

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. v. Haunerschen Kinderspital der Ludwig –
Maximilians – Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. Christoph Klein

**Frühzeitige Veränderungen der Mikrozirkulation und
Verlust der endothelialen Glykokalix bei Kindern mit
Diabetes mellitus Typ I**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig – Maximilians – Universität zu München

vorgelegt von

Ana Cecilia Cavalcanti Fernandes Hering

aus

João Pessoa, Brasilien

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Orsolya Genzel – Boroviczeny

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Andreas Lechner

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. med. Claudia Nussbaum

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 20.07.2017

Inhaltsverzeichnis

1) Einleitung.....	5
1.1) Die Mikrozirkulation	5
1.1.1) Anatomische und physiologische Grundlagen	5
1.1.2) Regulation der Mikrozirkulation	6
1.1.3) Pathologische Veränderungen der Mikrozirkulation	7
1.1.4) Die Glykokalix	8
1.1.5) Visualisierung der Glykokalix.....	10
1.1.6) Pathologische Veränderungen der Glykokalix.....	11
1.2) Monitoring der Mikrozirkulation.....	13
1.2.1) Laser–Doppler–Fluxmetrie	13
1.2.2) Intravitalmikroskopie	13
1.2.3) Nah–Infrarot–Spektroskopie	14
1.2.4) Orthogonale polarisierte spektrale Bildgebung.....	14
1.2.5) Sidestream Dark Field Imaging	15
1.3) Diabetes Mellitus	18
1.3.1) Allgemeine Aspekte	18
1.3.2) Epidemiologie	19
1.3.3) Mikrozirkulatorische Veränderungen bei Diabetes mellitus.....	20
1.3.4) Veränderungen der Glykokalix bei Diabetes Mellitus	21
1.4) Fragestellung.....	23
2) Material und Methoden	24
2.1) Patientenrekrutierung	24
2.2) Versuchsprotokoll	26
2.2.1) Aufbau des Messarbeitsplatzes.....	26
2.2.2) Durchführung der Messungen	27
2.2.3) Auswertung der Daten	28
2.2.4) Untersuchte Parameter.....	33
2.2.4.1) Glykokalixdicke.....	33
2.2.4.2) Parameter der Mikrozirkulation	33
2.2.5) Validierung der Auswertung.....	34
2.3) Statistik	35
3) Resultate	36
3.1) Klinische und laborchemische Parameter.....	36
3.2) Veränderungen mikrozirkulatorischer Parameter bei Kindern mit Diabetes mellitus	38
3.3) Verlust der Glykokalixdicke bei Kindern mit Diabetes mellitus.....	42
4) Diskussion.....	45

4.1) Diskussion der Ergebnisse	45
4.1.1) Veränderungen der Glykokalix	45
4.1.2) Parameter der Mikrozirkulation	48
4.2) Diskussion der Methode	51
4.2.1) Patientenkollektiv	51
4.2.2) SDF Imaging	51
4.2.2.1) Klinische Anwendbarkeit	51
4.2.2.2) Limitationen	52
4.2.3) Auswertungsprogramm AVA	53
4.2.4) Parameter der Mikrozirkulation	53
4.2.5) Glykokalixdicke	55
4.3) Ausblick	56
5) Zusammenfassung.....	57
6) Literaturverzeichnis	59
7) Anhang	70
7.1) Abkürzungen	70
7.2) Abbildungsverzeichnis.....	72
7.3) Tabellenverzeichnis	75
7.4) Patienteninformation.....	76
7.5) Einwilligungserklärung	78
7.6) Datenerhebungsblatt	80
8) Danksagung	81
9) Eidesstattliche Versicherung.....	82

1) Einleitung

1.1) Die Mikrozirkulation

1.1.1) Anatomische und physiologische Grundlagen

Die Mikrozirkulation umschreibt das hämodynamische Geschehen in der terminalen Strombahn und umfasst Arteriolen, Venolen und Kapillaren (47). Blutgefäße mit einem Durchmesser von weniger als 10 Mikrometern (μm) sind die kleinsten Abschnitte. Arteriolen und Venolen bezeichnen Gefäße mit einem Durchmesser von 10 bis 25 μm (68). Die Wände aller Abschnitte des Gefäßsystems bestehen aus Endothelzellen. Diese sind mit einer Schicht aus Glykoproteinen und Glykosaminoglykanen bedeckt, die Glykokalix (110). Die Endothelzellen der Arteriolen sind von glatten Gefäßmuskelzellen umgeben, die durch Kontraktion oder Relaxation den Gefäßdurchmesser und somit den Gefäßwiderstand regulieren (29). Eine Kontraktion bewirkt die Verengung des Gefäßes mit Verminderung der Blutversorgung. Eine Relaxation dagegen führt zur Gefäßdilataion, die eine verbesserte Blutversorgung des entsprechenden Organs bewirkt (30). Die Endothelzellen der Venolen umgibt eine Basalmembran. In größeren Venolen finden sich in den Gefäßwänden ebenfalls glatte Gefäßmuskelzellen (99). Die Wand der Kapillaren enthält keine Muskelzellen. Sie besteht aus Endothelzellen, deren Basallamina und einem zarten umgebenden Netz aus retikulären Fasern und einzelnen Mikrofibrillenbündeln. Die relativ undifferenzierten Perizyten (Bindegewebszellen) bedecken die äußere Endotheloberfläche der Kapillaren. Sie stabilisieren die Kapillarstruktur und spielen eine entscheidende Rolle im Angiogeneseprozess (99). Die adäquate Funktion der Mikrozirkulation ist die entscheidende Voraussetzung für die Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen und damit für die Funktion der Organe. Der Stoffaustausch zwischen Gefäßsystem und Gewebe erfolgt dabei über Diffusion in den Blutkapillaren, die vielfältig miteinander anastomosieren. Sie sind daher der funktionell wichtigste Abschnitt des Gefäßsystems (30, 47, 109). Neben der Aufrechterhaltung einer adäquaten Versorgung des Gewebes vermittelt die Mikrozirkulation auch Anpassungsvorgänge an veränderte metabolische Bedingungen, denen dann morphologische Anpassungen folgen (2, 44). Zusätzlich spielt das Endothel eine wichtige Rolle in der Kontrolle von koagulatorischen und immunologischen Funktionen (47, 75). Die Struktur und Funktion des mikrozirkulatorischen Systems ist in verschiedenen Organsystemen höchst heterogen und angepasst an die unterschiedlichen Anforderungen der jeweiligen Gewebe (30, 47, 99). Im komplexen Netzwerk der Mikrozirkulation hängt die Perfusion von zahlreichen Faktoren wie der arteriellen Sauerstoffsättigung, dem Sauerstoffverbrauch, der Blutviskosität, der Kapillarpermeabilität und dem Muskeltonus der Arteriolen ab (29, 47, 92). Im erweiterten Sinne werden auch Erythrozyten, Leukozyten und plasmatische Bestandteile des Blutes zur Mikrozirkulation gezählt (47).

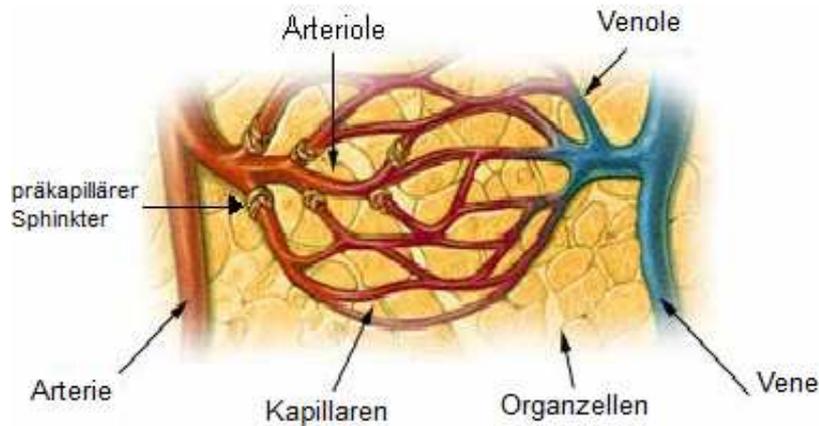


Abbildung 1: Die Mikrozirkulation (4)

1.1.2) Regulation der Mikrozirkulation

Präkapilläre Arteriolen regulieren den Gefäßwiderstand und damit den lokalen Blutfluss im Gewebe (106). Diese Gefäße unterliegen hauptsächlich einer lokalen autokrinen und parakrinen Kontrolle entsprechend dem Sauerstoffbedarf der Gewebszellen (47). Als autokrine Sekretion wird ein Mechanismus bezeichnet, bei dem die abgegebenen Substanzen, meist Hormone oder Wachstumsfaktoren, auf die absondernde Zelle selbst wirken. Parakrin von einer Zelle sezernierte Substanzen wirken direkt auf Zellen in der unmittelbaren Umgebung. Hierin unterscheiden sie sich von den mittelgroßen und großen Gefäßen, bei denen das autonome Nervensystem die Dilatation oder Konstriktion der Gefäße reguliert (50, 106). Endotheliale Zellen agieren im direkten Kontakt mit Blut als Sauerstoffsensoren (82). Über die Ausschüttung vasoaktiver Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin (PGI₂) bewirken sie eine Dilatation (NO) beziehungsweise Konstriktion (PGI₂) der Blutgefäße (82, 106). Gemäß der sogenannten metabolischen Theorie ist der Tonus der mikrovaskulären Gefäße eng an den intrazellulären Sauerstoffpartialdruck der Gewebszellen gebunden. Dieser ist Ausdruck der intrazellulären Verfügbarkeit von Sauerstoff zur Produktion von Adenosintriphosphat (ATP) (106). Entscheidendes Bindeglied zwischen parenchymatösem Metabolismus und mikrovaskulärem Tonus scheint der interstitielle Sauerstoffpartialdruck zu sein. So resultiert ein erniedrigter interstitieller Sauerstoffpartialdruck in einer vaskulären Dilatation und umgekehrt (106). Bei veränderten Bedingungen, wie erhöhtem Sauerstoffbedarf oder reduziertem Sauerstoffangebot, muss es zu einer einheitlichen Reaktion des mikrovaskulären Endotheliums (im Sinne einer Vasodilatation) im gesamten Kapillarbett kommen. Endotheliale Zellen leiten untereinander lokale stimulatorische Signale weiter (30). Diese Zell-zu-Zell Kommunikation wird über "gap junctions", spezielle Kanäle, die das Zytoplasma einer Zelle mit einer anderen verbinden, vermittelt. Die über diese Kanäle übertragenen elektrischen Signale verursachen eine Änderung des Membranpotentials in der Empfängerzelle. Durch nachfolgende

Rezeptoraktivierung, beispielsweise für Stickstoffmonoxid (NO), wird der Tonus der glatten Gefäßmuskulatur und dadurch konsekutiv der Blutfluss reguliert (30, 56, 93, 94, 95). Ebenso reagieren die Zellen auf Veränderungen des Blutflusses als Signaltransduktoren von Schubspannung ("shear stress"). Dies führt reflektorisch zu Kontraktion oder Dilatation der Endothelmuskulatur (30, 56). Im mikrovaskulären Netzwerk liegen somit verschiedene Signalwege der Vernetzung der Endothelzellen zugrunde, welche den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur und damit den lokalen Blutfluss beeinflussen (94).

1.1.3) Pathologische Veränderungen der Mikrozirkulation

Störungen der Mikrozirkulation können strukturell oder funktionell bedingt sein. Strukturelle Veränderungen sind beispielsweise eine reduzierte Kapillardichte oder Shunts, also Kurzschlussverbindungen mit Flüssigkeitsübertritt zwischen normalerweise getrennten Gefäßen. Störungen der Permeabilität oder die fehlende Produktion endotheleigener Substanzen sind funktionell bedingt. Generell gehen funktionelle Veränderungen der Mikrozirkulation strukturellen Alterationen voran und bestimmen so die Morphologie des Gefäßsystems (2). Pathologische Veränderungen finden sich sowohl bei Patienten mit chronischen Erkrankungen wie Diabetes mellitus, peripherer arterieller Verschlusskrankheit oder arterieller Hypertonie als auch bei akuten Zuständen, wie bei septischen Patienten, bei denen diese Veränderungen mit der Entwicklung eines Multiorganversagens und Tod assoziiert sind (6, 24, 73, 90). Die standardisierte Überwachung von Patienten, vor allem im intensivmedizinischen Bereich, beinhaltet ausschließlich Parameter der Makrozirkulation. Üblicherweise erfolgt die kontinuierliche Überwachung von Herzfrequenz, arteriellem Blutdruck inklusive mittlerem arteriellem Druck (MAP), Herzindex (HI), sowie Sauerstoffangebot (DO_2) und -verbrauch (VO_2). Die Mikrozirkulation und konsekutiv die Gewebeversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen kann trotz Normwerten der oben genannten Parameter massiv gestört sein (31). Mikrozirkulatorische Parameter zeigen die Veränderungen von Organfunktionen, beispielsweise bei septischem Krankheitsbild, deutlich präziser als die oben genannten Parameter der Makrozirkulation (5, 31). Patienten im septischen Schock weisen eine Störung der endothelialen Funktionen auf. Es kommt zu einer massiven Reduktion und Heterogenität der kapillären Perfusion. Die nachfolgende regionale Hypoxie und eine überschießende inflammatorische Antwort führen zum Organversagen und letztlich zur hohen Mortalität bei diesem Krankheitsbild (27). Zur Aufrechterhaltung eines ausreichenden makrozirkulatorischen Perfusionsdruckes werden beispielsweise Substanzen wie Noradrenalin und Vasopressin eingesetzt. Diese führen aufgrund der vasokonstriktorischen Wirkung zusätzlich zu einer Minderperfusion des Gewebes (27). Um den Einfluss der oben genannten Erkrankungen auf die Mikrozirkulation systematisch zu untersuchen wurden verschiedene Methoden des Monitorings

entwickelt. So liefern Orthogonal Polarisation Spectral (OPS) Imaging und Sidestream Dark Field (SDF) Imaging ein Bild der Mikrozirkulation in Echtzeit (siehe Abschnitte 1.2.4. und 1.2.5.).

1.1.4) Die Glykokalix

Bereits 1940 wurde das Vorhandensein einer Schicht aus Polypeptiden zwischen Kapillaren und Endothelzellen beschrieben (21). Die luminale Oberfläche der Endothelzellen jedes gesunden Blutgefäßes ist mit einem Netz aus Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen und Glykoproteinen beschichtet. Dabei handelt es sich um die negativ geladene endotheliale Glykokalix. In der aktuellen Studienlage wird die Dicke der menschlichen Glykokalix in den Kapillaren der Muskelgefäße mit etwa 0,5 µm angegeben (86). Aktuelle tierexperimentelle Daten geben Hinweise darauf, dass die Schichtdicke sich mit Zunahme des Gefäßdurchmessers vergrößert und bei Mäusen von etwa 0,5 µm in Kapillargefäßen der Muskeln über 2 bis 3 µm in kleinen Arterien bis zu 4,5 µm in der Arteria carotis communis reicht (69, 108). Die Zusammensetzung dieser Schicht ist nicht statisch, sondern befindet sich durch Einlagerung plasmatischer Moleküle und enzymatische Einflüsse in einem ständigen Auf- und Abbau (49, 56, 84, 86, 94). Proteoglykane sind das Rückgrat der Glykokalix. Sie bestehen aus einem Kernprotein, an das oft über hundert Glykosaminoglykanketten gebunden sind (11, 86). Die häufigsten Glykosaminoglykane (GAG) sind Heparansulfat, Chondroitinsulfat und Hyaluronsäure. Die drei oben erwähnten GAG sind nicht gleichmäßig in der Glykokalix verteilt. Heparansulfat findet sich vorwiegend in den oberen, luminalen Anteilen, wohingegen Chondroitinsulfat und Hyaluronsäure eher in der lumenfernen Zone der Glykokalix vorkommen (35). Heparansulfat spielt eine bedeutende Rolle in der strukturellen Integrität der Glykokalix. Chondroitinsulfat und Hyaluronsäure tragen entscheidend zur Aufrechterhaltung der physiologischen Permeabilität der Struktur bei (35). Glykoproteine binden die Glykokalix an die Endothelzellen. Eingelagerte lösliche Moleküle endothelialer oder plasmatischer Herkunft sind unter anderem für die negative Ladung dieses Geflechts mitentscheidend (12, 86).

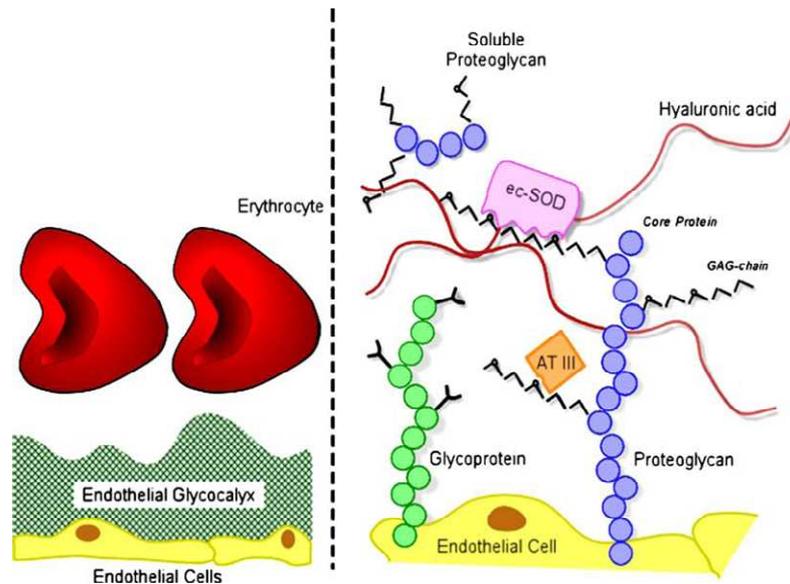


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Hauptkomponenten der endothelialen Glykokalix (ec-SOD: extrazelluläre Superoxiddismutase; AT III: Antithrombin III) (86)

Die unbeschädigte Glykokalix dient zusammen mit den Endothelzellen und der Basallamina als Permeabilitätsbarriere zwischen dem Gefäßsystem und dem umliegenden Gewebe. Der Durchtritt großer und negativ geladener Moleküle wird verhindert (12, 86). Das Endothel ist durch den kontinuierlichen Blutfluss ununterbrochen mechanischer Schubspannung unterworfen. Endothelzellen, die vermehrter Schubspannung ausgesetzt sind, produzieren Stickstoffmonoxid (NO). NO besitzt einen vasodilatierenden Effekt (88). Die endotheliale Glykokalix spielt wahrscheinlich bei der Mechanotransduktion, also der Umwandlung von biomechanischen Kräften in biochemische Signale, eine entscheidende Rolle (86). Die Glykokalix hat entscheidenden Einfluss auf die Hämostase. Wichtige antikoagulatorische Faktoren, beispielsweise Antithrombin III, können an die Glykokalix binden und werden dort zum Teil erst aktiviert (86, 107). Dies erklärt die antiadhäsive Eigenschaft von gesundem Endothel (28). Heparansulfathaltige Proteoglykane hemmen zudem eine übermäßige Bindung von Leukozyten. Die intakte Glykokalix schirmt endotheliale Adhäsionsmoleküle wie Selektine oder Integrine ab, welche bei der Rekrutierung von Leukozyten eine wichtige Rolle spielen (18). Durch Abschwächung der Bindungsfähigkeit von Zytokinen an Zelloberflächenrezeptoren werden Entzündungsreaktionen moduliert (86). Durch Bindung von Sauerstoffradikalfängern reduziert die Glykokalix oxidativen Stress (62). Die endotheliale Glykokalix stellt darüber hinaus ein Reservoir für Wachstumsfaktoren und Chemokine dar, welche eine bedeutende Rolle in der Regulierung von Leukozyten- und Thrombozytenaggregation spielen (107).

1.1.5) Visualisierung der Glykokalix

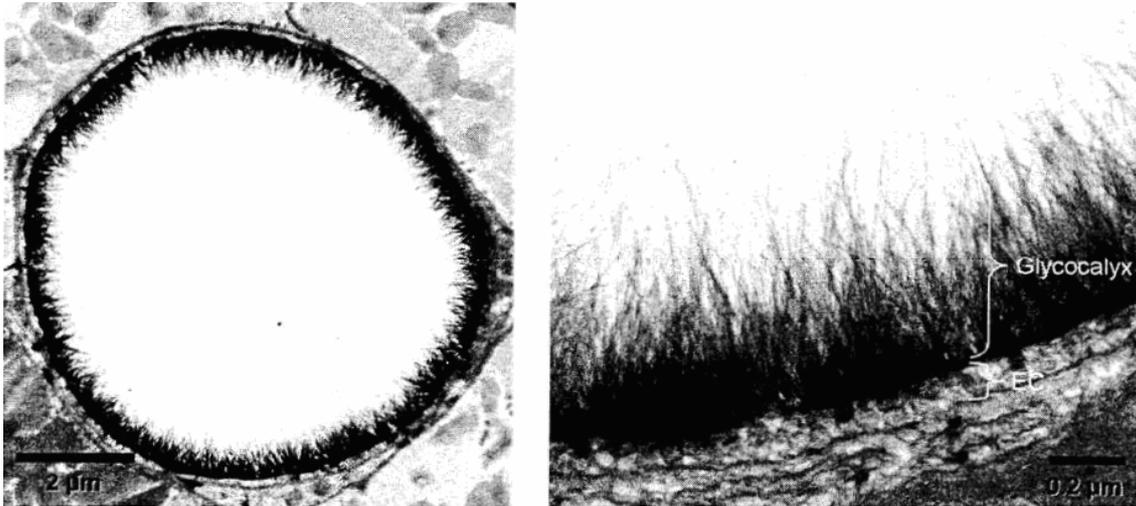


Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Darstellung der koronaren Kapillare einer Ziege (Anfärbung mit Alician blue) (107)

Aufgrund der funktionellen Bedeutung der endothelialen Glykokalix kommt ihrer direkten Visualisierung eine wichtige Rolle zu. In der Frühphase der mikroskopischen Darstellung wurde die Schichtdicke der durch damalige Präparationsprotokolle oftmals beschädigten Glykokalix unterschätzt (86). Beispielhaft wurde bei einer elektronenmikroskopischen Darstellung unter Anwendung von Rutheniumrot im Jahre 1966 die Glykokalixdicke mit lediglich 20 Nanometern (nm) angegeben (64). Dank neuer Färbe- und Präparationsprotokolle ist es seitdem gelungen, mit Hilfe der Elektronenmikroskopie die bildliche Darstellung der Glykokalix zu verbessern. Zum Einsatz kommen dabei spezifische fluoreszierende oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Marker, die sich an einen oder mehrere Bestandteile der Glykokalix binden. Durch elektronenmikroskopische Verfahren kann die Glykokalix der Gefäßwand auf diese Weise dargestellt werden. Lektine binden sich beispielsweise an bestimmte funktionelle Gruppen der Glykosaminoglykanketten und ermöglichen so eine bildliche Darstellung (72). Andere Methoden verwenden Antikörper gegen Heparansulfate, Syndecan-1 oder Hyaluronan (32). Eine neue Markierungstechnik auf Lanthanbasis ermöglicht die Visualisierung einer intakten Glykokalix (11, 13, 14, 48, 85). Der grundsätzliche Nachteil der Elektronenmikroskopie besteht darin, dass sie nicht *in vivo* angewendet werden kann. Etwa 30 Jahre nach den ersten Visualisierungsversuchen mittels Elektronenmikroskopie kam die Intravitalmikroskopie erstmals zur Anwendung. 1996 erkannten Vink und Kollegen die kapilläre Glykokalix im Tiermodell als Lücke zwischen dem Endothel und den fließenden Erythrozyten (110). Die mit der Intravitalmikroskopie nur indirekt messbare Glykokalixdicke wurde mit 0,4 bis 0,5 µm angegeben (110). Limitationen der Intravitalmikroskopie sind eine potentielle Schädigung der

Glykokalix bei zu hohen Lichtintensitäten und das Versagen bei der Darstellung der endothelialen Glykokalix in größeren Gefäßen (86). Eine Weiterentwicklung der Intravitalmikroskopie war die ab 1987 eingesetzte orthogonale polarisierte spektrale (OPS)-Bildgebung, die ohne Fluoreszenzfarbstoffe die Visualisierung der Mikrozirkulation auch in vivo ermöglicht (40). Das "sidestream dark field imaging" (SDF Imaging) wiederum stellt eine Verbesserung der OPS-Bildgebung dar (47). Die beiden Techniken werden in dieser Arbeit in Abschnitt 1.2 genauer beschrieben.

1.1.6) Pathologische Veränderungen der Glykokalix

Wie bereits erwähnt, ist die intakte endotheliale Glykokalix verantwortlich für das Ausmaß der Gefäßpermeabilität. Sie verhindert Zell-Gefäßwand-Interaktionen und spielt eine entscheidende Rolle in der Mechanotransduktion. Durch ihre antikoagulatorischen und antiinflammatorischen Eigenschaften erfüllt sie eine gefäßprotective Funktion. Bei Schädigung oder Veränderung der Schichtstruktur gehen diese Eigenschaften verloren, was Auswirkungen auf den gesamten Organismus hat. Die Einflüsse verschiedener pathophysiologischer Zustände auf die Glykokalix sollen im Folgenden erörtert werden. Totale oder partielle Ischämien, infolge von absentem oder abnehmendem Blutfluss, führen zu mikrovaskulärer Dysfunktion (39). Prädilektionsort für ischämische Schädigungen sind die postkapillären Venolen. Während ischämischer Zustände leiden die Endothelzellen unter erhöhtem oxidativem Stress (66, 112). Bereits kurzzeitige Ischämien können die Glykokalix vollständig degradieren. Für die ischämiebedingte Schädigung der Glykokalix auf molekularer Ebene spielen vermehrt gebildete Sauerstoffradikale ("endogenous reactive oxygen species" (ROS)) und damit zusammenhängend eine Inaktivierung von NO eine zentrale Rolle (89). Während der Reperfusion wird der Gewebeschaden zusätzlich durch verstärkte Leukozytenadhäsion, Thrombozytenaggregation und erhöhte vaskuläre Permeabilität aggraviert (85, 112). Es konnte gezeigt werden, dass eine Blockade der ROS durch exogen zugeführte Hyaluronsäure oder Pertussistoxin im Tierversuch die Gewebeschäden durch Ischämie und Reperfusion reduziert (72). Hypervolämische Infusionen isoonkotischer Kolloide, etwa in einem perioperativen Umfeld können die Barrierefunktion der Glykokalix schädigen (12). Konsekutiv kommt es zu einer Verschiebung der Flüssigkeit in den interstitiellen Raum (50, 51). Arteriosklerotische Gefäßveränderungen und cholesterinreiche Diät mit subendothelialen Anlagerungen von Lipoproteinen führen zu einer Einwanderung von Leukozyten und einer lokalen Entzündungsreaktion. Konsekutiv kommt es zu fibrotischen Veränderungen und Einlagerung von Kalzium. Es bilden sich atheromatöse Plaques, und die Durchmesser von Tunica intima und Tunica media nehmen zu (31). Die Entzündungsreaktion verursacht erhöhten oxidativen Stress für die Endothelzellen (86). Im Tierversuch führt dies zu einer Verringerung der Glykokalixdicke (6). In arteriosklerotisch veränderten Gefäßen besteht eine inverse Relation zwischen der Dicke der Tunicae intima und

media und der Glykokalixdicke (5, 86). Daraus resultiert eine verringerte gefäßprotektive Funktion der Glykokalix in Regionen mit erhöhtem Arterioskleroserisiko. Während einer Sepsis kommt es ebenfalls zu erhöhtem oxidativem Stress und Abspaltung von Glykokalixbestandteilen von der Endothelmembran. Folgen sind Ödembildung und eine vermehrte Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten. Diese Veränderungen der Mikrozirkulation sind mit einer erhöhten Mortalität bei Sepsispatienten assoziiert (73). Hyperglykämische Zustände können das Volumen der Glykokalix verringern (74, 75). Die Einzelheiten der pathophysiologischen Veränderungen der Glykokalix bei Diabetes mellitus werden in Kapitel 1.3.4. eingehend erörtert.

1.2) Monitoring der Mikrozirkulation

1.2.1) Laser–Doppler–Fluxmetrie

Die Laser–Doppler–Fluxmetrie (LDF) basiert auf dem Prinzip der Dopplerverschiebung von Laserlicht durch sich bewegende Teilchen. Monochromatisches, hochfrequentes Laserlicht wird auf Gewebe gestrahlt und dringt dabei etwa 1 bis 1,5 Millimeter ein. Ein Teil des Lichts wird an den Gefäßwänden reflektiert. Das übrige Licht wird von sich bewegenden Erythrozyten reflektiert und verändert dadurch seine Frequenz. Diese Frequenzverschiebung wird analysiert, um mit Hilfe des Dopplergesetzes die Geschwindigkeit der Erythrozyten zu bestimmen (44). Diese Methodik wurde erstmals 1972 zur Messung der Fließgeschwindigkeit von Erythrozyten in retinalen Gefäßen eingesetzt. Die LDF ist einfach anzuwenden, und die Ergebnisse sind in wenigen Minuten abrufbar. Limitierende Faktoren sind die geringe Eindringtiefe des Lichtstrahls und die hohe Artefaktanfälligkeit. Aufgrund fehlender Absolutwerte ist ein interindividueller Vergleich nahezu unmöglich. In der klinischen Routine hat sich diese Methodik nicht durchgesetzt, da aufgrund der geringen Eindringtiefe das Gefäßkompartiment, welches für die Lichtreflexion verantwortlich ist, nicht eindeutig bestimmt werden kann. So stammt das reflektierte Licht vermutlich zum Großteil aus Gefäßen, die nicht für die nutritive Versorgung der Haut verantwortlich sind (17).

1.2.2) Intravitalmikroskopie

Die Grundlagen dieser Technik beruhen auf einer Darstellung des Gewebes mit Transillumination, Epiillumination oder phosphoreszierenden Substanzen. Bei der Mikroskopie mittels Transillumination wird das zu untersuchende Material zwischen einer Lichtquelle und dem das Licht detektierenden Mikroskop platziert. Durch die Absorption des Lichtes im Gewebe entsteht Kontrast in der Bilddarstellung. Die Technik der Epiillumination basiert auf der Anregung eines fluoreszenzfähigen Materials mit Licht der passenden Wellenlänge. Bevor das durch eine externe Lichtquelle erzeugte Licht in das Gewebe eindringt, passiert es einen optischen Anregungsfilter (100). Die Fluoreszenzemission gelangt über einen Sperr- oder Emissionsfilter zu einem optischen Detektor. Ab den 1930er Jahren konnte mit der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen eine bessere Darstellung der Mikrozirkulation erreicht werden (100). Dabei werden die jeweiligen Strukturen nach Applikation des Farbstoffes mit einem Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskop visualisiert. Die Anwendung der Intravitalmikroskopie am Menschen ist auf dünnes, lichtdurchlässiges Gewebe wie den Nagelfalz beschränkt. Da die phototoxischen Fluoreszenzfarbstoffe zwar kontrastreiche Bilder liefern, aber für die Anwendung am Menschen nicht zugelassen sind, hat dieses Verfahren keinen Platz in der klinischen Routine.

1.2.3) Nah–Infrarot–Spektroskopie

Bei der Nah–Infrarot–Spektroskopie (NIRS) handelt sich um eine nicht invasive Methode, bei der monochromatisches Licht appliziert wird. Hierdurch lässt sich indirekt die Perfusion des unterliegenden Gewebes und folglich der Status der Mikrozirkulation qualitativ beurteilen. 1977 wurde diese Technik zum ersten Mal in vivo angewendet (52). Die Eindringtiefe von Licht hängt von dessen Wellenlänge ab. Licht im Infrarotbereich mit einer Wellenlänge zwischen 650 und 950 nm dringt besonders tief in das Gewebe ein. Je nach Oxygenierungszustand wird das Licht in unterschiedlichem Ausmaß von Hämoglobin absorbiert. Der Teil des Lichtes, der nicht absorbiert wird, wird mehrfach gestreut und verlässt das Gewebe. Er kann mit Hilfe von Lichtdetektoren erfasst werden. Aus dem Verhältnis von ausgesandtem zu reflektiertem Licht werden mittels einer spektrophotometrischen Analyse Konzentrationsveränderungen von Oxy- und Desoxyhämoglobin bestimmt. Besonders zur Beurteilung von zerebralem Blutfluss und Oxygenierungsstatus von Neugeborenen wurde dieses Verfahren als nicht invasives fetales Monitoring während der Geburt eingesetzt (17). Limitierend für die NIRS sind fehlende Kalibrierungsverfahren der Messwerte, so dass nur relative Veränderungen ermittelt werden können (52). Außerdem können nur Aussagen über den Gesamtzustand im unterliegenden Gewebe gemacht werden ohne Erkenntnisse über den Status einzelner Gefäße.

1.2.4) Orthogonale polarisierte spektrale Bildgebung

Eine Weiterentwicklung der Intravitalmikroskopie wurde 1987 erstmals als orthogonale polarisierte spektrale Bildgebung ("orthogonal polarisation spectral imaging", OPS Imaging) vorgestellt. Der entscheidende Vorteil dieser Technik ist die Visualisierung der Mikrozirkulation ohne Fluoreszenzfarbstoffe. Daher ist OPS Imaging auch beim Menschen anwendbar (40, 96). Zur Validierung der neuen Methode wurden Parameter der Mikrozirkulation mit OPS Imaging und konventioneller Intravitalmikroskopie gemessen. Dabei zeigten sich beide Verfahren in ihren Resultaten äquivalent (40). OPS Imaging eignet sich sehr gut für die intraoperative Bewertung der Mikrozirkulation von inneren Organen, wie Gehirn, Leber und Herz (7, 58, 67, 104). Zur Beurteilung der kutanen Mikrozirkulation von Erwachsenen eignen sich nur wenig oder nicht keratinisierte Bereiche, wie die Schleimhaut des Mundes, die Konjunktiva, der periunguale Bereich und Wunden (16, 23, 54, 55, 60, 67). Die Haut von Früh- und Neugeborenen ist aufgrund ihrer geringen Keratinisierung für die Abbildung der Mikrozirkulation mittels OPS Imaging geeignet (16). Licht einer externen Lichtquelle gelangt durch einen Lichtleiter zur OPS-Einheit. Es wird durch einen Polarisator oder Spektralfilter geleitet, in dem es isoliert und linear polarisiert wird. Die resultierende Wellenlänge von 548 nm liegt zwischen der maximalen Lichtabsorption des Hämoglobins (420 nm) und der optimalen Eindringtiefe des

Licht in das Gewebe (810 nm) (92). Das polarisierte Licht wird im 90-Grad-Winkel über einen Spiegel auf das Gewebe zur Untersuchung geworfen. Ein Teil des Lichts wird an der Oberfläche reflektiert, wobei es polarisiert bleibt, und von einem zweiten orthogonal stehenden Polarisator (Analysator) gefiltert wird. Dieser Anteil des Lichts steht damit nicht für die Bilderschaffung zur Verfügung. Das übrige Licht dringt ins Gewebe ein. Es wird gestreut, dabei depolarisiert und vom Hämoglobin in den Erythrozyten absorbiert. Das gestreute, depolarisierte Licht wird vom Analysator an eine "charge coupled device" (CCD)-Videokamera weitergeleitet (103). Die Durchführung der Messung kann simultan auf einem Bildschirm verfolgt werden. Für die automatisierte Auswertung sind stabile Bilder nötig. Daher erschweren Bewegungsartefakte die Auswertung der Daten. Ein weiterer limitierender Faktor ist die Tatsache, dass viel Druck auf das untersuchte Gewebe die Gefäße komprimiert und die Fließgeschwindigkeit des Bluts vermindert. Da hierdurch die Auswertung beeinträchtigt wird, muss der Operateur die Sonde vorsichtig auf dem Gewebe platzieren, um Druck zu vermeiden. Zudem werden Strukturen, die kein Hämoglobin enthalten, wie Leukozyten und Endothelzellen, nicht dargestellt.

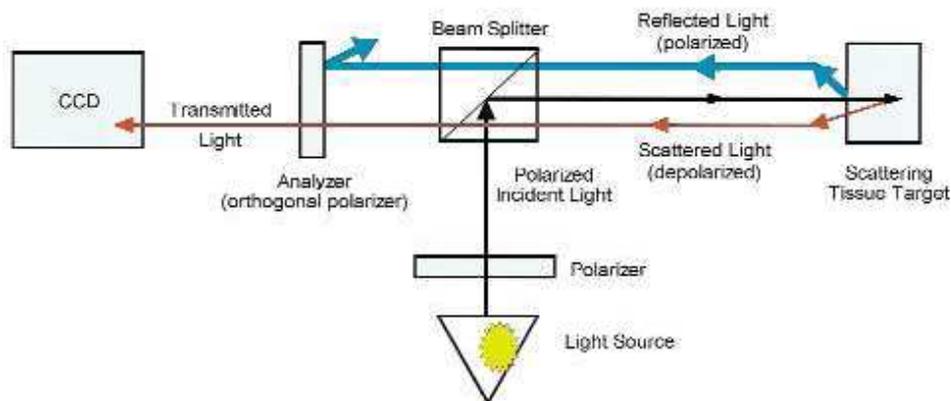


Abbildung 4: Schematische Darstellung der OPS - Imaging Technik: Das in der Lichtquelle generierte Licht passiert den Polarisator. In einem 90° - Winkel wird das polarisierte Licht über einen Spiegel auf das zu untersuchende Gewebe gelenkt. Ein Teil des polarisierten Lichtes wird reflektiert. Ein anderer Teil wird depolarisiert und dient zur Bildarstellung, nachdem es den Analysator passiert hat (40).

1.2.5) Sidestream Dark Field Imaging

Eine Weiterentwicklung des OPS Imaging stellt das "sidestream dark field imaging" (SDF Imaging) dar (47). Es erlaubt wie der Vorgänger die nicht invasive, direkte Beobachtung der Mikrozirkulation der Organoberfläche, verfügt aber über eine höhere Sensitivität und bessere Auflösung als das OPS Imaging (103). Bei dieser Methode, wird grünes Licht von Leuchtdioden (LED) erzeugt, die einen Lichtleiter konzentrisch umgeben. Das emittierte Licht mit einer

Wellenlänge von 530 nm wird von Oxy- und Desoxyhämoglobin zu gleichen Anteilen absorbiert. Das Absorptionsspektrum ist folglich unabhängig vom Oxygenierungsstatus des Hämoglobins (38). Das Licht, das nicht von Hämoglobin absorbiert wird, wird zur Bilddarstellung verwendet. Es tritt, nachdem es gestreut wurde, aus dem Gewebe aus und wird durch den Lichtleiter aufgefangen. Das entstandene Bild wird, nachdem es durch eine spezielle Linse auf das 5-Fache vergrößert wurde, an eine Videokamera weitergeleitet. Der Anteil des Lichtes, der an der Oberfläche reflektiert wird, würde die Bilddarstellung stören. Da der Lichtleiter jedoch optisch von dem LED Ring isoliert ist, besteht dieses Problem nicht. Ein Analog-zu-Digital Konverter (Canopus ADV C110, Kobe, Japan) ermöglicht die Beobachtung der aufgenommenen Sequenzen und deren Speicherung auf einem Computer. Um klare Aufnahmen der sich bewegenden Blutzellen zu erhalten geben die LED pulsierende Lichtsignale, ähnlich einem Stroboskop, ab. Die kurzen Beleuchtungsintervalle entsprechen der Bildfrequenz der CCD-Videokamera und verbessern die Bildqualität der bewegten Strukturen deutlich. Die Leuchtdioden haben einen sehr geringen Stromverbrauch. Das Gerät kann von einem tragbaren Computer aus gesteuert werden, was die klinische Anwendbarkeit deutlich erleichtert.

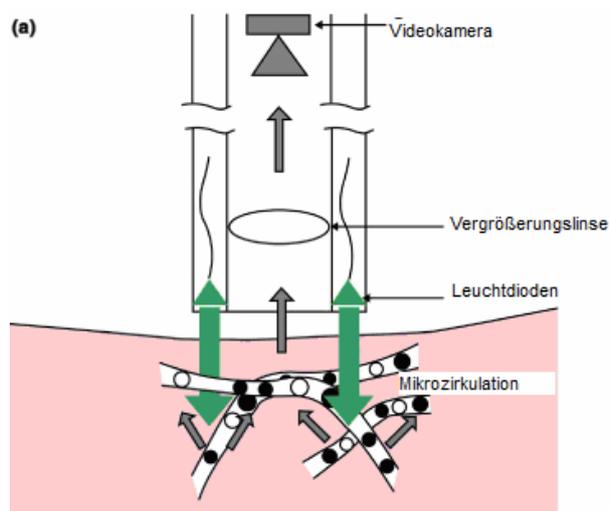


Abbildung 5: Funktionsweise des SDF Imaging: Das von den Leuchtdioden produzierte grüne Licht dringt in das Gewebe ein. Ein Teil des Lichtes wird von den in den Kapillaren zirkulierenden Erythrozyten absorbiert. Der nicht absorbierte Anteil wird im Gewebe gestreut, vom Lichtleiter aufgefangen und zur Bildentstehung verwendet. Das an der Oberfläche reflektierte Licht dient nicht zur Bilderzeugung (29).

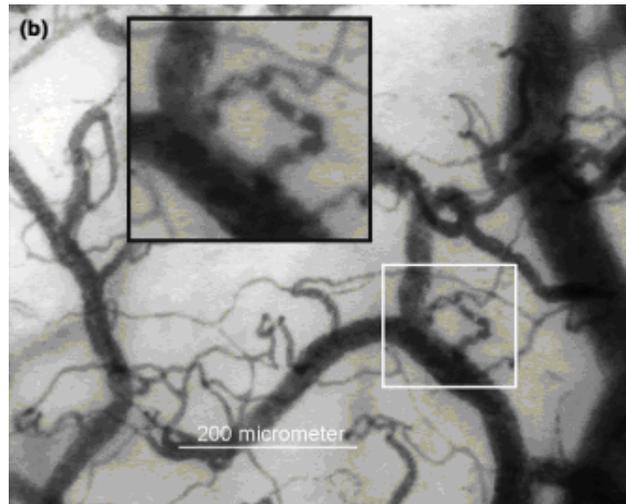


Abbildung 6: Visualisierung der Mikrozirkulation mittels SDF Imaging: Zirkulierende Blutzellen absorbieren das emittierte Licht (dunkel). Gewebe ohne hämoglobinhaltige Zellen absorbieren kein Licht und werden nicht dargestellt (47).

1.3) Diabetes Mellitus

1.3.1) Allgemeine Aspekte

Diabetes mellitus ist der Überbegriff für eine heterogene Gruppe von Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels aufgrund eines Fehlens der Insulinsekretion, der Insulinwirkung oder beider Systeme (3). Es besteht also ein absoluter oder relativer Insulinmangel. Eine Gefährdung des Organismus besteht einerseits durch akut lebensbedrohliche hyperglykämische Zustände wie die diabetische Ketoazidose beziehungsweise das hyperosmolare Koma. Andererseits ist die Erkrankung langfristig mit schweren Folgeschäden durch Mikro- und Makroangiopathien, wie Atherosklerose, Retinopathie, Nephropathie und Neuropathie assoziiert. Nachfolgend sind die Kriterien zur Diagnosesicherung eines Diabetes mellitus gemäß der Leitlinien der amerikanischen Diabetesgesellschaft (ADA) von 2003 aufgeführt.

1. **Nüchternblutzucker > 126 mg/dl (7,0 mmol/l)**. Der Nüchternblutzucker ist definiert als Blutglukosewert nach einer mindestens achtstündigen Nahrungskarenz.

Oder

2. **Symptome der Hyperglykämie plus ein Gelegenheitsblutzucker > 200 mg/dl**. Die klassischen Symptome der Hyperglykämie sind Polyurie, Polydypsie und unerklärliche Gewichtsabnahme. Der Gelegenheitsblutzucker ist der Blutglukosewert zu jedem Zeitpunkt des Tages unabhängig von der letzten Nahrungsaufnahme.

Oder

3. **Plasmaglukosewert = 200 mg/dl nach zwei Stunden während eines oralen Glukosetoleranztests (OGTT)**. Beim OGTT wird eine Glukoselösung entsprechend 75 Gramm wasserfreie Glukose in Wasser gelöst und getrunken.

