

Aus dem Institut für Kardiovaskuläre Physiologie und Pathophysiologie
(im Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin, WBex)
der Ludwig-Maximilians-Universität München
ehem. Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl

**Einfluss aktivierter Leukozyten auf die
Integrität der endothelialen Glykokalyx und
Rückkopplung mit der intravasalen
Adhäsionsrate
Studien im ex-vivo Organmodell**

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

vorgelegt von
Elisabeth Wiltfang
geb. Kirchhofer
aus Peißenberg

2019

Mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. B. F. Becker

Mitberichterstatterinnen: PD Dr. Claudia Nußbaum

PD Dr. Teresa Kauke

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. D. Chappell

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

Tag der mündlichen Prüfung: 21. 11. 2019

„Wissenschaft wird immer eine Suche sein, niemals wirklich eine Entdeckung.
Es ist eine Reise, niemals wirklich eine Ankunft.“

Karl R. Popper (1902 – 1994)

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	4
<u>I. EINLEITUNG</u>	<u>6</u>
I.1 DIE ENDOTHELIALE GLYKOKALYX	6
I.1.1 ZUSAMMENSETZUNG UND AUFBAU DER GLYKOKALYX	6
I.1.2 PHYSIOLOGISCHE UND PATHOPHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG DER GLYKOKALYX.....	7
I.1.3 BEDEUTUNG VON SHEDDING DER GLYKOKALYX	8
I.2 ADHÄSION.....	10
I.3 AKTIVIERTE LEUKOZYTEN	11
I.4 STAND DER FORSCHUNG	11
I.5 FRAGESTELLUNG DER STUDIE	12
<u>II. MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>13</u>
II.1 VERWENDETE SUBSTANZEN UND LÖSUNGEN	13
II.1.1 SUBSTANZEN UND BEZUGSQUELLEN	13
II.1.2 LÖSUNGEN	13
II.2 ISOLIERUNG HUMANER BLUTZELLEN	15
II.3 TIEREXPERIMENTELLER TEIL	16
II.3.1 VERSUCHSTIERE	16
II.3.2 LANGENDORFF – MODELL DES ISOLIERTEN PERFUNDIERTEN HERZENS	17
II.3.3 HERZPRÄPARATION.....	17
II.3.4 VERSUCHSAPPARATUR.....	18
II.3.5 PROTOKOLL DER VERSUCHSREIHE.....	19
II.4 DURCHFLUSSZYTOMETRIE	22
II.4.1 ANTIKÖRPERMARKIERUNG DER PMN	23
II.4.2 FACS MESSUNGEN	23
II.5 MESSUNG VON GLYKOKALYXBESTANDTEILEN	24
II.6 IMMUNHISTOCHEMIE UND ELEKTRONENMIKROSKOPIE	25
II.7 STATISTISCHES PROGRAMM UND AUSWERTUNG	25
<u>III. ERGEBNISSE</u>	<u>27</u>
III.1 ERMITTLUNG DER GLYKOKALYXBESTANDTEILE	27
III.1.1 HEPARANSULFAT	27
III.1.2 HYALURONAN.....	30
III.2 INTRAKORONARE LEUKOZYTENADHÄSION	33
III.3 ELEKTRONENMIKROSKOPIE UND IMMUNHISTOCHEMIE	34
<u>IV. DISKUSSION</u>	<u>37</u>
IV.1 DISKUSSION DER METHODIK.....	37
IV.1.1 VERWENDUNG VON HUMANEM BLUT	37

IV.1.2 PMN – PRÄPARATION	37
IV.1.3 MODELL DES ISOLIERT PERFUNDIERTEN HERZENS	38
IV.1.4 HERZPRÄPARATION	39
IV.1.5 PROTOKOLL DER VERSUCHSREIHE	39
IV.1.6 FACS-MESSUNGEN	40
IV.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE.....	41
IV.2.1 ADHÄSIVE PROZESSE VON MIT FMLP ODER PAF AKTIVIERTEN LEUKOZYTEN.....	41
IV.2.2 SHEDDING VON HEPARANSULFAT UND HYALURONAN	42
IV.2.3 GLYKOKALYXSCHÄDIGUNG DURCH SERINPROTEASEN.....	43
IV.2.4 DIE ROLLE VON ANTITHROMBIN III BEI DER GLYKOKALYX-PROTEKTION	45
<u>V. ZUSAMMENFASSUNG.....</u>	<u>47</u>
<u>VI. ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>49</u>
<u>VII. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</u>	<u>50</u>
<u>VIII. LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>52</u>
<u>IX. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....</u>	<u>63</u>

I. Einleitung

I.1 Die endotheliale Glykokalyx

Die Glykokalyx ist eine Struktur, die sich vorwiegend aus Proteoglykanen, Glykoproteinen und Glykosaminoglykanen zusammensetzt und im gesamten Kreislaufsystem zu finden ist, insbesondere auf der apikalen Oberfläche der Endothelzellen (1,2). Jedes gesunde Gefäß wird von dieser Struktur ausgekleidet, deren Existenz erstmals in den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts vermutet wurde (3). Aufgrund der ursprünglichen Annahme, die endotheliale Glykokalyx habe nur eine Dicke von weniger als 20 nm, wurde ihr zunächst keine relevante physiologische Bedeutung beigemessen (4). Eine Weiterentwicklung der Färbe- und Fixierungstechniken in den letzten Jahren zeigte dann aber eine Dicke der Glykokalyx von ca. 0,5 µm, womit eine relevante physiologische Funktion nahe lag (5). Diese Reevaluierung rückte die Glykokalyx in den Mittelpunkt des Interesses von Physiologen und Medizinern. Neuere Studien zeigten zudem, dass die endotheliale Glykokalyx in vivo Plasmaproteine bindet und damit den physiologisch aktiven „Endothelial Surface Layer“ (ESL) ausbildet (1), welcher sich mit einer Dicke von ca. 1 µm, in manchen Regionen sogar größer als die Endothelzelle selbst darstellt (6).

I.1.1 Zusammensetzung und Aufbau der Glykokalyx

Die Glykokalyx ist eine Hüllschicht, welche an der Außenseite nahezu aller Zellen zu finden ist. Besonders ausgeprägt findet man diese kohlenhydratreiche, negativ geladene Schicht auf dem Gefäßendothel (7). Die Glykokalyx setzt sich überwiegend zusammen aus membrangebundenen Glykoproteinen und transmembranären Proteoglykanen (z.B. Syndecan-1), welche negativ geladene Kohlenhydrat-reiche Seitenketten (Glykosaminoglykane, wie z.B. Heparan- und Chondroitinsulfate) tragen (8). Hyaluronsäure, ein langkettiges, nicht-sulfatiertes Glykoprotein, fungiert in diesem Netzwerk als Stabilisator.

Es wird vermutet, dass die Zusammensetzung und die Dicke der endothelialen Glykokalyx in den einzelnen Organsystemen unterschiedlich sind und sie sich damit den verschiedenen Bedingungen der Umgebung und dem Bedarf und der Funktion des jeweiligen Organs anpasst. Im „Steady-State“ herrscht ein dynamisches

Gleichgewicht von Auf- und Abbau dieser Struktur, wobei sich einzelne Plasmabestandteile aus dem vorbeifließenden Blutstrom an das bestehende Grundgerüst ständig anlagern, interkalierend verbinden, aber auch wieder gelöst werden können (2). Große Bedeutung kommt hierbei dem Plasma-Albumin zu, von dem die Bildung und Stabilität des ESL abhängt.

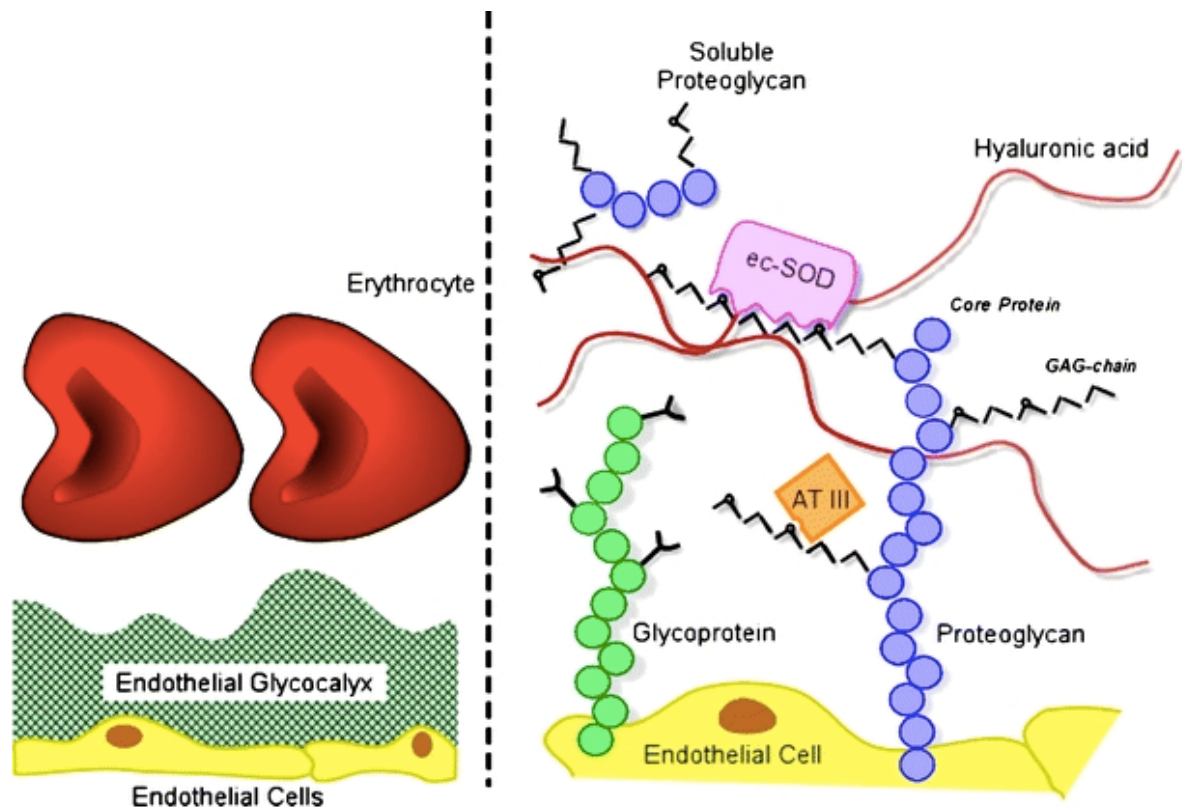


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der endothelialen Glykokalyx nach Reitsma et al.(9)

GAG = Glycosaminoglycan, ec-SOD = extracelluläre Superoxid-Dismutase, AT III = Antithrombin III

I.1.2 Physiologische und pathophysiologische Bedeutung der Glykokalyx

Angesiedelt zwischen dem Endothel und dem Blutstrom misst man der endothelialen Glykokalyx verschiedene entscheidende (patho-)physiologische Funktionen bei. Am besten untersucht ist gegenwärtig ihre Bedeutung als Komponente der vaskulären Permeabilitätsbarriere (10,11)

So wird dieser Struktur eine Art Schrankenfunktion zugeschrieben, welche den Zugang zur Endothelzellmembran sowie zum interstitiellen Raum für bestimmte Moleküle

reguliert (9). Darüber hinaus ist die Glykokalyx mechanischen Kräften seitens des Blutstroms ausgesetzt und fungiert als Übersetzer von biomechanischen Kräften in biologisch-chemische Signale. Ein Beispiel hierfür ist das durch Wirken von Schubspannung („shear stress“) von der Endothelzelle produzierte Stickstoffmonoxid (NO) (12). Eine weitere wichtige Bedeutung hat die endotheliale Glykokalyx in der Interaktion mit verschiedenen Plasmamolekülen. Wichtige Mediatoren der Antikoagulation, wie zum Beispiel Antithrombin III, binden an die Heparansulfate innerhalb der Glykokalyx, was den Antikoagulationsprozess in Gang setzt (13). Auch fällt der endothelialen Glykokalyx eine regulierende Aufgabe bei Entzündungsreaktionen zu, da Cytokine innerhalb dieser Struktur gebunden werden. Eine weitere anti-inflammatorische Wirkung der Glykokalyx besteht in der Abschirmung vaskulärer Adhäsionsmoleküle, exprimiert auf der Endothelzellmembran. Aufgrund deren geringer Länge von ca. 30 nm sind diese tief innerhalb der Glykokalyx verborgen und haben damit normalerweise keinen direkten Kontakt zu zirkulierenden Blutzellen (14). Diese Beispiele verdeutlichen die gefäßprotective Aufgabe der endothelialen Glykokalyx, welche darin besteht, als Schutzschicht das Endothel in seiner Funktion zu erhalten (9).

I.1.3 Bedeutung von Shedding der Glykokalyx

Unter „Shedding“ wird das Abspalten von Glykokalyxbestandteilen von der Endothelmembran oder dem Grundgerüst verstanden. Durch Shedding wird die endotheliale Glykokalyx in ihrer Funktion beeinträchtigt. Verschiedene exogene und endogene Faktoren sind verantwortlich für die Degradierung der endothelialen Glykokalyx und wurden in klinischen Studien beschrieben (15-18). Im Falle einer Ischämie und der darauf folgenden Reperfusion kommt es zu einem ausgeprägten Shedding der Glykokalyx, die mit dem Ausmaß und der Dauer des ischämischen Insults korreliert (16). Bekanntermaßen führen Ischämie/Reperfusion zu Gewebeschädigungen, einer verstärkten vaskulären Permeabilität mit teils ausgeprägten Gewebsödemen, Leukozytenadhäsion und -migration sowie einzelnen Organdysfunktionen bis hin zum Organversagen (10,19,20). Das Ausmaß der Schädigung kann anhand des Anstiegs verschiedener Glykokalyxbestandteile (z.B. Syndecan-1, Heparansulfat oder Hyaluronan) im Plasma indirekt quantifiziert werden (16).

In der Pathogenese der Arteriosklerose scheint die Zerstörung der Glykokalyx der erste nachweisbare Schritt in Richtung Krankheitsgeschehen zu sein. So werden subendothelial Lipoproteine eingelagert, wodurch zunächst diverse inflammatorische Prozesse ablaufen und es im Verlauf zu Plaqueablagerungen kommt (21). Ein weiteres Krankheitsbild, bei dem pathophysiologische Veränderungen des vaskulären Systems eine Schlüsselrolle spielen, stellt der Diabetes mellitus dar. Hier scheint die Hyperglykämie Ursache für die Schädigung der Glykokalyx und die daraus folgende endotheliale Dysfunktion zu sein (22). Die zentrale Rolle der endothelialen Glykokalyx für die vaskuläre Barrierefunktion zeigt sich vor allem auch bei (experimentell erzeugter) Inflammation sowie im septischen Schock, wo es durch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren, Proteasen, Radikalen und anderen Mediatoren zum Shedding der Glykokalyx mit nachfolgender Leukozytenadhärenz, Permeabilitätsstörung und Ödementwicklung kommt (5,17). Auch beim Trauma (23) zeigte eine klinische Studie die Bedeutung der endothelialen Glykokalyx. Unabhängig vom Ausmaß des Traumas war die Menge an Glykokalyxbestandteilen im Blut ein unabhängiger Prädiktor der Mortalität und ging mit Gerinnungsstörungen und erhöhtem Vasopressorenbedarf einher.

Verschiedene experimentelle Studien haben sich in den letzten Jahren mit dem Schutz der endothelialen Glykokalyx auseinander gesetzt. So scheint der Serinproteaseninhibitor Antithrombin III (24), welcher an Glykosaminoglykane in der Glykokalyx bindet, während Ischämie/Reperfusion und Infusion von TNF-alpha stabilisierende bzw. protektive Wirkungen zu haben. Auch die Gabe von Hydrocortison vor Ischämie/Reperfusion führte zu einer reduzierten Sheddingrate der Glykokalyx, am ehesten durch eine Stabilisierung von Mastzellen was die Freisetzung vieler Mediatoren wie Histamin verhindert (25). Jacob et al. untersuchten die Wirkung von Albumin als Zugabe zu kardioplegischen Lösungen in einem Tiermodell für Herzexplantationen (26). Hier zeigten sich eine niedrigere Sheddingrate sowie eine verbesserte rechtsventrikuläre Pumpfunktion. Die Gabe des volatilen Anästhetikums Sevofluran im isolierten Organmodell schien ebenfalls protektive Einflüsse auf die Glykokalyxintegrität zu haben (27).

I.2 Adhäsion

Der Adhäsionsprozess von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) ist mittlerweile sehr gut beschrieben und tritt unter anderem bei der Pathogenese des postischämischen Reperfusionsschadens auf. Adhäsive Prozesse sind die Voraussetzung dafür, dass aus dem Blutstrom Leukozyten in den extravaskulären Raum im Rahmen eines inflammatorischen Vorganges emigrieren. Den ersten Schritt in der Adhäsionskaskade stellt ein Kontakt der Leukozyten mit der Gefäßwand der postkapillären Venolen und Sammelvenolen dar (28-30). Die Interaktion zwischen Leukozyten und mikrovaskulärem Endothel folgt einer Zwei-Schritt-Sequenz (31), wobei jeweils Adhäsions-Rezeptormoleküle auf der Oberfläche der Leukozyten und der Endothelzelle involviert sind. In einem ersten Schritt vermitteln die vaskulären Selectine die primäre Interaktion der Leukozyten am mikrovaskulären Endothel („Rolling“) (20). Dieses „Abtasten“ des Endothels durch die Leukozyten ist eine notwendige Voraussetzung für deren Adhärenz an die Endotheloberfläche und Emigration ins Gewebe (31,32). Rolling wird primär durch die Interaktion von P- und E-Selectin (GMP-140, CD62, ELAM-1) auf aktivierten Endothelzellen (33,34) und sLex (sialyl Lewisx), sowie L-Selectin (LECAM-1, LAM-1) (35,36) den Liganden für P- und E-Selectin auf den Leukozyten induziert (37). Im zweiten Schritt werden Leukozyten chemotaktisch stimuliert, β 2-Integrine, insbesondere MAC-1 (CD11b/CD18) (38,39) aktiviert und LECAM-1 (L-Selectin) (35,36) von der Oberfläche der Leukozyten abgestreift. Über β 2-Integrine und deren endotheliale Liganden ICAM-1 (38) für MAC-1 und LFA-1 sowie ICAM-2 für LFA-1 erfolgt dann die permanente Adhäsion der Leukozyten am mikrovaskulären Endothel, sogenanntes „Sticking“, sowie deren transendotheliale Migration (31,40). Spezifische Antikörper sowohl gegen CD11a, CD11b, CD18, als auch gegen ICAM-1 können diese Adhäsivität hemmen. Nach der Migration der Leukozyten in den subendothelialen Raum erfolgt die kontinuierliche Aktivierung des Endothels und der Leukozyten durch Zytokine, Chemokine und durch lokale, chemische Lockstoffe (19,37). Anschließend wandern die aktivierten Leukozyten durch die subendotheliale extrazelluläre Matrix zu dem Ort der Inflammation oder Immunreaktion, wo sie schlussendlich akkumulieren (37).

Fest steht, dass eine übermäßige Adhäsion von Leukozyten am Gefäßendothel ursächlich an Gefäß- und Gewebsschäden und daraus resultierender Organdysfunktion beteiligt ist.

I.3 Aktivierte Leukozyten

Die Aktivierung von Leukozyten spielt eine wichtige Rolle bei der Entzündungsreaktion. Sie fungieren als Mediatoren bei inflammatorischen Prozessen, indem sie Zytokine wie TNF- α , IL -1, - 6 und - 8 freisetzen und durch Chemotaxie weitere Entzündungszellen anziehen (41). Auch können die lokal konzentrierten Leukozyten ihrerseits durch endothelial freigesetzte Mediatoren wie z.B. Chemokine oder den plättchenaktivierenden Faktor (PAF) in einen aktivierten Zustand versetzt werden (42). Die Aktivierungsprozesse der Leukozyten und die des Endothels durch Zytokine begünstigen sich also gegenseitig im Sinne eines "positive feedback". Aktivierte Leukozyten schädigen das Gewebe indem sie Proteasen, Kollagenasen, Elastasen, Lipooxygenasen, Phospholipasen und Myeloperoxidasen freisetzen, welche das Proteingerüst der extrazellulären Matrix angreifen und deren Aufbau zerstören (43). Ein Anstieg der Gefäßpermeabilität mit Eindringen von extravasaler Flüssigkeit und die Bildung von Ödemen sind die Folgen. Vermutlich schädigen diese Enzyme, einzeln oder im Zusammenspiel, die endotheliale Schutzschicht der Glykokalyx, wodurch die Adhäsion weiterer Entzündungszellen propagiert wird.

I.4 Stand der Forschung

Eine intakte endotheliale Glykokalyx scheint die Voraussetzung dafür zu sein, dass es zu keinem direkten Kontakt von Blutzellen mit ihren korrespondierenden vaskulären Adhäsionsmolekülen kommt. Unter physiologischen Umständen sollten diese Moleküle innerhalb der Glykoklayx verborgen bleiben und somit eine antiinflammatorische Wirkung zustande kommen (44). Eine pharmakologische Protektion gegen Einflüsse von Proteasen, Radikalen und Histamin wurde in unserer Arbeitsgruppe mit Substanzen wie Antithrombin III und Hydrocortison ex-vivo am

Modell des isoliert perfundierten Herzens nachgewiesen. Diese Protektion bewirkte eine reduzierte Zelladhäsion und eine erhaltene Barrierefunktion. Das isolierte Organmodell arbeitete allerdings mit kristalloider Lösung ohne Blutbestandteile und damit u.a. ohne korpuskuläre Blutelemente und Plasmabestandteile, die im Rahmen von Ischämie/Reperfusion oder Inflammation aktiviert werden und damit selbst in den Pathomechanismus eingreifen dürften.

I.5 Fragestellung der Studie

Das Ziel unserer Studie war die Untersuchung, ob Pathomechanismen von aktivierten Leukozyten ausgehen, die auf die Integrität der endothelialen Glykokalyx Einfluss nehmen. Als Folge einer Zerstörung der Glykokalyx sollte wiederum die Adhäsionsrate der Leukozyten zunehmen. Diese Interaktion wurde hier im isolierten Organmodell des Herzens mit einem intakten koronaren Gefäßbett ohne Einfluss von Ischämie/Reperfusion oder Inflammation quantifiziert.

Im Speziellen stellten sich folgende Fragen:

Wird die Integrität der Glykokalyx durch in vitro aktivierte Leukozyten beeinflusst und hat dies eine Auswirkung auf die intravaskuläre Adhäsionsrate?

Entfaltet in diesem Szenario eine Präkonditionierung des Organs durch den Proteaseninhibitor Antithrombin III eine protektive Wirkung auf die Integrität der Glykokalyx und auf die Leukozytenadhäsion?

II. Material und Methoden

II.1 Verwendete Substanzen und Lösungen

II.1.1 Substanzen und Bezugsquellen

CO ₂	Linde, Höllriegelskreuth, Deutschland
O ₂	Linde, Höllriegelskreuth, Deutschland
Glucose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Iloprost	Merck, Darmstadt, Deutschland
Insulin	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kalziumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat-Hexahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumpyruvat	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Cellfix	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Cellwash	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Lysing-Solution	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

II.1.2 Lösungen

II.1.2.1 Krebs-Henseleit-Puffer (Perfusat)

NaCl	116 mM
KCl	3,6 mM
NaHCO ₃	23 mM
CaCl ₂	1,2 mM

MgSO ₄	0,58 mM
KH ₂ PO ₄	1,16 mM
Glucose	5,4 mM
Natriumpyruvat	0,3 mM
Insulin	2,8 U/L

Der Krebs-Henseleit-Puffer wurde unter konstanter Erwärmung (37°C) mit 94,6% O₂ und 5,4% CO₂ begast. Der pH-Wert betrug immer 7,35-7,45.

II.1.2.2 PBS (Phosphate buffered saline)

NaCl	120 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	4,0 mM
KH ₂ PO ₄	5,0 mM
EDTA	0,1%

Der pH-Wert der PBS betrug konstant 7,4.

II.1.2.3 Tyrode-Lösung

NaCl	137,0 mM
KCl	2,6 mM
MgCl ₂	1,0 mM
CaCl ₂	3,0 mM
TRIS	1,0 mM
Glucose	0,1%

Der pH-Wert der Tyrode-Lösung betrug 7,4.

II.2 Isolierung humaner Blutzellen

Zur Gewinnung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) wurde humanes Blut verwendet. In früheren Experimenten konnte gezeigt werden, dass PMN aus humanem Blut und aus Blut unserer Versuchstiere (Meerschweinchen) ähnlich in Bezug auf Adhäsion reagieren (45,46). Es war somit möglich, die Anzahl der Versuchstiere gering zu halten, da keine Tiere als Blutspender benötigt wurden. Zur Isolierung der PMN dienten magnetisch markierte Antikörper und ein „magnetic cell separation system“ (MACS, Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland). Die Präparation begann mit der Gewinnung von ca. 10-20 ml humanem Blut, entnommen aus den Cubitalvenen gesunder, erwachsener Spender. Das gewonnene Blut wurde mit 0,1% EDTA antikoaguliert und für 15 min bei 400 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Bei diesem Vorgang bildete sich der sogenannte Buffy Coat, ein dünner Leukozytenfilm zwischen Erythrozyten und Blutplasma. Dieser wurde abpipettiert und die dabei gewonnenen 1000 µl (gewonnene Menge aus zwei Versuchen) bei 4°C 15 min lang mit 30 µl an paramagnetische Teilchen gebundene monoklonale Antikörper gegen CD 15 (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland), eptospezifisch für Neutrophile, inkubiert. Währenddessen wurde das MACS vorbereitet, in welches eine Separationssäule, gespült mit 500 µl einer PBS Lösung, die 0,5% bovines Serumalbumin (BSA) enthielt, eingesetzt wurde. Anschließend separierte ein MACS den Teil des Buffy Coat, welcher als „magnetische“ PMN beim Durchlaufen der Säule retiniert wurde, von dem passierenden Rest. Vor Trennung vom Magneten wurde die Säule insgesamt viermal mit je 500 µl PBS gespült, um nicht-markierte, unspezifisch hängengebliebene Zellen wie Erythrozyten, Plättchen, Lymphozyten und Monozyten zu entfernen. Der Anteil, welcher in der Säule verblieb, wurde mithilfe von 1 ml PBS und eines speziellen Stempels dem System entnommen. Des weiteren erfolgte eine Verdünnung mit 9 ml PBS und anschließend eine zehnmünütige Zentrifugation bei 360 x g. Das dabei entstandene Pellet wurde einmal gewaschen und, mit 4 ml Tyrode versetzt, am Vortex in Suspension gebracht. Die genaue Zelldichte wurde mittels Coulter Counter bestimmt und durch weitere Zugabe von Tyrode-Lösung auf einen Wert von $2,25 \times 10^6$ PMN/ml eingestellt. Die Herstellung der PMN-Suspension benötigte maximal eine Stunde und wurde bei Raumtemperatur durchgeführt (46).

Zur Aktivierung der Leukozyten entschieden wir uns zum Einen für den plättchenaktivierenden Faktor (PAF), der eine große Rolle bei der Zell-Zell Adhäsion infolge von intrinsischen Entzündungsreaktionen spielt (59) und der nachweislich für die PMN-Migration im Falle eines Inflammationsprozesses verantwortlich ist. Zum Anderen benutzten wir das Bakterienpeptid f-Met-Leu-Phe (fMLP), ein Mediator, der schon früher verwendet wurde, um transendotheliale Protein-Wanderungen zu induzieren (60,61). Er ist ein potenter Stimulus für neutrophile Granulozyten und ein probates Mittel, um die Gefäßpermeabilität zu erhöhen (62-64). Die Aktivierung der PMN erfolgte unmittelbar vor der intrakoronaren Applikation der Zellen (siehe II.3.5). Hierzu wurde pro ml der PMN-Suspension entweder 0,5 ml Tyrode-Lösung mit 10^{-7} M fMLP oder 0,5 ml Tyrode-Lösung mit 10^{-6} M PAF vermischt. Bei Kontrollansätzen wurde 0,5 ml Tyrode-Lösung ohne Zusatz verwendet.

II.3 Tierexperimenteller Teil

Die Experimente der Studie erfüllen alle die Richtlinien des Tierschutzgesetzes und wurden nach Prüfung durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen 209. 1/211-2531.3-3/99).

II.3.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche Meerschweinchen (Harlan Winkelmann GmbH, Borchon, Deutschland) verwendet, welche ein Gewicht von 250-300 g hatten. Die Standarddiät, bestehend aus Trockenfutter und Wasser, wurde gemäß den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes verabreicht. Untergebracht waren die Versuchstiere in Tierställen, wo sie bei zwölfstündigem Tag- und Nachtrhythmus gehalten wurden und eine zweiwöchige Gewöhnungsphase vor Beginn der Versuchsreihe durchliefen.

II.3.2 Langendorff – Modell des isolierten perfundierten Herzens

Erstmals beschrieben wurde das Langendorff-Modell 1895 von Oskar Langendorff. Es stellt eine Methode zur retrograden Perfusion eines isolierten Säugetierherzens dar. Eine Weiterentwicklung des ursprünglichen Langendorff-Modells ging von Döring aus und wird heute weltweit in dieser modifizierten Version verwendet (47).

Das isolierte Herz wird bei der Langendorff-Versuchsanordnung retrograd über eine Kanüle, welche dafür in die Aorta eingeführt wird, mit einer protein- und zellfreien Lösung (Krebs-Henseleit-Puffer) perfundiert. Zusätzlich wird das Perfusat vor der Applikation mit Sauerstoff und Kohlendioxid in einem festen Mischungsschema begast. Sobald die Perfusion erfolgt, schließt sich die Aortenklappe und das Myokard wird orthograd über die Koronararterien mit Sauerstoff und Energie versorgt. Der Abtransport erfolgt dann über den Sinus coronarius zum rechten Vorhof und Ventrikel und wird anschließend über den Truncus pulmonalis vom spontan schlagenden Herzen selbst aus dem System gepumpt (47). Dieses koronarvenöse Effluat sowie das direkt von der Herzoberfläche abgegebene Transsudat werden gesammelt. Die Langendorff-Versuchsapparatur ermöglicht es, Versuche am isolierten Organ durchzuführen, sodass alles, was in das Herz hineinfließt, beim Hinausfließen quantitativ aufgefangen und analysiert werden kann.

II.3.3 Herzpräparation

Für die Herzpräparation wurden die Meerschweinchen durch zervikale Dislokation mittels eines speziell entwickelten Gerätes und anschließendem beidseitigen Karotidschnitt getötet. Anschließend wurden sie auf einem Operationstisch für Versuchstiere fixiert und das abdominale Fell des Tieres wurde entfernt. Nach Eröffnung des Thorax durch einen longitudinalen Schnitt entlang des Sternums und zwei Schnitten entlang der Rippenbögen wurde das Herz rasch freigelegt und mit 4°C kalter isotonischer Natriumchloridlösung die Cardioplegie herbeigeführt. Das Perikard wurde von der Herzspitze bis zum cranialen Ende abpräpariert und die Aorta sowie A. pulmonalis und Vv. cavae superior und inferior dargestellt. Um die Perfusionskanüle in die Aorta ascendens einzuführen wurde letztere mit einem Faden umschlungen, angeschnitten und die Kanüle fixiert. Das Herz wurde sogleich mit 37°C warmem Perfusat (Krebs-Henseleit-Puffer) retrograd über die Aortenkanüle durchströmt. Diese

Wiederversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen führte zum Wiedereintritt der Herzkontraktionen bei einem spontanen Sinusrhythmus und somit zum Ende der etwa einminütigen Ischämiephase welche für die Präparation des Herzens maximal benötigt wurde. Diese Kürze der Ischämiezeit bei gleichzeitiger Hypothermie ohne Herzaktivität minimierte die Möglichkeit einer eventuellen Schädigung des Herzens durch Hypoxie.

Anschließend wurden angrenzende Organe wie Lungen und Thymus entfernt, um einen nicht-rezirkulierenden Kreislauf innerhalb des intakten Koronarsystems des Herzens zu ermöglichen. Im letzten Schritt zur vollständigen Explantation des Herzens aus dem Meerschweinchensitus wurden die restlichen Gefäße wie Vv. cavae, Vv. pulmonales und die V. azygos von Fett- und Bindegewebsresten befreit und mit Fäden ligiert. Abschließend wurde in die A. pulmonalis ebenfalls eine Kanüle eingebracht und mit einer Ligatur fixiert, um ein Auffangen der Perfusionslösung nach Koronarpassage (koronares Effluat) zu gewährleisten. Ein spezielles Flussmessgerät (Transsonic T206, Ithaca, NY, USA), wurde vor der arteriellen Kanüle angebracht um eine kontinuierliche Messung des koronaren Flusses zu ermöglichen.

II.3.4 Versuchsaapparatur

Die Langendorff-Apparatur besteht zunächst aus einer großen Vorratsflasche, welche ungefähr 2,5 Liter des Krebs-Henseleit-Puffers enthält. Dieser wurde, bevor er dem Herzen zugeführt wurde, mit 94,6% Sauerstoff und 5,4% Kohlendioxid (Linde AG, Höllriegelskreuth, Deutschland) mittels einer Gasmischpumpe (K. Wösthoff OHG, Bochum, Deutschland) äquilibriert. Gleichzeitig erwärmte eine Thermostat-geregelte Wärmepumpenanlage (Colora Messtechnik GmbH, Lorch / Württemberg, Deutschland) das Perfusionsgemisch auf konstante 37°C. Eine Peristaltikpumpe (MS-1 Regio/8-160, Ismatex Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld, Deutschland) sorgte für einen konstanten Fluss. Um ischämische Ereignisse durch Luftembolien zu verhindern, gewährleistete eine kurz vor dem Eintritt in die Aorta platzierte Blasenfalle einen luftblasenfreien Flüssigkeitsstrom. Ausgeleitet aus dem System über einen Schlauch an der Pulmonaliskanüle konnte das Perfusionsgemisch (Effluat), ebenso wie das direkt an der epikardialen Oberfläche vom Versuchsherzen abtropfende Transsudat, aufgefangen und quantitativ bestimmt werden (Abbildung 2). In der aktuellen Arbeit fand aber das Transsudat keine gesonderte Beachtung. Die mit

fMLP oder PAF aktivierten Leukozyten wurden unterhalb der Blasenfalle direkt in die aortale Perfusionsleitung kontinuierlich über eine Minute mittels Perfusor (MS-1 Regio/8-160, Ismatex Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld, Deutschland) appliziert.

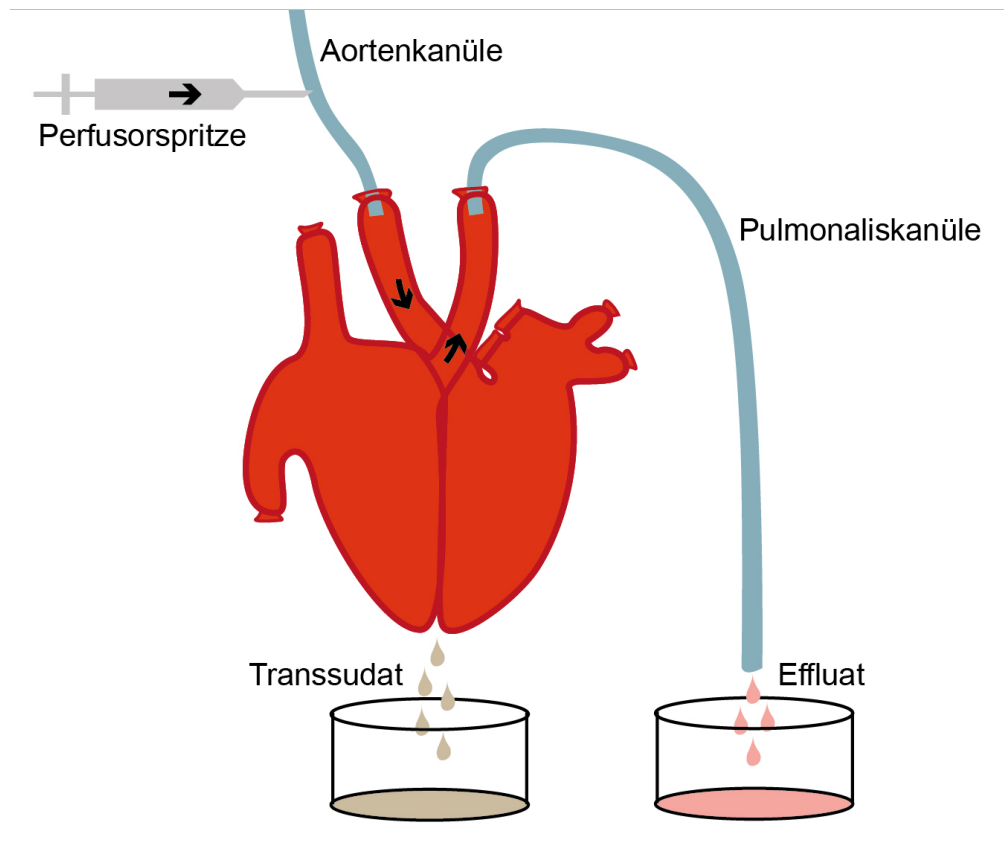


Abbildung 2: Schematischer Versuchsaufbau der retrograden Perfusion nach Langendorff

II.3.5 Protokoll der Versuchsreihe

Anschließend an die Entnahme und Präparation der Versuchsherzen folgte eine Äquilibrationsphase über 15 Minuten. Während dieser Zeit konnten sich die Herzen von der Präparationsphase erholen und es stellten sich die gleichen stabilen „steady state“ Voraussetzungen bei allen Präparaten ein (48). Der Aortenperfusionsdruck blieb während der Versuchsreihe immer konstant bei ca. 70 cmH₂O.

Nach der Äquilibrationsphase wurden über eine Perfusor-gesteuerte Infusionsspritze, eingestellt auf eine Förderrate von 1 ml/min, die PMN Suspensionen

intrakoronar appliziert. Zur Bestimmung des sogenannten „input“ an PMN wurde aus der Infusionsspritze bei jeder einzelnen Suspension zuerst ein „Testbolus“ von 1 ml innerhalb von einer Minute extrakardial aufgefangen. Unmittelbar darauf erfolgte die intrakoronare Applikation von 1 ml der jeweiligen Suspension. Je nach Versuchsgruppe enthielt die Suspension PMN ($1,5 \times 10^6/\text{ml}$) ohne Stimulation (Kontrolle), PMN vorbehandelt mit 10^{-7}M formyl-Met-Leu-Phe-OH (fMLP, Sigma Aldrich, München, Deutschland), oder PMN vorstimuliert mit 10^{-6}M platelet activating factor (PAF, Sigma Aldrich, München, Deutschland). Die Gabe dieser PMN Boli erfolgte standardisiert über genau eine Minute.

In den Versuchsreihen, in denen wir den Einfluss von Antithrombin III (AT III, Kybernin, ZLB Behring, Marburg, Germany) auf das Shedding der Glykokalyx untersuchten, erfolgte die Zugabe von AT III während der gesamten Äquilibrierungsphase mit einer Rate von 1U/mL des Perfusates. 1U AT III / mL entspricht dem Äquivalent von $\approx 100\%$ der Aktivität im menschlichen Vollblut (49). Diese Gabe von AT III hielt auch während der Infusion der PMN Suspensionen (1ml mit $1,5 \times 10^6$ PMN in 1 min) an. Als Probenmaterial diente das koronare Effluat. Es wurde über 2 min vor (Basal), während (5 min), und über 5 min nach der PMN-Applikation gesammelt, gewogen und in der Kühlkammer (-60°C) bis zur Analyse aufbewahrt. Die Effluatprobe, in der aus dem Koronarsystem austretende PMN zu erwarten waren (Zeitraum von 0 bis 5. min der Applikation) wurde in 3%iger Formalinlösung aufgefangen, fixiert, und mittels FACS analysiert (siehe II.4). Die Gesamtzahl der in dieser Probe enthaltenen PMN ergab den sogenannten „output“ an PMN.

Eine Übersicht des Versuchsablaufes bietet das Flußschema 1, eine Übersicht der Versuchsgruppen findet sich in Tabelle 1.

Flußschema 1. Versuchsablauf

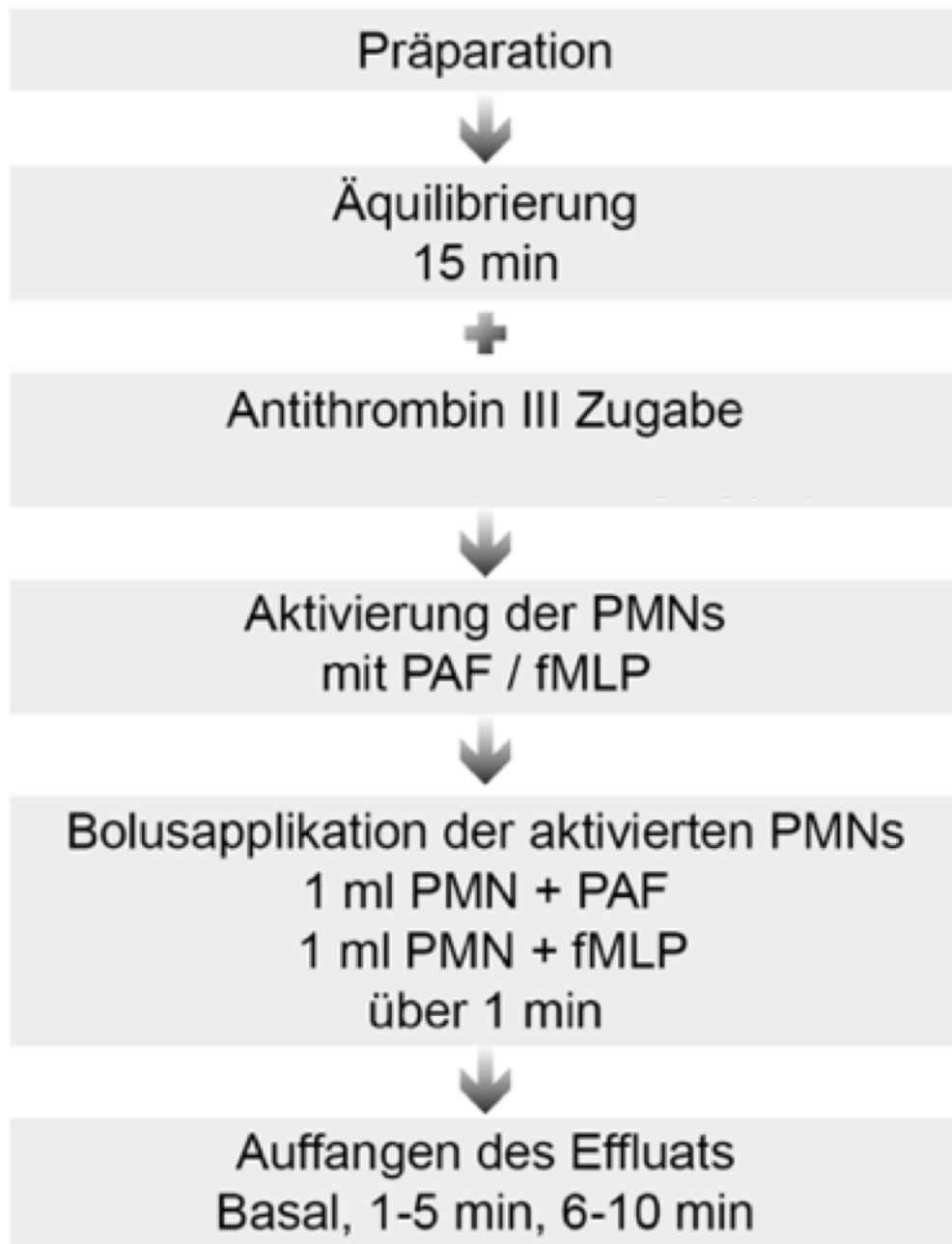


Tabelle 1. Übersicht der Versuchsgruppen

Gruppe	ØIntervention	Intervention	Intervention	Intervention	Intervention
Heparansulfat	Kontrolle	PAF	fMLP	PAF + AT III	fMLP+ AT III
Hyaluron	Kontrolle	PAF	fMLP	PAF + AT III	fMLP+ AT III

II.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS) ist ein seit Jahren etabliertes Verfahren zur quantitativen Messung von fluoreszenz-markierten Zellen und deren Eigenschaften (50). Die Analyse basiert auf den verschiedenen Streulichteigenschaften der Zellen und dem Prinzip der Antigen-Antikörper Reaktion, bei dem fluoreszenz-markierte Antikörper sich an die zu messenden Zellen heften und diese unter einem Laser oder einer anderen Lichtquelle aufleuchten lassen.

Für unsere Messungen wurde ein FACScan (Fluorescence Activated Cell Sorting) von Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland, verwendet. Die Zellpopulationen durchlaufen dieses Gerät, wobei sie mittels Streu- und Fluoreszenzlicht einzeln detektiert werden. Je nachdem, in welche Richtung das Licht gestreut wird, können Rückschlüsse auf verschiedene Strukturen der Zellen gezogen werden. So hängt das Vorwärtsstreulicht (FSC, Forward Scatter) im flachen Winkel vor allem von der Größe der Zelle ab, wohingegen das Seitwärtsstreulicht (SSC, Sideward Scatter) im rechten Winkel von dem Inhalt, beispielsweise der Granularität der Zelle beeinflusst wird. Bei der Fluoreszenzmessung werden mit dem Einsatz von fluoreszenz-markierten Antikörpern, welche gegen bestimmte Oberflächenantigene gerichtet sind, die Zellen beim Durchqueren des Laserstrahls zum Leuchten gebracht. Je nachdem, wie hoch der Aktivitätsgrad der Zelle ist, bindet mehr bzw. weniger Antikörper an die spezifische Zelle (48).

II.4.1 Antikörpermarkierung der PMN

Zur Färbung von Oberflächenmarkern (z.B. CD-Antigenen) wurden fluorochrom-konjugierte Antikörper verwendet. Im Falle der PMN wurden zu 250 µl der mit Formalin fixierten Effluatprobe 5 µl Lösung eines monoklonalen, mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-markierten Maus-Anti-Human CD11b Antikörper (AbD Serotec, Oxford, UK) gegeben. Nach einer Inkubationszeit von ca. 20 Minuten wurden die PMN-haltigen Proben mit der FACS-Lysing Solution (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) ergänzt. Des weiteren wurden die Proben nochmals für 10 Minuten beiseite gestellt, damit restliche, die Messung störende Erythrozyten hämolysieren konnten. Nach einer zweimaligen Waschung mit PBS-Lösung wurden die Proben im letzten Schritt der Antikörperanfärbung bei 1500 U/min für je 3 min zentrifugiert. Die Proben, die zur Bestimmung des „PMN-input“ von den Prezidorspritzen vor den Herzen entnommen wurden, wurden in identischer Weise behandelt und zur Zählung vorbereitet.

Diesem Procedere schloss sich eine Aufbewahrungsphase der Proben in der Kühlkammer (4°C) an, bevor sie innerhalb eines Zeitraumes von maximal 12 Stunden zur Messung herangezogen wurden.

II.4.2 FACS Messungen

Um die Streulichtmessungen zu veranschaulichen, stellt eine spezielle Computersoftware (CellQuest Software; Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) diese graphisch als Zweiparameterdarstellung, sog. Dot-Plots, und in Histogrammen dar. Dabei wird beim Dot-Plot das Vorwärtsstreulicht (FSC) auf der x-Achse und das Seitwärtsstreulicht (SSC) auf der y-Achse aufgetragen. Somit beschreiben Anhäufungen von Punkten Zellpopulationen mit ähnlichen Streulichteigenschaften.

Im Histogramm gibt die horizontale x-Achse die Fluoreszenzintensität FL1 wieder, wohingegen die Zellzahl auf der vertikalen y-Achse dargestellt wird. Dieses graphische Mittel ermöglicht eine quantitative Bestimmung der Antikörperbindung und damit der Antigenexpression.

Vor der eigentlichen Messung im FACS-Gerät wurden die einzelnen Probenröhrchen mit je 850 µl Cellwash (Becton Dickinson) versetzt. Anschließend wurden 100 µl hiervon abpipettiert und mit 50 µl CALTAG counting beads (Invitrogen, Karlsruhe,

Deutschland) gemischt. Anschließend quantifizierte das Durchflusszytometer sowohl die Zellpopulationen als auch die Menge an Counting Beads (Jacob et al., 2009). Da die Anzahl der Counting Beads immer konstant auf 10.000 Ereignisse eingestellt war, konnten die Proben untereinander verglichen und valide Aussagen über die Menge an Zellen (Leukozyten, PMN) in den Proben getroffen werden.

Die Berechnung der Adhäsion der PMN als Prozentanteil der applizierten Zellzahl erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Adhäsion [\%]} = [(\text{PMN input} - \text{PMN output}) / \text{PMN input}] \times 100$$

II.5 Messung von Glykokalyxbestandteilen

Um eine Aussage über das Shedding der Glykokalyx treffen zu können und damit einen Hinweis für das Ausmaß der Schädigung der Glykokalyx zu erbringen, wurde das koronarvenöse Effluat auf zwei Hauptbestandteile (Hyaluronan und Heparansulfat) untersucht (26).

Beim Hyaluronan, welches bei fast allen Entzündungen in erhöhter Konzentration zu finden ist, handelt es sich um ein hochmolekulares Polysaccharid, das durch den CD 44-Rezeptor an der Endothelzellmembran gehalten wird (51). Um die Menge an Hyaluronan zu ermitteln, wurde ein enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA, Echelon Biosciences, Salt Lake City, UT, USA) durchgeführt.

Heparansulfat gehört der Gruppe der Glykosaminoglykane an, ist ein Ekto-Bestandteil der Plasmamembran und verfügt über nicht-kovalente Bindungen mit Hyaluronan (52), bzw. bindet kovalent an die Grundgerüstproteoglykane.

Um die Heparansulfat-Konzentration zu messen, wurde ein ELISA (Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan) durchgeführt, welcher auf zwei Antikörpern basiert. Diese Antikörper sind gegen Heparansulfat-spezifische Epitope gerichtet (26).

Alle ELISA-Messungen wurden nach den Spezifikationen der Hersteller durchgeführt (25-27).

II.6 Immunhistochemie und Elektronenmikroskopie

Für die lichtmikroskopische Immunhistochemie erfolgte eine Perfusions-Fixierung der Meerschweinchenherzen mit 4%-igem Formalin und eine darauffolgende Aufbewahrung in einer 1%-igen Formaldehyd-Lösung. Zur weiteren Präparation nach Paraffinierung wurden aus den Herzen 5 µm dünne Schnitte angefertigt und anschließend mit Antikörpern gegen humane Elastase markiert (6).

Die Elektronenmikroskopie zur Identifikation der Glykokalyx wurde nach einer modifizierten Methode von Vogel und Mitarbeitern durchgeführt (53). Das Prinzip dieser Methode basiert auf Perfusionsfixierung der Herzen mit einer Lösung, die das trivalente Kation Lanthan enthält. La^{3+} bindet an negativ geladene Glykoproteine und stabilisiert somit die Glykokalyx. Die Fixation erfolgte mit einer Lanthan(III)nitrat-Glutaraldehyd-Lösung (10).

Die oben genannten Abläufe erfolgten mit der Unterstützung von Prof. Dr. Ulrich Welsch vom Institut für Anatomie der Universität München.

II.7 Statistisches Programm und Auswertung

Die statistischen Analysen erfolgten mittels der Software SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc., San Jose, California, USA).

Die Daten der Durchflusszytometrie werden als Medianwerte, die Werte der anderen Ergebnisse als Mittelwerte (MW) aufgeführt. Die zugehörigen Konfidenzintervalle (95% bzw. 5%) und Standardfehler (SD bzw. SEM) werden mit angegeben. Aufgrund der geringen Fallzahl ($n = 8$ pro Gruppe) wurde von einer nicht normal verteilten Stichprobe ausgegangen.

Beim statistischen Vergleich der Gruppen untereinander wurde für abhängige Werte der Wilcoxon-Test, für unabhängige Werte der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Sollten mehr als zwei Gruppen oder mehrere Parameter verschiedener Gruppen verglichen werden, wurde die Varianzanalyse (ANOVA) herangezogen.

Zeigten sich signifikante Effekte, wurden post hoc Tests mittels Student-Newman-Keuls-Methode unter Gebrauch der Bonferroni Korrektur durchgeführt.

Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden als signifikant angesehen für $p < 0,05$.

III. Ergebnisse

III.1 Ermittlung der Glykokalyxbestandteile

III.1.1 Heparansulfat

Heparansulfat wurde im Koronareffluat aller perfundierten Herzen nachgewiesen (Abbildung 3). Der Begriff „Intervention“ beschreibt jeweils die Inkubation der Leukozyten mit PAF (Gruppe Heparansulfat PAF) oder fMLP (Gruppe Heparansulfat fMLP). In einer zweiten Versuchsserie erfolgte die Gabe von Antithrombin III während der Infusion von mit PAF- oder fMLP-inkubierten PMN (Intervention + AT III). Auf der x-Achse werden die jeweiligen Gruppen im zeitlichen Perfusionsverlauf (weiß: basal, grau: 1-5 min und schwarz: 6-10 min) dargestellt. Auf der y-Achse wird die Freisetzung der Glykokalyxbestandteile in $\mu\text{g/ml}$ angegeben. Im Folgenden werden Shedding-Werte stets in $\mu\text{g/mL}$ angegeben.

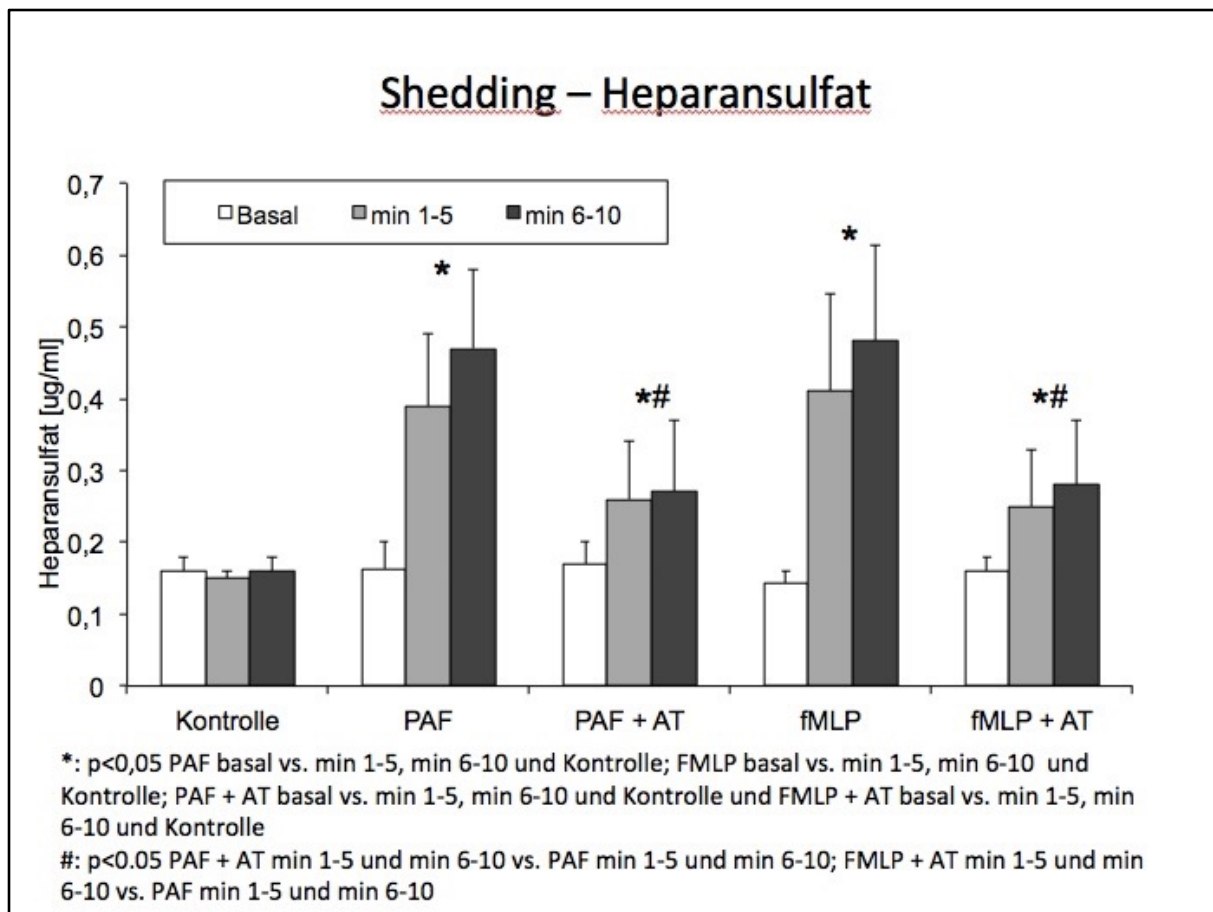


Abbildung 3: Freisetzung des Glykokalyxbestandteils Heparansulfat im koronarvenösen Effluat vor (Basal) und nach (Zeiten 1-5 und 6-10 min) Infusion von PMN (1,5 Millionen) bzw. 1,5 Millionen PMN nach deren Aktivierung mit PAF oder fMLP. + AT bezeichnet PMN-Infusionen in Herzen, die mit Antithrombin III in der Äquilibrationsphase vorperfundiert wurden. N = 8 pro Gruppe

In der Kontrollgruppe ohne Intervention (Gruppe Heparansulfat Kontrolle) konnten während der 10-minütigen Perfusionsphase nach Gabe von PMN keine signifikanten Unterschiede zu der basalen Freisetzungsrates gezeigt werden (Basal: $0,16 \pm 0,02$, 1-5 min: $0,15 \pm 0,01$; 6-10 min: $0,16 \pm 0,02$).

In den Interventionsgruppen zeigte sich nach Aktivierung der Leukozyten mit PAF (Gruppe Heparansulfat PAF) ein kontinuierlich signifikanter Anstieg der Freisetzung von Heparansulfat während Minuten 1-5 sowie Minuten 6-10, jeweils verglichen mit dem Basalwert (Basal: $0,16 \pm 0,04$; 1-5 min: $0,39 \pm 0,10$; 6-10 min: $0,47 \pm 0,11$). Verglichen mit der Kontrollgruppe führte die Aktivierung der Leukozyten mit PAF zu einer signifikanten Zunahme des Heparansulfat-Sheddings zu beiden gemessenen Zeitpunkten. Die zusätzliche Gabe von Antithrombin (Gruppe Heparansulfat PAF+AT)

zeigte im Vergleich zur isolierten Aktivierung mit PAF einen signifikant verringerten Anstieg der HS-Freisetzung. Bezogen auf den Basalwert und die Kontrollgruppe zeigte sich nach AT-Gabe allerdings immer noch ein signifikanter Anstieg der HS-Freisetzung im zeitlichen Verlauf (Basal: $0,17 \pm 0,03$; 1-5 min: $0,26 \pm 0,08$; 6-10 min: $0,27 \pm 0,1$).

In den Interventionsgruppen zeigte sich nach Aktivierung der Leukozyten mit fMLP (Gruppe Heparansulfat fMLP) ein kontinuierlich signifikanter Anstieg der Freisetzung von Heparansulfat während Minuten 1-5 sowie Minuten 6-10, jeweils verglichen mit dem Basalwert (Basal: $0,14 \pm 0,02$; min 1-5: $0,41 \pm 0,14$; min 6-10: $0,48 \pm 0,13$). Im Bezug auf die Kontrollgruppe führte die Aktivierung der Leukozyten mit fMLP zu einer signifikanten Zunahme des Heparansulfat-Sheddings zu beiden gemessenen Zeitpunkten. Durch die Zugabe von Antithrombin (Gruppe Heparansulfat fMLP+AT) war der Anstieg des Heparansulfats signifikant geringer (Basal: $0,16 \pm 0,02$; min 1-5: $0,25 \pm 0,08$; min 6-10: $0,28 \pm 0,09$). Bezogen auf den Basalwert und die Kontrollgruppe zeigte sich nach AT-Gabe nach wie vor ein signifikanter Anstieg der HS-Freisetzung im zeitlichen Verlauf.

Abbildung 3 zeigt, dass die Applikation von PAF (Gruppe Heparansulfat PAF) oder fMLP (Gruppe Heparansulfat fMLP) zu einem deutlichen Anstieg der Heparansulfatfreisetzung führte. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Basal PAF: $0,16 \pm 0,04$ und Basal fMLP: $0,14 \pm 0,02$; min 1-5 PAF: $0,39 \pm 0,1$ und min 1-5 fMLP: $0,41 \pm 0,14$; min 6-10 PAF: $0,47 \pm 0,11$ und min 6-10 fMLP: $0,48 \pm 0,13$, jeweils $p > 0,05$).

Die Gabe von Antithrombin während der Infusion von mit PAF oder fMLP inkubierten PMN verringerte die Freisetzung von Heparansulfat deutlich, ohne dass ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen im zeitlichen Verlauf zu erkennen war (Basal PAF+AT: $0,17 \pm 0,03$ und Basal fMLP+AT: $0,16 \pm 0,02$; min 1-5 PAF+AT: $0,26 \pm 0,08$ und min 1-5 fMLP+AT: $0,25 \pm 0,08$, min 6-10 PAF+AT: $0,27 \pm 0,1$ und min 6-10 fMLP+AT: $0,28 \pm 0,09$, jeweils $p > 0,05$).

III.1.2 Hyaluronan

Hyaluronan wurde im Koronareffluat aller perfundierten Herzen nachgewiesen (Abbildung 4). Die Intervention beschreibt die Inkubation der Leukozyten mit PAF-

(Gruppe Hyaluronan PAF) oder fMLP (Gruppe Hyaluronan fMLP). In einer zweiten Versuchsserie erfolgte die Gabe von Antithrombin III vor und während der Infusion von mit PAF oder fMLP inkubierten PMN. Auf der x-Achse werden die jeweiligen Gruppen im zeitlichen Perfusionsverlauf (weiß: basal, grau: 1-5 min und schwarz 6-10 min) dargestellt. Auf der y-Achse wird die Freisetzung der Glykokalyxbestandteile in $\mu\text{g/ml}$ angegeben. Alle Werte werden im Folgenden in $\mu\text{g/ml}$ angegeben.

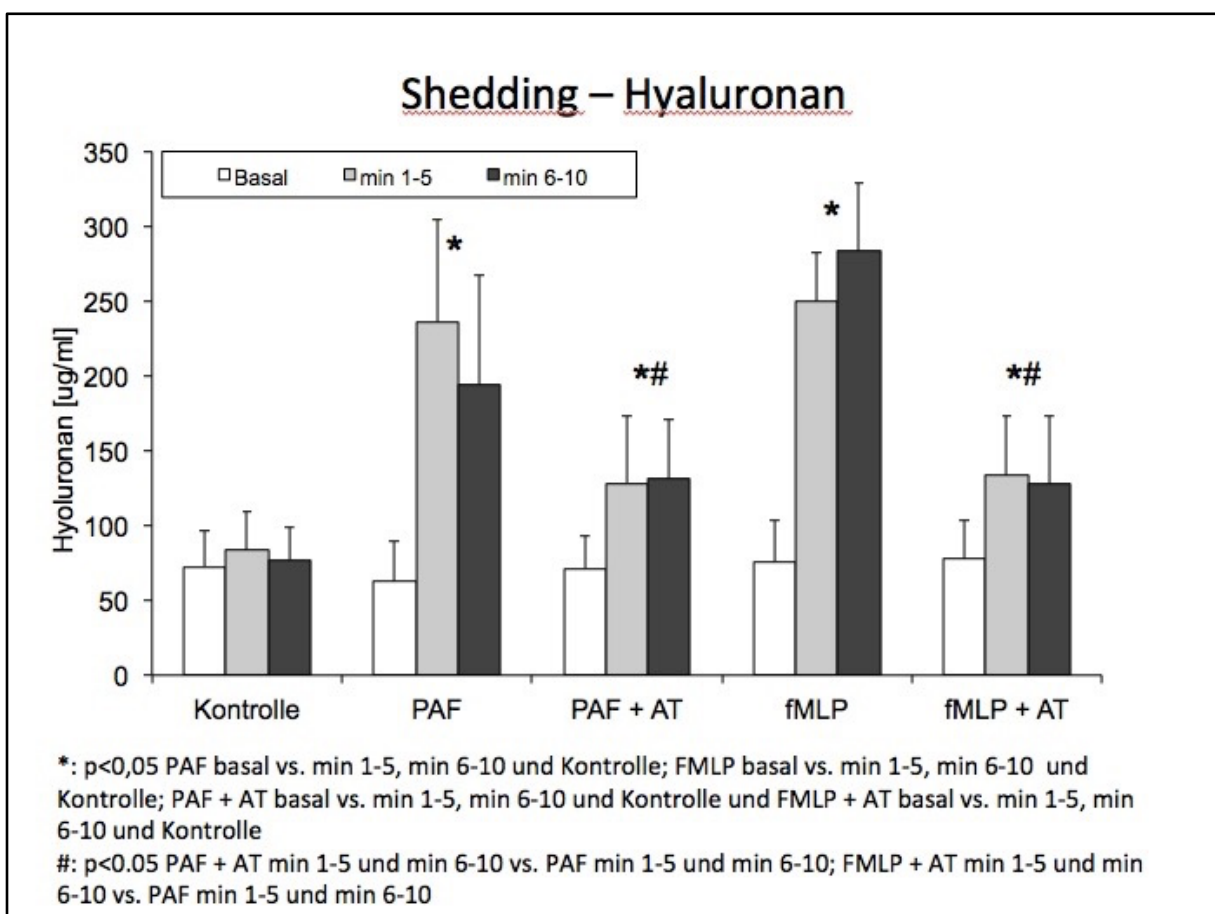


Abbildung 4: Freisetzung des Glykokalyxbestandteils Hyaluronan im koronarvenösen Effluat vor (Basal) und nach (Zeiten 1-5 und 6-10 min) Infusion von PMN (1,5 Millionen) bzw. 1,5 Millionen PMN nach deren Aktivierung mit PAF oder fMLP. + AT bezeichnet PMN-Infusionen in Herzen, die mit Antithrombin III in der Äquilibrationphase vorperfundiert wurden. N = 8 pro Gruppe

In der Kontrollgruppe ohne Intervention (Gruppe Hyaluronan Kontrolle) konnten während der 10-minütigen Perfusionsphase nach PMN-Applikation keine signifikanten

Unterschiede festgestellt werden (Basal: $72,7 \pm 24$; 1-5 min: $83,4 \pm 26$; 6-10 min: $76,5 \pm 22$).

In der Interventionsgruppe nach Zugabe von mit PAF aktivierten PMN (Gruppe Hyaluronan PAF) kam es im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einem signifikanten Anstieg der Hyaluronanfreisetzung während Minuten 1-5 und Minuten 6-10. Auch bezogen auf den Basalwert zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Hyaluronanfreisetzung, die nach Minute 1-5 nicht weiter zunahm. In Abbildung 4 deutet sich sogar ein geringes Abfallen der Hyaluronanfreisetzung an in Minuten 6-10. Verglichen mit dem Basalwert war der Anstieg aber weiterhin signifikant (Basal: $62,4 \pm 27$; min. 1-5: $236,3 \pm 73,7$; min. 6-10: $193,7 \pm 67,8$).

In der Interventionsgruppe nach Zugabe von PAF und Antithrombin III (Gruppe Hyaluronan PAF+AT) war im zeitlichen Verlauf von 10 Minuten der Anstieg des Hyaluronan im Vergleich zum Basalwert signifikant geringer als ohne Antithrombin (Basal: $71,4 \pm 22$; min. 1-5: $128,4 \pm 44,6$; min. 6-10: $131,4 \pm 39,9$). Dennoch war der Anstieg der Hyaluronanfreisetzung im zeitlichen Verlauf im Vergleich zur Kontrollgruppe und im Vergleich zum Basalwert statistisch signifikant.

In der Interventionsgruppe nach Zugabe von mit fMLP aktivierten PMN (Gruppe Hyaluronan fMLP) konnte während der 10-minütigen Perfusionsphase eine kontinuierlich signifikante Zunahme der Hyaluronanfreisetzung gemessen werden (Basal: $76,0 \pm 27,5$; min. 1-5: $249,8 \pm 32,3$; min. 6-10: $283,5 \pm 45,2$). Die Hyaluronanfreisetzung war auch im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht.

Nach Zugabe von Antithrombin III (Gruppe Hyaluronan fMLP+AT) zeigte sich weiterhin ein signifikanter Anstieg der Hyaluronanfreisetzung gegenüber dem Basalwert und im Vergleich zur Kontrollgruppe (Basal: $77,4 \pm 25,9$; min. 1-5: $133,4 \pm 40,1$, min. 6-10: $127,6 \pm 45,4$). Die Zugabe von AT III führte allerdings zu einer signifikanten Verringerung der Hyaluronanfreisetzung im Vergleich zur Aktivierung mit fMLP alleine.

Abbildung 4 zeigt, dass die Applikation von mit PAF (Gruppe Hyaluronan PAF) oder fMLP (Gruppe Hyaluronan fMLP) inkubierten PMN insgesamt zu einem signifikanten Anstieg der Hyaluronanfreisetzung führt. Es erwies sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Basal PAF: $62,4 \pm 27,0$ und Basal fMLP: $76,0 \pm 27,5$;

1-5 min PAF: $193,7 \pm 67,8$ und 1-5 min fMLP: $249,8 \pm 32,3$, min 6-10 PAF: $236,3 \pm 73,7$ und min 6-10 fMLP: $283,5 \pm 45,2$, jeweils $p > 0,05$).

Die Gabe von Antithrombin III während der Infusion von mit PAF oder fMLP inkubierten PMN verringerte die Freisetzung von Hyaluronan signifikant ohne einen Unterschied zwischen den beiden Gruppen im zeitlichen Verlauf hervor zu rufen (Basal PAF+AT: $71,4 \pm 22,0$ und Basal fMLP+AT: $77,4 \pm 25,9$, min 1-5 PAF+AT: $128,4 \pm 44,6$ und min 1-5 fMLP+AT: $133,4 \pm 40,1$, min 6-10 PAF+AT: $131,4 \pm 39,9$ und min 6-10 fMLP+AT: $127,6 \pm 45,4$, jeweils $p > 0,05$).

III.2 Intrakoronare Leukozytenadhäsion

Während des Versuches blieb in allen Gruppen ein gewisser Anteil der infundierten Leukozyten an den Gefäßwänden des Koronarsystems haften (Abbildung 5).

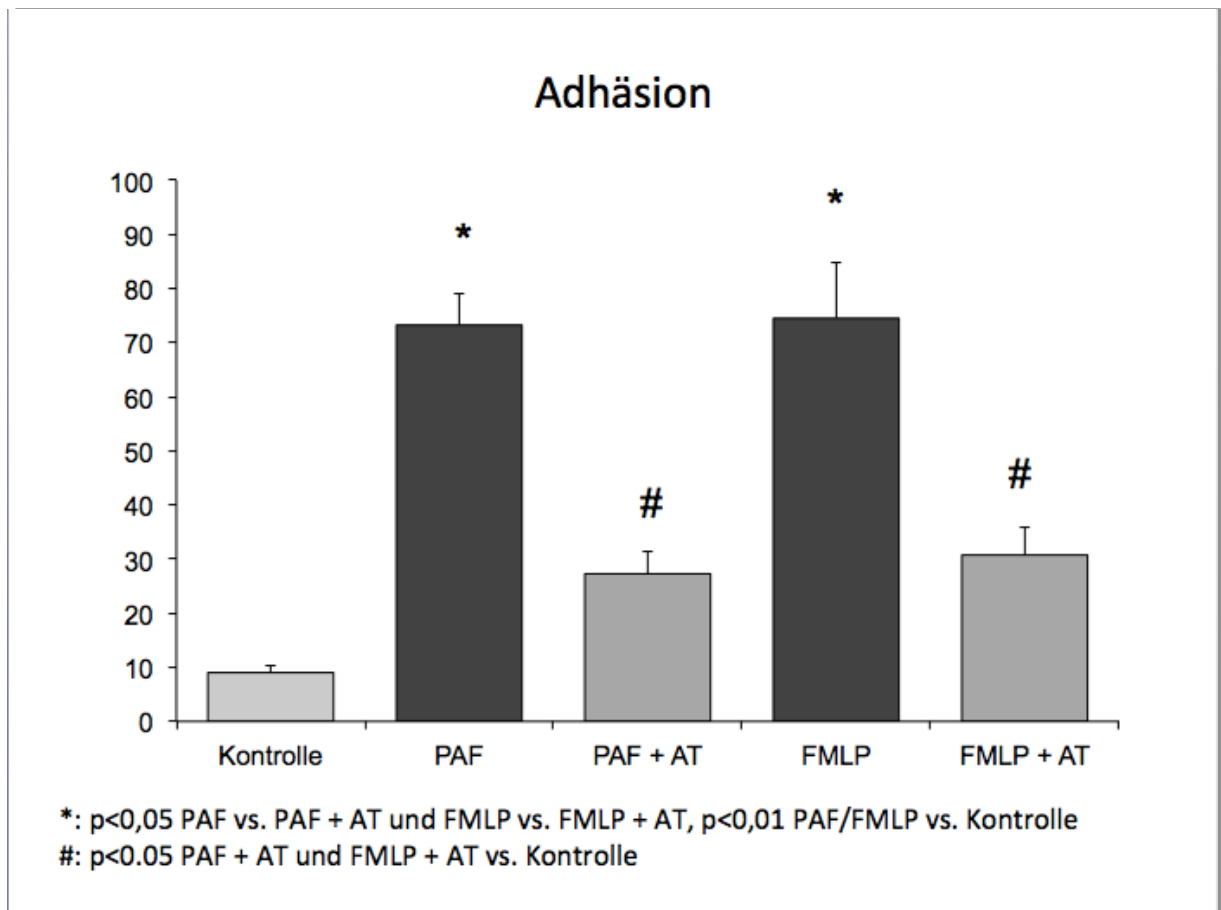


Abbildung 5: PMN-Adhäsionswerte in % der applizierten Zellzahl

Nach Applikation der PMN ohne vorausgegangene Intervention (Gruppe Kontrolle) zeigte sich eine Adhäsionsrate von $9,0\% \pm 1,4\%$. Nach Gabe von mit PAF (Gruppe PAF) bzw. von mit fMLP (Gruppe fMLP) aktivierten PMN stiegen die Werte für die PMN-Adhäsion hochsignifikant auf $73,2\% \pm 5,7\%$, bzw. $74,5\% \pm 10,3\%$ an.

Nach zusätzlicher Applikation von Antithrombin III kam es in beiden Interventionsgruppen zu einem signifikanten Abfall der Leukozytenadhäsion (Gruppe PAF+AT: $27,3\% \pm 4,0\%$ und fMLP+AT: $30,7\% \pm 5,3\%$). Bezogen auf die Kontrollgruppe

allerdings war die Leukozytenadhäsion in beiden Interventionsgruppen nach Gabe von AT (PAF+AT und fMLP+AT) weiter signifikant erhöht.

III.3 Elektronenmikroskopie und Immunhistochemie

Elektronenmikroskopische Aufnahmen veranschaulichen die Dicke und Beschaffenheit der endothelialen Glykokalyx nach Beendigung des Experiments. Während sich in der Kontrollgruppe eine weitestgehend intakte Glykokalyx über den gesamten Gefäßumfang darstellen ließ, zeigte sich in den Gruppen nach Infusion von aktivierten Leukozyten nur eine rudimentäre Reststruktur auf der vaskulären Oberfläche sowie ausgeprägte interstitielle Ödeme. Die elektronenmikroskopischen Darstellungen nach Behandlung mit Antithrombin III weisen eine zwar in ihrer Dicke deutlich dezimierte Glykokalyx auf, die Struktur ist an sich aber erhalten.

Diese qualitativen Ergebnisse decken sich mit den Erwartungen, die sich anhand der oben wiedergegebenen quantitativen Messdaten zum Shedding von Glykokalyxbestandteilen ergeben.

PMN humanen Ursprungs konnten in Dünnschnitten von Ventrikelmyokard der perfundierten Meerschweinchenherzen lichtmikroskopisch einwandfrei identifiziert werden. In der immunhistochemischen Darstellung mit einem Antikörper gegen das humane Elastase-Enzym zeigte sich anhand der braunen Färbung wie sich Elastase von einem mit fMLP stimulierten polymorphonukleären neutrophilen Granulozyten, der an die Wand einer kleinen Vene haftet, entlang der oberflächlichen endothelialen Glykokalyx ausbreitet.

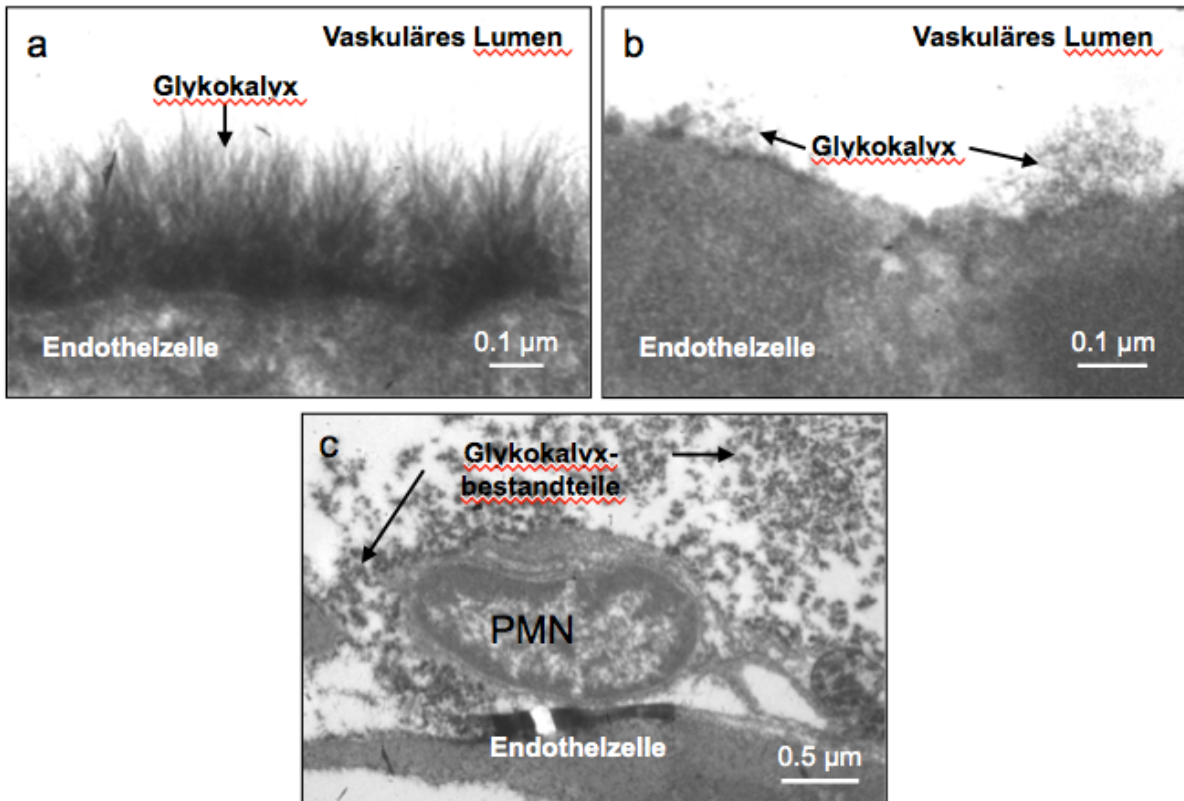


Abbildung 6. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Meerschweinchenherzen. Abbildung a zeigt eine intakte Glykokalyx nach Perfusion. In Abbildung b ist nach Aktivierung der Leukozyten mit fMLP nur noch eine rudimentäre Glykokalyx zu sehen. Abbildung c zeigt einen adhärennten polymorphonuklearen Granulozyten (PMN) umgeben von abgsheddeten Glykokalvxbestandteilen .

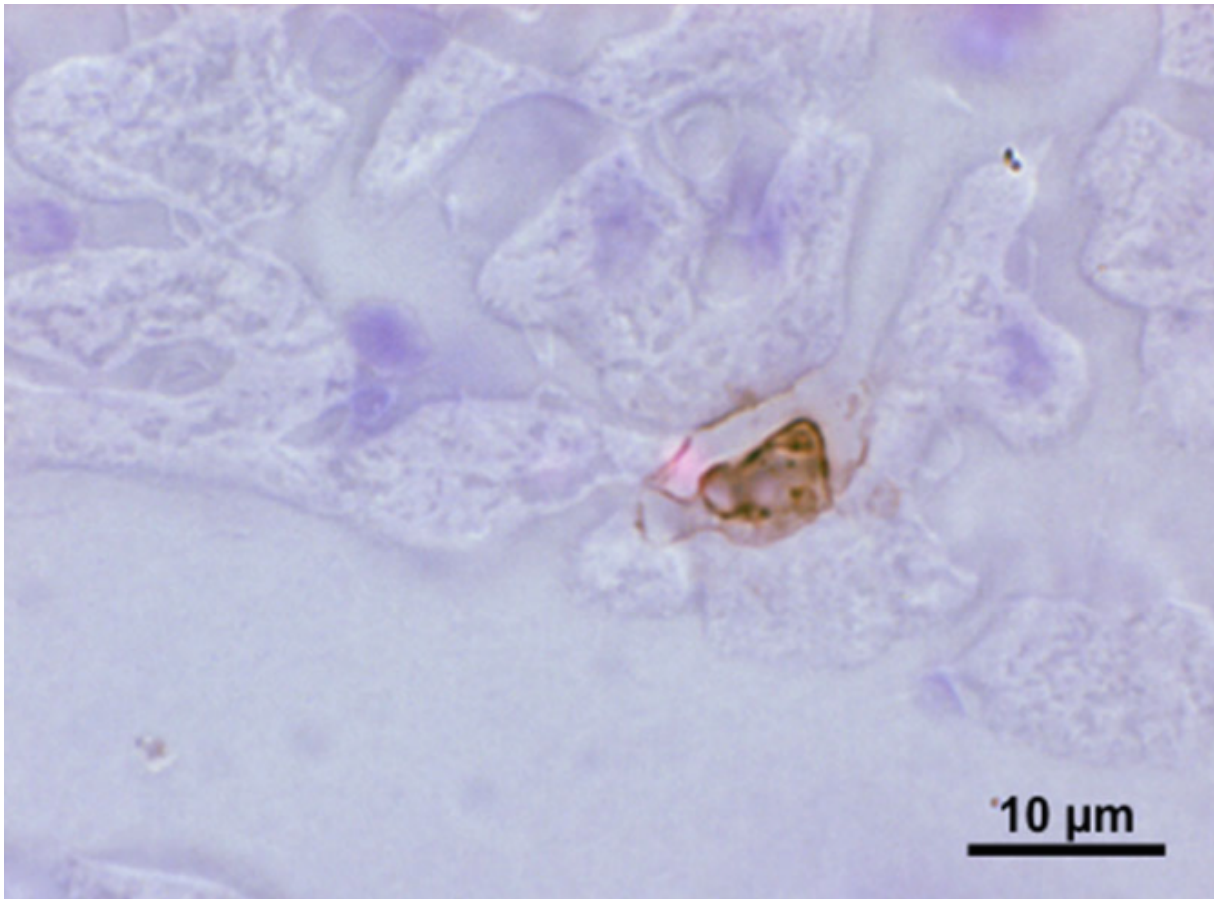


Abbildung 7: Lichtmikroskopische Darstellung eines mit fMLP stimulierten polymorphonukleären neutrophilen Granulozyten humanen Ursprungs im Ventrikelmuskard eines Meerschweinchens. Die Anfärbung erfolgte mit einem Antikörper gegen humane Elastase (52).

IV. Diskussion

Unsere Studie zeigt, dass in-vitro aktivierte Leukozyten die Integrität der endothelialen Glykokalyx deutlich zu mindern vermögen. Obwohl das hier bestimmte Shedding im Vergleich zu bisherigen pathologischen Situationen wie Ischämie/Reperfusion oder Inflammation quantitativ geringer zu sein scheint, war die Leukozyten-Adhäsionsrate am Endothel deutlich höher. Eine mögliche Erklärung wäre, dass es nicht zu einem generellen Shedding kommt, sondern zu einem regionalen, und zwar dort, wo die aktivierten Leukozyten die Glykokalyx penetrieren. Die Applikation von Antithrombin III, einem bekannten Glykokalyx-protectiven Serinproteaseinhibitor, konkretisierte diesen Effekt, allerdings nur zu einem gewissen Grad.

IV.1 Diskussion der Methodik

IV.1.1 Verwendung von humanem Blut

Bei dem in unserer Studie verwendeten Blut handelt es sich ausschließlich um humanes Blut. Gewonnen wurde es von gesunden Erwachsenen, die diese Blutentnahme freiwillig leisteten.

Unsere Arbeitsgruppe bevorzugte schon in vorherigen Experimenten humanes Blut (46), da es für unsere Studienzwecke aus mehreren Gründen von entscheidendem Vorteil gegenüber Meerschweinchenblut ist. Zum einen sind die zur Gewinnung von PMN aus Spenderblut wichtigen monoklonalen Antikörper nur für menschliches Blut verfügbar. Zum anderen wird dadurch die Anzahl der zu den Versuchen benötigten Tiere gering gehalten (keine Blutspendertiere) und Meerschweinchen nur zur Herzentnahme gebraucht.

IV.1.2 PMN – Präparation

Für den Versuchserfolg war es wichtig, dass die Struktur und Funktion der PMN durch die Präparation so wenig wie möglich beeinträchtigt und die physiologischen Bedingungen erhalten wurden. Um die Präparation der PMN unter optimalen

Bedingungen durchführen zu können, war es entscheidend, dass das entnommene Blut ohne Verzögerung aufbereitet (54), die isolierten Zellen sofort in den Versuch genommen und anschließend sofort mit den Messungen begonnen wurde. Deshalb legten wir Wert auf eine kurze Präparationsdauer der PMN sowie der Herzen und es kam unmittelbar nach Auffangen der Koronareffluatproben zur Zellfixierung und Zentrifugation (55). Weitere Merkmale des Vorgehens waren die Einhaltung einer konstanten Temperatur (56), eine kurze Lagerung der Proben und eine sorgfältige Auswahl des Antikoagulans. Wir entschieden uns hier für Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), welches das für die Gerinnung wichtige Calciumkation irreversibel komplexiert und in der Labormedizin am häufigsten Gebrauch findet. Für die Isolation der PMN wurde ein paralleles Zelltrennungsverfahren, die magnetische Zellseparation (MACS) verwendet. Das seit Anfang des Jahres 1990 existierende Verfahren ermöglichte es, die PMN durch Konjugate aus monoklonalen Antikörpern und kleinen superparamagnetischen Partikeln, den sogenannten Microbeads, zu separieren. Die Microbeads setzen sich aus Eisenoxid und Polysacchariden zusammen und verfügen über gebundene Antikörper. Im Fall der humanen PMN sind dies Antikörper gegen das Merkmal CD15. Vorteil dieser Vorgehensweise war die rasche, schonende Gewinnung einer sehr reinen Zellfraktion. Auch konnte bei dieser Methode eine vorzeitige Aktivierung der PMN wesentlich verringert werden (46), was gerade für die Kontrollgruppen wichtig war.

IV.1.3 Modell des isoliert perfundierten Herzens

Das Modell des isoliert perfundierten Herzens nach Langendorff stellt eine gute Möglichkeit zur Untersuchung der endothelialen Glykokalyx und des Koronargefäßsystems dar. Die Vorteile beim isoliert perfundierten Herzen, im Gegensatz zu in vivo perfundierten Herzmodellen, sind die Ausschaltung vieler komplexer Regelkreise und Mechanismen, welche normalerweise im Gesamtorganismus herrschen. Die koronaren Gefäße können in ihrer physiologischen Umgebung gezielt hinsichtlich vieler verschiedener Fragestellungen untersucht werden, außerdem lassen sich Aussagen über die Integrität und mögliche Protektion der endothelialen Glykokalyx treffen. Nachteilig beim Langendorff – Modell ist, dass das isolierte Meerschweinchenherz nur mit einer artifiziellen Perfusionslösung

perfundiert wird ohne diverse Blutbestandteile (z.B. Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten, Gerinnungsfaktoren, Plasmakolloide, etc.). Dafür können Bestandteile nach Wunsch dem Perfusat hinzugefügt werden. Obwohl es sich um ein aktiv schlagendes Herz mit einem intakten Gefäßsystem handelt, bewegt sich das isoliert perfundierte Herz irgendwo zwischen in vivo und in vitro als ex vivo Modell. Die daraus resultierenden Ergebnisse sind daher nicht unbedingt direkt auf den Gesamtorganismus anwendbar (57).

IV.1.4 Herzpräparation

Zwischen Tötung der Tiere und der Reperfusion des Meerschweinchenherzens ist für einen kurzen Moment (ca. 1min) die Sauerstoffversorgung des Herzens unterbrochen. Um einen möglichen Ischämieschaden so gering wie möglich zu halten, wird das Myokard direkt nach Eröffnung des Brustkorbes mit einer kalten, isotonen Natriumchloridlösung gekühlt. Diese Kälte-Kardioplegie sorgt für einen temporären Stillstand des Herzens. Damit sich das Herz nach der erneuten Perfusion „einschlagen“ konnte, wurde vor Beginn der Versuche dem Myokard eine etwa 15 minütige Erholungsphase gegönnt. Diese ermöglicht dem Herzen erwiesenermaßen, sich den neuen Gegebenheiten anzupassen und ein „steady-state“ zu erlangen. Erst nach Ablauf dieser Äquilibrationsphase wurde mit den Versuchsphasen gestartet.

IV.1.5 Protokoll der Versuchsreihe

Nach der angesprochenen 15 minütigen Äquilibrationsphase und dem Erreichen eines funktionellen „steady state“ der Versuchsherzen wurde unmittelbar mit den Versuchsreihen begonnen. Unsere Arbeitsgruppe hat bereits in der Vergangenheit gezeigt, dass damit praktisch gleiche Bedingungen für alle Herzen herrschen (58). Eine geringe Ausdehnung der Arbeitsphase um weitere 20-25 Minuten spielt für die Stabilität des Präparates keine Rolle (57).

Unsere Arbeitsgruppe hat in früheren Versuchen gezeigt, dass eine Protektion der endothelialen Glykokalyx mit AT III zu einer reduzierten Leukozytenadhäsion nach

Ischämie/Reperfusion führt. Ebenso konnte in Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe eine protektive Wirkung von Hydrocortison auf die postischämische Glykolalyx nachgewiesen werden (25). In dieser Studie wollten wir jetzt untersuchen, ob eine Aktivierung der Leukozyten per se einen Effekt auf die Integrität der endothelialen Glykokalyx hat und ob eine pharmakologische Protektion dort ebenfalls belegt werden kann.

IV.1.6 FACS-Messungen

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein zytophotometrisches Analyseverfahren zur quantitativen Analyse von Zelleigenschaften. Je nach Größe, Granularität oder Färbung werden verschiedene Effekte erzeugt, wonach die Zellen sortiert und gezählt werden können (65). Das Vorwärtsstreulicht (FSC) hängt vom Volumen der Zelle ab wohingegen das Seitwärtsstreulicht (SSC) von der Granularität der Zelle bestimmt wird. Das Fluorescence activated cell sorting (FACS) wird als serielles Zelltrennverfahren bezeichnet und beinhaltet neben Fluoreszenzdetektoren auch einen Mechanismus, welcher den ankommenden Flüssigkeitsstrom in einzelne Tropfen unterteilt, so dass die Messung sehr detailliert ablaufen kann (66). Das Prinzip beim FACS ist vergleichbar mit dem eines Fluoreszenzmikroskops. Jedoch ist es beim FACS möglich, an die 10.000 Zellen in der Sekunde zu analysieren. Ein weiterer Vorteil dieses Messinstruments besteht darin, dass nach den unterschiedlichsten Parametern (Form, Struktur und Färbung) sortiert werden kann. Als Nachteil muss sicher der hohe technische, finanzielle und zeitliche Aufwand gesehen werden, unter welchem die Messungen stattfinden, im Gegensatz zu anderen Zelltrennungsverfahren, wie beispielsweise der magnetischen Separation. Weil das hohe Volumen der durchgeschleusten Partikel bei der FACS-Analyse die Gefahr einer fehlenden Präzision mit sich ziehen kann, wurden in unserer Studie nur bis zu 5.000 Ereignisse in der Sekunde gemessen. Einen Faktor für eine mögliche Verfälschung der Messungen stellen Zellpartikel dar, welche ähnliche Merkmale wie die zu untersuchenden PMN aufweisen (67). Auch um diesbezüglich fehlerhafte Auswertungsergebnisse zu vermindern, wird eine Begrenzung der Messrate angestrebt.

IV.2 Diskussion der Ergebnisse

Übereinstimmend mit vorherigen Untersuchungen konnte unsere Studie zeigen, dass aktivierte Leukozyten großen Einfluss auf die Degradation der endothelialen Glykokalyx haben und eine nicht mehr intakte Glykokalyx zu erhöhter endothelialer Permeabilität, Adhäsion von Leukozyten (71,72), Inflammationsprozessen und Gewebeödemen führt (73). Die vaskuläre Permeabilität wird beschrieben durch ein „double-barrier“-Konzept (10), wonach die endotheliale Schranke nicht nur aus den Zellkörpern der Endothelzellen besteht, sondern ebenfalls aus der endothelialen Glykokalyx. Gesetzt den Fall, dass es bei beiden Komponenten zu einer Schädigung oder teilweisem Funktionsverlust kommt, ist die vaskuläre Barriere gestört. Es kann eine Leukozytenadhärenz mit Permeabilitätsstörung und Ödementwicklung folgen (10).

IV.2.1 Adhäsive Prozesse von mit fMLP oder PAF aktivierten Leukozyten

Diverse pathophysiologische Prozesse wie Inflammation und Sepsis (74-77), Ischämie/Reperfusion (14,16), chronische Nierenerkrankungen (78), Diabetes (79,80), Trauma (23) und Atherosklerose (81,82) resultieren aus strukturellen und funktionalen Schädigungen der endothelialen Glykokalyx. So wurden in vielen Versuchen mit Tieren, wie auch in klinischen Untersuchungen die zentrale Position von PMN hinsichtlich ihrer gewebeschädigenden Komponente unter Beweis gestellt (83).

Um diese Schädigung der Glykokalyx zu untersuchen und zu veranschaulichen, welche Rolle Adhäsionsprozesse von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) an der koronaren Gefäßwand spielen und wie wichtig die Unversehrtheit der Glykokalyx ist, damit Leukozyten und Blutplättchen an einer Adhäsion mit den Endothelzellen gehindert werden, wurden mit Hilfe von fMLP und PAF Leukozyten aktiviert und ihre Wirkung auf die intakte endotheliale Glykokalyx getestet. fMLP-stimulierte PMN zeigen als Reaktion auf ihre Aktivierung eine vorübergehende Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen species). Diese ROS Freisetzung ist verbunden mit einem erhöhten endothelialen Ca^{2+} Gradienten und verstärkter Gefäßpermeabilität (62). Die Leukozyten-Aktivierung durch PAF beinhaltet zunächst Chemotaxis, Aggregation, ROS-Freisetzung, LTB_4 -Produktion,

Ausschüttung von lysosomalen Enzymen und die vermehrte Expression von CD11b Integrin (59). Durch den somit eingeläuteten Inflammationsprozess ist die Unversehrtheit der endothelialen Glykokalyx nicht mehr gegeben. Weil deren Struktur in ihrem ursprünglichen Ausmaß dezimiert wird, kommt es zu erhöhter Gefäßpermeabilität und Gewebeödemen. Außerdem werden vaskuläre Adhäsionsmoleküle wie Selektine (PECAM; VCAM, ICAM) und Integrine (CD11/CD18) auf den Endothelzellen freigelegt, exprimiert und aktiviert, so dass PMN und Plättchen an diese binden und Leukozyten ins Gewebe emigrieren können (44).

Die Vorbehandlung mit Antithrombin III konnte die Adhäsionswerte der aktivierten Leukozyten signifikant senken, ein vollständiges Ausbleiben von adhäsiven Prozessen der PMN wurde dadurch allerdings nicht erzielt. Bedeutsamerweise sind PMN die ersten Zellen, welche vermehrt auftreten, um im Falle von akuter Inflammation zu reagieren. Selbst unter physiologischen Bedingungen lässt sich eine basale transendotheliale Leukozyten-Migration in den extravaskulären Raum beobachten. Jedoch werden im Falle einer Inflammation u. a. Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interferon γ und Interleukine verstärkt freigesetzt. Diese aktivieren vermehrt die Expression vorher erwähnter endothelialer Adhäsionsmoleküle, welche wiederum die Rekrutierung von PMN an Stellen mit degradierter endothelialer Glykokalyx und somit das Fortschreiten der Läsion beschleunigen (84-86). Die Fähigkeit der Glykokalyx, als vaskuläre Barriere zu agieren, geht verloren und es kommt zur weiteren Degradation durch Shedding von Glykokalyxbestandteilen.

IV.2.2 Shedding von Heparansulfat und Hyaluronan

Nach Infusion der durch fMLP oder PAF aktivierten PMN zeigt sich ein fulminanter Anstieg der koronarvenösen Freisetzung der Glykokalyxbestandteile Heparansulfat und Hyaluronan. Die deutlich erhöhte Abspaltung dieser Gefäßwandkomponenten ist als Ausdruck einer Schädigung der endothelialen Glykokalyx durch die aktivierten Leukozyten zu werten. Interessanterweise bewirkt die Applikation von unstimulierten PMN (Kontroll-Gruppe) keine Zunahme des Glykokalyxabbaues über das basale Niveau in den isoliert perfundierten Herzen hinaus.

Eine Schädigung der endothelialen Glykokalyx, welche durch das Heparansulfat- und Hyaluronan-Shedding angezeigt werden kann, führt unmittelbar zu vermehrter

Leukozytenadhäsion und -migration sowie zu einer erhöhten Permeabilität (10,87). Diese Störungen der Integrität der Glykokalyx werden durch die von uns angefertigten elektronenmikroskopischen Bilder dieser Herzen veranschaulicht. Beachtenswert erscheint, dass in unseren Versuchen die gesteigerte Abspaltung der Glykokalyxbestandteile unmittelbar mit Gabe der aktivierten PMN einsetzte und selbst nach Beendigung der 1-minütigen Applikation unvermindert über mindestens 10 Minuten anhielt. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass die bereits intravasal adhärent gewordenen Leukozyten den weiteren Abbau unterstützen.

Erhöhte Serum-Konzentrationen von Hyaluronan fanden sich als Folge von vermehrtem Polysaccharid-Ausstrom im Blutkreislauf, wie dies bei inflammatorischen Vorgängen im Körper zu beobachten ist, vorwiegend bei der rheumatoiden Arthritis (89,90). Der Inflammationsprozess, welchen wir in unserer Arbeit mit Hilfe der durch fMLP und PAF „künstlich“ aktivierten Leukozyten herstellen, induziert die enzymatische Degradation der Glykokalyx durch das Auftreten von Proteasen, welche vermehrt Heparansulfat und Hyaluronan aus ihrem ursprünglichen Umfeld herauslösen. Dieser Verlust von Glykokalyxbestandteilen reduziert das Volumen der Glykokalyx deutlich. So beschreiben Ergebnisse von Gao und Lipowsky eine Volumenreduktion von 60% durch Heparanase und eine Reduktion der Glykokalyxdicke um 20% nach Einwirkung von Hyaluronidase (91). Eine vollständige Detektion der einzelnen Proteasen und Sheddasen, welche am Glykokalyx-Shedding beteiligt sind, ist noch nicht restlos gelungen (52). Immerhin konnte entdeckt werden, dass Glykokalyxschäden, welche durch Ischämie/Reperfusion entstehen durch eine intravenöse Infusion von Hyaluronan teilweise vermieden oder wieder repariert werden (88).

IV.2.3 Glykokalyxschädigung durch Serinproteasen

PMN besitzen zur Abwehr mikrobieller Pathogene einen vorgefertigten Pool an Serinproteasen (z.B neutrophile Elastase). Serinproteasen lassen sich als Gruppe von Enzymen zusammenfassen, welche bei Koagulationsprozessen, Apoptose und Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle spielen (92). Diese Proteasen werden in Granula aufbewahrt, die nach Stimulation bzw. Aktivierung von PMN, wie in unserer Studie mit fMLP und PAF, mit der Zellmembran verschmelzen und die Proteasen in den extrazellulären Raum freisetzen. PMN sind in-vivo die ersten Abwehrzellen an

einer entzündeten Stelle und setzen dort Proteasen frei. Die Serinprotease Elastase beispielsweise greift die Proteoglykane der Glykokalyx an und spaltet diese aus dem Grundgerüst heraus (93). Eine Studie an Ratten hat gezeigt, dass eine intestinale Ischämie/Reperfusion durch Freisetzung von Elastase aus Leukozyten zur Schädigung der – im weiteren Strömungsverlauf liegenden - pulmonalen Mikrozirkulation führen kann (94). Es ist mittlerweile gut bekannt, dass neutrophile Elastase im akuten Lungenversagen eine zentrale Rolle für die pulmonale Permeabilitätserhöhung spielt (95) und in hohen Konzentrationen in der bronchoalveolären Lavage nachzuweisen ist (96).

In unseren Studien zeigte die immunhistologische Markierung von Elastase in den mit aktivierten PMN perfundierten Herzen dieses Enzym in eindrucksvoller Weise in PMN-Granula und – bereits freigesetzt – in der Gefäßwand in der näheren Umgebung von adhären PMN. In-vitro Experimente haben gezeigt, dass die oberflächengebundene Serinprotease Elastase nach Expression nicht mehr von natürlichen Proteaseinhibitoren im Plasma (z.B. Antithrombin III) inaktiviert werden kann. Diese Proteaseinhibitoren regulieren normalerweise die Aktivität der ins Plasma freigesetzten Enzyme. Somit könnten die Proteasen auf der Zelloberfläche einen wichtigen Beitrag in der Pathogenese der Zell- und Glykokalyxschädigung leisten. Passenderweise vermochte die Behandlung der Herzen mit AT III in unseren Untersuchungen das PMN-induzierte Shedding nicht vollständig zu unterdrücken.

Inhibitionsstudien mit monoklonalen Antikörpern und synthetischen Peptiden identifizierten das β 2-Integrin CD11b als Hauptbindungsstelle auf der leukozytären Zelloberfläche. Adhäsion von PMN an Endothelzellen erfolgt hauptsächlich über die Bindung von CD11b an ICAM-1 auf dem Endothel (38). Ein shedding-bedingter Verlust der schirmenden Glykokalyxabdeckung dürfte den Zugang von leukozytärem CD11b an endotheliales ICAM-1 erleichtern. Somit können PMN durch Freisetzung, z. B. von Elastase, die eigene Adhäsionsrate steigern. Dieser Ablauf stellt einen Mechanismus mit positiver Rückkopplung dar.

Aktivierte Leukozyten schädigen die Glykokalyx, vermögen dadurch adhären zu werden, setzen lokal weitere Proteasen und Aktivatoren frei, zerstören dadurch noch mehr Glykokalyx und erlauben dadurch zusätzlichen Leukozyten adhären und aktiv zu werden.

IV.2.4 Die Rolle von Antithrombin III bei der Glykokalyx-Protektion

Antithrombin III ist ein physiologischer Inhibitor von Serinproteasen, welcher die Aktivität der ins Plasma freigesetzten Enzyme reguliert. Zu den Serinproteasen zählen u.a. Thrombin, Plasmin, Protease-3 und Elastase (44,97). Diese Proteasen partizipieren an den verschiedensten Vorgängen im Körper, wie dem Blutgerinnungsprozess, der Immunität und der Inflammation (98). Nach Ischämie/Reperfusion konnte eine weitreichende Schädigung der Glykokalyx in den unterschiedlichsten Organen wie Niere (99), Darm (100) und Lunge (101) durch den Einsatz von Antithrombin III und die damit einhergehende Ausschüttung von Prostazyklin unterbunden werden. Die protektive Funktion, welche Antithrombin III hier ausübt, basiert auf der Stimulation von endothelialer Prostazyklinproduktion durch die Interaktion mit Heparin-ähnlichen Glykosaminoglykanen (102). Diese Verbindung mit Glykosaminoglykanen, unter anderem solche des Membranproteins Syndecan-4, beeinflusst lokale Adhäsionsprozesse und ist an der Chemotaxis und Zellmigration beteiligt. Synthese und Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren wird dadurch verringert und die Leukozytenaktivierung und -interaktion mit der Gefäßwand moduliert (103,104). Prostazyklin hemmt zudem die Thrombozytenaggregation sowie die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen über einen cAMP-abhängigen Prozess. Dieser Vorgang verhindert die Aktivierung von neutrophilen Zellen und reduziert dadurch ebenso die neutrophile Degranulation wie die Freisetzung von Elastase und toxischen Sauerstoffradikalen (105-107).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Antithrombin III fest an die Glykokalyx bindet und eine ausreichende Dosis davon, verankert in der Glykokalyx, einen Schutz vor Proteasen, Heparanasen und Hyaluronidasen und damit auch vor Shedding der endothelialen Glykokalyx darstellt (108). Jedoch setzt dieser Protektionsmechanismus des Antithrombins III voraus, dass eine weitgehend intakte Glykokalyx vorhanden ist. Die Ergebnisse unserer Versuchsreihen bestätigen die Beobachtung, dass bei bereits geschädigter Glykokalyx ein Einsatz von Antithrombin III keinen hinreichenden Schutz gegen Shedding von Glykokalyxbestandteilen darstellt. Weder konnte die Freisetzung von Heparansulfat, noch von Hyaluronan, einer der ersten Marker des Glykokalyxsheddings, in dem Maße verhindert werden, dass die Schädigung der

Glykokalyx mit einer damit einhergehenden erhöhten intravaskulären Leukozytenadhäsion vollständig verhindert werden konnte (9,74,109-111).

Ein weiterer Aspekt dreht sich um die Bindung von Antithrombin III, welche es unter anderem mit Heparansulfat selbst eingeht. Ein Shedding von Heparansulfat bewirkt vermehrt lösliches Heparansulfat, welches dann in Konkurrenz zu dem membranständigen Antithrombin III/Heparansulfatkomplex stehen könnte und somit die Wirkung von Antithrombin hinsichtlich der Glykokalyx-Protektion schwächen könnte (112). Dieser Effekt sollte in unserem ex-vivo Modell bei nicht-rezirkulierender Perfusion mit kristalloider Lösung keine Rolle spielen. Andererseits könnten abnehmende Bindungsstellen in Form von zu Verlust gegangenem Heparansulfat an der endothelialen Membran einen Schutzeffekt durch AT III reduzieren. Diese Vermutung wird durch die Tatsache unterstrichen, dass in unseren Versuchen Heparansulfat nur ungenügend vor vermehrter Freisetzung durch den Einsatz von Antithrombin III gehindert werden konnte.

Insgesamt dürfen wir schlußfolgern, dass der Schutz von Antithrombin III gegen eine fortschreitende Leukozytenadhäsion nur bei nicht degradiertem Glykokalyx gegeben sein dürfte. Dies unterstreichen auch immunhistologische Bilder, wonach bei intakter endothelialer Glykokalyx Antithrombin III vorwiegend an der Gefäßwand in Verbindung mit Heparansulfat zu finden ist, bei eingeschränkter Funktionstüchtigkeit der Glykokalyx dagegen eher im Interstitium (24).

V. Zusammenfassung

Die Glykokalyx übt gemeinsam mit der Endothelzelle eine vaskuläre Barrierefunktion aus. Beide bilden eine funktionelle Schranke nach dem „double-barrier“-Konzept, welche im arteriolen und kapillären Gefäßbereich für Moleküle von >50 kDa ein schwer durchdringbares Hindernis darstellt. Bestehend aus Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen und Glykoproteinen ist die endotheliale Glykokalyx an vielen wichtigen physiologischen Funktionen maßgeblich beteiligt. Die Integrität der Glykokalyx bestimmt den funktionellen Zustand des Gefäßendothels und eine mögliche Läsion mit Abnahme ihrer Dichte führt zu vermehrter Gefäßpermeabilität, Verlust der Schubspannungs-abhängigen Freisetzung von Stickoxid und Abbau des „endothelial surface layer“ (14), wodurch Adhäsionsmoleküle an der Oberfläche freigelegt werden (7,9). Es kommt zu vermehrter Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten (74,113) und ein Gewebeödem entsteht (114).

In der vorliegenden Arbeit haben wir ergründet, welchen Einfluss aktivierte Leukozyten (PMN) auf die Integrität der endothelialen Glykokalyx haben, welche Folgen dies für die intravaskuläre Adhäsion von Leukozyten hat und welche Rolle Antithrombin III beim Schutz vor Glykokalyxshedding und Adhäsionsteigerung spielt. Das Langendorff-Modell des isoliert perfundierten Herzens des Meerschweinchens bot optimale Voraussetzungen, um an einem intakten Gefäßsystem (die Koronarien) ex-vivo Versuche hinsichtlich der Integrität der Glykokalyx nach Gabe von mit fMLP oder PAF aktivierten polymorphonukleären neutrophilen Granulozyten durchzuführen. Die PMN wurden aus humanen Blutzellen gewonnen und in vitro mit fMLP (0,1µM) oder PAF (1µM) aktiviert und anschließend über die Aortenkanüle in das Versuchsherz infundiert. Neben der Fixation für die Elektronen- und Lichtmikroskopie wurde koronarvenöses Effluat gesammelt und analysiert. Bestimmt wurden darin die freigesetzten Mengen der Glykokalyxbestandteile Heparansulfat und Hyaluronsäure (mittels ELISA) sowie die Zahl der nach intrakoronarer Applikation von ca. $1,5 \times 10^6$ PMN wieder austretenden Leukozyten.

Unsere Studie hat gezeigt, dass es nach Applikation der durch fMLP und PAF aktivierten Leukozyten – bei beiden Substanzen ähnlich – zu einem signifikanten Shedding der Glykokalyx kommt (Steigerung der Heparansulfatabgabe um ca. 150%,

Zunahme von Hyaluronan um ca. Faktor 4). Zudem konnte eine Steigerung der intravaskulären Adhäsionsrate von PMN beobachtet werden (Steigerung um etwa den Faktor 7). Elektronenmikroskopische Darstellungen der Glykokalyx spiegelten die erwartete Zerstörung wider. Die Gabe von Antithrombin III konnte das Shedding reduzieren, was von einer Verminderung der Adhäsion von PMN begleitet wurde. Eine vollständige Protektion der Glykokalyx war durch Antithrombin III alleine jedoch nicht möglich, ebensowenig wie eine Rückkehr der Adhäsion auf Basalwerte. Als möglicher Wirkmechanismus des Serinproteasen-Hemmers Antithrombin III kommt eine Hemmung der neutrophilen Elastase in Frage. Wir konnten diese Serinprotease in hoher Konzentration in der Nähe von adhären PMN an der Oberfläche des Gefäßendothels nachweisen (immunhistologische Lichtmikroskopie).

Eine Hauptidee unserer experimentellen Studie ist der Nachweis, dass ein positiver Rückkopplungsmechanismus besteht zwischen Aktivierung und Adhäsion von PMN einerseits und Shedding der Glykokalyx andererseits: Aktivierte Leukozyten (PMN) schädigen die endotheliale Glykokalyx, wodurch die Adhäsion gesteigert wird. Adhärenz aktivierte Leukozyten zerstören die Glykokalyx weiter, wodurch zusätzliche Leukozyten adhären werden.

Diese Sequenz stellt einen Pathomechanismus mit großer pathophysiologischer Relevanz dar.

Antithrombin III scheint eine Schutzfunktion auszuüben. Allerdings bedarf es weiterer Maßnahmen als die Gabe des Serinprotease-Hemmers, um die Zerstörung der Glykokalyx durch die Vermeidung von Leukozytenadhäsion zu unterbinden und einen Erhalt der vaskulären Barriere zu ermöglichen.

VI. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau der endothelialen Glykokalyx nach Reitsma et al. 2007

Abbildung 2: Schematischer Versuchsaufbau der retrograden Perfusion nach Langendorff

Abbildung 3: Freisetzung des Glykokalyxbestandteils Heparansulfat im koronarvenösen Effluat über den Zeitraum von 10 Minuten nach der Äquilibrationsphase

Abbildung 4: Freisetzung des Glykokalyxbestandteils Hyaluronan im koronarvenösen Effluat über einen Zeitraum von 10 Minuten nach der Äquilibrationsphase

Abbildung 5: PMN-Adhäsionswerte in %

Abbildung 6: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Meerschweinchenherzen

Abbildung 7: Lichtmikroskopische Darstellung eines mit fMLP aktivierten polymorphonukleären neutrophilen Granulozyten

VII. Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
AT	Antithrombin III
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Celsius
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD15	cluster of differentiation 15 = Leukozytenrezeptor
cmH ₂ O	Zentimeter Wassersäule
CO ₂	Kohlendioxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EG	endotheliale Glykokalyx
ELAM	endothelial-leukocyte adhesion molecule
ELISA	enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESL	endothelial surface layer
FACS	fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FSC	forward scatter
g	Gramm
GMP	platelet alpha-granule membrane protein
H ₂ O	Wasser
ICAM	intracellular adhesion molecule
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo Dalton
KHB	Krebs-Henseleit-Puffer
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
L	Liter
LAM	leukocyte adhesion molecule
LECAM	lectin adhesion molecule
LDL	low Density Lipoprotein
MAC-1	macrophage-1 antigen
MACS	magnetic cell separation system

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min.	Minute
ml.	Milliliter
n	Anzahl der Versuche
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
nm	Nanometer
O ₂	Sauerstoff
PAF	platelet activating factor
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PECAM	platelet endothelial cell adhesion molecule
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
SEM	standard error of the mean
SSC	sideward scatter
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TRIS	Trishydroxymethyl-aminomethan
U/ml	Units/Millimeter
× g	Mikrogramm
× m	Mikrometer
V.	Vena
VCAM	vascular cell adhesion molecule
Vv.	Venae

VIII. Literaturverzeichnis

1. Pries AR, Secomb TW. Microvascular blood viscosity in vivo and the endothelial surface layer. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. American Physiological Society; 2005 Dec;289(6):H2657–64.
2. Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. The endothelial surface layer. *Pflugers Arch*. 2000 Sep;440(5):653–66.
3. Danielli JF. Capillary permeability and oedema in the perfused frog. *J Physiol (Lond)*. Wiley-Blackwell; 1940 Mar 14;98(1):109–29.
4. Luft JH. Fine structures of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. *Fed Proc*. 1966 Nov;25(6):1773–83.
5. Chappell D, Jacob M, Becker BF, Hofmann-Kiefer K, Conzen P, Rehm M. [Expedition glycocalyx. A newly discovered “Great Barrier Reef”]. *Anaesthesist*. Springer-Verlag; 2008 Oct;57(10):959–69.
6. Bruegger D, Rehm M, Jacob M, Chappell D, Stoeckelhuber M, Welsch U, et al. Exogenous nitric oxide requires an endothelial glycocalyx to prevent postischemic coronary vascular leak in guinea pig hearts. *Crit Care*. BioMed Central Ltd; 2008;12(3):R73.
7. Weinbaum S, Tarbell JM, Damiano ER. The Structure and Function of the Endothelial Glycocalyx Layer. <http://dxdoiorg/101146/annurevbioeng9060906151959>. *Annual Reviews*; 2007 Jul 25;9(1):121–67.
8. Nieuwdorp M, Meuwese MC, Vink H, Hoekstra JB, Kastelein JJ, Stroes ES. The endothelial glycocalyx: a potential barrier between health and vascular disease. *Current Opinion in Lipidology*. 2005 Oct 1;16(5):507.
9. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MAMJ, oude Egbrink MGA. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch*. Springer-Verlag; 2007 Jun;454(3):345–59.
10. Rehm M, Zahler S, Lötsch M, Welsch U, Conzen P, Jacob M, et al. Endothelial glycocalyx as an additional barrier determining extravasation of 6% hydroxyethyl starch or 5% albumin solutions in the coronary vascular bed. *Anesthesiology*. 2004 May;100(5):1211–23.
11. D C, M J, K H-K, D B, M R, P C, et al. Hydrocortisone preserves the vascular barrier by protecting the endothelial glycocalyx. *Anesthesiology*. 2007 Nov 1;107(5):776–84.
12. Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol*. 1986 Jun;250(6 Pt 2):H1145–9.

13. Quinsey NS, Greedy AL, Bottomley SP, Whisstock JC, Pike RN. Antithrombin: in control of coagulation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Mar;36(3):386–9.
14. Becker BF, Chappell D, Jacob M. Endothelial glycocalyx and coronary vascular permeability: the fringe benefit. *Basic Res Cardiol.* 2010 Nov;105(6):687–701.
15. Nieuwdorp M, Meuwese MC, Vink H, Hoekstra JB, Kastelein JJ, Stroes ES. The endothelial glycocalyx: a potential barrier between health and vascular disease. *Current Opinion in Lipidology.* 2005 Oct 1;16(5):507.
16. Rehm M, Bruegger D, Christ F, Conzen P, Thiel M, Jacob M, et al. Shedding of the endothelial glycocalyx in patients undergoing major vascular surgery with global and regional ischemia. *Circulation.* Lippincott Williams & Wilkins; 2007 Oct 23;116(17):1896–906.
17. Nelson A, Berkestedt I, Schmidtchen A, Ljunggren L, Bodelsson M. Increased levels of glycosaminoglycans during septic shock: relation to mortality and the antibacterial actions of plasma. *Shock.* 2008 Dec;30(6):623–7.
18. Chappell D, Bruegger D, Potzel J, Jacob M. Hypervolemia increases release of atrial natriuretic peptide and shedding of the endothelial glycocalyx. *Crit Care.* 2014.
19. Menger MD, Vollmar B. Role of microcirculation in transplantation. *Microcirculation.* 2000 Oct;7(5):291–306.
20. Messmer BJ, Okies JE, Hallman GL, Cooley DA. Early and late thromboembolic complications after mitral valve replacement: a comparative study of various prostheses. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 1972 May;13(3):281–9.
21. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J.* 1999 Nov;138(5 Pt 2):S419–20.
22. Nieuwdorp M, Meuwese MC, Vink H, Hoekstra JB, Kastelein JJ, Stroes ES. The endothelial glycocalyx: a potential barrier between health and vascular disease. *Current Opinion in Lipidology.* 2005 Oct 1;16(5):507.
23. Johansson PI, Sørensen AM, Perner A, Welling KL, Wanscher M, Larsen CF, et al. Disseminated intravascular coagulation or acute coagulopathy of trauma shock early after trauma? An observational study. *Crit Care. BioMed Central Ltd;* 2011;15(6):R272.
24. Chappell D, Jacob M, Hofmann-Kiefer K, Rehm M, Welsch U, Conzen P, et al. Antithrombin reduces shedding of the endothelial glycocalyx following ischaemia/reperfusion. *Cardiovasc Res.* The Oxford University Press; 2009 Jul 15;83(2):388–96.
25. Chappell D, Jacob M, Hofmann-Kiefer K, Bruegger D, Rehm M, Conzen P, et al. Hydrocortisone Preserves the Vascular Barrier by Protecting the Endothelial Glycocalyx. *Anesthesiology.* 2007 Nov;107(5):776–84.

26. Jacob M, Paul O, Mehringer L, Chappell D, Rehm M, Welsch U, et al. Albumin augmentation improves condition of guinea pig hearts after 4 hr of cold ischemia. *Transplantation*. 2009 Apr 15;87(7):956–65.
27. Annecke T, Fischer J, Hartmann H, Tschoep J, Rehm M, Conzen P, et al. Shedding of the coronary endothelial glycocalyx: effects of hypoxia/reoxygenation vs ischaemia/reperfusion. *Br J Anaesth*. Oxford University Press; 2011 Nov;107(5):679–86.
28. Atherton A, Born GV. Quantitative investigations of the adhesiveness of circulating polymorphonuclear leucocytes to blood vessel walls. *J Physiol (Lond)*. Wiley-Blackwell; 1972 Apr;222(2):447–74.
29. Granger DN, Benoit JN, Suzuki M, Grisham MB. Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol*. 1989 Nov;257(5 Pt 1):G683–8.
30. Menger MD, Pelikan S, Steiner D, Messmer K. Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox". *Am J Physiol*. 1992 Dec;263(6 Pt 2):H1901–6.
31. Andrian von UH, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arfors KE, Butcher EC. Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. National Academy of Sciences; 1991 Sep 1;88(17):7538–42.
32. Lawrence MB, Springer TA. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell*. 1991 May 31;65(5):859–73.
33. Lenter M, Levinovitz A, Isenmann S, Vestweber D. Monospecific and common glycoprotein ligands for E- and P-selectin on myeloid cells. *J Cell Biol*. The Rockefeller University Press; 1994 Apr;125(2):471–81.
34. Sako D, Chang XJ, Barone KM, Vachino G, White HM, Shaw G, et al. Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell*. 1993 Dec 17;75(6):1179–86.
35. Kishimoto TK, Warnock RA, Jutila MA, Butcher EC, Lane C, Anderson DC, et al. Antibodies against human neutrophil LECAM-1 (LAM-1/Leu-8/DREG-56 antigen) and endothelial cell ELAM-1 inhibit a common CD18-independent adhesion pathway in vitro. *Blood*. 1991 Aug 1;78(3):805–11.
36. Picker LJ, Warnock RA, Burns AR, Doerschuk CM, Berg EL, Butcher EC. The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140. *Cell*. 1991 Sep 6;66(5):921–33.
37. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*. 1994 Oct 1;84(7):2068–101.
38. Tandon P, Diamond SL. Kinetics of beta2-integrin and L-selectin bonding

- during neutrophil aggregation in shear flow. *Biophys J. Elsevier*; 1998 Dec;75(6):3163–78.
39. Lo SK, Van Seventer GA, Levin SM, Wright SD. Two leukocyte receptors (CD11a/CD18 and CD11b/CD18) mediate transient adhesion to endothelium by binding to different ligands. *J Immunol.* 1989 Nov 15;143(10):3325–9.
 40. Arumugam TV, Salter JW, Chidlow JH, Ballantyne CM, Kevil CG, Granger DN. Contributions of LFA-1 and Mac-1 to brain injury and microvascular dysfunction induced by transient middle cerebral artery occlusion. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology. American Physiological Society*; 2004 Dec;287(6):H2555–60.
 41. Jaeschke H, Hasegawa T. Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury. *Liver Int. Blackwell Publishing Ltd*; 2006 Oct;26(8):912–9.
 42. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol. Annual Reviews* 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA; 1997;15(1):675–705.
 43. Gourdin MJ, Bree B, De Kock M. The impact of ischaemia–reperfusion on the blood vessel. *European Journal of Anaesthesiology (EJA).* 2009 Jul 1;26(7):537–47.
 44. Becker BF, Chappell D, Bruegger D, Annecke T, Jacob M. Therapeutic strategies targeting the endothelial glycocalyx: acute deficits, but great potential. *Cardiovasc Res. The Oxford University Press*; 2010 Jul 15;87(2):300–10.
 45. Heindl B, Reichle FM, Zahler S, Conzen PF, Becker BF. Sevoflurane and isoflurane protect the reperfused guinea pig heart by reducing postischemic adhesion of polymorphonuclear neutrophils. *Anesthesiology.* 1999 Aug;91(2):521–30.
 46. Zahler S, Kowalski C, Brosig A, Kupatt C, Becker BF, Gerlach E. The function of neutrophils isolated by a magnetic antibody cell separation technique is not altered in comparison to a density gradient centrifugation method. *Journal of Immunological Methods.* 1997 Jan 15;200(1-2):173–9.
 47. Döring HJ. The isolated perfused heart according to Langendorff technique--function--application. *Physiol Bohemoslov.* 1990;39(6):481–504.
 48. Chappell D, Dörfler N, Jacob M, Rehm M, Welsch U, Conzen P, et al. Glycocalyx protection reduces leukocyte adhesion after ischemia/reperfusion. *Shock.* 2010 Aug;34(2):133–9.
 49. Chappell D, Hofmann-Kiefer K, Jacob M, Rehm M, Briegel J, Welsch U, et al. TNF- α induced shedding of the endothelial glycocalyx is prevented by hydrocortisone and antithrombin. *Basic Res Cardiol. D. Steinkopff-Verlag*; 2009;104(1):78–89.
 50. Zahler S, Kowalski C, Brosig A, Kupatt C, Becker BF, Gerlach E. The function

of neutrophils isolated by a magnetic antibody cell separation technique is not altered in comparison to a density gradient centrifugation method. *Journal of Immunological Methods*. 1997 Jan;200(1-2):173–9.

51. Laurent TC, Fraser JR. Hyaluronan. *FASEB J. Federation of American Societies for Experimental Biology*; 1992 Apr;6(7):2397–404.
52. Becker BF, Jacob M, Leipert S, Salmon AHJ, Chappell D. Degradation of the endothelial glycocalyx in clinical settings: searching for the sheddases. *Br J Clin Pharmacol*. 2015 Sep;80(3):389–402.
53. Vogel J, Sperandio M, Pries AR, Linderkamp O, Gaehtgens P, Kuschinsky W. Influence of the endothelial glycocalyx on cerebral blood flow in mice. *J Cereb Blood Flow Metab. Nature Publishing Group*; 2000 Nov;20(11):1571–8.
54. Himmelfarb J, Hakim RM, Holbrook DG, Leeber DA, Ault KA. Detection of granulocyte reactive oxygen species formation in whole blood using flow cytometry. *Cytometry. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company*; 1992;13(1):83–9.
55. Berends C, Dijkhuizen B, de Monchy JG, Gerritsen J, Kauffman HF. Induction of low density and up-regulation of CD11b expression of neutrophils and eosinophils by dextran sedimentation and centrifugation. *Journal of Immunological Methods*. 1994 Jan 3;167(1-2):183–93.
56. Forsyth KD, Levinsky RJ. Fibronectin degradation; an in-vitro model of neutrophil mediated endothelial cell damage. *J Pathol. John Wiley & Sons, Ltd*; 1990 Aug;161(4):313–9.
57. Sutherland FJ, Hearse DJ. The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacol Res*. 2000 Jun;41(6):613–27.
58. Becker BF, Gerlach E. Acute effects of nicotine on hemodynamic and metabolic parameters of isolated, perfused hearts of guinea pigs and rats. *Klin Wochenschr*. 1984;62 Suppl 2:58–66.
59. McManus LM, Pinckard RN. PAF, a putative mediator of oral inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000;11(2):240–58.
60. Lefebvre JS, Marleau S, Milot V, Lévesque T, Picard S, Flamand N, et al. Toll-like receptor ligands induce polymorphonuclear leukocyte migration: key roles for leukotriene B4 and platelet-activating factor. *FASEB J. Federation of American Societies for Experimental Biology*; 2010 Feb;24(2):637–47.
61. Coëffier E, Delautier D, Le Couedic JP, Chignard M, Denizot Y, Benveniste J. Cooperation between platelets and neutrophils for paf-acether (platelet-activating factor) formation. *J Leukoc Biol. Society for Leukocyte Biology*; 1990 Mar;47(3):234–43.
62. Zhu L, Castranova V, He P. fMLP-stimulated neutrophils increase endothelial [Ca²⁺]_i and microvessel permeability in the absence of adhesion: role of reactive oxygen species. *American Journal of Physiology - Heart and*

Circulatory Physiology. American Physiological Society; 2005 Mar;288(3):H1331–8.

63. Schroeder JT, MacGlashan DW, Lichtenstein LM. Human basophils: mediator release and cytokine production. *Adv Immunol.* 2001;77:93–122.
64. Hook WA, Siraganian RP. Complement-induced histamine release from human basophils. III. Effect of pharmacologic agents. *J Immunol.* 1977 Feb;118(2):679–84.
65. Rothe A, Nathanielsz A, Hosse RJ, Oberhäuser F, Strandmann EP, Engert A, et al. Selection of human anti-CD28 scFvs from a T-NHL related scFv library using ribosome display. *J Biotechnol.* 2007 Jul 15;130(4):448–54.
66. Fulwyler MJ. Electronic separation of biological cells by volume. *Science.* 1965 Nov 12;150(3698):910–1.
67. Davey HM, Kell DB. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiol Rev. American Society for Microbiology (ASM);* 1996 Dec;60(4):641–96.
68. Giles H, Smith RE, Martin JF. Platelet glycoprotein IIb-IIIa and size are increased in acute myocardial infarction. *Eur J Clin Invest.* 1994 Jan;24(1):69–72.
69. Nurden P, Bihour C, Combrie R, Gralnick H, Nurden AT. Glycoprotein Ia-IIa (VLA-2) and glycoprotein Ib-IX complexes are processed independently during thrombin-induced platelet activation. *J Lab Clin Med.* 1994 Oct;124(4):579–88.
70. Kuijpers TW, Tool AT, van der Schoot CE, Ginsel LA, Onderwater JJ, Roos D, et al. Membrane surface antigen expression on neutrophils: a reappraisal of the use of surface markers for neutrophil activation. *Blood.* 1991 Aug 15;78(4):1105–11.
71. Mulivor AW, Lipowsky HH. Role of glycocalyx in leukocyte-endothelial cell adhesion. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology. American Physiological Society;* 2002 Oct 1;283(4):H1282–91.
72. Constantinescu AA, Vink H, Spaan JAE. Endothelial cell glycocalyx modulates immobilization of leukocytes at the endothelial surface. *Arterioscler Thromb Vasc Biol. Lippincott Williams & Wilkins;* 2003 Sep 1;23(9):1541–7.
73. van den Berg BM, Spaan JAE, Rolf TM, Vink H. Atherogenic region and diet diminish glycocalyx dimension and increase intima-to-media ratios at murine carotid artery bifurcation. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology. American Physiological Society;* 2006 Feb 1;290(2):H915–20.
74. Henry CB, Duling BR. TNF-alpha increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology.* 2000 Dec;279(6):H2815–23.

75. Mulivor AW, Lipowsky HH. Inflammation- and ischemia-induced shedding of venular glycocalyx. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. American Physiological Society; 2004 May 1;286(5):H1672–80.
76. Ostrowski SR, Berg RMG, Windeløv NA, Meyer MAS, Plovsing RR, Møller K, et al. Coagulopathy, catecholamines, and biomarkers of endothelial damage in experimental human endotoxemia and in patients with severe sepsis: a prospective study. *J Crit Care*. Elsevier; 2013 Oct;28(5):586–96.
77. Salmon AHJ, Satchell SC. Endothelial glycocalyx dysfunction in disease: albuminuria and increased microvascular permeability. *J Pathol*. John Wiley & Sons, Ltd; 2012 Mar;226(4):562–74.
78. Padberg J-S, Wiesinger A, di Marco GS, Reuter S, Grabner A, Kentrup D, et al. Damage of the endothelial glycocalyx in chronic kidney disease. *Atherosclerosis*. 2014 Jun;234(2):335–43.
79. Nieuwdorp M, Mooij HL, Kroon J, Atasever B, Spaan JAE, Ince C, et al. Endothelial glycocalyx damage coincides with microalbuminuria in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2006 Apr;55(4):1127–32.
80. Zuurbier CJ, Demirci C, Koeman A, Vink H, Ince C. Short-term hyperglycemia increases endothelial glycocalyx permeability and acutely decreases lineal density of capillaries with flowing red blood cells. *J Appl Physiol*. American Physiological Society; 2005 Oct;99(4):1471–6.
81. Nieuwdorp M, Holleman F, de Groot E, Vink H, Gort J, Kontush A, et al. Perturbation of hyaluronan metabolism predisposes patients with type 1 diabetes mellitus to atherosclerosis. *Diabetologia*. Springer-Verlag; 2007;50(6):1288–93.
82. van den Berg BM, Nieuwdorp M, Stroes ESG, Vink H. Glycocalyx and endothelial (dys) function: from mice to men. *Pharmacol Rep*. 2006;58 Suppl:75–80.
83. Suematsu M, DeLano FA, Poole D, Engler RL, Miyasaka M, Zweifach BW, et al. Spatial and temporal correlation between leukocyte behavior and cell injury in postischemic rat skeletal muscle microcirculation. *Lab Invest*. 1994 May;70(5):684–95.
84. Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2003 Oct;170(2):191–203.
85. Dunne JL, Ballantyne CM, Beaudet AL, Ley K. Control of leukocyte rolling velocity in TNF-alpha-induced inflammation by LFA-1 and Mac-1. *Blood*. 2002 Jan 1;99(1):336–41.
86. Bahra P, Rainger GE, Wautier JL, Nguyet-Thin L, Nash GB. Each step during transendothelial migration of flowing neutrophils is regulated by the stimulatory concentration of tumour necrosis factor-alpha. *Cell Adhes Commun*. 1998;6(6):491–501.

87. Vollmar B, Glasz J, Menger MD, Messmer K. Leukocytes contribute to hepatic ischemia/reperfusion injury via intercellular adhesion molecule-1-mediated venular adherence. *Surgery*. 1995 Feb;117(2):195–200.
88. Rubio-Gayosso I, Platts SH, Duling BR. Reactive oxygen species mediate modification of glycocalyx during ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. American Physiological Society; 2006 Jun 1;290(6):H2247–56.
89. Engström-Laurent A. Changes in hyaluronan concentration in tissues and body fluids in disease states. *Ciba Found Symp*. 1989;143:233–40–discussion240–7–281–5.
90. Engström-Laurent A. Hyaluronan as a clinical marker. ... tissue markers; 1989.
91. Gao L, Lipowsky HH. Composition of the endothelial glycocalyx and its relation to its thickness and diffusion of small solutes. *Microvasc Res*. 2010 Dec;80(3):394–401.
92. Heutinck KM, Berge ten IJM, Hack CE, Hamann J, Rowshani AT. Serine proteases of the human immune system in health and disease. *Mol Immunol*. 2010 Jul;47(11-12):1943–55.
93. Adachi T, Fukushima T, Usami Y, Hirano K. Binding of human xanthine oxidase to sulphated glycosaminoglycans on the endothelial-cell surface. *Biochem J*. Portland Press Ltd; 1993 Jan 15;289 (Pt 2)(Pt 2):523–7.
94. Carden D, Xiao F, Moak C, Willis BH, Robinson-Jackson S, Alexander S. Neutrophil elastase promotes lung microvascular injury and proteolysis of endothelial cadherins. *Am J Physiol*. American Physiological Society; 1998 Aug;275(2 Pt 2):H385–92.
95. Killackey JJF, Killackey BA. Neutrophil-mediated increased permeability of microcarrier-cultured endothelial monolayers: a model for the in vitro study of neutrophil-dependent mediators of vasopermeability. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. NRC Research Press Ottawa, Canada; 2011 Feb 13;68(7):836–44.
96. Lee CT, Fein AM, Lippmann M, Holtzman H, Kimbel P, Weinbaum G. Elastolytic activity in pulmonary lavage fluid from patients with adult respiratory-distress syndrome. *N Engl J Med*. 1981 Jan 22;304(4):192–6.
97. Wiedermann CJ. Clinical review: Molecular mechanisms underlying the role of antithrombin in sepsis. *Critical Care*. BioMed Central Ltd; 2006 Feb 13;10(1):209.
98. Strukova SM. Role of Platelets and Serine Proteinases in Coupling of Blood Coagulation and Inflammation. *Biochemistry (Moscow)*. Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers; 2004;69(10):1067–81.
99. Ozden A, Sarioglu A, Demirkan NC, Bilgihan A, Düzcan E. Antithrombin III

- reduces renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Res Exp Med (Berl)*. 2001 Mar;200(3):195–203.
100. Ozden A, Tetik C, Bilgihan A, Calli N, Bostanci B, Yis O, et al. Antithrombin III prevents 60 min warm intestinal ischemia reperfusion injury in rats. *Res Exp Med (Berl)*. 1999 Mar;198(5):237–46.
 101. Salvatierra A, Guerrero R, Rodriguez M, Alvarez A, Soriano F, Lopez-Pedreria R, et al. Antithrombin III prevents early pulmonary dysfunction after lung transplantation in the dog. *Circulation*. 2001 Dec 11;104(24):2975–80.
 102. Mizutani A, Okajima K, Uchiba M, Isobe H. Antithrombin reduces ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats by inhibiting leukocyte activation through promotion of prostacyclin production. *BLOOD-NEW ...* 2003.
 103. Feistritzer C, Kaneider NC, Sturn DH, Wiedermann CJ. Syndecan-4-dependent migration of human eosinophils. *Clin Exp Allergy*. Blackwell Science Ltd; 2004 May;34(5):696–703.
 104. Kaneider NC, Egger P, Dunzendorfer S, Wiedermann CJ. Syndecan-4 as antithrombin receptor of human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Sep 14;287(1):42–6.
 105. Horie S, Ishii H, Kazama M. Heparin-like glycosaminoglycan is a receptor for antithrombin III-dependent but not for thrombin-dependent prostacyclin production in human endothelial cells. *Thromb Res*. 1990 Sep 15;59(6):895–904.
 106. Uchiba M, Okajima K, Murakami K. Effects of various doses of antithrombin III on endotoxin-induced endothelial cell injury and coagulation abnormalities in rats. *Thromb Res*. 1998 Mar 1;89(5):233–41.
 107. Yamauchi T, Umeda F, Inoguchi T, Nawata H. Antithrombin III stimulates prostacyclin production by cultured aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989 Sep 29;163(3):1404–11.
 108. Rohling RG, Rentsch KM, Beck-Schimmer B, Fuchs-Buder T. Risk of recurarization during retransfusion of autologous blood withdrawn after injection of muscle relaxants: a comparison of rocuronium and mivacurium. *J Clin Anesth*. 2003 Mar;15(2):85–90.
 109. Mulivor AW, Lipowsky HH. Inhibition of glycan shedding and leukocyte-endothelial adhesion in postcapillary venules by suppression of matrixmetalloprotease activity with doxycycline. *Microcirculation*. Blackwell Publishing Ltd; 2009 Nov;16(8):657–66.
 110. Pries AR, Kuebler WM. Normal Endothelium. In: *The Vascular Endothelium I*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2006. pp. 1–40. (Handbook of Experimental Pharmacology; vol. 176/I).
 111. Loss of Endothelial Glycocalyx During Acute Hyperglycemia Coincides With

Endothelial Dysfunction and Coagulation Activation In Vivo. Diabetes. American Diabetes Association; 2006 Feb 1;55(2):480–6.

112. Kainulainen V, Wang H, Schick C, Bernfield M. Syndecans, heparan sulfate proteoglycans, maintain the proteolytic balance of acute wound fluids. *J Biol Chem.* 1998 May 8;273(19):11563–9.
113. Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol. Society for Leukocyte Biology;* 1994 May;55(5):662–75.
114. Massoudy P, Zahler S, Freyholdt T, Henze R, Barankay A, Becker BF, et al. Sodium nitroprusside in patients with compromised left ventricular function undergoing coronary bypass: Reduction of cardiac proinflammatory substances. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery.* 2000 Mar;119(3):566–74.

IX. Eidesstattliche Versicherung



Eidesstattliche Versicherung

Wiltfang, Elisabeth

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

_____ dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Einfluss aktivierter Leukozyten auf die Integrität der endothelialen Glykokalyx und Rückkopplung mit der intravasalen Adhäsionsrate Studien im ex-vivo Organmodell

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

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

München, 3.02.2019

Ort, Datum

Elisabeth Wiltfang

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand