

Aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
Direktor Prof. Dr. Wolfgang Rüther

**Korrelation mikrozirkulatorischer Parameter  
mit dem Ausmaß der Hyperglykämie  
beim Onset des Diabetes mellitus  
– eine intravitalmikroskopische Studie in  
UCP1/DTA Mäusen**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin

Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Christian Schäfer  
aus Bremen

Hamburg, 2003

---

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am: 19.09.2003

Veröffentlicht mit der Genehmigung des Fachbereichs Medizin  
der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. med. W. Rüter

Prüfungsausschuss 2. Gutachter/in: PD Dr. med. S. Ergün

Prüfungsausschuss 3. Gutachter/in: Prof. Dr. med. E. Windler

---

---

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1 EPIDEMIOLOGIE DES DIABETES MELLITUS</b> .....	<b>5</b>
<b>1.2 DIABETES MELLITUS TYP 2 UND ASSOZIIERTES METABOLISCHES SYNDROM</b> .....	<b>6</b>
<b>1.3 BEDEUTUNG DER MIKROZIRKULATION UND DIABETES MELLITUS ASSOZIIERTE MIKROANGIOPATHISCHE VERÄNDERUNGEN</b> .....	<b>7</b>
<b>1.4 TIERMODELLE DES DIABETES MELLITUS</b> .....	<b>9</b>
<b>1.5 ZIELE DER ARBEIT</b> .....	<b>13</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1 VERSUCHSTIERE</b> .....	<b>14</b>
<b>2.2 BIOMETRISCHE PLANUNG</b> .....	<b>15</b>
<b>2.3 METABOLISCHE PARAMETER</b> .....	<b>17</b>
2.3.1 Gewicht, Temperatur und Blutglukose .....	17
2.3.2 Glukose-Toleranz-Test.....	17
2.3.4 Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) .....	17
<b>2.4 MIKROZIRKULATORISCHE PARAMETER</b> .....	<b>18</b>
2.4.1 Rückenhautkammerimplantation .....	18
2.4.2 Intravitalmikroskopie .....	21
2.4.3 Gefäßdurchmesser, Funktionelle Gefäßdichte, Blutflussgeschwindigkeit ( $V_{\text{mean}}$ ), Blutflussrate (BFR) .....	22
2.4.4 Gefäßpermeabilität und Volumen-Oberflächen-Verhältnis.....	26
2.4.5 Leukozyten-Endothel-Interaktionen (LEI) und Scherrate .....	29
<b>2.5 STATISTISCHE AUSWERTUNG</b> .....	<b>32</b>
<b>3. ERGEBNISSE</b> .....	<b>33</b>
<b>3.1 METABOLISCHE PARAMETER</b> .....	<b>33</b>
3.1.1 Körpertemperatur .....	33
3.1.2 Körpergewicht.....	33
3.1.3 Blutglukose und Glukose-Toleranz-Test (GGT) .....	33
3.1.4 Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) im Serum .....	34
<b>3.2 MIKROZIRKULATORISCHE PARAMETER</b> .....	<b>35</b>
3.2.1 Mikrovaskuläre Permeabilität .....	35
3.2.2 Funktionelle Gefäßdichte und mittlerer Gefäßdurchmesser .....	35
3.2.3 Blutflußrate (BFR) und Blutflussgeschwindigkeit ( $V_{\text{mean}}$ ) .....	36
3.2.4 Leukozyten-Endothel-Interaktionen (LEI).....	36

---

---

<b>4. DISKUSSION DER ERGEBNISSE.....</b>	<b>38</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>46</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>47</b>
<b>7. DANKSAGUNG .....</b>	<b>57</b>
<b>8. CURRICULUM VITAE .....</b>	<b>58</b>
<b>9. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....</b>	<b>60</b>
<b>10. ANHANG ZU DEN ERGEBNISSEN .....</b>	<b>61</b>

---

# **1. Einleitung**

## **1.1 Epidemiologie des Diabetes mellitus**

Der Diabetes mellitus (DM) ist ein Sammelbegriff für heterogene Störungen des Stoffwechsels, die mit einer chronischen Hyperglykämie einhergehen. Die Ursache des DM ist eine gestörte Insulinsekretion und/oder eine gestörte Insulinwirkung, die zu einem absoluten oder relativen Insulinmangel führt (1). Der DM weist eine hohe Prävalenz in den Industrienationen auf. In Deutschland ist die Zahl der Erkrankten seit 1960 von etwa 0,3 Millionen Menschen progredient auf 3,5 Millionen 1990 und 4,5 Millionen Menschen 2002 angestiegen (2). Die Inzidenz steigt exponentiell mit dem Alter an und verdoppelt sich zwischen dem 40 und 80 Lebensjahr alle 10 Jahre bei Männern und alle 9 Jahre bei Frauen (3). Der relative Anteil des Typ 2-Diabetes an der Gesamtprävalenz des DM beträgt etwa 90% und stellt damit die Mehrheit dar (2, 4). Die Lebenserwartung von Diabetikern ist im Vergleich zur restlichen Bevölkerung um bis zu einem Drittel reduziert, wobei die Mortalität und Morbidität in jeder Altersstufe deutlich erhöht ist (5, 6). Dies begründet sich vor allem in der hohen Rate an mikro- und makroangiopathischen Komplikationen, die mit ansteigender Erkrankungsdauer zunimmt (7). So führt der Diabetes Mellitus zu einer Inzidenzerhöhung von Myokardinfarkten und peripheren arteriellen Verschlusskrankheiten (pAVK) auf das doppelte respektive fünffache (8). Häufig muß retrospektiv nach Myokardinfarkten die Erstdiagnose Diabetes mellitus gestellt werden (9), wobei die Prognose des Myokardinfarktes nach revaskularisierenden Maßnahmen (Lyse, Angioplastie) aufgrund der distalen, mikroangiopathischen Komponente verschlechtert ist (10). Eine pAVK ist in 15,9% der Diabetiker nachweisbar und führt bei Diabetikern zu einer 33 bis 44 fachen Erhöhung des Risikos einer Amputation (11, 12). Bei 66-76% aller Amputierten mit fehlender traumatischer Genese ist ein Diabetes nachweisbar (13, 14). Beim Diabetes mellitus konnte eine hohe Prävalenz von Mikroangiopathien gezeigt werden (15, 16). Bei Diagnosestellung weisen viele Typ 2 Diabetiker bereits Angiopathien mit konsekutiven Organerkrankungen auf. Die Folgen der mikroangiopathischen Veränderungen betreffen in besonderem Maße vor allem die Niere, das Auge und die peripheren Nerven (17). Aus der diabetischen

---

Nephropathie (Glomerulosklerose Kimmelstiel-Wilson) resultieren annähernd 30-50% der Dialysepflichtigen Patienten in Deutschland (18, 19). Dies entspricht etwa 9.000-15.000 Patienten pro Jahr, wobei 21% der Typ 1 und 11% der Typ 2 Diabetiker an nephrologischen Komplikationen versterben (20). Die diabetische Retinopathie ist mit einer Inzidenz von etwa 2,1-3,2 Erblindungen/100.000 pro Jahr die häufigste Erblindungsursache in Deutschland bei Menschen unter 65 Jahren und die zweithäufigste insgesamt (27% aller Erblindungen) (21-24). Aus den genannten Komplikationen ergeben sich nicht nur häufigere sondern auch längere Krankenhausaufenthalte im Vergleich zur Restbevölkerung (25, 26). Die Mortalität während stationärer Aufenthalte zeigt sich bei Diabetikern vor allem durch kardiovaskuläre und nephrologische Komplikationen sowie einer 4fach größeren Infektionsrate erhöht (26).

## **1.2 Diabetes mellitus Typ 2 und assoziiertes metabolisches Syndrom**

Der Diabetes mellitus Typ 2 ist charakterisiert durch einen schleichenden, meist symptomlosen Beginn im mittleren bis höheren Erwachsenenalter. Als Ursachen werden ein multifaktorielles Zusammenspiel aus polygener Prädisposition und Umwelteinflüssen angenommen. Die Patienten bieten dabei oft das Bild des metabolischen Syndroms mit Adipositas, Hyperglykämie, Insulinresistenz mit Hyperinsulinämie, Hypertonie und Dyslipidämie (1, 4). Die Diagnose wird vielfach zufällig im Rahmen einer Routineuntersuchung oder stationären Einweisung gestellt, wobei nach der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (DDG) eine Nüchterblutglukose  $>110\text{mg/dl}$  im kapillären Vollblut bzw. ein 2h-Glukosewert  $>200\text{mg/dl}$  im Verlauf eines oralen Glukosetoleranztestes (OGTT) als Kriterien zur Diagnosestellung eines DM genannt werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl die Nüchternblutglukose, als auch der 2h-OGTT-Wert mit der Diabetes assoziierten erhöhten Mortalität korreliert waren (27).

---

### **1.3 Bedeutung der Mikrozirkulation und Diabetes mellitus assoziierte mikroangiopathische Veränderungen**

Die Mikrozirkulation, definiert als der Anteil der Blutgefäße, der Arteriolen, Venolen und Kapillaren umfasst, nimmt im Rahmen des Stoffwechsels auf Grund der großen Oberfläche von mehr als 1.000 m<sup>2</sup> eine zentrale Rolle für das metabolische Umfeld ein (28). Bedingt durch die ca. 800fache Vergrößerung der Gesamtquerschnittsfläche im Kapillarnett, verglichen mit der Aorta, sinkt die aortale Strömungsgeschwindigkeit des Blutes von 300 mm/s auf ca. 0,3mm/s in den Kapillaren (29). Durch die Verlangsamung des Blutstroms und der großen Oberfläche ist in der Mikrozirkulation die Kontaktzeit des Blutes mit der Gefäßwand am längsten und ermöglicht den Substrat- und Zellaustausch zwischen Blut und Interstitium. Der Stoff- und Gasaustausch findet in erster Linie durch Diffusion, d.h. Wanderung entlang eines Konzentrationsgefälles und Konvektion, d.h. mit dem Flüssigkeitsstrom statt (30). Dabei hängt die Art des Substrattransportes hauptsächlich von seiner Größe, seiner Lipidlöslichkeit, seiner Ladung und dem Ort des Austausches ab (31-33). Die Kapillaren der meisten Organe (Ausnahmen z.B. Gehirn, Hoden) sind frei permeabel gegenüber Wasser und Molekülen bis zu einer Größe von 2nm, was Plasmaproteine ausschließt (34, 35). Die morphologischen Äquivalente zu den physiologisch ermittelten Porengrößen sind nach wie vor Gegenstand der Diskussion (36).

Aus dem Zusammenhang von Gefäßoberfläche, Gewebsperfusion und Gefäßdurchlässigkeit, sowie der Rolle des Endothels im Rahmen der zellulären Immunabwehr wird deutlich, dass Veränderungen eines oder mehrerer Parameter zu einer empfindlichen Störung des mikrovaskulären Gleichgewichts führen und konsekutiv zu gravieren Veränderungen des mikrovaskulären metabolischen Umfeldes. Verringerungen der Gefäßdichte bewirken eine Einschränkung der Substrataustauschfläche und über eine konsekutive Verlängerung der Diffusionsstrecke eine Verlangsamung des Stoffaustausches bis zum Erliegen desselben, da beispielsweise die mittlere Diffusionsstrecke von Sauerstoff zwischen 100-200µm liegt (28). Eine Reduktion der mikrovaskulären Gefäßdichte wurde bereits im diabetischen Modell beschrieben (37). Eine Erhöhung der Gefäßdichte im Zuge einer Neovaskularisation führt im Rahmen der diabetischen Retinopathie zu Blutungen und Amotio retinae (38). Auch außerhalb des Auges

---

wurden mehrfach Erhöhungen der Gefäßdicke beim diabetischen Patienten und Modell beschrieben (39, 40). Verlangsamungen der Blutflussgeschwindigkeit führen zu einer Verlängerung der Kontaktzeit über das physiologische Maß hinaus und zu einem früheren Erreichen des Stoffaustauschäquilibriums (41). Auch dies kann zu einer Verringerung des Substratangebotes und –abtransportes führen. Die Blutflussgeschwindigkeit hängt einerseits vom Gefäßdurchmesser und der Blutdruckdifferenz über das Gefäßbett ab und weiterhin von der Viskosität des Blutes (41). Im diabetischen Modell und bei diabetischen Patienten ist eine Verringerung der mikrovaskulären Blutflussgeschwindigkeit und Perfusion beschrieben worden (40, 42). Veränderungen der Permeabilität des Endothels gegenüber Molekülen führt über interstitielle Druckveränderungen zu Alterationen im Stoffaustausch, wie am Beispiel von malignen Neoplasien gezeigt werden konnte (43). Besonders in Organen mit fehlendem Lymphsystem, wie z.B. dem Auge, bewirkt eine Permeabilitätssteigerung eine chronische interstitielle Druckerhöhung mit Ödem. Aus mikrovaskulärer Permeabilitätserhöhung zusammen mit Neovaskularisationen im Kammerwinkel (Rubeosis iridis) resultiert beim Diabetiker und im diabetischen Modell eine Schädigung von Retina und Nervus opticus im Rahmen eines sekundären Glaukoms (38, 44). Abweichungen der Permeabilität können weiterhin unphysiologische onkotische Drücke im Gefäß verursachen und somit eine Viskositätsänderung des Blutes bewirken. Auf Grund ihrer Bedeutung für die Scherrate des Blutstroms im Gefäß haben die Viskosität des Blutes, die Blutflussgeschwindigkeit und der Gefäßdurchmesser entscheidenden Einfluss auf die Leukozyten-Endothel-Interaktionen und den Austausch von Leukozyten zwischen Blut und Interstitium (45). Beim Diabetes mellitus sind vermehrte Leukozytensequestrationen in der Mikrozirkulation beschrieben worden (40, 46-49). Aus einem Defizit oder Übermaß an Leukozyten im Gewebe kann eine schwere Störung der Gewebshomöostase folgen, wie am Beispiel der Wundheilung gezeigt werden konnte (50-52).

Funktionelle Veränderungen der Mikrozirkulation gehen den morphologischen Veränderungen voraus und prägen somit bedeutend die Gefäßmorphologie (53). Aus dem oben Genannten resultiert, dass die Eigenschaften der Mikrozirkulation nicht nur den Substrattransport beeinflussen, 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 inflammatorischen Vorgängen vermitteln (54-58). Die komplexen Interaktionen unterstreichen die Bedeutung, ein möglichst umfassendes Bild aller mikrovaskulärer Parameter zu erreichen, um so die Alterationen einzelner Parameter gewichten zu können.

Als ursächlich für die funktionellen und morphologischen Alterationen der Gefäßeigenschaften beim Diabetiker und im diabetischen Modell wurden vorwiegend advanced glycation end products (AGE) und die Hyperglykämie angeführt (59, 60). Die oben beschriebenen Veränderungen der Mikrozirkulation treten sequentiell auf, beginnend mit funktionellen Dysfunktionen, wie der Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität und der Sequestration von Leukozyten in der Mikrozirkulation, die im Tiermodell schon nach einer wenige Stunden andauernden Hyperglykämie beobachtet werden konnte (44, 47). Morphologische Alterationen, wie veränderte Gefäßdurchmesser und Gefäßdichten treten erst später auf, wobei die minimale Dauer einer diabetischen Stoffwechsellage, um morphologische Veränderungen zu bewirken, noch nicht geklärt ist (40, 42).

Zusammenfassend ist der pathophysiologische Zusammenhang zwischen Stoffwechselfdysregulation und mikrovaskulären Angiopathien nach wie vor nicht ausreichend geklärt. Die Gefäßveränderungen während der diabetischen Erkrankung wurden in vielen Studien nur partiell beleuchtet, da keine umfassende Erhebung aller, die Mikrozirkulation charakterisierenden, Parameter durchgeführt wurde. Auch der Zusammenhang zwischen Ausmaß der diabetischen Stoffwechsellage und der konsekutiven Gefäßalterationen verbleiben weitgehend unklar.

## **1.4 Tiermodelle des Diabetes Mellitus**

Die Untersuchung der mikrovaskulären Veränderungen im Rahmen der diabetischen Krankheit gestaltet sich auf Grund des invasiven Charakters der Untersuchungen beim Patienten schwierig und ist vorwiegend auf ophthalmoskopische Fundusuntersuchungen, bioptische und postmortale Histologie begrenzt. Die Forschung an geeigneten Tiermodellen stellt damit die einzige

---

Möglichkeit dar, weitergehende Untersuchungen zur diabetischen Mikroangiopathie durchzuführen. Es sind derzeit viele Tiermodelle beschrieben, die sich zur Untersuchung des Diabetes mellitus eignen.

Die Applikation von Streptozotocin ist die am häufigsten beschriebene Methode zur Induktion eines Diabetes (61). Bevorzugt werden dabei Nager, wie Mäuse und Ratten, verwendet. Bei dieser Methode entwickeln die Tiere einen Diabetes auf dem Boden einer Insulinitis, die durch eine Autoimmunreaktion gegenüber  $\beta$ -Zellen des Pankreas ausgelöst wird (62). Die Tiere sind durch eine schwere Hyperglykämie bei einer Insulindefizienz in Pankreas und Plasma charakterisiert (63). Damit bietet dieses Modell Parallelen zum insulin-dependent Diabetes mellitus (Typ 1) im Menschen (64).

Eine vergleichbare Methode ist die Applikation von Alloxan, das ein potenter Generator von Sauerstoffradikalen ist, wobei die genaue Vermittlung der beta-Zell-Toxizität noch unklar ist (65). Beide oben genannten Modelle weisen somit ein Fehlen der typischen sequentiellen Entwicklung eines Diabetes im Rahmen eines metabolischen Syndroms auf und eignen sich demzufolge nicht für Studien zur Pathophysiologie des Typ 2 Diabetes mellitus.

Zur Simulation des Typ 2 Diabetes bzw. genetischer Adipositas Syndrome des Menschen stehen genetisch alterierte Maus- und Rattenmodelle, z.B. ob/ob, db/db, fa/fa zur Verfügung. Die ob/ob Mäuse weisen eine Punktmutation des Leptin-Gens auf Chromosom 6 auf und entwickeln aufgrund des Leptinmangels eine Hyperphagie mit konsekutiver Adipositas. Das db/db Mausmodell und das fa/fa Rattenmodell (Zucker-fatty rat) weisen eine Mutation auf dem Gen des Leptinrezeptors (Mäuse: Chromosom 4 / Ratten: Chromosom 5) auf, welches zu einer Reduktion der Leptinwirkung führt (66). Auch diese Tiere sind durch eine Hyperphagie mit konsekutiver Adipositas, eine Hyperglykämie bei Hyperinsulinämie und eine Dyslipidämie charakterisiert (66-68). Die oben genannten Tiermodelle des Typ 2 Diabetes weisen jedoch bedingt durch die genetische Alteration deutliche Unterschiede zum Typ 2 DM des Menschen auf. Es konnte eine signifikante Störung in der hypothalamisch-hypophysären Achse gezeigt werden (69). Daraus resultieren Sekretionsstörungen hypothalamischer Hormone und z.T. Aufhebung des normalen Tagessekretionsmusters. Es wurden, divergierend zum Typ 2 Diabetiker, Erhöhungen der

---

Plasmaglukokortikoidspiegel, ein eingeschränktes Längenwachstum, eine verminderte Fertilität und eine Verringerung des Körpergesamtproteins gefunden (67, 70-72).

In dieser Studie wurde mit den „uncoupling promoter-driven diphtheria toxin a-chain mice“ (UCP1/DTA) ein Modell des Typ 2 DM verwendet, das die Nachteile der oben genannten Adipositas- / Diabetes-Modelle nicht aufweist und somit dem Typ 2 Diabetes bzw. dem metabolischen Syndrom des Menschen ähnlicher ist. UCP1/DTA-Mäuse exprimieren, vom Promoter des Uncoupling-Protein-1 (UCP1) gesteuert, die A-Kette des Diphtherie-Toxins. Das Uncoupling-Protein-1 wird selektiv im braunen Fettgewebe exprimiert und ermöglicht die zitterfreie Wärmebildung (73). Die Aktivierung des braunen Fettgewebes zur zitterfreien Wärmebildung ist abhängig von der Umgebungstemperatur und steigt progressiv bei Abnahme der Umgebungstemperatur unterhalb der Thermoneutralitätsgrenze. Die Thermoneutralitätstemperatur entspricht dabei der Umgebungstemperatur von 35°C, bei der die Wärmebildung der Maus und die Umgebungstemperatur keine zusätzliche Wärmebildung notwendig macht, und somit das braune Fettgewebe nur minimal aktiviert wird (74).

Durch Exposition der UCP1/DTA-Mäuse von 24°C Umgebungstemperatur kommt es zur Expression der A-Kette des Diphtherie-Toxins und konsekutiv zu einer selektiven Ablation des braunen Fettgewebes. Dies führt zu einer verminderten Wärmebildung mit einem reduzierten Energieverbrauch. Weiterhin entwickeln die Mäuse im Alter von acht Wochen eine Hyperphagie (73, 75, 76). Die Reduktion des Energieverbrauches bei gleichzeitiger erhöhter Nahrungszufuhr führt bereits im Alter von acht Wochen zu einer Adipositas, später sequentiell gefolgt von einer Insulinresistenz, einer Hyperglykämie und einer Dyslipidämie, mit erhöhten Cholesterin- und Triglyzeridwerten im Blut.

Im Alter von 19-22 Wochen sind UCP1/DTA Mäuse charakterisiert durch eine Erhöhung des Körpergewichts von +54% (Männchen) / +75% (Weibchen) bei erhöhtem bzw. unverändertem Körpergesamtprotein. Weiterhin zeigen sie erhöhte Blutglukosespiegel von +30% und 85fach bis 125fach erhöhte Insulinwerte im Blut (73, 75). Die Mäuse weisen zu diesem Zeitpunkt einen 3fach erhöhten Triglyceridspiegel und einen 2fach erhöhten Cholesterinspiegel im Blut auf (73). Letztlich zeigen diese Mäuse eine arterielle Hypertonie (77). Da die metabolischen Alterationen sequenziell ablaufen, ist das Vollbild eines Diabetes

---

mellitus erst im Alter von 20 Wochen erreicht. Die Mäuse weisen zu diesem Zeitpunkt keine Einschränkungen der Fertilität auf.

Damit entspricht das UCP1/DTA-Modell sowohl durch die Entwicklung der Adipositas, als auch durch die nachfolgenden metabolischen Veränderungen einem metabolischen Syndrom mit konsekutiver Manifestation eines Typ 2 Diabetes mellitus und eignet sich außerordentlich zur Untersuchung der pathophysiologischen Vorgänge während der Entwicklung und Dauer der Erkrankung. Um den Onset des Diabetes mellitus Typ 2 zu simulieren und bereits frühe Veränderungen der Mikrozirkulation zu erfassen, wurden UCP1/DTA Mäuse im Alter von 20 Wochen verwendet.

---

## 1.5 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, bereits die frühen mikrovaskulären Veränderungen zum Zeitpunkt des Onset des Diabetes mellitus Typ 2 im diabetischen Modell der UCP1/DTA Mäuse zu evaluieren. Dabei wurden die Methoden so gewählt, dass eine möglichst umfassende Datenerhebung und –analyse erreicht werden konnte, um der Komplexität der Interaktionen in der Mikrozirkulation gerecht zu werden. Diese Ergebnisse sollten weiter zum noch nicht ausreichenden Verständnis der Pathophysiologie der mikrovaskulären Alterationen im Rahmen des Diabetes mellitus beitragen und mögliche neue Therapieansätze herausarbeiten. Besonderes Augenmerk sollte dabei auf die, zunehmend diskutierte, inflammatorische Komponente im Rahmen der pathophysiologischen Entwicklung mikrovaskulärer Veränderungen beim Diabetes mellitus gelegt werden. Weiterhin sollte nicht nur das Auftreten mikroangiopathischer Veränderungen erfasst, sondern auch ihr möglicher Zusammenhang mit dem Ausmaß der metabolischen Dysregulation analysiert werden, um die Bedeutung klinischer Parameter, wie z.B. der Blutglukose weiter vor dem pathophysiologischen Hintergrund zu evaluieren.