Je nach ursächlicher Störung des Glukosestoffwechsels werden verschiedene Typen von Diabetes unterschieden. Der Diabetes mellitus Typ 1 macht etwa 5 – 10 Prozent aller Diabetesfälle aus. Er ergibt sich als Folge einer autoimmunologisch bedingten Zerstörung der Beta-Zellen der Pankreas. Dies führt zu einem absoluten Mangel an Insulin und damit einer Abhängigkeit von exogen zugeführtem Insulin. Der Typ 1 Diabetes hat zahlreiche genetische Prädispositionen und ist mit einigen noch nicht eindeutig definierten Umweltfaktoren assoziiert (3). Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 zeigen in der Regel kein Übergewicht. Es besteht eine Prädisposition für andere Autoimmunerkrankungen wie Hyperthyreose mit diffuser Struma (Morbus Basedow), Hashimoto-Thyreoiditis, primäre Nebennierenrindeninsuffizienz (Addison-Krankheit), Vitiligo, Myasthenia gravis und Zöliakie. Die klinischen Symptome des Diabetes mellitus Typ 1 hängen entscheidend vom Alter bei der Erstmanifestation ab. Die klassische

Symptomtrias bei älteren Kindern und Erwachsenen sind Polydipsie, Polyphagie und Gewichtsabnahme. Bei Kindern unter drei Jahren treten meist eher subtilere Symptome wie übersteigerte Erregbarkeit und Unruhe auf (20). In etwa 25 Prozent der Fälle ist das ketoazidotische Koma allerdings die Erstmanifestation der Krankheit (3). Die diabetische Ketoazidose ist die Haupttodesursache bei Diabetes mellitus Typ 1. Besonders gefürchtet ist hierbei das zerebrale Ödem als Komplikation. Die Inzidenz des Hirnödems bei Ketoazidose beträgt zwischen 0,7 bis 4,3 Prozent, die Mortalität liegt bei bis zu 64 Prozent (20). Therapiemaßnahmen bei Ketoazidose sollten folglich vorrangig die Verhinderung des Hirnödems zum Grundsatz haben. 90 – 95 Prozent aller Fälle von Diabetes mellitus werden durch Diabetes mellitus Typ 2 verursacht (3). Die Zellen der Körpergewebe zeigen eine verminderte Reaktion auf Insulin. Diese Patienten haben einen relativen Insulinmangel. Eine Insulintherapie ist zumindest zu Beginn der Erkrankung, oft auch im gesamten Krankheitsverlauf, nicht notwendig (3). Da die Hyperglykämie und die daraus resultierenden Symptome sich sehr langsam entwickeln, bleibt diese Diabetesform oft über lange Zeit unerkannt. Dennoch bringt die Erkrankung ein erhöhtes Risiko für die Ausprägung mikro- und makrovaskulärer Komplikationen mit sich (3). Das Risiko für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 erhöht sich mit zunehmendem Alter, Übergewicht und fehlender körperlicher Belastung (3). Frauen mit vorhergehendem Gestationsdiabetes und Patienten mit arterieller Hypertonie und Dyslipidämie sind häufiger betroffen. Eine genetische Prädisposition findet sich häufiger in dieser Diabetesform als beim Diabetes mellitus Typ1. Die pathologische Insulinresistenz kann durch Gewichtsreduktion und medikamentöse Behandlung der Hyperglykämie gebessert werden, lässt sich jedoch selten völlig normalisieren. Neben den oben erwähnten Diabetesformen, die weit über 90 Prozent aller Erkrankungsfälle ausmachen, gibt es eine Reihe weiterer Diabetesformen. Beispielhaft sei der medikamentös oder chemisch induzierte Diabetes erwähnt. Weniger als 1 Prozent aller Diabetiker leiden unter einer sekundären Diabetesform, die sich als Folge einer anderen Krankheit entwickeln kann (Morbus Cushing, Leberschaden, chronische Pankreatitis oder gestörte Insulinsynthese durch Eiweißmangel) (3). Der Gestationsdiabetes bei schwangeren Frauen ist definiert als jegliche erstmalig während der Schwangerschaft aufgetretene Ausprägung von Glukoseintoleranz (3). Eine Zunahme dieser Glukoseintoleranz findet sich während des letzten Schwangerschaftsabschnittes. In der überwiegenden Zahl der Fälle sistiert die Erkrankung nach Ende der Schwangerschaft, es kann jedoch die Entwicklung zu einem Diabetes mellitus Typ 2 folgen. Die Hyperglykämie und die konsekutive Hyperinsulinämie kann beim Fetus zu Makrosomie, kongenitalen Herzvitien und sogar zum perinatalen Tod führen (3).

1.3.2) Epidemiologie

Weltweit beträgt die Zahl der an Diabetes mellitus erkrankten erwachsenen Personen etwa 171

Millionen (113). Nach Angaben der internationalen Diabetesföderation (IDF) wird diese Zahl bis zum Jahr 2030 auf etwa 334 Millionen Erkrankte steigen. Die meisten großen epidemiologischen Untersuchungen unterscheiden nicht zwischen Diabetes mellitus Typ 1 und 2. Es ist jedoch anzunehmen, dass beide Diabetestypen weltweit zunehmen (113). Auch wenn, wovon kaum auszugehen ist, die Prävalenz von Übergewicht weltweit bis 2030 unverändert bleiben sollte, wird sich die Zahl der Diabetesfälle aufgrund des Älterwerdens der Bevölkerung und der Urbanisierung verdoppeln. Unter Hinzunahme der global steigenden Anzahl von Menschen mit Adipositas, einem Risikofaktor für Diabetes mellitus, sind die hier angegebenen Schätzzahlen für 2030 vermutlich noch zu gering angegeben (113). Diabetes mellitus ist eine der häufigsten chronischen Erkrankungen in Deutschland, mit einer Gesamtprävalenz von ca. 4,8 Prozent, das entspricht etwa 4 Millionen betroffener Bundesbürger (41). Jährlich nimmt die Zahl der an Diabetes mellitus erkrankten Personen in Deutschland um etwa 5 Prozent zu (42). Dies stellt eine bedeutende Belastung für das Gesundheitssystem dar. Die allgemeinen diabetesassoziierten Kosten, also Aufwendungen für Behandlung der eigentlichen Krankheit und vor allem der Folgeerkrankungen sowie für präventive Maßnahmen werden in Deutschland auf jährlich etwa 15 Milliarden Euro geschätzt (42). Die Mortalität durch Herz-Kreislaufkrankungen ist sowohl bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 als auch mit Typ 2 gegenüber der erwachsenen Allgemeinbevölkerung erhöht. Die absolute Zahl an Todesfällen innerhalb der Gruppe der Erkrankten ist bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 jedoch höher. Diese Tatsache erklärt sich möglicherweise durch das typischerweise höhere Manifestationsalter dieser Diabetesform. Die Mortalität durch akute kardiale Ischämien korreliert mit zunehmendem Lebensalter (57).

1.3.3) Mikrozirkulatorische Veränderungen bei Diabetes mellitus

Die Pathophysiologie der diabetischen Gefäßveränderungen ergibt sich aus dem Zusammenspiel von endothelialer Dysfunktion, erhöhter Thrombozytenaggregationsneigung, verstärkter Leukozytenadhäsion und veränderter Funktion der Muskelzellen der Gefäßwand (19). Hämorheologische Parameter, wie Hämatokrit, Plasmaproteine, Erythrozytenaggregation und Erythrozytendeformierbarkeit, sind bei Diabetes mellitus oft verändert (15). Dies führt zu einer signifikanten Erhöhung der Plasma- aber auch der gesamten Blutviskosität. Durch den konsekutiv verringerten Blutfluss kann es zu Gewebhypoxie und Laktatazidose und damit zu mikrovaskulären Schäden kommen (15). Hyperglykämische Stoffwechsellagen führen zu einer erhöhten endogenen Glykierung von Hämoglobin und Eiweißen der erythrozytären Zellmembran. Die Erythrozyten werden dadurch deutlich schlechter deformierbar (15). Während dies in großen Gefäßen weniger bedeutsam ist, führt eine Abnahme der Deformierbarkeit der Erythrozyten in Kapillaren mit einem Durchmesser kleiner als 10 µm und bei einer

durchschnittlichen Erythrozytengröße von etwa 8 µm zu einer Passagebehinderung. Die konsekutive Hypoperfusion führt zu einer Minderversorgung des umgebenden Gewebes mit Sauerstoff (15). Intrazelluläre Hyperglykämie inhibiert die endotheliale Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) (19, 71). NO bewirkt über Aktivierung der Guanylylzyklase in vaskulären Muskelzellen eine Relaxation, welche zur Vasodilatation führt. Der antiatherogene Effekt von NO zeigt sich durch eine Verhinderung der Adhäsion von Leukozyten und der Aggregation von Thrombozyten an das Endothel (19). Die Produktion freier Sauerstoffradikale (ROS) wird durch NO reduziert (71). Eine Verminderung der Produktion beziehungsweise der Aktivität des NO verstärkt den intrazellulären oxidativen Stress, stört die Vasodilatation und erhöht das Thromboserisiko (19, 71). Bei Diabetikern findet sich eine Erhöhung von Faktoren der plasmatischen Gerinnung (Faktor VII und Thrombin). Endogene Antikoagulantien wie Thrombomodulin und Protein C sind hingegen erniedrigt. Durch eine zusätzliche erhöhte thrombozytäre Aktivität und Aggregation steigt das Risiko thrombotischer Gefäßverschlüsse und konsekutiver Gewebeischämie (19). Morphologische Gefäßveränderungen im Zusammenhang mit hyperglykämischen Zuständen können bereits in Frühphasen der Erkrankung auftreten (2). Die sogenannte kapilläre Rarefizierung bezeichnet die Abnahme der Gefäßdichte im mikrozirkulatorischen System und führt zu einer Abnahme der Gewebepерfusion. Sie ist möglicherweise durch eine veränderte Expression des Wachstumsfaktors Angiopoetin und seines Rezeptors bei Diabetes mellitus verursacht (2). Die beschriebenen funktionellen und morphologischen Veränderungen der Mikrozirkulation führen zu diabetesassoziierten Komplikationen wie Neuropathie, Retinopathie und Wundheilungsstörungen (33, 34, 83, 114).

1.3.4) Veränderungen der Glykokalix bei Diabetes Mellitus

Charakteristisch für eine durch Hyperglykämie induzierte Vaskulopathie sind eine gesteigerte kapilläre Permeabilität für Proteine mit einem hohen Molekulargewicht, eine Abnahme des Kapillardurchmessers und eine erhöhte Adhäsivität von Thrombozyten und Leukozyten an die endotheliale Oberfläche (9, 75, 91, 115). Diese vaskulären Veränderungen sind mit Schädigungen der Glykokalix assoziiert. Die pathologische Abnahme der Dicke der Glykokalix ist vor allem durch einen Verlust an Heparansulfat bedingt (35). Dieser Umstand resultiert jedoch nicht zwangsläufig in einer Zunahme der Permeabilität. Vermutlich kommt es zu einem Kollaps der Glykokalix, durch den die verbleibenden Schichten der Struktur dichter gepackt werden und somit der Permeabilitätszunahme entgegenwirken (35). Eine signifikante Zunahme der Permeabilität mit Beeinträchtigung der Barrierefunktion resultiert vor allem aus einem gesteigerten Abbau von Hyaluronsäure. Hyaluronsäure ist hauptverantwortlich für die Aufrechterhaltung der physiologischen Permeabilität der Glykokalix (35, 76, 94). Die erhöhten

Werte von Hyaluronsäure in hyperglykämischen Zuständen weisen auf eine pathologische Zunahme des Abbaus der Substanz hin, bedingt durch eine gesteigerte Expression und Aktivität von Hyaluronidase (43, 75, 76). Die Permeabilitätserhöhung ermöglicht den Einstrom von Makromolekülen wie Albumin in das Gewebe. Das resultierende interstitielle Ödem führt zu einer verminderten Sauerstoffausschöpfung (24, 47). Durch eine ödembedingte Kompression der Gefäße der Mikrozirkulation und damit der Stoffaustauschfläche kommt es zu einer zusätzlichen Sauerstoffminderversorgung des Gewebes (12, 48, 72, 85, 86, 111). Selbst nach iatrogen induzierten hyperglykämischen Stoffwechsellagen für nur einige Stunden konnte bei ansonsten gesunden Probanden eine Abnahme des Glykokalixvolumens detektiert werden (76). Bei Patienten mit langjährigem Diabetes mellitus Typ 1 ist das systemische Glykokalixvolumen um bis zu 50 Prozent im Vergleich zu normoglykämischen Probanden reduziert. Dieser Effekt ist beim Nachweis einer Mikroalbuminurie als Prädiktor einer diabetischen Nephropathie noch verstärkt (75). Hyperglykämien resultieren in einer inflammatorischen Antwort des Organismus mit Erhöhung der Plasmaspiegel von Tumornekrosefaktor - alpha (TNF - α), Interleukin - 6 (IL-6) und C - reaktives Protein (CRP) (63, 87, 91). Die resultierenden Glykokalixschäden führen zu einer vermehrten Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten an die Gefäßwand (63, 87, 91). Die genauen Mechanismen der Glykokalixschädigung durch Inflammation werden in Abschnitt 4.2.2 erläutert.

1.4) Fragestellung

Diabetes mellitus ist eine chronische Krankheit, deren vaskuläre Folgeerkrankungen die Lebensqualität der Patienten beeinträchtigen und das Gesundheitssystem stark belasten. Es ist daher von eminenter Bedeutung, die pathophysiologischen Mechanismen dieser Erkrankung besser zu verstehen. Dies kann die Prävention kardiovaskulärer Komplikationen, frühzeitige Interventionen und die Entwicklung alternativer Therapien ermöglichen. Durch einige in vivo Studien wurden Veränderungen der Mikrozirkulation bei Diabetikern bereits beschrieben. Das SDF Imaging erlaubt einen Einblick in die mikrozirkulatorischen Verhältnisse bei Diabetespatienten. Untersuchungen bei Erwachsenen zeigten bereits Veränderungen der Glykokalixdicke bei Diabetikern.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Bestehen bei Kindern mit Diabetes mellitus Typ 1 Veränderungen der Mikrozirkulation?
2. Gibt es eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Veränderung der Mikrozirkulationsparameter und klinischen und laborchemischen Parametern?
3. Wie groß ist die Schichtdicke der Glykokalix in Blutgefäßen von Kindern mit Diabetes Mellitus Typ 1?
4. Gibt es eine Korrelation zwischen Schichtdicke der Glykokalix und klinischen und laborchemischen Parametern?

2) Material und Methoden

2.1) Patientenrekrutierung

Die Rekrutierung der Probanden fand zwischen Juli 2009 und September 2010 statt. Die pädiatrischen Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 (DM 1) wurden aus dem Patientenkollektiv der endokrinologischen Ambulanz des Dr. von Haunerschen Kinderspitals rekrutiert, wo die Patienten seit Erstdiagnose des DM 1 betreut wurden.

Einschlusskriterien:

- 1) Diagnostizierter DM 1 seit mindestens einem Jahr (gemäß den Diagnosekriterien der American Diabetes Association, siehe Abschnitt 1.3.1)
- 2) Täglicher Insulinbedarf

Ausschlusskriterien:

- 1) Vorhandensein von Spätsymptomen des DM 1 (z.B. Mikroalbuminurie oder Retinopathie)
- 2) Fehlende elterliche Zustimmung

Die Rekrutierung der Patienten erfolgte in enger Absprache mit den zuständigen pädiatrischen Kollegen. Das durchschnittliche Alter betrug 12,8 Jahre (Minimum: 8,4 Jahre, Maximum: 16,4 Jahre). Die studienbezogenen Messungen wurden unmittelbar nach Vorstellung in der endokrinologischen Ambulanz durchgeführt, sie fanden also im Rahmen der Routineuntersuchungen der Diabetes-Sprechstunde statt. Der Nüchtern-Blutglukosewert im Serum und der HbA1c-Wert wurden routinemäßig in der Ambulanz bestimmt und den Studienverantwortlichen zur Verfügung gestellt. Eine zusätzliche, für die Kinder oft unangenehme zweite venöse Punktion, wurde so vermieden.

Die Rekrutierung der Probanden der Kontrollgruppe erfolgte aus einem Patientenkollektiv der Ambulanz der Kinderchirurgischen Klinik und Poliklinik des Dr. von Haunerschen Kinderspitals. Die Kinder stellten sich dort zu elektiven Operationen aus orthopädischen, dermatologischen und urologischen Indikationen vor. Es handelte sich um kleinere Eingriffe wie osteosynthetische Versorgungen von Extremitätenfrakturen, Nävusexzisionen oder Zirkumzisionen. Das durchschnittliche Alter betrug in dieser Gruppe 11,8 Jahre (Minimum: 7,8; Maximum: 16,6).

Einschlusskriterium:

- 1) Elterliche Zustimmung zur Studienteilnahme

Ausschlusskriterien:

- 1) Komorbiditäten mit resultierender Veränderung des Gefäßsystems und der Mikrozirkulation (z.B. Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, kongenitale Defekte)
- 2) Fehlende elterliche Zustimmung

Das Studienprotokoll wurde kurz vor der anästhesiologisch angeordneten Prämedikation für den geplanten chirurgischen Eingriff durchgeführt. Alle Kinder erfüllten gängige präoperative Nüchternheitskriterien. Als Nüchternheit wurde eine Nahrungskarenz von mindestens 6 Stunden definiert. Bei allen Probanden wurde am Tag der Untersuchung im Rahmen der präoperativen Vorbereitung Blut abgenommen. Der in die Studienfragestellung einfließende Glukosewert im Serum wurde routinemäßig bestimmt. Eine zweite venöse Punktion für Studienzwecke war also auch in der Kontrollgruppe nicht nötig. Alle teilnehmenden Probanden beider Gruppen und mindestens ein Elternteil erteilten in schriftlicher Form die Einwilligung zur Durchführung der Untersuchung und zur Verwendung der Daten für wissenschaftliche Zwecke. Bei der Rekrutierung beider Gruppen wurde dem Probanden und dem anwesenden Elternteil die Funktionsweise des Sidestream Dark Field Imaging Geräts und der Ablauf der Untersuchung ausführlich mit Hilfe eines Informationsblattes erläutert. Um eine Pseudonymisierung der Daten zu gewährleisten, wurde jedem untersuchten Kind zur Auswertung ein Code bestehend aus 4 Ziffern zugewiesen. Die Studie wurde vor Beginn von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU) genehmigt.

2.2) Versuchsprotokoll

2.2.1) Aufbau des Messarbeitsplatzes

Für die Darstellung der Mikrozirkulation wurde das MicroScan Video Microscope System® der Firma MicroVisionMedical (Amsterdam, Niederlande) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein handgeführtes Videomikroskop mit LED-Beleuchtung, das Bilder der Mikrozirkulation in vivo liefert. Das MicroScan® Mikroskop verwendet die bereits in der Einleitung dieser Arbeit beschriebene Sidestream Dark Field (SDF) Imaging Technik. Das Gerät setzt sich aus dem eigentlichen Mikroskop (MicroScan Imaging Unit®) und einer Batterieeinheit zusammen, da die Messungen nicht durch externe Stromversorgung betrieben werden können. Die aufgenommenen Bildsequenzen werden durch einen Analog-zu-Digital-Umwandler (Canopus ADVC110, Thomson Inc dba Grass Valley, Kobe, Japan) in das Format „Auto Video Interleaved®“ übertragen. Über einen handelsüblichen Videoausgang können dann die Videosequenzen auf dem Bildschirm des Computers (Fujitsu Lifebook, Modell E-8310, Fujitsu Siemens GmbH) unmittelbar dargestellt oder zur späteren Offline Analyse auf einer Festplatte aufgezeichnet werden. Die dargestellte Bildfläche umfasst eine Größe von ca. 0,94 mm x 0,75 mm. Die Bilder haben eine Auflösung von etwa 1 Pixel, das entspricht näherungsweise 1 µm (30).



Abbildung 7: Mikroskop mit LED-Beleuchtung (Firma MicroVisionMedical)

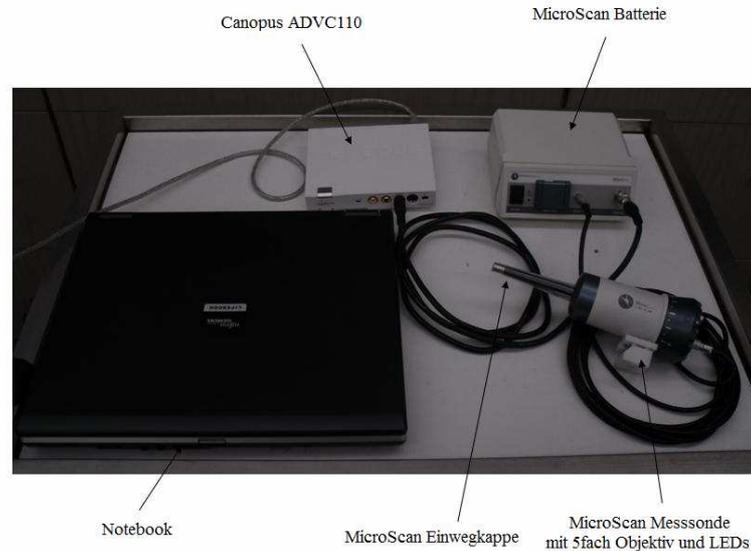


Abbildung 8: MicroScan Imaging Unit® bestehend aus der MicroScan Messsonde, der Batterieeinheit, dem Analog-zu-Digital Umwandler (Canopus ADVC110), sowie dem Computer, auf dem die Videos abgespielt und gespeichert werden können.

2.2.2) Durchführung der Messungen

Vor jeder Messung wurde das Mikroskop desinfiziert. Sterile Schutzkappen, die auf den Sensor aufgesetzt werden, gewährleisteten ausreichende hygienische Bedingungen. Als Messort wurde die Schleimhaut der Zungenunterseite gewählt. Sie bietet einen einfachen Zugang und ist stark kapillarisiert. Die Kinder waren allesamt nicht sediert, wach und zeigten regelrechte Schutzreflexe. Für alle Messungen in beiden Gruppen herrschten konstante Untersuchungsbedingungen. Die Kinder lagen bequem auf einer gepolsterten Untersuchungsfläche. Die Messungen fanden stets in Rückenlage bei geöffnetem Mund statt. Zur Minimierung von Druck- und Bewegungsartefakten wurden die Probanden vor Beginn der Messung gebeten, die Zunge so still wie möglich zu halten. Druckartefakte führen zu einer gesteigerten Reflektion des Lichts, was sich in einer Veränderung der Hintergrundhelligkeit im Monitor niederschlägt. Durch Anweisungen an die Patienten konnten Druckartefakte während der Messung unmittelbar korrigiert werden. Eine Messung dauerte 5 bis 10 Minuten, und von jedem Kind wurden mindestens 5 Videosequenzen zu je 10 Sekunden aufgenommen. Zur Digitalisierung und Aufzeichnung der Messdaten wurde ein handelsüblicher Computer (*Fujitsu Lifebook*, Modell E-8310, Fujitsu Siemens GmbH) verwendet.

2.2.3) Auswertung der Daten

Die Sequenzen wurden als Audio Video Interleave (AVI)-Daten auf einer portablen Festplatte (Freecom Mobile Drive XXS) für die spätere Offline-Analyse gespeichert. Pro Kind erfolgte die Auswertung von mindestens zwei Videosequenzen. Die Offline Analyse wurde zunächst von einem Auswerter, der bezüglich Diagnose des Kindes verblindet war, mit einer speziellen Software für halbautomatisierte Auswertungen mikrozirkulatorischer Videoaufnahmen durchgeführt, der "automated vascular analysis®" (AVA) Software (Version 3.0, University of Amsterdam, Amsterdam, Niederlande). Mit AVA konnte die Bildqualität eines ausgewählten Videoabschnittes durch Optimierung von Helligkeit und Kontrast verbessert werden. Zur Verminderung von Bewegungsartefakten wurde ebenfalls mit Hilfe von AVA eine Bildstabilisierung durchgeführt. Durch die Software wurden im stabilisierten Videoabschnitt sichtbare Blutgefäßen je nach Durchmesser mit Linien unterschiedlicher Farbe automatisch markiert. Abschließend erstellte das Programm einen Analysenbericht mit den erhobenen Daten.

Gefäßgröße	Gefäßdurchmesser (μm)	Farbe
Klein	01 bis 10	Gelb
Mittel	10 bis 20	Orange
Groß	20 bis 50	Rot
Sehr groß	50 bis 10000	Blau

Tabelle 1: Gefäßeinteilung nach Durchmesser



Abbildung 9: Gefäßteilung nach Durchmesser: Nachdem der ausgewählte Videoabschnitt analysiert wurde, klassifizierte das Programm AVA die Gefäße anhand ihres Durchmessers

Zur Auswertung der Glykokalixdicke wurde die in Abschnitt 2.2.4.1 beschriebene Methode von Nieuwdorp und Kollegen verwendet (78). Die Originalsequenzen wurden zunächst mit Hilfe des Videoerfassungs- und -bearbeitungsprogramms Virtual Dub® gekürzt. Abschnitte der Videosequenzen, in denen die Passage eines Leukozyten durch eine Kapillare beobachtet werden konnte, wurden gezielt ausgewählt. Nur Gefäße mit einem Durchmesser zwischen 3 und 7 μm wurden für die Messung der Glykokalixdicke ausgewählt. Bei größeren Gefäßen wird die endotheliale Oberfläche durch Leukozyten nicht mechanisch beeinflusst. Die AVI-Abschnitte wurden offline mit dem Videobildanalyseprogramm Image J® auf einem handelsüblichen Notebook ausgewertet. Vor Messbeginn kalibrierte das Programm die Bildeigenschaften ("Image – Properties"). Nach Optimierung des Kontrastes wurde der gewünschte Ausschnitt zunächst optisch vergrößert. Zur Bestimmung der Gefäßdurchmesser wurde eine 30 μm lange Linie ("ImageJ straight line") senkrecht zur Richtung des Blutflusses durch das Gefäß gelegt (siehe Abbildung 10 und 11). Anhand einer Skala lassen sich die Grauwerte entlang der Linie graphisch darstellen. Polarisiertes Licht wird nur von Erythrozyten absorbiert. Im Zentrum des Gefäßes finden sich daher die dunkelsten Graustufen, während es in Richtung der Gefäßwand zu einer Aufhellung kommt. So entsteht ein V-förmiger Graph. Die Breite der Erythrozytensäule wurde definiert als Abschnitt auf der X-Achse bei halbmaximaler Intensität der Grauwerte ("full width at half maximum") zu beiden Seiten des Graphen (siehe Abbildung 12 und 13). Die ImageJ straight line verfügt über eine μm -Skalierung. Mit Hilfe des Messschiebers wurde die Breite der fließenden Erythrozytensäule unmittelbar vor und nach dem spontanen Durchfluss eines Leukozyten gemessen.

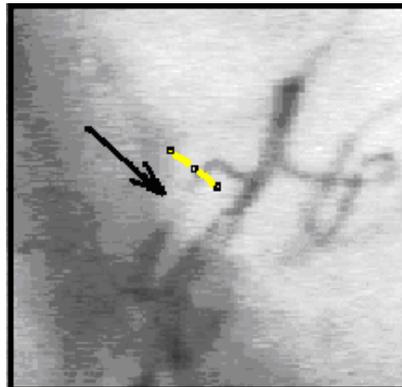


Abbildung 10: Kapillare vor Leukozytendurchtritt. Zu einer ausgewählten Kapillare wird eine senkrechte Linie gezogen. Dadurch kann der Durchmesser der Erythrozytensäule vor und nach Leukozytendurchtritt gemessen werden. Der Leukozyt stellt sich im Bild aufgrund des fehlenden Hämoglobins als Negativbild (weißer Punkt) dar. Er absorbiert das emittierte Licht nicht. Der schwarze Pfeil markiert den Leukozyten.

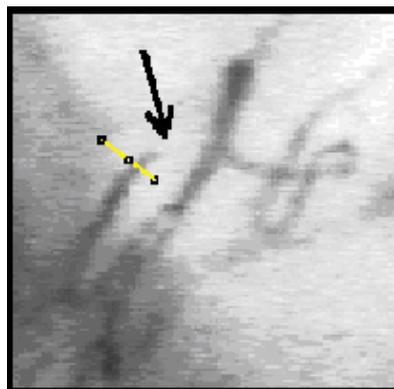


Abbildung 11: Kapillare aus Abbildung 10 unmittelbar nach Leukozytenpassage. Anhand der perpendicularen Linie lässt sich der veränderte Durchmesser der Erythrozytensäule messen.

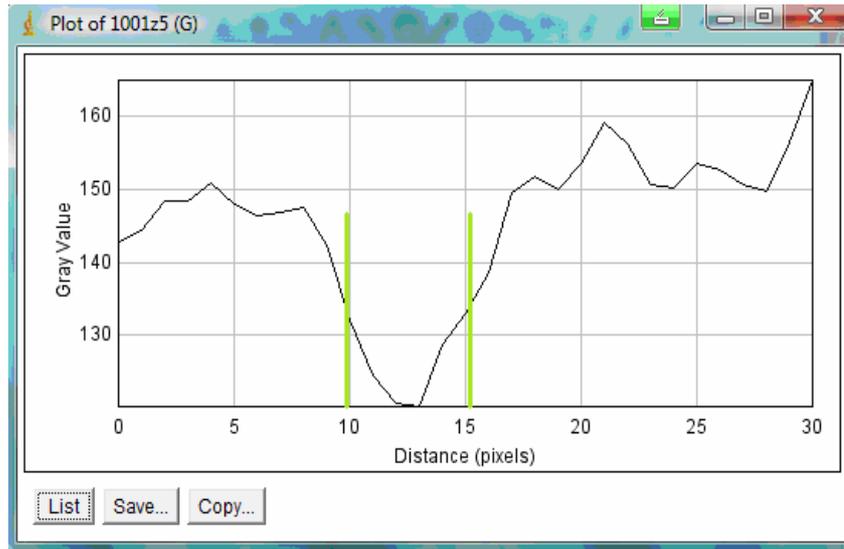


Abbildung 12: Darstellung einer Kapillare vor einer Leukozytenpassage anhand einer Grauskala. Auf der y-Achse sind die Grauwerte, auf der x-Achse die Image J straight line mit μm - Skalierung aufgetragen. Das Zentrum des Gefäßes ist gekennzeichnet durch den der x-Achse am nächsten gelegenen Punkt der Figur. Dies entspricht dem dunkelsten (hämoglobinreichsten) Punkt der Grauskala. Die Begrenzungen der Kapillare sind durch die „V“ - förmige Struktur der Figur abgebildet. Die Messung des Durchmessers erfolgte ab dem Mittelpunkt zwischen Zentrum und Begrenzung der Kapillare bei halbmaximaler Intensität der Grauwerte (je eine grüne Vertikale)

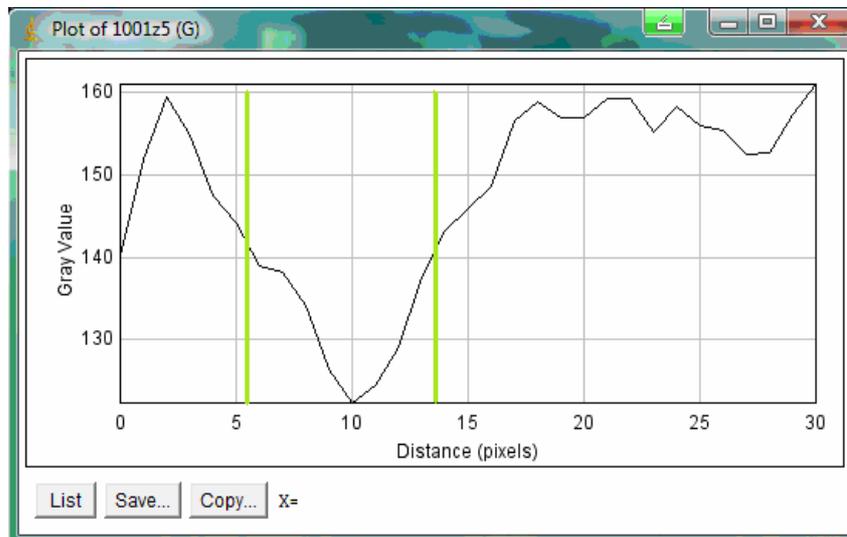


Abbildung 13: Darstellung der Kapillare aus Abbildung 12 nach einer Leukozytenpassage anhand einer Grauskala. Die Ermittlung des Kapillardurchmessers erfolgte, wie in der vorherigen Abbildung erläutert. Die Differenz der Durchmesser vor und nach Leukozytenpassage geteilt durch 2 ergab die Veränderung der Glykokalixdicke. Die Glykokalix wird durch Leukozytenpassage an die kapilläre Gefäßwand gedrückt

Die anhand dieser Grauskala ermittelten Durchmesserwerte der Erythrozytensäulen vor (D_{prae}) und nach (D_{post}) Leukozytendurchfluss wurden in eine Excel - Tabelle übertragen.

2.2.4) Untersuchte Parameter

Als Parameter wurden die Glykokalixdicke und 4 Parameter zur Beschreibung der Mikrozirkulation bestimmt.

2.2.4.1) Glykokalixdicke

Die Methode basiert auf der Tatsache, dass Erythrozyten die intakte Glykokalix nicht penetrieren können, wodurch ein an die Gefäßwand angrenzender erythrozytenfreier Raum entsteht (78). Der Durchmesser der Erythrozytensäule ist also geringer als der eigentliche anatomische Gefäßdurchmesser. Leukozyten, die weniger verformbar sind, komprimieren dagegen die Glykokalix während der Passage durch Kapillaren. Hierdurch können die nachfolgenden Erythrozyten kurzzeitig näher an die Gefäßwand gelangen, was als Verbreiterung der Erythrozytensäule sichtbar wird. Die Größe dieser Erythrozytensäule wird vor und unmittelbar nach der Passage eines Leukozyten gemessen. Die Veränderung der Erythrozytensäule nach dem Durchtritt eines Leukozyten, also bei komprimierter Glykokalix, entspricht dem sogenannten anatomischen Durchmesser der Kapillare ($D_{cap_{anat}}$). Die Höhe der Erythrozytensäule vor Leukozytenpassage ergibt eine Abschätzung des sogenannten funktionellen, also perfundierten Kapillardurchmesser ($D_{cap_{func}}$). Nach der Formel $[D_{cap_{anat}} - D_{cap_{func}}] / 2$ lässt sich die Glykokalixdicke für die jeweilige Kapillare abschätzen (75).

2.2.4.2) Parameter der Mikrozirkulation

1) Gefäßdichte ("total vessel density", TVD): Die TVD entspricht der Gesamtlänge des Gefäßnetzes in mm pro Fläche des Bildausschnitts in mm^2 . Mit dem SDF Imaging können nur perfundierte Gefäße visualisiert werden, da das emittierte Licht vom Hämoglobin der Erythrozyten absorbiert wird. Nicht perfundierte Gefäße werden nicht visualisiert und werden deshalb nicht erfasst. Für jede Messung wurde ein Bildausschnitt ausgewählt. Das Programm AVA berechnete automatisch die Gesamtlänge aller Gefäße des Ausschnittes.

2) Gefäßverteilung nach Durchmesser ("diameter distribution", DD): Die Gefäße werden nach ihrem Durchmesser in μm klassifiziert. In dieser Studie wurden die Gefäße entsprechend ihres Durchmessers in klein (bis 10 μm), mittelgroß (10 - 20 μm) und groß (größer 20 μm) eingeteilt. Die DD entspricht dem prozentualen Anteil der jeweiligen Durchmesser-kategorie an der Gesamtlänge aller Gefäße (TVD) in Prozent und wird automatisiert von AVA ermittelt.

3) Gefäßabdeckung ("vessel coverage", VC): Die VC entspricht dem Anteil der Fläche des Bildausschnitts, die durch Blutgefäße bedeckt wird in Prozent. Somit kombiniert die VC die

Information der Gefäßdicke (TVD) und der Durchmesser- und Verteilung pro Bildausschnitt (DD). Auch dieser Parameter wird durch das Computerprogramm AVA automatisiert berechnet.

4) Qualität des Flusses ("microvascular flow index", MFI): Der MFI ist ein semiquantitativer Score, welcher die Qualität und Geschwindigkeit des Blutflusses in einem Gefäß beschreibt (7). Zur Ermittlung dieses Parameters werden die Videosequenzen in 4 Quadranten geteilt. Für jeden Quadranten erfolgt die Analyse des Blutflusses gemäß der untenstehenden Tabelle. Der Mittelwert der für die Quadranten ermittelten Werte ergibt den MFI.

Klassifikation	Flow Type – Art des Flusses
0	<i>No flow</i> – kein Blutfluss
1	<i>Intermittent</i> – intermittierender Blutfluss
2	<i>Sluggish</i> – träger Blutfluss
3	<i>Continuous</i> – kontinuierlicher Blutfluss
4	<i>Hyperdynamic</i> – hyperdynamischer Blutfluss

Tabelle 2: Klassifizierung des MFI

2.2.5) Validierung der Auswertung

Um die Validierung der Datenauswertung zu gewährleisten wurden die Interrater- und Intrarater-Reliabilität bestimmt. Die Reliabilität ist ein Maß für die Zuverlässigkeit empirischer Untersuchungen. Wiederholte Messungen unter gleichen Rahmenbedingungen sollen gleiche Messergebnisse erzielen. Die Interrater-Reliabilität bezeichnet die Replizierbarkeit der Ergebnisse von Auswertungen derselben Sequenz durch zwei Untersucher unabhängig voneinander. Die Intrarater-Reliabilität beschreibt die Reliabilität bei der Auswertung derselben Sequenz zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch ein und denselben Untersucher.

2.3) Statistik

Die statistische Analysen wurden mittels des Programms SigmaStat 3.5 (Systat software company GmbH, Erkrath, Germany) durchgeführt. Die Daten wurden als Median und Interquartile Range angegeben. Der Wilcoxon rank sum test diente zum Vergleich der resultierenden Mediane der beiden Gruppen. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0.05$ festgelegt.

Für die Überprüfung einer Korrelation zwischen der Dicke der endothelialen Glykokalix und den klinischen und laborchemischen Daten, wie BMI und Blutglukosewerte, wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson (r) bestimmt. Der Korrelationskoeffizient ist ein dimensionsloses Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs zwischen zwei mindestens intervallskalierten Merkmalen. Der Koeffizient kann Werte zwischen +1 (vollständig positiver Zusammenhang) und -1 (vollständig negativer Zusammenhang) annehmen. Bei einem Korrelationskoeffizienten von 0 besteht kein linearer Zusammenhang der untersuchten Variablen. Als Signifikanzniveau wurde ebenfalls $p < 0.05$ festgelegt.

3) Resultate

3.1) Klinische und laborchemische Parameter

Insgesamt wurden 38 Kinder untersucht. Nach Abschluss der Messungen wurden die Videosequenzen von 10 Kindern als nicht auswertbar ausgeschlossen.

Die Probanden der Kontrollgruppe wiesen, abgesehen von dem jeweiligen Befund, der den geplanten operativen Eingriff rechtfertigte, keine Vorerkrankungen auf.

Im Kollektiv der Patientengruppe fanden sich einige Kinder, die zusätzlich zum Diabetes mellitus Typ 1 (DM 1) weitere Erkrankungen hatten. So war bei 2 Teilnehmern eine Hashimoto-Thyreoditis diagnostiziert, die durch die regelmäßige Einnahme von L-Thyroxin therapiert wurde. Ein Kind litt unter rezidivierenden Krampfanfällen unklarer Genese, ein weiteres war übergewichtig und erfüllte die Kriterien einer Prähypertonie. Die Kinder der Patientengruppe befanden sich ausnahmslos im Frühstadium des DM 1. So zeigten gängige Verfahren zum Screening auf Vaskulopathien wie Urinuntersuchung und ophthalmologische Kontrollen keine klinisch apparenten Pathologien im Sinne von Mikroalbuminurien und Retinopathien.

Wie aus Tabelle 3 zu entnehmen, unterschieden sich die beiden Gruppen nicht signifikant hinsichtlich der klinischen Charakteristika. Die Blutglukosewerte waren erwartungsgemäß bei den Kindern mit Diabetes mellitus Typ 1 signifikant höher als bei denen aus der Kontrollgruppe. Überraschenderweise ergab sich im Patientenkollektiv eine signifikant höhere Leukozytenanzahl.

	<i>Diabetes</i>	<i>n</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>n</i>	<i>p (rank sum test)</i>
Klinische Daten					
Alter (Jahre)	13.6 [9.9 – 14.4]	14	11.6 [9.7 – 14]	14	0.382
Alter bei der Erstdiagnose (Jahre)	6.5 [3.3 – 9.3]	14	-		-
Männliche Kinder	-	8	-	7	-
BMI (kg/m ²)	20.4 [16.7 – 23.0]	14	16.5 [15.5 – 19.1]	11	0.106
RR syst (mmHg)	112 [108 – 117]	14	111 [109 – 116]	13	0.752
RR diast (mmHg)	63 [58 – 67]	14	65 [61 – 72]	13	0.679
Laborchemische Daten					
Serum Blutzucker (mg/dl)	127 [93 – 165]	14	81 [75 – 95]	14	0.004
HbA1c (%)	7.8 [7.2 – 8.4]	13	-		-
Hämatokrit (%)	38 [36 – 41]	14	38 [36 – 39]	14	0.50
Leukozytenzahl (G/l)	6.9 [5.8 – 9.1]	14	5.9 [5.0 – 6.0]	14	0.031

Tabelle 3: Klinische und laborchemische Parameter (Werte angegeben als Median und Interquartile Range), BMI = body mass index.

3.2) Veränderungen mikrozirkulatorischer Parameter bei Kindern mit Diabetes mellitus

Die Untersuchungen der sublingualen Mikrozirkulation zeigten signifikante Veränderungen einiger Parameter in der Patientengruppe. Im Gefäßbett von Kindern mit Diabetes mellitus war die Anzahl von Kapillaren mit einem Durchmesser kleiner 10 µm tendenziell verringert (Abb. 14). Bei den mittelgroßen Gefäßen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 15). Im Gegenzug kamen größere Gefäße mit einem Durchmesser von mehr als 20 µm in der Patientengruppe signifikant häufiger vor als in der Kontrollgruppe (Abb. 16). Durch die erhöhte Anzahl an großen Gefäßen (> 20 µm Durchmesser) zeigte sich bei den erkrankten Kindern eine signifikant höhere Gefäßabdeckung ("vessel coverage", VC) im untersuchten sublingualen Gewebe (Abb. 17). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Gefäßdichte (TVD) zwischen der Patientengruppe und der Kontrollgruppe (Abb. 18). Bei der Qualität und Geschwindigkeit des Blutflusses, gemessen mit dem semiquantitativen "microvascular flow index" (MFI), zeigte sich bei Kindern mit Diabetes mellitus tendenziell ein etwas niedrigerer Fluss. Der Unterschied erreichte jedoch kein Signifikanzniveau (Abb. 19).

Prozentsatz der kleinen Gefäße (Durchmesser kleiner 10 µm)

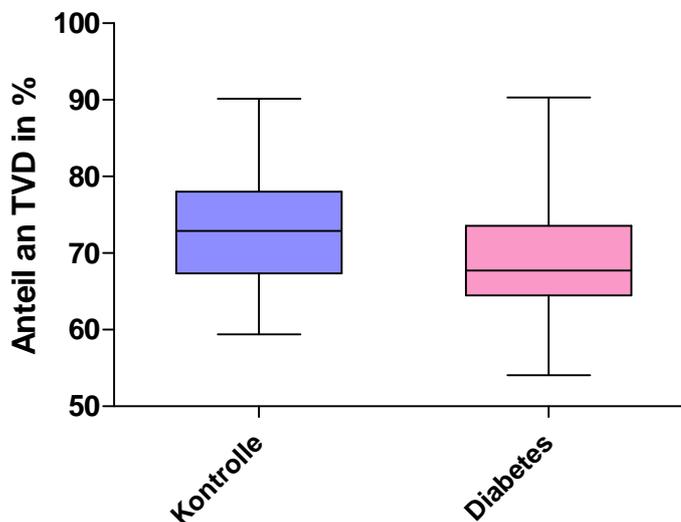


Abbildung 14: Prozentsatz der Gefäße mit einem Durchmesser kleiner 10 µm: In der Patientengruppe zeigt sich eine Verminderung von Kapillaren mit einem Durchmesser kleiner 10 µm, allerdings ohne statistische Signifikanz (Patientengruppe 69 % ± 8.7% vs. Kontrollgruppe 73% ± 8.6%, p = 0.26).

Prozentsatz der mittelgroßen Gefäßen (Durchmesser 10 - 20 µm)

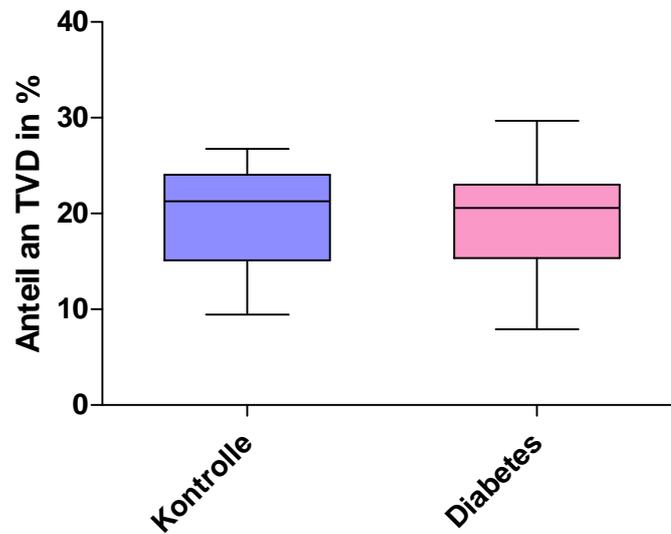


Abbildung 15: Prozentsatz der Kapillaren mit einem Durchmesser zwischen 10 und 20 µm: Bei dem prozentualen Anteil der mittelgroßen Kapillaren an der Gesamtheit der Kapillaren ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Patienten- und der Kontrollgruppe (20% ± 5.5% in der Patientengruppe vs. 21% ± 5.3% in der Kontrollgruppe, p= 0.34).

Prozentsatz der großen Gefäßen (Durchmesser größer 20 µm)

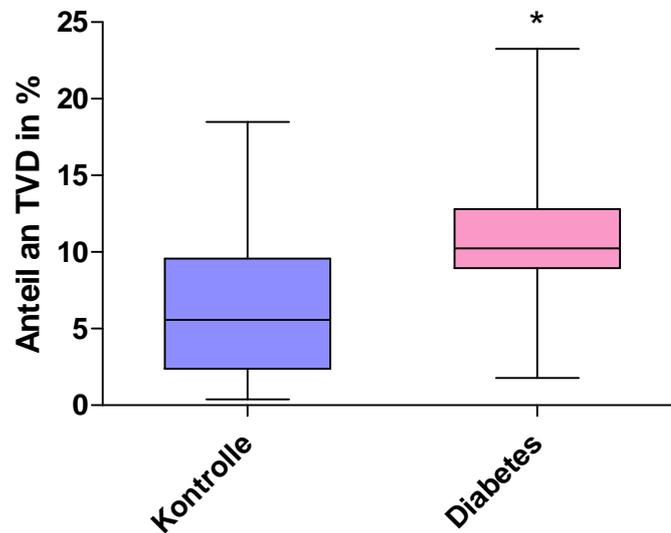


Abbildung 16: Prozentsatz der Gefäße mit einem Durchmesser größer 20 µm: * In der Gruppe der Kinder mit Diabetes mellitus fand sich ein signifikant erhöhter prozentualer Anteil an Gefäßen mit großem Durchmesser gegenüber der Kontrollgruppe (11% ± 4.8% vs. 6.7% ± 5.0%, p = 0.023).

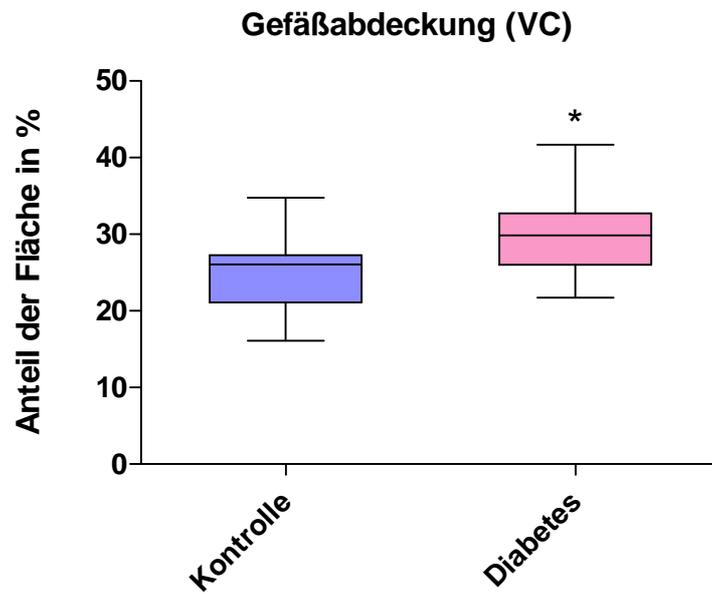


Abbildung 17: Gefäßabdeckung: * In der Patientengruppe zeigte sich eine signifikant größere Gefäßabdeckung als in der Kontrollgruppe (30% ± 5.0% in der Patientengruppe vs. 25% ± 4.9 % in der Kontrollgruppe, p = 0.041).

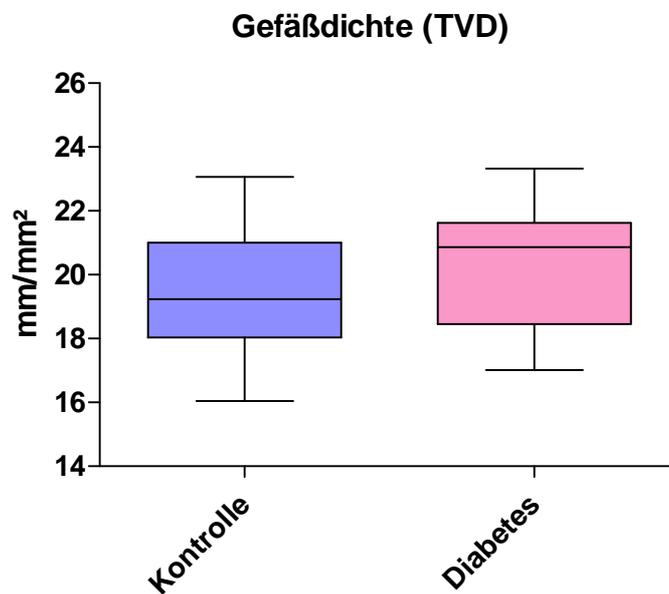


Abbildung 18: Bei dem Parameter Gefäßdicke wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Gruppen festgestellt (Patientengruppe: 20.86 mm/mm² ± 2.0 mm/mm² vs. Kontrollgruppe: 19,24 mm/mm² ± 2.0 mm/mm², p = 0.2).

Qualität des Flusses (MFI)

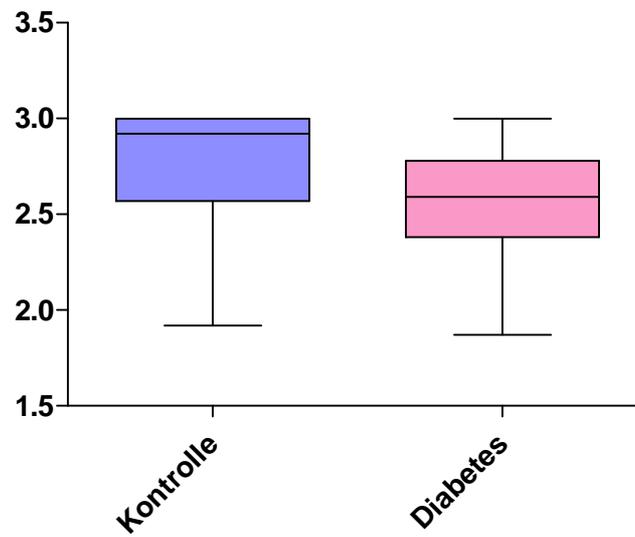


Abbildung 19: Vergleich des "microvascular flow index" (MFI) zwischen beiden Gruppen. Wie bereits erwähnt, ist der MFI ein semiquantitativer Score mit den Werten 0 (kein Blutfluss) bis 4 (hyperdynamischer Blutfluss). Sowohl in der Patienten- als auch in der Kontrollgruppe fand sich ein überwiegend kontinuierlicher Blutfluss (Kontrollgruppe 2.9 ± 0.38 vs. Patientengruppe 2.6 ± 0.32).

3.3) Verlust der Glykokalixdicke bei Kindern mit Diabetes mellitus

Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die Dicke der endothelialen Glykokalix der sublingualen Gefäße in der Patientengruppe signifikant reduziert (Abb. 20). Es bestand zudem eine inverse Beziehung zwischen Glykokalixdicke und Höhe der Blutglukosewerte (Abb. 21). Eine Korrelation zwischen Glykokalixdicke und BMI der Kinder zeigte sich nicht. Unerwarteterweise korrelierten erhöhte HbA1c-Werte nicht mit dem Verlust der Glykokalix. Auch die Dauer der Erkrankung ließ sich in keine Beziehung zum Verlust der Glykokalixdicke setzen.

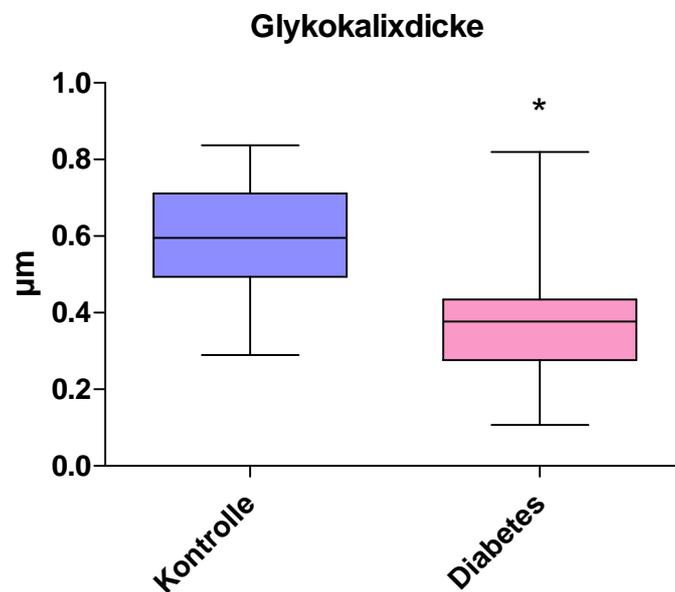


Abbildung 20: Vergleich der Glykokalixdicke: * In der Patientengruppe zeigte sich eine signifikante Reduktion der Glykokalixdicke im Vergleich zur Kontrollgruppe (0.38 µm [0.3-0.41 µm] in der Patientengruppe vs. 0.60 µm [0.51-0.70 µm] in der Kontrollgruppe, p = 0.013).

Korrelation: Glykokalixdicke vs. Blutglukosewerte

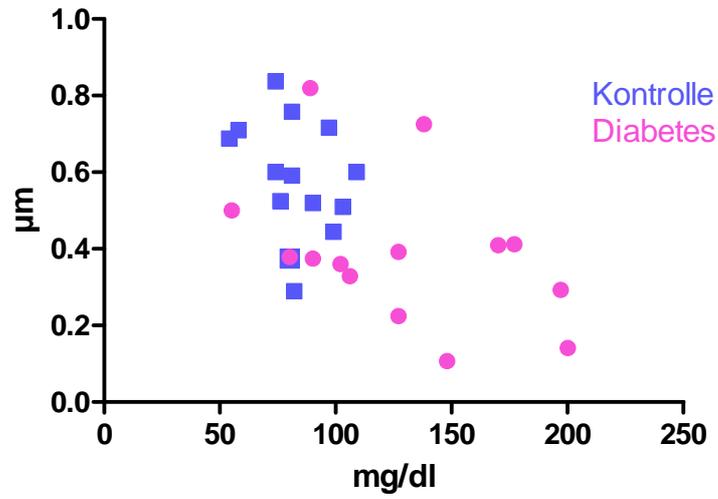


Abbildung 21: Korrelation zwischen Glykokalixdicke und Blutglukosewerte: Die Dicke der endothelialen Glykokalix war umgekehrt proportional zum Blutglukosespiegel ($r = -0.62$, $p = 0.0007$).

Wie in Tabelle 4 zusammengestellt, zeigten die vorgestellten Resultate zu Parametern der Mikrozirkulation und Glykokalixdicke mit Korrelationskoeffizienten zwischen 0.74 und 0.99 sowohl eine gute Intra- als auch Interraterreabilität.

Messungen	Patienten / Kontrolle	Intrarater correlation (r)	p-Wert	Interrater correlation (r)	p-Wert
TVD	10/10	0.98	<.001	0.96	<.001
Vessel coverage	10/10	0.96	<.001	0.90	<.001
% kleine Gefäße	10/10	0.99	<.001	0.94	<.001
% mittelgroße Gefäße	10/10	0.96	<.001	0.94	<.001
% große Gefäße	10/10	0.99	<.001	0.92	<.001
Glykokalixdicke	5/5	0.74	.015	0.78	.008

Tabelle 4: Intra-und Interraterreliabilität bei den erhobenen Parametern der Mikrozirkulation und der Glykokalixdicke.

4) Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Mikrozirkulation von Kindern mit der mindestens seit einem Jahr gesicherten Diagnose eines Diabetes mellitus Typ 1 und Kindern ohne diese Erkrankung verglichen. Die erkrankten Kinder wiesen bis dato keine der bekannten mit Diabetes mellitus Typ 1 assoziierten vaskulären Folgeerkrankungen auf. Für die Durchführung der Untersuchungen wurde eine Technik verwendet, die eine unmittelbare Darstellung der kapillaren Strombahn ermöglicht, das SDF Imaging. Als Studiendesign wurde eine prospektive, kontrollierte Beobachtungsstudie gewählt.

4.1) Diskussion der Ergebnisse

Bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 wird die Erkrankung meist im Kindesalter diagnostiziert. Dennoch liegt der Forschungsschwerpunkt auf der Untersuchung der Pathologien im Erwachsenenalter. Über mikrozirkulatorische Veränderungen bei pädiatrischen Patienten findet sich wenig Fachliteratur. Zur Veränderung der Glykokalixdicke in diesem Patientenkollektiv gibt es unseres Wissens bis dato keine Studien. Die geringe Fallzahl der vorliegenden Arbeit lässt nur eine eingeschränkte Aussage über Veränderungen der Mikrozirkulation bei Diabetes mellitus Typ 1 zu. Es ist des Weiteren nicht auszuschließen, dass es sich bei den gezeigten Veränderungen in der Gruppe der Kinder mit Diabetes mellitus um temporäre Phänomene handelt. Vorangegangene Studien mit längeren Beobachtungszeiträumen ergaben jedoch sowohl im Tiermodell als auch bei erwachsenen Patienten mit Diabetes mellitus ähnliche Resultate (2, 9, 75, 115). Es ist außerdem nicht auszuschließen, dass die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Veränderungen der Mikrozirkulation ein auf die sublinguale Mukosa beschränktes Phänomen sind. Hyperglykämische Stoffwechsellagen beeinträchtigen jedoch die systemische Mikrozirkulation. Zudem ist die mukosale Perfusion der Zunge mit der der inneren Organe (Niere, Kolon, Magen) gut vergleichbar (51).

4.1.1) Veränderungen der Glykokalix

In der vorliegenden Untersuchung konnten schädigende Einflüsse hyperglykämischer Stoffwechsellagen auf die endotheliale Glykokalix nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der Glykokalixdicke in der Patientengruppe trotz in der Regel erst verhältnismäßig kurzer Krankheitsdauer und fehlender diabetesassoziierter vaskulärer

Komplikationen. Zudem ergab sich eine inverse Beziehung zwischen Blutglukosewerten und Glykokalixdicke. Frühere Arbeiten wiesen eine geringere Schichtdicke in den sublingualen Kapillaren von erwachsenen Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 und 2 im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen nach (9, 75). Nieuwdorp und Kollegen konnten zeigen, dass die Abnahme des systemischen Glykokalixvolumens in einer Patientensubgruppe mit Diabetes mellitus Typ 1, die eine Mikroalbuminurie aufwies, stärker als im Gesamtkollektiv der Patienten ausgeprägt war (75). Bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 fand sich eine in ihrem Ausmaß vergleichbar verringerte Glykokalixdimension sowohl in den sublingualen als auch retinalen Kapillaren (8). Hyperglykämische Stoffwechsellagen sind für die mitochondriale Bildung von Sauerstoffradikalen (ROS) verantwortlich (70). Diese führen zu einer verminderten Synthese von Glykosaminoglykanen, der entscheidenden Determinante des Glykokalixvolumens (76, 99). Der durch die konsekutive Bildung von Peroxynitrit und Nitrotyrosin induzierte oxidative Stress schädigt die Glykokalixstruktur und führt zu endothelialer Dysfunktion (10, 70). Die mitochondriale Produktion von Superoxidanionen erhöht die intrazelluläre Produktion von Endprodukten der Glykosilierung (sog. Advanced Glycation Endproducts, AGE). Die AGE verstärken wiederum die Bildung von freien Sauerstoffradikalen und erhöhen damit ihrerseits den zellulären oxidativen Stress. Des Weiteren initiieren die AGE durch Bindung an plasmatische Proteine eine inflammatorische Kaskade mit verstärkter Zytokinproduktion (10, 19, 80). Bereits frühere Studien im Tiermodell und an erwachsenen Probanden konnten zeigen, dass akute hyperglykämische Zustände sowohl zu einem Funktionsverlust der Glykokalix als auch, zumindest beim Menschen, zu einer Verminderung des systemischen Glykokalixvolumens führen können (76, 115). Bereits nach kurzen iatrogen induzierten hyperglykämischen Episoden von wenigen Stunden ließen sich bei sonst normoglykämischen Probanden eine Reduktion des systemischen Glykokalixvolumens um etwa fünfzig Prozent und erhöhte Plasmawerte ihrer Bestandteile, wie Hyaluronsäure, detektieren (76). Während Hyperglykämien kommt es zu einer Aktivitätserhöhung des Enzyms Hyaluronidase, welches den Abbau von Hyaluronsäure steuert. Hyaluronsäure ist entscheidend für die Permeabilität der Glykokalix, wohingegen Proteoglykane hauptsächlich die Glykokalixdicke regulieren (35, 43, 77, 115). Im Tiermodell konnte eine Erhöhung der Glykokalixdurchlässigkeit allerdings ohne Abnahme der Glykokalixdicke nachgewiesen werden. Die Autoren führen dies auf einen überwiegenden Einfluss der Hyperglykämie auf die Hyaluronsäurekomponente der Glykokalix zurück (115). Ein direkter Nachweis einer Permeabilitätserhöhung der Glykokalix, beispielsweise durch Nachweis eines interstitiellen Ödems, erfolgte in der vorliegenden Untersuchung nicht. Die Beschädigung der Glykokalix führt zu einer endothelialen Dysfunktion, die systemisch im gesamten Kapillarnetz des Organismus auftritt. Die insuffiziente Barrierefunktion des geschädigten Endothels erhöht die Permeabilität für Makromoleküle durch die Gefäßwand (97, 98). Dies führt am glomerulären Filtrationsapparat der Nieren zum Auftreten von Mikroalbuminurie. Bereits 1989 wurde erstmalig die Hypothese geäußert, dass Mikroalbuminurie und die generalisierte endotheliale Dysfunktion einen

gemeinsamen Ursprung haben (25). Eine pathologisch erhöhte Permeabilität im gesamten Kapillarbett, besonders für Albumin, ist ein früher sensitiver Marker für eine generalisierte endotheliale Dysfunktion, beispielhaft in der Retina, den Nieren und dem mesenterialen Gefäßbett (2, 25). Diese Gefäßdurchlässigkeit lässt sich bereits in frühen Stadien eines Diabetes mellitus nachweisen (9). Die Mikroalbuminurie ist nicht nur der sicherste Prädiktor für eine diabetische Nephropathie, sie ist außerdem assoziiert mit einer systemischen Mikro- und Makroangiopathie bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1. Folgen der Gefäßveränderungen sind beispielsweise die diabetische Retinopathie und Atherosklerose der Herzkranzgefäße. Nieuwdorp und Kollegen konnten eine direkte Korrelation zwischen der Abnahme des lokalen Glykokalix in sublingualen Kapillaren und einer generalisierten Reduktion des systemischen Glykokalixvolumens unter hyperglykämischen Bedingungen zeigen (75). Auch bei Diabetes mellitus Typ 2 lässt sich eine parallele Abnahme der Glykokalixdimensionen an verschiedenen Stellen des Organismus feststellen (9). Die erwähnten Forschungsergebnisse lassen vermuten, dass Parameter der sublingualen Mikrozirkulation, insbesondere Veränderungen der Glykokalix, zur Detektion einer generalisierten subklinischen Mikroangiopathie herangezogen werden können. Neben Veränderungen der vaskulären Permeabilität ist eine Abnahme der Glykokalixdicke mit makroangiopathischen Prozessen wie der Atherosklerose assoziiert. So zeigt sich eine Korrelation zwischen erhöhten Plasmawerten von Hyaluronsäure, die, wie bereits erwähnt, bei Schädigungen der Glykokalix freigesetzt wird, und einer Zunahme der Schichtdicke von Tunica intima und Tunica media der Arteria carotis interna (77).

In der vorliegenden Arbeit fand sich keine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Glykokalixveränderungen und dem HbA1c-Wert der Patienten. Die Nüchternglukosespiegel im Plasma zeigten jedoch, wie bereits erwähnt, eine klare Korrelation mit der Abnahme der Glykokalixdicke. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu vorherigen Untersuchungen (75). So konnten Nieuwdorp und Kollegen eine Korrelation zwischen Abnahme der Glykokalixdicke und erhöhten HbA1c-Werten nachweisen, nicht jedoch zwischen dem Nüchternglukosewert und Glykokalixveränderungen (75). Die Patientenkollektive unterschieden sich allerdings in beiden Studien erheblich. Denn in der vorliegenden Arbeit wurden pädiatrische Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 im Frühstadium ohne krankheitsassoziierte Komplikationen untersucht. Nieuwdorp und Kollegen wählten ein erwachsenes Patientengut mit langem Krankheitsverlauf und zum Teil bereits bestehenden Spätfolgen wie Mikroalbuminurie (75). Der HbA1c-Wert gibt Auskunft über die mittleren Werte der Blutglukose innerhalb der letzten 8 bis 12 Wochen vor Bestimmung. Er erfasst keine akuten Schwankungen des Blutzuckerspiegels, wie beispielsweise akute Hyperglykämien. Diese glykämische Variabilität ist jedoch weit mehr als chronisch gering erhöhte Blutglukosewerte für die mitochondriale Bildung von Sauerstoffradikalen (ROS) und konsekutive Glykokalixschädigungen verantwortlich (70, 115). Dies könnte eine mögliche Erklärung für die fehlende Korrelation der Glykokalixdicke mit den HbA1c Werten darstellen. Da es sich um eine Messung zu einem einzelnen Zeitpunkt handelt, kann nicht beurteilt werden, ob es sich beim Verlust der Glykokalix um ein transientes oder

dauerhaftes Phänomen handelt. Zur Klärung dieser Fragestellung sind zukünftige Studien mit longitudinalem Ansatz notwendig.

In der Patientengruppe wurde eine signifikant höhere Leukozytenzahl detektiert als in der Kontrollgruppe. Dies ist möglicherweise Ausdruck einer chronisch inflammatorischen Komponente der Erkrankung Diabetes mellitus. Hyperglykämie ist ein potenter proinflammatorischer Stimulus. Marker einer chronischen Inflammation, wie das C-reaktive Protein (CRP), Tumornekrosefaktor (TNF - α) und Interleukin - 6 (IL - 6) sind bei erwachsenen Patienten mit Diabetes mellitus Typ1 pathologisch erhöht (63, 87, 91). Der Nachweis dieser Entzündungsmarker ist auch mit dem Auftreten einer Mikroalbuminurie assoziiert (75, 91). TNF- α beispielsweise schädigt die endotheliale Glykokalix sowohl auf direkte als auch auf indirekte Weise. Einerseits steigert der Tumornekrosefaktor die Produktion von endothelialen Zelladhäsionsmolekülen und von IL - 6. TNF - α erhöht aber auch unmittelbar die endotheliale Permeabilität und zerstört die Glykokalix (91). Es gibt Hinweise, dass die verstärkte Leukozytenadhäsion an der Endothelwand die kapilläre Perfusion nicht nur durch Verengung des Gefäßlumens, sondern auch durch Inaktivierung von vasodilatatorischem Stickstoffmonoxid (NO) beeinträchtigt. Die Inaktivierung erfolgt dabei durch vermehrt gebildete ROS (2, 19). Die Produktion von NO wird bei intrazellulären Hyperglykämien auch direkt durch verminderte Genexpression herunterreguliert. Die Minderproduktion von NO geht einher mit einer Mehrproduktion der vasokonstriktorischen Substanz Endothelin-1 (10). Diese Veränderungen resultieren in einer endothelialen Dysfunktion.

Grundsätzlich ist die Normoglykämie erwiesenermaßen ein protektiver Faktor zur Verringerung vaskulärer Komplikationen, wie Nephropathie, Retinopathie und Neuropathie, bei Patienten mit Diabetes mellitus (26, 34, 48, 49, 102, 105). Daher kommen präventiven Maßnahmen wie engmaschige Kontrolle der Plasmaglukosewerte, regelmäßige Bewegung und eine ausgewogene Ernährung eine entscheidende Bedeutung im Kampf gegen Diabetes mellitus und seine Komplikationen im Langzeitverlauf zu.

4.1.2) Parameter der Mikrozirkulation

Die untersuchten Kinder mit Diabetes mellitus Typ 1 wiesen im Vergleich zu den Probanden der Kontrollgruppe eine erhöhte Gefäßabdeckung (VC) pro Bildausschnitt auf. Aellen und Kollegen konnten zeigen, dass Patienten mit manifester arterieller Hypertonie mit und ohne Diabetes mellitus Typ 2 bei adäquater Blutdrucktherapie keine Unterschiede in der VC aufwiesen (1). Debbabi und Kollegen wiesen bei Hypertonikern ohne Diabetes mellitus eine reduzierte VC im Gegensatz zu normotensiven Kontrollpersonen nach (22). Ein möglicher Erklärungsansatz dafür ist der profunde, widersprüchliche Einfluss von Diabetes mellitus auf die Angiogenese. So kommt es einerseits zur Ausbildung dysfunktionaler endothelialer Vorläuferzellen mit

konsekutiver behinderter Gefäßneubildung, andererseits beispielsweise im Rahmen der proliferativen Retinopathie aufgrund einer lokalen Ischämie zu einer pathologischen Kapillarvermehrung (1). Die Zunahme der Gefäßabdeckung in der Patientengruppe war in vorliegender Arbeit vergesellschaftet mit einer Verschiebung des Durchmessers der Blutgefäße hin zu größeren Gefäßen. In der Patientengruppe fand sich somit ein signifikant höherer Prozentsatz an Gefäßen mit größerem Durchmesser (größer 20 µm), während der Anteil kleinerer Gefäße tendenziell verringert war. Dies ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen anderer Arbeiten. Koscielny und Kollegen konnten eine Vergrößerung des Gefäßdurchmessers in der Mikrozirkulation des Nagelbettes bei Kindern mit medikamentös unzureichend eingestelltem Diabetes mellitus nachweisen (65). Im Tiermodell an Mäusen mit beginnendem Diabetes mellitus konnte eine solche Durchmesserzunahme ebenfalls beschrieben werden (2). Die Verschiebung der Durchmesser-Verteilung hin zu größeren Gefäßen hat bedeutende Konsequenzen für die Gewebepfusion. Die kleinen Gefäße sind der funktionell wichtigste Abschnitt des Gefäßsystems. Über Diffusion erfolgt hier der Stoffaustausch zwischen Kapillaren und Gewebe. Durch eine Verringerung der Austauschfläche für Nährstoffe und Sauerstoff kommt es zu Gewebehypoxie, einer Minderversorgung der Zellen mit Nährstoffen und einer Anhäufung von Abfallprodukten des zellulären Metabolismus (81). Möglicherweise sorgt eine durch Hyperglykämie bedingte Inaktivierung oder Abnahme vasodilatierender Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO) für eine initiale Vasokonstriktion. Diese Gefäßverengung behindert den Blutfluss durch die Kapillare und führt zu deren Ausdünnung. Im Verlauf werden die nicht perfundierten Kapillaren vom Gewebe absorbiert. Nach und nach kommt es zu einer anatomischen Rarefizierung der Mikrozirkulation, die auch ein Kennzeichen arterieller Hypertension ist (46, 61).

In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich keine signifikante Abnahme der Gefäßdichte (TVD) bei Diabetes mellitus. Auch Aellen und Kollegen konnten bei Hypertonikern, die zusätzlich unter Diabetes mellitus leiden, keine Abnahme der TVD im Vergleich zu Hypertonikern ohne Diabetes mellitus feststellen, wenn eine adäquate Blutdruckeinstellung mittels eines Blockers des Renin-Angiotensin-Systems gewährleistet war (1). Auch im Vergleich zu normotensiven Probanden zeigte sich in der erwähnten Arbeit keine Veränderung der TVD. Es ergeben sich bezüglich der TVD jedoch kontroverse Ergebnisse in der aktuellen Literatur. Einige Arbeiten zeigen eine Abnahme der TVD bei Diabetes mellitus sowohl im Tiermodell als auch bei nicht suffizient therapiertem Diabetes mellitus Typ 1 bei Kindern im Frühstadium der Erkrankung (2, 65). Tibiriçá und Kollegen verglichen mikrozirkulatorische Parameter der Extremitätengefäße bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 ohne und mit atherosklerotisch veränderten Gefäßen (101). Bei Patienten, die bereits atherosklerotische Gefäßalterationen zeigten, ergab sich eine erhöhte TVD in den Extremitäten, die ebenfalls mit höherem Alter und längerer Krankheitsdauer korrelierte. Patienten ohne pathologische Gefäßveränderungen wiesen eine Erhöhung der TVD in den Gefäßen der unteren, nicht jedoch der oberen Extremitäten auf. Die Autoren mutmaßen, dass Veränderungen der Mikrozirkulation bei

Diabetes mellitus sich zuerst in den Kapillaren der unteren Extremität manifestieren (101). Die zum Teil widersprüchlichen Resultate sind möglicherweise auf verschiedene Techniken zur Visualisierung der Mikrozirkulation zurückzuführen. Auch unterschieden sich die Lokalisationen der untersuchten Gewebe. Einige Arbeiten führten die Messungen sublingual durch, andere an der Retina oder der Haut der Extremitäten. Zudem waren die untersuchten Gruppen sehr heterogen. Es handelte sich sowohl um Tiermodelle als auch um pädiatrische und erwachsene Patienten mit Diabetes mellitus mit oder ohne bestehende Komorbiditäten wie arterielle Hypertonie. Eine mögliche Erklärung für die fehlende Erhöhung der TVD in der Patientengruppe der vorliegenden Arbeit ist die Tatsache, dass es sich ausschließlich um Diabetes mellitus Typ 1 im Frühstadium handelte. Zudem war eine engmaschige Überwachung der Erkrankung durch die Anbindung an die endokrinologische Ambulanz des Kinderhospitals garantiert. Der mediane HbA1c-Wert lag bei 7,8 %. Möglicherweise würde eine Untersuchung an Patienten mit exazerbiertem Diabetes mellitus Typ 1 und in späteren Stadien der Erkrankung eine Veränderung der TVD zeigen.

4.2) Diskussion der Methode

4.2.1) Patientenkollektiv

Das für die vorliegende Untersuchung ausgewählte Probandenkollektiv bestand aus 2 Gruppen, von jeweils 14 Kindern. Die Rekrutierung des Probandenkollektivs erfolgte aus der Diabetes-Sprechstunde beziehungsweise der kinderchirurgischen Klinik und Poliklinik des Dr. von Haunerschen Kinderspitals. Die Selektion aus der vorbestehenden Gruppe der Diabetes-Sprechstunde erlaubte eine realistische Abbildung des Patientenkollektivs und eine zügige Rekrutierung der Patienten. Der Krankheitsverlauf war ausführlich dokumentiert und aktuelle studienrelevante Laborwerte wie HbA1c waren bereits vorhanden. Die Auswahl der Kontrollgruppe aus Patienten, die sich einem kleinen elektiven kinderchirurgischen Eingriff unterzogen, erfolgte aus mehreren Gründen. Die Kinder waren stets von mindestens einem Elternteil begleitet, das die Zustimmung zur Studienteilnahme geben konnte. Am Operationstag erfolgte eine routinemäßige präoperative Blutentnahme, was eine zusätzliche rein studienbezogene venöse Punktion und die damit verbundene psychische Belastung der Kinder vermeiden konnte. Außerdem ist davon auszugehen, dass die Kinder sonst gesund und damit zur Kontrolle gut geeignet sind. Kontrollen sind an Alter und Geschlecht an Patienten angepasst.

4.2.2) SDF Imaging

4.2.2.1) Klinische Anwendbarkeit

Das Verfahren des SDF Imaging ist zur Visualisierung mikrozirkulatorischer Vorgänge bereits etabliert. Die auf der Absorption von Licht durch Hämoglobin in Erythrozyten basierende Technik des SDF Imaging benötigt keine fluoreszierenden Farbstoffe. Da es sich um eine nichtinvasive, schmerzfreie Methode ohne Strahlenbelastung handelt, ist das SDF Imaging gut für Untersuchungen an Kindern geeignet. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind keine durch das Verfahren verursachten Nebenwirkungen bekannt (40). Die Bildqualität ist der des OPS Imaging überlegen (38). Die Messsonde kann ohne lange Vorbereitungszeit bedient werden und ist aufgrund ihrer Größe und ihres Gewichts gut mit einer Hand manövrierbar. Aufgrund der leichten Bedienbarkeit ist die interindividuelle Variabilität der Resultate bei unterschiedlichen Anwendern nicht signifikant (45). SDF Imaging wird bereits in verschiedenen klinisch-experimentellen Versuchsanordnungen vor allem zur Detektion von Veränderungen der Mikrozirkulation bei generalisierten Infektionen und septischem Schock eingesetzt (24, 29, 47, 70, 90). Als Messort für unsere Studie wurde die sublinguale Mukosa gewählt. Es handelt sich

um einen gut zu erreichenden Zugang zur menschlichen Schleimhaut. Das polarisierte Licht des SDF Imaging durchdringt die Zungenschleimhaut aufgrund der gering ausgeprägten Epidermoidschicht besonders leicht.

4.2.2.2) Limitationen

Für eine korrekte Interpretation der erhobenen Daten müssen die Bilder der Mikrozirkulation stabil sein. Artefakte können sowohl durch Bewegungen des Untersuchers als auch des Probanden entstehen. Eine stabile Positionierung der Messsonde am Zungengrund ist für die Bildqualität von großer Bedeutung. Ein zu starker Druck auf das Gewebe beim Versuch, die Messsonde zu stabilisieren, kann jedoch zu einer Verlangsamung des Blutflusses durch Kompression der untersuchten Kapillare führen. Dies ist durch eine Zunahme der Hintergrundhelligkeit erkennbar (16, 52). Es wurde in den durchgeführten Messungen darauf geachtet, dass dies nicht der Fall war. Pro Proband wurden mehrere Videosequenzen an Messorten, die maximal einige Millimeter voneinander entfernt waren, ausgewertet. Dies sollte zum einen eine Beeinflussung der Ergebnisse durch regionale Unterschiede bei der Positionierung minimieren. Zum anderen sollte durch die Auswertung mehrerer Sequenzen die Wahrscheinlichkeit systematischer technischer Fehler, wie zu hoher Druck auf das Gewebe, reduziert werden. Die Probanden wurden in regelmäßigen Abständen gebeten ruhig zu liegen. Um die Belastung der Probanden gering zu halten, wurde die Untersuchung durch mehrere kurze Pausen unterbrochen. Selbstverständlich lässt sich auch durch diese Maßnahmen die Einbeziehung von Artefakten in die Auswertung der Daten nicht gänzlich ausschließen. Mit SDF Imaging können nur Zellen detektiert werden, die Hämoglobin enthalten. Da die zellulären Bestandteile der Glykokalix kein Hämoglobin enthalten, kann das SDF Imaging nur die Zu beziehungsweise Abnahme der Erythrozytensäule und nicht die eigentliche Kapillarwand darstellen. Veränderungen der Glykokalix können also nur indirekt gemessen werden. Ein Gefäß mit beschädigter Glykokalix zeigt eine Zunahme der Erythrozytensäule ohne Veränderungen des kapillären Durchmessers (78). Messungen der Veränderung der Erythrozytensäule vor und nach einer Leukozytenpassage können fehleranfällig sein. So wird bei der Messung der vorübergehenden Zunahme der Erythrozytensäule nach Leukozytendurchgang die Glykokalixdicke um bis zu 30 Prozent unterschätzt (78). Der Grund hierfür ist eine unvollständige Kompression der Glykokalix durch den Leukozyt. Dies muss bei der Bestimmung des Kapillardurchmessers berücksichtigt werden. Eine Herausforderung besteht zudem in der Auswahl eines geeigneten Videoabschnittes durch den Untersucher zur nachfolgenden automatisierten Analyse. Es muss sich um stabile Bilder ohne Artefaktüberlagerungen handeln. Dennoch ist die Messung der Veränderung der Erythrozytensäule eine zuverlässige Methode, um die Glykokalixdicke zu bestimmen (9, 75, 78).

4.2.3) Auswertungsprogramm AVA

Die mikrozirkulatorischen Parameter der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe der sogenannten "automated vascular analysis software" (AVA) gewonnen. Es handelt sich um ein Programm zur Auswertung mikrozirkulatorischer Videosequenzen. Das Programm stabilisiert die vom Untersucher zur Analyse ausgewählten Sequenzen und minimiert automatisch vorhandene Bewegungsartefakte. Die automatisierte Bildanalyse erfolgt sehr schnell und vermeidet subjektive Auswertungsartefakte durch den Untersucher. Die Datensätze können zur späteren visuellen Offline Analyse gespeichert werden. Eine Onlineauswertung während der Messung kann allerdings nicht durchgeführt werden. Gelegentlich werden Gefäßdurchmesser nicht korrekt abgegrenzt oder Artefakte nicht als solche erkannt. Dies kann zu falsch-positiven oder negativen Auswertungen bei der Verteilung der Kapillare nach ihrem Durchmesser führen. Das menschliche Auge verfügt über eine höhere Diskriminationsfähigkeit als das Auswertungsprogramm. Nach visueller Kontrolle wurden Abbildungen mit Artefaktüberlagerungen vor der weiteren Auswertung verworfen. Zur Vermeidung einer interindividuellen Variabilität wurden die für die Datenerhebung herangezogenen Auswertungen nur durch einen Untersucher (Hauptuntersucher) durchgeführt. Zusätzlich wurden zur Ermittlung der Interrater-Reliabilität randomisierte Videosequenzen parallel von einem zweiten Untersucher analysiert. Die dabei unter Umständen auftretenden Abweichungen wurden prozentual ermittelt und gemessen. Die Analyse der mikrozirkulatorischen Parameter und der Glykokalixdicke zeigten mit einem Korrelationskoeffizienten zwischen 0,78 und 0,96 eine gute Interrater-Reliabilität. Zur Ermittlung der Intrarater-Reliabilität wurden randomisierte Videosequenzen durch den Hauptuntersucher zu einem späteren Zeitpunkt erneut ausgewertet. Wie bei der Interrater-Reliabilität zeigte sich auch hier mit Korrelationskoeffizienten zwischen 0,74 und 0,99 ein hohes Maß an Zuverlässigkeit der Datenerhebung.

4.2.4) Parameter der Mikrozirkulation

Die Parameter der Mikrozirkulation wurden automatisch durch AVA berechnet. Eine manuelle Nachkorrektur erfolgte nicht. Damit konnte der subjektive Einfluss eines Auswerters vermieden werden. Der Korrelationskoeffizient der Interrater-Reliabilität lag, wie im vorherigen Abschnitt erwähnt, dennoch nicht bei 1. Diese Variabilität ist vermutlich der vor Beginn der automatischen Auswertung von beiden Untersuchern individuell durchgeführten Optimierung des Kontrastes geschuldet. Dies führte dazu, das AVA nicht immer die gleiche Anzahl an Gefäßen detektieren konnte. Die Gefäßdichte ("total vessel density", TVD) entspricht der Gesamtlänge des Gefäßnetzes in Millimetern pro Fläche eines ausgewählten Bildausschnittes in Quadratmillimetern. Die TVD ist einer der wichtigsten Indikatoren der Gewebepерfusion im

Tiermodell (79). Die Gefäßdichte ist auch ein entscheidender Faktor für das Überleben eines hämorrhagischen Schocks (53). Die TVD lässt allerdings keine Rückschlüsse über die Qualität des Blutflusses in den perfundierten Kapillaren zu. Der Gefäßdurchmesser wird nicht berücksichtigt. Areale mit einer hohen TVD, also einer großen Anzahl an Gefäßen, können daher bei langsamem oder gar stagniertem Blutfluss dennoch an einer Minderperfusion des Gewebes leiden. Ein weiterer Analyseparameter, der die Verteilung der Blutgefäße in Abhängigkeit von ihren Durchmessern erfasst, ist die "diameter distribution" (DD). Es erfolgt die Einteilung in Gefäße mit kleinem, mittlerem und großem Durchmesser. Da der Stoffaustausch per Diffusion zwischen Blut und Gewebe vor allem in den Kapillaren mit kleinem Durchmesser erfolgt, lässt sich anhand des prozentualen Anteils des jeweiligen Gefäßtyps die Nährstoffversorgung des umliegenden Gewebes abschätzen und gibt im konkreten Fall Hinweise auf den Einfluss von hyperglykämischen Stoffwechsellagen auf den Zustand der Mikrozirkulation im untersuchten Areal. Diese Klassifizierung der Gefäße berücksichtigt außerdem die Tatsache, dass ein Schwund der mikrovaskulären Gefäße im Gewebe zu einer Erhöhung des peripheren Widerstandes führt (46). Die „vessel coverage“ (VC) bezeichnet die Fläche des Bildausschnitts, die durch Blutgefäße bedeckt ist, in Prozent. Sie wird automatisch durch eine Grauwertbestimmung im Bildausschnitt berechnet. Die Beeinflussung durch eine manuelle Untersuchung seitens des Auswerters entfällt. Da die Bestimmung der VC kaum durch Artefakte verfälscht wird, ergibt sich ein valides Bild der aktuellen Gefäßabdeckung der untersuchten Fläche. Die VC kombiniert Informationen der Gefäßdichte (TVD) und der Durchmesserverteilung pro Bildausschnitt (DD). Sie erweist sich in der Detektion geringer Veränderungen der mikrozirkulatorischen Versorgung sensitiver als die beiden Parameter TVD und DD. So können beispielsweise eine jeweils nichtsignifikante Erniedrigung der TVD und eine prozentuale Vermehrung der kleinen Gefäße zu einer signifikant verringerten VC führen. Der "microvascular flow index" (MFI) ist ein semiquantitativer Score, welcher die Qualität und Geschwindigkeit des Blutflusses in einem Gefäß beschreibt. Für die Nähr- und Sauerstoffversorgung des Gewebes ist ein kontinuierlicher Blutfluss im Kapillarbett entscheidend. Verminderte Flussgeschwindigkeiten oder gar Sistieren des Blutflusses wie bei Atherosklerose und peripherer arterieller Verschlusskrankheit beeinträchtigen die Funktionsweise des umliegenden Gewebes. Eine Schwierigkeit der Auswertung des MFI besteht in der Zuordnung der Ätiologie der Veränderungen. Neben Störungen der Mikrozirkulation können bereits geringe Bewegungen des Untersuchers zu Druck auf das Gewebe und somit zu artifiziell veränderten Flussgeschwindigkeiten führen. Die daraus resultierenden Ungenauigkeiten beeinträchtigen die Aussagekraft dieses Parameters. Obwohl keiner der genannten Parameter isoliert betrachtet ausreicht um die Funktion der Mikrozirkulation zuverlässig einzuschätzen, erlaubt die Zusammenschau einen validen Überblick über die aktuelle mikrozirkulatorische Situation im untersuchten Gewebe.

4.2.5) Glykokalixdicke

Der Bestimmung der Glykokalixdicke kommt in der aktuellen Forschung große Bedeutung zu. Diverse Studien zeigen Veränderungen der Glykokalixdicke bei verschiedenen Krankheiten wie arterieller Hypertonie, Sepsis und kardiovaskulären Erkrankungen. Durch Abnahme der Glykokalixdicke lassen sich bereits in frühen Phasen dieser Krankheiten schädigende Einflüsse auf die Mikrozirkulation nachweisen (12, 72, 73, 74, 75). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde in der vorliegenden Arbeit der Effekt von Diabetes mellitus auf diesen Parameter bei Kindern untersucht. Die indirekte Bestimmung des Glykokalixdurchmessers mittels Messung der Erythrozytensäule vor und nach Leukozytenpassage ist durch den Einsatz in Vorarbeiten validiert (75, 78). Diese Methode ist auf die Anwendung in den Kapillaren beschränkt. In Gefäßen, in denen aufgrund des Durchmessers keine Kompression der Glykokalix durch Leukozyten stattfindet, kann die Schichtdicke nicht bestimmt werden. Veränderungen der Glykokalixdicke können also nicht bis in den größeren Gefäßen erkannt werden. Aber auch die kapilläre Messung zeigt Limitationen. Wie bereits in Abschnitt 4.1.2.2 erwähnt, wird die Glykokalixdicke nach dieser Methode um bis zu 30 Prozent unterschätzt (78).

4.3) Ausblick

Ein kleiner Ausschnitt der zahlreichen wissenschaftlichen Beiträge, die sich mit dem Einfluss von Diabetes mellitus auf die Mikrozirkulation und die endotheliale Glykokalix im Speziellen beschäftigen, wurde in der vorliegenden Arbeit zitiert. Die nichtinvasive Beurteilung der Mikrozirkulation der sublingualen Mukosa zeigt eine gute Korrelation mit den mikrozirkulatorischen Verhältnissen der zentralen Organe (9, 75). Der leichte Zugangsweg, die einfache Handhabung des Mikroskops und die schnelle Erhebung aussagekräftiger Daten zum aktuellen Zustand der Glykokalix erlauben in Zukunft möglicherweise eine frühzeitige Detektion von subklinischen vaskulären Veränderungen bei Diabetes mellitus. Zusätzlich ließen sich die Effekte der bekannten Therapiestrategien zur Verringerung des kardiovaskulären Risikoprofils überprüfen (75). Die Früherkennung ist entscheidend, um schwerwiegenden vaskulären Komplikationen vorbeugen zu können. Vorstellbar wäre auch eine „Bedside“-Diagnostik zur schnellen Erfassung mikrozirkulatorischer Veränderungen bei anderen Krankheitsbildern, beispielsweise im intensivmedizinischen Bereich. Die pathologischen Veränderungen der Glykokalix bei Vorliegen einer Sepsis könnten so am Patientenbett rasch evaluiert werden. Aufbau und Funktionsweise der endothelialen Glykokalix sind inzwischen gut verstanden. Daher stellt die Glykokalix einen potentiellen Angriffspunkt für neue Therapiestrategien dar. Therapeutische Ziele sind einerseits der Erhalt der bestehenden Glykokalix, andererseits der Wiederaufbau einer bereits geschädigten Schicht. Die strenge Einhaltung von Normoglykämie und die Vermeidung auch kurzer hyperglykämischer Zustände sind die beste Präventivmaßnahme für den Erhalt einer intakten Glykokalix. Die externe Zufuhr von Hydrokortison während ischämischen Zuständen und konsekutiver Reperfusion zeigt protektive Effekte auf die Glykokalix im Tiermodell (11). Bei Patienten mit Sepsis ist der Erhalt der Funktion der Glykokalix durch die Applikation von Hydrokortison eine vielversprechende Therapiestrategie (11). Ein neuerer therapeutischer Ansatz ist die externe Zuführung von Bestandteilen der Glykokalix. Vorläufermoleküle der Glykosaminoglykane, bestehend aus Heparan- und Dermatansulfat, können Patienten mit Diabetes mellitus oral appliziert werden. Nach achtwöchiger Einnahme konnte bei vorher verminderter Dicke eine erneute Zunahme der Glykokalixdimensionen nachgewiesen werden (9). Zusätzlich zeigten sich eine verminderte transkapilläre Albuminpassage und eine Abnahme des Hyaluronsäurekatabolismus (9). Die Wiederherstellung der endothelialen Glykokalix scheint somit ein vielversprechendes Ziel zur Behebung der vaskulären Dysfunktion bei bereits bestehender Schädigung der Mikrozirkulation durch Diabetes mellitus zu sein. Weitere Forschung muss zeigen, ob dieses Konzept tatsächlich einen Benefit für das kardiovaskuläre System im Langzeitverlauf bietet. Hier könnte das SDF Imaging ein effizientes Instrument zur Überwachung des Therapieerfolgs darstellen.

5) Zusammenfassung

Diabetes mellitus stellt eine der häufigsten chronischen Erkrankungen weltweit dar. Der Grad vaskulärer Veränderungen trägt entscheidend zur Morbidität und Mortalität der Patienten bei. Sowohl mikro- als auch makroangiopathische Gefäßalterationen nehmen graduell im Verlauf der Erkrankung zu. Endstadien der Gefäßpathologien bei Diabetes mellitus, wie Atherosklerose, Nephropathie und Retinopathie, sind bereits ausführlich beschrieben. Die initialen Veränderungen der Mikrozirkulation dagegen sind erst seit kürzerer Zeit Gegenstand medizinischer Forschung. Die vorliegende Arbeit untersuchte Veränderungen der Mikrozirkulation bei Diabetes mellitus Typ 1 im Kindesalter. Die Mikrozirkulation von 14 pädiatrischen Patienten mit diagnostiziertem Diabetes mellitus im Frühstadium und ohne assoziierte vaskuläre Komplikationen wurde mittels nichtinvasiver Videomikroskopie (SDF Imaging) analysiert. Als Kontrollgruppe dienten 14 Kinder ohne Diabetes mellitus oder andere Erkrankungen mit begleitenden Gefäßalterationen. Untersuchungsort war die sublinguale Mukosa. Diese ist aufgrund des leichten Zugangs, des geringen Anteils epidermoidalen Gewebes und der guten Lichtdurchlässigkeit gut für SDF Imaging geeignet. Die gewonnenen Videosequenzen wurden offline analysiert. Parameter der Mikrozirkulation wurden mit der Automated Vascular Analysis (AVA)©, einem Programm zur halbautomatisierten Auswertung mikrozirkulatorischer Videosequenzen ausgewertet. Die Bestimmung der Glykokalixdicke erfolgte indirekt mit dem Programm Image J©. Neben mikrozirkulatorischen Parametern wurden auch klinische und laborchemische Daten erfasst.

Einige der untersuchten Parameter wie die Gefäßdichte (TVD) zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Patientenkollektiv und der Kontrollgruppe. Auch der „microvascular flow index“ (MFI), der die Qualität und Geschwindigkeit des Blutflusses in einem Gefäß beschreibt, zeigte keine signifikante Veränderung zwischen den beiden Gruppen.

Auffällig war eine Umverteilung der Gefäßdurchmesser zugunsten größerer Gefäße (Durchmesser größer 20 µm) auf Kosten der Kapillaren (Durchmesser kleiner 10 µm). Die Patientengruppe wies somit einen signifikant höheren Anteil von Gefäßen mit großem Durchmesser auf. Folglich war die „vessel coverage“, also der Anteil von Gewebe, der mit Blutgefäßen bedeckt ist, in der Patientengruppe signifikant erhöht. Durch die Abnahme kleiner Gefäße ist die entscheidende metabolische Austauschfläche zwischen vaskulärem System und Gewebe eingeschränkt. Daher kommt es möglicherweise bereits im Frühstadium der Erkrankung zu einer Minderversorgung des Gewebes mit Sauerstoff und einer Anhäufung toxischer Stoffwechselmetabolite. Der zentrale Unterschied zwischen beiden Gruppen war die signifikant verringerte Glykokalixdicke bei Kindern mit Diabetes mellitus Typ 1. Dies lässt vermuten, dass die Erkrankung bereits im frühen Stadium die Mikrozirkulation schädigt. Es zeigte sich eine inverse Beziehung zwischen Abnahme der Glykokalixdicke und erhöhten Blutglukosewerten. Zwischen Glykokalixveränderungen und den HbA1c-Werten ließ sich jedoch

keine Korrelation feststellen. Möglicherweise sind akute Blutzuckerschwankungen mit kurzen hyperglykämischen Zuständen hauptverantwortlich für die Schädigung der endothelialen Glykokalix durch erhöhten oxidativen Stress und Zytokinliberation. Einige Studien belegten bereits den negativen Einfluss von Diabetes mellitus auf die endotheliale Glykokalix. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Erkrankung bereits im Frühstadium bei pädiatrischen Patienten zu einer Schädigung der endothelialen Glykokalix führt.

6) Literaturverzeichnis

- (1) Aellen J, Dabiri A, Heim A, Liaudet L, Burnier M, Ruiz J, Feihl F, Waeber B (2012). Preserved capillary density of dorsal finger skin in treated hypertensive patients with or without type 2 diabetes. *Microcirculation* 19: 554-562, 2012.
- (2) Algenstaedt P, Schaefer C, Biermann T, Hamann A, Schwarzloh B, Greten H, Rütther W, Hansen-Algenstaedt N (2003). Microvascular alterations in diabetic mice correlate with level of hyperglycemia. *Diabetes*; Feb; 52(2): 542-9.
- (3) American Diabetes Association (2008). *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. *Diabetes Care* Jan 31.
- (4) Bailey R. Microcirculation. <http://biology.about.com/od/anatomy/ss/microcirculation.htm>
Ref. Type: Website
- (5) Bateman R M, Walley K R (2005). Microvascular resuscitation as a therapeutic goal in severe sepsis. *Critical Care*, 9(suppl 4): S27-S32.
- (6) Berg B M van den, Spaan J A, Rolf T M, Vink H (2006) Atherogenic region and diet diminish glycocalyx dimension and increase intima-to-media ratios at murine carotid artery bifurcation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H915–H920.
- (7) Boehm D H, Christ F, Harris A G, Reichenspurner H, Reichart B, Messmer K (2000): First application of intravital microscopy on the beating heart using OPS imaging. *J Vasc Res* 37: 23.
- (8) Boerma EC, Mathura KR, van der Voort PH, Spronk PE, Ince C (2005). Quantifying bedside-derived imaging of microcirculatory abnormalities in septic patients: a prospective validation study. *Crit Care* 9(6): R601-R606.
- (9) Broekhuizen L N, Lemkes B A, Mooij H L, Meuwese M C, Verberne H, Holleman F, Schlingemann R O, Nieuwdorp M, Stroes E S, Vink H (2010). Effect of sulodexide on endothelial glycocalyx and vascular permeability in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* Dec; 53(12): 2646-55. Epub 2010 Sep 25.
- (10) Brownlee M(2005). *The Pathobiology of Diabetic Complications: A Unifying Mechanism*. *Diabetes*. Jun;54(6): 1615-25.

- (11) Chappell D, Jacob M, Hofmann-Kiefer K et al. (2007) Hydrocortisone preserves the vascular barrier by protecting the endothelial glycocalyx. *Anesthesiology* 107: 776–784.
- (12) Chappell D, Jacob M, Becker B F, Hofmann-Kiefer K, Conzen P, Rehm M (2008): Expedition Glykokalyx: Ein neu entdecktes “Great Barrier Reef”. *Anaesthesist* 557: 959-969.
- (13) Chappell D, Jacob M, Rehm M et al. (2008) Heparinase selectively sheds heparan sulphate from the endothelial glycocalyx. *Biol Chem* 389: 79–82.
- (14) Chappell D, Jacob M, Paul O, Rehm M, Welsch U, Stoeckelhuber M, Conzen P, Becker B. F. (2009) The glycocalyx of the human umbilical vein endothelial cell: an impressive structure ex vivo but not in culture. *Circ Res* 104: 1313–1317.
- (15) Cho Y I, Mooney M P, Cho D J (2008). Hemorheological disorders in diabetes mellitus. *J Diabetes Sci Technol*. Nov; 2(6):1130-8.
- (16) Christ F, Genzel-Boroviczeny O, Schaudig S, Niklas M, Schiessler C, Strötgen J, Eifert S, Reichenspurner H, Harris A G, Messmer K (2000): Monitoring of the Microcirculation in Cardiac Surgery and Neonates Using Orthogonal Polarization Spectral Imaging. *Prog Appl Microc*. Basel, Karger 24: 82-93.
- (17) Christ F, Bauer A, Brugger D (2002). Different optical methods for clinical monitoring of the microcirculation. *Eur.Surg.Res*, v. 34, p. 145-151.
- (18) Constaninescu A A, Vink H, Spaan J A (2003) Endothelial cell glycocalyx modulates immobilization of leukocytes at the endothelial surface. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 1541–1547.
- (19) Creager M A, Lüscher T F, Cosentino F, Beckman J A (2003). Diabetes and Vascular Disease: Pathophysiology, Clinical Consequences, and Medical Therapy: Part I; *Circulation* 108; 1527-1532.
- (20) Damiani D (2008). Complicações Hiperglicêmicas Agudas no Diabetes Melito Tipo 1 do Jovem. *Arq Bras Endocrinol Metab* 52/2: 367-374.
- (21) Danielli J F (1940) Capillary permeability and oedema in the perfused frog. *J Physiol* 98: 109–129.
- (22) Debbabi H, Uzan L, Mourad J J, Safar M, Levy B I, Tibirica E (2006). Increased skin capillary density in treated essential hypertensive patients. *Am J Hypertension* 19: 477-483.

- (23) De Backer D, Creteur J, Vincent J-L (2000): Use of Orthogonal Polarization Spectral Imaging in Intensive Care. *Prog Appl Microcirc.Basel*, Karger 24: 104-9.
- (24) De Backer D, Creteur J, Preiser J C., Dubois M J, Vincent J L (2002): Microvascular Blood Flow Is Altered in Patients with Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* Vol 166. pp 98–104.
- (25) Deckert T, Feldt-Rasmussen B, Borch-Johnsen K, Jensen T, Kofoed-Enevoldsen A (1989). Albuminuria reflects widespread vascular damage. The Steno hypothesis. *Diabetologia* 32: 219–226.
- (26) Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The relationship of glycemic exposure (HbA1c) to the risk of development and progression of retinopathy in the diabetes control and complications trial. *Diabetes*. 1995; 44: 968–983.
- (27) Dubin A, Pozo M O, Casabella C A, Pálizas Jr F, Murias G, Moseinco M C, Edul V S K, Pálizas F, Estenssoro E, Ince C (2009). Increasing arterial blood pressure with norepinephrine does not improve microcirculatory blood flow: a prospective study. *Critical Care*13: R92 (doi: 10.1186/cc7922).
- (28) Egbrink M G, Van Gestel M A, Broeders M A, Tangelder G J, Heemskerk J M, Reneman R S, Slaaf D W (2005). Regulation of microvascular Thromboembolism in vivo. *Microcirculation* 12: 287 – 300.
- (29) Elbers P W G, Ince C (2006): Bench-to-bedside review: Mechanisms of critical illness – classifying microcirculatory flow abnormalities in distributive shock. *Critical Care* 10(4): 221.
- (30) Ellis CG, Jagger J, Sharpe M (2005).The microcirculation as a functional system. *Crit Care* 9: S3–S8.
- (31) Esper R J, Vilariño J O, Machado R A, Paragano A (2008). Endothelial dysfunction in normal and abnormal glucose metabolism, *Adv Cardiol*, 45: 17– 43.
- (32) Florian J A, Kosky J R, Ainslie K, Pang Z, Dull R O, Tarbell J M (2003) Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. *Circ Res* 93: e136–e142.
- (33) Flynn M D, Tooke JE (1995). Diabetic neuropathy and the microcirculation. *Diabet Med*, 12(4): 298–301.

- (34) Fong D S, Aiello L, Gardner T W, King G L, Blankenship G, Cavallerano J D, Ferris III F L, Klein R (2004). Retinopathy in Diabetes; *Diabetes Care* January vol. 27 no. suppl 1 s84-s87.
- (35) Gao L, Lipowsky H H. Composition of the Endothelial Glycocalyx and its Relation to its Thickness and Diffusion of Small Solutes. *Microvasc Res.* 2010 December ; 80(3): 394–401.
- (36) Genzel-Boroviczény O, Strötgen J, Harris A G, Messmer K, Christ F (2002). Orthogonal Polarization Spectral Imaging (OPS): A Novel Method to Measure the Microcirculation in Term and Preterm Infants Transcutaneously. *Pediatr Res.* Mar; 51(3): 386-91.
- (37) Genzel-Boroviczény O, Christ F, Glas V (2004). Blood Transfusion Increases Functional Capillary Density in the Skin of Anemic Preterm Infants. *Pediatric Research*; 56(5): 751-755.
- (38) Goedhart P T, Khalilzada M, Bezemer R, Merza J, Ince C (2007). Sidestream Dark Field (SDF) imaging: a novel stroboscopic LED ring-based imaging modality for clinical assessment of the microcirculation. *Opt Express.* Nov 12; 15(23): 15101-14.
- (39) Granger D N (1999). Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. *Microcirculation* 6: 167 – 168.
- (40) Groner W, Winkelmann J W, Harris A G, et al (1999). Orthogonal polarization spectral imaging: a new method for study of the microcirculation. *Nat Med* 5: 1209-12.
- (41) Hauner, H.; Von Ferber, L. und Koster, I. (1992): Schätzung der Diabeteshäufigkeit in der Bundesrepublik Deutschland anhand von Krankenkassendaten. Sekundär analysierten Daten einer repräsentativen Stichprobe AOK-Versicherter der Stadt Dortmund, *Dtsch.Med.Wochenschr.* 117 [17], Seite 645-650. URL: PM:1572247.
- (42) Hauner, H (2006). Kosten und Anzahl der Typ-2-Diabetes-Fälle in Deutschland. *Der Diabetologe* Volumen 2 Supplement 1, S38-S43.
- (43) Henry C B, Duling B R (1999). Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan. *Am J Physiol* 277: H508–H514.
- (44) Holloway G A, Watkins D A (1977). The laser doppler measurement of cutaneous blood flow. *J. Invest. Dermatol.* 69, 306-309.
- (45) Hubble S M, Kyte H L, Gooding K, Shore A C (2009): Variability in sublingual microvessel density and flow measurements in healthy volunteers. *Microcirculation* 16:183-191.

- (46) Humar R, Zimmerli L, Battagay E (2009). Angiogenesis and hypertension: an update. *J Human Hypertens* 23: 773-782.
- (47) Ince C. (2005). The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care*.9 Suppl 4:S13-9. Epub 2005 Aug 25.
- (48) Jacob M, Bruegger D, Rehm M et al. (2006) Contrasting effects of colloid and crystalloid resuscitation fluids on cardiac vascular permeability. *Anesthesiology* 104: 1223–31.
- (49) Jacob M, Bruegger D, Rehm M et al. (2007) The endothelial glycocalyx affords compatibility of Starling's principle and high cardiac interstitial albumin Levels. *Cardiovasc Res* 73: 575-586.
- (50) Jacob M, Chappell D, Hofmann-Kiefer K et al. (2007) Determinants of insensible fluid loss. Perspiration, protein shift and endothelial glycocalyx. *Anaesthetist* 56: 747–764.
- (51) Jin X, Weil M H, Sun S, Tang W, Bisera J, Mason E J(1998). Decreases in organ blood flows associated with increases in sublingual PCO₂ during hemorrhagic shock. *J Appl Physiol* 85: 2360-4.
- (52) Jöbsis F F (1977). Noninvasive, infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters. *Science* Dec 23; 198(4323): 1264-7.
- (53) Kerger H, Saltzman D J, Menger M D, Messmer K, Intaglietta M (1996). Systemic and subcutaneous microvascular Po₂ dissociation during 4-h hemorrhagic shock in conscious hamsters. *Am J Physiol. Mar*; 270 (3 Pt 2): H827-36.
- (54) Klijn E, Den Uil C A, Bakker J, Ince C (2008). The heterogeneity of the microcirculation in critical illness. *Clin Chest Med. Dec*; 29(4): 643-54, viii.
- (55) Klitzman B, Braun R D, Lockhart A C, Heller L, Dewhirst M W, Hurwitz H I (2000): Wound-Induced Angiogenesis: A Clinical Model. *Prog Appl Microcirc Basel, Karger* 24: 110-114
- (56) Koller A, Kaley G (1991). Endothelial regulation of wall shear stress and blood flow in skeletal muscle microcirculation. *Am J Physiol. Mar*; 260(3 Pt 2): H862-8.
- (57) Laing S P, Swerdlow A J, Slater S D, Burden A C, Morris A, Waugh N R, Gatling W, Bingley P J, Patterson C C (2003). Mortality from heart disease in a cohort of 23,000 patients with insulin-treated diabetes; *Diabetologia* 46: 760–765.

- (58) Langer S, Harris A G, Biberthaler P, von Dobschütz E, Messmer K (2001): OPS Imaging as a tool for the assessment of hepatic microcirculation. *Transplantation* 71: 1249-1256.
- (59) Langer S, Hatz R, Harris A G, Hernandez-Richter T, Maiwald G, Messmer K (2001). Assessing the microcirculation in a burn wound by use of OPS imaging. *Eur J Med Res*. Jun 28;6(6): 231-4.
- (60) Langer S, Born F, Hatz R, Biberthaler P, Messmer K (2002): Orthogonal Polarization Spectral Imaging versus Intravital Fluorescent Microscopy for Microvascular Studies in Wounds. *Ann Plast Surg* 48: 646-653.
- (61) Levy B I, Ambrosio G, Pries A R, H.A.J. Struijker-Boudier H A J (2001). Microcirculation in Hypertension: A New Target for Treatment? *Circulation*; 104: 735-740.
- (62) Li Q, Bolli R, Qiu Y, Tang X L, Murphree S S, French B A (1998). Gene therapy with extracellular superoxide dismutase attenuates myocardial stunning in conscious rabbits. *Circulation* 98: 1438 – 1448.
- (63) Llauro G, Ceperuelo-Mallafre V, Vilardell C, Simo R, Freixenet N, Vendrell J, Gonzalez-Clemente J M (2012). Arterial stiffness is increased in patients with type 1 diabetes without cardiovascular disease: a potential role of low-grade inflammation. *Diabetes Care* 35:1083-1089.
- (64) Luft J H (1966) Fine structures of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. *Fed Proc* 25:1773–1783.
- (65) Koscielny J, Latza R, Wolf S, Kiesewetter H, Jung F (1998): Early rheological and microcirculatory changes in children with type I diabetes mellitus. *Clin Hemorheol Microcirc* 19:139-150.
- (66) Kurose I, Argenbright L W, Wolf R, Lianxi L, Granger D N (1997). Ischemia / reperfusion-induced microvascular dysfunction: role of oxidants and lipid mediators. *Am J Physiol* 272: H2976-H2982.
- (67) Mathura K R, Bouma G J, Ince C (2001): Abnormal microcirculation in brain tumors during surgery. *Lancet* 358: 1698-1699.
- (68) Mchedlishvili G, Maeda N (2001). Blood flow structure related to red cell flow: determinant of blood fluidity in narrow microvessels. *Jpn J Physiol*; 51(1): 19-30.

- (69) Megens R T A, Reitsma S, Schiffers P H M, Hilgers R H P, De Mey J G R, Slaaf D W, oude Egbrink M G A, van Zandvoort M A M J (2007). Two-Photon Microscopy of Vital Murine Elastic and Muscular Arteries: Combined Structural and Functional Imaging with Subcellular Resolution. *J Vasc Res*; 44:87–98.
- (70) Monnier L, Mas E, Ginet C, Michel F, Villon L, Cristol J P, Colette C (2006). Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *JAMA* 295:1681-1687.
- (71) Mulac K (2005). Pathomechanismen der Atherosklerose bei Diabetes mellitus. *Austrian Journal of Cardiology* 12 (1-2), 9-14.
- (72) Mulivor A W, Lipowsky H H (2004) Inflammation- and ischemia_induced shedding of venular glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H1672–H 1680.
- (73) Nelson A, Berkestedt I, Schmidtchen A et al. (2008) Increased levels of glycosaminoglycans during septic shock: relation to mortality and the antibacterial actions of plasma. *Shock* Dec;30(6): 623-7.
- (74) Nieuwdorp M, Meuwese MC, Vink H et al. (2005). The endothelial glycocalyx: a potential barrier between health and vascular disease. *Curr Opin Lipidol* 16: 507–511.
- (75) Nieuwdorp M, Mooij H L, Kroon J, Atasever B, Spaan J A E, Ince C, Holleman F, Diamant M, Heine R J, Hoekstra J B L, Kastelein J J P, Stroes E S G, Vink H (2006): Endothelial Glycocalyx Damage Coincides With Microalbuminuria in Type 1 Diabetes. *Diabetes* 55: 1127-1132.
- (76) Nieuwdorp M, van Haefen T W, Gouverneur M C, Mooij H L, van Lieshout M H, Levi M, Meijers JC, Holleman F, Hoekstra J B, Vink H, Kastelein J J, Stroes E S (2006) Loss of endothelial glycocalyx during acute hyperglycemia coincides with endothelial dysfunction and coagulation activation in vivo. *Diabetes* 55: 480–486.
- (77) Nieuwdorp M, Holleman F, de Groot E, Vink H, Gort J, Kontush A, Chapman M J, Hutten B A, Brouwer C B, Hoekstra J B, Kastelein J J, Stroes E S (2007). Perturbation of hyaluronan metabolism predisposes patients with type 1 diabetes mellitus to atherosclerosis. *Diabetologia* 50:1288-1293.

- (78) Nieuwdorp M, Meuwese M C, Mooij H L, Ince C, Broekhuizen L N, Kastelein J J, Stroes E S, Vink H (2008). Measuring endothelial glycocalyx dimensions in humans: a potential novel tool to monitor vascular vulnerability. *J Appl Physiol*.104: 845– 852.
- (79) Nolte D, Zeintl H, Steinbauer M, Pickelmann S, Messmer K (1995). Functional capillary density: an indicator of tissue perfusion? *Int J Microcirc Clin Exp*. Sep-Oct; 15(5): 244-9.
- (80) Peppas M; Uribarri J; Vlassara H (2003). Glucose, Advanced Glycation End Products, and Diabetes Complications: What Is New and What Works. *Clinical Diabetes* October vol. 21 no. 4 186-187.
- (81) Pittman R N (2005): Oxygen transport and exchange in the microcirculation. *Microcirculation* 12: 59-70.
- (82) Pohl U, Busse R (1989): Hypoxia stimulates release of endothelium-derived relaxant factor. *Am J Physiol*; Vol. 256 no. 6, H1595-H1600.
- (83) Popescu RM, Cotuțiu C, Graur M, Căruntu I D (2010): Vascular and nerve lesions of the diabetic foot: a morphological study. *Rom J Morphol Embryol* ;51(3): 483-8.
- (84) Pries A R, Secomb T W, Gaetgens P (2000). The endothelial surface layer. *Pflugers Arch* 440: 653–666.
- (85) Rehm M, Zahler S, Lotsch M et al. (2004) Endothelial glycocalyx as an additional barrier determining extravasation of 6% hydroxyethyl starch or 5% albumin solutions in the coronary vascular bed. *Anesthesiology* 100: 1211–1223.
- (86) Reitsma S, Slaaf D W , Vink H, van Zandvoort M A M J, Egbrink M G A (2007). The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Arch - Eur J Physiol*. 454: 345–359.
- (87) Romano M, Pomilio M, Vigneri S, Falco A, Chiesa P L, Chiarelli F, Davi G (2001). Endothelial perturbation in children and adolescents with type 1 diabetes: association with markers of the inflammatory reaction. *Diabetes Care* 24: 1674-1678.
- (88) Rubanyi G M, Romero J C, Vanhoutte P M (1986). Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 250: H1145 – H1149.

- (89) Rubio-Gayosso I, Platts S H, Duling B R (2006). Reactive oxygen species mediate modification of glycocalyx during ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290:H2247– H2256.
- (90) Sakr Y, Dubois M J, De Backer D, Creteur J, Vincent J L (2004): Persistent microcirculatory alterations are associated with Organ failure and death in patients with septic shock. *Crit Care Med* 32:1825–1831.
- (91) Satchell S C, Tooke J E (2008): What is the mechanism of microalbuminuria in diabetes: a role for the glomerular endothelium?; *Diabetologia* 51: 714-725.
- (92) Schießler C, Schaudig S, Harris A G, Christ F (2002): Orthogonal polarization spectral imaging: Eine neue klinische Methode für das Monitoring der Mikrozirkulation. *Anaesthesist* 51:576–579.
- (93) Segal S S, Duling B R (1987). Propagation of vasodilation in resistance vessels of the hamster: development and review of a working hypothesis. *Circ Res. Nov*; 61(5 Pt 2): II20-5.
- (94) Segal S S, Duling B R (1989). Conduction of vasomotor responses in arterioles: a role for cell-to-cell coupling? *Am J Physiol. Mar*; 256 (3 Pt 2): H838-45.
- (95) Segal S S (2005). Regulation of blood flow in the microcirculation. *Microcirculation: Jan-Feb*; 12(1): 33-45.
- (96) Slaaf D W, Tangelder G J, Reneman R S, Jäger K, Bollinger A (1987): A versatile incident illuminator for intravital microscopy. *Int J Microcirc* 6: 391-7.
- (97) Singh A, Satchell S C, Neal C R, McKenzie E A, Tooke J E, Mathieson P W (2007). Glomerular Endothelial Glycocalyx Constitutes a Barrier to Protein Permeability; *J Am Soc Nephrol* 18: 2885–2893.
- (98) Singh A, Friden V, Dasgupta I, Foster R R, Welsh G I, Tooke J E, Haraldsson B, Mathieson PW, Satchell S C(2011). High glucose causes dysfunction of the human glomerular endothelial glycocalyx; *Am J Physiol Renal Physiol* 300: F40-F48.
- (99) Sobotta Lehrbuch Histologie (2010) Welsch, Ulrich. S 207 – 212.
- (100) Teichmann K (1942). Beobachtungen über Stoffaustausch im Capillargebiet mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie. *Z ges exp Med* 110: 732-745.

- (101) Tibiriçá E, Rodrigues E, Cobas R, Gomes M B (2009). Increased functional and structural skin capillary density in type 1 diabetes patients with vascular complications. *Diabetol Metab Syndr* 1:24. Published online (doi: 10.1186/1758-5996-1-24).
- (102) The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993). The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329: 977-986.
- (103) Turek Z, Cerný V, Parížková R (2008). Noninvasive in vivo Assessment of the Skeletal Muscle and Small Intestine Serous Surface Microcirculation in Rat: Sidestream Dark-Field (SDF) Imaging. *Physiol Res.* 57(3): 365-71. Epub 2007 Apr 25.
- (104) Uhl E, Lehmborg J, Steiger H J, Messmer K (2000): Intraoperative Observation of Human Cerebral Microcirculation. *Prog Appl Microcirc.* Basel, Karger 24: 72-81.
- (105) UKPDS, (UK Prospective Diabetes Study Group). Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive therapy. *American Journal of Ophthalmology* 2000; 129: 704–705.
- (106) Vallet B (2002): Endothelial cell dysfunction and abnormal tissue perfusion. *Crit Care Med*, 30 (suppl 5): S229-S234.
- (107) Van den Berg B M, Nieuwdorp M, Stroes E S G, Vink H (2006). Glycocalyx and endothelial (dys) function: from mice to men; *Pharmacol Rep.*; 58 Suppl: 75-80.
- (108) van Haaren P M A, VanBavel E, Vink H, Spaan J A E (2003). Localization of the permeability barrier to solutes in isolated arteries by confocal microscopy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H2848–H2856.
- (109) Verdant C, De Backer D. (2005). How monitoring of the microcirculation may help us at the bedside. *Curr.Opin.Crit Care* 11, 240-244.
- (110) Vink H, Duling B R (1996). Identification of Distinct Luminal Domains for Macromolecules, Erythrocytes, and Leukocytes Within Mammalian Capillaries. *Circulation Research*; 79: 581-589
- (111) Vink H, Duling B R (2000) Capillary endothelial surface layer selectively reduces plasma solute distribution volume. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H 285–H 289.

(112) Vollmar B, Glasz J, Menger M D, Messmer K (1995) Leukocytes contribute to hepatic ischemia/reperfusion injury via intercellular adhesion molecule-1-mediated venular adherence. *Surgery* 117: 195–200.

(113) Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H (2004): Global Prevalence of Diabetes Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* May 27, number 5, 1047-53.

(114) Zimny S, Dessel F, Ehren M, Pfohl M, Schatz H (2001). Early detection of microcirculatory impairment in diabetic patients with foot at risk. *Diabetes Care*. Oct; 24 (10): 1810-4.

(115) Zuurbier C J, Demirci C, Koeman A, Vink H, Ince C (2005). Short-term hyperglycemia increases endothelial glycocalyx permeability and acutely decreases lineal density of capillaries with flowing red blood cells. *J Appl Physiol*. Oct; 99 (4): 1471-6.

7) Anhang

7.1) Abkürzungen

ADA	Amerikanische Diabetesgesellschaft
AGE	Endprodukte der Glykosilierung (advanced glycation endproducts)
ATP	Adenosintriphosphat
AVA	automated vascular analysis
AVI	audio video interleave
BMI	body mass index
CCD	charge coupled device (Videokamera)
CRP	C - reaktives Protein
CO ₂	Sauerstoffverbrauch
Dcap _{anat}	Durchmesser der Kapillare
Dcap _{func}	Funktioneller Kapillardurchmesser
DD	Gefäßverteilung nach Durchmesser (diameter distribution)
D _{prae}	Durchmesserwert vor Leukozytenpassage
D _{post}	Durchmesserwert nach Leukozytenpassage
DM	Diabetes mellitus
DO ₂	Sauerstoffangebot
GAG	Glykosaminoglykane
HbA1c	Glykohämoglobin
HI	Herzindex
IL - 6	Interleukin - 6
LDF	Laser - Doppler - Fluxometrie
LED	Leuchtdioden
MAP	Mittlerer arterieller Druck
MFI	Qualität des Flusses (microvascular flow index)
µm	Mikrometer
mm	Millimeter
NO	Stickstoffmonoxid
OPS	orthogonal polarisation spectral imaging
PGI ₂	Prostazyklin
ROS	Sauerstoffradikale (endogenous reactive oxygen species)
RR _{sys}	Systolischer arterieller Druck (nach Riva - Rocci)
RR _{dias}	Diastolischer arterieller Druck (nach Riva - Rocci)

SDF	sidestream dark field
TNF- α	Tumornekrosefaktor
TVD	Gefäßdichte (total vessel density)
VC	Gefäßabdeckung (vessel coverage)

7.2) Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Mikrozirkulation (85)	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Hauptkomponenten der endothelialen Glykokalix (ec-SOD: extrazelluläre Superoxiddismutase; AT III: Antithrombin III) (87).....	9
Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Darstellung der koronaren Kapillare einer Ziege (Anfärbung mit Alician blue) (108).....	10
Abbildung 4: Schematische Darstellung der OPS - Imaging Technik: Das in der Lichtquelle generierte Licht passiert den Polarisator. In einem 90° - Winkel wird das polarisierte Licht über einen Spiegel auf das zu untersuchende Gewebe gelenkt. Ein Teil des polarisierten Lichtes wird reflektiert. Ein anderer Teil wird depolarisiert und dient zur Bilddarstellung, nachdem es den Analysator passiert hat (40).	15
Abbildung 5: Funktionsweise des SDF Imaging: Das von den Leuchtdioden produzierte grüne Licht dringt in das Gewebe ein. Ein Teil des Lichtes wird von den in den Kapillaren zirkulierenden Erythrozyten absorbiert. Der nicht absorbierte Anteil wird im Gewebe gestreut, vom Lichtleiter aufgefangen und zur Bildentstehung verwendet. Das an der Oberfläche reflektierte Licht dient nicht zur Bilderzeugung (29).	16
Abbildung 6: Visualisierung der Mikrozirkulation mittels SDF Imaging: Zirkulierende Blutzellen absorbieren das emittierte Licht (dunkel). Gewebe ohne hämoglobinhaltige Zellen absorbieren kein Licht und werden nicht dargestellt (47).....	17
Abbildung 7: Mikroskop mit LED-Beleuchtung (Firma MicroVisionMedical).....	26
Abbildung 8: MicroScan Imaging Unit® bestehend aus der MicroScan Messsonde, der Batterieeinheit, dem Analog - Digital - Wandler (Canopus ADVC110), sowie dem Computer, auf dem die Videos abgespielt und gespeichert werden können.....	27
Abbildung 9: Gefäßeinteilung nach Durchmesser: Nachdem der ausgewählte Videoabschnitt analysiert wurde, klassifizierte das Programm AVA die Gefäße anhand ihres Durchmessers ..	29
Abbildung 10: Kapillare vor Leukozytendurchtritt. Zu einer ausgewählten Kapillare wird eine senkrechte Linie gezogen. Dadurch kann der Durchmesser der Erythrozytensäule vor und nach Leukozytendurchtritt gemessen werden. Der Leukozyt stellt sich im Bild aufgrund des fehlenden Hämoglobins als Negativbild (weisser Punkt) dar. Er absorbiert das emittierte Licht nicht. Der schwarze Pfeil markiert den Leukozyten.....	30
Abbildung 11: Kapillare aus Abbildung 10 unmittelbar nach Leukozytenpassage. Anhand der	

perpendikulären Linie lässt sich der veränderte Durchmesser der Erythrozytensäule messen. 31

Abbildung 12: Darstellung einer Kapillare vor einer Leukozytenpassage anhand einer Grauskala. Auf der y - Achse sind die Grauwerte, auf der x - Achse die Image J straight line mit μm - Skalaierung aufgetragen. Das Zentrum des Gefäßes ist gekennzeichnet durch den der x - Achse am nächsten gelegenen Punkt der Figur. Dies entspricht dem dunkelsten (hämoglobinreichsten) Punkt der Grauskala. Die Begrenzungen der Kapillare sind durch die „V“- förmige Struktur der Figur abgebildet. Die Messung des Durchmessers erfolgte ab dem Mittelpunkt zwischen Zentrum und Begrenzung der Kapillare bei halbmaximaler Intensität der Grauwerte (je eine grüne Vertikale) 32

Abbildung 13: Darstellung der Kapillare aus Abbildung 12 nach einer Leukozytenpassage anhand einer Grauskala. Die Ermittlung des Kapillardurchmessers erfolgte wie in der vorherigen Abbildung erläutert. Die Differenz der Durchmesser vor und nach Leukozytenpassage geteilt durch 2 ergab die Veränderung der Glykokalixdicke. Die Glykokalix wird durch Leukozytenpassage an die kapilläre Gefäßwand gedrückt 32

Abbildung 14: Prozentsatz der Gefäße mit einem Durchmesser kleiner $10\ \mu\text{m}$: In der Patientengruppe zeigt sich eine Verminderung von Kapillaren mit einem Durchmesser kleiner $10\ \mu\text{m}$, allerdings ohne statistische Signifikanz (Patientengruppe $69\% \pm 8.7\%$ vs. Kontrollgruppe $73\% \pm 8.6\%$, $p = 0.26$) 38

Abbildung 15: Prozentsatz der Kapillaren mit einem Durchmesser zwischen 10 und $20\ \mu\text{m}$: Bei dem prozentualen Anteil der mittelgroßen Kapillaren an der Gesamtheit der Kapillaren ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Patienten- und der Kontrollgruppe ($20.5\% \pm 5.5\%$ in der Patientengruppe vs. $21.3\% \pm 5.3\%$ in der Kontrollgruppe, $p = 0.34$)..... 39

Abbildung 16: Prozentsatz der Gefäße mit einem Durchmesser größer als $20\ \mu\text{m}$: * In der Gruppe der Kinder mit Diabetes mellitus fand sich ein signifikant erhöhter prozentualer Anteil an Gefäßen mit großem Durchmesser gegenüber der Kontrollgruppe ($11.1\% \pm 4.8\%$ vs. $6.7\% \pm 5.0\%$, $p = 0.023$). 39

Abbildung 17: Gefäßabdeckung: * In der Patientengruppe zeigte sich eine signifikant größere Gefäßabdeckung als in der Kontrollgruppe ($29.85\% \pm 5.0\%$ in der Patientengruppe vs. $26.07\% \pm 4.9\%$ in der Kontrollgruppe, $p = 0.041$). 40

Abbildung 18: Bei dem Parameter Gefäßdicke konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Gruppen festgestellt werden (Patientengruppe: $20.86\ \text{mm}/\text{mm}^2 \pm 2.0\ \text{mm}/\text{mm}^2$ vs. Kontrollgruppe: $19,24\ \text{mm}/\text{mm}^2 \pm 2.0\ \text{mm}/\text{mm}^2$, $p = 0.2$). 40

Abbildung 19: Vergleich des "microvascular flow index (MFI) zwischen beiden Gruppen. Wie

bereits erwähnt ist der MFI ein semiquantitativer Score mit den Werten 0 (kein Blutfluss) bis 4 (hyperdynamischer Blutfluss). Sowohl in der Patienten- als auch in der Kontrollgruppe fand sich ein MFI im oberen Bereich der Skala entsprechend einem überwiegend kontinuierlichen Blutfluss ohne wesentlichen Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Kontrollgruppe 2.9 ± 0.38 vs. Patientengruppe 2.6 ± 0.32). 41

Abbildung 20: Vergleich der Glykokalixdicke: * In der Patientengruppe zeigte sich eine signifikante Reduktion der Glykokalixdicke im Vergleich zur Kontrollgruppe ($0.38 \mu\text{m}$ [$0.3-0.41 \mu\text{m}$] in der Patientengruppe vs. $0.60 \mu\text{m}$ [$0.51-0.70 \mu\text{m}$] in der Kontrollgruppe, $p = 0.013$)..... 42

Abbildung 21: Korrelation zwischen Nüchtern-glucosewerten im Plasma und Glykokalixdicke: Die Dicke der endothelialen Glykokalix war umgekehrt proportional zum Blutglucosespiegel ($r = -0.62$, $p = 0.0007$). 43

7.3) Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gefäßeinteilung nach Durchmesser.....	28
Tabelle 2: Klassifizierung des MFI	34
Tabelle 3: Klinische und laborchemische Parameter (Werte angegeben als Median ± Interquartile Range).....	37
Tabelle 4: Intra-und Interraterreliabilität bei den erhobenen Parametern der Mikrozirkulation und der Glykokalixdicke	44

-

7.4) Patienteninformation

Patienteninformation

Untersuchung der Mikrozirkulation Kinder mit Diabetes Mellitus Typ I

Liebe Eltern,

wir dürfen uns ganz herzlich für Ihr Interesse an unserer Studie bedanken.

Diabetes Mellitus ist eine der häufigsten Stoffwechselerkrankungen im Jugendlichenalter. Die Forschung der letzten Jahre hat gezeigt, dass als Langzeitfolge des Diabetes mellitus im Kindesalter auch Störungen in der Durchblutung der kleinen und großen Gefäße der Haut auftreten können. Deswegen möchten wir die Mikrozirkulation Ihres Kindes, also den Blutfluss in den kleinsten Gefäßen der Haut, untersuchen, um einen besseren Einblick in die Vorgänge der Hautdurchblutung gewinnen zu können. Uns interessieren insbesondere die Gefäßdichte der Haut Ihres Kindes, sowie die Dicke der Innenbeschichtung der Gefäße. Diese Daten werden wir im Anschluss mit Kindern vergleichen, die nicht an Diabetes mellitus erkrankt sind. Die Untersuchung der Mikrozirkulation ist für Ihr Kind völlig schmerzfrei und wird nicht - invasiv durchgeführt. Die Hautdurchblutung wird durch ein Mikroskop, das mit grünem Licht arbeitet, dargestellt. Ihr Kind wird einen kleinen Messfühler auf die Haut am Handgelenk, sowie unter die Zunge gelegt bekommen. Die durch diesen Messfühler und durch das grüne Licht erhaltenen Bilder werden in Echtzeit auf einem Laptop dargestellt, so dass Ihr Kind die Untersuchung mitverfolgen kann. Die Untersuchung dauert ca. 10 Minuten. Zudem werden die Körpermaße Ihres Kindes aus der Akte erfasst (Gewicht, Größe). Dies dient der Einschätzung des aktuellen Wachstumsstandes Ihres Kindes sowie dem Vergleich mit anderen entsprechenden Studienteilnehmern. Zudem werden wir eine Blutdruckmessung bei Ihrem Kind durchführen. Wir hoffen, durch unsere Studie wesentliche Erkenntnisse für die Prävention von Langzeitfolgen des Diabetes mellitus erhalten zu können, und so einen Beitrag für die Verbesserung der Lebensqualität künftiger Diabetes-Patienten leisten zu können. Gerne klären wir weitere Fragen zu unserer Studie in einem persönlichen Gespräch. Für Rückfragen stehen wir natürlich jederzeit gerne zur Verfügung. Falls Sie dieses wünschen, informieren wir auch gerne Ihren Haus- bzw. Kinderarzt über die Durchführung der Studie.

Die Teilnahme an der Untersuchung ist freiwillig, und Sie können jederzeit die Teilnahme Ihres Kindes ohne Angabe von Gründen zurückziehen.

Information zum Datenschutz:

Bei dieser Studie werden die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz eingehalten. Ihre persönliche Daten und Befunde werden verschlüsselt (pseudonymisiert), d.h. weder Ihr Name noch Ihre Initialen oder das exakte Geburtsdatum erscheinen im Verschlüsselungscode. Im Falle Ihres Widerrufs der Einwilligung werden die pseudonymisiert gespeicherten Daten in irreversibel anonymisierter Form weiter verwendet. Der Zugang zu den Originaldaten und zum Verschlüsselungscode ist auf die Studienleiterin Frau Prof. Orsolya Genzel-Boroviczény, Frau Priv. Doz. Dr. med. S. Bechtold - Dalla Pozza und Frau Ana Cecilia Cavalcanti Fernandes Hering beschränkt. Die Unterlagen werden im Forschungszimmer der Neonatologischen Arbeitsgruppe von Frau Prof. Genzel-Boroviczény in der Universitätsfrauenklinik Maistasse für 10 Jahre aufbewahrt. Im Falle von Veröffentlichungen der Studienergebnisse bleibt die Vertraulichkeit der persönlichen Daten ebenfalls gewährleistet.

Wir danken Ihnen für Ihr Interesse!

Prof. Dr. med. O. Genzel-Boroviczény
Leiterin der Neonatologie
Perinatalzentrums Klinikums Innenstadt - Maistraße
Tel.: 089-4400-54535

Priv. Doz. Dr. med. S. Bechtold - Dalla Pozza
Klinikum der Universität München Innenstadt

Ana Cecilia Cavalcanti Fernandes Hering
Doktorandin
E-Mail: Ana.Hering@med.uni-muenchen.de

7.5) Einwilligungserklärung

Einwilligungserklärung für Eltern

Name der Studie: *Untersuchung der Mikrozirkulation Kinder mit Diabetes Mellitus Typ I*

Inhalt, Vorgehensweise und Ziel der oben genannten Studie sowie die Befugnis zur Einsichtnahme in die erhobenen Daten sind mir / uns ausreichend erklärt worden. Ich / Wir hatte(n) Gelegenheit, Fragen zu stellen, und wir habe(n) hierauf Antwort erhalten. Ich / Wir hatte(n) ausreichend Zeit, mich / uns für oder gegen die Teilnahme meines / unseres Kindes an der Studie zu entscheiden. Eine Kopie der Elterninformation habe(n) ich / wir erhalten.

Ich / Wir willigen in die Teilnahme unseres Kindes an oben genannter Studie ein.

.....
(Name des Kindes)

.....
(Unterschrift des Vaters)

.....
(Unterschrift der Mutter)

.....
(Ort, Datum)

Information und Einwilligungserklärung zum Datenschutz

Bei wissenschaftlichen Studien werden persönliche Daten und medizinische Befunde über Ihr Kind erhoben. Die Speicherung, Auswertung und Weitergabe dieser studienbezogenen Daten erfolgt nach gesetzlichen Bestimmungen und setzt vor Teilnahme an der Studie folgende freiwillige Einwilligung voraus:

Ich / Wir erkläre(n) mich / uns damit einverstanden, dass im Rahmen dieser Studie erhobene Daten/Krankheitsdaten meines/unseres Kindes auf Fragebögen und elektronische Datenträger aufgezeichnet und ohne Namensnennung verarbeitet werden. Außerdem erkläre(n) ich / wir mich / uns damit einverstanden, dass eine autorisierte und zur Verschwiegenheit verpflichtete Person (z.B.: des Auftraggebers, der Universität) in die erhobenen personenbezogenen Daten meines / unseres Kindes Einsicht nimmt, soweit dies für die Überprüfung des Projektes notwendig ist. Für diese Maßnahme entbinde(n) ich / wir den Arzt von der ärztlichen Schweigepflicht.

.....
(Unterschrift des Vaters)

.....
(Unterschrift der Mutter)

Ort, Datum

Im Namen der Forschungsgruppe danken wir Ihnen sehr herzlich für Ihre Kooperation.

Prof. O. Genzel-Boroviczény

Leiterin der Neonatologie
Perinatalzentrum Klinikum Innenstadt - Maistraße
Tel.: 089-4400-54535

7.6) Datenerhebungsblatt

Code	
Untersuchungsdatum	
Alter	
Gewicht	
Größe	
Herzfrequenz	
PAS	
PAD	
PAM	
Nüchternglykämie	
HbA1c	
Erythrozyten	
Hämoglobin	
Hämatokrit	
Retikulozyten	
Thrombozyten	
Leukozyten	
CRP	
Mikroalbuminurie	
Diabetesdiagnose (Datum)	
Insulin Therapie	
Andere Medikamente	
Andere Diagnosen	

Anamnese:

.....

8) Danksagung

Zuallererst möchte ich meiner Doktormutter Frau Prof. O. Genzel-Boroviczény danken für die exzellente Förderung und Unterstützung während der Durchführung dieser Arbeit und für ihre Geduld!

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. C. Nußbaum, die mich kompetent betreut und geduldig meine Fehler korrigiert hat.

Mein herzlicher Dank gilt auch Frau Priv. Doz. Dr. Susanne Bechtold-Dalla Pozza für die Rekrutierung der Patienten auf der endokrinologischen Station im Hauerschen Kinderspital.

Bei den Vorgängerdoktorandinnen Alexandra Puchwein-Schwepcke und Zuzana Mormanova, möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mich die Bedienung des SDF-Imaging lehrten und jederzeit für Fragen zur Verfügung standen.

Ganz besonders möchte ich den Kindern und deren Eltern danken, die ihr Einverständnis für die Messungen gegeben haben. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Meinem Ehemann Dr. Philipp Hering und meinen Schwiegereltern danke ich für die geduldige Unterstützung bei dem Verfassen der Arbeit in einem Idiom, das nicht meine Muttersprache ist.

Bei meiner Familie in Brasilien möchte ich mich für die mir Zeit meines Lebens dargebrachte uneingeschränkte Unterstützung ganz herzlich bedanken!

9) Eidesstattliche Versicherung

Ich, Ana Cecilia Cavalcanti Fernandes Hering, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Frühzeitige Veränderungen der Mikrozirkulation und
Verlust der endothelialen Glykokalix bei Kindern mit
Diabetes mellitus Typ I**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, Datum

Ana Cecilia Cavalcanti Fernandes Hering
Unterschrift