

**Die überaktive Blase - Systemische Arteriosklerose als  
pathogenetischer Faktor?**

**Funktionelle und CT-morphologische Veränderungen der  
Harnblase bei ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäusen**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Anne-Kathrin Dannenmaier

geboren in Wuppertal

Gießen 2017

**Aus dem Medizinischen Zentrum für Chirurgie,  
Anästhesiologie und Urologie  
Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie  
Justus-Liebig-Universität Gießen  
Direktor: Prof. Dr. med. Florian M. E. Wagenlehner**

**Gutachter:** Prof. Dr. Dr. Thomas Bschiepfer

**Gutachter:** Prof. Dr. Gerhard Alzen

**Prüfungsvorsitz:** Prof. Dr. Klaus-Dieter Schlüter

**Prüfungsmitglied:** Prof. Dr. Dieter Glebe

**Tag der Disputation:**

04. Juli 2017

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Überaktive Blase	1
1.2	Arteriosklerose	8
1.3	Ziel und Fragestellung der Arbeit	10
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>13</b>
2.1	Tiermodell	13
2.2	Cystostomie	15
2.3	Cystomanometrie	17
2.4	Perfusion und Präparation	20
2.5	Bildgebung	22
2.5.1	Nano-Computertomographie	23
2.5.1.1	Aufbau des Nano-Computertomographen	23
2.5.1.2	Scanvorgang der Gesamtharnblasen und der Blasensegmente	24
2.5.2	Rekonstruktion der Rohdaten	26
2.5.3	Quantitative Bildanalyse	27
2.5.3.1	Quantitative Analyse der Gesamtblasen-Nano-CT-Bilder mittels ANALYZE®	27
2.5.3.2	Quantitative Analyse der Blasensegment-Nano-CT-Bilder mittels ANALYZE®	28
2.5.3.3	Quantitative Analyse der Blasensegment-Nano-CT-Bilder mittels CT-Analyser®	28
2.6	Statistik	29
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>30</b>
3.1	Auswertung der Cystomanometrie	30
3.1.1	Ergebnisse der Cystomanometrie mit NaCl-Lösung	30
3.1.2	Ergebnisse der Cystomanometrie mit KCl-Lösung	34
3.2	Darstellung im Nano-CT	35
3.2.1	Darstellung der mit Vaseline gefüllten Harnblasen	35
3.2.2	Darstellung der Segmente der Harnblase	39
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>43</b>
4.1	Tiermodell	43
4.2	Interpretation der Ergebnisse der Cystomanometrie	47
4.2.1	Cystomanometrie	47

4.2.2	Cystomanometrie mit NaCl-Lösung.....	48
4.2.3	Cystomanometrie mit KCl-Lösung.....	52
4.3	Interpretation der Ergebnisse der Nano-CT Bilder.....	55
4.3.1	Nano-CT .....	55
4.3.2	Ganze Blasen .....	56
4.3.3	Segmente.....	57
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>63</b>
	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>64</b>
	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>67</b>
	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>68</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>71</b>
	<b>PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....</b>	<b>81</b>
	<b>EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>83</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>84</b>

## 1 EINLEITUNG

Die Prävalenz des Krankheitsbildes der überaktiven Blase steigt mit zunehmendem Alter [161]. Dasselbe gilt auch für das systemische Leiden der Arteriosklerose [117]. Bisherige Untersuchungen gaben schon Hinweise auf einen Zusammenhang beider Erkrankungen [10, 121], eindeutige Belege gibt es jedoch bislang nicht [181]. Anhand eines Tiermodells für systemische Arteriosklerose versuchten wir die Relation dieser zur überaktiven Blase darzulegen.

### 1.1 Überaktive Blase

Lange gab es keine international einheitliche Definition des Krankheitsbildes der überaktiven Blase. Dies erschwerte die Diagnosestellung, wie den Vergleich und die Interpretation von Studienergebnissen gleichermaßen. 2002 führte die ICS (International Continence Society) eine einheitliche Begriffsklärung ein. Seitdem wird die überaktive Blase (ÜAB) oder overactive bladder (OAB) definiert als Störung mit gesteigertem, oft imperativem Harndrang und daraus folgender Blasenentleerung mit oder ohne Dranginkontinenz, meist zusätzlich vergesellschaftet mit erhöhter Miktionsfrequenz (Pollakisurie) und Nykturie [4]. *Imperativer Harndrang* bedeutet plötzlicher, ohne Vorwarnung einsetzender Harndrang, der nicht unterdrückt werden kann und mit der Gefahr des Harnverlustes einhergeht. *Dranginkontinenz* ist der unwillkürliche Urinabgang in Zusammenhang mit imperativem Harndrang. *Pollakisurie* bedeutet eine erhöhte Miktionsfrequenz bei grundsätzlich normaler Harnmenge (bis 2,8 l/24 h). *Nykturie* bedeutet eine einmalige oder mehrmalige Unterbrechung des nächtlichen Schlafes zur Blasenentleerungen [2, 4, 169].

Der Symptomenkomplex der überaktiven Blase als symptomatische Diagnose, steht häufig, jedoch nicht immer, in ursächlichem Zusammenhang mit einer Überaktivität des M. detrusor vesicae (Detrusorhyperaktivität), welche demgegenüber ein urodynamisch objektivierbares Krankheitszeichen darstellt [166]. Die Detrusorhyperaktivität stellt keine eigene Diagnose dar und es können ihr eine Vielzahl möglicher Ursachen zugrunde liegen. Klinische Symptome sind dabei unterschiedlichster Art und können mit urodynamisch gemessenen Werten korrelieren aber auch gänzlich fehlen [4]. Schätzungen zufolge leiden 64% der Patienten mit überaktiver Blase an Detrusorhyperaktivität und 83% der Patienten mit Detrusorhyperaktivität weisen

Symptome der überaktiven Blase auf [61]. Dennoch sind beide Begriffe nicht synonym zu verwenden [147].

Die betroffenen Patienten leiden sehr unter den Symptomen der überaktiven Blase [67], wobei die Beeinträchtigung im Alltag mit der Häufigkeit und Stärke der Symptome sowie einem Vorliegen von Harninkontinenz positiv korreliert [33, 112, 170]. Vor allem die Inkontinenz stellt einen immensen Verlust von Lebensqualität und auch sexuellem Befinden dar. Schwer Betroffene sind weniger körperlich aktiv, leiden unter Gewichtszunahme durch den Aktivitätsmangel und verlassen weniger häufig das Haus [112]. Gerade Personen, die auch unter Inkontinenz leiden, geben ein vermindertes sexuelles Lustempfinden an und sind ferner weniger sexuell aktiv. Männer sind zusätzlich häufiger von erektiler Dysfunktion und Ejakulationsstörungen betroffen [34, 73]. Auch die Häufigkeit von Komorbiditäten wie Angststörung, Depression und verminderte Schlafqualität steigt mit zunehmender Miktionsfrequenz, Nykturie und Inkontinenz [112, 161]. Zudem erhöht sich das Risiko von Stürzen und Frakturen, Infektionen des Urogenitaltraktes sowie Infektionen der Haut v. a. im Genitalbereich [22].

Trotz dieses hohen Leidensdrucks und des Verlusts an Lebensqualität machen Betroffene aus Schamgefühlen in erster Linie Gebrauch von nicht-medizinischen Bewältigungsstrategien anstatt sich ärztlichen Rat einzuholen. Ricci et al. zeigten, dass weniger als die Hälfte der Patienten mit Symptomen der überaktiven Blase (43,5%) in den letzten 12 Monaten vor Befragung fachliche Beratung in Anspruch nahm [146].

### *Epidemiologie*

Die Anzahl epidemiologischer Studien, die sich mit dem Thema der überaktiven Blase befassen, sind insgesamt eher rar und zudem schwierig zu vergleichen. Zum einen sind viele Studien auf nur ein einziges Land [32, 67, 165], auf nur ein Geschlecht [93] oder auf unterschiedliche Altersgruppen [111, 165] bezogen. Zum anderen wird die überaktive Blase je nach Studiengruppe unterschiedlich definiert, da es bis 2002 keine einheitliche Begrifflichkeit gab und auch nach 2002 nicht alle Untersuchungen mit exakt dieser Definition durchgeführt wurden. Allen Studien gemeinsam ist jedoch die hohe und im Alter deutlich ansteigende Prävalenz der Symptome der überaktiven Blase. Milsom et al. zeigten 2001 eine Prävalenz der überaktiven Blase von 16,6 % nach Befragung von 16776 Probanden  $\geq 40$  Jahren aus sechs verschiedenen europäischen Ländern. Zudem konnte ein Anstieg der Symptomatik im Alter verzeichnet werden [111].

Stewart et al. zeigten 2003 die Geschlechtsunabhängigkeit und im Alter ansteigende

Prävalenz der überaktiven Blase. Die Befragung von 5204 Probanden  $\geq 18$  Jahre in den USA ergab eine ähnliche Prävalenz bei Männern (16,0 %) und Frauen (16,9 %). Allerdings seien der Schweregrad und auch die Art der Symptomatik geschlechtsspezifisch. So ging deutlich hervor, dass betroffene Frauen insgesamt häufiger und auch früher unter Dranginkontinenz leiden als Männer. Die Prävalenz der Dranginkontinenz steigt bei Frauen von 2,0 % auf 19 % mit einem steilen Anstieg nach dem 44. Lebensjahr. Bei Männern steigt die Prävalenz von 0,3 % auf 8,9 % mit steilerem Anstieg erst nach dem 64. Lebensjahr [161].

2005 führten Irwin et al. [72] eine große Telefonstudie mit 19165 Probanden  $\geq 18$  Jahren in fünf Ländern (Kanada, Deutschland, Großbritannien, Schweden, Italien) durch (EPIC Study). Hierbei wurde erstmals exakt die ICS-Definition von 2002 verwendet, wodurch die etwas geringere Prävalenz im Vergleich zu vorangehenden Studien abgeleitet werden kann. Es zeigte sich, dass 11,8 % aller Teilnehmer (10,8 % der Männer und 12,8 % der Frauen) an überaktiver Blase litten. Es ließ sich feststellen, dass tendenziell die Prävalenz der Symptome der überaktiven Blase bei Frauen vor dem 60. Lebensjahr höher ist, wohingegen bei Männern *nach* dem 60. Lebensjahr eine höhere Prävalenz vorliegt. Fast die Hälfte aller betroffenen Frauen und 28,7 % der betroffenen Männer leiden unter Inkontinenzsymptomen, was eine enorme Einschränkung der Lebensqualität mit sich bringt [72].

Um die damals aktuelle (2008) weltweite Prävalenz der überaktiven Blase zu schätzen und diese für die Jahre 2013 und 2018 vorherzusagen, bedienten sich Irwin et al. den Ergebnissen der 2006 veröffentlichten EPIC Studie [72], sowie den Daten der U.S. Census Bureau International Data Base, die weltweite geschlechts- und altersgeschichtete Bevölkerungszahlen ermitteln [167]. Die Studie zeigt eine weltweit hohe Prävalenz von 10,7 % der überaktiven Blase 2008 die sich im Jahr 2018 um 20,1 % auf 546 Millionen betroffene Menschen erhöhen wird. Dieser Progress kann unter anderem auf das weltweite Bevölkerungswachstum bei zunehmender Altersentwicklung zurückgeführt werden [71]. Zukünftig wird diese Entwicklung weltweit auch zu einer Erhöhung der jetzt schon großen finanziellen Belastung, die diese Erkrankung mit sich bringt, führen [50, 69, 80, 144].

### *Wirtschaftliche Belastungen*

In Deutschland verursacht das Krankheitsbild der überaktiven Blase jährliche Kosten von 3,98 Millionen Euro (€) wobei € 1,76 Millionen von der gesetzlichen Krankenkasse, € 1,8 Millionen von der Pflegeversicherung und € 0,41 Millionen von den Patienten selbst abgedeckt werden. Die Kosten für Pflege belaufen sich dabei auf 45% des Gesamtbetrages (€ 1,8 Millionen), Medizinische Produkte machen 17% (€ 0,68

Millionen) aus, Arztbesuche 16% (€ 0,65 Millionen), die Kosten verursacht durch Komplikationen belaufen sich auf 19 % (€ 0,75 Millionen) und Medikamente machen 2% (€ 0,08 Millionen) der Gesamtkosten aus. Die entstehende finanzielle Belastung des deutschen Gesundheitssystems sowie der Patienten sind durchaus vergleichbar mit anderen chronischen Erkrankungen wie Diabetes mellitus oder Demenz [80].

Ganz et al. postulierten 2010, dass die finanzielle Bürde, welche durch überaktive Blase und Inkontinenz bedingt ist, ca. fünf Mal höher sei, als bisher in vorangehenden Studien [68, 69, 80, 144] beschrieben. So wurde ermittelt, dass sich in den USA die Pro-Kopf-Kosten auf 1944 US Dollar (\$) (2015) bzw. \$ 1969 (2020) belaufen, was jährliche Gesamtkosten von \$ 76,2 Millionen (2015) bzw. \$ 82,6 Millionen (2020) ergibt [50].

### *Ätiopathogenese*

Bis heute ist die genaue Ätiopathogenese der überaktiven Blase nicht vollständig geklärt. Man geht jedoch von einem multifaktoriellen Geschehen aus. Es existieren verschiedene Erklärungsansätze, die den Fokus auf jeweils unterschiedliche Teilaspekte des Miktionsvorgangs richten [17]. Am Miktionsvorgang beteiligt sind zum einen Bereiche des zentralen Nervensystems (ZNS) wie höhere Großhirnareale, die Pons und das Rückenmark. Zum anderen sind das periphere autonome Nervensystem sowie somatische und sensorische afferente Nervenfasern und natürlich die unteren Harnwege selbst in den Vorgang der Blasenentleerung involviert [17]. Auf jeder Ebene der Miktion kann es zu Störungen kommen, die des Weiteren zu Symptomen der überaktiven Blase führen, der wie schon erwähnt häufig eine Hyperaktivität des *M. detrusor vesicae* zu Grunde liegt. Dabei unterscheidet man prinzipiell zwischen neurogener und nicht neurogener Ursache der Detrusorhyperaktivität.

Auf Seiten der neurogenen Ursachen kann z. B. eine unzureichende zentralnervöse Hemmung des Miktionsreflexes vorliegen. Unter normalen Umständen werden afferente Signale des unteren Harntrakts bei Blasenfüllung an das ZNS gesendet, woraufhin die Miktion als Antwort erfolgt. Kontrolliert wird der Miktionsvorgang bzw. die dafür zuständige Muskulatur der Blase (*M. detrusor vesicae*) durch verschiedene neuronale Schaltkreise im ZNS [151, 183]. Bei deutlicher Füllung und dadurch zunehmender Dehnung des *M. detrusor vesicae* kommt es zu einer Steigerung der afferenten neuronalen Aktivität der Harnblase. Dies wiederum resultiert in der bewussten Wahrnehmung im Sinne eines Harndrangs mit nachfolgender, willkürlich steuerbarer Blasenentleerung. Ist die Blase noch wenig gefüllt, werden unwillkürliche Detrusorkontraktionen durch supraspinale Signale inhibiert. Bei fehlender oder

ungenügender zentraler Inhibition kommt es somit schon bei wenig gefüllter Blase zu einer Harndrangsymptomatik [37].

Auch eine verstärkte afferente Signalübertragung von Harndrangimpulsen in das ZNS führt zu einer Imbalance von exzitatorischen und inhibitorischen Reizen, was Drangsymptomatik und eine Blasenüberaktivität zur Folge haben kann. Als afferente Fasern dienen myelinisierte A $\delta$ - und unmyelinisierte C-Fasern, die auf z. B. mechanische sowie chemische Reize ansprechen. Es werden zahlreiche Rezeptoren und Ionenkanäle auf diesen Afferenzen exprimiert, die deren Exzitabilität modulieren [29, 39].

Das Urothel als sekretorisch und metabolisch aktives Gewebe, dem früher lediglich Barrierefunktion zugesprochen wurde, kann ebenso maßgeblich an der Entstehung einer Blasenüberaktivität beteiligt sein. Es konnte nachgewiesen werden, dass das Urothel mit darunterliegenden afferenten Nervenendigungen über verschiedene Signalwege kommuniziert [182]. Einerseits verfügt es über die Fähigkeit zahlreiche Rezeptoren und Ionenkanäle (u. a. für Bradykinin, Neurothropin, Purin, Norepinephrin und Acetyl-Cholin (nikotinisch und muskarinisch)) auszubilden, andererseits kann das Urothel unterschiedliche Neurotransmitter (z. B. Prostanoiden, Stickstoffmonoxid (NO), Adenosintriphosphat (ATP), „nerve growth factor“ (NGF), Tachykinine und Acetyl-Cholin (ACh)) synthetisieren sowie freisetzen. Die vom Urothel freigesetzten Substanzen sind in der Lage die Erregbarkeit afferenter Nervenendigungen akut oder auch chronisch zu modifizieren und direkt auf Detrusormuskelzellen einzuwirken [38, 39].

Richtet man den Blick auf den M. detrusor vesicae selbst und dessen neuronale Versorgung, so werden mehrere Ursachen für eine Detrusor-Übererregbarkeit und Blasenhypersensitivität diskutiert [19]. Neben myogenen Ursachen ist dabei auch eine partielle Denervierung der Blase möglich. Eine vesikale Minderperfusion, wie z. B. im Fall der Blasenauslassobstruktion (BOO), wird unter anderem für diese Veränderungen an Muskel- und Stromazellen sowie an den den M. detrusor vesicae innervierenden Nervenfasern verantwortlich gemacht. Auch eine Modifikation der Signalweiterleitung zwischen den verschiedenen Strukturen kann hieraus resultieren [29, 157]. Um im Falle einer BOO die Blase trotzdem effektiv entleeren zu können, ist ein erhöhter Druck nötig, wodurch es im Verlauf zu einer Blasenwandhypertrophie kommt. Diese Hypertrophie führt v. a. während der Kontraktionsphasen zu einer reduzierten Perfusion und dadurch zu prolongierten ischämischen Phasen [95].

Normalerweise sind die einzelnen glatten Muskelfasern des Detrusors bei sehr dichter Innervation nur durch wenige „gap junctions“ miteinander verbunden. Diese Konnektivität gewährleistet einen interzellulären, elektrischen, sowie chemischen

Austausch. Bedingt durch Denervierung erhöht sich die Anzahl der „gap junctions“ woraus in der Folge eine gesteigerte Exzitabilität des Detrusors resultiert [28, 58]. In verschiedenen Studien wurde darüber hinaus ein Anstieg des NGF [159], eine Hypersensitivität muskarinischer Rezeptoren auf Detrusorzellen [154], und eine Zunahme der Expression purinerger Rezeptoren [122] nachgewiesen.

### *Diagnosestellung*

Bei dem Symptomenkomplex der überaktiven Blase handelt es sich grundsätzlich um eine Ausschlussdiagnose. Um die laut Definition *symptomatische Diagnose* der überaktiven Blase letztendlich zu stellen, müssen die Patienten eingehend untersucht werden, um Organpathologien des unteren Harn- oder des Genitaltraktes wie z. B. Entzündung, Tumor oder Fremdkörper auszuschließen [4, 147]. Auch Medikamenteneinnahme, ein lokaler Östrogenmangel, Voroperationen oder Vorbehandlung der Blase durch z. B. Radiatio oder Chemoinstillation sollten präzise eruiert werden, da diese ebenfalls die Symptomatik der überaktiven Blase bedingen können. Darüber hinaus können psychische Belastung oder Angststörungen das urogenitale Empfinden verändern und eine Harndrangsymptomatik mit Pollakisurie oder Nykturie hervorrufen [24, 147].

Das primäre Vorgehen bei Verdacht auf eine überaktive Blase beinhaltet eine ausführliche Anamnese, die körperliche Untersuchung und eine Urinanalyse. Die Anamnese kann durch Fragebögen und Miktionstagebücher zusätzlich vervollständigt und objektiviert werden. Neben abdomineller, urogenitaler und rektaler Untersuchung sollten die Patienten zusätzlich orientierend neurologisch beurteilt werden. Um die Basisdiagnostik zu komplettieren und um eine bakterielle Genese der Symptome sicher auszuschließen, wird eine Urindiagnostik inklusive Urinkultur durchgeführt [2, 147]. Bei vielen Patienten ist diese Basisdiagnostik ausreichend und konservative Therapieoptionen verschaffen Linderung. Im Falle von komplexen Symptomen, therapierefraktären oder komplizierten Krankheitsverläufen sowie Hinweisen auf neurologische Grunderkrankungen wird eine weiterführende Diagnostik empfohlen. Zur ergänzenden Bildgebung zählen die Sonographie des Urogenitaltraktes, der Nieren und die Miktionszystourethrographie (MCU). Zusätzlich können invasive urodynamische Untersuchungen angeschlossen werden. Dies kann die Durchführung einer Uroflowmetrie, einer Urethrocystoskopie, einer Videourodynamik oder einer Cystomanometrie ggf. mit Provokationstest beinhalten. Ergänzende neurologische Untersuchungen, Laboruntersuchungen, zusätzliche Bildgebung wie Abdomenleeraufnahme, Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT) oder Ausscheidungsurographie (AUG) stellen weitere Möglichkeiten der

Diagnostik dar, die jedoch individuell an den einzelnen Patienten und dessen Krankheitsgeschichte und Leidensdruck angepasst, durchgeführt werden sollten [2, 56, 147].

### *Therapie*

Die überaktive Blase stellt ein Krankheitsbild dar, welches die Lebensqualität äußerst einschränkt, wobei für Betroffene zu keiner Zeit akute Lebensgefahr besteht. Aus diesem Grund sollte streng der Nutzen, den eine bestimmte Therapie mit sich bringt, gegen deren Risiko hinsichtlich Schwere und Reversibilität von Nebenwirkungen abgewogen werden. Außerdem sollte die Therapie sehr individuell je nach Beschwerdebild des Patienten gewählt werden. Im Sinne der partizipativen Entscheidungsfindung („shared-decision-making“) ist nach Ausschluss behandlungsbedürftiger Situationen auch der Entschluss gegen jede Form der Therapie durchaus vertretbar [56]. Prinzipiell ist die Behandlung der überaktiven Blase entsprechend den Ergebnissen der Diagnostik als Stufentherapie konzipiert. An erster Stelle (first-line treatment) steht die risikoarme konservative Therapie aus Verhaltens- und Physiotherapie. Die Verhaltenstherapie sieht Miktions- und Toilettentraining sowie das Führen eines Miktionstagebuches vor. Physiotherapeutisch wird bei Inkontinenzsymptomen der Beckenboden konservativ oder intensiviert durch Elektrostimulations- und Biofeedbackgeräte trainiert [44]. An zweiter Stelle (second-line treatment) steht die Pharmakotherapie. Muskarin-Rezeptorantagonisten (Anticholinergika/Antimuskarinika), als Mittel der ersten Wahl, können dabei als Monotherapie verabreicht und mit konservativen Maßnahmen kombiniert werden [27, 62]. Bei der Frau kann zusätzlich eine lokale Östrogenbehandlung in Betracht gezogen werden [114]. Die Kombination verschiedener Verfahren stellt hierbei einen Benefit für den Patienten dar. Operative Therapien als Drittlinientherapien (third-line treatment) sind dann indiziert, wenn vorhergehende Maßnahmen wenig Erfolg zeigten oder z. B. infolge intolerabler Nebenwirkungen nicht durchgeführt werden können. Eine minimalinvasive Option besteht in der Infiltration der Blasenwand mit Botulinumtoxin A, was zu einem deutlichen Rückgang der Detrusorhyperaktivität und einer Verbesserung der Lebensqualität führen kann [81]. Auch die invasive sakrale Neuromodulation mit Implantation eines Neurostimulators stellt eine alternative Behandlungsmethode dar [3]. Als Ultima Ratio der Therapie der überaktiven Blase gelten Blasenaugmentation, Harnblasenersatz oder Harnableitung [2, 56, 147].

## 1.2 Arteriosklerose

Arteriosklerose, im Volksmund auch „Gefäßverkalkung“ genannt, ist definiert als krankhafte Veränderung der Arterien im Sinne von Verhärtung, Verdickung, Elastizitätsverlust sowie Lumeneinengung. Dieses polyätiologische Krankheitsbild wird durch zahlreiche exogene und endogene Noxen bzw. Krankheiten hervorgerufen und weiter verschlimmert. Als Risikofaktoren wurden z. B. arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie, Hypercholesterinämie, Hyperfibrinogenämie, Diabetes mellitus, Nikotin, Alter, Geschlecht, Stress, Toxine, Entzündungen oder familiäre Belastung identifiziert [135, 141, 177]. Die Pathogenese ist als sehr komplex anzusehen und unterliegt einer Kombination aus inflammatorischen sowie immunmodulatorischen Prozessen [97]. Die oben genannten Risikofaktoren fördern die Ausbildung einer endothelialen Dysfunktion, die zunächst ohne morphologische Veränderungen bleibt [26, 45]. Im Verlauf kommt es zu einer verstärkten Ansammlung von Low Density Lipoprotein (LDL) Molekülen in der Gefäßwand. Diese LDL Moleküle werden dort zu oxLDL oxidiert, welche eine starke proinflammatorische Wirkung aufweisen [66, 109, 110]. Die daraus folgende Überexpression von Adhäsionsmolekülen des Endothels führt zu einer vermehrten Haftung mit anschließender transendothelialer Migration von Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten aus der Blutbahn in den subendothelialen Raum [36, 57, 139, 140]. Neben Adhäsionsmolekülen sind an der Zell-Zell-Kommunikation eine Vielzahl an Zytokinen beteiligt, die vom Endothel und den eingewanderten Leukozyten sezerniert werden, wodurch glatte Muskelzellen, Endothelzellen sowie Leukozyten selbst wiederum aktiviert werden. Als Folge dessen kommt es zu einer sich selbst unterhaltenden Immunantwort und somit zu einer Progredienz der Ausbildung arteriosklerotischer Läsionen [49, 59, 60, 164]. Aktivierte glatte Muskelzellen der Gefäße bilden Kollagen, Extrazellulärmatrix und weitere proinflammatorische Faktoren mit der Folge eines Gewebeumbaus und Verdickung der Gefäßintima [41]. Die zu Makrophagen differenzierten Monozyten nehmen die oxLDL Moleküle auf und werden zu Schaumzellen [51]. Diese durch Gewebeumbau, Kalzifizierung und Einwanderung von Zellen bedingte Intimaverdickung führt zu so genannten Plaques, die das Gefäßlumen einengen. Daraus folgt eine zunehmend verminderte Blutversorgung der Organe bis hin zum vollständigen Verschluss des betreffenden Gefäßes. Bei Ruptur eines instabilen arteriosklerotischen Plaques kommt es durch den Kontakt mit Thrombozyten zur Entstehung eines intravasalen Thrombus [46] und plötzlichem Gefäßverschluss mit dessen verheerenden Folgen [9, 35, 171, 172].

So stellt Arteriosklerose als Systemerkrankung die Weichen für unzählige, z. T. lebensgefährliche Folgeerscheinungen wie Angina pectoris, Herzinfarkt, Niereninsuffizienz, Schlaganfall oder periphere arterielle Verschlusskrankheit [145]. Auch Erkrankungen des Urogenitaltraktes scheinen in ursächlichem Zusammenhang mit Arteriosklerose, bzw. mit den Arteriosklerose auslösenden Risikofaktoren, zu stehen. Ponholzer et al. [138] zeigte z. B. anhand eines Fragebogens den Zusammenhang zwischen den vier vaskulären Hauptrisikofaktoren Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Nikotinabusus und Hyperlipidämie und Symptomen des unteren Harntraktes (Lower Urinary Tract Symptoms, LUTS) auf. LUTS fassen eine Vielzahl an Beschwerden zusammen, die die Blasenfüllung, Blasenentleerung und/oder Beschwerden nach der Miktion beschreiben [4]. 2010 diskutierten Gorbachinsky et al. die Entstehung verschiedener urologischer Symptome bzw. Erkrankungen infolge eines metabolischen Syndroms [55], Pashootan et al. konnten 2015 einen Zusammenhang zwischen dem metabolischen Syndrom und LUTS bei 55-100-jährigen Männern zeigen [134].

Die Prävalenz der Arteriosklerose und ihrer Folgeerkrankungen steigt signifikant mit zunehmendem Alter und stellen weltweit die häufigste Todesursache dar [99]. Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) starben 2012 insgesamt 17.512.520 Menschen (31,4 %) weltweit an kardiovaskulären Erkrankungen [178]. In Deutschland starben im Jahr 2013 gemäß Angaben des Statistischen Bundesamtes insgesamt 354.493 Menschen (39,7 % aller Todesfälle) an den Folgen von Erkrankungen des Herzkreislaufsystems [156]. Auch in Zukunft ist ein globaler Anstieg der Prävalenz der Arteriosklerose und der hiermit vergesellschafteten Komplikationen zu erwarten [100, 102, 115]. Zum einen begründet sich dies auf der fortschreitenden Alterung der Bevölkerung bei steigender Lebenserwartung. Zum anderen nimmt der ungesunde Lebensstil der Wohlstandsgesellschaft, der „Western Lifestyle“, und damit verbundene Risikofaktoren wie Übergewicht, Typ II Diabetes mellitus, Hypertension oder Hypertriglycerinämie, weltweit zu. In den letzten Jahren sind davon zunehmend auch Entwicklungsländer betroffen [99, 143, 184, 185]. Alarmierend stellt sich darüber hinaus die ausgedehnte Verbreitung kardiovaskulärer Risikofaktoren schon bei Kindern und Jugendlichen dar [78, 176], was in der Zukunft zu einem zusätzlichen Anstieg von arteriosklerotischen Folgeerkrankungen führen wird [18].

### 1.3 Ziel und Fragestellung der Arbeit

Arteriosklerose führt im Körper zu Hypoxämie und Ischämie, was morphologische sowie funktionelle Veränderungen von Organen zur Folge haben kann. Schon länger besteht die Vermutung, dass sich ischämische Zustände ebenfalls auf die Funktion der Blase auswirken und offenbar zur bisher unklaren Pathogenese der überaktiven Blase beitragen [136, 138, 180]. Bislang gibt es nur wenige Studien, die den Effekt einer Minderperfusion auf Blase und Blasenfunktion untersuchen. Das Ziel dieser Arbeit ist, einen möglichen Zusammenhang von systemischer Arteriosklerose und Detrusorhyperaktivität festzustellen.

Beim Menschen konnte mittels Dopplersonographie ein Zusammenhang zwischen verringertem Blutfluss der Blase und Blasendysfunktion im Sinne einer Detrusorhyperaktivität ermittelt werden [136]. Im Tierexperiment wurde in verschiedenen Studien an Ratten mittels uni- bzw. bilateraler Ligatur der Arteria (A.) iliaca interna eine artifizielle Blasenischämie induziert [53, 75, 149, 180]. Andere Studien beschreiben eine Stenosierung der Iliakalgefäße von Ratten bzw. Kaninchen durch Ballon-Deendothelialisierung und damit Verletzung der Gefäßwand mit anschließender Entwicklung einer Organischämie distal der Stenose [14, 121, 148]. Alle Untersuchungen weisen signifikante Veränderungen der Blasenfunktion und Morphologie auf. Es konnte eine gesteigerte Miktionsfrequenz, Detrusorhyperaktivitäten [75], Reduktion des Miktionsvolumens, des maximalen Detrusordruckes, der Detrusorkontraktilität sowie des intravesikalen Druckes während der Miktion gezeigt werden [75, 180]. Beschrieben werden darüber hinaus Urothelschäden, ein submuskuläres Ödem und eine glattmuskuläre Degeneration [149] mit einer Reduktion der Blasenkontraktilität [148]. Auch eine Neurodegeneration [11] mit Anstieg des NGF [16] und ein Anstieg von Markern für oxidativen Stress [120] werden angegeben. Allen beschriebenen Studien ist jedoch gemeinsam, dass die vesikale Ischämie artifiziell induziert wird und lokal begrenzt ist. Zudem wird durch die verschiedenen Operationen in den pelvinen Organen sehr plötzlich die arterielle Blutzufuhr verringert. Dieses Prozedere spiegelt offensichtlich nicht die physiologischen Zustände beim Menschen wider, da die Arteriosklerose hier systemisch vorherrscht und überdies langsam und kontinuierlich über Jahre hinweg entsteht.

Bisher gibt es nur sehr wenige Studien, die einen Zusammenhang zwischen systemischer Arteriosklerose und Detrusorhyperaktivität beschreiben. Neben operativ induzierter Reduktion der vesikalen Blutversorgung liegen nur vereinzelte tierexperimentelle Ansätze vor, die aufgrund von z. B. genetischen Veränderungen und

ohne vorangehende Operation zu vesikaler Minderperfusion führen. So weisen spontan hypertensive Ratten eine deutliche Reduktion der vesikalen Blutversorgung und der Blasencompliance auf [70]. Cystomanometrisch zeigt sich hier ein signifikanter Anstieg der Miktionsfrequenz bei Reduktion des jeweiligen Miktionsvolumens. Auch Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) Kaninchen, die als Tiermodell für hereditäre Hyperlipidämie dienen und u. a. eine Arteriosklerose der Iliakalgefäße ausbilden, zeigen entsprechende Veränderungen der Urodynamik [181]. Obwohl Zeichen einer Detrusorhyperaktivität festgestellt werden konnten, ist unklar, in wieweit hypoxische Schädigungen des ZNS durch zerebrale, arteriosklerotische Läsionen verursacht wurden und somit Einfluss auf die Entwicklung der Blasenfunktionsstörung genommen wurde. Demzufolge kann mit diesem Tiermodell letztlich nicht zwischen neurogener und nicht-neurogener Detrusorhyperaktivität unterschieden werden.

Unabhängig von der Art und Durchführung der verschiedenen Untersuchungen stützen die bisherigen Forschungsergebnisse die Hypothese, dass eine Minderperfusion und die damit einhergehende Hypoxie zu Blasenveränderungen führen und somit auch in die Krankheitsentstehung der Detrusorhyperaktivität bzw. der überaktiven Blase involviert sind. Die vorliegende Studie präsentiert die ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Maus als neues Tiermodell für Untersuchungen einer non-neuronalen Detrusorhyperaktivität. Auslöser dafür ist eine vesikale Minderperfusion und somit Hypoxie aufgrund systemischer, arteriosklerotischer Läsionen, die progredienten Gefäßveränderungen beim alternden Menschen entsprechen [85, 118], ohne Ausbildung zerebraler Arteriosklerose [88]. Um diese Veränderungen der Blasenfunktion zu detektieren, führten wir nach Katheterimplantation Blasendruckmessungen (Cystomanometrien) am lebenden, wachen Tier durch, wie von Pandita et al. beschrieben [127]. Morphologische Veränderungen der Blasenwand beurteilten wir unter Einsatz nanocomputertomographischer Verfahren [86].

Es stellten sich folgende Fragen:

1. Wirkt sich im Tierversuch eine fortgeschrittene systemische Arteriosklerose auf urodynamische Parameter aus?
2. Wirken sich provokationscystomanometrische Untersuchungen mit Kaliumchlorid (KCl) auf die Urodynamik von ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäusen aus?
3. Ist es möglich das Hohlorgan Blase im Nano-CT darzustellen und aussagekräftige Bilder zu generieren?

4. Gibt es anhand der computertomographischen Bilder Unterschiede der Blasenvaskularisation zwischen ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäusen und gesunden Kontrolltieren?
5. Gibt es anhand der computertomographischen Bilder Unterschiede der Blasenwanddicke und des Blasenwandvolumens zwischen ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäusen und gesunden Kontrolltieren?

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Tiermodell

Alle beschriebenen Tierversuche wurden entsprechend der Richtlinien des Europäischen Rats (European Communities Council Directive) vom 24.11.1986 (86/609/EEC) zum Schutze von Labortieren und nach § 8 Abs. 1 des deutschen Tierschutzgesetzes vom 24.05.2007 (GVBL.I S.307) durchgeführt. Die Versuche zur Etablierung eines Tiermodells zur Induktion des Krankheitsbildes einer „overactive bladder“ (OAB) mit Ausbildung von Detrusorhyperaktivität auf dem Boden einer vesikalen Minderperfusion bei ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>- Doppel-Knockout-Mäusen wurden durch das Regierungspräsidium Gießen am 11.08.2009 genehmigt (RP Gießen: Geschäftszeichen V 54 - 19 c 20-15 (I) GI 20/25 - Nr.46/2009).

Schon seit Mitte des letzten Jahrhunderts versuchte man Tiermodelle zu etablieren, die die Arterioskleroseentwicklung im Menschen repräsentieren. Durch fett- und cholesterinreiche Nahrung konnten frühe, einfache arteriosklerotische Läsionen bei Tieren induziert werden [125]. Aber erst durch das Ausschalten von Genen, die am Fett- und Cholesterinstoffwechsel beteiligt sind, konnten fortgeschrittene Veränderungen und Plaques im Gefäßbett hervorgerufen werden [137].

Die ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Maus stellt ein weltweit verbreitetes und in der Arterioskleroseforschung genutztes Tiermodell dar [20]. Das Gen für den essentiellen Liganden Apolipoprotein E (ApoE) sowie das Gen für den Low Density Lipoprotein Rezeptor (LDL Rezeptor) werden durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen ausgeschaltet. Beide Proteine sind wichtige Bestandteile des Fettstoffwechsels und vermitteln die Cholesterin- und Triglyceridaufnahme sowie Cholesterin- und Triglyceridausscheidung im Körper. Aus dem Verlust beider Liganden resultiert eine altersunabhängige, schwere Hypercholesterinämie sowie Hypertriglycerinämie. Diese Änderung der Blutzusammensetzung führt schon bei jungen Tieren zu ausgeprägten arteriosklerotischen Läsionen [74, 137, 186]. Mittels cholesterin- und fettreicher Nahrung („Western Diet“) können die Plasmacholesterin- und Plasmatriglyceridwerte im Blut zusätzlich gesteigert werden, was die Entwicklung und Schwere der Arteriosklerose beschleunigt bzw. verstärkt [118]. Histologisch ähneln die Stadien und Schweregrade dieser Läsionen den sklerotischen Plaques der Gefäße des Menschen [85, 118]. Lokalisiert sind die arteriosklerotischen Veränderungen in der

Aorta und den großen Arterien, wie Studien anhand der ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Maus zeigen konnten [118, 142].

Als Besonderheit konnte nachgewiesen werden, dass es unabhängig vom Alter der Tiere, nicht zu einer Ausbildung arteriosklerotischer Veränderungen zerebraler Gefäße kommt. Wie in der Einleitung beschrieben, kommen als mögliche Ursache für eine Detrusorhyperaktivität neurogene als auch nicht-neurogene Ursachen in Betracht. Auf Seiten der neurogenen Ursachen wird u. a. eine Schädigung der zentralen, supranukleären Strukturen beschrieben, welche zu einer ausbleibenden Inhibition des Miktionsreflexes und somit zum Bild der neurogen enthemmten Blase führen. Eine zerebrale Arteriosklerose könnte zu einer zerebralen Nervenschädigung und somit zu einer zentralen Enthemmung des Miktionsreflexes führen. In der Folge wäre eine Unterscheidung zwischen neurogenem und nicht-neurogenem Auslöser für die Detrusorhyperaktivität sehr schwierig. Aufgrund des Fehlens zerebraler arteriosklerotischer Veränderungen wird in unserer Arbeit allein der periphere Effekt einer Minderperfusion der Harnblase im Sinne einer nicht-neurogenen Ursache erforscht [88].

Die hier untersuchten Knockout-Mäuse wurden 2002 durch den Fachbereich Medizin der Universitätsklinik in Gießen erworben, sie stammen ursprünglich aus der Charles River GmbH in Sulzfeld, Deutschland. Die Tiere werden seitdem in der SPF-Anlage (Specific Pathogen-Free Facility) des Zentralen Tierstalls der Universitätsklinik Gießen und Marburg, Standort Gießen, gehalten und gezüchtet. Dabei wird streng auf die Homozygotie der Tierlinie geachtet. Die Mäuse werden in Käfigen mit maximal fünf Tieren gehalten. Den Tieren wird sowohl Wasser als auch ein Basisfutter (#1320 Maus/Ratte Haltung, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland) zur freien Aufnahme zur Verfügung gestellt. Ein Tag-Nacht-Rhythmus von je 12 Stunden wird eingehalten. Die Versuche erfolgen an weiblichen Tieren, um funktionelle Blasenveränderungen durch subvesikale Obstruktion seitens der Prostata männlicher Tiere auszuschließen. Als korrespondierender Wildtyp dienen weibliche, 60 Wochen alte, native C57Bl6/N Mäuse (Zucht Charles River GmbH, Sulzfeld, Deutschland). Diese Tiere stellen gesunde Kontrolltiere da, deren Genom unverändert ist.

Die Versuche werden an 60 Wochen alten Mäusen durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt von fortgeschrittenen Gefäßveränderungen und einer ausgeprägten Arteriosklerose der ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäuse ausgegangen werden kann [89]. Initial sollten 14 ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäuse und 14 C57Bl6/N Mäuse untersucht werden. Die Cystomanometrie konnte aber nur bei 6 ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-

Knockout-Mäusen durchgeführt werden, da 3 Tiere während bzw. nach der Cystostomie verstarben, die Messung bei 4 Tieren aufgrund eines sehr schlechten klinischen Zustandes nicht durchgeführt wurde und der Katheter bei einem Tier Undichtigkeiten aufwies. Wegen eines zu eng gesetzten Knotens der Tabaksbeutelnaht und Undichtigkeiten des Schlauches durch Manipulation der Tiere konnte die Cystomanometrie nur bei 10 Kontrolltieren durchgeführt werden. 12 Blasen der ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäuse (7 gefüllt mit Gelatine/5 gefüllt mit Vaseline) und alle 14 Blasen der Kontrolltiere konnten im Nano-CT untersucht werden.

## 2.2 Cystostomie

Im Alter von 60 Wochen erfolgt bei allen Tieren die Cystostomie unter Anästhesie durch intraperitoneale Injektion eines Gemisches aus Atropin (0,05 mg/kg; Atropinsulfat B. Braun<sup>®</sup>, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany), Ketamin (100 mg/kg; Ketalar<sup>®</sup>, Park Davis, Barcelona, Spanien) und Xylazin (15 mg/kg; Rompun<sup>®</sup>, Bayer AG, Leverkusen, Germany). Zur zusätzlichen Schmerzstillung wird Meloxicam (1,5 mg/kg KG, i.m.; Metacam<sup>®</sup>, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim/Rhein, Germany) intramuskulär injiziert. Daraufhin wird das Abdomen mittels medianer Laparotomie eröffnet und vorsichtig exploriert, um die Blase darzustellen (Abb. 2 A). Vor der Implantation des Polyethylen-Katheters (PE 10, Intramedic<sup>®</sup>, BD Becton, Dickinson and Company, New York, USA) wird dieser an einem Ende erhitzt wodurch er sich aufwirft und einen Cuff formt, der eine Dislokation aus der Blase verhindert. Das Lumen des Katheters bleibt dadurch unverändert (Abb. 1). Die Einlage des Katheters erfolgt nach Inzision am Dom der Blase und wird dort mittels Tabaksbeutelnaht (6-0 Vicryl<sup>®</sup>, Ethicon, Johnson & Johnson MEDICAL GmbH, Norderstedt, Germany) fixiert (siehe Abb. 2 B und C). Mit Hilfe einer stumpfen Kanüle wird der Katheter subkutan nach dorsal bis zum Nacken des Tieres getunnelt, dort über einen kleinen Hautschnitt ausgeleitet und mittels Ligatur (4-0 Vicryl<sup>®</sup>, Ethicon, Johnson & Johnson MEDICAL GmbH, Norderstedt, Germany) und Pflasterstreifen (Leukoplast<sup>®</sup>, Beiersdorfer AG, Hamburg, Deutschland) fixiert (Abb. 2 D). Abschließend wird das Abdomen schichtweise durch Einzelknopfnähte verschlossen.

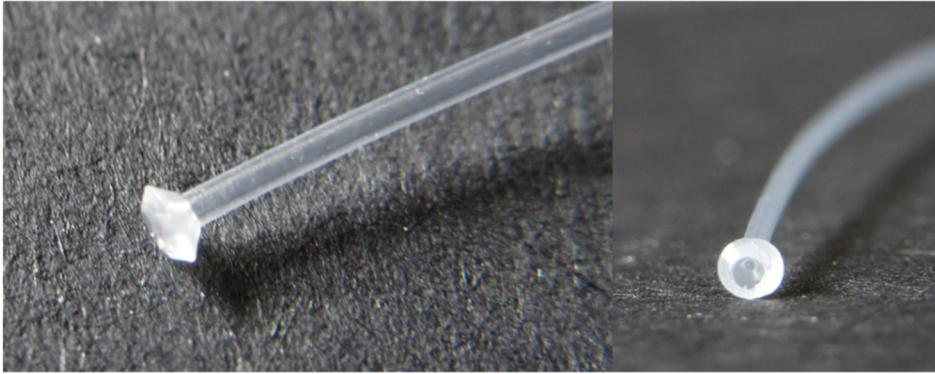


Abb. 1: Vorbereiteter Polyethylen-Katheter mit Cuff, der ebenso wie die Tabaksbeutelnaht eine Dislokation aus der Blase verhindern soll. Das Lumen des Katheters bleibt dabei unverändert.

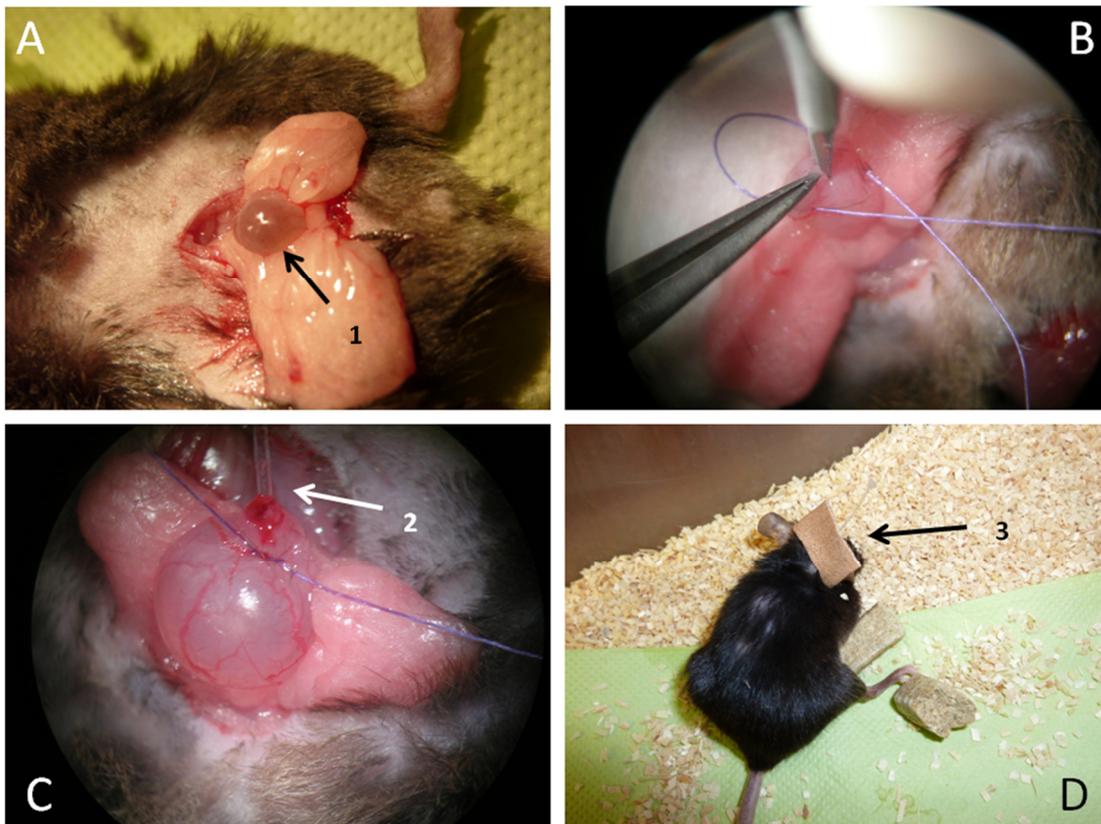


Abb. 2: Darstellung der Cystostomie mit Kathetereinlage: Nach Eröffnung des Abdomens wird die Harnblase freigelegt (A) und die Tabaksbeutelnaht vorgelegt. Die Inzision der Blase erfolgt am Blasendom (B) mit nachfolgender Kathetereinlage und Fixierung durch die Tabaksbeutelnaht (C). Der Katheter wird anschließend subkutan getunnelt, am Nacken ausgeleitet und dort fixiert (D). Pfeil 1 = freigelegte Blase; Pfeil 2 = am Blasendom fixierter Katheter; Pfeil 3 = am Nacken ausgeleiteter und durch Pflaster sowie Ligatur fixierter Katheter.

### 2.3 Cystomanometrie

Drei Tage nach Katheterimplantation erfolgt die Cystomanometrie am wachen Tier. Über den am Nacken ausgeleiteten Katheter kann die Blase der Maus artifiziell gefüllt werden, wobei gleichzeitig über selbigen die Messung des Blaseninnendrucks möglich ist.

Die Tiere werden einzeln in einen metabolischen Käfig (diuresis cage 3700D001, Techniplast Deutschland GmbH, Hohenpreißenberg, Deutschland) gesetzt (Abb. 3 B) und der Katheter wird über einen weiteren Polyethylenschlauch (PE 50, Intramedic<sup>®</sup>, BD Becton, Dickinson and Company, New York, USA ) an einen Perfusor (Perfusor<sup>®</sup> compact, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) angeschlossen. Über diesen wird die Blase mit steriler physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl-Lösung, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) mit einer Geschwindigkeit von 1,5 ml/h gefüllt. Gleichzeitig wird der intravesikale Druck über einen Druckumwandler (model P23XL, Grass, Astro-med Industrial Park, West Warwick, RI/USA) konstant gemessen (Abb. 3 A). Unter dem Käfig wird zusätzlich ein Auffangbehälter befestigt, in dem der Urin der Maus gesammelt und gemessen wird (Abb. 3 C). Durch einen Kraftumwandler (model FT03D, Grass, Astro-med, Inc. Product Group, Astro-med Industrial Park, West Warwick, RI/USA) kann auf diese Weise das Miktionsvolumen bestimmt werden. Die Verstärkung der Messdaten aus beiden Geräten, Druck- und Kraftumwandler, erfolgt über den AC/DC Strain Cage Amplifier (model LP122, Grass, Astro-med, Inc. Product Group, Astro-med Industrial Park, West Warwick, RI/USA). Daraufhin werden die Daten weiterverarbeitet (MP100, Biopac Systems, Inc., Med.NATIC GmbH, München, Deutschland) und mittels AcqKnowledge<sup>®</sup> Software, Version 3.8.2. (Biopac Systems, Inc., Med-NATIC GmbH München, Deutschland) erfasst und bildlich dargestellt (Abb. 4). Während der Messung werden kontinuierlich Miktion, Defäkation und Verhalten der Tiere protokolliert, um Kurvenverläufe bei späterer Betrachtung exakt interpretieren zu können. Nach einer anfänglichen Stabilisierungsphase von ca. 30 Minuten (min), in der das Tier zur Ruhe kommt, erfolgt die Blasenfüllung mit NaCl-Lösung so lange bis der Verlauf fünf bis sechs eindeutige Miktionskurven zeigt. Danach werden weitere fünf bis sechs Miktionsphasen aufgezeichnet während derer zusätzlich der Restharn bestimmt wird. Durch Diskonnektion des Polyethylen-Katheters vom Druckabnehmer direkt nach erfolgter Miktion kann ein in der Blase verbliebener Urin im Schlauch zurücklaufen und aufgefangen werden. Dieser Urin entspricht einem postmiktionell in der Blase verbliebenden Restharn, dessen Volumen durch Wiegen bestimmt wird.

Im Anschluss erfolgt die Messung bei gleichem Versuchsaufbau mit 0,2 molarer KCl-Lösung, um eine eventuelle Detrusorhyperaktivität aufgrund einer Barriere- bzw. Permeabilitätsstörung des Urothels zu untersuchen. Eine durch Arteriosklerose verursachte vesikale Minderperfusion mit einer das Urothel schädigenden Ischämie als Folge, könnte diese Barriestörung hervorrufen. KCl würde in diesem Fall das Urothel überwinden und irritativ auf suburothelial gelegene sensorische Nervenfasern wirken und eine Überaktivität induzieren. Um vesikale Reizungen der Tiere nach Beendigung der Messung zu vermeiden, wird die Blase erneut mit physiologischer Kochsalzlösung gespült. Anhand der gewonnenen Daten werden folgende Parameter erhoben (siehe auch Abb. 4):

#### *Maximaler Blasendruck ( $P_{max}$ )*

Der maximale Blasendruck bezeichnet den höchsten gemessenen Druck in der Harnblase während der Austreibungsphase der Miktion.

#### *Peak-Peak-Intervall (PP)*

Das Peak-Peak-Intervall gibt das Zeitintervall zwischen Detrusoraktivitäten an und muss vom Begriff des Miktionsintervalls abgegrenzt werden.

#### *Miktionsintervall (MI)*

Das Miktionsintervall charakterisiert die Zeit ab Beginn der Blasenfüllung, bis zur erfolgten Miktion.

#### *funktionelle Blasenkapazität (fBK)*

Die funktionelle Blasenkapazität ergibt sich aus der Differenz von maximaler Blasenkapazität, d. h. max. Fassungsvermögen, und Restharmmenge.

#### *Miktionsvolumen (MV)*

Als Miktionsvolumen wird die gesamte Menge an ausgeschiedenem Urin bezeichnet, die nach einer erfolgten Miktion gemessen werden kann.

#### *Restharmmenge (RV)*

Restharn bezeichnet die Menge an Urin, die nach normaler Miktion in der Blase verbleibt und wird als pathologisch angesehen, da die Blase vollständig entleert werden sollte.

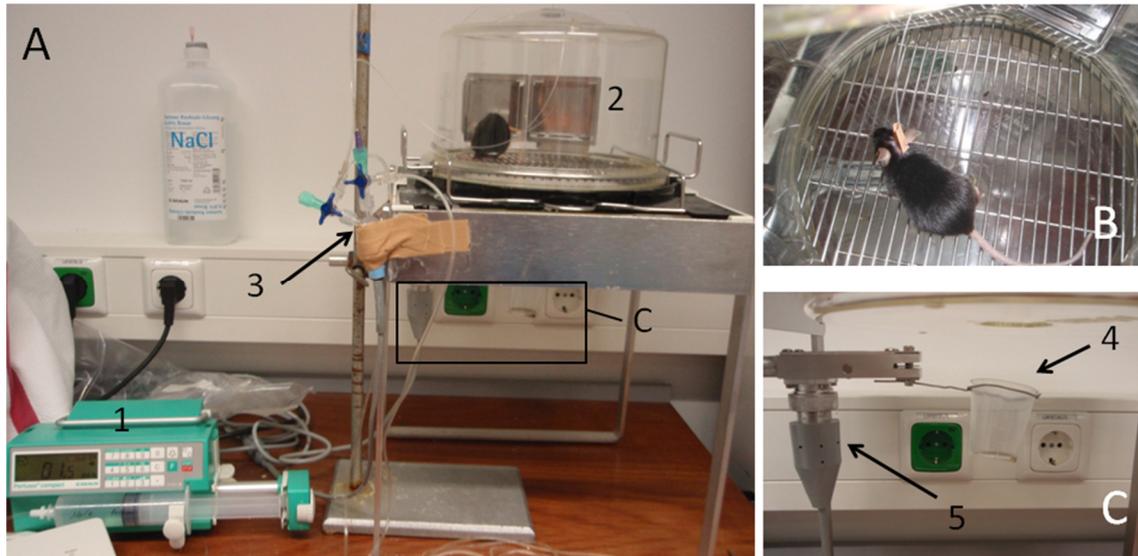


Abb. 3: Versuchsaufbau der Cystomanometrie: A = Übersicht; Mit Hilfe eines Perfusors (1) wird die Blase langsam kontinuierlich mit 1,5 ml/h über einen Polyethylenkatheter gefüllt. Über einen Druckabnehmer (3) wird der intravesikale Druck gemessen. Der Urin wird in einem Becher (4) unter dem Käfig (2) aufgefangen und das Volumen mit Hilfe eines Kraftumwandlers (5) gemessen. B = Maus im Untersuchungskäfig mit am Nacken ausgeleitetem und fixiertem Katheter. C = Darstellung des Urinauffangbehälters und des Kraftumwandlers unter dem Käfig.

