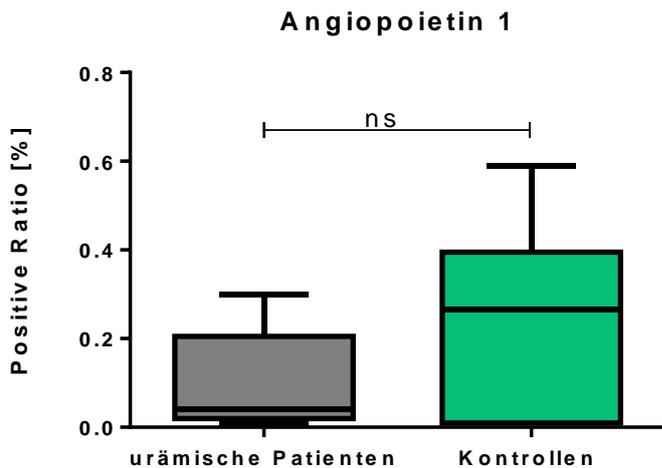


Abbildung 36: Vergleich der Angiopoietin 1 Dichte (Positiv-Ratio) im omentalen Gewebe nierengesunder und niereninsuffizienter Kinder. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Dargestellt als Box&Whiskers Plot mit Median. Daten der Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. C. P. Schmitt, Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Heidelberg.

Mann-Whitney Test: Median Kontrollen= 0,27% (der Gesamtfläche), Median uräm.Patienten= 0,04% (der Gesamtfläche), $p^{ns}=0,3694$, $n=15$ (6 Kontrollen und 9 uräm. Patienten).

Hingegen war die Angiopoietin 2-Expression im Omentum der niereninsuffizienten Kindern signifikant niedriger als bei der Kontrollgruppe ($p=0,0006$), s. Abbildung 37.

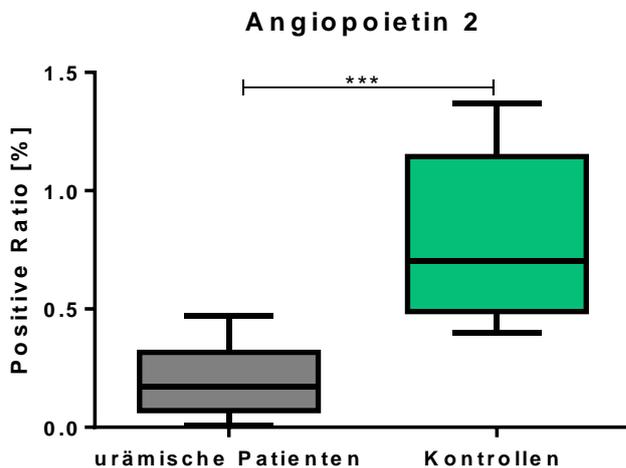


Abbildung 37: Vergleich der Angiopoietin 2 Dichte (Positiv-Ratio) im omentalen Gewebe nierengesunder und niereninsuffizienter Kinder. Es zeigte sich eine signifikant geringere Angiopoietin 2-Expression bei den urämischen Patienten. Dargestellt als Box&Whiskers Plot mit Median. Daten der Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. C. P. Schmitt, Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Heidelberg.

Mann-Whitney Test: Median Kontrollen= 0,71% (der Gesamtfläche), Median uräm.Patienten= 0,17% (der Gesamtfläche), $p^{***}=0,0006$, $n=16$ (6 Kontrollen und 10 uräm. Patienten).

Die Angiotensin 1-/Angiotensin 2-Ratio zeigte keine signifikanten Unterschiede ($p^{ns} = 0,4709$) zwischen den beiden Gruppen (niereninsuffizient vs. gesund). Sie lag bei den niereninsuffizienten Kindern im Mittel (Mean) bei $0,84 \pm 1,21$ vs. $0,26 \pm 0,22$ bei der Kontrollgruppe, s.a. Tabelle 15 und Abbildung 38.

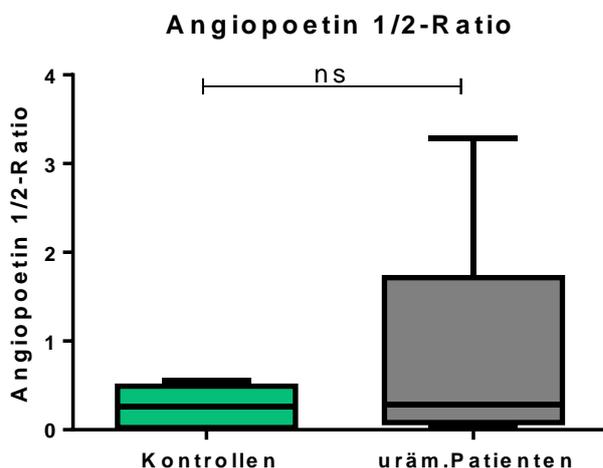


Abbildung 38: Vergleich der Angiotensin 1/2 -Ratio im omentalen Gewebe nierengesunder und niereninsuffizienter Kinder. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Dargestellt als Box&Whiskers Plot mit Median. Daten der Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. C. P. Schmitt, Zentrum für Kinder-und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Heidelberg.

Mann-Whitney Test: Median Kontrollen= 0,26% (der Gesamtfläche), Median uräm.Patienten= 0,29% (der Gesamtfläche), $p^{ns}=0,4709$, $n=14$ (6 Kontrollen und 8 uräm. Patienten).

Tabelle 15: Angiotensin 1-/Angiotensin 2-Ratio niereninsuffizienter und gesunder Kinder. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

| | Kontrollgruppe | Niereninsuffiziente Kinder |
|----------------|--------------------|----------------------------|
| Stichprobe (n) | 6 | 8 |
| Minimum | 0,02 | 0,03 |
| Median | 0,26 ^{ns} | 0,29 ^{ns} |
| Maximum | 0,55 | 3,29 |
| Mean | 0,26 | 0,84 |
| SD | 0,22 | 1,21 |

Mann-Whitney: $p^{ns}=0,3129$, $n= 14$

5 Diskussion

In dieser Arbeit konnten strukturelle Veränderungen der Mikrozirkulation im Sinne einer kapillären Rarefizierung bei Kindern mit chronisch terminaler Niereninsuffizienz (CKD 5) nachgewiesen werden. Es zeigte sich im Mittel eine fast 50%-ige Reduktion der Kapillardichte bei chronisch niereninsuffizienten Kindern vor Initiierung einer Dialysetherapie als Zeichen einer ausgeprägten Rarefizierung des mikrozirkulatorischen Netzwerkes. Diese ausgeprägte Rarefizierung der Mikrozirkulation bestätigte sich auch in einer zweiten Messung mit einer anderen Methode durch einen unabhängigen Untersucher.

Veränderungen des kardiovaskulären Systems und ihr Einfluss auf die erhöhte Morbidität und Mortalität chronisch nierenkranker Menschen konnten in verschiedenen Studien gezeigt werden. Die Rolle von Veränderungen der Mikrozirkulation in diesem Zusammenhang ist bisher nicht ausreichend geklärt, jedoch gibt es eine akkumulierende Evidenz dafür, dass die frühesten Manifestationen kardiovaskulärer Erkrankungen auf der Ebene der Mikrozirkulation stattfinden. Die Mikrovaskulatur umfasst eine enorme endotheliale Oberfläche und ist in viele Funktionen des kardiovaskulären Systems eingebunden wie dem Flüssigkeits- und Nährstoffaustausch, der Regulation der Perfusion, Hämostase und Koagulation, der Entzündungsreaktion sowie der Angiogenese (Pries *et al.*, 2000). Bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz wurde eine endotheliale Dysfunktion in zahlreichen Untersuchungen gefunden (Fliser *et al.*, 2011), aber morphologische Biopsie-basierte Untersuchungen der Mikrozirkulation fehlen bis heute. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass eine chronische Niereninsuffizienz bei Kindern mit einer ausgeprägten Rarefizierung der Mikrozirkulation im Omentum verbunden ist. Dieser Befund bestätigte sich auch in einer zweiten Untersuchung mit einer vollautomatisierten Auswertungsmethode durch eine unabhängige Arbeitsgruppe aus Heidelberg.

5.1 Studienpopulation

Die hier untersuchten niereninsuffizienten Kinder wurden präterminal im Stadium 5 der CKD, d.h. vor Beginn einer Peritonealdialyse-Behandlung rekrutiert. Hiermit konnte ein Einfluss der Dialyse auf die untersuchte Mikrozirkulation als Störvariable ausgeschlossen werden. Dass eine Dialysetherapie mit Veränderungen der Mikrozirkulation einhergeht, konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden. Chung *et al.* fanden bei Hauptbiopsien im Rahmen einer Nierentransplantation eine erhöhte Steifigkeit der Arteriolen von dialysierten gegenüber präemptiv transplantierten Patienten (Chung *et al.*, 2010). In einer Studie von Farkas *et al.*, die

die endotheliale Funktion von Patienten mit essentieller Hypertonie und Hämodialysepatienten mit Hypertonie im Vergleich zu normotensiven Kontrollen untersuchte, zeigte sich eine gestörte endothelabhängige Vasodilatation bei der Hämodialysegruppe im Vergleich zu gesunden Kontrollen und Patienten mit essentieller Hypertonie (Farkas *et al.*, 2005). Auch Ghiadoni *et al.* konnten eine gestörte endothelabhängige Vasodilatation von Patienten mit Dialysetherapie nicht nur im Vergleich zu gesunden Kontrollen, sondern auch zu Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ohne Dialysetherapie zeigen (Ghiadoni *et al.*, 2004). Diese Studien unterstreichen die Notwendigkeit, Veränderungen der Mikrozirkulation vor Beginn einer Dialysetherapie zu untersuchen, um den Einfluss der Urämie ohne Beeinflussung durch eine Dialysetherapie beobachten zu können.

In der hier untersuchten Studienpopulation waren angeborene Erkrankungen mit Abstand die häufigste Ursache der chronischen Niereninsuffizienz. Dies entspricht der in der Literatur angegebenen Verteilung der häufigsten Ursachen der Niereninsuffizienz im Kindesalter (Harambat *et al.*, 2012), wodurch eine gute Vergleichbarkeit mit Ergebnissen anderer Studien an chronisch niereninsuffizienten Kinder besteht.

Durch die kontrollierte Auswahl der Studienteilnehmer im Sinne einer matched case-control study (Kontrollgruppe vs. niereninsuffiziente Kinder) konnte eine gute Vergleichbarkeit der Gruppen hinsichtlich der anthropometrischen Daten erreicht werden. So zeigte sich zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe der niereninsuffizienten Kinder ein vergleichbares durchschnittliches Gewicht, Körperoberfläche und ein vergleichbarer (alters- und geschlechtsbezogener) BMI-SDS. Dies unterstreicht die Annahme, dass die gefundenen Unterschiede in der Kapillardichte zwischen den beiden Gruppen auf die chronische Niereninsuffizienz und nicht auf Unterschiede der anthropometrischen Daten zurückzuführen sind.

Hinsichtlich der Grunderkrankungen und durchgeführten Operationen der nierengesunden Kontrollen bestanden Unterschiede zwischen den Kindern, die in der Charité-Universitätsmedizin Berlin und der Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Heidelberg rekrutiert wurden. Diese Unterschiede lassen sich mit den unterschiedlichen Behandlungsschwerpunkten der Universitätskliniken erklären. So gehören u.a. anorektale Malformationen zu den Spezialisierungsschwerpunkten der Kinderchirurgie der Charité-Universitätsmedizin Berlin, weshalb der Hauptteil der Kinder mit dieser Diagnose von dort stammte. Hingegen kamen die Kinder mit Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes, wie der gastroösophagealen Refluxkrankheit, hauptsächlich aus dem Universitätsklinikum Heidelberg.

5.2 Methodik

Die in dieser Arbeit gewählte Methode der Gefäßdarstellung mit Hilfe der CD 31-Immunhistochemie mit dem monoklonalen Antikörper JC70 findet eine breite Anwendung zur Darstellung benigner und maligner vaskulärer Prozesse (Parums *et al.*, 1990; Kuzu *et al.*, 1992), und der Antikörper zeigt eine gute Sensitivität und Spezifität als endothelialer Marker (Orre *et al.*, 1998). Durch die zusätzliche immunhistochemische Analyse mit dem selektiven lymphatischen Endothel-Marker Podoplanin (Breiteneder-Geleff *et al.*, 1999) konnte die Anzahl der Lymphgefäße im Omentum untersucht werden. Die geringe Gesamtzahl an Lymphkapillaren sowie die fehlenden Unterschiede zwischen den Gruppen spricht dafür, dass die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse zur Kapillardichte nicht durch den Einfluss von Lymphkapillaren beeinträchtigt wurden. Ein Messfehler bei der Beurteilung der Kapillardichte durch den Einfluss von Lymphkapillaren konnte damit berücksichtigt bzw. weitgehend ausgeschlossen werden.

Zur Untersuchung der Apoptose in den omentalen Gewebeschnitten wurde eine immunhistochemische Darstellung mit einem Caspase-3 Antikörper gewählt, der die langen Fragmente der aktivierten Caspase-3 erkennt, die nach Spaltung neben Asparaginsäure an der Position 175 entstehen und eine der wichtigsten Effektorcaspasen in der Apoptose-Kaskade darstellt. Die Aktivierung der Caspase-3 als gemeinsame Endstrecke der verschiedenen Apoptosewege (Watanabe *et al.*, 2002) gilt als ein spezifischer Indikator des Apoptoseprozesses. Die Detektion eines gespaltenen Anteils der aktivierten Caspase-3 kann somit als sensitive und spezifische Methode genutzt werden, um Apoptose in Gewebe darzustellen (Gown & Willingham, 2002).

Als Marker der Autophagie im untersuchten Gewebe wurde ein Antikörper benutzt, der die Leichtketten-Isoformen 3A und 3B des Mikrotubuli assoziierten Proteins 1 erkennt (LC3A/B) und gebräuchlich in der Darstellung von Autophagie in Geweben ist (Kabeya *et al.*, 2000; Kabeya *et al.*, 2004). Die Limitation einer statischen Messung der Autophagie, wie der in dieser Arbeit benutzten immunhistochemischen Analyse, als hochdynamischer Prozess muss in der Interpretation der Ergebnisse jedoch berücksichtigt werden.

