

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus dem Lehrstuhl für Orthopädie

Direktor: Prof. Dr. W. Rüter

Etablierung eines *in vivo* Modells zur vergleichenden Analyse der Mikrozirkulation im Knochen- und Weichgewebe in der NOD scid gamma-Maus

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Gerrit Hauenherm
aus Meppen

Hamburg, 2016

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 03.08.2016**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. W. Rüther

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. F. Barvencik

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	8
2.1.	Versuchstiere	8
2.2.	Femur Window	9
2.3.	Rückenhautkammer	10
2.4.	Femur Window-Operation	11
2.5.	Rückenhautkammer-Operation	14
2.6.	Intravitalmikroskopie	17
2.7.	Fluorochrome	17
2.8.	Versuchsablauf in der Femur Window-Gruppe	18
2.9.	Versuchsablauf in der Rückenhautkammer-Gruppe	22
2.10.	Biometrische Planung	25
2.11.	Körpergewichtsmessung	26
2.12.	Auswertung der mikrovaskulären Gefäßparameter	26
2.12.1.	Blutflussgeschwindigkeit (V_{mean}) und Blutflussrate (BFR)	26
2.12.2.	Gewebepерфуsionsrate (TPR)	28
2.12.3.	Funktionelle Gefäßdichte (VD)	29
2.12.4.	Gefäßdurchmesser (D)	29
2.12.5.	Mikrovaskuläre Gefäßpermeabilität (P)	29
2.12.6.	Oberflächen-Volumen-Verhältnis (V/S)	30
2.13.	Statistische Auswertung	31
3.	Ergebnisse	32
3.1.	Körpergewicht	32
3.2.	Blutflussgeschwindigkeit (V_{mean})	33
3.3.	Blutflussrate (BFR)	35
3.4.	Gewebepерфуsionsrate (TPR)	37
3.5.	Funktionelle Gefäßdichte (VD)	38
3.6.	Gefäßdurchmesser (D)	40
3.7.	Mikrovaskuläre Gefäßpermeabilität (P)	42
4.	Diskussion	44
4.1.	Diskussion des Tiermodells	44
4.2.	Diskussion der Untersuchungstechniken	45

4.3.	Diskussion der Ergebnisse	47
5.	Zusammenfassung	55
5.1.	Summary	56
6.	Abbildungsverzeichnis	57
7.	Abkürzungsverzeichnis	59
8.	Literaturverzeichnis	61
9.	Danksagung	78
10.	Lebenslauf	79
11.	Anhang	80
11.1.	Ergebnistabellen	80
11.1.1.	Rückenhautkammer-Gruppe	80
11.1.2.	Femur Window-Gruppe	80
12.	Eidesstattliche Versicherung	81

1. Einleitung

Medizinische und biologische Prozesse und Fragestellungen erfordern in ihrer Erforschung immer häufiger Untersuchungen und Experimente die *in vivo* stattfinden. Viele dieser *in vivo* Untersuchungen und daraus resultierende wichtige Erkenntnisse wurden und werden an Versuchstieren gewonnen. Besonders die Mauspezies bietet dabei gegenüber anderen Tierarten den großen Vorteil, dass sie genetisch sehr gut in unzähligen Studien und Untersuchungen charakterisiert ist. Um diese *in vivo* - Untersuchungen auf die menschliche Physiologie und Pathophysiologie übertragen zu können, wurden „vermenschlichte Mäuse“ (humanized mice) entwickelt. Humanized mice sind immuninkompetente Tiere, in denen es möglich ist menschliche biologische Prozesse zu beobachten und diese dann auf die menschliche Physiologie und/oder Pathophysiologie zu übertragen (1). So wurde zunächst die Scid-Maus (Severe combined immunodeficiency) entwickelt (2). Scid-Mäuse haben eine eingeschränkte Fähigkeit T- und B-Lymphozyten zu bilden und Teile des Komplementsystems zu aktivieren. Es stellte sich allerdings heraus, dass Scid-Mäuse mit steigendem Alter doch zur Bildung von T- und B-Lymphozyten fähig sind und ein hohes Niveau an Natural-Killer-Zellen (NK-Zellen) und anderen Faktoren des angeborenen Immunsystems besitzen (3). Später wurde die Scid- auf die NOD-Mutation (Non-obese-diabetic) übertragen. NOD-Mäuse wurden 1980 entwickelt (4) und weisen eine Anfälligkeit zur Entwicklung eines autoimmunen insulinabhängigen Diabetes mellitus (IDDM) auf (5). Der Auslöser des autoimmunen Typ I Diabetes mellitus in den NOD-Mäusen ist eine Insulinitis, die durch Veränderungen der IL-2-Produktion und Unterdrückung der T-Zell-Immunantwort entsteht (4, 6, 7). Diese neu entwickelte NOD-scid-Mauslinie besitzt eine geringere Aktivität der NK-Zellen als die Scid-Mäuse und zusätzliche Defekte im angeborenen Immunsystem (8). Es gab aber noch immer Probleme mit der Restaktivität der NK-Zellen und des angeborenen Immunsystems und so kam es zu einer weiteren Entwicklung. Es wurde eine Mauslinie entwickelt, die eine homozygote Mutation des Interleukin-2 Rezeptors (IL-2R) γ -Ketten-Locus besaß (9). Die IL-2R γ -Kette ist ein essentieller Bestandteil der Rezeptoren von IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21 (10). Dies führt zu einer starken Funktionseinschränkung der T- und B-Lymphozyten und verhindert die Entwicklung von NK-Zellen (11). Diese Mutation in Verbindung mit der NOD-scid-Mutation führte zur NOD scid gamma-Maus (NOD-Prkdc^{scid} Il2rg) (12). Die NOD scid gamma-Maus gehört zu den

immunkompromittiertesten Mausstämmen die derzeit in der Forschung eingesetzt werden (1) und ermöglicht so eine verbesserte Erforschung immunologischer, onkologischer, hämatologischer und infektiologischer Fragestellungen. Durch den genetischen NOD-Hintergrund ist sie zusätzlich ein geeignetes Modell für die diabetologische Forschung.

Die Intravitalmikroskopie ist eine Möglichkeit sich diesen Forschungsfeldern zu nähern. Intravitalmikroskopie beschreibt den Vorgang einer *in vivo*-Betrachtung von Gewebe unterschiedlicher Art. Diese Beobachtung kann einmalig oder kontinuierlich mit oder ohne Zuhilfenahme einer, in das Versuchsobjekt implantierten Beobachtungskammer durchgeführt werden. Es wurden zahlreiche Beobachtungskammern und Techniken für die Intravitalmikroskopie entwickelt, um verschiedene Gewebe in unterschiedlichen Tiermodellen *in vivo* zu betrachten. So wurden Studien zu mikrovaskulären Parametern (13), zu Tumoren (14, 15), zur Wundheilung (16, 17) bis hin zu der Darstellung von inneren Organen durchgeführt (18). Die verschiedenen Beobachtungskammern wurden an verschiedenen tierischen (13, 18, 19) und auch menschlichen Geweben eingesetzt (17, 20). Unter den verschiedenen Beobachtungskammern die in der Intravitalmikroskopie angewendet werden, hat sich die Rückenhautkammer (Dorsal skinfold chamber) als besonders nützliches Instrument zur *in vivo* Beobachtung von subkutanem Gewebe der Maus etabliert. Zusätzlich zu den oben erwähnten Anwendungsmöglichkeiten wurden mit der Rückenhautkammer Transplantationsstudien (21), Studien zur Neovaskularisation von Biomaterialien (22) und mikrochirurgische Studien (23) durchgeführt.

Um intravitalmikroskopische Studien der Mikrozirkulation von Knochengewebe durchführen zu können, wurde in unserer Arbeitsgruppe das Femur Window entwickelt (24). Mit dem Femur Window ist es möglich, kontinuierliche *in vivo* Untersuchungen am Femur von Mäusen durchzuführen. Bisher wurden hauptsächlich Studien zur Tumorangiogenese im Knochengewebe und zur Knochenmetastasierung mit dem Femur Window durchgeführt (25-27) in denen sich das Femur Window als aussagekräftiges Studienmodell etablieren konnte. Untersuchungen zu weiteren Fragestellungen wie zum Beispiel der Knochendefektheilung sind ebenfalls realisierbar.

Diese beiden intravitalmikroskopischen Beobachtungskammern sind in der hier vorliegenden Studie zum Einsatz gekommen. Ziel der Studie war es zum ersten Mal

kontinuierlich und *in vivo* mikrozirkulatorische Parameter im Knochen- und im Subkutangewebe in der hochgradig immunkompromittierten NOD scid gamma-Maus zu erheben. Zum einen wird hier erstmalig die Mikrozirkulation von Knochen und Weichgewebe *in vivo* in der NOD scid gamma-Maus verglichen, zum anderen wird die Grundlage für weitere Studien mit dieser Mauslinie geschaffen, indem der physiologische Zustand der Mikrozirkulation charakterisiert wird.

Die Parameter dienen der Einschätzung der Mikrozirkulation und Angiogenese im Vergleich von Subkutan- und Knochengewebe.

Angiogenese ist die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Blutgefäßen (28). Sie spielt eine wichtige Rolle in der Embryo- und Organogenese der fetalen Entwicklung um die Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen und Stoffwechselabfallprodukte zu entsorgen (29, 30). Außerhalb der Fetalperiode findet die Angiogenese physiologisch während der Wundheilung, des Wachstums und in den weiblichen Reproduktionsorganen statt. Von der Angiogenese zu unterscheiden ist die Neubildung von Blutgefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen, die als Vaskulogenese bezeichnet wird (31).

Das Wachstum der Blutgefäße geschieht, ausgehend von bereits bestehenden Gefäßen, einerseits durch Sprossungs- und andererseits durch Spaltungsvorgänge aufgrund eines angiogenen Reizes. Dieser Reiz kann zum Beispiel eine Gewebehypoxie sein. Zur Hypoxie kommt es, wenn die maximale Sauerstoffdiffusionsstrecke von ca. 200µm im Gewebe überschritten wird (32). Ist ein Gewebe also mehr als 200µm von einem Blutgefäß entfernt, kommt es zur Neubildung von Gefäßen, um die Hypoxie zu überwinden.

Zu den Sprossungsvorgängen in der Angiogenese kommt es, indem angiogene Wachstumsfaktoren ausgeschüttet werden. Diese stimulieren vorhandene Endothelzellen zur Ausschüttung von Proteinase, die zur Lyse der Basalmembran in der Umgebung führen. Es kommt zur Endothelzellmigration in das Interstitium und so zur Bildung von Gefäßsprossen, die sich in Richtung der Quelle des angiogenen Stimulus verlängern. Die Lumenbildung findet statt und verschiedene Gefäßsprossen verbinden sich zu einem neuen Gefäßnetzwerk und der Blutfluss beginnt. Perizyten und glatte Muskelzellen sorgen für die notwendige Stabilität der neu gebildeten Blutgefäße und es bildet sich eine neue Basalmembran (33-35).

Bei den Spaltungsvorgängen der Angiogenese nähern sich zwei gegenüberliegende Kapillarwände eines Gefäßes aneinander an und kommen schließlich in Kontakt zueinander. Die Gefäßwand wird durchlässig und ermöglicht so Wachstumsfaktoren den Weg in das Gefäßlumen. Eine Säule aus Perizyten und Fibroblasten bildet sich an der Kontaktzone der zwei neuen Gefäße. Mit Hilfe dieser Zellen bildet sich neue extrazelluläre Matrix, die die zwei neu entstehenden Gefäße voneinander trennt. Der Blutfluss ist während des gesamten Umbauvorgangs gegeben. Diese Form der Angiogenese stellt also lediglich eine Umstrukturierung bereits vorhandener Zellen und Gefäße dar (36, 37).

Zu den bekanntesten angiogenen Wachstumsfaktoren die unerlässlich für die oben beschriebenen Vorgänge sind gehören neben zahlreichen anderen VEGF (Vascular endothelial growth factor), FGF-1 und 2 (Fibroblast growth factor 1 und 2) und PDGF (platelet derived growth factor) (38, 39). Während der physiologisch stattfindenden Angiogenese stehen diese im Gleichgewicht mit zahlreichen antiangiogenen Faktoren wie Ang2 (Angiopoietin 2) und Angiostatin (40).

Geraten diese Faktoren allerdings in ein Ungleichgewicht, so kann es zu zahlreichen, teils schwerwiegenden, Erkrankungen kommen. Zu unterscheiden sind Erkrankungen, die mit einer pathologisch erhöhten oder einer pathologisch erniedrigten Angiogeneseaktivität einhergehen (30).

Beispielsweise gehen die meisten Tumorerkrankungen mit einer erhöhten Angiogeneseaktivität einher. Durch die maximale Sauerstoffdiffusionsstrecke von 200µm ist das Wachstum von soliden Tumoren ohne die Fähigkeit zur Angiogenese auf 1-2 mm³ beschränkt (41, 42). Tumoren dieser Größe sind oft symptomlos und klinisch wenig relevant. Wird die Angiogenese und damit das Wachstum des Tumors unterdrückt, wird der Zustand der „Tumor Dormancy“ erreicht (43). Um über diese limitierte Größe hinaus wachsen zu können, ist die Bildung neuer Blutgefäße zur Versorgung des Tumors notwendig (35). Die Gewebehypoxie löst die Ausschüttung von angiogenen Wachstumsfaktoren wie VEGF aus und verschiebt so das Gleichgewicht von angiogenen und antiangiogenen Faktoren. Es kommt zum sogenannten „angiogenic switch“ (44). Der Tumor kann so über seine zuvor limitierte Größe hinaus wachsen (45).

Die Angiogenese ist bei vielen Erkrankungen von erheblicher therapeutischer Bedeutung. Man unterscheidet die antiangiogenetische Therapie von der proangiogenetischen Therapie.

So können bestimmte solide Tumoren einer antiangiogenen Therapie unterzogen werden, mit dem Ziel das Tumorwachstum einzudämmen und den Status der „Tumor Dormancy“ zu erreichen. Im Jahr 2004 wurde Bevacizumab (Avastin®), ein monoklonaler Antikörper gegen VEGF, in den USA zur Behandlung des metastasierten Kolon- oder Rektumkarzinoms zugelassen (46). Es folgten Zulassungen zur Behandlung des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (47), des Nierenzellkarzinoms (48) und des Ovarialkarzinoms (49).

Die Arteriosklerose kann andererseits einer proangiogenetischen Therapie unterzogen werden, indem Wachstumsfaktoren eingesetzt werden, die einen günstigen Einfluss auf die Angiogenese nehmen (50). So wurden bisher mehrere klinische Studien mit den proangiogenetischen Wachstumsfaktoren VEGF und FGF-1 zur Behandlung der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) und der koronaren Herzkrankheit (KHK) durchgeführt (51-54).

Die Hoffnungen, die zunächst in die angiogenetische Therapie gesetzt wurden, konnten bisher allerdings nicht vollends erfüllt werden. Gerade in der antiangiogenen Krebsbehandlung konnten zwar Erfolge verzeichnet werden, diese blieben aber hinter den erwarteten Ergebnissen zurück. Doch steht die Forschung hier erst an ihrem Anfang und weitere Schritte müssen unternommen werden, um die Mechanismen der pathologischen Angiogenese und deren Therapiemöglichkeiten zu verstehen (55).

Die Mikrozirkulation, die sich definitionsgemäß in den Arteriolen, Venolen und Kapillaren abspielt, nimmt aufgrund seiner enorm großen Oberfläche von mehr als 1000m² die entscheidende Rolle im Rahmen des Stoffwechsels ein (56). Durch die Verlangsamung des Blutstroms in diesen Gefäßen und der großen Oberfläche ist in der Mikrozirkulation die Kontaktzeit des Blutes mit der Gefäßwand am längsten und ermöglicht so erst einen suffizienten Substrat- und Zellaustausch zwischen Blut und Interstitium. Dieser Stoff- und Gasaustausch findet in erster Linie durch Diffusion, das heißt durch Wanderung entlang eines Konzentrationsgefälles und Konvektion, also mit dem Flüssigkeitsstrom statt (57). Aus dem Zusammenhang von Gefäßoberfläche, Gewebepfusion und Gefäßdurchlässigkeit wird deutlich, dass Veränderungen eines oder mehrerer Parameter zu einer empfindlichen Störung des mikrovaskulären

Gleichgewichts führen und unmittelbar nachfolgend Veränderungen des mikrovaskulären metabolischen Umfeldes entstehen können. Eine Abnahme der Gefäßdichte bewirkt eine Einschränkung der Substrataustauschfläche und über die verlängerte Diffusionsstrecke eine Verlangsamung des Stoffaustausches bis zu dessen Erliegen. Eine Reduktion der mikrovaskulären Gefäßdichte wurde beispielsweise im diabetischen Modell beschrieben (58).

Weiterhin führt eine Abnahme der Blutflussgeschwindigkeit zu einer verlängerten Kontaktzeit von Blut und Endothel über das physiologische Maß hinaus und so zu einem früheren Erreichen des Stoffaustauschäquilibrium (59). Auch dies kann zu einem verringerten Substratangebot und –abtransport führen.

Die Blutflussgeschwindigkeit hängt einerseits vom Gefäßdurchmesser und der Blutdruckdifferenz über dem Gefäßbett ab und andererseits von der Viskosität des Blutes (59). Abweichungen der Permeabilität können weiterhin unphysiologische onkotische Drücke im Gefäß verursachen und somit eine Viskositätsänderung des Blutes bewirken.

Funktionelle Veränderungen der Mikrozirkulation gehen den morphologischen Veränderungen voraus und prägen somit bedeutend die Gefäßmorphologie (60). Folglich beeinflussen die Eigenschaften der Mikrozirkulation nicht nur den Substrattransport, sondern auch die Anpassung an veränderte metabolische Anforderungen bzw. lokale Bedingungen, wie z.B. während des Wachstums, der Wund- und Knochenbruchheilung und im Rahmen von entzündlichen Vorgängen (61-64).

Die komplexen Interaktionen, die die einzelnen Mikrozirkulationsparameter miteinander verbindet unterstreichen die Bedeutung, ein möglichst umfassendes Bild aller mikrovaskulären Parameter zu erreichen, um so eventuelle Abweichungen und Veränderungen einzelner Parameter gewichten zu können.

Die Angiogenese und die Mikrozirkulation stehen in einem engen Zusammenhang. So ist beispielsweise die Gefäßdichte ein Surrogatmarker für die Angiogenese (65, 66). In der Diagnostik und Therapie des Brustkrebs gilt die Gefäßdichte sogar als Prognosefaktor für den Verlauf der Erkrankung (67). Gerade intravitalmikroskopische Untersuchungen zur Tumorangiogenese (68-70), zur Knochendefektheilung (71, 72) und Untersuchungen zur Vaskularisation im Tissue Engineering (73-75) nutzten die funktionelle Gefäßdichte bisher als Marker für eine stattfindende Angiogenese. Doch

nicht nur intravitalmikroskopische Studien, auch Untersuchungen mit histologischer Bildgebung (66, 76) nutzen die Gefäßdichte als Angiogeneseparameter.

Die Angiogenese und die Mikrozirkulation sind aktive, dynamische Prozesse. Die Intravitalmikroskopie durch Beobachtungskammern ist ein leistungsfähiges Instrument um kontinuierliche *in vivo* Beobachtungen dieser Prozesse mit einer hohen räumlichen und zeitlichen Auflösung durchzuführen (77). Die hier gezeigten Untersuchungen fanden mit den etablierten Modellen der Rückenhautkammer und des Femur Windows statt, um so eine Vergleichsmöglichkeit der Mikrozirkulation und Angiogenese im Subkutan- und im Knochengewebe zu gewinnen.

Die Verwendung von Mäusen in der intravitalmikroskopischen Forschung bringt den Vorteil mit sich, dass Mäuse die am besten charakterisierten Versuchstiere darstellen. In dieser Studie wurde zum ersten Mal, die Mikrozirkulation in der NOD scid gamma-Maus untersucht und hierbei die Perfusion von Knochen- und Weichgewebe miteinander verglichen. Diese Versuchstiere gehören zu den immunkompromittiertesten Mausstämmen die derzeit in der Forschung eingesetzt werden (1).

Es sollen so Vergleichsdaten für zukünftige pathologische und therapeutische Fragestellungen für diese Mauslinie geschaffen werden, um die weitere Erforschung der Angiogenese und der angiogenetischen Therapie voranzubringen.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere:

Für die in dieser Studie beschriebenen Versuche wurden höchstgradig immunkompromittierte NOD scid gamma (Non-obese diabetic–severe combined immunodeficiency/ γ -chain, (NOD-Prkdc^{scid} Il2rg)) Mäuse (1) verwendet. NOD scid gamma Mäusen mangelt es an reifen T-, B- und Natural Killer-Zellen (12). Außerdem haben sie mehrere Defekte in verschiedenen Zytokin-Signalwegen und ihrem angeborenen Immunsystem (8, 12).

Bei Eintritt in den Versuch hatten die Mäuse ein Lebensalter von 12 Wochen und waren allesamt männlich. Die Tiere wurden in der zentralen Tierhaltung des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf gezüchtet und sind dort bis zur Geschlechtsreife aufgewachsen und gehalten worden.

Die Haltung erfolgte bei konstanten Bedingungen in einem Käfig mit Holz-Einstreu bei 20°C und 55% Luftfeuchtigkeit. Durch künstliches Raumlicht wurde ein 12- Stunden Tag- und Nachtrhythmus aufrechterhalten. Den Tieren stand Futter und keimfreies Wasser ad libitum zur Verfügung. Bis zum Eintritt in den Versuch wurden die Mäuse in Gruppen von vier bis fünf Tieren gehalten. Ab dem Eintritt in die Versuchsprozeduren wurden die Mäuse einzeln in separaten Käfigen gehalten.

Sämtliche beschriebenen Versuchsprozeduren an den Tieren sind im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz abgelaufen und durch das Amt für Gesundheit in Hamburg mit der Tierversuchsnummer 05/12 genehmigt worden.

2.2. Femur Window:

Das Femur Window (Maschinenshop, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf in Kooperation mit dem Zentrum für Biomechanik, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, Hamburg, Deutschland) ist speziell für intravitalmikroskopische Beobachtungen von Knochengewebe entwickelt worden. Viele Fragestellungen zur ossären Mikrozirkulation konnten hiermit bereits beantwortet werden (24-27).

Das Femur Window stellt einen Zylinder aus Titan mit einem Innendurchmesser von 4mm dar. Es wird mit einem U-förmigen Haltebügel, der medial des Femurs entlang geführt wird, an seiner Position gehalten. Der Haltebügel besitzt an seinen beiden Enden jeweils ein Gewinde, über das Femur Window und Haltebügel mit zwei Muttern der Größe M1 miteinander verschraubt werden (s. Abb. 1). Der Titanbügel ist zum besseren Sitz am Knochen mittig abgeflacht.

Die Öffnung des Femur Windows ist mit einem, im Durchmesser 5mm messenden, Deckglas verschlossen und ermöglicht so die folgenden kontinuierlichen intravitalmikroskopischen Beobachtungen. Das gesamte Knochenfenster hat ein Eigengewicht von circa 2,0g.

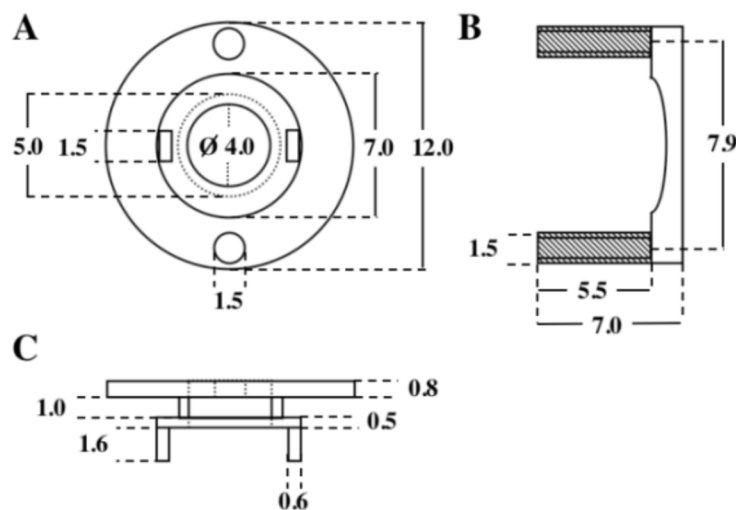


Abbildung 1: Technische Zeichnung des Femur Window. Ansicht des Zylinders von oben (A) und seitlich (C). Seitliche Ansicht des Bügels (B). Maßangaben in Millimeter (24).

2.3. Rückenhautkammer:

Die Rückenhautkammer (Dorsal Skin Fold Chamber, Maschinenshop, Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA) besteht aus zwei Titanrahmen und einem, im Durchmesser etwa 11mm messenden, Deckglas, welches mit einem Sprengring im Rahmen fixiert wird. Die beiden Titanrahmen werden mit drei Schrauben und sechs Muttern zusammengefügt. (s. Abb. 2) Das Gesamtgewicht aller Bauteile beträgt 3,2g.

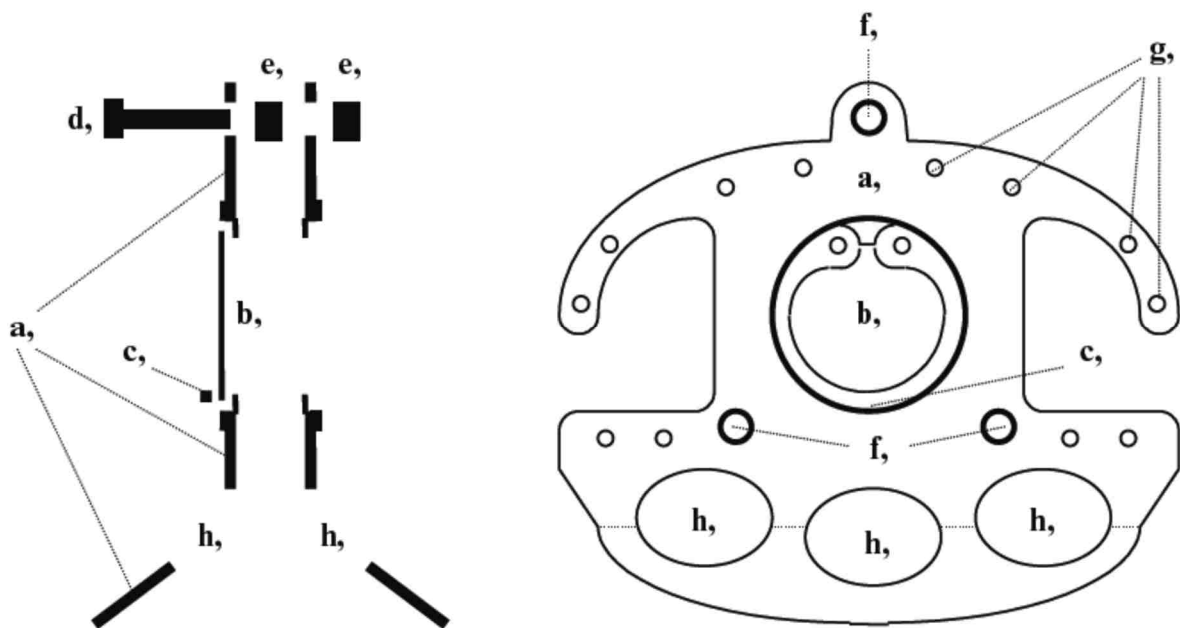


Abbildung 2: Technische Zeichnung der Rückenhautkammer. (A) Schnitt durch die Mitte der Rückenhautkammer, (B) Seitliche Ansicht. a Titanrahmen, b Deckglas, c Sprengring, d Schraube, e Mutter, f Bohrlöcher für die Schrauben, g Bohrlöcher für die Fixationsnähte, h Aussparungen zur Gewichtsreduktion der Kammer (77).

2.4. Femur Window-Operation:

Alle Bauteile des Femur Windows und die zur Implantation benötigten Instrumente wurden vorher für zwei Stunden bei 200°C autoklaviert oder waren sterile Einmalprodukte. Die physiologische Körpertemperatur der Versuchstiere während des Eingriffs wurde durch Verwendung einer Wärmeunterlage (Witte + Sutor GmbH, Murrhardt, Deutschland) sichergestellt.

Die Implantation des Femur Window wurde nach dem folgenden Arbeitsschema durchgeführt.

Das Körpergewicht des Versuchstieres wurde bestimmt (Waage Modell LS2000, Ohaus Scale Corporation, Pine Brook, NJ, USA), um dann eine gewichtsadaptierte, systemische Anästhesie mit 7,5mg Ketamin (Ketanest S® 25mg/ml, Pfizer Pharma GmbH, Berlin, Deutschland) und 2,5mg Xylazinhydrochlorid (Rompun® 2%, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) /100g Körpergewicht durch intraperitoneale Injektion zu verabreichen. Die Narkosetiefe wurde durch Überprüfung des aufgehobenen Cornealreflex festgestellt und die Augen mit Bepanthen Augen- und Nasensalbe (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) vor Austrocknung geschützt. Der rechte Hinterlauf des Versuchstieres wurde rasiert, (Philishave C281, Philips, Amsterdam, Niederlande) depiliiert (Enthaarungscreme Balea, dm, Karlsruhe, Deutschland) und anschließend sorgfältig desinfiziert (Cutasept F, Bode Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland).

Unter einem Stereomikroskop (STEMI 2000-C, Carl Zeiss Lichtmikroskopie, Göttingen, Deutschland) mit Hilfe einer Kaltlichtquelle (KL1500 LCD, Carl Zeiss Lichtmikroskopie, Göttingen, Deutschland) zur Ausleuchtung des Operationssitus, fanden die weiteren Operationsschritte unter sterilen Kautelen statt. Die Haut wurde im Verlauf des Femurs auf circa einem Zentimeter Länge eröffnet und das subkutane Fettgewebe präpariert. Nach Eröffnung der Muskelfaszie wurden die Muskeln stumpf vom Femur abgeschoben und die Femurdiaphyse in ihrer gesamten Länge dargestellt (s. Abb. 3). Mit einer elektrischen Fräse (Fine Science Tools Inc., North Vancouver, Kanada) wurde die Crista femoralis abgefräst. Danach wurde mit einem Einmalskalpell (Cutfix #11, Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) der Markraum eröffnet und eine plane Auflagefläche für das Femur Window geschaffen. Nun wurde der Haltebügel unter dem Femur hindurchgeführt, so dass die Gewinde des Bügels nach lateral zeigen. Das Knochenfenster wurde mit dem Deckglas verklebt, auf den Haltebügel

aufgesetzt und dann mit diesem durch zwei Muttern der Größe M1 verschraubt. Die Fixation am Knochen erfolgte in Sandwich-Technik (s. Abb. 4). Zur Abdichtung und Stabilisierung des Femurs mit dem Knochenfenster wurden bestehende Freiräume mit Stumpfaufbaumaterial (LuxaCore®, DMG, Hamburg, Deutschland) aufgefüllt. Abschließend wurde die Wunde durch nicht resorbierbares Nahtmaterial (Ethibond®Excel 5-0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) in Einzelknopfnahntechnik verschlossen. Durch die muskelschonende Operationstechnik wurde einer Insuffizienz des Bewegungsapparates vorgebeugt.

Zur Dokumentation des Operationsergebnisses wurde das implantierte Femur Window in eine Halterung eingespannt, um lichtmikroskopische Aufnahmen (Kamera Axiocam H, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) aufzunehmen (s. Abb. 5). Im Anschluss an den Eingriff wurden die Versuchstiere bis zum Erwachen aus der Narkose auf einer Wärmeunterlage (Witte + Sutor GmbH, Murrhardt, Deutschland) gehalten. Die gesamte oben beschriebene Prozedur nahm circa 30 Minuten in Anspruch.



Abbildung 3: Intraoperative Darstellung der Femurdiaphyse während der Femur Window Implantation. (Maßstab = 25mm)

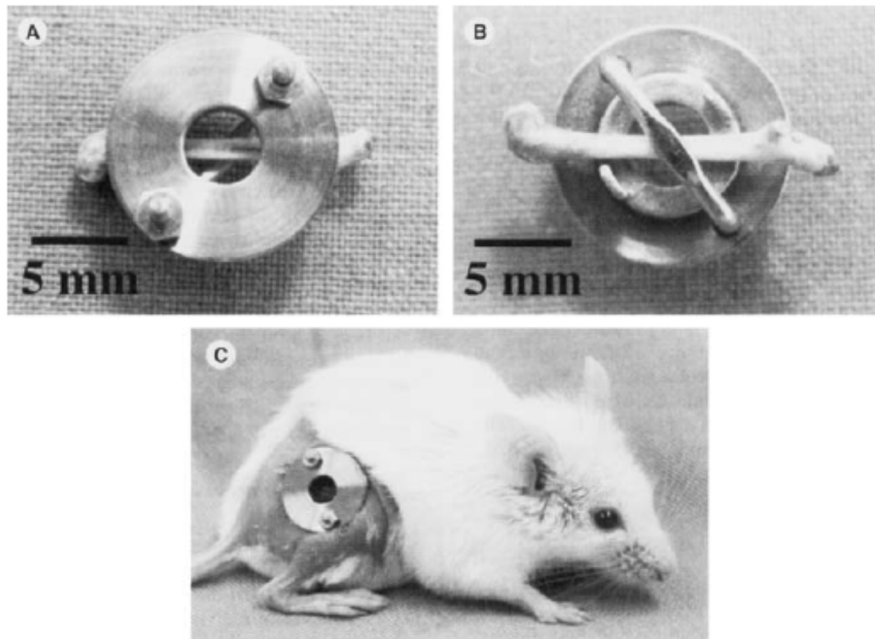


Abbildung 4: Position des Femurs im Femur Window, dargestellt am explantiertem Femur (A+B), Position des Femur Window *in vivo* (C) (24)

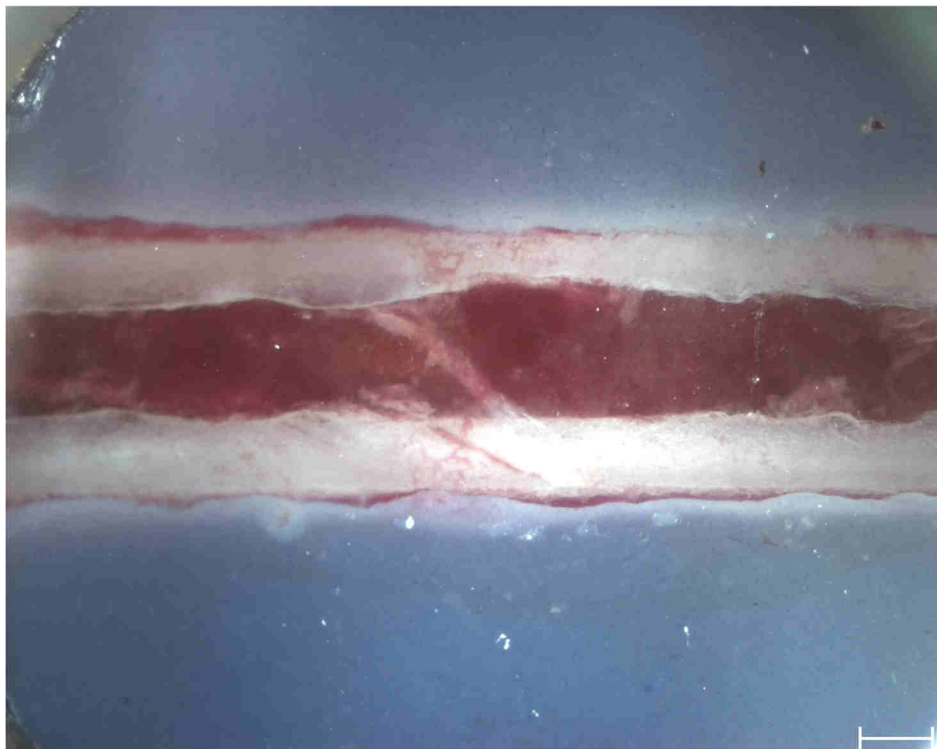


Abbildung 5: Lichtmikroskopische Aufnahme in 2,5x Vergrößerung direkt nach der Femur Window-Operation (Tag 0). (Maßstab = 0,5mm)

2.5. Rückenhautkammer-Operation:

Vor der Rückenhautkammer-Operation wurden alle Bauteile und die benötigten Instrumente für zwei Stunden bei 200°C autoklaviert oder waren sterile Einmalprodukte. Auch bei diesem Eingriff wurden die Versuchstiere auf einer Wärmeunterlage (Witte + Sutor GmbH, Murrhardt, Deutschland) positioniert.

Die Präparation der Rückenhautkammer wurde nach folgendem Arbeitsschema unter aseptischen Kautelen durchgeführt. Die Körpergewichtsmessung und auch die darauf folgende Anästhesie fand auf die gleiche Art und Weise wie bei der zuvor beschriebenen Femur Window-Operation (siehe 2.4.) statt.

Anschließend wurde das Fell der Rückenhaut rasiert (Philishave C281, Philips, Amsterdam, Niederlande), depilliert (Enthaarungscreme Balea, dm, Karlsruhe, Deutschland) und sorgfältig desinfiziert (Cutasept F, Bode Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland).

In einem nächsten Schritt wurde die Maus in Bauchlage gelegt, die Rückenhautfalte angehoben und entlang ihrer Mittellinie mit zwei Haltefäden horizontal aufgespannt. Nun war es unter Gegenlichtkontrolle möglich, den rückseitigen Titanrahmen der Rückenhautkammer an ihrem Oberrand mit Nähten (Ethibond®Excel 5-0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) zu fixieren. Im basalen Bereich der Hautfalte wurden durch Inzision zwei Durchgänge geschaffen, durch die die beiden Schrauben des Kammerrahmens zur Vorderseite gelangen.

Im nächsten Schritt wurde unter Gegenlichtkontrolle ein rundes Gewebeareal im Durchmesser von etwa 15mm markiert, welches im späteren Beobachtungsbereich lag und in den folgenden Schritten abgetragen wurde. Der Durchmesser des Hautareals wurde größer gewählt als der des Beobachtungsfensters des Titanrahmens, um eine Gewebekompression nach Anbringen des vorderseitigen Kammerbauteils zu vermeiden und so die physiologische Blutversorgung des Gewebes in der Kammer zu gewährleisten.

Für das weitere Vorgehen wurden die Haltefäden entfernt und die Maus in Seitenlage unter dem Stereomikroskop (STEMI 2000-C, Carl Zeiss Lichtmikroskopie, Göttingen, Deutschland) positioniert. Mit Hilfe einer Kaltlichtquelle (KL1500 LCD, Carl Zeiss Lichtmikroskopie, Göttingen, Deutschland) konnte eine optimale Ausleuchtung des Operationssitus erreicht werden.

Die dem Beobachtungsfenster zugewandte Kutis, Subkutis mit quergestreiftem Hautmuskel sowie beide Schichten des Retraktormuskels wurden nun mikrochirurgisch präpariert und entfernt. Die verbliebene Schicht, welche aus kontralateralem quergestreiftem Hautmuskel, Subkutangewebe und Haut bestand, wurde mit steriler Kochsalzlösung gespült. Im folgenden Schritt wurde der vorderseitige Rahmen mit Muttern auf den Verbindungsschrauben in einem Abstand von 0,4 bis 0,5mm zum hinteren Titanrahmen positioniert. Anschließend konnte das Deckglas des Beobachtungsfensters auf den freipräparierten Muskel aufgebracht und mit einem Sprengring fixiert werden. Durch dieses Deckglas war es nun möglich, die kontinuierlichen intravitalmikroskopischen Beobachtungen im Versuch durchzuführen. Die endgültige Fixierung des Titanrahmens wurde durch Fixationsnähte (Ethibond®Excel 5-0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) im Bereich der dafür vorgesehenen Bohrungen erreicht (s. Abb. 6).

Zur Dokumentation des Operationsergebnisses wurde das Versuchstier auf eine spezielle Halterung gelagert, um lichtmikroskopische Aufnahmen (Kamera AxioCam H, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) aufzunehmen (s. Abb. 7). Im Anschluss an den Eingriff wurden die Versuchstiere bis zum Erwachen aus der Narkose auf einer Wärmeunterlage (Witte + Sutor GmbH, Murrhardt, Deutschland) gehalten. Die gesamte oben beschriebene Prozedur nahm circa 30 Minuten in Anspruch.



Abbildung 6: Maus nach Implantation der Rückenhautkammer. Im Beobachtungsfenster sind die Blutgefäße zu erkennen.

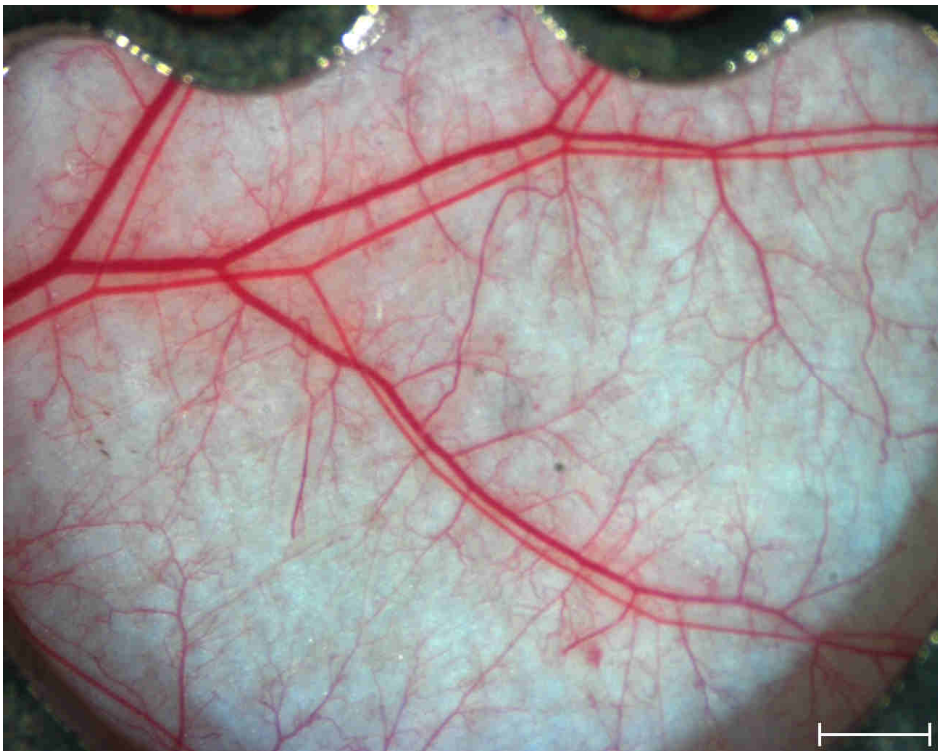


Abbildung 7: Lichtmikroskopische Aufnahme in 1,0x Vergrößerung direkt nach der Rückenhautkammer-Operation (Tag 0). (Maßstab = 1,0mm)

2.6. Intravitalmikroskopie:

Um die mikrozirkulatorischen Parameter zu bestimmen, wurden jeweils drei bestimmte Bereiche des Femur Windows und der Rückenhautkammer an allen Messtagen intravitalmikroskopisch untersucht.

Das dazu verwendete teilmotorisierte Intravitalmikroskop (Axioplan 2, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) ist mit Objektiven der Vergrößerung 1,25x, 2,5x, und einem 20x long distance Objektiv (LD Achroplan 20x/0,40, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) und Filtersets für Fluorescein-Isothiocyanid (FITC) ausgestattet. Zur Bilderfassung wurde eine intensified charge coupled device (CCD) Kamera (Hamamatsu C-0377-1, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee, Deutschland) und ein Video-Controller (C2400, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee, Deutschland) genutzt. Zur analogen Messung der Lichtintensität wurde eine Photomultipliertube (R4632, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee, Deutschland) verwendet und das Signal mit einem Analog-Digitalwandler (PowerLab/200, Chromaphor Analysen Technik GMBH, Duisburg, Deutschland) weiterverarbeitet. Zur digitalen Aufzeichnung wurde ein Computer (Apple Power Macintosh, G4, Dual 500 MHz Power PC, 1GB SDRAM, Apple Inc., Cupertino, CA, USA) genutzt.

Durch die Verwendung der CCD-Camera zusammen mit einem Exzitationslicht-Reduktionsfilter (25% und 50%, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) war es möglich, die Bestrahlungsintensität und Bestrahlungsdauer zu reduzieren, um phototoxische Schäden des Gewebes zu vermeiden (78, 79).

2.7. Fluorochrome:

Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen in diesem Versuch wurde der Farbstoff Fluorescein-Isothiocyanid (FITC) genutzt. Fluorescein-Isothiocyanid hat sein Exzitationsmaximum bei 494nm und ein Emissionsmaximum bei 518nm. Für die Messung der gefäßmorphologischen Parameter wurde das FITC an Dextran (MW 2mio., Molecular Probes, Invitrogen Ltd., Paisley UK) gebunden. Dadurch bleibt der Farbstoff überwiegend intravasal und lässt die Gefäße unter dem Fluoreszenzmikroskop grün erscheinen (s. Abb. 8).

Für die Permeabilitätsmessungen wurde ebenfalls Fluorescein-Isothiocyanid verwendet. Jedoch wurde es bei diesen Messungen an bovines Serum Albumin (FITC-BSA, Molecular Probes, Invitrogen Ltd., Paisley, UK) gebunden, das durch seine geringere Molekülgröße aus den Gefäßen austreten kann.

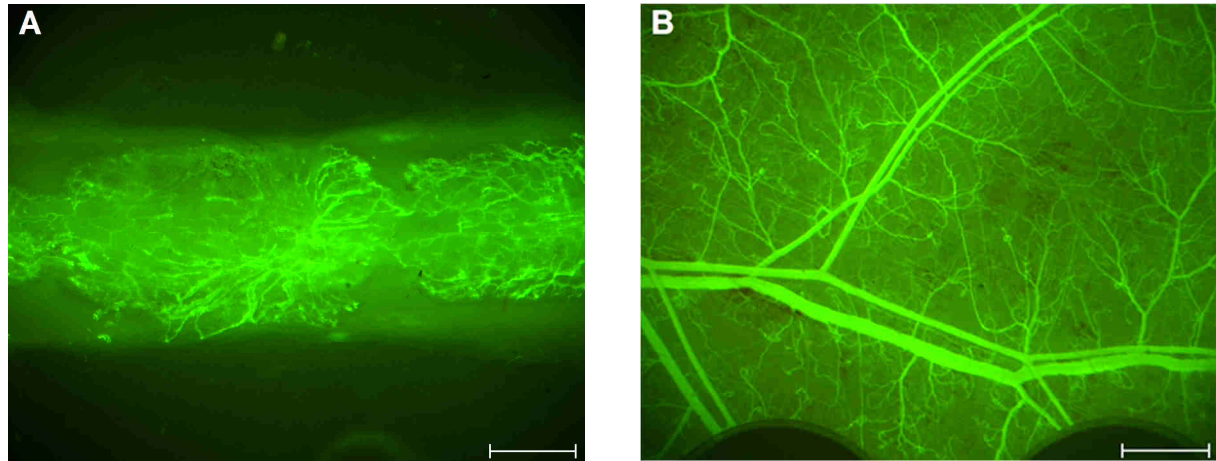


Abbildung 8: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Injektion von 100µl FITC-Dextran. A) Femur Window in 2,5x Vergrößerung (Maßstab = 0,5mm)

B) Rückenhautkammer in 1,25x Vergrößerung (Maßstab = 1mm)

2.8. Versuchsablauf in der Femur Window-Gruppe:

Die morphologischen und funktionellen Gefäßparameter sowie das Körpergewicht der Versuchstiere wurden an allen Messtagen bestimmt.

Die Gewichtsbestimmung und anschließende Anästhesie der Versuchstiere fand in gleicher Art und Weise wie bei der Femur Window-Operation (siehe 2.4.) statt.

Nach Überprüfung der Narkosetiefe wurde in eine der Schwanzvenen der Maus ein intravenöser Zugang gelegt, über den im weiteren Verlauf die Farbstoffe injiziert werden konnten. Die Maus wurde in eine Messvorrichtung gelegt, in der sich das implantierte Femur Window fixieren lässt, um eine senkrechte Beobachtung des Knochenfensters zu ermöglichen und die Atembewegungen der Maus nahezu ausschaltet, ohne die eigentliche Atmung der Maus zu behindern. Die Maus wurde auf einer Wärmeunterlage (Witte + Sutor GmbH, Murrhardt, Deutschland) gelagert und das Deckglas des Femur Windows unter dem Stereomikroskop (STEMI 2000-C, Carl Zeiss Lichtmikroskopie, Göttingen, Deutschland) gereinigt, um Artefakte während der mikroskopischen Messungen zu vermeiden. Mit der digitalen Kamera (AxioCam H, Carl

Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) wurden nun Lichtbilder aufgenommen (s. Abb. 9).

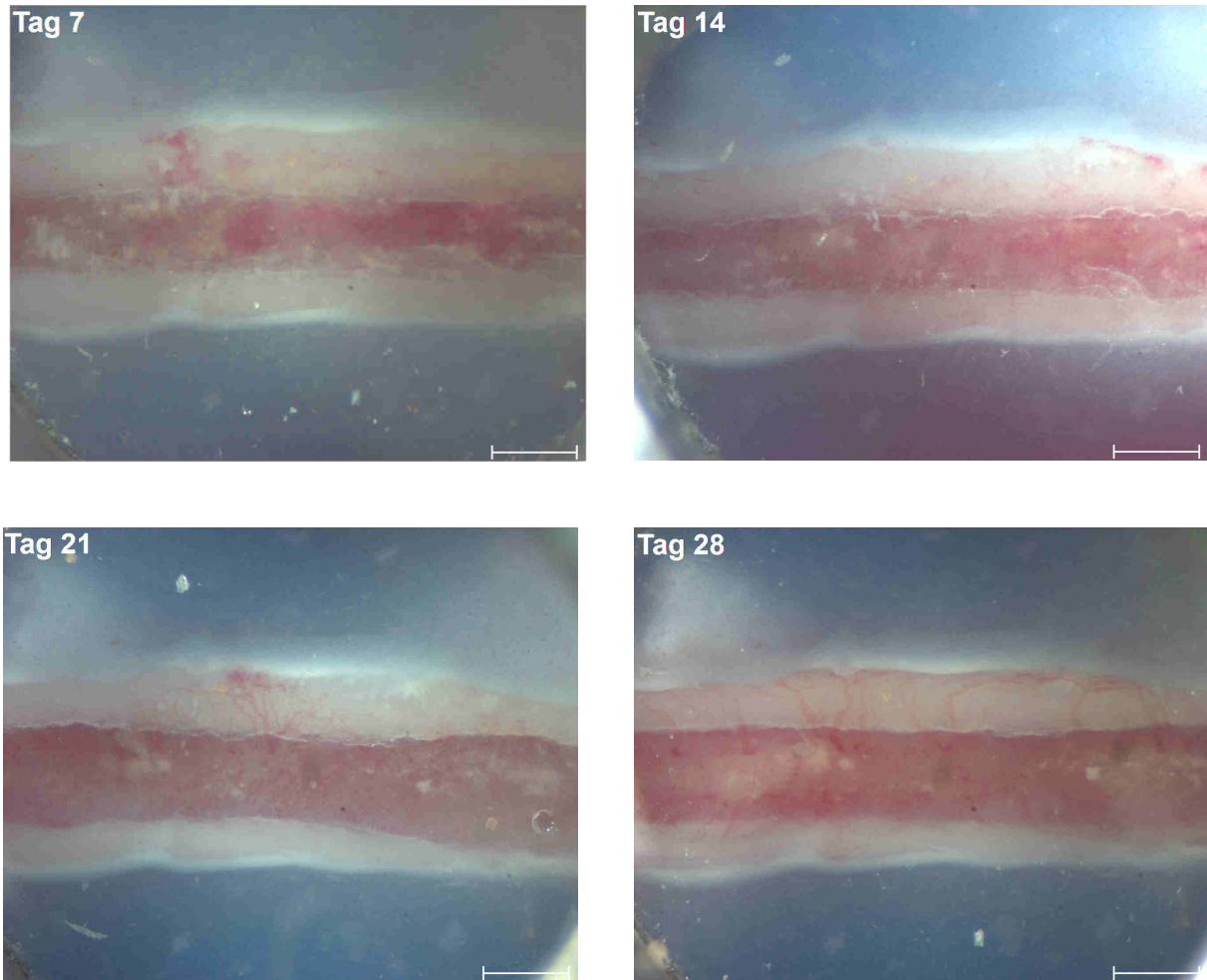


Abbildung 9: Lichtmikroskopische Aufnahmen in 2,5x Vergrößerung des Femur Window an den vier Messtagen. (Maßstab = 0,5mm)

Danach wurde die Maus unter dem Intravitalmikroskop (Axioplan 2, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) gelagert und über den intravenösen Zugang wurde 100µl Fluorescein-Isothiocyandid-Dextran (FITC-Dextran, MW 2mio., Molecular Probes, Invitrogen Ltd., Paisley UK) injiziert. Dieses hat durch seine molekulare Größe die Eigenschaft im Gefäßsystem zu verbleiben und dieses unter dem Intravitalmikroskop grün erscheinen zu lassen. Nun konnten mit der Axiocam H-Kamera in Verbindung mit den FITC-Filtersets des Intravitalmikroskops Fluoreszenzaufnahmen aufgenommen werden (s. Abb. 10). Es wurde jeweils ein Bild in 2,0x- und 2,5x-Vergrößerung aufgenommen, um die Gefäßarchitektur des Knochens darzustellen.

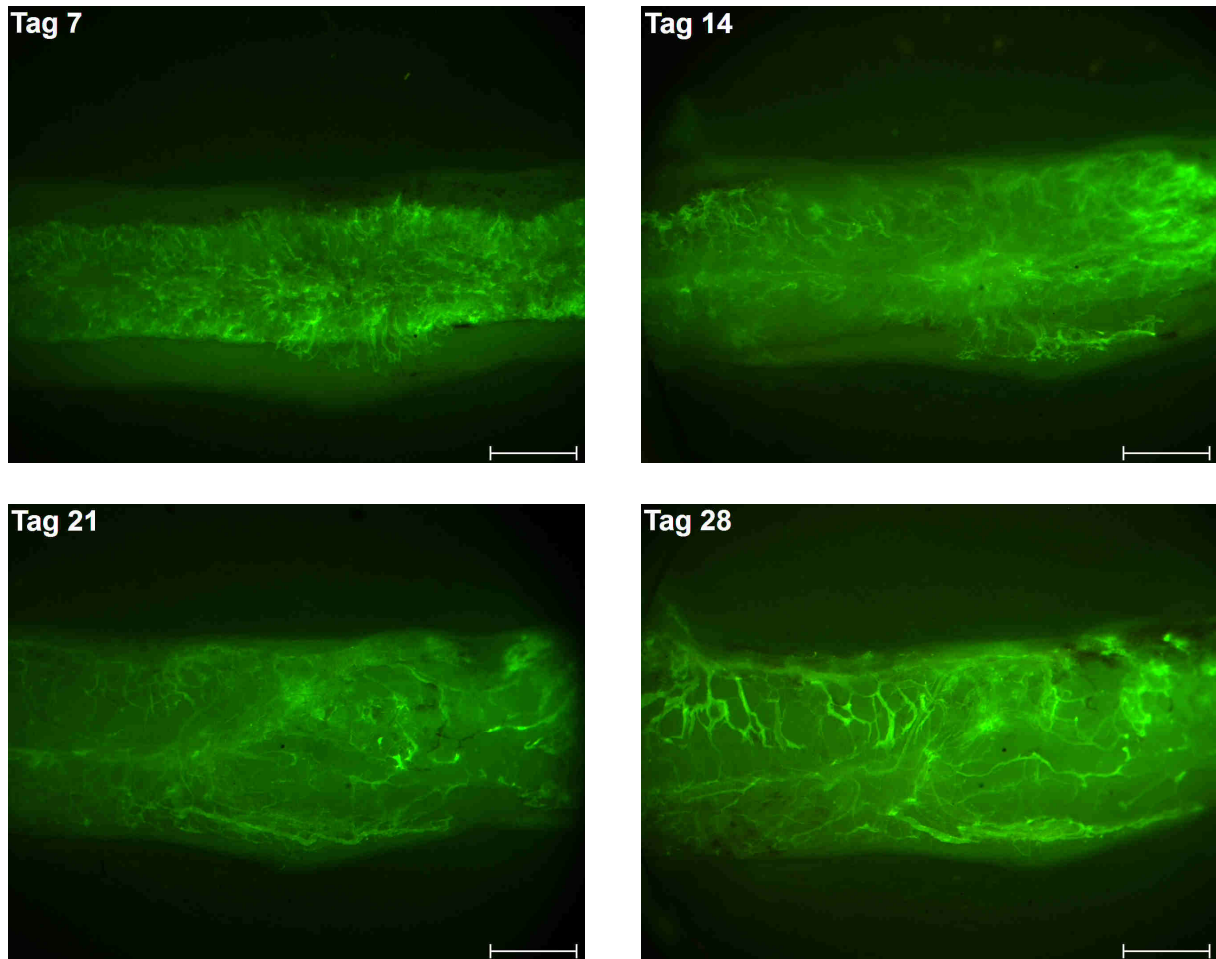


Abbildung 10: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Injektion von 100 μ l FITC-Dextran. Femur Window in 2,5x Vergrößerung an den vier Messtagen (Maßstab=0,5mm)

Nun erfolgte die digitale Aufnahme von drei Filmen in festgelegten Regionen des Femurs mittels einer intensified CCD Kamera (Hamamatsu C-0377-1, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee, Deutschland) durch ein 20x long distance Objektiv (LD Achroplan 20x/0,40, Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Der erste der, jeweils 10 Sekunden dauernden Filme wurde am distalen, der zweite am proximalen Ende des Femurs und der dritte in der Mitte des Femurs aufgenommen. Anhand dieser Filme wurde später die Auswertung der funktionellen Gefäßparameter vorgenommen (s. Abb. 11).

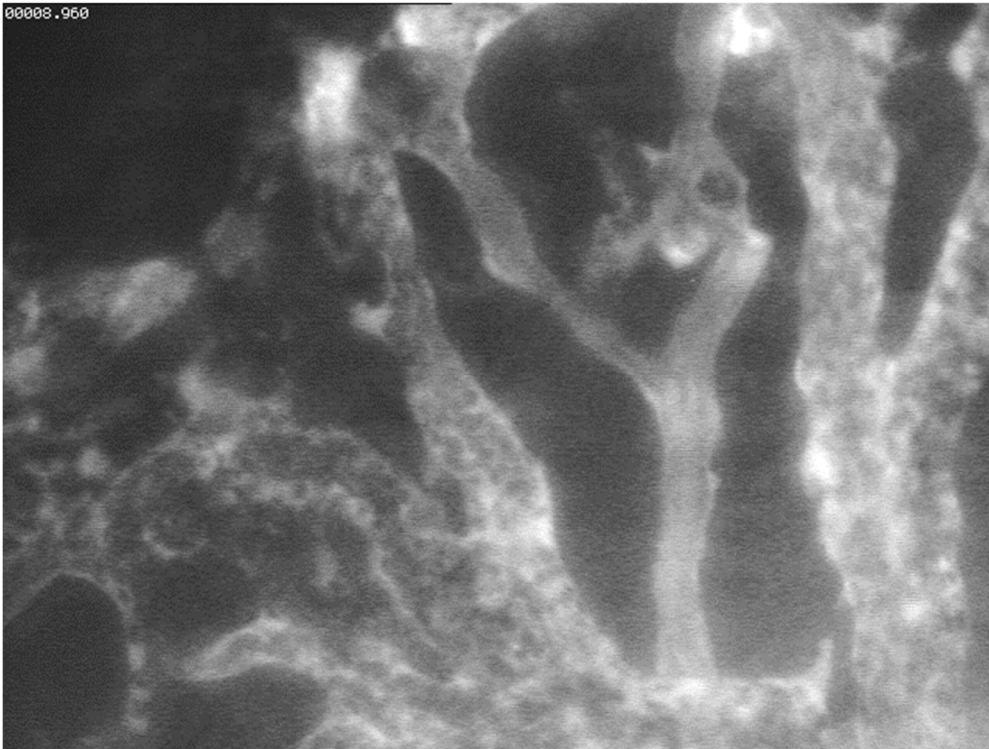


Abbildung 11: Beispielhaftes Einzelbild einer der Femur Window-Filme, an denen die spätere Analyse der morphologischen und funktionellen ossären Gefäßparameter durchgeführt wurde in 20x Vergrößerung.

In der Region des dritten Films wurde anschließend die Permeabilitätsmessung vorgenommen.

Nach i.v. Bolusinjektion von 100µl Fluorescein-Isothiocyanid, welches an bovines Serum Albumin (FITC-BSA, Molecular Probes, Invitrogen Ltd., Paisley, UK) gebunden war, wurde für zehn Minuten in einem zweiminütigem Abstand die kumulierende Fluoreszenzintensität gemessen (Photomultipliertube, Hamamatsu Photonics, Herrsching am Ammersee, Deutschland).

Die BSA Molekülmasse von 67.000 bewirkt eine permeabilitätsabhängige Extravasation aus den Gefäßen in das Interstitium der Observationsfelder (80).

Alle Daten wurden digital gespeichert und später offline zur Bestimmung der Gefäßparameter analysiert.

Im Anschluss an die Messungen wurde die Maus bis zum Erwachen aus der Narkose auf einer Wärmeunterlage (Witte + Sutor GmbH, Murrhardt, Deutschland) gehalten. Die gesamte oben beschriebene Prozedur nahm circa 25 Minuten in Anspruch.

2.9. Versuchsablauf in der Rückenhautkammer-Gruppe:

Die morphologischen und funktionellen Gefäßparameter sowie das Körpergewicht der Versuchstiere wurden an allen Messtagen bestimmt.

Die Gewichtsmessung und Anästhesie der Mäuse erfolgte nach oben beschriebener Anleitung.

Der Maus wurde in eine der Schwanzvenen ein intravenöser Zugang gelegt, über den im weiteren Verlauf die Farbstoffe injiziert werden konnten. Die Rückenhautkammer der narkotisierten Maus wurde nun in einer speziellen Halterung fixiert, um Artefakte durch die Atembewegungen der Maus auszuschalten und eine senkrechte Beobachtung der Rückenhautkammer zu ermöglichen. Die Maus wurde auf einer Wärmeunterlage (Witte + Sutor GmbH, Murrhardt, Deutschland) gelagert und das Deckglas der Rückenhautkammer unter dem Stereomikroskop (STEMI 2000-C, Carl Zeiss Lichtmikroskopie, Göttingen, Deutschland) gereinigt. Mit der Kamera (Axiocam H, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) wurden nun Lichtbilder in 0,8x, 1,0x und 1,25x Vergrößerung aufgenommen (s. Abb. 12).

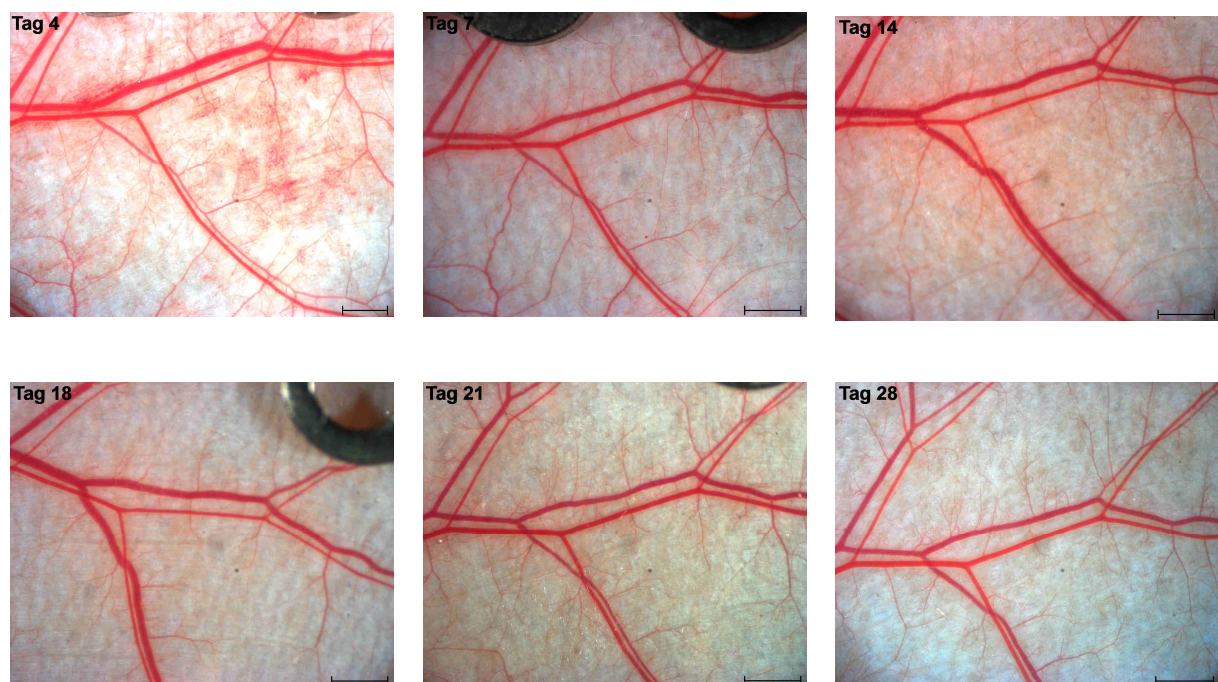


Abbildung 12: Lichtmikroskopische Aufnahmen in 1,25x Vergrößerung der Rückenhautkammer an den sechs Messtagen. (Maßstab = 1,0mm)

Danach wurde die Maus unter dem Intravitalmikroskop (Axioplan 2, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) gelagert und über den intravenösen Zugang wurde 100 μ l Fluorescein-Isothiocyanid-Dextran (FITC-Dextran, MW 2mio., Molecular Probes, Invitrogen Ltd., Paisley UK) injiziert. Nun konnten mit der Axiocam H-Kamera (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) in Verbindung mit dem FITC-Filterset des Intravitalmikroskops Fluoreszenzaufnahmen aufgenommen werden. Es wurde jeweils ein Bild in 1,25x, 2,5x und 20x Vergrößerung aufgenommen, um die Gefäßarchitektur in der Rückenhautkammer darzustellen (s. Abb. 13).

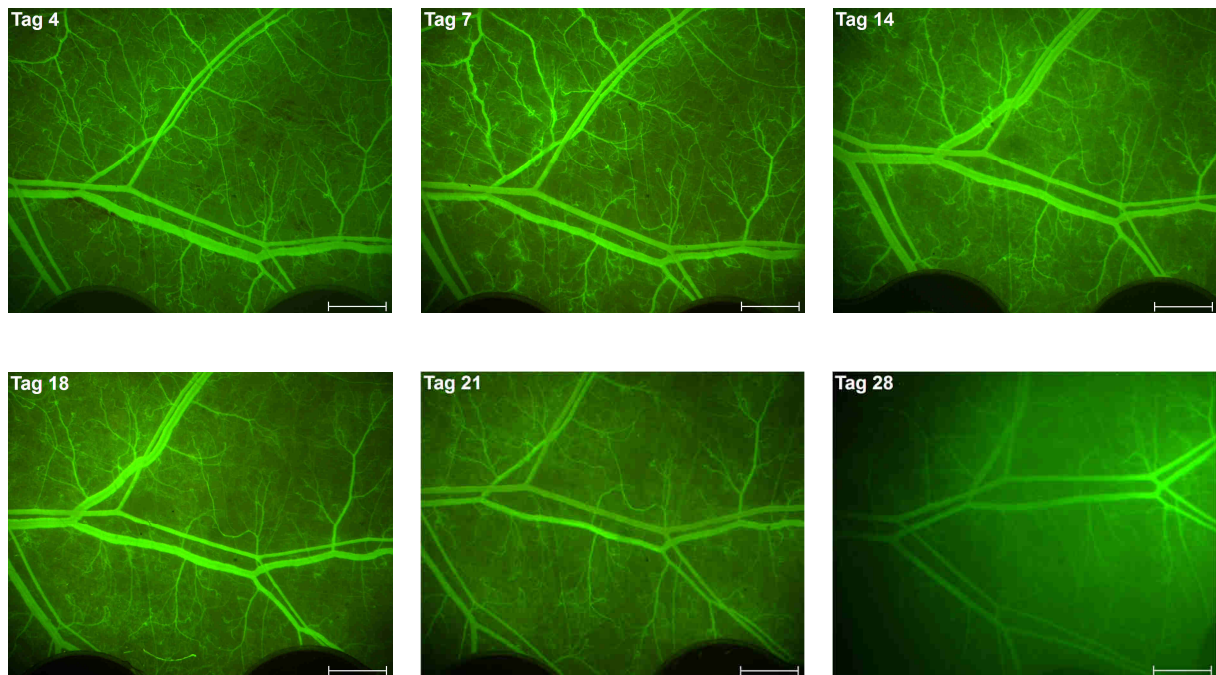


Abbildung 13: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Injektion von 100 μ l FITC-Dextran. Rückenhautkammer in 1,25x Vergrößerung an den sechs Messtagen (Maßstab=1,0mm)

Nun erfolgte die digitale Aufnahme von drei Filmen in festgelegten Regionen der Kammer mittels der intensified CCD Kamera (Hamamatsu C-0377-1, Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee, Deutschland) durch ein 20x long distance Objektiv (LD Achromplan 20x/0,40, Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Der erste der, jeweils 10 Sekunden dauernden Filme, wurde am oberen distalen Ende der Kammer, möglichst im Bereich der Ösen des Spannrings aufgenommen. Der zweite in darunter liegender senkrechter Verlängerung des ersten Films und der dritte wiederum senkrecht darunter am proximalen unteren Ende der Kammer. Anhand dieser Filme wurde später die Auswertung der funktionellen Gefäßparameter vorgenommen (s. Abb. 14).

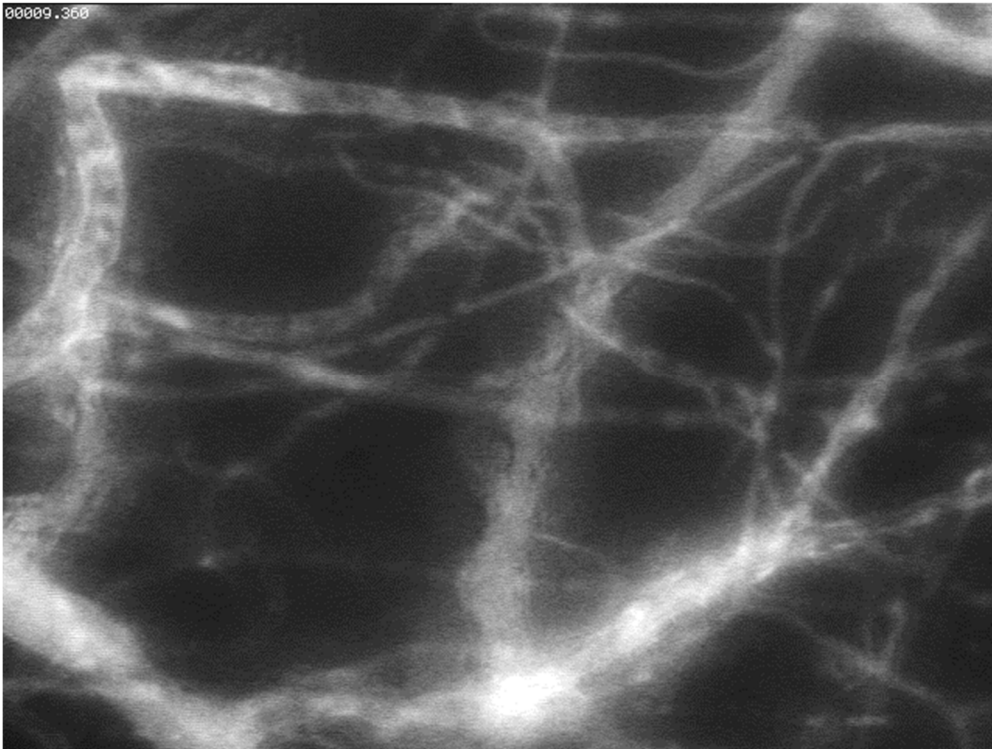


Abbildung 14: Beispielhaftes Einzelbild einer der Rückenhautkammer-Filme, an denen die spätere Analyse der morphologischen und funktionellen Gefäßparameter durchgeführt wurde in 20x Vergrößerung.

In der Region des dritten Films wurde anschließend die Permeabilitätsmessung vorgenommen.

Nach i.v. Bolusinjektion von 100µl Fluorescein-Isothiocyanid, welches an bovines Serum Albumin (FITC-BSA, Molecular Probes, Invitrogen Ltd., Paisley, UK) gebunden ist, wurde für zehn Minuten in einem zweiminütigem Intervall die kumulierende Fluoreszenzintensität gemessen (Photomultipliertube, Hamamatsu Photonics, Herrsching am Ammersee, Deutschland).

Die BSA Molekülmasse von 67.000 bewirkt eine permeabilitätsabhängige Extravasation aus den Gefäßen in das Interstitium der Observationsfelder [6]. Alle Daten wurden digital gespeichert und später offline zur Bestimmung der Gefäßparameter analysiert.

Im Anschluss an die Messungen wurde die Maus bis zum Erwachen aus der Narkose auf einer Wärmeunterlage (Witte + Sutor GmbH, Murrhardt, Deutschland) gehalten. Die gesamte oben beschriebene Prozedur nahm circa 25 Minuten in Anspruch.

2.10. Biometrische Planung:

Die morphologischen und funktionellen Gefäßparameter wurden in der Femur Window-Gruppe an vier Messtagen (Tag 7, 14, 21 und 28) und in der Rückenhautkammer-Gruppe an sechs Messtagen (Tag 4, 7, 14, 18, 21 und 28) intravitalmikroskopisch mit dem Fluoreszenzmikroskop bestimmt. In der Rückenhautkammer-Gruppe wurde wegen des fragileren Gefäßsystems und aufgrund der in der Literatur beschriebenen kürzeren Messintervalle und Standzeiten in diesem Modell zwei zusätzliche Messtage etabliert (s. Abb. 15).

Das Körpergewicht wurde am Tag der Femur Window- bzw. Rückenhautkammer-Operation (Tag 0) und an allen der jeweiligen Messtage gemessen.

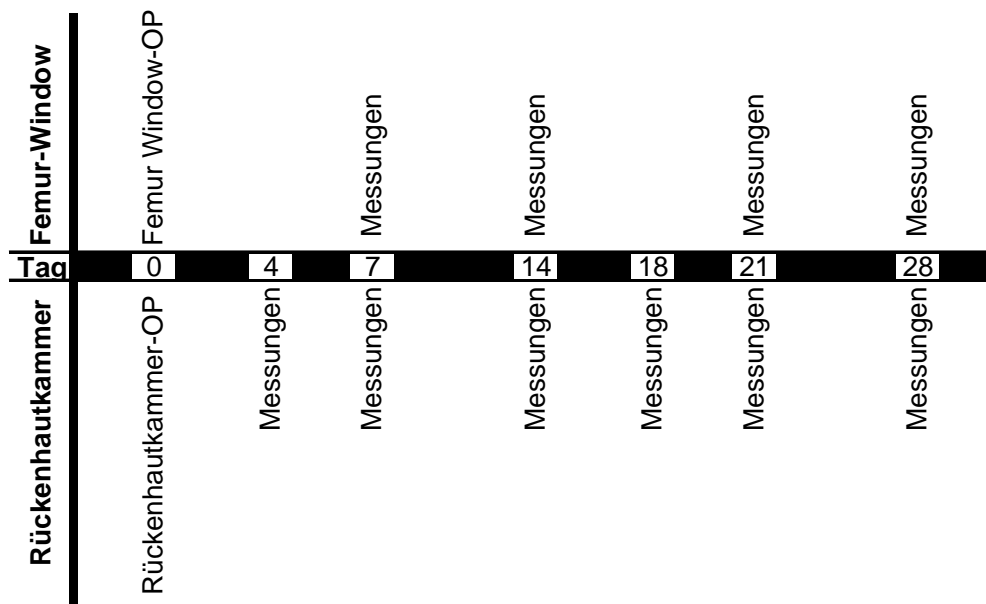


Abbildung 15: Biometrische Planung für die Femur Window-Gruppe oben und für die Rückenhautkammer-Gruppe unten dargestellt. Dargestellt ist der jeweilige Versuchstag im Verhältnis zur jeweiligen Operation.

2.11. Körpergewichtsmessung:

Das Gewicht der Versuchstiere wurde jeweils unmittelbar vor der Femur-Window- bzw. Rückenhautkammer-Operation (Tag 0) sowie unmittelbar vor den jeweiligen Messungen bestimmt (Waage Modell LS2000, Ohaus Scale Corporation, Pine Brook, NJ, USA). Bei der Femurwindow-Gruppe also an Tag 7, 14, 21 und 28 und bei der Rückenhautkammergruppe an Tag 4, 7, 14, 18, 21 und 28. Bei den Körpergewichtsbestimmungen vor den Messungen wurde das Messergebnis um das Eigengewicht der implantierten Kammer bereinigt.

2.12. Auswertung der mikrovaskulären Gefäßparameter:

Die Offline-Analyse, der an allen Messtagen gewonnenen Filme, erfolgte durch Verwendung einer Bildanalysesoftware des National Institute of Health (NIH Image 1.62) an einem Macintosh Computer (Apple Power Mac Dual 500MHz G4 1GB SDRAM, Apple, Cupertino, USA).

2.12.1. Blutflussgeschwindigkeit (V_{mean}) und Blutflussrate (BFR):

Die Blutflussgeschwindigkeit (V_{mean}) (Formel 1) wurde auch durch die Bildanalysesoftware (NIH Image 1.62) ausgewertet. Dazu wurde ermittelt, wie lange ein Erythrozyt im Zentrum des Gefäßes benötigt, um eine definierte Strecke zurückzulegen.

Formel 1: Blutflussgeschwindigkeit V_{mean} ($\mu\text{m/s}$) = $\frac{1}{G} \sum_{x=1}^G \left(\sum_{n=1}^Z \frac{V_{RBC_n}}{\alpha} \right)_x$

Die durchschnittliche Blutflussrate, definiert als Volumenfluss pro Zeiteinheit im Einzelgefäß, wird rechnerisch aus Gefäßdurchmesser (D) und maximaler Blutflussgeschwindigkeit in der Gefäßmitte (V_{RBC}) nach folgender Formel (Formel 2) ermittelt:

$$\text{Formel 2: Blutflussrate BFR } (\mu\text{m}^3/\text{s}) = \frac{1}{G} \sum_{x=1}^G \left(\frac{\pi}{4Z} \sum_{n=1}^Z \frac{V_{RBC_n}}{\alpha} D_n^2 \right)_n$$

Dabei entspricht D dem Gefäßdurchmesser, V_{RBC} der maximalen Blutflussgeschwindigkeit im Gefäßzentrum, Z der Gesamtzahl der Gefäße und G der Anzahl der Observationsfelder. Bei α handelt es sich um einen experimentell ermittelten linearen Korrekturfaktor, der berücksichtigt, dass die Strömungsgeschwindigkeit des Blutes von der Gefäßmitte zum Gefäßrand, bedingt durch die zunehmende Reibung, abnimmt (s. Abb. 16) (81). Das nichtlineare Strömungsprofil begründet sich in der abnehmenden Reibungsfläche der Flüssigkeitslamellen vom Gefäßrand zum Gefäßzentrum (s. Abb. 17) (82).

Bei kleinen Gefäßdurchmessern lässt sich das Strömungsprofil linear approximieren. Dabei ist $\alpha=1,3$ für Gefäßdurchmesser $<10\mu\text{m}$ und $\alpha=1,6$ für Gefäßdurchmesser $>15\mu\text{m}$. Für Gefäße mit einem Durchmesser zwischen $10\mu\text{m}$ und $15\mu\text{m}$ wird α linear extrapoliert: $\alpha = 1,3 + \left((D - 10) * \frac{0,3}{5} \right)$ (83-85).

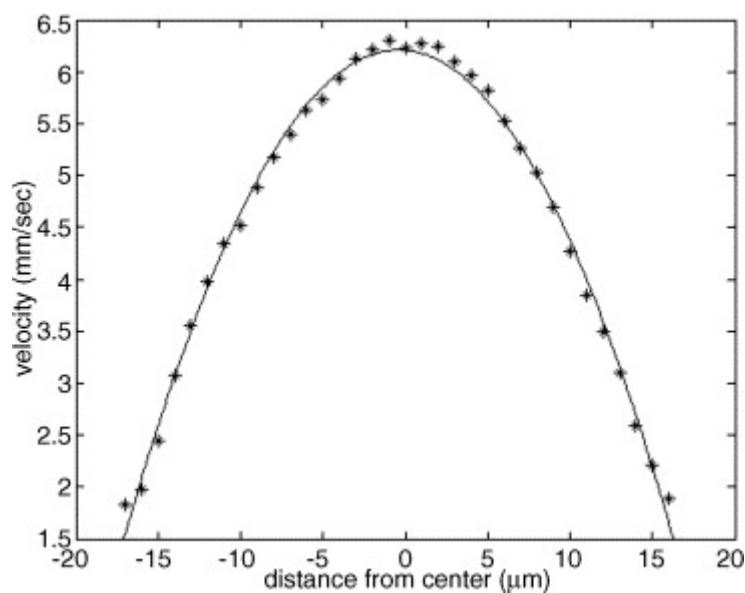


Abbildung 16: Darstellung der Blutflussgeschwindigkeit in einem linearen Gefäß. Es ist zu erkennen, dass die Flussgeschwindigkeit von der Gefäßmitte hin zum Gefäßrand abnimmt (81).

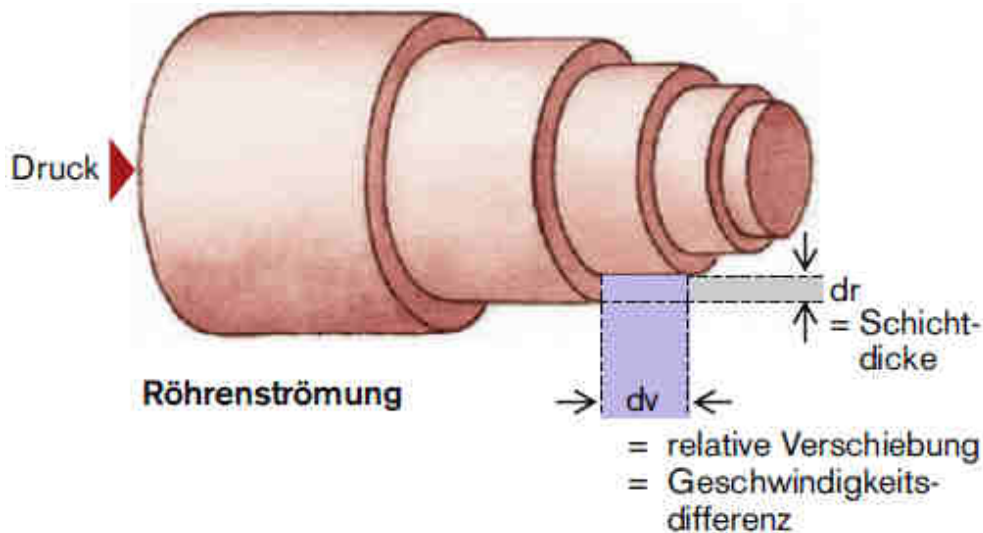


Abbildung 17: Röhrenströmung. In der Röhrenströmung entsteht ein Geschwindigkeitsprofil, weil die Reibungsfläche zwischen zwei benachbarten Flüssigkeitsschichten zur Rohrachse hin kleiner wird (82).

2.12.2. Gewebepfusionsrate (TPR):

Die Gewebepfusionsrate (Tissue perfusion rate, TPR) gibt den mittleren Blutfluss pro Zeiteinheit und Fläche an. Sie wird rechnerisch aus dem Gefäßdurchmesser und der maximalen Blutflussgeschwindigkeit nach folgender Formel (Formel 3) ermittelt.

$$\text{Formel 3: TPR (x10}^{-5}\text{ml/cm}^2\text{s)} = \frac{1}{G} \sum_{x=1}^G \left(\frac{\pi}{4A} \sum_{n=1}^Z D \frac{2}{n} x \frac{1}{\alpha} V_{RBC_{mean}} \right)_x$$

Dabei entspricht D dem Gefäßdurchmesser, V_{RBC} der Blutflussgeschwindigkeit im Gefäßzentrum, Z der Gesamtzahl der Gefäße und G der Anzahl der Observationsfelder. Der Korrekturfaktor α ist ein experimentell ermittelter, linearer Näherungswert (siehe oben) (83, 85, 86).

2.12.3. Funktionelle Gefäßdichte (VD):

Die funktionelle Gefäßdichte (VD) (Formel 4), definiert als Länge der Gefäße mit Plasmafluss pro Observationsfläche wurde ebenfalls per Bildanalysesoftware (NIH Image 1.62) graphisch ermittelt (87, 88).

Formel 4: Funktionelle Gefäßdichte VD (cm/cm²) = $\frac{1}{G} \sum_{x=1}^G \left(\frac{1}{A} \sum_{n=1}^G L_n \right)_x$

Dabei entspricht G der Anzahl der Observationsfelder, A der Observationsfläche und L der Länge des Einzelgefäßes.

2.12.4. Gefäßdurchmesser (D):

Der durchschnittliche Gefäßdurchmesser der Einzelgefäße (D) (Formel 5) wurde per Bildanalysesoftware (NIH Image 1.62) graphisch ermittelt (87, 88).

Formel 5: Mittlerer Gefäßdurchmesser D (µm) = $\frac{1}{G} \sum_{x=1}^G \left(\frac{1}{Z} \sum_{n=1}^G D_n \right)_x$

Dabei entspricht G der Anzahl der Observationsfelder (Anzahl der ausgewerteten Filme), Z der Gesamtzahl der Gefäße und D dem Durchmesser des Einzelgefäßes.

2.12.5 Mikrovaskuläre Gefäßpermeabilität (P):

Die Permeabilitätsmessung erfolgte nach i.v. Bolusinjektion von 100µl Fluorescein-gebundenem bovinen Serum Albumin (FITC-BSA, Molecular Probes, Invitrogen Ltd., Paisley, UK). Die Signale wurden an einen Computer (Apple Power Mac 500MHz G4 1GB SDRAM, Apple, Cupertino, CA, USA) übertragen, an welcher Stelle über die Software LabChart (ADInstruments, Colorado Spring, CO, USA) die Speicherung und spätere Offline-Auswertung erfolgte (78, 80, 84).

Die Permeabilität (P) wird nach folgender Formel (Formel 6) berechnet:

Formel 6: Permeabilität P (cm/s) = $(1 - HT) \times \frac{V}{S} \times \left(\frac{1}{(I_o - I_b)} \times \frac{\Delta I}{\Delta t} + \frac{1}{K} \right)$

Dabei wird der Hämatokrit (HT), wie in der Literatur (89) beschrieben als 19% angenommen. I entspricht der durchschnittlichen Intensität des gesamten Bildausschnittes, I_o der Intensität, nachdem sämtliche Gefäße sich mit dem Fluorochrom gefüllt haben, und I_b der Hintergrundfluoreszenz. ΔI stellt die Fluoreszenzzunahme über den Messzeitraum dar und Δt steht für diesen Messzeitraum. K steht für die Zeitkonstante der Plasmaclearance und ist mit $9,1 \cdot 10^3$ s angegeben (78, 80). V steht für das Gefäßvolumen und S für die Gefäßoberfläche im Observationsfeld.

2.12.6 Oberflächen-Volumen-Verhältnis (V/S):

Das Gefäßvolumen (V) und die Gefäßoberfläche (S) der Gefäße im Observationsfeld wurde aus den erhobenen Daten nach folgender Formel (Formel 7) berechnet:

Formel 7: Oberflächen-Volumen-Verhältnis V/S (cm) = $\frac{\pi \sum_{n=1}^Z D_n^2 L_n}{\pi \sum_{n=1}^Z D_n L_n}$

Dabei entspricht Z der Anzahl, L der Länge und D dem Durchmesser der Gefäße im Observationsfeld (85).

2.13. Statistische Auswertung:

Die Ergebnisse werden angegeben als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (standard error of the mean; SEM). Da es sich um nicht normalverteilte Daten handelt, wurden nicht-parametrische Tests zur Auswertung herangezogen. Die Werte wurden mit Hilfe einer Statistiksoftware (IBM SPSS Statistics 19, Chicago Illinois, USA) mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen. Um Korrelationen zwischen Parametern zu testen, wurde der Spearman-Rank-Correlation-Test angewendet. Die gebildeten Gruppen wurden dann ebenfalls mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen. Als statistische Signifikanzgrenze wurden p-Werte kleiner als 0,05 gewählt.

3. Ergebnisse

Die erhobenen einzelnen mikrovaskulären Gefäßparameter und das Körpergewicht der Versuchstiere wurden in der jeweiligen Versuchsgruppe, also Rückenhautkammer- und Femur Window-Gruppe, über den Versuchszeitraum von 28 Tagen gemessen. Im Folgenden werden die Parameter über die Versuchszeit einzeln dargestellt und die beiden Gruppen miteinander verglichen.

3.1. Körpergewicht:

Ausgehend vom Implantationstag (Tag 0) der jeweiligen Beobachtungskammer konnte in beiden Versuchsgruppen eine Abnahme des Körpergewichts zum jeweils ersten Messtag gemessen werden. Dieser Gewichtsverlust war sowohl in der Femur Window- als auch in der Rückenhautkammer-Gruppe nicht signifikant.

Im weiteren Verlauf kam es nur zu geringen Schwankungen des Mausegewichtes in beiden Gruppen. In beiden Versuchsgruppen konnte an Messtag 21 ein minimales Körpergewicht (Femur Window-Gruppe 28,5g, Rückenhautkammer-Gruppe 26,4g) verzeichnet werden. Ein nicht signifikanter minimaler Körpergewichtszuwachs konnte dann bis zum Ende des Versuchszeitraumes (Tag 28) gemessen werden.

Der Körpergewichtsunterschied zwischen den beiden Messgruppen betrug zu Versuchsbeginn (Tag 0) 1,5g zu Gunsten der Femur Window-Gruppe. Dieser Unterschied war nicht signifikant. Der Unterschied wurde im Versuchsverlauf geringer und war nur an Messtag 14 signifikant ($p=0,017$).

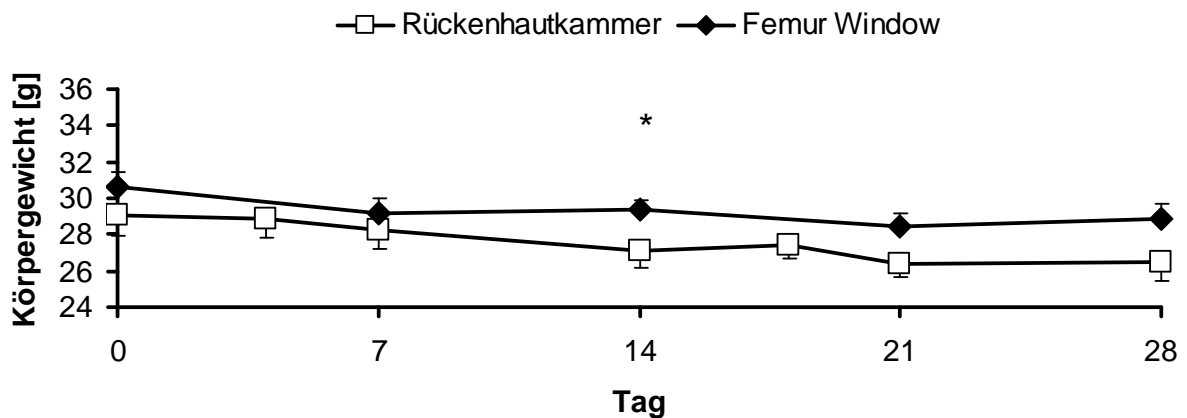


Abbildung 18: Körpergewicht der Versuchstiere in beiden Versuchsgruppen (RHK: n=12, FW: n=13). Mittelwert \pm SEM. (*=p< 0,05)

3.2. Blutflussgeschwindigkeit (V_{mean})

Die Veränderungen der Blutflussgeschwindigkeit (V_{mean}) unterlagen in den beiden Versuchsgruppen einer unterschiedlichen Dynamik.

In der Rückenhautkammer-Gruppe kam es zu keinen signifikanten Änderungen der Blutflussgeschwindigkeit über den Messzeitraum. In der Femur Window-Gruppe kam es initial zu einem signifikanten ($p=0,038$) Anstieg der Blutflussgeschwindigkeit von Tag 7 (116,96 $\mu\text{m/s}$) zu Tag 14 (135,32 $\mu\text{m/s}$). Danach kam es bis zum Versuchsende an Tag 28 zu einem Abfall der Blutflussgeschwindigkeit (122,22 $\mu\text{m/s}$).

Im Vergleich beider Gruppen zeigte sich in der Femur Window-Gruppe eine signifikant höhere Blutflussgeschwindigkeit an Tag 21 ($p=0,034$).

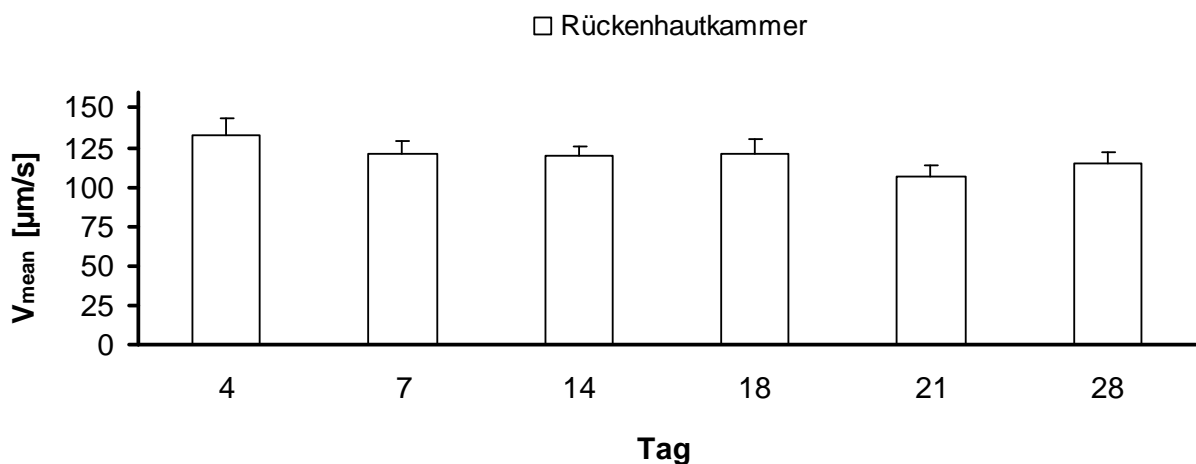


Abbildung 19: Blutflussgeschwindigkeit (V_{mean}) in der Rückenhautkammer-Gruppe (n=12). Mittelwert \pm SEM.

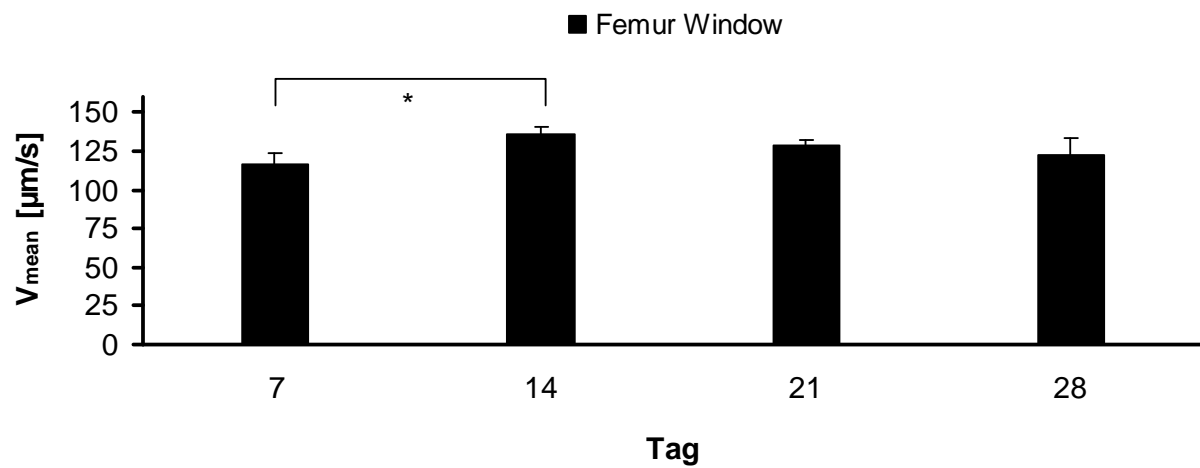


Abbildung 20: Blutflussgeschwindigkeit (V_{mean}) in der Femur Window-Gruppe (n=13). Mittelwert \pm SEM. (*= $p < 0,05$)

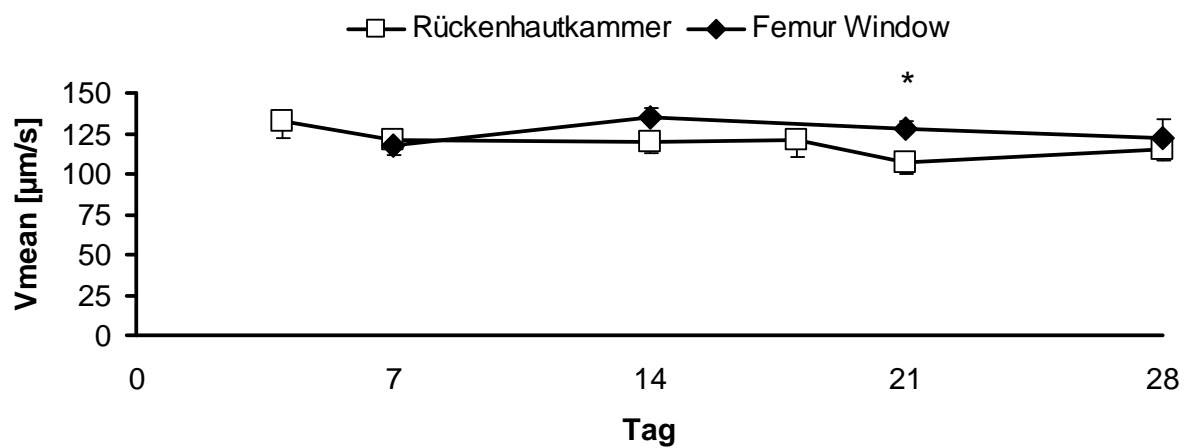


Abbildung 21: Blutflussgeschwindigkeit (V_{mean}) in beiden Versuchsgruppen (RHK: n=12, FW: n=13). Mittelwert \pm SEM. (*= $p < 0,05$)

3.3. Blutflussrate (BFR)

Die Blutflussrate zeigte an allen Versuchstagen signifikant und hochsignifikant höhere Werte in der Femur Window-Gruppe im Vergleich zur Rückenhautkammer-Gruppe.

Der durchschnittliche Blutvolumendurchfluss durch das Einzelgefäß pro Zeiteinheit in der Rückenhautkammer-Gruppe zeigte nur leichte Schwankungen mit dem geringsten Wert an Tag 18 ($8,38 \times 10^3 \mu\text{m}^3/\text{s}$) und dem höchsten Wert an Tag 21 ($10,92 \times 10^3 \mu\text{m}^3/\text{s}$).

In der Femur Window-Gruppe zeigte sich über den Versuchszeitraum ein permanenter Anstieg der Blutflussrate. Sie betrug am siebten Tag $14,80 \times 10^3 \mu\text{m}^3/\text{s}$ und stieg bis Messtag 28 auf einen Wert von $25,10 \times 10^3 \mu\text{m}^3/\text{s}$. Dieser Anstieg ist signifikant ($p=0,013$).

Im Vergleich der beiden Versuchsgruppen zeigte sich an jedem Vergleichstag ein signifikanter (Tag 7 $p=0,039$) bzw. hochsignifikanter (Tag 14, 21 und 28 jeweils $p \leq 0,01$) Unterschied in der Durchflussrate.

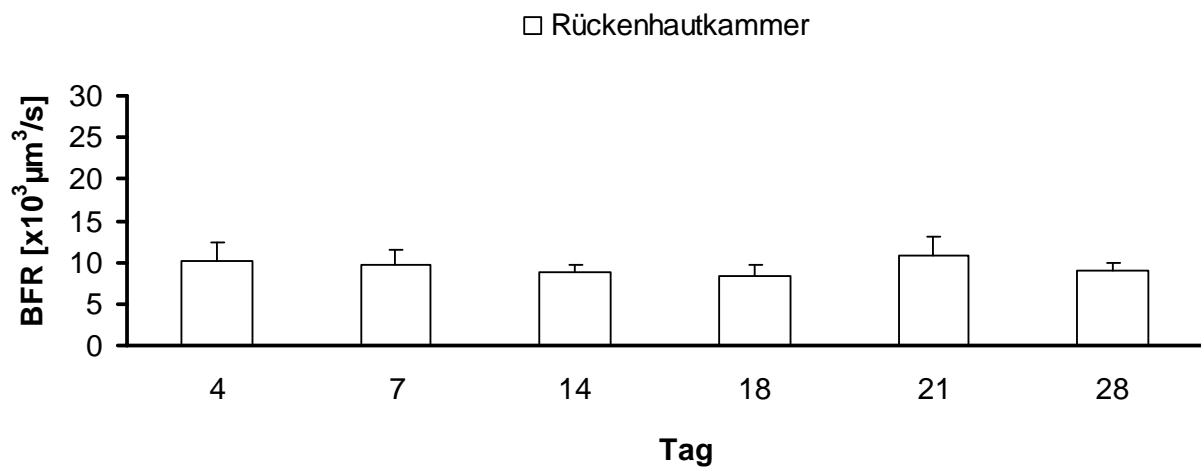


Abbildung 22: Blutflussrate (BFR) in der Rückenhautkammer-Gruppe ($n=12$). Mittelwert \pm SEM.

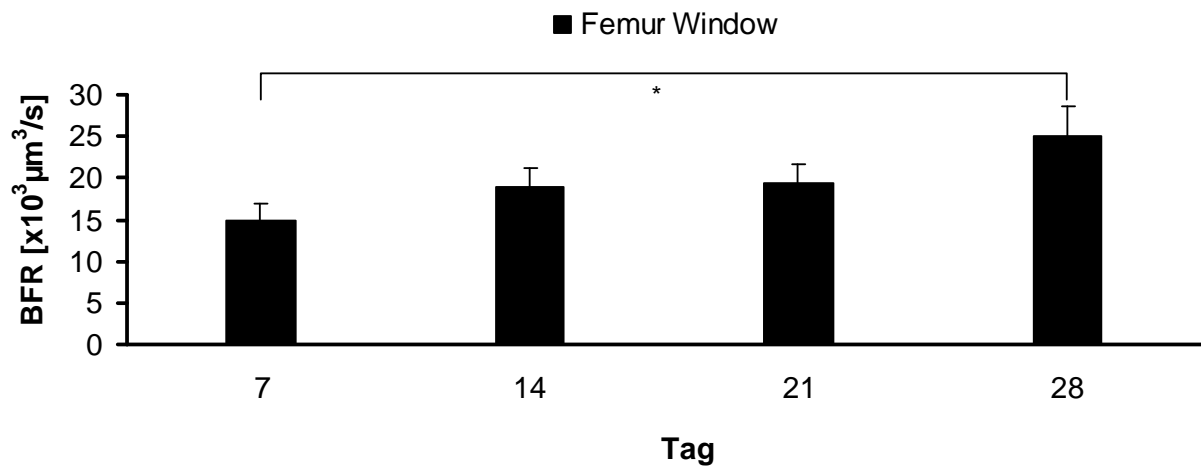


Abbildung 23: Blutflussrate (BFR) in der Femur Window-Gruppe (n=13). Mittelwert \pm SEM. (*= $p < 0,05$)

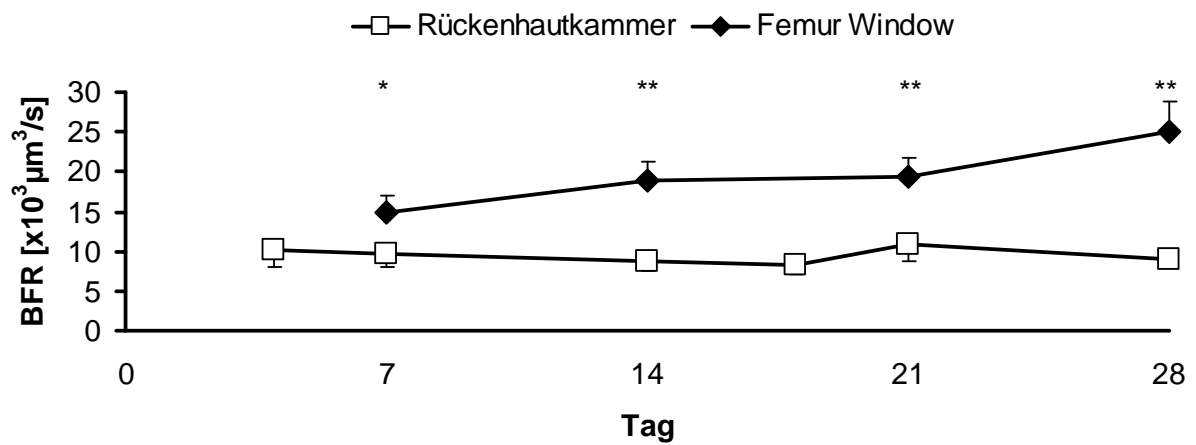


Abbildung 24: Blutflussrate (BFR) in beiden Versuchsgruppen (RHK: n=12, FW: n=13). Mittelwert \pm SEM. (*= $p < 0,05$; **= $p \leq 0,01$)

3.4. Gewebepfusionsrate (TPR)

Die Gewebepfusionsrate zeigte in der Rückenhautkammer-Gruppe keine signifikanten Änderungen über den Versuchszeitraum. Die höchste Rate konnte an Tag 4 mit $39,49 \times 10^{-5} \text{ ml/cm}^2 \text{ s}$ gemessen werden. Im Verlauf fiel der Wert bis Tag 18 auf $31,25 \times 10^{-5} \text{ ml/cm}^2 \text{ s}$ ab, um dann bis zum Versuchstag 28 auf $34,43 \times 10^{-5} \text{ ml/cm}^2 \text{ s}$ anzusteigen.

Auch in der Femur Window-Gruppe zeigten sich keine Veränderungen. Die gemessenen Werte schwanken von $34,30 \times 10^{-5} \text{ ml/cm}^2 \text{ s}$ an Tag 7 bis zu $44,26 \times 10^{-5} \text{ ml/cm}^2 \text{ s}$ an Tag 28.

Auch im Vergleich der beiden Beobachtungsgruppen konnte kein signifikanter Unterschied der Gewebepfusionsrate aufgezeigt werden.

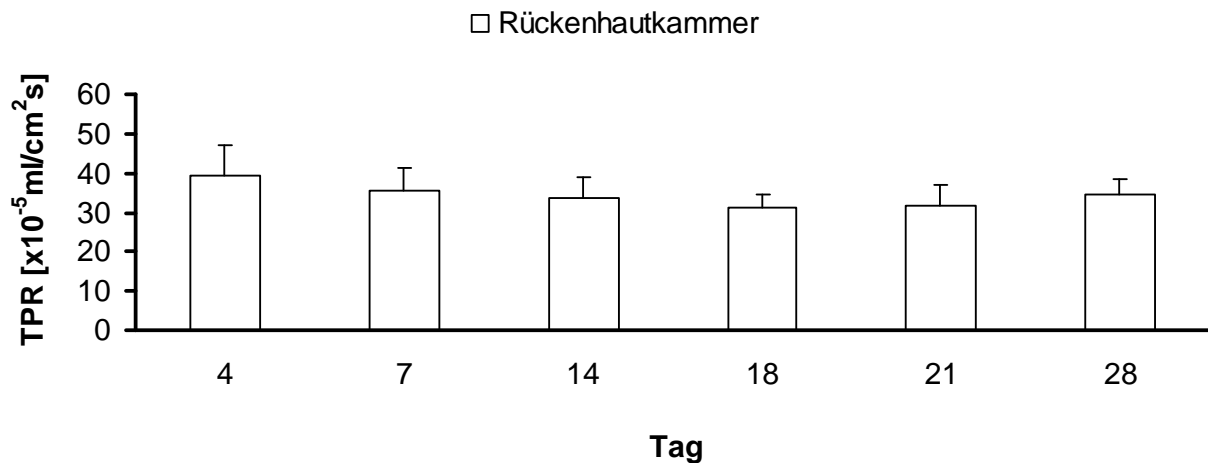


Abbildung 25: Gewebepfusionsrate (TPR) in der Rückenhautkammer-Gruppe (n=12). Mittelwert \pm SEM.

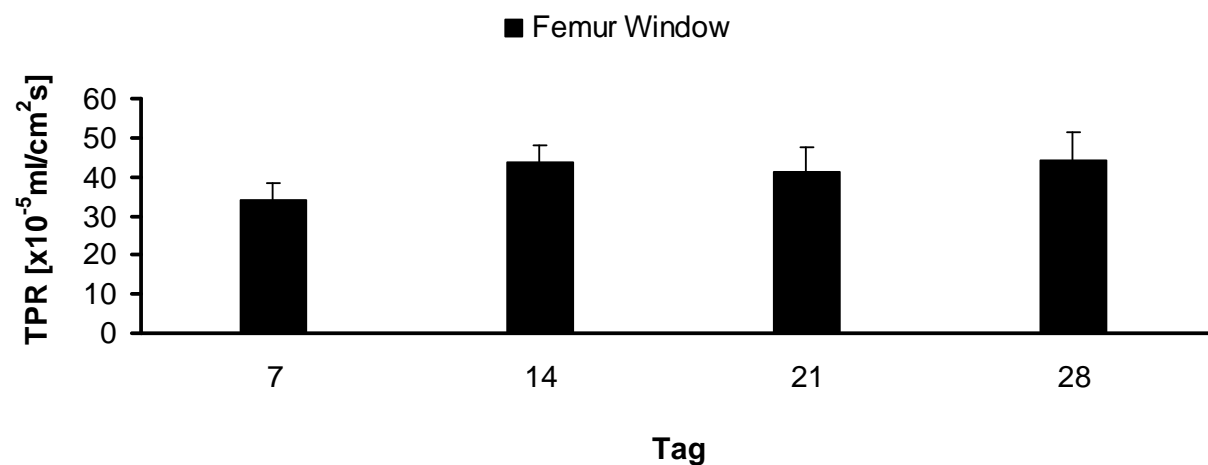


Abbildung 26: Gewebepfusionsrate (TPR) in der Femur Window-Gruppe (n=13). Mittelwert \pm SEM.

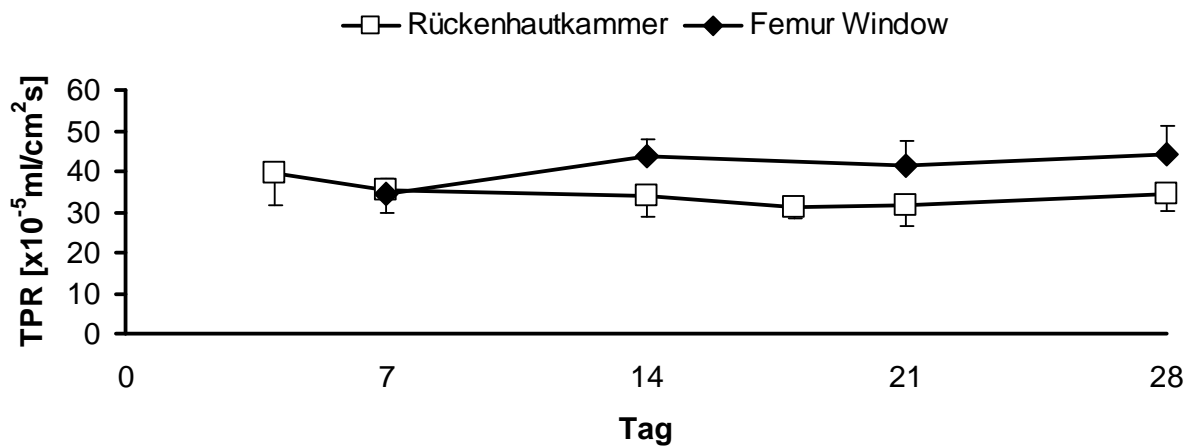


Abbildung 27: Gewebepfusionsrate (TPR) in beiden Versuchsgruppen (RHK: n=12, FW: n=13). Mittelwert \pm SEM.

3.5. Funktionelle Gefäßdichte (VD)

Im Rückenhautkammer-Kollektiv kam es über den gesamten Versuchszeitraum zu geringgradigen und nicht signifikanten Schwankungen der funktionellen Gefäßdichte, die ein Maß für die kumulative Gesamtlänge der Gefäße bezogen auf die Fläche ist. Die minimale Gefäßdichte konnte an Tag 21 mit $334,99 \text{ cm/cm}^2$ und die maximale an Tag 7 mit $398,43 \text{ cm/cm}^2$ gemessen werden.

In der Femur Window-Gruppe war ebenfalls kein Trend über die Zeit festzustellen. Die minimale Gefäßdichte betrug am letzten Versuchstag (Tag 28) $126,57 \text{ cm/cm}^2$. Die maximale Gefäßdichte betrug am 14. Tag $160,91 \text{ cm/cm}^2$. Dieser Unterschied zwischen Tag 14 und 28 ist als signifikant ($p=0,022$) zu betrachten.

Im Vergleich der beiden Versuchsgruppen zeigte sich an allen vier Vergleichstagen eine hochsignifikant höhere Gefäßdichte in der Rückenhautkammer-Gruppe ($p \leq 0,01$ an allen Vergleichstagen).

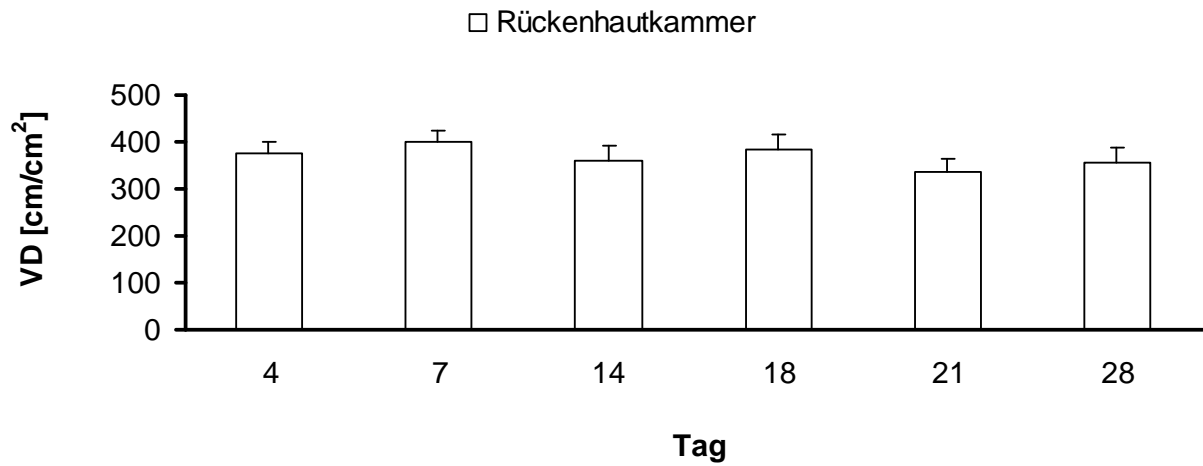


Abbildung 28: Gefäßdichte (VD) in der Rückenhautkammer-Gruppe (n=12). Mittelwert ± SEM.

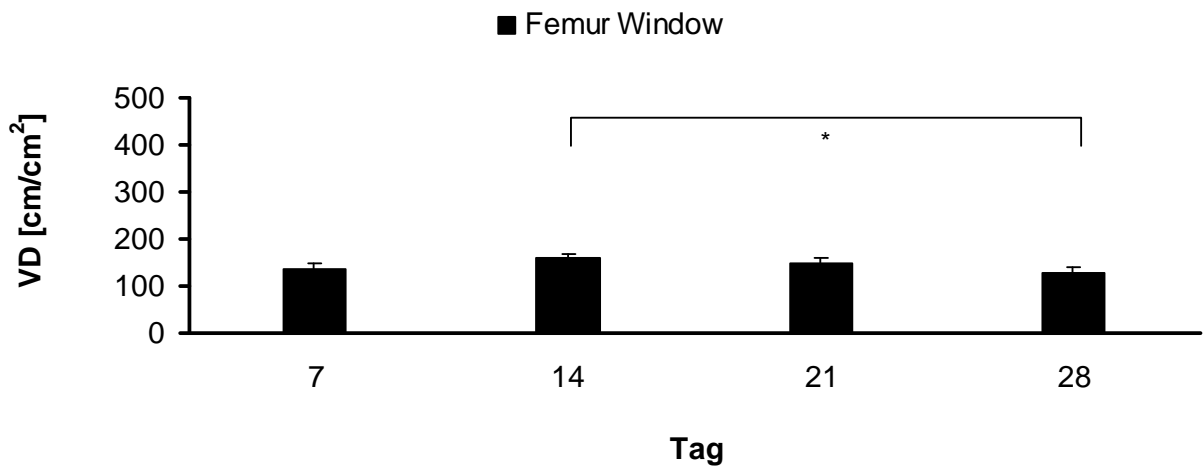


Abbildung 29: Gefäßdichte (VD) in der Femur Window-Gruppe (n=13). Mittelwert ± SEM. (*=p<0,05)

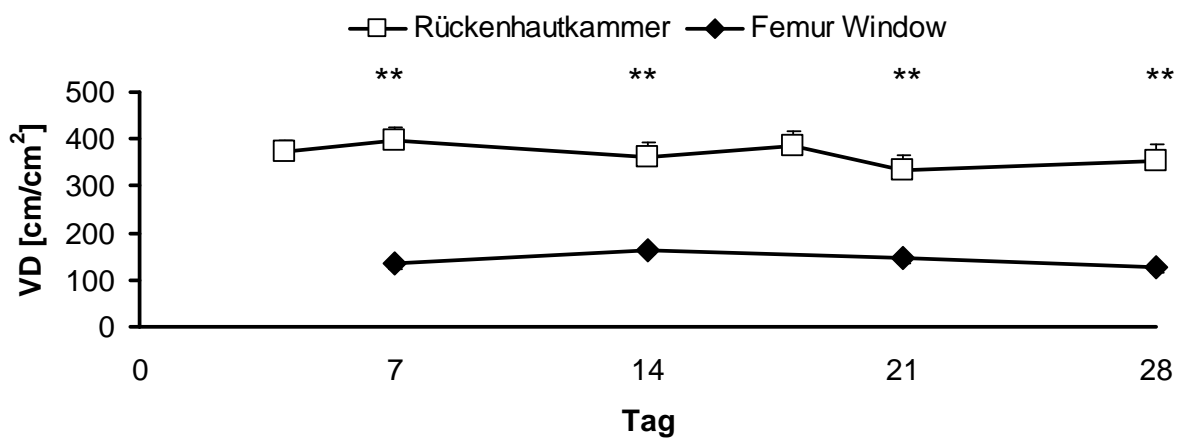


Abbildung 30: Gefäßdichte (VD) in beiden Versuchsgruppen (RHK: n=12, FW: n=13). Mittelwert ± SEM. (**=p≤0,01)

3.6. Gefäßdurchmesser (D)

Der Gefäßdurchmesser in der Rückenhautkammer-Gruppe unterlag nicht signifikanten Schwankungen, die keinem erkennbaren Trend im Versuchszeitraum folgten. An Tag 7 betrug der minimale durchschnittliche Gefäßdurchmesser $8,1\mu\text{m}$ und an Tag 21 konnte mit $9,0\mu\text{m}$ der größte durchschnittliche Gefäßdurchmesser gemessen werden. Im Femur Window-Kollektiv war eine kontinuierliche Vergrößerung des Gefäßdurchmessers über den gesamten Versuchszeitraum zu beobachten. Zu Beginn der Versuchsreihe (Tag 7) betrug der Durchmesser $11,7\mu\text{m}$ und stieg bis zum letzten Versuchstag (Tag 28) auf $14,9\mu\text{m}$ an. Dieser Anstieg ist hochsignifikant ($p\leq 0,01$). Der Anstieg von Tag 14 auf Tag 28 ist signifikant ($p=0,020$).

Der Vergleich von Rückenhautkammer- und Femur Window-Gruppe zeigte an allen vier Vergleichstagen einen hochsignifikant größeren Gefäßdurchmesser in der Femur Window-Gruppe ($p\leq 0,01$ an allen Vergleichstagen)

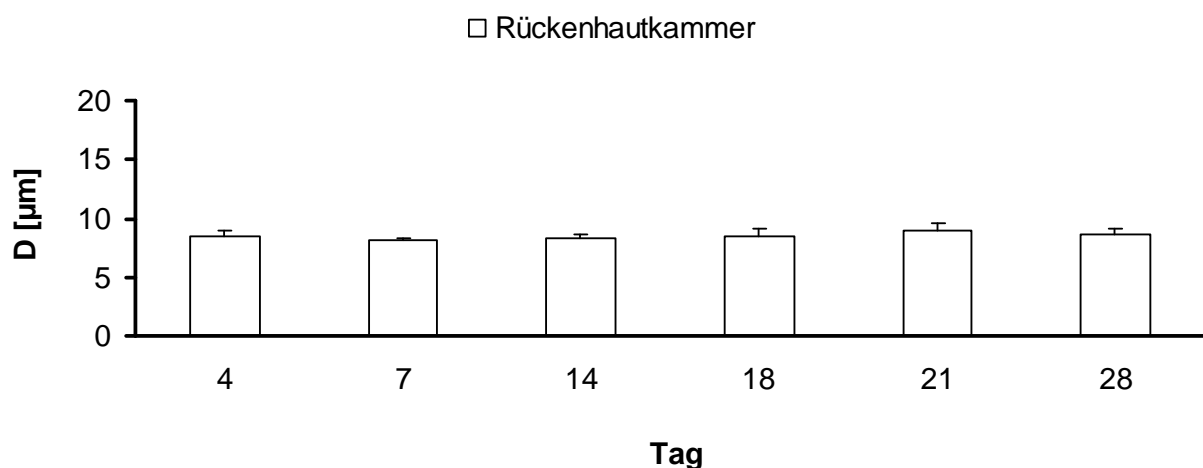


Abbildung 31: Gefäßdurchmesser (D) in der Rückenhautkammer-Gruppe (n=12). Mittelwert \pm SEM.

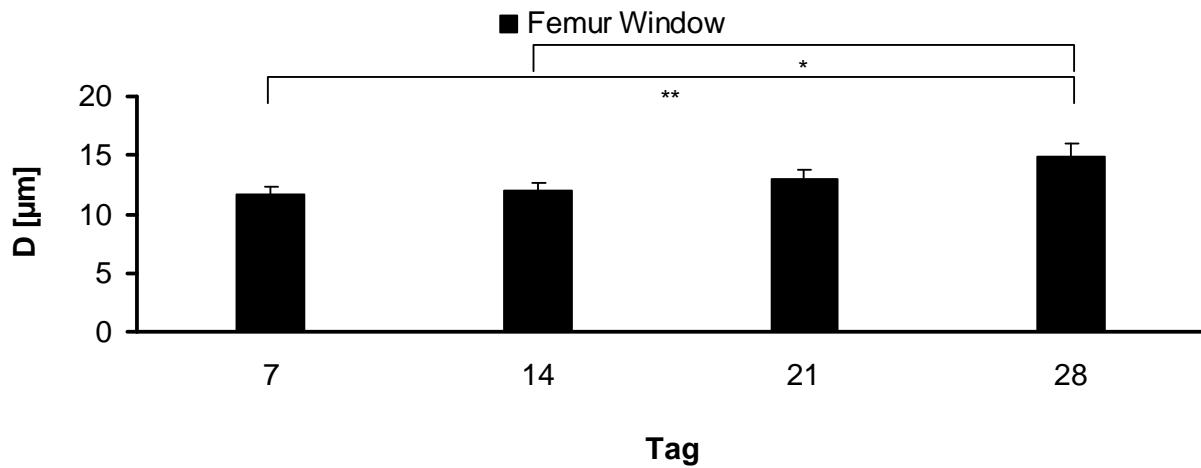


Abbildung 32: Gefäßdurchmesser (D) in der Femur Window-Gruppe (n=13). Mittelwert \pm SEM. (*= $p < 0,05$; **= $p \leq 0,01$)

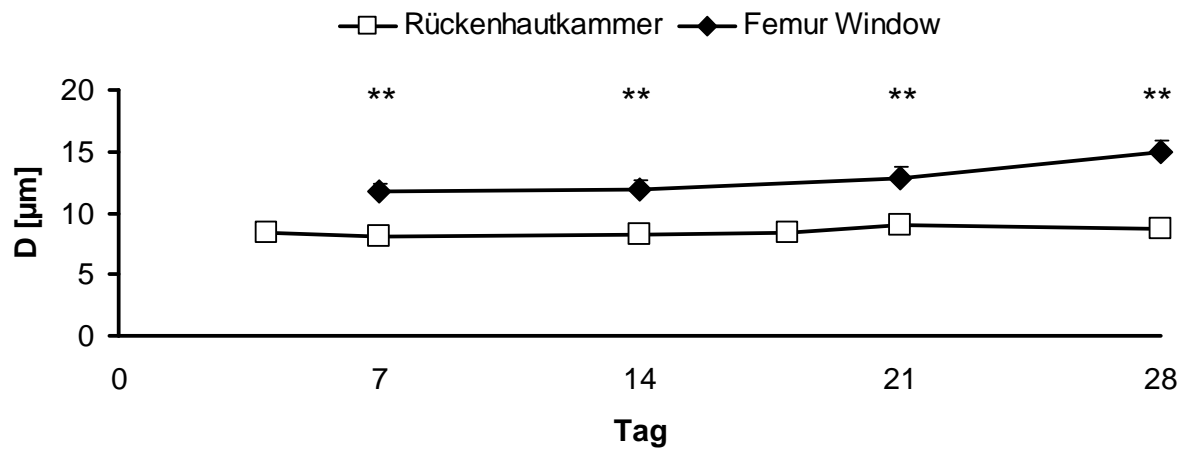


Abbildung 33: Gefäßdurchmesser (D) in beiden Versuchsgruppen (RHK: n=12, FW: n=13). Mittelwert \pm SEM. (**= $p \leq 0,01$)

3.7. Mikrovaskuläre Gefäßpermeabilität (P)

Die mikrovaskuläre Gefäßpermeabilität von Albumin als Maß für die Durchlässigkeit der Gefäßwand zeigte in der Rückenhautkammer-Gruppe einen signifikanten ($p=0,014$) Anstieg von Messtag 14 ($3,67 \times 10^{-3} \text{cm/s}$) zu Messtag 21 ($5,28 \times 10^{-3} \text{cm/s}$). Von Tag 21 kommt es wiederum zu einem signifikanten ($p=0,019$) Abfall der Permeabilität zum Versuchsende an Tag 28 ($3,85 \times 10^{-3} \text{cm/s}$).

In der Femur-Window-Gruppe war ein Anstieg der mikrovaskulären Gefäßpermeabilität von Tag 7 ($5,78 \times 10^{-3} \text{cm/s}$) bis Tag 28 ($6,39 \times 10^{-3} \text{cm/s}$) zu verzeichnen der allerdings nicht signifikant war.

Im Vergleich der beiden Versuchsgruppen fiel eine an allen vier Vergleichstagen höhere Gefäßpermeabilität in der Femur Window-Gruppe auf. Diese Unterschiede waren an den Versuchstagen 14 und 28 hochsignifikant ($p \leq 0,01$).

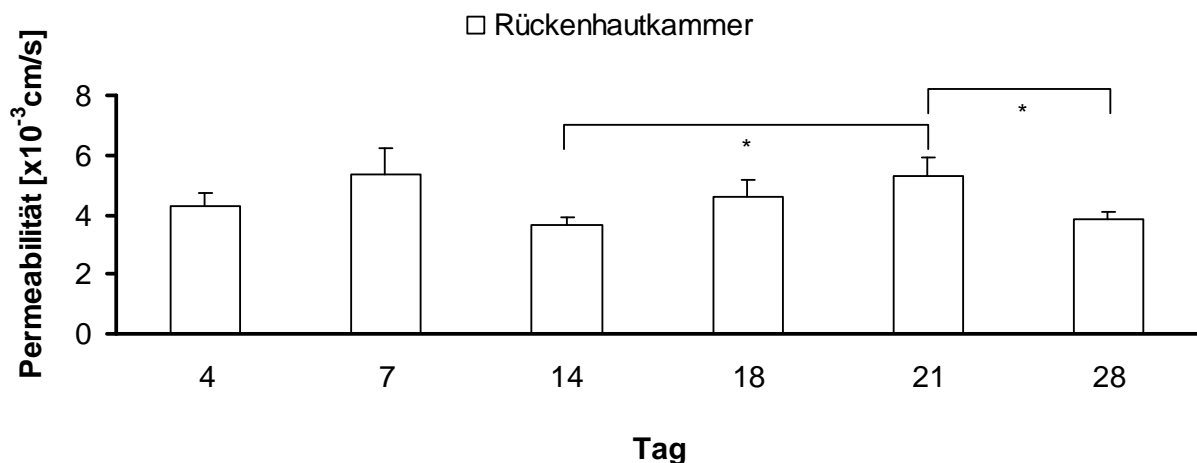


Abbildung 34: Mikrovaskuläre Gefäßpermeabilität in der Rückenhautkammer-Gruppe ($n=12$). Mittelwert \pm SEM. (*= $p < 0,05$)

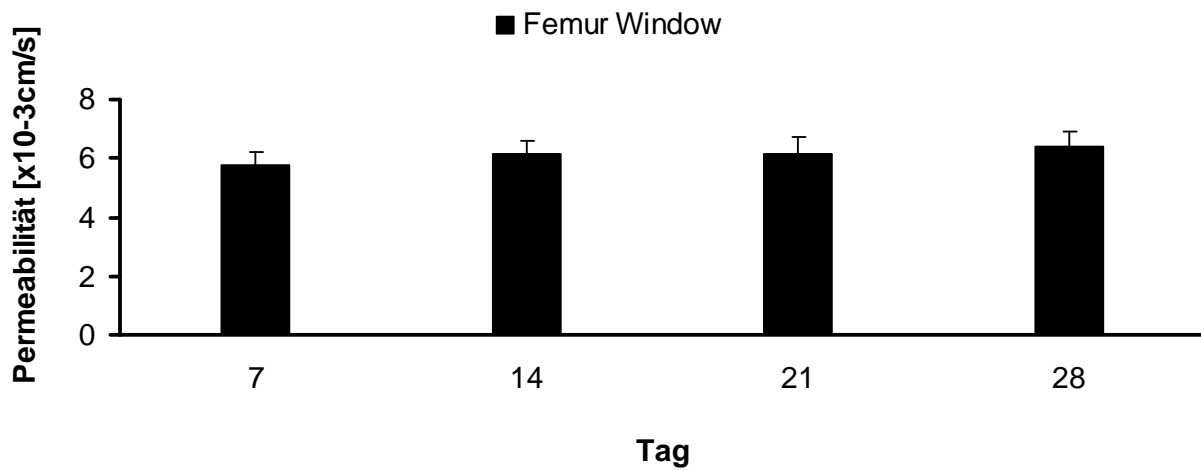


Abbildung 35: Mikrovaskuläre Gefäßpermeabilität in der Femur Window-Gruppe (n=13). Mittelwert \pm SEM.

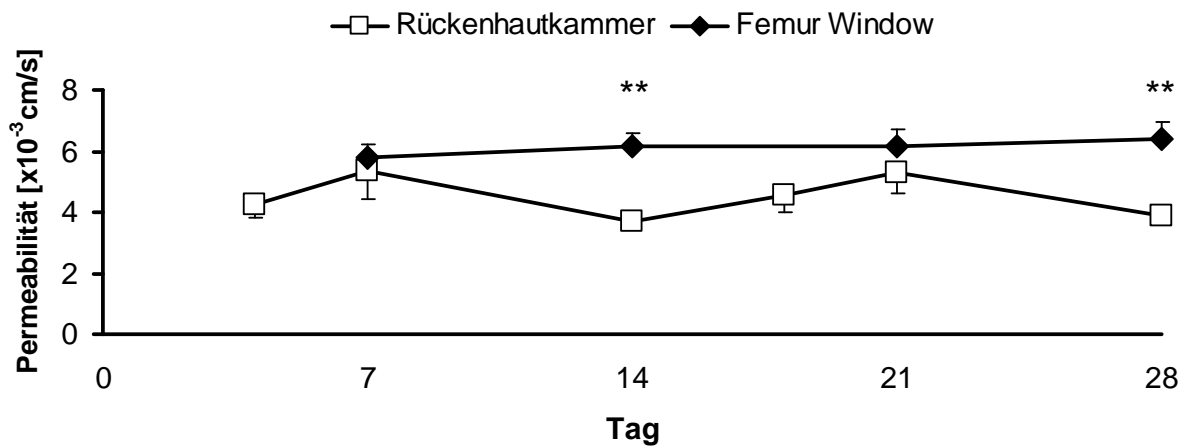


Abbildung 36: Mikrovaskuläre Gefäßpermeabilität in beiden Versuchsgruppen (RHK: n=12, FW: n=13). Mittelwert \pm SEM. (**=p \leq 0,01)

4. Diskussion

4.1. Diskussion des Tiermodells

Die NOD scid gamma-Maus gehört zu den immunkompromittiertesten Versuchsmäusen, die derzeit in der tierexperimentellen Forschung eingesetzt werden (1). Seit ihrer ersten Beschreibung 2005 (12) wurde diese Mauslinie in zahlreichen Studien in der Immunologie (90, 91), Hämatologie (92, 93), Stammzellforschung (94), Infektiologie (95, 96) und der Diabetes-Forschung (97) (98) eingesetzt. Des Weiteren erreichte die NOD scid gamma-Maus einen besonderen Stellenwert in der onkologischen Forschung. So wurde die Mausreihe bisher in zahlreichen onkologischen Studien als Versuchstier eingesetzt. Unter anderem in der Erforschung des Blasenkrebses (99), des Brustkrebses (100), der malignen Hirntumoren (101), des Lungenkrebses (102) und des Prostatakarzinoms (103). Diese Liste könnte beliebig lang erweitert werden und unterstreicht die Bedeutung der NOD scid gamma-Maus in der aktuellen onkologischen Forschung.

Die NOD scid gamma-Maus ist bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht in intravitalmikroskopischen Studien zum Einsatz gekommen. Doch unter anderem lassen sich gerade Fragestellungen zur *in vivo* Tumorangio-genese in orthotopen Modellen mit der Intravitalmikroskopie beantworten.

Die Techniken der Intravitalmikroskopie und die dadurch erhobenen Daten zur Mikrozirkulation im Knochen- und Weichgewebe sind in dieser Studie mit dem Femur Window und der Rückenhautkammer erstmals erfolgreich an NOD scid gamma-Mäusen angewendet worden. Damit stehen zum ersten Mal physiologische Vergleichsdaten der Mikrozirkulation für zukünftige Studien mit dieser Mauslinie zur Verfügung. Die hohe Immuninkompetenz der NOD scid gamma-Maus eröffnet somit die Möglichkeit weitreichendere intravitalmikroskopische Untersuchungen auf den oben genannten Forschungsfeldern zu betreiben, als es bisher möglich war.

Dieser hohe Grad an Immuninkompetenz bringt allerdings den Nachteil eines höheren Aufwandes in der Haltung und dem Umgang mit den Versuchstieren mit sich. Die Tiere sind sehr anfällig für Infektionen, da Infektionserreger über jegliche Art von Hautdefekten eintreten können. Der häufigste beschriebene Grund für eine Infektion der Mäuse ist ein aufsteigender Harnwegsinfekt (104). Diese Art der Infektionen konnte in der vorliegenden Studie nicht beobachtet werden. Die Infektionsrate war, im

Vergleich mit den anderen Mauslinien die bisher in der Arbeitsgruppe für intravitalmikroskopische Fragestellungen eingesetzt wurden, nicht erhöht.

4.2. Diskussion der Untersuchungstechniken

Die Beobachtung der Mikrozirkulation kann invasiv oder nicht-invasiv erfolgen. Histologische oder molekulare Analysen erlauben dies auf subzellulärer Ebene, sind aber für kontinuierliche und funktionelle Analysen ungeeignet. Bildgebende Untersuchungen wie PET, CT und MRT haben nicht die nötige Auflösung für bestimmte Fragestellungen. Die Intravitalmikroskopie bietet, als einzige der genannten Untersuchungsmethoden, die Möglichkeit wiederholte *in vivo* Untersuchungen an einem Gewebe mit einer hohen räumlichen und zeitlichen Auflösung durchzuführen (105).

Sandison führte 1924 die ersten intravitalmikroskopischen Untersuchungen an Kaninchenohren durch (19). Ihm war es aber nur möglich die Vaskularisation während des Wundheilungsprozesses zu beobachten.

Auch wurden schon früher Knochenkammermodelle zur intravitalmikroskopischen Beobachtung entwickelt. 1959 entwickelte Branemark ein Hohlschraubenmodell zur Untersuchung der Knochenbruchheilung im Kaninchen (106). Diese Kammer und deren Weiterentwicklungen (107-109) erlauben die intravitalmikroskopische Beobachtung von neu gebildetem Knochengewebe über einen Zeitraum von bis zu einem Jahr. Allerdings sind Mäuse zu klein für diese Art der Beobachtungskammer. Die Mausspezies bietet jedoch den großen Vorteil, dass sie genetisch sehr gut charakterisiert ist, und dass zahlreiche Antikörper für immunhistochemische Analysen zur Verfügung stehen (110).

So wurde neben dem Femur Window eine weitere Knochenbeobachtungskammer, das „Cranial Window“ oder die „Calvarian Bone Chamber“ für Untersuchungen von Knochengewebe an der Maus entwickelt.

Zunächst wurden mit dieser Technik Studien an größeren Tieren wie Katzen und Ratten durchgeführt (111), heute noch an Ratten mit funktionellen und morphologischen Fragestellungen zur Knochenangiogenese (87, 112, 113).

Die Technik wurde inzwischen erfolgreich auf verschiedene Mauslinien übertragen. Die dort gewonnenen physiologischen Daten zu mikrovaskulären Gefäßparametern im Knochengewebe vergleiche ich im Folgenden mit Parametern, die in diesen Studien

erhoben wurden. Vergleichsstudien, in denen Ergebnisse zu Gefäßparametern unter pathologischen Bedingungen, wie zum Beispiel unter Tumoreinfluss (69, 70, 114) gewonnen wurden, werden hier nicht berücksichtigt.

Ziel der heutigen Intravitalmikroskopie ist die wiederholte kontinuierliche Beobachtung der Mikrozirkulation von unterschiedlichen Geweben durch eine transparente Kammer, die das Versuchsobjekt möglichst wenig oder nicht beeinträchtigt. Die mikrovaskulären Parameter wurden in dieser Studie durch zwei Beobachtungskammern, das Femur Window und die Rückenhautkammer, an NOD scid gamma-Mäusen erhoben. Durch diese beiden Beobachtungskammern war es erstmals möglich die Perfusion von Knochen- und Weichgewebe in einer Mauslinie miteinander zu vergleichen.

Das Femur Window wurde von unserer Arbeitsgruppe entwickelt (24). Es konnte nun bereits in mehreren Studien (25-27) inklusive dieser gezeigt werden, dass es ein etabliertes Modell ist, um Antworten auf mikrozirkulatorische Fragestellungen zum Knochengewebe zu erhalten. Es erlaubte bisher intravitalmikroskopische Untersuchungen am orthotopen Modell zur Angiogenese und Osteogenese in der Knochendefektheilung und Tumormetastasierung in einer hohen Auflösung (24).

Die Rückenhautkammer (Dorsal Skinfold Chamber) wird seit Jahrzehnten zu *in vivo* Untersuchungen der Angiogenese genutzt. Die Rückenhautpräparation wurde erstmals 1943 von Algire (115) beschrieben. Inzwischen wurde die Rückenhautkammer weiterentwickelt und ist für die Ratte (116), den Hamster (117) und die Maus (118) für unterschiedlichste intravitalmikroskopische Fragestellungen der Angiogenese etabliert. Durch die intravenöse Gabe von Fluoreszenzfarbstoffen kann die Mikrozirkulation der Rückenhautmuskulatur beobachtet werden. Durch den Einsatz dieser Fluoreszenzfarbstoffe kann es durch Bildung von Sauerstoffradikalen zu phototoxischen Effekten kommen. Diese Sauerstoffradikale können das zu untersuchende Gewebe schädigen. So kann es eventuell zu Endothelzellschäden (119), Vasospasmen (120) und einer Reduktion der funktionellen Kapillardichte (121) kommen. Zur Minimierung dieser potentiellen Gewebeschädigung wurde die jeweilige Beobachtungszeit auf ein Minimum beschränkt.

An beiden Beobachtungskammern konnte gezeigt werden, dass sie sich zur Xenotransplantation von verschiedenen Tumorzelllinien eignen und so Untersuchungen zur Tumorangiogenese und Tumorwachstum erlauben. Ein Unterschied zwischen den beiden Kammernmodellen besteht hierbei, dass die

Konstruktion der Rückenhautkammer eine Manipulation des zu untersuchenden Gewebes oder eine Transplantation von Materialien auch im Verlauf der Studie erlaubt. Das Einbringen von Transplantaten ist im Femur Window nur zum Zeitpunkt der Implantation möglich. Nachträgliche Manipulationen würden die Beobachtungskammer zerstören.

4.3. Diskussion der Ergebnisse

Insgesamt wurden in der Rückenhautkammer-Gruppe an 12 Versuchstieren und an sechs Messtagen 8013 Gefäßabschnitte und in der Femur Window-Gruppe an 13 Versuchstieren und vier Messtagen 3121 Gefäßabschnitte beobachtet und ausgewertet. Damit wurden erstmalig detaillierte Vergleichsdaten über eine lange Beobachtungsperiode für zukünftige mikrovaskuläre Fragestellungen zum Knochen- und Weichgewebe geschaffen.

Im Vergleich der beiden Gruppen fallen vor allem Unterschiede in der Gefäßdichte (VD) auf. Die größere Gefäßdichte in der Rückenhautkammer ist durch die höhere Gesamtanzahl der Gefäße in der Rückenhautkammer-Gruppe zu erklären. Dadurch resultiert eine hochsignifikant höhere Gefäßdichte in der Rückenhautkammer über den gesamten Versuchszeitraum hinweg.

Der Volumenfluss pro Zeiteinheit im Einzelgefäß (Blutflussrate, BFR) fällt in der Femur Window-Gruppe jedoch höher aus, da diese von dem größeren Gefäßdurchmesser (D) in dieser Gruppe beeinflusst wird. Die Blutflussgeschwindigkeit (V_{mean}), ist in beiden Gruppen annähernd vergleichbar. Deswegen resultiert eine signifikant (Tag 7) und hochsignifikant (Tag 14, 21 und 28) höhere Blutflussrate in der Femur Window-Gruppe. Auch der signifikante Anstieg der Blutflussrate von Beginn des Versuchszeitraumes zu dessen Ende ist durch den hochsignifikanten Anstieg des Gefäßdurchmessers im Femur Window bei vergleichbarer Höhe der Blutflussgeschwindigkeit in beiden Gruppen erklärbar.

Die Gewebepfusionsrate (TPR), also der Blutfluss pro Zeiteinheit und Fläche, zeigt im Vergleich der Gruppen keinen signifikanten Unterschied und wird maßgeblich vom Gefäßdurchmesser, der Blutflussgeschwindigkeit und der Gesamtanzahl der Gefäße beeinflusst. Der Gefäßdurchmesser ist in der Femur Window-Gruppe zwar signifikant gegenüber der Rückenhautkammer-Gruppe erhöht, bei vergleichbarer

Blutflussgeschwindigkeit wird dies aber durch die erhöhte Zahl der beobachteten Gefäße in der Rückenhautkammer kompensiert. Hieraus ergibt sich kein messbarer Unterschied in der Gewebepерfusionrate.

Im Folgenden vergleiche ich die hier dargestellten Ergebnisse mit intravitalmikroskopischen Studien mit anderen Mauslinien. Zunächst gehe ich dabei auf intravitalmikroskopische gewonnene Daten zum Knochengewebe im Femur Window ein.

Die ersten mikrovaskulären Parameter zum Femur Window wurden an 19 c57-black-Mäusen über einen Zeitraum von 12 Tagen gewonnen (24). Um einen Vergleich der dort gewonnenen Daten mit denen in dieser Studie zu ermöglichen, werden im Folgenden die Daten von Messtag 6 mit den jetzigen Daten von Tag 7 und die Daten von Messtag 12 mit den neu gewonnenen von Tag 14 verglichen.

Die Blutflussgeschwindigkeit (V_{mean}) der C57-black-Mäuse stieg von Tag 6 ($111,52 \pm 11,52 \mu\text{m/s}$) zu Tag 12 ($121,63 \pm 28,35 \mu\text{m/s}$) an. In den NOD scid gamma-Mäusen dieser Studie konnte die gleiche Beobachtung von Tag 7 zu Tag 14 gemacht werden. Hier war der Anstieg von V_{mean} sogar signifikant (Tag 7: $116,96 \pm 6,46 \mu\text{m/s}$, Tag 14: $135,32 \pm 5,82 \mu\text{m/s}$, s. Abb: 20). Die Höhe der Blutflussgeschwindigkeit ist in beiden Mauslinien vergleichbar. Es ist anzunehmen, dass eine um zwei Tage verlängerte Versuchszeit in der damaligen Studie auch zu einem signifikanten Anstieg geführt hätte.

Die Blutflussrate (BFR) lag bei den damaligen Untersuchungen unter der, die in dieser Studie gemessen wurde. Sie wurde an Tag 6 mit $2,50 \pm 0,26 \times 10^3 \mu\text{m}^3/\text{s}$ gemessen und sank auf $2,40 \pm 0,46 \times 10^3 \mu\text{m}^3/\text{s}$ an Tag 12. Bei den NOD scid gamma-Mäusen konnte der Volumenfluss pro Zeiteinheit im Einzelgefäß 6-8mal höher gemessen werden (Tag 7: $14,80 \pm 2,13 \times 10^3 \mu\text{m}^3/\text{s}$, Tag 14: $18,95 \pm 2,35 \times 10^3 \mu\text{m}^3/\text{s}$, s. Abb: 23).

Die Höhe der BFR ist jedoch direkt abhängig von der Blutflussgeschwindigkeit (V_{mean}) und dem Gefäßdurchmesser (D). Da die Ergebnisse der V_{mean} in beiden Mauslinien vergleichbar waren, lag der Unterschied in der BFR am Durchmesser der Gefäße. Dieser lag bei den Beobachtungen der c57-black-Mäuse (Tag 6: $5,37 \pm 0,45 \mu\text{m}$, Tag 12: $5,05 \pm 0,4 \mu\text{m}$) unter dem der NOD scid gamma-Mäuse (Tag 7: $11,74 \pm 0,57 \mu\text{m}$, Tag 14: $11,96 \pm 0,64 \mu\text{m}$, s. Abb: 32). Dieser Unterschied ist nicht durch den diabetischen Hintergrund der neuen Versuchsmaus zu erklären, da Diabetes mellitus

zu kleineren Gefäßdurchmessern führt (122). Der Unterschied ist also wahrscheinlich durch die Gefäßcharakteristik der neuen Mauslinie an sich zu erklären.

Die Gefäßdichte (VD) stieg in beiden Mausgruppen über die vergleichbare Zeit nicht signifikant an (c57-black-Mäuse Tag 6: $89,31 \pm 9,33 \text{ cm/cm}^2$, Tag 12: $111,27 \pm 15,63 \text{ cm/cm}^2$, NOD scid gamma-Mäuse Tag 7: $135,23 \pm 12,7 \text{ cm/cm}^2$, Tag 14: $160,91 \pm 7,82 \text{ cm/cm}^2$, s. Abb. 29). Die Absolutwerte der Gefäßdichte sind allerdings höher in der aktuellen Studie gemessen worden. Auch dieser Unterschied könnte wiederum durch die neu untersuchte Mauslinie bedingt sein.

Die mikrovaskuläre Gefäßpermeabilität (P) unterliegt im Vergleichszeitraum in beiden Mauslinien nur geringsten Schwankungen. Allerdings ist die Gefäßpermeabilität die in den Femora der C57-black-Mäuse gemessen wurde viel geringer, als die der Mäuse der vorliegenden Studie (c57-black-Mäuse Tag 6: $6,05 \times 10^{-8} \pm 0,89 \times 10^{-8} \text{ cm/s}$, Tag 12: $5,9 \times 10^{-8} \pm 1,33 \times 10^{-8} \text{ cm/s}$, NOD scid gamma-Mäuse Tag 7: $5,78 \times 10^{-3} \pm 0,45 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$, Tag 14: $6,13 \times 10^{-3} \pm 0,48 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$, s. Abb. 35). Dies kann durch eine genetische Modulation, hervorgerufen durch den Diabetes mellitus erklärt werden, die zu einer endothelialen Dysfunktion führt und so die Permeabilität der Gefäße der NOD scid gamma-Mäus erhöht (123).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es teils deutliche Unterschiede bei den Ergebnissen der mikrovaskulären Gefäßparameter zwischen c57-black-Mäusen und NOD scid gamma-Mäusen gab. Dies gilt es in zukünftigen Studien zu berücksichtigen, da es den Anschein macht, dass beobachtete Parameter nur mit zuvor gewonnenen Parametern in der gleichen Mauslinie direkt verglichen werden können.

Die weiteren Studien mit dem Femur Window (25-27) wurden an scid-Mäusen durchgeführt. In diesen wurden aber lediglich Daten in Verbindung mit, ins Femur Window eingebrachten, Tumorzelllinien gewonnen. Auf Grund dessen sind die dort gemessenen pathophysiologischen Ergebnisse nicht mit denen, unter physiologischen Bedingungen gewonnenen, Parametern dieser Studie zu vergleichen. Es lässt sich aber feststellen, dass für jede einzelne der untersuchten und zu untersuchenden Mauslinien eine eigene Baseline der mikrozirkulatorischen Parameter charakterisiert werden muss, die als Grundlage für weitere Fragestellungen mit der jeweiligen Mauslinie dient.

Tavassol et al. entwickelten zu einem späteren Zeitpunkt ebenfalls ein Beobachtungsfenster zur mikrovaskulären Untersuchung von Mäusefemora (124). In

dieser Studie, in der Balb/c-Mäuse über einen Zeitraum von 22 Tagen untersucht wurden, wurde unter anderem die funktionelle Gefäßdichte gemessen. Diese zeigte in der Kontrollgruppe der Versuchsreihe keinerlei Veränderungen, was mit einer nicht stattfindenden Angiogenese gleichgesetzt wurde. In der hier vorliegenden Studie wurden bei der Messung der Gefäßdichte sehr wohl Unterschiede an den einzelnen Messtagen festgestellt, die von Messtag 14 zu 28 sogar als signifikant zu bezeichnen sind (s. Abb. 29). Die Abnahme der Gefäßdichte ist wiederum durch den Diabetes mellitus der NOD scid gamma-Mäuse zu erklären. Diabetes mellitus führt zu einer reduzierten Gefäßdichte in diabetischen Mäusen (125). Einschränkend muss jedoch gesagt werden, dass in der Studie von Tavassol et al. ein Knochendefektmodell beschrieben worden ist und nicht wie in der vorliegenden Studie die Mikrozirkulation im Knochen an sich untersucht wurde.

Sinikovic et al. führten ihre Untersuchungen zum Tissue engineering mit der Calvaria Bone Chamber an 32 Balb/c Mäusen über ein Versuchszeitraum von 22 Tagen durch (126). In der Kontrollgruppe dieser Studie wurde eine steigende funktionelle Kapillardichte über den gesamten Versuchszeitraum angegeben. Zudem betragen die gemessenen Werte der Gefäßdichte in etwa ein Viertel der Ergebnisse der Gefäßdichte der Femora der NOD scid gamma Mäuse. Hier liegt der Grund der Diskrepanz der Ergebnisse wahrscheinlich in der unterschiedlichen Ossifikationsweise und damit Angiogenese von desmalem (Schädelkalotte) und chondralem Knochengewebe (Femur) (127). Ergänzend muss auch hier angemerkt werden, dass es sich bei der Calvaria Bone Chamber um ein Knochendefektmodell handelt.

Holstein et al. haben Untersuchungen im Cranial Window von 22 CD-1 Mäusen zur Knochendefektheilung über einen Zeitraum von 21 Tagen durchgeführt (71). Die gleichen Ergebnisse sind einer weiteren Veröffentlichung zu entnehmen (72). In diesen Studien liegen also monokortikale Knochendefektmodelle vor. Sie untersuchten den Effekt von körperlicher Ertüchtigung auf die Knochendefektheilung und Angiogenese, indem sie einer Untersuchungsgruppe ein Laufrad zur Verfügung stellten. In der Kontrollgruppe ohne Laufrad (n=7) zeigte sich, dass die Gefäßdichte ab Messtag 6 bis zum Versuchsende anstieg. Der Anstieg war von Tag 6 bis Tag 15 sehr stark, fiel dann an Tag 18 gering und stieg dann erneut leicht wieder an bis zum Messtag 21. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Untersuchung des Gefäßdurchmessers der CD-1 Mäuse. Hier war ein starker Anstieg von Tag 3 bis Tag 9 zu beobachten. Danach fiel der Gefäßdurchmesser wieder leicht ab und hielt sich dann annähernd konstant bis

zum Versuchsende an Tag 21. Zum Vergleich stieg die Gefäßdichte im Femur Window der NOD scid gamma-Mäuse initial an, um dann von Tag 14 zu Tag 28 signifikant abzufallen (s. Abb.29). Nach Heilung des monokortikalen Defektes im Cranial Window der CD-1 Mäuse gleichen sich die Messergebnisse der hier zu vergleichenden Beobachtungssituationen an und es liegen vergleichbare Messwerte in der Gefäßdichte vor.

Der Gefäßdurchmesser im Femur Window stieg über den gesamten Messzeitraum von 28 Tagen kontinuierlich an. Von Tag 7 zu Tag 28 war dieser Anstieg hochsignifikant (s. Abb. 32).

Die Begründung für die unterschiedlichen Messergebnisse am Studienbeginn liegt wahrscheinlich am monokortikalen Defekt des Cranial Window. Nachdem sich zum Versuchsende die Untersuchungsbedingungen angepasst haben, sind vergleichbare Werte in der Gefäßdichte messbar. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind durch die jeweilig intravitalmikroskopisch untersuchte Mauslinie zu erklären und das Beobachtungsmodell erklärbar.

Zu dem Design der vorliegenden Studie sei angemerkt, dass hier das Femur Window-Modell zur Betrachtung der Auswirkung von körperlicher Ertüchtigung auf Knochendefektheilung und der damit verbundenen Angiogenese wahrscheinlich besser geeignet gewesen wäre. Das Femur Window erlaubt strukturelle und funktionelle Untersuchungen des Knochens. Die Mäuse sind von der Implantation nicht beeinträchtigt und belasten das operierte Femur in vollem Ausmaß (24). Es wäre also möglich die Vor- oder Nachteile von körperlicher Ertüchtigung auf die Knochendefektheilung direkt an einem belasteten Knochen zu untersuchen. Im Cranial Window sind lediglich die systemischen Auswirkungen der Laufrad-Benutzung auf die Angiogenese zu messen.

In der Studie von Hansen-Algenstaedt et al. (86) wurden funktionelle und morphologische mikrovaskuläre Gefäßparameter zur Tumervaskularisation im Cranial Window in SCID-Mäusen erfasst. In der Kontrollgruppe wurde über einen Versuchszeitraum von 49 Tagen unter anderem die Permeabilität, die Gefäßdichte und der Gefäßdurchmesser beobachtet.

Die Gefäßpermeabilität sank im Cranial Window über den gesamten Versuchszeitraum ab, während die Permeabilität im Femur Window ansteigt. Die Höhe der gemessenen Werte lag im Cranial Window weit unter denen der Femur Window-Gruppe. Dies könnte erneut durch eine genetische Modulation, hervorgerufen worden

sein, die durch den Diabetes mellitus der NOD scid gamma-Mäuse verursacht worden ist, die zu einer endothelialen Dysfunktion führt und so die Permeabilität der Gefäße der NOD scid gamma-Mäuse erhöht (123). Eine weitere mögliche Erklärung für das unterschiedliche Permeabilitätsniveau in den beiden Modellen ist das Vorhandensein einer funktionellen Blut-Hirn-Schranke und die sinusoidale Konfiguration der Gefäße im Cranial Window (128).

Im Folgenden gehe ich auf die Ergebnisse aus den Untersuchungen mit dem Modell der Rückenhautkammer ein.

Die ersten Daten zur Mikrozirkulation in der Rückenhautmuskulatur veröffentlichten Lehr et al. 1993 (118). Dort wurden die Daten aus immuninkompetenten Nacktmäusen über einen Zeitraum von mindestens 14 Tagen gewonnen und mit vorhandenen Daten aus Rückenhautkammern in Hamstern verglichen. Die Ergebnisse für die funktionelle Kapillardichte, Gefäßdurchmesser und Blutflussgeschwindigkeit wurden als einzelner Durchschnittswert für den gesamten Versuchszeitraum mit der jeweiligen Range der Werte angegeben. Es ist zum einen anzumerken, dass die Versuche an nicht-narkotisierten Nacktmäusen stattgefunden haben und es nicht auszuschließen ist, dass die Narkose Auswirkungen auf die Mikrozirkulation haben konnte (129). Des Weiteren unterschieden Lehr et al. in Ihren Ergebnissen für den Gefäßdurchmesser und die Blutflussgeschwindigkeit zwischen Arteriolen, Kapillargefäßen und Venolen. Diese Unterscheidung fand in der vorliegenden Studie nicht statt.

Die Gefäßdichte in den Nacktmäusen wurde mit $249 \pm 12 \text{ cm/cm}^2$ gemessen (Range: $180 - 312 \text{ cm/cm}^2$). Im Vergleichszeitraum liegt die Gefäßdichte der NOD scid gamma-Mäuse zwischen $359,48 \pm 33 \text{ cm/cm}^2$ (Tag 14) und $398,43 \pm 25,75 \text{ cm/cm}^2$ (Tag 7) und damit deutlich über der Gefäßdichte, die in der damaligen Studie gemessen wurde.

Der Gefäßdurchmesser der Kapillargefäße wurde mit $5,6 \pm 1,8 \text{ }\mu\text{m}$ (Range: $4-9 \text{ }\mu\text{m}$) bestimmt. In den NOD scid gamma-Mäusen zwischen $8,11 \pm 0,27 \text{ }\mu\text{m}$ (Tag 7) und $8,47 \pm 0,53 \text{ }\mu\text{m}$ (Tag 4) und damit im oberen Gefäßdurchmesser-Bereich der Range der Kapillargefäße der Nacktmäuse.

Die Blutflussgeschwindigkeit in den Kapillargefäßen der Nacktmäuse lag mit $120 \pm 30 \text{ }\mu\text{m/s}$ (Range: $80-260 \text{ }\mu\text{m/s}$) annähernd bei der Geschwindigkeit, die in der vorliegenden Studie gemessen wurde (s. Abb. 19).

Die Ergebnisse in Bezug auf den Gefäßdurchmesser und die Blutflussgeschwindigkeit sind in diesen beiden Studien durchaus vergleichbar. Die deutlich unterschiedlichen

Ergebnisse der gemessenen Gefäßdichte sind eventuell durch die unterschiedliche Auswertungsmethode erklärbar. So kam bei den Nacktmäusen ein computer-assistiertes Mikrozirkulation-Analyse-System zum Einsatz und zusätzlich wurde eine weitaus geringere Anzahl von Blutgefäßen analysiert.

Nolte et al. (130) gaben in ihrer Kontrollgruppe eine Gefäßdichte von $220 \pm 20 \text{ cm/cm}^2$ in balb/c-Mäusen an. Auch diese Gefäßdichte wurde an nicht-narkotisierten Tieren gemessen, liegt in ihrer Höhe aber so weit unter der Gefäßdichte der NOD scid gamma-Mäuse, dass von einem tatsächlichen Unterschied zwischen diesen beiden Mauslinien ausgegangen werden sollte.

Schäfer (85, 131) führte Untersuchungen an transgenen prediabetischen UCP1/DTA-Mäusen mit einer gestörten Glukose-Toleranz und deren nicht-transgenen Wurfgeschwistern als Kontrollkollektiv durch. In dieser Studie wurden die Messungen zur Mikrozirkulation in der Rückenhautkammer am 6. Tag post implantationem durchgeführt. Die dort gewonnenen Ergebnisse vergleiche ich mit denen an Messtag 7 gewonnen in den NOD scid gamma-Mäusen.

Im Vergleich der erhobenen Daten fällt erneut die massiv erhöhte mikrovaskuläre Gefäßpermeabilität der NOD scid gamma-Mäuse gegenüber den UCP1/DTA-Mäusen auf. Eine erhöhte mikrovaskuläre Gefäßpermeabilität ist als ein frühes Zeichen einer endothelialen Dysfunktion in Verbindung mit einer diabetischen Erkrankung bekannt. Die Gefäßdichte der NOD scid gamma-Mäuse ($398,43 \pm 25,75 \text{ cm/cm}^2$) ist eher mit denen der Kontrollgruppe ($334,3 \pm 12,3 \text{ cm/cm}^2$) vergleichbar, ist aber gegenüber beiden UCP1/DTA-Gruppen (Prediabetische Mäuse: $275 \pm 15,4 \text{ cm/cm}^2$) erhöht. Im Gegensatz dazu ist der Gefäßdurchmesser der NOD scid gamma-Mäuse ($8,11 \pm 0,27 \mu\text{m}$) geringer gemessen worden als in den beiden UCP1/DTA-Gruppen (Transgene Mäuse: $14,4 \pm 1,2 \mu\text{m}$, Kontrollgruppe: $10,6 \pm 0,4 \mu\text{m}$). Diese Beobachtungen passen nicht zu bisher veröffentlichten Ergebnissen, nach denen beim Diabetes mellitus eine herabgesetzte funktionelle Gefäßdichte mit einem erhöhten Gefäßdurchmesser einhergeht (132, 133). Es ist also davon auszugehen, dass trotz des manifesten Diabetes mellitus der NOD scid gamma-Mäuse, grundlegend abweichende mikrozirkulatorische Gefäßparameter im Vergleich zu den UCP1/DTA-Mäusen vorliegen. Die Blutflussgeschwindigkeit ist in diesem Vergleich am höchsten in der Kontrollgruppe ($244,3 \pm 28 \mu\text{m/s}$) der UCP1/DTA-Mäuse gemessen worden. Die

Flussgeschwindigkeit nimmt von den prediabetischen Mäusen ($161,9 \pm 33,2 \mu\text{m/s}$) hin zu den diabetischen NOD scid gamma-Mäusen ($120,48 \pm 8,5 \mu\text{m/s}$) weiter ab.

Da die Gefäßdicke keine genügende Aussage darüber zulässt, wie das Gewebe mit Blut und Sauerstoff versorgt wird und wie Stoffwechselabfallprodukte abtransportiert werden, wurde auch in dieser Vergleichsstudie die Blutflussrate, also der Volumenfluss pro Zeiteinheit im Einzelgefäß, aus der Blutflussgeschwindigkeit und dem Gefäßdurchmesser berechnet (114). Die Höhe der Blutflussrate ist höher bei den NOD scid gamma Mäusen ($9,74 \pm 1,71 \times 10^3 \mu\text{m}^3/\text{s}$, UCP1/DTA-Mäuse: $5,7 \pm 0,8 \times 10^3 \mu\text{m}^3/\text{s}$, Kontrollgruppe: $5,1 \pm 0,7 \times 10^3 \mu\text{m}^3/\text{s}$). Es ist also davon auszugehen, dass in den NOD scid gamma-Mäusen eine erhöhte Stoffwechselaktivität im Vergleich zu den UCP1/DTA-Mäusen vorliegt.

Die mikrozirkulatorischen Parameter, die in den Rückenhautkammern dieser beiden Mauslinien beobachtet wurden, sind nicht direkt miteinander vergleichbar, dies sollte bei zukünftigen Studien Berücksichtigung finden.

Es gab zahlreiche weitere Experimente mit der Rückenhautkammer an den verschiedensten Mauslinien und mit unterschiedlichsten Fragestellungen (134-136). In diesen wurden allerdings lediglich pathophysiologische Gefäßparameter erhoben, die nicht mit den physiologischen Parametern dieser Studie zu vergleichen sind.

Abschließend lässt sich sagen, dass die gewonnen Daten und deren Vergleich mit anderen etablierten Studien dafür sprechen, dass sowohl das Femur Window als auch das Modell der Rückenhautkammer erfolgreich auf die NOD scid gamma-Mauslinie übertragen werden konnte. Es wurden hier physiologische Daten in beiden Modellen erhoben, die in zukünftig folgenden Studien und Versuchsreihen mit pathophysiologischen Fragestellungen als Vergleich dienen sollten, da sich gezeigt hat, dass mikrozirkulatorische Parameter, die in anderen Mauslinien in gleichen oder vergleichbaren Beobachtungskammern gemessen wurden, nicht direkt auf eine neu zu Untersuchende übertragen werden können.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig *in vivo* der standardisierte Vergleich der physiologischen Mikrozirkulation und Angiogenese im Knochen und im Weichgewebe an der hochgradig immunkompromittierten NOD scid gamma-Maus intravitalmikroskopisch dargestellt und analysiert.

Die Ergebnisse unterstreichen die organspezifischen Unterschiede in der Mikrozirkulation. So sind der Gefäßdurchmesser sowie die Blutperfusionsrate im Knochen signifikant höher als im Weichgewebe, welches unter anderem eine vermehrte Durchblutung anzeigt. Die höhere Gefäßdichte im Weichgewebe ist auf den kleineren Gefäßdurchmesser zurückzuführen.

Es konnte gezeigt werden, dass die mikrozirkulatorischen Parameter nicht uneingeschränkt auf andere Mauslinien übertragen werden können. So stellen die hier gewonnenen physiologischen Daten der NOD scid gamma-Maus die Grundlage für weitere Untersuchungen und pathophysiologischen Fragestellungen dar.

Mit den beiden intravitalmikroskopischen Modellen wird es möglich sein, zum Beispiel das Wachstum von Tumoren in Bezug auf Ihre Blutversorgung im Knochen und im Weichgewebe zu vergleichen und weiterführend die Evaluation der organspezifischen Therapieeffizienz im Rahmen des Tumorwachstums von ossären Tumoren ermöglichen.

5.1. Summary

In the present thesis an in vivo standardized comparison of the physiological microcirculation and angiogenesis in the bone and the soft tissue at the highly immunocompromised NOD scid gamma-mouse was shown and analyzed by intravital microscopy for the first time ever

The findings underline the organ-specific differences in the microcirculation. Thus, the vessel diameter and the blood flow rate in the bone were significantly higher than in the soft tissue, which indicates amongst other things an increased blood circulation. The increased vessel density in the soft tissue was a result of the smaller vessel diameter.

It could be shown that the parameters of microcirculation can not be transferred without restriction to other mouse breeds. Therefore the physiological data obtained in the recent study forms the basis for further pathophysiological investigations of the NOD scid gamma-mouse.

With both intravital microscopic models it will be possible, for example, to compare the growth of tumors in relation to their blood supply in the bone and soft tissue. These results support the further evaluation of organ-specific therapy efficiency in the context of osseous tumor growth.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Technische Zeichnung des Femur Window	9
Abbildung 2: Technische Zeichnung der Rückenhautkammer	10
Abbildung 3: Intraoperative Darstellung der Femurdiaphyse	12
Abbildung 4: Position des Femurs im Femur Window	13
Abbildung 5: Lichtmikroskopische Aufnahme des FW Tag 0	13
Abbildung 6: Maus nach Implantation der Rückenhautkammer	15
Abbildung 7: Lichtmikroskopische Aufnahme der RHK Tag 0	16
Abbildung 8: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen	16
Abbildung 9: Lichtmikroskopische Aufnahmen des FW	19
Abbildung 10: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des FW	20
Abbildung 11: Beispielhaftes Einzelbild einer der FW-Filme	21
Abbildung 12: Lichtmikroskopische Aufnahmen der RHK	22
Abbildung 13: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der RHK	23
Abbildung 14: Beispielhaftes Einzelbild einer der RHK-Filme	24
Abbildung 15: Biometrische Planung	24
Abbildung 16: Blutflussgeschwindigkeit in einem linearen Gefäß	27
Abbildung 17: Röhrenströmung	28
Abbildung 18: Körpergewicht in beiden Versuchsgruppen	33
Abbildung 19: Blutflussgeschwindigkeit (V_{mean}) in der RHK-Gruppe	33
Abbildung 20: Blutflussgeschwindigkeit (V_{mean}) in der FW-Gruppe	34
Abbildung 21: Blutflussgeschwindigkeit (V_{mean}) in beiden Versuchsgruppen	34
Abbildung 22: Blutflussrate (BFR) in der RHK-Gruppe	35
Abbildung 23: Blutflussrate (BFR) in der FW-Gruppe	36
Abbildung 24: Blutflussrate (BFR) in beiden Versuchsgruppen	36
Abbildung 25: Gewebepfusionsrate (TPR) in der RHK-Gruppe	37
Abbildung 26: Gewebepfusionsrate (TPR) in der FW-Gruppe	37
Abbildung 27: Gewebepfusionsrate (TPR) in beiden Versuchsgruppen	38
Abbildung 28: Gefäßdichte (VD) in der RHK-Gruppe	39
Abbildung 29: Gefäßdichte (VD) in der FW-Gruppe	39
Abbildung 30: Gefäßdichte (VD) in beiden Versuchsgruppen	39
Abbildung 31: Gefäßdurchmesser (D) in der RHK-Gruppe	40
Abbildung 32: Gefäßdurchmesser (D) in der FW-Gruppe	41

Abbildung 33: Gefäßdurchmesser (D) in beiden Versuchsgruppen	41
Abbildung 34: Mikrovaskuläre Gefäßpermeabilität in der RHK-Gruppe	42
Abbildung 35: Mikrovaskuläre Gefäßpermeabilität in der FW-Gruppe	43
Abbildung 36: Mikrovas. Gefäßpermeabilität in beiden Versuchsgruppen	43

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ang	Angiopoietin
BFR	Blutflussrate
BSA	bovines Serum Albumin
CCD	charge coupled device
cm	Zentimeter
CT	Computer-Tomographie
D	Gefäßdurchmesser
DTA	Diphtherie Toxin A
IDDM	Insulin dependend Diabetes mellitus
FGF	Fibroblast growth factor
FITC	Fluorescein-Isothiocyanid
FW	Femur Window
g	Gramm
IL	Interleukin
IL-2R	Interleukin-2 Rezeptor
KHK	Koronare Herzkrankheit
MW	molecular weight
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
n	Anzahl
NK-Zellen	Natural-Killer-Zellen
nm	Nanometer
NOD	Non-obese-diabetic
P	Mikrovaskuläre Gefäßpermeabilität
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PDGF	platelet derived growth factor
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
RHK	Rückenhautkammer

s	Sekunde
s.	siehe
S	Gefäßoberfläche
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
Scid	Severe combined immunodeficiency
TPR	Gewebepfusionsrate
UCP1	uncoupling protein 1
V	Gefäßvolumen
VD	funktionelle Gefäßdichte
VEGF	Vascular endothelial growth factor
V_{mean}	Blutflussgeschwindigkeit
V_{RBC}	maximale Blutflussgeschwindigkeit in der Gefäßmitte

8. Literaturverzeichnis

1. Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL. Humanized mice in translational biomedical research. *Nature reviews Immunology*. 2007 Feb;7(2):118-30.
2. Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*. 1983 Feb 10;301(5900):527-30.
3. Greiner DL, Hesselton RA, Shultz LD. SCID mouse models of human stem cell engraftment. *Stem Cells*. 1998;16(3):166-77.
4. Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken dobutsu Experimental animals*. 1980 Jan;29(1):1-13.
5. Kikutani H, Makino S. The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. *Advances in immunology*. 1992;51:285-322.
6. Tang Q, Adams JY, Penaranda C, Melli K, Piaggio E, Sgouroudis E, et al. Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction. *Immunity*. 2008 May;28(5):687-97.
7. Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*. 2003 May 29;423(6939):506-11.
8. Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, Gott B, Schweitzer IB, Tennent B, et al. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol*. 1995 Jan 1;154(1):180-91.
9. Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, et al. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood*. 2002 Nov 1;100(9):3175-82.

10. Sugamura K, Asao H, Kondo M, Tanaka N, Ishii N, Ohbo K, et al. The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Annual review of immunology*. 1996;14:179-205.
11. Cao X, Shores EW, Hu-Li J, Anver MR, Kelsall BL, Russell SM, et al. Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity*. 1995 Mar;2(3):223-38.
12. Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Chen X, Chaleff S, et al. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol*. 2005 May 15;174(10):6477-89.
13. Kerger H, Torres Filho IP, Rivas M, Winslow RM, Intaglietta M. Systemic and subcutaneous microvascular oxygen tension in conscious Syrian golden hamsters. *The American journal of physiology*. 1995 Feb;268(2 Pt 2):H802-10.
14. Jain RK, Munn LL, Fukumura D. Dissecting tumour pathophysiology using intravital microscopy. *Nature reviews Cancer*. 2002 Apr;2(4):266-76.
15. Pahernik S, Harris AG, Schmitt-Sody M, Krasnici S, Goetz AE, Dellian M, et al. Orthogonal polarisation spectral imaging as a new tool for the assessment of antivascular tumour treatment in vivo: a validation study. *British journal of cancer*. 2002 May 20;86(10):1622-7.
16. Devoisselle JM, Begu S, Tourne-Peteilh C, Desmettre T, Mordon S. In vivo behaviour of long-circulating liposomes in blood vessels in hamster inflammation and septic shock models-use of intravital fluorescence microscopy. *Luminescence : the journal of biological and chemical luminescence*. 2001 Mar-Apr;16(2):73-8.
17. Vranckx JJ, Slama J, Preuss S, Perez N, Svensjo T, Visovatti S, et al. Wet wound healing. *Plastic and reconstructive surgery*. 2002 Dec;110(7):1680-7.

18. Bertera S, Geng X, Tawadrous Z, Bottino R, Balamurugan AN, Rudert WA, et al. Body window-enabled in vivo multicolor imaging of transplanted mouse islets expressing an insulin-Timer fusion protein. *BioTechniques*. 2003 Oct;35(4):718-22.
19. JC S. A new method for the microscopic study of living growing tissues by introduction of a transparent chamber in the rabbit's ear. *Anat Rec*. 1924;28:281-7.
20. Branemark PI, Braide M, Bagge U. Intravascular anatomy of blood cells in man-(movie). *Acta medica portuguesa*. 1983 Apr;Suppl:9-11.
21. Chen DC, Agopian VG, Avansino JR, Lee JK, Farley SM, Stelzner M. Optical tissue window: a novel model for optimizing engraftment of intestinal stem cell organoids. *The Journal of surgical research*. 2006 Jul;134(1):52-60.
22. Menger MD, Walter P, Hammersen F, Messmer K. Quantitative analysis of neovascularization of different PTFE-implants. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 1990;4(4):191-6.
23. Mordon S, Desmettre T, Devoisselle JM, Mitchell V. Selective laser photocoagulation of blood vessels in a hamster skin flap model using a specific ICG formulation. *Lasers in surgery and medicine*. 1997;21(4):365-73.
24. Hansen-Algenstaedt N, Schaefer C, Wolfram L, Joscheck C, Schroeder M, Algenstaedt P, et al. Femur window--a new approach to microcirculation of living bone in situ. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2005 Sep;23(5):1073-82.
25. Fuhrhop I, Schroeder M, Rafnsdottir SL, Viezens L, Ruther W, Hansen-Algenstaedt N, et al. Dynamics of microvascular remodelling during tumor growth in bone. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2010 Jan;28(1):27-31.

26. Schaefer C, Fuhrhop I, Schroeder M, Viezens L, Otten J, Fiedler W, et al. Microcirculation of secondary bone tumors in vivo: the impact of minor surgery at a distal site. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2010 Nov;28(11):1515-21.
27. Schaefer C, Schroeder M, Fuhrhop I, Viezens L, Otten J, Fiedler W, et al. Primary tumor dependent inhibition of tumor growth, angiogenesis, and perfusion of secondary breast cancer in bone. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2011 Aug;29(8):1251-8.
28. Zygmunt M, Herr F, Munstedt K, Lang U, Liang OD. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2003 Sep 22;110 Suppl 1:S10-8.
29. Drake CJ. Embryonic and adult vasculogenesis. *Birth defects research Part C, Embryo today : reviews*. 2003 Feb;69(1):73-82.
30. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nature medicine*. 2003 Jun;9(6):653-60.
31. Tahergorabi Z, Khazaei M. A review on angiogenesis and its assays. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2012 Nov;15(6):1110-26.
32. Folkman J, Hochberg M. Self-regulation of growth in three dimensions. *The Journal of experimental medicine*. 1973 Oct 1;138(4):745-53.
33. Folkman J. Angiogenesis: initiation and control. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1982;401:212-27.
34. Folkman J. Tumor angiogenesis. *Advances in cancer research*. 1985;43:175-203.

35. Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes memorial Award lecture. *Cancer research*. 1986 Feb;46(2):467-73.
36. Burri PH, Hlushchuk R, Djonov V. Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2004 Nov;231(3):474-88.
37. Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *Journal of neuro-oncology*. 2000 Oct-Nov;50(1-2):1-15.
38. Norrby K. Angiogenesis: new aspects relating to its initiation and control. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 1997 Jun;105(6):417-37.
39. Risau W. Angiogenic growth factors. *Progress in growth factor research*. 1990;2(1):71-9.
40. Polverini PJ. Angiogenesis in health and disease: insights into basic mechanisms and therapeutic opportunities. *Journal of dental education*. 2002 Aug;66(8):962-75.
41. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *Journal of the National Cancer Institute*. 1990 Jan 3;82(1):4-6.
42. Read TA, Farhadi M, Bjerkvig R, Olsen BR, Rokstad AM, Huszthy PC, et al. Intravital microscopy reveals novel antivascular and antitumor effects of endostatin delivered locally by alginate-encapsulated cells. *Cancer research*. 2001 Sep 15;61(18):6830-7.
43. Almog N. Molecular mechanisms underlying tumor dormancy. *Cancer letters*. 2010 Aug 28;294(2):139-46.

44. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews Cancer*. 2003 Jun;3(6):401-10.
45. Leek RD, Landers RJ, Harris AL, Lewis CE. Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *British journal of cancer*. 1999 Feb;79(5-6):991-5.
46. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2004 Jun 3;350(23):2335-42.
47. Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine*. 2006 Dec 14;355(24):2542-50.
48. Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, Ravaud A, Bracarda S, Szczylik C, et al. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet*. 2007 Dec 22;370(9605):2103-11.
49. Burger RA, Brady MF, Bookman MA, Fleming GF, Monk BJ, Huang H, et al. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *The New England journal of medicine*. 2011 Dec 29;365(26):2473-83.
50. Simons M, Bonow RO, Chronos NA, Cohen DJ, Giordano FJ, Hammond HK, et al. Clinical trials in coronary angiogenesis: issues, problems, consensus: An expert panel summary. *Circulation*. 2000 Sep 12;102(11):E73-86.
51. Folkman J. Angiogenic therapy of the human heart. *Circulation*. 1998 Feb 24;97(7):628-9.
52. Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, Asahara T, et al. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet*. 1996 Aug 10;348(9024):370-4.

53. Schumacher B, Pecher P, von Specht BU, Stegmann T. Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors: first clinical results of a new treatment of coronary heart disease. *Circulation*. 1998 Feb 24;97(7):645-50.
54. Stegmann TJ, Hoppert T, Schneider A, Gemeinhardt S, Kocher M, Ibing R, et al. [Induction of myocardial neoangiogenesis by human growth factors. A new therapeutic approach in coronary heart disease]. *Herz*. 2000 Sep;25(6):589-99. Induktion der myokardialen Neoangiogenese durch humane Wachstumsfaktoren. Ein neuer Therapieansatz bei koronarer Herzkrankheit.
55. Hayden EC. Cutting off cancer's supply lines. *Nature*. 2009 Apr 9;458(7239):686-7.
56. Folkman J. Harrison's Textbook of Internal Medicine- Angiogenesis. Braunwald E FA, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL,, editor: McGraw-Hill; 2001. 517-30 p.
57. Leonard EF, Jorgensen SB. The analysis of convection and diffusion in capillary beds. *Annual review of biophysics and bioengineering*. 1974;3(0):293-339.
58. Kampfer H, Pfeilschifter J, Frank S. Expressional regulation of angiopoietin-1 and -2 and the tie-1 and -2 receptor tyrosine kinases during cutaneous wound healing: a comparative study of normal and impaired repair. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2001 Mar;81(3):361-73.
59. Gaetgens P. Das Kreislaufsystem. *Lehrbuch der Physiologie*. 2. Stuttgart: R Klinker, S. Silbernagel; 1996. p. 141-84.
60. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature medicine*. 2000 Apr;6(4):389-95.
61. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *The New England journal of medicine*. 1999 Sep 2;341(10):738-46.

62. Hunt TK. The physiology of wound healing. *Annals of emergency medicine*. 1988 Dec;17(12):1265-73.
63. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature medicine*. 1999 Jun;5(6):623-8.
64. Aronson J. Temporal and spatial increases in blood flow during distraction osteogenesis. *Clinical orthopaedics and related research*. 1994 Apr(301):124-31.
65. Pruneri G, Ponzoni M, Ferreri AJ, Decarli N, Tresoldi M, Raggi F, et al. Microvessel density, a surrogate marker of angiogenesis, is significantly related to survival in multiple myeloma patients. *British journal of haematology*. 2002 Sep;118(3):817-20.
66. Kvasnicka HM, Thiele J. Bone marrow angiogenesis: methods of quantification and changes evolving in chronic myeloproliferative disorders. *Histology and histopathology*. 2004 Oct;19(4):1245-60.
67. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP, Gion M, et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer*. 2002 Aug;38(12):1564-79.
68. Debergh I, Van Damme N, Pattyn P, Peeters M, Ceelen WP. The low-molecular-weight heparin, nadroparin, inhibits tumour angiogenesis in a rodent dorsal skinfold chamber model. *British journal of cancer*. 2010 Mar 2;102(5):837-43.
69. Klenke FM, Merkle T, Fellenberg J, Abdollahi A, Huber PE, Gebhard MM, et al. A novel model for the investigation of orthotopically growing primary and secondary bone tumours using intravital microscopy. *Laboratory animals*. 2005 Oct;39(4):377-83.

70. Klenke FM, Gebhard MM, Ewerbeck V, Abdollahi A, Huber PE, Sckell A. The selective Cox-2 inhibitor Celecoxib suppresses angiogenesis and growth of secondary bone tumors: an intravital microscopy study in mice. *BMC cancer*. 2006;6:9.
71. Holstein JH, Becker SC, Fiedler M, Scheuer C, Garcia P, Histing T, et al. Exercise enhances angiogenesis during bone defect healing in mice. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2011 Jul;29(7):1086-92.
72. Holstein JH, Becker SC, Fiedler M, Garcia P, Histing T, Klein M, et al. Intravital microscopic studies of angiogenesis during bone defect healing in mice calvaria. *Injury*. 2011 Aug;42(8):765-71.
73. Laschke MW, Mussawy H, Schuler S, Eglin D, Alini M, Menger MD. Promoting external inosculation of prevascularised tissue constructs by pre-cultivation in an angiogenic extracellular matrix. *European cells & materials*. 2010;20:356-66.
74. Laschke MW, Mussawy H, Schuler S, Kazakov A, Rucker M, Eglin D, et al. Short-term cultivation of in situ prevascularized tissue constructs accelerates inosculation of their preformed microvascular networks after implantation into the host tissue. *Tissue engineering Part A*. 2011 Mar;17(5-6):841-53.
75. Kaigler D, Wang Z, Horger K, Mooney DJ, Krebsbach PH. VEGF scaffolds enhance angiogenesis and bone regeneration in irradiated osseous defects. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2006 May;21(5):735-44.
76. Cackowski FC, Anderson JL, Patrene KD, Choksi RJ, Shapiro SD, Windle JJ, et al. Osteoclasts are important for bone angiogenesis. *Blood*. 2010 Jan 7;115(1):140-9.
77. Sckell A, Leunig M. The dorsal skinfold chamber: studying angiogenesis by intravital microscopy. *Methods Mol Biol*. 2009;467:305-17.

78. Yuan F, Leunig M, Berk DA, Jain RK. Microvascular permeability of albumin, vascular surface area, and vascular volume measured in human adenocarcinoma LS174T using dorsal chamber in SCID mice. *Microvascular research*. 1993 May;45(3):269-89.
79. Steinbauer M, Harris AG, Abels C, Messmer K. Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft für Chirurgie*. 2000 Jul;385(4):290-8.
80. Yuan F, Dellian M, Fukumura D, Leunig M, Berk DA, Torchilin VP, et al. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer research*. 1995 Sep 1;55(17):3752-6.
81. Bransky A, Korin N, Nemirovski Y, Dinnar U. Correlation between erythrocytes deformability and size: A study using a microchannel based cell analyzer. *Microvascular research*. 2007 Jan;73(1):7-13.
82. Klinke R. *Physiologie* 2010.
83. Lipowsky HH, Zweifach BW. Application of the "two-slit" photometric technique to the measurement of microvascular volumetric flow rates. *Microvascular research*. 1978 Jan;15(1):93-101.
84. Algenstaedt P, Schaefer C, Biermann T, Hamann A, Schwarzloh B, Greten H, et al. Microvascular alterations in diabetic mice correlate with level of hyperglycemia. *Diabetes*. 2003 Feb;52(2):542-9.
85. Schäfer C. Korrelation mikrozirkulatorischer Parameter mit dem Ausmaß der Hyperglykämie beim Onset des Diabetes mellitus – eine intravitalmikroskopische Studie in UCP1/DTA Mäusen. Hamburg 2003.

86. Hansen-Algenstaedt N, Joscheck C, Schaefer C, Lamszus K, Wolfram L, Biermann T, et al. Long-term observation reveals time-course-dependent characteristics of tumour vascularisation. *Eur J Cancer*. 2005 May;41(7):1073-85.
87. Yuan F, Salehi HA, Boucher Y, Vasthare US, Tuma RF, Jain RK. Vascular permeability and microcirculation of gliomas and mammary carcinomas transplanted in rat and mouse cranial windows. *Cancer research*. 1994 Sep 1;54(17):4564-8.
88. Leunig M, Yuan F, Menger MD, Boucher Y, Goetz AE, Messmer K, et al. Angiogenesis, microvascular architecture, microhemodynamics, and interstitial fluid pressure during early growth of human adenocarcinoma LS174T in SCID mice. *Cancer research*. 1992 Dec 1;52(23):6553-60.
89. Brizel DM, Klitzman B, Cook JM, Edwards J, Rosner G, Dewhirst MW. A comparison of tumor and normal tissue microvascular hematocrits and red cell fluxes in a rat window chamber model. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1993 Jan 15;25(2):269-76.
90. Ishikawa F, Yasukawa M, Lyons B, Yoshida S, Miyamoto T, Yoshimoto G, et al. Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor γ chain(null) mice. *Blood*. 2005 Sep 1;106(5):1565-73.
91. Andre MC, Erbacher A, Gille C, Schmauke V, Goecke B, Hohberger A, et al. Long-term human CD34+ stem cell-engrafted nonobese diabetic/SCID/IL-2R γ (null) mice show impaired CD8+ T cell maintenance and a functional arrest of immature NK cells. *J Immunol*. 2010 Sep 1;185(5):2710-20.
92. Wunderlich M, Chou FS, Link KA, Mizukawa B, Perry RL, Carroll M, et al. AML xenograft efficiency is significantly improved in NOD/SCID-IL2RG mice constitutively expressing human SCF, GM-CSF and IL-3. *Leukemia*. 2010 Oct;24(10):1785-8.
93. Diamanti P, Cox CV, Blair A. Comparison of childhood leukemia initiating cell populations in NOD/SCID and NSG mice. *Leukemia*. 2012 Feb;26(2):376-80.

94. Ledran MH, Krassowska A, Armstrong L, Dimmick I, Renstrom J, Lang R, et al. Efficient hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells on stromal cells derived from hematopoietic niches. *Cell stem cell*. 2008 Jul;3(1):85-98.
95. Stoddart CA, Maidji E, Galkina SA, Kosikova G, Rivera JM, Moreno ME, et al. Superior human leukocyte reconstitution and susceptibility to vaginal HIV transmission in humanized NOD-scid IL-2Rgamma(-/-) (NSG) BLT mice. *Virology*. 2011 Aug 15;417(1):154-60.
96. Jimenez-Diaz MB, Mulet T, Viera S, Gomez V, Garuti H, Ibanez J, et al. Improved murine model of malaria using *Plasmodium falciparum* competent strains and non-myelodepleted NOD-scid IL2Rgammanull mice engrafted with human erythrocytes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009 Oct;53(10):4533-6.
97. King M, Pearson T, Shultz LD, Leif J, Bottino R, Trucco M, et al. A new Hu-PBL model for the study of human islet alloreactivity based on NOD-scid mice bearing a targeted mutation in the IL-2 receptor gamma chain gene. *Clin Immunol*. 2008 Mar;126(3):303-14.
98. Hickey RD, Galivo F, Schug J, Brehm MA, Haft A, Wang Y, et al. Generation of islet-like cells from mouse gall bladder by direct ex vivo reprogramming. *Stem cell research*. 2013 Jul;11(1):503-15.
99. Lin TY, Li YP, Zhang H, Luo J, Goodwin N, Gao T, et al. Tumor-targeting multifunctional micelles for imaging and chemotherapy of advanced bladder cancer. *Nanomedicine*. 2013 Aug;8(8):1239-51. PubMed PMID: 23199207.
100. Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, Stenzinger A, Schillert A, Vogel V, et al. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nature biotechnology*. 2013 Jun;31(6):539-44.

101. Sartelet H, Durrieu L, Fontaine F, Nyalendo C, Haddad E. Description of a new xenograft model of metastatic neuroblastoma using NOD/SCID/IL2rg null (NSG) mice. *In vivo*. 2012 Jan-Feb;26(1):19-29.
102. Simpson-Abelson MR, Sonnenberg GF, Takita H, Yokota SJ, Conway TF, Jr., Kelleher RJ, Jr., et al. Long-term engraftment and expansion of tumor-derived memory T cells following the implantation of non-disrupted pieces of human lung tumor into NOD-scid IL2Rgamma(null) mice. *J Immunol*. 2008 May 15;180(10):7009-18.
103. Nanta R, Kumar D, Meeker D, Rodova M, Van Veldhuizen PJ, Shankar S, et al. NVP-LDE-225 (Erismodegib) inhibits epithelial-mesenchymal transition and human prostate cancer stem cell growth in NOD/SCID IL2Rgamma null mice by regulating Bmi-1 and microRNA-128. *Oncogenesis*. 2013;2:e42.
104. Foreman O, Kavirayani AM, Griffey SM, Reader R, Shultz LD. Opportunistic bacterial infections in breeding colonies of the NSG mouse strain. *Veterinary pathology*. 2011 Mar;48(2):495-9.
105. Fukumura D, Jain RK. Imaging angiogenesis and the microenvironment. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2008 Jul-Aug;116(7-8):695-715.
106. Branemark PI. Vitalof bone marrow in rabbit. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 1959;11 Supp 38:1-82.
107. McCuskey RS, McClugage SG, Younker WJ. Microscopy of living bone marrow in situ. *Blood*. 1971 Jul;38(1):87-95.
108. Albrektsson T, Albrektsson B. Microcirculation in grafted bone. A chamber technique for vital microscopy of rabbit bone transplants. *Acta orthopaedica Scandinavica*. 1978 Feb;49(1):1-7.
109. Winet H. A horizontal intravital microscope-plus-bone chamber system for observing bone microcirculation. *Microvascular research*. 1989 Jan;37(1):105-14.

110. Menger MD, Lehr HA. Scope and Perspectives of Intravital Microscopy - Bridge over from in-Vitro to in-Vivo. *Immunol Today*. 1993 Nov;14(11):519-22.
111. Levasseur JE, Wei EP, Raper AJ, Kontos AA, Patterson JL. Detailed description of a cranial window technique for acute and chronic experiments. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1975 May-Jun;6(3):308-17. PubMed PMID: 1154467.
112. Stuehmer C, Schumann P, Bormann KH, Laschke MW, Menger MD, Gellrich NC, et al. A new model for chronic in vivo analysis of the periosteal microcirculation. *Microvascular research*. 2009 Mar;77(2):104-8.
113. Rana M, von See C, Rucker M, Schumann P, Essig H, Kokemuller H, et al. Increase in periosteal angiogenesis through heat shock conditioning. *Head & face medicine*. 2011;7:22.
114. Schaefer C, Krause M, Fuhrhop I, Schroeder M, Algenstaedt P, Fiedler W, et al. Time-course-dependent microvascular alterations in a model of myeloid leukemia in vivo. *Leukemia*. 2008 Jan;22(1):59-65.
115. Algire G. An adaption of the transparent chamber technique to the mouse. *Journal of the National Cancer Institute*. 1943;4(1):1-11.
116. Hobbs JB, Chusilp S, Hua A, Kincaid-Smith P, McIver MA. The pathogenesis of hypertensive vascular changes in the rat: microscopic and ultrastructural correlation in vivo. *Clinical science and molecular medicine Supplement*. 1976 Dec;3:73s-5s.
117. Endrich B, Asaishi K, Gotz A, Messmer K. Technical report--a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Research in experimental medicine Zeitschrift fur die gesamte experimentelle Medizin einschliesslich experimenteller Chirurgie*. 1980;177(2):125-34.

118. Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K. Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *The American journal of pathology*. 1993 Oct;143(4):1055-62.
119. Reed MW, Miller FN. Importance of light dose in fluorescent microscopy. *Microvascular research*. 1988 Jul;36(1):104-7.
120. Saetzler RK, Jallo J, Lehr HA, Philips CM, Vasthare U, Arfors KE, et al. Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1997 Apr;45(4):505-13.
121. Friesenecker B, Tsai AG, Instaglietta M. Capillary perfusion during ischemia-reperfusion in subcutaneous connective tissue and skin muscle. *The American journal of physiology*. 1994 Dec;267(6 Pt 2):H2204-12.
122. Valentin S, Rudolph J, Goertz O, Botteck N, Langer S, Schneider S. Effect of fenofibrate on microcirculation and wound healing in healthy and diabetic mice. *European journal of medical research*. 2009;14:65-70.
123. Mangialardi G, Katare R, Oikawa A, Meloni M, Reni C, Emanuelli C, et al. Diabetes causes bone marrow endothelial barrier dysfunction by activation of the RhoA-Rho-associated kinase signaling pathway. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2013 Mar;33(3):555-64.
124. Tavassol F, Kampmann A, Schumann P, Lindhorst D, Kokemuller H, Essig H, et al. A novel approach for studying microcirculation in bone defects by intravital fluorescence microscopy. *Tissue engineering Part C, Methods*. 2011 Dec;17(12):1151-9.
125. Oikawa A, Siragusa M, Quaini F, Mangialardi G, Katare RG, Caporali A, et al. Diabetes mellitus induces bone marrow microangiopathy. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010 Mar;30(3):498-508.

126. Sinikovic B, Schumann P, Winkler M, Kuestermeyer J, Tavassol F, von See C, et al. Calvaria bone chamber--a new model for intravital assessment of osseous angiogenesis. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2011 Nov;99(2):151-7.
127. Chung UI, Kawaguchi H, Takato T, Nakamura K. Distinct osteogenic mechanisms of bones of distinct origins. *Journal of orthopaedic science : official journal of the Japanese Orthopaedic Association*. 2004;9(4):410-4.
128. Monsky WL, Mouta Carreira C, Tsuzuki Y, Gohongi T, Fukumura D, Jain RK. Role of host microenvironment in angiogenesis and microvascular functions in human breast cancer xenografts: mammary fat pad versus cranial tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2002 Apr;8(4):1008-13.
129. Heistad DD, Abboud FM. Factors That Influence Blood-Flow in Skeletal-Muscle and Skin. *Anesthesiology*. 1974;41(2):139-56.
130. Nolte D, Hecht R, Schmid P, Botzlar A, Menger MD, Neumueller C, et al. Role of Mac-1 and ICAM-1 in ischemia-reperfusion injury in a microcirculation model of BALB/C mice. *The American journal of physiology*. 1994 Oct;267(4 Pt 2):H1320-8.
131. Schaefer C, Biermann T, Schroeder M, Fuhrhop I, Niemeier A, Ruther W, et al. Early microvascular complications of prediabetes in mice with impaired glucose tolerance and dyslipidemia. *Acta diabetologica*. 2010 Dec;47 Suppl 1:19-27.
132. Cheung AT, Perez RV, Chen PC. Improvements in diabetic microangiopathy after successful simultaneous pancreas-kidney transplantation: a computer-assisted intravital microscopy study on the conjunctival microcirculation. *Transplantation*. 1999 Oct 15;68(7):927-32.
133. Cheung AT, Ramanujam S, Greer DA, Kumagai LF, Aoki TT. Microvascular abnormalities in the bulbar conjunctiva of patients with type 2 diabetes mellitus. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*. 2001 Sep-Oct;7(5):358-63.

134. Fukumura D, Yuan F, Monsky WL, Chen Y, Jain RK. Effect of host microenvironment on the microcirculation of human colon adenocarcinoma. *The American journal of pathology*. 1997 Sep;151(3):679-88.
135. Ring A, Langer S, Tilkorn D, Goertz O, Henrich L, Stricker I, et al. Induction of angiogenesis and neovascularization in adjacent tissue of plasma-collagen-coated silicone implants. *Eplasty*. 2010;10.
136. Vajkoczy P, Menger MD, Vollmar B, Schilling L, Schmiedek P, Hirth KP, et al. Inhibition of tumor growth, angiogenesis, and microcirculation by the novel Flk-1 inhibitor SU5416 as assessed by intravital multi-fluorescence videomicroscopy. *Neoplasia*. 1999 Apr;1(1):31-41.

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit tatkräftig zur Seite standen.

Herrn Professor Dr. Rüter für die Überlassung des Themas.

Herrn PD Dr. Schäfer für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe wissenschaftlich tätig zu sein.

Besonderen Dank an meine Betreuer Dr. Malte Schröder und Dr. Lennart Viezens für die vorbildliche Betreuung bei dieser Dissertation.

Besonderen Dank ebenfalls an das „Laborteam“: Dr. Haider Mussawy und Herr Roland Gessler. Ohne deren stetiges Engagement der Erfolg dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und Madeleine, ohne die das Medizinstudium und diese Arbeit undenkbar gewesen wären.

10. Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

11. Anhang

11.1. Ergebnistabellen

11.1.1. Rückenhautkammer-Gruppe:

Tag	0	4	7	14	18	21	28
Körpergewicht [g]	29,0	28,8	28,25	27,08	27,42	26,42	26,50
SEM	1,10	0,98	1,00	0,92	0,73	0,77	1,01
Blutflussgeschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]		132,	120,4	119,3	120,5	107,0	115,1
SEM		10,5	8,50	6,17	9,91	6,68	6,75
BFR [$\times 10^3 \mu\text{m}^3/\text{s}$]		10,2	9,74	8,71	8,38	10,92	8,98
SEM		2,19	1,71	1,06	1,22	2,25	1,00
TPR [$\times 10^{-5} \text{ml}/\text{cm}^2\text{s}$]		39,4	35,43	33,75	31,25	31,83	34,43
SEM		7,70	5,84	4,99	3,09	5,18	4,19
Vessel density [cm/cm^2]		374,	398,4	359,4	385,8	334,9	354,3
SEM		23,8	25,75	33,00	31,89	29,99	33,50
Durchmesser [μm]		8,47	8,11	8,27	8,45	8,99	8,66
SEM		0,53	0,27	0,41	0,64	0,58	0,54
Permeabilität [$\times 10^{-3} \text{cm/s}$]		4,26	5,33	3,67	4,57	5,28	3,85
SEM		0,47	0,92	0,22	0,59	0,66	0,25

11.1.2. Femur Window-Gruppe

Tag	0	7	14	21	28
Körpergewicht [g]	32,62	29,15	29,38	28,46	28,85
SEM	0,81	0,81	0,56	0,71	0,81
Blutflussgeschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]		116,96	135,32	127,91	122,22
SEM		6,46	5,82	4,51	10,93
BFR [$\times 10^3 \mu\text{m}^3/\text{s}$]		14,80	18,95	19,46	25,10
SEM		2,13	2,35	2,24	3,62
TPR [$\times 10^{-5} \text{ml}/\text{cm}^2\text{s}$]		34,30	43,51	41,30	44,26
SEM		3,92	4,28	6,15	7,02
Vessel density [cm/cm^2]		135,23	160,91	147,43	126,57
SEM		12,70	7,82	11,01	12,88
Durchmesser [μm]		11,74	11,96	12,89	14,91
SEM		0,57	0,64	0,82	1,02
Permeabilität [$\times 10^{-3} \text{cm/s}$]		5,78	6,13	6,13	6,39
SEM		0,45	0,48	0,59	0,55

12. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift:

Gerrit Hauenherm