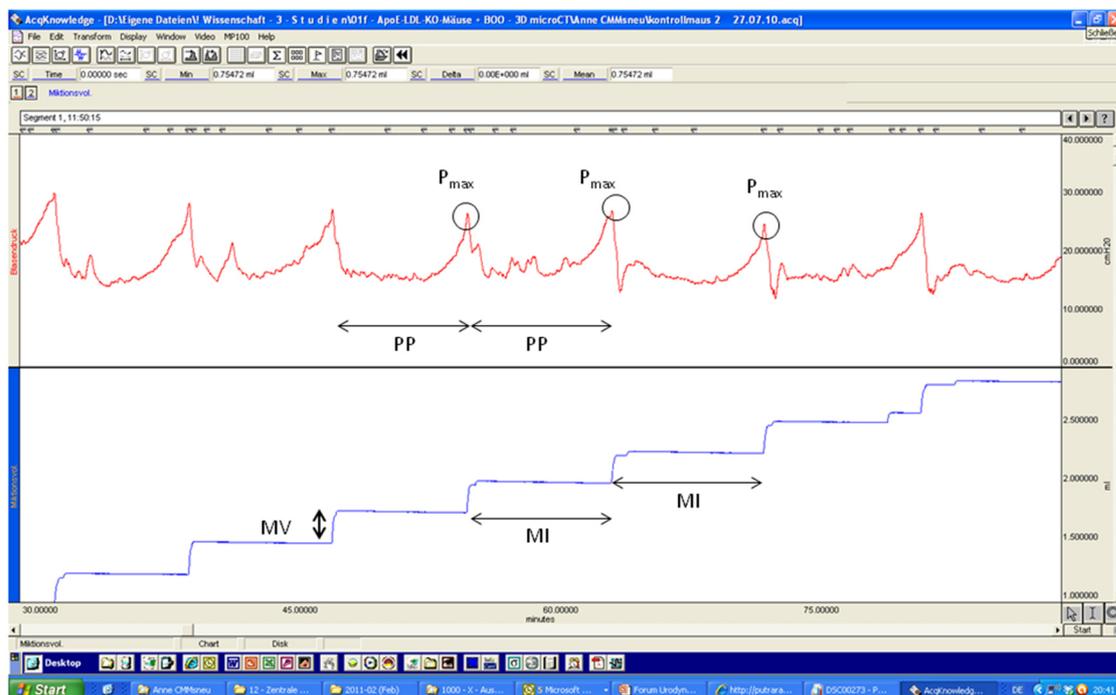
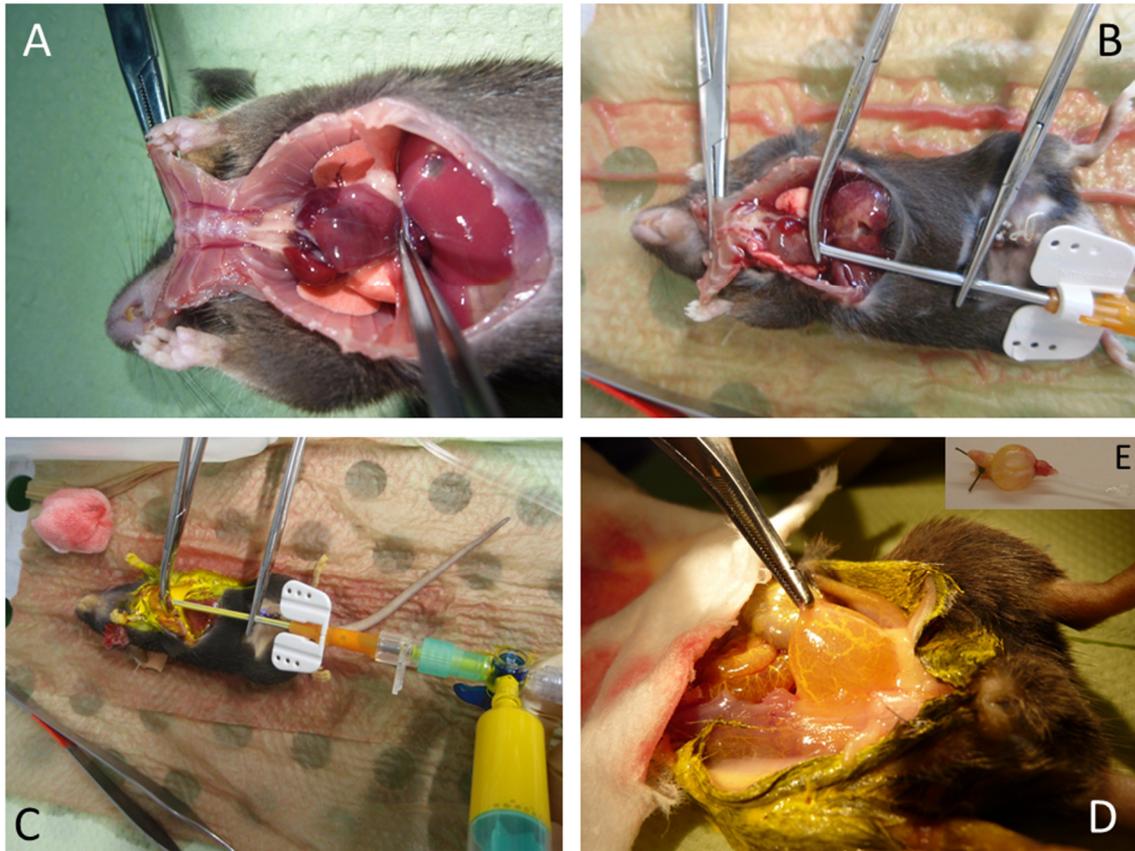


Abb. 4: Ausschnitt einer Cystomanometrie zur Darstellung der erhobenen Parameter.  $P_{max}$  = maximaler Blasendruck, PP = Peak-Peak-Intervall, MV = Miktionvolumen, MI = Miktionsintervall.

## 2.4 Perfusion und Präparation

Im Anschluss an die Cystomanometrie werden die Tiere durch eine letale Dosis Sevofluran (Abbott, Wiesbaden, Deutschland) euthanasiert. Nach Prüfung sicherer Todeszeichen wird zügig das Abdomen und über das Diaphragma der Thorax von kaudal eröffnet (Abb. 5 A). Das Herz wird vorsichtig gelöst und der rechte Vorhof sowie der linke Ventrikel inzidiert. Über die Inzision des Ventrikels wird ein peripherer Venenverweilkatheter der Größe Gauge 18 wenige Millimeter eingeführt. Die Stahlnadel wird so weit zurückgezogen bis die Nadelspitze im Kunststoffkatheter verschwunden ist, um keine Verletzungen am Herzen durch die Nadel zu verursachen. Die Kanüle wird daraufhin mit einer Klemme am linken Ventrikel fixiert. Um eine intravasale Agglutination zu verhindern wird heparinisierte Kochsalzlösung (10 ml sterile 0,9 % NaCl-Lösung mit 1000 IE Heparin) über den Katheter infundiert bis der venöse Ausstrom aus dem rechten Atrium kein Blut mehr enthält (Abb. 5 B). Um das Gefäßsystem der Tiere in der Nano-CT geeignet darzustellen, wird das röntgendichte, intravasal aushärtende Kontrastmittel Microfil<sup>®</sup> (Flow Tech. Inc., Carver, Massachusetts, USA) unmittelbar im Anschluss an die Spülung mit heparinierter NaCl-Lösung vorsichtig appliziert (siehe Abb. 5 C). Microfil<sup>®</sup> wird direkt vor dem Gebrauch mit Hilfe eines Magnetrührers aus drei Komponenten (MV Compound, MV Diluent und MV Curing Agent) im Verhältnis 1:1:0,2 möglichst blasenfrei gemischt. Nach der ca. 30-minütigen Polymerisationsphase erlangt Microfil<sup>®</sup> die gewünschte gummiartige Konsistenz und haftet im Gefäßsystem, wodurch dieses stabilisiert bzw. fixiert wird. Anschließend wird die Harnblase der Tiere dargestellt und freipräpariert (Abb. 5 D). Der Blasenhalss wird durch eine 4-0 Ligatur verschlossen und die Blase kann daraufhin mit noch liegendem Katheter entnommen werden. Um eine aussagekräftige Darstellung des Hohlorgans mit Abgrenzung von Blasenlumen und Blasenwand in der Computertomographie zu erreichen, wird frisch angerührte Gelatine (Ruf Sofort Gelatine, RUF Lebensmittelwerk KG, Quakenbrück, Deutschland) über den im Blasendom liegenden Katheter appliziert. Da nach den ersten CT-Scans der gefüllten Blasen (ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup> -Maus Nr. 1-7) die Unterscheidung von Blasenwand und Gelatine aufgrund ähnlicher Dichteverhältnisse nicht ausreichend möglich war, wurde statt Gelatine künftig Vaseline (Chesebrough Vaseline, Unilever, Hamburg, Deutschland) verwendet, die vor Applikation durch Erwärmen verflüssigt wurde. Abschließend wird die gefüllte Harnblase in 3,5 % - 3,7 % Formalinlösung (Formaldehyd-Lösung, Otto Fischer GmbH und Co. KG, Saarbrücken, Deutschland) fixiert und gekühlt aufbewahrt.



*Abb. 5: Präparation und Perfusion: Eröffnung des Abdomens sowie des Thorax und Lösen des Herzens (A) mit anschließender Inzision des rechten Atriums als auch des linken Ventrikels. Nach Befestigung der Kanüle erfolgt die Perfusion mit heparinierter Kochsalzlösung (B). Direkt im Anschluss erfolgt die Perfusion mit Kontrastmittel (C). Nach dem Aushärten des Kontrastmittels Präparation der Blase (D), die nach Ligatur der Urethra entnommen und über den liegenden Katheter mit Gelatine bzw. Vaseline gefüllt wird (E).*

Es erfolgt zunächst der Nano-CT-Scan der gefüllten Gesamtblasen (siehe Kapitel 2.5). Im Anschluss werden diese in sechs definierte Segmente (a = Blasendach, b = ventral, c = dorsal, d = rechts, e = links, f = Blasenboden) zerteilt (Abb. 6), um detailliertere Aussagen über die Blasenwandgefäßversorgung treffen zu können. Dabei werden jedoch nur die vier Wandsegmente (b, c, d, e) gescannt und analysiert. Dach- und Bodensegment werden nicht untersucht, da Katheter und Ligatur zu Bildartefakten führen.

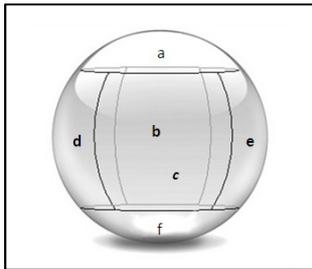


Abb. 6: Darstellung des Segmentierungsschemas der Harnblasen.

## 2.5 Bildgebung

Die computertomographische Untersuchung der gefüllten Harnblasen sowie der Harnblasensegmente erfolgt am Universitätsklinikum Gießen, Deutschland, mit dem Nano-CT (SkyScan2011 nanotomograph) der Firma SkyScan®, Kontich, Belgien (Abb. 7). Um auswertbare Daten zu erhalten werden drei Schritte benötigt. Zuerst erfolgt der Scan der Proben. Anschließend werden die gewonnenen Rohdaten rekonstruiert. Daraufhin können diese Bilder bearbeitet und analysiert werden.



Abb. 7: Nano-Computertomograph der Firma SkyScan®, Kontich, Belgien an der Justus-Liebig-Universität Gießen.

## 2.5.1 Nano-Computertomographie

### 2.5.1.1 Aufbau des Nano-Computertomographen

Der Nano-Computertomograph besteht aus mehreren Teilen (Abb. 8). Das größte Gehäuse beinhaltet die eigentliche Funktionseinheit des Geräts, welches aus Röntgenröhre, Probenschlitten und Bilddetektor besteht. Daran angeschlossen ist ein Druckluftkompressor (air compressor), eine Vorvakuumpumpe (rotary vacuum pump) sowie ein Computer zur Systemsteuerung und Rekonstruktion der Rohdatensätze.

Die hier verwendete Nanofokusröntgenröhre vom offenen Typ (open source) mit Transmissionsanode bedarf eines kontinuierlichen Vakuums, das durch spezielle Pumpen (Vorvakuum- und Turbopumpe) gewährleistet wird. Die Röhre kann bei Spannungen von 20 - 80 kV betrieben werden. Ein Glühdraht aus Lanthanhexaborid ( $\text{LaB}_6$ ) bildet die Kathode, die eigentliche Strahlenquelle des Systems. Bevor der von der Kathode emittierte Elektronenstrahl auf die Anode trifft, wird dieser durch zwei elektromagnetische Linsen gebündelt und fokussiert. Diese Fokussierung ermöglicht die Größenminimierung des Brenn- oder Fokuspunktes, um die Strahlenquelle möglichst punktförmig zu erhalten. Ein kleiner Brennpunkt erlaubt die Positionierung der Proben sehr nahe am Röntgenfokus, was zu einer hohen Auflösung des später entstehenden Bildes führt. Um den Elektronenstrahl zu beschleunigen wird zusätzlich negative Spannung an der Kathode angelegt. Die Anode besteht aus einer dünnen Wolframschicht, die einem Berylliumfenster, dem so genannten Strahlenaustrittsfenster aufliegt. Trifft nun der beschleunigte und fokussierte Elektronenstrahl auf die Wolframbeschichtung, entsteht Röntgenstrahlung mit Fokusgröße von  $< 400$  nm, die durch das Berylliumfenster kegelförmig ausgesendet wird.

Zwischen Röntgenröhre und Bilddetektor befindet sich die Probenkammer mit einer beweglichen Probenbühne. Auf dieser Probenbühne befindet sich der Probenhalter auf dem die Gewebeproben (Objekte) fixiert werden können. Die Probenbühne lässt sich elektronisch gesteuert in drei Richtungen verschieben. Zum einen dient dies der korrekten Zentrierung der Probe im kegelförmigen Röntgenstrahl vor dem Detektor, um das gesamte Objekt zu erfassen. Zum anderen dient die Verschiebung des Objektes entlang der Längsachse zwischen Strahlenquelle und Detektor der geometrischen Vergrößerung und somit auch der Bildauflösung. Befindet sich das Objekt nahe der punktförmigen Strahlenquelle steigt der Vergrößerungsfaktor und die Ortsauflösung des entstehenden Bildes nimmt zu.

Der Bilddetektor besteht aus einem Bildverstärker, einer Charged Coupled Device (CCD) - Kamera und einem Bildumwandler. Die Röntgenstrahlen treffen durch ein

dünnes Berylliumfenster auf den Bildverstärker, der via Szintillatorprinzip das Röntgensignal in Lichtsignale umwandelt und zusätzlich verstärkt. Dieses Lichtsignal wird daraufhin von der hochauflösenden 12-bit CCD-Kamera (Detektormatrix von 1280 x 1024 Pixeln) eingefangen, mit Hilfe des Bildumwandlers digitalisiert und über ein Firewire-Kabel an den Computer gesendet und als 16-bit-TIFF-Datei gespeichert [1].

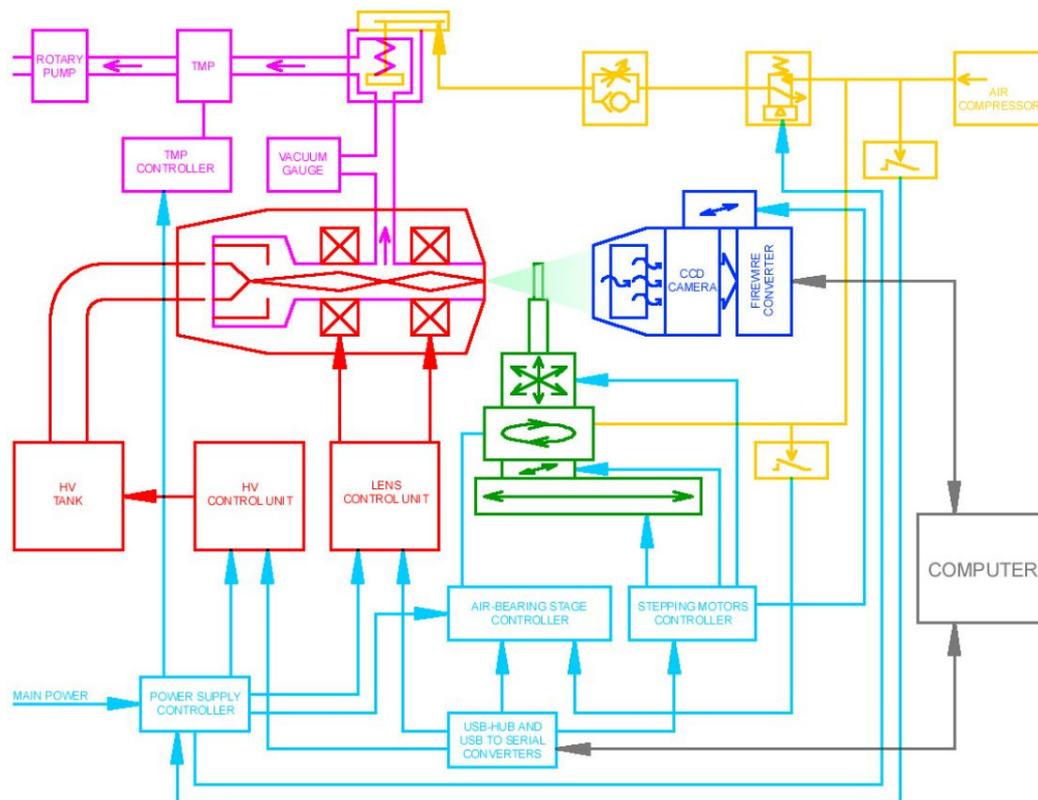


Abb. 8: Schematische Darstellung des Nano-Computertomographen [1]; wichtigste Elemente: rot = Röntgenröhre, grün = Probenschlitten, blau = Bilddetektor, rosa = Vakuumpumpensystem, gelb = Pneumatisches Subsystem

### 2.5.1.2 Scanvorgang der Gesamtharnblasen und der Blasensegmente

Vor dem Scanvorgang werden die Proben in Parafilm®-Folie gewickelt, um sie auf der beweglichen Haltevorrichtung innerhalb der Probenkammer zu befestigen und vor Austrocknung zu schützen. Für beste Ergebnisse eignen sich Objekte mit einer Größe von 0,2 - 1 mm. Der maximale Durchmesser einer Probe sollte 11 mm nicht überschreiten. Die Probe wird daraufhin möglichst nahe an der Strahlenquelle

---

positioniert, um eine maximale Vergrößerung und damit minimale Voxelgröße zu erhalten. Dabei muss jedoch auf die vollständige Lage im kegelförmigen Röntgenstrahl geachtet werden, da sonst Randteile des Objektes vom Detektor nicht erfasst werden können. Während der Scanphase rotiert die auf der Haltevorrichtung befestigte Probe in  $0,35^\circ$  Schritten (Harnblasen als Gesamtorgane) bzw.  $0,2^\circ$  Schritten (Blasensegmente) um insgesamt  $180^\circ$  um die eigene vertikale Achse, wobei pro Einzelbild jeweils 2000 Millisekunden (ms) belichtet wird. Zur Reduktion des Rauschens im späteren Bild wird sich hier des „frame averaging“ bedient. Pro Rotationsschritt werden mehrere Aufnahmen gemacht, aus denen ein „Durchschnittsbild“ erzeugt wird. Werden beispielsweise neun Bilder erfasst, so führt dies zu einer  $\sqrt{9}$  = Verdreifachung der Bildqualität. Allerdings wird die Dauer des Scanvorgangs dadurch verlängert. Während des Scans der Gesamtblasen werden pro Rotationsschritt 6 Bilder erstellt, bei den Segmenten je 4 Bilder. Die Scandauer ergibt sich aus dem Rotationswinkel, der Anzahl der Rotationsschritte, der Anzahl geschossener Bilder pro Rotationsschritt sowie der Belichtungszeit pro Einzelbild. Im Durchschnitt beträgt die Scanzeit pro Objekt hier zwei Stunden.

Der Scan der gefüllten Gesamtblasen erfolgt bei 50 Kilovolt (kV) und 160 Mikroampere ( $\mu\text{A}$ ). Die Harnblasensegmente werden bei 30 kV und 200  $\mu\text{A}$  gescannt. Die minimale Pixelgröße der Bilder der Gesamtblasen kann Tab. 1 entnommen werden. Die Pixelgröße der 76 gescannten Harnblasenwandsegmente variiert zwischen 4,0 Mikrometer ( $\mu\text{m}$ ) und 9,5  $\mu\text{m}$ , je nach Größe des Segments.

Harnblasen	Image Pixel Size [ $\mu\text{m}$ ]
ApoE <sup>-/-</sup> -LDLR <sup>-/-</sup> 1	7,0
ApoE <sup>-/-</sup> -LDLR <sup>-/-</sup> 2	7,0
ApoE <sup>-/-</sup> -LDLR <sup>-/-</sup> 3	9,5
ApoE <sup>-/-</sup> -LDLR <sup>-/-</sup> 4	6,0
ApoE <sup>-/-</sup> -LDLR <sup>-/-</sup> 5	6,3
Harnblasen	Image Pixel Size [ $\mu\text{m}$ ]
C57Bl6/N 1	7,5
C57Bl6/N 2	7,5
C57Bl6/N 3	7,0
C57Bl6/N 4	8,0
C57Bl6/N 5	7,25
C57Bl6/N 6	7,5
C57Bl6/N 7	7,75
C57Bl6/N 8	8,75
C57Bl6/N 9	7,25
C57Bl6/N 10	7,0
C57Bl6/N 11	8,5
C57Bl6/N 12	9,0
C57Bl6/N 13	7,3
C57Bl6/N 14	7,5

Tabelle 1: Darstellung der Image Pixel Size der mit Vaseline gefüllten Gesamtharnblasen.

## 2.5.2 Rekonstruktion der Rohdaten

Da sich die digitalisierten Projektionsdaten noch nicht zur Darstellung und Auswertung eignen, müssen diese zuerst rekonstruiert werden. Mittels NRecon<sup>®</sup> 1.6.1.2, der integrierten Rekonstruktionssoftware des Nano-Computertomographen, ist dies möglich. Die primären 16-bit TIFF-Dateien als Rohdaten, werden anhand des Feldkamp-Kegelstrahl-Algorithmus zu 8-bit Schnittbildern transformiert. Diese werden als BMP-Dateien mit isotropen Voxeln gespeichert. Nach der Rekonstruktion ist es möglich, die Datensätze mit Hilfe bestimmter Bildanalyseprogrammen in drei orthogonalen Ebenen (transversal, sagittal, coronar) darzustellen, die Schnitt für

Schnitt gesichtet werden können. Außerdem besteht die Option, die Objekte als dreidimensionale Bilder anzuzeigen. Anhand dieser Bilder erfolgt des Weiteren auch die Analyse und Auswertung.

### 2.5.3 Quantitative Bildanalyse

Zur Auswertung der im Nano-CT entstandenen Datensätze dient die Bildbearbeitungssoftware ANALYZE® 10.0 (Biomedical Imaging Resource, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA). Zur Ermittlung der Blasenwanddicke wird zusätzlich die Software CT Analyser® 1.8.1.4 (CT An, SkyScan®, Kontich, Belgien) genutzt.

#### 2.5.3.1 Quantitative Analyse der Gesamtblasen-Nano-CT-Bilder mittels ANALYZE®

Zur Analyse der Bilder wird sich des Segmentierungsprinzips bedient. Da das Kontrastmittel in den Gefäßen der Blase, die Harnblasenwand (ohne Gefäße) und die Vaseline im Inneren der Blase sehr unterschiedliche Dichte- und somit Grauwerte aufweisen, können diese drei Objekte voneinander separiert werden. Jeder Pixel des Bildes wird anhand seines Grauwertes auf der Skala 0 - 255 einer dieser drei Fraktionen zugeteilt. Dabei wird Luft als Referenz mit einem Wert von 0 angenommen. Mittels ANALYZE® wird folgend in jedem zweidimensionalen Schnittbild das Volumen der einzelnen Grauwertfraktionen ermittelt. Diese Werte aus allen Einzelschnitten werden summiert und ergeben Gesamtvolumina der definierten Objekte, die anhand der „Volume Render“-Funktion als dreidimensionale Strukturen dargestellt werden können. Auf diese Weise erhält man das

- a) Volumen des Harnblasenlumens [ $\text{mm}^3$ ]
- b) Volumen der Blasenwand (ohne Gefäße) [ $\text{mm}^3$ ]
- c) Volumen der Gefäße [ $\text{mm}^3$ ].

Aus diesen Werten können daraufhin folgende Größen ermittelt werden:

- Volumen der Gesamtharnblasenwand (  $b + c$  ) [ $\text{mm}^3$ ]
- Gesamtvolumen des Objekts (  $a + b + c$  ) [ $\text{mm}^3$ ]
- Gefäßvolumenanteil (  $\frac{c}{(b+c)}$  ), vascular volume fracture (VVF) [%]

### 2.5.3.2 Quantitative Analyse der Blasensegment-Nano-CT-Bilder mittels ANALYZE®

Auch bei der Auswertung der Segment-Nano-CT-Bilder werden die verschiedenen Dichte- bzw. Grauwerte des Kontrastmittels in den Gefäßen und des umliegenden Gewebes genutzt und danach segmentiert. Jeder Pixel des Bildes wird wieder einer Grauwertfraktion zugeteilt. Daraus ergeben sich zusammenhängende Pixelfraktionen je eines 2D-Schnittbildes. Durch deren Summation können wiederum die Gesamtvolumina ermittelt werden:

- a) Volumen der Gefäße [ $\text{mm}^3$ ]
- b) Volumen des Segments ohne Gefäße [ $\text{mm}^3$ ].

Daraus kann anschließend das

- Gesamtvolumen des Segments (  $a + b$  ) [ $\text{mm}^3$ ] und der
- Gefäßvolumenanteil (  $\frac{a}{(a+b)}$  ), vascular volume fracture (VVF) [%]

errechnet werden.

### 2.5.3.3 Quantitative Analyse der Blasensegment-Nano-CT-Bilder mittels CT-Analyser®

Zur Ermittlung der Blasenwanddicke [ $\text{mm}$ ] mittels der Bildbearbeitungssoftware CT-Analyser® werden die rekonstruierten Dateien der einzelnen Blasenwandsegmente zunächst segmentiert. Dies bedeutet, dass mit Hilfe des Thesholdings anhand der 255 Grauwertstufen (8-bit-Skala) das komplette Wandsegment als ein Objekt dargestellt und so vom Hintergrund abgegrenzt wird. Hierauf erfolgt die automatische Messung der Objektdicke in jedem einzelnen Schnitt. Aus diesen Werten wird mittels folgender Formel der Mittelwert berechnet und im Weiteren als „structure thickness“-Wert bzw. Blasenwanddicke bezeichnet:

$$St. Th = \frac{2}{(Obj. S / Obj. V)}$$

*St. Th = Structure Thickness*

*Obj. S = Object Surface*

*Obj. V = Object Volume*

## 2.6 Statistik

Die aus den Untersuchungen gewonnenen Daten werden mit Hilfe von SigmaPlot® Version 11.0 (Systat Software Inc. (SSI), San Jose, California, USA) ausgewertet. Als statistisch signifikant wird ein Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  angenommen. Sowohl die gewonnenen Daten aus den urodynamischen Untersuchungen, als auch die Daten aus den Nano-CT-Bildern werden bei fehlender Normalverteilung mittels Mann-Whitney-U-Test (U-Test) für unabhängige Stichproben ausgewertet. Der Test auf Normalverteilung erfolgte mittels Kolmogorov-Smirnov-Test (mit der Lilliefors-Berichtigung). Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgt mit Hilfe von SigmaPlot® Version 11.0 und PowerPoint (Microsoft® Office 2007, Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland).

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Auswertung der Cystomanometrie

##### 3.1.1 Ergebnisse der Cystomanometrie mit NaCl-Lösung

Es sollte untersucht werden, ob signifikante Unterschiede in der Urodynamik zwischen ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäusen mit arteriosklerotisch veränderten Gefäßen und gesunden Kontrolltieren bestehen. Dazu wurden 6 ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäuse und 10 C57Bl6/N Kontrolltiere cystomanometrisch untersucht. Zunächst erfolgte die Cystomanometrie mit NaCl-Lösung. Schon anhand der Kurvenverläufe zeigten sich deutliche Unterschiede (Abb. 9).

Nach Auswertung der Messergebnisse und nachfolgender statistischer Analyse mittels Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben zeigten sich signifikante Unterschiede den Daten beider Versuchsgruppen. In der Gruppe der ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäuse war ein signifikanter Anstieg des intravesikalen Drucks ( $P_{\max}$ ), sowie ein verkürztes Miktionsintervall (MI), verkürzte Zeitabstände zwischen Druckspitzen (Peaks) (PP), eine reduzierte funktionelle Blasenkapazität (fBK) sowie ein reduziertes Miktionsvolumen (MV) zu verzeichnen. Ein signifikanter Unterschied der Restharmenge (RV) ließ sich nicht nachweisen (Tab. 2 und Abb. 10).

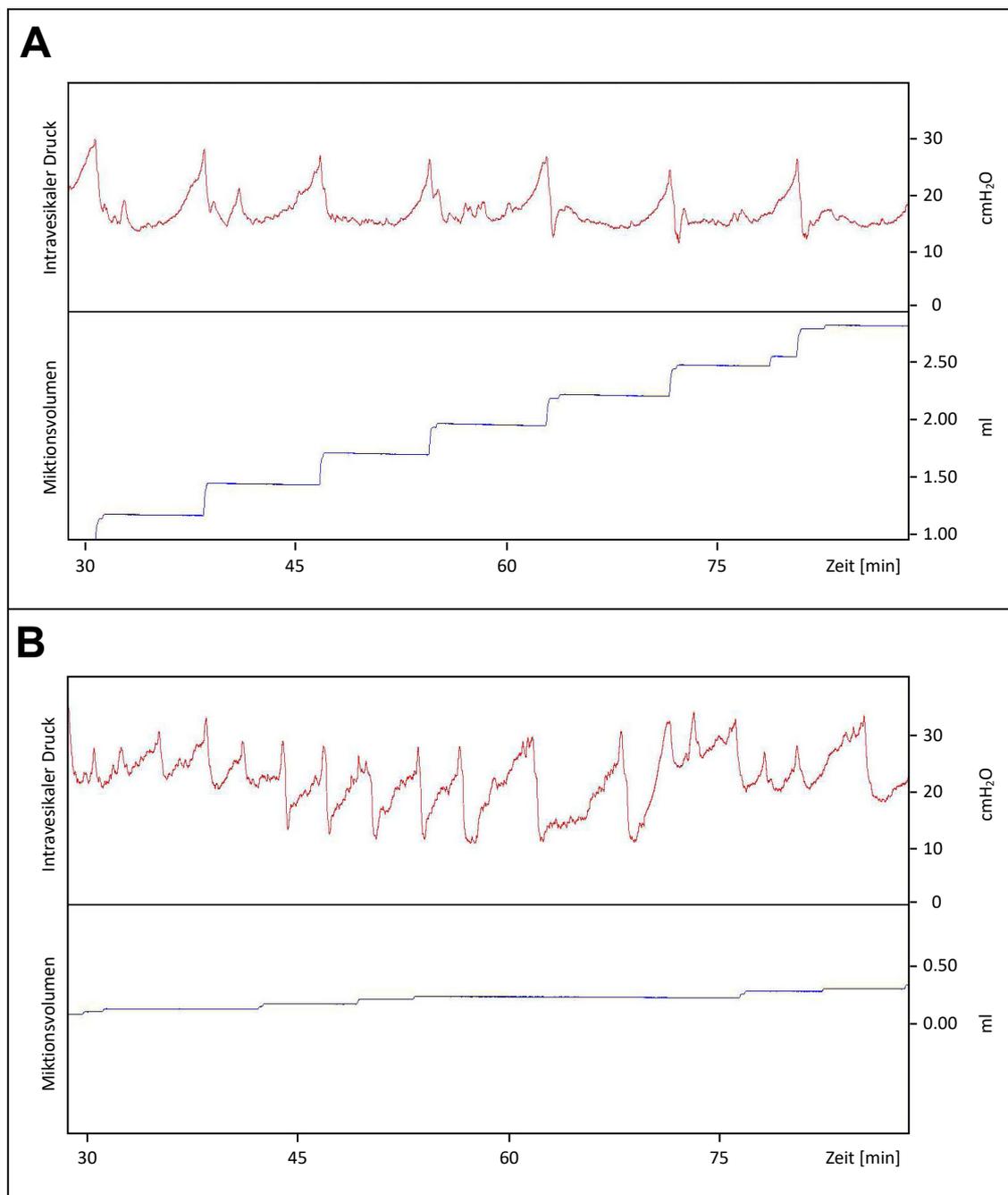


Abb. 9: Darstellung von Cystomanometrie Kurven, die rote, obere Kurve zeigt den intravesikalen Druck, die blaue, untere Kurve zeigt das Volumen des aufgefangenen Urins.

A = Kurve einer C57Bl6/N Kontrollmaus, B = Kurve einer ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Maus

	n		P <sub>max</sub> [cmH <sub>2</sub> O]	PP [sec]	MI [sec]	MV [ml]	fBK [ml]	RV [ml]
ApoE <sup>-/-</sup> LDLR <sup>-/-</sup>	6	Median	31,971	149,260	132,779	0,102	220,628	0,009
C57Bl6/N	10	Median	27,278	416,176	353,604	0,227	526,350	0,002
U-Test		p =	<b>0,045*</b>	<b>0,001*</b>	<b>0,001*</b>	<b>0,002*</b>	<b>0,001*</b>	0,115

Tabelle 2: Cystomanometrie mit NaCl-Lösung: Urodynamische Messwerte von ApoE<sup>-/-</sup>LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout- und C57Bl6/N-Mäusen.

\* = signifikant

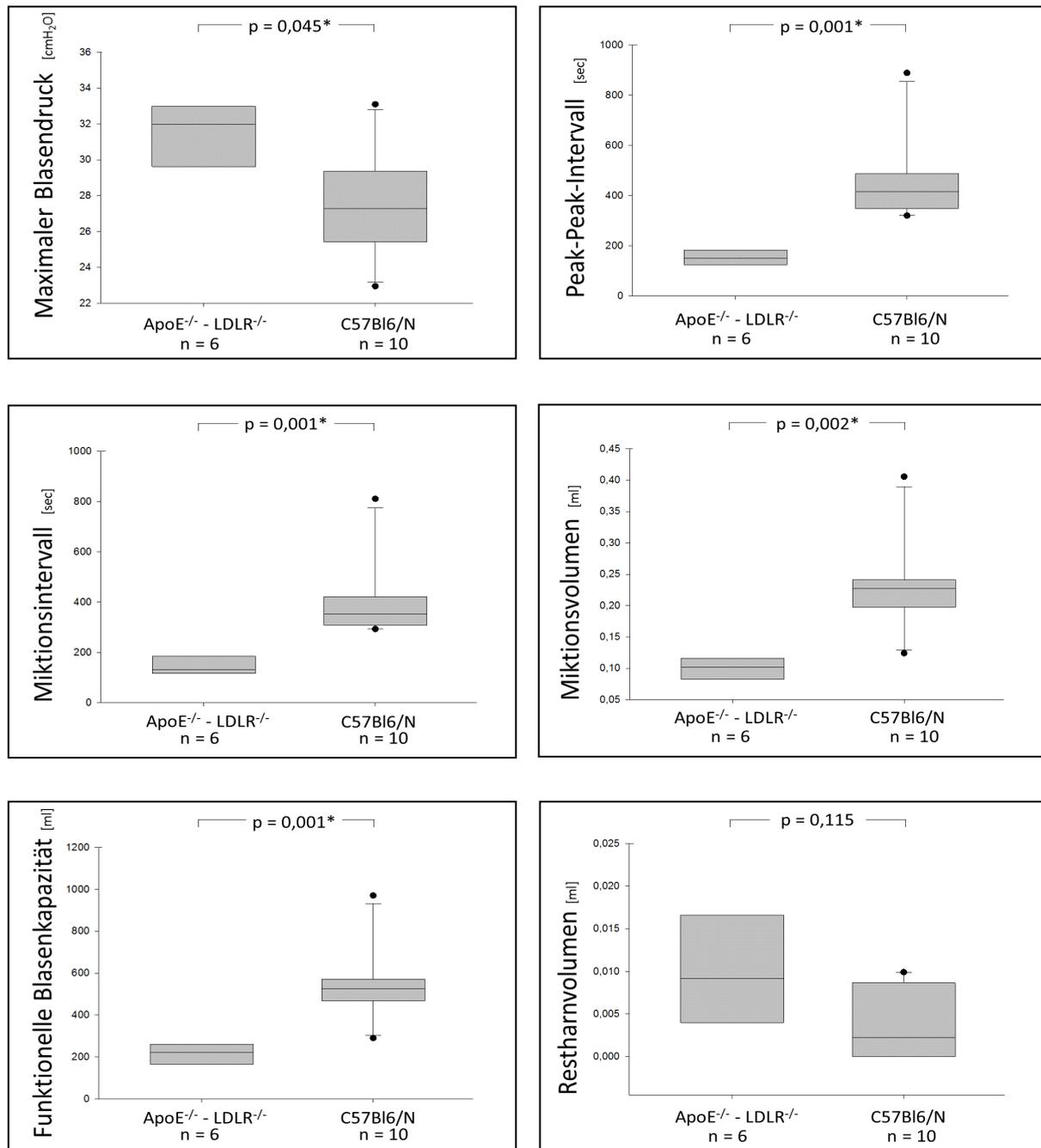


Abb. 10: Cystomanometrie mit NaCl-Lösung: Box-Plot-Darstellung der statistischen Auswertung der urodynamischen Messwerte von ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout- und C57Bl6/N-Mäusen.

### 3.1.2 Ergebnisse der Cystomanometrie mit KCl-Lösung

Im Anschluss an die Cystomanometrie mit NaCl-Lösung wird der Versuch, bei sonst identischem Versuchsaufbau, mit 0,2 molarer KCl-Lösung bei allen Tieren durchgeführt. Nach Auswertung der Messkurven werden die Daten der NaCl-Untersuchung von 6 ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäusen mit den Daten der KCl-Messung von 6 ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäusen verglichen. Dabei zeigen sich keine signifikanten Unterschiede (Tab. 3).

n				P <sub>max</sub> [cmH <sub>2</sub> O]	PP [sec]	MI [sec]	MV [ml]	fBK [ml]	RV [ml]
ApoE <sup>-/-</sup> -LDLR <sup>-/-</sup>	6	NaCl	Median	31,971	149,260	132,779	0,102	220,628	0,009
ApoE <sup>-/-</sup> -LDLR <sup>-/-</sup>	6	KCl	Median	30,629	181,290	160,427	0,100	203,191	0,010
U-Test			p =	0,310	0,132	0,310	0,818	0,699	0,937

Tabelle 3: Cystomanometrie mit NaCl-Lösung und KCl-Lösung: Gegenüberstellung der urodynamischen Messwerte der ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäuse.

Auch die Daten aus 10 NaCl-Messungen sowie aus 10 KCl-Messungen der Kontrolltiere werden gegenübergestellt und statistisch analysiert. Auch hier sind keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen (Tab. 4).

n				P <sub>max</sub> [cmH <sub>2</sub> O]	PP [sec]	MI [sec]	MV [ml]	fBK [ml]	RV [ml]
C57Bl6/N	10	NaCl	Median	27,278	416,176	353,604	0,227	526,350	0,002
C57Bl6/N	10	KCl	Median	26,800	499,217	415,408	0,210	503,980	0,000
U-Test			p =	0,623	0,121	0,140	0,910	0,970	0,211

Tabelle 4: Cystomanometrie mit NaCl-Lösung und KCl-Lösung: Gegenüberstellung der urodynamischen Messwerte der C57Bl6/N-Mäuse.

Des Weiteren werden die Daten der KCl-Untersuchung der 6 ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäuse mit den Daten der KCl-Untersuchung von 10 C57Bl6/N Kontrolltieren verglichen. Diese Analyse präsentiert äquivalente Ergebnisse zu denen der NaCl-Messungen (siehe 3.1.1 Ergebnisse der Cystomanometrie mit NaCl). Ein signifikanter Anstieg des intravesikalen Drucks ( $P_{max}$ ), sowie ein verkürztes Miktionsintervall (MI), verkürzte Zeitabstände zwischen Druckspitzen (Peaks) (PP), eine reduzierte funktionelle Blasenkapazität (fBK) sowie ein reduziertes Miktionsvolumen (MV) sind zu verzeichnen. Zusätzlich zeigt sich hier aber auch ein signifikanter Unterschied der Restharmenge (RV) mit  $p = 0,044$  (Tab. 5).

n				$P_{max}$	PP	MI	MV	fBK	RV
				[cmH <sub>2</sub> O]	[sec]	[sec]	[ml]	[ml]	[ml]
ApoE <sup>-/-</sup> LDLR <sup>-/-</sup>	6	KCl	Median	30,629	181,290	160,427	0,102	203,191	0,010
C57Bl6/N	10	KCl	Median	26,800	499,217	415,408	0,210	503,980	0,000
U-Test			p =	<b>0,015*</b>	<b>0,003*</b>	<b>0,006*</b>	<b>0,011*</b>	<b>0,006*</b>	<b>0,044*</b>

Tabelle 5: Cystomanometrie mit KCl-Lösung: Urodynamische Messwerte von ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout- und C57Bl6/N-Mäusen.

\* = signifikant.

## 3.2 Darstellung im Nano-CT

### 3.2.1 Darstellung der mit Vaseline gefüllten Harnblasen

Nach der Perfusion der Gefäße mit röntgendichtem Kontrastmittel und Präparation der Harnblasen werden die Gesamtblasen zunächst in gefülltem Zustand gescannt. Anhand der Grauwerte der verschiedenen Strukturen können diese segmentiert und quantifiziert werden. Da der Grauwert der Gelatine ähnlich dem der Blasenwand erscheint, war hier eine Segmentierung beider Strukturen nicht möglich. Das Blasenlumen kann somit nicht von der Blasenwand abgegrenzt werden. Deshalb fließen in die statistische Analyse der gefüllten Blasen nur jene mit ein, die mit Vaseline gefüllt wurden, da Vaseline und Blasenwand gut differenzierbare Grauwerte besitzen (Abb. 12 und Abb. 13). Es werden die Daten der Nano-CT-Bilder von 5 Harnblasen der

ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäuse mit den Daten der Nano-CT-Bilder von 14 Blasen der C57Bl6/N Kontrolltiere verglichen (Tab. 6 und Abb. 11). Eine signifikante Abnahme des Blasenwandvolumens (ohne Gefäße) ist zu verzeichnen.

			Blasenwand		Blasenwand-		VVF [%]	Gesamt- volumen [mm <sup>3</sup> ]
n		Blasen- lumen [mm <sup>3</sup> ]	-volumen (ohne Gefäße) [mm <sup>3</sup> ]	Gefäß- volumen [mm <sup>3</sup> ]	volumen + Gefäß- volumen [mm <sup>3</sup> ]			
ApoE <sup>-/-</sup> LDLR <sup>-/-</sup>	5	Median	72,850	14,872	4,179	20,318	0,0967	86,218
C57Bl6/N	14	Median	93,976	45,185	4,019	48,935	0,0805	142,429
U-Test		p =	0,287	<b>0,047*</b>	0,963	0,071	0,179	0,127

Tabelle 6: Nano-CT-Bilder der mit Vaseline gefüllten Gesamtblasen: Messwerte von ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout- und C57Bl6/N-Mäusen.

\* = signifikant

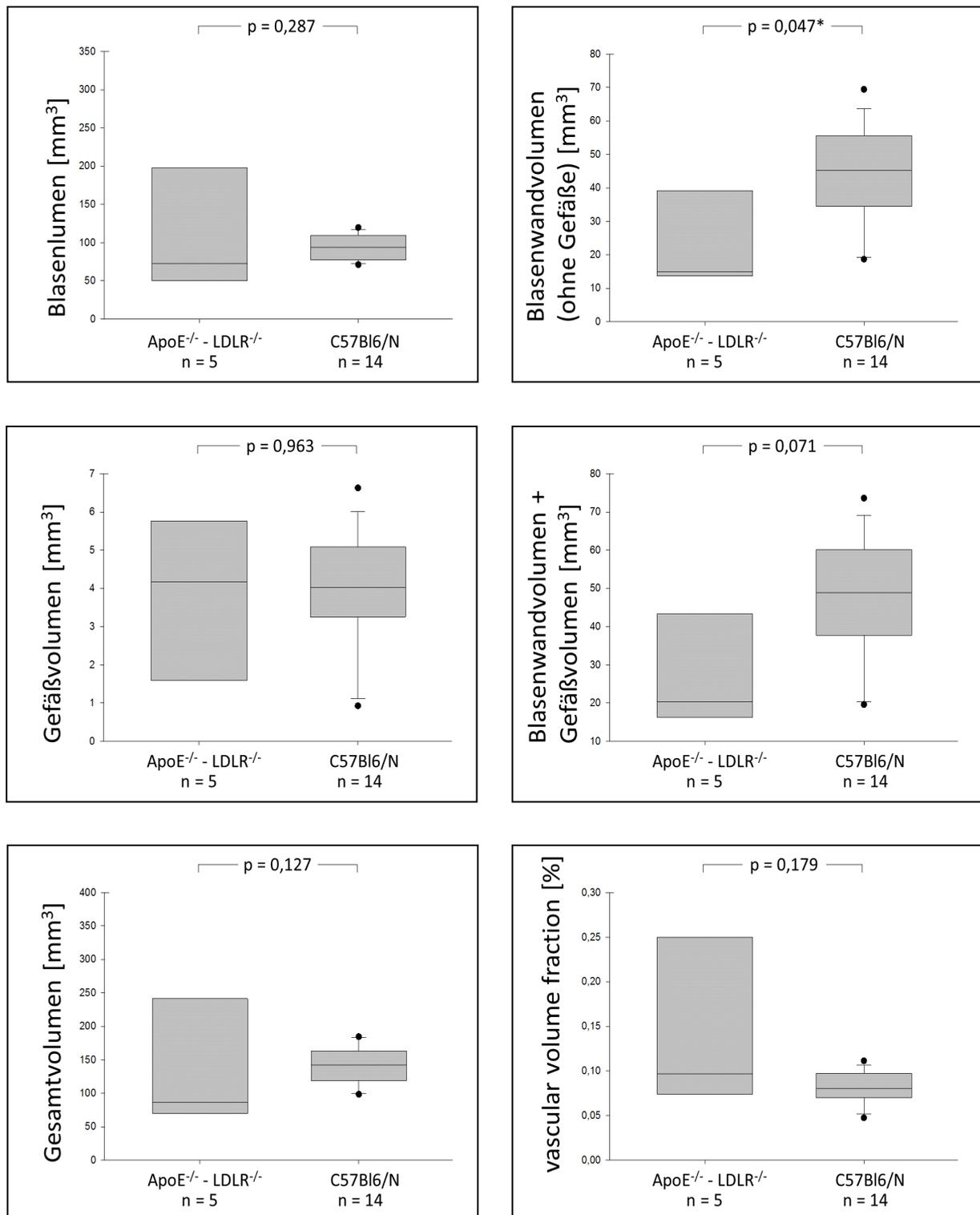


Abb. 11: Box-Plot-Darstellung der statistischen Auswertung der Nano-CT-Bilder der mit Vaseline gefüllten Gesamtblasen.

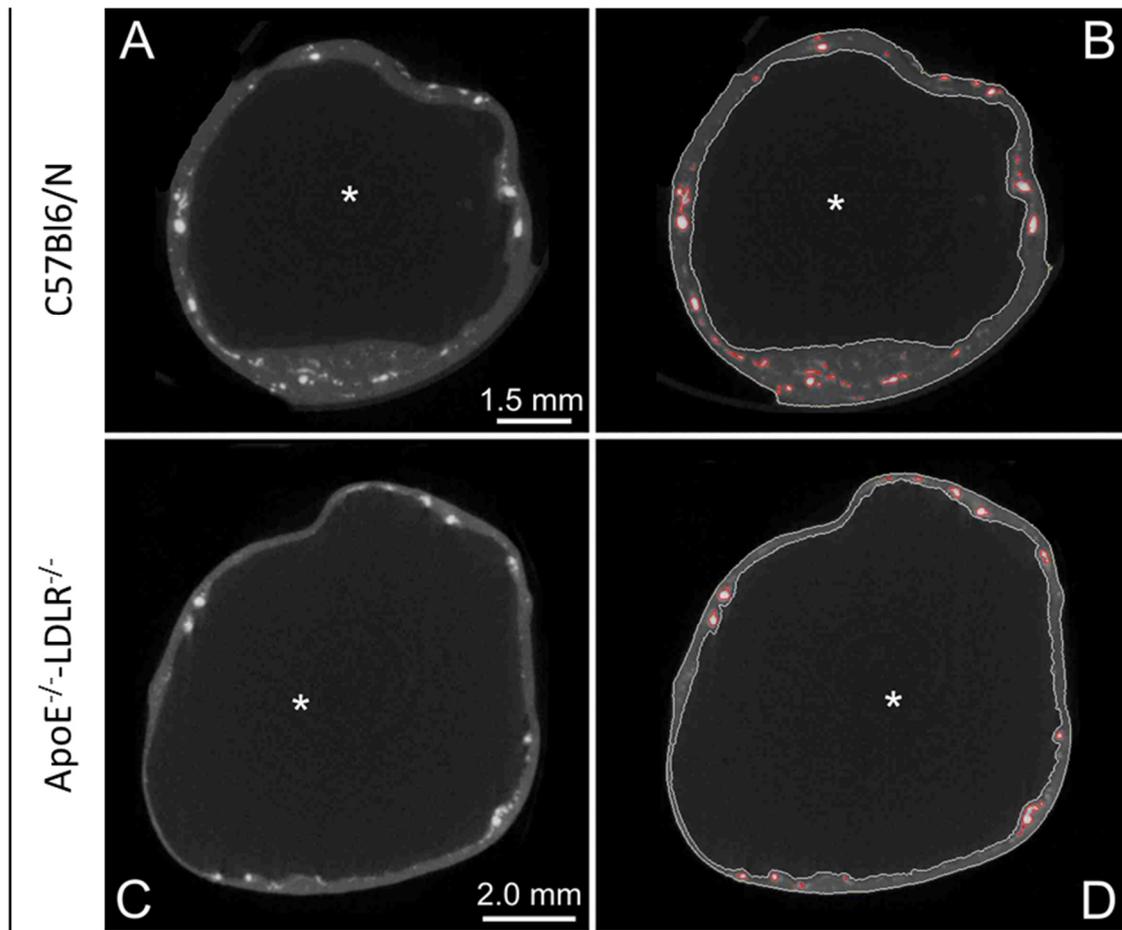


Abb. 12: Darstellung mittels ANALYZE<sup>®</sup>: Blase eines Kontrolltieres (A = nativ, B = Segmentierung) und Blase eines ApoE<sup>-/-</sup>LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Tieres (C = nativ, B = Segmentierung) im Querschnitt.

\* = mit Vaseline gefülltes Blasenlumen

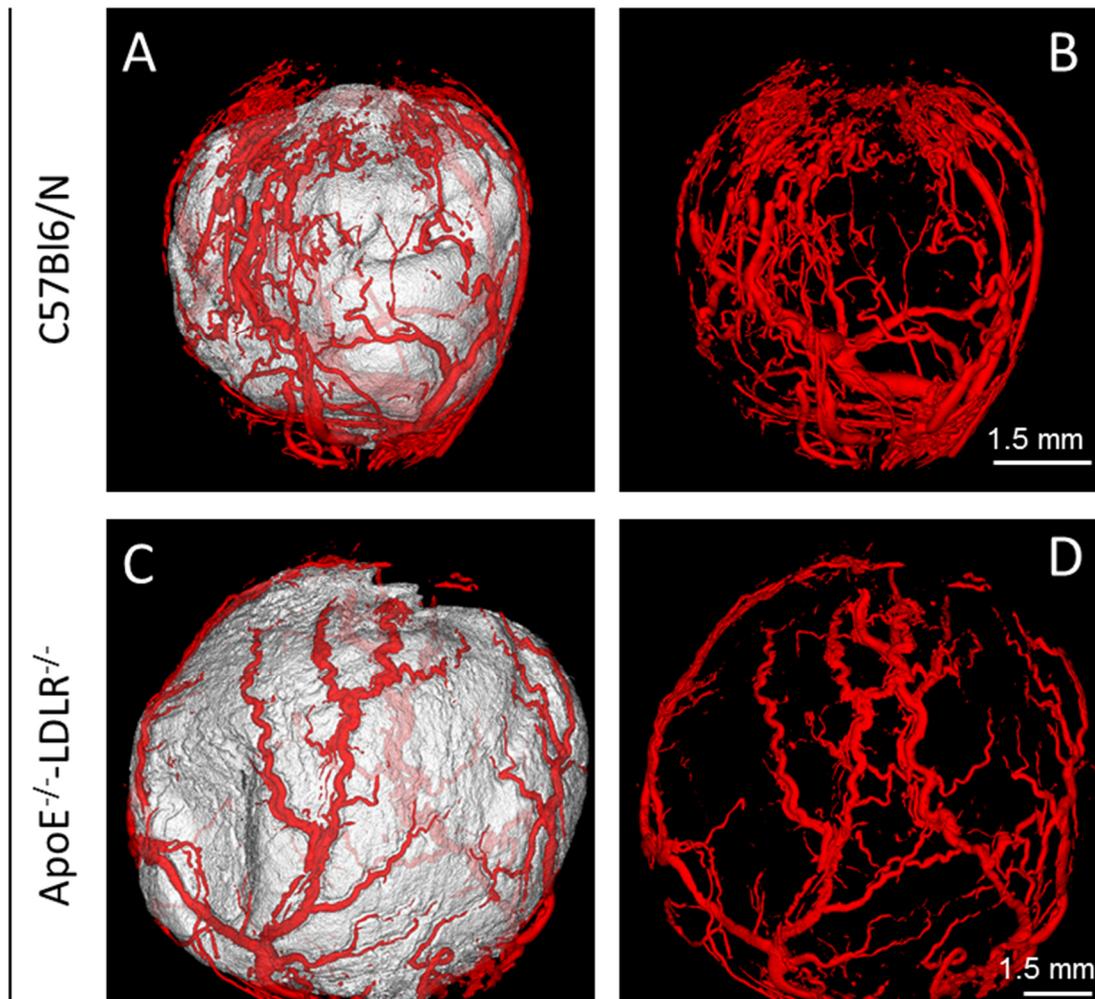


Abb. 13: Darstellung mittels ANALYZE<sup>®</sup>: Blase eines Kontrolltieres (A = Gefäße und Blasenlumen (Vaseline), B = Gefäße) und einer ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Maus (C = Gefäße und Blasenlumen (Vaseline), D = Gefäße) im Vergleich. Die kontrastmittelgefüllten Gefäße stellen sich rot dar, das mit Vaseline gefüllte Blasenlumen weiß.

### 3.2.2 Darstellung der Segmente der Harnblase

Um genauere Aussagen über Gefäßversorgung und -veränderungen sowie Blasenwandvolumen treffen zu können und um die Blasenwanddicke zu bestimmen, werden die Harnblasen zerteilt und die einzelnen Segmente im Nano-CT gescannt. Durch die kleinere Objektgröße verbessert sich die Auflösung des Bildes und erhöht so die Aussagekraft der erhobenen Daten. Zudem fließen auch die Daten der zuvor mit Gelatine gefüllten Harnblasen in die Berechnungen mit ein, da nach Zerteilung der Blasen die Art der Blasenfüllung irrelevant ist. Es werden 48 Blasensegmente der

ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäuse und 56 Blasensegmente der C57Bl6/N Kontrolltiere gescannt (Abb. 15 und Abb. 16). Die Blasendach- als auch die Blasenbodensegmente werden nicht untersucht, um eine Reduktion von Artefakten, die durch die Katheterimplantation bzw. durch die Urethraligatur bedingt sind, zu erzielen. Nach der Datenakquise der CT-Bilder erfolgt die statistische Analyse mittels Mann-Whitney-U-Tests für unabhängige Stichproben. Es zeigen sich signifikante Unterschiede beider Gruppen. Die Blasensegmente der ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäuse weisen eine signifikante Reduktion des Gefäßvolumens, Segmentvolumens (ohne Gefäße), des Gesamtsegmentvolumens (mit Gefäßen), der Relation von Gefäßvolumen zu Blasenwandvolumen (‘vascular volume fraction’ (VVF)) und auch der Blasenwanddicke auf (Tab. 7 und Abb. 14).

	n		Segment- volumen (ohne Gefäße) [mm <sup>3</sup> ]	Gefäß- volumen [mm <sup>3</sup> ]	Segment- volumen (mit Gefäßen) [mm <sup>3</sup> ]	VVF [%]	Blasenwand- dicke [mm]
ApoE <sup>-/-</sup> -LDLR <sup>-/-</sup>	48	Median	4,212	0,255	4,530	5,580	0,133
C57Bl6/N	56	Median	6,190	0,605	6,606	7,980	0,188
U-Test		p =	<b>&lt;0,001*</b>	<b>&lt;0,001*</b>	<b>&lt;0,001*</b>	<b>0,011*</b>	<b>0,001*</b>

Tabelle 7: Nano-CT-Bilder der Harnblasensegmente: Messwerte von ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout- und C57Bl6/N-Mäusen.

\* = signifikant

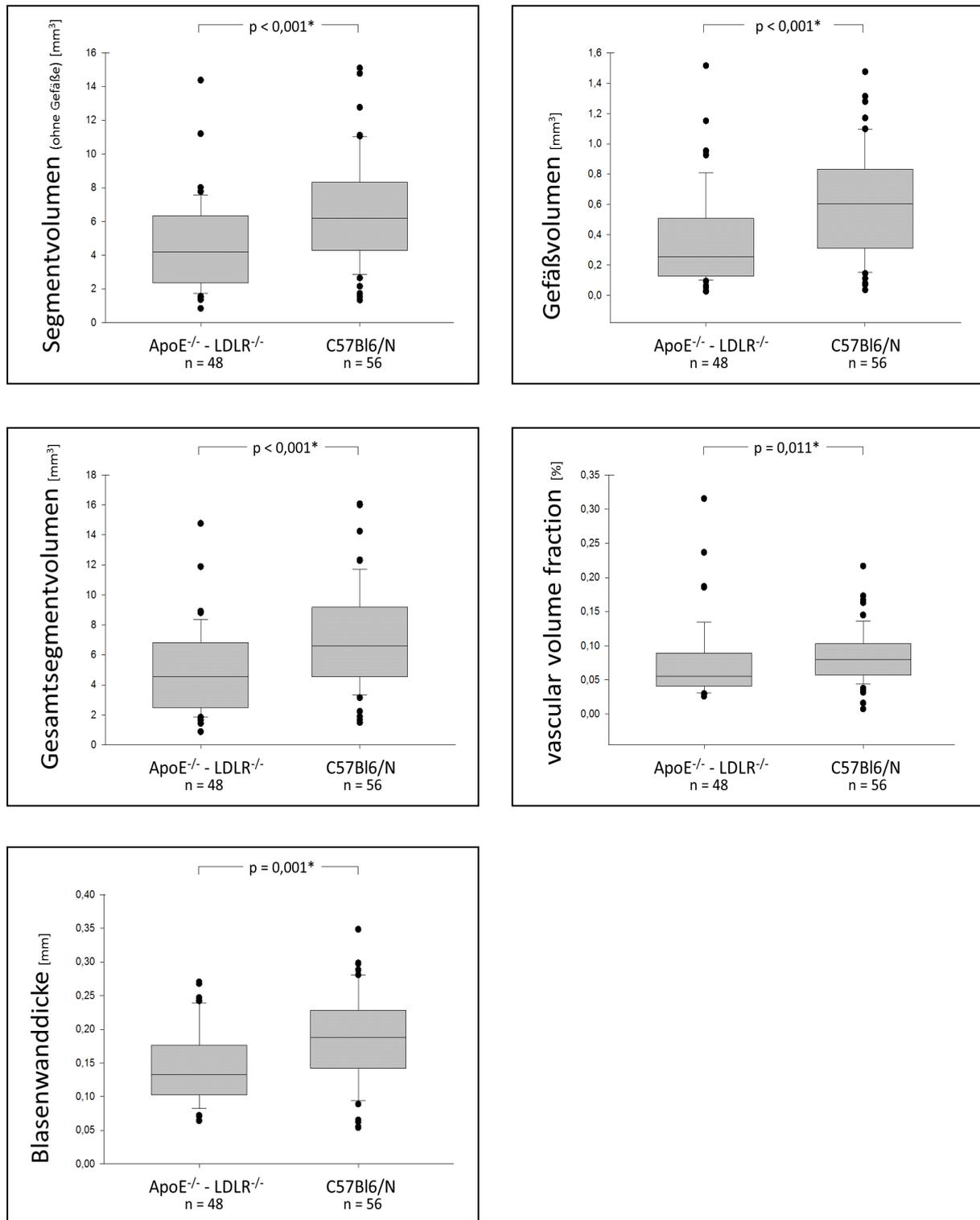


Abb. 14: Box-Plot-Darstellung der statistischen Auswertung der Nano-CT-Bilder der Blasensegmente.

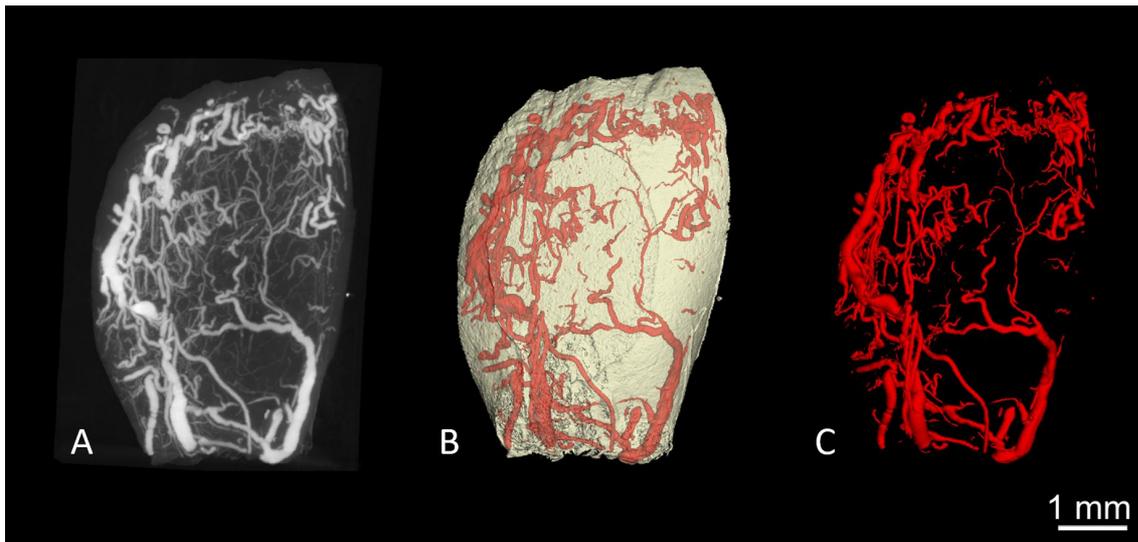


Abb. 15: Darstellung mittels ANALYZE®: Segment einer Kontrollmaus, A = MIP (Maximumintensitätsprojektion), B = Blasenwand und Gefäße, C = Gefäße.

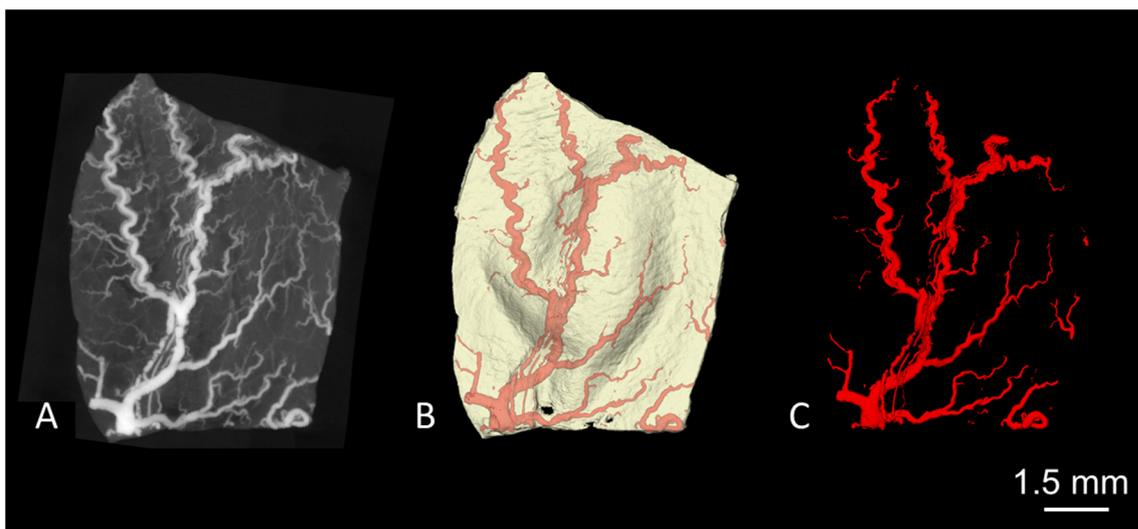


Abb. 16: Darstellung mittels ANALYZE®: Segment einer ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Maus, A = MIP (Maximumintensitätsprojektion), B = Blasenwand+Gefäße, C = Gefäße.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Tiermodell

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen möglichen Zusammenhang zwischen systemischer Arteriosklerose und Blasendysfunktionen bzw. der überaktiven Blase zu ermitteln. Versuche am Menschen sind zur Ermittlung der Häufigkeit der Detrusorhyperaktivität mittels Cystomanometrie bei gesunden Probanden im Vergleich zu Probanden mit systemischer Arteriosklerose prinzipiell denkbar. Die Probandenrekrutierung und Versuchsdurchführung ist dabei sehr aufwendig. Zudem ist die Interpretation der Ergebnisse schwierig, da die Versuchsgruppen durch unterschiedliche Lebensweisen inhomogen sind und eine eindeutige Quantifizierung der Arteriosklerose nicht möglich ist. Darüber hinaus ist eine Präparation und weitere Untersuchung der Harnblasen ex vivo ethisch nicht vertretbar, deshalb werden hierzu Tiermodelle eingesetzt. Bislang gibt es verschiedene Ansätze, um im Tierversuch an Ratten oder Kaninchen eine Minderperfusion und somit Hypoxie der Harnblase zu induzieren. Um ein neues Tiermodell zu etablieren, bedienen wir uns 60 Wochen alter, weiblicher und genetisch veränderter Mäuse, die durch ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Rezeptor - Defizienz eine progrediente systemische Arteriosklerose entwickeln. Wegen ihrer Körpergröße, der raschen Vermehrung, der unproblematischen Pflege und Haltung sowie der vergleichsweise einfachen Möglichkeit der Genveränderung eignen sich Mäuse sehr gut als Versuchstiere [63]. Die Gefäßveränderungen der Knockout-Mäuse spiegeln die alters- und risikofaktorabhängigen Prozesse beim Menschen äquivalent wieder [85, 118]. Als Unterschied ist jedoch zu nennen, dass die ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäuse keine zerebralen Läsionen ausbilden [88]. D. h. als Ursache der überaktiven Blase kann ein zentrales Geschehen, im Sinne einer gestörten zentralen Inhibition der Miktion, ausgeschlossen werden. Wir untersuchten den Effekt einer *progredienten* Hypoxie auf die Blasenfunktion und Blasenmorphologie. Das Alter der Tiere wählten wir mit 60 Wochen als guten Kompromiss zwischen maximaler Ausbildung arteriosklerotischer Läsionen und Überleben der Tiere. Wir beschränkten uns zusätzlich auf die Untersuchung weiblicher Tiere, um funktionelle Blasenveränderungen durch subvesikale Obstruktion seitens der Prostata männlicher Tiere auszuschließen. Interessanterweise bevorzugten sehr viele Versuchsgruppen männliche Versuchstiere. Azadzoj et al. [12-14] untersuchten männliche Kaninchen,

Matsui et al. [108], Goi et al. [54], Yokoi et al. [180], Saito et al. [149] und auch Nomiya et al. [121] führten Tests zu Blasenminderperfusion an männlichen Ratten durch. Erste Versuche, eine vesikale Minderperfusion zu induzieren, wurden mittels Ligatur der A. iliaca oder A. vesicalis realisiert. Gill et al. vollzogen 1988 einen uni- bzw. bilateralen, vollständigen Verschluss der Aa. vesicales an Kaninchen, was v. a. im Rahmen der beidseitigen Ligatur der Gefäße zu *plötzlicher* Organischämie führte [53]. Nach ein bzw. zwei Wochen konnten sowohl erhebliche funktionelle, als auch morphologische Veränderungen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der in vivo Cystomanometrie am anästhesierten Tier zeigten je nach Ligatur und Hypoxie-Intervall eine Reduktion der Blasenkapazität und der Blasencompliance. Während der Füllungsphase wurden zudem häufige spontane Kontraktionen detektiert. Eine deutliche Reduktion der in vitro Muskelkontraktilität konnte durch Untersuchungen der Blasenmuskulatur im Muskelbad bei allen Versuchsgruppen nachgewiesen werden. Histologische Begutachtungen der Blasenwand zeigten im Lichtmikroskop Inflammation, Muskeldegeneration und Nekrose, v. a. auf der Seite der Blase, an der die Ligatur gesetzt wurde [53]. Yokoi et al. [180] sowie Saito et al. [149] arbeiteten mit Ratten und ligierten deren A. iliaca interna ein- bzw. beidseits vollständig. Die Tiere wurden einer 7- bzw. 14- tägigen vesikalen Ischämie ausgesetzt. Daraufhin wurde eine in vivo Cystomanometrie in Narkose durchgeführt, die hier einen Anstieg der Blasenkapazität, eine Reduktion des maximalen Blasendrucks sowie einen Anstieg des Restharnvolumens zeigte. In vitro Versuche mit Stimulation durch Bethanechol, ATP und KCl legten eine verminderte Blasenmuskelkontraktilität dar [149, 180]. Saito et al. führten zudem histologische Untersuchungen durch, die Blasenmuskeldegeneration und ein Ödem der Submukosa sowie der Muskulatur aufwiesen [149]. Eine andere Methode wurde von Azadzoj et al. etabliert [14] und von weiteren Forschungsgruppen um Sagawa [148] und Nomiya [121] aufgegriffen. Mit Hilfe eines transluminalen Ballonkatheters wurde das Endothel der A. iliaca uni- oder bilateral durch Zurückziehen verletzt. Aufgrund dieser artifiziellen Endothelverletzung kommt es im Verlauf zu diffuser Arteriosklerose der A. iliaca communis und interna sowie der A. pudenda. Zusätzlich erhielten manche Versuchstiere eine cholesterinreiche Nahrung, die die Entstehung der Gefäßstenose noch beschleunigte [14]. Nomiya et al. führten acht Wochen nach Ballon-Deendothelialisierung cystomanometrische Untersuchungen am wachen Tier durch. V. a. in Kombination mit cholesterinreicher Nahrung konnten deutliche Zeichen einer Detrusorhyperaktivität detektiert werden [121]. Sagawa et al. analysierten in vitro einzelne Blasenmuskelstreifen von Ratten, die vorher durch Ballon-Deendothelialisierung der A. iliaca eine ausgeprägte Ischämie distal der

Stenose entwickelten. Hierbei wurde wiederum eine deutliche Abnahme der Kontraktionskraft der Muskulatur der ischämischen Blasen detektiert [148].

Neuere Studien bedienten sich, entsprechend unseren Versuchen, genveränderten Tieren, um den progredienten Krankheitsprozess beim Menschen möglichst ähnlich darzustellen. Spontan hypertensive Ratten werden hierbei als nützliches Tiermodell in der Erforschung der Pathogenese von Blasendysfunktionen angesehen [158]. Sie entwickeln einen fortschreitenden Bluthochdruck [84, 124], welcher als Risikofaktor für Strömungsveränderungen des Blutflusses sowie für Arteriosklerose identifiziert wurde [141]. Es konnte gezeigt werden, dass diese Tiere, im Vergleich zu normotensiven Kontrolltieren, funktionelle Blasenveränderungen im Sinne einer Detrusorhyperaktivität ausbilden [70, 155].

Auch Myocardial Infarction-Prone Watanabe Heritable Hyperlipidemic (WHHLMI) Kaninchen wurden als Versuchstiere herangezogen, um die Pathogenese von Blasendysfunktionen zu erforschen [181]. Diese Kaninchen stellen ein weit verbreitetes Tiermodell für Hyperlipidämie, Gefäßveränderungen sowie Organischämie und damit verbundene Erkrankungen dar. Trotz normaler Nahrung konnten deutlich ausgeprägte arteriosklerotische Läsionen und Arteriosklerose der Aorta, welche ab einem Alter von vier Monaten auftrat, festgestellt werden. Diese Läsionen nahmen mit zunehmendem Alter signifikant zu [153, 175]. Yoshida et al. konnten darlegen, dass diese Tiere zum einen arteriosklerotische Stenosen der Iliakalgefäße aufweisen und zum anderen funktionell-überaktive wie auch histologische Veränderungen der Harnblasen zeigen [181]. Im Unterschied zu unseren Versuchstieren, konnte beim Tiermodell der WHHLMI Kaninchen arteriosklerotische Läsionen zerebral detektiert werden, die eine zentrale Beteiligung der festgestellten Blasenüberaktivität nicht ausschließen. Ito et al. beobachteten, dass 96% der untersuchten WHHL Kaninchen cerebrovaskuläre Läsionen aufwiesen [76]. Betroffen waren die A. vertebralis sinistra und dextra, die A. basilaris, die A. cerebri anterior, A. cerebri posterior und A. cerebri media, sowie die A. inferior anterior cerebelli und A. inferior posterior cerebelli. Zusätzlich wurden arteriosklerotische Läsionen in kleinen Arterien mit Verbindung zum Circulus arteriosus cerebri, zu beiden Aa. vertebrales, zur A. basilaris und in oberflächlichen Ästen mit Bezug zum Kleinhirn, Pons und Medulla oblongata gefunden. Jedoch waren keine penetrierenden intrazerebralen Arterien betroffen [76].

70 Wochen alte, männliche Apolipoprotein E Knockout Mäuse (APOEKO) kamen in Studien von Shenfeld et al. zum Einsatz [152]. Ähnlich wie die von uns genutzten Tiere entwickeln diese im Laufe ihres Lebens massive Gefäßstenosen infolge einer fortschreitenden Arteriosklerose [63]. Hier wurden jedoch keine funktionellen in vivo Versuche vorgenommen. Stattdessen wurde nach Entnahme der Harnblasen in vitro

---

Versuche zur Bestimmung der Kontraktionskraft an Streifen der glatten Blasenmuskulatur durchgeführt. Erstaunlicherweise zeigte sich hierbei kein signifikanter Unterschied der Detrusorfunktion verglichen mit gleichaltrigen Kontrolltieren. Als mögliche Begründung diene hier die langsam fortschreitenden arteriosklerotischen Veränderungen, im Gegensatz zu operativ induzierter, lokaler Arteriosklerose [152].

Im Vergleich zu allen bisher durchgeführten Tiermodellen zur Realisierung einer vesikalen Minderperfusion bzw. vesikalen Hypoxie und zur Erforschung eines Zusammenhangs dieser Minderperfusion mit einer Detrusorhyperaktivität stellt unser Tiermodell ein Novum dar. Es kamen zum einen nur weibliche Tiere zum Einsatz, um mögliche Einflüsse der Prostata im Sinne einer subvesikalen Obstruktion zu unterbinden. Zum anderen bedienten wir uns genetisch veränderter Mäuse, die eine progrediente systemische Arteriosklerose ausbilden, welche nicht nur auf die Beckenorgane beschränkt ist. Hier bestehen große Ähnlichkeiten zu menschlichen Gefäßveränderungen [89]. Durch Fehlen zerebraler arteriosklerotischer Läsionen kann eine Detrusorhyperaktivität durch zentral-neurogene Ursachen, wie der Verlust der zentralen Inhibition des Miktionsreflexes, weitgehend ausgeschlossen werden [88]. Ein weiterer positiver Aspekt unseres Tiermodells ist die Entwicklung der arteriosklerotischen Läsionen ohne zusätzliche Operation. Jede weitere Operation und jede weitere Narkose stellt ein erneutes Risiko für Komplikationen wie den Tod der Tiere und unvorhersehbare Einflussgrößen dar. Die funktionellen Untersuchungen wurden in vivo ohne Sedierung durchgeführt, um Effekte durch Narkotika möglichst gering zu halten und aussagekräftige, realistische Ergebnisse zu erhalten.

Als Limitation unseres Tiermodells ist die im Alter von 60 Wochen stark ausgeprägte Arteriosklerose zu nennen. Diese ist möglicherweise im Vergleich zur durchschnittlichen Manifestation arteriosklerotischer Läsionen beim Menschen erheblich weiter fortgeschritten. Nichtsdestotrotz hilft dieses Tiermodell Aufschluss zu geben über den Zusammenhang zwischen Gefäßlumen-Einengung und Auswirkungen auf Blasenfunktionalität sowie Morphologie. Ein weiterer Punkt stellt die Mitbeteiligung peripherer Nerven dar. Es bleibt unklar, in wieweit diese durch Minderperfusion und hypoxische Zustände mitbetroffen sind und Einfluss auf die Funktion der Blase nehmen.

## 4.2 Interpretation der Ergebnisse der Cystomanometrie

### 4.2.1 Cystomanometrie

Beim Menschen entspricht die überaktive Blase einem Krankheitsbild, dessen Diagnose allein symptomatisch durch gezielte Anamnese und ergänzende Fragebögen gestellt werden kann [2]. Laut Digesu et al. korreliert die Diagnose der überaktiven Blase jedoch nicht mit dem Vorhandensein einer Detrusorhyperaktivität und es wird eine Kombination aus Anamnese, d. h. Symptomatik, sowie Urodynamik empfohlen [40]. Dies ist im Tiermodell nicht möglich. Hier können bedeutende Aussagen lediglich über objektive Messungen oder Beobachtungen gemacht werden. Deshalb bedient man sich im Tierversuch neben in vitro Untersuchungen der Blasenmuskulatur [148, 152, 181] oder Verhaltensbeobachtungen [54, 121], der Cystomanometrie. Dies hat sich als gut realisierbare Methode in der in vivo Untersuchung von Blasendysfunktionen etabliert [168]. Dabei ist indes anzumerken, dass die Cystomanometrie eine *Detrusorhyperaktivität* als urodynamische Diagnose detektiert und nicht die *überaktive Blase* an sich [4].

Verschiedene Arten der in vivo Versuchsdurchführung kamen bisher zum Einsatz. Bedacht werden sollte dabei jedoch, dass verschiedene Einflussgrößen, wie Alter der Tiere, Anästhetika, Füllungsrate oder die Art der Kathetereinlage, einen Effekt auf die Messergebnisse haben [7, 104]. Floyd et al. führten 1976 cystomanometrische Messungen an Katzen durch und nutzten dabei transurethral eingelegte Katheter [47]. Da transurethral liegende Katheter, im Sinne einer Blasenauslassobstruktion, zu erhöhten Miktionsdrücken führen [104], zeigen jüngste Studien einen Trend zur Katheterimplantation in den Blasendom. Über diesen Katheter kann die Blase artifiziell gefüllt werden bei gleichzeitiger Messung des intravesikalen Drucks. Hierbei bleibt die Urethra unberührt, was den Tieren ermöglicht, via naturalis die Blase zu entleeren [10, 54, 70, 108, 121, 181].

Viele Versuchsgruppen führen die Cystomanometrie am analgosedierten Tier durch, um technische Schwierigkeiten, die durch wache und aktive Tiere hervorgerufen werden, zu umgehen [13, 14, 70, 181]. Wie wenige andere Forschungsgruppen [54, 121] entschieden wir uns gegen eine Sedierung und führten die urodynamischen Messungen am wachen, frei beweglichen Tier durch. Dadurch ergeben sich aber einige Herausforderungen bezüglich der Versuchsumsetzung. Anfangs verlängert sich die Dauer der Untersuchung, weil abgewartet werden muss bis die Maus im Versuchskäfig zur Ruhe gekommen ist und es zu regelmäßigen Miktionen kommt. Zusätzlich muss das Verhalten der Maus während der gesamten Messung sehr genau

beobachtet und dokumentiert werden. Zum einen müssen intravesikale Druckanstiege durch echte Miktionen von Druckanstiegen anderer Genese wie z. B. Defäkationen unterschieden werden, da sich abdominale Druckanstiege auch positiv auf den intravesikalen Druck auswirken. Zum anderen muss verhindert werden, dass die sehr aktiven Tiere am Katheter, der dorsal am Nacken ausgeleitet wurde, manipulieren. Diese Einflüsse durch wache Versuchstiere erschweren zwar die Versuchsdurchführung, verhindern aber den nicht unerheblichen Einfluß von Medikamenten wie Anästhetika auf die Messparameter. Diese Effekte zeigen verschiedene Studien sowohl an Tieren als auch beim Menschen [25, 42, 52, 103, 106, 116, 163]. Unter Anästhesie mit z. B. Ketamin / Xylazin oder Urethan konnten Cannon et al. z. B. während Untersuchungen an weiblichen Ratten eine signifikant verminderte Blasenkapazität im Vergleich zu wachen Tieren feststellen [25]. Ghoniem et al. führten Blasenfunktionsmessungen an Rhesusaffen durch und konnten zeigen, dass Fluran eine 40%-ige Verminderung des maximalen Detrusordruckes verursachte. Dagegen schien Ketamin wenig Einfluß auf den maximalen Detrusordruck zu haben [52].

#### 4.2.2 Cystomanometrie mit NaCl-Lösung

Nach Auswertung der cystomanometrischen Messergebnisse konnten wir einen signifikanten Unterschied beider Versuchsgruppen nachweisen. Die ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäuse weisen deutliche Hinweise einer Detrusorhyperaktivität der Blase auf. Dies zeigte sich zum einen anhand eines verkürzten Miktionsintervalls sowie der Reduktion des Miktionsvolumens. Das bedeutet, es kommt schon bei einer geringeren Blasenfüllung zur Miktion, was als Drangsymptomatik interpretiert werden kann. Zusätzlich kam es bei unseren Knockout-Mäusen zu einem verkürzten Peak-Peak-Intervall, das den Zeitabstand zwischen eindeutigen Detrusoraktivitäten angibt. Dabei konnte nicht jedem Peak, d. h. nicht jeder Detrusoraktivität, eine entsprechende Miktion zugeordnet werden. Zu verstehen ist dies als Blasenkontraktionen während der Füllungsphase, die dennoch zu keinem kontrollierten oder unkontrollierten Urinverlust führten. Dieser Aspekt passt ebenso zu einer Hyperaktivität des Detrusors. Zudem zeigte sich eine reduzierte funktionelle Blasenkapazität, was auf ein erniedrigtes mögliches Füllungsvolumen schließen lässt. Wir konnten des Weiteren einen signifikant erhöhten intravesikalen Druck detektieren. Während unserer Messungen ließ sich jedoch keine Veränderung der Restharmenge nachweisen. Dies spricht dafür, dass es sowohl 60 Wochen alten nativen Mäusen als auch den ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäusen möglich ist, die Blase komplett und effektiv zu entleeren,

wobei die ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäuse allerdings einen erhöhten Druck aufwenden.

Die urodynamischen Ergebnisse der aktuellen Studie bzgl. Miktionsvolumen, Miktionsfrequenz und Miktionsintervall stimmen mit Arbeiten einiger anderer Forschungsgruppen überein. Es wurden ähnliche Versuche durchgeführt, um den Effekt einer Minderperfusion auf die Blasenfunktion zu untersuchen. Goi et al., die cystomanometrische Tests sowie Beobachtungen des Miktionsverhaltens über drei Tage an 16 Wochen alten, wachen Ratten vornahmen, an denen zuvor eine Ballon-Deendothelialisierung der Iliakalgefäße vorgenommen wurde, konnten gleichermaßen eine Erhöhung der Miktionsfrequenz und sowohl eine Reduktion des Miktionsintervalls als auch des Miktionsvolumens nachweisen. Die tägliche Urinmenge blieb hingegen konstant [54]. Die Untersuchungen von Nomiya et al. zeigten sehr ähnliche Ergebnisse. Auch hier wurde acht Wochen nach Ballon-Deendothelialisierung der Iliakalgefäße das Miktionsverhalten von 18 Wochen alten, männlichen, wachen Ratten im Käfig beobachtet und zusätzlich Blasendruckmessungen vorgenommen. Die operierten Tiere erhielten darüber hinaus eine cholesterinreiche Nahrung. Im Vergleich zu Sham-operierten Tieren, die auch die cholesterinreiche Nahrung bekamen und gesunden Kontrolltieren konnte die Miktionsfrequenz erhöht, das Miktionsintervall sowie das Miktionsvolumen erniedrigt gemessen werden [121]. Matsui et al. führten an wachen, 15 Wochen alten, männlichen Ratten acht Wochen nach Ballon-Deendothelialisierung der Iliakalgefäße cystomanometrische Untersuchungen über einen am Blasendom eingebrachten Katheter durch, die eine Abnahme des Miktionsintervalls zeigten [108]. Azadzo et al. beschrieben eine Erhöhung der Miktionsfrequenz nach Beobachtung wacher, männlicher Kaninchen, 12 Wochen nach artifiziell hervorgerufener pelviner Minderperfusion durch Ballon-Deendothelialisierung der Iliakalgefäße. Zudem konnte die Zahl spontaner Blasenkontraktionen während cystomanometrischer Untersuchungen am narkotisierten Tier erhöht gemessen werden [10]. Inoue et al. bedienten sich spontan hypertensiver männlicher Ratten im Alter von 18 Wochen, die im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren eine Verminderung des vesikalen Blutflusses aufwiesen. Der Blutfluss wurde durch die Hydrogen Clearance Methode festgestellt. Durch Beobachtung des Miktionsverhaltens konnten eine erhöhte Miktionsfrequenz, ein erniedrigtes Miktionsvolumen und eine im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren erniedrigte Tagesgesamturinproduktion ermittelt werden. Per Cystomanometrie am narkotisierten Tier wurde die Abnahme des Miktionsvolumens abermals bestätigt [70]. Männliche WHHLMI Kaninchen im Alter von 20-24 Monaten kamen bei Versuchen von Yoshida et al. zum Einsatz. Mittels Cystomanometrie am anästhesierten Tier konnte eine Reduktion des Miktionsintervalls, des

Miktionsvolumens und eine Erhöhung der Miktionsfrequenz detektiert werden [181]. Insgesamt kann man sagen, dass unabhängig von der Art der Blasenhypoxie-Induktion und auch unabhängig von der Art der Tiere und der Versuchsdurchführung, die minderperfundierte Blase überaktiv, im Sinne einer Detrusorhyperaktivität, reagiert.

Die in der vorliegenden Arbeit reduziert gemessene funktionelle Blasenkapazität zeigt an, dass es den hypoperfundierten Harnblasen nicht mehr möglich ist, so viel Urin zu speichern wie Harnblasen entsprechender gesunder Tiere. Die Blase wird früher, also bei weniger Füllungsvolumen, entleert. Insgesamt wird nur wenig über Veränderungen der funktionellen Blasenkapazität berichtet. Saito et al. [149] sowie Yokoi et al. [180], die durch Ligatur der Iliakalgefäße eine pelvine Minderperfusion hervorriefen, beschreiben bei bilateralem Verschluss der Gefäße einen Anstieg der Blasenkapazität. Der Unterschied zu unseren Ergebnissen könnte zum einen durch die abrupte Art der Hypoxie-Induktion, im Sinne einer plötzlichen, kompletten Unterbindung der Blutzufuhr, als auch durch die Durchführung der Cystomanometrie in Narkose erklärt werden.

Hinsichtlich der Frage nach dem vesikalen Druck ergeben sich diskrepante Ergebnisse in der Literatur. Unsere Studie konnte einen geringen, aber dennoch signifikant erhöhten maximalen Blasendruck während cystomanometrischer Untersuchung der ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäuse zeigen. Einen im Vergleich zu gesunden Tieren zwar nicht signifikant jedoch leicht erhöhten intravesikalen Druck konnten Nomiya et al. feststellen nach urodynamischen Messungen an wachen Ratten [121]. In Arbeiten von Goi et al., Inoue et al. oder Matsui et al. konnte keine Veränderung des vesikalen Drucks detektiert werden [54, 70, 108]. Im Gegensatz dazu ermittelten Yoshida et al. einen signifikant erniedrigten vesikalen Druck während der Durchführung der Cystomanometrie an narkotisierten WHHLMI Kaninchen [181]. Da die Versuche hier unter Pentobarbital Narkose vorgenommen wurden und die Kontraktilität des Detrusors dadurch nachweislich beeinflusst wird [7], könnte dies eine Erklärung für die uneinheitlichen Resultate sein. In älteren Arbeiten von Yokoi et al. 1996 [180], Saito et al. 1998 [149] und Ishida et al. 1999 [75] wurde ebenso eine Erniedrigung des maximal gemessenen Blasendruckes angegeben. Alle drei Arbeitsgruppen führten jedoch Ligaturen der Iliakalgefäße durch, die zu einer *plötzlichen*, bei bilateralem Verschluss auch kompletten Ischämie des Organs führten. Dieser extreme Eingriff hat natürlich erhebliche Funktionseinbußen seitens der Blasenmuskulatur zur Folge, was einen erniedrigten vesikalen Druck während der Miktion verständlich macht. Azadzoï et al., die in ihren Arbeiten eine Blasenischämie mittels Ballon-Deendothelialisierung beschreiben, unterscheiden anhand Blutflussmessungen zwischen schwerer und moderater Organischämie [13]. Bei Tieren mit moderater Ischämie konnte entsprechend unserer Ergebnisse ebenso ein erhöhter vesikaler Druck gemessen

werden. Schwere ischämische Zustände führten wiederum zu einem Druckabfall, was mit den oben schon erwähnten Arbeiten von Yokoi et al., Saito et al. und Ishida et al. vergleichbar erscheint, und mit völligem Funktionsverlust des Detrusors erklärt werden kann.

Vergleichsweise wenige Arbeitsgruppen befassten sich mit der Frage nach Restharn. Inoue et al. konnten zeigen, dass es zu keinen signifikanten Veränderungen des Restharns kommt. Hier wurden Blasenfunktionstests in Narkose an 12 Wochen alten, männlichen, spontan hypertensiven Ratten durchgeführt [70]. Auch in der Arbeit von Saito et al. konnte kein signifikant veränderter Restharn während ihrer Tests an männlichen Ratten nachgewiesen werden [149]. Nomiya et al. gaben ferner an, dass das Restharnvolumen ihrer Versuche insgesamt zu gering gewesen sei, um gemessen werden zu können, woraus man schließen kann, dass es auch dort nicht zu einer relevanten Restharnentstehung kam [121]. Diese Ergebnisse decken sich mit unseren Beobachtungen, dass es allen Tieren trotz hypoperfundierter Blase durchaus möglich ist, diese komplett zu entleeren. Es erscheint denkbar, dass durch ischämiebedingte Veränderungen der Blasenmuskulatur, wie z. B. glattmuskuläre Degeneration oder fibrotische Umbauten, die Effektivität des Detrusors während der Miktion nur durch einen erhöhten vesikalen Druck aufrechterhalten werden kann.

In einer Arbeit von Azadzi et al. wird beschrieben, wie während der Cystomanometrie simultan der vesikale Blutfluss gemessen wurde. Festgestellt wurde ein Abfall des Blutflusses während der Füllungsphase [16], der auch von anderen Forschungsgruppen ermittelt worden ist [121]. Durch eine erhöhte Miktionsfrequenz und dadurch vermehrte Phasen des erniedrigten Blutflusses wird die bestehende Blasenischämie noch zusätzlich verstärkt. Diese wiederkehren Zyklen der Ischämie mit nachfolgender Reperfusion führen zu oxidativem Stress und zytotoxischen Produkten, die ihrerseits wiederum in strukturellen Defekten und neuronaler Dysfunktion resultieren [16].

Letztendlich ist die genaue Pathogenese der Detrusorhyperaktivität bisher nicht sicher geklärt. Jedoch werden verschiedene Ansätze diskutiert, die Hinweise auf die Entstehung der Detrusorhyperaktivität geben. Eine adäquate Blutversorgung ist essentiell, um das komplexe Zusammenspiel von Rezeptoren, Transmittern, Nerven und Blasenmuskulatur sowie dem Urothel zu gewährleisten. Eine durch z. B. fortschreitende Arteriosklerose bedingte Minderperfusion des Gewebes hat verschiedenste Regulationsvorgänge zur Folge als Versuch, der Ischämie entgegenzuwirken. In der Literatur gibt es einige Studien die zeigen, dass in überaktiven Blasen ein Anstieg des NGF zu verzeichnen ist [10, 101, 159]. Eine Erklärung hierfür könnte z. B. ein Verlust von Vasa nervorum sein, der durch

Neurodegeneration und Schädigung von Myelinscheiden aufgrund unzureichender Sauerstoff- sowie Nährstoffzufuhr entsteht. Der Anstieg des NGF dient somit als Schutzmechanismus. Ein weiterer Mechanismus, bedingt durch zunehmende Denervierung, ist eine erhöhte Anzahl der „gap junctions“ zwischen einzelnen glatten Muskelfasern der Blasenmuskulatur. Normalerweise sind die Muskelzellen nur durch wenige „gap junctions“ miteinander verbunden, es besteht jedoch eine sehr dichte Innervation. In der Folge resultiert eine Zunahme der „gap junctions“ in einer gesteigerten Exzitabilität des Detrusors, da der interzelluläre, elektrische und chemische Austausch zwischen den Zellen verstärkt wird [28, 58]. Drake et al. konnten zudem eine signifikant höhere Rate an lokalen „Micromotions“ der Blasenmuskulatur bei Frauen mit Harndrangsymptomatik nachweisen, die mittels Cystomanometrie nicht detektierbar waren. Diese lokalen Kontraktionen des Detrusors führen zu einer Stimulation von afferenten Nervenfasern des Miktionsreflexes, was in der Folge zu verfrühtem Harndrang führt [43]. Muskarinische Rezeptoren auf Zellen des M. detrusor vesicae spielen die entscheidende Rolle in der Auslösung des Miktionsreflexes. Eine weitere Erklärung für die Pathogenese der Detrusorhyperaktivität ist eine Hypersensitivität dieser Rezeptoren [6, 154, 160], wodurch diese „sensibler“ reagieren und eine Detrusorhyperaktivität resultieren kann. Der progrediente ischämische Zustand hat auch Auswirkungen auf das Urothel als metabolisch wirksame Struktur der Harnblase. Man geht davon aus, dass die Hypoxie zu einer vermehrten Expression von Rezeptoren und Ausschüttung von Transmittern führt, was wiederum Auswirkungen auf die Exzitabilität der Blase hat [38].

Nach unserem Wissen ist dies die erste Studie, die anhand eines in vivo Mausmodells den kausalen Zusammenhang zwischen Hyperlipoproteinämie mit Ausbildung systemischer Arteriosklerose und non-neuronaler Detrusorhyperaktivität darlegt.

### **4.2.3 Cystomanometrie mit KCl-Lösung**

Um weitere Aussagen über die Blase und deren Funktion zu machen, kann die Cystomanometrie auch beim Menschen im Rahmen der Diagnostik, statt mit Kochsalzlösung, zusätzlich auch mit weiteren Substanzen durchgeführt werden. Dabei bedient man sich unter anderem verdünnter KCl-Lösung um Urothelschädigungen nachzuweisen [128]. Im Normalfall stellt das Urothel eine Barriere zwischen Urin und den darin enthaltenen Substanzen sowie dem darunterliegenden Gewebe dar. Neben der physikalischen Barriere aus Zellmembranen und Tight Junctions spielt die Glycosaminynglykan-Schicht (GAG-Schicht) als osmotisches Hindernis eine

entscheidende Rolle in der Barrierefunktion des Urothels [96, 133]. Diese dem Blasenlumen zugewandte Schleimschicht besteht aus anionischen Mucopolysacchariden, die aufgrund ihrer Hydrophilie Wassermoleküle binden. Dies unterbindet eine ungehinderte Passage geladener und ungeladener Teilchen und die erschwerte Anhaftung von Pathogenen an das Urothel [129, 130]. Normalerweise liegt im Urin eine deutlich höhere Kaliumkonzentration vor als im Interstitium oder dem Blutplasma. Besteht eine Schädigung der GAG-Schicht, wird das Urothel permeabel und Kalium sowie andere im Urin enthaltenen Substanzen können in das Suburothel vordringen. Dort werden zum einen Nervenendigungen gereizt, was zu einer unwillkürlichen Aktivierung des Miktionsreflexbogens führt. Zum anderen kann es auch zu einer direkten Depolarisation mit nachfolgender Kontraktion glatter Muskelzellen des Detrusors kommen. Hieraus resultiert eine Überaktivität des Detrusors und in gewisser Hinsicht ein Verlust der Blasenkontrolle [8, 65, 131, 132], was sich klinisch in einer Harndrangsymptomatik äußern kann [64]. Der KCl-Test stellt somit einen Test für die Funktionsfähigkeit des Urothels dar.

Parsons et al. führten cystomanometrische Untersuchungen u. a. an gesunden Probanden durch [131]. Den Versuchspersonen wurde über einen Blasenkatheter zunächst Natrium-, dann Kalium-Lösung instilliert, wodurch jedoch keine Symptome wie Harndrang oder Schmerzen ausgelöst wurden. Mittels Protamin-Sulfat-Lösung erfolgte eine Schädigung der Blaseschleimhaut bzw. der GAG-Schicht, woraufhin die erneute Instillation von Natrium- bzw. Kalium-Lösung durchgeführt wurde. Reaktionen im Sinne einer Detrusorhyperaktivität wurden durch Kalium-Lösung ausgelöst, nicht jedoch durch Natrium-Lösung. Heparin Spülung der Blase hob die Wirkung des Protamin-Sulfats auf, die Funktion der GAG-Schicht wurde wiederhergestellt, was in einer deutlichen Abnahme der Symptomstärke resultierte. Dieser Versuch zeigt deutlich, dass ein geschädigtes Urothel eine erhöhte Permeabilität für z. B. Kalium Moleküle aufweist, wodurch Symptome einer Detrusorhyperaktivität ausgelöst werden können [131]. Hohlbrugger et al. postulierten, dass die Folge einer reduzierten vesikalen Blutversorgung eine Akkumulation von interstitiellem Kalium sei, da es zu einem verringerten „washout“ bzw. Abtransport des Kalium komme [64]. Dieser Mechanismus führe demnach zu einer zusätzlichen Erhöhung der interstitiellen Kaliumkonzentration.

Vor Versuchsbeginn ergab sich die Überlegung, dass bei möglichen nicht signifikanten Unterschieden der Cystomanometrie mit NaCl beider Versuchsgruppen ggf. der KCl-Test weitere Aufschlüsse über Veränderungen der Blase geben kann. Denkbar war ein durch Hypoxie hervorgerufener Urothelschaden, der in der Folge über z. B. Kaliumstrom ins Interstitium zu reaktiver Überaktivität der Blasenmuskulatur führt.

Direkt im Anschluss an die Cystomanometrie mit Kochsalzlösung führten wir diese mit 0,2 molarer KCl-Lösung bei gleichem Versuchsaufbau durch. Dabei zeigte sich weder in der Gruppe der ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäuse noch in der Gruppe der Kontrolltiere ein signifikanter Unterschied der Ergebnisse im Vergleich zu der vorangehenden Messung mit reiner Kochsalzlösung. Dabei kann es natürlich sein, dass sich eine zusätzliche, durch KCl ausgelöste Detrusorhyperaktivität hinter der in der Cystomanometrie mit NaCl schon nachgewiesenen Detrusorhyperaktivität „versteckt“. Ein wichtiger Aspekt wäre hier die subjektive, vesikale Empfindung der Tiere während der Untersuchung. Es ist denkbar, dass die Mäuse während des KCl-Testes durchaus eine andere sensible Empfindung verspüren, die jedoch nicht zwangsläufig zu einer Veränderung des Verhaltens im Käfig oder Veränderung des Miktionsverhaltens führen muss. Bei Versuchen an Menschen können derart feine subjektive Unterschiede zusätzlich zu den objektiven Messdaten der Cystomanometrie erhoben werden, was bei der Auswertung und Interpretation der Daten weitere, wichtige Informationen birgt.

Darüber hinaus ist noch zu erwähnen, dass die Gegenüberstellung der Messdaten der ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäuse und der Kontrolltiere, die im Verlauf des KCl-Tests erhoben wurden, das gleiche Ergebnis hervorbrachte, wie der Vergleich der Daten der Cystomanometrie beider Gruppen mit NaCl. Dieses Resultat bestärkt unsere These, dass eine vesikale Ischämie zu funktionellen Blasenveränderungen führt. Als einziger Unterschied konnte hier jedoch gezeigt werden, dass es in der Gruppe der ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäuse zu einem signifikant höherem Restharnvolumen gekommen ist. Eine passende Erklärung, warum sich die Messdaten hier nur bezüglich dieses Parameters unterscheiden, können wir nicht geben. Vielleicht induziert das KCl in der Blase doch Veränderungen, die anhand unserer Messmethode nicht weiter spezifizierbar sind, die es aber den Mäusen schwieriger macht, die Blase bei der Miktion komplett zu entleeren.

Es scheint also, dass die progrediente Ischämie unserer Versuchstiere nicht zu einer, zumindest mittels Cystomanometrie, erfassbaren Schädigung des Urothels geführt hat. Veränderungen des Urothels bzw. der GAG-Schicht können anhand unserer Untersuchungen zwar nicht sicher ausgeschlossen werden, aber zumindest geben diese Hinweise darauf, dass es zu keinem massiven Defekt der Blasenschleimhaut der ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäuse gekommen sein kann. Wir gehen demnach davon aus, dass ein geschädigtes und somit durchlässiges Urothel als Grund für die Detrusorhyperaktivität der ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäuse unwahrscheinlich ist.

### 4.3 Interpretation der Ergebnisse der Nano-CT Bilder

#### 4.3.1 Nano-CT

Um Aussagen über Gefäßversorgung oder Morphologie der Blase zu machen, wurden bisher verschiedenste Methoden verwendet. Der Blutfluss wurde in vivo per Laser Doppler-Flowmetrie gemessen [15, 149] oder konnte mittels „pencil lens charge-coupled device“ Mikroskopiersystem zur Bestimmung der Mikrozirkulation ermittelt werden [113, 179]. Eine Arbeitsgruppe nutzte zur Bestimmung des vesikalen Blutflusses die Hydrogen Clearance Methode [70] und in der Arbeit von Goi et al. wird ein Verfahren mittels Omegazone Laser Speckle Bildwandler beschrieben, um den Blutfluss als hochaufgelöstes 2-dimensionales farbiges Bild darzustellen [54]. Auch histologische sowie immunhistochemische Analysen wurden vorgenommen, um Veränderungen an Gefäßen oder der Blase zu detektieren [13, 16, 54, 119, 181]. Computertomographische Untersuchungen wurden indessen bisher nicht durchgeführt. Die Nano-CT, als innovative Technologie, die erst in den letzten Jahren konzipiert wurde, stellt eine Möglichkeit der nicht-destruktiven Abbildung von Objekten mit einer Auflösung im Submikrometerbereich dar. Der erste Nano-Computertomograph wurde 2005 von der belgischen Firma SkyScan auf den Markt gebracht. Seither wurden die Geräte vor allem in der biomedizinischen Forschung [5, 87, 92, 162] aber auch in der Materialwissenschaft [31] genutzt. Bislang konnten z. B. die Niere [87, 173] aber v. a. auch Gefäße und deren Veränderungen in verschiedenen Stromgebieten erfolgreich mittels Nano-CT dargestellt werden [77, 162]. Untersuchungen an Hohlorganen wie der Blase wurden hingegen noch nicht verwirklicht. Unsere Studie ist demnach die erste, die sich der Technik des Nano-CTs bedient, um Aussagen über die Morphologie einer hypoperfundierten Harnblase zu machen. Darüber hinaus ist unsere Studie die erste, die zeigen konnte, dass es möglich ist, Hohlorgane im Nano-CT zu scannen und auswertbare Bilder zu generieren.

Um die Gefäßversorgung von Organen optimal abzubilden und diese im Anschluss zu quantifizieren, wird vor dem Scan die Applikation eines Kontrastmittels nötig. Ohne Kontrastierung würden Gefäße, eingebettet in umliegendes Gewebe, homogen und schlecht abgrenzbar erscheinen. Suspensionen aus Bariumsulfat und Gelatine (z. B. Baritop®) oder ein Kontrastmittelpolymer aus Silikon und Chromat (z. B. Microfil®) können eingesetzt werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass Microfil®, im Gegensatz zu bariumsulfathaltigen Mitteln, weit mehr und v. a. kleine Gefäße mit einem Durchmesser von  $< 20 \mu\text{m}$  perfundieren und dadurch kontrastverstärkt abbilden kann [91, 107]. D. h. mit Hilfe des intravasal aushärtenden Kontrastmittelpolymers aus

Silicon und Chromat zusätzlich kombiniert mit adäquaten Computertomographen, können insgesamt sehr detaillierte Aussagen zur Gefäßversorgung gemacht werden. Dieses Verfahren wurde bisher an verschiedensten Organen angewandt. Als erste Arbeitsgruppe machten wir uns diese jüngste Technologie zunutze und scannten Harnblasen der ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäuse und entsprechender Kontrolltiere, um die Gefäßversorgung darzustellen, sowie Analysen bezüglich der Blasenwand durchzuführen.

Die Präparation und das Scannen von Hohlorganen bedürfen im Vergleich zu anderen Organen auch anderer Vorbereitung. Um eine bestmögliche Darstellung der Hohlorgane zu erreichen ist eine Füllung von Vorteil, um ein Zusammenfallen oder Aneinanderlegen der Innenwände zu verhindern. Wir entschieden uns zunächst für die Füllung der Blase mit Gelatine. Erst nach den ersten Scans zeigte sich, dass die Gelatine auf den Bildern aufgrund sehr ähnlicher Dichtewerte nicht eindeutig von der Blasenwand abzugrenzen war. Deshalb wurden die verbliebenen Blasen mit Vaseline gefüllt, was sich als gut umsetzbare Methode herausstellte und auf den Nano-CT Bildern zu klar auswertbaren Ergebnissen führte.

### 4.3.2 Ganze Blasen

Bei der Auswertung der Parameter der ganzen Harnblasen der ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäuse wurden nur die mit Vaseline gefüllten Organe eingeschlossen. Hier zeigte sich im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren eine signifikante Abnahme des Blasenwandvolumens ohne Gefäße. Die statistische Auswertung der anderen erhobenen Parameter wie Gefäßvolumen, Blasenwandvolumen mit Gefäßen, Relation von Gefäßvolumen zu Blasenwandvolumen („vascular volume fraction“ (VVF)) sowie Gesamtvolumen der Harnblasen konnte keine signifikanten Unterschiede beider Gruppen nachweisen. Die Interpretation dieses Ergebnisses stellt sich als schwierig dar, weil nur ein Parameter signifikante Veränderungen zeigt.

Da sich erst nach Füllung der ersten Harnblasen mittels Gelatine herausstellte, dass diese wegen sehr ähnlicher Dichtewerte schlecht von der Harnblasenwand abgegrenzt werden konnte, gingen in die Auswertung nur 5 mit Vaseline gefüllte Blasen der ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäuse ein, was die statistische „Power“ hier deutlich mindert. Jedoch alle 14 Blasen der Kontrolltiere konnten mit Vaseline gefüllt werden und wurden den 5 Blasen der Knockout-Mäuse gegenübergestellt. Dieses Missverhältnis der Gruppengröße könnte ein möglicher Erklärungsansatz für das unerwartete Ergebnis sein. Durch die Kathetereinlage am Blasendom sowie die Ligatur am Blasenboden entstehen zudem Artefakte, die die Auswertung der Messergebnisse

zusätzlich erschweren. Darüber hinaus ist zu erwähnen, dass die ermittelte Blasengröße nicht mehr der Originalgröße entspricht, da die Tabaksbeutelnaht zur Fixierung des Katheters nicht immer exakt an der gleichen Stelle gesetzt werden konnte und dadurch auch unterschiedlich viel Blasenwand destruiert wurde. Aufgrund dieser zahlreichen Limitationen und der verbesserten Auflösung bei kleinerer Objektgröße wurden die Gesamtblasen im Anschluss an die erste computertomographische Untersuchung in Segmente zerteilt. Diese wurden daraufhin einzeln im Nano-CT gescannt.

Die Untersuchungen der Gesamtblase liefern bildgebend jedoch einen guten Überblick über die Gefäßversorgung der Blasen der ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäuse sowie der gesunden Kontrolltiere. Eine Gefäßrarefizierung lässt sich anhand der Bilder durchaus erahnen, wenn auch nicht eindeutig statistisch verifizieren.

### 4.3.3 Segmente

Die Analyse der Harnblasensegmente ergab eindeutige Ergebnisse und zeigte signifikante Unterschiede zwischen ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäusen und den entsprechenden Kontrolltieren. Im Gegensatz zur oben beschriebenen Auswertung der Gesamtblasen fiel die Gruppengröße der ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäuse deutlich höher aus, da die Blasensegmente der zuvor mit Gelatine gefüllten Blasen in die Auswertung eingeschlossen werden konnten, da hier die Art der Füllung keine Rolle mehr spielt. Nicht mit berücksichtigt wurden jedoch die Segmente des Blasendaches und des Blasenbodens, da an dieser Stelle durch Ligatur und Kathetereinlage das Gewebe destruiert wurde. Infolgedessen wäre das Ergebnis der Auswertung ungünstig beeinflusst worden. Ein weiterer Vorteil der Analyse der Blasensegmente ist die deutlich kleinere Objektgröße, die ein Bild mit höherer Auflösung möglich macht. Auf diese Weise kann eine noch präzisere Darstellung der Gefäßversorgung erzielt werden, welche die Ergebnisse der Auswertung noch genauer bzw. reliabler macht.

Nach statistischer Begutachtung der Messdaten zeigte sich bei den ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäusen eine signifikante Reduktion aller erhobenen Parameter, was Gefäßvolumen, Segmentvolumen (ohne Gefäße), Gesamtsegmentvolumen, Relation von Gefäßvolumen zu Blasenwandvolumen (‘vascular volume fraction‘ (VVF)) als auch Blasenwanddicke einschließt. Dieses Ergebnis legt dar, dass sich eine progrediente Arteriosklerose nicht nur auf die Funktionalität sondern auch auf die Morphologie der Harnblase auswirkt. Es kommt folglich zu einer Verdünnung der Blasenwanddicke mit gleichzeitig relativer Abnahme des Gefäßvolumens. Eine Reduktion des

Blasenwandvolumens könnte prinzipiell nur durch eine Reduktion des Gefäßvolumens, bedingt durch arteriosklerotische Läsionen, erklärt werden. Hier zeigt sich aber zudem eine Verminderung des Blasenwandvolumens ohne Gefäße, d.h. es besteht eine Volumenreduktion über die Gefäßvolumenreduktion hinaus. Diese atrophischen Effekte können dabei nicht dem fortgeschrittenen Alter der Tiere [30, 98, 105, 174] zugeschrieben werden, da unsere Kontrolltiere diesbezüglich den Knockout-Mäusen entsprachen.

Andere Arbeitsgruppen beschäftigten sich ebenso mit der Frage nach sowohl strukturellen als auch vaskulären Veränderungen von Organen, die einer Hypoxie, z. B. ausgelöst durch Arteriosklerose, ausgesetzt wurden [23, 48, 87, 126, 138]. Langheinrich et al. konnten beispielsweise mittels Micro-CT am Tiermodell für systemische Arteriosklerose ein reduziertes Hodenvolumen sowie eine Abnahme der vascular volume fraction bei 80 Wochen alten ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäusen im Vergleich zu gesunden, gleichaltrigen Kontrolltieren zeigen [90]. Auch die computertomographische Untersuchung der Nieren von 80 Wochen alten ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäusen ergab eine deutlich reduzierte vascular volume fraction [87]. Diese Studien konnten unter Einsatz von histologischen Verfahren zudem ausgeprägte arteriosklerotische Plaques als auch eine perivaskuläre Inflammation zeigen. Da uns ebenso die ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Maus als Versuchstier diente und wir mittels Nano-CT eine Reduktion der vascular volume fraction ermitteln konnten, gehen wir davon aus, dass auch in der Blasenwand ähnliche Veränderungen zu finden sind, die für das signifikant verminderte Gefäßvolumen verantwortlich gemacht werden können. Nomiya et al. zeigten anhand histologischer Untersuchungen, dass es bei Ratten nach Ballon-Deendothelialisierung der Iliakalarterien neben der dort entstehenden lokalen Gefäßveränderungen auch in distalen Blasenarteriolen zu Wandverdickung mit Lumeneinengung kommt [121]. Eine Blutflussverminderung wurde in mehreren Arbeiten an verschiedenen Tiermodellen im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren beschrieben, was auf vaskuläre Veränderungen der Organe schließen lässt [14, 70]. So beschreiben z. B. Azadzi et al. 16 Wochen nach Ballon-Deendothelialisierung der Iliakalarterien männlicher Kaninchen eine Abnahme des iliakalen arteriellen Blutflusses sowie eine Abnahme des vesikalen Blutflusses, welcher mittels Laser-Doppler-Flowmeter am Dom der Blase gemessen wurde. Arteriographische Untersuchungen dieser Tiere konnten diffuse arteriosklerotische Lumen-Einengungen der Aa. iliacaes communes, Aa. iliacaes internaes sowie der Aa. pudendae zeigen. Diese Stenosen mit Intimaverdickung, konzentrischen Schaumzellen und diffusen fibrotischen Veränderungen der Iliakatarterien wurden histologisch bestätigt [14, 15].

Neben dem reduzierten Gefäßvolumen konnten wir ebenfalls eine Verminderung des Harnblasenwandvolumens detektieren. Unklar ist dabei jedoch, ob diese Volumenreduktion Veränderungen der Basenmuskulatur, des Urothels oder des Bindegewebes zuzuschreiben ist. Diese Strukturen können aufgrund sehr ähnlicher Dichtewerte im Nano-CT nicht differenziert werden. Zweifellos kommt es aber zu Veränderungen der Blasenwand, die deutliche Auswirkungen auf die Blasenfunktion haben, wie wir anhand cystomanometrischer Untersuchungen zeigen konnten. Eine Erklärung für den Volumenverlust der Harnblasenwand könnte eine, aufgrund der Hypoxie entstandene, glattmuskuläre Degeneration des Detrusors sein. Diese Degeneration der Blasenmuskulatur wurde sowohl durch Saito et al. [149] als auch durch Ishida et al. [75] anhand histologischer Bilder beschrieben. Beiden Studien gemeinsam ist jedoch die vollständige Ligatur der Iliakalarterien, die zu einer plötzlichen Minderperfusion der Harnblase führt. Histologische Untersuchungen zeigten ein ausgeprägtes Ödem der Submukosa und der Muskelschicht. Zudem konnte das Blasengewicht erhöht gemessen werden, was auch von Yokoi et al. [180] beschrieben wurde. Obwohl das Blasenwandvolumen bzw. die Blasenwanddicke im Rahmen dieser Studien nicht gemessen wurden, legen der Nachweis des Ödems und das erhöhte Blasengewicht den Schluss nahe, dass es hier zu einer Verdickung der Blasenwand kommt. Klarer Unterschied zu unserer Studie ist die operative Methode der Hypoxie-Induktion. Yoshida et al., die Untersuchungen an WHHLM I Kaninchen durchführten, konnten gleichermaßen eine Reduktion der glatten Blasenmuskulatur sowie eine Reduktion der Urotheldicke feststellen. Dabei zeigte sich eine Zunahme bindegewebiger Strukturen [181]. Entsprechend unserer Versuche wurde hier mit einem genveränderten Tiermodell gearbeitet *ohne* initiale Operation zur Blasenhypoxie-Induktion. Die Tatsache einer langsam entstehenden Minderperfusion, kann ein mögliches Argument für eine Reduktion der Blasenwanddicke bzw. des Blasenwandvolumens sein. Die Gewebeveränderungen unterscheiden sich deutlich zwischen akutem und chronischem Geschehen. Akute Prozesse resultieren anfangs in einem reaktiven Ödem, was auch zum Anstieg des Blasengewichtes und einer Verdickung der Blasenwand führt. In der Folge kommt es jedoch auch zu degenerativen Prozessen, die ebenso wie chronische Vorgänge, deutliche funktionelle Veränderungen zur Folge haben [149, 180]. Azadzi et al., die zahlreiche Versuche zu funktionellen als auch strukturellen Auswirkungen einer minderperfundierten Harnblase durchführten [10-16], bedienten sich männlicher Kaninchen, denen durch Ballon-Deendothelialisierung der Iliakalgefäße die vesikale Blutzufuhr verringert wurde. Dieses Tiermodell spiegelt im Gegensatz zu unseren Versuchen nicht die Auswirkung einer langsam entstehenden systemischen Arteriosklerose wider. Hier kommt es aber

auch nicht zu einem plötzlichen Abbruch der arteriellen Blutversorgung wie in Arbeiten von Yokoi et al. [180], Saito et al. [149] oder Ishida et al. [75] beschrieben. Vielmehr entsteht die Gefäßstenose sukzessiv über den Zeitraum mehrerer Wochen. Daraus resultiert eine diffuse Fibrose, Abnahme von glatten Muskelzellen des Detrusors, strukturelle Veränderungen des Urothels als auch eine Verdickung der Lamina propria. Diese morphologischen Veränderungen korrelierten mit dem Schweregrad der Blasenischämie [14]. Anhand immunhistochemischer Färbungen mit Markern für Schwann-Zellen und myelinisierte Nervenfasern konnte in ischämischen Blasen eine signifikante Abnahme von Nervenfasern detektiert werden. Die verbliebenen Nervenfasern erschienen hypertroph. Insgesamt sprechen diese Ergebnisse für eine diffuse Neurodegeneration des Blasengewebes verursacht durch eine Minderperfusion der Harnblase [11, 16].

Unsere Untersuchungen ergaben nicht nur eine Abnahme des Blasenwandvolumens, sondern auch eine Abnahme der Blasenwanddicke. Als Methode zur Bestimmung der Blasenwanddicke beim Menschen wurden bisher meist Ultraschalluntersuchungen durchgeführt [21, 123]. Vorteil der sonographischen Untersuchung ist die einfache, schnelle, billige und nicht-invasive Versuchsdurchführung. Nachteil hierbei ist jedoch die Untersucherabhängigkeit [79] sowie die Schwierigkeit der korrekten Messung aller Blasenabschnitte und der Einfluss der Art der Ultraschalldurchführung [82]. Zhao et al. stellten kürzlich ein alternatives Verfahren mittels Magnetresonanztomographie vor, das im Gegensatz zu Ultraschalluntersuchungen, untersucherunabhängig die Darstellung der Blasenwanddicke und Wandbeschaffenheit ermöglicht. Ähnlich unseren Nano-CT Bildern ist es dabei möglich, die Blase als dreidimensionales Objekt abzubilden [187]. Unterschied zu unserer Studie ist hier die Untersuchung humaner Blasen in vivo. Genaue Aussagen über die Vaskularisation wurden hier nicht gemacht. Bei Patienten mit Detrusorhyperaktivität wird die Blasenwanddicke typischerweise verdickt gemessen [83, 94, 150]. Diese Detrusorhypertrophie entsteht im Grunde durch die verstärkte Muskelarbeit im Sinne eines Muskeltrainings. Der genaue Pathomechanismus der Detrusorhyperaktivität ist bisher nicht bekannt, aber man geht von einem multifaktoriellen Geschehen aus. Unsere Ergebnisse weisen jedoch eine Abnahme der Blasenwanddicke bei gleichzeitig bestehender Detrusorhyperaktivität auf. In der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus aber lediglich auf die progrediente Blasenhypoxie als pathogenetischen Faktor gelegt, was ein Erklärungsansatz für die Diskrepanz unserer Ergebnisse sein kann. Obwohl wir eine Detrusorhypertrophie der ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäuse nicht ausschließen können, gehen wir dennoch von einem Verlust glatter Muskulatur aus, da sowohl das Harnblasenvolumen

als auch die Harnblasenwanddicke im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren reduziert gemessen wurde.

Unsere Studie belegt demnach den Zusammenhang zwischen systemischer Arteriosklerose und einer reduzierten Vaskularisation der Harnblasenwand, welche einer Verringerung der Anzahl an Gefäßen der Blasenwand zuzuschreiben ist. Insgesamt gibt es viele Forschungsergebnisse, die unsere These stützen, in dieser Form konnte diese Relation aber bisher noch nicht dargestellt werden. Um Aufschluss zu geben über genaue Gefäß- sowie Harnblasenwandveränderungen ist in der Folge eine weitere Aufarbeitung der Harnblasenproben nötig. Histologische und immunhistochemische Untersuchungen können dann den Nachweis arteriosklerotischer Plaques und strukturellen Veränderungen der Harnblasenwand sowie des Urothels detailgenau erbringen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Bis heute ist die genaue Pathogenese des Krankheitsbildes der überaktiven Blase nicht gänzlich geklärt. Ein Zusammenhang zwischen systemischer Arteriosklerose und überaktiver Blase bzw. Detrusorhyperaktivität liegt nahe, da die Prävalenz beider Erkrankungen im Alter signifikant zunimmt. Zudem wird Arteriosklerose auch für Funktionseinbußen vieler anderer Organe verantwortlich gemacht. Als erste Arbeitsgruppe konnten wir diesen Zusammenhang anhand eines neuen Tiermodells belegen.

Die ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Maus bildet arteriosklerotische Läsionen aus, ähnlich derer beim Menschen, jedoch ohne Manifestation in zerebralen Gefäßen. Wir untersuchten Veränderungen der Blasenfunktion als auch morphologische Unterschiede, mit Fokus auf die Vaskularisation der Harnblasenwand. Dazu dienten uns 60 Wochen alte, weibliche ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäuse sowie gleichaltrige, weibliche C57Bl6/N Mäuse. Cystomanometrische Untersuchungen wurden nach operativer Kathetereinlage in den Dom der Blase am wachen, frei beweglichen Tier durchgeführt. Im Anschluss wurde das Gefäßbett der Tiere mit einem intravasal aushärtenden Kontrastmittel gefüllt. Nach Präparation und Entnahme der Blase erfolgte deren Untersuchung im Nano-CT.

Wir konnten feststellen, dass Harnblasen der ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäuse im Vergleich zu nativen Kontrolltieren eindeutige Zeichen einer Detrusorhyperaktivität aufweisen. Dies präsentierte sich in einer signifikanten Reduktion des Miktionsintervalls, des Peak-Peak-Intervalls, des Miktionsvolumens und der funktionalen Blasenkapazität. Der maximale Blasendruck konnte indessen erhöht gemessen werden. Scan und Datenanalyse der computertomographischen Bilder belegen, dass Untersuchungen von Hohlorganen im Nano-CT realisierbar sind. Die Ergebnisse der ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäuse zeigen eine signifikante Abnahme des Gefäßvolumens, der vascular volume fraction als auch des Wandvolumens und der Blasenwanddicke, was auf degenerative Prozesse als Folge der arteriosklerotischen Zustände hinweist.

Mittels unseres neu etablierten in-vivo Mausmodells konnte so erstmals der Zusammenhang zwischen systemischer Arteriosklerose und non-neurogener Detrusorhyperaktivität gezeigt werden. Grund dafür scheint u. a. die reduzierte Vaskularisation der Blasenwand zu sein. Um jedoch noch präzisere Aussagen über die Gefäß- und Gewebeveränderungen machen zu können, müssten weitere histologische sowie immunhistochemische Untersuchungen folgen.

## 6 SUMMARY

Until now, the specific pathogenesis of the overactive bladder is not clearly understood. A correlation between systemic arteriosclerosis and overactive bladder seems to be likely, since the prevalence of both diseases increase significantly with age. Besides, arteriosclerosis has been implicated in the loss of functionality of many other organs. The main object of the present study was to investigate this potential correlation by means of a new animal model: the apoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-double-knockout-mouse.

These mice develop arterial lesions similar to those in humans without affecting cerebral vessels. We examined changes of bladder function as well as morphological alterations focusing on the vascularisation of the bladder wall in 60 weeks old, female apoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-double-knockout-mice and female C57Bl6/N-mice of the same age. After placing a intravesical catheter operatively, cystomanometric tests were carried out on conscious, freely moving animals. Then, the vascular bed of all animals was filled with a intravesical curing contrast medium and after preparation, the urinary bladder was scanned in a nano-CT.

Bladders of apoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-double-knockout-mice showed obvious characteristics of detrusor overactivity in comparison to native controls. Specifically, we found a reduction of the micturition interval, the peak-peak interval, the micturition volume and the functional bladder capacity. However, maximum bladder pressure was increased. Furthermore, this investigation is the first to show that the examination of hollow organs is possible with nano-CT technology. The results suggest a significant reduction of the total vascular volume, the vascular volume fraction, the bladder wall volume and the bladder wall thickness of the apoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-double-knockout-mice compared to control animals. These changes indicate degenerative processes as a result of systemic arteriosclerosis.

The present study introduces a new in-vivo mouse model for non-neurogenic detrusor overactivity due to systemic arteriosclerosis. It seems that one mechanism by which systemic arteriosclerosis leads to overactive bladder might be a significant reduction of vascularisation of the bladder wall. In order to investigate these vessel and tissue alteration in more detail, histological and immunohistochemical analyses are necessary.

---

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

\$	US Dollar
%	Prozent
§	Paragraph
°	Grad
µA	Mikroampere
µm	Mikrometer
€	Euro
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
ACh	Achetylcholin
ApoE	Apolipoprotein E
ATP	Adenosintriphosphat
AUG	Ausscheidungsurographie
BGB	Bundesgesetzbuch
Bit	<b>binary digit</b> , englisch für Binärziffer
BMP	Windows Bitmap Datei
BOO	bladder outlet obstruction, Blasenaustrittsobstruktion
ca.	circa
CCD	Charged Coupled Device
cmH <sub>2</sub> O	Zentimeter Wassersäule
CMM	Cystomanometrie
CT	Computertomograph(ie)
d. h.	das heißt
et al.	et alii/ et aliae, lateinisch für „und andere“
evtl.	eventuell
fBK	funktionelle Blasenkapazität
G	Gauge
GAG-Schicht	Glykosaminoglykan-Schicht
GVBL	Gesetz- und Verordnungsblatt
h	Stunde

---

ICS	International Continence Society
IE	Internationale Einheiten
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
Ko	Kontrollmaus
kV	Kilovolt
l	Liter
LaB <sub>6</sub>	Lanthanhexaborid
LDL	Low Density Lipoprotein
LUTS	Lower Urinary Tract Symptoms
MCU	Miktionszystourethrographie
mg	Milligramm
MI	Miktionsintervall
min	Minute
MIP	Maximumintensitätsprojektion
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm <sup>3</sup>	Quadratmillimeter
MRT	Magnetresonanztomograph(ie)
ms	Millisekunde
MV	Miktionsvolumen
N	Anzahl der untersuchten Tiere
NaCl	Natriumchlorid
Nano-CT	Nano-Computertomograph(ie)
NGF	nerve growth factor, Nervenwachstumsfaktor
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
Nr.	Nummer
OAB	Overactive Bladder, überaktive Blase
Obj. S	Object Surface
Obj. V	Object Volume
p	Signifikanzniveau
PE	Polyethylen
P <sub>max</sub>	Maximaler intravesikaler Druck
PP	Peak-Peak-Intervall
RH	Restharn
RP	Regierungspräsidium

---

S.	Seite
sec	Sekunde
SPF	Specific Pathogen-Free Facility
St.Th	Structure Thickness
Tab.	Tabelle
TIFF	Tagged Image File Format
ÜAB	Überaktive Blase
U-Test	Mann-Whitney-U-Test
v. a.	vor allem
VVF	vascular volume fraction
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
ZNS	Zentrales Nervensystem

---

**TABELLENVERZEICHNIS**

- Tabelle 1:** Darstellung der Image Pixel Size der mit Vaseline gefüllten Gesamtharnblasen
- Tabelle 2:** Cystomanometrie mit NaCl-Lösung: Urodynamische Messwerte von ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout- und C57Bl6/N-Mäusen
- Tabelle 3:** Cystomanometrie mit NaCl-Lösung und KCl-Lösung: Gegenüberstellung der urodynamischen Messwerte der ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäuse.
- Tabelle 4:** Cystomanometrie mit NaCl-Lösung und KCl-Lösung: Gegenüberstellung der urodynamischen Messwerte der C57Bl6/N-Mäuse.
- Tabelle 5:** Cystomanometrie mit KCl-Lösung: Urodynamische Messwerte von ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout- und C57Bl6/N-Mäusen.
- Tabelle 6:** Nano-CT-Bilder der mit Vaseline gefüllten Gesamtblasen: Messwerte von ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout- und C57Bl6/N-Mäusen.
- Tabelle 7:** Nano-CT-Bilder der Harnblasensegmente: Messwerte von ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout- und C57Bl6/N-Mäusen.

---

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

- Abbildung 1:** Vorbereiteter Polyethylen-Katheter mit Cuff, der ebenso wie die Tabaksbeutelnaht eine Dislokation aus der Blase verhindern soll. Das Lumen des Katheters bleibt dabei unverändert.
- Abbildung 2:** Darstellung der Cystostomie mit Kathetereinlage: Nach Eröffnung des Abdomens wird die Harnblase freigelegt (A) und die Tabaksbeutelnaht vorgelegt. Die Inzision der Blase erfolgt am Blasendom (B) mit nachfolgender Kathetereinlage und Fixierung durch die Tabaksbeutelnaht (C). Der Katheter wird anschließend subkutan getunnelt, am Nacken ausgeleitet und dort fixiert (D). Pfeil 1 = freigelegte Blase; Pfeil 2 = am Blasendom fixierter Katheter; Pfeil 3 = am Nacken ausgeleiteter und durch Pflaster sowie Ligatur fixierter Katheter.
- Abbildung 3:** Versuchsaufbau der Cystomanometrie: A = Übersicht; Mit Hilfe eines Perfusors (1) wird die Blase langsam kontinuierlich mit 1,5 ml/h über einen Polyethylenkatheter gefüllt. Über einen Druckabnehmer (3) wird der intravesikale Druck gemessen. Der Urin wird in einem Becher (4) unter dem Käfig (2) aufgefangen und mit Hilfe eines Kraftumwandlers (5) gemessen. B = Maus im Untersuchungskäfig mit am Nacken ausgeleitetem und fixiertem Katheter. C = Darstellung des Urinauffangbehälters und des Kraftumwandlers unter dem Käfig.
- Abbildung 4:** Ausschnitt einer Cystomanometrie zur Darstellung der erhobenen Parameter.  $P_{\max}$  = maximaler Blasendruck, PP = Peak-Peak-Intervall, MV = Miktionsvolumen, MI = Miktionsintervall.
- Abbildung 5:** Präparation und Perfusion: Eröffnung des Abdomens sowie des Thorax' und Lösen des Herzens (A) mit anschließender Inzision des rechten Atriums als auch des linken Ventrikels. Nach Befestigung der Kanüle erfolgt die Perfusion mit heparinisierter

Kochsalzlösung (B). Direkt im Anschluss erfolgt die Perfusion mit Kontrastmittel (C). Nach dem Aushärten des Kontrastmittels Präparation der Blase (D), die nach Ligatur der Urethra entnommen und über den liegenden Katheter mit Gelatine bzw. Vaseline gefüllt wird (E).

- Abbildung 6:** Darstellung des Segmentierungsschemas der Harnblasen
- Abbildung 7:** Nano-Computertomograph der Firma SkyScan®, Kontich, Belgien an der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Abbildung 8:** Schematische Darstellung der Funktionseinheiten des Nano-Computertomographen [1]; wichtigste Elemente: rot = Röntgenröhre, grün = Probenschlitten, blau = Bilddetektor, rosa = Vakuumpumpensystem, gelb = Pneumatisches Subsystem
- Abbildung 9:** Darstellung von Cystomanometrikurven, die rote, obere Kurve zeigt den intravesikalen Druck, die blaue, untere Kurve zeigt das Volumen des aufgefangenen Urins. A = Kurve einer C57Bl6/N Kontrollmaus, B = Kurve einer ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Maus.
- Abbildung 10:** Cystomanometrie mit NaCl-Lösung: Box-Plot-Darstellung der statistischen Auswertung der urodynamischen Messwerte von ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout- und C57Bl6/N-Mäusen.
- Abbildung 11:** Box-Plot-Darstellung der statistischen Auswertung der Nano-CT-Bilder der mit Vaseline gefüllten Gesamtblasen.
- Abbildung 12:** Darstellung mittels ANALYZE®: Blase eines Kontrolltieres (A = nativ, B = Segmentierung) und Blase eines ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Tieres (C = nativ, B = Segmentierung) im Querschnitt.
- Abbildung 13:** Darstellung mittels ANALYZE®: Blase eines Kontrolltieres (A = Gefäße und Blasenlumen (Vaseline), B = Gefäße) und einer ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Maus (C = Gefäße und

---

Blasenlumen (Vaseline), D = Gefäße) im Vergleich. Die kontrastmittelgefüllten Gefäße stellen sich rot dar, das mit Vaseline gefüllte Blasenlumen weiß.

**Abbildung 14:** Box-Plot-Darstellung der statistischen Auswertung der Nano-CT-Bilder der Blasensegmente.

**Abbildung 15:** Darstellung mittels ANALYZE®: Segment einer Kontrollmaus, A = MIP (Maximumintensitätsprojektion), B = Blasenwand und Gefäße, C = Gefäße.

**Abbildung 16:** Darstellung mittels ANALYZE®: Segment einer ApoE<sup>-/-</sup>-LDLR<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Maus, A = MIP (Maximumintensitätsprojektion), B = Blasenwand+Gefäße, C = Gefäße.

---

**LITERATURVERZEICHNIS**

1. Instruction Manual SkyScan-2011 X-ray Nanotomograph. Designed and produced by SkyScan N.V., Kartuizersweg 3B, 2550 Kontich, Belgium, 2007
2. Die überaktive Blase ÜAB; AWMF-Register Nr. 015/007 ; Klasse: S2k. 2010;
3. Abrams P, Blaivas JG, Fowler CJ, Fourcroy JL, Macdiarmid SA, Siegel SW, Van Kerrebroeck P. The role of neuromodulation in the management of urinary urge incontinence. *BJU Int* 2003; 91: 355-359
4. Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, Van Kerrebroeck P, Victor A, Wein A. The standardisation of terminology in lower urinary tract function: report from the standardisation sub-committee of the International Continence Society. *Urology* 2003; 61: 37-49
5. Alt V, Kogelmaier DV, Lips KS, Witt V, Pacholke S, Heiss C, Kampschulte M, Heinemann S, Hanke T, Thormann U, Schnettler R, Langheinrich AC. Assessment of angiogenesis in osseointegration of a silica-collagen biomaterial using 3D-nano-CT. *Acta Biomater* 2011; 7: 3773-3779
6. Andersson KE. Antimuscarinic mechanisms and the overactive detrusor: an update. *Eur Urol* 2011; 59: 377-386
7. Andersson KE, Soler R, Fullhase C. Rodent models for urodynamic investigation. *Neurourol Urodyn* 2011; 30: 636-646
8. Angelico P, Guarneri L, Fredella B, Testa R. In vivo effects of different antispasmodic drugs on the rat bladder contractions induced by topically applied KCl. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1992; 27: 33-39
9. Arbustini E, Dal Bello B, Morbini P, Burke AP, Bocciarelli M, Specchia G, Virmani R. Plaque erosion is a major substrate for coronary thrombosis in acute myocardial infarction. *Heart* 1999; 82: 269-272
10. Azadzi KM, Chen BG, Radisavljevic ZM, Siroky MB. Molecular reactions and ultrastructural damage in the chronically ischemic bladder. *J Urol* 2011; 186: 2115-2122
11. Azadzi KM, Radisavljevic ZM, Golabek T, Yalla SV, Siroky MB. Oxidative modification of mitochondrial integrity and nerve fiber density in the ischemic overactive bladder. *J Urol* 2010; 183: 362-369
12. Azadzi KM, Radisavljevic ZM, Siroky MB. Effects of ischemia on tachykinin-containing nerves and neurokinin receptors in the rabbit bladder. *Urology* 2008; 71: 979-983
13. Azadzi KM, Shinde VM, Tarcan T, Kozlowski R, Siroky MB. Increased leukotriene and prostaglandin release, and overactivity in the chronically ischemic bladder. *J Urol* 2003; 169: 1885-1891
14. Azadzi KM, Tarcan T, Kozlowski R, Krane RJ, Siroky MB. Overactivity and structural changes in the chronically ischemic bladder. *J Urol* 1999; 162: 1768-1778
15. Azadzi KM, Tarcan T, Siroky MB, Krane RJ. Atherosclerosis-induced chronic ischemia causes bladder fibrosis and non-compliance in the rabbit. *J Urol* 1999; 161: 1626-1635
16. Azadzi KM, Yalla SV, Siroky MB. Oxidative stress and neurodegeneration in the ischemic overactive bladder. *J Urol* 2007; 178: 710-715
17. Banakhar MA, Al-Shaiji TF, Hassouna MM. Pathophysiology of overactive bladder. *Int Urogynecol J* 2012; 23: 975-982
18. Bonow RO, Smaha LA, Smith SC, Jr., Mensah GA, Lenfant C. World Heart Day 2002: the international burden of cardiovascular disease: responding to the emerging global epidemic. *Circulation* 2002; 106: 1602-1605

19. Brading AF. A myogenic basis for the overactive bladder. *Urology* 1997; 50: 57-67; discussion 68-73
20. Breslow JL. Mouse models of atherosclerosis. *Science* 1996; 272: 685-688
21. Bright E, Oelke M, Tubaro A, Abrams P. Ultrasound estimated bladder weight and measurement of bladder wall thickness--useful noninvasive methods for assessing the lower urinary tract? *J Urol* 2010; 184: 1847-1854
22. Brown JS, McGhan WF, Chokroverty S. Comorbidities associated with overactive bladder. *Am J Manag Care* 2000; 6: S574-579
23. Brown WR, Thore CR. Review: cerebral microvascular pathology in ageing and neurodegeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2011; 37: 56-74
24. Bschiepfer T, Wagenlehner F, Weidner W. Etiology and pathogenesis of overactive bladder. *Urologe A* 2011; 50: 477-480
25. Cannon TW, Damaser MS. Effects of anesthesia on cystometry and leak point pressure of the female rat. *Life Sci* 2001; 69: 1193-1202
26. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992; 340: 1111-1115
27. Chapple CR, Khullar V, Gabriel Z, Muston D, Bitoun CE, Weinstein D. The effects of antimuscarinic treatments in overactive bladder: an update of a systematic review and meta-analysis. *Eur Urol* 2008; 54: 543-562
28. Christ GJ, Day NS, Day M, Zhao W, Persson K, Pandita RK, Andersson KE. Increased connexin43-mediated intercellular communication in a rat model of bladder overactivity in vivo. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 284: R1241-1248
29. Chu FM, Dmochowski R. Pathophysiology of overactive bladder. *Am J Med* 2006; 119: 3-8
30. Chun AL, Wallace LJ, Gerald MC, Levin RM, Wein AJ. Effect of age on in vivo urinary bladder function in the rat. *J Urol* 1988; 139: 625-627
31. Cnudde V, Masschaele B, Dierick M, Vlassenbroeck J, Hoorebeke LV, Jacobs P. Recent progress in X-ray CT as a geosciences tool. *Applied Geochemistry* 2006; 21: 826-832
32. Corcos J, Schick E. Prevalence of overactive bladder and incontinence in Canada. *Can J Urol* 2004; 11: 2278-2284
33. Coyne KS, Sexton CC, Kopp ZS, Ebel-Bitoun C, Milsom I, Chapple C. The impact of overactive bladder on mental health, work productivity and health-related quality of life in the UK and Sweden: results from EpiLUTS. *BJU Int* 2011; 108: 1459-1471
34. Coyne KS, Sexton CC, Thompson C, Kopp ZS, Milsom I, Kaplan SA. The impact of OAB on sexual health in men and women: results from EpiLUTS. *J Sex Med* 2011; 8: 1603-1615
35. Davies MJ. The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart* 2000; 83: 361-366
36. Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJH, Pigott R, Woolf N, Katz D, Kyriakopoulos A. The Expression of the Adhesion Molecules Icam-1, Vcam-1, Pecam, and E-Selectin in Human Atherosclerosis. *Journal of Pathology* 1993; 171: 223-229
37. de Groat WC. A neurologic basis for the overactive bladder. *Urology* 1997; 50: 36-52; discussion 53-36
38. de Groat WC. The urothelium in overactive bladder: passive bystander or active participant? *Urology* 2004; 64: 7-11
39. de Groat WC, Yoshimura N. Afferent nerve regulation of bladder function in health and disease. *Handb Exp Pharmacol* 2009; 91-138
40. Digesu GA, Khullar V, Cardozo L, Salvatore S. Overactive bladder symptoms: do we need urodynamics? *Neurourol Urodyn* 2003; 22: 105-108

41. Doran AC, Meller N, McNamara CA. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 812-819
42. Doyle PT, Briscoe CE. The effects of drugs and anaesthetic agents on the urinary bladder and sphincters. *Br J Urol* 1976; 48: 329-335
43. Drake MJ, Harvey IJ, Gillespie JI, Van Duyl WA. Localized contractions in the normal human bladder and in urinary urgency. *BJU Int* 2005; 95: 1002-1005
44. Dumoulin C, Hay-Smith J. Pelvic floor muscle training versus no treatment, or inactive control treatments, for urinary incontinence in women. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; CD005654
45. Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1983-1992
46. Fernandez-Ortiz A, Badimon JJ, Falk E, Fuster V, Meyer B, Mailhac A, Weng D, Shah PK, Badimon L. Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23: 1562-1569
47. Floyd K, Hick VE, Morrison JF. Mechanosensitive afferent units in the hypogastric nerve of the cat. *J Physiol* 1976; 259: 457-471
48. Friedman E. The role of the atherosclerotic process in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2000; 130: 658-663
49. Frostegard J, Ulfgren AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, Hansson GK. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis* 1999; 145: 33-43
50. Ganz ML, Smalarz AM, Krupski TL, Anger JT, Hu JC, Wittrup-Jensen KU, Pashos CL. Economic costs of overactive bladder in the United States. *Urology* 2010; 75: 526-532, 532 e521-518
51. Geng Y, Kodama T, Hansson GK. Differential expression of scavenger receptor isoforms during monocyte-macrophage differentiation and foam cell formation. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 798-806
52. Ghoniem GM, Shoukry MS, Monga M. Effects of anesthesia on urodynamic studies in the primate model. *J Urol* 1996; 156: 233-236
53. Gill HS, Monson FC, Wein AJ, Ruggieri MR, Levin RM. The effects of short-term in-vivo ischemia on the contractile function of the rabbit urinary bladder. *J Urol* 1988; 139: 1350-1354
54. Goi Y, Tomiyama Y, Nomiya M, Sagawa K, Aikawa K, Yamaguchi O. Effects of Silodosin, a Selective alpha-Adrenoceptor Antagonist, on Bladder Blood Flow and Bladder Function in a Rat Model of Atherosclerosis Induced Chronic Bladder Ischemia Without Bladder Outlet Obstruction. *J Urol* 2013;
55. Gorbachinsky I, Akpinar H, Assimos DG. Metabolic syndrome and urologic diseases. *Rev Urol* 2010; 12: e157-180
56. Gormley EA, Lightner DJ, Burgio KL, Chai TC, Clemens JQ, Culkin DJ, Das AK, Foster HE, Jr., Scarpero HM, Tessier CD, Vasavada SP. Diagnosis and treatment of overactive bladder (non-neurogenic) in adults: AUA/SUFU guideline. *J Urol* 2012; 188: 2455-2463
57. Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* 1998; 2: 275-281
58. Haferkamp A, Mundhenk J, Bastian PJ, Reitz A, Dorsam J, Pannek J, Schumacher S, Schurch B, Buttner R, Muller SC. Increased expression of connexin 43 in the overactive neurogenic detrusor. *Eur Urol* 2004; 46: 799-805
59. Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1876-1890

60. Hansson GK. Regulation of immune mechanisms in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 947: 157-165; discussion 165-156
61. Hashim H, Abrams P. Is the bladder a reliable witness for predicting detrusor overactivity? *J Urol* 2006; 175: 191-194; discussion 194-195
62. Hay-Smith J, Herbison P, Ellis G, Moore K. Anticholinergic drugs versus placebo for overactive bladder syndrome in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2002; CD003781
63. Hofker MH, van Vlijmen BJ, Havekes LM. Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1998; 137: 1-11
64. Hohlbrugger G. Leaky urothelium and/or vesical ischemia enable urinary potassium to cause idiopathic urgency/frequency syndrome and urge incontinence. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 1996; 7: 242-255
65. Hohlbrugger G. Urinary potassium and the overactive bladder. *BJU International* 1999; 83: 22-28
66. Holvoet P, Davey PC, De Keyser D, Doukoure M, Deridder E, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Beaufort E, Bishay K, Andrieux N, Benhabiles N, Marguerie G. Oxidized low-density lipoprotein correlates positively with toll-like receptor 2 and interferon regulatory factor-1 and inversely with superoxide dismutase-1 expression: studies in hypercholesterolemic swine and THP-1 cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1558-1565
67. Homma Y, Yamaguchi O, Hayashi K. An epidemiological survey of overactive bladder symptoms in Japan. *BJU Int* 2005; 96: 1314-1318
68. Hu TW, Wagner TH, Bentkover JD, LeBlanc K, Piantentini A, Stewart WF, Corey R, Zhou SZ, Hunt TL. Estimated economic costs of overactive bladder in the United States. *Urology* 2003; 61: 1123-1128
69. Hu TW, Wagner TH, Bentkover JD, Leblanc K, Zhou SZ, Hunt T. Costs of urinary incontinence and overactive bladder in the United States: a comparative study. *Urology* 2004; 63: 461-465
70. Inoue S, Saito M, Tsounapi P, Dimitriadis F, Ohmasa F, Kinoshita Y, Satoh K, Takenaka A. Effect of silodosin on detrusor overactivity in the male spontaneously hypertensive rat. *BJU Int* 2012; 110: E118-124
71. Irwin DE, Kopp ZS, Agatep B, Milsom I, Abrams P. Worldwide prevalence estimates of lower urinary tract symptoms, overactive bladder, urinary incontinence and bladder outlet obstruction. *BJU Int* 2011; 108: 1132-1138
72. Irwin DE, Milsom I, Hunskaar S, Reilly K, Kopp Z, Herschorn S, Coyne K, Kelleher C, Hampel C, Artibani W, Abrams P. Population-based survey of urinary incontinence, overactive bladder, and other lower urinary tract symptoms in five countries: results of the EPIC study. *Eur Urol* 2006; 50: 1306-1314; discussion 1314-1305
73. Irwin DE, Milsom I, Reilly K, Hunskaar S, Kopp Z, Herschorn S, Coyne KS, Kelleher CJ, Artibani W, Abrams P. Overactive bladder is associated with erectile dysfunction and reduced sexual quality of life in men. *J Sex Med* 2008; 5: 2904-2910
74. Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL, Brown MS. The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 4431-4435
75. Ishida T, Shimoda N, Sato K, Ogawa O, Nishizawa O, Kato T. [Effects of ischemia on voiding function and nerve growth factor of the rat urinary bladder]. *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi* 1999; 90: 564-571
76. Ito T, Shiomi M. Cerebral atherosclerosis occurs spontaneously in homozygous WHHL rabbits. *Atherosclerosis* 2001; 156: 57-66
77. Kampschulte M, Brinkmann A, Stieger P, Sedding DG, Dierkes C, Bohle RM, Krombach G, Ritman EL, Langheinrich AC. Quantitative CT imaging of the spatio-temporal

- distribution patterns of vasa vasorum in aortas of apoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup> double knockout mice. *Atherosclerosis* 2010; 212: 444-450
78. Kelishadi R. Childhood overweight, obesity, and the metabolic syndrome in developing countries. *Epidemiol Rev* 2007; 29: 62-76
  79. Kessler TM, Gerber R, Burkhard FC, Studer UE, Danuser H. Ultrasound assessment of detrusor thickness in men-can it predict bladder outlet obstruction and replace pressure flow study? *J Urol* 2006; 175: 2170-2173
  80. Klotz T, Bruggenjurgen B, Burkart M, Resch A. The economic costs of overactive bladder in Germany. *Eur Urol* 2007; 51: 1654-1662; discussion 1662-1653
  81. Knuepfer S, Juenemann KP. Experience with botulinum toxin type A in the treatment of neurogenic detrusor overactivity in clinical practice. *Ther Adv Urol* 2014; 6: 34-42
  82. Kuhn A, Bank S, Robinson D, Klimek M, Kuhn P, Raio L. How should bladder wall thickness be measured? A comparison of vaginal, perineal and abdominal ultrasound. *Neurourol Urodyn* 2010; 29: 1393-1396
  83. Kuhn A, Genoud S, Robinson D, Herrmann G, Gunthert A, Brandner S, Raio L. Sonographic transvaginal bladder wall thickness: does the measurement discriminate between urodynamic diagnoses? *Neurourol Urodyn* 2011; 30: 325-328
  84. Lais LT, Rios LL, Boutelle S, DiBona GF, Brody MJ. Arterial pressure development in neonatal and young spontaneously hypertensive rats. *Blood Vessels* 1977; 14: 277-284
  85. Langheinrich AC, Bohle RM. Atherosclerosis: humoral and cellular factors of inflammation. *Virchows Arch* 2005; 446: 101-111
  86. Langheinrich AC, Bohle RM, Breithecker A, Lommel D, Rau WS. [Micro-computed tomography of the vasculature in parenchymal organs and lung alveoli]. *Rofo* 2004; 176: 1219-1225
  87. Langheinrich AC, Kampschulte M, Scheiter F, Dierkes C, Stieger P, Bohle RM, Weidner W. Atherosclerosis, inflammation and lipoprotein glomerulopathy in kidneys of apoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup> double knockout mice. *BMC Nephrol* 2010; 11: 18
  88. Langheinrich AC, Michniewicz A, Bohle RM, Ritman EL. Vasa vasorum neovascularization and lesion distribution among different vascular beds in ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup> double knockout mice. *Atherosclerosis* 2007; 191: 73-81
  89. Langheinrich AC, Michniewicz A, Sedding DG, Walker G, Beighley PE, Rau WS, Bohle RM, Ritman EL. Correlation of vasa vasorum neovascularization and plaque progression in aortas of apolipoprotein E<sup>-/-</sup>/low-density lipoprotein<sup>-/-</sup> double knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 347-352
  90. Langheinrich AC, Paradowska A, Kilinski R, Kampschulte M, Steinfeld K, Altinkilic B, Steger K, Stieger P, Bergmann M, Weidner W. Mixed testicular atrophy related to atherosclerosis: first lessons from the ApoE<sup>-/-</sup>/LDL receptor<sup>-/-</sup> double knockout mouse model. *International Journal of Andrology* 2012; 35: 562-571
  91. Langheinrich AC, Vormann S, Seidenstucker J, Kampschulte M, Bohle RM, Wienhard J, Zygmunt M. Quantitative 3D micro-CT imaging of the human fetoplacental vasculature in intrauterine growth restriction. *Placenta* 2008; 29: 937-941
  92. Langheinrich AC, Yeniguen M, Ostendorf A, Marhoffer S, Kampschulte M, Bachmann G, Stolz E, Gerriets T. Evaluation of the middle cerebral artery occlusion techniques in the rat by in-vitro 3-dimensional micro- and nano computed tomography. *BMC Neurol* 2010; 10: 36
  93. Lapitan MC, Chye PL. The epidemiology of overactive bladder among females in Asia: a questionnaire survey. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2001; 12: 226-231
  94. Lekskulchai O, Dietz HP. Detrusor wall thickness as a test for detrusor overactivity in women. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008; 32: 535-539

95. Levin RM, Longhurst PA, Monson FC, Kato K, Wein AJ. Effect of bladder outlet obstruction on the morphology, physiology, and pharmacology of the bladder. *Prostate Suppl* 1990; 3: 9-26
96. Lewis SA. Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 278: F867-874
97. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135-1143
98. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell* 2013; 153: 1194-1217
99. Lopez AD, Mathers CD. Measuring the global burden of disease and epidemiological transitions: 2002-2030. *Ann Trop Med Parasitol* 2006; 100: 481-499
100. Lopez AD, Murray CC. The global burden of disease, 1990-2020. *Nat Med* 1998; 4: 1241-1243
101. Lowe EM, Anand P, Terenghi G, Williams-Chestnut RE, Sinicropi DV, Osborne JL. Increased nerve growth factor levels in the urinary bladder of women with idiopathic sensory urgency and interstitial cystitis. *Br J Urol* 1997; 79: 572-577
102. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012; 380: 2095-2128
103. M.D TWC, Ph.D MSD. Effects of anesthesia on cystometry and leak point pressure of the female rat. *Life Sciences* 2001; 69: 1193-1202
104. Macneil HF, Williams JH, Brading AF. Effect of different anaesthetics, routes of catheterisation, age, and filling rate on the urodynamics of the guinea-pig. *Neurourology and Urodynamics* 1992; 11: 239-244
105. Madersbacher S, Pycha A, Schatzl G, Mian C, Klingler CH, Marberger M. The aging lower urinary tract: a comparative urodynamic study of men and women. *Urology* 1998; 51: 206-212
106. Malinovsky JM, Le Normand L, Lepage JY, Malinge M, Cozian A, Pinaud M, Buzelin JM. The urodynamic effects of intravenous opioids and ketoprofen in humans. *Anesth Analg* 1998; 87: 456-461
107. Marxen M, Thornton MM, Chiarot CB, Klement G, Koprivnikar J, Sled JG, Henkelman RM. MicroCT scanner performance and considerations for vascular specimen imaging. *Med Phys* 2004; 31: 305-313
108. Matsui T, Oka M, Fukui T, Tanaka M, Oyama T, Sagawa K, Nomiya M, Yamaguchi O. Suppression of bladder overactivity and oxidative stress by the phytotherapeutic agent, Eviprostat, in a rat model of atherosclerosis-induced chronic bladder ischemia. *Int J Urol* 2012; 19: 669-675
109. McMurray HF, Parthasarathy S, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoprotein is a chemoattractant for human T lymphocytes. *J Clin Invest* 1993; 92: 1004-1008
110. Mertens A, Holvoet P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *FASEB J* 2001; 15: 2073-2084
111. Milsom I, Abrams P, Cardozo L, Roberts RG, Thuroff J, Wein AJ. How widespread are the symptoms of an overactive bladder and how are they managed? A population-based prevalence study. *BJU Int* 2001; 87: 760-766
112. Milsom I, Kaplan SA, Coyne KS, Sexton CC, Kopp ZS. Effect of bothersome overactive bladder symptoms on health-related quality of life, anxiety, depression, and treatment seeking in the United States: results from EpiLUTS. *Urology* 2012; 80: 90-96
113. Mizuno H, Yamamoto T, Okutsu H, Ohtake A, Sasamata M, Matsukawa Y, Funahashi Y, Kato M, Hattori R, Gotoh M. Effect of tamsulosin on bladder microcirculation in a rat

- ischemia-reperfusion model, evaluated by pencil lens charge-coupled device microscopy system. *Urology* 2010; 76: 1266 e1261-1265
114. Moehrer B, Hextall A, Jackson S. Oestrogens for urinary incontinence in women. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; CD001405
  115. Mokdad AH, Bowman BA, Ford ES, Vinicor F, Marks JS, Koplan JP. The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States. *JAMA* 2001; 286: 1195-1200
  116. Morikawa K, Ichihashi M, Kakiuchi M, Yamauchi T, Kato H, Ito Y, Gomi Y. Effects of various drugs on bladder function in conscious rats. *Jpn J Pharmacol* 1989; 50: 369-376
  117. Mukherjee D, Cho L. Peripheral arterial disease: considerations in risks, diagnosis, and treatment. *J Natl Med Assoc* 2009; 101: 999-1008
  118. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 133-140
  119. Nomiya M, Burmeister DM, Sawada N, Campeau L, Zarifpour M, Yamaguchi O, Andersson KE. Effect of melatonin on chronic bladder-ischaemia-associated changes in rat bladder function. *BJU Int* 2013; 112: E221-230
  120. Nomiya M, Sagawa K, Yazaki J, Takahashi N, Kushida N, Haga N, Aikawa K, Matsui T, Oka M, Fukui T, Andersson KE, Yamaguchi O. Increased bladder activity is associated with elevated oxidative stress markers and proinflammatory cytokines in a rat model of atherosclerosis-induced chronic bladder ischemia. *Neurourol Urodyn* 2012; 31: 185-189
  121. Nomiya M, Yamaguchi O, Andersson KE, Sagawa K, Aikawa K, Shishido K, Yanagida T, Kushida N, Yazaki J, Takahashi N. The effect of atherosclerosis-induced chronic bladder ischemia on bladder function in the rat. *Neurourol Urodyn* 2012; 31: 195-200
  122. O'Reilly BA, Kosaka AH, Chang TK, Ford AP, Popert R, McMahon SB. A quantitative analysis of purinoceptor expression in the bladders of patients with symptomatic outlet obstruction. *BJU Int* 2001; 87: 617-622
  123. Oelke M, Hofner K, Jonas U, Ubbink D, de la Rosette J, Wijkstra H. Ultrasound measurement of detrusor wall thickness in healthy adults. *Neurourol Urodyn* 2006; 25: 308-317; discussion 318
  124. Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 1963; 27: 282-293
  125. Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis* 1987; 68: 231-240
  126. Palm F, Nordquist L. Renal tubulointerstitial hypoxia: cause and consequence of kidney dysfunction. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2011; 38: 474-480
  127. Pandita RK, Fujiwara M, Alm P, Andersson KE. Cystometric evaluation of bladder function in non-anesthetized mice with and without bladder outlet obstruction. *J Urol* 2000; 164: 1385-1389
  128. Parsons CL. Potassium sensitivity test. *Tech Urol* 1996; 2: 171-173
  129. Parsons CL. The role of the urinary epithelium in the pathogenesis of interstitial cystitis/prostatitis/urethritis. *Urology* 2007; 69: 9-16
  130. Parsons CL, Boychuk D, Jones S, Hurst R, Callahan H. Bladder surface glycosaminoglycans: an epithelial permeability barrier. *J Urol* 1990; 143: 139-142
  131. Parsons CL, Greenberger M, Gabal L, Bidair M, Barme G. The role of urinary potassium in the pathogenesis and diagnosis of interstitial cystitis. *J Urol* 1998; 159: 1862-1866; discussion 1866-1867
  132. Parsons CL, Greene RA, Chung M, Stanford EJ, Singh G. Abnormal urinary potassium metabolism in patients with interstitial cystitis. *J Urol* 2005; 173: 1182-1185
  133. Parsons CL, Lilly JD, Stein P. Epithelial dysfunction in nonbacterial cystitis (interstitial cystitis). *J Urol* 1991; 145: 732-735

134. Pashootan P, Ploussard G, Cocaul A, de Gouvello A, Desgrandchamps F. Association between metabolic syndrome and severity of lower urinary tract symptoms (LUTS): an observational study in a 4666 European men cohort. *BJU Int* 2015; 116: 124-130
135. Pfreundschuh M, Schölmerich J. *Pathophysiologie, Pathobiochemie*. 2. Auflage, Urban & Fischer, 2004.
136. Pinggera GM, Mitterberger M, Steiner E, Pallwein L, Frauscher F, Aigner F, Bartsch G, Strasser H. Association of lower urinary tract symptoms and chronic ischaemia of the lower urinary tract in elderly women and men: assessment using colour Doppler ultrasonography. *BJU Int* 2008; 102: 470-474
137. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 1992; 71: 343-353
138. Ponholzer A, Temml C, Wehrberger C, Marszalek M, Madersbacher S. The association between vascular risk factors and lower urinary tract symptoms in both sexes. *Eur Urol* 2006; 50: 581-586
139. Poston RN, Haskard DO, Coucher JR, Gall NP, Johnson-Tidey RR. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 1992; 140: 665-673
140. Price DT, Loscalzo J. Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *Am J Med* 1999; 107: 85-97
141. Pschyrembel W, *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. 259. Auflage, de Gruyter, 2002.
142. Reddick RL, Zhang SH, Maeda N. Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 141-147
143. Reddy KS, Yusuf S. Emerging epidemic of cardiovascular disease in developing countries. *Circulation* 1998; 97: 596-601
144. Reeves P, Irwin D, Kelleher C, Milsom I, Kopp Z, Calvert N, Lloyd A. The current and future burden and cost of overactive bladder in five European countries. *Eur Urol* 2006; 50: 1050-1057
145. Renz-Polster H. KS, Braun J. *Basislehrbuch Innere Medizin*. 3. Auflage, Elsevier Urban & Fischer,
146. Ricci JA, Baggish JS, Hunt TL, Stewart WF, Wein A, Herzog AR, Diokno AC. Coping strategies and health care-seeking behavior in a US national sample of adults with symptoms suggestive of overactive bladder. *Clin Ther* 2001; 23: 1245-1259
147. Robinson D, Cardozo L. Overactive bladder: diagnosis and management. *Maturitas* 2012; 71: 188-193
148. Sagawa K, Aikawa K, Nomiya M, Ogawa S, Akaihata H, Takahashi N, Yamaguchi O, Kojima Y. Impaired detrusor contractility in a rat model of chronic bladder ischemia. *Urology* 2013; 81: 1379 e1379-1379 e1314
149. Saito M, Yokoi K, Ohmura M, Kondo A. Effects of ligation of the internal iliac artery on blood flow to the bladder and detrusor function in rat. *Int Urol Nephrol* 1998; 30: 283-292
150. Serati M, Salvatore S, Cattoni E, Soligo M, Cromi A, Ghezzi F. Ultrasound measurement of bladder wall thickness in different forms of detrusor overactivity. *Int Urogynecol J* 2010; 21: 1405-1411
151. Shefchyk SJ. Sacral spinal interneurons and the control of urinary bladder and urethral striated sphincter muscle function. *J Physiol* 2001; 533: 57-63
152. Shenfeld OZ, Meir KS, Yutkin V, Gofrit ON, Landau EH, Pode D. Do atherosclerosis and chronic bladder ischemia really play a role in detrusor dysfunction of old age? *Urology* 2005; 65: 181-184

153. Shiomi M, Ito T, Yamada S, Kawashima S, Fan J. Development of an animal model for spontaneous myocardial infarction (WHHLMI rabbit). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1239-1244
154. Speakman MJ, Brading AF, Gilpin CJ, Dixon JS, Gilpin SA, Gosling JA. Bladder outflow obstruction--a cause of denervation supersensitivity. *J Urol* 1987; 138: 1461-1466
155. Spitsbergen JM, Clemow DB, McCarty R, Steers WD, Tuttle JB. Neurally mediated hyperactive voiding in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res* 1998; 790: 151-159
156. Statistisches Bundesamt; <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/EckdatenTU.html>, 10.10.2015
157. Steers WD. Pathophysiology of overactive bladder and urge urinary incontinence. *Rev Urol* 2002; 4 Suppl 4: S7-S18
158. Steers WD, Clemow DB, Persson K, Sherer TB, Andersson KE, Tuttle JB. The spontaneously hypertensive rat: insight into the pathogenesis of irritative symptoms in benign prostatic hyperplasia and young anxious males. *Exp Physiol* 1999; 84: 137-147
159. Steers WD, Tuttle JB. Mechanisms of Disease: the role of nerve growth factor in the pathophysiology of bladder disorders. *Nat Clin Pract Urol* 2006; 3: 101-110
160. Stevens LA, Chapple CR, Chess-Williams R. Human idiopathic and neurogenic overactive bladders and the role of M2 muscarinic receptors in contraction. *Eur Urol* 2007; 52: 531-538
161. Stewart WF, Van Rooyen JB, Cundiff GW, Abrams P, Herzog AR, Corey R, Hunt TL, Wein AJ. Prevalence and burden of overactive bladder in the United States. *World J Urol* 2003; 20: 327-336
162. Stolz E, Yeniguen M, Kreisel M, Kampschulte M, Doenges S, Sedding D, Ritman EL, Gerriets T, Langheinrich AC. Angioarchitectural changes in subacute cerebral venous thrombosis. A synchrotron-based micro- and nano-CT study. *Neuroimage* 2011; 54: 1881-1886
163. Streng T, Hedlund P, Talo A, Andersson KE, Gillespie JI. Phasic non-micturition contractions in the bladder of the anaesthetized and awake rat. *BJU Int* 2006; 97: 1094-1101
164. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 2006; 86: 515-581
165. Temml C, Heidler S, Ponholzer A, Madersbacher S. Prevalence of the overactive bladder syndrome by applying the International Continence Society definition. *Eur Urol* 2005; 48: 622-627
166. Tubaro A. Defining overactive bladder: epidemiology and burden of disease. *Urology* 2004; 64: 2-6
167. U.S. Census Bureau International Data Base. <http://www.census.gov/ipc/>.
168. Uvin P, Everaerts W, Pinto S, Alp, zar YA, Boudes M, Gevaert T, Voets T, Nilius B, Talavera K, De Ridder D. The Use of Cystometry in Small Rodents: A Study of Bladder Chemosensation. *J Vis Exp* 2012; e3869
169. van Kerrebroeck P, Abrams P, Chaikin D, Donovan J, Fonda D, Jackson S, Jennum P, Johnson T, Lose G, Mattiasson A, Robertson G, Weiss J. The standardisation of terminology in nocturia: report from the Standardisation Sub-committee of the International Continence Society. *Neurourol Urodyn* 2002; 21: 179-183
170. Vaughan CP, Johnson TM, 2nd, Ala-Lipasti MA, Cartwright R, Tammela TL, Taari K, Auvinen A, Tikkinen KA. The prevalence of clinically meaningful overactive bladder: bother and quality of life results from the population-based FINNO study. *Eur Urol* 2011; 59: 629-636
171. Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the vulnerable plaque. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: C13-18

172. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1262-1275
173. Wagner R, Van Loo D, Hossler F, Czymmek K, Pauwels E, Van Hoorebeke L. High-Resolution Imaging of Kidney Vascular Corrosion Casts with Nano-CT. *Microscopy and Microanalysis* 2011; 17: 215-219
174. Watanabe K, Shibuya S, Ozawa Y, Nojiri H, Izuo N, Yokote K, Shimizu T. Superoxide dismutase 1 loss disturbs intracellular redox signaling, resulting in global age-related pathological changes. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 140165
175. Watanabe Y. Serial inbreeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHL-rabbit). *Atherosclerosis* 1980; 36: 261-268
176. Williams CL, Hayman LL, Daniels SR, Robinson TN, Steinberger J, Paridon S, Bazzarre T. Cardiovascular health in childhood: A statement for health professionals from the Committee on Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in the Young (AHOY) of the Council on Cardiovascular Disease in the Young, American Heart Association. *Circulation* 2002; 106: 143-160
177. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation* 1998; 97: 1837-1847
178. World Health Organization, Global Health Observatory Data Repository, *Causes of deaths, 2012*: <http://apps.who.int/gho/data/node.main.CODWORLD?lang=en>, 10.10.2015
179. Yamamoto T, Tada T, Brodsky SV, Tanaka H, Noiri E, Kajiya F, Goligorsky MS. Intravital videomicroscopy of peritubular capillaries in renal ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 282: F1150-1155
180. Yokoi K, Ohmura M, Kondo A, Miyake K, Saito M. Effects of in vivo Ischemia on the infusion cystometry and in vitro whole bladder contractility of the rat. *Hinyokika Kiyo* 1996; 42: 117-122
181. Yoshida M, Masunaga K, Nagata T, Satoji Y, Shiomi M. The effects of chronic hyperlipidemia on bladder function in myocardial infarction-prone Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHLMI) rabbits. *Neurourol Urodyn* 2010; 29: 1350-1354
182. Yoshida M, Masunaga K, Nagata T, Yono M, Homma Y. The forefront for novel therapeutic agents based on the pathophysiology of lower urinary tract dysfunction: pathophysiology and pharmacotherapy of overactive bladder. *J Pharmacol Sci* 2010; 112: 128-134
183. Yoshimura N, Chancellor MB. Neurophysiology of lower urinary tract function and dysfunction. *Rev Urol* 2003; 5 Suppl 8: S3-S10
184. Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S. Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation* 2001; 104: 2746-2753
185. Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S. Global burden of cardiovascular diseases: Part II: variations in cardiovascular disease by specific ethnic groups and geographic regions and prevention strategies. *Circulation* 2001; 104: 2855-2864
186. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 1992; 258: 468-471
187. Zhao Y, Liang Z, Zhu H, Han H, Duan C, Yan Z, Lu H, Gu X. Bladder wall thickness mapping for magnetic resonance cystography. *Phys Med Biol* 2013; 58: 5173-5192

---

## PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

### Originalarbeiten

Bschleipfer T, Dannenmaier AK, Illig C, Kreisel M, Gattenlohner S, Langheinrich AC, Krombach GA, Weidner W, Kampschulte M. *Systemic Atherosclerosis Causes Detrusor Overactivity: Functional and Morphological Changes in Hyperlipoproteinemic apoE<sup>-/-</sup>LDLR<sup>-/-</sup> Mice*. J Urol (Jan 2015) Vol. 193, Issue 1, 345-351, <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2014.08.098>

### Vorträge

Dannenmaier AK, Illig C, Weidner W, Kreisel M, Langheinrich A, Kampschulte M, Bschleipfer T. *Cystomanometrische und computertomographische Veränderungen der Blase bei Mäusen mit ApoE-LDL-Rezeptordefizienz*. 53. Jahrestagung der Südwestdeutschen Gesellschaft für Urologie e. V., Wiesbaden, 2012, Club 35

Bschleipfer T, Dannenmaier AK, Illig C, Weidner W, Kreisel M, Gattenlöhner S, Langheinrich A, Kampschulte M. *Systemische Arteriosklerose und Blasenüberaktivität – Computertomographische und histomorphologische Veränderungen der Blasenwand im Mausmodell*. 64. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie (DGU), Leipzig, 2012

Bschleipfer T, Dannenmaier AK, Illig C, Weidner W, Kreisel M, Gattenlöhner S, Langheinrich A, Kampschulte M. *Systemische Arteriosklerose und Blasenüberaktivität – Computertomographische und histomorphologische Veränderungen der Blasenwand im Mausmodell*. 23. Jahrestagung des Forum Urodynamicum e. V., Zürich, 2012

### Poster

Bschleipfer T, Dannenmaier AK, Illig C, Weidner W, Langheinrich A, Kampschulte M. *Functional and morphological changes of the urinary bladder in mice suffering from atherosclerosis*. 27th Annual EAU Congress, Paris, 2012

**Preise**

„Poster of the day“ der Deutschen Gesellschaft für Urologie (2011)

63. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie (DGU), Hamburg

„Poster of the day“ der Deutschen Gesellschaft für Urologie (2012)

64. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Urologie (DGU), Leipzig

---

## EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

---

## DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Dr. Thomas Bschleipfer möchte ich ganz herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und die Begeisterung hierfür danken. Vielen Dank für deine Ideen, deine große Hilfe beim Entstehen dieser Arbeit, für deine Geduld mit mir und deine Mühe dafür, dass diese Arbeit am Ende so geworden ist, wie sie jetzt ist.

Prof. Dr. Alexander Langheinrich und Dr. Marian Kampschulte aus der Abteilung für Diagnostische und Interventionelle Radiologie gilt großer Dank für die Möglichkeit der Untersuchung der Harnblasen im Nano-CT und die große Unterstützung, dass der radiologische Teil dieser Arbeit so gut gelang.

Ohne die Einarbeitung, tatkräftige Hilfe, fachliche und persönliche Unterstützung durch Christian Illig und Stefan Möller wäre diese Arbeit niemals gelungen. Lieber Christian, dir gilt hier sowieso der größte Dank.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Gunhild Martels, die maßgeblich an der Entstehung der tollen Nano-CT Bilder beteiligt war, die jederzeit für Fragen fachlicher oder persönlicher Natur bereit stand und mir auch sonst eine große Hilfe war.

Auch bei den Mitarbeitern des Instituts für Anatomie und Zellbiologie möchte ich mich herzlich bedanken, die mir bei Fragen und Problemen jederzeit immer gerne und tatkräftig zur Seite standen. Vielen Dank auch den Mitarbeitern des zentralen Tierstalls, in dem meine Mäuse immer gut versorgt wurden.

Auch einen großen Dank an meinen Oberarzt Herrn Dr. Dirk Grothues, der mir in den letzten Zügen der Arbeit unerwarteter Weise zur Seite stand.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, die mir das Studium ermöglichten. Danke dafür, dass Ihr immer für uns Kinder da seid und uns eure große Unterstützung in jeder Lebenslage zukommen lasst. Vielen Dank auch bei meinen Freunden, Kommilitonen und „Leidensgenossen“, deren Aufmunterung, Ratschläge, Tipps und Ansporn ich immer gut gebrauchen konnte. Und „last but not least“ muss ich mich noch bei meiner WG-Anja bedanken. Ohne dich, deine kompetenten Ratschläge und dein Büro hätte ich den Endspurt nie geschafft und wäre wahrscheinlich sowieso verhungert.