---

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Versuchstiere**

Als diabetisches Mausmodell wurden UCP1/DTA-Mäuse verwendet. UCP1/DTA-Mäuse exprimieren, vom Promoter des Uncoupling-Protein-1 (UCP1) gesteuert, die A-Kette des Diphtherie-Toxins. Das Uncoupling-Protein-1 wird selektiv im braunen Fettgewebe exprimiert und ermöglicht die zitterfreie Wärmebildung (73). Die Aktivierung des braunen Fettgewebes zur zitterfreien Wärmebildung ist abhängig von der Umgebungstemperatur und steigt progressiv bei Abnahme der Umgebungstemperatur unterhalb der Thermoneutralitätsgrenze. Die Thermoneutralitätstemperatur entspricht dabei der Umgebungstemperatur von 35°C, bei der die Wärmebildung der Maus und die Umgebungstemperatur keine zusätzliche Wärmebildung notwendig macht und somit das braune Fettgewebe nur minimal aktiviert wird (74).

Durch Exposition der UCP1/DTA-Mäuse von 24°C Umgebungstemperatur kommt es zur Expression der A-Kette des Diphtherie-Toxins und konsekutiv zu einer selektiven Ablation des braunen Fettgewebes. Dies führt zu einer verminderten Wärmebildung mit einem reduzierten Energieverbrauch. Weiterhin entwickeln die Mäuse im Alter von acht Wochen eine Hyperphagie (73, 75, 76). Die Reduktion des Energieverbrauches bei gleichzeitiger erhöhter Nahrungszufuhr führt bereits im Alter von acht Wochen zu einer Adipositas gefolgt von einer Insulinresistenz, einer Hyperglykämie und einer Dyslipidämie, mit erhöhten Cholesterin- und Triglyzeridwerten im Blut.

Im Alter von 19-22 Wochen sind UCP1/DTA Mäuse charakterisiert durch eine Erhöhung des Körpergewichts von +54% (Männchen) / +75% (Weibchen), des Blutglukosespiegels von +30% und 85fach bis 125fach erhöhte Insulinwerte im Blut (73, 75). Die Mäuse weisen zu diesem Zeitpunkt einen 3fach erhöhten Triglyzeridspiegel und einen 2fach erhöhten Cholesterinspiegel im Blut auf (73). Da die metabolischen Alterationen sequenziell ablaufen, ist das Vollbild der oben beschriebenen Parameter im Alter von 20 Wochen erreicht.

Damit entspricht das UCP1/DTA-Modell sowohl durch die Entwicklung der Adipositas, als auch durch die nachfolgenden metabolischen Veränderungen einem metabolischen Syndrom mit konsekutiver Manifestation eines Typ 2

---

Diabetes mellitus. Um den Onset des Diabetes mellitus Typ 2 zu simulieren, wurden UCP1/DTA Mäuse im Alter von 20 Wochen verwendet. Um ein geringes Maß an interindividuellen Unterschieden zu gewährleisten, wurden als Kontrollgruppe die nicht-transgenen Geschwistertiere verwendet. Die Mäuse stammen von J. S. Flier (Department of Medicine, Beth Israel Hospital, Boston, Massachusetts 02215, USA) und wurden als Eigenzucht des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf von A. Hamann (I. Abteilung für Innere Medizin, Universitätsklinikum Heidelberg) und P. Algenstaedt (Medizinische Kernklinik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) etabliert. Die Tiere wurden, nach Absetzen von der Mutter, in Einzelkäfigen bei 24°C Umgebungstemperatur und einer Luftfeuchtigkeit von 50% mit Zugang zu Futter (Nagerfutter Nummer S5714S040, Ssniff, Soest, Deutschland) und Wasser *ad libitum* gehalten.

Alle Prozeduren an den Mäusen wurden nach den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes, nach Genehmigung des Antrages zur Durchführung von Tierversuchen durch das Amt für Gesundheit in Hamburg (Nr.15/2000 Az.: G8151/591-00.33), durchgeführt.

## 2.2 Biometrische Planung

Die Messungen der mikrozirkulatorischen Gefäßparameter wurden am 6. und 9. Tag nach Implantation der Rückenhautkammer durchgeführt. Das Ausmaß der metabolischen Alteration wurde durch Messung von Blutglukosespiegel, Körpergewicht und Körperkerntemperatur über einen Zeitraum von 12 Tagen bestimmt. Am Tag der Rückenhautkammerimplantation wurde ein Glukosetoleranztest durchgeführt. Nach Abschluss der Messungen wurde das Serum zur Bestimmung von Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  asserviert (Siehe Abb. 1; S. 16).

---

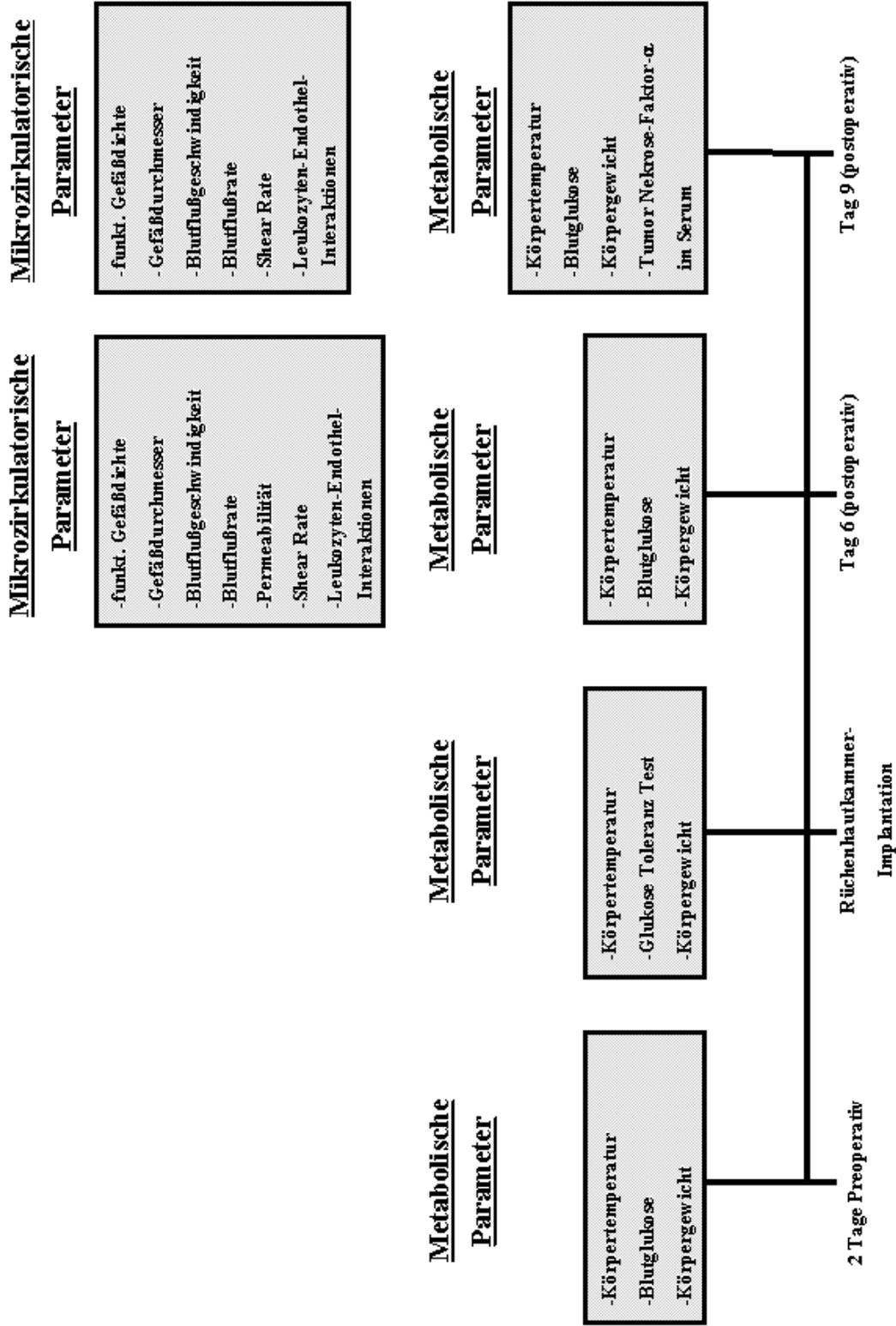


Abb. 1 Biometrische Planung zur Versuchsdurchführung

## 2.3 Metabolische Parameter

### 2.3.1 Gewicht, Temperatur und Blutglukose

Das Gewicht der Tiere wurde jeweils zwei Tage vor, am Tage der Kammerimplantation, sowie am 6. und 9. Tag *post implantationem* bestimmt (Waage Modell 936 B-2, Korona GMBH / Moringen, Deutschland). Die Körperkerntemperatur wurde rektal ermittelt (Thermalert TH-5, Physitemp / Clifton, USA). Die Vollblutglukose wurde nach der Glukose Oxidase Methode (Glukometer One Touch II, Ortho Diagnostic Systems / Neckargemünd, Deutschland) bestimmt, wobei das Blut mittels Schwanzvenenpunktion gewonnen wurde.

### 2.3.2 Glukose-Toleranz-Test

Vor Rückenhautkammerimplantation wurden die Tiere einem Glukosetoleranztest unterzogen. Nach einer Nüchternperiode von 12 Stunden wurde den Mäusen 0,01ml/g KG einer 10%igen Glukoselösung intraperitoneal appliziert (Glukose von Sigma Chemical Co. / St. Louis, USA in PBS (Phosphate buffered saline) Dulbeccos, Life Technologies LTD / Paisley, Schottland. Die Blutglukose wurde nach der Glukose Oxidase Methode zum Zeitpunkt 0, 15, 30, 60, 90 und 120 Minuten nach Glukoseapplikation bestimmt.

### 2.3.4 Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

Zur Ermittlung des Serum TNF- $\alpha$  Spiegels wurden die Mäuse am 9. Tag *post implantationem* zunächst mittels 7,5mg Ketaminhydrochlorid (Ketanest 50mg/ml, Parke-Davis GMBH / Berlin, Deutschland) und 2,5mg Xylazinhydrochlorid (Rompun 2%, Bayer Vital / Leverkusen, Deutschland) pro 100g KG anästhetisiert. Das Blut wurde durch transperitoneale Herzpunktion unter Verwendung einer heparinisierten Spritze gewonnen. Nachfolgend wurde das Blut bei 3000 U/min und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert und das Serum im Überstand gewonnen. Die Bestimmung der TNF- $\alpha$  Konzentration erfolgte unter Verwendung eines Enzyme linked immuno sorbent assays (Mouse TNF- $\alpha$ , Quantikine M, R&D Systems Inc. / Minneapolis, USA).

---

## 2.4 Mikrozirkulatorische Parameter

### 2.4.1 Rückenhautkammerimplantation

Um die Gefäßparameter nicht-invasiv, kontinuierlich *in vivo* messen zu können wurde den Mäusen eine Rückenhautkammer (Dorsal skin fold Chamber, Maschinenshop, Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA) implantiert. Die Rückenhautkammer ermöglicht eine direkte Sicht auf das subkutane Gefäßbett (43, 78-81). Die Kammer besteht aus zwei Titanrahmen, einem Glascoverslip und einem Spannring, welche zusammen ein Gewicht von 3,2 Gramm aufweisen (Abb. 2; S. 19).

Vor Implantation wurden die Mäuse mit 7,5mg Ketaminhydrochlorid (Ketanest, Parke-Davis / Berlin, Deutschland) und 2,5mg Xylazinhydrochlorid (Rompun 2%, Bayer Vital / Leverkusen, Deutschland) pro 100g KG narkotisiert. Die physiologische Körpertemperatur wurde durch Verwendung einer Wärmeplatte (Omnilab PST 100, Jürgens) gewährleistet.

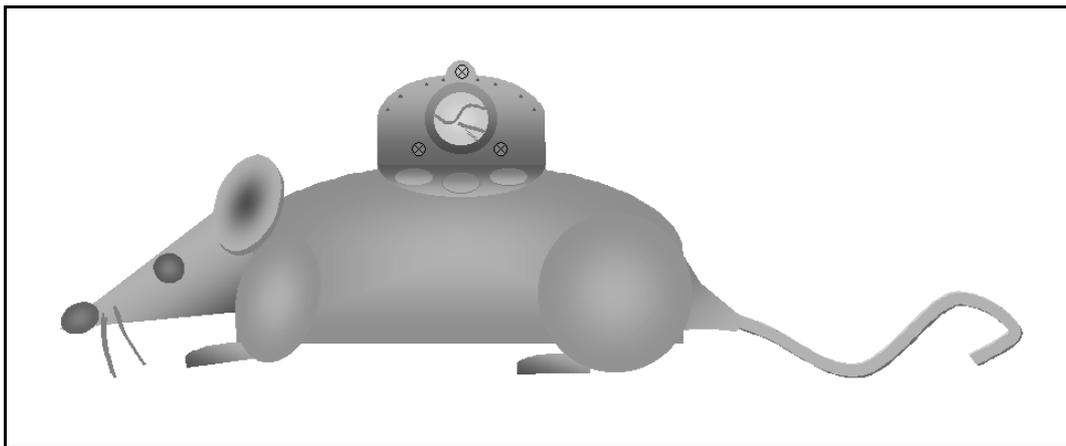
Um ein haarfreies Operationsfeld zu erhalten wurden im ersten Schritt die Haare der Rückenhaut mechanisch gekürzt (Haarschneidemaschine, BaByliss / Paris, Frankreich). Danach wurde die Rückenhaut mittels einer Depilierungscreme (Sally Hansen, Del Laboratories / USA) behandelt.

Das anschließende chirurgische Procedere wurde unter Einhaltung aseptischer Bedingungen durchgeführt. Primär wurde mit temporären Nähten (Ethibond Excel 5/0, Johnson & Johnson / Brüssel, Belgien) die Rückseite der Kammer an der Haut fixiert. Durch vorsichtige Extension wurde ein Rückenhaut-Doppellayer geschaffen, in den zwei Durchgänge für die fixierenden Schrauben präpariert wurden. Im folgenden Schritt wurde in einem Hautlayer eine kreisrunde Fläche mit ca. 15mm Durchmesser entfernt, um einen Blick auf das subkutane Gewebe der gegenüberliegenden Seite zu ermöglichen. Mikrochirurgisch wurde unter Verwendung eines stereotaktischen Mikroskops (Stemi 1000, Zeiss / Oberkochen, Deutschland) die quergestreifte Muskulatur des gegenüberliegenden Hautlayers atraumatisch bis zur Darstellung der subkutanen Gefäßschicht präpariert. Nach Abschluss der Feinpräparation wurde die zweite Hälfte der Rückenhautkammer platziert und mit den drei Schrauben der Gegenseite und vier zusätzlichen Nähten (Ethibond Excel 5/0, Johnson & Johnson / Brüssel, Belgien) fixiert. Der runde Hautdefekt wurde mit einem Glas-Coverslip bedeckt und gegen die Außenwelt

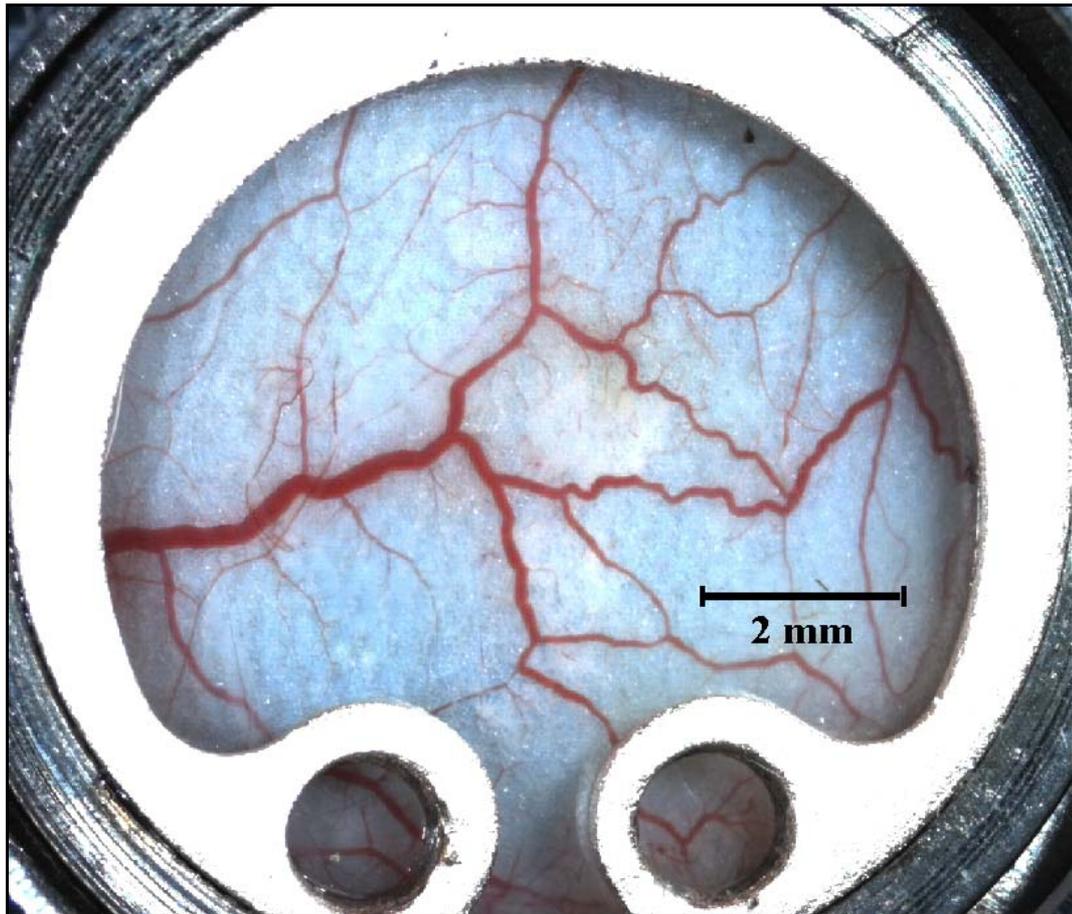
---

abgeschlossen. Die Befestigung des Glas-Coverslips wurde durch einen Spannring erreicht. Abschließend wurden die temporären Haltefäden entfernt. Die Mäuse konnten sich für sechs Tage von der Narkose und dem chirurgischen Eingriff erholen (Abb. 2; S. 19 und Abb. 3; S. 20).

Die Qualität der Rückenhautkammern wurde jeden dritten Tag nach Implantation mittels Durchlichtmikroskopie (Axioplan 2, Zeiss / Oberkochen, Deutschland) in 12,5facher Vergrößerung auf Inflammationszeichen überprüft, wobei jegliche entzündliche Veränderung als obligates Ausschlusskriterium sämtlicher Messparameter gewertet wurde. Dazu wurden die Mäuse ohne Narkose in einer, dem höheren Körpergewicht angepassten, Polyacrylatröhre mit 4cm Innendurchmesser platziert und die Rückenhautkammer auf einem Polyacrylatablett mittels einer Metallschiene fixiert, um die Eigenbewegung der Maus zu minimieren.



**Abb. 2** Schematische Darstellung der Rückenhautkammer (Dorsal skin fold chamber) nach Implantation (Tag 0). Diese Präparation ermöglicht eine direkte und kontinuierliche Beobachtung der Unterseite der gegenüberliegenden Subcutis.



**Abb. 3** Auflichtbild der Mikrozirkulation des subkutanen Gewebes direkt nach Rückenhautkammerimplantation (Tag 0, *post implantationem*).

### 2.4.2 Intravitalmikroskopie

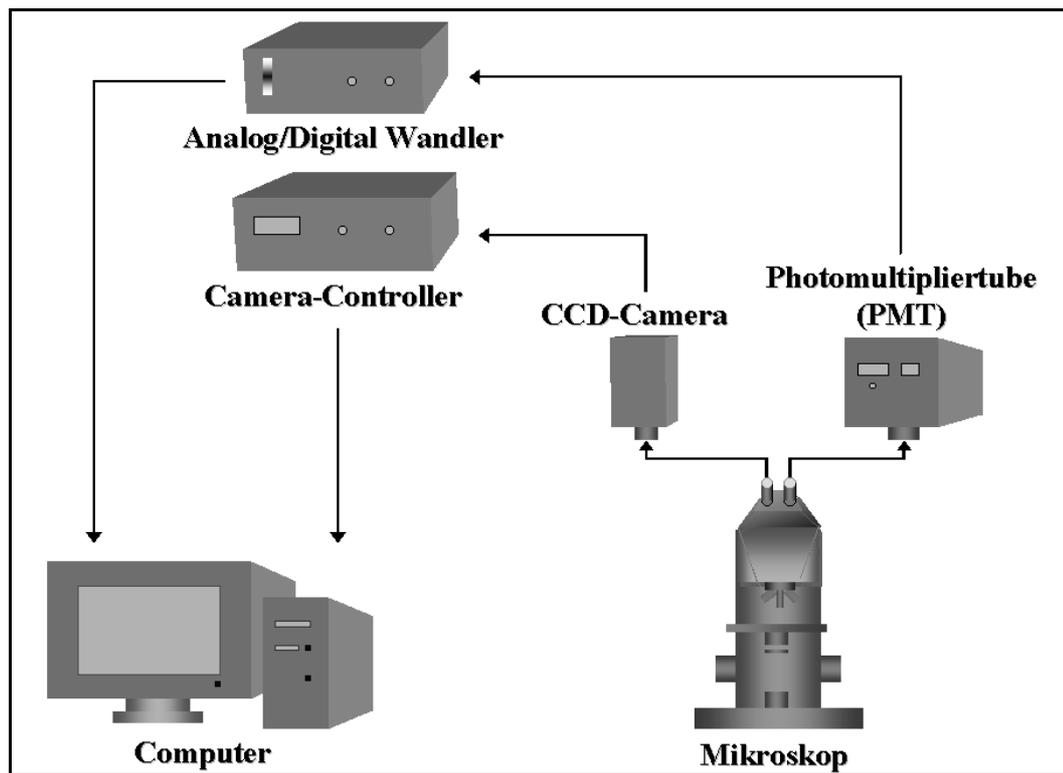
Um die mikrozirkulatorischen Parameter zu bestimmen, wurden jeweils fünf zufällig ausgewählte Gebiete der Rückenhautkammer am 6. und 9. Tag mittels der Intravitalmikroskopie untersucht.

Die Mäuse wurden wie oben beschrieben anästhesiert. Zur Applikation der Fluorochrome wurde ein intravenöser Zugang zu einer Schwanzvene geschaffen. Die Mäuse wurden in einer Polyacrylatröhre, wie oben beschrieben, fixiert. Hierdurch waren die Eigenbewegung der Rückenhautkammer während der Messung auf ein Minimum reduziert, ohne die Atmung der Maus zu behindern. Während der Messung wurde die physiologische Körpertemperatur der Mäuse mittels einer Heizmatte (Omnilab PST 100, Jürgens) erhalten.

Das Intravitalmikroskop (Axioplan 2, Zeiss / Oberkochen, Deutschland) ist mit Objektiven der Stärke 1,25x, 2,5x, 5x, 10x und einem 20x long distance Objektiv (LD Achroplan 20x/0,40, Zeiss / Oberkochen, Deutschland), Filtersets für Fluoreszeinisothiozyanat (FITC), Rhodamin-6G und Tetramethylrhodamin (TRITC) ausgerüstet. Zur Bilderfassung wurde eine intensified charge coupled device (CCD) video camera (C-2400-97, Hamamatsu Photonics / Herrsching, Deutschland) und ein Video-Controller (C2400, Hamamatsu Photonics / Herrsching, Deutschland) genutzt. Zur analogen Messung der Lichtintensität wurde eine Photomultipliertube (PMT) (R4632, Hamamatsu Photonics / Herrsching, Deutschland) verwendet und das Signal mit einem Analog-Digitalwandler (PowerLab/200, Chromaphor Analysen Technik GMBH / Duisburg, Deutschland) weiterverarbeitet. Zur unkomprimierten digitalen Aufzeichnung und weiterführender Analyse wurde ein Computer (Apple Power MacIntosh, G4, Dual 500 MHz Power PC, 1GB SDRAM) genutzt (Setup Abb. 4; S. 22).

Die Verwendung einer hochempfindlichen CCD-Camera zusammen mit einem Exzitationslicht-Reduktionsfilter (25% und 50%, Zeiss / Oberkochen, Deutschland) ermöglicht es, die Bestrahlungsintensität und Bestrahlungsdauer auf einem Minimum zu reduzieren, um phototoxische Schäden des Gewebes zu vermeiden (78, 82).

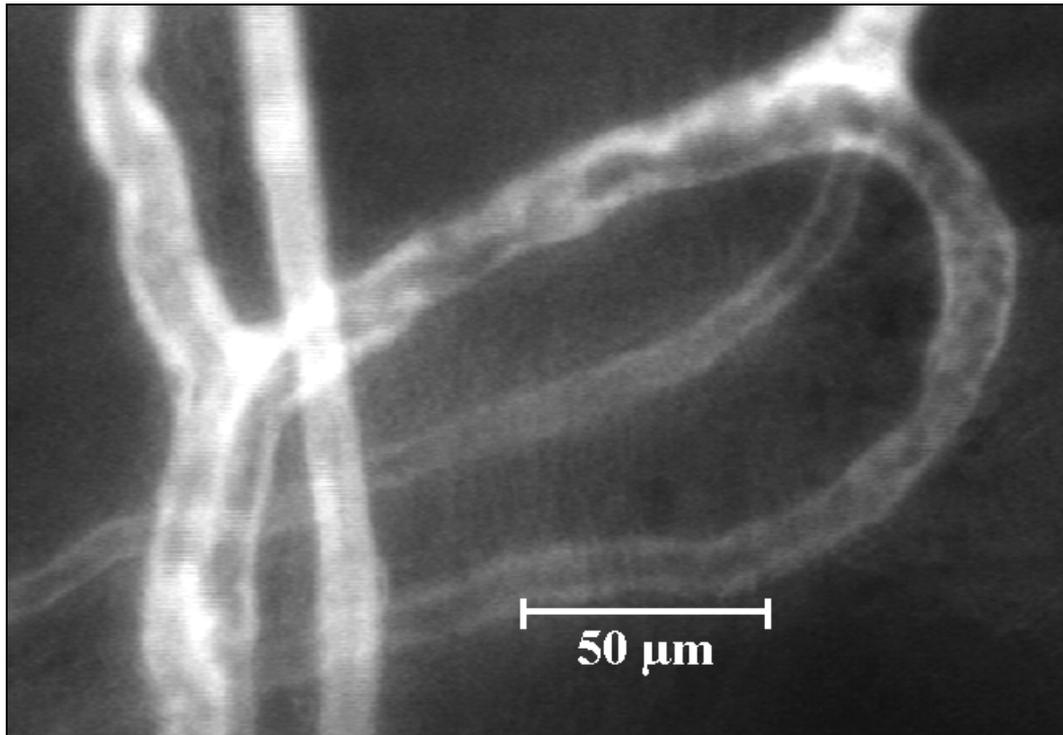
---



**Abb. 4** Intravitalmikroskopisches Setup zur digitalen Erfassung der Lichtintensität (PMT) und der fluoreszenzmikroskopischen Bilddaten (CCD-Camera) zur späteren Off-Line Analyse

#### **2.4.3 Gefäßdurchmesser, Funktionelle Gefäßdichte, Blutflussgeschwindigkeit ( $V_{\text{mean}}$ ), Blutflussrate (BFR)**

Am 6. und 9. Tag nach Kammerimplantation wurden der Gefäßdurchmesser, die funktionelle Gefäßdichte, die Blutflussgeschwindigkeit ( $V_{\text{mean}}$ ) und die Blutflussrate (BFR) bestimmt. Dazu wurden 100  $\mu\text{l}$  Fluoreszeinisothiocyanid markiertes Dextran (50 mg FITC-Dextran /ml 0,9% NaCl, Molmasse 2.000.000, Mobitec / Taufkirchen, Deutschland), zur Plasma-Markierung und konsekutiven Darstellung der funktionellen Gefäße, intravenös appliziert. Während jeder der fünf Observationsperioden wurde die Mikrozirkulation für 30 Sekunden aufgezeichnet und später Off-Line analysiert (Abb. 5; S. 23).



**Abb. 5** Mikrozirkulation nach intravenöser Applikation von FITC-Dextran zur Bestimmung von Gefäßdurchmesser, funktioneller Gefäßdichte, Blutflussgeschwindigkeit ( $V_{\text{mean}}$ ) und Blutflussrate (BFR). Dabei fungiert der Fluoreszenztracer zur Kontrastierung des Blutplasmas. Die Blutzellen bzw. Blutzellkonglomerate sind als dunkle Aussparungen in den Gefäßen sichtbar.

Die funktionelle Gefäßdichte (Formel (1)), definiert als summierte Länge der Gefäße mit Plasmafluß pro Observationsfläche, und der durchschnittliche Gefäßdurchmesser der Einzelgefäße (Formel (2)) wurde mittels einer Bildanalysesoftware (National Institutes of Health Image 1.62) graphisch ermittelt (31, 43).

$$(1) \text{ funktionelle Gefäßdichte } (cm/cm^2) = \frac{1}{G} \sum_{x=1}^G \left( \frac{1}{A} \sum_{n=1}^Z L_n \right)_x$$

$$(2) \text{ durchschnittlicher Gefäßdurchmesser } D_{\text{mean}} (\mu m) = \frac{1}{G} \sum_{x=1}^G \left( \frac{1}{Z} \sum_{n=1}^Z D_n \right)_x$$

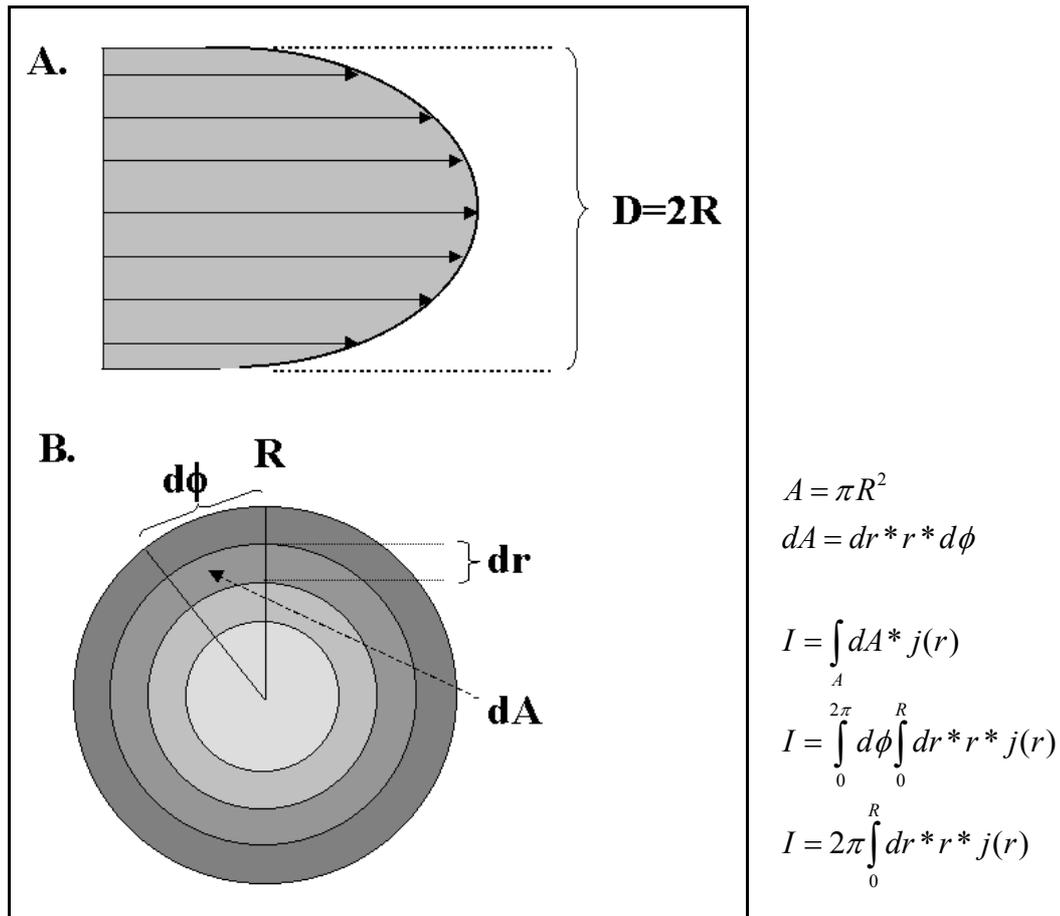
Dabei entspricht L der Länge des Einzelgefäßes, D dem Durchmesser des Einzelgefäßes, A der Observationsfläche, Z der Gesamtzahl der Gefäße und G der Anzahl der Observationsfelder.

Die maximale Blutflussgeschwindigkeit ( $V_{RBC}$ ) wurde opto-elektronisch mittels der two-slit Methode (Exbem 3.0, Pixlock e.k. / Münster, Deutschland) und einer Bildanalysesoftware (National Institutes of Health Image 1.62) gemessen (31). Dabei wurde die Zeitdifferenz gemessen, die ein Erythrozytenkonglomerat im Gefäßzentrum benötigte, um eine definierte Strecke zurückzulegen. Fehlende Krümmung und Abwesenheit von Gefäßverzweigungen waren die Kriterien zur Auswahl eines Gefäßabschnitts, um eine laminare Strömung annehmen zu können. Die Blutflussgeschwindigkeit (Formel (3)) und die durchschnittliche Blutflussrate (Formel(4)), definiert als mittlerer Volumenfluß pro Zeiteinheit im Einzelgefäß, wurde rechnerisch aus Gefäßdurchmesser und maximaler Blutflussgeschwindigkeit in der Gefäßmitte ( $V_{RBC}$ ) nach untenstehenden Formeln ermittelt:

$$(3) \text{ Blutflussgeschwindigkeit } V_{mean} \text{ (cm / s)} = \frac{1}{G} \sum_{x=1}^G \left( \sum_{n=1}^Z \frac{V_{RBCn}}{\alpha} \right)_x$$

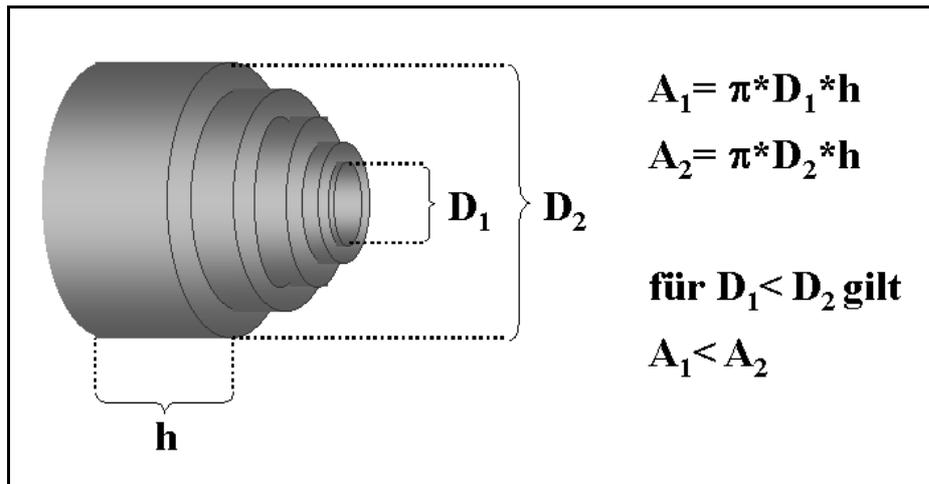
$$(4) \text{ Blutflussrate } BFR \text{ (}\mu\text{m}^3 \text{ / s)} = \frac{1}{G} \sum_{x=1}^G \left( \frac{\pi}{4Z} \sum_{n=1}^Z \frac{V_{RBCn}}{\alpha} D_n^2 \right)_x$$

Dabei entspricht D dem Gefäßdurchmesser,  $V_{RBC}$  der Blutflussgeschwindigkeit im Gefäßzentrum, Z der Gesamtzahl der Gefäße und G der Anzahl der Observationsfelder. Der Korrekturfaktor  $\alpha$  ist ein experimentell ermittelter, linearer Näherungswert, der berücksichtigt, dass die Blutflussgeschwindigkeit, bedingt durch die Reibung an der Gefäßwand und im Blut, vom Gefäßzentrum zum Gefäßrand hin abnimmt (Abb. 6; S. 25). Das nichtlineare Strömungsprofil begründet sich in der abnehmenden Reibungsfläche der Flüssigkeitslamellen vom Gefäßrand zum Gefäßzentrum (Abb. 7; S. 26). Bei kleinen Gefäßdurchmessern lässt sich das Strömungsprofil linear approximieren. Dabei ist  $\alpha=1,3$  für Gefäßdurchmesser  $<10 \mu\text{m}$  und  $1,6$  für Gefäßdurchmesser  $>15 \mu\text{m}$ . Für Durchmesser zwischen  $10$  und  $15 \mu\text{m}$  wird linear extrapoliert ( $\alpha=1,3 + ((D-10)*0,3/5)$ )(83).



**Abb. 6 Strömungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit vom Gefäßdurchmesser**

**A.** Schematischer Längsschnitt durch ein Gefäß mit dem Durchmesser (D) mit Darstellung des Strömungsprofils. Die Länge der Pfeile illustriert schematisch die Geschwindigkeit der Flüssigkeitslamellen (Verändert nach Harms (84)). **B.** Schematischer Querschnitt durch ein Gefäß, wobei das Strömungsprofil durch unterschiedliche Graustufen repräsentiert ist. Der durchschnittliche Volumenfluss  $I$  (ml/s) errechnet sich durch Summation der Einzelflächen  $dA$  ( $\text{cm}^2$ ) multipliziert mit der Stromstärke am jeweiligen Ort  $r$  (Strömungsdichte  $j(r)$  ( $\text{ml} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ ), wobei sich die Einzelfläche aus Multiplikation von Radiusdifferenz  $dr$  (cm), Winkeldifferenz  $d\phi$  (Dimensionslos) an dem Punkt  $r$  (cm) des Gesamtradius ( $R$ ) ergibt.



**Abb. 7** Das Strömungsprofil einer Röhrenströmung ist parabelförmig, bedingt durch die Zunahme der Reibungsfläche ( $A$ ) bei der Entfernung vom Gefäßzentrum. Die Reibungsfläche  $A$  zwischen zwei Flüssigkeitlamellen ist abhängig von der Gefäßlänge ( $h$ ) und dem Durchmesser des Gefäßes ( $D$ ) (41).

#### 2.4.4 Gefäßpermeabilität und Volumen-Oberflächen-Verhältnis

Am 6. Tag nach Rückenhautkammerimplantation wurde die effektive Gefäßpermeabilität, definiert als der reziproke Widerstand der Gefäßwand gegenüber einem definierten Stoff, gemessen. Die Menge extravasierter Stoffes wird durch seine Diffusion, d.h. der Wanderung entlang eines Konzentrationsgefälles auf Grund der Brown'schen Molekularbewegung, bestimmt, wobei die treibende Kraft das Bestreben nach einer geringen Entropie im System darstellt. Die Menge des diffundierenden Stoffes pro Zeiteinheit wird durch das Fick'sche Diffusionsgesetz beschrieben (Formel (5)).

$$(5) \text{ Permeierter Stoff pro Zeiteinheit } (dn / dt) = D \cdot A \cdot \frac{C_i - C_o}{l}$$

Dabei ist die Anzahl diffundierter Moleküle ( $dn$ ) pro Zeiteinheit ( $dt$ ) abhängig von der Diffusionskonstante ( $D$ ), der Gefäßfläche ( $A$ ), der Dicke der Gefäßwand ( $l$ ), der Konzentration des Stoffes im Gefäß ( $C_i$ ) und im Interstitium ( $C_o$ ).

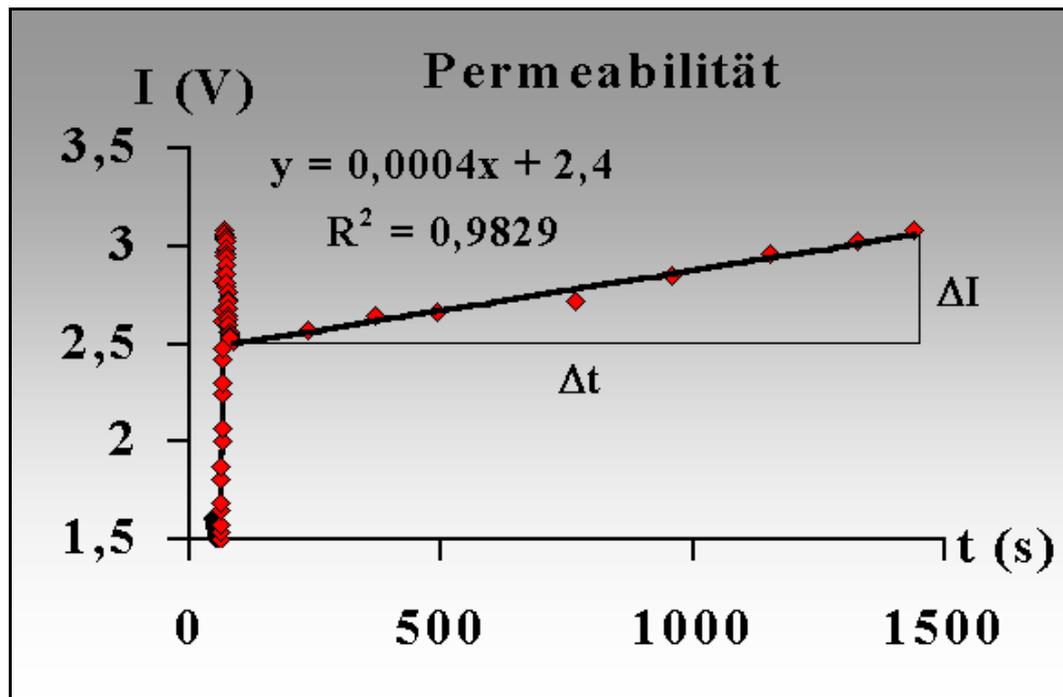
Die Menge permeierten Albumins ist diffusionslimitiert. Während der Perfusion wird hierbei kein Austauschäquilibrium erreicht, sondern es permeiert aufgrund des hohen Widerstandes der Gefäßwand gegenüber Albumin (geringe Diffusionskonstante) nur ein sehr geringer Teil des Albumins in das Interstitium.

Weiterhin wird die Diffusionsbewegung durch Konvektion von Flüssigkeit, in diesem Fall Wasser, beeinflusst. Die Konvektion begründet sich in einem höheren hydrostatischen Druck in den Kapillaren, verglichen mit dem Interstitium. Dies führt zu einer Konvektion von Flüssigkeit mit postarteriolärem Wasserausstrom aus dem Gefäß und im weiteren Verlauf, abhängig vom venösen Druck und dem steigenden osmotischen Druck, zu einem Wassereinstrom. Bei der gewählten Meßmethodik wurde die effektive Permeabilität, d.h. Menge des extravasierenden Stoffes unabhängig von der treibenden Kraft erfasst.

Zur Messung der mikrovaskulären Permeabilität wurde Tetramethylrhodamin (TRITC) markiertes Albumin (TRITC-BSA, Molmasse 67.000, Exzitationswellenlänge 525-555nm, Emissionswellenlänge 580-635nm, 10mg/ml, Molecular Probes / Eugene, OR, USA) in PBS (Phosphate buffered saline, Dulbeccos, Life Technologies LTD / Paisley, Schottland) gelöst und mittels einer size exclusion column (Econo-Pac 10 DG, Disposable Chromatography Columns, Bio-Rad Laboratories), der nicht an BSA gebundene Farbstoff entfernt.

Die Mäuse erhielten nach Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz einen Bolus TRITC-BSA in einer Dosis von 0,04mg/g KG intravenös appliziert. Die Lichtintensität wurde durch die oben beschriebene Photomultipliertube erfasst und digital als Funktion über die Zeit intermittierend für 30 min aufgezeichnet (Abb. 8; S. 28).

---



**Abb. 8** Lichtintensitätsanstieg nach intravenöser Applikation von TRITC-BSA zur Bestimmung der mikrovaskulären Permeabilität. Der initiale Peak repräsentiert das, in hoher Konzentration anflutende, Fluorochrom im Gefäßsystem. Nach Durchmischung im Blutkreislauf fällt die Konzentration des Fluorochroms, und damit die Lichtintensität, wieder ab. Die nachfolgende Steigung des Graphen spiegelt die Extravasation des Fluorochroms pro Zeiteinheit wider.

Die Daten wurden Off-Line mit einer Analysesoftware (Kaleidagraph) ausgewertet und mit den Bilddaten der Mikrozirkulation desselben Observationsfeldes korreliert, da die Menge des permeierten Albumins nicht nur von der Durchlässigkeit der Gefäßwand, sondern auch von der Gefäßoberfläche abhängig ist (siehe auch Formel (5)). Die effektive Permeabilität errechnete sich nach Formel (6) (31, 78, 79, 85, 86).

$$(6) \text{ Permeabilität } P(\text{cm/s}) = (1 - Hkt) * \frac{V}{S} * \left( \frac{\Delta I}{\Delta t (I_o - I_B)} + \frac{1}{K} \right)$$

Dabei entspricht  $I$  der Lichtintensität der Observationsfläche,  $t$  der Zeit,  $I_0$  der initialen Lichtintensität nach Füllung aller Gefäße mit TRITC-BSA und  $I_B$  der Hintergrundfluoreszenz des Gewebes. Der mittlere mikrovaskuläre Hämatokrit

(Hkt) wurde gleich 19% gesetzt (87). Die Zeitkonstante der Plasmaclearance (K) von BSA in Mäusen ist  $9,1 \times 10^3$  s (85).

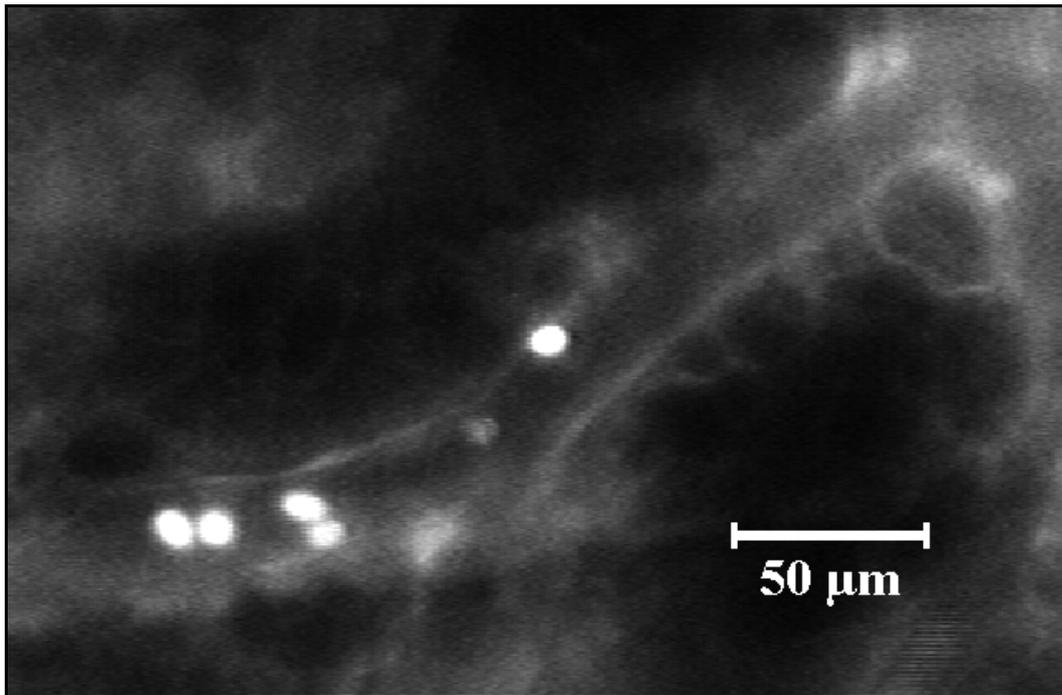
Das Gefäßvolumen (V) und die Gefäßoberfläche (S) der Gefäße in der Observationsarea wurde aus den, oben beschriebenen, Bilddaten nach FITC-Dextran Applikation nach Formel (7) berechnet.

$$(7) \text{ Gefäßvolumen/Gefäßoberfläche (cm)} = \frac{\pi \sum_{n=1}^Z D_n^2 L_n}{\pi \sum_{n=1}^Z D_n L_n}$$

Dabei entspricht Z der Anzahl, L der Länge und D dem Durchmesser der observierten Gefäße im Gesichtsfeld.

#### 2.4.5 Leukozyten-Endothel-Interaktionen (LEI) und Scherrate

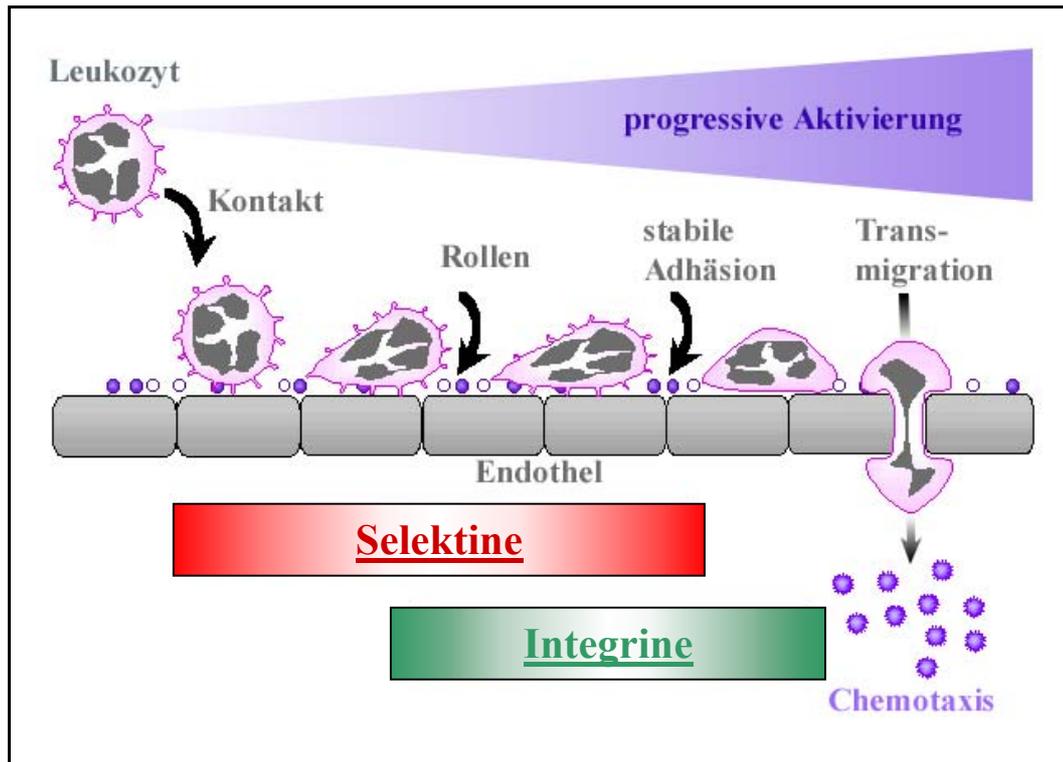
Am 6. und 9. Tag nach Kammerimplantation wurden die Leukozyten-Endothel-Interaktionen untersucht. Wie bereits in der Literatur beschrieben wurde ein Bolus von 20µl 0,1% Rhodamin 6G Chlorid (Molmasse 479, Emissionswellenlänge 528nm, Exzitationswellenlänge 550nm, Molecular Probes / Leiden, Niederlande) in 0,9% physiologischer NaCl-Lösung intravenös durch die Schwanzvene appliziert. Rhodamin 6G markiert *in vivo* Leukozyten und in geringem Maß auch das Endothel. Es wurden unter Epiillumination randomisiert fünf Observationsfelder für jeweils 30sec erfasst und aufgezeichnet (Abb. 9; S. 30).



**Abb. 9** Mikrozirkulation nach *in vivo* Markierung der Leukozyten mit Rhodamin-6G zur Darstellung und Quantifizierung der Leukozyten-Endothel-Interaktionen (LEI). Im Bild sind die Leukozyten als helle Punkte gegenüber dem nicht markierten, dunklen Blutplasma sichtbar.

Die Kriterien zur Auswahl des Gefäßes waren ein mindestens über 100μm langes Gefäßstück ohne Krümmung oder Verzweigung, um eine laminare Strömung annehmen zu können. Um die Komparabilität zu erhöhen, wurde ein Minimum von 20μm und ein Maximum von 30μm als Grenzen der Gefäßdurchmesser festgelegt. Die Gefäße entsprachen postkapillären Venulen, welche, bedingt durch niedrige Blutflussgeschwindigkeiten, neben den Kapillaren die Hauptlokalisierung für den Leukozytenaustausch zwischen Gefäß und umliegenden Gewebe darstellen (41). Die Bilddaten wurden Off-Line mittels einer Bildanalysesoftware (National Institutes of Health Image 1.62) analysiert.

Die Leukozyten-Endothel-Interaktion verläuft sequentiell. Dabei steigt die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion mit zunehmender Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Endotheloberfläche und Aktivierung der Leukozyten und sinkt bei zunehmender Scherrate des Blutstroms (88-90) (Abb. 10; S. 31).



**Abb. 10** Schema zur Leukozyten-Endothel-Interaktion zur Illustration der Auswertungskriterien. Die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion zwischen Leukozyt und Endothel mit fakultativer Extravasation steigt mit zunehmender Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Endotheloberfläche und dem Grad der Leukozytenaktivierung. Dabei nimmt die Geschwindigkeit der Leukozyten im Blutstrom der Graphik folgend von links (fließende Leukozyten  $100\% V_{RBC}$ ) über die Mitte (rollende Leukozyten  $<50\% V_{RBC}$ ) nach rechts (adhärende Leukozyten  $0\% V_{RBC}$ ) ab.

Es wurde die Anzahl der fließenden ( $N_f$ ), der rollenden ( $N_r$ ) und der adhären den ( $N_a$ ) Leukozyten bestimmt. Dabei war „Rollen“ als langsame ( $<50\% V_{RBC}$ ) Bewegung entlang der Gefäßwand und „Adhärenz“ als stabile Position an der Gefäßwand über 30sec definiert (Abb. 10; S. 31).

Der Leukozytenfluß (Formel(8)) wurde berechnet durch Normalisierung der Anzahl fließender Leukozyten ( $N_f$ ) mit dem Gefäßquerschnitt, wobei D der Gefäßdurchmesser ist:

$$(8) \text{ Leukozytenfluß (Zellen / mm}^2\text{s)} = 10^6 \frac{N_f}{\pi (D/2)^2 * 30s}$$

Der Rolling Count, definiert als prozentualer Anteil der rollenden Leukozyten ( $N_r$ ) an der Gesamtzahl der Leukozyten ( $N_t = N_f + N_r + N_a$ ), wurde nach Formel (9) berechnet:

$$(9) \text{ Rolling Count (\%)} = 100 * \frac{N_r}{N_t}$$

Zur Bestimmung der Leukozytendichte (Formel (10)) an der Gefäßwand wurde die Anzahl adhärennder Leukozyten ( $N_a$ ) durch die Oberfläche des beobachteten Gefäßabschnitts dividiert, wobei D dem Durchmesser des beobachteten Gefäßes entspricht:

$$(10) \text{ Leukozytendichte (Zellen / mm}^2\text{)} = 10^6 \frac{N_a}{\pi * D * 100 \mu\text{m}}$$

Die Scherrate, als repräsentativer Wert für die Scherkraft des Blutstroms an der Gefäßwand, beschreibt die hämodynamische Kraft des Blutes, auf mit dem Endothel interagierende Leukozyten, welche antagonistisch zu den oben (Abb. 10; S. 31) beschriebenen Adhäsionsprozessen wirkt.

Die Scherrate wurde aus der maximalen Blutflussgeschwindigkeit ( $V_{RBC}$ ) und dem Gefäßdurchmesser (D) nach Formel (11) errechnet und durch  $\alpha$  (siehe oben), zur Berücksichtigung der Abhängigkeit der Blutflussgeschwindigkeit von der Entfernung zum Gefäßzentrum, korrigiert (89).

$$(11) \text{ Scherrate (s}^{-1}\text{)} = 8 * \frac{V_{RBC} / \alpha}{D}$$

## 2.5 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sind präsentiert als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (standard error of the mean; SEM). Da es sich bei den erhaltenen Daten, nach Analyse mit dem Fisher-Z-Test, um nicht normalverteilte Daten handelte, wurden nicht-parametrische Tests zur Auswertung verwendet. Die Werte der UCP1/DTA Mäuse wurden mit der Kontrollgruppe durch den Mann-Whitney-U Test unter Verwendung einer Statistiksoftware (StatView, Abacus / Berkeley, USA) verglichen. Um Korrelationen zwischen Parametern zu testen, wurde der Spearman-Rank-Correlation Test verwendet und die gebildeten Gruppen mittels Mann-Whitney-U Test verglichen. Als statistische Signifikanzgrenze wurden P-Werte kleiner als 5% gewählt.

---

## **3. Ergebnisse**

### **3.1 Metabolische Parameter**

#### **3.1.1 Körpertemperatur**

Die Körpertemperatur war über den gesamten Messzeitraum (Tag -2, 0, 6, 9) signifikant niedriger in UCP1/DTA Mäusen ( $\sim 1^{\circ}\text{C}$ ;  $p < 0,0001$ ), verglichen mit der Kontrollgruppe (Abb. 11; S. 61). Dabei zeigte die Kontrollgruppe am Tag 0 nach der zwölfstündigen Fastenperiode vor dem Glukose-Toleranztest einen Abfall der Körpertemperatur um ca.  $0,7^{\circ}\text{C}$  verglichen zu Tag -2, während die UCP1/DTA Mäuse keine Veränderung zeigten. Weiterhin kam es in beiden Messgruppen zu einer Reduktion der Körpertemperatur um  $0,3^{\circ}\text{C}$  am 6. und 9. Tag verglichen mit Tag -2.

#### **3.1.2 Körpergewicht**

Verglichen mit der Kontrollgruppe (26,3g) zeigten die UCP1/DTA Mäuse ein signifikant höheres Körpergewicht (40,1g; +52,5%;  $p < 0,01$ ) zwei Tage vor Kammerimplantation. Das Körpergewicht sank während des Messzeitraum von 12 Tagen (Tag -2 bis Tag 9) sowohl in der Gruppe der UCP1/DTA Mäuse (-18,2%), als auch in der Kontrollgruppe (-5,7%), verblieb aber an jedem Messpunkt signifikant erhöht in UCP1/DTA Mäusen ( $p < 0,01$ ) (Abb. 12; S. 62). Die Differenz des Körpergewichtes von Tag 0 bis Tag 9 korrelierte signifikant mit der Höhe des Ausgangsgewichtes an Tag 0 ( $p < 0,01$ ) (Abb. 13; S. 62).

#### **3.1.3 Blutglukose und Glukose-Toleranz-Test (GGT)**

Die Blutglukose wurde an den Tagen -2, 0, 6 und 9 bestimmt. UCP1/DTA Mäuse zeigten während der gesamten Observationsperiode signifikant erhöhte Blutglukosewerte ( $p < 0,01$ ). Verglichen mit der Kontrollgruppe ( $107 \text{ mg/dl} \pm 3 \text{ mg/dl}$ , Tag 6;  $109 \text{ mg/dl} \pm 3 \text{ mg/dl}$ , Tag 9) zeigten die UCP1/DTA Mäuse eine Erhöhung auf  $206 \text{ mg/dl} \pm 13 \text{ mg/dl}$  (+92,1%) am Tag 6 und  $195 \text{ mg/dl} \pm 13 \text{ mg/dl}$  (+77,9%) am Tag 9. Dabei zeigten beide Gruppen im Vergleich zum

---

Ausgangswert von Tag -2 eine Abnahme des Blutglukosewertes bis zum Tag 9 (UCP1/DTA: -9%; Kontrollen: -6%)(Abb. 14; S. 63).

Zusätzlich wurde ein Glukose-Toleranz-Test (GTT) an Tag 0 durchgeführt. Der Nüchternwert der Blutglukose nach zwölfstündiger Fastenperiode war mit 151,4 mg/dl  $\pm$  9,1 mg/dl UCP1/DTA Mäusen signifikant pathologisch erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe (81,4 mg/dl  $\pm$  4,2 mg/dl). Der GTT zeigte signifikant eingeschränkte Glukosetoleranzen der UCP1/DTA Mäuse ( $p < 0,01$ ), wobei der Blutzuckerwert nach 2h noch 212,8 mg/dl  $\pm$  11,7 mg/dl betrug (Abb. 15; S. 63).

#### **3.1.4 Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) im Serum**

Der TNF- $\alpha$  Spiegel im Serum der UCP1/DTA Gruppe (9,28 pg/ml  $\pm$  1,60 pg/ml) war signifikant erhöht im Vergleich mit der Kontrollgruppe (3,11 pg/ml  $\pm$  0,87 pg/ml;  $p < 0,01$ ) (Abb. 16; S. 64).

Die TNF- $\alpha$  Werte korrelierten unabhängig von der Messgruppe signifikant mit dem Blutglukosespiegel ( $p < 0,01$ ) und zeigten einen positiven, annähernd linearen ( $R^2 = 0,984$ ) Anstieg in Abhängigkeit der Blutglukose. Es konnte ein Anstieg von 0,69 pg/ml  $\pm$  0,31 pg/ml auf 13,34 pg/ml  $\pm$  3,41 pg/ml bei Blutglukosewerten von 55-99 mg/dl bis 200-279 mg/dl gemessen werden (Abb. 17; S. 64).

---

## 3.2 Mikrozirkulatorische Parameter

### 3.2.1 Mikrovaskuläre Permeabilität

Die effektive mikrovaskuläre Permeabilität gegenüber Albumin war signifikant höher in UCP1/DTA Mäusen (n=10) verglichen mit der Kontrollgruppe (n=8;  $p < 0,05$ ). Dabei zeigte sich eine annähernd vierfach erhöhte Permeabilität in UCP1/DTA Mäusen ( $22 \times 10^{-7} \pm 2,3 \times 10^{-7}$  cm/s) gegenüber den Kontrollmäusen ( $6,2 \times 10^{-7} \pm 4,2 \times 10^{-7}$  cm/s) (Abb. 18; S. 65).

### 3.2.2 Funktionelle Gefäßdichte und mittlerer Gefäßdurchmesser

Die Analyse der funktionellen Gefäßdichte ergab eine signifikante Reduktion um 19% in UCP1/DTA Mäusen (Tag 6,  $264 \pm 11$  cm/cm<sup>2</sup>; Tag 9,  $276 \pm 13$  cm/cm<sup>2</sup>) verglichen mit der Kontrollgruppe (Tag 6,  $326 \pm 9$  cm/cm<sup>2</sup>; Tag 9,  $323 \pm 9$  cm/cm<sup>2</sup>) (Abb. 19; S. 66).

Die weiterführende Untersuchung zeigte eine, von der Messgruppe (Transgen/Kontrolle) unabhängige Korrelation zwischen Gefäßdichte und Blutglukosewert. Dabei erwies sich die Gefäßdichte als negativ korreliert mit dem Blutglukosespiegel ( $p < 0,0001$ ). In der Gruppe mit Blutglukosewerten zwischen 250 und 299 mg/dl fand sich eine Abnahme der Gefäßdichte um 27% ( $246 \pm 11$  cm/cm<sup>2</sup>) verglichen mit der Gruppe mit Blutglukosewerten zwischen 50 und 99 mg/dl ( $335 \pm 12$  cm/cm<sup>2</sup>) (Abb. 20; S. 66).

Der mittlere Gefäßdurchmesser war in UCP1/DTA Mäusen (Tag 6,  $10 \pm 0,8$  µm; Tag 9,  $10 \pm 1,1$  µm) signifikant ( $p < 0,01$ ) erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tag 6,  $5,3 \pm 0,2$  µm; Tag 9,  $5,2 \pm 0,2$  µm) (Abb. 21; S. 67).

Die Analyse der Verteilung der Gefäßdurchmesser illustrierte, dass die geringere Gefäßdichte in UCP1/DTA Mäusen auf eine signifikante Reduktion kleinster Gefäße mit Durchmesser um 3µm zurückzuführen war ( $p < 0,05$ ). Weiterhin zeigte sich das Maximum der Gefäßverteilung in UCP1/DTA Mäusen von 3µm auf Durchmesser um 5µm verschoben (Abb. 22; S. 67).

---

Der mittlere Gefäßdurchmesser war, unabhängig von der Messgruppe (Transgen/Kontrolle), durch eine signifikant positive Korrelation zur Blutglukose charakterisiert ( $p < 0,0001$ ). Dabei zeigte sich ein Minimum bei niedrigen Blutglukosewerten (80-119 mg/dl;  $5,4 \mu\text{m} \pm 0,2 \mu\text{m}$ ), gefolgt von einem Anstieg, bis zum Erreichen eines Plateaus bei Blutglukosewerten  $>160$  mg/dl ( $9,1 \mu\text{m} \pm 0,6 \mu\text{m}$ ) (Abb. 23; S. 68).

### 3.2.3 Blutflußrate (BFR) und Blutflussgeschwindigkeit ( $V_{\text{mean}}$ )

Die Messung der durchschnittlichen Blutflussgeschwindigkeit im Einzelgefäß ( $V_{\text{mean}}$ ) zeigte eine signifikante Reduktion der Flussgeschwindigkeit in UCP1/DTA Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p < 0,01$ ). Dabei war die  $V_{\text{mean}}$  in der UCP1/DTA Gruppe (Tag 6,  $529 \mu\text{m/s} \pm 44 \mu\text{m/s}$ ; Tag 9,  $535 \mu\text{m/s} \pm 39 \mu\text{m/s}$ ) um durchschnittlich 36,6% niedriger, als in der Kontrollgruppe (Tag 6,  $859 \mu\text{m/s} \pm 46 \mu\text{m/s}$ ; Tag 9,  $818 \mu\text{m/s} \pm 42 \mu\text{m/s}$ ) (Abb. 24; S. 69).

Die signifikante Korrelation ( $p < 0,0001$ ) zur Blutglukose zeigte sich bei der  $V_{\text{mean}}$  spiegelbildlich verlaufend im Vergleich zum Durchmesser, unabhängig von der Messgruppe (Transgen/Kontrolle). Die  $V_{\text{mean}}$  war dabei charakterisiert durch ein Maximum ( $840 \mu\text{m/s} \pm 31 \mu\text{m/s}$ ) bei niedrigen Blutglukosewerten (80-119 mg/dl) und einen Abfall mit nachfolgendem Plateau ( $591 \mu\text{m/s} \pm 39 \mu\text{m/s}$ ) bei Blutglukosewerten  $>160$ mg/dl (Abb. 23; S. 68).

Die Messungen der Blutflussrate (BFR), als Parameter für den durchschnittlichen Blutfluß pro Sekunde im Einzelgefäß, ergaben interessanterweise keine Unterschiede zwischen den Messgruppen (Abb. 25; S. 69).

### 3.2.4 Leukozyten-Endothel-Interaktionen (LEI)

Der durchschnittliche Gefäßdurchmesser der beobachteten postkapillären Venulen betrug  $27,1 \mu\text{m} \pm 0,82 \mu\text{m}$  in der Kontrollgruppe und  $25,7 \mu\text{m} \pm 1,3 \mu\text{m}$  in der UCP1/DTA Gruppe.

Die Analyse der Leukozyten-Endothel-Interaktionen (LEI) zeigte während des gesamten Messzeitraums signifikant erhöhte LEI in UCP1/DTA Mäusen verglichen mit der Kontrollgruppe. Der Rolling Count, definiert als prozentualer Anteil der am Endothel entlang rollenden Leukozyten, bezogen auf die

---

Gesamtzahl der Leukozyten, war in UCP1/DTA Mäusen signifikant höher mit  $42,4\% \pm 2,7\%$  an Tag 6 und  $45,2\% \pm 2,8\%$  an Tag 9 verglichen mit  $22,0\% \pm 3,8\%$  an Tag 6 und  $31,1\% \pm 3,8\%$  an Tag 9 in der Kontrollgruppe ( $p < 0,01$ ) (Abb. 26; S. 70).

Die Leukozytendichte, als Maß für die Anzahl der adhären den Leukozyten bezogen auf die Gefäßwandfläche, war wenigstens dreifach erhöht in der UCP1/DTA Gruppe (Tag 6,  $126 \text{ Zellen/mm}^2 \pm 17 \text{ Zellen/mm}^2$ ; Tag 9,  $107 \text{ Zellen/mm}^2 \pm 13 \text{ Zellen/mm}^2$ ) versus Kontrollgruppe (Tag 6,  $39 \text{ Zellen/mm}^2 \pm 21 \text{ Zellen/mm}^2$ ; Tag 9,  $13 \text{ Zellen/mm}^2 \pm 6 \text{ Zellen/mm}^2$ ) ( $p < 0,01$ ) (Abb. 27; S. 70).

Die Leukozyten-Endothel-Interaktionen korrelierten signifikant mit den Blutglukosewerten, unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit (Transgen/Kontrolle) ( $p < 0,001$ ). Die weitere Analyse ergab eine positive annähernd lineare ( $R^2 = 0,9643$ ) Korrelation der Leukozytendichte mit der Blutglukose und spiegelte damit den gleichen Verlauf der Fraktion rollender Leukozyten wider (Abb. 28; S. 71).

Der Leukozytenfluß, bezogen auf die Gefäßquerschnittsfläche, zeigte am 6. Tag eine signifikante Reduktion in UCP1/DTA Mäusen ( $1830 \text{ Zellen/mm}^2\text{s} \pm 176 \text{ Zellen/mm}^2\text{s}$ ) verglichen mit der Kontrollgruppe ( $2958 \text{ Zellen/mm}^2\text{s} \pm 375 \text{ Zellen/mm}^2\text{s}$ ). Der deutliche Trend an Tag 9 verfehlte nur knapp die Signifikanzgrenze ( $p = 0,060$ ) (Abb. 29; S. 72).

Die Scherrate, als Maß für die tangentielle Kraft des Blutstroms an der Gefäßwand, war mit 43% an Tag 6 und 53% an Tag 9 signifikant ( $p < 0,01$ ) erniedrigt in UCP1/DTA Mäusen (Tag 6,  $185\text{s}^{-1} \pm 24\text{s}^{-1}$ ; Tag 9,  $210\text{s}^{-1} \pm 23\text{s}^{-1}$ ) verglichen mit der Kontrollgruppe (Tag 6,  $432\text{s}^{-1} \pm 37\text{s}^{-1}$ ; Tag 9,  $397\text{s}^{-1} \pm 40\text{s}^{-1}$ ), wie nach der Erniedrigung von  $V_{\text{RBC}}$  bei gleichen Gefäßdurchmessern, wie oben beschrieben, zu erwarten war (Abb. 30; S. 73).

Die Scherrate korrelierte signifikant mit den Blutglukosewerten ( $p < 0,001$ ) und zeigte ein Maximum bei niedrigen Blutglukosewerten (80-119 mg/dl) mit  $426\text{s}^{-1} \pm 30\text{s}^{-1}$ , einen Abfall bei steigenden Glukosewerten und mit  $212\text{s}^{-1} \pm 25\text{s}^{-1}$  ein Plateau bei Blutglukosespiegeln  $> 160 \text{ mg/dl}$  (Abb. 31; S. 74).

---

## **4. Diskussion der Ergebnisse**

Die mikrozirkulatorischen Eigenschaften beeinflussen nicht nur die Effizienz des Substrataustausches, sondern vermitteln auch die Anpassungsvorgänge an lokale Bedürfnisse des Gewebes und nehmen Einfluß auf die lokalen metabolischen Bedingungen (Microenvironment). Die gefundenen Ergebnisse zeigen erstmalig, dass funktionelle und morphologische Veränderungen in der Mikrozirkulation von UCP1/DTA Mäusen, während des early staged diabetes, vorhanden sind. Weiterhin konnte das erste Mal gezeigt werden, dass sowohl die funktionellen, als auch die morphologischen Alterationen direkt mit dem Ausmaß der metabolischen Veränderungen, repräsentiert durch die Blutglukosespiegel, korrelieren. Dieser Zusammenhang zwischen Ausmaß der metabolischen Dysregulation und Gefäßalteration unabhängig von der Messgruppe macht es unwahrscheinlich, dass die beobachteten mikrozirkulatorischen Veränderungen auf die genetische Veränderung der transgenen Mäuse zurückzuführen ist.

Die bereits beschriebene metabolische Entwicklung der UCP1/DTA Mäuse konnte durch die Ergebnisse dieser Studie bestätigt werden. Es zeigte sich eine erniedrigte Körpertemperatur von  $1^{\circ}\text{C}$ , wie früher berichtet (74). Die weitere Reduktion der Körpertemperatur um  $0,3^{\circ}\text{C}$  an den Messtagen 6 und 9 in beiden Gruppen ist wahrscheinlich auf die Rückenhautkammerimplantation zurückzuführen. Die deutlich höhere Wärmeleitfähigkeit des auf der Haut aufliegenden Metalls führt damit möglicherweise konsekutiv zu einem erhöhten Wärmeverlust.

Das Körpergewicht der UCP1/DTA Mäuse war nachweislich erhöht und wies mit +52% im Vergleich zur Kontrollgruppe ähnlich hohe Werte auf, wie bereits in der Literatur beschrieben (73, 75). Das Körpergewicht der Mäuse beider Gruppen sank während des Beobachtungszeitraumes von 12 Tagen. Der initiale Gewichtsverlust von Tag -2 bis Tag 0 (-5%) in beiden Messgruppen war wahrscheinlich auf die Fastenperiode zum Erreichen eines nüchternen Zustandes vor dem Glukose-Toleranz-Test (GTT) zurückzuführen. Der weitere Gewichtsverlust von maximal 13% war möglicherweise durch die chirurgische Intervention der Rückenhautkammerimplantation bedingt. Ein Gewichtsverlust von 15% nach Rückenhautkammerimplantation ist bereits in der Literatur

---

beschrieben (43). Der scheinbar höhere Gewichtsverlust in der UCP1/DTA Gruppe relativierte sich durch die gefundene Korrelation von Ausgangsgewicht und Gewichtsverlust unabhängig von der Messgruppe. Tiere mit einem niedrigen Ausgangsgewicht wiesen einen geringeren Gewichtsverlust auf. Dies ist möglicherweise auf die noch höhere Wachstumspotenz dieser kleineren Tiere zurückzuführen.

Die Blutglukosewerte und der Glukosetoleranztest spiegelten signifikant die diabetische Stoffwechsellaage der UCP1/DTA Mäuse wider. Dabei war der Nüchternwert nach der Blutglukose mit 151 mg/dl oberhalb der Definitionsgrenze der Deutschen-Diabetes-Gesellschaft von 110 mg/dl zur Diagnose eines Diabetes mellitus (1). Dies zusammen mit einem durchschnittlichen 2h-Blutglukosewert von 212 mg/dl während des GTTs beweist eindeutig die diabetische Stoffwechsellaage der UCP1/DTA Mäuse und bestätigt die Ergebnisse früherer Studien (1, 73, 75, 76). Der Blutzucker beider Gruppen nahm im Verlauf der Observationsperiode von Tag -2 bis Tag 9 ab (UCP1/DTA -9%; Kontrollen -6%). Dies war wahrscheinlich Folge der Gewichtsreduktion im Zuge der Nüchternperiode bzw. der Rückenhautkammerimplantation. Der erniedrigte Blutzuckerwert an Tag 0 im Verlauf ist auf den nüchternen Zustand der Mäuse vor dem GTT zurückzuführen.

Die mikrozirkulatorischen Eigenschaften zeigten abhängig von der metabolischen Alteration signifikante funktionelle und morphologische Veränderungen. Eine Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität, im Besonderen gegenüber Albumin, wurde bereits als frühes Zeichen einer Endotheldysfunktion, in der Retina (91), der Niere (92) und im Mesenterium des Darmes von Ratten (40), im Rahmen des frühen Diabetes beschrieben. Wir konnten in dieser *in vivo* Studie zeigen, dass auch im subkutanen Gewebe die mikrovaskuläre Permeabilität erhöht ist. Dies deutet darauf hin, dass eine Permeabilitätserhöhung, bedingt durch eine Endotheldysfunktion, nicht nur ein sensitiver Parameter, sondern auch ein systemisches Merkmal im Rahmen des frühen Diabetes ist. Wir konnten keinen Zusammenhang zwischen dem Grad der metabolischen Dysregulation und der mikrovaskulären Permeabilität nachweisen. Dies beruht wahrscheinlich auf der hohen Sensitivität dieses Parameters, der möglicherweise schon bei einer Glukoseintoleranz mit einem starken Anstieg reagiert.

---

Die funktionelle Gefäßdichte war in diabetischen Mäusen signifikant reduziert, wobei der durchschnittliche Gefäßdurchmesser erhöht war, wie in früheren Veröffentlichungen in Konjunktivalgefäßen von Diabetikern beschrieben (39, 42). Die durchschnittliche Blutflußrate im Einzelgefäß (BFR) war, aufgrund der reduzierten Blutflussgeschwindigkeit ( $V_{\text{mean}}$ ) und dem erhöhten Gefäßdurchmesser, unverändert. Die Kombination aus einer reduzierten Gefäßdichte bei einem unveränderten Blutfluß (BFR) im Einzelgefäß führt zu einer verminderten Gewebsperfusion in den diabetischen Mäusen und könnte somit auch zu einer verminderten Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen führen. Die nähere Analyse zeigte, dass die Reduktion der Gefäßdichte und partiell die Erhöhung des Gefäßdurchmessers auf einer reduzierten Zahl von kleinsten Gefäßen mit Durchmessern um 3  $\mu\text{m}$  beruhte. Dabei konnten wir nachweisen, dass die Reduktion der kleinsten Gefäße signifikant mit der metabolischen Situation, repräsentiert durch den Blutglukosespiegel, korrelierte. Diese in Abhängigkeit der Stoffwechsellage eingeschränkte Gewebsperfusion stellt, zumindest partiell, ein Erklärungsmodell für die Wundheilungsstörungen dar, die bei einer diabetischen Stoffwechsellage gefunden werden. Die Korrelation der Ausprägung der mikrozirkulatorischen Veränderungen mit dem metabolischen Status unterstützt weiterhin die Erkenntnis, dass eine Verschlechterung der glykämischen Kontrolle direkt zu funktionellen gefolgt von morphologischen Alterationen der Mikrozirkulation führt. Der molekulare Hintergrund bleibt dabei ungeklärt und sollte in weiteren Studien untersucht werden. Erste Untersuchungen im diabetischen Mausmodell (db/db) weisen darauf hin, dass eine erhöhte Gefäßvulnerabilität durch die veränderte Expression von Angiopoetin-1 / -2 und ihrem Rezeptor Tie-2 bedingt sein könnte (37), wobei diese Rezeptoren eine wichtige Funktion in der Gefäßreifung, -stabilisierung und im Gefäßremodelling besitzen (93). Die erhöhte Gefäßvulnerabilität könnte nicht nur durch eine verringerte Gefäßdichte mit konsekutiver Einschränkung der Gewebsperfusion und des Nährstoffangebotes, sondern auch durch eine verschlechterte Fähigkeit zur Angiogenese, Aussprossung von Kapillaren, und Gefäßreifung zu einer diabetischen Wundheilungsstörung beitragen, wie in Ansätzen beschrieben (37). Auch der in dieser Studie gefundene erhöhte TNF- $\alpha$  Spiegel könnte eine Erklärung für die Reduktion von Gefäßen bieten. TNF- $\alpha$  führt in unphysiologisch hohen

---

Plasmaspiegeln (im Nanogrammbereich) zu einer verringerten Angiogenese und einer Verzögerung der Wundheilung (94). TNF- $\alpha$ -Rezeptor (p55) Knock-out-Mäuse weisen eine beschleunigte Wundheilung mit Erhöhung von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und seiner Rezeptoren (Flt-1, Flk-1) und konsekutiv gesteigerter Angiogenese auf, wohingegen im diabetischen Mausmodell der db/db Mäuse die Expression von VEGF und seiner Rezeptoren abgeschwächt ist (37, 95). Die in dieser Studie gemessenen TNF- $\alpha$  Serumkonzentrationen bewegten sich allerdings im Bereich von Pikogramm, nicht im Nanogrammbereich wie von Fajardo et al. beschrieben (94), welches die erhöhten TNF- $\alpha$  Werte als Ursache für die Gefäßreduktion unwahrscheinlich macht, vorausgesetzt die lokalen Gewebekonzentrationen sind nicht um den Faktor 1000 höher.

Die mittlere Blutflussgeschwindigkeit ( $V_{\text{mean}}$ ) zeigte eine Reduktion der Flussgeschwindigkeit in diabetischen UCPI/DTA Mäusen und eine Abhängigkeit von der Blutglukose. Dabei nahm die Flussgeschwindigkeit mit steigender Blutglukose ab und erreichte ab Blutglukosewerten von >160 mg/dl ein Plateau. Dies bestätigt frühere Studien, in denen die Blutflussgeschwindigkeit im Mesenterium von Ratten (40) und in der konjunktivalen Mikrozirkulation von diabetischen Patienten (39) gemessen wurde, wobei in dieser Studie, nach meinem Wissensstand erstmals, eine direkte Korrelation zwischen Ausmaß der metabolischen Alteration und der Blutflussgeschwindigkeit zeigen konnten.

Überraschend stellte sich die Blutflussrate (BFR) unverändert dar. Die BFR, gemessen als mittleres Transportvolumen pro Zeit im Einzelgefäß, ist neben der Gefäßdichte die zweite wichtige Determinante für die Gewebsperfusion. Nach dem Hagen-Poiseuille'schen Gesetz hängt der Blutfluß von dem Gefäßdurchmesser (D), der Gefäßlänge (l), der Blutviskosität ( $\eta$ ) und der Druckdifferenz über dem Gefäß ( $\Delta P$ ) ab:  $\text{Blutfluß} = \Delta P * \pi/8 * l/\eta * (D/2)^4$  (84). Dabei ist die Viskosität direkt abhängig von der Blutflussgeschwindigkeit und dem Gefäßdurchmesser. Bei niedrigen Blutflussgeschwindigkeiten erhöht sich die Blutviskosität aufgrund der Bildung von Erythrozytenaggregaten. In antagonistischer Weise führt die Axialmigration bei kleineren Gefäßdurchmessern (<300  $\mu\text{m}$ ) zu einer Reduktion der Viskosität (Faraus-Linquist-Effekt). Dieser Effekt nimmt bei kleinsten Gefäßen (<10  $\mu\text{m}$ ), bedingt durch die Verformbarkeitsgrenze der Erythrozyten, wieder ab (41). Dies verdeutlicht, dass

---

die Blutflussgeschwindigkeit ( $V_{\text{mean}}$ ) und der Gefäßdurchmesser ( $D$ ) wichtige Parameter zur Beurteilung des Blutflusses (BFR) darstellen. Der unveränderte Blutfluss (BFR) der Einzelgefäße in diabetischen Mäusen ist wahrscheinlich bedingt durch die Kombination einer geringeren  $V_{\text{mean}}$ , die u.a. auch zu einer Erhöhung der Viskosität führt, und eines höheren mittleren Gefäßdurchmessers ( $>10\mu\text{m}$ ), der die Viskosität in Gefäßen höherer Gefäßdurchmesser abnehmen läßt.

Es wird in der Literatur zunehmend eine, mit dem Diabetes assoziierte, inflammatorische Komponente, als wichtige, mitverursachende Kraft, sowohl des Diabetes mellitus Typ 2 als auch der makro- und mikroangiopathischen Veränderungen postuliert (96, 97). Erhöhte Leukozyten-Endothel-Interaktionen (LEI) sind als Ursache für kapilläre Perfusionsstops, Störungen der Blut-Retina Schranke und Neovaskularisationen im Auge beschrieben worden (46-49). Weiterhin erhöhen vermehrte LEI Ischämie-Reperfusionsschäden beim Diabetes (40) und führen durch Freisetzung von Sauerstoffradikalen zur Inaktivierung von Stickstoffmonoxid (NO) und konsekutiv zu einer Endotheldysfunktion (98). Die Interaktion zwischen Leukozyt und Endothel wird durch Adhäsionskräfte und Scherkräfte des Blutflusses beeinflusst. Die Adhäsion wird durch die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Endotheloberfläche (ICAM-1, P-Selectin, PECAM-1, VCAM-1) (90, 99-101) und der Oberfläche der Leukozyten (L-Selectin,  $\beta_2$ -Integrinen) (88, 90) vermittelt. Die Interaktion zwischen Leukozyt und Endothel verläuft dabei sequentiell und beginnt mit dem Kontakt, der abhängig von der Adhäsionsmolekülexpression zum sogenannten „Rolling“ führt. Es kommt im weiteren zu einer Leukozytenaktivierung mit Downregulation von Selectinen und vermehrter Expression von  $\beta_2$ -Integrinen bis zur stabilen Adhäsion („sticking“) mit der Möglichkeit einer späteren Leukozytenextravasation (88, 99). Antagonistisch zu den Adhäsionskräften wirkt dabei die tangentielle Scherkraft des Blutstroms (Scherrate), welche vom Gefäßdurchmesser und der Blutflussgeschwindigkeit abhängig ist (89).

In dieser Studie fanden sich signifikant vermehrte Leukozyten-Endothel-Interaktionen, sowohl in der Analyse der Rollfraktion (Rolling Count), als auch in der Leukozytendichte pro Endotheloberfläche bei einem verringerten Leukozytenfluß pro Gefäßquerschnittsfläche. Die Verringerung des Leukozytenflusses könnte seine Ursache in einer vermehrten Sequestration der

---

Leukozyten in der Mikrozirkulation haben. Die vermehrten Zell-Oberflächenkontakte korrelierten signifikant mit der Höhe des Blutglukosespiegels und weisen auf eine, durch das Ausmaß der metabolischen Dysregulation ausgelöste, Inflammationsreaktion in der Mikrozirkulation hin. Diese Erkenntnisse stehen mit früheren *in vitro* und *in vivo* Ergebnissen in Einklang, die im Mesenterium von Ratten mit Streptocotocin-induziertem Diabetes (40), Mesenterium von Ratten unter kontinuierlicher Glukoseinfusion (102) und in Human-Umbilical-Vein-Endothelial-Cells (HUVEC) Flow Chamber (103) gewonnen wurden. Die gefundene, signifikant erniedrigte, Scherrate weist darauf hin, dass die vermehrten LEI partiell durch die Reduktion der tangentialen Krafteinwirkung des Blutstroms bedingt waren, wie bereits früher beschrieben (40). Die weitere Analyse der signifikanten Korrelation von LEI und Scherrate mit der Blutglukose zeigte allerdings deutlich, dass die Scherrate mit zunehmender Blutglukose abnahm, jedoch bei Blutglukosewerten >160 mg/dl ein Plateau erreichte, während die LEI - Rolling Count und Leukozytendichte – eine annähernd lineare ( $R^2=0,96$ ) Beziehung zum Blutglukosespiegel aufwies und auch bei Werten >160 mg/dl weiter anstieg. Dieses Ergebnis macht es unwahrscheinlich, dass die vermehrte Leukozytenadhäsion nur auf der Reduktion hämodynamischer Kräfte beruht, wie bereits diskutiert (40). Diese Schlussfolgerung wird weiterhin durch *in vivo* Beobachtungen am Mesenterium von Ratten über 12h unterstützt, die zeigten, dass topische Applikation von Glukose zu vermehrten LEI führten, ohne die mikrovaskuläre Scherrate zu verändern (100).

Eine Glukose induzierte Expression von Adhäsionsmolekülen, wie bereits *in vitro* beschrieben (103), bieten ein Erklärungsmodell für vermehrte Leukozytenadhäsionen. Weiterhin ist für Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  bekannt, dass er die Fähigkeit besitzt, die Expression von Adhäsionsmolekülen (E-Selectin, VCAM-1, ICAM-1) in humanen intestinalen mikrovaskulären Endothelzellen (101) und dermalen Endothelzellen (104) dosisabhängig zu erhöhen und durch seine Abwesenheit im Knock-out-Modell zu einer verringerten Expression von Adhäsionsmolekülen zu führen (95). Es konnte gezeigt werden, dass lokal applizierter TNF- $\alpha$  *in vivo* zu einer Zunahme der Leukozyten-Endothel-Interaktionen und der Leukozyten im Interstitium in der subkutanen Mikrozirkulation führt, ohne jedoch hämodynamische Parameter, wie die mittlere

---

Blutflußgeschwindigkeit, den Durchmesser oder die Scherrate zu verändern (89, 105). Im Fettgewebe der UCP1/DTA Mäuse ist die Expression von TNF- $\alpha$  dreifach erhöht (75, 76) und zeigt damit ein ähnliches Bild wie die Serum-TNF- $\alpha$  Konzentration in adipösen Menschen und Diabetikern (106-108). Unsere Ergebnisse zeigen signifikant dreifach erhöhte TNF- $\alpha$  Konzentrationen im Serum von UCP1/DTA Mäusen. Weiterhin korrelierten die TNF- $\alpha$  Werte annähernd linear ( $R^2=0,98$ ) mit der Blutglukosekonzentration und könnten somit eine mögliche Erklärung für den weiteren Anstieg der LEI, trotz unveränderter Scherrate, bei Blutglukosewerten  $>160$  mg/dl darstellen. Gesteigerte Leukozyten-Endothel-Interaktionen können über die Leukozytenextravasation mit Anhäufung im Interstitium *in vivo* zu einer verschlechterten Wundheilung führen, wie an Darmanastomosen von Ratten mit Streptozotocin-induziertem Diabetes gezeigt werden konnte (109). Bei der Wundheilung scheint insgesamt ein Abweichen von der physiologischen Leukozytenkonzentration im Gewebe die Wundheilung zu verschlechtern (95). So führt sowohl eine Abnahme (51, 52, 110) als auch eine Zunahme an Leukozyten (50, 109, 111) im Wundgebiet zu einer verschlechterten Heilung.

In dieser Studie konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass funktionelle und morphologische mikrovaskuläre Veränderungen im subkutanen Gewebe bereits zu einem frühen Zeitpunkt nach Auftreten einer diabetischen Stoffwechsellaage vorhanden sind. Damit eignet sich das diabetische Modell der UCP1/DTA Mäuse zu weiteren Studien zur Untersuchung der Ätiologie und Pathogenese der diabetischen Mikroangiopathie und ihren Folgen. Die mikrozirkulatorischen Alterationen korrelierten mit dem Ausmaß der metabolischen Entgleisung repräsentiert durch die Blutglukosespiegel. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass auch eine Hyperglykämie von kurzer Dauer bereits nicht nur zu funktionellen, sondern auch zu morphologischen Veränderungen der Mikrozirkulation führt. Eine präzise glykämische Kontrolle kann somit die Entwicklung einer diabetischen Mikroangiopathie reduzieren. In welchem Ausmaß bereits eine eingeschränkte Glukosetoleranz und besonders postprandiale Blutzuckerspitzen zu mikroangiopathischen Veränderungen führen und zur Mortalität und Morbidität beitragen, rückt zunehmend in den wissenschaftlichen Blickpunkt und sollte weiter untersucht werden (112).

---

Um frühe mikrovaskuläre Alterationen zu erkennen, könnte ein mikrovaskuläres Monitoring der Patienten mit Diabetes mellitus oder eingeschränkter Glukosetoleranz notwendig werden. Erste nichtinvasive Methoden zur Erfassung von mikrovaskulären Veränderungen in der Konjunktiva (42) oder der Schleimhaut bzw. der Oberfläche von Organen (113) sind bereits beschrieben.

Die wachsende Erkenntnis zur inflammatorischen Komponente des Diabetes mellitus, die durch unsere Ergebnisse weiter untermauert werden konnte, weist darauf hin, dass neue anti-inflammatorische Therapiestrategien, wie beispielweise die niedrigdosierte Anwendung von Cyclooxygenase-Inhibitoren (114, 115), eine Möglichkeit darstellen könnten, die mikrovaskuläre inflammatorische Komponente des Diabetes zu reduzieren und somit mikrovaskuläre Alterationen zu verhüten. Weitere Untersuchungen sollten diese Therapiemöglichkeiten evaluieren.

---

## **5. Zusammenfassung**

Vaskuläre Komplikationen bestimmen wesentlich die Morbidität und Mortalität von diabetischen Patienten. Trotz der Bedeutung mikrovaskulärer Eigenschaften ist wenig bekannt über die endothelialen Zellveränderungen und ihrer pathophysiologischen Auswirkungen während der Entwicklung des Diabetes mellitus, sowie ihrer Korrelation zur metabolischen Situation. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe der Rückenhautkammerpräparation (dorsal skin-fold chamber) und der Fluoreszenzmikroskopie kontinuierlich, nicht-invasiv und *in vivo*, funktionelle und morphologische mikrovaskuläre Veränderungen in transgenen, hyperglykämischen und hyperinsulinämischen UCP1/DTA Mäusen gemessen. UCP1/DTA Mäusen zeigten hierbei eine dramatische Reduktion der Gefäßdichte, welche auf eine deutliche Reduktion kleinster Gefäße zurückzuführen war. Die vaskuläre Permeabilität und die Leukozyten-Endothel-Interaktionen (LEIs) waren signifikant erhöht. Das Ausmaß der mikrovaskulären Alterationen korrelierte hierbei mit dem Ausmaß der metabolischen Dysfunktion. Die beobachtete, reduzierte Gewebepfusion könnte eine Rolle bei der, bei Diabetikern beobachteten, verschlechterten Wundheilung spielen. Die erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität scheint, als frühes Zeichen endothelialer Dysfunktion, einen Indikator für beginnende, vaskuläre Alterationen während des initialen Diabetes zu bieten. Die gefundenen erhöhten LEI unterstützen, zusammen mit erhöhten TNF- $\alpha$  Spiegel, die wachsende Erkenntnis einer inflammatorischen Komponente der diabetischen Krankheit. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass ein frühes mikrovaskuläres Monitoring von diabetischen Patienten, oder bereits von Patienten mit pathologischer Glukosetoleranz, ein Benefit zur Früherkennung mikrovaskulärer Alterationen erbringen könnte. Die wachsende Erkenntnis der inflammatorischen Komponente des Diabetes mellitus, welche durch die Ergebnisse dieser Studie weiter untermauert werden konnte, weist darauf hin, dass neue anti-inflammatorische Therapiestrategien, wie beispielweise die niedrigdosierte Anwendung von Cyclooxygenase-Inhibitoren, eine Möglichkeit darstellen könnten, die mikrovaskuläre inflammatorische Komponente des Diabetes zu reduzieren und somit mikrovaskuläre Alterationen zu verhüten. Weitere Untersuchungen sollten diese Therapiemöglichkeiten evaluieren.

