

Aus dem Physiologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. U. Pohl

**Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung von
venulären Endothelzellen der menschlichen myokardialen
Mikrozirkulation**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Ekkehard Benno Reichenbach-Klinke
aus München

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. S. Nees

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Chr. Kupatt

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung 06.03.2008

Inhaltsverzeichnis

Einleitung und Zielsetzung	1
Material und Methoden	12
<u>Material</u>	12
Verbrauchsmaterialien und Bezugsquellen	12
Chemikalien und Bezugsquellen	12
Reagenzien für Immunhistologie	13
Lösungen	13
Dichtegradienten	15
Kulturmedien	16
Geräte und Lieferanten	16
Materialien für Filtrationsstudien	17
<u>Methoden</u>	18
1. Isolation und Kultivation venulärer Endothelzellen aus Mäuseherzen	18
1.1. Herzpräparation und proteolytische Gewebedissoziation	18
1.2. Anreicherung der venulären Endothelzellen mittels Dichtegradientenzentrifugation	20
1.3. Herstellung spezieller Wachstumsmedien und Proliferation in Gewebekultur	20
2. Isolierung von venulären Endothelzellen aus menschlichen Explantatherzen	21
2.1. Vorbereitung der Herzen	21
2.2. Proteolytische Dissoziation von Myokardgewebe	23
2.3. Anreicherung von venulären Endothelzellen mittels Dichtegradientenzentrifugation	23
2.4. Zellkultur und spezifische Reinigung	24
2.5. Erstellen von Wachstumskurven	25
2.6. Einfrieren und Revitalisieren kultivierter Zellen	25
3. Gewinnung von weitgehend intakten Mikrogefäßnetzen aus dem Myokard des Menschen für histologische Zwecke	26
4. Identifizierung mikrovaskulärer Zellarten	28
4.1. Histologische Schnitte	28
4.2. Enzymhistochemische Nachweisverfahren	28
4.3. Immunfluoreszenzmikroskopische Techniken	29
4.4. Rasterelektronenmikroskopie	30
5. Messung der hydraulischen Konduktivität konfluenter Endothelschichten	31

Ergebnisse	33
1. Identifizierung mikrovaskulärer Gefäßsegmente in Myokardschnitten und Gefäßen (Maus, Mensch)	33
2. Versuche zur Etablierung venulärer Endothelzellen des Mäuseherzens in Gewebekultur	39
3. Etablierung und Langzeitkultur reiner Zellkulturen venulärer Endothelzellen aus menschlichen Explantatherzen	46
4. Identifizierung venulärer Endothelzellen	57
5. Optimierung eines Filtersystems zur Messung hydraulischer Konduktivität von bis zur Konfluenz gezüchteten Monolayern venulärer Endothelzellen	60
6. Orientierende Messung der hydraulischen Konduktivität konfluenter venulärer Endothelschichten unter verschiedenen Bedingungen	65
Diskussion	70
1. Myokardiale Gewebetextur	70
2. Isolierung venulärer Endothelzellen	71
3. Identifizierung venulärer Endothelzellen	75
4. Messung hydraulischer Konduktivitäten von Zellschichten	76
Zusammenfassung	80
Literatur	82
Lebenslauf	93
Danksagung	94

Einleitung und Zielsetzung

Das Endothel als luminale Deckschicht aller Blutgefäße bildet in seiner Gesamtheit gewissermaßen den eigentlichen Blutbehälter. Jeglicher Austausch zwischen dem Blutmilieu und den umgebenden Parenchymenten muss zwangsläufig über dieses strikt einschichtige Gewebe stattfinden. Besonders engen Kontakt mit dem Blut besitzt das Endothel der Endstrohmbahnen: hier stehen jeweils 5000 cm² Endotheloberfläche im Kontakt mit nur 1 ml Blut⁷⁷. Je nach dem Organsystem, in dem sich das jeweils betrachtete Mikrogefäßsystem entfaltet - im weiteren wird das Hauptaugenmerk vor allem dem mikrovaskulären Endothel des myokardialen Gefäßsystems gelten - und auch je nach der Größe des jeweils betrachteten Gefäßsegments, sei es makro- oder mikrovaskulär, haben die Endothelzellen offenbar unterschiedliche spezialisierte physiologische und morphologische Eigenschaften^{1, 2}. Auch gibt es bereits einige Berichte, die auf eine unterschiedliche Ausprägung des endothelialen Stoffwechsels in verschiedenen Provinzen des Kreislaufsystems hinweisen^{1, 2, 17}. Generell scheint es sich bei allen vaskulären Endothelien aber um recht stoffwechselaktive Gewebe zu handeln^{1, 2, 17, 90}.

Am besten sind bisher – wohl aus methodischen Gründen – Endothelgewebe größerer Arterien oder Venen untersucht worden. In den Mikrozirkulationssystemen der Organe erreicht das Kreislaufsystem aber seine höchste anatomische und funktionelle Ausprägung, und es liegt nahe, dass es gerade in den verschiedenen, jeweils auf besondere Funktionen ausgerichteten Segmenten der Mikrogefäßsysteme auch eine besondere funktionelle Spezialisierung des jeweils vorliegenden Endothels gibt, die dann auch besondere morphologische und histologische Eigenschaften bedingt^{1, 2}.

Die kleinsten mikrozirkulatorischen Einheiten des Gefäßsystems bestehen aus einer zuführenden Arteriole, einem sich anschließenden kleinen Kapillarnetz, und einer (oder mehreren) abführenden Venule. Die kleinsten postkapillären Venulen besitzen einen Durchmesser von 10-40 µm und münden in größere Sammelvenulen (Durchmesser 40-100 µm)¹⁰⁰. Der überwiegende Teil der zur Spezialisierung der entsprechenden Endothelien erschienenen Literatur bezieht sich auf das Endothel der Arteriolen, bekanntlich erstrecken sich deren spezielle Aufgaben vor allem auf die Regulation von Blutdruck und Blutfluß³⁶.

Das Endothel der Venulen hingegen ist vergleichsweise noch wenig erforscht. Erkenntnisse hierzu wurden fast ausschließlich aus in situ Beobachtungen geschöpft. Leider gibt es nur wenige Literaturberichte zur erfolgreichen Isolierung und Kultivierung spezifisch venulären Endothels^{73, 89}. Angesichts der herausragenden Bedeutung gerade dieser Endothelart bei der Pathogenese von Entzündung und Ödem, wie im folgenden noch ausgeführt werden soll, wäre

die Verfügbarkeit hochdifferenzierter Zellkulturen dieser Endothelart jedoch von besonderem, auch klinischem Interesse, weil das Gewebe dann unter den strikt kontrollierbaren in vitro-Bedingungen viel besser untersucht werden könnte.

Im Folgenden seien nun einige der wichtigsten physiologischen und morphologischen Besonderheiten dieses speziellen Endothels etwas näher beschrieben.

Bereits in morphologischer Hinsicht besitzt venuläres Endothel sehr typische Merkmale, die zur Unterscheidung von Endothelien anderer Gefäßprovinzen beitragen. In ultrastruktureller Hinsicht erwähnenswert sind vor allem die sogenannten Vesikulo-vakuolären Organellen (VVO). 16-18 % des Zytoplasmas einer normalen venulären Endothelzelle wird von diesen Zellorganellen eingenommen. Sie umschließen ca. 100-400 einzelne Vesikel. Ein solcher „Vesikel-Cluster“ hat eine Ausdehnung von ca. 1-2 μm , ein einzelnes Vesikel hat einen Durchmesser von ca. 100 nm. Die Vesikel können untereinander kommunizieren, einige kommunizieren auch offen oder mit einem Diaphragma verschlossen mit der luminalen bzw. abluminalen Oberfläche^{23, 25, 26}. Nach Meinung dieser Autoren stellen diese speziellen Organellen einen transzellulären Transportweg für lösliche Makromoleküle dar, wie dies experimentell für Ferritin und Meerrettichperoxidase nachgewiesen werden konnte²³. Auch sollen die VVO als spezifische Zellorganellen des venulären Endothels an der Regulation der Durchlässigkeit einer Venulenwand beteiligt sein^{23, 25, 26}.

Vorbedingung für die in vitro Untersuchung venulärer Endothelzellen ist die Möglichkeit, sie mit spezifischen Markern eindeutig von Endothelzellen anderer Gefäßregionen zu unterscheiden, d.h. sie eindeutig als Endothelzellen venulärer Provenienz zu identifizieren. Andererseits kann auch das Fehlen von spezifischen Markern von Endothelgeweben in anderen Gefäßregionen noch ein spezifisches Merkmal für ein gerade betrachtetes spezielles Endothel sein. So soll z.B. das venuläre Endothel der Ratte in situ bestimmte Proteoglykane (wahrscheinlich der endothelialen Glykokalyx) nicht besitzen, die arterioläre oder kapilläre Endothelzellen auszeichnen. Letzteres ist beispielsweise im Hinblick auf Proteoglykane der Fall, die das Lektin WGA (wheat germ agglutinin) an das Endothel von Arteriolen und Kapillaren, nicht aber an venuläres Endothel der Ratte binden⁹⁹. Ein Marker, der aber offenbar hochselektiv nur vom postkapillären Endothel entfaltet wird, ist dagegen ein spezielles Enzym: die Dipeptidylaminopeptidase IV (CD26)^{7, 33, 57}. Es handelt sich um eine membrangebundene Ektopeptidase, die Dipeptide von Proteinen abspalten kann, sofern sich ein Prolin in der vorletzten Position des NH_2 -terminalen Endes der Peptidkette befindet³⁷.

Andere spezifische Marker venulärer Endothelgewebe stehen in engem Zusammenhang mit der übergeordneten Hauptfunktion dieses Gewebes, der Rekrutierung der Masse aller zellulären und humoralen Komponenten der Immunabwehr vom Blut ins Gewebe zu dienen. Als mit speziellen Antikörpern nachweisbare, schon konstitutiv vorhandene Marker können vor allem die Leukozytenadhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und die P- und E-Selektine dienen¹⁰⁰. Nach Einwirkung von Entzündungsmediatoren, wie z.B. Histamin, Serotonin, IL-1, TNF- α oder LPS werden diese schon konstitutiv vorhandenen Adhäsionsmoleküle für Leukozyten rasch vermehrt an der Oberfläche speziell postkapillärer Venulen ausgeprägt¹². P-Selektin wird zusammen mit FVIII:Ag in Weibel-Palade Körperchen gespeichert und auf einen inflammatorischen Reiz hin an die Zelloberfläche gebracht, die anderen genannten Moleküle werden nicht intrazellulär gespeichert, ihre Transskription wird nach Stimulation jedoch rasch gesteigert^{43, 100}. Das Zytokin IL-8 wird auch von der venulären Endothelzelle auf einen Entzündungsreiz hin synthetisiert und an der Zelloberfläche exprimiert^{72, 108}. Dem venulären Endothel kommt also eine ganz herausragende Stellung bei der Rekrutierung aller Leukozyten für die Immunantwort zu.

Der Vorgang der Leukozytenadhäsion, der unabhängig von hämodynamischen Faktoren ist⁵⁴, lässt sich, wie in Abb.1 für die Rekrutierung von polymorphonukleären Granulozyten (PMN) schematisch skizziert in mehrere Stufen untergliedern^{12, 19, 55, 68, 95}:

- 1) Initialer Kontakt eines normalerweise nur im Blutstrom vorbeischwimmenden Leukozyten mit der Endotheloberfläche vermittelt durch die Interaktion von P-Selektin der aktivierten venulären Endothelzelle mit dem konstitutiv auf Leukozyten vorkommenden mucinähnlichen PSGL-1 Molekül einerseits und von endothelalem E-Selektin und L-Selektin des ruhenden Leukozyten mit korrespondierenden Strukturen der jeweils anderen an der Interaktion beteiligten Zelle andererseits. Der P-Selektin-Bindung kommt hierbei einigen Untersuchungen zufolge die größte Bedeutung zu^{55, 69, 79}.
- 2) Aktivierung der nun Selektin-vermittelt auf der Gefäßwand entlang rollenden Leukozyten durch vom Endothel freigesetzte, chemotaktisch wirksame Zytokine, wie z.B. IL-8 oder PAF^{46, 49, 94}. Auch die Bindung von E-Selektin an unstimulierte Leukozyten kann möglicherweise bereits eine solche Aktivierung verursachen^{12, 94}. Aufgrund der Aktivierung des Leukozyten erfahren die leukozytären Integrine LFA-1 und Mac-1 eine Konformationsänderung, die ihre Affinität zum endothelialen ICAM-1-Molekül erhöht. Zusätzlich wird die Menge des an der leukozytären Zelloberfläche präsentierten Mac-1 erheblich gesteigert^{12, 95}.

- 3) Festere Adhäsion durch Bindung der Integrine LFA-1 und Mac-1 des aktivierten Leukozyten an ICAM-1-Moleküle der venulären Endothelzellen.
- 4) Transendotheliale Migration des Leukozyten in das umliegende Gewebe unter maßgeblicher Beteiligung des immunglobulinähnlichen PECAM-1-Moleküls, das in den entstandenen interendothelialen Lücken^{15, 19, 46, 49, 74} und auch auf PMNs^{15, 19, 74} lokalisiert sein kann.

Im Zusammenhang mit dem zur Emigration der Leukozyten ins entzündete Gewebe führenden Prozess der Diapedese kommen auch noch andere Eigenschaften der venulären Endothelzelle ins Spiel. So besitzt das venuläre Endothel im Gegensatz zu allen anderen Endothelarten auch kontraktile Eigenschaften^{5, 32}. Venuläre Endothelzellen sind durch besonders hohe Aktin-, Myosin- und Tropomyosinkonzentrationen gekennzeichnet, eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels bewirkt -vergleichbar einer glatten Muskelzelle- eine Aktivierung der Myosin-Leichte-Ketten-Kinase durch einen Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex und letztendlich eine Kontraktion der Zelle^{6, 8, 31, 109, 110}. Diese kontraktile Elemente finden sich vor allem in der Nähe von Zellverbindungen^{31, 35, 49}. Interessanterweise kommen hier auch Histaminrezeptoren gehäuft vor³⁵, die wiederum auf arteriolärem oder kapillärem Endothel kaum zu finden sind - ein weiterer Hinweis auf die Spezialisierung des venulären Endothels in funktioneller Hinsicht. So werden unter dem Einfluß von Entzündungsmediatoren aktiv Interzellularspalten geöffnet- nicht nur eine Voraussetzung für die Diapedese eines angehefteten Leukozyten, sondern auch die Basis für die Extravasion von Plasmabestandteilen⁶⁷ im Zuge der Ödementstehung. Hervorhebenswert ist in diesem Zusammenhang auch eine ältere Arbeit, die vorausschauend innovative Ansätze in der antiinflammatorischen Therapie diskutiert, die bis heute aktuell geblieben sind. Danach könnten die kontraktile Elemente bzw. die Signaltransduktionswege, die letztendlich die Kontraktion der venulären Endothelzelle bewirken, Angriffspunkt neuartiger Pharmaka sein, die die entzündungsbedingte Steigerung der Gefäßpermeabilität unabhängig von auslösenden Faktoren herabsetzen³¹.

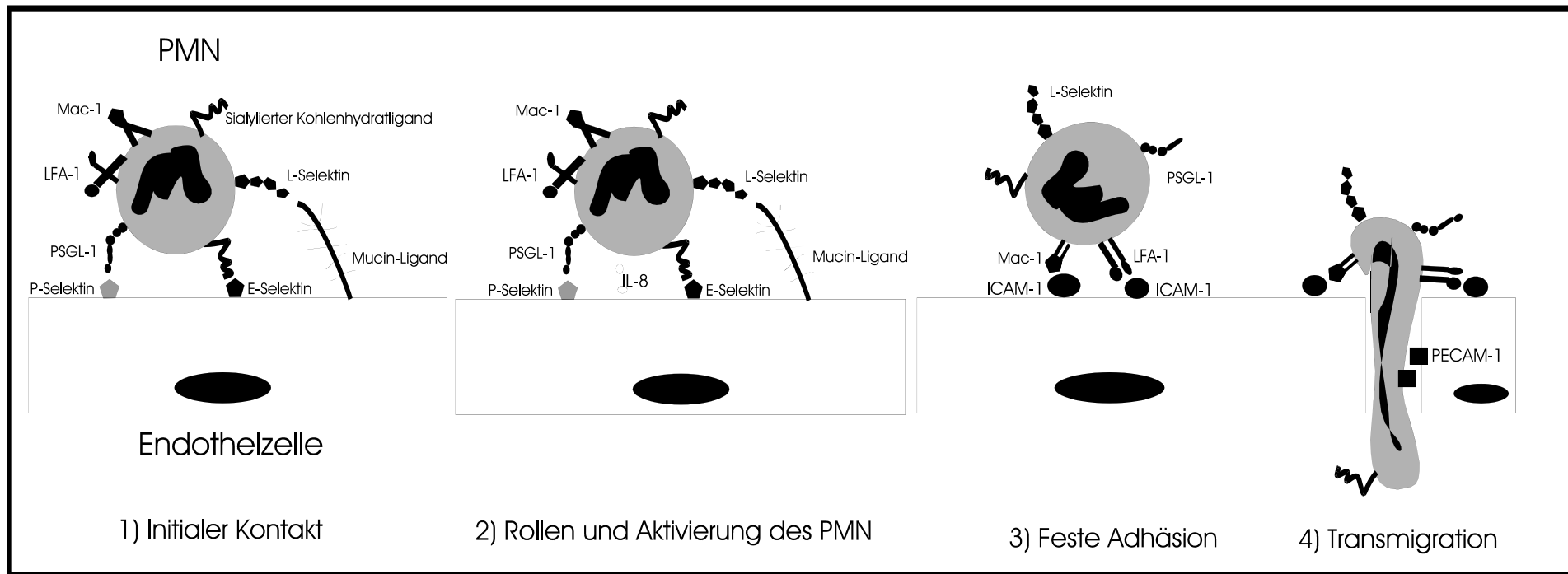


Abb. 1: Schema eines 4-Stufen-Modells zur Adhäsion und Transmigration eines polymorphkernigen bzw. neutrophilen Granulozyten (PMN) durch eine venuläre Endothelschicht. Einzelheiten siehe Text.

In Vergleich mit Arbeiten, die sich mit der Interaktion zwischen venulärem Endothel und Leukozyten beschäftigen, sind Arbeiten über Wechselwirkungen zwischen Endothel und Thrombozyten vergleichsweise selten. Bemerkenswerterweise besitzen aber auch Plättchen mit Oberflächenmolekülen, wie LFA-1²⁹, PECAM-1^{65, 67}, PSGL-1²⁸ und mit sLe^x mögliche Liganden für E-Selektin¹² und sie können deshalb in ganz ähnlicher Weise wie die Leukozyten mit Endothelzellen interagieren. Auch Thrombozyten können deshalb an der Endotheloberfläche entlangrollen^{3, 29} (hierbei spielt neueren Untersuchungen zufolge auch die Interaktion zwischen dem von aktivierten Endothelzellen präsentierten vWF und dem thrombozytären Glycoprotein IIb/IIIa eine Rolle³), fest adhären^{29, 65, 103} und schließlich das Gefäßlumen verlassen. Letzteres geschieht einigen Untersuchungen zufolge auch auf transzellulärem Wege²⁷. Analoge direkte Wechselwirkungen können auch zwischen Plättchen und PMN stattfinden: PMN können beispielsweise im Bereich einer Gefäßverletzung auf einer Schicht adhärenter aktivierter Plättchen wie auf einer Endothelschicht vermittelt durch die Interaktion von P-Selektin des aktivierten Thrombozyten mit leukozytärem PSGL-1 entlangrollen^{10, 12, 24}. Durch Zytokine (z.B. PAF¹⁰⁶), wahrscheinlich aber auch bereits durch diese lockere Bindung vermittelt kann der rollende PMN aktiviert werden^{24, 29} und jetzt durch Bindung der leukozytären Integrine LFA-1 an thrombozytäres ICAM-2^{45, 106} und Mac-1 an einen thrombozytären Liganden fest adhären^{10, 12, 24}. Umgekehrt können aber auch aktivierte Plättchen indirekt durch Interaktion mit einem auf einer Endothelzelle adhärenen PMN an der Gefäßwand gebunden werden¹⁰³. Derartige zelluläre Interaktionen werden heute zunehmend auch zur Erklärung atherosklerotischer Läsionen herangezogen. Atherosklerose wird als chronisch entzündlicher Prozess diskutiert, in dem Leukozyten, speziell Monozyten mit strukturell, nicht aber funktionell intaktem arteriellem Endothel interagieren. In vivo konnte gezeigt werden, dass zirkulierende aktivierte Thrombozyten, wie sie im Blut von Arteriosklerose-Patienten beobachtet werden, über die zuvor geschilderten Mechanismen die Rekrutierung von Monozyten in atherosklerotischen Arterien fördern können und somit die Bildung arteriosklerotischer Läsionen in Apolipoprotein-E defizienten Mäusen beschleunigen können³⁸.

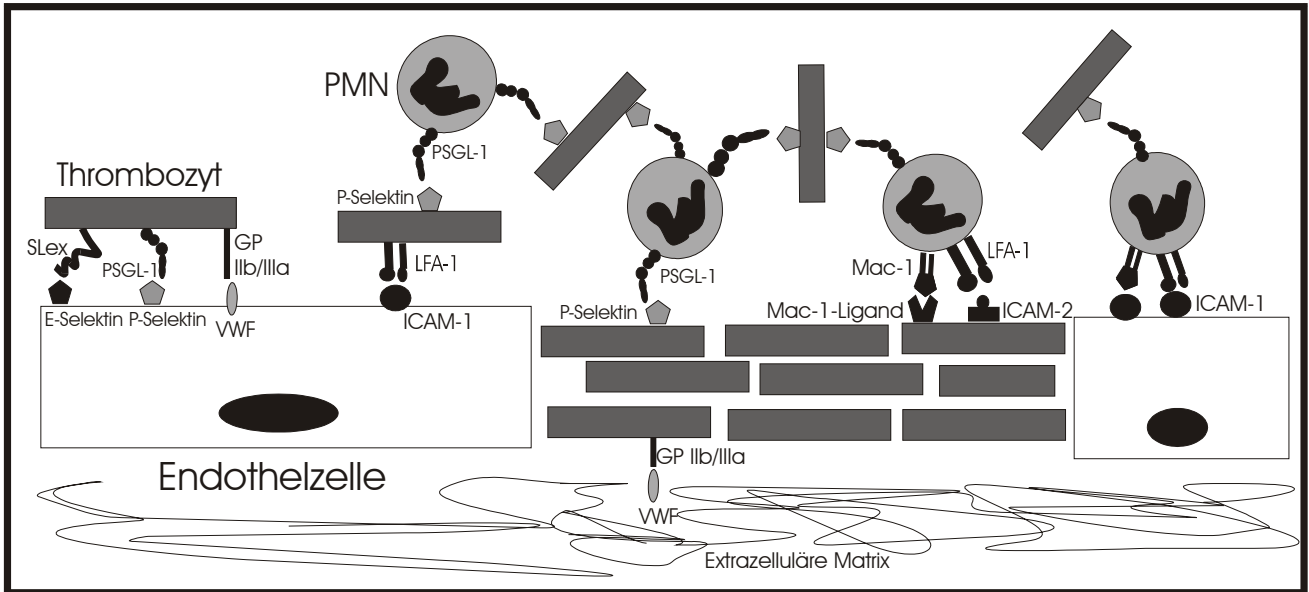


Abb.2: Schema zur Interaktion zwischen venulären Endothelzellen, Thrombozyten und PMN. Den Thrombozyten kommt eine bislang wenig diskutierte Brückenfunktion bei der Bildung inflammatorischer Zellaggregate zu. Weitere Einzelheiten siehe Text.

Es würde den Rahmen dieser Einleitung sprengen detailliert die bis heute bekannten Pathomechanismen von Entzündung und Ödembildung erschöpfend darzulegen. Doch sei auch hierzu noch cursorisch auf einige interessante Aspekte eingegangen, die in der Literatur bisher kaum Berücksichtigung finden.

Zunächst muß man sich vor Augen führen, daß das Mikrogefäßsystem ein dreidimensionales Geflecht darstellt, bei dem folglich Venulen auch direkt neben besonders reichhaltig mit Perizyten ausgestatteten Kapillaren oder Arteriolen zu liegen kommen. Nun ist die antithrombogene Potenz eine sehr komplex angelegte physiologische Eigenschaft aller Endothelarten des Gefäßsystems⁸⁶. Wie aus dem folgenden Schema (Abb.3) ersichtlich ist, wird es erst durch das intakte Endothel mit seinen antiaggregatorischen, antikoagulatorischen und profibrinolytischen Eigenschaften ermöglicht, daß das zirkulierende Blut flüssig bleibt. Unter bestimmten Voraussetzungen, z.B. bei der mechanischen Verletzung eines Gefäßes, ist es jedoch von vitaler Bedeutung, daß hämostatische Prozesse in Gang kommen. Jetzt kommen die prothrombogenen Eigenschaften tieferer Wandschichten zum Tragen, die sonst durch das Endothel vom Blutmilieu abgeschirmt werden. Bei Kontakt des Blutes mit diesen subendothelialen Strukturen, insbesondere den mit großen Mengen an Gewebefaktor ausgestatteten Perizyten⁹ kommt es zur Koagulation des Blutes.

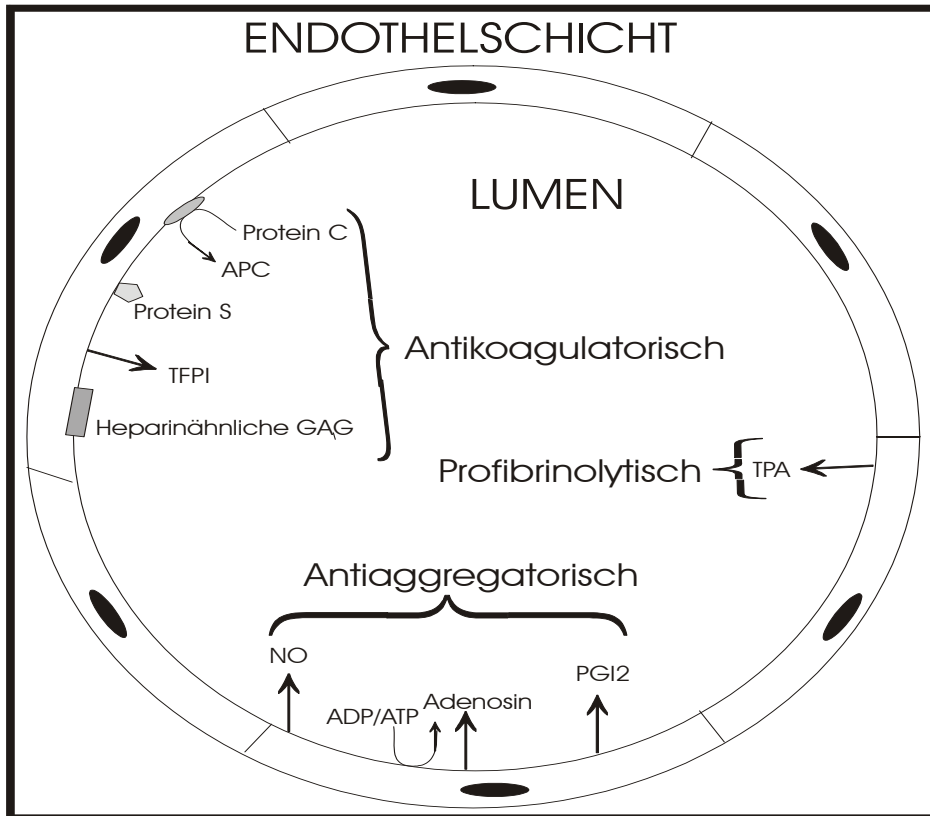


Abb. 3: Stark vereinfachtes Schema zur antithrombotischen Potenz von Endothelzellen. Endothelzellen können die antiaggregatorisch wirksamen Substanzen Adenosin, Stickstoffmonoxid (NO), und Prostacyclin (PGI₂) in das Gefäßlumen freisetzen.

Endothelzellen können die Blutgerinnung hemmen, also antikoagulatorisch wirken, indem sie Gewebefaktor-Inhibitor (TFPI) freisetzen. Endothelgebundene heparinähnliche Glycosaminoglykane (GAG) (z.B. Heparan) katalysieren außerdem die Elimination von Thrombin durch Bindung an Antithrombin III. Endotheliales Thrombomodulin kann schließlich Protein C zu APC aktivieren, welches dann im Komplex mit endothelgebundenem Protein S die Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa inaktivieren kann⁸⁶.

Durch einen gewebespezifischen Plasminogenaktivator (TPA) können Endothelzellen die Fibrinolyse fördern, also auch noch profibrinolytisch wirken.

Ähnlich wie bei einer traumatischen Verletzung der Gefäßwand können auch nach aktiver Öffnung von Interzellularspalten des venulären Endothels subendotheliale Gewebeschichten freigelegt werden. Zum einen können jetzt Thrombozyten an Proteinen der extrazellulären Matrix, wie z. B. Kollagen oder Fibronectin adhären^{40, 62}, zum anderen kann der freigelegte

Gewebefaktor, beispielsweise von Perizyten eines benachbarten Kapillarnetzes, die ihre konstitutive Gewebefaktorkonzentration nach Einfluß von Entzündungsmediatoren sogar noch steigern⁹, nun im Komplex mit dem Gerinnungsfaktor VIIa über den extrinsischen Mechanismus der Blutgerinnung letztendlich die Bildung von Fibrin auslösen^{40, 62, 86}. Es kommt zur Thrombembolisierung der betroffenen Venule, die Durchblutung des Herdbereiches wird somit gedrosselt. Unter diesem funktionellen Aspekt ist besonders hervorzuheben, daß das in den Mikrogefäßen befindliche Blut, auch in den Venulen in einem sehr engen Kontakt mit der Gefäßwand steht: Der Quotient Endotheloberfläche zu Blutvolumen ist hier, wie auch in den Kapillaren besonders hoch. Auch aufgrund des nach Ausströmen von Plasmabestandteilen durch entstandene Lücken in der Endothelschicht entstehenden Ödems und des dadurch gestiegenen interstitiellen Druckes kann der Blutzufuß in den Bereich des Entzündungsgeschehens durch Kompression der zuführenden arteriellen Gefäße eingeschränkt werden. Bemerkenswerterweise werden jedoch die initialen Lymphgefäße des Herzens mit Hilfe feiner Ankerfilamente offengehalten¹¹. Unter Ödembedingungen sind Lymphgefäße sogar dilatiert⁸⁷.

Für einige Substanzen, wie z.B. Acetylcholin, Serotonin oder Thrombin wurde eine früher paradox erscheinende Wirkung nachgewiesen⁵⁹: bei Applikation von der luminalen Seite her kann eine endothelvermittelte dilatative Wirkung auf ein Blutgefäß^{56, 66}, bei Applikation von der abluminalen Seite her, also bei direktem Einfluß auf die glatte Gefäßmuskulatur z.B. einer Arteriole kann dagegen eine vasokonstriktorische Wirkung beobachtet werden⁶⁶. Gelangt eine solche Verbindung im Gefolge der Ödementstehung in den Intervasalraum, kommt es folglich zur Konstriktion umliegender Arteriolen und damit zur Drosselung des arteriellen Zuflusses in den erkrankten Bereich. Man kann diesen Vorgang als einen selbstregulierenden Prozeß zur Abschottung eines Entzündungsherdens begreifen.

Schließlich findet im Zentrum eines akuten Entzündungsherdens als Folge aller hier nur kurz geschilderten Mechanismen, die ihren Ausgang in der Rekrutierung der gesamten Immunabwehr durch das venuläre Endothel haben, keine Perfusion mehr statt- eine Tatsache, die den Pathologen als Phänomen lange bekannt ist, die aber die erst jetzt in Ansätzen erklärbar wird. Interessanterweise werden um sich greifende „Venulothrombose“ und „Venulitis“ neuerdings vermehrt als definitive Zeichen einer Abstoßung transplantierter Organe gewertet^{101, 102}, Prozesse, die gewissermaßen eine pathologische Entgleisung der eben geschilderten Venulenfunktionen darstellen.

Bereits in früheren Studien der Arbeitsgruppe um Prof. Nees am Physiologischen Institut der Universität München konnte die Öffnung von Interzellulargapen in venulären, aus Rinder-, Meerschweinchen- oder Rattenherzen etablierten Endothelzellschichten unter dem Einfluss von Freisetzungserzeugnissen aktivierter Thrombozyten und PMN erstmalig beobachtet werden. Auch konnte qualitativ mittels Zeitraffervideoaufnahmen der Einfluß von therapeutisch einsetzbaren Substanzen abgeschätzt werden, das Hauptaugenmerk galt hierbei der Stoffklasse der Flavonoide. Flavonoide erscheinen neueren Untersuchungen zufolge als hochpotente Antiphlogistika^{63, 71}, die beispielsweise in der Therapie der chronisch venösen Insuffizienz (CVI) schon lange eingesetzt werden⁹⁶. Es ist bekannt, daß die Expression der endothelialen Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin durch Flavonoide gehemmt wird^{30, 46} und die Zellaktivierung durch Hemmung von Phosphodiesterasen abgeschwächt wird⁶³. Doch war insgesamt zu Beginn der vorliegenden Arbeit in Bezug auf die Wirkung der Flavonoide auf die Dichtigkeit gerade von venulärem Endothelgewebe noch vergleichsweise wenig bekannt.

Natürlich erschien es besonders interessant, die funktionellen Besonderheiten myokardialer venulärer Endothellagen auch an Zellmaterial aus menschlichen, im Verlauf von Herztransplantationen erhaltenen Explantatherzen zu charakterisieren. Aus organisatorischen und logistischen Gründen (beschränkte Verfügbarkeit menschlicher Explantatherzen) war es jedoch sinnvoll zunächst auch auf ein geeignetes Tiermodell zurückzugreifen. Die Maus hat in den letzten Jahren aufgrund der Etablierung von Techniken zur Herstellung transgener Tiere eine enorme Bedeutung als Versuchstier erlangt. Auch im Zusammenhang mit Forschungsprojekten anderer Kollegen am Physiologischen Institut erschien es wünschenswert, Methoden zur Isolierung mikrovaskulärer Zellen aus dem Mäuseherzen aufzubauen.

Vor dem Hintergrund dieser weitgespannten, hier aber nur kurz dargestellten Zusammenhänge ging die vorliegende Dissertation von folgenden Zielsetzungen aus:

1. Anwendung spezifischer enzymhistochemischer Färbemethoden zur Identifizierung von Arteriolen, Kapillaren und Venulen im Ventrikelmyokard des Menschen und der Maus und in isolierten myokardialen Mikrogefäßnetzen dieser Spezies. Diese Studien sollten im Vergleich mit dem in dieser Hinsicht bereits gut charakterisierten Myokard des Rindes durchgeführt werden und der Vorbereitung geplanter Zellisolierungsverfahren dienen.

2. Adaptation eines Verfahrens zur Isolierung venulärer Endothelzellen aus dem Rindermuskard zur Isolierung von Venulen bzw. venulärem Endothel aus Mäuseherzen und menschlichen Explantatherzen (letztere wurden uns im Verlauf von Herztransplantationen am Klinikum Großhadern in Aussicht gestellt).
3. Pilotmäßige Versuche zur Etablierung reiner Kulturen venulärer Endothelzellen aus dem Herzen der Maus und/oder des Menschen.
4. Etablierung von konfluenten Endothelschichten venulären Ursprungs auf porösen Filtern und erste Erprobung eines neuartigen Filtrationssystems zur präzisen Erfassung hydraulischer Konduktivitäten von Gefäßwandgeweben.

Material und Methoden

Material

Verbrauchsmaterialien und Bezugsquellen

- ◆ Sterile Kulturschalen, 35 mm und 60 mm, sterile Zentrifugenröhrchen, 15 ml und 50 ml, sterile Pipetten, 2 ml, 5 ml und 10ml, 6-well-Multiwell-Platten, PET-Filtermembraneinsätze Porengröße 1 μm ($1,6 \times 10^6 / \text{cm}^2$) und 0,4 μm ($1,0 \times 10^8 / \text{cm}^2$); Falcon, Becton Dickinson, Lincoln Park, USA
- ◆ Sterile 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml Einmalspritzen, Kanülen und Dreiwegehähne; Braun, Melsungen
- ◆ Pipettenspitzen 100, 1000 und 2500 μl -Eppendorf-Pipetten, 1,5 ml, 2,5ml PP-Reaktionsgefäße; Eppendorf, Hamburg
- ◆ Cryotubes; Nunc, Wiesbaden
- ◆ Spritzenfilter, 0,2 μm und 0,45 μm Porenweite; Sartorius, Göttingen
- ◆ Faltenfilter Schleicher und Schuell, Dassel
- ◆ Viton- und Silikon- und Teflonschläuche; Labokron, Sinsheim
- ◆ Runde Deckgläschen, Durchmesser 42 mm; Helmut Saur Laborbedarf, Reutlingen
- ◆ Objektträger Superfrost; Menzel, Braunschweig
- ◆ Sterile Einmalskalpelle Feather Fig. 11 und Fig. 20; PfM- Produkte für die Medizin, Köln
- ◆ Chirurgisches Nahtmaterial Ethibond 3/0; Ethicon, Nordestedt

Chemikalien und Bezugsquellen

- ◆ Carbogen (95% O₂, 5% CO₂); Linde, München
- ◆ Sephadex G 75 und G 50; Pharmacia, Uppsala, Schweden
- ◆ Percoll, bovines Albumin, Papaverinhydrochlorid, Gelatine aus boviner Haut, D-Ribose, Taurin, Kreatin, Ficoll 70, fMLP, Histamin, ASMX-Phosphat, N,N-Dimethyl-Formamid, Fast-Blue-BB, Echtblausalz, Gly-Pro-Arg-Naphthylamid, DMSO; Sigma, Deisenhofen.
- ◆ Ethanol, Formaldehyd 30%, Glutardialdehyd 50%; Roth, Karlsruhe
- ◆ Narkoseäther; Hoechst, Frankfurt
- ◆ Polymorphoprep[®]; Nycomed Pharma, Oslo
- ◆ Fragmin[®]; Pharmacia, Erlangen

- ◆ Ketanest[®]; Parke-Davis, Berlin
- ◆ Rompun[®] 2 %; Bayer, Leverkusen
- ◆ Alle weiteren Chemikalien in p.A.-Qualität von Merck, Darmstadt

Reagenzien für Immunhistologie

- ◆ Anti- α -smooth muscle actin mAb clone 1A4, mouse ascites IgG, Cat.No. A2547, Sigma
- ◆ Anti vWF rabbit IgG .Cat.No. F3520, Sigma
- ◆ Anti-human vonWillebrand Factor sheep, FITC-conjugate: Serotec, Kidlington, GB
- ◆ Anti tissue factor mouse mAb (Cat. No. 4509) sowie rabbit pAb (Cat.No. 4502) american diagnostica, Greenwich, USA
- ◆ Anti- α -smooth muscle actin mAb clone 1A4, FITC Konjugat Cat.No. F3777, Sigma
- ◆ Anti-mouse IgG (Cat.No. A3562) und anti-rabbit (Cat.No. A3812) AP-Konjugat, Sigma
- ◆ Anti rabbit IgG TRITC Cat.No. T6778, Sigma
- ◆ Anti mouse IgG FITC Cat.No. F5262 Sigma, St.Louis
- ◆ Anti-mouse IgG Alexa Fluor 350, 488 und 546, Anti rabbit IgG Alexa Fluor 488 und 546, Anti goat IgG 546; Sytox Green: Molecular Probes, Eugene, USA
- ◆ Anti-mouse IgG AP-conjugate (Cat.No. A3562)
- ◆ DiIacLDL: Molecular Probes, Eugene, USA

Lösungen

- ◆ Krebs-Henseleit-Medium (KHM): NaCl 127 mM; KCl 4,6 mM; MgSO₄ 1,1 mM; KH₂PO₄ 1,2 mM; Glucose 8,3 mM; NaHCO₃ 24,8 mM; Pyruvat 2 mM; Kreatin 10 mM; Taurin 20 mM; Ribose 5 mM; Asparaginsäure 2 mM; L-Glutamin 2 mM; L-Arginin 1 mM; Harnsäure 0,05 mM. Lösung in bidestilliertem H₂O, mit Carbogengas auf pH 7,4 eingestellt.
- ◆ Earlesalt (ES): NaCl 142 mM; KCl 5,4 mM; NaH₂PO₄ 1 mM; MgSO₄ 0,8 mM; D-Glucose 5,5 mM. Lösung in bidestilliertem H₂O, mit NaOH eingestellt auf pH 7,4.
- ◆ Hepes-Konzentrat: Hepes 500 mM, 2% (w/v) bovines Albumin. Lösung in bidestilliertem H₂O, pH auf 7,2 eingestellt mit NaOH.

- ◆ ES-Konzentrat (20x): NaCl 2,84 M; KCl 108 mM; MgSO₄ 16 mM; NaH₂PO₄ 20 mM; Glucose 110 mM. Lösung in bidestilliertem H₂O, keine pH-Einstellung.
- ◆ Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS): NaCl 132 mM; NaH₂PO₄ 5 mM. Lösung in bidestilliertem H₂O, mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt.
- ◆ Kardioplegische Lösung: NaCl 15 mM; Kaliumhydrogen-2-ketoglutarat 1 mM; MgCl₂·6H₂O 4 mM; Histidin-HCl-H₂O 18 mM; Histidin 180 mM; Tryptophan 2 mM; Mannit 30 mM; CaCl₂ 1,7 mM; Lösung in bidestilliertem H₂O, pH auf 7,4 eingestellt.
- ◆ Veronalpuffer: Natrium-Veronal (0,1 M), CaCl₂ (2mM), in bidestillierten H₂O, mit HCl auf pH 9,0 eingestellt.
- ◆ Formaldehyd-Lösung: 10% (v/v) Verdünnung der 37 %-igen Stammlösung in ES.
- ◆ Gelatinelösung: Bovine Gelatine 0,1% (w/v), Lösung in bidestilliertem H₂O bei 100 °C.
- ◆ Sephadex-Säulen: 8 g Sephadex G 75 bzw. G 50 wurden in 200 ml PBS in einem Becherglas gelöst und 6 h bei 80 °C im Trockenschrank stehen gelassen. Nach dem Auskühlen auf Zimmertemperatur wurde der klare Überstand mittels einer Pipette entnommen und verworfen und das sich am Boden sammelnde Gel durch vorsichtiges Umrühren durchmischt. Nun wurde das Gel luftblasenfrei in die dafür vorgesehene Kunststoffsäule bis zur vorgesehenen Füllhöhe eingegossen und noch 2 h mit KHM durchspült.
- ◆ Enzymlösung I: 90 mg Kollagenase D wurden in 2 ml KHM gelöst und auf eine 14 cm hohe Sephadex G 75-Säule mit einem Durchmesser von 4 cm aufgetragen, die mit KHM durchspült wurde. Die ersten 14 ml des Eluats wurden verworfen, die nächsten 20 ml aufgefangen und in 4 Aliquots zu je 5 ml aufgeteilt. Eines dieser Aliquots wurde mit 3 mg Dispase I, 3 mg Trypsin 1:250 und 50 mg bovinem Albumin in KHM auf ein Endvolumen von 25 ml aufgefüllt. Die übrigen Aliquots wurden bei -20 °C gelagert und konnten zu späteren Zeitpunkten zum Ansetzen von Enzymlösung I verwendet werden.
- ◆ Enzymlösung II: 90 mg Kollagenase D (nicht durch Gel-Chromatographie gereinigt), 12 mg Trypsin, 25 mg Dispase II in 100 ml KHM gelöst
- ◆ Trypsinlösung: 0,05% (w/v) Trypsin, 0,67 mM EDTA, Lösung in PBS.
- ◆ „Endothelial Cell Purification Solution“ (ECPS) von Prof. Nees freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Dichtegradienten

- ◆ Percoll-Stammlösungen: Die im Text genannten Percoll-Prozente beziehen sich auf die prozentualen Volumenanteile Percoll in der Endlösung (v/v).

Percoll [% v/v]	ES-Konzentrat [% v/v]	Hepes- Konzentrat v/v]	Bidest. H ₂ O * [% v/v]
20	5	5	70
22,5	5	5	67,5
25	5	5	65
30	5	5	60
32,5	5	5	57,5
35	5	5	55
37,5	5	5	52,5
40	5	5	50
42,5	5	5	47,5
45	5	5	45
90	5	5	0

* Zur besseren Kontrolle der Aufsichtung im Zentrifugenglas kann jeder zweiten Verdünnung Phenolrot zur deutlichen Rotfärbung beigegeben werden.

- ◆ Herstellung von Dichtegradient I:
5,5-ml-Aliquots der 20 bzw. 22,5 bzw. 32,5 bzw. 35 bzw. 40 bzw. 45 bzw. 90 %-igen Percoll-Stammlösungen wurden mit nach oben abnehmender Dichte in ein 50-ml-Falcon-Röhrchen mittels einer peristaltischen Pumpe vorsichtig aufeinander geschichtet. Zur besseren Sichtbarkeit der Schichtgrenzen wurde jede zweite Fraktion mit Phenolrot angefärbt. Der so erhaltene diskontinuierliche Percoll-Gradient wurde ca. 12 h bei Raumtemperatur erschütterungsfrei stehen gelassen. Zur Veranschaulichung vgl. Abb. 12.
- ◆ Herstellung von Dichtegradient II:
1,5-ml-Aliquots der 20, 25, 30, 35, 40 bzw. 90 %-igen Percoll-Stammlösungen wurden mit nach oben hin abnehmender Dichte in einem 15-ml-Falcon-Röhrchen wie für Dichtegradient I bereits beschrieben vorsichtig aufeinander geschichtet. Das weitere

Protokoll zum Erhalt des kontinuierlichen Gradienten war ebenfalls analog zu Dichtegradient I.

Kulturmedien

- ◆ Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM), Medium 199 (M199), Fötale Kälberserum (FCS), L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin; Gibco, Paisley, Schottland
- ◆ Endothelial Cell Growth Medium; Promocell, Heidelberg
- ◆ DMEM / F-12 HAM, HEPES-gepuffertes Medium; Sigma, Deisenofen.
- ◆ Standard-Kulturmedium: DMEM mit Zusatz von FCS 10% (v/v), L-Glutamin 2 mM, Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml.
- ◆ Einfriermedium I: M199 mit Zusatz von 20% (v/v) FCS, L-Glutamin 2mM, Penicillin 100 U/l, Streptomycin 100 µg/ml, 20 mM HEPES.
- ◆ Einfriermedium II: Einfriermedium I mit Zusatz von 20% (v/v) DMSO.
- ◆ Spezialmedium Maus: Selbst hergestellte Peptidfraktion aus neugeborenen Mäusen (siehe Kapitel Ergebnisse) mit Zusatz von 2 mM L-Glutamin, Penicillin 100 U/l, Streptomycin 100 µg/l.
- ◆ Promocell-Medium: Promocell ECGM mit Zusatz von FCS 10% (v/v), L-Glutamin 2mM.
- ◆ Mischmedium: Promocell-Medium und Standardkulturmedium 1:1 (v/v) gemischt.
- ◆ Filtermedium: DMEM / F-12 HAM mit Zusatz von 10% FCS(v/v), L-Glutamin 2 mM, Penicillin 100 U/l, Streptomycin 100 µg/l, 15 mM HEPES, frisch über 0,2 µm filtriert.
- ◆ Trypsininhibitormedium: Mischmedium mit Zusatz von 13,4 U/ml Trypsininhibitor.

Geräte und Lieferfirmen

- ◆ Kühlzentrifuge 4K10; Sigma, Osterode
- ◆ Eppendorfszentrifuge 5412; Eppendorf, Hamburg
- ◆ Herasafe Sterilbank; Heraeus, Hanau
- ◆ Brutschrank Functionline; Heraeus, Hanau
- ◆ Autoklav: National Steril-Quick 704-9000-D; Heinicke, USA
- ◆ Elektronische Feinwaage Mettler H54; Mettler, Deutschland

- ◆ Elektronische Feinwaage Sartorius BP410S; Sartorius, Göttingen
- ◆ Elektronischer Gasdruckregler (1-200 mbar); Bosch, Jungingen
- ◆ pH-Meter Typ 766; Knick, Berlin
- ◆ Chromatographiesäulen: Pharmacia, Uppsala, Schweden
- ◆ Wasserbadschüttler Model 676; New Brunswick Scientific, New Brunswick, USA
- ◆ Wärmeplatte PZ 28-1 SR mit Regler PZ 2860; Gestigkeit, Düsseldorf
- ◆ Stickstofftanks VHC 35; Union Carbide, Chicago, USA
- ◆ Fraktionensammler Ultrorack; LKB Bromma, Schweden
- ◆ Mikroskop Axiovert 35 und Axioskop; Zeiss, Göttingen
- ◆ Peristaltische Schlauchpumpen Colora 3600; Colora-Messtechnik, Lorch
- ◆ Kühlzentrifuge; Sorvall, Newtown, USA
- ◆ Reinstwasseranlage mit Liqui Pure 1 Cartige (USF); Millipore, Molsheim, Frankreich
- ◆ Chromatographiesäulen; Pharmacia, Uppsala, Schweden
- ◆ Pipettierhilfe Pipetus Standard; Hirschmann-Laborgeräte, Eberstadt
- ◆ Pipetten; Eppendorf, Hamburg
- ◆ Mikrotom Cryostat CM 3050; Leica,
- ◆ Elektronenmikroskopie:
 CO₂-Kritisch-Punkt-Trocknung: Balzer CPD 020; Bal-Tec, Walluf
 Goldbedampfungsgerät Polaron E 5000 Dioden-Sputter; Plano, Marburg
 Elektronenmikroskop Jeol JSM 35 CF; Jeol, Japan

Materialien für Filtrationsstudien

- ◆ Elektronische Feinwaage Sartorius BP410S; Sartorius, Göttingen
- ◆ Datenübertragungssoftware YSC01L Vers. 3.1.2; Sartorius, Göttingen
- ◆ PET-Filtermembraneinsätze Porengröße 0,4 µm (Porendichte 1,0 x 10⁸ / cm²); Falcon, Becton Dickinson, Lincoln Park, USA
- ◆ Peristaltische Schlauchpumpen Colora 3600; Colora-Messtechnik, Lorch

Methoden

1. Isolierung und Kultivierung venulärer Endothelzellen aus Mäuseherzen

1.1. Herzpräparation und proteolytische Gewebedissoziation

Eine adulte Maus erhielt eine subkutane Injektion von 5000 I.U. Fragmin. 20 min später wurde das Tier dekapitiert und für 10 min in eiskaltem PBS abgekühlt. Danach wurden Thorax und Abomen eröffnet, das Pericard und Teile der Lunge wurden entfernt. Die weitere mikrochirurgische Präparation erfolgte unter Zuhilfenahme einer Lupenbrille und mikrochirurgischer Instrumente. Nach Darstellung der Aorta wurde diese knapp proximal des Abganges des Truncus brachiocephalicus inzidiert. Das Herz wurde nun mit 0,5 ml Fragmin umspült, die Aorta wurde mittels eines Bindfadens an einer, durch die Inzision eingeführten Kanüle fixiert. Nach vollständiger Exzision des nunmehr an der Kanüle hängenden Herzens wurde diese auf den bereits durchströmten Auslaß des Durchlauferwärmers (D) (siehe Abb. 4) aufgesteckt.

Nun wurde das Herz mit einem Druck von 150 hPa über einen Zeitraum von 5 min mit DMEM perfundiert. Durch entsprechendes Umschalten der Dreiwegehähne I und II wurde anschließend 5 min lang Ca^{2+} -freies KHM mit Zusatz von 10 μM Papaverin durch das Koronarsystem gespült. Um auch bei einer, im Laufe der folgenden enzymatischen Desintegration des Herzens auftretenden Undichtigkeit der Aortenklappen eine ausreichende Koronarperfusion zu gewährleisten, wurden nach Sistieren der mechanischen Herzaktion die Pulmonalgefäße ligiert.

Durch erneutes Umschalten des Dreiwegehahnes II konnte das Herz schließlich bei immer noch unverändertem Druck mit Enzymlösung I, der ebenfalls 10 μM Papaverin beigemischt wurde, perfundiert werden. Unmittelbar nach Beginn der Perfusion mit Enzymlösung wurde das Herz bei geöffneter Schlauchklemme (a) in ein 50 ml Falcon-Tube, das 30 %-iges Percoll enthielt, eingetaucht. (vgl. Abb. 4). Dann wurde Schlauchklemme (a) wieder geschlossen und die Peristaltische Pumpe (P) eingeschaltet, so dass die Proteasemischung weiterhin ein weit gestelltes Koronarsystem bei konstantem Perfusionsdruck, aber nur noch mit einer Flußgeschwindigkeit von 0,2 ml/min durchströmen konnte.

Nach 25-minütiger Perfusion mit Enzymlösung wurde das Herz vorsichtig aus dem Percoll-Bad entnommen und auf eine sterile Teflonplatte überführt. Dort wurden mit Hilfe einer

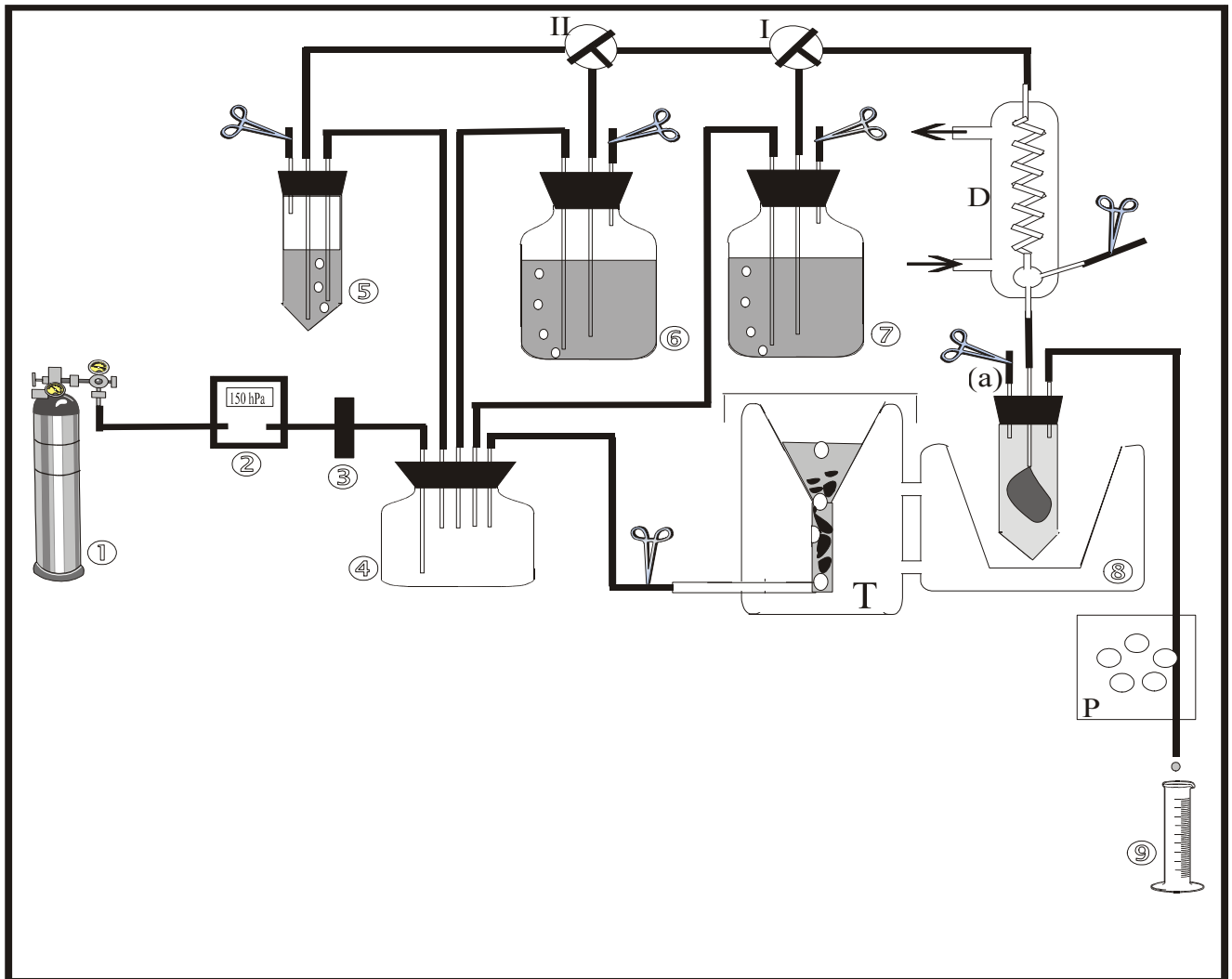


Abb. 4: Spezielle Perfusionsapparatur zur enzymatischen Desintegration der Herzen kleiner Tiere. Die Apparatur ist in allen Einzelteilen autoklavierbar. Durch entsprechendes Öffnen der Dreiwegehähne I und II konnte das Herz nacheinander bei definiertem Druck mit Ca^{2+} -haltigem, Ca^{2+} -freiem Perfusionsmedium und Proteasemischung perfundiert werden. Während der enzymatischen Desintegration des Organs befindet sich das Herz in einem dicht verschlossenen 50-ml-Falcon-Tube mit 30 %-iger Percoll-Lösung, aus dem mittels einer peristaltischen Pumpe (P) mit definierter Geschwindigkeit kontinuierlich Flüssigkeit entnommen werden kann. Das nach Perfusion proteolytisch bereits deutlich aufgeweichte Organ wird zerschnitten und in einem speziellen Trichter (T) mit Proteasen nachverdaut, wobei die Suspension durch von unten aufsteigende Gasblasen aufrechterhalten wird. Weitere Einzelheiten siehe Text.

(1=Carbogenflasche; 2=Druckminderer; 3=Sterilfilter; 4=Gasverteiler; 5=Vorratsbehälter für Enzymlösung; 6=Vorratsbehälter für calciumfreies Perfusionsmedium; 7=Vorratsbehälter für calciumhaltiges Perfusionsmedium; 8=beheizbares Wasserbad (37°C); 9=Auffanggefäß)

sterilen Rasierklinge Kanüle, Lungenreste und makroskopisch erkennares Bindegewebe entfernt und anschließend das Ventrikelgewebe in Würfel der Kantenlänge 1 mm zerschnitten. Das so erhaltene Myokardgewebe wurde nun mit 4 ml frischer Enzymlösung I im Trichter (T) 45 min lang mit Proteasen nachinkubiert. Während dieser Zeit wurde die Suspendierung der Gewebeteile durch langsam von unten aufsteigende Carbogen-Gasblasen aufrechterhalten. Die schließlich erhaltene Zell- und Gefäßsuspension wurde mittels mehrmaligen Einsaugens in eine Pipette nochmals gut durchmischt und schließlich über ein Nylonnetz der Maschenweite 200 µm filtriert.

1.2. Anreicherung der venulären Endothelzellen mittels Dichtegradientenzentrifugation

Die wie zuvor beschrieben erhaltene Gewebesuspension wurde im Verhältnis 1:1 mit 20 %-iger Percoll-Lösung versetzt und dann vorsichtig mittels einer Pipette zu gleichen Teilen auf zwei kontinuierliche Dichtegradienten II, dessen Herstellung weiter oben bereits erläutert wurde, aufgeschichtet. Bei langsamer Beschleunigung der Zentrifuge erfolgte nun eine 20-minütige Zentrifugation der Gradienten bei 1000 g.

Nach langsamem automatischem Abbremsen der Zentrifuge wurden die Zentrifugenröhrchen mit den Dichtegradienten in eine spezielle Fraktionierungsapparatur eingespannt (vgl. Abb. 13, Kapitel Ergebnisse), die in einer sterilen Gewebebank aufgestellt wurde. Durch Anstechen des Röhrchens von unten mittels einer Kanüle konnten nun sterile Aliquots zu je 1,5 ml in separaten Gefäßen gesammelt werden.

Die einzelnen Dichtefraktionen wurden nach zweimaligem Waschen in PBS in Standardkulturmedium suspendiert und in sterilen Kulturschalen oder auf speziell behandelten Oberflächen ausgesät.

1.3. Herstellung spezieller Wachstumsmedien und Proliferation in Gewebekultur

Zur Kultivierung von Zellen aus bestimmten Fraktionen wurden verschiedene, speziell entwickelte Wachstumsmedien eingesetzt. Die Zusammensetzung dieser eigens hergestellten Medien wird im Kapitel Ergebnisse eingehend dargestellt (Seite 43 und 44).

Einige dieser speziellen Wachstumsmedien enthielten auch speziesautologe Extrakte. Die Gewinnung dieser Extrakte erfolgte aus neugeborenen Mäusen oder aus 5 Tage alten

Jungtieren. Die Tiere wurden dekapitiert. Die Restkörper von 6 so geschlachteten Jungtieren mit einem Gesamtgewicht von 15 g wurden zusammen mit 15 ml eiskaltem DMEM in ein 50 ml Falcon-Tube gegeben und dort mit Hilfe eines Handmixers (Ultra-Turrax) homogenisiert. Aus der auf diese Weise erhaltenen Suspension wurde die wässrige Lösung durch stufenweises Zentrifugieren abgetrennt (zweimal 10 min bei 500 g, einmal 2 min bei 20 000 g und weitere zweimal 90 min bei 40 000 g). Der so erhaltene Extrakt wurde jetzt noch mittels Spritzenfilter der Porenweite 0,45 µm und 0,22 µm filtriert und letztendlich auf eine zuvor 4 h lang mit DMEM gespülte, 20 cm hohe Sephadex G50-Säule aufgetragen. Die ersten 50 ml des Eluats wurden verworfen, die nächsten 50 ml Peptidfraktion mit einem Molekulargewicht <30000 aufgefangen und zum Ansetzen der speziellen Kulturmedien (s. Kapitel Ergebnisse) verwendet.

Die gewonnenen Primärkulturen wurden 24 h nach Aussaat mit diesen Wachstumsmedien versorgt und konnten mittels eines Phasenkontrastmikroskops betrachtet werden.

Einige der Primärkulturen wurden auch auf Gelatine-beschichteten Glasplättchen ausgesät. Hierzu wurden runde Deckgläschen mit einem Durchmesser von 42 mm mit 0,1 %-iger Gelatine-Lösung bei einer Temperatur von 100 °C für 10 min inkubiert. Nachdem die so behandelten Glasplättchen an der Luft getrocknet waren wurden sie in Petrischalen gelegt und unter dem UV-Licht sterilisiert. Nun konnte zentral auf dem Glasplättchen ein Tüpfel von 200 µl der zuvor gewonnenen Zellsuspension platziert werden. Nach 12 h wurde die Schale gänzlich mit Kulturmedium angefüllt.

2. Isolierung von venulären Endothelzellen aus menschlichen Explantatherzen

2.1. Vorbereitung der Herzen

Menschliche Explantatherzen, die von der Herzchirurgischen Klinik am Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München (Prof. Dr. E. Kreuzer) bzw. der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen (Prof. Dr. T. Fischlein) unter Wahrung der

Richtlinien der betreffenden Ethikkommissionen freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden, wurden noch intraoperativ mit eisgekühlter kardioplegischer Lösung perfundiert. Der Transport ins Labor erfolgte ebenso in eisgekühlter kardioplegischer Lösung. Im Labor wurden die Herzen ca. 6 cm über der Apex horizontal durchtrennt. Nur das dabei jeweils anfallende Herzspitzenstück wurde verwendet.

2-4 der epikardial angeschnittenen Koronararterienäste wurden ausgewählt, über die die Perfusion der Herzspitze erfolgen konnte. In diese ausgewählten arteriellen Gefäße wurden 4 cm lange Teflonschläuche mit einem Außendurchmesser von weniger als 1 mm, die über Silikon- und Vitonschläuche mit den Durchlauferwärmern (D) verbunden waren, mit Einzelknopfnähten fixiert. Kollateralgefäße der myokardialen Querschnittsfläche, über die Perfusionslösung ausströmen konnte, wurden sorgfältig aufgesucht und ligiert bzw. bis zur Dichtigkeit mit einer ausgeglühten Messerspitze koaguliert. Auch weitere Bereiche der Myokardschnittfläche, aus denen diffus Perfusat austrat wurden noch durch Aufdrücken eines unter der Gasflamme erhitzten Messers verklebt. Die parallel zu den epikardialen Arterien verlaufenden großen Koronarvenen wurden inzidiert um einen ungehinderten Abfluss der Perfusionslösung über das venöse Gefäßsystem zu gewährleisten (siehe auch Abb. 18 Kapitel Ergebnisse).

2.2. Proteolytische Dissoziation von Myokardgewebe

Die Perfusion der Herzspitze erfolgte mit Hilfe einer Modifizierung der für das Mäuseherz bereits erläuterten Perfusionsapparatur (siehe Abb. 16, Kapitel Ergebnisse).

Das vorbereitete Myokardstück wurde in den auf 37°C temperierten Trichter überführt und 30 min lang mit KHM bei einem Druck von 90 hPa perfundiert. Das Eluat, das sich im Boden des Trichters ansammelte, wurde laufend über den Dreiwegehahn III abgesaugt und verworfen. Durch Umschalten der Dreiwegehähne I und II konnte das Präparat nun 90 min mit Enzymlösung II perfundiert werden. Hierzu wurde der Perfusionsdruck nach 10 min auf 60 hPa und nach weiteren 20 min auf 30 hPa reduziert. Die ersten 10 ml des Eluats wurden abgesaugt und verworfen, dann wurde durch Umschalten des Dreiwegehahnes III und Einschalten der Peristaltischen Pumpe P das weitere Eluat kontinuierlich in den

Vorratsbehälter zurückgepumpt (zirkumfundiert). Die Pumpgeschwindigkeit wurde rasch genug eingestellt, um Anstau des Perfusats im Trichter zu vermeiden.

Nach Beendigung der Enzymperfusion wurde die Herzspitze aus dem Trichter entnommen. Mittels einer Schere und eines scharfen Löffels wurden die an ihrer Konsistenz und Farbaufhellung erkennbaren, proteolytisch aufgeweichten Myokardanteile herauspräpariert. Diese aufgelockerten Gewebebereiche wurden dann in Würfel der Kantenlänge 1 mm zerschnitten und in den zweiten Trichter (T), der 50 ml frische Enzymlösung II enthielt, gegeben. Dieser Trichter wurde langsam von unten her mit Carbogengasblasen durchperlt, wodurch größere, in den engen Trichterauslaß absinkende Myokardstückchen auf schonende Weise homogenisiert wurden.

Nach 90-minütiger Nachinkubation im Trichter wurde die erhaltene Zell- und Gefäßsuspension in ein Becherglas überführt und im Verhältnis 1:10 mit PBS versetzt. Nach vorsichtiger Durchmischung wurde diese Suspension für 1 min ruhig stehen gelassen, um besonders große oder unverdaute Gewebebrocken durch Sedimentation abzutrennen und den zellhaltigen Überstand durch Dekantieren gewinnen zu können. Diese Prozedur wurde noch zweimal wiederholt. Die letztendlich gewonnene Zell- und Gefäßsuspension wurde anschließend über Nylonnetze mit einer Maschenweite von 200 µm filtriert. Dieses Filtrat wurde nochmals im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt und schließlich 15 min lang zur Sedimentation der Zellen bei 400 g zentrifugiert.

2.3. Anreicherung der venulären Endothelzellen mittels Dichtegradientenzentrifugation

Die nach 2.2. sedimentierte Zellfraktion wurde in 10 %-iger Percoll-Lösung resuspendiert. Diese Suspension wurde nun mittels einer Pipette zu gleichen Teilen auf 6 kontinuierliche Dichtegradienten I (Herstellung siehe Seite 15) aufgeschichtet und unter langsamem Beschleunigen und Abbremsen der Zentrifuge für 45 min bei 1000 g zentrifugiert.

Die Trennung des Gradienten in seine Fraktionen erfolgte in analoger Weise, wie bereits für das Mäuseherz erläutert worden ist. Verwendet wurde hierzu eine größenmäßig an 50-ml-Falcon-Tubes angepasste, sonst aber identische Fraktionierungsapparatur, mit der Fraktionen zu je 5 ml gesammelt wurden.

Die einzelnen Fraktionen wurden in PBS und Standardkulturmedium gewaschen und schließlich in Standardkulturmedium durch vorsichtiges auf und ab ziehen in einer Pipette resuspendiert.

2.4. Zellkultur und spezifische Reinigung

Die nach dem Auswaschen der Percoll-Bestandteile mit PBS durch Zentrifugation erhaltenen Zellsuspensionen wurden schließlich in sterile Zellkulturschalen ausgesät (ca. 10^3 Zellen pro cm^2).

Nach 4-tägiger Kultur unter Standardbedingungen ($37\text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2) wurde das Standardkulturmedium durch Mischmedium ersetzt. Weitere Mediumwechsel erfolgten alle 5 Tage, wobei stets beim Absaugen darauf geachtet wurde, dass der Boden der Petrischale stets mit einem Flüssigkeitsfilm bedeckt blieb. Nach einem Zeitraum von ca. 3 Monaten wurden diese Zellkulturen der Reinigung mit ECPS zugeführt.

Hierzu wurden die Primärkulturen mit ECPS-Lösung (1:20-Verdünnung in Standardkulturmedium) für 30 min bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Inkubationslösung abgesaugt und durch Standardkulturmedium ersetzt. 6 h später wurden die Kulturen mittels einer Spritze und einer gelben 20 G –Kanüle mäanderförmig mit einer Spülgeschwindigkeit von 0,5 ml pro s mit 0,1 %-iger Albumin-PBS-Lösung gespült. Die Randbezirke einer jeden Schale wurden mittels eines autoklavierten Silikongummis gänzlich von Zellen befreit. Nach dem Spülvorgang wurden die gereinigten Zellkulturen erneut mit Mischmedium versehen.

Im Anschluß an die ECPS-Reinigungsprozedur wurden unter mikroskopischer Kontrolle mit Hilfe eines autoklavierten Glasspatels einzelne noch erkennbare nicht-endotheliale Zellen entfernt. Die gereinigten Zellkulturen wurden behutsam 2 mal mit PBS gespült, wobei wiederum darauf geachtet wurde, dass die Zellschicht stets von einem Flüssigkeitsfilm bedeckt blieb und nun mit 0,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung je 35-mm Kulturschale inkubiert. Nach 20 min wurde die Zellsuspension in 3,5 ml Trypsininhibitormedium aufgenommen und anschließend zur weiteren Subkultivierung verwendet. Dies geschah für verschiedene Zwecke, wobei im Prinzip immer Co-Kulturen angelegt wurden:

1. Die Zellsuspension wurde auf dem Boden von 6-well-Zellkulturclustern ausgesät. Nach weiteren 12 h erfolgte ein Mediumwechsel mit Mischmedium, danach wurde zusätzlich ein PET-Filtereinsatz der Porengröße $1\ \mu\text{m}$, $1,6 \times 10^6$ Poren/ cm^2 eingehängt und dieser mit menschlichen nicht-endothelialen Zellgemischen vaskulärer Herkunft als Ammenkulturen beimpft. Danach erfolgte ein Mediumwechsel alle 5 Tage.
2. Für Filtrationsstudien wurde die Zellsuspension direkt auf einen PET-Filtereinsatz der Porengröße $0,4\ \mu\text{m}$, $1,0 \times 10^8$ Poren/ cm^2 ausgesät. Dieser wurde in einen 6-Well-Zellkulturcluster eingehängt, dessen Boden zuvor mit menschlichen nicht-endothelialen Mischkulturen vaskulärer Herkunft beimpft wurde. Auch hier wurde 12 h nach Aussaat ein Mediumwechsel mit Mischmedium durchgeführt. Danach erfolgte ein Mediumwechsel alle 5 Tage.

2.5. Erstellen von Wachstumskurven

Für die Erstellung von Wachstumskurven wurden gereinigte Kulturen zu Anteilen von ca. 10^4 Zellen auf 35-mm-Kulturschalen ($9,62\ \text{cm}^2$) ausgesät. 24 h nach Aussaat wurden zufällige Ausschnitte der Zellkultur ausgewählt und diese durch Kratzen eines Rahmens unter mikroskopischer Kontrolle in den Boden der Petrischale mittels einer feinen Kanüle definiert. Unter Verwendung eines zehnfach vergrößernden Okulars und eines 1:10-Objektivs umfasste ein solcher Rahmen eine Fläche von $0,2\ \text{mm}^2$.

Die Zahl der Zellen, die sich in einem Rahmen befanden wurde fortan alle 24 h registriert, bis eine Konfluenz des gewählten Ausschnitts erreicht war.

Zum Erstellen von Wachstumskurven wurden Zellzahlen aus je 4 solcher Rahmen ausgewertet.

2.6. Einfrieren und Revitalisieren kultivierter Zellen

24 h vor dem Einfrieren wurde ein Mediumwechsel in den betreffenden Kulturen durchgeführt. Nach dem Absaugen des Mediums und dreimaligem Waschen mit PBS wurden

die Kulturen 15 min lang mit Trypsinlösung inkubiert. Während dieser Zeit lösten sich die Zellen vom Schalenboden ab. Diese Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:5 mit Standardkulturmedium verdünnt, in 15-ml-Falcon-Tubes überführt und 10 min bei 395 g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Sedimente in Einfriermedium I resuspendiert. Nun wurde die Zellsuspension bei 0 °C gelagert und durch partitionierte Zugabe von 0 °C kaltem Einfriermedium II über den Zeitraum von einer Stunde hinweg im Verhältnis 1:2 verdünnt (jetzt ca. 10^5 Zellen/ml). Jetzt konnte die Zellsuspension in Portionen zu 2 ml in Cryotubes abgefüllt werden. Die Cryotubes wurden in einen Styroporbehälter eingeschichtet, dieser wurde über 4 h bei -80 °C gelagert. Danach konnten die auf diese Weise langsam abgekühlten Zellen in flüssigen Stickstoff überführt werden und dort beliebig lange gelagert werden.

Zur Revitalisierung eingefrorener Zellen wurden die ausgewählten Cryotubes aus dem Stickstoffbad entnommen und in einem Wasserbad der Temperatur 37 °C rasch aufgetaut, mit Kulturmedium verdünnt und in der gewünschten Konzentration in sterilen Kulturschalen ausgesät. 24 h nach Aussaat wurde noch ein Mediumwechsel durchgeführt.

3. Gewinnung von weitgehend intakten Mikrogefäßnetzen aus dem Myokard des Menschen für histologische Zwecke

Die Vorbereitung und Präparation der Herzen erfolgte in analoger Weise, wie für die Gewinnung von Zellkulturen bereits erläutert wurde. Allerdings wurde das Herz nun nur 45 min lang mit Enzymlösung perfundiert, anschließend 5 min mit KHM (calciumfrei) durchspült und dann nur 45 min im Trichter (T) nachverdaut. Im Anschluss an die Inkubation im Trichter wurde die Gewebesuspension im Verhältnis 1:5 mit eiskaltem ES verdünnt und ruhig stehen gelassen, so dass in Suspension befindliche Mikrogefäßnetze bei 1 g sedimentieren konnten. Nach 5 min wurde vorsichtig der Überstand und auch noch das oberste Drittel des rasch entstehenden Bodensatzes abgesaugt und in ein weiteres Gefäß überführt.

Von dieser Suspension wurden nun mittels einer Pipette Tropfen von 0,3 ml zentral in 60-mm-Kulturschalen eingebracht und bei Zimmertemperatur für 10 min ruhig stehen gelassen.

Dann wurde vorsichtig mit Hilfe einer Pipette der Flüssigkeitstropfen gemäß dem Schema in Abb. 5 über die Schalenfläche ausgestrichen und für weitere 10 min leicht schräg gestellt. Der Flächenbereich unter dem ursprünglichen Tropfen sollte hierbei nicht austrocknen. Durch vorsichtige Zugabe von Formaldehydlösung konnten die hier am Schalenboden adhären gewordenen Gefäße nun fixiert werden und anschließend enzymhistochemischen oder immunhistochemischen Untersuchungen zugeführt werden, deren Durchführung weiter unten geschildert wird.

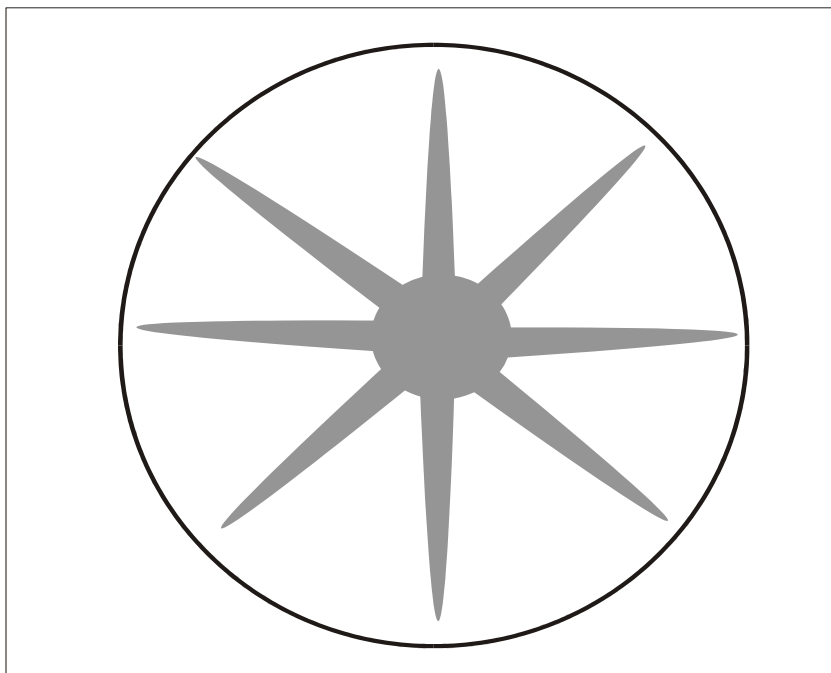


Abb. 5: Ein zuvor zentral aufgebrachtener Suspensionstropfen wird sternförmig über den gesamten Schalenboden verteilt.

4. Identifizierung mikrovaskulärer Zellarten

4.1. Histologische Schnitte

Zum Anfertigen von Mikrotomschnitten wurden aus dem Herzmuskel menschlicher Explantatherzen mittels eines Skalpells Würfel der Kantenlänge 1 cm ausgeschnitten. Die Gewebestücke wurden nun auf eine Messingplatte mit einem Durchmesser von 4 cm und einer Dicke von 1 cm aufgebracht, die zuvor für 4 h bei einer Temperatur von -80 °C gelagert wurde. Das auf diese Weise schnell gefrorene Myokardstück wurde nach 5 min wieder mittels eines Metallspatels von dieser Platte entfernt und nun auf den auf -20 °C vorgekühlten Stempel, auf den unmittelbar vorher noch spezielles Kontaktgel aufgetragen wurde aufgebracht. Das Gewebe war mit diesem Stempel durch eine Schicht Kontaktgel nun fest verbunden. Der Metallstempel mit dem zu untersuchenden Präparat konnte jetzt in die dafür vorgesehene Halterung im Mikrotom eingespannt werden. Es wurden Schnitte der Dicke 25 µm angefertigt. Hierbei kam mir die Hilfe von Frau Ziesche (Lehrstuhl Anatomie III der Ludwig-Maximilians-Universität München) sehr zugute.

4.2. Enzymhistochemische Nachweisverfahren

Die enzymhistochemische Anfärbung mikrovaskulärer Zellarten wurde sowohl an Mikrotomschnitten als auch an isolierten Mikrogefäßnetzen und an Zellkulturen vorgenommen.

Präparate, die für die histochemische Charakterisierung vorgesehen waren, wurden 2 mal mit PBS gewaschen, 2 min mit Formaldehydlösung (37%-ige Stammlösung der Firma Merck 1:10 mit ES-Lösung verdünnt) inkubiert und anschließend noch 2mal mit PBS gespült. An so fixierten Objekten konnte nun der Nachweis der Aktivitäten von Dipeptidylaminopeptidase IV (DAP IV, CD26) und Alkalischer Phosphatase erfolgen.

Die besagten Färbungen konnten einzeln oder in Kombination durchgeführt werden. Im Falle einer Doppelfärbung wurde zuerst die Peptidasefärbung durchgeführt und anschließend nach mehrfachem Spülen mit PBS die Färbung auf Alkalische Phosphatase.

Für den Nachweis der DAP IV-Aktivität wurden 4 mg Peptid (Gly-Pro-Methoxy- β -Naphthylamid) in 20 μ l Dimethylformamid gelöst und danach mit 10 ml ES mit einer Temperatur von 4 °C, in dem zuvor 4 mg Echtblausalz gelöst wurden unter weitestmöglicher Lichtabschirmung vermischt. Die so erhaltene Färbelösung wurde über einen 0,22 μ m-Spritzenfilter auf die entsprechend fixierten Objekte gegeben. Die anschließende 3-stündige Inkubation erfolgte bei völliger Dunkelheit und unter langsamem, ständigem Schwenken bei 4 °C.

Zum Nachweis der perizytenspezifischen Alkalischen Phosphatase wurden sechs Volumenteile Veronalpuffer mit zwei Volumenteilen 3 mM ASMX-Phosphat-Lösung und einen Volumenteil 3 mM Fast-Blue-BB-Lösung vermischt und über einen 0,22 μ m-Spritzenfilter auf das zu färbende, fixierte Präparat gegeben. Die Inkubation erfolgte unter den gleichen Bedingungen, wie für die DAP IV-Färbung erläutert über 12 h.

4.3. Immunfluoreszenzmikroskopische Techniken

Die zum Nachweis von Faktor-VIII-Antigen und α -Aktin vorgesehenen Präparate (Zellkulturschalen oder Mikrotomschnitte auf Objektträgern) wurden 2 mal mit PBS gewaschen und für mindestens 15 Minuten (bis zu mehreren Monaten) mit Formaldehydlösung fixiert. Im Anschluß hieran wurden die Präparate nach erneutem 2-maligen Waschen mit PBS für 2 min mit -20 °C kaltem 100 %-igen Methanol inkubiert und danach 5 mal mit PBS gespült. Nun wurden die Objekte 60 Minuten unter ständigem Schwenken bei 37 °C mit dem verdünnten Primärantikörper inkubiert (gebräuchliche Verdünnung: 1:30 in PBS mit Zusatz von 3 % Albumin (w/v)) und danach 5 mal mit PBS mit Zusatz von 0,1 % Albumin (w/v) gewaschen. Anschließend erfolgte auf analoge Weise die Inkubation mit dem verdünnten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (übliche Verdünnung: 1:60 in PBS mit Zusatz von 3 % Albumin (w/v)). Schließlich wurden die

Objekte noch 15 mal mit PBS mit Zusatz von 0,1 % Albumin (w/v) gewaschen und mit 70 % Glycerin überschichtet und mit einem Deckgläschen versehen.

So vorbereitete Präparate konnten nun mit dem Fluoreszenzmikroskop bei geeigneten Anregungswellenlängen betrachtet werden. Für kurzbelichtete photographische Aufnahmen wurden hochempfindliche (400 ASA) Filme verwendet, um ein zu rasches Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden.

Die zum Nachweis des Ac-LDL-Rezeptors vorgesehenen Zellkulturen wurden in vitalem Zustand mit serumarmem Endothelial Cell Growth Medium (2% FCS) beschickt. Nach Zusatz von 50 µl/ml eines Rhodamin-markierten Ac-LDL-Konzentrats (Dil-Ac-LDL, 42 mg/dl) wurde 4 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellkulturen gründlich mit PBS gewaschen und mit Formaldehydlösung fixiert. Die Zellkulturen wurden nun erneut mit PBS gespült, mit einem Tropfen 90%iger Glycerinlösung (10% (v/v) Cacodylatpuffer pH 7,40) versehen und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Präparate konnten nun mit einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

4.4. Rasterelektronenmikroskopie

Ausgewählte Proben wurden 2 mal mit PBS gewaschen und mit 5 % (v/v) Glutaraldehyd in Phosphatpuffer (100 mM, pH 7,7) fixiert und gelagert. Nach mehrfachem, sorgfältigem Waschen mit PBS wurden die Proben mit in einer feuchten Kammer für 2 h mit Osmiumtetroxyd bedampft. Hierzu wurden Kulturschalen über einen Tropfen 4%iger Osmiumtetroxydlösung gestülpt, ohne dass das Präparat mit der Lösung in direkten Kontakt geriet. Anschließend wurden die Proben wiederum mit PBS sorgfältig gewaschen, 12 h in PBS bei 4°C stehengelassen und danach erneut mehrfach gewaschen. Die Präparate wurden daraufhin zugeschnitten und in einer Ethanolverdünnungsreihe (50%, 70%, 80%, 90%, 100%) mit zunehmender Ethanolkonzentration entwässert. Die schließlich in 100% Ethanol überführten Präparate wurden am kritischen Punkt von CO₂ getrocknet und auf polierte Aluminium-Objekthalterungen aufgebracht. Nach Aufdampfung einer ca. 15 nm dicken Goldschicht wurden die Präparate mit dem Rasterelektronenmikroskop bei 15 kV Beschleunigungsspannung betrachtet und photographiert.

5. Messung der hydraulischen Konduktivität konfluenter Endothelschichten

Venuläre Endothelzellen wurden, wie weiter oben bereits erläutert auf handelsüblichen PET-Filtermembraneinsätzen (Porenweite $0,4 \mu\text{m}$, 10^8 Poren/ cm^2) bis zur Konfluenz gezüchtet. Mit Hilfe einer speziell im Rahmen der vorliegenden Dissertation optimierten Apparatur, deren technische Einzelheiten später (Abb. 32, Kapitel Ergebnisse) noch genauer erläutert werden, konnte nun die hydraulische Konduktivität der auf einer solchen Filtermembran etablierten Endothelschicht erfasst werden.

Die hierzu verwendete Apparatur bestand durchwegs aus biologisch inerten, autoklavierbaren Materialien.

Die Kammerteile werden gespült, autoklaviert und gemäß Abb. 32 (Kapitel Ergebnisse) zusammengesetzt. Nach dem Temperieren der Apparatur im Wärmeschrank auf $37 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde das basale Kompartiment vollständig mit Filtermedium und die Halterung für den Filtermembraneinsatz aufgesetzt. Es wurde darauf geachtet, dass Luftblasen vollständig aus dem unteren Kompartiment entweichen konnten.

Vor dem Einsetzen des zellbeschichteten Filters wurde dieser mehrmals sorgsam in auf $37 \text{ }^\circ\text{C}$ temperiertes PBS mit Zusatz von $0,1 \%$ Albumin (w/v) eingetaucht und auf diese Weise von Schwebeteilchen gereinigt. Anschließend wurde der Membraneinsatz mit 2 ml Filtrationsmedium angefüllt, welches unmittelbar zuvor über einen $0,2 \mu\text{m}$ -Spritzenfilter filtriert wurde. Bei all diesen Schritten wurde wiederum strikt darauf geachtet, dass die Zellschicht stets von einem Flüssigkeitsfilm bedeckt war.

Nun konnte der Filtereinsatz unter leichtem Schrägstellen der Apparatur in die entsprechende Halterung eingehängt werden, so dass die Unterseite der Filtermembran direkten Kontakt zur Flüssigkeit im unteren Kompartiment erhielt und Luft aus der Kammer vollständig entweichen konnte. Anschließend wurde noch der Polycarbonatzylinder, der das obere Kompartiment darstellt aufgesetzt.

Nach 30 min Ruhezeit bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ im Wärmeinkubator wurde das obere Kompartiment entsprechend dem gewählten hydrostatischen Druck mit dem jeweiligen Filtrationsmedium aufgefüllt. Das Flüssigkeitsvolumen im oberen Kompartiment wurde während der gesamten Versuchsdauer mittels einer Umwälzpumpe konstant gehalten. Der Flüssigkeitsspiegel im unteren Kompartiment wurde durch stetiges Absaugen über eine Kanüle mit einem Durchmesser von $0,6 \text{ mm}$ aus einem Steigrohr mit einem Innendurchmesser von 5 mm mittels einer peristaltischen Pumpe auf einem Niveau konstant gehalten, das 2 cm oberhalb der Filtermembran lag.

Die auf diese Weise aus dem unteren Kompartiment kontinuierlich entnommene Flüssigkeit wurde direkt in ein Gefäß gepumpt, das sich auf einer elektronischen Feinwaage befand. Der Massenzuwachs dieses Gefäßes konnte durch Vernetzung der Waage mit einem Computer und mit Hilfe eines speziell ausgesuchten Datenübernahmeprogramms in Abständen von 30 s über einen beliebig langen Zeitraum registriert und daraus die hydraulische Konduktivität des zellbewachsenen Filters L_p berechnet werden. Letztere ist definiert als Volumenfluß pro Zeiteinheit t , Filteroberfläche A [cm^2] und hydrostatische Druckdifferenz Δp [cmH_2O]:

$$L_p = dV / (dt \times A \times \Delta p) \text{ [cm}^3 / \text{s} / \text{cmH}_2\text{O]}$$

Für die Berechnung der hydraulischen Konduktivität der Zellschichten ($L_{p\text{Zellschicht}}$) alleine gilt:

$$1/L_{p\text{Zellschicht}} = 1/L_{p\text{Gesamtsystem}} - 1/L_{p\text{Filter}}$$

Da der nicht mit Zellen bewachsene, freie Filter einen hydrodynamischen Widerstand aufweist, der etwa um den Faktor 30 geringer ist als der konfluent mit venulären Endothelzellen bewachsene Filter wird die L_p des Gesamtsystems in erster Linie durch die Eigenschaften der Zellschicht bestimmt.

Durch Unterschichtung konnte das Inkubationsmedium unmittelbar über der Zellschicht besonders eingerichtet werden. Zu diesem Zweck wurden in Filtermedium speziell aufbereitete Lösungen (z.B. Histamin [$10 \mu\text{M}$] und Thrombin [1 U/ml]) verwendet, die zusätzlich 5% Ficoll 70 (w/v) enthielten. Solche, im Vergleich mit dem Filtrationsmedium schwereren Lösungen konnten besonders langsam und einfach mit Hilfe einer Kanüle mit 0,8 mm Durchmesser eingebracht werden, deren unteres Ende sich nur 2 mm über der Zellschicht befand. Vor der Unterschichtung wurden die verwendete Spritze und ihre Kanüle vollständig entlüftet, um beim Unterschichten Turbulenzen und Vermischungseffekte durch austretende Luftblasen zu vermeiden.

Ergebnisse

1. Identifizierung mikrovaskulärer Gefäßsegmente in Myokardschnitten und Gefäßen (Maus, Mensch)

Zur Identifizierung mikrovaskulärer Gefäßsegmente wurden zunächst enzymhistochemische Studien an Myokardschnitten des Mäuseherzens durchgeführt, anschließend auch an zur Transplantation abgelehnten menschlichen Herzen. Zur Unterstützung der gewonnenen histologischen Einblicke folgten analoge Studien an isolierten Gefäßpräparaten menschlicher Herkunft.

Im Myokardschnitt der Maus (Abb. 6) ließ sich alkalische Phosphatase-Aktivität ausschließlich in arteriellen Mikrogefäßen bis zu einem Durchmesser von 35 µm nachweisen. Ein enzymhistochemischer Nachweis von Dipeptidylaminopeptidase IV- Aktivität konnte spezifisch in venösen Mikrogefäßen bis zu einem Durchmesser von 20 µm erbracht werden.

Abb. 7 zeigt exemplarisch eine Schnittserie durch menschliches Herzmuskelgewebe. Deutlich sichtbar ist auch hier das Vorkommen blau und rot gefärbter Gefäßabschnitte. Das Vorkommen alkalischer Phosphatase-Aktivität war hier auf kleine arterielle Gefäße (<50 µm) beschränkt und erstreckte sich bis etwa zur Hälfte des anschließenden Kapillarsystems. Dipeptidylaminopeptidase IV- Aktivität konnte nur in den postkapillären Venulen nachgewiesen werden, die sich offenbar wie im Rindermyokard zu weiträumigen, bizarr geformten Sammelsystemen („venuläre Konglomerate“) formierten.

Diese im Myokardschnitt erhobenen Befunde konnten auch anhand isolierter Mikrogefäßnetze aus dem menschlichen Herzen bestätigt werden. Hierzu zeigt Abb. 9 ein Beispiel.

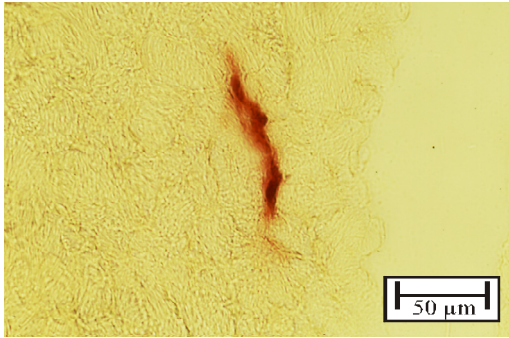
Zur Isolierung weitgehend intakter Mikrogefäßnetze wurde die Herzspitze eines menschlichen Explantatherzens nur für eine relativ kurze Zeit (45 min) mit einem speziell optimierten Proteasengemisch perfundiert und anschließend nur so lange in dieser Enzymlösung im

Trichter weiter inkubiert, bis die Gefäße komplett von Parenchymzellen frei waren. Venulen überstanden diese Prozedur nur schlecht, ihre lückenhafte und dünne Gefäßwand zerfiel unter Proteaseneinwirkung rasch in ihre zellulären Bestandteile (Abb. 8). Besonders stabil erwiesen sich hingegen alle Kapillaren und Arteriolen, selbst bei längerer Enzyminkubation.

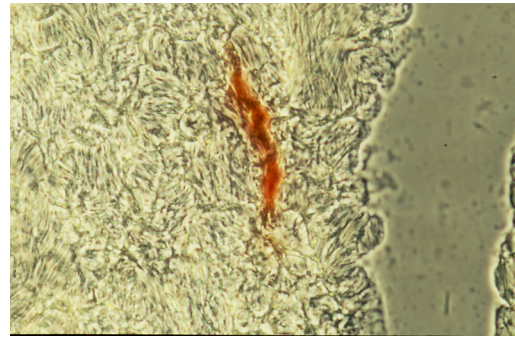
Durch starkes Verdünnen der so erhaltenen Zellsuspension in kaltem PBS konnte die Proteasenaktivität rasch vermindert werden und durch einfache Sedimentation bei $g=1$ in der Suspension enthaltene, weitgehend intakte Mikrogefäßbäume besonders schonend angereichert werden. Durch dünnes Ausstreichen eines Tropfens mikrogefäßhaltiger Gewebesuspension und Schrägstellen der Petrischale konnten diese oft zur Adhärenz gebracht werden und nun histologischen Betrachtungen zugeführt werden.

Ein in Abb. 9 exemplarisch gezeigtes, auf doppelte Weise enzymhistochemisch gefärbtes Mikrogefäßnetz aus einem menschlichen Herzen macht deutlich, dass die mit einem blauen Azofarbstoff nachweisbare alkalische Phosphatase ausschließlich im arteriellen Schenkel des Mikrogefäßsystems (Arteriolen und arterieller Schenkel des Kapillarsystems) vorkommt und auf Gefäße mit einem Durchmesser $<100 \mu\text{m}$ beschränkt ist. Die mit einem roten Azofarbstoff nachweisbare Dipeptidylaminopeptidase IV (CD26) konnte dagegen nur eng begrenzt in den Venulen der koronaren Mikrozirkulation beobachtet werden (Abb. 9). Zwischen blau und rot gefärbten Gefäßanteilen befindliche Kapillarnetze waren nur unspezifisch gelb gefärbt, enthielten also keines der untersuchten Markerenzyme. An keiner Stelle konnte ein gleichzeitiger Nachweis beider dargestellter Enzyme erfolgen.

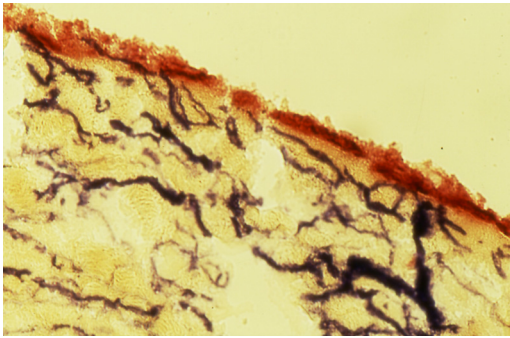
Wie anhand früherer histologischer Studien der Arbeitsgruppe um Prof. Nees an Herzen anderer Spezies (Ratte, Meerschweinchen, Rind) bereits gezeigt, ermöglichen also auch in der menschlichen koronaren Mikrozirkulation enzymhistochemische Nachweisverfahren eine zuverlässige histologische Diskriminierung von Mikrogefäßsegmenten.



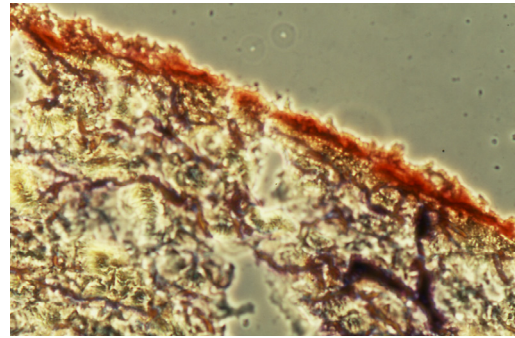
a



b



c



d

Abb. 6: Mikrotomschnitt des Mäuseherzens.

a und b: spezifisch durch Dipeptidylaminopeptidase IV rot gefärbte Venule im Arbeitsmyokard der Maus (linker Ventrikel).

c und d: alkalische Phosphatase-Aktivität war ausschließlich in arteriellen Mikrogefäßen, Dipeptidylaminopeptidase IV- Aktivität ausschließlich in den Venulen nachweisbar, die sich bei dieser Spezies im Epikard zu konzentrieren scheinen.

Abbildungen a und c Hellfeld, b und d Phasenkontrastoptik. Abbildungen a-d in gleichem Maßstab.

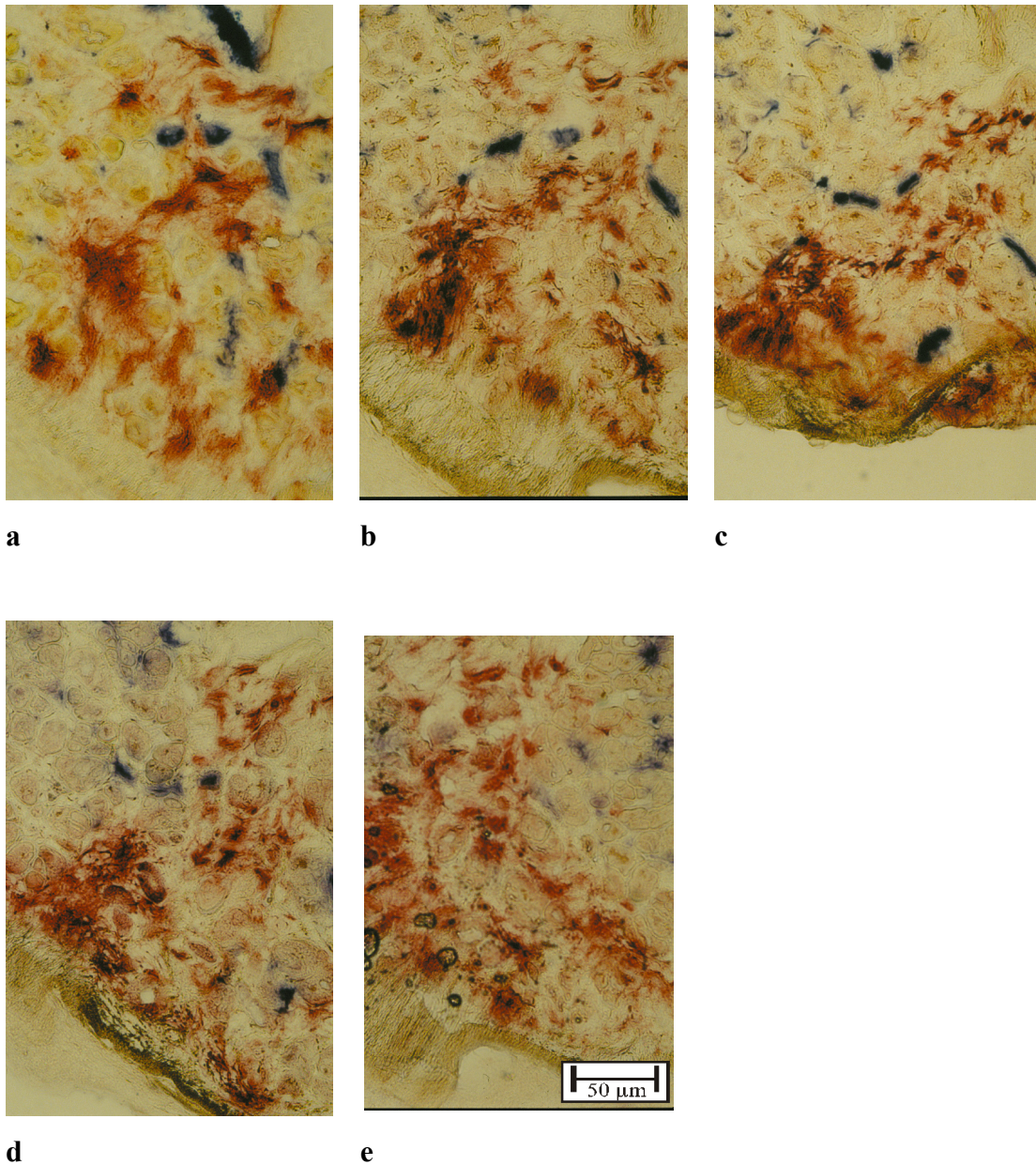


Abb. 7 (a-e): Serie direkt aufeinander folgender Mikrotomschnitte von menschlichem Myokard (linker Venrikel). Die Dicke des einzelnen Schnittes betrug 25 µm. Auch im Myokard des Menschen blieb die alkalische Phosphatase-Aktivität (blau) auf kleine arterielle Gefäße, die Dipeptidylaminopeptidase IV- Aktivität (rot) auf die Venulen beschränkt. Weitere Einzelheiten siehe Text.

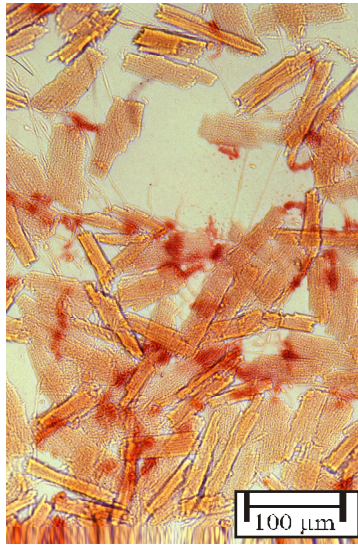


Abb. 8: Gewebesuspension nach proteolytischer Dissoziation menschlichen Myokards. Rot gefärbt (einige mit Pfeilen markiert) sind dispergierte venuläre Endothelzellen.

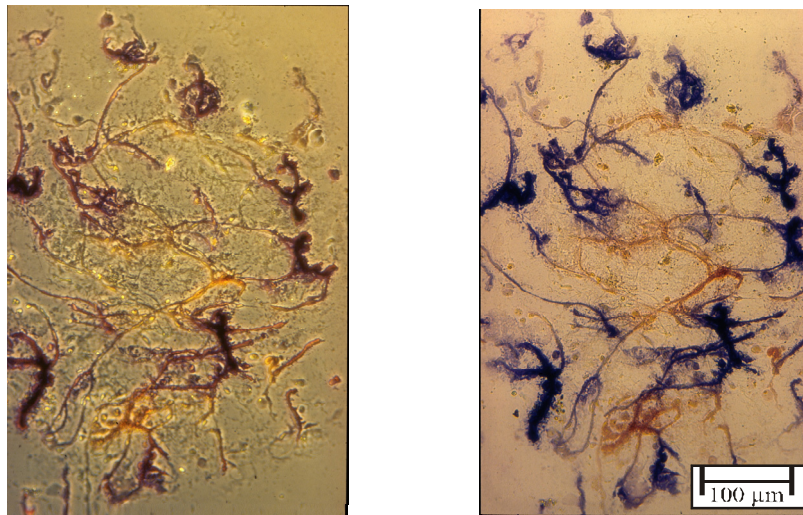


Abb. 9: Mikrogefäßnetz aus dem Myokard des Menschen. Arteriolen wurden mittels perizytenspezifischer Alkalischer Phosphatase blau, Venulen durch Dipeptidylaminopeptidase IV rot und Kapillaren unspezifisch gelb gefärbt. (Links in Phasenkontrastoptik, rechts im Hellfeld aufgenommen)

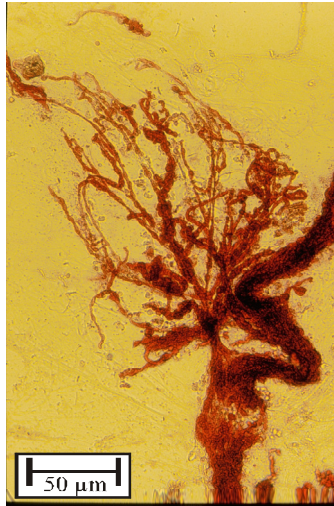


Abb. 10: Isolierter Venulenkomples aus der menschlichen koronaren Mikrozirkulation. Die rote Farbe wurde enzymhistochemisch mit Hilfe des Markerenzym Dipeptidylaminopeptidase IV erzeugt.

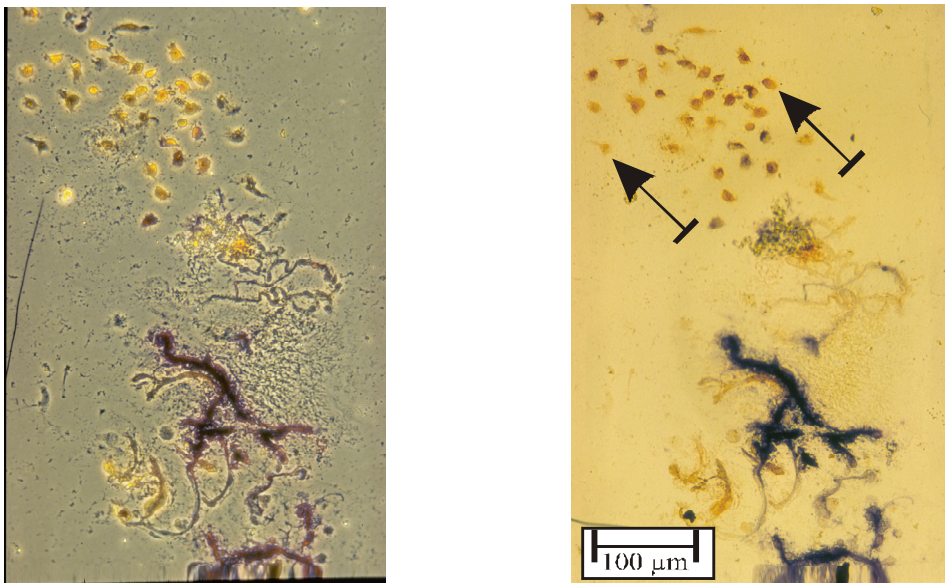


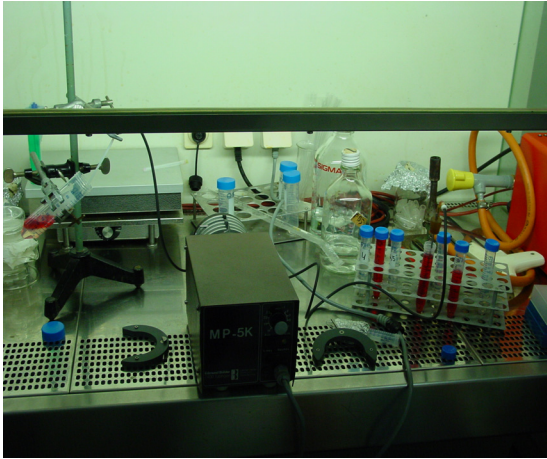
Abb. 11: Bei voranschreitender proteolytischer Dissoziation einer Gewebesuspension zerfielen zuerst Venulen in ihre zellulären Bestandteile, wohingegen Arteriolen und Kapillaren noch länger intakt blieben. Die Pfeilmarkierungen weisen auf venuläre Endothelzellen hin (links in Phasenkontrastoptik, rechts im Hellfeld).

2. Versuche zur Etablierung venulärer Endothelzellen des Mäuseherzens in Gewebekultur

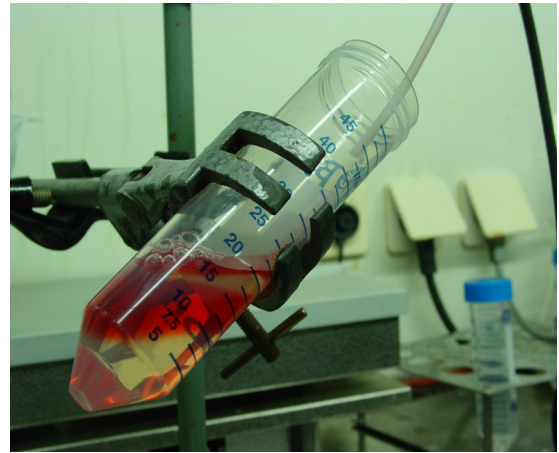
Vor Tötung der Maus erwies sich die subkutane Injektion von synthetisch hergestelltem, niedermolekularem Heparin (Fragmin®) als unverzichtbar um die Entstehung von Thromben im Koronarsystem zu vermeiden und eine gleichmäßige Herzperfusion zu gewährleisten. Der Einsatz von hochmolekularem Heparin erwies sich in Vorversuchen als unzuverlässig, da offenbar zahlreiche Koronargefäße Spasmen entwickelten und eine gleichmäßige Perfusion unmöglich machten. Die Folgen waren große Infarktbereiche. Ursache waren möglicherweise kleinste Mengen Histamin, die sich präparationsbedingt in der makromolekularen Heparinlösung befanden (Mitteilungen auf Angiologenkongress, Berlin 2000). Um dennoch auftretende Spasmen zu vermeiden und eine gleichmäßige Verteilung des optimierten Enzymgemisches zu erreichen, wurde sowohl der Ca^{2+} -freien Perfusionslösung als auch dem Enzymperfusat 10 μM Papaverinhydrochlorid beigesetzt. Unter solchen Bedingungen fand eine homogene Perfusion statt.

Nach der Enzymperfusion wurde das Herz, wie im Methodenteil erläutert, zerkleinert und in einem speziell angefertigten Glastrichter mit Proteaselösung nachinkubiert. Langsam aufsteigende, kleine Carbogenblasen bewirkten eine vollständige -aufgrund der durch sie ausgeführten geringen Scherkräfte- besonders schonende Dissoziation herabsinkender, noch undissoziierter Gewebestückchen. Um hinreichend kleine Gasbläschen zu erhalten wurde ein 1 mm dicker Teflonschlauch in den Trichter eingesetzt.

Eine wichtige Voraussetzung für die Etablierung von Zellkulturen venulärer Endothelzellen aus der so erhaltenen Gewebesuspension war deren Anreicherung mittels eines speziell ausgearbeiteten Verfahrens. Zu diesem Zweck wurde ein kontinuierlicher Dichtegradient verwendet, dessen Herstellung im Kapitel „Material und Methoden“ bereits erläutert wurde. Der durch vorsichtiges Aufeinanderschichten der einzelnen Percoll-Verdünnungen entstandene diskontinuierliche Gradient (siehe Abb. 12) wurde durch erschütterungsfreies Stehen lassen bei Zimmertemperatur innerhalb von 12 h durch Diffusion kontinuierlich bzw. linear.



a



b



c



d

Abb. 12: Zur Herstellung des diskontinuierlichen Percoll-Gradienten (c) wurden mit Hilfe einer geeigneten peristaltischen Pumpe die jeweiligen Percoll-Verdünnungen vorsichtig aufeinander geschichtet (a, b). Zur besseren Sichtbarkeit der Schichtgrenzen wurde jeder zweiten Fraktion Phenolrot zugemischt. Durch Diffusion entstand bei Zimmertemperatur über Nacht ein kontinuierlicher Gradient (d). Weitere Einzelheiten im Text.

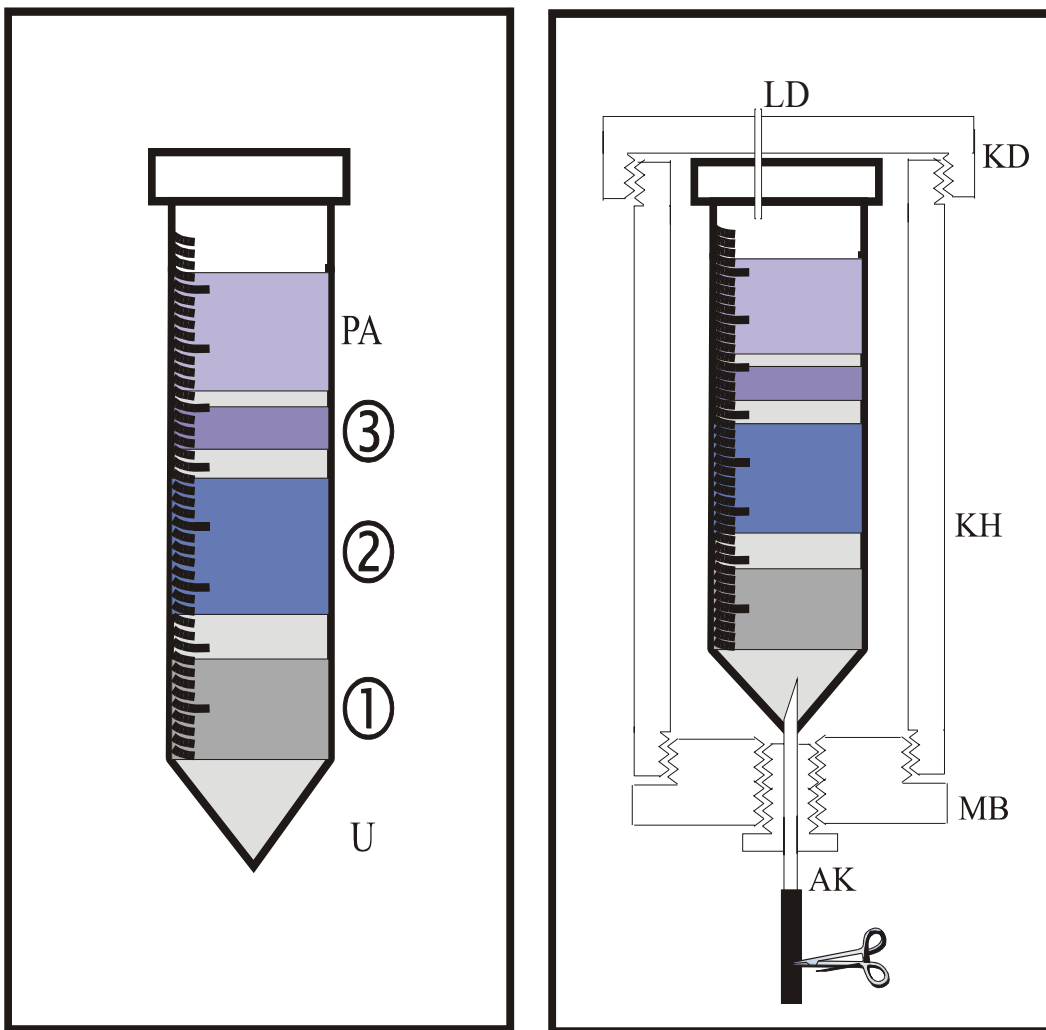


Abb. 13: Die linke Skizze zeigt schematisch die Fraktionen des Dichtegradienten

PA= Probenauftragszone, 3= Kapillarbande, 2= Gefäßfraktion (hauptsächlich Arteriolen), 1= Angereicherte Venulen und Kardiomyozyten, U= Unterschichtung mit 90%-iger Percoll-Lösung.

Die rechte Skizze zeigt, wie die einzelnen Fraktionen eines solchen Gradienten entnommen werden konnten.

KH= durchsichtiges Kunststoffgehäuse, MB= aufschraubbare Metallbodenplatte, KD Kunststoffdeckel mit mittiger Aussparung, AK= aufschraubbare Metallkanüle, LD= Kanüle zur Perforation des Deckels.

Nach Zentrifugation über diesen kontinuierlichen Dichtegradienten wurden mit Hilfe einer speziell entwickelten Fraktionierungsapparatur (siehe Abb. 13) auf einfache Weise die Dichtefractionen entnommen. Im Bereich der 40 %-igen bis 35 %-igen Percollösungen fanden sich vor allem venuläre Endothelzellen und Venulenfragmente angereichert. Im mittleren Bereich des Gradienten (30 %-ige Percoll-Verdünnung) fanden sich vor allem Endothelzellen arteriolärer Herkunft und zahlreiche Arteriolenfragmente, in den dünneren Bereichen (25-20 %-ige Percoll-Verdünnung) konnten einzelne Bindegewebszellen, kapilläre Endothelzellen und leere Basalmembranschläuche von Kapillaren beobachtet werden.

Anfänglich eingesetzte diskontinuierliche Gradienten erwiesen sich zur Auftrennung der einzelnen Zellarten als ungeeignet, da zahlreiche Zellen und Gefäßfragmente die scharfen Schichtgrenzen nicht überwinden konnten, sich dort ansammelten und weitere Objekte am Durchtritt in tiefere Bereiche des Gradienten hinderten.

In der Zellkultur zeigte sich in Dulbecco-Standardkulturmedium ein nur mäßiges Wachstum der im Dichtegradienten angereicherten Endothelzellen, wohingegen in der Kultur befindliche Fremdzellen, vor allem Perizyten vorzugsweise proliferierten. Vorhandene Endothelzellklone wurden rasch umwachsen und hatten bald keine Möglichkeit mehr, sich weiter auszubreiten (Abb. 14).

Des Weiteren wanderten die Zellen zunächst konfluenter Endothelinseln binnen weniger Tage auseinander, was zur Folge hatte, dass wiederum die im Übermaß proliferierenden Fremdzellen in die entstandenen Lücken zwischen den Endothelzellen einwachsen konnten und die Bildung eines konfluenten Endothelrasens unmöglich machten. Zudem konnte beobachtet werden, dass einzelne, vor allem venuläre Endothelzellen nicht in der Lage waren, sich voll auf dem Schalenboden auszubreiten und sich abkugelten (Abb. 15). Offenbar waren die angebotenen Bedingungen, insbesondere das Angebot eines spezie fremden fetalen Serums (FCS) nicht genügend, um ein ausreichendes Wachstum von Endothelzellen dieser Tierspezies zu gewährleisten.

Im Folgenden wurde nun in ausgedehnten Versuchen darauf abgezielt, die Kulturbedingungen so zu optimieren, dass dennoch speziell Endothelzellen die Möglichkeit zur Proliferation und zur Bildung konfluenter Zelllagen hatten.

Teils wurden hierzu selbst hergestellte spezie autologe Seren und fetale Wachstumsfaktor-Extrakte verwendet, teils im Handel erhältliche spezielle Endothel-Wachstumsmedien, wie in untenstehender Liste tabellarisch dargestellt. Die Extrakte aus neugeborenen Mäusen, deren Herstellung im Methodenteil erläutert wurde, wurden mittels Gel-Chromatographie nach

Molekülgrößen der gelösten Bestandteile in 2 Fraktionen (Niedrigmolekulare Fraktion: MG < 30 000, Hochmolekulare Fraktion: MG >30 000) aufgetrennt und hinsichtlich ihrer Wirkung getrennt betrachtet.

Versuchsweise eingesetzte spezielle Wachstumsmedien:

Medium 1

DMEM + 10 % FCS
+ 10 % adultes Mäuseserum
+ 10 % adultes Mäuseserum + 10 % FCS

Medium 2

Extrakt neugeborener Mäuse in DMEM, 1. (niedermolekulare) Fraktion
ohne Zusätze
+ 10 % FCS
+ 10 % FCS + 0,5 mM LACA
wärmebehandelt, ohne Zusätze
wärmebehandelt + 10 % FCS

Medium 3

Extrakt neugeborener Mäuse in DMEM, 2. (hochmolekulare) Fraktion
ohne Zusätze
+ 10 % FCS
wärmebehandelt, ohne Zusätze
wärmebehandelt + 10 % FCS

Medium 4

Gibco Human Endothelial-SFM Basal Growth Medium
+ 10 % FCS
+ 10 % adultes Mäuseserum
+ 10 % adultes Mäuseserum + 10 % FCS

Medium 5

Promocell ECGM

+ 10 % FCS

+ 10 % adultes Mäuseserum

+ 10 % adultes Mäuseserum + 10 % FCS

Medium 6

D-Valin-Medium + 10 % FCS

In keinem dieser Kulturmedien gelang es jedoch, ein selektives Wachstum venulärer Endothelzellen wenigstens angenähert zu erreichen bzw. diesen einen Wachstumsvorteil gegenüber den immer noch im Übermaß proliferierenden nicht-endothelialen Zellen zu verschaffen. Das im Vergleich beste Endothelwachstum zeigten jedoch Medien, die fraktionierten Extrakt neugeborener Mäuse enthielten. Doch konnten sich kaum größere konfluente, homogen zusammengesetzte Endothelfelder zusammenschließen. Das Perizytenwachstum konnte auch durch Zusatz von 0,5 mM L-Azetidin-2-Carboxylsäure (einem Inhibitor der Kollagensynthese) oder durch Verwendung eines in der Literatur⁶⁰ empfohlenen D-Valin-haltigen und L-Valin-freien Selektiv-Mediums nicht gehemmt werden. In Primärkulturen, die auf speziell mit Gelatine oder Kollagen beschichteten Wachstumsflächen etabliert wurden, konnten ebenfalls keine spezifischen Vorteile für das Endothelwachstum erkannt werden.

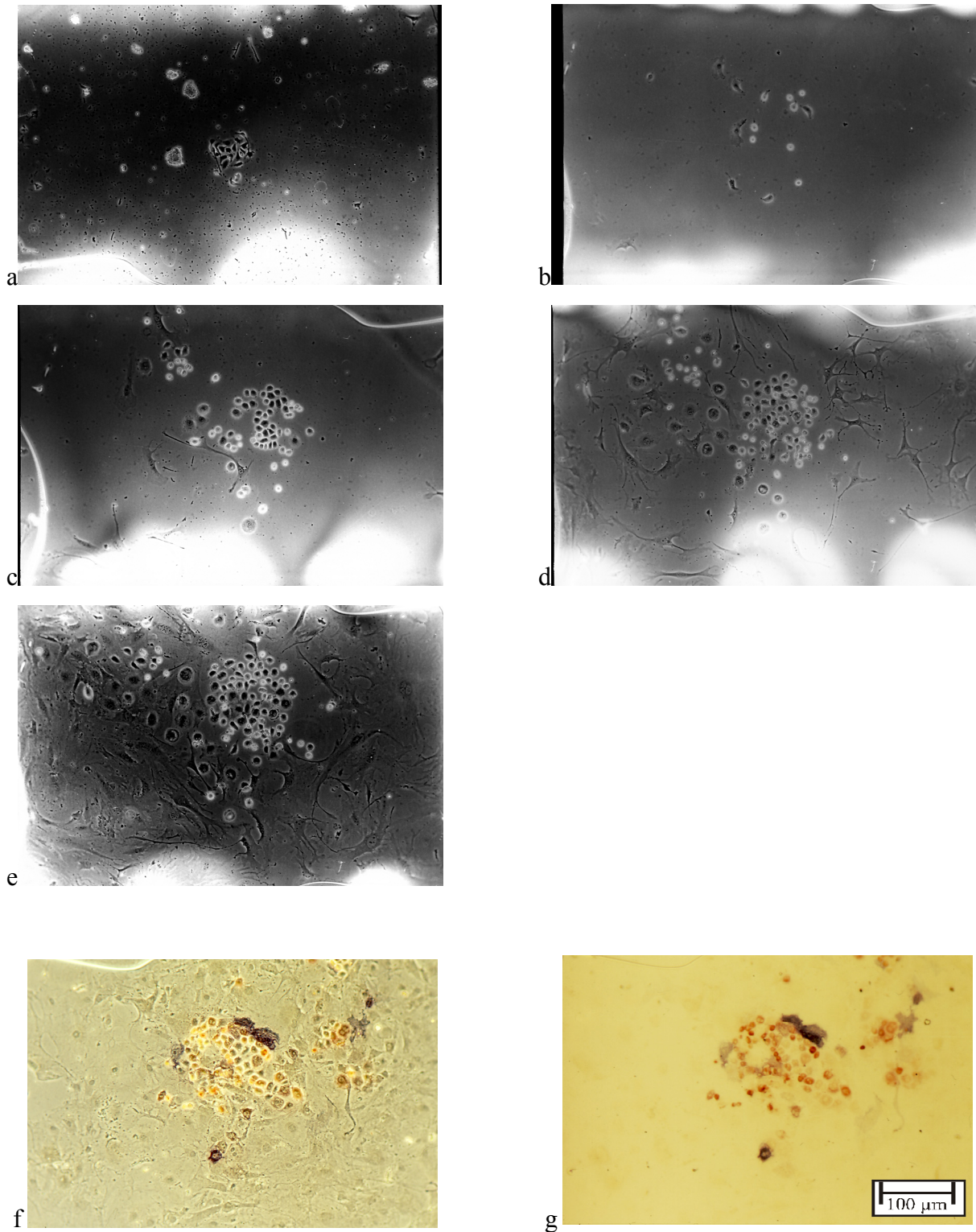


Abb. 14: Identischer Ausschnitt aus einer Primärkultur angereicherter venulärer Endothelzellen der myokardialen Mikrozirkulation der Maus. Die Aufnahmen entstanden 1 (a), 3 (b), 5 (c), 7 (d) und 9 (e) Tage nach Zellaussaat.

Aufnahmen f und g zeigen den zu (e) identischen Ausschnitt nach enzymhistochemischer Doppelfärbung auf alkalische Phosphatase und Dipeptidylaminopeptidase IV: venuläre Endothelzellen sind rot, Perizyten blau gefärbt.

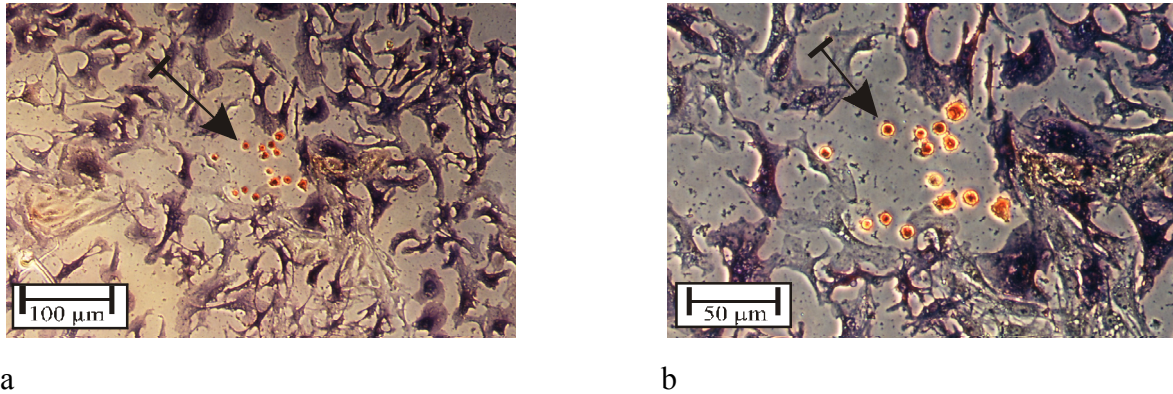


Abb. 15: Primärkultur aus dem Myokard der Maus: Venuläre Endothelzellen (rot, Pfeil) konnten unter den gebotenen Bedingungen nicht zu konfluenten Zelllagen heranwachsen, wohingegen Perizyten (blau) überschüssig proliferierten.

3. Etablierung und Langzeitkultur reiner Zellkulturen venulärer Endothelzellen aus menschlichen Explantatherzen

Abb. 16 zeigt eine Abwandlung der für das Herz der Maus verwendeten und bereits erläuterten Perfusionsapparatur, mit der auch entsprechend größere Herzen, wie das des Menschen perfundiert und reproduzierbar enzymatisch desintegriert werden konnten.

Unverzichtbare Vorbedingungen für die Proteolyse möglichst großer Organbezirke waren einerseits die sorgfältige Auswahl der zur Perfusion geeigneten epikardialen Arterien und ihre Kanülierung und andererseits die möglichst vollständige Ligatur arterieller Kurzschlussgefäße, durch die der größte Anteil des Perfusats unter Umgehung der Widerstandsgefäße der Mikrozirkulation ausströmen könnte.

Des Weiteren musste der Abfluss der Perfusionslösung über das venöse System gewährleistet sein, damit das optimierte Proteasengemisch das gesamte Gefäßsystem durchströmen und somit eine gleichmäßige Dissoziation des Myokards bewirken konnte. Zu diesem Zweck wurden angeschnittene epikardiale Venen in ihrem Verlauf so weit wie möglich aufgeschnitten, damit das Perfusat ungehindert abfließen konnte. Auch eine akzidentelle Ligatur eines solchen Gefäßes bei Kanülierung oder Ligatur einer benachbarten Arterie konnte so auf einfache Weise vermieden werden.

Einzelheiten hierzu sind der Abb. 18 zu entnehmen

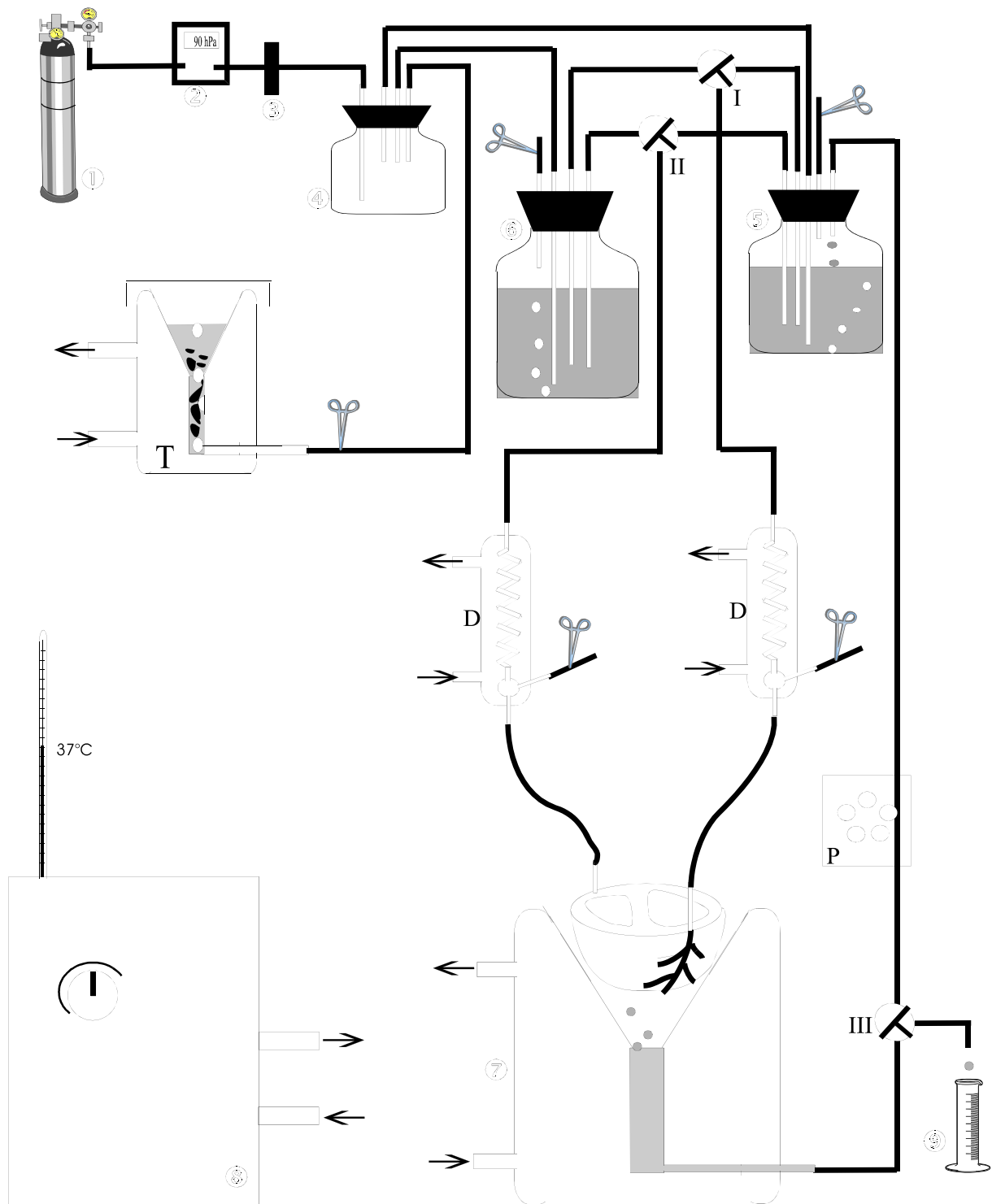


Abb. 16: Apparatur zur Perfusion menschlicher Herzen. Einzelheiten sind dem Text zu entnehmen.

(1=Carbogenvorrat; 2=Druckminderer; 3=Sterilfilter; 4=Gasverteiler; 5=Vorratsbehälter für Enzymlösung; 6=Vorratsbehälter für calciumfreies Perfusionsmedium; 7=beheizbarer Trichter; 8=beheizbares Wasserbad (37°C); 9=Auffanggefäß)

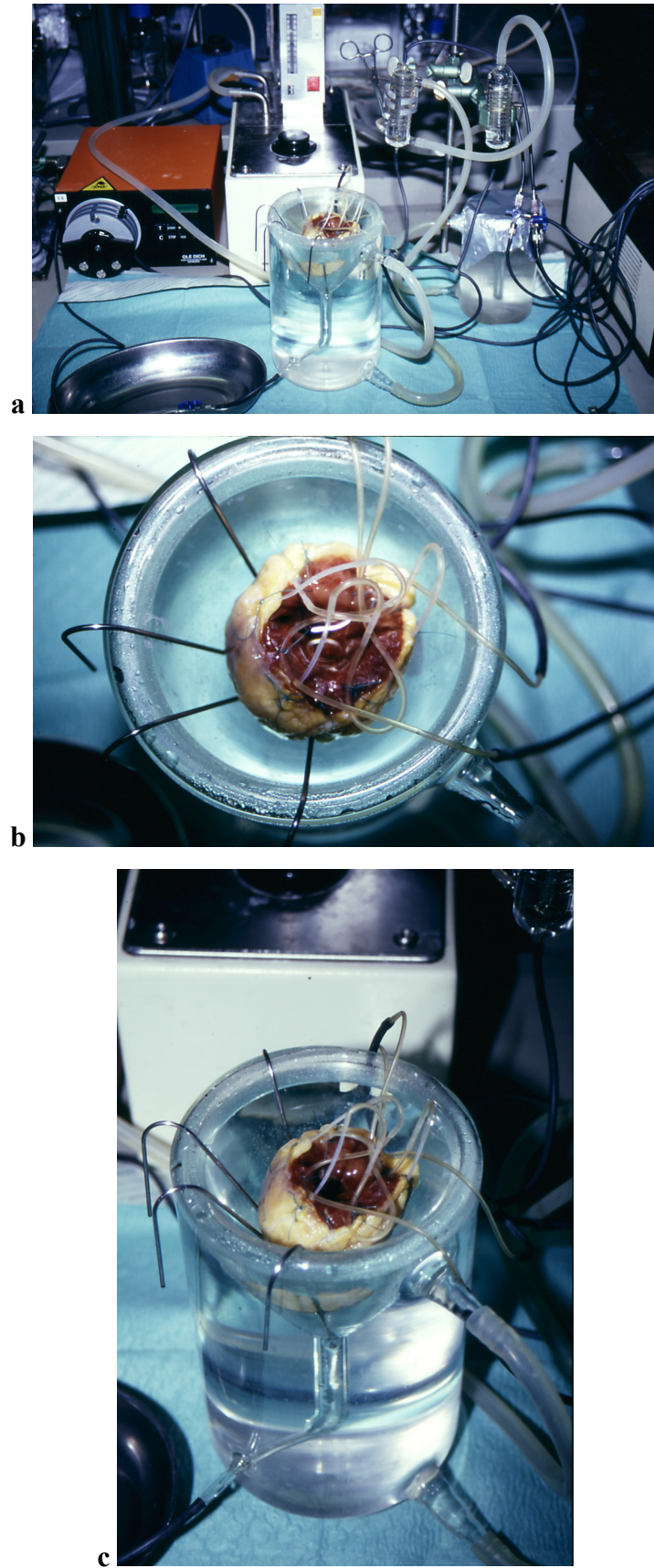


Abb. 17: Auf im Text geschilderte Weise präparierte menschliche Herzspitze während der Perfusion mit geeigneter Lösung.

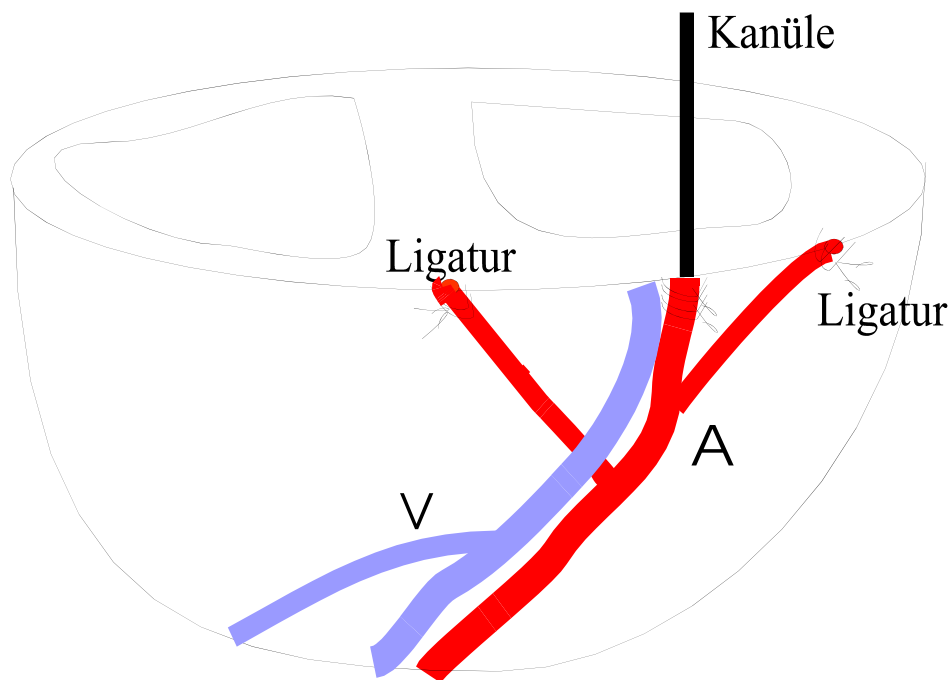


Abb. 18: Schematisch dargestellt ist eine menschliche Herzspitze. Angeschnittene Koronararterien (A) wurden kanüliert, Kollateralarterien ligiert. Epikardiale Venen (V) wurden inzidiert und offen gehalten. Weitere Einzelheiten siehe Text.

Nach 90-minütiger Perfusion der Explantatherzspitze mit Enzymlyösung waren zwischen 40 und 80 % des Myokardgewebes so weit dissoziiert, dass diese Anteile durch eine breiige, teils flüssige Struktur und eine im Vergleich zu intaktem Myokard helle Verfärbung auffielen. So konnten perfundierte leicht von nicht-perfundierten Organbezirken unterschieden werden und so gezielt das dissoziierte Gewebe der weiteren Nachverdauung in einem an die größeren Gewebemengen angepassten Trichter zugeführt werden.

Während der nun folgenden 90-minütigen Enzyminkubation im allerdings erheblich größeren Trichter konnte analog zum Myokard der Maus durch langsam aufsteigende Carbogengasblasen und damit Einwirkung geringer Scherkräfte auf sich zersetzendes Myokard eine besonders schonende weitere Dissoziation des Gewebes erreicht werden. Aufgrund der großen Gewebemengen blieben hier allerdings noch einzelne, unzureichend zersetzte Myokardbrocken in der Suspension zurück. Diese sedimentierten jedoch bei Verdünnung der Gewebesuspension mit PBS in einem Becherglas innerhalb von etwa 10 Sekunden und konnten durch wiederholtes Dekantieren des Überstandes von dissoziiertem und deshalb suspendiertem Gewebe getrennt werden. Die auf diese Weise gewonnene

Suspension weitgehend homogen dissoziierten Myokardgewebes konnte nun flüssig über Nylonnetze der Maschenweite 200 μm filtriert werden, wobei nur noch wenige minderverdaute Gewebeflocken zurückblieben.

Die Enzymperfusions- und Inkubationszeiten mussten so lange gewählt werden, bis kaum noch intakte Mikrogefäßsegmente in der Suspension enthalten waren, sondern in erster Linie Einzelzellen.

Nun konnte die Anreicherung venulärer Endothelzellen mittels einer speziell angepassten und optimierten Dichtegradientenzentrifugation erfolgen. Vor dem Auftragen auf die kontinuierlichen Dichtegradienten, deren Herstellung analog zu dem bei der Maus verwendeten Percoll-Gradienten erfolgte, erwies es sich als günstig, die Gewebesuspension im Verhältnis 1:1 mit 20 %-iger Percoll-Lösung zu versetzen und zu gleichen Teilen (jeweils 15 ml Gewebesuspension) auf mindestens 6 Dichtegradienten aufzutragen. Somit wurde sowohl das Eindringen von Zellen und Gefäßfragmenten in den Dichtegradienten erleichtert als auch eine Überladung des Gradienten durch zu große Gewebemengen vermieden.

Nach Zentrifugation über diesen Gradienten und Fraktionierung zeigte sich ein ganz ähnliches Verteilungsmuster der einzelnen Fraktionen, wie bereits für das Herz der Maus erläutert wurde (siehe Abb. 13). Im Unterschied zum Mäuseherzen fanden sich hier jedoch in der untersten Fraktion fast ausschließlich Erythrozyten und kaum noch Zellen myokardialen Ursprungs. Die venulären Endothelzellen waren hier vor allem im Bereich der 37,5 bis 35%-igen Percoll-Lösung angereichert.

Bei Aussaat der Zellen in Standardkulturmedium musste besonderes Augenmerk auf die Aussaatdichte gelegt werden. Als optimal erwies sich hierbei eine Suspension, nach deren Aussaat in einer Kulturschale etwa 1000 Zellen pro cm^2 zur Anheftung kamen. Bei einer größeren Zellzahl pro Flächeneinheit kam es zu einer raschen Überwucherung der Gewebekultur durch nicht-endotheliale Zellen, so dass sich kaum konfluente Endothelinseln bilden konnten. Bei zu geringer Zellzahl zeigten insbesondere Endothelzellen ein vergleichsweise schlechtes Wachstum. In idealer Dichte ausgesäte Primärkulturen wuchsen unter den weiter unten geschilderten Zellkulturbedingungen innerhalb von 10 – 14 Tagen zur Konfluenz heran (Abb. 19).

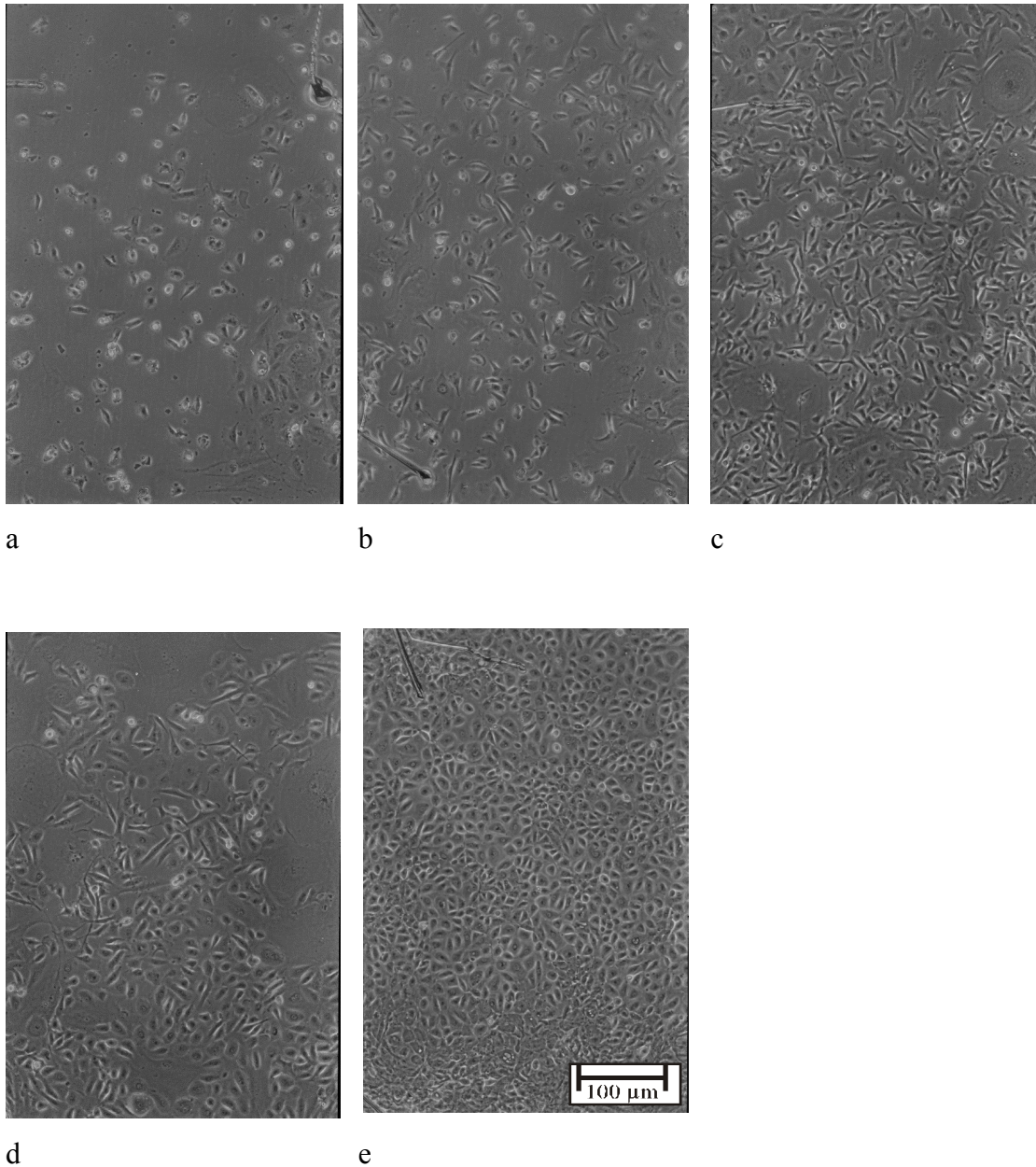


Abb. 19: Identischer Ausschnitt aus einer Primärkultur angereicherter venulärer Endothelzellen der menschlichen myokardialen Mikrozirkulation fotografiert nach 1 (a), 3 (b), 5 (c), 7 (d) und 9 (e) Tagen nach Aussaat.

Bei der Primärkultur so angereicherter venulärer Endothelzellen erwies sich das Standardkulturmedium als unzulänglich. Endothelzellen proliferierten hier nur sehr schlecht, wohingegen Zellen nicht-endothelialer Herkunft ein sehr gutes Wachstum zeigten. Käufliches Endothelwachstumsmedium (Firma Promocell) gewährleistete zwar ein gutes Wachstum der

Endothelzellen, allerdings auch in sehr hohem Maße der Fremdzellen. Ein ähnliches Bild ergab auch der Zusatz von Wachstumsfaktoren (EGF 0,1 ng/ml, bFGF 1,0 ng/ml) zu Standardkulturmedium. Eine Mischung aus 50 % Standardkulturmedium und 50 % Promocell-Medium induzierte hingegen ein selektives Endothelwachstum (vergleichsweise langsamere Proliferation nicht-endothelialer Zellen). Zusätzlich zeigten die Endothelzellen bei Zugabe von 10 % (v/v) menschlichem Serum-Ultrafiltrat (Ausschlussgrenze 100.000 Dalton) zu diesem Mischmedium eine besonders charakteristische Morphologie. Es erwies sich daher als vorteilhaft Primärkulturen 4 Tage nach Aussaat mit diesem Medium zu versorgen. Bei jedem Mediumwechsel musste darauf geachtet werden, dass die Schalen nie ganz von altem Medium entblößt wurden, da venuläre Endothelzellen offenbar besonders empfindlich auf Oberflächenspannungseffekte, Scherkräfte und Änderungen des osmotischen Drucks bzw. des pH-Wertes reagierten.

Nach mindestens zweimonatiger Primärkultur konnte beobachtet werden, dass Endothelzellrasen, die vollständig von Fremdzellen umgeben waren weiterhin proliferierten, dass die Zellen im Inneren des Klons eng zusammenrückten, Zellen in der Peripherie der Kolonie sich teilweise unter die umgebenden Fremdzellen schoben, diese abhoben und langsam verdrängten. Auf diese Weise erhielt man schließlich großflächig ausgedehnte, homogen zusammengesetzte Endothelschichten (Abb. 20).

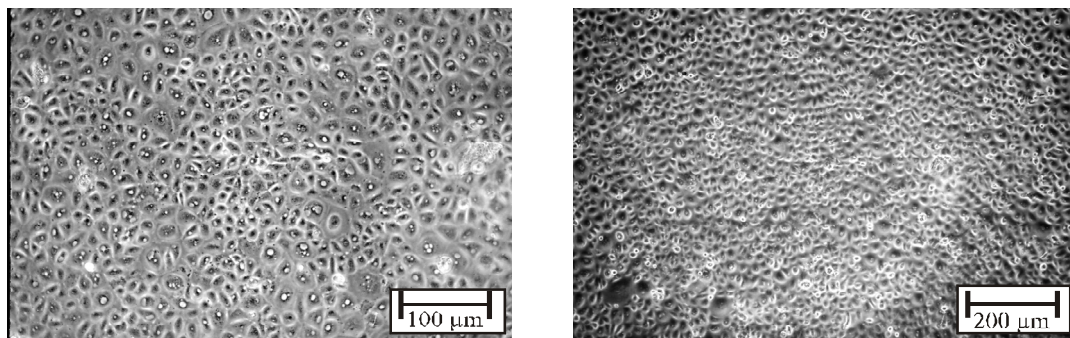


Abb. 20: Konfluenten Rasen menschlicher venulärer Endothelzellen bei verschiedenen Vergrößerungen.

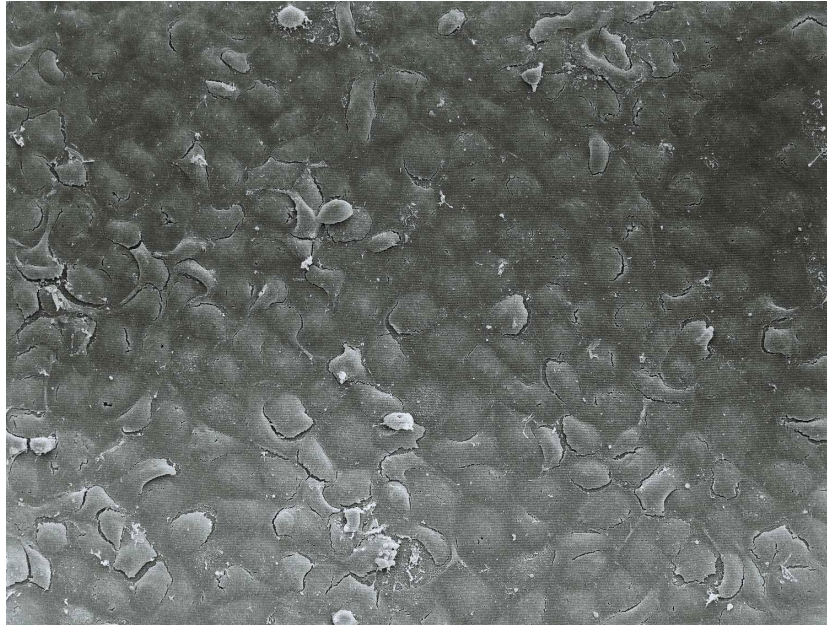


Abb. 21: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines venulären Endothelzellrasens aus dem menschlichen Herzen.

Mit dem geschilderten Studium der Gewebekultur waren die Vorbedingungen zur weiteren spezifischen Nachreinigung und anschließenden Subkultivation geschaffen. Zu diesem Zweck kam eine spezielle „Endothelial Cell Purification Solution“ (ECPS) zum Einsatz, die von Prof. Nees entwickelt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. ECPS verminderte die Adhäsionsfähigkeit und Vitalität spezifisch der kontaminierenden Begleitzellen. Bereits während der 30-minütigen Inkubation einer Zellkultur mit einer 1:20- Verdünnung von ECPS in Standardkulturmedium lösten sich zahlreiche Fremdzellen ab, während die Endothelzellen adhärent blieben. Dieser Ablösevorgang nicht-endothelialer Zellen hielt sogar noch während der anschließenden 6-stündigen Erholungszeit in Standardkulturmedium an, wohingegen Endothelzellen, die ihren Kontakt zum Schalenboden in weitaus geringerem Maße lockerten sich in diesem Zeitraum wieder fest anhefteten. Im Anschluss konnten abgelöste oder stark geschwächte Fremdzellen durch gezieltes Spülen mit PBS mittels Spritzen mit aufgesetzter Kanüle selektiv entfernt werden. Bei kürzeren Erholungszeiten wurden durch den Spülvorgang auch zahlreiche Endothelzellen weggerissen, längere Erholungszeiten, wie auch Inkubation mit Mischmedium während der Erholungszeit erlaubte Fremdzellen teilweise eine erneute feste Adhäsion. Die nach dem Spülvorgang noch adhären, jetzt reinen Endothelkolonien konnten nach weiterer Erholungszeit in Mischmedium mit Trypsinlösung abgelöst und weiter subkultiviert werden. (siehe hierzu Bilderserie Abb. 22).

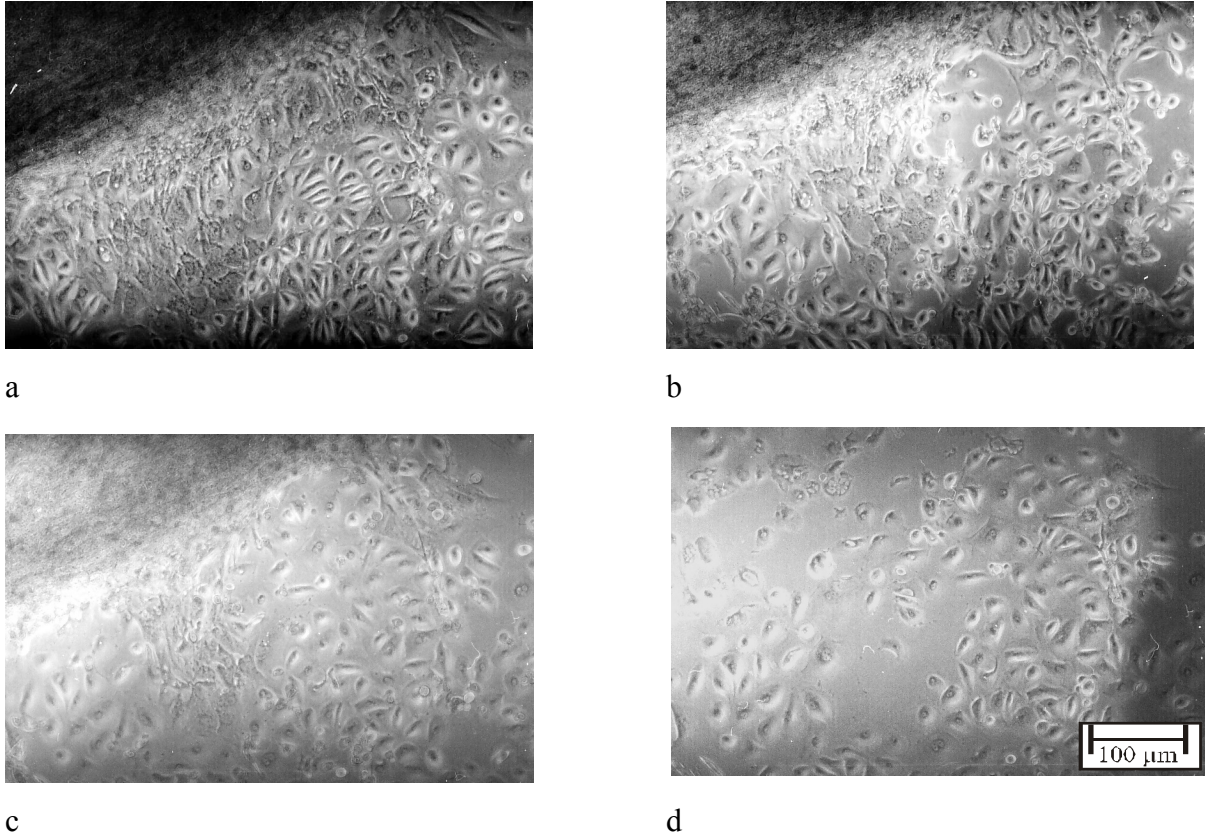


Abb. 22: Spezifische Reinigung einer Zellkultur mittels ECPS-Lösung. a: Ausgangskultur, b: identischer Ausschnitt nach 30-minütiger Inkubation mit ECPS-Lösung, c: identischer Ausschnitt nach 6-stündiger Erholungszeit, d: identischer Ausschnitt nach Spülung der Kultur.

Durch Vermeidung einer Zentrifugation zur Abtrennung des Trypsin/EDTA-Gemisches ließ sich der Prozentsatz avitaler Endothelzellen von ca. 20 % auf ca. 5 % senken. Die abgelösten Zellen in Trypsinlösung wurden dazu in einem geeigneten Volumen Mischmedium suspendiert, dem zuvor im Überschuß Trypsininhibitor beigemischt wurde. Die so ausgesäten vitalen Zellen adhärten innerhalb von 2 h auf dem Schalenboden und erhielten sofort anschließend noch einmal frisches Wachstumsmedium.

Wie aus den Wachstumskurven (Abb. 24) ersichtlich ist, war bei der weiteren Kultur hochreiner venulärer Endothelzellen auffällig, dass die Endothelzellen nun ein deutlich schlechteres und langsames Wachstum zeigten als in der Primärkultur oder in Gegenwart nicht-endothelialer Zellen, die offenbar als Ammenzellen wirkten. Deshalb wurden verschiedene Kokultur-Modelle erprobt. Als besonders zweckmäßig erwiesen sich handelsübliche, transparente Filtermembraneinsätze, die mit menschlichen nicht-endothelialen Mischkulturen beimpft wurden und in Multiwell-Schalen, die reine Endothelkulturen enthielten eingehängt wurden („Costar Transwell-System“). Umgekehrt konnten auch venuläre Endothelzellen auf geeigneten Filtermembranen ausgesät werden und in das untere Kompartiment die Mischkulturen eingebracht werden. Auf diese Weise wurde in geeignetem Kulturmedium eine optimale Proliferation venulären Endothels auch in Reinkultur ermöglicht.

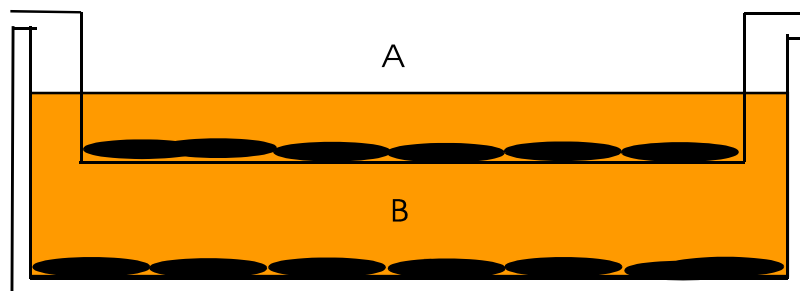


Abb. 23: Kokultur-Modell zur Kultur venulärer Endothelzellen: Reine Endothelkulturen konnten im Kompartiment A proliferieren, weil nicht-endotheliale Mischkulturen im Kompartiment B die benötigten Cofaktoren für ihr Wachstum sezernierten.

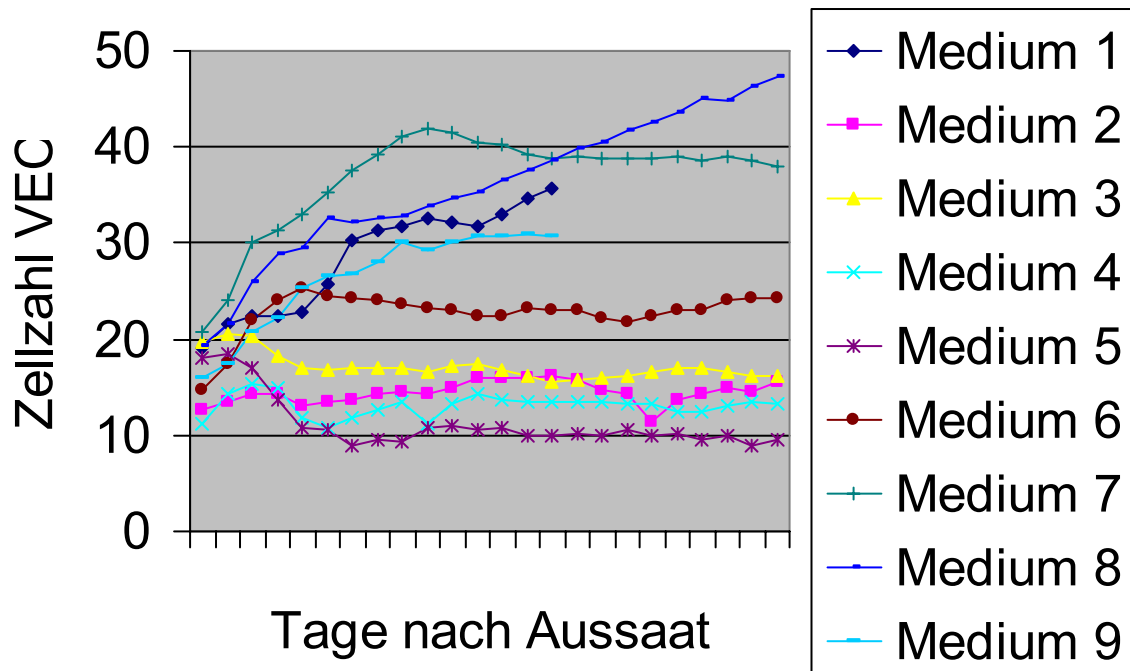


Abb.24a: Wachstumskurven menschlicher venulärer Endothelzellen. Im Vergleich mehrere eingesetzte Kulturmedien (Linien 1-9). Jeweils Mittelwerte aus 4 Bestimmungen aufgetragen.

Medium 1: DMEM + 20% FCS + EGF 0,1 ng/ml, bFGF 1,0 ng/ml

Medium 2: DMEM + 20% FCS + Heparin

Medium 3: M199 + 20% FCS + Heparin

Medium 4: Gibco-Medium + 20% FCS

Medium 5: Gibco-Medium + 20% FCS + Heparin

Medium 6: Gibco-Medium + 10% FCS + EGF 0,1 ng/ml, bFGF 1,0 ng/ml

Medium 7: Gibco-Medium + 10% autologes Serumfiltrat + EGF 0,1 ng/ml, bFGF 1,0 ng/ml

Medium 8: Mischmedium

Medium 9: Promocell-Medium

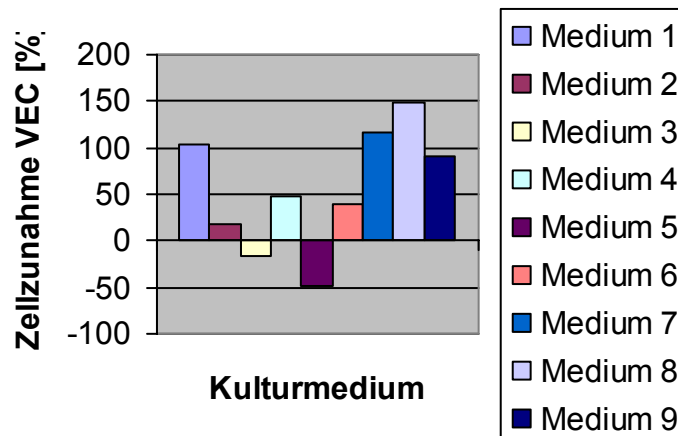


Abb. 24b: Prozentuale Zunahme der Zellzahl menschlicher venulärer Endothelzellen nach 24-tägiger Kultur in den oben genannten Kulturmedien. Mittelwerte aus jeweils 4 Bestimmungen.

4. Identifizierung venulärer Endothelzellen

Charakteristisch für venuläre Endothelzellen war ihre vergleichsweise hohe spezifische Dichte von ca. $1,06 \text{ g/cm}^3$, weshalb sie bei Zentrifugation über den Percoll-Dichtegradienten in den Bereich der 37,5 bis 35 %-igen Percollverdünnungen vordrangen und dort angereichert werden konnten.

Venuläre Endothelzellen des Menschen und der Maus fielen in konfluenten Zellkulturen bei lichtmikroskopischer Betrachtung bereits durch ihre charakteristische Morphologie, ihr einschichtiges, kontaktinhibiertes und pflastersteinartiges Wachstum und durch ihre auffallende Dicke auf.

Die eingangs bereits als Markerenzym für venuläre Gefäßprovinzen angesprochene DAP IV konnte auch in der Zellkultur durch enzymhistochemische Anfärbung auf venulären

Endothelzellen des Menschen und der Maus nachgewiesen werden. Diese imponierten durch ihre intensive Rotfärbung. Abb. 25 zeigt eine Zellkultur aus menschlichem Myokard. Erkennbar ist, dass hier im Gegensatz zur Maus auch noch andere Zellen venulären Ursprungs Aktivität an DAP IV besaßen, die keine Endothelzellen waren.

Die durch Alkalische Phosphatase hervorgerufene Blaufärbung konnte hingegen in Gewebekultur sowohl des menschlichen Herzens als auch des Mäuseherzens nur an Zellen arteriolen Ursprungs beobachtet werden, die keine DAP IV - Aktivität besaßen. Wie bereits für isolierte Mikrogefäßbäumchen und histologische Schnitte erläutert ließen sich also auch in der Zellkultur speziesübergreifend niemals beide Markerenzyme an der gleichen Zelle nachweisen.

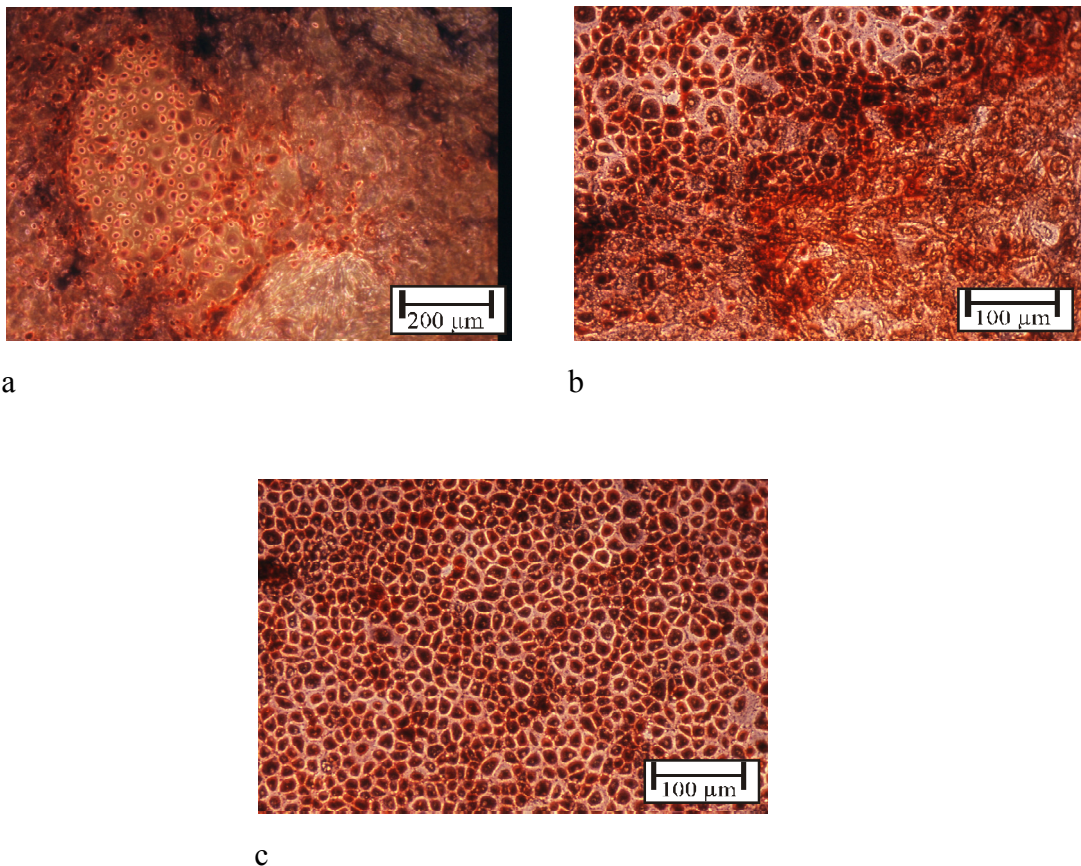


Abb. 25: Auf Dipeptidylaminopeptidase IV gefärbte Zellkultur aus menschlichem Myokard. Im menschlichen Myokard war DAP IV auf venulären Endothelzellen nachweisbar (c), daneben auch auf anderen Zellen venulären Ursprungs (a,b).

Die gereinigten venulären Endothelzellen besaßen im Gegensatz zu Endothelzellen aus vielen anderen vaskulären Provinzen kaum F VIII zugehöriges Antigen (F VIII:Ag). Dieses „von Willebrand Protein“ liegt in diesem Endotheltyp offenbar nicht in den in makrovaskulären Endothelzellen häufigen Weibel-Palade-Körperchen gespeichert vor, sondern diffus in geringen Konzentrationen im Zellinneren verteilt und extrazellulär in der gebildeten Basalmembran.

Venuläre Endothelzellen besaßen auch relativ hohe intrazelluläre Konzentrationen an glattmuskulärem α -Aktin.

Die Anwesenheit von Rezeptoren für acetyliertes LDL (Ac-LDL) konnte durch fluoreszenzmarkiertes Ac-LDL nachgewiesen werden.

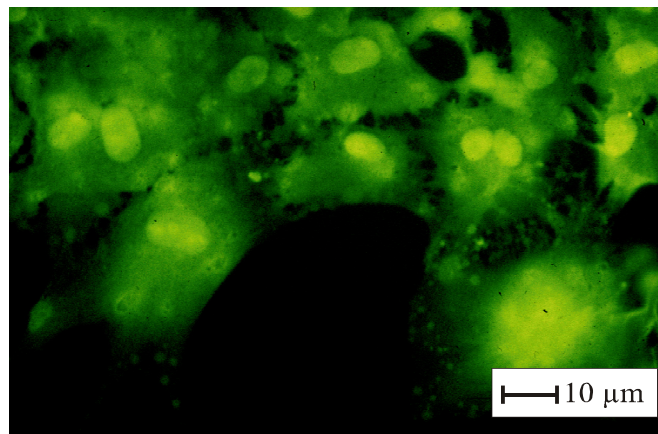


Abb. 26: Immunhistochemischer Nachweis von FVIII:Ag in kultivierten venulären Endothelzellen aus einem menschlichen Herzen.

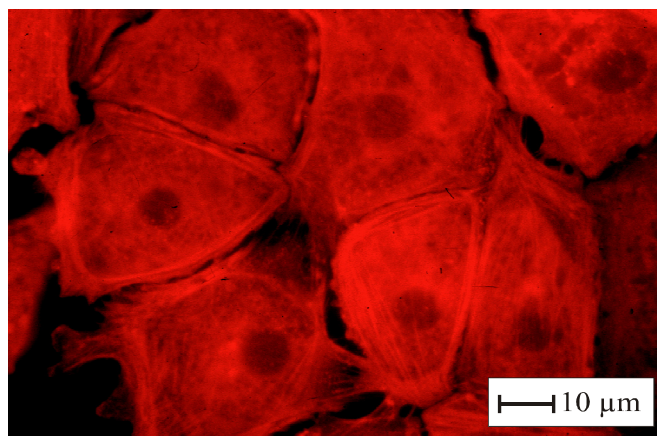


Abb. 27: Immunhistochemischer Nachweis von glattmuskulärem α -Aktin in kultivierten venulären Endothelzellen aus einem menschlichen Herzen.

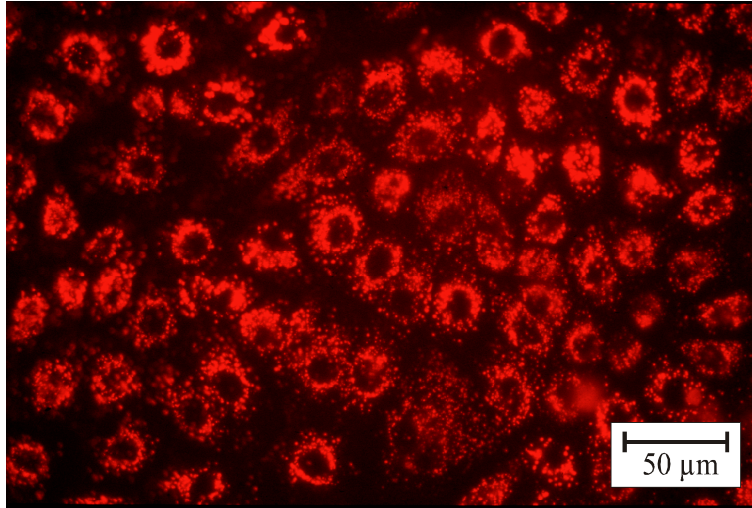


Abb. 28: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Aufnahme von Ac-LDL durch menschliche venuläre Endothelzellen.

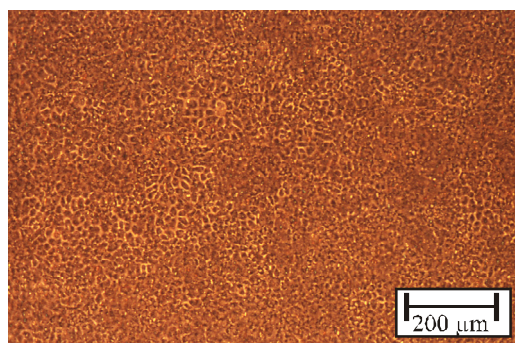
5. Optimierung eines Filtersystems zur Messung hydraulischer Konduktivitäten von bis zur Konfluenz gezüchteten Monolayern venulärer Endothelzellen

Ein im Rahmen der Dissertation meines Kollegen Gerd Juchem [„Etablierung und Charakterisierung mikrovaskulärer Endothelzellen und Perizyten aus dem bovinen Koronarsystem in Gewebekultur“, München 1999] bereits früher erprobtes Meßsystem zur Erfassung hydraulischer Konduktivitäten konfluenter Zellschichten wurde in systematischen Versuchen weiterentwickelt und speziell optimiert. Hier werden nur die Endergebnisse präsentiert.

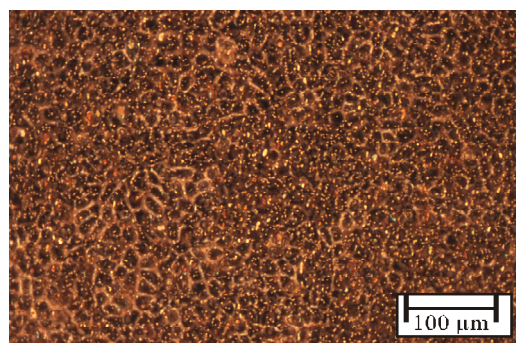
Voraussetzung zur Verwendung des zur Verfügung stehenden Systems von Gerd Juchem war die Etablierung konfluenter Zellschichten auf einer mit Gelatine und Fibronectin vorbehandelten und in eine spezielle Halterung eingespannten Polycarbonatmembran. Eine Beobachtung der Zellen auf dieser Membran war unmöglich, der Konfluenzgrad der Zellkultur optisch nicht überprüfbar.

Eine erhebliche Vereinfachung, Standardisierung und entscheidende Verbesserung der Reproduzierbarkeit dieses Systems stellte die Verwendung im Handel erhältlicher

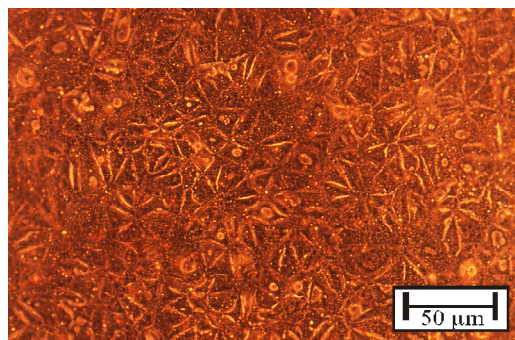
Filtermembraneinsätze dar, wenn es gelänge, sie in eine geeignete Apparatur zu integrieren. Tatsächlich stand auch ein in der Arbeitsgruppe speziell entwickeltes Gerät zur Verfügung. Venuläre Endothelzellen des menschlichen Herzens zeigten unter den zuvor geschilderten Bedingungen problemloses Wachstum auf handelsüblichen Filtermembraneinsätzen aus Polyethylenterephthalat (PET) (Abb.29). Konfluent auf solchen handelsüblichen Filtermembranen etablierte Endothelschichten wurden in dem optimierten Filtermeßsystem als Grenze zweier Flüssigkeitskompartimente angeordnet. Der Konfluenzgrad der Zellschicht konnte optisch direkt geprüft werden.



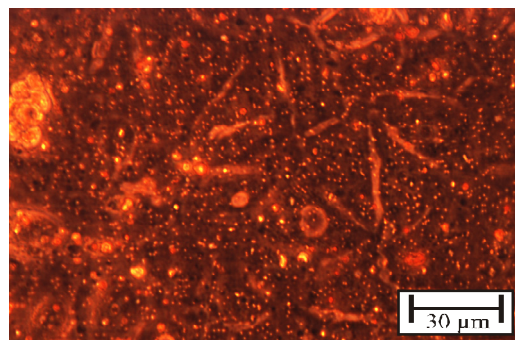
a



b



c



d

Abb. 29: Auf poröser PET-Filterfolie nach dem geschilderten Kokultur-Prinzip angezüchtete Reinkultur venulärer Endothelzellen des menschlichen Herzens bei verschiedenen Vergrößerungen.

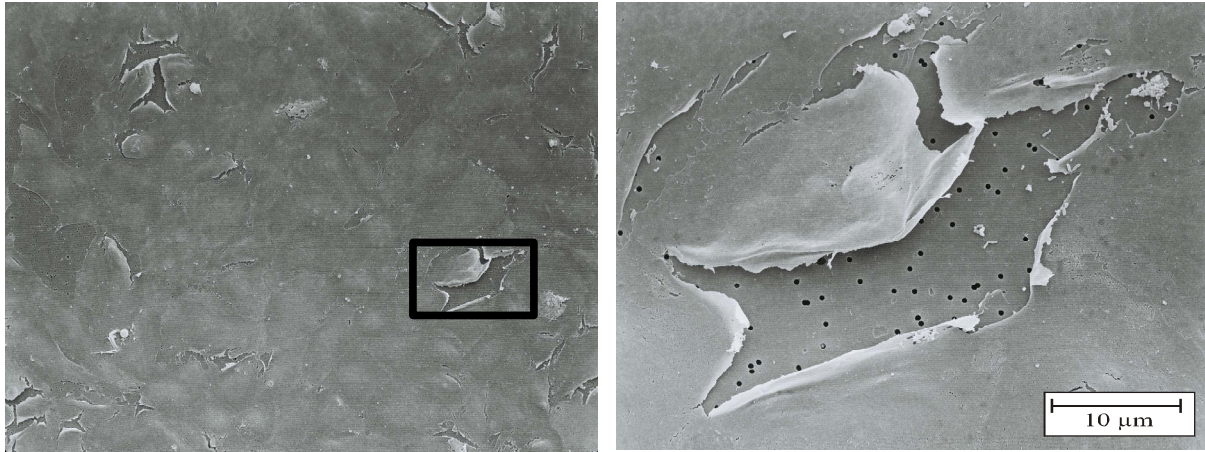


Abb.30: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer auf PET-Filtermembran angezüchteten Reinkultur venulärer Endothelzellen. Das rechte Bild stellt eine Ausschnittsvergrößerung des markierten Bezirks des linken Bildes dar. Durch die freigewordene Lücke nach Aufbrechen der Interzellularspalten wird die darunterliegende Filtermembran mit ihren feinen (hier 0,4 µm großen) Poren erkennbar.

Abb. 31 zeigt das im Rahmen dieser Arbeit noch weiter speziell optimierte, einfach zu bedienende und vollständig autoklavierbare Filtermeßsystem, mit dessen Hilfe hydraulische Konduktivitäten venulärer Endothelmonolayer quantitativ erfasst werden konnten.

Durch unterschiedliche Befüllung des oberen Flüssigkeitskompartiments konnten leicht beliebige transmembranöse Druckgradienten im Bereich von 0 – 10 cm H₂O eingestellt werden. Zwei peristaltische Pumpen sorgten dabei für die Konstanthaltung des gewählten Flüssigkeitsniveaus und somit auch des dadurch vorgegebenen transmembranösen Druckgradienten.

Auch ein nur geringer Flüssigkeitstransport durch die Zellschicht konnte über eine feine Ablaufkanüle im Steigrohr des unteren Kompartiments, dessen Flüssigkeitsspiegel somit auf konstantem Niveau gehalten wurde gravimetrisch direkt und präzise erfasst und somit die hydraulische Konduktivität der Zellschicht errechnet werden.

Für die verwendete Ablaufkanüle und die abführenden Schlauchsysteme war es wesentlich, einen geeigneten, möglichst geringen Durchmesser zu wählen, weil ein zu großes Schlauchvolumen (vor allem bei sommerlichen Außentemperaturen) leicht zur Verdunstung eines Teils der sehr geringen, zu detektierenden Flüssigkeitsmengen und damit zu einer Verfälschung der Messergebnisse führen kann.

Durch Verwendung eines engen Steigrohrs im Verein mit einer dünnen Kanüle konnte die Empfindlichkeit des optimierten Systems im Vergleich zum vorbestehenden System um den Faktor 50 gesteigert werden. Eine weitere Vereinfachung und Präzisierung stellte die direkte Übertragbarkeit der erfassten Messdaten mittels einer speziellen Software in die gängigen Datenverarbeitungsprogramme dar. Dazu wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit das Datenübertragungsprogramm YSC01L Vers. 3.1.2 der Firma Sartorius, Göttingen ausgewählt und mit Erfolg eingesetzt.

Ein weiteres Problem stellte die Form der Probenapplikation dar. Das Einführen einer dünnen Kanüle bis 2 mm oberhalb des Filterniveaus ermöglichte die Applikation ausgewählter Substanzen direkt auf die Zellschicht, wenn sie in einer Lösung höherer Dichte als der des Filtrationsmediums gelöst waren. Zu untersuchende Substanzen wurden nach längeren Vorversuchen schließlich routinemäßig in Filtermedium, das 5 % (w/v) Ficoll 70 enthielt gelöst und konnten so in definierten und relativ kleinen Volumina von 1 ml unterschichtet werden. Eine Durchmischung mit dem Filtermedium, das sich ständig im oberen Kompartiment befand und über die peristaltischen Pumpen mit dem Vorratsgefäß kommunizierte trat unter diesen Bedingungen nicht auf. Es war eine scharfe Phasengrenze erkennbar, das Ficoll-Medium bedeckte die Zellschicht vollständig und beeinflusste die Filtrationsrate selbst nicht messbar.

Eine wesentliche Voraussetzung für die Erfassung der hydraulischen Konduktivität einer Zellschicht war die sorgfältige Filtration aller eingesetzten Medien über Filter der Porenweite $0,2\ \mu\text{m}$ unmittelbar vor Beginn des Experiments, um eine Verfälschung der Flussrate durch Verstopfung der Poren der zelltragenden Filtermembran durch mikroskopische Partikel zu verhindern.

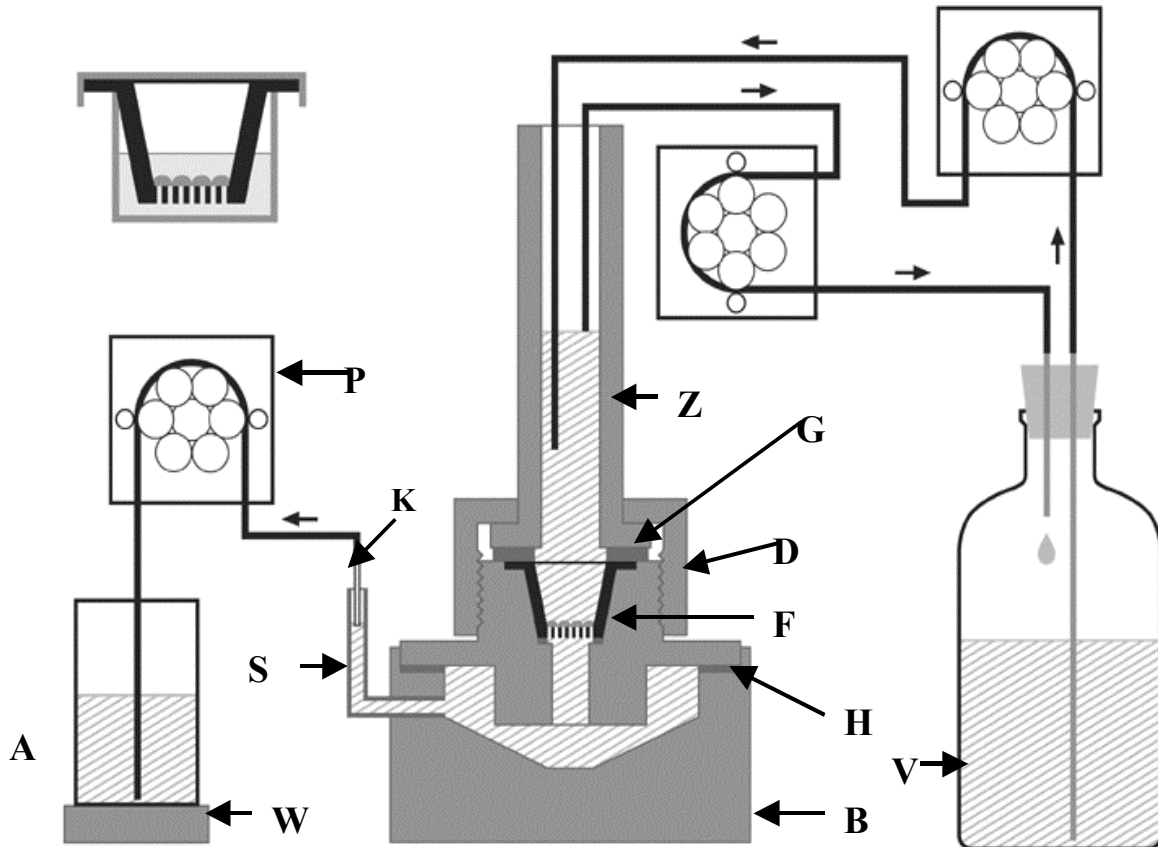


Abb. 31: Schematische Darstellung der eigens entwickelten Apparatur zur Durchföhrung von Filtrationsexperimenten zur quantitativen Erfassung hydraulischer Konduktivitäten über eine Zellschicht.

Die Apparatur besteht im einzelnen aus einem konisch ausgehöhltem Kunststoffblock, auf den nach sorgfältiger Entlüftung die eigentliche Halterung für den Filtermembraneinsatz aufgesetzt werden kann. Ein handelsüblicher, konfluent bewachsener Filtermembraneinsatz (F) (vgl. auch Darstellung im linken oberen Eck der Graphik) kann besonders einfach direkt in die Meßapparatur eingespannt werden. Mittels eines aufschraubbaren Deckels (D) kann nach Auflage einer Gummidichtung (G) ein Kunststoffzylinder (Z) aufgesetzt werden, der das eigentliche Flüssigkeitsreservoir des oberen Kompartiments darstellt, in dem ein beliebiger Flüssigkeitsspiegel durch 2 persiltische Pumpen, die Flüssigkeit aus dem Vorratsgefäß (V) nachpumpfen konstant gehalten werden kann. Die über die zellbewachsene Filtermembran filtrierte Flüssigkeitsmenge wird aus dem Steigkamin (S) über eine feine Kanüle (K) mittels einer peristaltischen Pumpe (P) stetig abgesaugt und in ein auf einer Waage (W) platzierten Abtropfgefäß transportiert.

6. Orientierende Messung der hydraulischen Konduktivität konfluenter venulärer Endothelschichten unter verschiedenen Bedingungen

Zunächst wurde die hydraulische Konduktivität der verwendeten Filtermembran ohne Zellschicht bestimmt. Diese betrug für die gewählten, handelsüblichen Filtereinsätze ($1,0 \times 10^8$ Poren/cm², Porenweite 0,4 µm, Filteroberfläche 4,52 cm², Fa. Falcon, vgl. Kapitel Material und Methoden) $1,11 \times 10^{-3}$ cm/s/cmH₂O, lag also sehr hoch.

Um die Funktionalität der speziell optimierten Filterapparatur zu beweisen wurde zunächst ein orientierender Versuch durchgeführt. Eine homogene Suspension gereinigter venulärer Endothelzellen aus dem Rattenherzen (ca. 2×10^5 Zellen) wurde zu gleichen Teilen in eine 3,5-cm-Zellkulturschale und bei laufender Messung und einem konstanten transmembranösen Druckgradienten von 3 cmH₂O in das obere Kompartiment der Filterkammer eingebracht. Im Folgenden wurde die zeitgleich ausgesäte Zellkulturschale immer identisch behandelt, wie die in das Filtersystem eingebrachten Zellen. Zu ausgewählten Zeitpunkten wurden Photographien dieser Kontroll-Zellkultur angefertigt (Abb. 34). In der graphischen Darstellung der hydraulischen Konduktivität des Filtermembransystems (Abb. 32) sei auf die zum entsprechenden Zeitpunkt aufgenommenen Photos verwiesen, um den Zusammenhang zwischen der Morphologie der Zellschicht und ihrer hydraulischen Konduktivität zu verdeutlichen.

Die Adhäsion der Zellen auf der Filtermembran konnte anhand der rasch abnehmenden hydraulischen Konduktivität des Gesamtsystems verfolgt werden. Die hydraulische Konduktivität des Gesamtsystems nahm ständig ab und erreichte erst allmählich, ab etwa 11 h nach Aussaat einen konstanten, charakteristischen Wert von $4,17 \times 10^{-5}$ cm/s/cmH₂O (siehe Graphik, Abb. 32).

Die hydraulische Konduktivität der nunmehr konfluente Zellschicht alleine betrug demnach $4,36 \times 10^{-5}$ cm/s/cmH₂O. Diese wurde auch durch Unterschichtung von Ficoll-Medium ohne Zusätze oder Ficoll-Medium mit Zusatz von Thrombin 1 U/ml oder Histamin 20 µM im oberen Kompartiment nicht beeinflusst.

Die hydraulische Konduktivität des Gesamtsystems (Zellschicht und Filtermembran) wird also in erster Linie durch die hydraulische Konduktivität der Zellschicht bestimmt, über die sich somit zuverlässige funktionelle Aussagen treffen lassen.

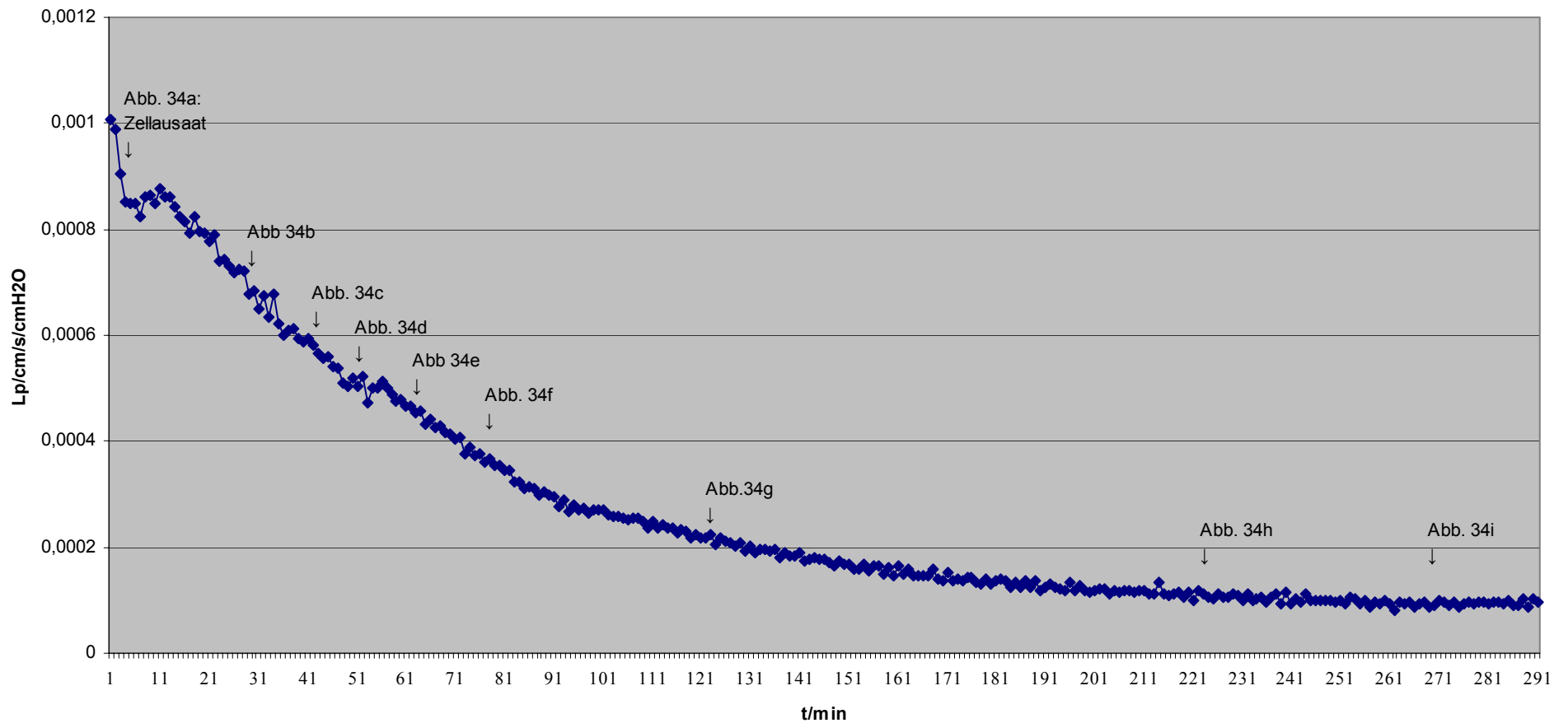


Abb. 32: Hydraulische Konduktivität über die Filtermembran in Abhängigkeit von der Zeit nach Zellaussaat. Zu den bezeichneten Zeitpunkten wurden Fotos angefertigt (siehe Abb. 34)

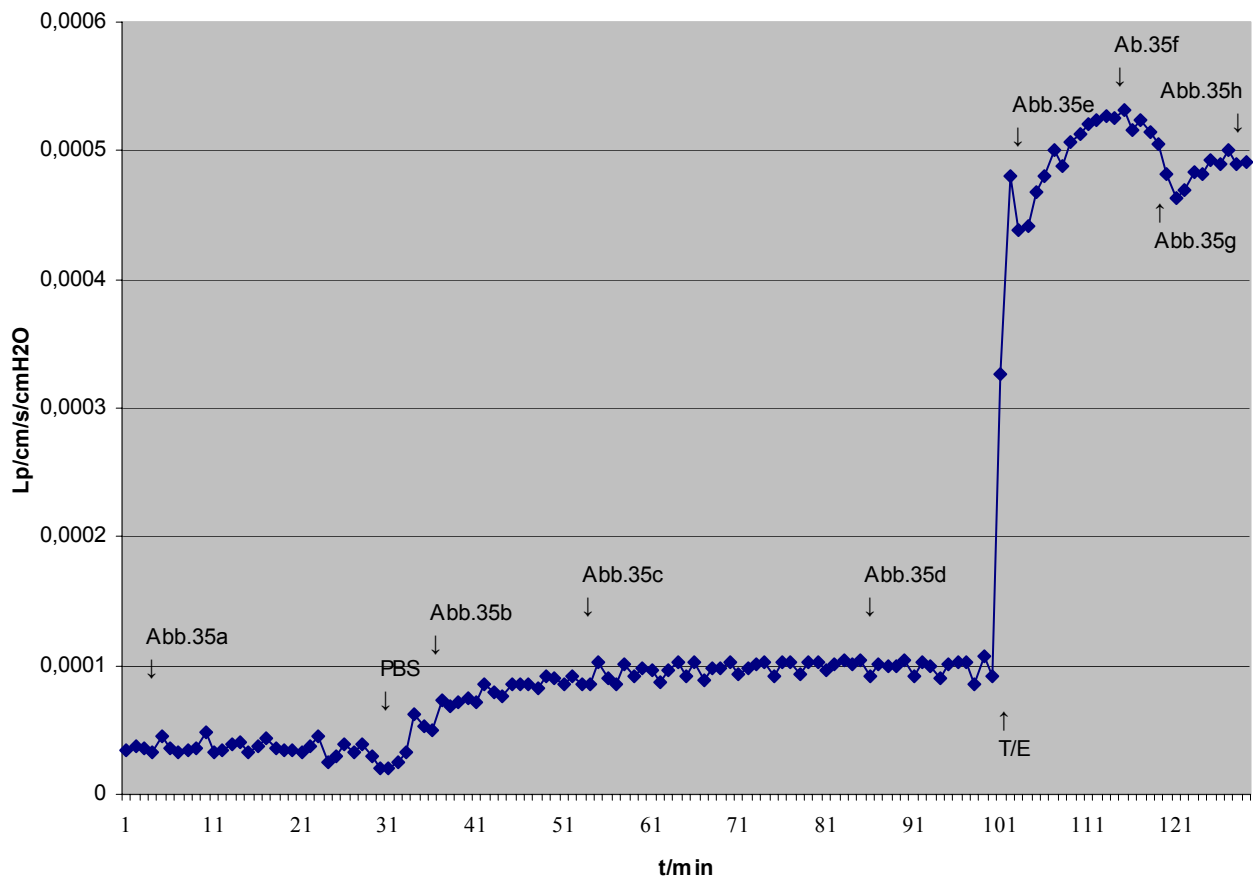


Abb. 33: Hydraulische Konduktivität während der Ablösung der Zellen von der Filtermembran. Die Morphologie der Zellschicht zu bezeichneten Zeitpunkten wurde wiederum fotografisch dokumentiert (siehe Abb. 35)

Die Sensibilität der Messwerterfassung wurde durch weitere Versuche wie den in Abb. 33 dargestellten belegt. Nach vorsichtigem Austauschen des Filtermediums im oberen Kompartiment gegen PBS nahm die hydraulische Konduktivität des Gesamtsystems zu, erreichte aber innerhalb von 10 min einen neuen konstanten Wert von $1,11 \times 10^{-4}$ cm/s/cmH₂O (siehe Graphik, Abb. 33). Das rasche Abkugeln der Zellen nach Unterschichtung des im oberen Kompartiment der Filterapparatur befindlichen PBS mit Trypsinlösung ging mit einer erheblichen Zunahme der hydraulischen Konduktivität des Filtersystems einher. Nach vollständiger Ablösung der auf der Filtermembran befindlichen Zellen wurden diese, um Ihre Vitalität und Anzahl zu prüfen, erneut in eine 3,5-cm-Kulturschale ausgesät, wo sie rasch adhärten und innerhalb von 24 h einen nahezu lückenlos konfluenten Endothelrasen bildeten (Abb. 36).

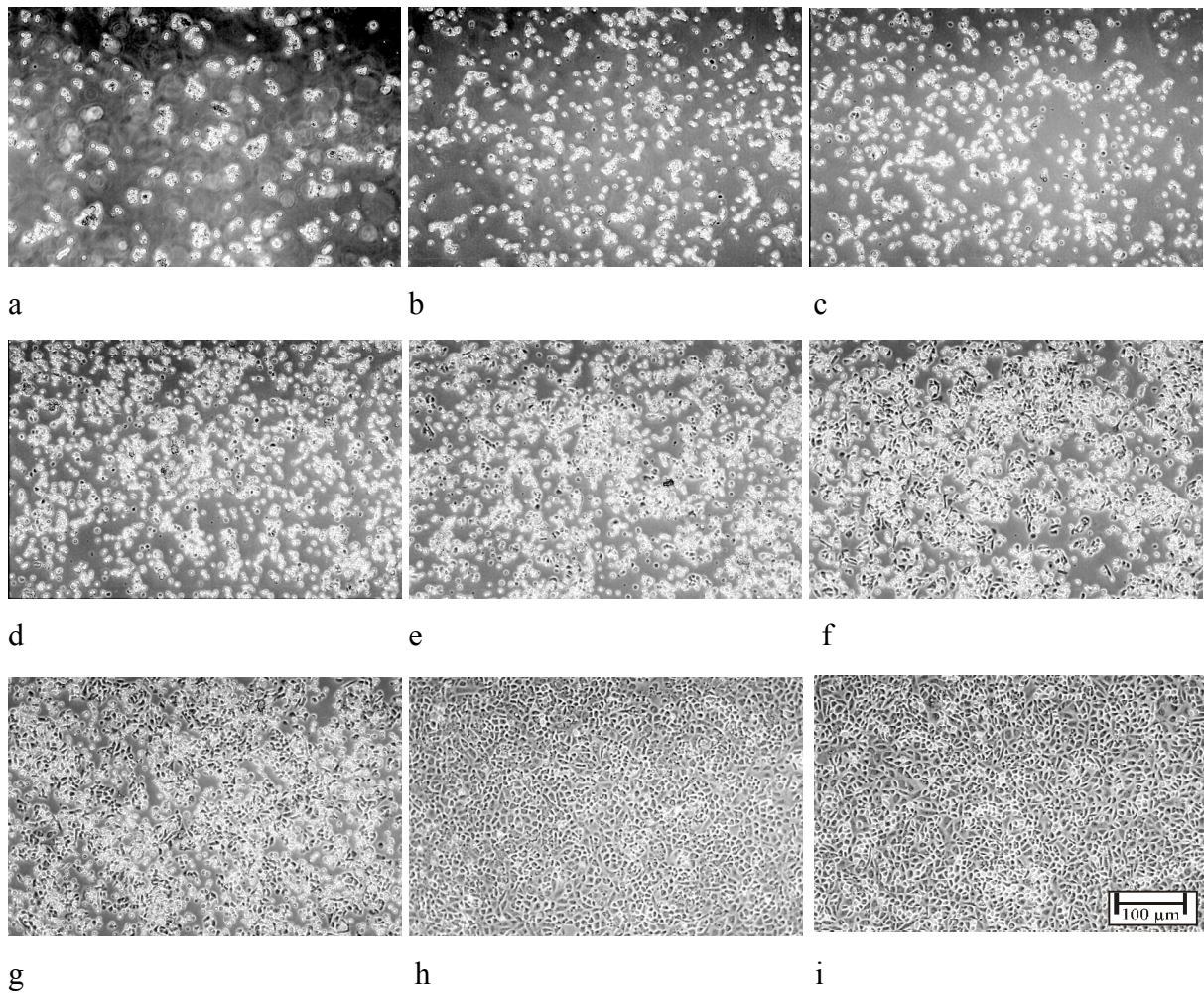


Abb. 34: Identisch zur auf der im geschilderten Filtrationsexperiment untersuchten Zellkultur behandelte Kontrollzellkultur venulärer Endothelzellen aus der koronaren Mikrozirkulation der Ratte. Die Bilder wurden zu den in obiger Kurve (Abb. 32) gekennzeichneten Zeitpunkten aufgenommen.

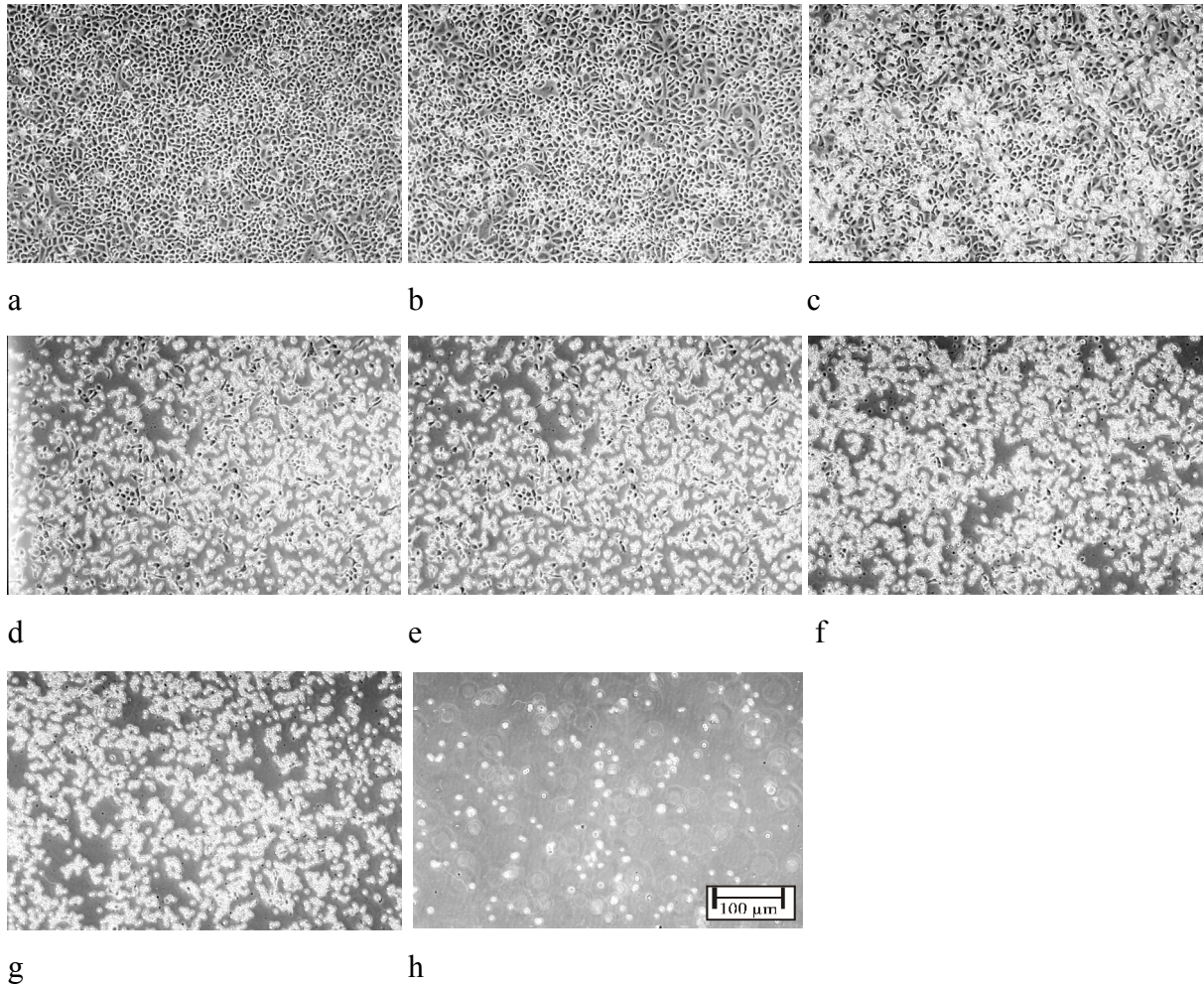


Abb. 35: Identisch zur auf der im geschilderten Filtrationsexperiment untersuchten Zellkultur behandelte Kontrollzellkultur venulärer Endothelzellen aus der koronaren Mikrozirkulation der Ratte. Die Bilder wurden zu den in obiger Kurve (Abb. 34) gekennzeichneten Zeitpunkten aufgenommen.

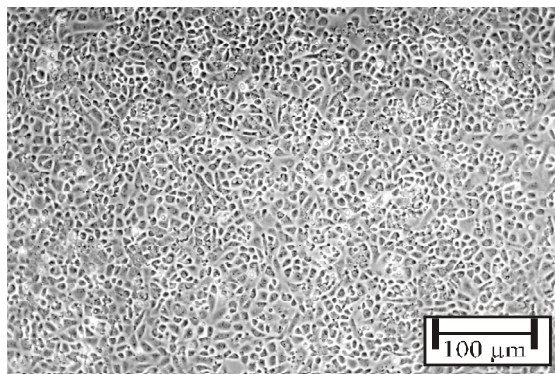


Abb. 36: Im Rahmen des Filtrationsexperiments von der Filtermembran abgelöste Zellen wenige Stunden nach erneuter Aussaat in einer Zellkulturschale.

Diskussion

1. Myokardiale Gewebetextur

Die quergestreifte Muskulatur des Herzens besteht aus Millionen verzweigter Einzelzellen, die über zahlreiche Zellverbindungen eng mit Ihren Nachbarn verknüpft sind. In seiner Gesamtheit ergibt sich ein enormes zelluläres Netzwerk, das trotz seiner histologischen Unterteilung in eindeutig voneinander abgrenzbare zelluläre Individuen in funktioneller Hinsicht dennoch eine Einheit bildet. Nur auf dieser Basis erscheint die elektrotonische Synchronisation der räumlich ausgedehnten Ventrikelbereiche im Verlauf der mechanischen Herzaktion überhaupt erst realisierbar.

Das myokardiale Mikrogefäßnetz ist außergewöhnlich dicht: jedem einzelnen Kardiomyozyten ist durchschnittlich eine eigene Kapillare zugeordnet. Bis zu 4000 Kapillaranschnitte pro mm^2 myokardialer Querschnitt konnten beobachtet werden¹⁰⁷. Ein elastisches interstitielles Bindegewebssystem erreicht jede einzelne Herzmuskelzelle und verankert sie über Kollagenfibrillen mit der kontinuierlichen Basalmembran der koronaren Mikrogefäße. Dieser enge anatomische Zusammenhang zwischen Parenchymzellen und Mikrovaskulatur wird zusätzlich gefördert durch die allen Mikrogefäßen zugeordneten Perizyten, wobei nicht selten ein Perizyt 2-3 Kapillarrohre gleichzeitig umschlingt²⁰ und fest verbindet. Diese adventitiellen Zellen besitzen aber auch über gap-junctions und sogenannte „peg and sockets“-Adhäsionsbereiche engsten Kontakt zu den Endothelzellen, die die Kapillarrohre formen^{16, 53, 75, 92, 93}. Der perizytäre Besatz des Mikrozirkulationsystems beginnt am arteriolar-kapillären Übergang und erstreckt sich stromabwärts bis in die sich dem Kapillarbett anschließenden postkapillären Venulen^{20, 21}.

Bezüglich der segmentalen Spezialisierung des Mikrogefäßsystems und speziell der Endothelzellen sei auf die Einleitung zu der vorliegenden Dissertation verwiesen, wo im Besonderen auf die physiologischen und morphologischen Charakteristika venulären Endothels in Abgrenzung zu Endothelzellen anderer Gefäßprovinzen eingegangen wird.

Die zelluläre Artenvielfalt des Myokardgewebes beschränkt sich allerdings längst nicht auf die vorgenannten Zellarten. Im vaskulären Bereich sind noch die arteriell und venös sicherlich unterschiedlichen glatten Gefäßmuskelzellen von wesentlicher Bedeutung. Das interstitielle Bindegewebssystem wird von Fibroblasten geknüpft, die in großer Zahl auch zumindest allen größeren Blutgefäßen eng assoziiert sind. Speziell im Myokard kommen außerdem große

Mengen von Histiozyten vor, denen im Zusammenhang mit pathophysiologischen Aspekten immer wieder große Bedeutung beigemessen wird^{64, 81}.

Zusätzlich ist im Herzmuskel ein komplexes, weit verzweigtes Lymphgefäßsystem angelegt, das eng mit dem Mikrogefäßsystem kommuniziert. Der Lymphabfluss des Myokards unterliegt durch die rhythmische, mechanische Herzaktion besonderen, im Körper einzigartigen physikalischen Bedingungen. Im Gegensatz zu anderen Organsystemen unterliegt die Amplitude und möglicherweise auch die Richtung des Lymphflusses hier einer kontinuierlichen Änderung im Verlauf eines Zyklus der mechanischen Herzaktion⁴⁸.

2. Isolierung venulärer Endothelzellen

Vor dem Hintergrund des vorgehend geschilderten großen zellulären Spektrums erscheint die Isolierung einzelner, spezieller Zellarten aus dem fest zusammengefügt Myokardgewebe als besonders komplexes Problem.

Zunächst stellten wir Versuche an, venuläre Endothelzellen aus dem Herzen der Maus zu isolieren. Gerade die Maus hat in den letzten Jahren enorm an Bedeutung als Versuchstier gewonnen, nicht zuletzt aufgrund der Etablierung von Techniken zur Herstellung transgener Tiere, die in immer größerer Bandbreite verfügbar sind. Vor diesem Hintergrund erschien die Auswahl der Maus als Versuchstier besonders interessant. Allerdings gelang es uns trotz zahlreicher systematischer Versuche nicht, venuläre Endothelzellkulturen aus dem Herzen der Maus in zufriedenstellender Reinheit zu etablieren. Offenbar haben Endothelzellen der Maus Ansprüche an Milieu und Wachstumsbedingungen, die sich deutlich von denen anderer Spezies (z.B. wie für Ratte und Mensch in eigenen Studien beobachtet) unterscheiden. Auch andere Autoren stellten fest, dass die Maus in physiologischer Hinsicht Besonderheiten aufweist: So fiel Duling et al. auf, dass Blutgefäße der Maus ein deutlich unterschiedliches Antwortverhalten fortgeleiteter vasomotorischer Signale zeigen, als dies zuvor für andere Spezies beschrieben wurde⁴⁷. Die Ergebnisse einer älteren Studie, die durch Verwendung eines Mediums, das D-Valin anstelle von L-Valin enthält, selektive Wachstumsbedingungen für mikrovaskuläre Endothelzellen verschiedener Organe der Maus postulieren³⁴ konnten wir in unseren umfangreichen, systematischen Experimenten nicht annähernd nachvollziehen. Die Maus erschien uns letztendlich als repräsentatives Tiermodell für die menschliche Physiologie als nur bedingt geeignet.

Im Laufe der Jahre wurden allerdings bereits einige Protokolle zur selektiven Isolierung von mikrovaskulären Endothelzellen verschiedener Organe und Spezies publiziert^{13, 44, 52, 58, 82,, 88}, so z.B. aus dem Gehirn⁸⁸ oder Fettgewebe⁴⁴ der Maus, aus der Lunge der Ratte¹³, aus der Lunge⁵⁸ oder dem Bauchfett⁴⁴ des Menschen, aus Gehirn, Herz, Hoden und Ovar des Schweines⁸².

Besonders kritisch zu werten ist eine Studie, in der ganze Gewebestücke der Lunge frisch getöteter Ratten in Gewebekulturschalen gelegt werden: wenn diese Gewebestücke nach 60-stündiger Kultur wieder entfernt wurden wollten die Autoren ein selektives Anheften aus dem Gewebe ausgewanderter mikrovaskulärer Endothelzellen beobachtet haben¹³. Die postulierte hohe Selektivität des Verfahrens konnte nicht stichhaltig begründet oder nachvollzogen werden.

Allgemein wurde die Vielfalt der in einem Organgewebe und selbst in der Mikrovaskulatur vorkommenden Zellarten und deren eingangs geschildertes enges morphologisches Gefüge in der Literatur unterschätzt.

Zudem differenzierten die meisten Autoren nicht nach der segmentalen Herkunft der Endothelzellen des Mikrogefäßsystems. Gerade unter den in der Einleitung erläuterten Gesichtspunkten der funktionellen Spezialisierung der Endothelzellen in den einzelnen Gefäßprovinzen, speziell des venulären Endothels erscheint eine solche Differenzierung aber ganz wesentlich. Unabdingbare Voraussetzung zur In-vitro-Erforschung der funktionellen Eigenschaften venulären Endothels stellt die Verfügbarkeit reiner Zellkulturen dar- bereits früher wurde dies von einzelnen Autoren erkannt und der Versuch der Etablierung entsprechender Kulturen unternommen.

So markierten Moyer et al.⁷³ Venulen in der Cremaster-Muskulatur der Ratte durch lokale Injektion von Histamin mit anschließender intravenöser Injektion von Monastral-Blau B. Auf diese Weise sichtbar gemachte Venulen wurden dann per Mikrodissektion isoliert und direkt in Gewebekultur verbracht. Im gleichen Jahr publizierten Schelling et al.⁸⁹ ein Verfahren zur Isolierung venulärer Endothelzellen aus dem Rinderherzen, das auf der Ablösung von Zellen aus Mikrogefäßen definierter Größe (hier: 15 µm) basiert.

Wie weiter oben dargestellt wurde, sind die Endothelzellen des Mikrogefäßsystems, auch des venulären Schenkels eng verbunden mit z.B. Bindegewebszellen und Perizyten. Es erschien uns daher von Anfang an unwahrscheinlich, dass durch die oben genannten einfachen Isolierungsstrategien wirklich reine Endothelzelllinien erhalten werden können. Besonders Bindegewebszellen und Perizyten proliferieren nach allgemeiner Erfahrung in Gewebekultur

besonders rasch, so dass die relativ langsamer wachsenden Endothelzellen bald unterdrückt und überwuchert werden.

Bereits in früheren Studien der Arbeitsgruppe um Prof. Nees war es möglich, selektiv mikrovaskuläre Endothelzellen und Perizyten aus dem Herzen des Rindes zu isolieren und reine Zellkulturen zu etablieren⁴². Auf der Basis und durch Fortentwicklung dieser Methodik erschien es uns besonders interessant ein einfaches Protokoll zu etablieren, auch aus dem koronaren Mikrogefäßsystem des Menschen spezifisch venuläre Endothelzellen zu isolieren.

Bei optimaler Enzyminkubationszeit sind die venulären Segmente der Mikrovaskulatur in ihre Einzelzellen zerfallen, in der Suspension noch erhaltene Mikrogefäßsegmente sind hauptsächlich arteriolären oder kapillären Ursprungs. Venulen zerfallen unter Proteaseneinfluss nämlich schneller als die übrigen Mikrogefäße. Der Grund hierfür liegt im speziellen histologischen Gefüge der Venulen: Venuläre Endothelzellen sind nur über lose organisierte Interzellularspalten miteinander verbunden⁹¹ und von einer lückenhaften Basalmembran überzogen⁶¹.

Die im Kapitel Material und Methoden beschriebene Herstellung eines Dichtegradienten stellt eine erhebliche Vereinfachung im Vergleich zu dem von Juchem⁴² beschriebenen Protokoll dar: Hier war eine spezielle Zentrifuge erforderlich, über die der Dichtegradient geformt und Zellsuspensionen aufgetrennt wurden. Durch die geschilderte einfache Herstellung eines kontinuierlichen Dichtegradienten in beliebigen handelsüblichen Zentrifugenröhrchen konnte eine Unabhängigkeit von der Verfügbarkeit spezieller technischer Gerätschaften erreicht und die Reproduzierbarkeit des Protokolls erheblich gesteigert werden. Auch konnten nun beliebig viele Dichtegradienten hergestellt und damit sehr viel größere Mengen an Gewebesuspension in kurzer Zeit aufgearbeitet werden, als dies zuvor überhaupt denkbar war.

Venuläre Endothelzellen konnten durch Zentrifugation von proteolytisch suspendierten Zellen über diesen Dichtegradienten bereits deutlich angereichert werden. Venuläre Endothelzellen besitzen eine überraschend hohe spezifische Dichte von ca. $1,06 \text{ g/cm}^3$ und damit eine vergleichbare Dichte, wie auch Kardiomyozyten, die ihrerseits allerdings einen weitaus höheren Gehalt an Proteinen und Mitochondrien haben. Dies könnte im Zusammenhang mit der in der Einleitung zu dieser Dissertation erörterten funktionellen Spezialisierung dieses Zelltyps erklärbar sein durch das Vorhandensein sehr dichter Zellorganellen oder Granula, was bislang aber noch nicht definitiv bewiesen wurde.

Die Kultivierung der auf diese Weise hochangereicherten venulären Endothelzellen setzte die Verwendung eines geeigneten Kulturmediums voraus. Hier sei auf Studien meines Kollegen Thallmair⁹⁸ verwiesen, der mikrovaskuläre Endothelzellen aus dem subkutanen Bauchfett des Menschen und des Pavians isolierte und kultivierte. Das von ihm verwendete Medium, eine Mischung aus einem von der Firma Promocell angebotenen „Endothelial Cell Growth Medium“ (ECGM) und üblichem Standardkulturmedium DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium mit Zusatz von fetalem Kälberserum) erwies sich auch für die Kultur venulärer Endothelzellen des menschlichen Herzens als optimal.

ECGM enthält einen Rinderhypophysenextrakt (ECGS), Hydrocortison, rekombinanten menschlichen epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) und rekombinanten menschlichen Fibroblasten-Basis-Wachstumsfaktor (FGF), wodurch sich die extreme proliferative Wirkung auf alle Zellarten und die im Kapitel Ergebnisse bei Verwendung als alleiniges Kulturmedium geschilderte rasche Überwucherung der Endothelzellen durch Zellen nichtendothelialer Herkunft erklärt.

DMEM hingegen enthält (außer den im fetalen Kälberserum enthaltenen) keine zusätzlichen Wachstumsfaktoren. Eigene Erfahrungen zeigten, dass diese Zusammensetzung für die Kultivierung vieler Endothelzelltypen, z.B. venuläre Endothelzellen der Ratte, makro- oder mikrovaskuläre Endothelzellen des Rindes⁴² völlig ausreichend sind. Der Bedarf menschlicher koronarer venulärer Endothelzellen kann hierdurch jedoch nicht gedeckt werden.

Eine ausreichend lange Primärkultur der so angereicherten venulären Endothelzellen stellte bereits eine wesentliche Voraussetzung für deren endgültige Reinigung dar. Eine Verdrängung nichtendothelialer Zellverbände durch proliferierende endotheliale Monolayer konnte nach etwa zweimonatiger Kultur beobachtet werden. Eine speziell zur Verfügung gestellte Lösung („ECPS“, siehe Kapitel Material und Methoden), die vor allem eine hohe Konzentration von Protaminchlorid enthielt stellte einen wichtigen Schritt für die Eliminierung nichtendothelialer Zellarten dar. Noch verbliebene einzelne vitale Fremdzellen konnten mit Hilfe der zwar mühsamen aber dennoch wirkungsvollen „Kratzmethode“ mittels eines sterilen Glasspatels vom Boden der Petrischale entfernt werden.

3. Identifizierung venulärer Endothelzellen

Endothelzellen weisen ein typisches pflastersteinartiges, stets einschichtiges, kontakthemmtes Wachstum auf. Diese charakteristische Gewebetextur fällt auch in Mischkulturen bei Betrachtung unter dem Mikroskop auf und gilt bereits als ein Identifizierungsmerkmal dieses Zelltyps⁴¹. Seit der erstmaligen Isolierung und Kultivierung dieses Zelltyps aus der V. umbilicalis⁴¹ ist bekannt, dass FVIII:Ag bzw. „von Willebrand-Protein“ in hoher Konzentration in Gefäßendothelien vorkommt und dort in den Weibel-Palade-Körperchen gespeichert wird⁸⁴. Zudem wird auch die selektive Markierung von Endothelzellen mit fluoreszierendem AcLDL seit vielen Jahren als Identifizierungskriterium angewendet⁷⁸. Alle diese charakteristischen, spezifischen Merkmale ließen sich an den im Rahmen der vorliegenden Arbeit kultivierten venulären Endothelzellen nachweisen.

Als zusätzliches Identifizierungskriterium wurde in den von uns isolierten venulären Endothelkulturen die Anwesenheit von Dipeptidylaminopeptidase IV (CD 26) bestimmt. Dipeptidylaminopeptidase IV ist ein membrangebundenes Protein, das auch auf aktivierten Lymphozyten³⁹ nachweisbar ist und innerhalb des Mikrogefäßsystems speziell auf den Endothelzellen des venösen Schenkels der Endstrombahn zu finden ist^{7,57}.

Funktionell wird diskutiert, dass diesem Molekül auf dem Endothel auch eine Bedeutung als Rezeptor und Mediator der pulmonalen Metastasierung zukommt, wie das für das Mammacarcinom der Ratte nachgewiesen wurde¹⁴.

Die Verwendung der Dipeptidylaminopeptidase IV als Markerenzym für venuläres Endothel stellt einen neuen Ansatz dar, der in der Arbeitsgruppe um Prof. Nees am Physiologischen Institut der Universität München gefunden wurde⁴² und auf der Basis von früheren Beobachtungen von Batra, Kuo und Rakusan⁷ erstellt wurde. Die genannten Autoren hatten unter Verwendung klassischer enzymhistochemischer Färbungsmethoden (vgl. Kapitel Methoden) für das Rattenherz nachgewiesen, dass Alkalische Phosphatase ein Markerenzym für den arteriellen Schenkel der Mikrogefäßsystems (Arteriolen und postarterioläre Kapillaren) darstellt, wohingegen Dipeptidylaminopeptidase IV ein selektives Markerenzym für den venösen Schenkel des Mikrogefäßsystems (prävenuläre Kapillaren und postkapilläre Venulen) ist. Frühere Studien der Arbeitsgruppe um Prof. Nees an Myokardschnitten, isolierten Mikrogefäßnetzen und Zellkulturen des Meerschweinchens, der Ratte und des Rindes⁴² erbrachten ein ganz ähnliches Ergebnis. Die Unterscheidung zwischen Gefäßen des

arteriellen und venösen Schenkels der Mikrozirkulation war nach doppelter Anfärbung auf einen Blick möglich.

Darüberhinaus konnte auch an Myokardschnitten und isolierten Mikrogefäßnetzen des Herzens des Rindes, der Ratte und des Menschen nachgewiesen werden, dass der Marker Dipeptidylaminopeptidase IV von den Endothelzellen der markierten Gefäße und nicht von deren Perizyten exprimiert wird⁷⁶. Die Alkalische Phosphatase hingegen ist als selektives Markerenzym für die mikrovaskulären Perizyten des arteriellen Schenkels zu werten^{42, 76}.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Reinkulturen venulärer Endothelzellen besaßen das Markerenzym Dipeptidylaminopeptidase IV auch nach längerer Kultur, eine Gegenfärbung mit perizytenspezifischer alkalischer Phosphatase konnte zusätzlich zum Ausschluß von Verunreinigungen durchgeführt werden. Eine Aussage über die Reinheit von Zellkulturen konnte lichtmikroskopisch rasch getroffen werden.

Die Enzymhistochemische Anfärbung zum Nachweis von Dipeptidylaminopeptidase IV stellt ein besonders einfach und rasch durchführbares Verfahren dar, das sowohl am Myokardschnitt, an isolierten Mikrogefäßnetzen als auch in Zellkulturen eine unter dem Lichtmikroskop einfache Identifizierung venulärer Endothelzellen zulässt.

4. Messung hydraulischer Konduktivitäten von Zellschichten

Venuläre Endothelzellen der menschlichen koronaren Mikrozirkulation konnten nun in Reinkultur gezüchtet und zuverlässig identifiziert werden. Die Optimierung und Erprobung eines Systems zur Erforschung von Barrierefunktionen venulärer Endothelschichten stellte eine weitere Zielsetzung der vorliegenden Arbeit dar.

Die Barrierefunktion einer venulären Endothelzellschicht wird hauptsächlich bestimmt durch das Öffnen und Schließen interzellulärer Lücken, die die Passage von Makromolekülen oder Leukozyten regulieren⁷⁰. Zur Charakterisierung der Barrierefunktion und „Dichtigkeit“ einer Endothelzellschicht wurde aufbauend auf frühere Studien der Arbeitsgruppe um Prof. Nees^{42, 76} die hydraulische Konduktivität einer solchen Zellschicht bestimmt. Die hydraulische Konduktivität L_p einer Zellschicht ist definiert als die pro Zeiteinheit, Fläche und hydrostatische Druckdifferenz über eine Zellschicht fließende Flüssigkeitsmenge⁸⁵ und damit ein direktes Maß für deren Durchlässigkeit.

Hydraulische Konduktivitäten von Mikrogefäßwänden und Zellschichten können *in vivo* und *in vitro* bestimmt werden. In der Mehrzahl der in der Literatur publizierten, auch aktuellen

Studien wird die *in vivo*-Messung in Anlehnung an die Methode von Landis⁵⁰ praktiziert: So kann nach Verschluss eines Mesenterialgefäßes dieses mittels einer Mikropipette perfundiert werden und der transmurale Flüssigkeitsfluß pro Flächeneinheit bei konstantem hydraulischem Druck gemessen werden^{104, 105}. Im *In-vivo*-Modell kann allerdings nur die hydraulische Konduktivität und damit die Barrierefunktion einer Gefäßwand (Endothel, Basalmembranstrukturen, Interstitium, weitere Gefäßwandzellen, perivaskuläres Bindegewebe) und nicht die nur einer definierten Zellschicht, z.B. des Endothels bestimmt werden. Dies ist nur *in vitro* sinnvoll durchführbar.

In vitro Messungen der hydraulischen Konduktivität von Endothelzellmonolayern wurden in der Literatur für aortale Endothelzellen des Rindes^{4, 22}, pulmonal-arterielle Endothelzellen von Schwein^{97, 98} und Schaf⁸³ und umbilikale Endothelzellen des Menschen⁵¹ durchgeführt.

Bestehende Protokolle zur Erfassung hydraulischer Konduktivitäten *in vitro* erschienen uns oft umständlich, eine Vereinfachung, Präzisierung und Optimierung dieser Systeme erschien uns eine zweckdienliche Aufgabe.

Suttorp et al.⁹⁷ montierten eine konfluent bewachsene Filtermembran als Trennschicht zweier Kompartimente in eine umgebaute Chemotaxiskammer. In einem oberen Kompartiment wurde ein konstanter hydrostatischer Druck appliziert, als Maß für die hydraulische Konduktivität wurde der Flüssigkeitsspiegel in einer mit dem unteren Kompartiment korrespondierenden 1 ml-Kapillare bestimmt.

Nees et al.⁷⁶ entwickelten ein Filtrationssystem, bei dem ein apikales Kompartiment unter konstantem Gasdruck gehalten wurde. Durch eine zellbewachsene Filtermembran wurde dieses apikale von einem basalen Kompartiment getrennt, das Filtrat wurde abgewogen.

Wie im Kapitel Ergebnisse bereits kurz angeschnitten basiert das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Filtrationssystem auf einem von Juchem⁴² im Rahmen seiner Dissertation etablierten System, das nun entscheidend fortentwickelt und verbessert wurde.

Grundvoraussetzung zur *in vitro*-Bestimmung hydraulischer Konduktivitäten ist das Etablieren reiner Zellkulturen auf porösen Filterfolien. Juchem, wie auch die vorgenannten Autoren, verwendete Polycarbonat-Membranen, die zuvor mit Gelatine beschichtet wurden und in einen speziellen Ring eingespannt wurden. Eine entscheidende Vereinfachung, Standardisierung und Verbesserung der Reproduzierbarkeit stellte nun die Verwendung handelsüblicher Filtermembraneinsätze für Multiwell-Kulturschalen (vgl. Kapitel Material und Methoden) dar. Die venulären Endothelzellen konnten direkt auf dem

Filtermembraneinsatz angezüchtet werden (Details hierzu siehe Kapitel Ergebnisse), welcher dann einfach in das eigens hierfür zugeschnittene Meßsystem eingesetzt werden konnte.

Die Empfindlichkeit und Messgenauigkeit des Systems konnte durch Verwendung eines Steigkamins um den Faktor 50 gesteigert werden: auf einer entsprechend und sinnvoll kleineren Fläche wird bereits durch einen weitaus geringeren Volumenzuwachs ein messbares Ansteigen des Flüssigkeitspegels bewirkt, als dies beim vorbestehenden System der Fall war. Weitaus geringere Änderungen der hydraulischen Konduktivität der beobachteten Zellschicht konnten somit letztendlich zuverlässig detektiert werden.

Eine weitere wesentliche Verbesserung stellt die Automatisierung der Datenerfassung dar. In beliebig klein gewählten Zeitabständen und über einen beliebig langen Zeitraum konnten mittels eines speziell abgestimmten Datenübertragungsprogrammes die kontinuierlich erhobenen Messdaten der elektronischen Feinwaage direkt an einen Computer übertragen und dort gängigen Datenverarbeitungsprogrammen zur Verfügung gestellt werden. So konnten sehr viel größere Mengen an Messdaten präzise erfasst werden als dies in früheren Protokollen überhaupt denkbar war.

Die Beobachtung, dass die Beimengung des osmotisch vernachlässigbaren Polysaccharids Ficoll die hydraulische Konduktivität einer venulären Endothelzellschicht nicht beeinflusst ist von großer Bedeutung: So kann bei laufender Messung und konstanten Messbedingungen das Inkubationsmedium mit definierten, auch kleinen Mengen beliebiger Lösungen unterschichtet werden.

Interessant ist auch ein neuerer Ansatz von Pang et al.⁸⁰, die ebenfalls direkt Transwell-Filtermembraneinsätze zur Messung hydraulischer Konduktivitäten verwendeten. Als Maß für die hydraulische Konduktivität der beobachteten Zellschicht (in der zitierten Arbeit wurden menschliche umbilikale Endothelzellen verwendet) wurde die Bewegung einer Luftblase in einer mit der abluminalen Seite verbundenen Glaskapillare verwendet. Allerdings erscheint der im Rahmen dieser Dissertation optimierte Ansatz einfacher praktikierbar, Messdaten sind über einen beliebig langen Zeitraum erfassbar und nicht beispielsweise durch die Länge einer Glaskapillare limitiert.

Durch ein einfaches Experiment wurde die Funktionalität des im Rahmen der vorliegenden Arbeit optimierten Meßsystems bewiesen: Änderungen der hydraulischen Konduktivität einer

Zellschicht konnten zuverlässig detektiert und in schlüssige Korrelation zur Morphologie der Zelllage gesetzt werden.

Die gemessene hydraulische Koduktivität für einen konfluenten, venulären Endothelmonolayer aus dem Herzen der Ratte betrug $4,36 \times 10^{-5}$ cm/s/cmH₂O unter Verwendung von Zellkulturmedium als Filtrationsmedium. Die von anderen Autoren in vitro gemessenen hydraulischen Konduktivitäten von Endothelzellschichten aortalen, pulmonalarteriellen oder umbilikalen Ursprungs liegen um etwa eine Größenordnung niedriger^{4, 22, 97, 98, 104, 105} - hält man sich vor Augen, dass die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten an reinen Kulturen venulärer Endothelzellen erhoben wurde erscheint dieser Unterschied schlüssig. Man würde für die in der genannten Literatur untersuchten Zelltypen sogar noch um einiges niedrigere hydraulische Konduktivitäten erwarten, da es sich hier, anders als im venulären Bereich (die funktionellen und physiologischen Besonderheiten wurden in der Einleitung zu dieser Dissertation bereits kurz dargestellt) um sehr dichte Gewebebarrieren handelt.

Die hydraulische Konduktivität eines Endothelmonolayers ist abhängig vom Albumingehalt des verwendeten Filtrationsmediums^{22, 42, 97}. Dies konnte mit Hilfe der geschilderten, optimierten Filtrationsapparatur bestätigt werden: Für die beobachtete Zellschicht konnte bei Verwendung von PBS anstelle des proteinhaltigen Kulturmediums eine charakteristisch höhere konstante hydraulische Konduktivität von $1,11 \times 10^{-4}$ cm/s/cmH₂O gemessen werden. Die Applikation von Thrombin hatte keinen messbaren Effekt auf die hydraulische Konduktivität der Zellschicht was sich durchaus mit den Ergebnissen neuerer in vivo-Studien deckt¹⁸.

Zusammenfassung

Die Einleitung enthält einen kurzen Literatur- und Erkenntnisüberblick über die Besonderheiten und die funktionelle Spezialisierung des venulären Endothels und dessen zentrale Bedeutung im Rahmen der Pathogenese von Entzündung und Ödembildung. Deutlich wird hier auch die enorme Wichtigkeit einer klaren Abgrenzung des venulären Endothels von Endothelzellen anderer Gefäßprovinzen.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war zunächst eine zuverlässige Identifizierung von Venulen in entsprechenden Organschnitten und enzymatisch herausgelösten Mikrogefäßnetzen.

Eine weitere umfassende Fragestellung galt der Entwicklung eines geeigneten Verfahrens, reine Zellkulturen venulärer Endothelzellen aus dem Myokard eines geeigneten Versuchstieres und aus menschlichen Explantatherzen zu etablieren und diese Zellen in ausreichender Menge zu züchten. Diese Zellen sollten weiterhin in Zellkultur präzise identifiziert werden.

Abschließend sollten diese gewonnenen reinen Endothelkulturen einer weiterführenden funktionellen Charakterisierung zugänglich gemacht werden. Ein geeignetes Filtersystem zur Erfassung hydraulischer Konduktivitäten sollte entwickelt und erprobt werden.

Die experimentell durchgeführte Arbeit erbrachte in erster Linie folgende Ergebnisse:

1. Mit Hilfe eines speziell optimierten Protokolls und Wahl geeignet kurzer Proteaseneinwirkungszeit gelang es, aus dem Myokard der Maus und des Menschen Mikrogefäßnetze in fast vollständig intakter Form von den restlichen Gewebestandteilen zu trennen. Sowohl in Mikrotomschnitten intakten Myokardgewebes der genannten Spezies, als auch in isolierten Mikrogefäßnetzen gelang eine eindeutige Identifizierung arteriolärer und venulärer Mikrogefäßsegmente durch doppelte Anfärbung der Markerenzyme Alkalische Phosphatase (arterieller Schenkel) und Dipeptidylaminopeptidase IV (venulärer Schenkel).

2. Reine Zellkulturen venulärer Endothelzellen aus dem Herzen der Maus konnten nicht etabliert werden. Nach primärer Anreicherung dieser Zellen gelang es nicht, ausreichende Wachstumsbedingungen für venuläre Endothelzellen zu schaffen und das Wachstum von Fremdzellen nützlich einzuschränken, wie dies bei anderen Spezies (Ratte, Rind,

Meerschweinchen, Mensch) möglich war. In der Literatur ist auch in anderem Zusammenhang von einer Sonderrolle der Maus in physiologischer Hinsicht die Rede.

3. Kulturen venulärer Endothelzellen aus menschlichen Explantatherzen konnten mittels einer speziell optimierten Methode in höchster Reinheit gewonnen werden. Nützlich war hier einerseits die lockere Architektur von Venulen, wodurch eine rasche Zerlegung dieser Gefäße in ihre Einzelzellen erreicht werden konnte und andererseits die überraschend hohe spezifische Dichte dieser Zellen, die so durch Zentrifugation einer Zellsuspension über einen Dichtegradienten erheblich angereichert werden konnten. Zellaussaat in geeigneter Dichte, Primärkultur mit optimiertem Kulturmedium, ausreichend lange Wachstumsdauer und eine anschließende immunologisch-mechanische Reinigung waren weitere wesentliche Bestandteile des Verfahrens. Venuläre Endothelzellen besaßen auch nach längerer Zellkultur das Markerenzym Dipeptidylaminopeptidase IV und konnten so rasch identifiziert werden.

4. Reinkulturen venulärer Endothelzellen konnten auch auf porösen Filtermembranen etabliert werden. Wesentlich ist auch die Beobachtung, dass hochgereinigte Zellkulturen besser proliferierten, wenn das Kulturmedium durch Mischkulturen nichtendothelialer Herkunft konditioniert wurde.

5. Ein geeignetes System zur Erfassung hydraulischer Konduktivitäten wurde fortentwickelt und speziell optimiert. Die Funktionalität und Praktikabilität dieses neuartigen Systems wurde durch ein einfaches Experiment bewiesen.

Durch Etablierung reiner Zellkulturen und Erprobung eines neuartigen Meßsystems zur Erfassung hydraulischer Konduktivitäten gezüchteter Zellmonolayer sind nun die Voraussetzungen für weiterführende Studien zur Erforschung der Barrierefunktion venulärer Endothelzellen des menschlichen Herzens somit gegeben. Besonders interessant als Gegenstand zukünftiger Forschungen ist beispielsweise die quantitative Erfassung der Änderung der Barrierefunktion venulärer Endothelzellen der menschlichen koronaren Mikrozirkulation durch Messung hydraulischer Konduktivitäten nach Applikation von aktivierten PMN oder Thrombozytenpräparationen und speziellen Flavonoidfraktionen mit optimierter Technik. Die so künftig erhebbaren Daten könnten eindrucksvoll in Korrelation zu Zeitraffervideoaufnahmen identischer Zellkulturen gesetzt werden.

Literatur

1. Aird WC:
Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms
Circ Res 2007; 100: 158-173
2. Aird WC:
Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds
Circ Res 2007; 100: 174-190
3. Andre P, Denis CV, Ware J, Saffaripour S, Hynes RO, Ruggeri ZM, Wagner DD:
Platelets adhere to and translocate on von Willebrand factor presented by endothelium in stimulated veins.
Blood 2000; 96: 3322-3328
4. Baetscher M, Brune K:
An in vitro system for measuring endothelial permeability under hydrostatic pressure
Exp Cell Res 1983; 148: 541-547
5. Baldwin AL, Thurston G:
Mechanics of Endothelial Cell Architecture and Vascular Permeability
Crit Rev Biomed Eng 2002; 29: 247-278
6. Baldwin AL, Thurston G:
Changes in endothelial actin cytoskeleton in venules with time after histamine treatment.
Am J Physiol 1995; 269: H1528-H1537
7. Batra S, Kuo C, Rakusan K:
Spatial Distribution of Coronary Capillaries: A-V-Segment Staggering.
Adv Exp Med Biol 1989; 248: 241-247
8. Boswell CA, Majno G, Joris I, Ostrom KA:
Acute Endothelial Cell Contraction *in Vitro*: A Comparison with Vascular Smooth Muscle Cells and Fibroblasts.
Microvasc Res 1992; 43: 178-191
9. Bouchard BA, Shatos MA, Tracy PB:
Human brain pericytes differentially regulate expression of procoagulant enzyme complexes comprising the extrinsic pathway of blood coagulation.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17: 1-9
10. Brown K, Henson PM, Maclouf J, Moyle M, Ely JA, Worthen GS:
Neutrophil-Platelet Adhesion: Relative Roles of Platelet P-Selectin and Neutrophil β_2 (CD18) Integrins.
Am J Respir Cell Mol Biol 1998; 18: 100-110
11. Castenholz A:
Functional Microanatomy of Initial Lymphatics with Special Consideration of the Extracellular Matrix.
Lymphology 1998; 31: 101-118

12. Celi A, Lorenzet R, Furie B, Furie BC:
Platelet-Leucocyte-Endothelial Cell Interaction on the Blood Vessel Wall.
Seminars in Hematology 1997; 34: 327-335
13. Chen S-F, Fei X, Li S-H:
A New Simple Method for Isolation of Microvascular Endothelial Cells Avoiding Both
Chemical and Mechanical Injuries
Microvascular Res 1995; 50: 119-128
14. Cheng HC, Abdel Ghany M, Elble RC, Pauli BU:
Lung Endothelial Dipeptidyl Peptidase IV Promotes Adhesion and Metastasis of Rat
Breast Cancer Cells via Tumor Cell Surface-associated Fibronectin
J Biol Chem 1998; 273: 24207-24215
15. Christofidou-Solomidou M, Nakada MT, Williams J, Muller MA, DeLisser HM:
Neutrophil platelet endothelial cell adhesion molecule-1 participates in neutrophil
recruitment at inflammatory sites and is down-regulated after leukocyte extravasation.
J Immunol 1997; 158: 4872-4878
16. Cuevas P, Gutierrez-Diaz JA, Reimers D, Dujovny M, Diaz FG, Ausman JI:
Pericyte endothelial gap junction in human cerebral capillaries
Anat Embryol 1984; 170: 155-159
17. Culic O, Gruwel ML, Schrader J:
Energy turnover of vascular endothelial cells
Am J Physiol 1997; 273: C205-C213
18. Curry FE, Zeng M, Adamson RH:
Thrombin increases permeability only in venules exposed to inflammatory conditions
Am J Physiol 2003; 285: H2446-H2453
19. Dejana E, Zanetti A, Del Maschio A:
Adhesive Proteins at Endothelial Cell-to-Cell-Junctions and Leukocyte Extravasation.
Haemostasis 1996; 26 (suppl 4): 210-219
20. Diaz Flores L, Gutierrez R, Varela H, Rancel N, Valladares F:
Microvascular pericytes: a review of their morphological and functional characteristics
Histol Histopathol 1991; 6: 269-286
21. Diaz-Flores L, Guterrez R, Varela H:
Behaviour of postcapillary venule pericytes during postnatal angiogenesis
J Morphol 1992; 213: 33-45
22. Dull RO, Jo H, Sill H, Hollis TM, Tarbell JM:
The effect of varying albumin concentration and hydrostatic pressure on hydraulic
Conductivity and albumin permeability of cultured endothelial monolayers
Microvasc Res 1991; 41: 390-407

23. Dvorak AM, Kohn S, Morgan ES, Fox P, Nagy JA, Dvorak HF:
The vesiculo-vacuolar organelle (VVO): a distinct endothelial cell structure that provides a transcellular pathway for macromolecular extravasation.
J Leukoc Biol 1996; 59: 100-115
24. Evangelista V, Manarini S, Sideri R, Rotondo S, Martelli N, Piccoli A, Totani L, Piccardoni P, Vestweber D, de Gaetano G, Cerletti C:
Platelet/Polymorphonuclear Leukocyte Interaction: P-Selectin Triggers Protein-Tyrosine Phosphorylation-Dependent CD11b/CD18 Adhesion: Role of PSGL-1 as a Signaling Molecule.
Blood 1999; 93: 876-885
25. Feng D, Nagy JA, Hipp J, Dvorak HF:
Vesiculo-Vacuolar Organelles and the Regulation of Venule Permeability to Macromolecules By Vascular Permeability Factor, Histamine, and Serotonin.
J Exp Med 1996; 183: 1981-1986
26. Feng D, Nagy JA, Hipp J, Pyne K, Dvorak HF, Dvorak AM:
Reinterpretation of endothelial cell gaps induced by vasoactive mediators in guinea-pig, mouse and rat: many are transcellular pores.
J Physiol 1997; 504: 747-761
27. Feng D, Nagy JA, Pyne K, Dvorak HF, Dvorak AM:
Platelets Exit Venules by a Transcellular at Sites of F-Met Peptide-Induced Acute Inflammation in Guinea Pigs.
Int Arch Allergy Immunol 1998; 116: 188-195
28. Frenette PS, Denis CV, Weiss L, Jurk K, Subbarao S, Kehrel B, Hartwig JH, Vestweber D, Wagner DD:
P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1) Is Expressed on Platelets and Can Mediate Platelet-Endothelial Interactions In Vivo.
J Exp Med 2000; 191: 1413-1422
29. Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD:
Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: An interaction mediated by endothelial P-selectin.
Proc Natl Acad Sci 1995; 92: 7450-7454
30. Gerritsen ME, Carley WW, Ranges GE, Shen C-P, Phan SA, Ligon GF, Perry CA:
Flavonoids Inhibit Cytokine-Induced Endothelial Cell Adhesion Protein Gene Expression.
Am J Pathol 1995; 147: 278-292
31. Grega GJ:
Contractile elements in endothelial cells as potential targets for drug action.
Trends Pharmacol Sci 1986; 452-457
32. Grega GJ, Adamski SW:
The role of venular endothelial cells in the regulation of macromolecular permeability.
Micocirc Endothelium Lymphatics 1988; 4: 143-167

33. Grim M, Carlson BM:
Alkaline Phosphatase and Dipeptidylpeptidase IV Staining of Tissue Components of Skeletal Muscle: A Comparative Study.
J Histochem Cytochem 1990; 38: 1907-1912
34. Gumbowski F, Kaminska G, Kaminski M, Mrissey LW, Auerbach R:
Heterogeneity of Mouse Microvascular Endothelium
Blood Vessels 1987; 24: 11-23
35. Heltianu C, Simionescu M, Simionescu N:
Histamine receptors of the microvascular endothelium revealed in situ with a histamine-ferritin conjugate: characteristic high-affinity binding sites in venules.
J Cell Biol 1982; 93: 357-364
36. Hester RL, Hammer LW :
Venular-arteriolar communication in the regulation of blood flow.
Am J Physiol 2002; 282: R1280-R1285
37. Hopsu-Havu VK, Glenner GG:
A New Dipeptide Naphthylamidase Hydrolyzing Glycyl-Prolyl- β -Naphthylamide.
Histochemistry 1966; 7: 197-201
38. Huo Y, Schober A, Forlow SB, Smith DF, Hyman MC, Jung S, Littman DR, Weber C, Ley K:
Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E.
Nat Med 2003; 9: 61-67
39. Invernizzi R, Montani N, Giusto M, Mosconi E, Lorenzutti F, Comolli G, Pecci A, Gamba G:
Expression of dipeptidylaminopeptidase IV/CD26 in peripheral blood lymphocytes of Hemophilic subjects
Eur J Haematol 1998; 60: 145-152
40. Jaffe E:
Biochemistry, Immunology and Cell Biology of Endothelium.
In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW (eds.): Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. 718-729. Philadelphia 1994.
41. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR:
Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by Morphologic and immunologic criteria
J Clin Invest 1973; 52: 2745-2756
42. Juchem G, Nees S, Pohl U:
Etablierung und Charakterisierung mikrovaskulärer Endothelzellen und Perizyten aus dem Bovinen Koronarsystem in Gewebekultur
Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München 1999

43. Jung U, Ley K:
Regulation of E-Selectin, P-Selectin, and Intercellular Adhesion Molecule 1 Expression in Mouse Cremaster muscle Microvasculature.
Microcirculation 1997; 4: 311-319
44. Kern PA, Knedler A, Eckel RH:
Isolation and Culture of Microvascular Endothelium of Human Adipose Tissue
J Clin Invest 1983; 71: 1822-1829
45. Kirchhofer D, Riederer MA, Baumgartner HR:
Specific Accumulation of Circulating Monocytes and Polymorphonuclear Leukocytes on Platelet Thrombi in a Vascular Injury Model.
Blood 1997; 89: 1270-1278
46. Korthuis JR, Gute DC:
Adhesion Molecule Expression in Postischemic Microvascular Dysfunction: Activity of a Micronized Purified Flavonoid Fraction.
J Vasc Res 1999; 36 (suppl 1): 15-23
47. Kumer SC, Damon DN, Duling BR:
Patterns of Conducted Vasomotor Response in the Mouse
Microvascular Res 2000; 59: 310-315
48. Laine GA, Granger HJ:
Microvascular, interstitial, and lymphatic interactions in normal heart
Am J Physiol 1985; 249: H834-H842
49. Lampugnani MG, Caveda L, Brevario F, del Maschio A, Dejana E:
Endothelial cell-to-cell-junctions. Structural characteristics and functional role in the regulation of vascular permeability and leukocyte extravasation.
Baill Clin Haematol 1993; 6: 539-558
50. Landis EM:
Microinjektion studies of capillary permeability. II. The relation between capillary pressure and the rate of fluid passes through the walls of single capillaries
Am J Physiol 1927; 82: 217-238
51. Langelier EG, van Hinsbergh VW:
Charakterisation of an in vitro model to study the permeability of human endothelial cell monolayers
Thromb Haemost 1988; 60: 240-246
52. Launder TM, Gegen NW, Knedler A, Harbeck RJ:
The isolation and characterisation of enriched microvascular endothelial cells from mouse Adipose tissue
J Immunol Meth 1987; 102: 45-52
53. Leeson TS:
Rat retinal blood vessels
Can J Ophthalmol 1979; 14: 21-28

54. Ley K, Gaethgens P:
Endothelial, Not Hemodynamic, Differences Are Responsible for Preferential Leucocyte Rolling in Rat Mesenteric Venules.
Circ Res 1991; 69: 1034-1041
55. Ley K, Tedder TF:
Leukocyte Interactions with Vascular Endothelium- New Insights into Selectin-Mediated Attachment and Rolling.
J Immunol 1995; 155: 525-528
56. Librizzi L, Folco G, De Curtis M:
Nitric Oxide Synthase Inhibitors unmask Acetylcholine-Mediated Constriction of Cerebral Vessels in the *In Vitro* Isolated Guinea-Pig Brain.
Neuroscience 2000; 101: 283-287
57. Lojda Z:
Studies on Dipeptidyl(Amino)Peptidase IV (Glycyl-Proline Naphthylamidase). II Blood Vessels.
Histochemistry 1979; 59: 153-166
58. Lou JN, Mili N, Decrind C, Donati Y, Kossodo S, Spiliopoulos A, Ricou B, Suter PM, Morel DR, Grau GE:
An improved method for isolation of microvascular endothelial cells from normal and inflamed human lung
In Vitro Cell Dev Biol 1998; 34: 529-536
59. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P:
Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries.
N Engl J Med 1986; 315: 1046-1051
60. Magee JC, Stone AE, Oldham KT, Guice KS:
Isolation, culture, and characterization of rat lung microvascular endothelial cells.
Am J Physiol 1994; 267: L433-L441
61. Majno G:
Ultrastructure of the vascular membrane
In: *Handbook of Physiology, Circulation, Section 2, Volume III*. American Physiological Society, Washington, 1965: pp 2293-2375
62. Makrides SC, Ryan US:
Overview of the Endothelium.
In: Loscalzo J, Schaefer A (eds.): *Thrombosis and Hemorrhage*. 295-307. Baltimore 1998.
63. Manthey JA:
Biological Properties of Flavonoids Pertaining to Inflammation.
Microcirculation 2000; 7: S29-S34
64. Marone G, Patella V, Crescenzo G, Genovese A, Adt M:
Human heart mast cells in anaphylaxis and cardiovascular disease
Int Arch Allergy Immunol 1995; 107: 72-75

65. Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F, Messmer K:
Platelet-Endothelial Cell Interactions During Ischemia/Reperfusion: The Role of P-Selectin.
Blood 1998; 92: 507-515
66. Matsuki T, Duling BR:
TNF- α Modulates Arteriolar Reactivity Secondary to a Change in Intimal Permeability.
Microcirculation 2000; 7: 411-418
67. McDonald DM:
Endothelial gaps and permeability of venules in rat tracheas exposed to inflammatory stimuli.
Am J Physiol 1994; 266: L61-L83
68. McEver RP:
Leucocyte-endothelial cell interactions.
Curr Opin Cell Biol 1992; 4: 840-849
69. McEver RP, Moore KL, Cummings RD:
Leukocyte Trafficking Mediated by selectin-Carbohydrate Interactions.
J Biol Chem 1995; 270: 11025-11028
70. Michel CC, Curry FE:
Microvascular permeability
Physiol Rev 1999; 79: 703-761
71. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC:
The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer.
Pharm Rev 2000; 52: 673-751
72. Middleton J, Neil S, Wintle J, Clark-Lewis I, Moore H, Lam C, Auer M, Hub E, Rot A:
Transcytosis and Surface Presentation of IL-8 by Venular Endothelial Cells.
Cell 1997; 91: 385-395
73. Moyer CF, Dennis PA, Majno G, Joris I:
Venular Endothelium in vitro: Isolation and Characterization.
In Vitro 1988; 24: 359-368
74. Muller WA, Randolph GJ:
Migration of leukocytes across the endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes.
J Leukoc Biol 1999; 66: 698-704
75. Nagy Z, Peters H, Huttner I:
Fracture faces of cell junctions in cerebral endothelium during normal and hyperosmotic Conditions
Lab Invest 1984; 50: 313-322

76. Nees S, Weiss D, Reichenbach-Klinke E, Rampp F, Heilmeier B, Kanbach J, Esperster A:
Protective Effects of Flavonoids Contained in the Red Vine Leaf on Venular Endothelium
Against the Attack of Activated Blood Components in vitro.
Drug Res 2003; 53: 330-341
77. Nees S, Weiss D, Thallmair M, Lamm P, Juchem G:
Neue Aspekte zur Pathogenese und Therapie chronischer peripherer Venenleiden
In: Fortschritt und Fortbildung in der Medizin; Band 24: 137-153
Deutscher Ärzteverlag, Köln 2000/2001
78. Netland PA, Zetter BR, Via DP, Voita JC:
In situ labelling of vascular endothelium with fluorescend acetylated low density
lipoprotein
Histochem J 1985; 17:1309-1320
79. Nolte D, Schmid P, Jäger U, Botzlar A, Roesken F, Hecht R, Uhl B, Messmer K,
Vestweber D:
Leukocyte rolling in venules of striated muscle is mediated by P-selectin, not by L-
Selectin.
Am J Physiol 1994; 267: H1637-H1642
80. Pang Z, Antonetti DA, Tarbell JM:
Shear stress regulates HUVEC hydraulic conductivity by occludin phosphorylation
Ann Biomed Eng 2005; 33: 1536-1545
81. Patella V, Genovese A, Marone G:
What are human heart mast cells for?
Chem Immunol 1995; 62: 171-186
82. Plendl J, Neumüller C, Vollmar A, Auerbach R, Sinowatz F:
Isolation and characterisation of endothelial cells from different organs of fetal pigs
Anat Embryol 1996; 194: 445-456
83. Powers MR, Blumenstock FA, Cooper JA, Malik AB:
Role of albumin arginyl sites in albumin-induced reduction of endothelial hydraulic
conductivity
J Cell Physiol 1989; 141: 558-561
84. Reinders JH, de Groot PG, Sixma JJ, van Mourik JA:
Storage and secretion of von Willebrand factor by endothelial cells
Haemostasis 1988; 18: 246-261
85. Renkin EM:
Multiple pathways of capillary permeability
Circ Res 1977; 41:735-743
86. Rodgers GM:
Hemostatic properties of normal and perturbed vascular cells.
FASEB J 1988; 2: 116-123

87. Sacchi G, Weber E, Agliano N, Comparini L:
Lymphatic vessels of the human heart: precollectors and collecting vessels. A morpho-
structural study.
J Submicrosc Cytol Pathol 1999; 31: 515-525
88. Sapatino BV, Welsh JR, Smith CA, Bebo BF, Linthicum DS:
Cloned Mouse cerebrovascular Endothelial Cells that Maintain their Differentiation
Markers for Factor VIII, Low Density Lipoprotein and Angiotensin Converting Enzyme
In Vitro Cell Dev Biol 1993; 29A: 923-928
89. Schelling ME, Meininger CJ, Hawker JR, Granger HJ:
Venular endothelial cells from bovine heart.
Am J Physiol 1988; 254: H1211-H1217
90. Shepro D, D'Amore PA:
Physiology and biochemistry of the vascular wall endothelium
In: Handbook of Physiology, The Cardiovascular System, Section 2, Volume IV,
Chapter 4. American Physiological Society, Bethesda, Maryland 1984
91. Simionescu M, Simionescu N:
Endothelial transport of macromolecules: transcytosis and endocytosis. A look from cell
biology
Cell Biol Rev 1991; 25: 5-78
92. Simionescu M, Simionescu N, Palade GE:
Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium: a survey of some
Newly evolving biochemical and physiological features
Basic Res Cardiol 1985; 80: 459-474
93. Sims DE:
Recent advances in pericyte biology – implications for health and disease
Can J Cardiol 1991; 7: 431-443
94. Smith W:
Possible steps Involved in the Transition to Stationary Adhesion of Rolling Neutrophils: A
Brief Review.
Microcirculation 2000; 7: 385-394
95. Springer TA:
Traffic Signals on Endothelium for Lymphocyte Recirculation and Leukocyte
Emigration.
Ann Rev Physiol 1995; 57: 827-872
96. Struckmann JR:
Clinical Efficacy of Micronized Purified Flavonoid Fraction: An Overview.
J Vasc Res 1999; 36 (suppl 1): 37-41
97. Suttorp N, Hesz T, Seeger W, Wilke A, Koob R, Lutz F, Drenckhahn D:
Bacterial exotoxins and endothelial permeability for water and albumin in vitro
Am J Physiol 1988; 255: C368-C376

98. Suttorp N, Nolte A, Wilke A, Drenckhahn D:
Human neutrophil elastase increases permeability of cultured pulmonary endothelial cell monolayers
Int J Microcirc Clin Exp 1993; 13: 187-203
98. Thallmair M, Nees S, Pohl U:
Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung von Endothelzellen aus subkutanem Bauchfett des Menschen und des Pavians zum Zwecke der Endothelialisierung vaskulärer Prothesen
Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München 2000
99. Thurston G, Baluk P, Hirata A, McDonald DM:
Permeability-related changes revealed at endothelial cell borders in inflamed venules by lectin binding.
Am J Physiol 1996; 271: H2547-H2562
100. Thurston G, Baluk P, McDonald D:
Determinants of Endothelial Cell Phenotype in Venules.
Microcirculation 2000; 7: 67-80
101. Torbenson M, Randhawa P:
Arcuate and interlobular phlebitis in renal allografts
Hum Pathol 2001; 32:1388-1391
102. Tsamandas AC, Jain AB, Felekouras ES, Fung JJ, Demetris AJ, Lee RG:
Central venulitis in the allograft liver: a clinicopathologic study
Transplantation 1997; 64: 252-257
103. Ware JA, Heistad DD:
Platelet-Endothelium Interactions.
New Engl J Med 1993; 328: 628-635
104. Waschke J, Curry FE, Adamson RH, Drenckhahn D:
Regulation of actin dynamics is critical for endothelial barrier functions
Am J Physiol 2005; 288: H1296-H1305
105. Waschke J, Drenckhahn D, Adamson RH, Barth H, Curry FE:
cAMP protects endothelial barrier functions by preventing Rac-1 inhibition
Am J Physiol 2004; 287: H2427-H2433
106. Weber C, Springer TA:
Neutrophil Accumulation on Activated, Surface-adherent Platelets in Flow Is Mediated by Interaction of Mac-1 with Fibrinogen Bound to α IIB β 3 and Stimulated by Platelet-activating Factor
J Clin Invest 1997; 100: 2085-2093
107. Wiedemann MP, Tuma RF, Mayrovitz HN:
An Introduction to Microcirculation.
Academic Press, New York, London 1981

108. Wolff B, Burns AR, Middleton J, Rot A:
Endothelial Cell „Memory“ of Inflammatory Stimulation: Human Venular Endothelial Cells Store Interleukin 8 in Weibel-Palade Bodies.
J Exp Med 1998; 188: 1757-1762
109. Yuan SY:
Signal Transduction Pathways in Enhanced Microvascular Permeability.
Microcirculation 2000; 7: 395-403
110. Yuan SY, Wu MH, Ustinova EE, Guo M, Tinsley JH, de Lanerolle P, Xu W:
Myosin Light Chain Phosphorylation in Neutrophil-Stimulated Coronary Microvascular Leakage.
Circ Res 2002; 90: 1214-1221

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Vornamen: Ekkehard Benno
 Familienname: Reichenbach-Klinke
 Geburtstag/-ort: 13.01.1976 in München

Staatsangehörigkeit: Deutsch
 Konfession: Römisch-katholisch

Eltern: Dr. med. Klaus Reichenbach-Klinke, Facharzt für Labormedizin
 Erika Reichenbach-Klinke, geb. Schwarz, Fachlehrerin

Lebenslauf

Schulausbildung

1982-1986 Besuch der Grundschule West in Fürstenfeldbruck
 1986-1995 Besuch des Viscardi-Gymnasiums in Fürstenfeldbruck, Abitur 1995

Wehrdienst

07/1995-12/1996 Wehrdienst in Würzburg, Fürstenfeldbruck und Landsberg am Lech, anschließend Wehrübungen in Kempten, Murnau und Dillingen

Studium

05/1997-06/2003 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München (3. Staatsexamen am 03.06.2003)
 04/2002-03/2003 Praktisches Jahr in der Medizinischen Klinik Innenstadt und der Urologischen Klinik und Poliklinik der Universität München sowie der Chirurgischen Klinik des Kantonsspitals Uri in Altdorf/Schweiz

Bisherige berufliche Tätigkeit

07/2003-12/2004 Arzt im Praktikum bzw. Assistenzarzt der Urologischen Abteilung des Klinikums Kempten-Oberallgäu unter der Leitung von Herrn Dr. med. Reinhold Mayer und Herrn Dr. med. Rudolf Gumpinger

01/2005- 03/2006 Assistenzarzt der Chirurgischen Abteilung des Kantonsspitals Uri, Altdorf/Schweiz unter der Leitung von Herrn Dr. med. Gallus Burri

seit 04/2006 Assistenzarzt der Urologischen Abteilung des Klinikums Kempten-Oberallgäu unter der Leitung von Herrn Dr. med. Rudolf Gumpinger

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn **Prof. Dr. Dr. S. Nees** für die Themenstellung und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Im speziellen danke ich ihm für die Einführung in eine große Vielfalt physiologischer und auch klinisch relevanter Aspekte. Sehr hilfreich war die systematische methodische Einarbeitung und stetige engagierte Betreuung während der gesamten Zeit meiner wissenschaftlichen Tätigkeit durch ihn.

Herrn **Prof. Dr. T. Fischlein** von der Herzchirurgischen Klinik der Universität Erlangen und Herrn **Prof. Dr. E. Kreuzer** von der Herzchirurgischen Klinik der Universität München danke ich für die Bereitstellung der Explantatherzen. Es bestand eine stets freundliche und verlässliche Kooperation.

Den Feinmechanikern **F. Singer**, **M. Buchner** und **J. Feuerstein** danke ich herzlich für ihre stets rasche, zuverlässige und professionelle Hilfe bei der Realisierung neuer Gerätschaften und neuer experimenteller Aufbauten.

Meinen Freunden und Kollegen **Dr. D. Weiss**, **J. Kanbach** und (in besonderem Maße hervorzuheben) **F. Rampp** sage ich großen Dank für die hervorragende, angenehme, kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Nicht zuletzt möchte ich noch **meinen Eltern** besonders herzlich danken, ohne deren Unterstützung mein Studium und diese Dissertationsarbeit nicht möglich gewesen wäre. Insbesondere mein Vater, Herr **Dr. K.-E. Reichenbach-Klinke** motivierte mich immer neu für Studium und wissenschaftliche Arbeit.