5.2.1 Validität und Reproduzierbarkeit der Messmethode

Die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse der manuellen Auswertungsmethode durch den gleichen Untersucher sowie durch einen zweiten Untersucher war mit einer akzeptablen Variabilität behaftet, wodurch eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse der Kapillardichtemessung bei Wiederholung des Messvorgangs erreicht werden konnte. Dies

bestätigte auch die Analyse mit der Bland-Altman Methode, die eine geringe Streuung der Messwertdifferenzen und der Intra- und Interobserver-Variabilität (Bias) zeigte. Hierbei war die Übereinstimmung bei Messwiederholung durch den gleichen Untersucher besser als bei Messwiederholung durch einen zweiten Untersucher.

Die manuelle Analyse der Mikrozirkulation respektive der Kapillaren mittels des Digitalmikroskops BZ-9000 und Analyzer Software®-II, wie oben beschrieben, erbrachte vergleichbare Ergebnisse wie die vollautomatisierte Bildanalyse (Aperio® Precision Image Analysis Software) durch unabhängige Untersucher der Heidelberger Arbeitsgruppe. Mit beiden Auswertungsmethoden zeigte sich eine signifikant reduzierte Kapillardichte bei urämischen Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im Methodenvergleich mit Hilfe der Bland-Altman Methode ließ sich jedoch eine zunehmende Variabilität bei zunehmender Kapillardichte zwischen den beiden Auswertungsverfahren erkennen. Unterschiede zeigten sich auch im Median der unterschiedlichen Auswertungsverfahren. So waren der Median der Kapillardichte bei der vollautomatisierten Messmethode höher als bei der manuellen Auswertung. Dies könnte sich darin begründen, dass eine manuelle Auswahl der Gefäße eine genauere Selektion ermöglicht als dies bei einer vollautomatisierten Auswahl möglich ist, z.B. durch Ausschluss möglicher Artefakte. Ein Nachteil der manuellen Auswertungsmethode gegenüber einer vollautomatisierten Auswertung könnte - neben einem prinzipiellen subjektiven Fehler bei nicht-verblindeter Auswertung - eine mögliche geringere Standardisierung der Auswahl-bzw. Ausschlusskriterien der zu selektionierenden Gefäße darstellen.

5.3 Kapillardichte

Veränderungen der Mikrozirkulation funktioneller und struktureller Art könnten eine der zentralen Ursachen für die erhöhte kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz darstellen. Die untersuchte omentale Mikrozirkulation in dieser Arbeit zeigte eine signifikant geringere Kapillardichte bei urämischen Kindern im Vergleich zu nierengesunden Kindern. Defizite der Mikrozirkulation, funktioneller oder struktureller Art, führen durch eine defizitäre Gewebeversorgung letztendlich zu Endorganschäden (Lockhart *et al.*, 2009).

Das Omentum stellt ein gut vaskularisiertes Gewebe mit hoher metabolischer Aktivität dar und dient als Quelle angiogener Faktoren (Singh *et al.*, 2008; Collins *et al.*, 2009). Bisher gibt es keine Untersuchungen der Gefäßdichte im omentalen Gewebe bei Kindern oder Erwachsenen mit chronischer Niereninsuffizienz. Bei adipösen Patienten und im Tiermodell der Adipositas

wurde eine mikrovaskuläre Rarefizierung im Fettgewebe beschrieben. Es zeigte sich, dass die Zunahme des Fettgewebes mit einer Gewebehypoxie verbunden ist, die durch eine gestörte angiogene Antwort bedingt wird. Diese Störungen der Mikrozirkulation fördern eine Inflammationsreaktion des Gewebes mit Makrophagen-Infiltration und einer erhöhten Expression inflammatorischer Zytokine (Pasarica *et al.*, 2009; Shimizu *et al.*, 2014). Ebenso zeigen Studien zu akutem Nierenversagen und chronischer Niereninsuffizienz, dass eine mikrovaskuläre Rarefizierung zu chronischer Gewebehypoxie, interstitieller Inflammation und Fibrose führt (Campanholle *et al.*, 2013). Auf diesem Wege könnte die in dieser Arbeit gezeigte kapilläre Rarefizierung zu einer systemischen Inflammation führen, die als Kennzeichen einer chronischen Niereninsuffizienz gilt und ein grundlegender Mechanismus bei der Entstehung eines „urämischen Phänotyps“ ist, der durch erhöhten oxidativen Stress, Gefäßverkalkungen, vorzeitiger Alterung und der hohen Mortalität infolge kardiovaskulärer Erkrankungen gekennzeichnet ist (Kooman *et al.*, 2014).

Die kapilläre Rarefizierung im Omentum bei Kindern aller Altersklassen könnte eine systemische Urämie-induzierte Pathogenese widerspiegeln. Unterstützt wird diese Annahme von Untersuchungen der kapillären Gefäßdichte in verschiedenen anderen Organen bei chronischer Niereninsuffizienz.

So finden sich Veränderungen der Mikrozirkulation auch im Tiermodell der Urämie. Amann *et al.* untersuchten die myokardiale Mikrozirkulation bei 5/6 nephrektomierten Ratten und fanden eine signifikante Abnahme der Längen- und Oberflächendichte der Kapillaren bei den urämischen Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe (Amann *et al.*, 1992). In einer weiteren Studie von Amann *et al.*, wiederum an 5/6 nephrektomierten Ratten, die jedoch dieses Mal eine moderate Niereninsuffizienz über eine kurze Zeitspanne hatten, wurde die myokardiale Mikrozirkulation im Vergleich zur Mikrozirkulation im Skelettmuskel analysiert (Amann *et al.*, 1997). Auch hier fand sich eine gestörte Kapillarisation im Herzmuskel, dagegen zeigten sich keine Veränderungen im Skelettmuskel. Hieraus leiteten die Autoren die Schlussfolgerung ab, dass die gefundenen Veränderungen der Mikrozirkulation aufgrund lokal wirkender Mechanismen in diesem Gewebe auf das Myokard beschränkt seien. Dieser Theorie einer auf das Herzmuskelgewebe beschränkten Veränderung der Mikrozirkulation widersprechen die Ergebnisse einer Studie von Flisiński *et al.* (Flisiński *et al.*, 2008). Auch hier wurde die Mikrozirkulation im Skelettmuskel bei 5/6 nephrektomierten Ratten untersucht. Zusätzlich gab es auch eine Gruppe mit milder Niereninsuffizienz (1/2 nephrektomiert). Im Gegensatz zu der

Studie von Amann et al. (Amann *et al.*, 1997) fanden sich in beiden Gruppen, d.h. bereits bei milder Niereninsuffizienz, eine kapilläre Rarefizierung im Skelettmuskel. Ob diese abweichenden Ergebnisse, wie von den Autoren vermutet, durch unterschiedliche experimentelle Bedingungen und Analysemethoden begründet sind, kann nur vermutet werden. Dass aber diese Ergebnisse die Hypothese einer auf das Myokard beschränkten Störung der Mikrozirkulation in Frage stellen, scheint naheliegend.

Die Frage nach der Übertragbarkeit der im Tiermodell gefundenen Veränderungen auf den Menschen muss mit Recht gestellt werden und kann nur durch Studien, die diese Veränderungen beim Menschen untersuchen, beantwortet werden. Mehrere Studien untersuchten die Mikrozirkulation des Myokards beim Menschen. Amann et al. verglichen in ihrer Studie die Kapillardichte post mortem bei Dialysepatienten, Patienten mit Hypertonie und normotensiven Kontrollen (Amann *et al.*, 1998). Es zeigte sich eine reduzierte Kapillardichte der niereninsuffizienten Patienten im Vergleich zu den normotensiven Kontrollen sowie zu den Patienten mit Hypertonie. Drei weitere Studien am Myokard (Tok *et al.*, 2005; Chade *et al.*, 2006; Bozbas *et al.*, 2009) beschäftigten sich anhand der koronaren Flussreserve mit dem funktionellen Status der Mikrozirkulation. Alle drei Studien fanden eine reduzierte koronare Flussreserve bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz als Zeichen einer gestörten Mikrozirkulation. Dem gegenüber stehen die Ergebnisse von einer Studie von Charytan et al. (Charytan *et al.*, 2010). Diese untersuchten in ihrer Studie zur koronaren Mikrozirkulation neben der koronaren Flussreserve auch den myokardialen Blutfluss in Ruhe und nach Adenosingabe. Sie fanden zwar ebenfalls eine verminderte koronare Flussreserve bei Patienten mit milder bis moderater Niereninsuffizienz, dieser Zusammenhang blieb nach Adjustierung für andere kardiovaskuläre Risikofaktoren jedoch nicht signifikant. Ebenfalls ließ sich kein signifikanter Unterschied beim myokardialen Blutfluss in Ruhe und nach Adenosingabe zwischen Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und der Kontrollgruppe finden. Doch in einer Follow-up Untersuchung nach einem Jahr zeigte sich ein Trend zu einem geringeren myokardialen Spitzenfluss bei zunehmender Niereninsuffizienz als auch eine Assoziation zwischen abnehmender Kreatinin-Clearance und einem höheren Rückgang der koronaren Flussreserve. In Anbetracht dieser z.T. widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich Veränderungen der myokardialen Mikrozirkulation bei chronischer Niereninsuffizienz müssen verschiedene Aspekte betrachtet werden. Die Messungen der myokardialen Mikrozirkulations-Parameter erfolgten in den erwähnten Studien z.T. mit unterschiedlichen Methoden. Die Studien von Tok et al. und Bozbas et al. verwendeten die transthorakalen Echokardiografie, Charytan et al. benutzten die

Positronenemissionstomografie und Chade et al. die invasive Koronarangiografie. Auch hinsichtlich der Studienpopulation gibt es Unterschiede zwischen den erwähnten Studien. So untersuchten Tok et al. und Bozbas et al. terminal niereninsuffiziente Patienten, Chade et al. und Charytan et al. hingegen Patienten mit milder bzw. milder bis moderater Niereninsuffizienz. Dass die gefundenen Veränderungen bei Patienten mit milder bis moderater Niereninsuffizienz einen schwächeren Zusammenhang mit der Nierenfunktion zeigen und z.T. bei Adjustierung für andere kardiovaskuläre Risikofaktoren ihre Signifikanz verlieren, lässt vermuten, dass erst bei fortgeschrittenen Niereninsuffizienz Störungen der myokardialen Mikrozirkulation klinisch nachweisbar sind. In diesem Zusammenhang wären Studien sinnvoll, die differenziert die unterschiedlichen Stadien der Niereninsuffizienz auf begleitende Veränderungen der myokardialen Mikrozirkulation hin untersuchen. Erwähnenswert ist die Tatsache, dass bei den erwähnten Studien, mit Ausnahme der Studie von Charytan et al., Patienten ausgeschlossen wurden, die bereits eine bekannte kardiovaskuläre Erkrankung hatten. Dies unterstützt die Annahme, dass mikrovaskuläre Veränderungen bei chronischer Niereninsuffizienz makrovaskulären Erkrankungen vorausgehen und sich vor einer klinischen Manifestation nachweisen lassen. Auch die in dieser Arbeit gezeigten Veränderungen der Mikrozirkulation waren ausgeprägter als Veränderungen der Makrovaskulatur bei pädiatrischen Präodialyse-Patienten, bei denen sich in arteriellen Biopsien die Gefäße histologisch noch normal darstellten (Shroff *et al.*, 2008). Dies hat insbesondere in Hinblick auf eine frühe Diagnostik und damit einer frühzeitigen Therapie vor Manifestation von makrovaskulären Erkrankungen erhebliche klinische Relevanz.

Die Hypothese einer generalisierten Störung der Mikrozirkulation bei Niereninsuffizienz wird durch Studien gestützt, die sich mit der Mikrozirkulation anderer Gefäßgebiete als dem myokardialen Gefäßbett beim Menschen beschäftigen. Zu den am häufigsten untersuchten Kapillargebieten gehört neben der Haut und Nagelfalz auch die Retina. Beiden Stromgebieten gemein ist die gute Erreichbarkeit und somit die Möglichkeit einer nicht-invasiven Untersuchungstechnik. Zudem konnte für verschiedene Erkrankungen gezeigt werden, dass Veränderungen der Retina (Ooi *et al.*, 2011) und der Haut (Stewart *et al.*, 2004; Holowatz *et al.*, 2008) mit Veränderungen anderer Gefäßgebiete einhergehen und somit als potentieller Surrogat-Parameter für die allgemeine Mikrozirkulation geeignet scheinen.

In einer Studie von Ooi et al. (Ooi *et al.*, 2011) wurde die retinale Mikrozirkulation von Patienten mit CKD Stadium 3-5 analysiert. Es zeigten sich Veränderungen der Mikrozirkulation im Sinne verengter retinaler Arteriolen und Venolen, die sich mit zunehmender

Verschlechterung der Nierenfunktion weiter verstärkten. Auch Sabanayagam et al. (Sabanayagam *et al.*, 2009) fanden einen Zusammenhang von verengten retinalen Arteriolen und chronischer Niereninsuffizienz. Neben einer Verengung retinaler Arteriolen konnten Baumann et al. (Baumann *et al.*, 2009) zeigen, dass diese Veränderungen der retinalen Mikrozirkulation auch als Prädiktoren der renalen Funktion geeignet sind. Dass Veränderungen der Mikrozirkulation nicht auf die Retina beschränkt sind, wird durch Studienergebnisse an dem Nagelfalz untermauert. Nissel et al. (Nissel *et al.*, 2009) fanden eine reduzierte maximale post-ischämische Erythrozyten-Flussgeschwindigkeit bei Patienten mit CKD Stadium 3-5 im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Neben einer funktionellen Störung der Mikrozirkulation konnten Thang et al. (Thang *et al.*, 2011) auch strukturelle Veränderungen im Sinne einer reduzierten Kapillardichte bei fortgeschrittener chronischer Niereninsuffizienz finden. Ähnliche Ergebnisse zeigen auch Untersuchungen an der Haut des Unterarmes. In einer Studie von Farkas et al. (Farkas *et al.*, 2005) konnte eine gestörte endotheliale Funktion der Mikrozirkulation der Unterarmhaut von Patienten mit essentieller Hypertonie und Dialysepatienten mit Hypertonie im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachgewiesen werden. Unterschiede zwischen den Patienten mit essentieller Hypertonie und Dialysepatienten mit Hypertonie bestanden jedoch nur bei einem Teil der durchgeführten Untersuchungen zur endothelialen Funktion. So war die endothel-unabhängige Vasodilatation nach Nitropussidnatriumgabe und die endothel-abhängige Vasodilatation nach zweifacher Gabe von Acetylcholin in der Gruppe der Hämodialysepatienten mit Hypertonie nicht nur im Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe, sondern auch im Vergleich mit den Patienten mit essentieller Hypertonie verringert. Alle anderen funktionalen Testungen zeigten keinen Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen, wodurch der Einfluss der Hypertonie auf die gezeigte endotheliale Dysfunktion an Bedeutung gewinnt. Stewart et al. (Stewart *et al.*, 2004) unterteilten die untersuchten Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz in Subgruppen mit Diabetes und/oder bekannten kardialen Erkrankungen und ohne diese beiden Komorbiditäten. Zwar ließ sich kein signifikanter Unterschied bei Patienten ohne Diabetes und bekannten kardiovaskulären Erkrankungen erkennen, doch stellten sich bei knapp der Hälfte dieser Patienten Abnormitäten der gemessenen Parameter als Hinweis auf eine gestörte endotheliale Funktion bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ohne begleitende Komorbidität im Sinne eines Diabetes oder einer kardialen Vorerkrankung dar.

Fasst man die Beobachtungen der verschiedenen Kapillargebiete zusammen, zeigt sich eine gute Evidenzlage für eine Pathologie der Mikrozirkulation bei chronischer Niereninsuffizienz bei Erwachsenen und im Tiermodell der Urämie. Im überwiegenden Anteil der Studien lässt sich

eine signifikante Verminderung der Mikrovaskulatur bzw. Kapillardichte bei chronischer Niereninsuffizienz nachweisen. Und auch in Studien, denen dieser Nachweis nicht gelingt, finden sich Abnormitäten der Mikrozirkulation der niereninsuffizienten Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Diese Daten sprechen zusammengefasst für das Vorliegen einer systemischen urämischen Mikroangiopathie. Diese Hypothese könnte ein wichtiger Baustein sein, um die Pathophysiologie der extrem erhöhten Mortalität infolge kardiovaskulärer Erkrankungen bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz zu verstehen, die durch traditionelle Risikofaktoren allein nicht zu erklären ist und wichtige Unterschiede in Klinik und Pathologie gegenüber der klassischen Atherosklerose aufweist (Drüeke & Massy, 2010). Eine mikrovaskuläre Dysfunktion, struktureller oder funktioneller Art, könnte durch eine unzureichende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Gewebe und einem unzureichenden Abtransport von Stoffwechselprodukten und konsekutiver Schädigung des Gewebes, einen wichtigen pathophysiologischen Erklärungsmechanismus liefern.

Bei Kindern gibt es bisher nur wenige Studien zu endothelialen Dysfunktion bzw. Veränderungen der Mikrozirkulation. Aber insbesondere diese Patientengruppe erscheint wichtig, um die Pathophysiologie der mikrovaskulären Veränderungen bei chronischer Niereninsuffizienz besser verstehen zu können. Denn potentielle Einflussfaktoren auf die Mikrozirkulation wie Rauchen, Diabetes und Alterungsprozesse spielen in dieser Population faktisch keine Rolle. Zum anderen ist besonders in dieser Altersgruppe die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität im Vergleich zur gesunden gleichaltrigen Population exzessiv erhöht (Lilien & Groothoff, 2009) und fordert Verbesserungen im Verständnis und der Therapie kardiovaskulärer Veränderungen.

Eine Studie von Kari et al. (Kari *et al.*, 1997) beschäftigte sich mit der endothelialen Funktion bei Kindern mit chronischer Niereninsuffizienz anhand der endothel-abhängigen Dilatation der Arteria brachialis. Es zeigte sich eine endotheliale Dysfunktion bei den Kindern mit chronischer Niereninsuffizienz im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Auch eine Studie von Briese et al. bei jungen Erwachsenen mit terminaler Niereninsuffizienz seit dem Kindesalter konnte einen um 40% reduzierten postischämischen Spitzenfluss als Zeichen einer endothelialen Dysfunktion zeigen. Diese Veränderungen zeigten eine signifikante Korrelation mit der Zeit der Nierenersatztherapie (Briese *et al.*, 2006). Da nach neueren Erkenntnissen Veränderungen der Mikrozirkulation bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen meist frühzeitig zu sehen sind, bevor sich Veränderungen der großen Gefäße oder Endorganschäden manifestieren

(Clough, 2015), ist in diesem Zusammenhang die Studienlage zur Mikrozirkulation von besonderem Interesse. Edwards-Richards et al. (Edwards-Richards *et al.*, 2014) untersuchten die Mikrozirkulation pädiatrischer Hämodialysepatienten anhand der Nagelfalz-Mikroskopie. Es zeigte sich eine signifikante Rarefizierung der Kapillardichte bei den Hämodialysepatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei den funktionellen Parametern, wie der maximalen Perfusion und dem Rekrutment nach Stimulation, fanden sich hingegen keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Diese Ergebnisse eines strukturellen kapillären Defizits an dem Nagelfalz bei pädiatrischen Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz unterstützen die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse einer kapillären Rarefizierung im Omentum im Sinne einer systemischen urämischen Mikroangiopathie bei chronischer Niereninsuffizienz. Wobei an dieser Stelle angemerkt sei, dass in der Studie bei Edwards-Richards et al. die Patienten bereits eine Dialysetherapie erhielten und somit ein Einfluss der Dialyse auf die Mikrozirkulation als Störvariable („Confounder“) nicht ausgeschlossen werden kann. Auch waren die pädiatrischen Patienten deutlich älter ($16,6 \pm 3,5$ Jahre) als in der vorliegenden Arbeit ($7,3 \pm 5,7$). Doch trotz dieser Differenzen im Studiendesign lassen die Ergebnisse vermuten, dass die im Tiermodell der Urämie und bei erwachsenen CKD Patienten gefundenen Störungen der Mikrozirkulation auch in der pädiatrischen Population bei chronischer Niereninsuffizienz vorzuliegen scheinen.

5.3.1 Zusammenhang der Kapillardichte mit klinischen und laborchemischen Parametern

Zum besseren Verständnis der Pathophysiologie der mikrovaskulären Rarefizierung bei chronischer Niereninsuffizienz kann der Zusammenhang mit klinischen und laborchemischen Parametern mögliche Hinweise liefern.

5.3.1.1 Einfluss des Alters und anthropometrischen Parameter auf die Kapillardichte

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich sowohl bei den niereninsuffizienten als auch bei den gesunden Kindern eine altersabhängige Abnahme der Kapillardichte. Demzufolge zeigte sich auch bei den anthropometrischen Parametern wie der Körperoberfläche, dem Gewicht und der Körperlänge eine inverse Assoziation mit der Kapillardichte. Dies zeigt einen wichtigen Einfluss der körperlichen Entwicklung auf das Kapillarangebot im Omentum und scheint für eine altersabhängige Abnahme der Kapillardichte zu sprechen, mit der höchsten Kapillardichte bei jüngeren Kindern und einer kontinuierlichen Abnahme im Alter. Wie sich diese Entwicklung im Erwachsenenalter fortsetzt, ist fraglich. In der Literatur finden sich nur wenige Studien, die sich

mit der Altersabhängigkeit der Kapillardichte beschäftigen. Eine Studie von Dolezalova et al. (Dolezalova *et al.*, 2003) untersuchte die Kapillardichte bei Kindern mit rheumatischer Erkrankung, gesunden Kindern und gesunden Erwachsenen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der eigenen Arbeit zeigte sich in dieser Studie eine zunehmender Kapillardichte mit dem Alter. Einschränkend muss die geringe Gruppengröße der gesunden Kinder von 17 in der Studie genannt werden, die einen Grund für die abweichenden Ergebnisse sein könnte. In einer größeren Studie von Herrick et al. (Herrick *et al.*, 2000) an 110 gesunden Kinder wurde ebenfalls mit der Nagelbettmikroskopie der Einfluss des Alters auf das Kapillarbett untersucht. Im Gegensatz zu der Studie von Dolezalova et al. zeigten sich hier keine Unterschiede der Kapillardichte in den unterschiedlichen Altersgruppen. Jedoch wurden hier nur die Altersgruppen zwischen 6-15 Jahren untersucht, im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, in der die Altersgruppe bis 2 Jahre die größte Zahl ausmacht.

In einer kürzlich publizierten Studie zur morphologischen Charakteristik des Peritoneums bestätigte sich die in dieser Arbeit gefundene Altersabhängigkeit der Kapillardichte. Es zeigte sich eine U-förmige Verteilung mit der höchsten Kapillardichte bei Kindern unter einem Jahr und bei Erwachsenen (Schaefer *et al.*, 2016).

In der eigenen Arbeit stellte sich in einer multiplen Regressionsanalyse jedoch nicht wie anfangs vermutet das Alter als bester Prädiktor für die Kapillardichte innerhalb der anthropometrischen Parameter dar, sondern die Größe. Bei den niereninsuffizienten Kindern zeigte sich neben der Größe auch die Körperoberfläche als guter Prädiktor der Kapillardichte. Da diese Parameter eine altersabhängige Entwicklung zeigen, widersprechen diese Ergebnisse nicht einer Altersabhängigkeit der Kapillardichte im Kindesalter, aber die Größe bzw. die Körperoberfläche scheinen in diesem Zusammenhang einen größeren prädiktiven Wert zu besitzen als das Alter selbst. Für einen Einfluss des Alters auf die Kapillardichte spricht auch die fehlende Korrelation der BMI-SDS-Werte mit der Kapillardichte, bei deren Berechnung bereits eine Altersabhängigkeit berücksichtigt ist. Ob die Gefäßdichte bei Kindern abhängig vom Volumen des viszeralen Fettgewebes ist, kann nicht eindeutig beantwortet werden. Sowohl bei Erwachsenen (Carroll *et al.*, 2008) als auch bei Kindern (Brambilla *et al.*, 2006) ist der BMI eng verbunden mit dem Anteil des viszeralen Fettgewebes. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich nur bei der gesunden Kontrollgruppe ein Zusammenhang mit der Kapillardichte, bei den niereninsuffizienten Kindern fehlte diese Assoziation. Da die alterskorrigierten BMI-SDS-Werte weder in der vorliegenden Arbeit, noch in der bereits erwähnten Studie von Schaefer et

al.(Schaefer *et al.*, 2016) an einem größeren Kollektiv (n= >100) eine Assoziation mit der Kapillardichte zeigen, lassen diese Ergebnisse vermuten, dass die Kapillardichte unabhängig vom Anteil des viszeralen Fettgewebes bei Kindern ist. Diese Vermutung wird auch durch die Ergebnisse der multiplen Regressionsanalyse gestützt, in der sich die Größe und die Niereninsuffizienz als einzige unabhängige Prädiktoren der Kapillardichte zeigten.

5.3.1.2 Einfluss des Blutdruckes auf die Kapillardichte

Eine arterielle Hypertonie ist bekanntermaßen mit Veränderungen der Mikrozirkulation verbunden (Hansen-Smith *et al.*, 1990; Kobayashi *et al.*, 2005; Delano *et al.*, 2011) und eine häufige Komorbidität bei chronischer Niereninsuffizienz (Sarnak *et al.*, 2003; Levey *et al.*, 2005), auch im Kindesalter (Olowu, 2015). Ebenso kann eine antihypertensive Medikation, neben ihrer indirekten Wirkung durch Beeinflussung der arteriellen Hypertonie, direkten Einfluss auf die endotheliale Funktion nehmen (Bonetti *et al.*, 2003; Goligorsky, 2015). In der vorliegenden Arbeit konnte kein Zusammenhang des Blutdruckes mit der Kapillardichte gefunden werden. Dies könnte sich an der geringen Anzahl an Kindern mit Hypertonie in dieser Studie begründen. Zum anderen wurden alle Kinder mit arterieller Hypertonie bereits antihypertensiv behandelt. Bemerkenswert ist jedoch, dass die in dieser Arbeit gefundene Rarefizierung der Kapillardichte bei niereninsuffizienten Kindern sich auf hochsignifikantem Niveau auch nach Ausschluss der Patienten, die eine arterielle Hypertonie und/oder eine antihypertensive Therapie erhalten hatten, bestätigte. Denn es ist bekannt, dass eine arterielle Hypertonie von einer mikrovaskulären Rarefizierung begleitet wird und zu Zielorganschäden führt (Feihl *et al.*, 2009). Dadurch stellen diese Ergebnisse, da sie den potentiellen Einfluss der Hypertonie bzw. der antihypertensiven Therapie auf die Kapillardichte ausschließen, den Einfluss der Urämie auf die Mikrozirkulation in den Vordergrund. Nur wenige anderen Studien zur Kapillardichte bei chronischer Niereninsuffizienz, wie oben dargestellt, berücksichtigen diese häufige und wichtige Komorbidität einer arteriellen Hypertonie bei chronischer Niereninsuffizienz in ihren Studien zur Mikrozirkulation bei Urämie.

5.3.1.3 Einfluss der Niereninsuffizienz auf die Kapillardichte

Das Hauptergebnis dieser Arbeit ist eine verringerte Kapillardichte bei Kindern mit chronischer terminaler Niereninsuffizienz im Vergleich zu nierengesunden Kindern. Der Einfluss der chronischen Niereninsuffizienz auf die Kapillardichte bestätigte sich auch in der multiplen linearen Regressionsanalyse, in der sich die Gruppenzugehörigkeit (niereninsuffizient vs. gesund) als wichtiger Prädiktor für die Kapillardichte herausstellte. Und auch für die

Nierenretentionsparameter Kreatinin und Harnstoff als Zeichen einer chronischen Niereninsuffizienz ließ sich ein signifikanter inverser Zusammenhang mit der Kapillardichte zeigen. Das heißt, je schlechter die Ausscheidungsfunktion der Niere und damit je höher die Retentionsparameter Kreatinin- und Harnstoff waren, desto geringer war die Kapillardichte. In der multiplen linearen Regressionsanalyse stellten sich die Kreatininwerte als gute Prädiktoren der Kapillardichte heraus, konnten sie doch 96% der Varianz der Kapillardichte erklären. Hingegen ließ sich für die (mit der sogenannten Schwartz-Formel) geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (Schwartz *et al.*, 2009) keine signifikante Assoziation mit der Kapillardichte darstellen. Da die geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (eGFR) nur eine Annäherung der wahren GFR darstellt, muss diese fehlende Assoziation zwar angemerkt sein, darf jedoch in ihrer Bedeutung nicht überschätzt werden. Denn die Ungenauigkeit dieser Kreatinin-basierten Bestimmung der geschätzten GFR im Kindesalter, insbesondere bei Kindern mit reduzierter Muskelmasse wie sie z.B. bei chronischer Niereninsuffizienz vorkommen kann, ist bekannt (Schwartz & Work, 2009).

5.3.1.4 Einfluss laborchemischer Parameter auf die Kapillardichte

Bei der Untersuchung des Zusammenhanges laborchemischer Parameter mit der Kapillardichte zeigte sich ein inverser Zusammenhang mit den Hämoglobinwerten in der Gruppe der niereninsuffizienten Kinder. Dies erscheint unverständlich, da man bei einer (mit niedriger Kapillardichte assoziierten) schlechteren Nierenfunktion auch niedrigere Hämoglobinwerte erwarten müsste. Möglicherweise ist dieser Zusammenhang durch therapeutische Korrektur niedriger Hämoglobinwerte zum Zeitpunkt der Biopsie, d.h. anlässlich der Nierentransplantation (Transfusionen, Gabe von Erythropoietin) erklärbar; dieser Verdacht war jedoch nicht durch Aktenstudium zu erhärten. Bei allen anderen Werten, insbesondere der Inflammationsparameter und Parameter des Mineralstoffwechsels, konnte kein Zusammenhang mit der Kapillardichte gefunden werden.

Der Zusammenhang einer chronischen Inflammation und der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen konnte für die Allgemeinbevölkerung, aber insbesondere auch für Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz gezeigt werden (Oh *et al.*, 2002; Kruger *et al.*, 2006). Erhöhte C-reaktive Protein (CRP)-Werte werden zu den urämiebezogenen Risikofaktoren bei chronischer Niereninsuffizienz gezählt (Mitsnefes, 2012) und dienen als Surrogatmarker für einen chronischen Mikroinflammationszustand, durch den die Urämie gekennzeichnet ist (Kumar *et al.*, 2014). So sind erhöhte CRP-Werte bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung mit einer

erhöhten kardiovaskulären Mortalität verbunden (Himmelfarb *et al.*, 2002; Kruger *et al.*, 2006). Zudem gibt es Hinweise, dass eine systemische Inflammation bei chronischer Niereninsuffizienz im Zusammenhang mit einer endothelialen Dysfunktion steht (Flisiński *et al.*, 2012). Jie *et al.* (Jie *et al.*, 2010) konnten eine negative Korrelation von zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen mit CRP-Werten bei Kindern unter Hämodialysetherapie zeigen und vermuteten, dass dies als Zeichen eines verminderten Potentials zur Gefäßregeneration zu sehen sei. Ob der chronische Inflammationszustand bei Urämie einen Einfluss auf die Mikrozirkulation hat, sollte in weiteren Studien untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich kein Hinweis eines Zusammenhangs der Inflammationsparameter (CRP) mit der Kapillardichte. Und auch in einer anderen Studie zur Mikrozirkulation bei jungen Hämodialyse-Patienten (Edwards-Richards *et al.*, 2014) fand sich kein Anhalt eines Zusammenhanges der Kapillardichte mit Inflammationsparametern.

Veränderungen des Mineralstoffwechsels bei chronischer Niereninsuffizienz sind eine bekannte Komorbidität und werden, ebenso wie erhöhte Inflammationsparameter, zu den urämiebezogenen Risikofaktoren gezählt (Johnson *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2014). Sie sind auch bei Kindern mit chronischer Niereninsuffizienz häufig anzutreffen (Mitsnefes, 2012) und standen vor allem wegen ihrer Rolle zu Gefäßverkalkungen bei CKD im Fokus (Shroff *et al.*, 2013a). Eine kürzlich publizierte Studie von Stevens *et al.* (Stevens *et al.*, 2015) fand auch einen Zusammenhang einer Phosphatexposition mit einer endothelialen Dysfunktion bei chronischer Niereninsuffizienz. Einen unabhängigen Einfluss erhöhter Bikarbonat- und Phosphatwerte auf die funktionelle und strukturelle Kapillardichte zeigten Thang *et al.* (Thang *et al.*, 2011) in ihrer Studie zur Kapillarisation des Nagelbettes bei fortgeschrittener Niereninsuffizienz. Auch Edwards-Richards *et al.* (Edwards-Richards *et al.*, 2014) fanden in ihrer Studie zur Kapillarisation des Nagelbettes bei jungen Hämodialysepatienten einen Zusammenhang von Störungen im Mineralstoffwechsel und der strukturellen Kapillardichte. Dass sich dieser Zusammenhang in der vorliegenden Arbeit nicht darstellen ließ, kann daran liegen, dass nur bei einem Teil der urämischen Kinder entsprechende Laborwerte vorlagen. Auch könnte das Therapie-Stadium, Dialyse in der Studie von Edwards-Richards *et al.* vs. konservative Therapie in der eigenen Arbeit, einen ursächlichen Einfluss auf die abweichenden Ergebnisse haben.

5.3.1.5 Zusammenhang der vollautomatisiert gemessenen Kapillardichte mit klinischen und laborchemischen Parametern

Die durch eine kooperierende Arbeitsgruppe von Prof. C. P. Schmitt *et al.* vollautomatisierte Messung der Kapillardichte an einer Stichprobe der Studienpopulation zeigte, wie bereits weiter

oben erwähnt, ebenfalls eine signifikant reduzierte Kapillardichte bei den chronisch niereninsuffizienten Kindern. In der weiteren Analyse konnten jedoch keine signifikanten Zusammenhänge mit klinischen und laborchemischen Parameter gefunden werden. Hierfür scheint in Anbetracht der Stichprobe die geringe Fallzahl die naheliegendste Erklärung zu sein.

5.4 Potentielle Mechanismen der kapillären Rarefizierung

Um den Mechanismus der kapillären Rarefizierung bei chronischer Niereninsuffizienz besser zu verstehen, wurden in dieser Arbeit verschiedene potentielle Faktoren untersucht. Verschiedene Studien konnten bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz oder im Tiermodell der Urämie zeigen, dass die chronische Niereninsuffizienz mit einer gestörten Angiogenese verbunden ist. Im Tiermodell der Urämie zeigte sich eine kapilläre Rarefizierung und Gewebehypoxie infolge einer progressiven experimentellen glomerulären Schädigung (Shimizu *et al.*, 1997) und das Modell der Hinterlauf-Ischämie bei subtotal nephrektomierten Ratten (Jacobi *et al.*, 2006) zeichnete sich durch eine gestörte angiogene Antwort aus, wie z.B. die fehlende Hochregulierung des Wachstumsfaktors „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) und seiner Rezeptoren (VEGF-Rezeptoren). Wohingegen die Gabe von VEGF zu einem Erhalt der Kapillardichte und einer verbesserten renalen Funktion führt (Kang *et al.*, 2001). Zudem sind erhöhte Serumspiegel des löslichen VEGF-Rezeptor 1(sFLT-1), eines VEGF Antagonisten, mit endothelialer Dysfunktion bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz verbunden (Di Marco *et al.*, 2009).

5.4.1 Apoptose und Autophagie

Eine potentielle Ursache einer kapillären Rarefizierung könnte die verstärkte Aktivierung des endothelialen Zelltodes sein. Die Apoptose ist neben der Nekrose die Hauptform des Zelltodes und der Prozess der Autophagie ist bei beiden Formen des Zelltodes involviert (Nikoletopoulou *et al.*, 2013). Der regulierte Zelltod, die Apoptose, wird durch Aktivierung der Caspase-Kaskade initiiert und führt letztendlich zum Zellsuizid (Gown & Willingham, 2002). Der Prozess der Autophagie als konstitutives Zellereignis, kann durch unterschiedliche Stimuli verstärkt werden (Kabeya *et al.*, 2000), zu denen unter anderem Hypoxie oder ein vermindertes Angebot an Wachstumsfaktoren zählen (Nikoletopoulou *et al.*, 2013). Sowohl Apoptose als auch Autophagie spielen eine zentrale Rolle bei der physiologischen Entwicklung, Aufrechterhaltung der Homöostase, sowie bei verschiedenen Erkrankungen (Nikoletopoulou *et al.*, 2013). Die hochgradige Abnahme der Kapillardichte im Omentum terminal niereninsuffizienter Kinder legt die Vermutung eines gesteigerten Abbaus von Kapillaren z.B. durch Apoptose- oder

Autophagietätigkeit im Gewebe niereninsuffizienter Kinder nahe. Dies bestätigte sich in der durchgeführten immunhistochemischen Analyse jedoch nicht. Weder bei der Kontrollgruppe, noch bei den niereninsuffizienten Kindern konnten messbaren Apoptose- oder Autophagieprozesse detektiert werden. In hypertensiven Ratten konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte endotheliale Zellapoptose im Zusammenhang mit oxidativem Stress steht (Kobayashi *et al.*, 2005) und eine mögliche Ursache für eine kapilläre Rarefizierung, wie sie auch in dieser Arbeit gefunden wurde, darstellen könnte. Zudem könnten reaktive Sauerstoffspezies sowie chronische Hyperphosphatämie eine verstärkte endotheliale Apoptose und Autophagie bei Urämie bedingen (Hsu *et al.*, 2015; Nussenzweig *et al.*, 2015). Da diese Mechanismen in der in dieser Arbeit gewählten immunhistochemischen Methode nicht nachgewiesen werden konnten, könnte zum einen daran liegen, dass die immunhistochemische Analyse nur eine Momentaufnahme darstellen kann. Zum anderen ist die chronische Nierenerkrankung ein in den meisten Fällen langsam voranschreitender Prozess, so dass Zelltodereignisse in der Mikrozirkulation, die sich möglicherweise über einen langen Zeitraum vollziehen, durch die gewählte Untersuchungstechnik zum Untersuchungszeitpunkt nicht adäquat abgebildet werden können (Gottlieb *et al.*, 2015). Die Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe können deswegen nicht mit letzter Sicherheit ausschließen, dass apoptotische und autophagische Prozesse an einer Rarefizierung der Kapillardichte im Omentum ursächlich beteiligt sind. Jedoch kann die physiologische Rückbildung von mikrozirkulatorischen Netzwerken auch mit verschiedenen anderen Mechanismen einhergehen (Pries & Secomb, 2014; Korn & Augustin, 2015).

5.4.2 VEGF-Familie und Angiopoietine

Die VEGF (vascular endothelial growth factor)-Familie, d.h. die VEG-Faktoren und ihre Rezeptoren, sind potente Regulatoren und Schlüsseldeterminanten der Angiogenese (Zhang *et al.*, 2012). VEGF ist ein wichtiger Angiogenesefaktor, der durch Bindung an den VEGF-Rezeptor trophische und proliferative Wirkungen auf das Gefäßendothel hat und somit essentiell für den Erhalt der Mikrovaskulatur ist (Doi *et al.*, 2010). Die VEGF-Rezeptoren werden primär im Gefäßendothel exprimiert und gehören zur Superfamilie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Sie besitzen eine extrazelluläre Domäne, an die sich eine transmembrane Region, eine juxtamembrane Region, sowie eine Tyrosin-Kinase Domäne, die durch ein Kinase-Insert geteilt wird, anschließt. Ihr Abschluss bildet ein C-terminales Ende (Olsson *et al.*, 2006). Der überwiegende Anteil der angiogenen Effekte wird durch Bindung von VEGF-A an den VEGF-Rezeptor 2, auch als fetal liver kinase 1 (flk-1) oder kinase insert domain receptor (KDR) bezeichnet, vermittelt. Neben diesem angiogenen Effekt werden auch mitogene und anti-

apoptotische Effekte durch ihn induziert (Zhang *et al.*, 2012). Die Verfügbarkeit von VEGF reguliert die Aktivität des VEGF-Rezeptors und kann durch Korezeptoren (Splicevarianten von VEGF-A und Neuropilin-1 und -2) moduliert werden (Olsson *et al.*, 2006). Als potenter endogener Antagonist von VEGF gilt sFlt-1 (soluble fms-like tyrosine kinase-1), eine Splice-Variante des VEGF-Rezeptors 1, der die Signaltransduktion des VEGF-Rezeptors 2 durch Bindung von VEGF und Besetzung der Bindungsstellen des Rezeptors vermindert (Di Marco *et al.*, 2009).

Kamba *et al.* (Kamba *et al.*, 2006) konnten zeigen, dass nach Inhibition des VEGF-Signalweges ein Rückgang der Kapillaren zu beobachten war und somit das normale Kapillarnetz beim Erwachsenen in verschiedenen Organen eine VEGF-abhängige Plastizität aufweist. Auch van der Veldt *et al.* (van der Veldt *et al.*, 2010) fanden in ihrer Studie eine Abnahme der Mikrovaskulatur in der Haut während einer Therapie mit einem Tyrosinkinase-Inhibitor (Sunitinib) und schlussfolgerten, dass eine Inhibition der VEGF-/VEGFR2-Signalübertragung zu einer Rarefizierung der Kapillardichte führt. Ähnliche Ergebnisse lieferte auch eine Studie von Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 2012) zur peritonealen Vaskulatur bei urämischen Patienten, in der sich eine starke Korrelation der VEGFR 2-Expression und der Kapillardichte zeigte. Flisiński *et al.* (Flisiński *et al.*, 2012) fanden bei Ratten mit fortgeschrittener Niereninsuffizienz neben einer reduzierten Kapillardichte eine signifikant verminderte mRNA-Expression von HIF-1 α , VEGF und VEGF-Rezeptor 1 und 2 beim Bewegungsmuskel M. gastrocnemius, was von den Autoren als Zeichen einer gestörten Antwort auf die durch die renale Anämie bedingte systemische Hypoxie gedeutet wurde. In einer Studie an subtotal nephrektomierten Ratten (Koleganova *et al.*, 2009a; Koleganova *et al.*, 2009b) fand sich neben einer erhöhten VEGF-Expression eine geringere Expression des VEGF-Rezeptors 2 bei Urämie. Die Ergebnisse dieser Studien deuten auf eine potente Rolle der VEGF-/VEGFR2-Signalachse in der kapillären Rarefizierung bei urämischen Patienten hin. Im Modell der spontanen hypertensiven Ratte, bei der regelhaft eine Abnahme der kapillären Gefäßdichte zu beobachten ist, konnten Tran *et al.* (Tran *et al.*, 2010; Tran *et al.*, 2011) eine Spaltung des VEGF-Rezeptors 2 zeigen, die mit einer erhöhten Matrix-Metalloproteinase (MMP)-Aktivität assoziiert war. Die VEGF-Rezeptor 2-Spaltung, ebenso wie die kapilläre Rarefizierung, ließ sich durch chronische Inhibition der MMPs abschwächen. Bei Menschen konnten lösliche Rezeptor-Fragmente im Plasma als indirektes Zeichen einer Rezeptor-Spaltung gefunden werden (Delano *et al.*, 2011). Durch Abspaltung des extrazellulären Anteils des VEGF-Rezeptors und einer damit einhergehenden Störung der VEGF-Bindungsmöglichkeit an den Rezeptor könnte dieses Modell auch einen Erklärungsansatz für die

kapilläre Rarefizierung bei urämischen Patienten liefern. In der vorliegenden Arbeit konnten jedoch weder signifikante Unterschiede der VEGF-A Expression im omentalen Gewebe zwischen gesunden und urämischen Kindern gefunden werden, noch Unterschiede des intra-oder extrazellulären Anteils des VEGF-Rezeptors 2. Dies spricht gegen die Hypothese einer eingeschränkten Angiogenese infolge einer quantitativen Störung auf Ebene des VEGF-Rezeptors 2 und seines Liganden VEGF-A bei Urämie. Ob sich jedoch die kapilläre Rarefizierung bei Urämie infolge einer gestörten VEGF-/VEGFR2-Signalübertragung vollzieht, muss in weiteren Studien genauer untersucht werden.

Ein weiterer wichtiger Regulator der Angiogenese und des Gefäßumbaus ist das Angiopoietin/Tie-System (Fukuhara *et al.*, 2010). Die Angiopoietine-1 und -2 binden an den endothelspezifischen Tie2-Rezeptor, der ebenso wie die VEGF-Rezeptoren zu den Rezeptor-Tyrosin-Kinasen gehört (Asahara *et al.*, 1998). Die Rolle von Angiopoietin-1 als proangiogener Faktor, der durch Bindung an den Tie2-Rezeptor das endotheliale Überleben und somit die endotheliale Integrität fördert, erscheint klarer als die von Angiopoietin-2. Auch dieser bindet an den Tie2-Rezeptor und galt lange Zeit als reiner Antagonist von Angiopoietin-1 und somit als anti-angiogener Faktor (Lobov *et al.*, 2002). Jedoch scheint Angiopoietin-2 eine duale, teils kontroverse Funktion zu haben. Diese erscheint abhängig vom Kontext als Agonist oder Antagonist der Angiogenese (Eklund & Olsen, 2006), worauf vor allem VEGF-A einen wichtigen modulierenden Einfluss nimmt (Lobov *et al.*, 2002). Ebenso unterschiedlich wie die Funktion sind auch die Studienergebnisse zu Angiopoietin-2. In einer Studie zu dem Zusammenhang von Angiopoietin-2 und der Mortalität bzw. MACE (major adverse cardiovascular events) bei erwachsenen Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz stellte sich Angiopoietin-2 als unabhängiger positiver Prädiktor für die Mortalität und MACE heraus (Tsai *et al.*, 2015). In einem Rattenmodell zeigte sich im M. soleus neben einer hohen VEGF-A-Expression eine höhere Angiopoietin-2/Angiopoietin-1-Ratio als im superfiziellen M. gastrocnemius, was mit einer höheren Anzahl an Kapillaren und Anastomosen verbunden war und für eine pro-angiogene Wirkung und den Erhalt des Kapillarnetzes in Anwesenheit von VEGF-A spricht (Fujino *et al.*, 2012). Hingegen zeigte sich bei einer Untersuchung an niereninsuffizienten Kindern bei der Prädialyse-Gruppe kein Unterschied in der Angiopoietin-2/Angiopoietin-1-Ratio im Vergleich zu gesunden Kindern. Nur in der Dialyse-Gruppe war eine signifikant erhöhte Angiopoietin-2/Angiopoietin-1-Ratio zu verzeichnen (Shroff *et al.*, 2013b). Diese z.T. widersprüchlichen Ergebnisse zeigen die Komplexität des Angiopoietin-/Tie-Systems auf.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in der Angiotensin-1-Expression kein Unterschied zwischen den Kindern mit chronischer Niereninsuffizienz und der Kontrollgruppe, jedoch fand sich eine signifikante Abnahme der Angiotensin-2-Expression im Omentum bei terminal niereninsuffizienten Kindern. Auf welchem Weg die Abnahme der Angiotensin-2-Expression zu einer Rarefizierung der Mikrovaskulatur bei Urämie führt und welche molekularen Mechanismen in diesen Prozess involviert sind, kann nur durch weitere Studien beantwortet werden.

5.5 Limitationen

Eine Limitation dieser Studie ist die begrenzte Gruppengröße der untersuchten Kinder. Die Studienpopulation ist mit einer Teilnehmerzahl von 55 Kindern relativ klein. Dies ist zum größten Teil der Schwierigkeit geschuldet, ausreichend gesunde Kinder für die Kontrollgruppe zu rekrutieren. Ein Grund dafür war die hohe Anzahl an Kindern, die aufgrund ihrer Erkrankung bzw. deren Therapie aus der weiteren Untersuchung ausgeschlossen werden mussten oder von vornherein nicht für diese Studie in Frage kamen. Als universitäre Einrichtungen werden in den Rekrutierungs-Kliniken, Charité-Universitätsmedizin Berlin und dem Universitätsklinikum Heidelberg, häufig komplex erkrankte Kinder behandelt, die deshalb nicht als gesunde Kontrollgruppe in Frage kamen. Zum anderen ist im Kindesalter jeder zusätzliche Eingriff während einer Operation, so komplikationslos er sein mag, eine schwierige Entscheidung für die Eltern, die aufgrund der geplanten Operation häufig unter psychischer Anspannung stehen. Zum anderen fand sich bei der altersbezogenen Auswahl der terminal niereninsuffizienten Kindern aus der PD-Biobank in dem Rekrutierungszeitraum nur eine begrenzte Anzahl von Kindern unter 2 Jahren, die bei den gesunden Kontrollen die am stärksten vertretende Altersgruppe ausmachten. Hieraus ergab sich eine Differenz zwischen der Anzahl der gesunden Kontrollen und der urämischen Kinder in der Altersgruppe bis 2 Jahre und entsprechend in der Gesamtzahl der Studienteilnehmer.

Insgesamt muss in Hinsicht auf die „gesunde“ Kontrollpopulation angemerkt sein, dass der Begriff der Gesundheit sich in diesem Zusammenhang zunächst auf die Nierenfunktion bezieht. Da die Gewebeentnahme nur während eines operativen Eingriffes möglich war, bestand bei jedem dieser Kinder prinzipiell eine Erkrankung, die die Indikation zur Operation beinhaltete. Es wurde durch die eingangs erwähnten Ausschlusskriterien (d.h. vor allem Ausschluss chronischer Erkrankungen, nur elektive Operationen) jedoch versucht, Erkrankungen mit potentiell

Einfluss auf die Mikrozirkulation auszuschließen und so den Einfluss möglicher Störungsvariablen („Confounder“) zu reduzieren.

Eine weitere Einschränkung in der vorliegenden Arbeit ist in den Abweichungen der unterschiedlichen Messmethoden der Kapillardichte zu sehen. Dies ist wahrscheinlich durch die unterschiedliche Berücksichtigung von CD31-gefärbten Strukturen mit der manuellen und automatischen Messmethode zu erklären. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass mit beiden Methoden eine signifikant verminderte Kapillardichte gefunden wurde. Die Mikrovaskulatur ist ein Kontinuum von kleinsten Kapillaren bis hin zu Arteriolen und Venolen, d.h. ein Netzwerk von kleinen Gefäßen, deren Größe mit einem Durchmesser von <150 (Levy *et al.*, 2001) bis zu $<170 \mu\text{m}$ (Chilian *et al.*, 1989) angegeben wird. Eine einheitliche Definition der Mikrozirkulation anhand anatomischer Kriterien ist jedoch nicht gegeben. Obwohl allein wegen der zahlenmäßig weit überwiegenden Anzahl kleinster Gefäße davon auszugehen ist, dass es sich bei den meisten erfassten Gefäßen um Kapillaren handelte, stellt deswegen die Bezeichnung „Kapillardichte“ eine Vereinfachung dar.

5.6 Schlussfolgerung

Veränderungen der Mikrozirkulation bei chronischer Niereninsuffizienz, wie sie in der vorliegenden Arbeit bei terminal niereninsuffizienten Kindern gezeigt werden konnten, sind möglicherweise Zeichen einer generalisierten mikrovaskulären Erkrankung im Sinne einer frühen kardiovaskulären Schädigung. Sie stellen eine potentiell reversible Veränderung mit prognostischer und therapeutischer Relevanz dar. Das Verständnis involvierter pathophysiologischer Prozesse könnte als Angriffsort für therapeutische Interventionen dienen und eine Möglichkeit zur Verbesserung der Morbidität und Mortalität vor dem Zeitpunkt der Manifestation makrovaskulärer Erkrankungen bei chronischer Niereninsuffizienz bieten.

6 Literaturverzeichnis

Literaturverzeichnis

- Adair A, Mitchell DR, Kipari T, Qi F, Bellamy CO, Robertson F, Hughes J & Marson LP. (2007). Peritubular capillary rarefaction and lymphangiogenesis in chronic allograft failure. *Transplantation* **83**, 1542-1550.
- Amann K, Breitbach M, Ritz E & Mall G. (1998). Myocyte/capillary mismatch in the heart of uremic patients. *J Am Soc Nephrol* **9**, 1018-1022.
- Amann K, Neimeier KA, Schwarz U, Törnig J, Matthias S, Orth SR, Mall G & Ritz E. (1997). Rats with moderate renal failure show capillary deficit in heart but not skeletal muscle. *Am J Kidney Dis* **30**, 382-388.
- Amann K, Wiest G, Zimmer G, Gretz N, Ritz E & Mall G. (1992). Reduced capillary density in the myocardium of uremic rats--a stereological study. *Kidney Int* **42**, 1079-1085.
- Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangé D, Lieberman EH, Ganz P, Creager MA & Yeung AC. (1995). Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol* **26**, 1235-1241.
- Asahara T, Chen D, Takahashi T, Fujikawa K, Kearney M, Magner M, Yancopoulos GD & Isner JM. (1998). Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ Res* **83**, 233-240.
- Baumann M, Schwarz S, Kotliar K, von Eynatten M, Trucksaess AS, Burkhardt K, Lutz J, Heemann U & Lanzl I. (2009). Non-diabetic chronic kidney disease influences retinal microvasculature. *Kidney Blood Press Res* **32**, 428-433.
- Bland JM & Altman DG. (1986). Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* **1**, 307-310.
- Bonetti PO, Lerman LO & Lerman A. (2003). Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 168-175.
- Bozbas H, Pirat B, Demirtas S, Simşek V, Yildirim A, Sade E, Sayin B, Sezer S, Karakayali H & Muderrisoglu H. (2009). Evaluation of coronary microvascular function in patients with end-stage renal disease, and renal allograft recipients. *Atherosclerosis* **202**, 498-504.

- Brambilla P, Bedogni G, Moreno LA, Goran MI, Gutin B, Fox KR, Peters DM, Barbeau P, De Simone M & Pietrobelli A. (2006). Crossvalidation of anthropometry against magnetic resonance imaging for the assessment of visceral and subcutaneous adipose tissue in children. *Int J Obes (Lond)* **30**, 23-30.
- Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, Horvat R, Amann G, Kriehuber E, Diem K, Weninger W, Tschachler E, Alitalo K & Kerjaschki D. (1999). Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am J Pathol* **154**, 385-394.
- Briese S, Wiesner S, Will JC, Lembcke A, Opgen-Rhein B, Nissel R, Wernecke KD, Andreae J, Haffner D & Querfeld U. (2006). Arterial and cardiac disease in young adults with childhood-onset end-stage renal disease-impact of calcium and vitamin D therapy. *Nephrol Dial Transplant* **21**, 1906-1914.
- Burkhardt D, Bartosova M, Schaefer B, Grabe N, Lahrmann B, Nasser H, Freise C, Schneider A, Lingnau A, Degenhardt P, Ranchin B, Sallay P, Cerkauskiene R, Malina M, Ariceta G, Schmitt CP & Querfeld U. (2016). Reduced Microvascular Density in Omental Biopsies of Children with Chronic Kidney Disease. *PLoS One* **11**, e0166050.
- Campanholle G, Ligresti G, Gharib SA & Duffield JS. (2013). Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 3. Novel mechanisms of kidney fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol* **304**, C591-603.
- Carroll JF, Chiapa AL, Rodriguez M, Phelps DR, Cardarelli KM, Vishwanatha JK, Bae S & Cardarelli R. (2008). Visceral fat, waist circumference, and BMI: impact of race/ethnicity. *Obesity (Silver Spring)* **16**, 600-607.
- Chade AR, Brosh D, Higano ST, Lennon RJ, Lerman LO & Lerman A. (2006). Mild renal insufficiency is associated with reduced coronary flow in patients with non-obstructive coronary artery disease. *Kidney Int* **69**, 266-271.
- Charytan DM, Shelbert HR & Di Carli MF. (2010). Coronary microvascular function in early chronic kidney disease. *Circ Cardiovasc Imaging* **3**, 663-671.
- Chavers BM, Li S, Collins AJ & Herzog CA. (2002). Cardiovascular disease in pediatric chronic dialysis patients. *Kidney Int* **62**, 648-653.
- Chilian WM, Layne SM, Klausner EC, Eastham CL & Marcus ML. (1989). Redistribution of coronary microvascular resistance produced by dipyridamole. *Am J Physiol* **256**, H383-390.

- Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT, Roccella EJ, Joint National Committee on Prevention D, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute & Committee NHBPEPC. (2003). Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* **42**, 1206-1252.
- Chung AW, Yang HH, Sigrist MK, Chum E, Booth AD, Gourlay WA & Levin A. (2010). Differential microvasculature dysfunction in living kidney donor transplant recipients: nondialyzed versus dialyzed chronic kidney disease patients. *J Vasc Res* **47**, 128-138.
- Cirillo M, Lombardi C, Mele AA, Marcarelli F & Bilancio G. (2012). A population-based approach for the definition of chronic kidney disease: the CKD Prognosis Consortium. *J Nephrol* **25**, 7-12.
- Civilibal M, Caliskan S, Adaletli I, Oflaz H, Sever L, Candan C, Canpolat N, Kasapcopur O, Kuruoglu S & Arisoy N. (2006). Coronary artery calcifications in children with end-stage renal disease. *Pediatr Nephrol* **21**, 1426-1433.
- Clough GF. (2015). Developmental conditioning of the vasculature. *Compr Physiol* **5**, 397-438.
- Cole TJ, Freeman JV & Preece MA. (1998). British 1990 growth reference centiles for weight, height, body mass index and head circumference fitted by maximum penalized likelihood. *Stat Med* **17**, 407-429.
- Collins D, Hogan AM, O'Shea D & Winter DC. (2009). The omentum: anatomical, metabolic, and surgical aspects. *J Gastrointest Surg* **13**, 1138-1146.
- Delano FA, Chen AY, Wu KI, Tran ED, Rodrigues SF & Schmid-Schönbein GW. (2011). The autodigestion hypothesis and receptor cleavage in diabetes and hypertension. *Drug Discov Today Dis Models* **8**, 37-46.
- Dennis VW. (2005). Coronary heart disease in patients with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* **16 Suppl 2**, S103-106.
- Deva R, Alias MA, Colville D, Tow FK, Ooi QL, Chew S, Mohamad N, Hutchinson A, Koukouras I, Power DA & Savige J. (2011). Vision-threatening retinal abnormalities in chronic kidney disease stages 3 to 5. *Clin J Am Soc Nephrol* **6**, 1866-1871.

- Di Marco GS, Reuter S, Hillebrand U, Amler S, König M, Larger E, Oberleithner H, Brand E, Pavenstädt H & Brand M. (2009). The soluble VEGF receptor sFlt1 contributes to endothelial dysfunction in CKD. *J Am Soc Nephrol* **20**, 2235-2245.
- Doi K, Noiri E & Fujita T. (2010). Role of vascular endothelial growth factor in kidney disease. *Curr Vasc Pharmacol* **8**, 122-128.
- Dolezalova P, Young SP, Bacon PA & Southwood TR. (2003). Nailfold capillary microscopy in healthy children and in childhood rheumatic diseases: a prospective single blind observational study. *Ann Rheum Dis* **62**, 444-449.
- Drüeke TB & Massy ZA. (2010). Atherosclerosis in CKD: differences from the general population. *Nat Rev Nephrol* **6**, 723-735.
- Eckardt KU, Berns JS, Rocco MV & Kasiske BL. (2009). Definition and classification of CKD: the debate should be about patient prognosis--a position statement from KDOQI and KDIGO. *Am J Kidney Dis* **53**, 915-920.
- Edwards-Richards A, DeFreitas M, Katsoufis CP, Seeherunvong W, Sasaki N, Freundlich M, Zilleruelo G & Abitbol CL. (2014). Capillary rarefaction: an early marker of microvascular disease in young hemodialysis patients, pp. 569-574. *Clin Kidney J*.
- Eklund L & Olsen BR. (2006). Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. *Exp Cell Res* **312**, 630-641.
- Farkas K, Nemcsik J, Kolossváry E, Járjai Z, Nádory E, Farsang C & Kiss I. (2005). Impairment of skin microvascular reactivity in hypertension and uraemia. *Nephrol Dial Transplant* **20**, 1821-1827.
- Feihl F, Liaudet L & Waeber B. (2009). The macrocirculation and microcirculation of hypertension. *Curr Hypertens Rep* **11**, 182-189.
- Fliser D, Wiecek A, Suleymanlar G, Ortiz A, Massy Z, Lindholm B, Martinez-Castelao A, Agarwal R, Jager KJ, Dekker FW, Blankestijn PJ, Goldsmith D, Covic A, London G, Zoccali C ; for European Renal and Cardiovascular Medicine working group of the European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association (ERA-EDTA). (2011). The dysfunctional endothelium in CKD and in cardiovascular disease: mapping the origin(s) of cardiovascular problems in CKD and of kidney disease in cardiovascular conditions for a research agenda. *Kidney Int Suppl (2011)* **1**, 6-9.

- Flisiński M, Brymora A, Bartłomiejczyk I, Wiśniewska E, Gołda R, Stefańska A, Pączek L & Manitius J. (2012). Decreased hypoxia-inducible factor-1 α in gastrocnemius muscle in rats with chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res* **35**, 608-618.
- Flisiński M, Brymora A, Elminowska-Wenda G, Bogucka J, Walasik K, Stefańska A, Odrowaz-Sypniewska G & Manitius J. (2008). Influence of different stages of experimental chronic kidney disease on rats locomotor and postural skeletal muscles microcirculation. *Ren Fail* **30**, 443-451.
- Frei U & Schober-Halstenberg H-J. (2008). Nierenersatztherapie in Deutschland. In Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006/2007. QuaSi-Niere.
- Fujino H, Kondo H, Murakami S, Nagatomo F, Fujita N, Takeda I, Ishihara A & Roy RR. (2012). Differences in capillary architecture, hemodynamics, and angiogenic factors in rat slow and fast plantarflexor muscles. *Muscle Nerve* **45**, 242-249.
- Fukuhara S, Sako K, Noda K, Zhang J, Minami M & Mochizuki N. (2010). Angiopoietin-1/Tie2 receptor signaling in vascular quiescence and angiogenesis. *Histol Histopathol* **25**, 387-396.
- Ghiadoni L, Cupisti A, Huang Y, Mattei P, Cardinal H, Favilla S, Rindi P, Barsotti G, Taddei S & Salvetti A. (2004). Endothelial dysfunction and oxidative stress in chronic renal failure. *J Nephrol* **17**, 512-519.
- Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE & Hsu CY. (2004). Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* **351**, 1296-1305.
- Goligorsky MS. (2015). Pathogenesis of endothelial cell dysfunction in chronic kidney disease: a retrospective and what the future may hold. *Kidney Res Clin Pract* **34**, 76-82.
- Gottlieb RA, Andres AM, Sin J & Taylor DP. (2015). Untangling autophagy measurements: all fluxed up. *Circ Res* **116**, 504-514.
- Gown AM & Willingham MC. (2002). Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase 3. *J Histochem Cytochem* **50**, 449-454.
- Grassmann A, Gioberge S, Moeller S & Brown G. (2005). ESRD patients in 2004: global overview of patient numbers, treatment modalities and associated trends. *Nephrol Dial Transplant* **20**, 2587-2593.

- Groothoff JW. (2005). Long-term outcomes of children with end-stage renal disease. *Pediatr Nephrol* **20**, 849-853.
- Groothoff JW, Gruppen MP, Offringa M, de Groot E, Stok W, Bos WJ, Davin JC, Lilien MR, Van de Kar NC, Wolff ED & Heymans HS. (2002a). Increased arterial stiffness in young adults with end-stage renal disease since childhood. *J Am Soc Nephrol* **13**, 2953-2961.
- Groothoff JW, Gruppen MP, Offringa M, Hutten J, Lilien MR, Van De Kar NJ, Wolff ED, Davin JC & Heymans HS. (2002b). Mortality and causes of death of end-stage renal disease in children: a Dutch cohort study. *Kidney Int* **61**, 621-629.
- Hansen-Smith F, Greene AS, Cowley AW & Lombard JH. (1990). Structural changes during microvascular rarefaction in chronic hypertension. *Hypertension* **15**, 922-928.
- Harambat J, van Stralen KJ, Kim JJ & Tizard EJ. (2012). Epidemiology of chronic kidney disease in children. *Pediatr Nephrol* **27**, 363-373.
- Hecht E, Freise C, Websky KV, Nasser H, Kretzschmar N, Stawowy P, Hoher B & Querfeld U. (2016). The matrix metalloproteinases 2 and 9 initiate uraemic vascular calcifications. *Nephrol Dial Transplant* **31**, 789-797.
- Henry RM, Kostense PJ, Bos G, Dekker JM, Nijpels G, Heine RJ, Bouter LM & Stehouwer CD. (2002). Mild renal insufficiency is associated with increased cardiovascular mortality: The Hoorn Study. *Kidney Int* **62**, 1402-1407.
- Herrick AL, Moore T, Hollis S & Jayson MI. (2000). The influence of age on nailfold capillary dimensions in childhood. *J Rheumatol* **27**, 797-800.
- Herzog CA, Asinger RW, Berger AK, Charytan DM, Díez J, Hart RG, Eckardt KU, Kasiske BL, McCullough PA, Passman RS, DeLoach SS, Pun PH & Ritz E. (2011). Cardiovascular disease in chronic kidney disease. A clinical update from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* **80**, 572-586.
- Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA & Hakim RM. (2002). The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int* **62**, 1524-1538.
- Hogg RJ, Furth S, Lemley KV, Portman R, Schwartz GJ, Coresh J, Balk E, Lau J, Levin A, Kausz AT, Eknoyan G, Levey AS & Initiative NKF's KDOQI. (2003). National Kidney Foundation's Kidney Disease Outcomes Quality Initiative clinical practice guidelines for chronic kidney disease in children and adolescents: evaluation, classification, and stratification. *Pediatrics* **111**, 1416-1421.

- Holowatz LA, Thompson-Torgerson CS & Kenney WL. (2008). The human cutaneous circulation as a model of generalized microvascular function. *J Appl Physiol (1985)* **105**, 370-372.
- Hsu YJ, Hsu SC, Huang SM, Lee HS, Lin SH, Tsai CS, Shih CC & Lin CY. (2015). Hyperphosphatemia induces protective autophagy in endothelial cells through the inhibition of Akt/mTOR signaling. *J Vasc Surg* **62**, 210-221.e212.
- Inker LA, Astor BC, Fox CH, Isakova T, Lash JP, Peralta CA, Kurella Tamura M & Feldman HI. (2014). KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for the evaluation and management of CKD. *Am J Kidney Dis* **63**, 713-735.
- Jacobi J, Porst M, Cordasic N, Namer B, Schmieder RE, Eckardt KU & Hilgers KF. (2006). Subtotal nephrectomy impairs ischemia-induced angiogenesis and hindlimb re-perfusion in rats. *Kidney Int* **69**, 2013-2021.
- Jie KE, Lilien MR, Goossens MH, Westerweel PE, Klein MK & Verhaar MC. (2010). Reduced endothelial progenitor cells in children with hemodialysis but not predialysis chronic kidney disease. *Pediatrics* **126**, e990-993.
- Johnson RC, Leopold JA & Loscalzo J. (2006). Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circ Res* **99**, 1044-1059.
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y & Yoshimori T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* **19**, 5720-5728.
- Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y & Yoshimori T. (2004). LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci* **117**, 2805-2812.
- Kamba T, Tam BY, Hashizume H, Haskell A, Sennino B, Mancuso MR, Norberg SM, O'Brien SM, Davis RB, Gowen LC, Anderson KD, Thurston G, Joho S, Springer ML, Kuo CJ & McDonald DM. (2006). VEGF-dependent plasticity of fenestrated capillaries in the normal adult microvasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**, H560-576.
- Kang DH, Hughes J, Mazzali M, Schreiner GF & Johnson RJ. (2001). Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: II. Vascular endothelial growth factor administration reduces renal fibrosis and stabilizes renal function. *J Am Soc Nephrol* **12**, 1448-1457.

- Kari JA, Donald AE, Vallance DT, Bruckdorfer KR, Leone A, Mullen MJ, Bunce T, Dorado B, Deanfield JE & Rees L. (1997). Physiology and biochemistry of endothelial function in children with chronic renal failure. *Kidney Int* **52**, 468-472.
- Kavey RE, Allada V, Daniels SR, Hayman LL, McCrindle BW, Newburger JW, Parekh RS, Steinberger J, Science AHAEPoPaP, Young CoCDit, Prevention CoEa, Nutrition Co, Metabolism CoPAa, Research CoHBP, Nursing CoC, Disease CotKiH & Research IWGoQoCaO. (2007). Cardiovascular risk reduction in high-risk pediatric patients: a scientific statement from the American Heart Association Expert Panel on Population and Prevention Science; the Councils on Cardiovascular Disease in the Young, Epidemiology and Prevention, Nutrition, Physical Activity and Metabolism, High Blood Pressure Research, Cardiovascular Nursing, and the Kidney in Heart Disease; and the Interdisciplinary Working Group on Quality of Care and Outcomes Research. *J Cardiovasc Nurs* **22**, 218-253.
- KDIGO. (2013). KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease., pp. 1-150. *Kidney Int Supplements*.
- Kobayashi N, DeLano FA & Schmid-Schönbein GW. (2005). Oxidative stress promotes endothelial cell apoptosis and loss of microvessels in the spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 2114-2121.
- Koleganova N, Piecha G, Ritz E, Bekeredjian R, Schirmacher P, Schmitt CP & Gross ML. (2009a). Interstitial fibrosis and microvascular disease of the heart in uremia: amelioration by a calcimimetic. *Lab Invest* **89**, 520-530.
- Koleganova N, Piecha G, Ritz E & Gross ML. (2009b). Calcitriol ameliorates capillary deficit and fibrosis of the heart in subtotaly nephrectomized rats. *Nephrol Dial Transplant* **24**, 778-787.
- Kooman JP, Kotanko P, Schols AM, Shiels PG & Stenvinkel P. (2014). Chronic kidney disease and premature ageing. *Nat Rev Nephrol* **10**, 732-742.
- Korn C & Augustin HG. (2015). Mechanisms of Vessel Pruning and Regression. *Dev Cell* **34**, 5-17.
- Kromeyer-Hauschild K, Wabitsch M, Kunze D & al e. (2001). Perzentile für den Body-Mass-Index für das Kindes- und Jugendalter unter Heranziehung verschiedener deutscher Stichproben. *Monatsschr Kinderheilk* **149**, 807-818.
- Kruger A, Stewart J, Sahityani R, O'Riordan E, Thompson C, Adler S, Garrick R, Vallance P & Goligorsky MS. (2006). Laser Doppler flowmetry detection of endothelial dysfunction in

- end-stage renal disease patients: correlation with cardiovascular risk. *Kidney Int* **70**, 157-164.
- Kumar S, Bogle R & Banerjee D. (2014). Why do young people with chronic kidney disease die early? *World J Nephrol* **3**, 143-155.
- Kuzu I, Bicknell R, Harris AL, Jones M, Gatter KC & Mason DY. (1992). Heterogeneity of vascular endothelial cells with relevance to diagnosis of vascular tumours. *J Clin Pathol* **45**, 143-148.
- Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, Levin A, Coresh J, Rossert J, De Zeeuw D, Hostetter TH, Lameire N & Eknoyan G. (2005). Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* **67**, 2089-2100.
- Levy BI, Ambrosio G, Pries AR & Struijker-Boudier HA. (2001). Microcirculation in hypertension: a new target for treatment? *Circulation* **104**, 735-740.
- Lilien MR & Groothoff JW. (2009). Cardiovascular disease in children with CKD or ESRD. *Nat Rev Nephrol* **5**, 229-235.
- Lindner A, Charra B, Sherrard DJ & Scribner BH. (1974). Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis. *N Engl J Med* **290**, 697-701.
- Lobov IB, Brooks PC & Lang RA. (2002). Angiotensin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11205-11210.
- Lockhart CJ, Hamilton PK, Quinn CE & McVeigh GE. (2009). End-organ dysfunction and cardiovascular outcomes: the role of the microcirculation. *Clin Sci (Lond)* **116**, 175-190.
- Mayer G. (2011). Capillary rarefaction, hypoxia, VEGF and angiogenesis in chronic renal disease. *Nephrol Dial Transplant* **26**, 1132-1137.
- McDonald SP, Craig JC & Association AaNZPN. (2004). Long-term survival of children with end-stage renal disease. *N Engl J Med* **350**, 2654-2662.
- Mitsnefes MM. (2008). Cardiovascular complications of pediatric chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* **23**, 27-39.

- Mitsnefes MM. (2012). Cardiovascular disease in children with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* **23**, 578-585.
- Mitsnefes MM, Kimball TR, Border WL, Witt SA, Glascock BJ, Khoury PR & Daniels SR. (2004). Impaired left ventricular diastolic function in children with chronic renal failure. *Kidney Int* **65**, 1461-1466.
- Mosteller RD. (1987). Simplified calculation of body-surface area. *N Engl J Med* **317**, 1098.
- Musa MG, Torrens C & Clough GF. (2014). The microvasculature: a target for nutritional programming and later risk of cardio-metabolic disease. *Acta Physiol (Oxf)* **210**, 31-45.
- National-High-Blood-Pressure-Education-Program-Working-Group-on-High-Blood-Pressure-in-Children-and-Adolescents. (2004). The fourth report on the diagnosis, evaluation, and treatment of high blood pressure in children and adolescents. *Pediatrics* **114**, 555-576.
- Neuhauser H. (2013). Referenzperzentile für anthropometrische Maßzahlen und Blutdruck aus der Studie zur Gesundheit von Kindern und Jugendlichen in Deutschland (KiGGS) 2003-2006. In *2 Auflage*, ed. Schienkiewitz A, Schaffrath Rosario A, Dortschy R & Kurth B-M, pp. 1-129. Robert Koch-Institut Berlin, www.rki.de.
- Neuhauser HK, Thamm M, Ellert U, Hense HW & Rosario AS. (2011). Blood pressure percentiles by age and height from nonoverweight children and adolescents in Germany. *Pediatrics* **127**, e978-988.
- Nikoletopoulou V, Markaki M, Palikaras K & Tavernarakis N. (2013). Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* **1833**, 3448-3459.
- Nissel R, Fischer DC, Puhlmann A, Holdt-Lehmann B, Mitzner A, Petzsch M, Körber T, Tiess M, Schmidt R & Haffner D. (2009). Short-term growth hormone treatment and microcirculation: effects in patients with chronic kidney disease. *Microvasc Res* **78**, 246-252.
- Nussenzweig SC, Verma S & Finkel T. (2015). The role of autophagy in vascular biology. *Circ Res* **116**, 480-488.
- Oh J, Wunsch R, Turzer M, Bahner M, Raggi P, Querfeld U, Mehls O & Schaefer F. (2002). Advanced coronary and carotid arteriopathy in young adults with childhood-onset chronic renal failure. *Circulation* **106**, 100-105.

- Olowu WA. (2015). Pre-treatment considerations in childhood hypertension due to chronic kidney disease. *World J Nephrol* **4**, 500-510.
- Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J & Claesson-Welsh L. (2006). VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 359-371.
- Ooi QL, Tow FK, Deva R, Alias MA, Kawasaki R, Wong TY, Mohamad N, Colville D, Hutchinson A & Savige J. (2011). The microvasculature in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* **6**, 1872-1878.
- Orre M, Lotfi-Miri M, Mamers P & Rogers PA. (1998). Increased microvessel density in mucinous compared with malignant serous and benign tumours of the ovary. *Br J Cancer* **77**, 2204-2209.
- Parekh RS, Carroll CE, Wolfe RA & Port FK. (2002). Cardiovascular mortality in children and young adults with end-stage kidney disease. *J Pediatr* **141**, 191-197.
- Parums DV, Cordell JL, Micklem K, Heryet AR, Gatter KC & Mason DY. (1990). JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol* **43**, 752-757.
- Pasarica M, Sereda OR, Redman LM, Albarado DC, Hymel DT, Roan LE, Rood JC, Burk DH & Smith SR. (2009). Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes* **58**, 718-725.
- Pries AR & Secomb TW. (2014). Making microvascular networks work: angiogenesis, remodeling, and pruning. *Physiology (Bethesda)* **29**, 446-455.
- Pries AR, Secomb TW & Gaehtgens P. (2000). The endothelial surface layer. *Pflugers Arch* **440**, 653-666.
- Sabanayagam C, Shankar A, Koh D, Chia KS, Saw SM, Lim SC, Tai ES & Wong TY. (2009). Retinal microvascular caliber and chronic kidney disease in an Asian population. *Am J Epidemiol* **169**, 625-632.
- Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culleton B, Hamm LL, McCullough PA, Kasiske BL, Kelepouris E, Klag MJ, Parfrey P, Pfeffer M, Raji L, Spinosa DJ, Wilson PW & American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease HBPR, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. (2003). Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure

- Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation* **108**, 2154-2169.
- Schaefer B, Bartosova M, Macher-Goeppinger S, Ujaszasi A, Wallwiener M, Nyarangi-Dix J, Sallay P, Burkhardt D, Querfeld U, Pfeifle V, Lahrmann B, Schwenger V, Wühl E, Holland-Cunz S, Schaefer F & Schmitt CP. (2016). Quantitative Histomorphometry of the Healthy Peritoneum. *Sci Rep* **6**, 21344.
- Schwartz GJ, Haycock GB, Edelmann CM & Spitzer A. (1976). A simple estimate of glomerular filtration rate in children derived from body length and plasma creatinine. *Pediatrics* **58**, 259-263.
- Schwartz GJ, Muñoz A, Schneider MF, Mak RH, Kaskel F, Warady BA & Furth SL. (2009). New equations to estimate GFR in children with CKD. *J Am Soc Nephrol* **20**, 629-637.
- Schwartz GJ & Work DF. (2009). Measurement and estimation of GFR in children and adolescents. *Clin J Am Soc Nephrol* **4**, 1832-1843.
- Shimizu A, Kitamura H, Masuda Y, Ishizaki M, Sugisaki Y & Yamanaka N. (1997). Rare glomerular capillary regeneration and subsequent capillary regression with endothelial cell apoptosis in progressive glomerulonephritis. *Am J Pathol* **151**, 1231-1239.
- Shimizu I, Aprahamian T, Kikuchi R, Shimizu A, Papanicolaou KN, MacLauchlan S, Maruyama S & Walsh K. (2014). Vascular rarefaction mediates whitening of brown fat in obesity. *J Clin Invest* **124**, 2099-2112.
- Shroff R, Long DA & Shanahan C. (2013a). Mechanistic insights into vascular calcification in CKD. *J Am Soc Nephrol* **24**, 179-189.
- Shroff R, Weaver DJ & Mitsnefes MM. (2011). Cardiovascular complications in children with chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* **7**, 642-649.
- Shroff RC, McNair R, Figg N, Skepper JN, Schurgers L, Gupta A, Hiorns M, Donald AE, Deanfield J, Rees L & Shanahan CM. (2008). Dialysis accelerates medial vascular calcification in part by triggering smooth muscle cell apoptosis. *Circulation* **118**, 1748-1757.
- Shroff RC, Price KL, Kolatsi-Joannou M, Todd AF, Wells D, Deanfield J, Johnson RJ, Rees L, Woolf AS & Long DA. (2013b). Circulating angiopoietin-2 is a marker for early cardiovascular disease in children on chronic dialysis. *PLoS One* **8**, e56273.

- Shulman NB, Ford CE, Hall WD, Blaufox MD, Simon D, Langford HG & Schneider KA. (1989). Prognostic value of serum creatinine and effect of treatment of hypertension on renal function. Results from the hypertension detection and follow-up program. The Hypertension Detection and Follow-up Program Cooperative Group. *Hypertension* **13**, 180-93.
- Singh AK, Patel J, Litbarg NO, Gudehithlu KP, Sethupathi P, Arruda JA & Dunea G. (2008). Stromal cells cultured from omentum express pluripotent markers, produce high amounts of VEGF, and engraft to injured sites. *Cell Tissue Res* **332**, 81-88.
- Stam F, van Guldener C, Becker A, Dekker JM, Heine RJ, Bouter LM & Stehouwer CD. (2006). Endothelial dysfunction contributes to renal function-associated cardiovascular mortality in a population with mild renal insufficiency: the Hoorn study. *J Am Soc Nephrol* **17**, 537-545.
- Stevens KK, Patel RK, Mark PB, Delles C & Jardine AG. (2015). Phosphate as a cardiovascular risk factor: effects on vascular and endothelial function. *Lancet* **385 Suppl 1**, S10.
- Stewart J, Kohen A, Brouder D, Rahim F, Adler S, Garrick R & Goligorsky MS. (2004). Noninvasive interrogation of microvasculature for signs of endothelial dysfunction in patients with chronic renal failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**, H2687-2696.
- Thambyrajah J, Landray MJ, McGlynn FJ, Jones HJ, Wheeler DC & Townsend JN. (2000). Abnormalities of endothelial function in patients with predialysis renal failure. *Heart* **83**, 205-209.
- Thang OH, Serné EH, Grooteman MP, Smulders YM, ter Wee PM, Tangelder GJ & Nubé MJ. (2011). Capillary rarefaction in advanced chronic kidney disease is associated with high phosphorus and bicarbonate levels. *Nephrol Dial Transplant* **26**, 3529-3536.
- Tok D, Gullu H, Erdogan D, Topcu S, Ciftci O, Yildirim I & Muderrisoglu H. (2005). Impaired coronary flow reserve in hemodialysis patients: a transthoracic Doppler echocardiographic study. *Nephron Clin Pract* **101**, c200-206.
- Tran ED, DeLano FA & Schmid-Schönbein GW. (2010). Enhanced matrix metalloproteinase activity in the spontaneously hypertensive rat: VEGFR-2 cleavage, endothelial apoptosis, and capillary rarefaction. *J Vasc Res* **47**, 423-431.
- Tran ED, Yang M, Chen A, Delano FA, Murfee WL & Schmid-Schönbein GW. (2011). Matrix metalloproteinase activity causes VEGFR-2 cleavage and microvascular rarefaction in rat mesentery. *Microcirculation* **18**, 228-237.

- Tsai YC, Lee CS, Chiu YW, Kuo HT, Lee SC, Hwang SJ, Kuo MC & Chen HC. (2015). Angiotensin-2 as a Prognostic Biomarker of Major Adverse Cardiovascular Events and All-Cause Mortality in Chronic Kidney Disease. *PLoS One* **10**, e0135181.
- Törnig J, Amann K, Ritz E, Nichols C, Zeier M & Mall G. (1996). Arteriolar wall thickening, capillary rarefaction and interstitial fibrosis in the heart of rats with renal failure: the effects of ramipril, nifedipine and moxonidine. *J Am Soc Nephrol* **7**, 667-675.
- van der Veldt AA, de Boer MP, Boven E, Eringa EC, van den Eertwegh AJ, van Hinsbergh VW, Smulders YM & Serné EH. (2010). Reduction in skin microvascular density and changes in vessel morphology in patients treated with sunitinib. *Anticancer Drugs* **21**, 439-446.
- Vanholder R, Massy Z, Argiles A, Spasovski G, Verbeke F, Lameire N & Group EUTW. (2005). Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality. *Nephrol Dial Transplant* **20**, 1048-1056.
- Watanabe M, Hitomi M, van der Wee K, Rothenberg F, Fisher SA, Zucker R, Svoboda KK, Goldsmith EC, Heiskanen KM & Nieminen AL. (2002). The pros and cons of apoptosis assays for use in the study of cells, tissues, and organs. *Microsc Microanal* **8**, 375-391.
- Weiß C. (2013). Schätzverfahren. In *Basiswissen Medizinische Statistik*, 6. Auflage edn, pp. 155. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- Zhang AH, Wang G, Zhang DL, Zhang QD, Liu S, Liao Y, Yin Y & Liu WH. (2012). Association between VEGF receptors and baseline peritoneal transport status in new peritoneal dialysis patients. *Ren Fail* **34**, 582-589.

7 Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Dorothea Burkhardt, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Rarefizierung der Mikrovaskulatur im Omentum chronisch niereninsuffizienter Kinder 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.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

8 Lebenslauf

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

9 Publikationsliste

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Dorothea Burkhardt hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Dorothea Burkhardt, Maria Bartosova, Betti Schaefer, Niels Grabe, Bernd Lahrman, Hamoud Nasser, Christian Freise, Axel Schneider, Anja Lingnau, Petra Degenhardt, Bruno Ranchin, Peter Sallay, Rimante Cerkauskiene, Michal Malina, Gema Ariceta, Claus Peter Schmitt, Uwe Querfeld, Reduced Microvascular Density in Omental Biopsies of Children with Chronic Kidney Disease, PLOS One, 2016

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen): diese Publikation stellt einen Teil meiner Doktorarbeit dar. Teil meiner Arbeit war die Auswahl und Rekrutierung der Probanden, Entnahme und Verarbeitung der Biopsien, immunhistochemische Methoden, insb. der CD 31-Immunhistochemie, sowie Etablierung und Durchführung der manuellen Analyseverfahren mittels des Digitalmikroskops wie auch die statistische Auswertung der Ergebnisse.

Publikation 2: Schaefer B, Bartosova M, Macher-Goeppinger S, Ujszaszi A, Wallwiener M, Nyarangi-Dix J, Sallay P, Burkhardt D, Querfeld U, Pfeifle V, Lahrman B, Schwenger V, Wühl E, Holland-Cunz S, Schaefer F & Schmitt CP, Quantitative Histomorphometry of the Healthy Peritoneum., Sci Rep, 2016

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen): Rekrutierung der Probanden, Entnahmeplanung und weitere Aufbereitung der peritonealen Biopsien.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

10 Anhang

10.1 Internationale Peritonealbiopsie-Studie bei Kindern

10.1.1 Anlage 1: Beispiel für Aufklärungsschrift für niereninsuffiziente Jugendliche

Information für Jugendliche an der Dialyse (14-17 Jahre)

Liebe/r,

leider arbeiten Deine Nieren so schlecht, dass Du eine Bauchfelldialyse (Peritonealdialyse) benötigst. Von Erwachsenen an der Peritonealdialyse weiß man, dass sich im Verlauf der Dialysebehandlung die Struktur des Bauchfells leider verändert und die Filtrationsleistung (Ultrafiltration) schlechter wird. Auch bei Kindern und Jugendlichen scheinen Veränderungen des Bauchfells an der Peritonealdialyse aufzutreten. Entsprechende Gewebeuntersuchungen sind jedoch bisher nur in Einzelfällen erfolgt. Wir wollen deshalb im Rahmen einer internationalen Studie bei 300 Kindern an der Peritonealdialyse das Bauchfell untersuchen. Wir beabsichtigen deshalb im Rahmen von aus anderen Gründen erforderlichen Operationen kleine Gewebeproben aus dem Bauchfell zu entnehmen. Wir möchten nun auch Dich fragen, ob Du an dieser Studie teilnimmst. Sie wird im Folgenden genau beschrieben und mit Dir mündlich besprochen. Auch im Verlauf kannst Du jederzeit Fragen zu der Studie stellen.

Wie wird die Studie durchgeführt?

Um die Bauchfelldialyse durchführen zu können, benötigst Du einen Katheter. Im Rahmen der Katheteranlage sollen kleine Gewebeproben entnommen werden. Eine Probe entnehmen wir aus dem sogenannten Netz, einer losen, dem Darm aufliegenden Struktur. Sie wird routinemäßig im Rahmen der Operation teilweise entfernt, da sie den Katheter verstopfen kann, was eine erneute Operation erforderlich machen würde. Das entfernte Netz wird normalerweise entsorgt. Diese Probenentnahme belastet Dich also nicht. Zwei weitere Proben entnehmen wir aus dem Bereich der Eintrittsstelle des Katheters in den Bauch. Sie sind ca. 1 x 1 cm groß und lediglich 3 mm dick. Diese Entnahme geht sehr schnell und verlängert deshalb die Operation allenfalls um wenige Minuten. Zusätzliche Schmerzen, Blutungen und die Entstehung eines Lecks in der Bauchhöhle sind dadurch nicht zu erwarten. Der Operateur und der in der Regel bei der Operation anwesende

Dialysearzt prüfen wie auch sonst üblich noch während der Operation, dass das Bauchfell dicht ist. Auch die Funktion des Bauchfells wird durch die Entnahme der Proben nicht beeinträchtigt.

Selten ist im Verlauf der Dialyse eine erneute Operation im Bereich der Bauchhöhle erforderlich, z.B. ein Katheterwechsel. Dann und ein letztes Mal im Rahmen einer hoffentlich bald erfolgenden Nierentransplantation wollen wir Dir erneut 3 Gewebeproben entnehmen. Bei diesen Operationen wird das Bauchfell eröffnet, so dass der Operateur ohne zusätzlichen Aufwand an das Bauchfell gelangt. Auch das oben beschriebene Netz wächst mit Dir Kind mit, so dass wir auch aus diesem wieder Proben entnehmen können.

Des Weiteren wollen wir Dir 10 ml Blut abnehmen (cirka 1 Esslöffel). Diese Abnahme erfolgt im Rahmen einer sowieso nötigen Blutabnahme, Du erhältst dafür also keinen zusätzlichen Stich. Die Blutmenge ist so gering, dass Du davon nichts merkst. Wir wollen im Blut u.a. Salze und Eiweiße bestimmen, die möglicherweise mit Veränderungen des Bauchfells im Zusammenhang stehen. Auch wollen wir schauen, ob Gene (Erbanlagen) einen Einfluss auf das Bauchfell haben können. Wir wollen diese, wenn Du einverstanden bist, hinsichtlich bereits bekannter Veränderungen (Mutationen), aber auch nach bisher noch nicht beschriebenen Veränderungen untersuchen. Die Blutentnahme erfolgt bei jeder Operation mit Gewinnung von Gewebeproben. Also vermutlich zweimal. Wenn Du weitere Operationen an der Bauchhöhle benötigst auch häufiger, maximal jedoch alle 3 Monate. Wir sammeln darüber hinaus Dialysatproben (je 5 ml) aus einem Auslauf und einem sowieso bei Dir durchgeführten Funktionstest (PET). So können wir die Transportleistung des Bauchfells genauer analysieren.

Welchen Nutzen könnte die Teilnahme haben?

Da wir Dein Bauchfell genau unter dem Mikroskop untersuchen, können wir Dir voraussichtlich mitteilen, ob und wie sehr das Bauchfell durch die Dialyse in Mitleidenschaft gezogen wird und können möglicherweise die Behandlung entsprechend anpassen. Versprechen können wir dies aber nicht. Deine üblichen Blutwerte kommst Du wie immer mitgeteilt. Bitte habe aber dafür Verständnis, dass wir Dir Untersuchungsergebnisse der Spezialuntersuchungen nicht mitteilen können. Es handelt sich um wissenschaftliche Analysen deren Wert noch nicht bewiesen ist. Am Ende der gesamten Studie, teilen wir Dir gerne die neuen Erkenntnisse mit. Insgesamt hoffen wir, durch die Studie die Ursache für die Veränderungen des Bauchfells bei Kindern und Jugendlichen besser zu verstehen und in Zukunft noch bessere Dialyselösungen entwickeln zu können.

Wie wird der Datenschutz gewährleistet?

Alle im Rahmen der Studie erhobenen Daten werden ohne Namensnennung ausschließlich mit einem Code verschlüsselt in eine Datenbank eingegeben und auf unbestimmte Zeit gespeichert. Nur der Studienarzt ist in der Lage, die Daten Dir zuzuordnen. Auch auf den Blut-, Dialysat- und Gewebeproben wird lediglich der Patienten-Code angegeben, so dass die Herkunft der Proben in keinem Labor zurückverfolgt werden kann.

Die Blut-, Dialysat und Gewebeproben werden nach Abschluss der Studie noch 20 Jahre aufbewahrt (solange Du Deine Einwilligung nicht widerrufst) und dann vernichtet.

Weitere Hinweise für Dich

Es liegt alleine an Deinen Eltern und Dir, eine Entscheidung zu treffen. Wenn Du zur Teilnahme bereit bist, wirst Du gebeten, eine Einwilligungserklärung zu unterzeichnen.

Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig. Du kannst jederzeit und ohne Angabe von Gründen die Zustimmung zur Teilnahme an der Studie widerrufen, ohne dass sich dies nachteilig auf Deine weitere medizinische Betreuung auswirkt. Auf Wunsch werden dann alle für die Studie gespeicherten Daten gelöscht bzw. anonymisiert (d.h. diese Daten können definitiv nicht mehr mit Dir in Verbindung gebracht werden) und alle noch vorhandenen Blut- und Gewebeproben vernichtet, sofern Du das willst.

Wenn Du weitere Fragen hast, kannst Du Dich jederzeit an Deinen Dich betreuenden Arzt wenden. Über Deine Teilnahme würden wir uns freuen!

10.1.2 Anlage 2: Beispiel für Aufklärungsschrift für gesunde Jugendliche (Kontrollgruppe)

Information für Jugendliche (14-17 Jahre)

Liebe/r,

Kinder mit fehlender Nierenfunktion werden meist über die Bauchhöhle dialysiert und so das Blut gereinigt. Leider kommt es im Verlauf der Zeit zur Veränderung des Bauchfells (der Innenwand der Bauchhöhle), die Reinigungsleistung der Dialyse nimmt ab. Diese Veränderungen wollen wir nun bei Kindern an der Bauchfelldialyse untersuchen. Allerdings wissen wir leider bisher auch nicht genau wie bei gesunden Kindern das Bauchfell aufgebaut ist.

Vermutlich nimmt z.B. die Dicke des Bauchfells mit dem Alter des Kindes zu. Deshalb wollen wir bei Kindern und Jugendlichen, die eine Operation an der Bauchhöhle bekommen kleine Proben aus dem Bauchfell gewinnen. Wir möchten nun auch Dich fragen, ob Du an dieser Untersuchung teilnimmst. Sie wird im Folgenden genau beschrieben und mit Dir mündlich besprochen. Auch im Verlauf kannst Du jederzeit Fragen zu der Studie stellen.

Wie wird die Studie durchgeführt?

Im Rahmen der Dir vorgesehenen Operation wird die Bauchhöhle eröffnet. In diesem Bereich wollen wir zwei ca. 1 x 1 cm groß und lediglich 3 mm dicke Proben aus dem Bauchfell entnehmen. Des Weiteren eine Probe aus dem sogenannten Netz, einer losen, dem Darm aufliegenden Struktur. Diese Entnahme geht sehr schnell und verlängert deshalb die Operation allenfalls um wenige Minuten. Zusätzliche Schmerzen und Blutungen in die Bauchhöhle sind dadurch nicht zu erwarten. Die Gewebeproben sind dünn und oberflächlich. Auch die Funktion des Bauchfells, das Vorbeigleiten von Darmstrukturen zu ermöglichen, wird durch die Entnahme der Proben nicht nennenswert beeinträchtigt.

Des Weiteren wollen wir Dir 5 ml Blut abnehmen (cirka 1 Teelöffel). Diese Abnahme erfolgt im Rahmen einer sowieso nötigen Blutabnahme, Du erhältst dafür also keinen zusätzlichen Stich. Die Blutmenge ist so gering, dass Du davon nichts merkst. Wir wollen im Blut u.a. Salze und Eiweiße bestimmen, die mit Veränderungen des Bauchfells im Zusammenhang stehen können.

Welchen Nutzen könnte die Teilnahme haben?

Vermutlich wirst Du keinen persönlichen Nutzen durch die Untersuchung haben, da Dein Bauchfell gesund ist. Sollten wir jedoch wider Erwarten auffällige Befunde an Deinem Bauchfell oder bei den Bestimmungen Deiner Blutwerte erheben, teilen wir Dir diese gerne mit. Insgesamt hoffen wir durch die Studie die Ursache für die Veränderungen des Bauchfells bei Kindern und Jugendlichen an der Bauchfelldialyse besser zu verstehen und in Zukunft bessere Dialyselösungen entwickeln zu können.

Wie wird der Datenschutz gewährleistet?

Alle im Rahmen der Studie erhobenen Daten werden ohne Namensnennung ausschließlich mit einem Code verschlüsselt in eine Datenbank eingegeben und auf unbestimmte Zeit gespeichert. Nur der Studienarzt ist in der Lage, die Daten Dir zuzuordnen. Auch auf den Blutproben wird lediglich der Patienten-Code angegeben, so dass die Herkunft der Proben in keinem Labor zurückverfolgt werden kann.

Die Blut-, Gewebeproben werden nach Abschluss der Studie noch 20 Jahre aufbewahrt (solange Du Deine Einwilligung nicht widerrufst) und dann vernichtet.

Weitere Hinweise für Dich

Es liegt alleine an Deinen Eltern und Dir, eine Entscheidung zu treffen. Wenn Du zur Teilnahme bereit bist, wirst Du gebeten, eine Einwilligungserklärung zu unterzeichnen.

Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig. Du kannst jederzeit und ohne Angabe von Gründen die Zustimmung zur Teilnahme an der Studie widerrufen, ohne dass sich dies nachteilig auf Deine weitere medizinische Betreuung auswirkt. Auf Wunsch werden dann alle für die Studie gespeicherten Daten gelöscht bzw. anonymisiert (d.h. diese Daten können definitiv nicht mehr mit Dir in Verbindung gebracht werden) und alle noch vorhandenen Blut- und Gewebeproben vernichtet, sofern Du das willst.

Wenn Du weitere Fragen hast, kannst Du Dich jederzeit an Deinen Dich betreuenden Arzt wenden. Über Deine Teilnahme würden wir uns freuen!