---

## **6. Literaturverzeichnis**

1. Brückel, J., Köbberling, J. Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. In: Scherbaum, W.A., Landgraf, R. (Hrsg) Praxisleitlinien der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG). Diabetes und Stoffwechsel, *11*: 6-8, 2002.
  2. Janka, H. U. and Michaelis, D. [Epidemiology of diabetes mellitus: prevalence, incidence, pathogenesis, and prognosis]. *Z Arztl Fortbild Qualitätssich*, *96*: 159-165., 2002.
  3. Barendregt, J. J., Baan, C. A., and Bonneux, L. An indirect estimate of the incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Epidemiology*, *11*: 274-279., 2000.
  4. Landgraf, R., Scriba, P.C. Diabetes mellitus. In: Classen, M., Diehl, V., Kochsiek, K. (Hrsg) Innere Medizin. Urban und Schwarzenberg München Wien Baltimore, *4. Auflage*: 895-924, 1998.
  5. Bertoni, A. G., Krop, J. S., Anderson, G. F., and Brancati, F. L. Diabetes-related morbidity and mortality in a national sample of U.S. elders. *Diabetes Care*, *25*: 471-475., 2002.
  6. Roper, N. A., Bilous, R. W., Kelly, W. F., Unwin, N. C., and Connolly, V. M. Cause-specific mortality in a population with diabetes: South Tees Diabetes Mortality Study. *Diabetes Care*, *25*: 43-48., 2002.
  7. Spijkerman, A. M., Dekker, J. M., Nijpels, G., Jager, A., Kostense, P. J., Van Hinsbergh, V. W., Bouter, L. M., Heine, R. J., and Stehouwer, C. D. Impact of diabetes duration and cardiovascular risk factors on mortality in type 2 diabetes: the Hoorn Study. *Eur J Clin Invest*, *32*: 924-930., 2002.
  8. Barrett-Connor, E. and Wingard, D. L. Sex differential in ischemic heart disease mortality in diabetics: a prospective population-based study. *Am J Epidemiol*, *118*: 489-496., 1983.
  9. Rathmann, W., Icks, A., Haastert, B., Giani, G., Lowel, H., and Mielck, A. Undiagnosed diabetes mellitus among patients with prior myocardial infarction. *Z Kardiol*, *91*: 620-625., 2002.
  10. Angeja, B. G., de Lemos, J., Murphy, S. A., Marble, S. J., Antman, E. M., Cannon, C. P., Braunwald, E., and Gibson, C. M. Impact of diabetes mellitus on epicardial and microvascular flow after fibrinolytic therapy. *Am Heart J*, *144*: 649-656., 2002.
  11. Janka, H. U., Standl, E., and Mehnert, H. Peripheral vascular disease in diabetes mellitus and its relation to cardiovascular risk factors: screening with the doppler ultrasonic technique. *Diabetes Care*, *3*: 207-213., 1980.
-

12. Stiegler, H., Standl, E., Frank, S., and Mendler, G. Failure of reducing lower extremity amputations in diabetic patients: results of two subsequent population based surveys 1990 and 1995 in Germany. *Vasa*, 27: 10-14., 1998.
  13. Trautner, C., Haastert, B., Spraul, M., Giani, G., and Berger, M. Unchanged incidence of lower-limb amputations in a German City, 1990- 1998. *Diabetes Care*, 24: 855-859., 2001.
  14. Trautner, C., Haastert, B., Giani, G., and Berger, M. Amputations and diabetes: a case-control study. *Diabet Med*, 19: 35-40., 2002.
  15. Stehouwer, C. D., Fischer, H. R., van Kuijk, A. W., Polak, B. C., and Donker, A. J. Endothelial dysfunction precedes development of microalbuminuria in IDDM. *Diabetes*, 44: 561-564., 1995.
  16. Haffner, S. M., Lehto, S., Ronnema, T., Pyorala, K., and Laakso, M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med*, 339: 229-234., 1998.
  17. Dahl-Jorgensen, K. Diabetic microangiopathy. *Acta Paediatr Suppl*, 425: 31-34., 1998.
  18. Thieler, H. [Dialysis treatment of chronic renal failure]. *Zentralbl Chir*, 118: 118-121, 1993.
  19. Schwenger, V., Mussig, C., Hergesell, O., Zeier, M., and Ritz, E. [Incidence and clinical characteristics of renal insufficiency in diabetic patients]. *Dtsch Med Wochenschr*, 126: 1322-1326., 2001.
  20. Morrish, N. J., Wang, S. L., Stevens, L. K., Fuller, J. H., and Keen, H. Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologia*, 44 Suppl 2: S14-21., 2001.
  21. Icks, A., Trautner, C., Haastert, B., Berger, M., and Giani, G. Blindness due to diabetes: population-based age- and sex-specific incidence rates. *Diabet Med*, 14: 571-575., 1997.
  22. Trautner, C., Haastert, B., Giani, G., and Berger, M. Incidence of blindness in southern Germany between 1990 and 1998. *Diabetologia*, 44: 147-150., 2001.
  23. Krumpaszky, H. G., Ludtke, R., Mickler, A., Klauss, V., and Selbmann, H. K. Blindness incidence in Germany. A population-based study from Wurttemberg-Hohenzollern. *Ophthalmologica*, 213: 176-182, 1999.
  24. Herman, W. H., Teutsch, S. M., Sepe, S. J., Sinnock, P., and Klein, R. An approach to the prevention of blindness in diabetes. *Diabetes Care*, 6: 608-613., 1983.
-

25. Axelrod, D. A., Upchurch, G. R., Jr., DeMonner, S., Stanley, J. C., Khuri, S., Daley, J., Henderson, W. G., and Hayward, R. Perioperative cardiovascular risk stratification of patients with diabetes who undergo elective major vascular surgery. *J Vasc Surg*, 35: 894-901., 2002.
  26. Charra, B., VoVan, C., Marcelli, D., Ruffet, M., Jean, G., Hurot, J. M., Terrat, J. C., Vanel, T., and Chazot, C. Diabetes mellitus in Tassin, France: remarkable transformation in incidence and outcome of ESRD in diabetes. *Adv Ren Replace Ther*, 8: 42-56., 2001.
  27. Eschwege, E. and Balkau, B. Hyperglycaemia: link to excess mortality. *Int J Clin Pract Suppl* 3-6., 2001.
  28. Folkman, J. Angiogenesis. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, (eds) *Harrison's Textbook of Internal Medicine*. McGraw-Hill, 15th Edition: 517-530, 2001.
  29. Schiebler, T. H. Das Kreislaufsystem. In: *Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen unter Berücksichtigung der Histophysiologie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 4. Auflage: 285-305, 1996.
  30. Leonard, E. F. and Jorgensen, S. B. The analysis of convection and diffusion in capillary beds. *Annu Rev Biophys Bioeng*, 3: 293-339, 1974.
  31. Yuan, F., Salehi, H. A., Boucher, Y., Vasthare, U. S., Tuma, R. F., and Jain, R. K. Vascular permeability and microcirculation of gliomas and mammary carcinomas transplanted in rat and mouse cranial windows. *Cancer Res*, 54: 4564-4568, 1994.
  32. Dellian, M., Yuan, F., Trubetskoy, V. S., Torchilin, V. P., and Jain, R. K. Vascular permeability in a human tumour xenograft: molecular charge dependence. *Br J Cancer*, 82: 1513-1518., 2000.
  33. Yuan, F., Dellian, M., Fukumura, D., Leunig, M., Berk, D. A., Torchilin, V. P., and Jain, R. K. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res*, 55: 3752-3756., 1995.
  34. Renkin, E. M. Cellular and intercellular transport pathways in exchange vessels. *Am Rev Respir Dis*, 146: S28-31., 1992.
  35. Feng, D., Nagy, J.A., Pyne, K., Hammel, I., Dvorak, H.F., Dvorak, A.M. Pathways of Macromolecular Extravasation across Microvascular Endothelium in Response to VPF/VEGF and Other Vasoactive Mediators. *Microcirculation*, 6: 23-44, 1999.
  36. Firth, J. A. Endothelial barriers: from hypothetical pores to membrane proteins. *J Anat*, 200: 541-548., 2002.
-

37. Kampfer, H., Pfeilschifter, J., and 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. *Lab Invest*, 81: 361-373., 2001.
  38. Domarus, D. V., Deuble-Bente K. Vaskuläre Erkrankungen der Netzhaut. In: Böcker W, Denk H, Heitz PhU (Hrsg) Pathologie. Urban und Schwarzenberg München Wien Baltimore 340, 1997.
  39. Cheung, A. T., Perez, R. V., and Chen, P. C. Improvements in diabetic microangiopathy after successful simultaneous pancreas-kidney transplantation: a computer-assisted intravital microscopy study on the conjunctival microcirculation. *Transplantation*, 68: 927-932., 1999.
  40. Panes, J., Kurose, I., Rodriguez-Vaca, D., Anderson, D. C., Miyasaka, M., Tso, P., and Granger, D. N. Diabetes exacerbates inflammatory responses to ischemia-reperfusion. *Circulation*, 93: 161-167., 1996.
  41. Gaehtgens, P. Das Kreislaufsystem In: Klinker, R., Silbernagel, S. (Hrsg) Lehrbuch der Physiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 2. Auflage: 141-184, 1996.
  42. Cheung, A. T., Ramanujam, S., Greer, D. A., Kumagai, L. F., and Aoki, T. T. Microvascular abnormalities in the bulbar conjunctiva of patients with type 2 diabetes mellitus. *Endocr Pract*, 7: 358-363., 2001.
  43. Leunig, M., Yuan, F., Menger, M. D., Boucher, Y., Goetz, A. E., Messmer, K., and Jain, R. K. Angiogenesis, microvascular architecture, microhemodynamics, and interstitial fluid pressure during early growth of human adenocarcinoma LS174T in SCID mice. *Cancer Res*, 52: 6553-6560, 1992.
  44. Antonetti, D. A., Lieth, E., Barber, A. J., and Gardner, T. W. Molecular mechanisms of vascular permeability in diabetic retinopathy. *Semin Ophthalmol*, 14: 240-248., 1999.
  45. Munn, L. L., Melder, R.J., Jain, R.K. Role of Erythrocytes in Leukocyte-Endothelial Interactions: Mathematical Model and Experimental Validation. *Biophys. J.*, 71: 466-478, 1996.
  46. Lutty, G. A., Cao, J., and McLeod, D. S. Relationship of polymorphonuclear leukocytes to capillary dropout in the human diabetic choroid. *Am J Pathol*, 151: 707-714., 1997.
  47. Miyamoto, K., Hiroshiba, N., Tsujikawa, A., and Ogura, Y. In vivo demonstration of increased leukocyte entrapment in retinal microcirculation of diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 39: 2190-2194., 1998.
-

48. Schroder, S., Palinski, W., and Schmid-Schonbein, G. W. Activated monocytes and granulocytes, capillary nonperfusion, and neovascularization in diabetic retinopathy. *Am J Pathol*, 139: 81-100., 1991.
  49. Miyamoto, K., Khosrof, S., Bursell, S. E., Rohan, R., Murata, T., Clermont, A. C., Aiello, L. P., Ogura, Y., and Adamis, A. P. Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin- induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 10836-10841., 1999.
  50. Ashcroft, G. S., Yang, X., Glick, A. B., Weinstein, M., Letterio, J. L., Mizel, D. E., Anzano, M., Greenwell-Wild, T., Wahl, S. M., Deng, C., and Roberts, A. B. Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. *Nat Cell Biol*, 1: 260-266., 1999.
  51. Danon, D., Kowatch, M. A., and Roth, G. S. Promotion of wound repair in old mice by local injection of macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86: 2018-2020., 1989.
  52. Leibovich, S. J. and Ross, R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol*, 78: 71-100., 1975.
  53. Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, 6: 389-395., 2000.
  54. Singer, A. J. and Clark, R. A. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*, 341: 738-746., 1999.
  55. Hunt, T. K. The physiology of wound healing. *Ann Emerg Med*, 17: 1265-1273., 1988.
  56. Gerber, H. P., Vu, T. H., Ryan, A. M., Kowalski, J., Werb, Z., and Ferrara, N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med*, 5: 623-628., 1999.
  57. Aronson, J. Temporal and spatial increases in blood flow during distraction osteogenesis. *Clin Orthop* 124-131., 1994.
  58. Street, J., Bao, M., deGuzman, L., Bunting, S., Peale, F. V., Jr., Ferrara, N., Steinmetz, H., Hoeffel, J., Cleland, J. L., Daugherty, A., van Bruggen, N., Redmond, H. P., Carano, R. A., and Filvaroff, E. H. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 9656-9661., 2002.
  59. Chiarelli, F., Santilli, F., and Mohn, A. Role of growth factors in the development of diabetic complications. *Horm Res*, 53: 53-67, 2000.
-

60. Koya, D. and King, G. L. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*, 47: 859-866., 1998.
  61. Like, A. A. and Rossini, A. A. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science*, 193: 415-417., 1976.
  62. McEvoy, R. C., Thomas, N. M., Hellerstrom, C., Ginsberg-Fellner, F., and Moran, T. M. Multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes in the mouse: further evidence for involvement of an anti-B cell cytotoxic cellular autoimmune response. *Diabetologia*, 30: 232-238., 1987.
  63. Like, A. A., Appel, M. C., Williams, R. M., and Rossini, A. A. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis in mice. Morphologic and physiologic studies. *Lab Invest*, 38: 470-486., 1978.
  64. Ziegler, M., Ziegler, B., and Hehmke, B. Severe hyperglycaemia caused by autoimmunization to beta cells in rats. *Diabetologia*, 27 *Suppl*: 163-165., 1984.
  65. im Walde, S. S., Dohle, C., Schott-Ohly, P., and Gleichmann, H. Molecular target structures in alloxan-induced diabetes in mice. *Life Sci*, 71: 1681-1694., 2002.
  66. Sone, M. and Osamura, R. Y. Leptin and the pituitary. *Pituitary*, 4: 15-23., 2001.
  67. Martin, R. J., Wangsness, P. J., and Gahagan, J. H. Diurnal changes in serum metabolites and hormones in lean and obese Zucker rats. *Horm Metab Res*, 10: 187-192., 1978.
  68. Bray, G. A. The Zucker-fatty rat: a review. *Fed Proc*, 36: 148-153., 1977.
  69. Bray, G. A. and York, D. A. Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol Rev*, 59: 719-809., 1979.
  70. Coleman, D. L. and Burkart, D. L. Plasma corticosterone concentrations in diabetic (db) mice. *Diabetologia*, 13: 25-26., 1977.
  71. Dubuc, P. U. Basal corticosterone levels of young og/ob mice. *Horm Metab Res*, 9: 95-97., 1977.
  72. Saito, M. and Bray, G. A. Diurnal rhythm for corticosterone in obese (ob/ob) diabetes (db/db) and gold-thioglucose-induced obesity in mice. *Endocrinology*, 113: 2181-2185., 1983.
  73. Lowell, B. B., V, S. S., Hamann, A., Lawitts, J. A., Himms-Hagen, J., Boyer, B. B., Kozak, L. P., and Flier, J. S. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue [see comments]. *Nature*, 366: 740-742, 1993.
  74. Klaus, S., Munzberg, H., Truloff, C., and Heldmaier, G. Physiology of transgenic mice with brown fat ablation: obesity is due to lowered body temperature. *Am J Physiol*, 274: R287-293, 1998.
-

75. Hamann, A., Benecke, H., Le Marchand-Brustel, Y., Susulic, V. S., Lowell, B. B., and Flier, J. S. Characterization of insulin resistance and NIDDM in transgenic mice with reduced brown fat. *Diabetes*, *44*: 1266-1273, 1995.
  76. Hamann, A., Flier, J. S., and Lowell, B. B. Decreased brown fat markedly enhances susceptibility to diet-induced obesity, diabetes, and hyperlipidemia. *Endocrinology*, *137*: 21-29., 1996.
  77. Cittadini, A., Mantzoros, C.S., Hampton, T.G., Travers, K.E., Katz, S.E., Morgan, J.P., Flier, J.S., Douglas, P.S. Cardiovascular abnormalities in transgenic mice with reduced brown fat: an animal model of obesity. *Circulation*, *100*: 2177-2183, 1999.
  78. Yuan, F., Leunig, M., Berk, D. A., and Jain, R. K. Microvascular permeability of albumin, vascular surface area, and vascular volume measured in human adenocarcinoma LS174T using dorsal chamber in SCID mice. *Microvasc Res*, *45*: 269-289, 1993.
  79. Hansen-Algenstaedt, N., Stoll, B. R., Padera, T. P., Dolmans, D. E., Hicklin, D. J., Fukumura, D., and Jain, R. K. Tumor oxygenation in hormone-dependent tumors during vascular endothelial growth factor receptor-2 blockade, hormone ablation, and chemotherapy. *Cancer Res*, *60*: 4556-4560., 2000.
  80. Hansen, N., Fukumura, D., Stoll, B.R., Hicklin, D.J., and Jain, R.K. Second wave of angiogenesis during KDR/flk-1 mAb therapy. *FASEB journal*, *13*: A2, 1999.
  81. Lehr, H. A., Leunig, M., Menger, M. D., Nolte, D., and Messmer, K. Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol*, *143*: 1055-1062., 1993.
  82. Steinbauer, M., Harris, A. G., Abels, C., and Messmer, K. Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks Arch Surg*, *385*: 290-298., 2000.
  83. Lipowsky, H. H. and Zweifach, B. W. Application of the "two-slit" photometric technique to the measurement of microvascular volumetric flow rates. *Microvasc Res*, *15*: 93-101., 1978.
  84. Harms, V. Die Strömung von Fluiden. In: *Physik*. Harms Verlag - Kiel, *13. Auflage*: 67-76, 1994.
  85. Yuan, F., Leunig, M., Huang, S. K., Berk, D. A., Papahadjopoulos, D., and Jain, R. K. Microvascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (stealth) liposomes in a human tumor xenograft. *Cancer Res*, *54*: 3352-3356., 1994.
-

86. Hansen-Algenstaedt, N., Fukumura, D., Stoll, B., Hicklin, D. J., and Jain, R. K. Oxygen levels during antivasular, neoplastic and combined therapy. *Proc AACR*, *40*: 458, 1999.
  87. Brizel, D. M., Klitzman, B., Cook, J. M., Edwards, J., Rosner, G., and Dewhirst, M. W. A comparison of tumor and normal tissue microvascular hematocrits and red cell fluxes in a rat window chamber model. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, *25*: 269-276, 1993.
  88. Lawrence, M. B. and Springer, T. A. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell*, *65*: 859-873., 1991.
  89. Fukumura, D., Salehi, H. A., Witwer, B., Tuma, R. F., Melder, R. J., and Jain, R. K. Tumor necrosis factor alpha-induced leukocyte adhesion in normal and tumor vessels: effect of tumor type, transplantation site, and host strain. *Cancer Res*, *55*: 4824-4829., 1995.
  90. Von Andrian, U. H., Hansell, P., Chambers, J. D., Berger, E. M., Torres Filho, I., Butcher, E. C., and Arfors, K. E. L-selectin function is required for beta 2-integrin-mediated neutrophil adhesion at physiological shear rates in vivo. *Am J Physiol*, *263*: H1034-1044, 1992.
  91. Antonetti, D. A., Barber, A. J., Khin, S., Lieth, E., Tarbell, J. M., and Gardner, T. W. Vascular permeability in experimental diabetes is associated with reduced endothelial occludin content: vascular endothelial growth factor decreases occludin in retinal endothelial cells. Penn State Retina Research Group. *Diabetes*, *47*: 1953-1959., 1998.
  92. Mogensen, C. E., Christensen, C. K., and Vittinghus, E. The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes*, *32 Suppl 2*: 64-78., 1983.
  93. Holash, J., Wiegand, S. J., and Yancopoulos, G. D. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene*, *18*: 5356-5362., 1999.
  94. Fajardo, L. F., Kwan, H. H., Kowalski, J., Prionas, S. D., and Allison, A. C. Dual role of tumor necrosis factor-alpha in angiogenesis. *Am J Pathol*, *140*: 539-544., 1992.
  95. Mori, R., Kondo, T., Ohshima, T., Ishida, Y., and Mukaida, N. Accelerated wound healing in tumor necrosis factor receptor p55- deficient mice with reduced leukocyte infiltration. *Faseb J*, *16*: 963-974., 2002.
  96. Das, U. N. Is metabolic syndrome X an inflammatory condition? *Exp Biol Med (Maywood)*, *227*: 989-997., 2002.
-

97. Engstrom, G., Stavenow, L., Hedblad, B., Lind, P., Eriksson, K. F., Janzon, L., and Lindgarde, F. Inflammation-sensitive plasma proteins, diabetes, and mortality and incidence of myocardial infarction and stroke: a population-based study. *Diabetes*, 52: 442-447., 2003.
  98. Rubanyi, G. M. and Vanhoutte, P. M. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol*, 250: H822-827., 1986.
  99. von Andrian, U. H., Chambers, J. D., McEvoy, L. M., Bargatze, R. F., Arfors, K. E., and Butcher, E. C. Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 7538-7542, 1991.
  100. Booth, G., Stalker, T. J., Lefer, A. M., and Scalia, R. Elevated ambient glucose induces acute inflammatory events in the microvasculature: effects of insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 280: E848-856., 2001.
  101. Haraldsen, G., Kvale, D., Lien, B., Farstad, I. N., and Brandtzaeg, P. Cytokine-regulated expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human microvascular endothelial cells. *J Immunol*, 156: 2558-2565., 1996.
  102. Schaffler, A., Arndt, H., Scholmerich, J., and Palitzsch, K. Acute hyperglycaemia causes severe disturbances of mesenteric microcirculation in an in vivo rat model. *Eur J Clin Invest*, 28: 886-893., 1998.
  103. Morigi, M., Angioletti, S., Imberti, B., Donadelli, R., Micheletti, G., Figliuzzi, M., Remuzzi, A., Zoja, C., and Remuzzi, G. Leukocyte-endothelial interaction is augmented by high glucose concentrations and hyperglycemia in a NF-kB-dependent fashion. *J Clin Invest*, 101: 1905-1915., 1998.
  104. Swerlick, R. A., Lee, K. H., Li, L. J., Sepp, N. T., Caughman, S. W., and Lawley, T. J. Regulation of vascular cell adhesion molecule 1 on human dermal microvascular endothelial cells. *J Immunol*, 149: 698-705., 1992.
  105. Vyalov, S., Desmouliere, A., and Gabbiani, G. GM-CSF-induced granulation tissue formation: relationships between macrophage and myofibroblast accumulation. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 63: 231-239, 1993.
  106. Dandona, P., Weinstock, R., Thusu, K., Abdel-Rahman, E., Aljada, A., and Wadden, T. Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients: fall with weight loss. *J Clin Endocrinol Metab*, 83: 2907-2910., 1998.
  107. Tsukui, S., Kanda, T., Nara, M., Nishino, M., Kondo, T., and Kobayashi, I. Moderate-intensity regular exercise decreases serum tumor necrosis factor-alpha and HbA1c levels in healthy women. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 24: 1207-1211., 2000.
-

108. Zahorska-Markiewicz, B., Janowska, J., Olszanecka-Glinianowicz, M., and Zurakowski, A. Serum concentrations of TNF-alpha and soluble TNF-alpha receptors in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 24: 1392-1395., 2000.
  109. Verhofstad, M. H., Lange, W. P., van der Laak, J. A., Verhofstad, A. A., and Hendriks, T. Microscopic analysis of anastomotic healing in the intestine of normal and diabetic rats. *Dis Colon Rectum*, 44: 423-431., 2001.
  110. Nagaoka, T., Kaburagi, Y., Hamaguchi, Y., Hasegawa, M., Takehara, K., Steeber, D. A., Tedder, T. F., and Sato, S. Delayed wound healing in the absence of intercellular adhesion molecule- 1 or L-selectin expression. *Am J Pathol*, 157: 237-247., 2000.
  111. Ashcroft, G. S., Lei, K., Jin, W., Longenecker, G., Kulkarni, A. B., Greenwell-Wild, T., Hale-Donze, H., McGrady, G., Song, X. Y., and Wahl, S. M. Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing. *Nat Med*, 6: 1147-1153., 2000.
  112. Hanefeld, M. and Temelkova-Kurktschiev, T. Control of post-prandial hyperglycemia--an essential part of good diabetes treatment and prevention of cardiovascular complications. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 12: 98-107., 2002.
  113. Groner, W., Winkelmann, J. W., Harris, A. G., Ince, C., Bouma, G. J., Messmer, K., and Nadeau, R. G. Orthogonal polarization spectral imaging: a new method for study of the microcirculation. *Nat Med*, 5: 1209-1212., 1999.
  114. Vane, J. The evolution of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their mechanisms of action. *Drugs*, 33: 18-27., 1987.
  115. Ridker, P. M., Cushman, M., Stampfer, M. J., Tracy, R. P., and Hennekens, C. H. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med*, 336: 973-979., 1997.
-

## **7. Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei dieser Arbeit unterstützten und mich auf dem beschwerlichen Weg vom ersten Versuch bis zur Fertigstellung der Dissertation begleitet haben.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Rüther, meinem Doktorvater, möchte ich für die wissenschaftliche Unterstützung danken. Weiterhin ermöglichte er mir, im Rahmen des Graduiertenkollegs 476 „*Knochensubstanz und –strukturverlust; Integration von Zellfunktion, Biomechanik, Klinik und Therapie.*“, mich vollständig auf meine wissenschaftliche Arbeit zu konzentrieren und stellte mir eine Plattform zur Verfügung, die mir ein optimales Arbeiten ermöglichte.

Weiterhin danke ich meinen wissenschaftlichen Betreuern Dr. Nils Hansen-Algenstaedt und Dr. Petra Algenstaedt. Sie ermöglichten, durch ihre Zielstrebigkeit und Hilfestellung zu jeder Tages- und Nachtzeit, nicht nur die Fertigstellung dieser Arbeit, sondern förderten in jeder Hinsicht mein wissenschaftliches Interesse und lehrten mich durch zahllose Diskussionen wissenschaftliches Arbeiten auf höchstem Niveau. Ich wünsche beiden, dass sie ihre Ziele erreichen mögen, für die sie so hart gearbeitet haben.

Ich danke auch dem gesamten Laborteam für Gedankenanstöße im technischen und wissenschaftlichen Rahmen – insbesondere Tanja Biermann für ihre stete Unterstützung während der alternierenden Erfolgsphasen.

Dank gebührt auch Dipl. phys. Jerome Meyer für den theoretisch-mathematischen Gedankenaustausch im Rahmen dieser Studie.

Besonderer Dank gebührt meinen Eltern, deren Zuspruch und Unterstützung während des gesamten Studiums und auch während der Dissertation beispielhaft waren, und die in mir den Ergeiz und die Zielstrebigkeit geweckt haben, dieses Projekt durchzuführen. Ich hoffe, dass ich Ihnen mit dieser Arbeit einen geringen Teil des Dankes geben kann, den sie verdienen.

Letztlich möchte ich Sonia Kachel danken, die jederzeit für mich da war, und mir Freiraum, Verständnis und Halt in einem bewundernswerten Maße entgegengebracht hat.

Hamburg, den 10.02.2003

Christian Schäfer

---

## **8. Curriculum Vitae**

Christian Schäfer, geb. am 14.03.1975 in Bremen

1981-1994	<b>Schulbildung</b> : Grundschule und Gymnasium in Bremen mit Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
1995-2003	<b>Hochschulausbildung</b> : Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
1997	Ärztliche Vorprüfung; Note 2,33
1998	1. Staatsexamen; Note 2,0
2002	2. Staatsexamen; Note 2,0
2003	3. Staatsexamen; Note 1,0
26.06.2003	Abschluss des Medizinstudiums; Gesamtnote -gut (1,66)-
04/2002-03/2003	<b>Praktisches Jahr</b> Prof. Dr. Spiller; Innere Medizin; AK Barmbek Prof. Dr. Rüter; Orthopädie; UKE Prof. Dr. Gross / Dr. Meinhövel; Chirurgie; AK Barmbek
	<b>Famulaturen</b>
07/1999-08/1999	Dr. Bauer; Traumatologie und Orthopädie Marbella High Care Klinik; Spanien
08/1999-09/1999	Prof. Dr. Lison; Kardiologie und Nephrologie Zentralkrankenhaus St.-Jürgen-Straße; Bremen
09/1999-10/1999	Prof. Dr. Rüter; Orthopädie Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
07/2000-09/2000	Berzin, M.D.; Chirurgie Chris Hani Baragwanath Hospital University of Witwatersrand Johannesburg, South Africa

---

**Wissenschaftliche Förderung**

04/2001-11/2002 Graduiertter des *Graduiertenkollegs GRK 476 – „Knochensubstanz und –strukturverlust; Integration von Zellfunktion, Biomechanik, Klinik und Therapie.“*

**Publikationen**

02/2003 *Microvascular Alterations in Diabetic Mice Correlate with Level of Hyperglycemia*  
(Diabetes, Vol. 52, Issue 2, pp.542-49, 1. February 2003)

03/2003 *Bilaterally Increased VEGF-Levels in Muscles during Experimental Unilateral Callus Distraction*  
(Accepted 02/2003; Journal of Orthopaedic Research)

**Präsentationen**

05/2002 *Morphological and Functional Microvascular Alterations in Diabetic Mice*  
Vortrag auf der 37. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft in Dresden mit Gewährung eines Travel Grants

05/2001 *Intravital Monitoring of Insulin Related Microvascular Dysfunktions Rationalizes Anti-Angiogenetic Therapy*  
VIII<sup>th</sup> International Symposium on Insulin Receptors and Insulin Action in Genf, Schweiz

02/2002 *Diabetes Specific Morphological and Functional Microvascular Alterations*  
Keystone Symposia – Angiogenesis in Cancer and other Diseases: From Genes to Funktion to Therapy;  
Banff, Canada

02/2002 *Nerve Growth Factor activates Angiogenesis via VEGF and its Receptors*  
Keystone Symposia – Angiogenesis in Cancer and other Diseases: From Genes to Funktion to Therapy;  
Banff, Canada

---

## **9. Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig 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.

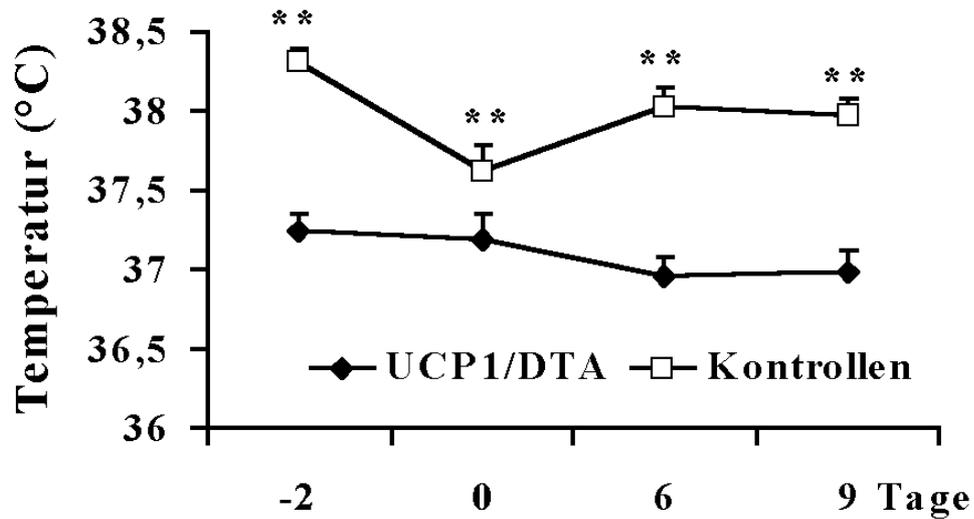
Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, den 10.02.2003

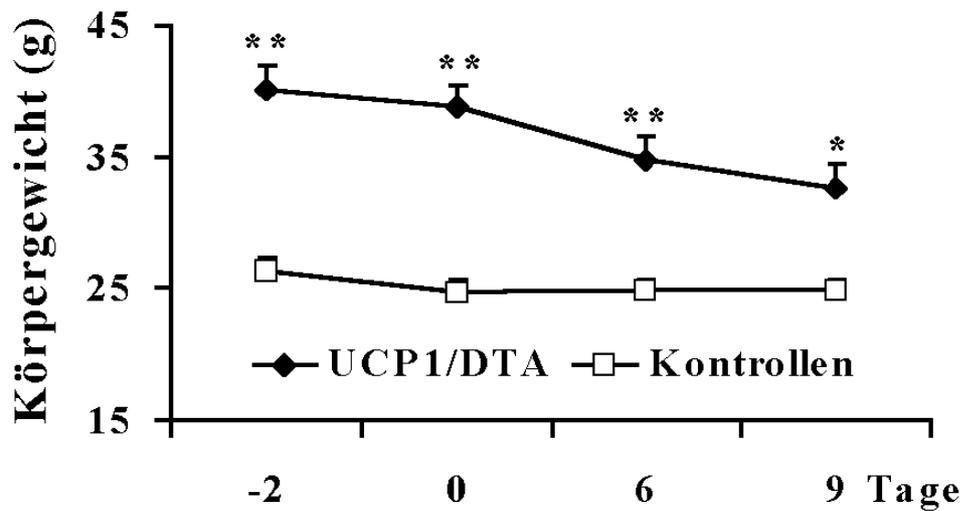
Christian Schäfer

---

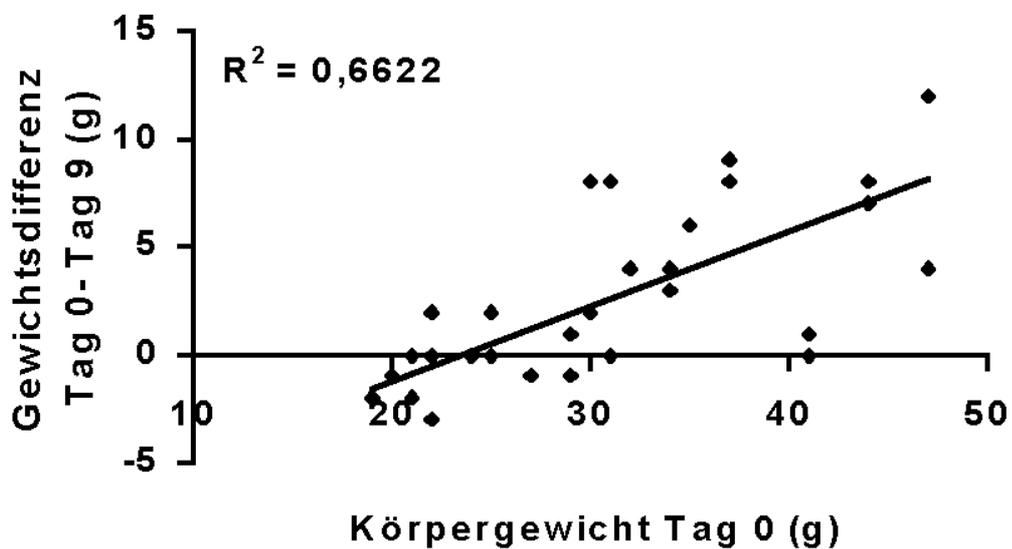
## 10. Anhang zu den Ergebnissen



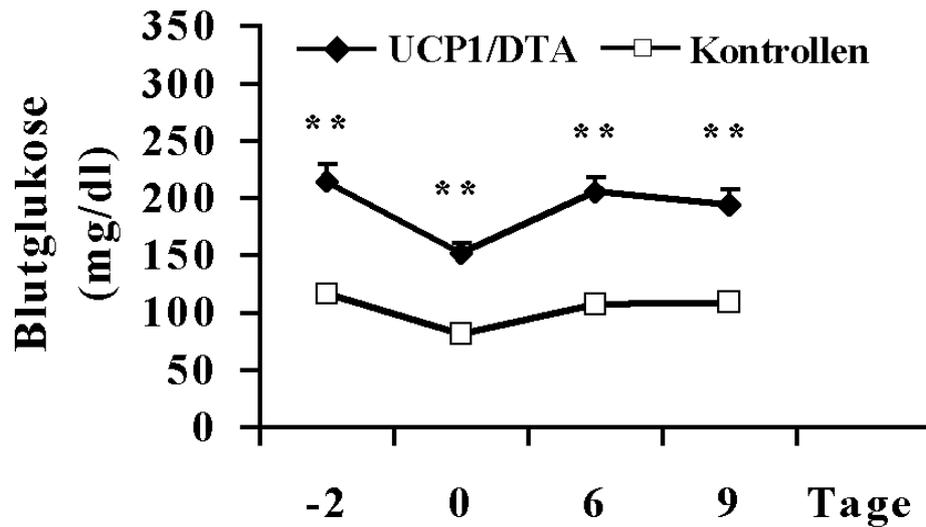
**Abb. 11** Die Körpertemperatur wurde am Tag -2, 0, 6, 9 in UCP1/DTA Mäusen (n=14) und Kontrollen (n=18) gemessen. Die Körpertemperatur der UCP1/DTA Mäuse zeigte sich über alle Messtage signifikant erniedrigt zur Kontrollgruppe. Die Werte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM (\*p<0,05; \*\*p<0,01)



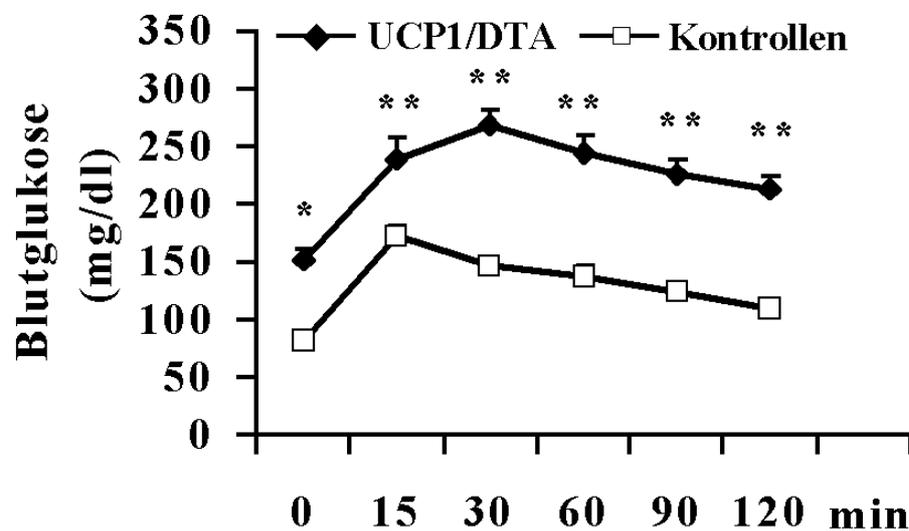
**Abb. 12** Das Körpergewicht wurde am Tag -2, 0, 6, 9 in UCP1/DTA Mäusen (n=14) und Kontrollen (n=18) gemessen und zeigte sich in UCP1/DTA Mäusen signifikant erhöht. Die Werte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM (\*p<0,05; \*\*p<0,01)



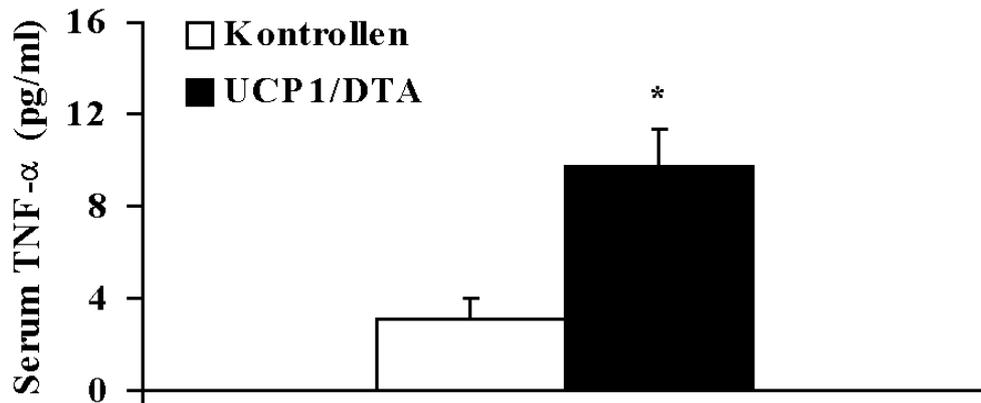
**Abb. 13** Die Differenz des Körpergewichtes (Tag 0 – Tag 9) aller Mäuse (n=32) aufgetragen in Abhängigkeit des Ausgangsgewichtes am Tag der Rückenhautkammerimplantation (Tag 0). Die Gewichtsdifferenz korrelierte signifikant mit der Höhe des Ausgangsgewichtes (p<0,01).



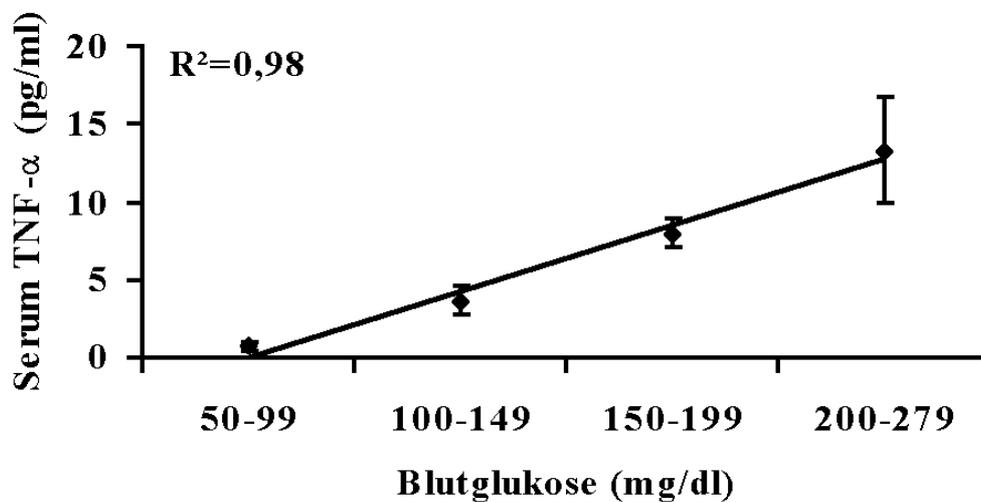
**Abb. 14** Die Blutglukose wurde an Tag -2, 0, 6, 9 in UCP1/DTA Mäusen (n=14) und Kontrollen (n=18) bestimmt. Der Tag 0 spiegelt den Nüchternblutzucker wider. UCP1/DTA Mäuse zeigten verglichen mit den Kontrolltieren signifikant erhöhte Blutglukosewerte über den gesamten Observationszeitraum. Die Werte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM (\*p<0,05; \*\*p<0,01)



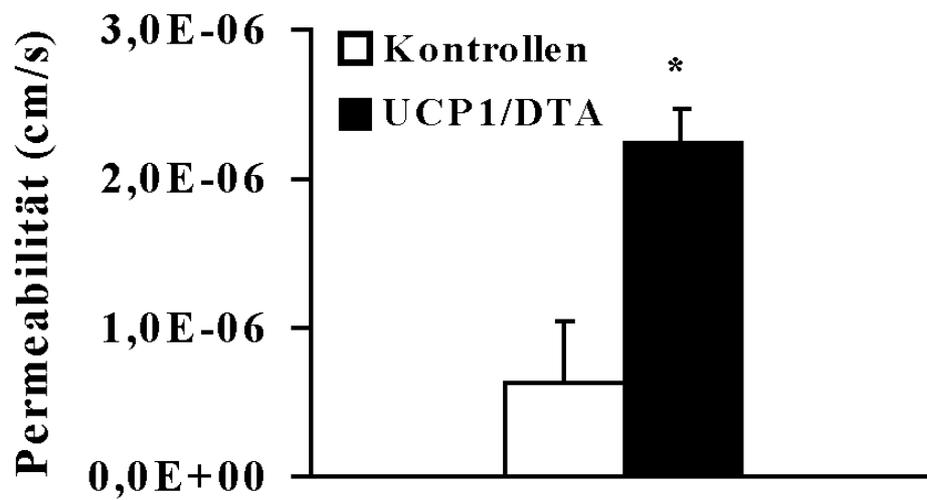
**Abb. 15** Am Tag 0 wurde vor Rückenhautkammerimplantation ein Glukose-Toleranz-Test in UCP1/DTA (n=14) und Kontrollen (n=18) durchgeführt. Die UCP1/DTA Mäuse zeigten eine pathologische Nüchternglukose (>110 mg/dl) und eine pathologische Glukosetoleranz mit einem 2h- Blutglukosewert >200 mg/dl. Die Werte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM (\*p<0,05; \*\*p<0,01)



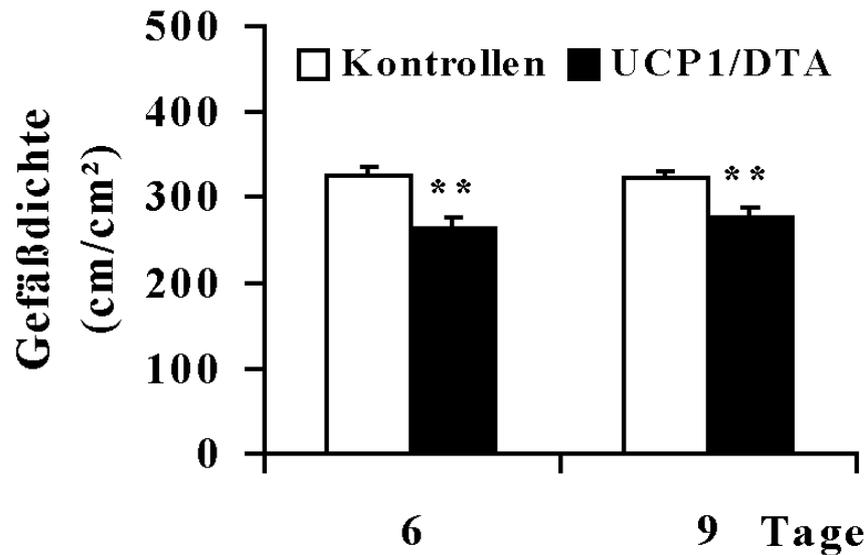
**Abb. 16** Der TNF- $\alpha$  Serum Spiegel wurde in UCP1/DTA Mäusen (n=10) und Kontrollen (n=12) mittels ELISA ermittelt. UCP1/DTA Mäuse wiesen signifikant erhöhte TNF- $\alpha$  Werte im Serum auf. Die Werte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM (\*p<0,05; \*\*p<0,01)



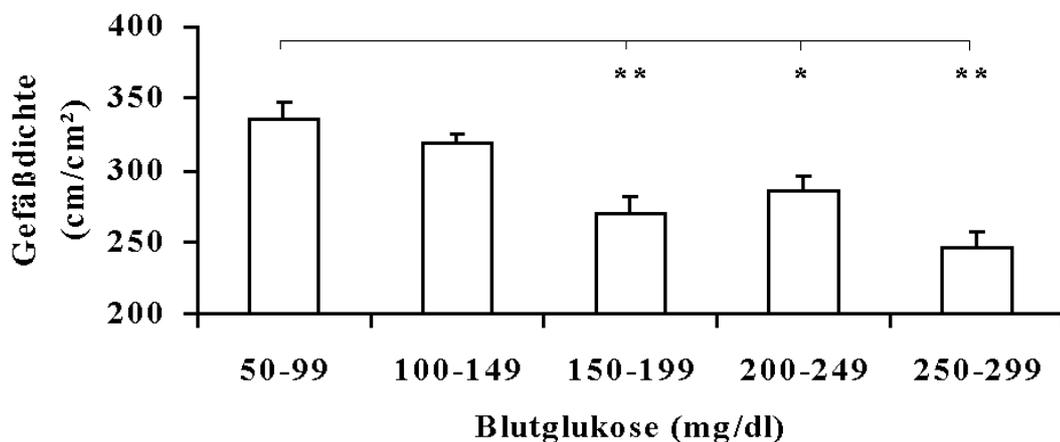
**Abb. 17** TNF- $\alpha$  Serum Spiegel aller Mäuse (n=22) aufgeführt gegen die Blutglukosewerte. Der TNF- $\alpha$  Serum Spiegel zeigte eine positive, annähernd lineare Korrelation zur Blutglukose ( $R^2=0,98$ ). Die Werte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM (\*p<0,05; \*\*p<0,01)



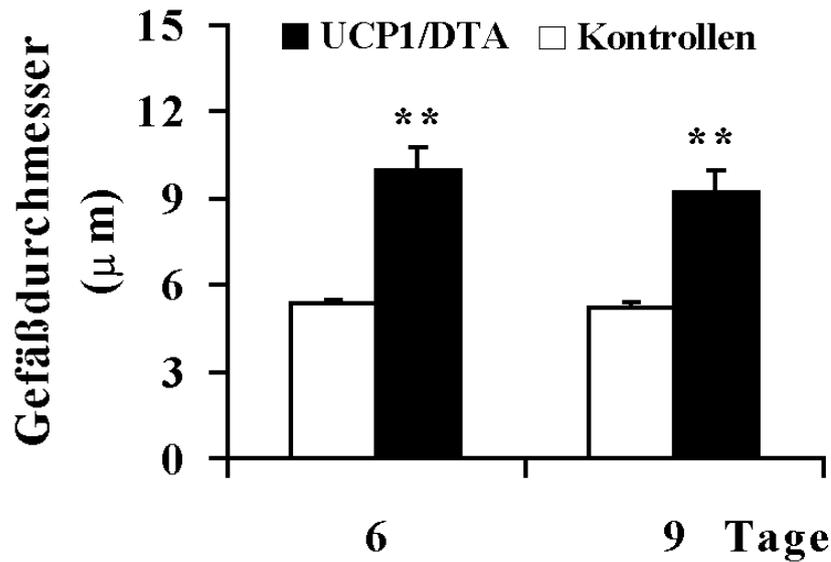
**Abb. 18** Die mikrovaskuläre Permeabilität, als sensitiver Parameter für die Integrität des Endothels war in UCP1/DTA (n=10) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=8) signifikant erhöht. Die Werte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM (\*p<0,05; \*\*p<0,01)



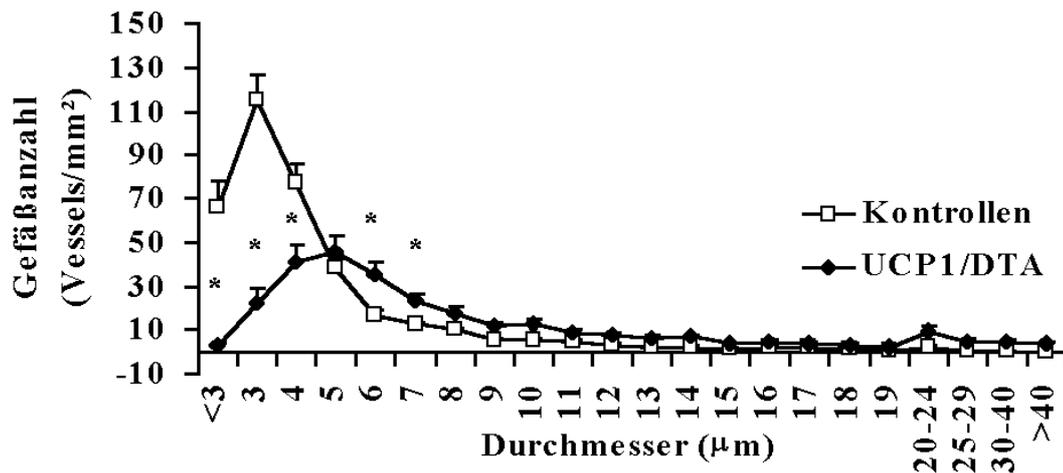
**Abb. 19** Die funktionelle Gefäßdichte bezogen auf die Observationsfläche wurde in UCP1/DTA (n=14) und Kontrollen (n=18), am Tag 6 und 9 nach Rückenhautkammerimplantation bestimmt. Die UCP1/DTA Mäuse zeigten an beiden Messpunkten signifikant erniedrigte Gefäßdichten im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die Werte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM (\*p<0,05; \*\*p<0,01)



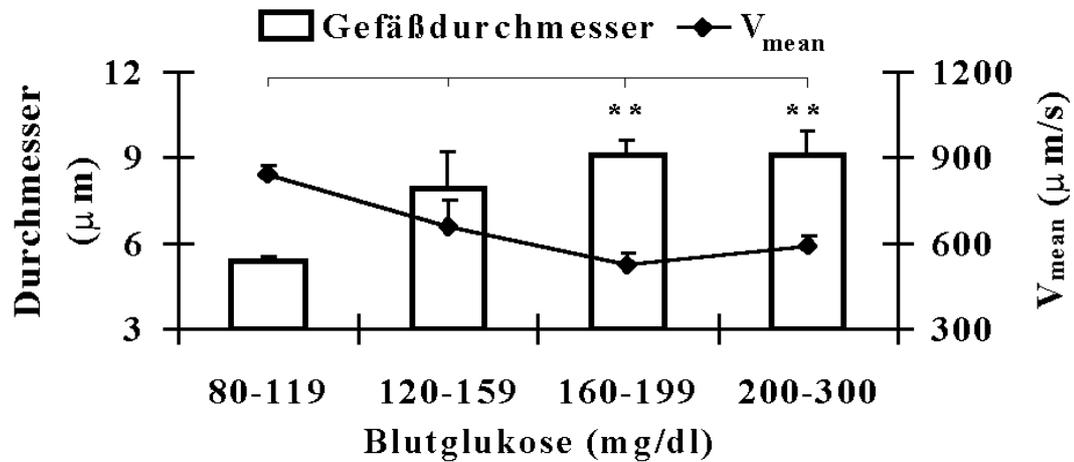
**Abb. 20** Gefäßdichte aller Mäuse und Messtage (n=64) aufgetragen gegen den Blutglukosespiegel. Die Gefäßdichte zeigte eine negative annähernd lineare Korrelation zur Blutglukose ( $R^2 = 0,86$ ; p<0,0001). Die Werte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM (\*p<0,05; \*\*p<0,01)



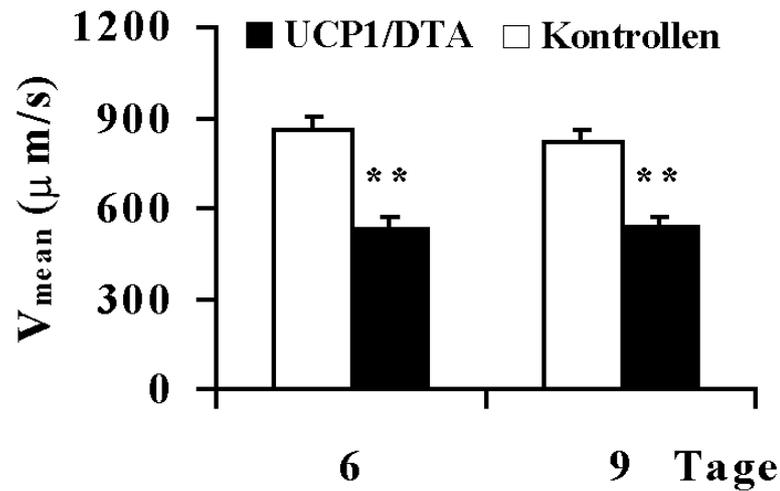
**Abb. 21** Der durchschnittliche Gefäßdurchmesser wurde in UCP1/DTA (n=14) und Kontrollen (n=18) am Tag 6 und 9 nach Rückenhautkammerimplantation gemessen. Dabei wiesen die UCP1/DTA signifikant erhöhte Gefäßdurchmesser verglichen mit der Kontrollgruppe auf. Die Werte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )



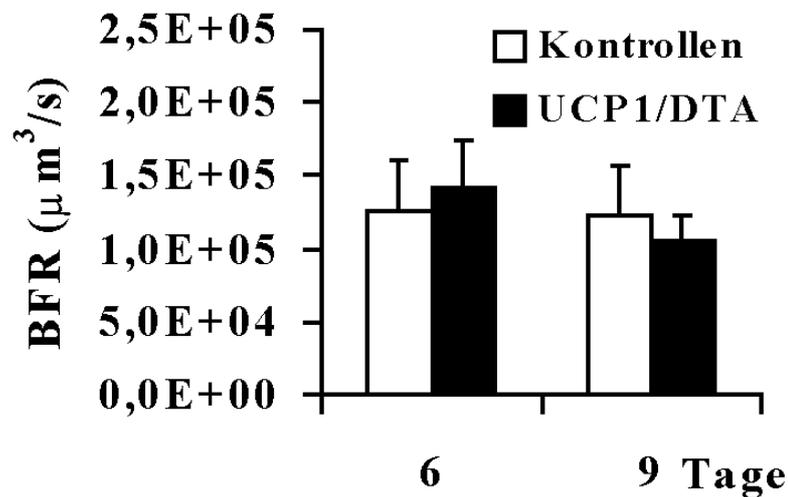
**Abb. 22** Durchschnittliche Gefäßanzahl pro Fläche aufgetragen gegen den Gefäßdurchmesser. UCP1/DTA Mäuse wiesen dabei ein signifikantes Defizit kleinster Gefäße mit Durchmessern um  $3\mu\text{m}$  auf. Zusätzlich zeigte sich der Häufigkeitsgipfel der Gefäßanzahl auf höhere Gefäßdurchmesser ( $5\mu\text{m}$ ) verschoben. Die Werte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )



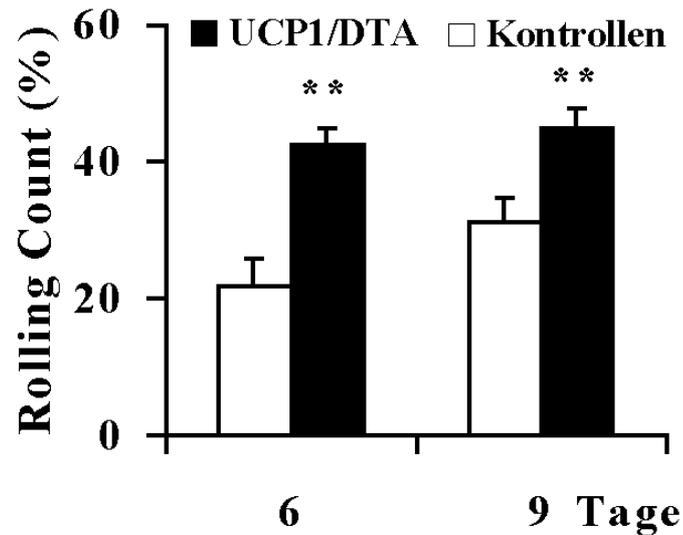
**Abb. 23** Durchschnittlicher Gefäßdurchmesser und mittlere Blutfluss-  
geschwindigkeit ( $V_{\text{mean}}$ ) aller Mäuse und Messtage ( $n=64$ ) aufgetragen gegen den  
Blutglukosespiegel. Während der Gefäßdurchmesser eine positive Korrelation zur  
Blutglukose aufwies ( $p<0,0001$ ), war  $V_{\text{mean}}$  negativ korreliert ( $p<0,0001$ ). Beide  
Parameter zeigen eine Plateauphase bei Blutglukosewerten  $>160\text{mg/dl}$ . Die Werte  
repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ )



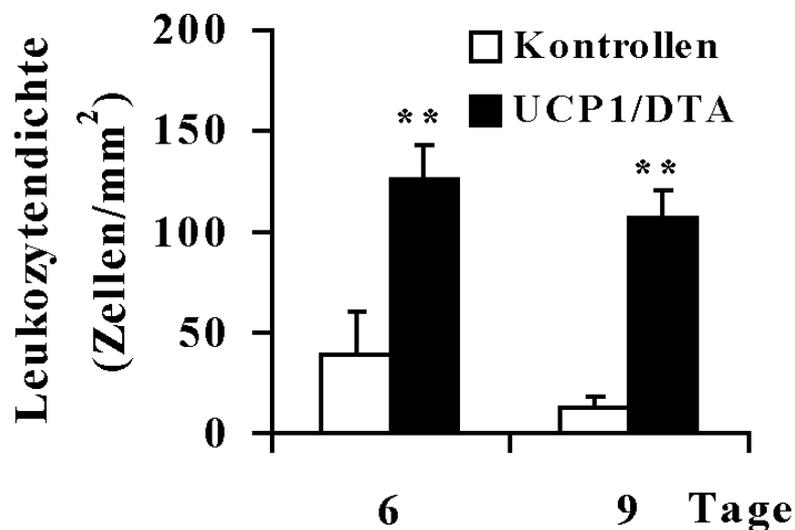
**Abb. 24** Die Blutflussgeschwindigkeit ( $V_{\text{mean}}$ ) wurde in UCP1/DTA (n=14) und Kontrollen (n=18), am Tag 6 und 9 nach Rückenhautkammerimplantation bestimmt. Die Blutflussgeschwindigkeit war in UCP1/DTA Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt. Die Werte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM (\*p<0,05; \*\*p<0,01)



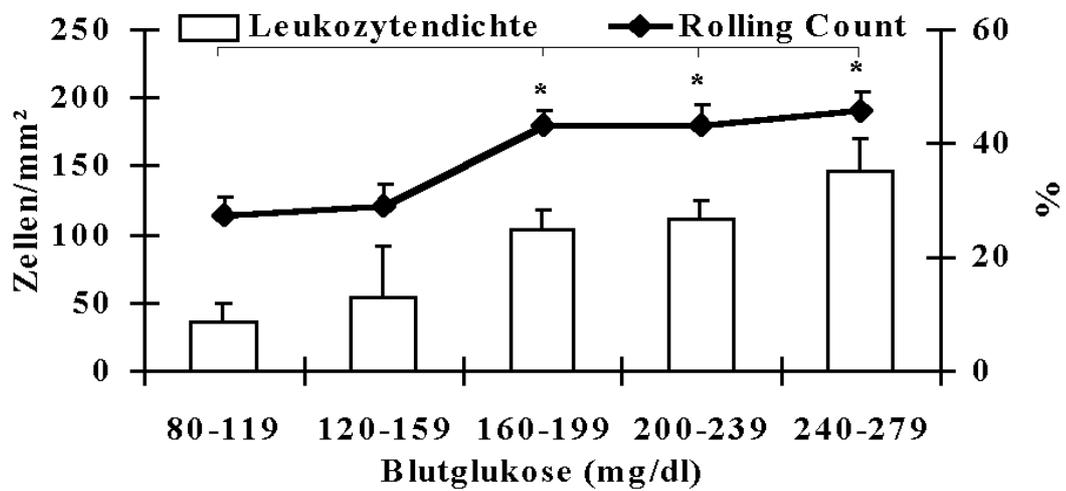
**Abb. 25** Die Blutflussrate (BFR), als mittleres Blutflussvolumen pro Zeit im Einzelgefäß, wurde in UCP1/DTA (n=14) und Kontrollen (n=18) am Tag 6 und 9 nach Rückenhautkammerimplantation gemessen. Die Messgruppen wiesen keine Unterschiede der BFR auf. Die Werte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM (\*p<0,05; \*\*p<0,01)



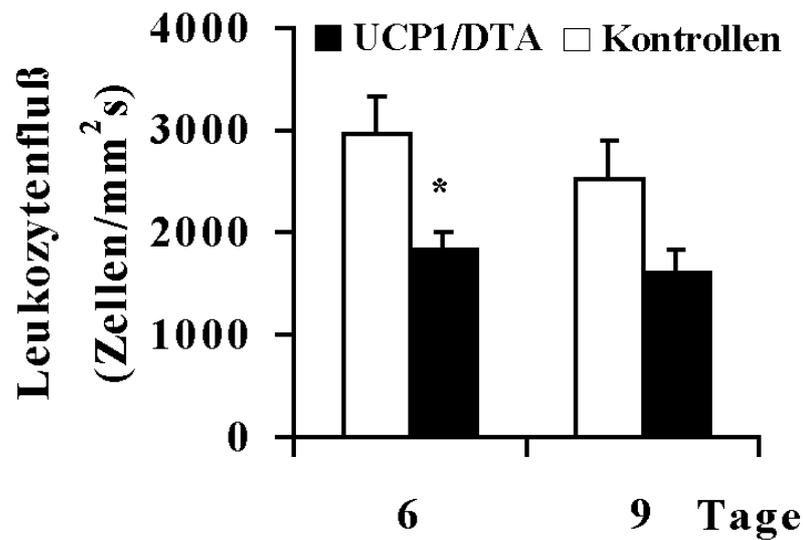
**Abb. 26** Der Rolling Count, als repräsentativer Parameter für die initiale Leukozyten-Endothel-Interaktion, wurde in UCP1/DTA (Tag 6, n=12; Tag 9 n=11) und Kontrollen (n=9) gemessen. Dabei wiesen die UCP1/DTA Mäuse einen signifikant erhöhten Rolling Count auf verglichen mit der Kontrollgruppe. Die Werte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM (\*p<0,05; \*\*p<0,01)



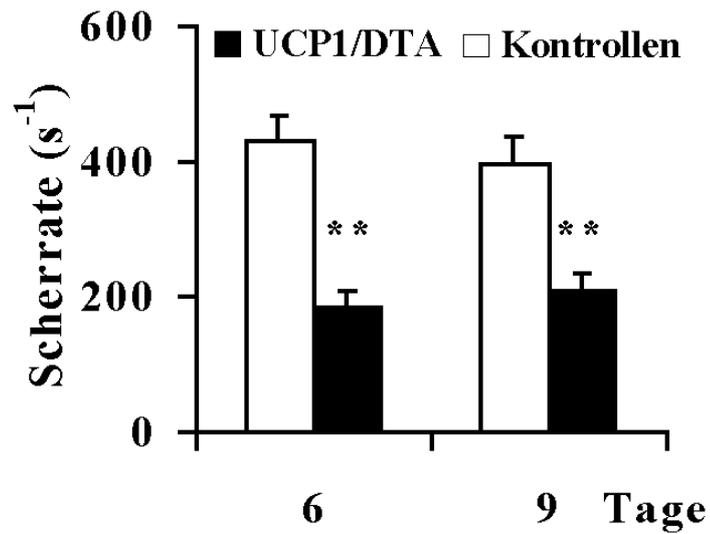
**Abb. 27** Die Leukozytendichte pro Gefäßwandfläche, die die sequentiell fortschreitende Interaktion zwischen Leukozyten und Endothel repräsentiert, wurde in UCP1/DTA (Tag 6, n=12; Tag 9 n=11) und Kontrollen (n=9) bestimmt. Die UCP1/DTA Mäuse zeigten signifikant erhöhte Leukozytendichten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Werte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM (\*p<0,05; \*\*p<0,01)



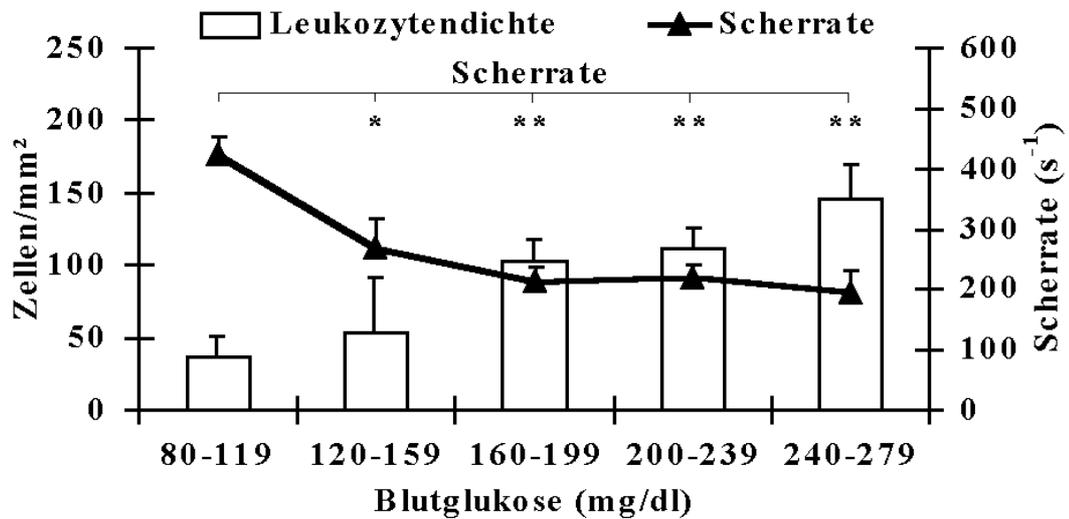
**Abb. 28** Rolling Count und Leukozytendichte aller Mäuse und Messtage (n=41) aufgetragen gegen den Blutglukosespiegel. Der Rolling Count ( $R^2=0,85$ ) und die Leukozytendichte ( $R^2=0,96$ ) waren positiv annähernd linear korreliert zum Blutglukosespiegel ( $p<0,001$ ). Die Werte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ )



**Abb. 29** Der Leukozytenfluß pro Gefäßquerschnittsfläche wurde in UCP1/DTA (Tag 6, n=12; Tag 9 n=11) und Kontrollen (n=9) gemessen. Dabei wiesen die UCP1/DTA Mäuse an Tag 6 im Vergleich zu der Kontrollgruppe einen signifikant erniedrigten Leukozytenfluß auf. An Tag 9 wurde die Signifikanzgrenze knapp verfehlt ( $p=0,060$ ). Die Werte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ )



**Abb. 30** Die Scherrate, als repräsentativer Parameter für die hämodynamische Kraft des Blutstroms, wurde in UCP1/DTA (n=14) und Kontrollen (n=18) am Tag 6 und 9 nach Rückenhautkammerimplantation mittels  $V_{\text{mean}}$  und Gefäßdurchmesser errechnet. Die Scherrate zeigte sich in UCP1/DTA Mäusen signifikant erniedrigt verglichen mit der Kontrollgruppe. Die Werte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM (\*p<0,05; \*\*p<0,01)



**Abb. 31** Leukozytendichte und Scherrate aller Mäuse und Messtage (n=41) aufgetragen gegen Blutglukosespiegel. Die Leukozytendichte war zum Blutglukosespiegel positiv, annähernd linear korreliert ( $R^2=0,96$ ;  $p<0,001$ ), während die Scherrate eine negative Korrelation zur Blutglukose aufwies ( $p<0,001$ ) und bei Blutglukosewerten  $>160$ mg/dl ein Plateau erreicht. Die Werte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ )