

**Isolierung und funktionelle Charakterisierung
venulärer Endothelzellen aus
Meerschweinchenherzen**

Bernhard Heilmeier
2004

Aus dem Physiologischen Institut
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. U. Pohl

**Isolierung und funktionelle Charakterisierung
venulärer Endothelzellen aus
Meerschweinchenherzen**

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

vorgelegt von
Bernhard Heilmeyer
aus
Landshut
2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. S. Nees

2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. W.-M. Franz

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. R. Huss

Prof. Dr. Dr. U. Welsch

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 22.07.2004

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	15
2.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial	15
2.2. Lösungen	17
2.3. Methoden	19
2.3.1. Enzymatische Dissoziation von Myokardgewebe und Anreicherung von venulären Endothelzellen aus Meerschweinchenherzen	19
2.3.2. Reinigung von Primärkulturen venulärer Endothelzellen	22
2.3.3. Isolierung von Gefäßen aus Meerschweinchenherzen	25
2.3.4. Arterielle Blutentnahme vom Meerschweinchen	27
2.3.5. Isolierung reiner Granulozyten aus Meerschweinchenblut	28
2.3.6. Isolierung gewaschener Plättchen	29
2.3.7. Gewinnung einer zellfreien Lösung von Freisetzungprodukten gemeinsam aktivierter PMN und Plättchen	30
2.3.8. Zeitraffer-videomikrokinematographische Studien zur Dokumentation der Interaktionen venulärer Endothelzellen mit Blutzellen	30
2.3.9. Identifizierung und Charakterisierung der Endothelzellen, Gefäße und Myokardschnitte	33
2.3.9.1. Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie	33
2.3.9.2. Anfertigen von Meerschweinchenmyokardschnitten	33
2.3.9.3. Histochemischer Nachweis typischer Markerenzyme	34
2.3.9.4. Fluoreszenzfärbungen	35

3	ERGEBNISSE	37
3.1.	Histologische Untersuchungen	37
3.2.	Isolierung reiner Granulozyten aus Meerschweinchenblut	45
3.3.	Isolierung von Primärkulturen venulärer Endothelzellen	49
3.3.1.	Perfusionsapparatur	49
3.3.2.	Dichtegradientenzentrifugation	51
3.4.	Wachstumsverhalten und weitere Reinigung	53
3.4.1.	Primärkultur und Zellausbeute	53
3.4.2.	Reinigung der Primärkulturen venulärer Endothelzellen	54
3.5.	Histologische Charakterisierung	56
3.5.1.	Phasenkontrast	56
3.5.2.	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	57
3.5.3.	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	57
3.5.4.	Fluoreszenzfärbungen	59
3.5.5.	Enzymhistochemischer Nachweis von Dipeptidyl- Aminopeptidase IV	61
3.6.	Videokinematographische und rasterelektronenmikroskopische Beobachtung gezüchteter Endothelschichten unter dem Einfluß aktivierter Blutbestandteile	63
4.	DISKUSSION	75
4.1.	Histologische Untersuchungen zur Identifizierung von koronaren Venulen und daraus isolierten Endothelzellen	75
4.2.	Isolierung reiner Granulozyten und gewaschener Plättchen aus Meerschweinchenblut	78
4.3.	Isolierung von Primärkulturen venulärer Endothelzellen	80
4.4.	Interaktion mit Plättchen und Leukozyten und deren Überständen	84
4.5.	Ausblick	93

5. ZUSAMMENFASSUNG	100
6. LITERATURVERZEICHNIS	103
Danksagung	115
Lebenslauf	117

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ac-LDL	acetyliertes Low-Density-Lipoprotein
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
APC	aktiviertes Protein C
AT III	Antithrombin III
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
C	Celsius
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation
cm	Zentimeter
COX I	Cyclooxygenase I
DMEM	Dulbeccos modified eagle medium
ECPS	Endothelzell-Reinigungslösung
EDRF	endothelium derived relaxing factor (= NO)
ELAM	Endothelzell-Leukozyten Adhäsionsmolekül
etc.	et cetera/und so weiter
FACS	fluorescence-activated cell sorting/Fluoreszenz-aktivierte Zellseparation
FCS	foetales Kälberserum
FMLP	Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
Glut-1	Glucosetransporter 1
HC II	Heparin-Cofaktor II
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1/interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 (= CD54)
IE oder IU	internationale Einheit(en)
JAM	junctional adhesion molecule/junktionales

	Adhäsionsmolekül
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
lat.	lateinisch
LDL	Low-Density-Lipoprotein/Lipoprotein geringer Dichte
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen-1/funktions- assoziiertes Lymphozyten-Antigen 1 (= CD11a)
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
Ltr	Leukotriene
M.	Musculus
Mac-1	ein β_2 -Leukozyten Integrin (CD11b/CD18)
mbar	Millibar
mg	Milligramm
min	Minute(n)
Mio.	Million(en)
ml/ μ l	Milliliter/Mikroliter
μ m	Mikrometer
mM/ μ M	millimolar/mikromolar
MS	Meerschweinchen
N.	Nervus
NADPH	Nikotinamid-adein-dinukleotid-phosphat (reduziert)
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
pCO ₂	Kohlendioxid-Partialdruck
PECAM	platelet-endothelial cell adhesion molecule/Plättchen- Endothelzell Adhäsionsmolekül
PG I ₂	Prostaglandin I ₂ (= Prostazyklin)
PG H ₂	Prostaglandin H ₂

pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PL	Phospholipide
PMN	polymorphonukleäre Granulozyten
PSGL	P-Selectin Glycoprotein Ligand
RBC	rote Blutkörperchen
rpm	Umdrehungen pro Minute
TF	tissue factor/Gewebefaktor
TFPI	tissue factor pathway inhibitor/Gewebefaktor-Inhibitor
TPA	tissue-type plasminogen activator/gewebespezifischer Plasminogenaktivator
TxA ₂	Thromboxan A ₂
V.	Vena
VEC	venuläre Endothelzellen
vgl.	vergleiche
vWF	von Willebrand Faktor (Faktor VIII-Antigen)
z. B.	zum Beispiel
∅	Durchmesser
∅ _i	Innendurchmesser

1. Einleitung und Zielsetzung

Alle Blutgefäße des Kreislaufsystems sind auf ihrer Innenseite von vaskulärem Endothel ausgekleidet. Dieses seit den grundlegenden Untersuchungen der Anatomen Henle⁶⁶ (1841), Kölliker⁷⁸ (1855), Frey⁵⁰ (1859), Langer⁸⁷ (1865) und His⁶⁹ (1865) bekannte Gewebe wurde zunächst lange Zeit nur als eine cellophanähnliche Deckschicht ohne ausgeprägte Eigenaktivität angesehen, weil es bei alleiniger lichtmikroskopischer Untersuchung nur wenig strukturiert erscheint. Auch nach stärkerer Nutzung elektronenmikroskopischer Verfahren ab etwa 1950 änderte sich diese Sicht nicht wesentlich, obgleich es durch Einsatz spezieller Kontrastierungs- und Schneideverfahren gelang, nun viele ultrastrukturelle Details vaskulärer Endothelzellen herauszuarbeiten, die – wie zum Beispiel das weitverzweigte rauhe endoplasmatische Retikulum der typischen Endothelzelle – auf eine erhebliche Stoffwechselaktivität hinweisen. Außerdem stehen auch morphologische Verschiedenheiten des Endothels in den Endstrombahnen der einzelnen Organe ins Auge, die unterschiedliche Kapillarformen bedingen. Darauf fußend wurden verschiedene Klassifizierungsschemata für die entsprechenden Mikrogefäße entwickelt^{15,56,64}. Aber auch das Endothel der Arteriolen, die das Blut in ihre jeweils zugeordneten

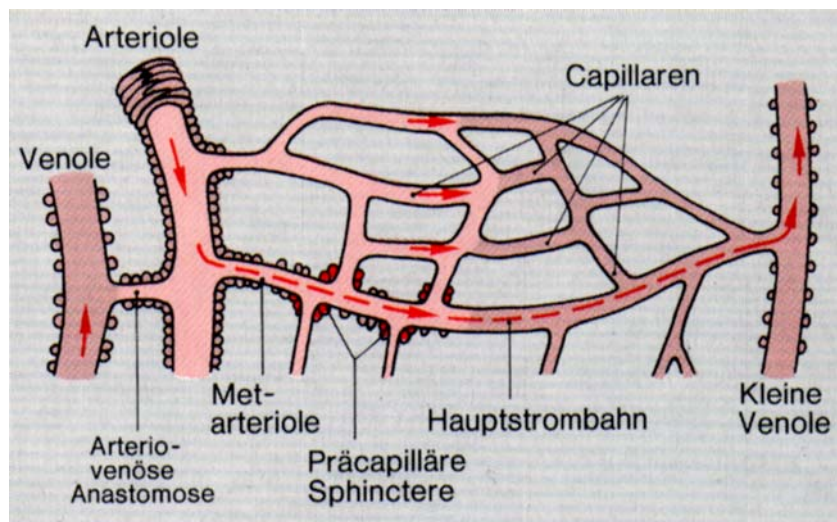


Abb. 1: Ausschnitt aus einem mikrovaskulären Gefäßnetz¹⁶².

Kapillarnetze leiten, unterscheidet sich schon in rein histologischer Sicht vom kapillären Endothel, und dieses wiederum vom Endothel der nachgeschalteten, das Blut aus den Kapillarnetzen abführenden Venulen^{84,130,134,147}.

Gegenüber Endothelzellen mikrovaskulären Ursprungs zeichnen sich Endothelzellen aus größeren Blutgefäßen (Arterien und Venen) durchweg durch hohe Konzentrationen eines sehr charakteristischen Organellums, sogenannte „Weibel-Palade-Körperchen“ aus, die sonst nur noch in den Blutplättchen vorkommen^{30,36,84,168}. Im Gegensatz zu den Endothelgeweben mancher Kapillararten sind die Interzellularspalten der Endothelauskleidung großer Blutgefäße (Arterien und Venen) durchweg durch einen hohen Organisationsgrad ihrer junktionalen Komplexe charakterisiert.

Zusammenfassend zu diesem kurzen, rein histologischen Exkurs soll also die Möglichkeit angedeutet werden, daß es sich beim vaskulären Endothel in seiner Gesamtheit weniger um ein einzelnes Gewebe, als vielmehr um ein aus verschiedenen Endothelgeweben bestehendes Organ handeln könnte. Um den anatomischen Begriff „Organ“ vollkommen auszufüllen, wäre allerdings auch noch der Nachweis spezifischer Funktionen in den Endothelzellgeweben der verschiedenen Kreislaufprovinzen vonnöten, die alle einer übergeordneten Aufgabe dienen: in diesem Fall dieser, ein idealer, das Blut ubiquitär im Körper verteiler, Thrombosen ständig vorbeugender und die Durchblutung auch aktiv mitregelnder Behälter zu sein. Außerdem sollte ein in zahllose Kapillarprovinzen ausgedehnter, bis an die Körperoberfläche ausgebreiteter und daher nicht nur extrem verletzungs-, sondern auch infektionsgefährdeter „idealer Blutbehälter“ auch über immunologische Abwehrmöglichkeiten verfügen, beziehungsweise diese rekrutieren können. Man erkennt schon jetzt, wie wichtig eine weitere Untersuchung der einzelnen Endothelspezifitäten auch in

medizinischer Hinsicht wäre. Allerdings sind Untersuchungen zur Aufklärung solcher Funktionen in situ kaum oder nur sehr schwer durchzuführen.

Im Jahre 1973⁷² wurde zum ersten Mal beschrieben, wie sich menschliche vaskuläre Endothelzellen aus einem langen, unverzweigten Gefäß (V. umbilicalis) auf relativ einfache Weise isolieren und anschließend in komplex zusammengesetzten Kulturmedien züchten lassen. Seither wurden Endothelzellen auch aus anderen, vorwiegend großen Blutgefäßen in Gewebekultur gebracht^{47,48,103,139}. Nun kann unter definierten in vitro – Bedingungen im Prinzip tatsächlich untersucht werden, was sich bisher nur von einigen weitsichtigen Forschern in funktioneller Hinsicht spekulieren ließ. Aufgrund vieler Studien ergab sich mittlerweile, daß der in mikroskopischer Hinsicht eher durch eine monotone Ultrastruktur gekennzeichnete Endothelzelltypus – unabhängig von seiner speziellen vaskulären Lokalisation – in biochemischer Hinsicht stets überraschend komplex ausgestattet ist. Eine große Palette von membrangebundenen Enzymen, Transportern und Rezeptoren machen alle vaskulären Endothelgewebe zu leistungsfähigen biochemischen Grenzflächenkatalysatoren, die einen großen Einfluß auf die Zusammensetzung des Blutes nehmen⁷⁴. Außerdem verfügt das Endothel auch über einen lebhaften intrazellulären Stoffwechsel, der durch hauptsächlich glykolytisch bereitgestellte Energie angefeuert wird³¹. Besonderes Gewicht erhalten diese Gegebenheiten in den mikrovaskulären, vor allem den kapillären und venulären Gefäßprovinzen. Dort steigt der Quotient aus Endotheloberfläche und Blutvolumen auf Spitzenwerte um 5000 cm^{-1} an: jeder Milliliter (in hunderten solcher Mikrogefäße) vorhandenen Blutes steht also mit einer endothelialen Katalysatorfläche von 5000 cm^2 in engstem Kontakt¹¹⁴.

Abb. 2 verdeutlicht noch einige weitere interessante Details zu den geometrischen Gegebenheiten in den verschiedenen Blutgefäßprovinzen.

Auf der Grundlage inzwischen weit fortgeschrittener Zellisolierungs- und Kultivierungsmethoden auch für Zellen aus der Mikrozirkulation, sensitiver gewordener biochemischer Analytik, und hochspezifischer immunologischer Färbeverfahren lassen sich mittlerweile einige Belege dafür finden, daß das Endothel in seinen verschiedenen Gefäßprovinzen alle Aufgaben wahrnimmt, die es in seiner Gesamtheit tatsächlich zu einem idealen Behälter für das Blut machen (siehe oben).

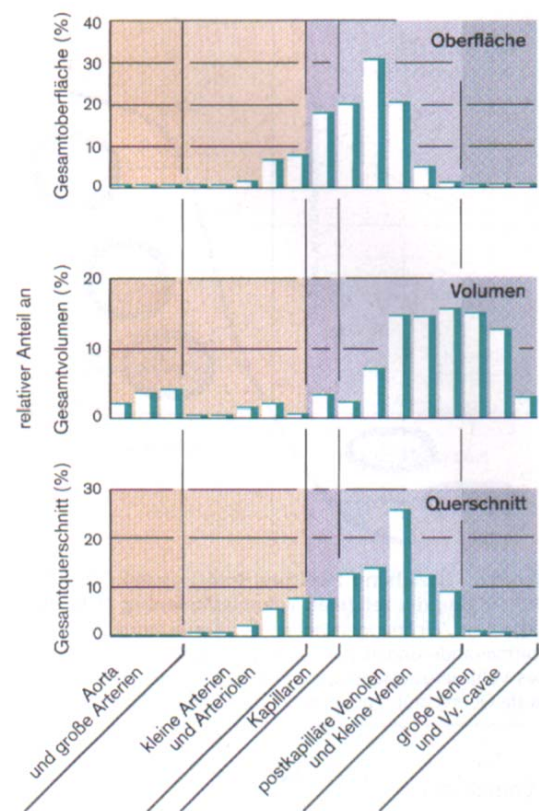


Abb. 2: Gesamtoberfläche, -volumen und -querschnitt in verschiedenen Gefäßprovinzen des Kreislaufsystems ⁵⁶.

Alle Endothelgewebe des Körpers haben zunächst einmal einen gemeinsamen funktionellen Nenner: ihre vielschichtig ausgeprägte, durch aktive Stoffwechsellleistungen kontinuierlich aufrechterhaltene Antithrombogenität. Sie sichert auf aktiv betriebene und komplex angelegte Weise die elementarste Anforderung an den oben erwähnten „idealen Blutbehälter des Körpers“: nämlich das Blut flüssig und damit überhaupt immer wieder verteilungsfähig zu machen und zu halten.

Wie Abb. 3 zeigt, spielt sich die endotheliale Antithrombogenität auf drei Funktionsebenen ab^{59,163}. „Antiaggregatorische“, also Plättchen-hemmende Endothelaktivitäten betreffen die ständige Synthese und Abgabe von Adenosin, Prostazyklin PGI_2 und Stickstoffmonoxid. „Antikoagulatorische“, also

gerinnungshemmende Endothelfunktionen fußen auf der ständigen Freisetzung von Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI), der Bindung und Aufnahme aktiver Gerinnungsfaktoren aus dem Plasma über Heparin/Antithrombin III – Komplexe in die Endothelzellen, und der Aktivierung von Protein C, das die aktivierten Gerinnungsfaktoren V_a und $VIII_a$ proteolytisch inaktiviert. Schließlich verfügt das Endothel über stimulierbare Synthese von Plasminogenaktivator vom Gewebetyp auch noch über eine stark „profibrinolytische“, also Fibringerinnsel auflösende Potenz.

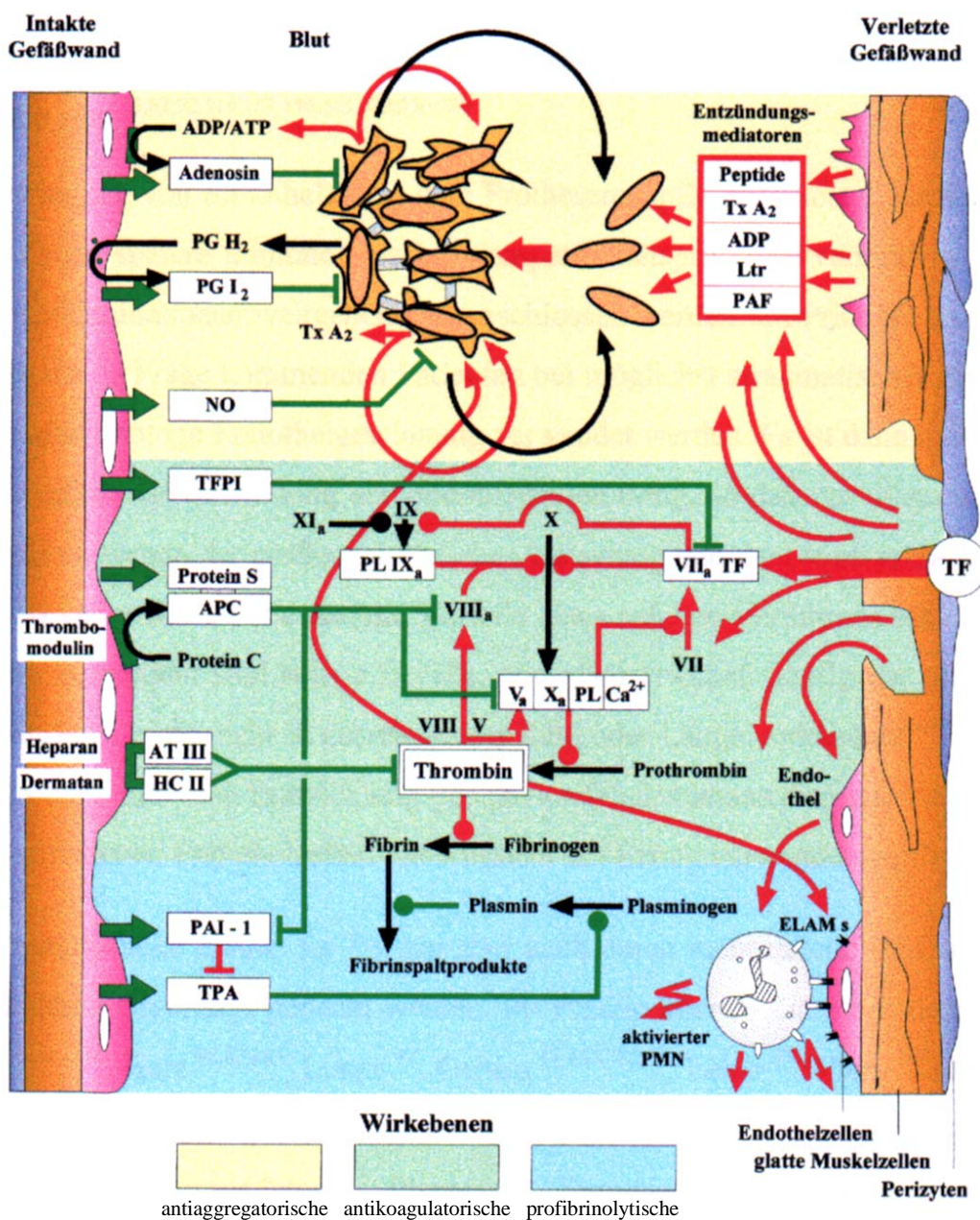


Abb. 3: Schematische Darstellung antithromogener Endothelfunktionen auf drei Wirkebenen (Das Schema wurde der Dissertationsschrift meines Kollegen Martin Thallmair¹⁵⁵ entnommen).

Auch die strikte und gegen die herrschenden Scherkräfte an der Endotheloberfläche ständig aktiv zu behauptende Geschlossenheit des vaskulären Endothelverbandes ist noch als eine wesentliche Komponente der Antithrombogenität jeder gesunden Gefäßwand anzuführen: denn in unmittelbarer Nachbarschaft zum Blutstrom – häufig in den Kapillarbereichen nur durch das hauchdünne Endothel vom Intravasalraum abgetrennt – sind stark prothrombogene Strukturen angeordnet⁴⁵, die im Falle einer Verletzung die lebenswichtige Aufgabe besitzen, möglichst rasch die Hämostase herbeizuführen. Neben Strukturproteinen wie den verschiedenen Kollagenarten, dem Fibronectin und dem von Willebrand Protein als Aktivator und Bindungspartner der Plättchen kommt im Zusammenhang mit der Hämostaseinduktion vor allem dem Gewebefaktor¹²³ eine entscheidende Rolle zu. Alle physiologisch und klinisch relevanten Koagulationsprozesse werden heutzutage auf den Kontakt des Blutes mit diesem biochemisch und molekularbiologisch gut charakterisierten Membranprotein zurückgeführt, das rasch zur Bildung von Thrombin führt und damit nicht nur eine schnelle und kräftige Aktivierung der Plättchen bedingt, sondern auch die Formung stabiler Fibrinkoagel⁸¹. Einige Ergebnisse weisen darauf hin, daß Gewebefaktor in besonders hoher Konzentration auf den mikrovaskulären Perizyten exprimiert wird, die sich den in jedem Organgefüge ubiquitär verbreiteten Kapillaren und Venulen auf ihrer adventitiellen Oberfläche anschmiegen^{21,114} (vgl. auch Abb. 7).

Weitere im Rahmen seiner Blutbehälterfunktion wichtige Funktionen entfaltet das vaskuläre Endothel physiologischerweise aber nur in ganz bestimmten Abschnitten der Mikrozirkulation. Zum Beispiel spielt das Endothel der Arterien, ganz besonders der Arteriolen eine wesentliche Rolle an der Blutfluß- und damit Blutdruckregulation. So wird die vasodilatierende Wirkung einer ganzen Reihe intravaskulär unter verschiedenen Bedingungen gebildeter oder anfallender Substanzen durch endotheliale Synthese und basale Freisetzung von

Stickstoffmonoxid vermittelt. Oft wirken dieselben Substanzen bei adventitieller Applikation – dann über glattmuskuläre Rezeptoren und Signaltransduktionssysteme vermittelt – jedoch als Konstriktoren: ein Effekt, der früher in der Pharmakologie als „paradoxe Wirkung“ bestimmter vasoaktiver Substanzen – wie zum Beispiel von Acetylcholin – diskutiert wurde^{53,54,125}. Außerdem können arterioläre und wohl auch kapilläre Endothelzellen über elektrische Synapsen (gap junctions) Potentiale an Nachbarzellen vermitteln, über analoge „myoendotheliale Zellverbindungen“ ebenfalls auf elektrotonischem Wege sogar auch an die benachbarte Arteriolenmuskulatur^{14,43,68,141,145,147,164}. Immer stärker ergibt sich beim Lesen entsprechender Fachliteratur der Eindruck, daß im wahrsten Sinne des Wortes in den Organen ein „mikrovaskuläres Internet“ existiert, das unter entscheidender Beteiligung des vaskulären Endothels einer ständigen und sofortigen Feineinstellung der Organdurchblutung dient, möglicherweise aber auch noch der Regulation anderer vaskulärer Funktionen.

Neben einer immer deutlicher werdenden Involvierung in die eben erwähnte Blutflußregulation, hat das kapilläre Endothel in seinen verschiedenen Organprovinzen vor allem die zentrale Funktion, den Stoffaustausch zwischen dem Intra- und Extravasalraum zu steuern und auf diese Weise die Ausbildung ganz spezieller interstitieller Milieus in den Parenchymgeweben – zum Beispiel in der Wand größerer Blutgefäße – zu ermöglichen. Auch hier hat sich längst erwiesen, daß die entsprechend spezialisierten Endothelgewebe alles andere sind als passive Diffusionsbarrieren. Vielmehr wird der Stoffaustausch – wie Abb. 4 und 5 stark vereinfacht zeigen – auf mehreren möglichen Routen durch die jeweilige endotheliale Gewebearchitektur vorgegeben und, wie ebenfalls immer deutlicher wird, über bestimmte Transportmechanismen fein reguliert. In den kontinuierlichen, extrem dichten Kapillaren fast aller Teile des Gehirns gibt es jedoch kaum parazelluläre oder vesikuläre Transportwege (vgl. Abb. 4 und 5). So kann – um ein Beispiel zu nennen – Glukose nur dann vom Blut ins Gehirn

gelangen, wenn das Endothel der Hirnkapillaren auf seiner apikalen und basalen Oberfläche spezielle Membrantransporter (vom Typ Glut-1) zur Verfügung stellt¹⁹.

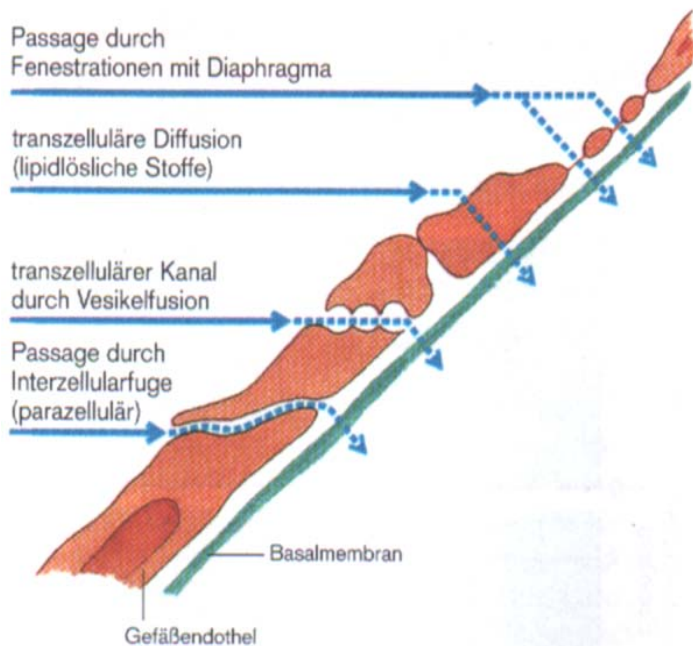


Abb. 4: Wege der Stoffpassage durch Gefäßendothel⁵⁶. Nicht im Schema dargestellt sind Membrantransporter, die in kontinuierlichen Kapillaren (siehe Abb. 5) die hauptsächlichsten transendothelialen Stoffaustauschrouten darstellen.

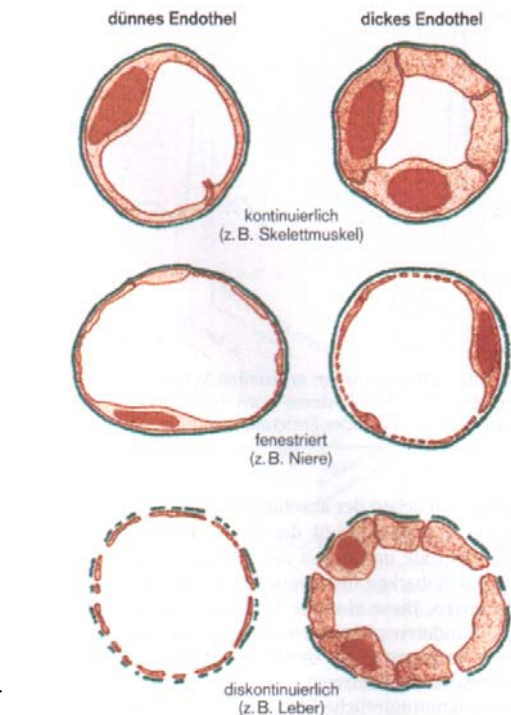


Abb. 5: Verschiedene Kapillartypen⁵⁶.

Versucht man, auch dem venulären Endothel (venula = lat. Verkleinerungsform von „Vena“) in aller Knappheit herausragende physiologische Spezialfunktionen zuzuordnen, stößt man auf seine im wahrsten Sinne des Wortes richtungsweisende Beteiligung bei der Rekrutierung der Immunabwehr. Diese realisiert sich auf zwei sehr unterschiedlichen funktionellen Ebenen: zum einen ist speziell das venuläre Endothel durch eine auffällige Kontraktilität gekennzeichnet⁶², zum anderen zeichnet sich venuläres Endothel vor allem auch dadurch aus, daß es – durch den Kontakt mit Entzündungsmediatoren, wie zum Beispiel PAF, induziert – zur schrittweisen Entfaltung vieler heute genau differenzierbarer Leukozyten-adhäsionsproteine befähigt ist (vgl. Abb. 6)

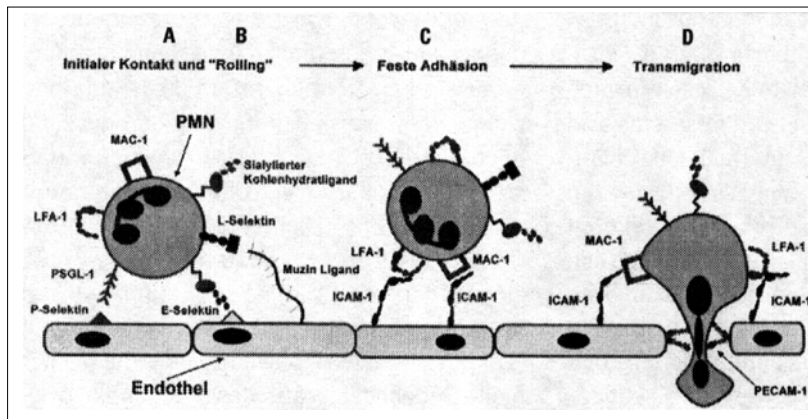


Abb. 6:

Das 4-Stufen-Modell der Rekrutierung von Leukozyten, dargestellt für die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten¹⁰⁵. Im Verlauf hier nur angedeuteter Interaktionen spezifischer endothelialer und leukozytärer Membranstrukturen wird ein

immer intensiver werdender Kontakt zwischen den beteiligten Zellarten hergestellt. Im Endeffekt wird so die Emigration der Leukozyten durch die aktiv geöffneten Zellspalten des venulären Endothels ermöglicht.

Vor dem Hintergrund dieser neueren funktionellen Erkenntnisse erscheint es erstaunlich, daß in der Literatur heute immer noch fast ausschließlich von „dem Endothel“ oder „dem Endothelgewebe“ gesprochen wird und funktionell ausgerichtete, oft auf spezielle Strombahnen (überwiegend arterielle und arterioläre) zielende Aussagen fast ausschließlich auf experimentellen Untersuchungen basieren, die vorwiegend in Kulturen von Zellen aus der V. umbilicalis durchgeführt werden und die deshalb nicht unbedingt zuverlässige Aussagen über typische arterielle oder arterioläre Endothelfunktionen machen können. Dies hat sicherlich zunächst einmal methodische Gründe, weil sich Nabelschnurvenenendothel relativ einfach isolieren und züchten läßt. Ein wenig besteht in der Literatur aber auch die Tendenz, unangenehme (weil mit ungleich höheren experimentellen Anforderungen verbundene) Sachverhalte zu verdrängen. So besteht möglicherweise die Gefahr, daß durch Bevorzugung der Untersuchungen von Endothelzellen makrovaskulärer Herkunft wichtige funktionelle Aspekte der Mikrozirkulation verloren gehen, vor allem was die Spezialisierung und die daran erwachsende Kooperativität der verschiedenen Gefäßsegmente anbelangt. Überblickt man die entsprechende Fachliteratur, wird bisher tatsächlich nur sehr wenig diskutiert und im Rahmen physiologischer und pathophysiologischer Funktionsmodelle in Erwägung gezogen, daß es ein Zusammenwirken der verschiedenen Mikrogefäßstrecken im Rahmen wichtiger

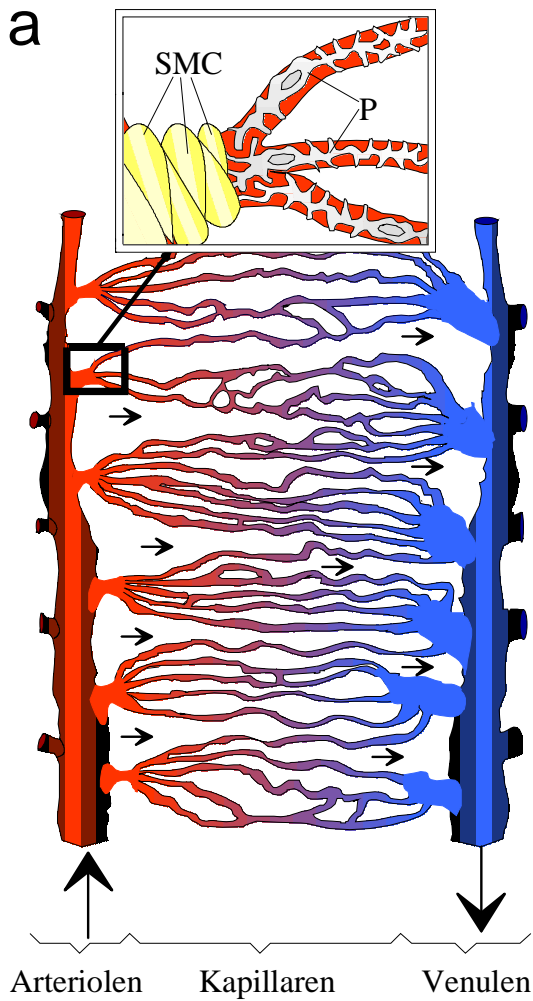


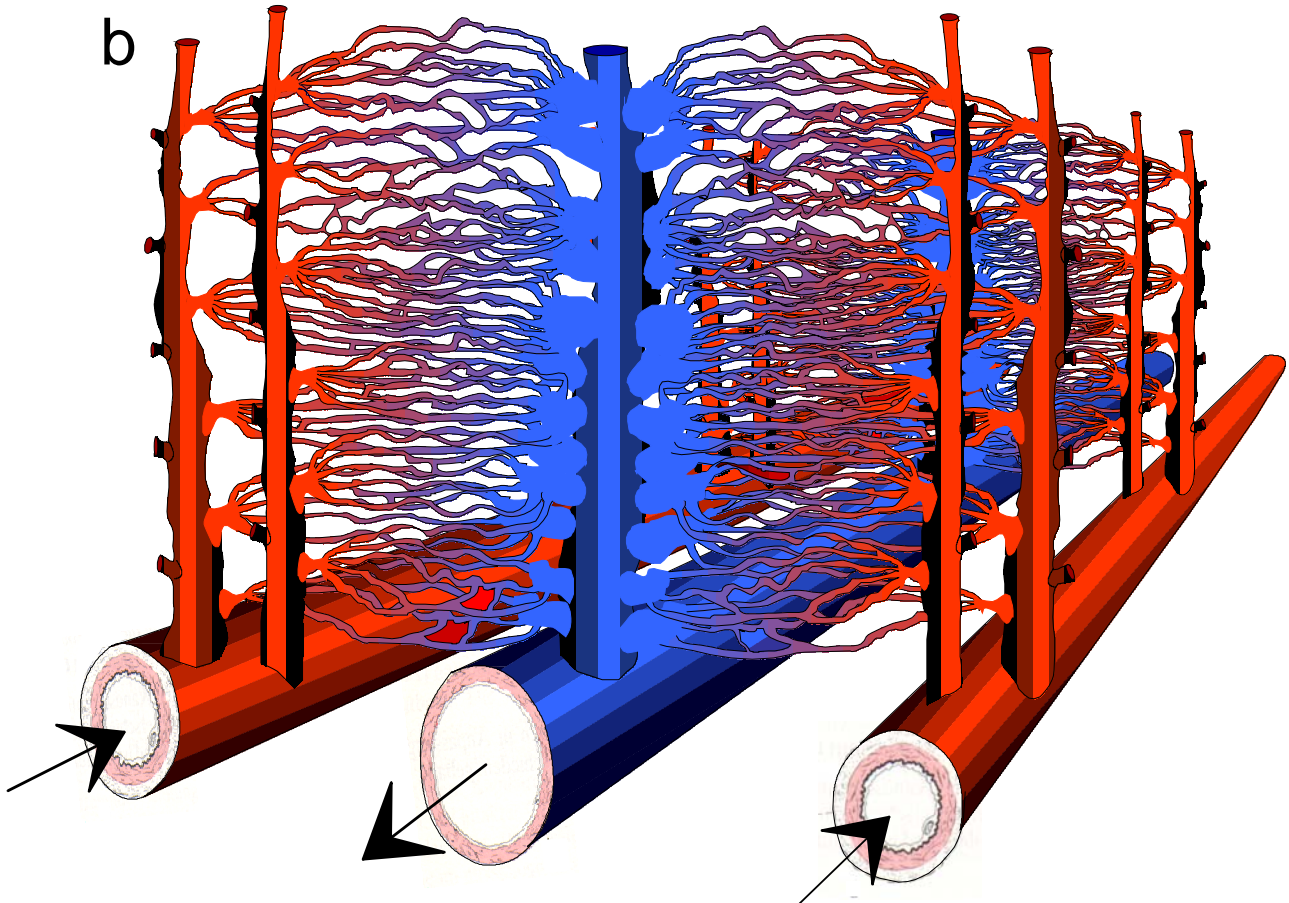
Abb. 7:

Schematische Darstellung architektonischer Zusammenhänge im Bereich der Endstrombahnen des Koronarsystems des Meerschweinchens.

a) Kleinste funktionelle Einheit des Koronarsystems: Eine zuführende Endarteriole mit zugehörigen Kapillarnetzen und einer ableitenden Venule.

Das vergrößerte Rahmenbild zeigt für ein markiertes Mikrogefäßareal die adventitiell angelagerten Perizyten, die in der Mikrovaskulatur des Herzens besonders zahlreich sind (P = Perizyten, SMC = glatte Muskelzellen).

b) Dreidimensionale Darstellung mehrerer kleinster Funktionseinheiten mit ihrer Anbindung an zwei größere Zuführungsarterien und eine Ableitungsvene zur Verdeutlichung der bizarren, Ingwerknollen-ähnlichen Architektur der postkapillären Venulenkonglomerate im Meerschweinchenherzen ^{24,86}.



Funktionskomplexe der Endstrombahnen geben könnte.

Hält man sich aber vor Augen, daß die Mikrozirkulationssysteme der Organe nicht ausschließlich – wie es viele schematischen Darstellungen in Büchern und Zeitschriften zunächst nahelegen (vgl. Abb. 7a) – zweidimensional aufgebaut, sondern in überaus zahlreichen Ebenen einander dreidimensional zugeordnet sind (vgl. Abb. 7b und die Abbildungsfolge im Diskussionskapitel 4.5.), so wird sofort deutlich, daß räumlich bedingte sofortige Kooperationsmöglichkeiten zwischen den verschiedenen Gefäßtypen möglich sind, in denen dann gerade auch die bisher vergleichsweise wenig erforschten Venulen wichtige Rollen spielen. Wird zum Beispiel das hochspezialisierte, kontraktile Endothel einer Venule im Verlauf einer Infektion durch Freisetzungserzeugnisse eingedrungener Bakterien aktiviert, kommt es zur Öffnung seiner Zellspalten und es resultiert – wie man von Beobachtungen blutperfundierter Endstrombahnen her schon sicher weiß – sofort ein entzündliches Ödem. Dabei eingeschwemmte Gerinnungsfaktoren könnten nun an der Oberfläche der Perizyten auf den umliegenden Kapillaren aktiviert werden und einen Gerinnungsprozeß induzieren, der schließlich den Entzündungsherd (vor allem durch venuläre Mikrothrombosen) vom übrigen Kreislauf abklemmt. Tatsächlich ist den Pathologen schon lange bekannt, daß das Zentrum eines akuten Entzündungsherdes fast immer von der Durchblutung ausgenommen ist (in den verfügbaren Lehrbüchern findet sich aber dafür nie eine Erklärung).

Normalerweise auf den Intravasalraum beschränkte, gefäßaktive und bei intraluminaler Applikation durch Vermittlung des Gefäßendothels vasodilatierende Substanzen könnten in dieser Situation nun vom Interstitium her an den umliegenden Arteriolen gefäßkonstriktiv wirken. Solche Prozesse würden dann auch durch Freisetzungserzeugnisse der durch das venuläre Endothel rekrutierten und in der Folge emigrierenden Leukozyten noch verstärkt. Außerdem würde sich auch der in ödematösem Gewebe hohe interstitielle Druck

stark durchblutungsmindernd auswirken. In die weitere Umgebung dieses Gewebebezirkes diffundierende Metabolite aus dem im Herdbereich nekrotisch werdenden Gewebe, wie zum Beispiel hochkonzentriertes Adenosin oder Kaliumionen, könnten zu der ebenfalls in der Medizin schon lange bekannten Hyperämie, beziehungsweise dem Schmerz in der Randzone um einen Entzündungsherd führen.

Immer mehr Bedeutung wird den venulären Endothelzellen neuerdings auch im Rahmen der hämatogenen Metastasierung bestimmter Tumoren beigemessen. Dabei müssen die Tumorzellen zunächst in die Blutbahn einbrechen (Invasionsphase) – bei Sarkomen, follikulären Schilddrüsen- und Nierenzellkarzinomen meist durch direkte Arrosion von Gefäßwänden, bei anderen hämatogen metastasierenden Tumoren häufig jedoch auch über den lymphogenen Weg¹³⁷. Einzelne maligne Zellen werden im Blut meist innerhalb von 24 Stunden zerstört. Verklumpen jedoch mehrere Tumorzellen miteinander und umgeben sie sich mit einem schützenden Fibrinmantel, so können sie als Tumoremboli in der Blutbahn verschleppt werden und bleiben meist in präkapillären Arteriolen stecken (Embolisierungsphase). Wandern nun einzelne Tumorzellen aus einem Tumorembolus aus, so können sie in das postkapilläre Venulumbett gelangen. Die malignen Zellen könnten nun mit den kontraktilen und mit zahlreichen Oberflächenproteinen ausgestatteten venulären Endothelzellen in Interaktion treten und so eine aktive Öffnung ihrer interendothelialen Verbindungen veranlassen. Der Weg für die Auswanderung aus der Blutbahn wäre dann frei (Implantationsphase).

Meist in vivo durchgeführte Untersuchungen haben allerdings schon gezeigt, daß die malignen Zellen in der Regel andere Adhäsionsproteine nutzen als auswandernde Leukozyten und daß das bei Leukozyten zur Adhäsion führende sogenannte „Rolling“ bei Tumorzellen an der venulären Endotheloberfläche nicht stattfindet^{8,156,159}. Neuere Nachforschungen konnten bisher nicht gekannte

Oberflächenantigene des venulären Endothels ausmachen und durch deren Blockade die erwartete Inhibition hämatogener Metastasierung erreichen¹¹.

An diesen hier nur stark vereinfacht und noch sehr spekulativ dargestellten Prozessen zeichnet sich die Möglichkeit ab, daß besonders auch dem venulären Endothel in klinischer Hinsicht außerordentlich großes, eine nähere Erforschung herausforderndes Interesse zukommt. Die wichtigste Vorbedingung zur vertieften Untersuchung venulärer Funktionen unter reproduzierbaren in vitro Bedingungen wäre allerdings die selektive Isolierung und Kultivierung dieses zunächst einmal schwer zugänglichen Endotheltyps unter Aufrechterhaltung seiner charakteristischen Merkmale, damit entsprechende in vitro Studien unter reproduzierbaren Bedingungen möglich werden. Dies wurde in der Vergangenheit schon mehrfach versucht^{103,141}, die in der Literatur aufgefundenen Berichte überzeugen allerdings nicht sehr, da sie sich – wie Computer-recherchen nahelegen – offenbar von anderen Untersuchern nicht reproduzieren ließen. Außerdem läßt sich gegen diese Berichte heutzutage einwenden, daß die entsprechenden Zellpräparate in immunologischer und zellbiologischer Hinsicht nur ungenügend identifiziert und charakterisiert worden sind.

Die geschilderten Zusammenhänge weckten in mir das Interesse, gerade diese venulären Endothelzellen selektiv zu isolieren, in Gewebekultur zu etablieren und anschließend mit geeigneten mikroskopischen Methoden in Hinblick auf ihre Interaktionen mit Blutzellen – vorwiegend neutrophile Granulozyten und Plättchen – zu beobachten. Neutrophile Granulozyten und Thrombozyten lassen sich akut durch Entzündungsmediatoren aktivieren und sie kooperieren aufs engste in metabolischer Hinsicht^{9,44,105}. Es ist aber noch weitgehend unbekannt, wie sie eventuell durch bestimmte Freisetzungserzeugnisse auch Einfluß auf Endothelgewebe nehmen. Hochinteressant in solchen Zusammenhängen

erschien auch die Frage, ob und wie sich derartige zelluläre und humorale Interaktionen pharmakologisch beeinflussen lassen.

Als Ausgangsorgan zur selektiven enzymatischen Isolierung von Venulen beziehungsweise deren Endothel bot sich im Rahmen meiner geplanten Untersuchungen das Meerschweinchenherz an, das am Physiologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität seit langem als isoliert perfundiertes Versuchspräparat zur Verfügung steht. Im Arbeitskreis von Professor Nees gibt es dort außerdem langjährige Erfahrung mit der Isolierung und Züchtung aller möglichen Gefäßwandzellen. Aus dieser Arbeitsgruppe erhielt ich auch schon vor Beginn meiner Experimente wertvolle Anregungen und Literaturhinweise.

Folgende Zielsetzungen wurden für die vor diesem Hintergrund geplante Dissertationsarbeit schließlich formuliert:

1. Entwicklung geeigneter Methoden zur Isolierung venulärer Endothelzellen aus Meerschweinchenherzen.
2. Etablierung und Vermehrung dieser Zellen in Reinkultur.
3. Histochemische Identifizierung dieser Zellen.
4. Isolierung reiner Granulozyten aus Meerschweinchenblut zur Durchführung der Interaktionsstudien im homologen System.
5. Aufbau videomikrokinematographischer Untersuchungssysteme zur Darstellung und Dokumentation kinetischer Zusammenhänge.
6. Untersuchung der Wirkung ausgewählter Flavonoide auf die Interaktion von Blutkomponenten mit gezüchtetem venulären Endothel.
7. Versuch der Einbringung der gemachten experimentellen Beobachtungen in ein venulär dominiertes Funktionsmodell der Pathogenese akut entzündlicher Zellinteraktionen.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Die folgenden Chemikalien und Materialien finden sich nach verschiedenen Verwendungsaspekten geordnet. Die Bezugsfirmen sind jeweils alphabetisch geordnet.

Isolierung und Reinigung von Endothelzellen und Isolierung von Gefäßen

- Sterile Kulturschalen 35 mm und 60 mm von Falcon, Becton Dickinson, Lincoln Park, USA;
- Dispase II, Kollagenase D von Boehringer, Mannheim;
- Sterile 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml Einmalspritzen und Kanülen von Braun, Melsungen;
- Dulbeccos Modified Eagle Medium, Foetales Kälberserum (FCS), L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin von Gibco, Paisley, Schottland;
- Sterile 15 ml und 50 ml Zentrifugenröhrchen von Greiner, Frickenhausen;
- Viton- und Silikonschläuche von Labokron, Sinsheim;
- Carbogen[®] (95 % O₂, 5 % CO₂) von Linde, München;
- Sterilfilter Millex-GS (Porenweite 0,22 µm) von Millipore S.A., Molsheim, Frankreich;
- Fragmin[®] (10.000 I.E./ml) von Pharmacia GmbH, Erlangen;
- Sephadex[®] G 75 von Pharmacia, Uppsala, Schweden;
- Endothelial Cell Basal Medium mit SupplementPack C-39210 (ECGS/H 2ml, FCS 10 ml, hbFGF 0,5 µg/500 µl, HC 500 µg/500 µl, hEGF 0,05 µg/500 µl, Amphotericin B 25 µg/500 µl, Gentamycin 25 mg/250 µl) von PromoCell, Heidelberg;
- Faltenfilter von Schleicher & Schuell, Dassel;
- Trypsin (1:250) von Serva, Heidelberg;
- Kreatin, Hepes (N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]),

Percoll, D(-)Ribose, Rinderalbumin, Sililierungsmittel „Sigmacote“, Taurin, Trypsin, Trypsininhibitor (1 mg inhibiert 1,7 mg Trypsin) von Sigma, St. Louis, USA;

- Rundfilter (Durchmesser 2,3 cm) von Whatman;
- Diverse Flavonoide im eingestellten Gemisch des Medikaments „Venoruton®“ der damaligen Zyma GmbH, München, heute: Novartis Consumer Health SA, Nyon, Schweiz;
- Meerschweinchen (MS): Full Barrier von Harlan, Borcheln;

Arterielle Blutentnahme vom Meerschweinchen und Isolierung von Granulozyten und Plättchen

- Rompun 2 % von Bayer AG, Leverkusen;
- Adenosindesaminase von Boehringer, Mannheim;
- Natriumcitratlösung 3,13 % von Fresenius AG, Bad Homburg;
- Polyethylenschlauch (Ø 0,58 mm, REF. 800/110/200/100) von Hythe, Kent, England;
- Polymorphprep™ von Nycomed Pharma AS, Oslo, Norwegen;
- Ketamin-ratiopharm® 100 O.K. (50 mg/ml) von ratiopharm GmbH & Co, Ulm;

Videomikroskopie

- Flavonoidgemisch „Venoruton®“: siehe oben;
- Kamera-Kontroll-Einheit (Modell MC-1002) von AVT-Horn, Aalen;
- Thermostat von Bühler, Tübingen;
- SVHS Videorecorder (Modell AG-6720A) von Panasonic;
- Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin (FMLP), Thrombin (From Human Plasma) von Sigma, St. Louis, USA;
- Monitor (Modell PVM-1442QM) von Sony;
- Lichtmikroskop (Axiovert 35) von Zeiss, Oberkochen;

Identifizierung und Charakterisierung von Endothel und Gefäßen

- N,N-Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid (DMSO), Echtblausalz B, Fast Blue BB Salz, Gly-Pro 4 Methoxy- β -Naphthylamid (Prolinpeptid), Naphtol AS-MX Phosphat von Sigma, St. Louis, USA;

Alle weiteren Chemikalien in p. A.-Qualität von Merck, Darmstadt.

2.2. Lösungen

Die aufgeführten Lösungen sind nach Verwendungsaspekten gegliedert und nach ihren Anfangsbuchstaben alphabetisch geordnet.

Isolierung und Reinigung von Endothelzellen und Isolierung von Gefäßen

- Dulbeccos-Medium (DMEM): Dulbeccos Modified Eagle Medium, L-Glutamin 2 mM, Penicillin 200 IE/ml, Streptomycin 20 μ g/ml, FCS 10 % v/v;
- Earlsalzlösung (ES): NaCl 142 mM; KCl 5,4 mM; NaH₂PO₄ 1 mM; MgSO₄ 0,8 mM; D-Glucose 5,5 mM in bidestilliertem H₂O; eingestellt auf pH 7,4;
- Endothelial Cell Purification Solution I (ECPS I): Wirkstoff zur Entfernung nichtendothelialer Zellen, von Prof. Nees zur Verfügung gestellt (Herstellung beschrieben in 2.3.2.), angesetzt in PC_{min};
- Hepes gepufferte ES-Lösung (HES): ES mit Zusatz von Hepes 25 mM;
- Krebs-Ringer-Spezial-Lösung (KRS): NaCl 127 mM; KCl 4,6 mM; MgSO₄ 1,1 mM; KH₂PO₄ 1,2 mM; Glucose 8,3 mM; NaHCO₃ 24,8 mM; Pyruvat 2 mM; Kreatin 10 mM; Taurin 20 mM; Ribose 5 mM; Asparaginsäure 2 mM; L-Glutamin 2 mM; L-Arginin 1 mM und Harnsäure 0,05 mM in bidestilliertem H₂O;
- Kalziumhaltige Krebs-Ringer-Spezial-Lösung (KRS_{Ca}): KRS mit 2,5 mM CaCl₂;
- Percoll-Stammlösung (90 %-ige Percolllösung): 18 Volumenteile Percoll, 1Teil Earlsalz(20x)-Konzentrat (NaCl 2,33 M; KCl 108 mM; NaH₂PO₄ 20

- mM; MgSO₄ 16 mM; D-Glucose 110 mM; bidestilliertes H₂O als Lösungsmittel, keine pH-Einstellung), 1 Teil Hepes (20x)-Konzentrat (Hepes 500 mM; Rinderalbumin 2 % w/v; bidestilliertes H₂O als Lösungsmittel; Einstellung des pH-Wertes auf 7,2);
- Weitere Percoll-Verdünnungen (73 %, 60 %, 52 %, 40 %, 30 %, 22,25 %, 20 %) wurden aus der Percoll-Stammlösung durch Zugabe von HES hergestellt;
 - Phosphat gepufferte physiologische Kochsalzlösung (PBS): NaCl 7,7 g/l, NaH₂PO₄ 0,7 g/l, eingestellt auf pH 7,4;
 - PromoCell-Vollmedium (PC): Endothelial Cell Basal Medium, SupplementPack C-39210, FCS 10 % v/v, Penicillin/Streptomycin 2% v/v;
 - PromoCell-Minimalmedium (PC_{min}): PC ohne FCS und ECGS/H;
 - Proteaselösung I: Kollagenase D 1,0 mg/ml; Dispase II 1,5 mg/ml; Trypsin 0,8 mg/ml und Rinderalbumin 1,5 mg/ml in KRS. Die in 2 ml KRS gelöste Kollagenase wurde durch Säulenchromatographie und KRS als Elutionspuffer vorgereinigt: Durchmesser 26 mm, 14 cm Säulenbett aus Sephadex® G 75. Nach einem Vorlauf von 14 ml wurden die nächsten 17 ml Eluat gesammelt.
 - Proteaselösung II: Kollagenase D 1,0 mg/ml (Vorreinigung analog zu Proteaselösung I); Trypsin 0,8 mg/ml; Rinderalbumin 0,75 mg/ml; Flavonoide 100 µM und ASS 100 µM in KRS.
 - Trypsin/EDTA: Trypsin 0,5 mg/ml und EDTA 0,2 mg/ml in PBS;
 - Trypsininhibitorlösung: 0,08 mg/ml Trypsininhibitor und 0,37 mg/ml CaCl₂ in DMEM gelöst;

Arterielle Blutentnahme vom Meerschweinchen und Videomikroskopie

- ASS-Lösung: Acetylsalicylsäure 10 mM in ES;
- EDTA-Lösung: Äthylendiamintetraessigsäure 50 mg/ml in PBS;

2.3. Methoden

2.3.1. Enzymatische Dissoziation von Myokardgewebe und Anreicherung von venulären Endothelzellen aus Meerschweinchenherzen

Verwendet wurden 250-900 Gramm schwere MS entweder sofort im Anschluß an die arterielle Blutentnahme oder nachdem sie durch Nackenschlag getötet worden waren. Nach Eröffnung von Abdomen und Thorax wurde der Herzbeutel abpräpariert und eine sterile Kanüle durch einen kleinen Einschnitt bis kurz vor die Abgänge der Koronararterien in die Aorta eingeführt und dort mit einem Faden fixiert. Nun konnte das Herz exzidiert und mit dem bereits durchströmten Auslaß des Durchlauferwärmers (A) verbunden werden (vgl. Abb. 24, die auch weitere Details dieser Methodik illustriert). Der Truncus Pulmonalis wurde eröffnet. Das Koronarsystem wurde von nun an unter gleichbleibend hohem Druck (160 mbar) mit unterschiedlichen Lösungen perfundiert: 5 min lang mit KRS_{Ca} , dann mit KRS. Nach dem Sistieren der Herzaktion wurden die Lungenvenen möglichst distal ligiert, um auch bei später unter der Einwirkung der Proteasen undicht werdenden Aorten- und Mitralklappen eine dauerhafte Koronarperfusion zu gewährleisten. Gleich danach wurde das kontinuierlich weiterperfundierte Herz in ein mit 30 %-iger Percoll-Verdünnung (gleiche Dichte wie Ventrikelmyokard) gefülltes 50 ml Zentrifugenröhrchen (C) überführt. Nach 15 sekundiger Perfusion mit Proteaselösung I wurde Schlauchklemme (I) geschlossen und die peristaltischen Pumpe (E) angeschaltet, so daß die Enzymlösung das vorher schon weit aufgedehnte Koronarsystem mit 1 ml/min unter gleichem Perfusionsdruck weiter durchströmte.

Nach 40 min Enzymperfusion wurde das Herz aus dem Falconröhrchen (C) entnommen, rasch auf eine sterile Teflonplatte überführt, dort von der Kanüle, größeren Gefäßen und Bindegewebe befreit und schließlich mit einer sterilen Rasierklinge zerstückelt. Eine vollständige enzymatische Dissoziation der schon sehr weich gewordenen Gewebebröckchen wurde innerhalb einer Stunde im

Trichter (D) mit 42 ml frischer Proteaselösung I erreicht, aufsteigende und im engen Unterteil des Trichters beim Hochsteigen geringe Scherkräfte ausübende Carbogenblasen förderten diesen Prozeß. Nach Filtration der Suspension durch ein Nylonnetz (Porenweite 200 µm) wurde das Filtrat mit einem Fluß von ca. 50 ml/min einmal durch eine Kanüle (G 20, 0,90 x 70 mm) passagiert, um speziell die Venulen vollständig in ihre zellulären Komponenten zu zerlegen.

Nun wurde das Zellgemisch in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 9 ml einer 90 %-igen Percoll-Verdünnung unterschichtet und 10 min bei 395 g zentrifugiert. Nach Abgesaugen des Überstandes wurde das Zentrifugenröhrchen mit den auf der Percollschicht verbliebenen Zellen bis zur 20 ml Marke mit HES aufgefüllt, zur Vermischung der Schichten geschüttelt, nochmals durch eine 20 G Kanüle gezogen und dann auf einen kontinuierlichen linearen Percoll-Dichtegradienten aufgetragen, zu dessen Herstellung Abb. 8 weitere Einzelheiten zeigt (Ausgangsvolumen der 45 %-igen Percoll-Lösung betrug 37 ml, das der 20 %-igen Lösung 32 ml). Die Zellfraktionierung erfolgte 40 min lang bei 2500 U/min ($g_{\max}=1000$ g). Bei auf 500 rpm reduzierter Drehzahl konnte der Gradient durch Überschichtung mit PBS über die Zentralkanüle ausgedrückt und in 5 ml Portionen gesammelt werden (zunächst wurden die 2 ml der unterschichteten 90 %-igen Percoll-Lösung abgesaugt und verworfen). Unter mikroskopischer Kontrolle wurden die Fraktionen mit der höchsten VEC-Konzentration (üblicherweise Fraktionen 2 (7-12 ml) bis 5 (22-27 ml)) ausgewählt, 2 mal in DMEM gewaschen, in DMEM resuspendiert und schließlich in Schalen ausgesät.

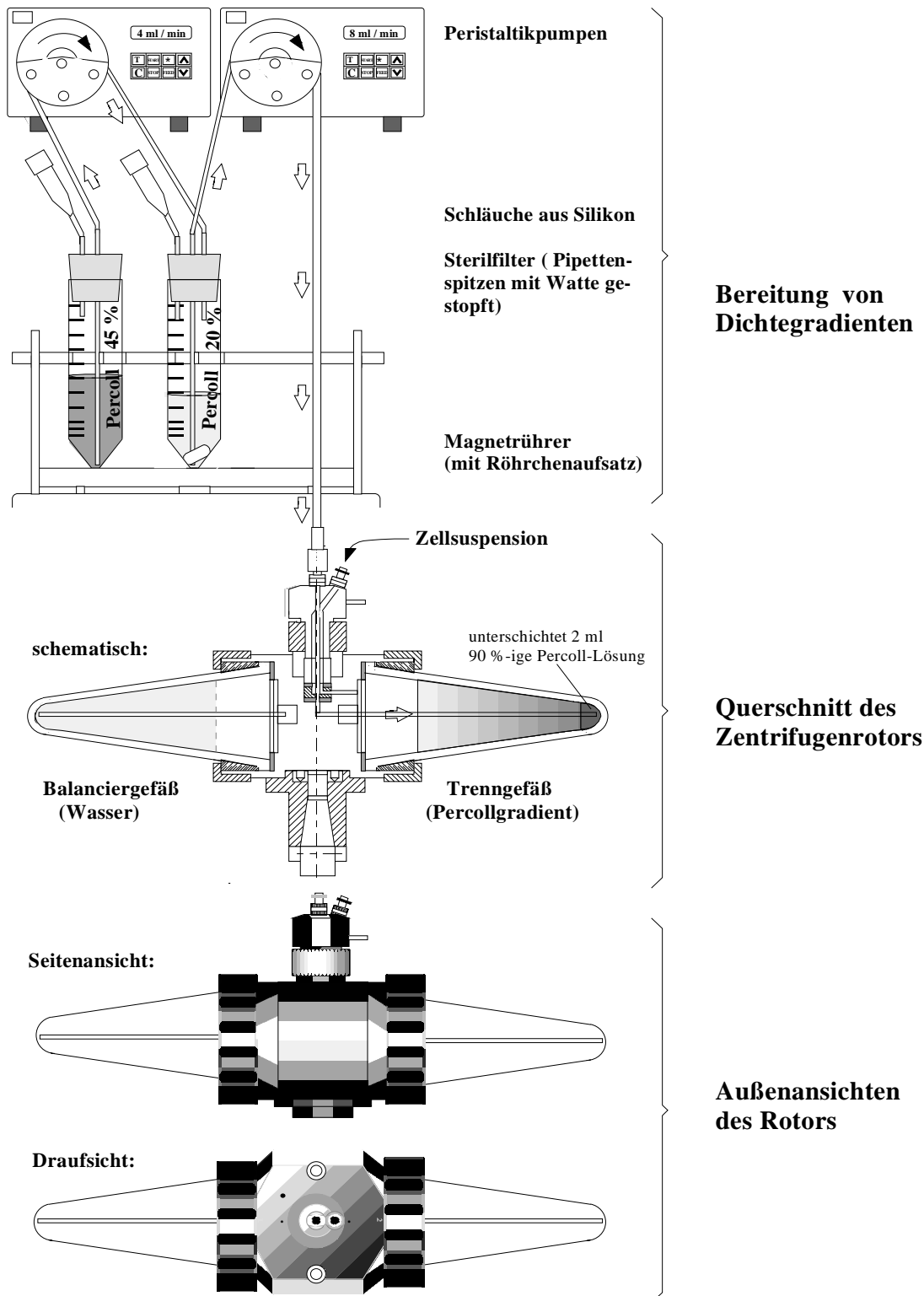


Abb. 8: Mischung und Eintragen eines kontinuierlichen Dichtegradienten in den speziell für unsere Zwecke entwickelten Rotor der Hermle-Zentrifuge Z 323. Diese Abbildung wurde mit geringfügigen Abänderungen mit freundlicher Genehmigung meines Kollegen Martin Thallmair seiner Dissertationsschrift¹⁵⁵ entnommen.

2.3.2. Reinigung von Primärkulturen venulärer Endothelzellen

Die Kulturen (35 mm Durchmesser) wurden einen Tag vor der Reinigung mit PC_{min} versorgt. Nun wurden die Kulturen mit 0,5 ml ECPS I (Herstellung siehe Fußnote) für 45 min im Brutschrank inkubiert. Nach einer 40 minütigen Erholungszeit in PC mit Zusatz von Flavonoidgemisch („Venoruton®“) (3×10^{-4} M) wurde die Kultur intensiv in einer in der Arbeitsgruppe Prof. Nees speziell entwickelten, in Abb. 9 näher erläuterten, Zellwaschanlage gespült (\varnothing_i der eingesetzten Kanüle 0,8 mm, Abstand zur Zellschicht 4,5 mm, Spüllösung PBS mit Zusatz von 0,04 % Albumin, Flußrate 82 ml/min). Unter diesen Bedingungen wurden die Fremdzellen selektiv vom Schalenboden abgelöst und abgesaugt, die Endothelzellen dagegen blieben haften. Nach dem Spülen wurden die Kulturen sofort mit PC überschichtet und ca. 3 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Herstellung von ECPS I:

ECPS wurde von Prof. Dr. Dr. S. Nees (Physiologisches Institut der LMU, München) zur Verfügung gestellt. Die Methodik zur Herstellung dieser Reinigungslösung soll im Folgenden kurz dargestellt werden: Standardmäßig nach Nees et al¹¹² angelegte und mit Fremdzellen überwucherte Endothelzellkulturen wurden 4 Wochen nach Erreichen der Konfluenz mit Trypsin/EDTA aus ihren Schalen abgelöst und die Zellen durch Zentrifugation gewaschen. Anschließend erfolgte ein Zellaufschluß in einem Dounce-Glas-Homogenisiergerät (von Braun, Melsungen) in 0,25 M Saccharoselösung durch 50 Schläge mit dem Pistill (0° C). Es folgte die Isolierung der Plasmamembranen mit Hilfe von Ultrazentrifugation (Ultrazentrifuge L5-65 mit Ausschwingrotor SW-56 von Beckmann, München: abgestellte Bremse, 27.500 rpm bzw. 70.000 g für 70 min bei 4° C). Danach wurden die Membranen bei 37° C für 12 Stunden mit Phospholipase C in 0,1 M Tris/HCl-Puffer bei pH 7,0 inkubiert (10 IU Enzym pro Membranfraktion aus jeweils 10^8 Zellen in 10 ml Tris/HCl). Die gewonnene Fraktion plasmalemmaler Phospholipide und Membranproteine wurde standardmäßig 1:1 mit Freundschem Adjuvanz als stabile Emulsion aufbereitet (Doppelkanülentechnik) und auf dem Rücken geschorener Kaninchen als 200-µl-Aliquots an jeweils 10 Applikationsstellen pro Tier unter die Haut injiziert. Nach 2 und 4 Wochen erfolgten in analoger Weise Wiederholungsimpfungen („Boosterungen“). Tiere mit nachgewiesenen hohen Antikörper-Titern (Macini-Methode) wurden durch Genickschlag getötet und anschließend durch Herzpunktion entblutet. Die nach Thrombosierung des Blutes und anschließender Zentrifugation erhaltenen Seren wurden zusammengefaßt und in 1-ml-Aliquots eingefroren (-80° C). Vor dem Einsatz für endotheliale Reinigungszwecke nach der in der vorliegenden Dissertation beschriebenen Methodik wurden Aliquots aufgetaut, 1:2 mit heparinisiertem Meerschweinchen-Poolplasma vermischt, anschließend 1:10 mit PBS verdünnt, sterilfiltriert und für die Versuche eingesetzt.

Anschließend wurden die VEC bei Raumtemperatur mit 0,5 ml Trypsin/EDTA abgelöst. Nach Zugabe von 2 ml Trypsininhibitorlösung (20° C) und homogener Suspendierung der Zellen wurden die Schalen in den Brutschrank gestellt. Im Zentrum der Schalen versammelten sich aufgrund der sich beim Aufwärmen der Schalen ergebenden Konvektionsströmung neben den Endothelzellen auch evtl. noch in geringer Anzahl vorhandene Fremdzellen, letztere verklumpten rasch miteinander. Die Fremdzellklümpchen konnten am nächsten Tag mit Hilfe von Dispase II-Lösung (Konzentration 10 mg/10 ml PBS, Inkubationszeit 30 min bei 37° C) und anschließende Spülung entfernt werden.

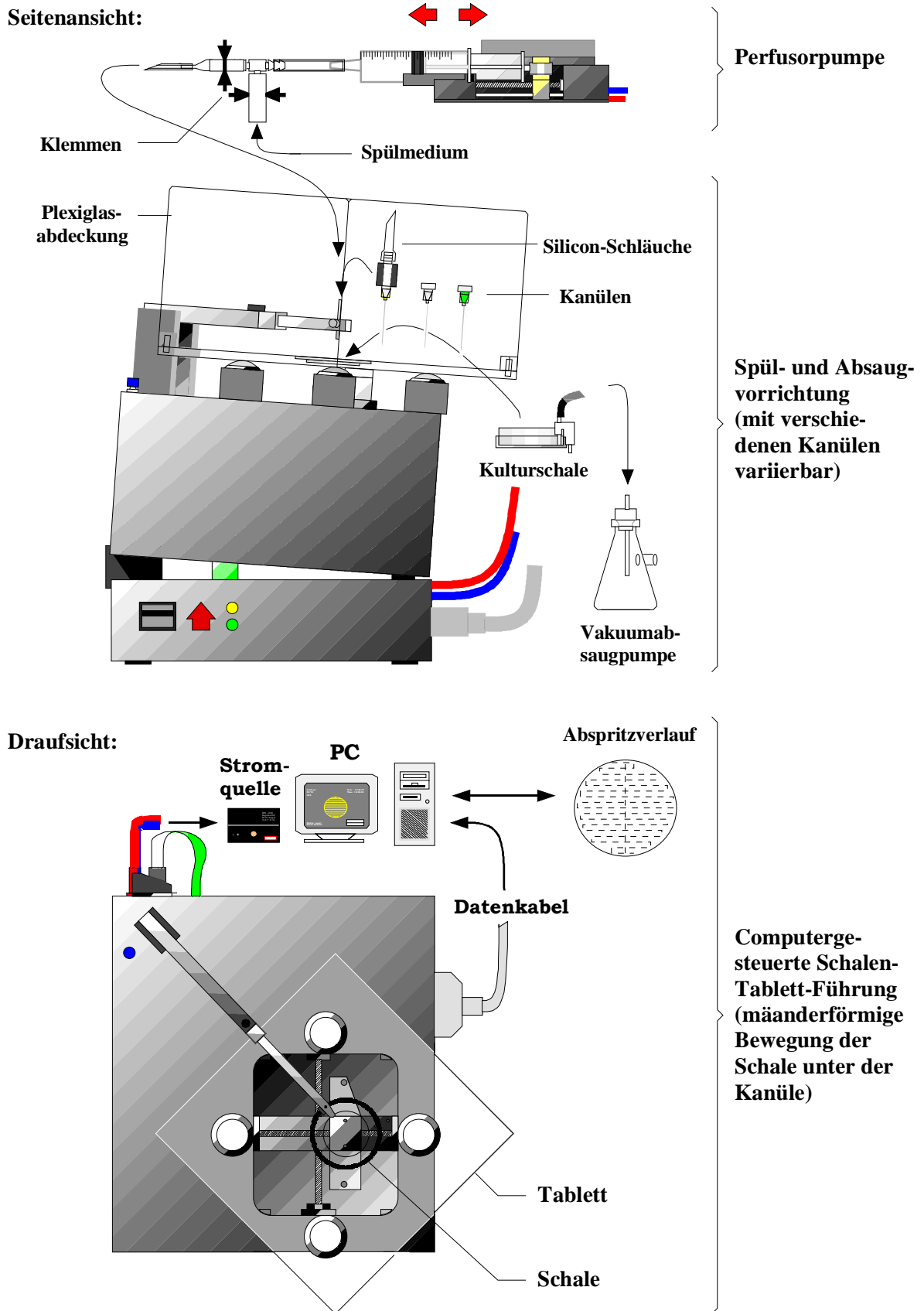


Abb. 9: In der Arbeitsgruppe Prof. Nees speziell entwickelte Zellwaschanlage zur Reinigung von Endothelzellkulturen. Diese Abb. wurde mit freundlicher Genehmigung meines Kollegen Martin Thallmair seiner Dissertationsschrift¹⁵⁵ entnommen.

2.3.3. Isolierung von Gefäßen aus Meerschweinchenherzen

Bei 500 Gramm schweren Meerschweinchen wurde vor dem Versuch die A. carotis communis kanüliert - analog zur arteriellen Blutentnahme (2.3.4.). Über diesen Zugang wurden nun Fragmin (80 IE/kg KG), frisch angesetzte und steril filtrierte Venoruton®-Lösung (0,4 mg/kg KG) und ASS (0,9 mg/kg KG) in die Aorta injiziert, um einer Schädigung der Gefäße durch aktivierte Entzündungszellen und Gerinnungsprozesse vorzubeugen (Fragmin = Gerinnungshemmer, ASS = Plättchenhemmer, Venoruton® = Endothel-abdichtende Flavonoide).

Die anschließende Entnahme und Perfusionsverdauung des Herzens erfolgte wie bei der Isolierung von venulärem Endothel (siehe 3.3.1. mit Abb. 24), allerdings mit folgenden Abänderungen:

- Zusatz von Venoruton® 0,07 mg/ml und ASS 100 µM zu KRS_{Ca} und KRS
- Verwendung von Proteaselösung II statt Proteaselösung I
- Entnahme des Herzens aus dem Falconröhrchen (C) bereits nach 30 min Enzymprefusion
- Im Trichter (D) wurde nicht die vollständige enzymatische Dissoziation abgewartet, sondern die Suspension wurde aus dem Trichter (D) entnommen, sobald sich bei der mikroskopischen Kontrolle intakte, von Kardiomyozyten befreite Gefäße zeigten (das 1. Mal nach ca. 15 min und dann ca. alle 10 min)

Je ein Tropfen der Gefäßsuspension aus dem Trichter („D“ in Abb. 24) wurde – unter Anwendung möglichst geringer Scherkräfte – in die Mitte einer Kulturschale (60 mm Durchmesser) pipettiert (Abb. 10 a). Nach Sedimentation der Objekte wurde durch spiralförmige Bewegungen mit einem Glasspatel der Durchmesser des Tropfens soweit vergrößert, daß nur noch ein schmaler Randstreifen des Schalenbodens unbenetzt blieb (Abb. 10 b). Nun wurden mit Hilfe eines sterilen Glasstabes strahlenartige Verbindungslinien des

Flüssigkeitsbereichs zum Rand der Kulturschale angelegt (Abb. 10 c) und dann unter Kippen und Drehen der Schale die Flüssigkeit vom Rand her möglichst vollständig abgesaugt (Abb. 10 d).

Nachdem die verschlossene und immer noch feuchte Schale 10 min in einer Neigung von ca. 45° im Brutschrank gestanden hatte, wurden letzte Reste der überschüssigen Flüssigkeit abgesaugt und die Schale sofort auf eine eisgekühlte Metallplatte gestellt. Ein Austrocknen der adhärennten Präparate muß unbedingt

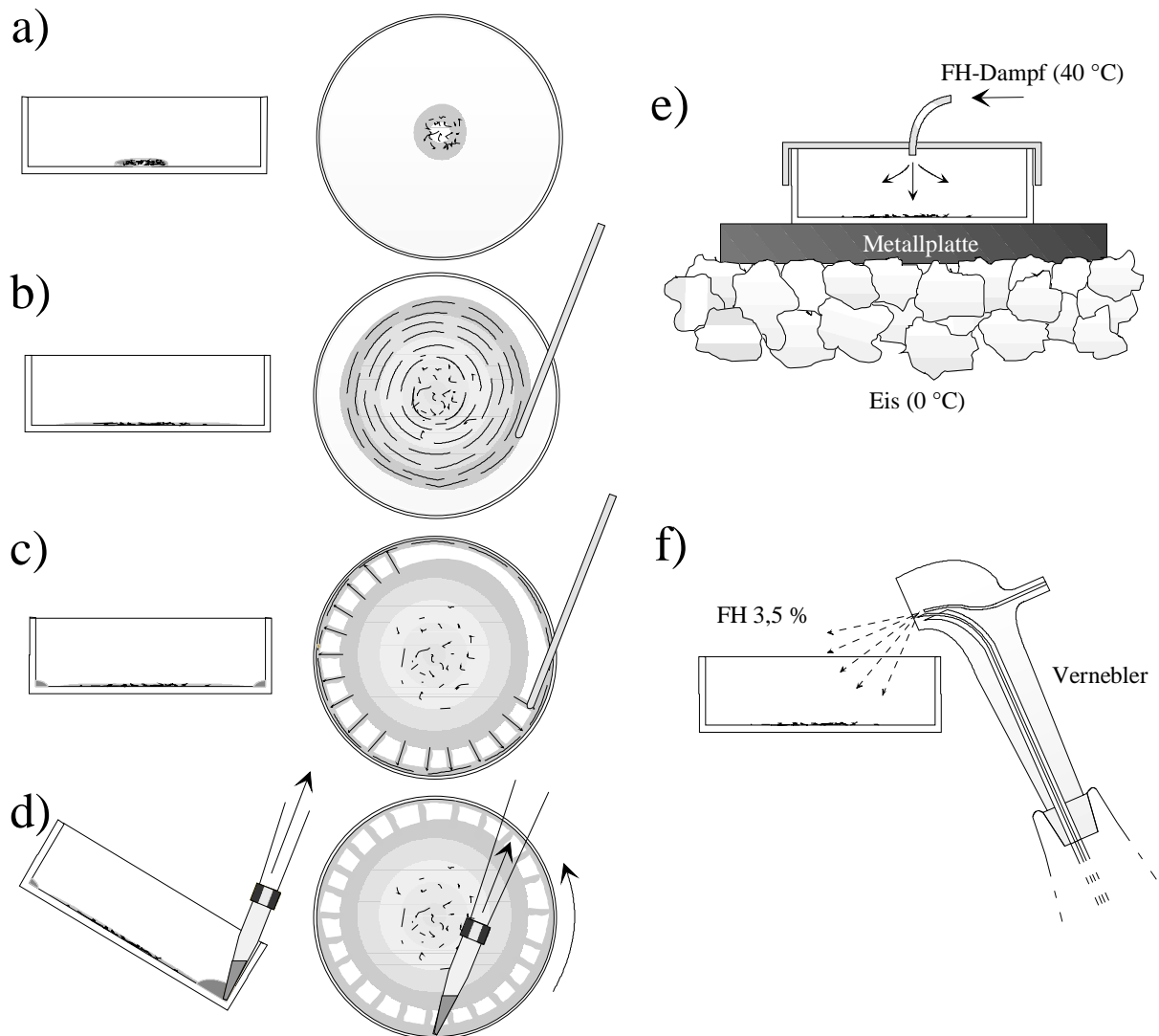


Abb. 10: Schematische Darstellung wichtiger Einzelschritte im Zuge der Adhärerung von Mikrogefäßen aus Meerschweinchenherzen. a) Tropfen einer Gefäßsuspension in der Mitte einer Kulturschale (60 mm) b) Vergrößerung der benetzten Fläche mit sterilem Glasspatel c) Schaffung strahlenförmiger Verbindungslinien zum Schalenrand d) Absaugen der Flüssigkeit unter Kippen und Drehen der Schale e) Fixieren der Gefäße durch kondensierende Formaldehyd (FH) - Dämpfe f) Weiteres Fixieren durch Besprühen mit Formaldehyd-Lösung.

vermieden werden. Anschließend wurden die am Schalenboden adhären gewordenen Gefäße unter Vermeidung von Scherkräften durch eingblasene und kondensierende Formaldehyd-Dämpfe fixiert, die zuvor bei 40 °C mit Wasserdampf gesättigt worden waren (Abb. 10 e). Daraufhin wurde 3,5 %-ige Formaldehyd-Lösung in PBS zur Vermeidung plötzlicher Scherkräfte zunächst mit einer Sprühflasche (Abb. 10 f), dann durch langsames zupipettieren in die Schale gebracht und dort für ca. 5 min belassen. Schließlich wurden die Präparate vorsichtig mit PBS gewaschen. Nun konnten die Gefäße durch immunologische und enzymhistochemische Verfahren weiterführend charakterisiert werden.

2.3.4. Arterielle Blutentnahme vom Meerschweinchen

450 – 1000 Gramm schwere Meerschweinchen wurden durch i.m. Injektion von Ketamin (0,3 ml/100 Gramm) und Rompun (25 µl/100 Gramm) anästhesiert. Nach ca. 10 min Warten auf das vollständige Einsetzen der Narkose wurde die Haut zwischen Sternum und Unterkiefer mit einer Pinzette angehoben und der ganze angehobene Hautlappen großzügig abgeschnitten. Nun konnte auf einer Seite das jetzt sichtbare Platysma und die Lamina superficialis entfernt werden. Anschließend wurde der M. sternocleidomastoideus in der Mitte durchtrennt und die Schilddrüse unter Schonung ihrer versorgenden Gefäße zur Seite präpariert. Falls die A. carotis communis noch nicht sichtbar wurde, wurde die infrahyale Muskulatur abpräpariert, unter der das Gefäß in jedem Fall zum Vorschein kam. Jetzt wurde die Arterie unter Schonung des N. vagus und der V. jugularis interna aus der Carotisscheide freipräpariert und 3 Fäden unter der Carotis hindurchgezogen. Mit dem 1. Faden wurde sie so weit kranial wie möglich abgebunden und der Faden fixiert. Dann wurde der 3. Faden kaudal unter Zug auf das Gefäß fixiert, so daß kein Blut mehr aus der Aorta einfließen konnte. Anschließend wurde die Arterie mit einer Schere im rechten Winkel bis zur Hälfte eingeschnitten und mit Hilfe einer rundgefeilten, 90 Grad gebogenen

Kanüle (G 27, 0,40 x 20 mm) ein Polyethylenschlauch eingeführt, in dem auf der anderen Seite eine Kanüle (G 22, 0,70 x 30 mm) und eine leere Spritze steckte. Der Schlauch wurde mit dem 2. Faden eingebunden und der 3. Faden gelöst, sodann der Schlauch in Richtung Herz vorgeschoben und nochmals mit dem 3. Faden fixiert. Nun wurden ein paar Tropfen Blut abgezogen und verworfen und das restliche Blut in mit EDTA-Lösung (je 200 µl für 10 ml Blut) vorgefüllte Spritzen gezogen.

2.3.5. Isolierung reiner Granulozyten aus Meerschweinchenblut

Jeweils 8 ml frisch gewonnenes EDTA-Blut adulter Meerschweinchen wurden auf 7 ml PolymorphprepTM in einem sterilen 15 ml Falconröhrchen aufgetragen und 35 min bei 600 g zentrifugiert. Es zeigte sich eine deutliche PMN-Bande, die allerdings noch viele Erythrozyten und Plättchen enthielt. Durch entsprechendes Anstechen des Falconröhrchens unmittelbar unterhalb dieser Zellfraktion mit einer sterilen 19 G Einmalkanüle konnte die etwa 1,5 ml umfassende Bande bei leicht geöffnetem Deckel in eine sterile Einmalspritze abgezogen werden (Abb. 23 a).

Die so gewonnene Zellsuspension (ca. 2 ml) wurde in einem frischen 15 ml Falconröhrchen 1:2 mit einer 60 %-igen Percoll-Verdünnung* verdünnt. Es folgte eine 11 minütige Zentrifugation bei 500 g, nach der die roten Blutzellen ein Pellet in der Spitze des Falcongefäßes bildeten, dem die PMN's nur locker auflagen (Abb. 23 b). Begleitende Plättchen sedimentierten bei diesem Verfahren nicht.

Nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes wurden die Granulozyten möglichst selektiv mit HES* abgespült und in ein neues 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, das dann bis zur 4 ml-Marke mit HES* aufgefüllt wurde. Im Anschluß an die nun folgende Zentrifugation (10 min, 395 g) befanden sich die Granulozyten in der Spitze des Röhrchens. Der Überstand wurde abgesaugt und die PMN's nach nochmaliger Suspendierung in 5 ml HES* auf den in Abb. 23 c

gezeigten, diskontinuierlichen Percoll-Gradienten aufgebracht und bei 600 g 35 min zentrifugiert. Die Granulozyten lagen dann - vgl. Abb. 23 c - etwa auf der 73 %-igen Percoll-Schicht*. Zu ihrer Gewinnung wurde eine 19 G Einmalkanüle an der 2 ml-Marke in das Falconröhrchen eingestochen, 2 ml 73 %-ige Percoll-Verdünnung* abgezogen und verworfen und weitere 3 ml, die die gereinigten PMN's enthielten, mit einer Einmalspritze abgesaugt (Abb. 23 c). Ein neues 15 ml Röhrchen, mit den 3 ml PMN-Suspension beschickt und mit ES* ganz aufgefüllt, wurde 10 min bei 395 g zentrifugiert, der Überstand bis zur 1,5 ml-Marke abgesaugt, erneut bis zur 4 ml-Marke mit ES* befüllt und nochmals schonend zentrifugiert (10 min, 112 g). Nachdem der Überstand abgesaugt war, wurden die als Pellet in der Röhrchenspitze liegenden PMN's in 25 µl EDTA-Plasma homogen resuspendiert.

* = jeweils mit Zusatz von 2 % Citrat und 2 % autologem EDTA-Plasma

2.3.6. Isolierung gewaschener Plättchen

Alle folgenden Schritte wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt. Citratblut wurde zunächst bei 4000 rpm zur Gewinnung von plättchenreichem Plasma (PRP) 20 Sekunden lang zentrifugiert. 10 ml PRP wurden anschließend in einem sterilen 15 ml Zentrifugenröhrchen auf 8 ml einer 22,25 %-igen, isotonen Percollösung (spezifische Dichte: 1,03 Gramm/ml) aufgeschichtet, der vorher 1,5 ml 90 %-ige, isotone Percollösung (spezifische Dichte: 1,117 Gramm/ml) unterschichtet worden waren. Beide in Abwesenheit von Kalzium hergestellten Percollösungen wurden zudem so aufbereitet, daß sie jeweils 100 µM Adenosin zur kompletten Inhibition von Plättchen enthielten.

Nach Zentrifugation bei 560 g für 35 min wurden die auf der untersten Percollschicht schwimmenden, von Plasma befreiten Plättchen vorsichtig mit einer Spritze abgesaugt. Nach Zugabe von 2 IE Adenosindesaminase und 3-minütiger Inkubation bei Zimmertemperatur zur vollständigen Umwandlung von

Adenosin in das Plättchen nicht mehr hemmende Inosin wurde die gewonnene Zellsuspension direkt für videokinematographische Studien verwendet, oder zusammen mit PMN aktiviert (vgl. nächster Abschnitt). In einigen Studien wurden die Plättchen vor ihrer Verwendung 15 min in Gegenwart von 100 μM Acetylsalicylsäure (Aspirin) irreversibel inaktiviert.

2.3.7. Gewinnung einer zellfreien Lösung von Freisetzungprodukten gemeinsam aktivierter PMN und Plättchen

Zu jeweils 400 μl der Suspension gewaschener Plättchen (vgl. 2.3.6., Inhalt ca. 10 Mio. Plättchen) wurden sukzessiv 25 μl gewaschene PMN (ca. 1 Mio. Zellen), Kalzium bis zur Endkonzentration 1,8 mM, 1 μM FMLP und 0,5 IU Thrombin gegeben. Nach 15-minütiger Inkubation bei 37° C wurde 2 min bei 10.000 g zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde direkt in entsprechende Versuche eingebracht bzw. zu späterer Verwendung aliquotiert (50 μl) und bei -80° C eingefroren.

2.3.8. Zeitraffer-videomikrokinematographische Studien zur Dokumentation der Interaktionen venulärer Endothelzellen mit Blutzellen

Die in DMEM herangewachsenen Kulturen (35 mm Durchmesser) wurden 5 Tage vor den Videoaufnahmen mit 1 ml PC_{min} überschichtet, das aufgrund systematischer Voruntersuchungen zu einer besonders schönen Ausprägung der typischen Pflastersteinmorphologie der gezüchteten Endothelzellen führte.

Für die Versuche wurde dem Medium Thrombin (1 IU/ml) zugesetzt. Auf dem Objektisch des Lichtmikroskops (A) wurde die zu filmende VEC-Kulturschale von einer Wärmekammer (B) umgeben, die durch einen Temperaturregler (C) exakt auf 37° C eingestellt wurde. Die richtige CO_2 -Atmosphäre in der Wärmekammer wurde erreicht durch kontinuierliches Einblasen von 5 % CO_2 aus der Gasflasche (D) über die Waschflasche (E). Das Lichtmikroskop enthielt

eine integrierte SVHS-Videokamera (F), die über eine Kamera-Kontroll-Einheit (G) mit einem zeitrafferfähigen Videorekorder (H) verbunden war. So konnten alle Versuche mit bis zu 550-facher Vergrößerung auf SVHS-Videokassetten dokumentiert werden. Außerdem konnten die Versuche auf einem Monitor (I), der an den Videorecorder angeschlossen war, mitverfolgt werden. Parallel dazu wurden mit einer ebenfalls integrierten Spiegelreflexkamera (J) zu ausgewählten Zeitpunkten Bilder angefertigt.

Zur spezifischen, irreversiblen Hemmung von Blutplättchen wurde in einigen Experimenten ASS (100 μM) verwendet. Eine Zugabe von Venoruton[®] erfolgte nach Bedarf, meist in einer Konzentration, die einer mittleren Flavonoidkonzentration von 100 μM entsprach.

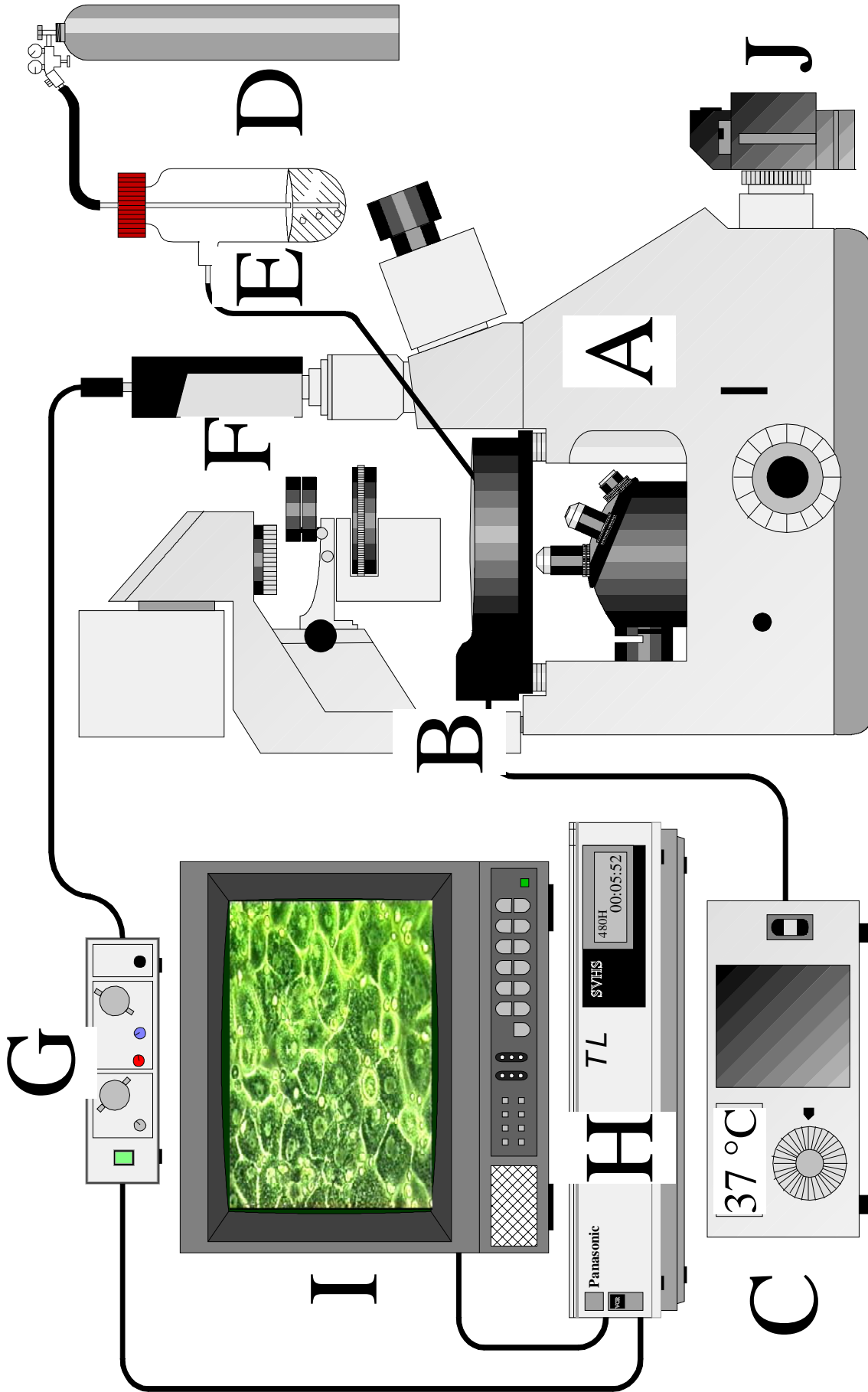


Abb. 11: Experimenteller Aufbau für die videomikroskopische Beobachtung und Dokumentation zellulärer Interaktionen an Endotheloberflächen:
 A-Gewebekulturmikroskop, B-Spezialinkubator mit Steereinheit C, D-Gaszylinder mit 5 % CO₂, E-Waschflasche, F-Videokamera,
 G-Kamera-Kontroll-Einheit, H- Videorekorder, I-Monitor, J-Fotoapparat.

2.3.7. Identifizierung und Charakterisierung der Endothelzellen, Gefäße und Myokardschnitte

2.3.7.1. Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie

Rasterelektronenmikroskopie:

Nach Fixierung in Cacodylatpuffer mit 10 % v/v Glutaraldehyd wurden die ausgewählten Proben schrittweise entwässert, und zwar für jeweils 15 bis 20 min in 25, 50, 75 und 100 %-iger v/v wässriger Ethanollösung. Anschließend wurden die Präparate mehrmals mit der 100 %-igen Alkohollösung gespült und am kritischen Punkt von CO₂ mit einem Balzers CD 030 Kritischen-Punkt-Trockner getrocknet. Danach wurden die Präparate mittels leitender Doppelklebefolie auf polierte Aluminium-Objekthalterungen aufgebracht und in einem Balzers SCD 050 Sputtergerät mit einer ca. 15 nm dicken Goldschicht bedampft. Zur Untersuchung diente ein Jeol JSM-35 CF Rasterelektronenmikroskop.

Transmissionselektronenmikroskopie:

Die Endothelschichten wurden mit ES gewaschen, mit 10% v/v Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer fixiert und anschließend mit einem Plastikspatel von den Kulturschalen abgelöst. Osmifizierung erfolgte mit wässriger OsO₄-Lösung (0,1 % w/v). Anschließend wurde das Metalloxyd durch Spülen mit PBS vollständig entfernt und dann die Dehydratisierung in aufsteigender Alkoholreihe durchgeführt, danach erfolgte die Einbettung der Präparate in Araldit. Nach dem Schneiden mittels eines Ultramikrotoms wurde standardmäßig gegengefärbt mit Uranylacetat und Bleicitrat. Untersuchung mit einem Philips 400T Transmissionselektronenmikroskop.

2.3.7.2. Anfertigen von Meerschweinchenmyokardschnitten

Das Herz wurde zunächst in ein mit Isopentan gefülltes Gefäß, das in flüssigem Stickstoff hing, ca. 1 min lang eingetaucht. Das schockgefrorene Gewebe wurde

dann in die Kühlkammer (ca. -20°C) des Cryocuts gelegt und dort 1-2 Stunden ruhen gelassen.

Anschließend wurde die Anti-Rollplatte heruntergeklappt und die Schichtdicke auf etwa $10\ \mu\text{m}$ eingestellt. Das Schneiden erfolgte nun mit dem Cryostat CM 3050 der Firma Leica mit einem Rotationsmikrotom mit einem C-Messer, das die gleiche Temperatur wie die Kühlkammer hatte. Nach dem Durchführen des Gewebes lag der Schnitt auf dem Messer. Die Anti-Rollplatte wurde hochgeklappt und der Schnitt mit einem gekühlten Objektträger abgenommen. Die Region des Schnittes wurde von unten mit der Fingerkuppe der linken Hand erwärmt und schließlich trocknen gelassen.

2.3.7.3. Histochemischer Nachweis typischer Markerenzyme

Zunächst Fixierung der Proben durch 3,5 %-ige Formaldehydlösung in PBS für exakt 1 min, danach viermaliges vorsichtiges Waschen mit ES. Zellkulturen und isolierte Mikrogefäßpräparate wurden direkt in die folgenden enzymhistochemischen Inkubationslösungen eingebracht. Myokardgewebe mußte dagegen zuvor, wie in 2.3.7.2. beschrieben, im gefrorenen Zustand geschnitten werden.

Färbung auf Dipeptidyl-Aminopeptidase IV (CD26) [EC 3.4.14.5]:

Als Substratlösung wurden 4 mg Gly-Pro 4 Methoxy- β -Naphthylamid in 80 μl Dimethylformamid gelöst und mit 10 ml 4°C kalten ES aufbereitet. In diesem kalten Gemisch wurden außerdem 4 mg Echtblausalz gelöst (Abschirmung von grellem Licht!) und nach 5 min über einen $0,22\ \mu\text{m}$ -Steckfilter auf die gewaschenen Präparate aufgebracht. Anschließend wurden die Schalen 4 Stunden in vollkommener Dunkelheit im Kühlraum (4°C) unter langsamem Schwenken inkubiert. Nach dieser Zeit wurde dreimal mit ES gewaschen und entweder eine Gegenfärbung mit perizytenspezifischer Alkalischer Phosphatase oder eine längerfristige Lagerung in ES mit 3,5%-igem Formaldehyd v/v bei 4°

C angeschlossen. (Eine komplette Entfärbung war durch 2-3 maliges Waschen über einen Zeitraum von ca. 15 min mit 100 %-igem Ethanol möglich, so daß mit denselben Kulturen auch noch Fluoreszenzfärbungen durchgeführt werden konnten). Mikroskopie erfolgte im Hellfeld (Mikroskop: Axiovert von Zeiss, Deutschland).

Perizyten-spezifische Alkalische Phosphatase [EC 3.1.3.1]:

6 Teile 0,1 M Veronalpuffer wurden mit 3 Teilen 3 mM AS-MX-Phosphat vermischt und mit 1 Teil 3 mM Fast Blue BB versetzt (der Vorgang erfolgte bei 4⁰ C). Vor Applikation auf die Präparate wurde das Gemisch über einen 0,22 µm Steckfilter filtriert. Nach 13 stündiger Inkubation bei 4⁰ C unter leichtem Schwenken im Dunkeln wurden die Präparate sorgfältig mit ES gewaschen und schließlich im Hellfeld mikroskopisch ausgewertet.

Durch DMSO/Azetonitril/Ethanol (3:2:5) konnten die Präparate wieder entfärbt und zusätzlich z.B. fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden.

2.3.7.4. Fluoreszenzfärbungen

Nachweis von Faktor VIII-Antigen (von Willebrand Protein), Blutgruppe 0 und glattmuskulärem α -Aktin:

Die auf Faktor VIII-Antigen bzw. α -Aktin hin zu untersuchenden Präparate wurden dreimal mit PBS gewaschen, 2 min lang mit -20⁰ C kaltem 100 %-igem Methanol fixiert und gleichzeitig permeabel gemacht, schließlich erneut fünfmal mit PBS gespült. Nun wurden die Präparate 60 min im Brutschrank mit dem verdünnten Primärantikörper (1:20 in PBS mit Zusatz von 3 % Albumin w/v) inkubiert. Anschließend erfolgte zehnmaliges sorgfältiges Waschen mit PBS (1% Al-bumin) und danach fünfzehnmal mit PBS (ohne Albumin). Die Inkubation mit dem daraufhin applizierten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (in der selben Verdünnung wie der Primärantikörper) erfolgte bei 37⁰ C für 45 min. Nachdem die Präparate wiederum zehn-mal mit PBS (1 % Albumin)

und fünfzehnmal mit purem PBS gespült worden waren, wurden sie mit einem glycerinbe-deckten Deckgläßchen abgedeckt und im Fluoreszenzmikroskop bei geeigneter Anre-gungswellenlänge betrachtet.

Der Nachweis der Blutgruppe 0 konnte ohne Sekundärantikörper durchgeführt werden, da hier spezifisch bindendes und bereits fluoreszierendes UEA I-Lektin (*Ulex europaeus* Agglutinin I) zur Verfügung stand.

Nachweis des Ac-LDL-Rezeptors:

Vorgesehene Zellkulturen wurden in vitalem Zustand mit serumarmem Promo-Cell--Medium (2 % FCS) versehen. Die Inkubation mit dem in einer Konzentration von 50 µl/ml zugesetzten Rhodamin-markierten Ac-LDL-Konzentrat (42 mg/dl) erfolgte im Brutschrank für 4 Stunden. Hierauf wurden die Präparate gründlich mit PBS gewaschen und mit 10 %-iger Formaldehyd-lösung fixiert. Die mikroskopische Betrachtung erfolgte mit einem Zeiss Axioplan Fluoreszenzmikroskop.

3. Ergebnisse

3.1. Histologische Untersuchungen

Identifizierung koronarer postkapillärer Venulen im Meerschweinchen-Myokard und in isolierten Gefäßpräparaten aus Meerschweinchenherzen:

Im Rahmen von Serienuntersuchungen myokardialer koronarer Gefrierschnitte kann der Verlauf einzelner koronarer Mikrogefäße in einem gegebenen Myokardraum im Phasenkontrast genau verfolgt werden. Typische postkapilläre Venulen zeigen nur eine geringe Wandstärke von ca. 2-4 μm . Ihr Durchmesser liegt im Bereich 10-20 μm und ist stets etwa doppelt so groß wie der der in ihrer direkten Nachbarschaft ebenfalls vorhandenen Endarteriolen. Dipeptidyl-Aminopeptidase IV [EC 3.4.14.5] erweist sich im Meerschweinchenherzen als hochselektives Markerenzym ausschließlich dieser kleinsten koronaren Venensegmente und führt im hier benutzten enzymhistochemischen Verfahren zu einer charakteristischen Rotfärbung in den behandelten Schnitten, die schlagartig aufhört beim Übergang der Venulen in die nachgeschalteten Sammelvenen (vgl. Abb. 12 und 13).

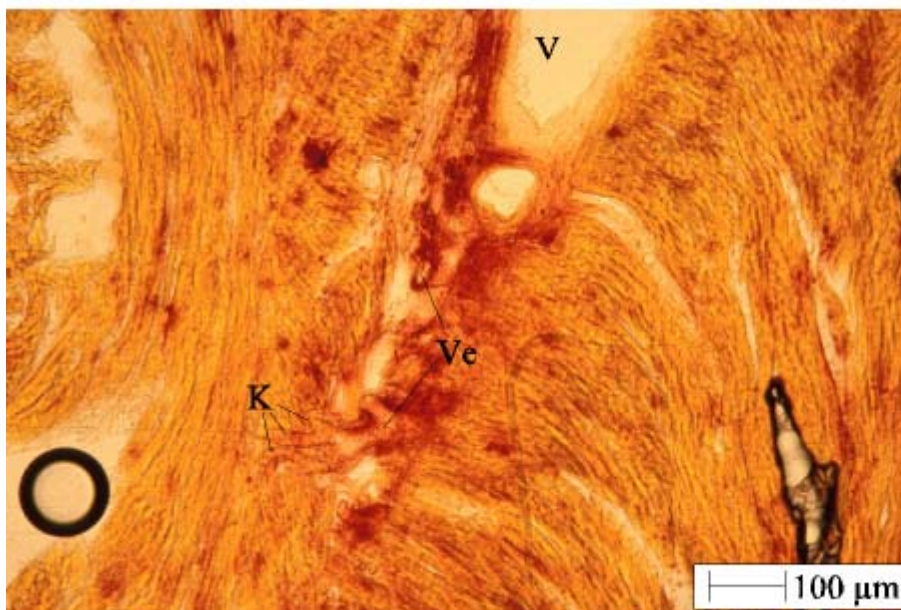


Abb. 12:
Gefrierschnitte des Meerschweinchen - Myokards. Färbung auf Dipeptidylpeptidase IV (Hellfeld). Charakteristische Rotfärbung von Venulen (Ve). Das Endothel der zuführenden Kapillaren (K) und der größeren Vene (V) ist nicht rot gefärbt.

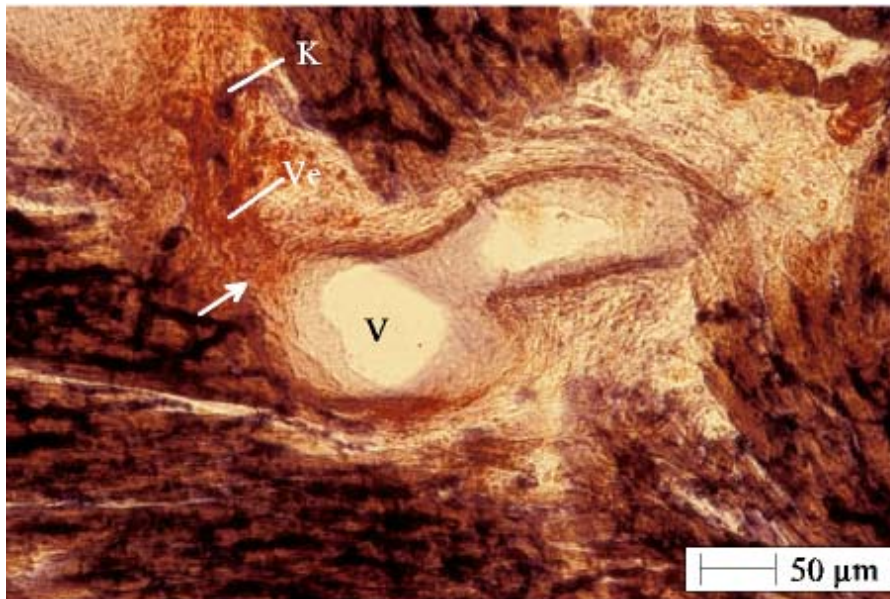


Abb. 13:
Doppelfärbung auf Alkalische Phosphatase (blau) und Dipeptidylpeptidase IV (rot). Phasenkontrast. An der Mündung (Pfeil) der Venule (Ve) in die Vene (V) endet die charakteristische Rotfärbung der Venule abrupt.

Die systematische Auswertung solcher in aufwendigen Serien durchgeführter Kryoschnitte läßt das Prinzip der myokardialen Mikrogefäßarchitektur im Meerschweinchenherzen deutlich werden. Großer Dank gebührt hier der freundlichen Unterstützung dieser Arbeit durch Herrn Professor Lange aus der Anatomischen Anstalt der LMU, insbesondere Frau Kerwin, die die benötigten Gefrierschnitte herstellte (enzymhistochemische Anfärbung im Physiologischen Institut). Alle untersuchten Venulen zeigen aufgrund zahlreicher Einmündungsstellen von Kapillaren eine bizarre Form, die an mikroskopisch kleine Ingwerknollen erinnert. Ihre nach Dipeptidase-IV-Anfärbung bestimmte Längenausdehnung beträgt 100-200 μm .

Im Gegensatz zu den postkapillären Venulen entfalten im Meerschweinchenmyokard die vorgeschalteten Kapillaren und Endarteriolen nie Dipeptidase-IV-Aktivität. Hingegen sind sie mit Hilfe des benutzten enzymhistochemischen Färbeverfahrens zum Nachweis Alkalischer Phosphatase tiefblau anfärbbar (Abb. 14). Die Expression der Alkalischen Phosphatase hört, wie schon Abb. 13 zeigt, an der Einmündungsstelle der Kapillaren in die zugehörigen postkapillären Venulenkompexe (Abb. 15) genauso schlagartig auf, wie beim Übergang der besenreiserähnlichen Endarteriolen in die vorgeschalteten Zuführungsarteriolen, was sich besonders überzeugend an

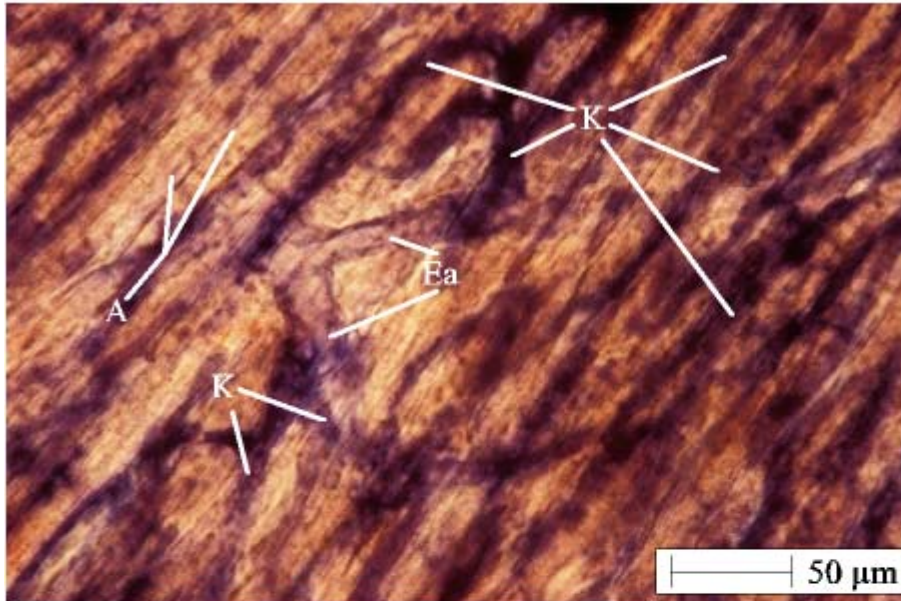


Abb. 14:
Die parallel zu den quergestreiften Herzmuskelzellen verlaufenden Kapillaren (K) und ebenso die Endarteriolen (Ea) zeichnen sich durch intensive Ausprägung des Enzyms Alkalische Phosphatase (Blaufärbung) aus. Die zuführende Arterie (A) weist keine Blaufärbung mehr auf.
Phasenkontrast.

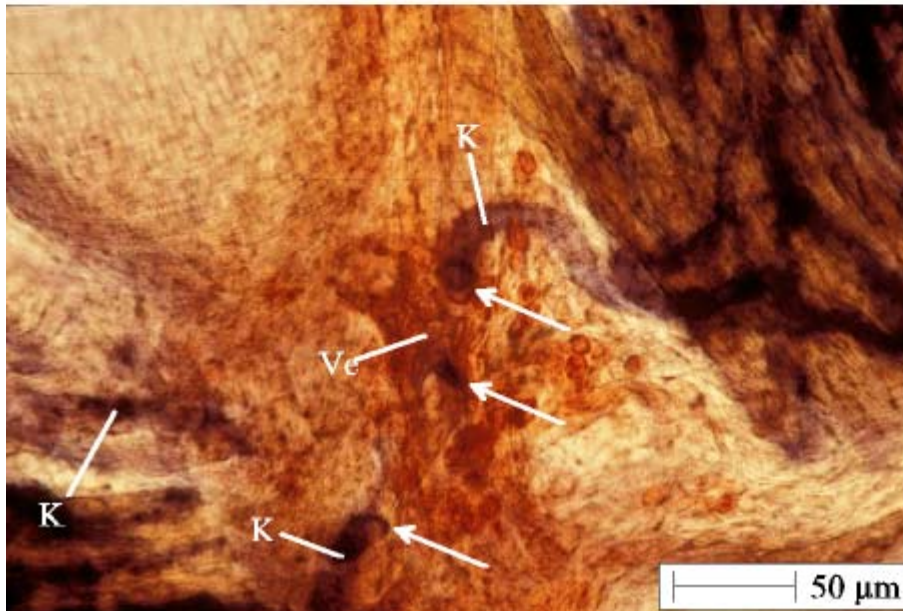


Abb. 15:
Vergrößerung des linken oberen Quadranten der Abb. 13. Abruptes Abbrechen der Expression der Alkalischen Phosphatase (blau) an der Einmündung (Pfeil) von Kapillaren (K) in die nachgeschaltete Venule (Ve).
Phasenkontrast.

enzymatisch isolierten Arteriolenbäumchen demonstrieren läßt (vgl. Abb. 16 a und b). Größere zuführende Arteriolen weisen auch im Querschnitt kaum noch Alkalische Phosphatase (Blaufärbung) auf (vgl. Abb. 14 und Abb. 17).

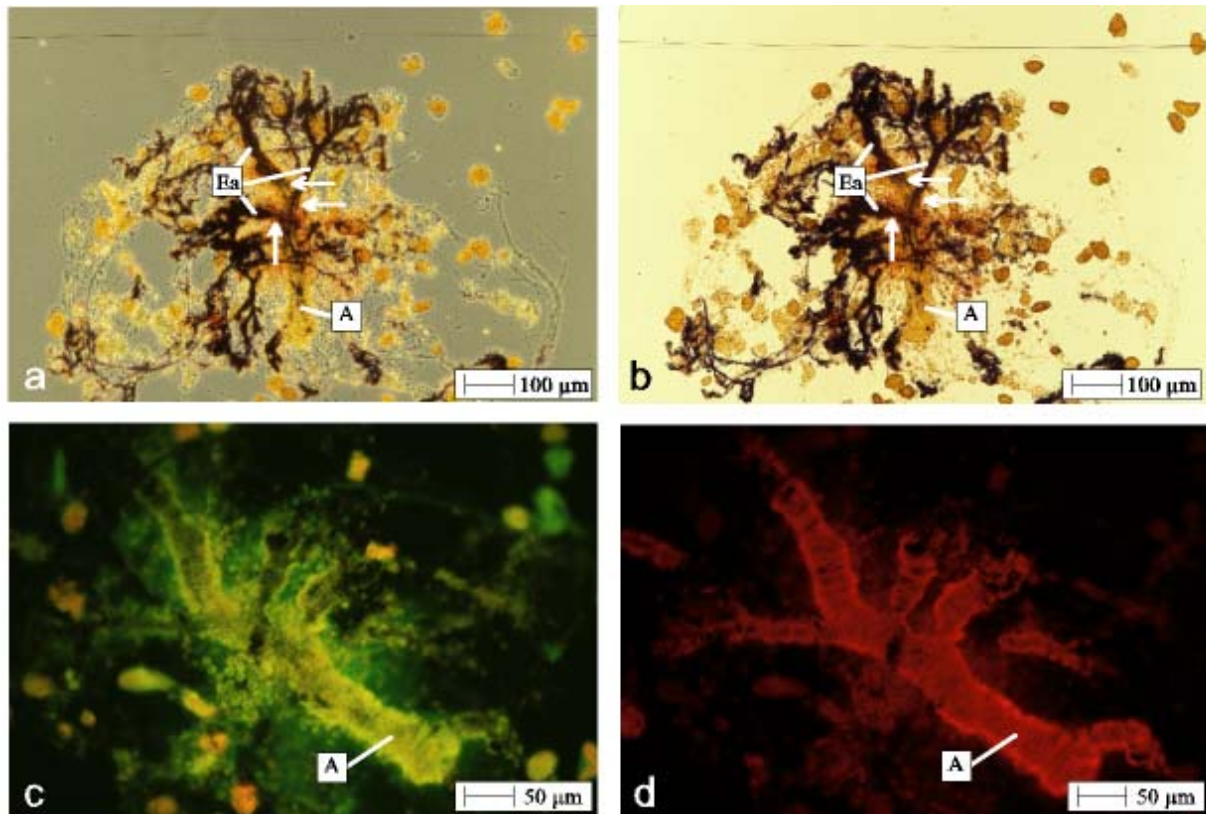


Abb. 16: Enzymatisch isoliertes Arteriolenbäumchen.

a und b) Färbung auf Alkalische Phosphatase (blau), a) Phasenkontrast, b) Hellfeld. Am Übergang (Pfeile) der Zuführungsarteriolen (A) in die Endarteriolen (Ea) schlagartiger Beginn der Blaufärbung.

c) Nachweis von Faktor VIII-Antigen (grüne Immunfluoreszenz).

d) Darstellung der spiralförmig verlaufenden glatten Muskulatur des Arteriolenbäumchens nach Anfärbung auf glattmuskuläres α -Actin (rote Fluoreszenz).

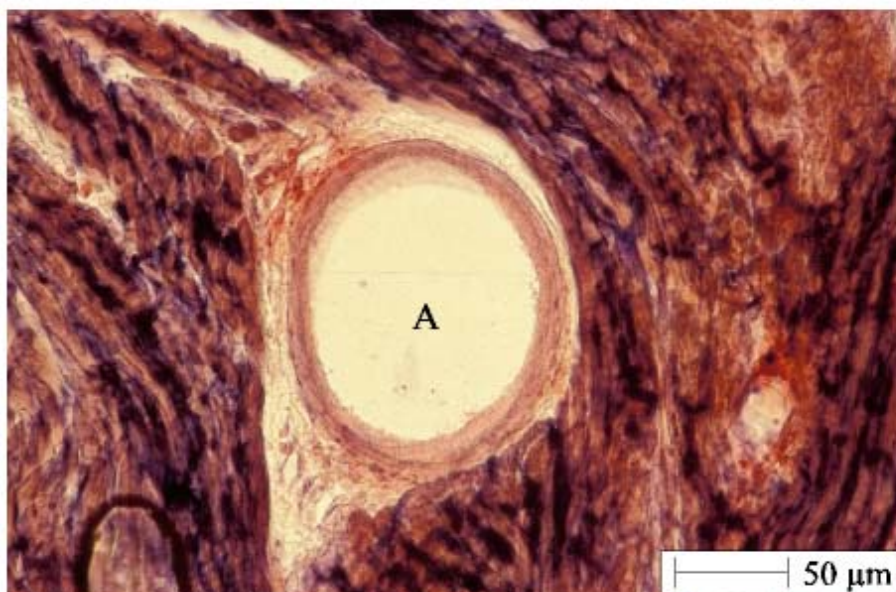


Abb. 17:

Größere Arteriole (A) im Meerschweinchenmyokard, die im Gegensatz zu den zahlreichen umgebenden Kapillaren keine Expression von Alkalischer Phosphatase (blau) aufweist. Phasenkontrast.

An isolierten und auf Dipeptidase-IV-Aktivität angefärbten koronaren Mikrogefäßnetzen läßt sich die hochspezifische Lokalisation dieser Protease in Venulenkplexen (VK) quasi im Überblick und besonders überzeugend bestätigen. Schon ungefärbt im Phasenkontrast aufgrund ihrer typischen Wandstruktur identifizierbare Arteriolen (A) und Kapillaren (K) erscheinen dabei nur unspezifisch gelblich gefärbt, weil sie im Meerschweinchenherzen diese Peptidase offensichtlich nicht besitzen (Abb. 18 a und b).

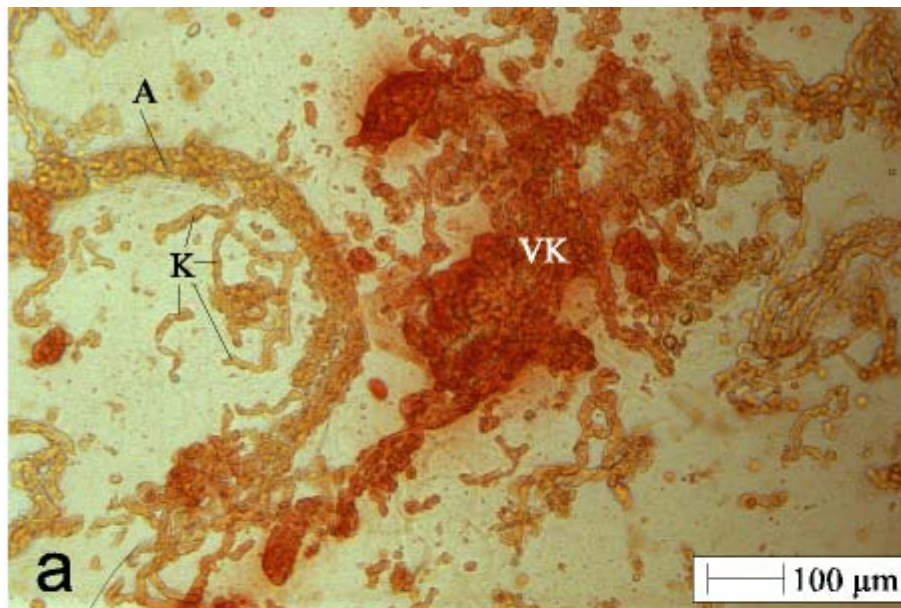
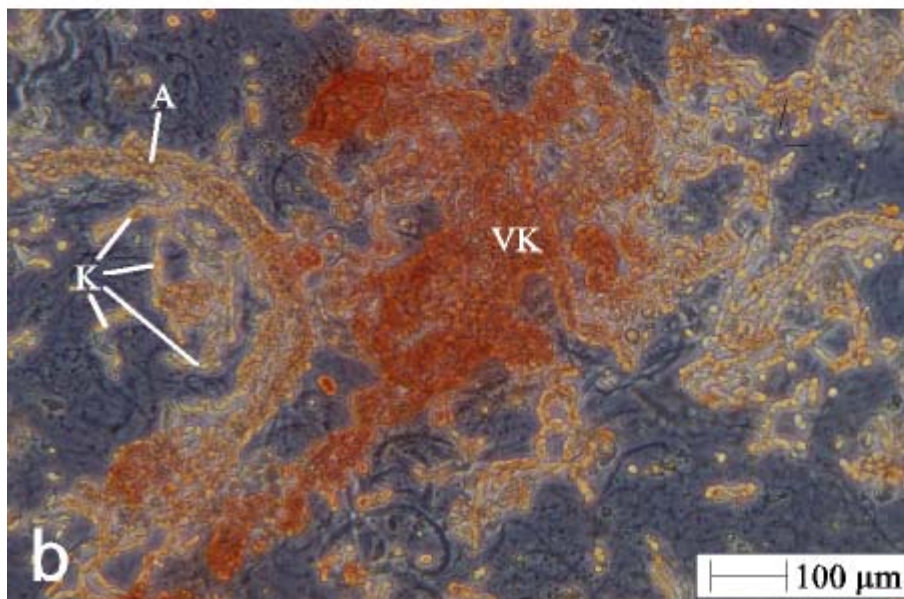


Abb. 18:
Isolierte koronare Mikrogefäße nach enzymhistochemischer Anfärbung auf Dipeptidyl-Amino-peptidase-IV-Aktivität,
a) im Hellfeld
b) im Phasenkontrast



Der augenscheinlich, im Vergleich mit den unter diesen Bedingungen stabilen Arteriolen und Kapillaren, besonders lockere Wandaufbau der Venulenkompexe bedingt, daß sie dem Angriff der im Rahmen dieser Untersuchungen eingesetzt, im Arbeitskreis von Professor Nees speziell entwickelten Proteasen-Mischung (Kollagenase-Dispase-Trypsin-Lösung, siehe Methoden) nicht standhalten können. Jedenfalls zerfallen Venulen innerhalb einer empirisch optimierten Kontaktzeit von insgesamt 60 min (Enzymperfusion und anschließende Nachinkubation im Trichter) komplett in ihre zellulären Bestandteile. Offenbar nur ein integraler Zelltyp der Venulenwand zeigt auch nach dieser enzymatischen Desintegrationsprozedur noch Dipeptidase IV als selektives Markerenzym und läßt sich, aufgrund des unter unseren Standardbedingungen im lokalen Bereich dieser Enzymaktivität enzymhistochemisch erzeugten roten Azofarbstoffs in der Rohsuspension myokardialer Gewebekomponenten, zum Beispiel gegenüber den Kardiomyozyten, klar ab-

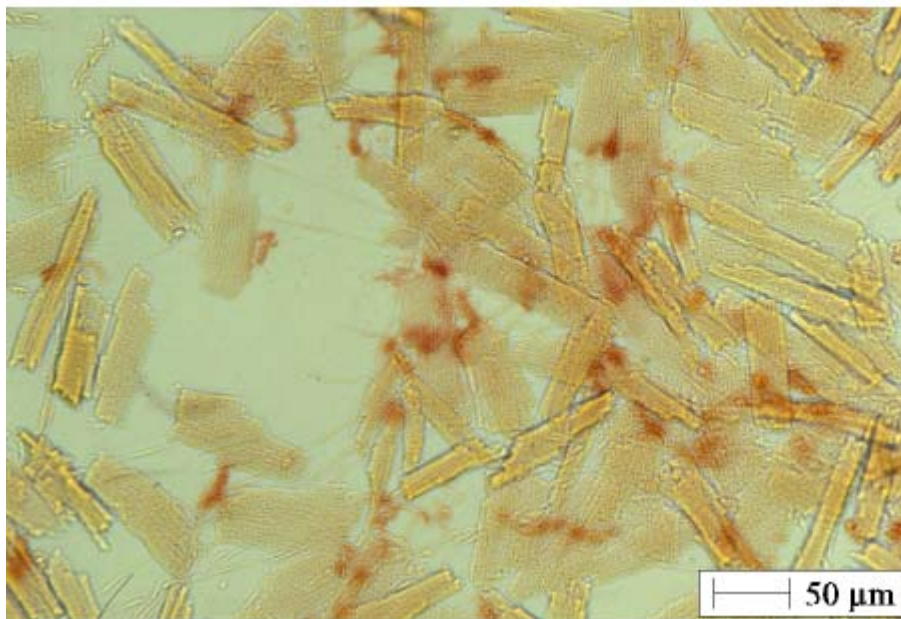


Abb. 19:
Dissoziierte venuläre Endothelzellen und Gefäßsegmente (rot) im Gemisch mit zahlreichen (stäbchenförmigen, unspezifisch gelbbraunen) Kardiomyozyten. Phasenkontrast.

grenzen (Abb. 19).

Solche Dipeptidase IV-positiven Zellen können aufgrund ihres offenbar besonders hohen spezifischen Gewichts mit Hilfe der beschriebenen Dichtegradientenzentrifugationstechnik sehr weitgehend von anderen vaskulären

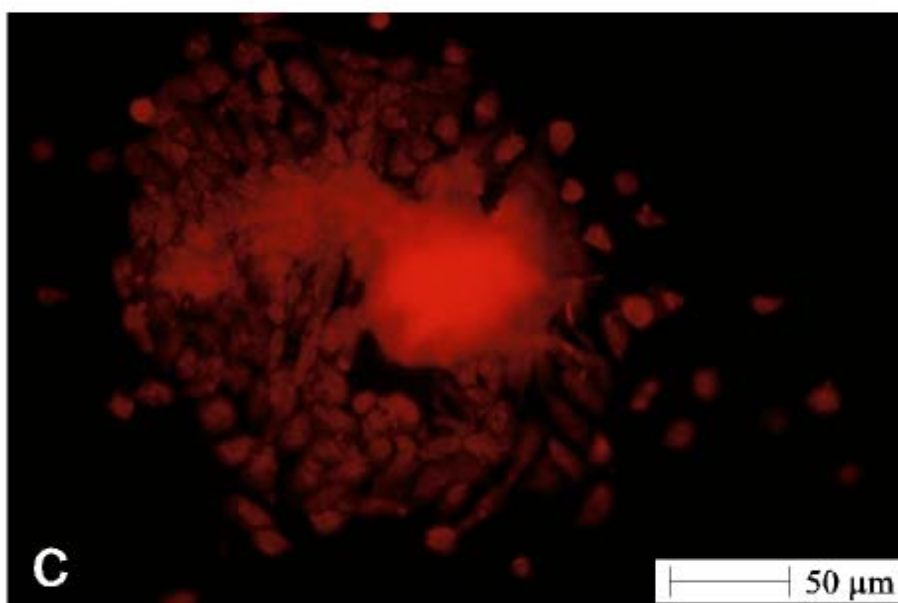
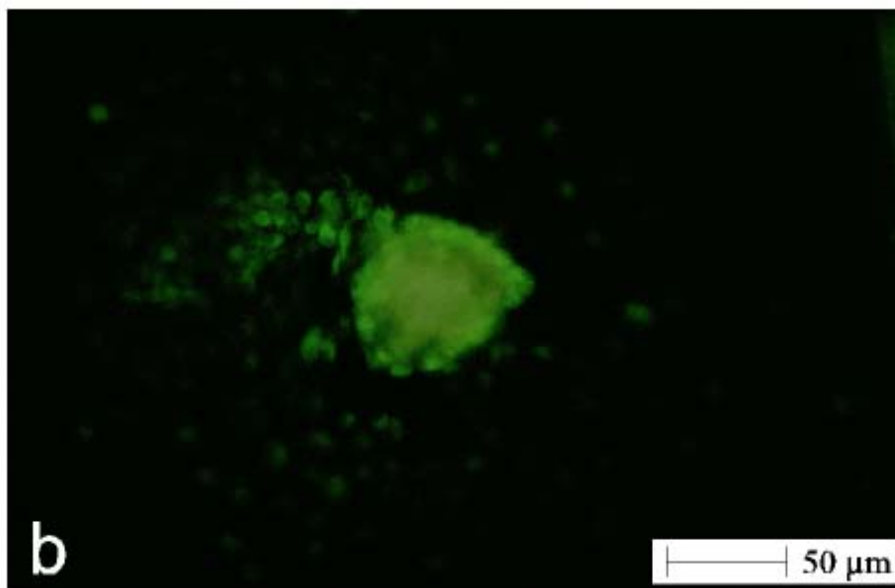
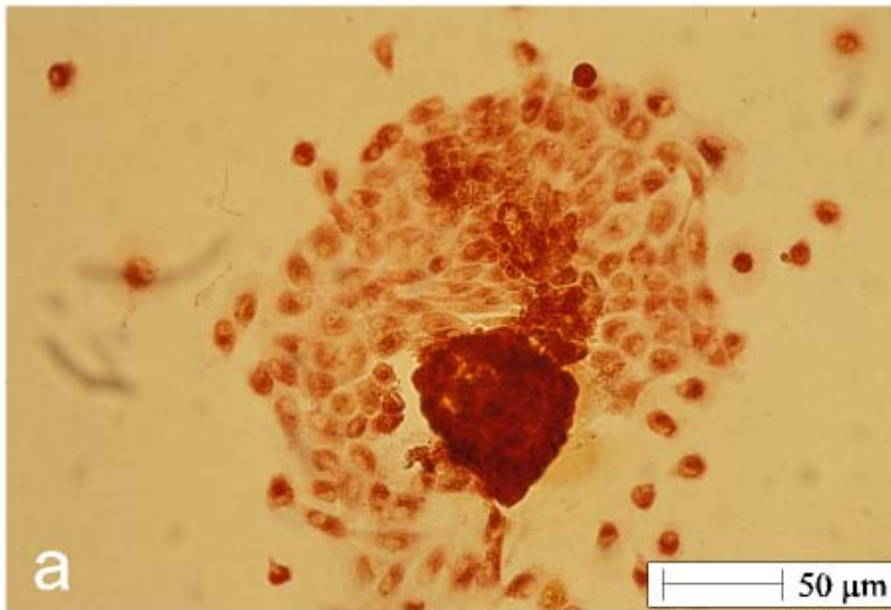


Abb. 20:
Enzymatisch isoliertes Venulenfragment nach eintägiger Kultivierung. Im Vergleich zu Teilbild a ist das selbe Präparat in den Teilbildern b und c um 90 Grad nach links gedreht.

a) Enzymhistochemische Färbung auf Dipeptidylpeptidase IV. Phasenkontrast.

b) Immunfluoreszenzmikroskopische Färbung auf von Willebrand Faktor.

c) Immunfluoreszenzmikroskopische Färbung auf glattmuskuläres α -Actin.

Zellarten des Koronarsystems abgetrennt beziehungsweise angereichert werden. Manchmal befinden sich in den schwersten Bereichen des zur Trennung der Zellen eingesetzten Dichtegradienten (siehe Methodenteil) auch noch kleinere, intakte Reststücke der ursprünglichen Venulenkompexe. Nach dem Einbringen solcher Segmente in Gewebekulturen lassen sich nach einem Tag Dipeptidase IV-positive und -negative Zellen unterscheiden (Abb. 20 a-c). Erstere weisen auch deutliche Konzentrationen an von Willebrand Protein auf (Abb. 20 b) und können so als die venulären Endothelzellen dieser Fragmente identifiziert werden. Dipeptidase IV ist in koronaren Venulen des Meerschweinchenherzens also ein hochselektives Markerenzym des venulären Endothels! Der dieses Enzym nicht aufweisende andere Zelltyp der Venulen im Meerschweinchenmyokard – dafür kommen nach der klassischen histologischen Lehrmeinung nur die venulären „Perizyten“ infrage – besitzt wie erwartet eine höhere Konzentration glattmuskulären α -Actins als die begleitenden Endothelzellen (Abb. 20 c), obgleich auch die letzteren dieses kontraktile Protein in (für Endothelzellen) auffälliger Konzentration enthalten.

3.2. Isolierung reiner Granulozyten aus Meerschweinchenblut

Erst nach langwierigen Versuchsreihen konnte mit dem in 2.3.5. beschriebenen Verfahren eine ausreichende Menge an unstimulierten PMN erhalten werden, die die für videokinematographische Zwecke bei starker Vergrößerung notwendige hohe Reinheit besaßen.

Für die Isolierung reiner Granulozyten aus Humanblut wird routinemäßig die Dichtegradientenlösung „Polymorphprep™“ eingesetzt. Damit lassen sich in einem Arbeitsgang sehr reine PMN aus menschlichem Blut isolieren (Abb. 21 a und 22 a). Versucht man mit dieser käuflichen Lösung jedoch polymorphkernige Granulozyten aus Meerschweinchenblut zu isolieren, so

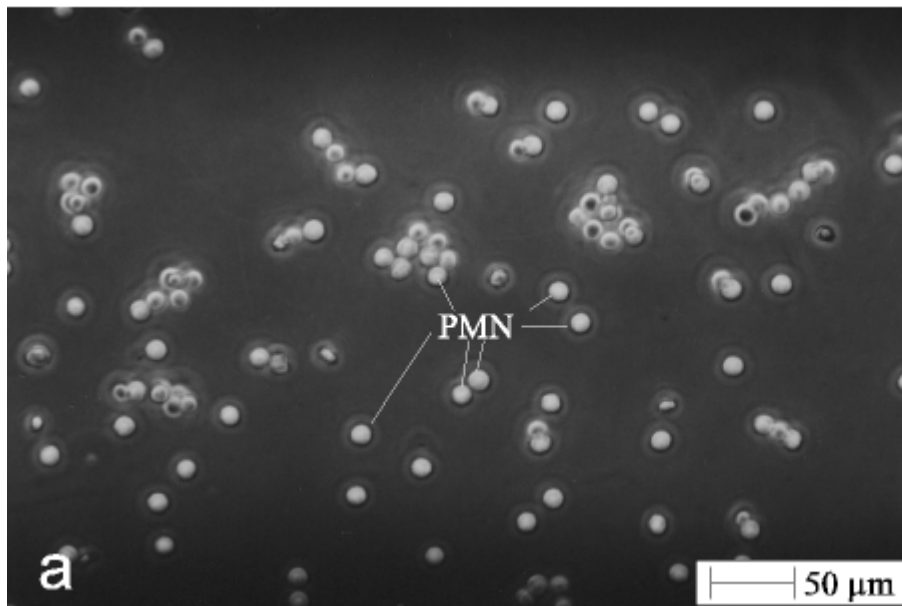
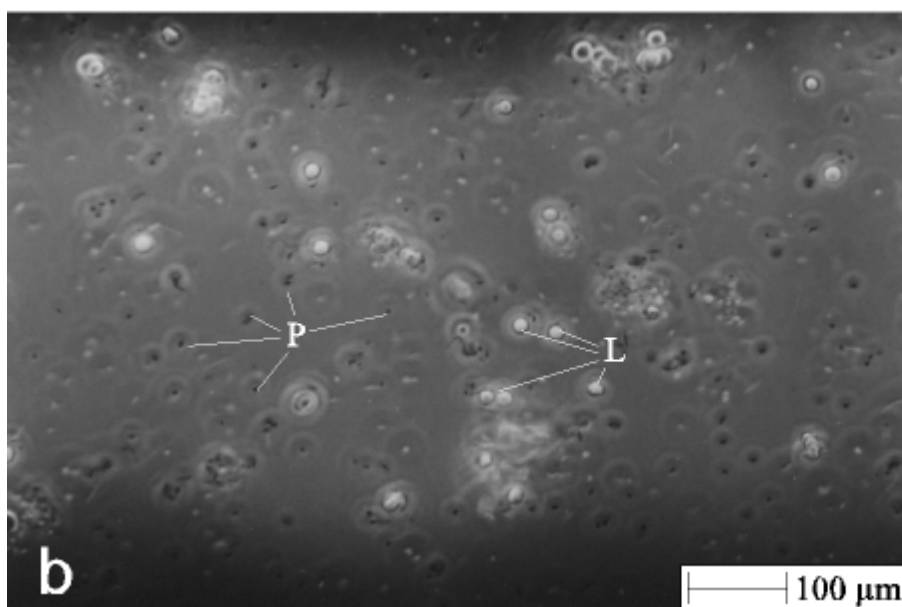


Abb. 21:
Ergebnis der Isolierung von PMN nach alleiniger "Polymorphprep" - Zentrifugation:

a) aus Humanblut: zu sehen sind fast ausschließlich Leukozyten, die sich nach Anfärbung (vgl. Abb. 22 a) als reine PMN herausstellen.



b) aus Meerschweinchenblut: man erkennt eine deutliche Anreicherung von Leukozyten (L), daneben jedoch auch zahlreiche Blutplättchen (P).

stellt man fest, daß sich damit für die geplanten kinematographischen Versuche nur viel zu unreine, durch Plättchen und andere Leukozyten stark verunreinigte, Granulozyten-Präparate erzielen lassen (Abb. 21 b).

Dieses Ergebnis läßt sich auch nicht wesentlich verbessern, wenn man nur geringe Blutmengen auf die Gradientenlösung aufträgt, vor allem ist dann natürlich auch die Ausbeute sehr klein. Ein wesentlicher Grund dafür ist die im Vergleich zum Menschen sehr unterschiedliche Form und Dichte der Zellfraktionen im Meerschweinchenblut, insbesondere der Blutplättchen, die viel größer sind und in nicht aktiviertem Zustand statt ellipsoider Form eine halbmondförmige Gestalt zeigen.

Um die erforderliche Reinheit für Granulozytenpräparate aus Meerschweinchen-

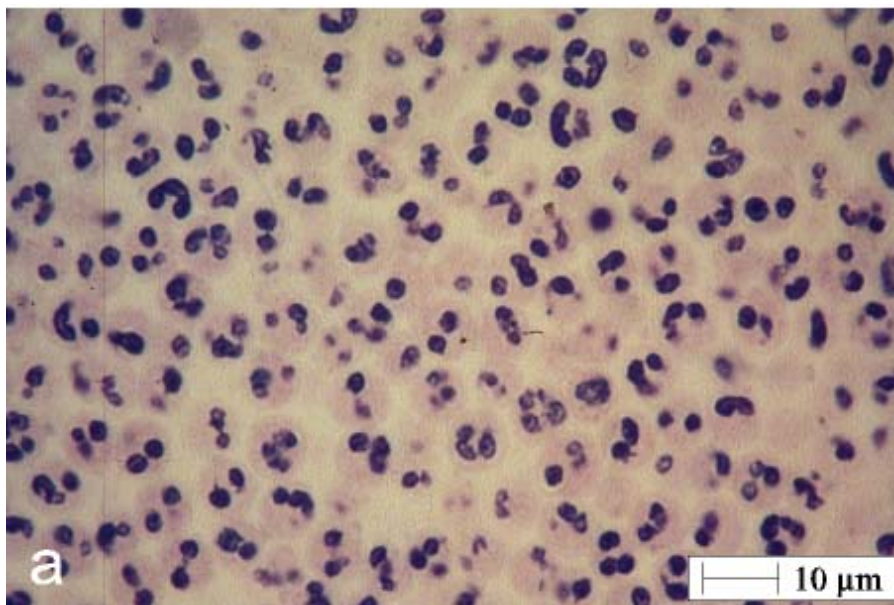
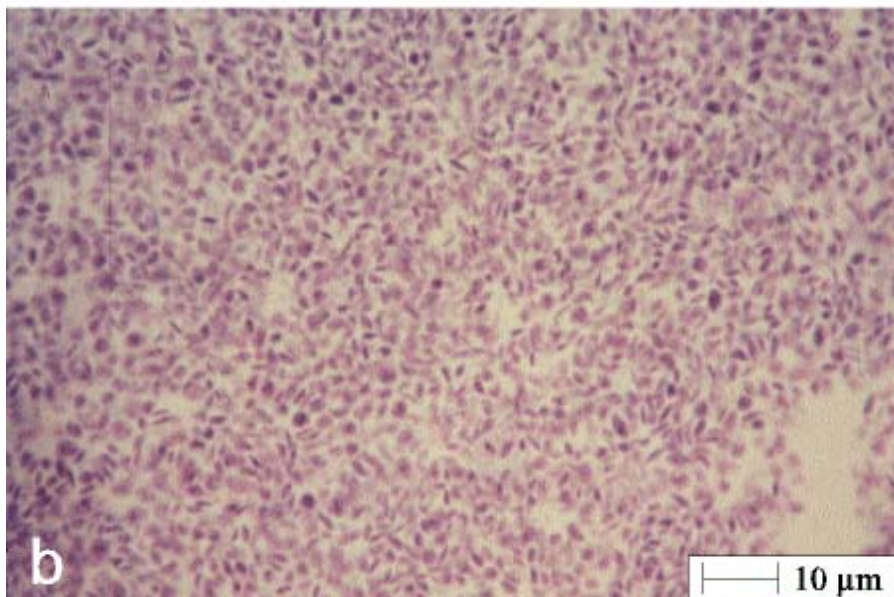


Abb. 22:
Gereinigte humane
Blutzellfraktionen:

a) PMN nach
"Polymorphprep" -
Zentrifugation.

b) Plättchen-reiches
Plasma nach
niedertouriger Zen-
trifugation von
Vollblut.



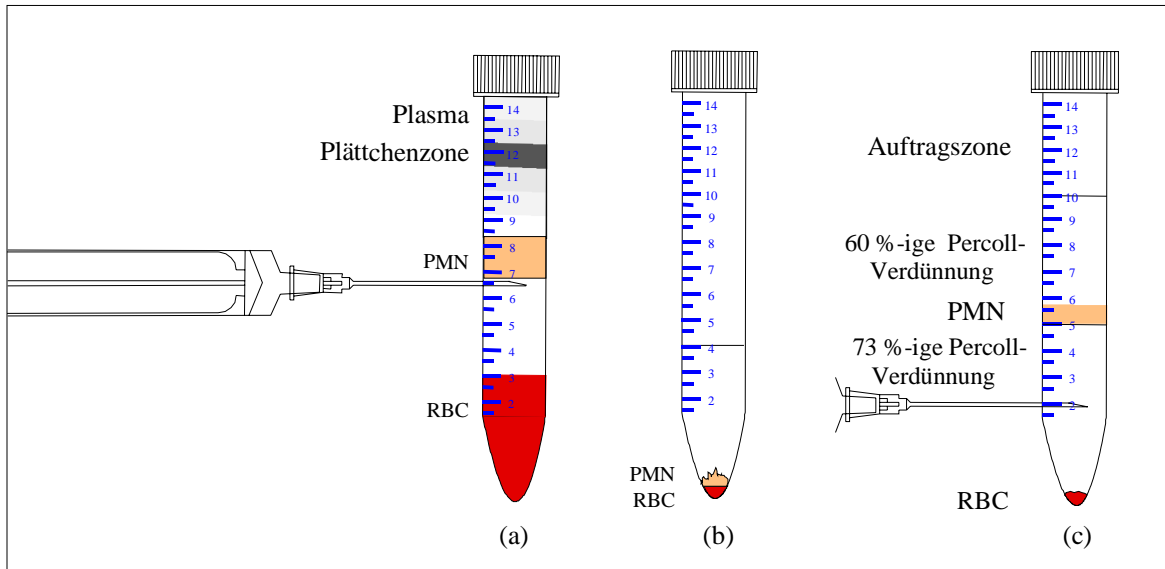


Abb. 23: Schrittweise Isolierung von hochreinen PMN mittels Zentrifugation.

a) Bandenmuster nach Polymorphprep-Zentrifugation, b) vorsichtig über 30 %-ige Percoll-Verdünnung sedimentierte PMN, c) Bandenmuster nach Zentrifugation der Zellpräparation über einen diskontinuierlichen Percoll-Gradienten.

blut zu erzielen, müssen – wie Abb. 23 schematisch zeigt – weitere, im Methodenteil ausführlich beschriebene Reinigungsschritte durchgeführt werden, die in systematischen Experimenten optimiert wurden.

Versucht man, die PMN-Schicht (vgl. Abb. 23 a) durch die Öffnung des Falconröhrchens abzusaugen, so führt dies zu einer Verschleppung größerer Mengen Thrombozyten in die darunterliegende PMN-Schicht. Daraus resultiert nicht nur eine Verunreinigung der Granulozyten, sondern auch deren Stimulierung durch Interaktionen mit den Blutplättchen. Diese Fehlerquelle wird ausgeschaltet durch vorsichtiges Absaugen der Granulozytenbande von unten über eine seitlich in das Zentrifugenröhrchen eingestochene Kanüle (Abb. 23 a). Eine grundlegende Anforderung an alle infrage kommenden Reinigungsverfahren ist stets, daß die schließlich erhaltenen PMN nicht vorstimuliert sein dürfen. Dies kann nur erreicht werden, wenn sämtliche zur Reinigung der PMN eingesetzten Lösungen auf einer Temperatur von 37° C gehalten und mit Citrat und autologem EDTA-Plasma versetzt werden. Zu hohe

Scherkräfte, zum Beispiel beim Pipettieren, führen ebenfalls sofort zu einer Vorstimulation der Granulozyten.

Bei Beachtung all dieser Vorbedingungen lassen sich aus einem 500 Gramm schweren Meerschweinchen im Endeffekt ca. 10^6 PMN etwa 95 %-iger Reinheit isolieren, die für unsere Versuchszwecke am besten nur in 25 μ l autologem EDTA-Plasma suspendiert wurden.

3.3. Isolierung von Primärkulturen venulärer Endothelzellen

3.3.1. Perfusionsapparatur

Mit der in Abb. 24 schematisch dargestellten Perfusionsapparatur gelingt es, das Meerschweinchenherz unter sterilen Bedingungen fast vollständig in Einzelzellen zu dissoziieren. Um eine maximale Ausbeute an venulären Endothelzellen zu erzielen, wird der gesamte Versuch unter Zuhilfenahme von Wärmeschrank, Durchlauferhitzer und den beschriebenen Trichtern bei 37° C durchgeführt.

Verschiedene Faktoren sind für eine homogene Koronarperfusion besonders wichtig und wurden deshalb im Rahmen der vorliegenden Arbeit optimiert:

1. Das Ligieren der Lungenvenen (ohne Abschnürung von Vorhofgewebe!) ist wichtig, damit die im Verlauf der proteolytischen Perfusion undicht werdenden Mitralklappen nicht dazu führen, daß Perfusat über diese Gefäße verloren wird.
2. Nachdem das Herz in das dicht verschlossene Zentrifugenröhrchen (C) (vgl. Abb. 24) überführt und Schlauchklemme (I) geschlossen ist, wird der Koronarfluß allein durch die peristaltische Pumpe (E) bestimmt. Diese pumpt ab aus dem zuvor bei einem Perfusionsdruck von 160 mbar weit aufgedehnten Koronarsystem, das durch die geschilderten Maßnahmen auch bei niedrigerem Perfusionsdruck nicht kollabieren oder sich spastisch verengen kann.
3. Während der Perfusion schwebt das Herz nahezu in einer 30 %-igen Percoll-lösung. Da diese fast die gleiche Dichte wie das Meerschweinchenherz besitzt, wird verhindert, daß das an der Kanüle hängende Herz aufgrund seines Eigengewichtes deformiert und dabei die Perfusion des Koronarsystems abgeklemmt wird.

Im Anschluß an die Nachverdauung im Trichter (D) werden durch Filtration der Suspension durch ein 200 µm Nylonnetz eventuell noch vorhandene Zell-

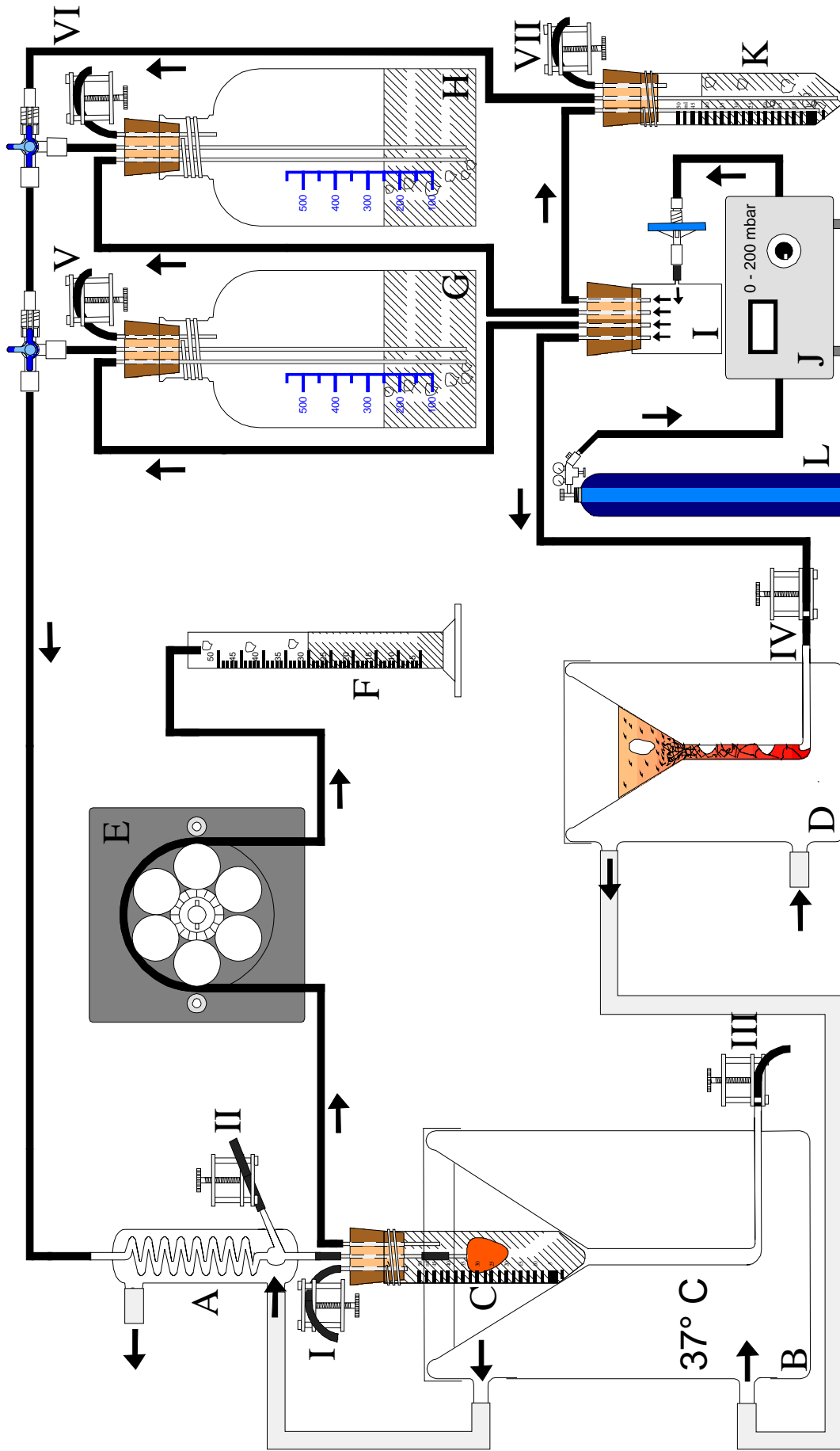


Abb. 24: Versuchsanordnung zur sterilen Perfusion und enzymatischen Desintegration isolierter Kleintierherzen: A-Durchlauferwärmer, B-Trichter groß, C-Zentrifugenröhrchen (50 ml), enthält das isoliert perfundierte Kleintierherz schwebend in 30%-iger Percollverdünnung, D-Trichter klein, E-peristaltische Pumpe, F-Auffanggefäß, G-Flasche mit KRSCa, H-Flasche mit KRSa, I-Verteilergefäß, J-Druckregler, K-Zentrifugenröhrchen (50 ml) mit Enzymlösung, L-Carbogen-Flasche; I-VII: Schlauchklemmen.

aggregate abgetrennt. Durch Passagieren der Suspension durch die unter 2.3.1. beschriebene 20 G Einmalkanüle werden dann auch noch die letzten Gefäßfragmente in Einzelzellen zerlegt.

Die Vorzentrifugation des Zellgemisches in einem mit 9 ml einer 90 %-igen Percolllösung unterschichteten 50 ml Falconröhrchen ermöglicht bereits eine Abtrennung einer größeren Menge von Verunreinigungen geringer Dichte wie z. B. totes Zellmaterial, das mit dem Überstand abgesaugt wird. Nach Hinzufügen von HES bis zur 20 ml Marke und Vermischen der Schichten befinden sich die dissoziierten Zellen in einer etwa 40 %-igen Percolllösung.

3.3.2. Dichtegradientenzentrifugation

Aufgrund der unterschiedlichen Dichte der Einzelzellen (Blutzellen, verschiedene Endothelzellen, Kardiomyozyten, Fibroblasten, glatte Muskelzellen und Perizyten) können diese in einem linearen Percoll-Dichtegradienten erheblich angereichert werden. Dazu eignet sich besonders eine in der Arbeitsgruppe von Prof. Nees entwickelte Zellseparationszentrifuge, deren typisches, konisch zugespitztes Separationsgefäß im unteren Teil der Abb. 25 dargestellt ist.

Da das Zellgemisch bereits in 40 %-igem Percoll als Probe in den Gradienten geschichtet wird, können Bestandteile mäßiger Dichte, z. B. kapilläre Endothelzellen und zahlreiche kleine Überreste von Gefäßwänden, erst gar nicht in den Gradienten einwandern, zumal die Zentrifugalkraft an der Auftragszone noch recht gering ist. Die Zellen mit der höchsten Dichte – rote und weiße Blutkörperchen und hyperkontrahierte Herzmuskelzellen – durchqueren dagegen den gesamten Gradienten. Auch die intakten Kardiomyozyten wandern weit in den Gradienten hinein und bilden mit den venulären Endothelzellen eine gemeinsame Bande bei einer Dichte von 1,060-1,065 Gramm/cm³. Hinter dieser Bande finden sich die Peptidase negativen kapillären Endothelzellen bei 1,05 Gramm/cm³ (sie bilden in Primärkultur typische flachzellige Kolonien, siehe

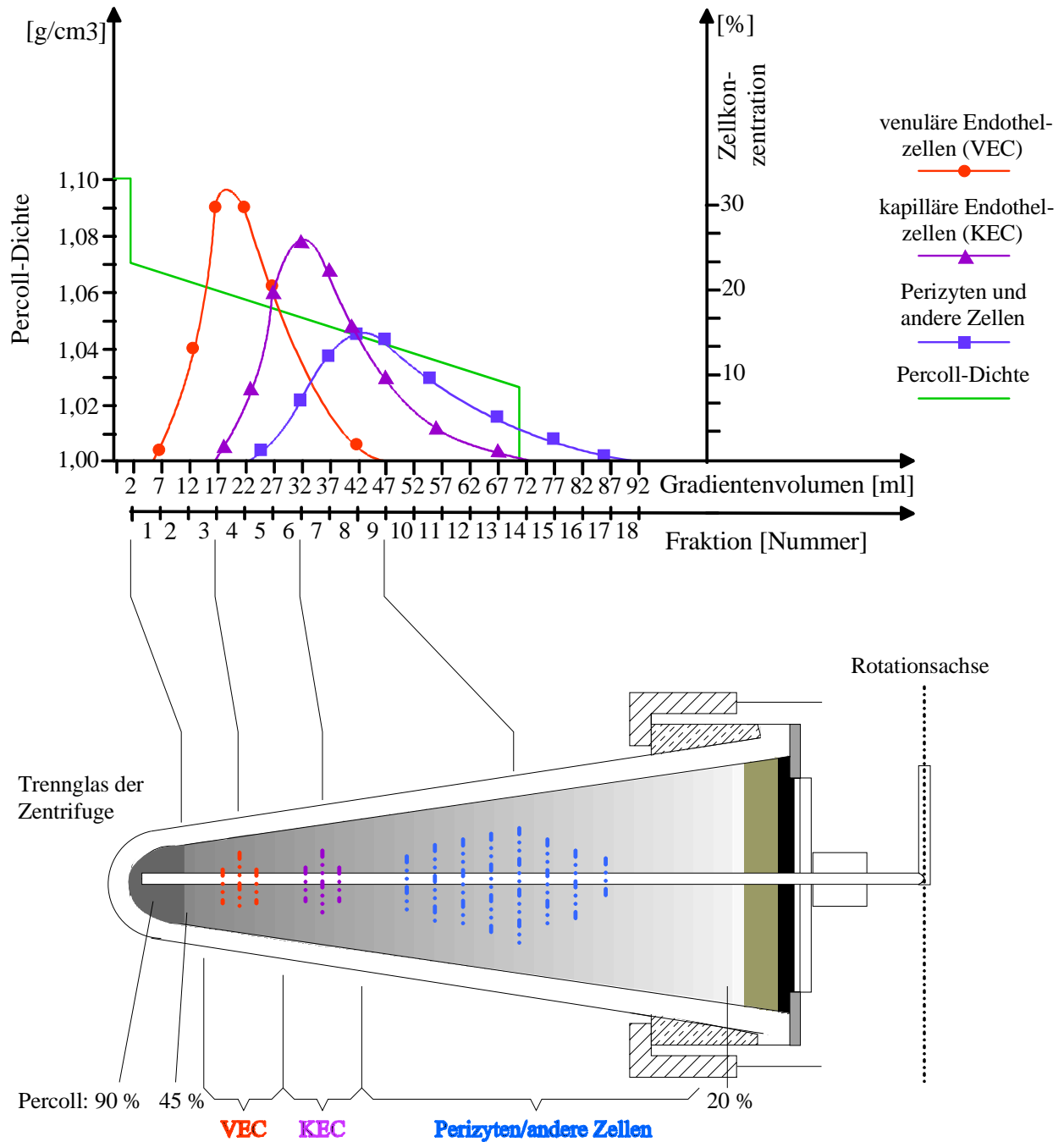


Abb. 25: Fraktionierung zellulärer Komponenten des Koronarsystems proteolytisch dissoziierter Meerschweinchenherzen mittels Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation. Die Zellkonzentrationen wurden jeweils in % der in dicht ausgesäten Primärkulturen mikroskopisch ausgezählten Gesamtzellen der jeweiligen Art ermittelt (= 100 %). VEC = venuläre Endothelzellen, KEC = kapilläre Endothelzellen.

Abb. 25). Die übrigen Zellen verteilen sich im darauffolgenden Bereich bis zur Auftragszone, die durch alkalische Phosphatase gekennzeichneten Perizyten akkumulieren in der Mitte des Gradienten zusammen mit glatten Muskelzellen und Fibroblasten. Die fraktionierten Zellen werden vor der Aussaat durch zweimaliges Waschen mit DMEM von Percollresten befreit.

3.4. Wachstumsverhalten und weitere Reinigung

3.4.1. Primärkultur und Zellausbeute

Die durch die Dichtegradientenzentrifugation hochgereinigten venulären Endothelzellen werden in DMEM ausgesät. In diesem vergleichsweise einfachen Kulturmedium können innerhalb einer Woche konfluente Primärkulturen erhalten werden, in denen die venulären Endothelzellen ihr typisches Markerenzym exprimieren. Die Verwendung von komplexeren Nährmedien mit zahlreichen Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel das spezielle Wachstumsmedium der Firma Promocell (PC), führt zu keinem wesentlich schnelleren Wachstum der Endothelzellen, wohl aber zu explosionsartiger Vermehrung der kontaminierenden Begleitzellen.

Kein Nährmedium konnte gefunden werden, das den venulären Endothelzellen einen entscheidenden Wachstumsvorteil gegenüber anwesenden glatten Muskelzellen, Perizyten und Fibroblasten gewährte. Letztere zeichnen sich durch eine nicht durch Kontaktinhibition gebremste Proliferationsfähigkeit und mehrschichtiges Wachstum aus, so daß sie innerhalb einer Woche in den Kulturen stark zunehmen und die inzwischen geformten Endothelzellkolonien venulärer Herkunft vollständig umzingeln. Eine solche Primärkultur ist in Abb. 26 a zu erkennen.

Ausführliche mikroskopische Zählreihen erbrachten das Ergebnis, daß die mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen und in gerade konfluent gewordenen Primärkulturen versammelten venulären Endothelzellen, bezogen

auf die in einem Meerschweinchenherzen vorliegende Gesamtzahl aller Zellen (ca. 10^9 Zellen pro 1 Gramm), ca. 15.000-fach angereichert werden können.

3.4.2. Reinigung der Primärkulturen venulärer Endothelzellen

Zur weiteren Reinigung der Primärkulturen kommt das im Methodenteil bereits ausführlich beschriebene Verfahren zum Einsatz. Durch die Inkubation der Kulturen mit PC_{\min} vor der Reinigung wird eine selektiv bessere Adhäsion der Endothelzellen erzielt, die nach einem Tag in diesem Minimalmedium noch fest auf dem Schalenboden sitzen, während die Fremdzellen nur noch schwach am Boden haften. So kann die Wirksamkeit des verwendeten ECPS I noch stark erhöht werden.

Abb. 26 verdeutlicht den schrittweise entwickelten Reinigungsprozeß: In Teilbild c dieser Abbildung ist zu sehen, daß sich bereits 25 min nach Zugabe von ECPS I vorher breitbasig aufsitzende Fremdzellen zu kontrahieren beginnen. Teilbild d zeigt eine noch stärkere Schädigung der Fremdzellbereiche. Nach dem Abstoppen erholen sich die inzwischen auch etwas irritierten Endothelzellen wieder, während die Schädigung der Fremdzellen noch fortschreitet. Der Zusatz von Flavonoiden beim Abstoppen verbessert zusätzlich die Haftung der Endothelzellen auf dem Boden der Kulturschale so gut, daß kräftig gespült werden kann, um so alle Fremdzellen vollständig zu entfernen (vgl. Abb. 26 f). Die so gereinigte Zellen sind vital und proliferieren rasch (vgl. Abb. 26 g und h).

Werden alle ausgesäten VEC eines Meerschweinchenherzens nach achttägiger Kultivation wie im Methodenteil beschrieben von Fremdzellen gereinigt, erhält man nach 21 Tagen eine Ausbeute von etwa 6×10^6 Zellen pro Gramm Herz in 90-98 %-iger Reinheit.

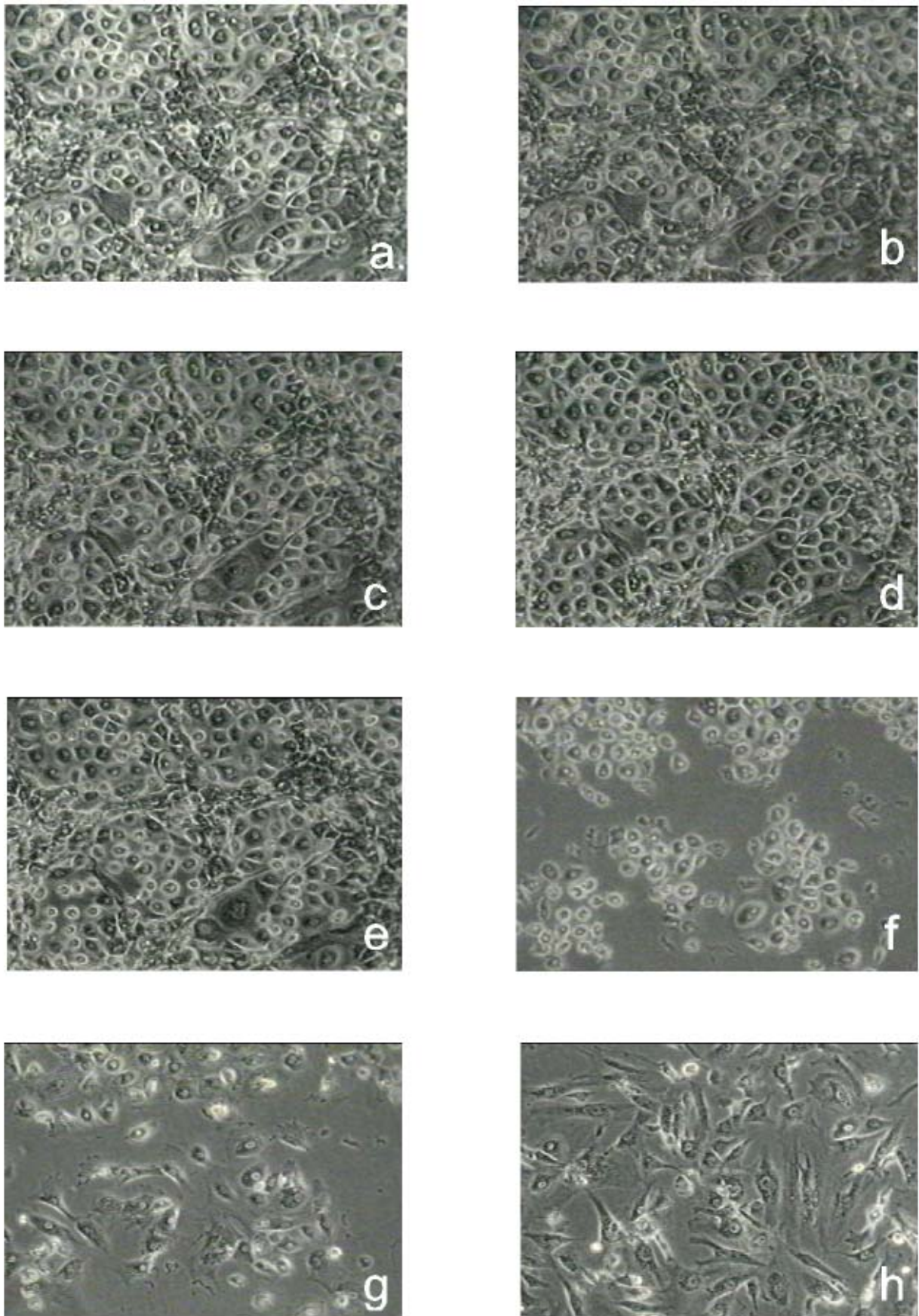


Abb. 26: Reinigung einer Primärkultur venulärer Endothelzellen nach dem im Methodenteil ausführlich beschriebenen ECPS-Verfahren: a) Ausgangssituation b) Sofort nach Zugabe von ECPS I c) 25 min nach Zugabe von ECPS I d) 50 min nach Zugabe von ECPS I, Zeitpunkt des Abstoppens e) 25 min nach Abstoppen von ECPS I mit Kulturmedium mit Zusatz von Flavonoiden ($300\mu\text{M}$) f) nach Spülen der Kultur mit der speziellen Zellwaschanlage g) 2 Stunden nach der Reinigung h) 12 Stunden nach der Reinigung. Alle Bilder in 100-facher Vergrößerung im Phasenkontrast.

3.5. Histologische Charakterisierung

3.5.1. Phasenkontrast

Im Phasenkontrast erkennt man den für Endothelzellen strikt einschichtigen Zellrasen mit der typischen „Pflastersteinarchitektur“. Letztere bildet sich besonders schön heraus, wenn die Kultur für einige Tage in „Endothelwachstumsmedium“ der Firma Promocell (PC) inkubiert wird (Abb. 27 b)

Ein spezielles Charakteristikum der kultivierten venulären Endothelzellen stellen zahlreiche schon mit diesem lichtmikroskopischen Verfahren erkennbare granulöse Einschlüsse dar, die möglicherweise verantwortlich sind für das auffallend hohe spezifische Gewicht dieses Zelltyps. Im Zellkern finden sich meist zwei Nucleoli.

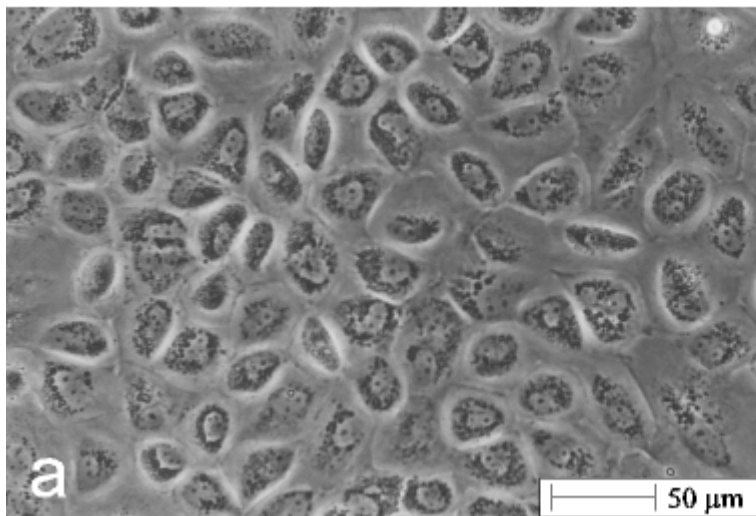
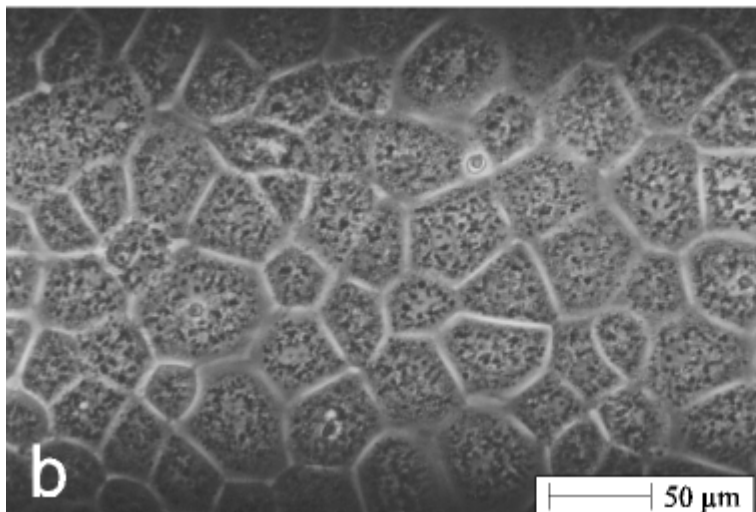


Abb. 27: Gereinigte venuläre Endothelzellkulturen, die über mehrere Tage in unterschiedlichen Medien kultiviert wurden:

a) in DMEM

b) in PC



3.5.2. Rasterelektronenmikroskopie (REM)

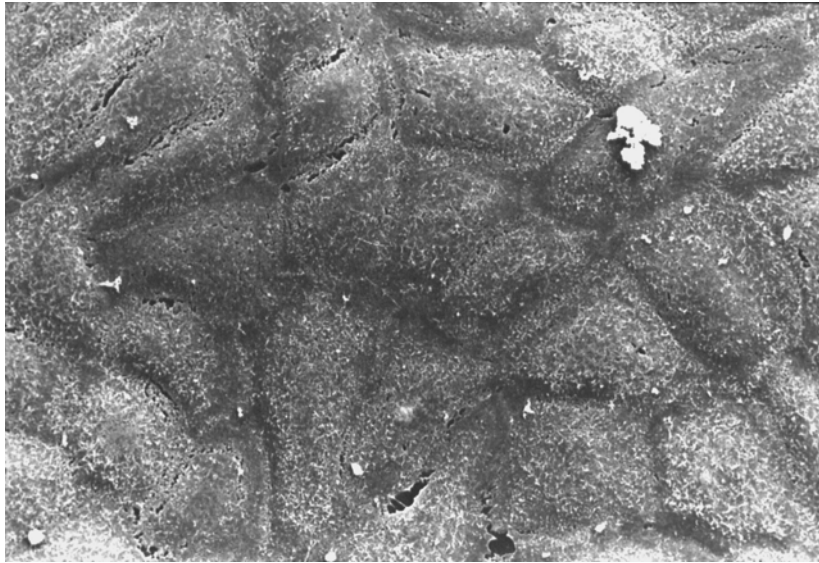


Abb. 28: Rasterelektronenmikroskopisches Bild einer Kultur venulärer Endothelzellen

Ruhende, im konfluenten Verband vorliegende venuläre Endothelzellen zeigen eine durch Ausbuchtungen intrazellulärer Organellen beziehungsweise Granula, aber auch viele kurze Pseudovilli bedingte starke Profilierung ihrer Oberfläche (Abb. 28). Im Bereich der Zellfugen kommt es zu reißverschlussartigen Überlappungen der benachbarten Zellen.

3.5.3. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Systematische ultrastrukturelle Untersuchungen (Abb. 29) offenbaren viele bemerkenswerte Einzelheiten der venulären Endothelzellen. Auffallend sind schon der große Zellkern, reichlich vorhandenes rauhes endoplasmatisches Retikulum und zahlreiche Golgi-Apparate. Die vielen schlauchförmigen Mitochondrien umgeben den Kern in besonders hoher Konzentration. Im Cytoplasma finden sich zahlreiche Weibel-Palade-Körperchen, die allerdings im Schnitt nur selten getroffen werden (vgl. Fluoreszenzfärbung auf von Willebrand Protein in Kapitel 3.5.4.).

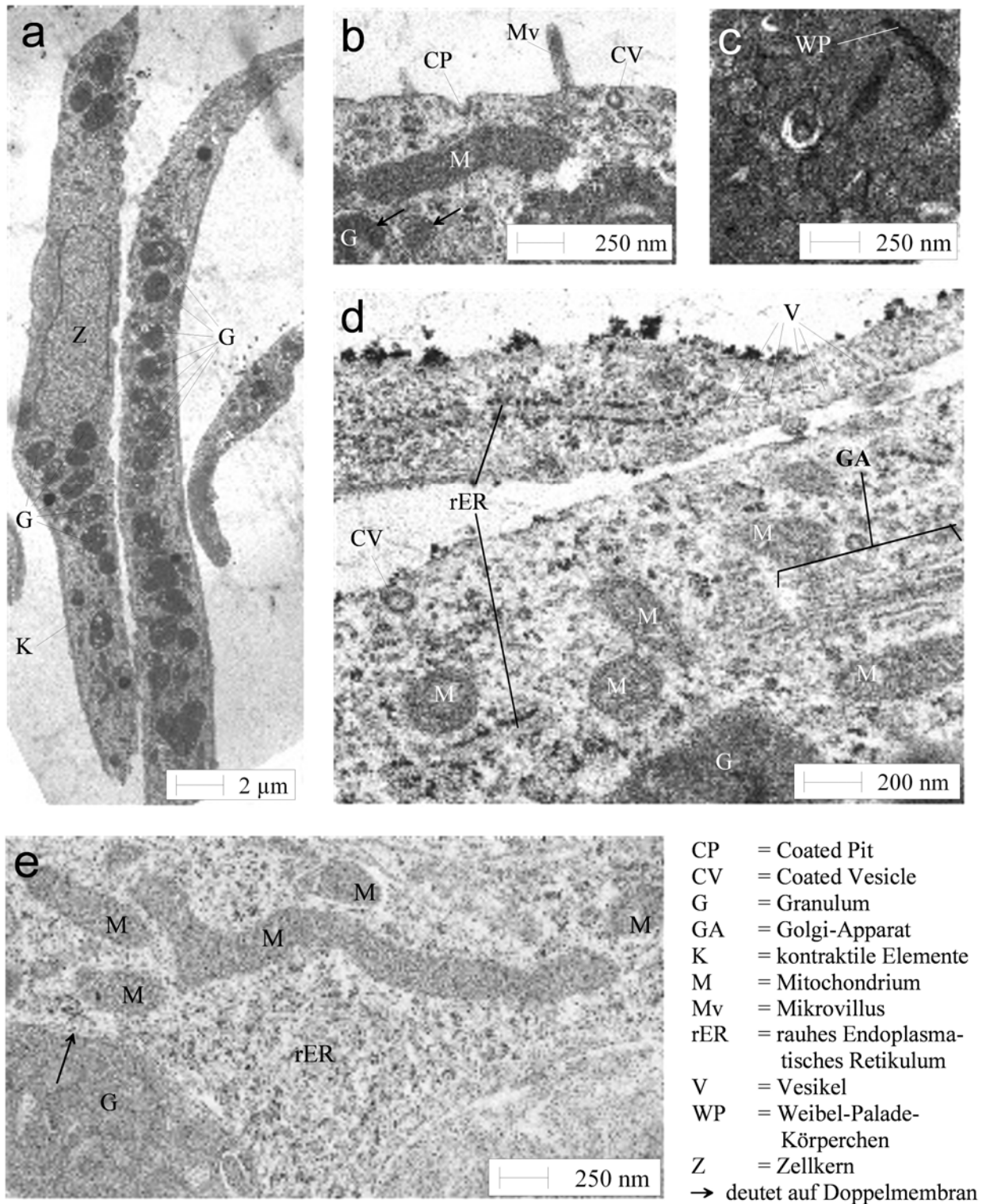


Abb. 29: Transmissionselektronenmikroskopisch untersuchte Ultrastruktur venulärer Endothelzellen.

Die Mehrzahl der im Phasenkontrast als „Granula“ imponierenden Strukturen entpuppen sich im Elektronenmikroskop als vesikulo-vakuoläre Organellen, die aus zahlreichen, ineinander verschachtelten Membranen, aber auch sehr proteinreichen Matrices zu bestehen scheinen. Wie in Abb. 29 b und e zu sehen ist, werden diese für venuläre Endothelzellen sehr typischen Organellen von einer gut ausgebildeten Doppelmembran umschlossen.

3.5.4. Fluoreszenzfärbungen

Nachweis von Faktor VIII-Antigen

Die in transmissionselektronenmikroskopischen Querschnitten nur hin und wieder getroffenen Weibel-Palade-Körperchen lassen sich aufgrund ihrer intensiven Expression von Faktor VIII-Antigen mit hochspezifischen fluoreszierenden Antikörpern in großer Zahl perinukleär nachweisen (Abb. 30).

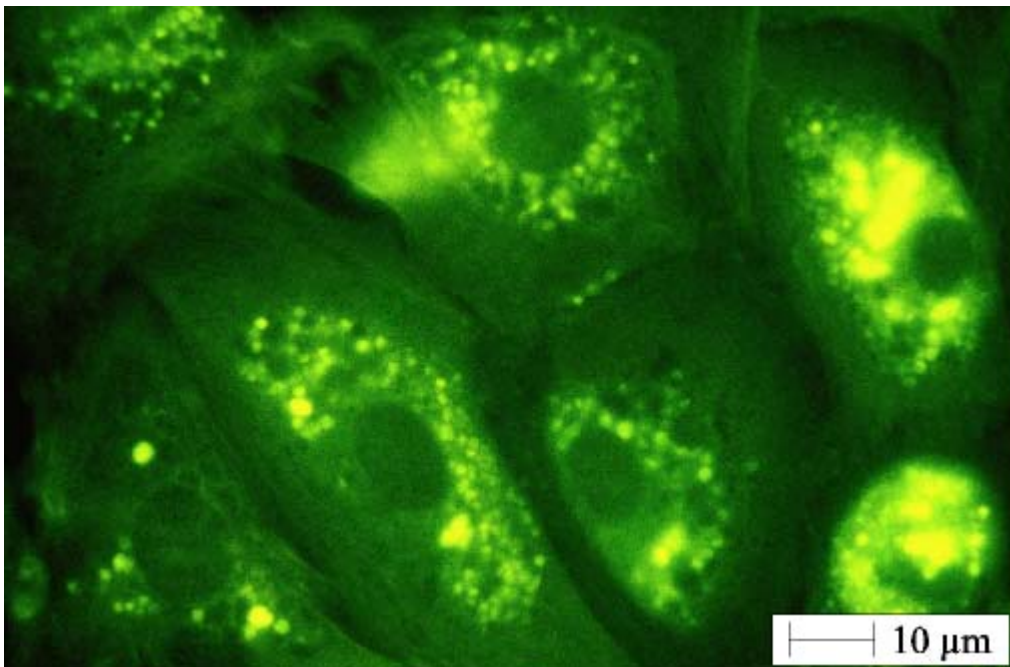


Abb. 30: Immunfluoreszenz-Nachweis von Faktor VIII-Antigen in gezüchteten venulären Endothelzellen aus Meerschweinchenherzen.

Nachweis des Ac-LDL-Rezeptors

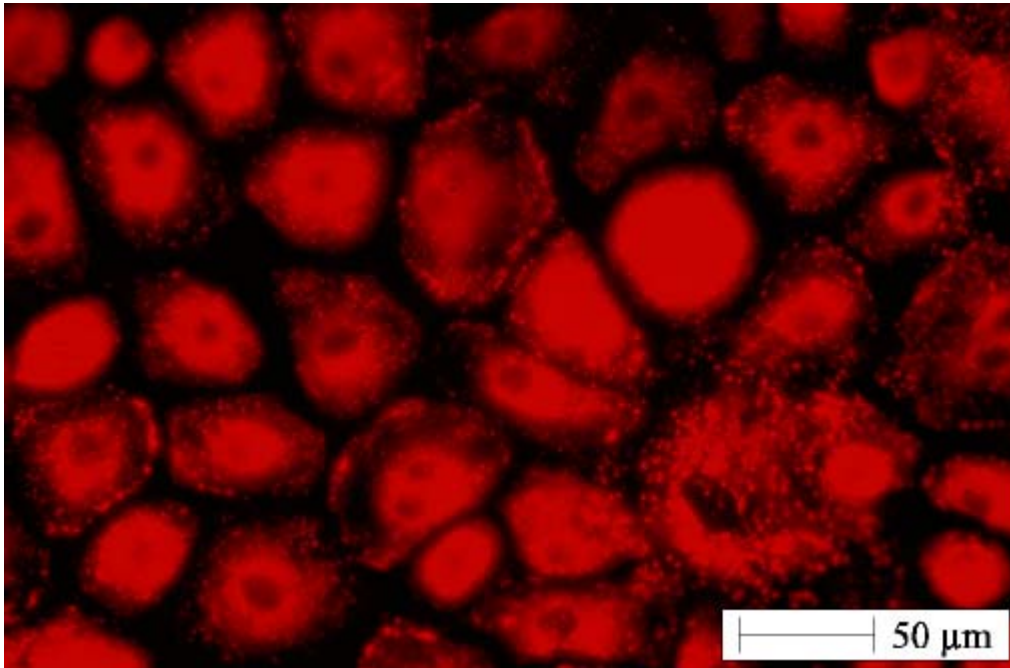


Abb. 31: Venuläre Endothelzellen nach Inkorporation von Rhodamin-markiertem Ac-LDL.

Im Gegensatz zu Fibroblasten und Perizyten nehmen Endothelzellen aufgrund ihres „Scavengerrezeptors“ schnell angebotenes Ac-LDL auf (Abb. 31) und bauen es in ihren Lysosomen ab. Unmarkiertes LDL hemmt konzentrationsabhängig die Aufnahme von Ac-LDL in die venulären Endothelzellen.

Nachweis von glattmuskulärem α -Actin:

Glattmuskuläres α -Actin ist gemeinhin kein typisches Endothelzellprotein. Venuläre Endothelzellen enthalten dieses kontraktile Protein jedoch in deutlich nachweisbarer Konzentration.

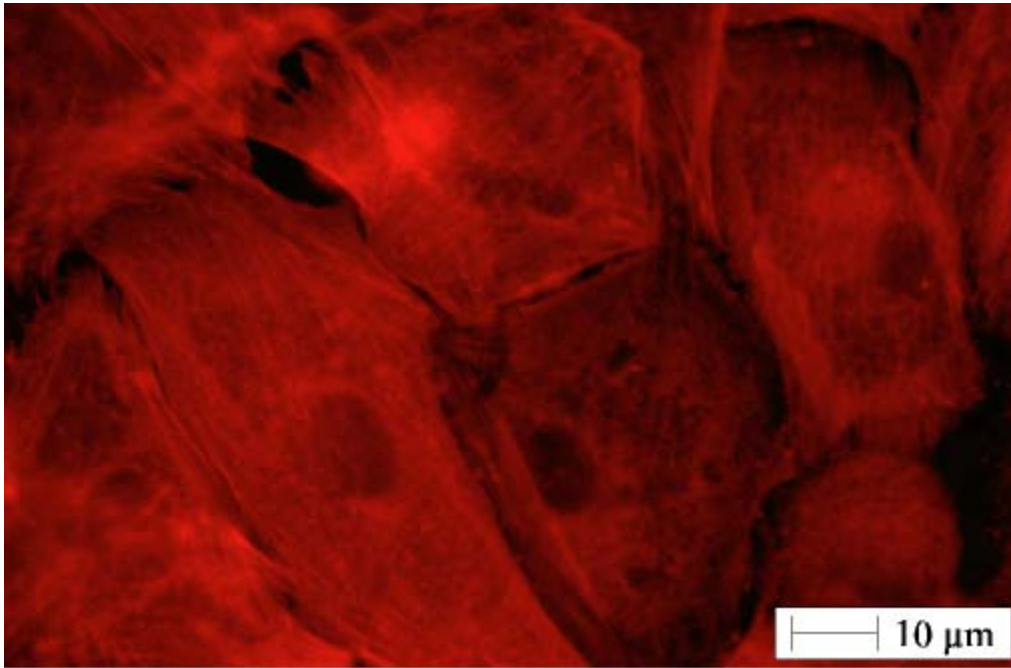


Abb. 32: Nachweis glattmuskulären α -Actins in venulären Endothelzellen durch deutliche rote Fluoreszenz.

3.5.5. Enzymhistochemischer Nachweis von Dipeptidyl-Aminopeptidase IV

Die Abbildungen 33 a-c zeigen Endothelzellen venulären Ursprungs in Primärkulturen, die sich aus dem durch Dichtegradientenzentrifugation vorgereinigten venulären Zellgemisch im Verlauf einer 2-wöchigen Kultivationsperiode entwickelt haben. Nur die mit typischer plasterstein-ähnlicher Koloniearchitektur wachsenden Endothelzellklone zeigen die enzymhistochemisch durch einen roten Farbstoff nachweisbare Peptidaseaktivität.

Abb. 33 c zeigt einen Ausschnitt einer reinen Kultur venulärer Endothelzellen, die weiterhin ihr Markerenzym entfalten.

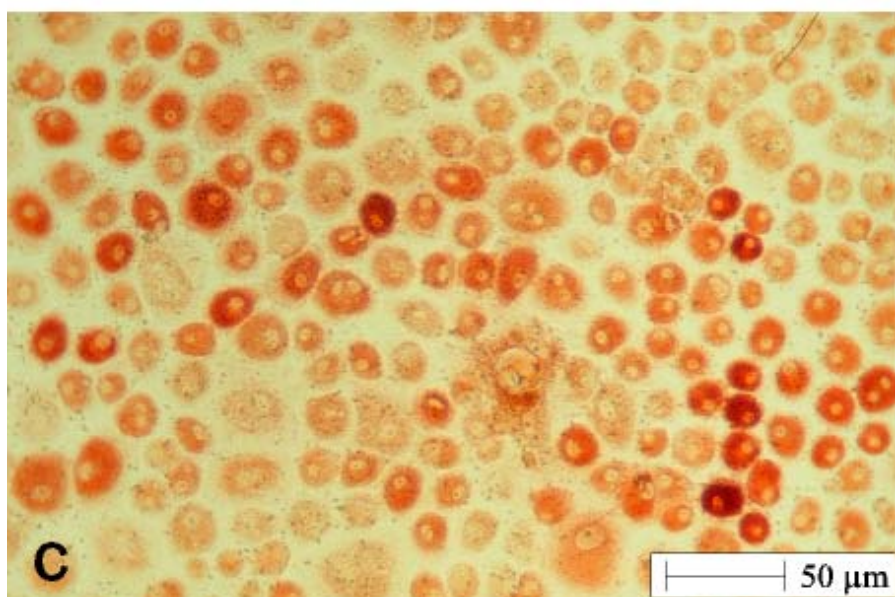
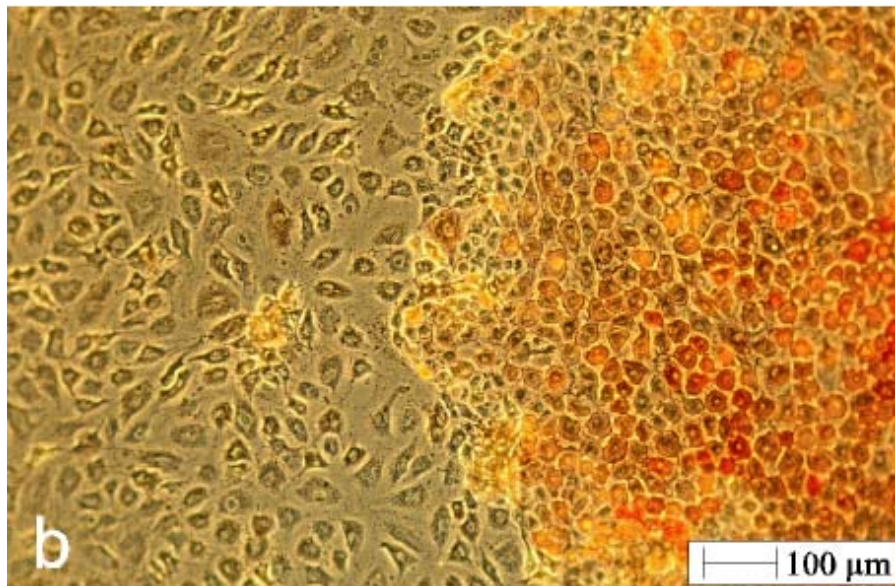
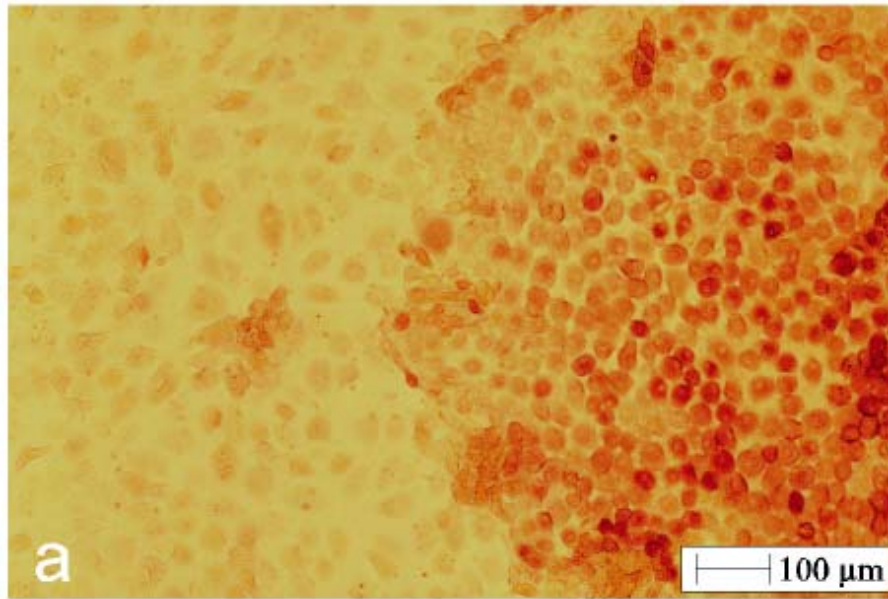


Abb. 33:
Enzymhistologische Identifizierung von venulären Endothelzellen aufgrund ihrer Dipeptidylpeptidase IV - Aktivität.

a und b) Ausschnitt aus einer Mischkultur im Hellfeld beziehungsweise im Phasenkontrast.

c) Ausschnitt aus einer reinen Kultur bei stärkerer Vergrößerung im Phasenkontrast.

3.6. Videokinematographische und rasterelektronenmikroskopische Beobachtung gezüchteter Endothelschichten unter dem Einfluß aktivierter Blutbestandteile

Erste Untersuchungen zu dieser Thematik galten dem akuten Einfluß von hochkonzentriertem Thrombin (1 IU/ml) auf die Integrität venulärer Endothelschichten. Dazu gibt die in Abb. 34 zusammengefaßte Bilderfolge aus einem Zeitraffervideofilm einen direkten Einblick. Man erkennt einen dichten Endothelrasen aus pflastersteinartigen Zellen, die durch ihre vielen durchscheinenden Organellen, vor allem aber durch sehr prägnante Zellfugen charakterisiert sind, die schon im Phasenkontrast einen dichten Eindruck machen. Die rasterelektronenmikroskopischen Abbildungen stark vergrößerter venulärer Zellfugen (Abb. 35 a, b) lassen erkennen, daß jede einzelne Endothelzelle umlaufend in ihrer peripheren Randzone durch zahlreiche Protrusionen charakterisiert ist, die sich in den Zellfugenbereichen reißverschlußartig überlappen. Alle in Abb. 34 abgebildeten Zellen befinden sich ganz offensichtlich in einem Ruhezustand, ein genauer Vergleich der Organellenverteilung in jeder Zelle im hier dokumentierten Zeitverlauf macht aber deutlich, daß auf ultrastruktureller Ebene dennoch eine langsame, aber ständige Umformung der Zellen stattfindet, und daß auch die Zellen selbst geringe Ortswechsel vollziehen. Diese Tatsache läßt sich natürlich besonders überzeugend mit einem kompletten Zeitraffervideofilm belegen. Insgesamt befindet sich Endothelgewebe also ständig in einem Umbauprozess. Thrombin hat aber keinerlei akut erkennbaren Effekt auf diese Gegebenheiten, vor allem auch nicht im Hinblick auf eine Öffnung von Zellspalten.

In solche Schichten konfluenter Endothelzellen venulären Ursprungs integrierte Perizyten lassen sich durch Thrombin jedoch zu einer augenblicklichen Kontraktion induzieren (vgl. Abb. 36), die minutenlang auf die lokale

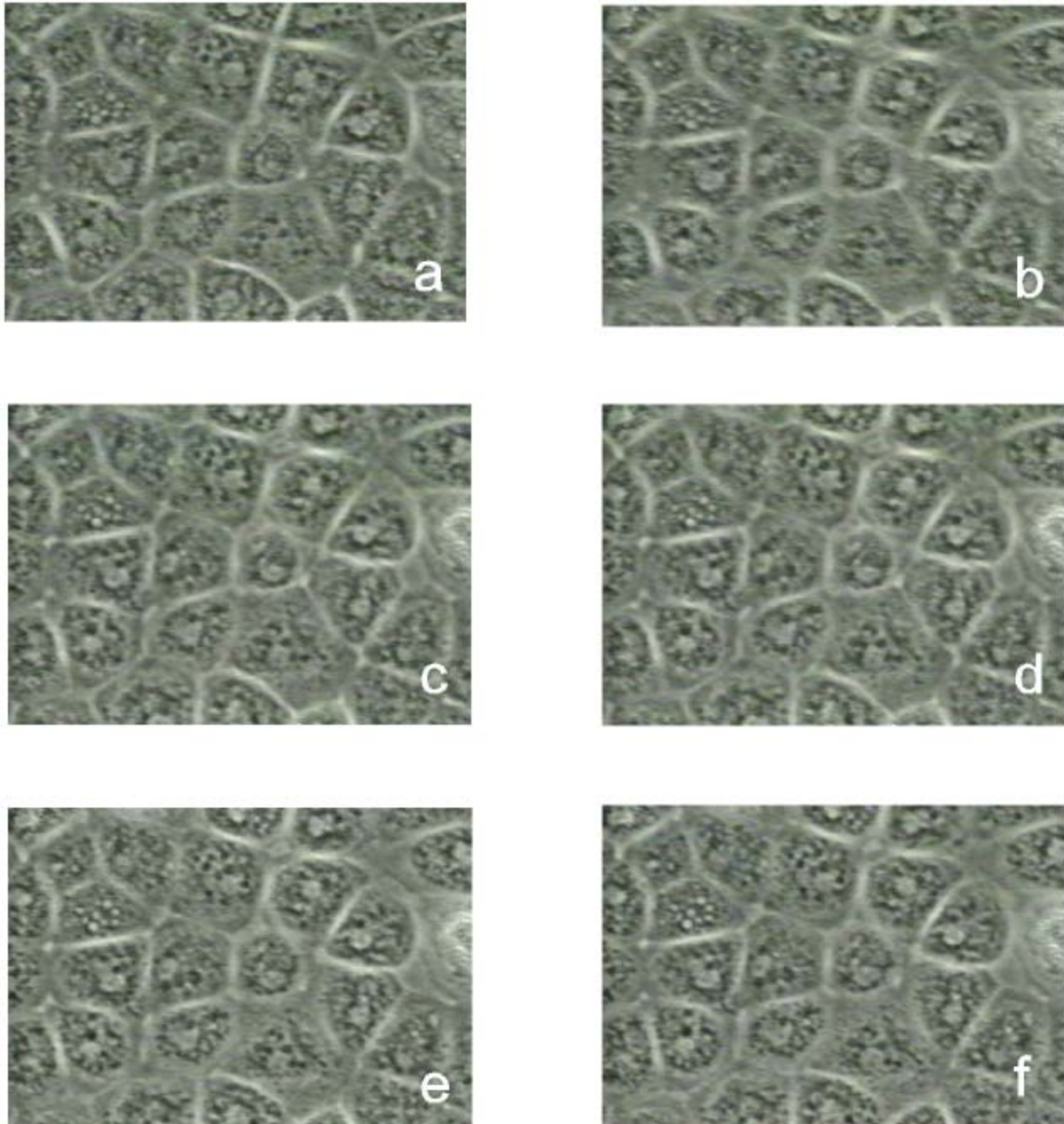


Abb. 34: Einfluß von Thrombin (1 IU/ml Inkubationsmedium) auf eine in vitro bis zur Konfluenz etablierte Schicht venulärer Endothelzellen. a) Ausgangssituation b) sofort, c) 3, d) 6, e) 15 und f) 25 Minuten nach Zugabe von Thrombin. Diese wichtigste Protease der Gerinnungskaskade hat offensichtlich keinen Einfluß auf die lichtmikroskopisch erkennbare Weite der Interzellularspalten. Phasenkontrastdarstellungen in 450-facher Vergrößerung.

Dichtigkeit der Zellschicht großen Einfluß hat: jedenfalls kommt es im Bereich des Perizyten zu einer deutlich erkennbaren Öffnung der Endothelbarriere.

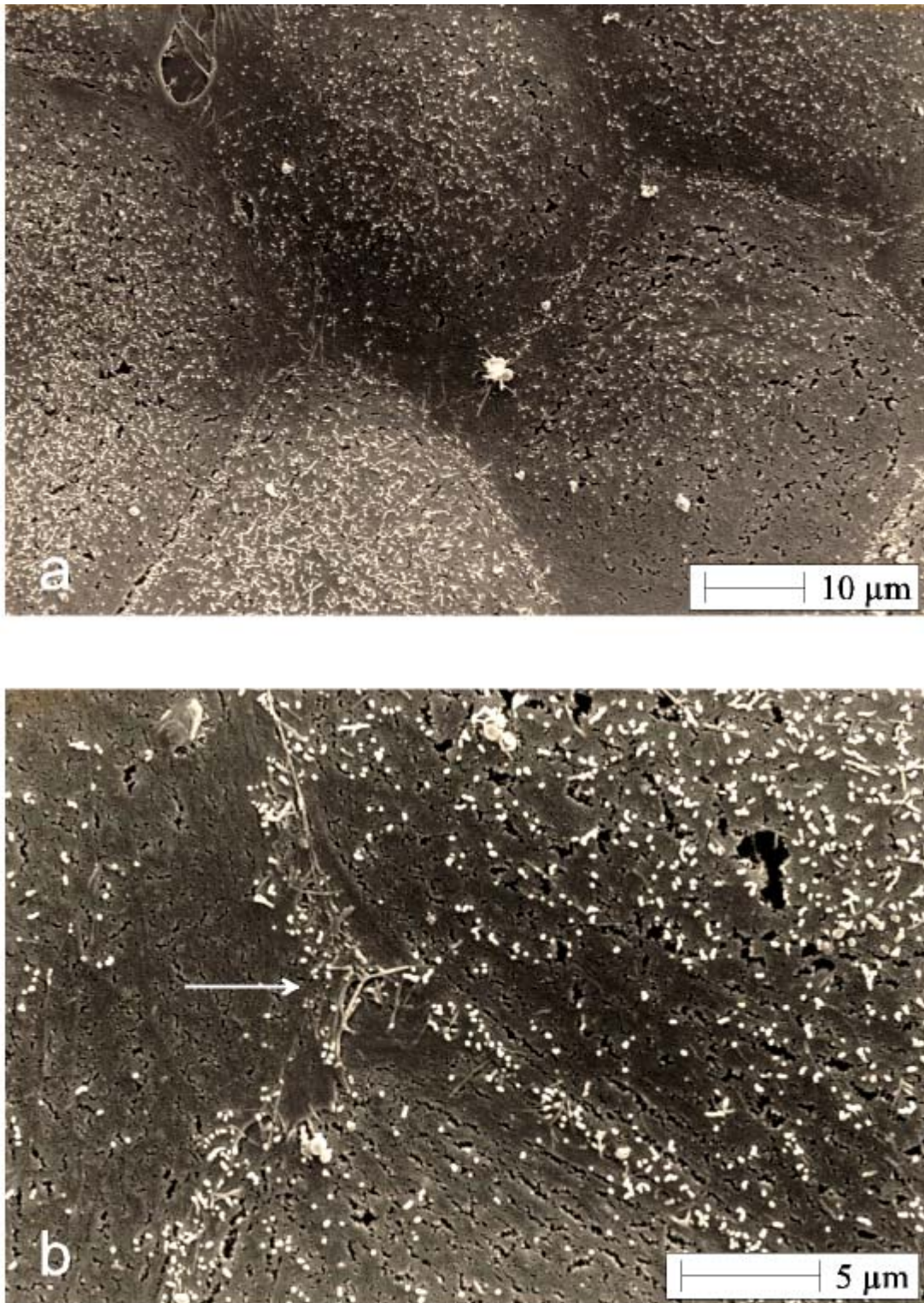


Abb. 35: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen einer ruhenden Schicht konfluenter Endothelzellen venulären Ursprungs (Meerschweinchen). a) Übersichtsaufnahme, b) Detailvergrößerung. Deutlich sind die reißverschlußartigen Überlappungen der Zellgrenzen zu erkennen (siehe Pfeil).

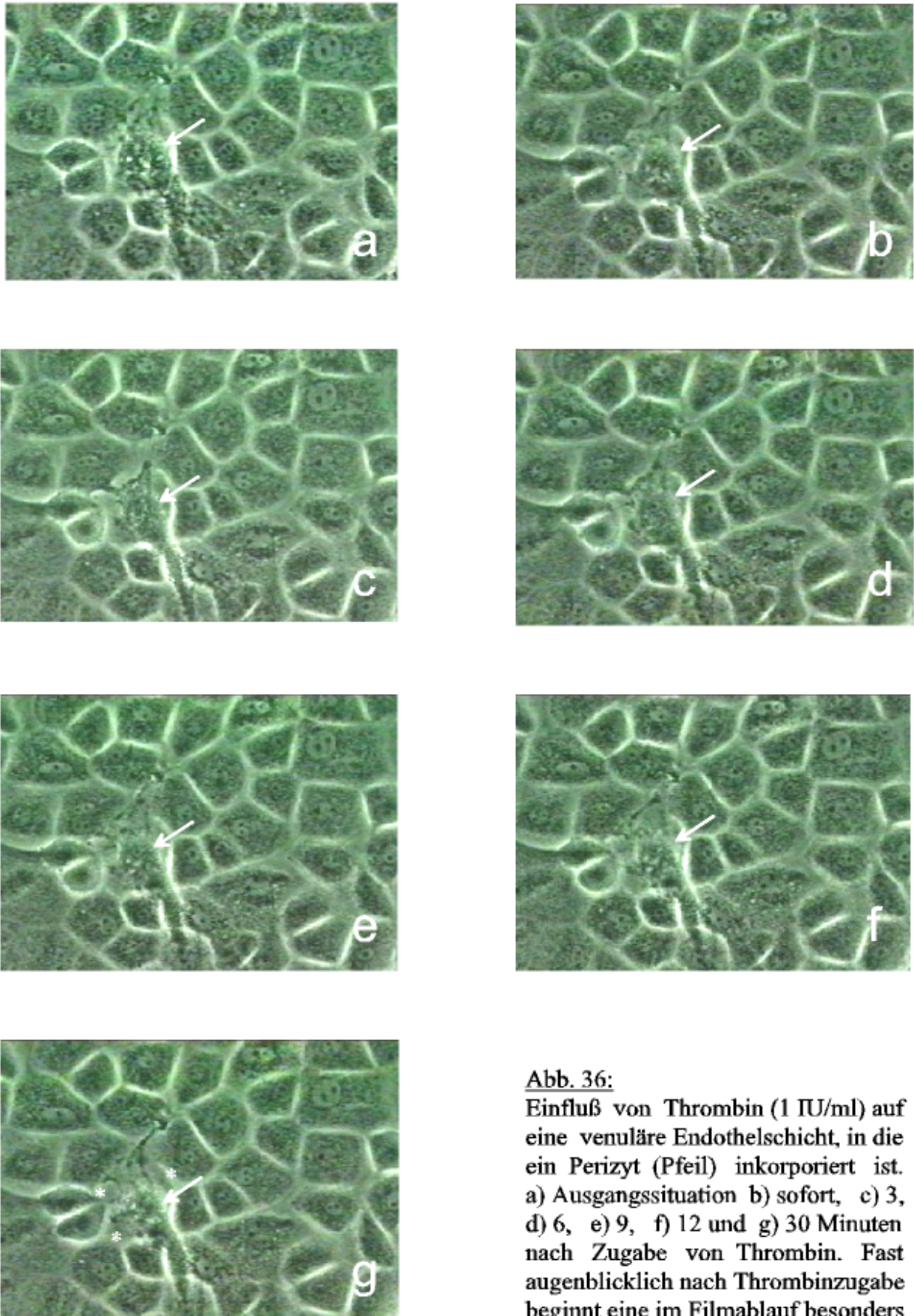


Abb. 36:

Einfluß von Thrombin (1 IU/ml) auf eine venuläre Endothelschicht, in die ein Perizyt (Pfeil) inkorporiert ist. a) Ausgangssituation b) sofort, c) 3, d) 6, e) 9, f) 12 und g) 30 Minuten nach Zugabe von Thrombin. Fast augenblicklich nach Thrombinzugabe beginnt eine im Filmablauf besonders deutliche Zuckung des Perizyten, die

zu bleibenden Löchern (*) in der Gewebeschicht führt (vergleiche Ausgangsbild in a). In Teilbild c hat der Perizyt sich am stärksten kontrahiert und so die Endothelbarriere besonders deutlich geöffnet. Phasenkontrastdarstellungen in 320-facher Vergrößerung.

Werden in Gegenwart der genannten Thrombinkonzentration in das Inkubationsmedium auch aus Meerschweinchenblut isolierte Plättchen zugesetzt, werden diese durch die Gerinnungsprotease natürlich aktiviert. Die in Abb. 37 zusammengefaßte Zeitraffervideobildfolge zeigt aber, daß auch in dieser Situation die Dichtigkeit gezüchteter venulärer Gewebeschichten nicht wesentlich beeinflußt wird. Kleinere, gelegentlich beobachtete Öffnungsbereiche der Zellverbindungen in jungen Kulturen venulärer Endothelzellen werden sogar unter diesen Bedingungen rasch verschlossen.

Auch mit Hilfe der speziell entwickelten Reinigungsmethode rein dargestellte, im Verlauf des Experiments durch Zugabe von FMLP sogar besonders stark aktivierte Granulozyten haben keinen deutlichen Einfluß auf die Integrität der Zellfugen des venulären Endothelzellrasens (vgl. Abb. 38). Rasterelektronenmikroskopische Bilder lassen jedoch (allerdings nur bei starker Vergrößerung) erkennen, daß direkt unter am Endothel adhärent gewordenen Granulozytenansammlungen endotheliale Membranschäden sichtbar werden (Abb. 39 a, b). Derartige Einflüsse ließen sich im Experiment durch zugesetzte Antioxidantien wie zum Beispiel 100 µM Harnsäure oder Flavonoide („Venoruton®“) komplett verhindern. Die endothelialen Zellfugen erscheinen dagegen noch weitgehend geschlossen (Abb. 39).

Eine völlig veränderte Situation ergibt sich, wenn gezüchtete Meerschweinchen-Endothelschichten venulären Ursprungs mit gleichzeitig durch Thrombin (1 IU/ml) aktivierten Plättchen (ca. 10^6 /Schale) und FMLP-aktivierten Granulozyten (ca. 10^5 /Schale) aus Meerschweinchenblut zusammengebracht werden (Abb. 40). Noch bevor die Zellen in direkten Kontakt mit der Endothelschicht geraten, ist bereits eine beginnende Kontraktion der Endothelzellen evident (vgl. Abb. 40 b), die aber nicht sofort zur Öffnung von Zellfugen führt. Diese uniforme Reaktion des Zellrasens kann nur durch

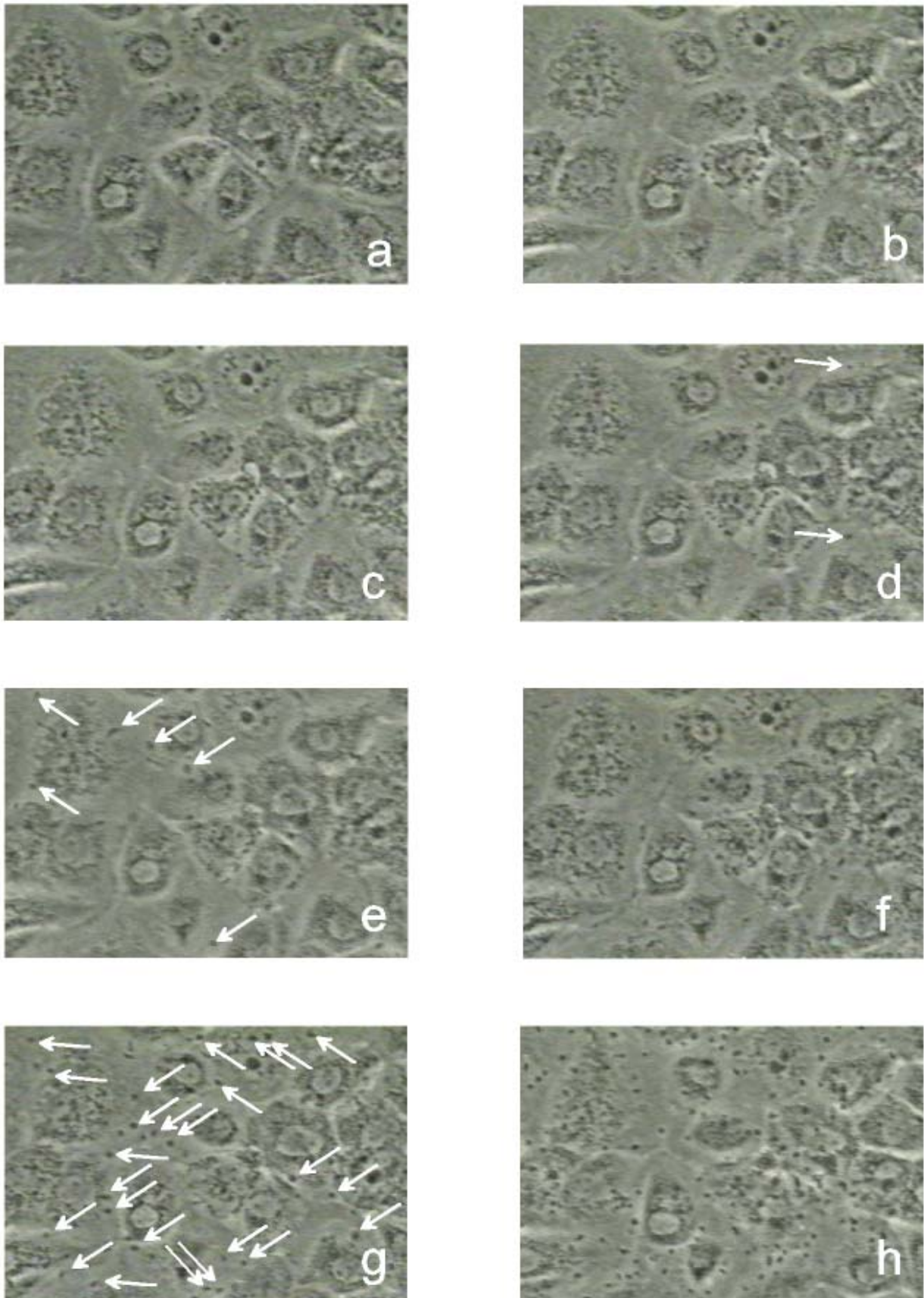


Abb. 37: Einfluß von aus Meerschweinchenblut isolierten Plättchen (ca. 1.000.000 pro 35 mm Standard-
schale) auf venuläres Endothel. a) Ausgangssituation b) 3, c) 6, d) 12, e) 18, f) 27, g) 45 und h) 90
Minuten nach Zugabe des plättchenreichen Plasmas. Erst nach etwa 1/4 Stunde sinken die zuge-
setzten Plättchen auf die scharf gestellte Ebene der Endothelschicht ab und werden dann in immer
größerer Zahl sichtbar (Pfeile). In allen Kulturen venulärer Endothelzellen erkennbare kleinere
Öffnungsbereiche endothelialer Zellfugen werden unter dem Einfluß der Plättchen eher vermehrt
verschlossen, als weiter geöffnet. Phasenkontrastdarstellungen in 320-facher Vergrößerung.

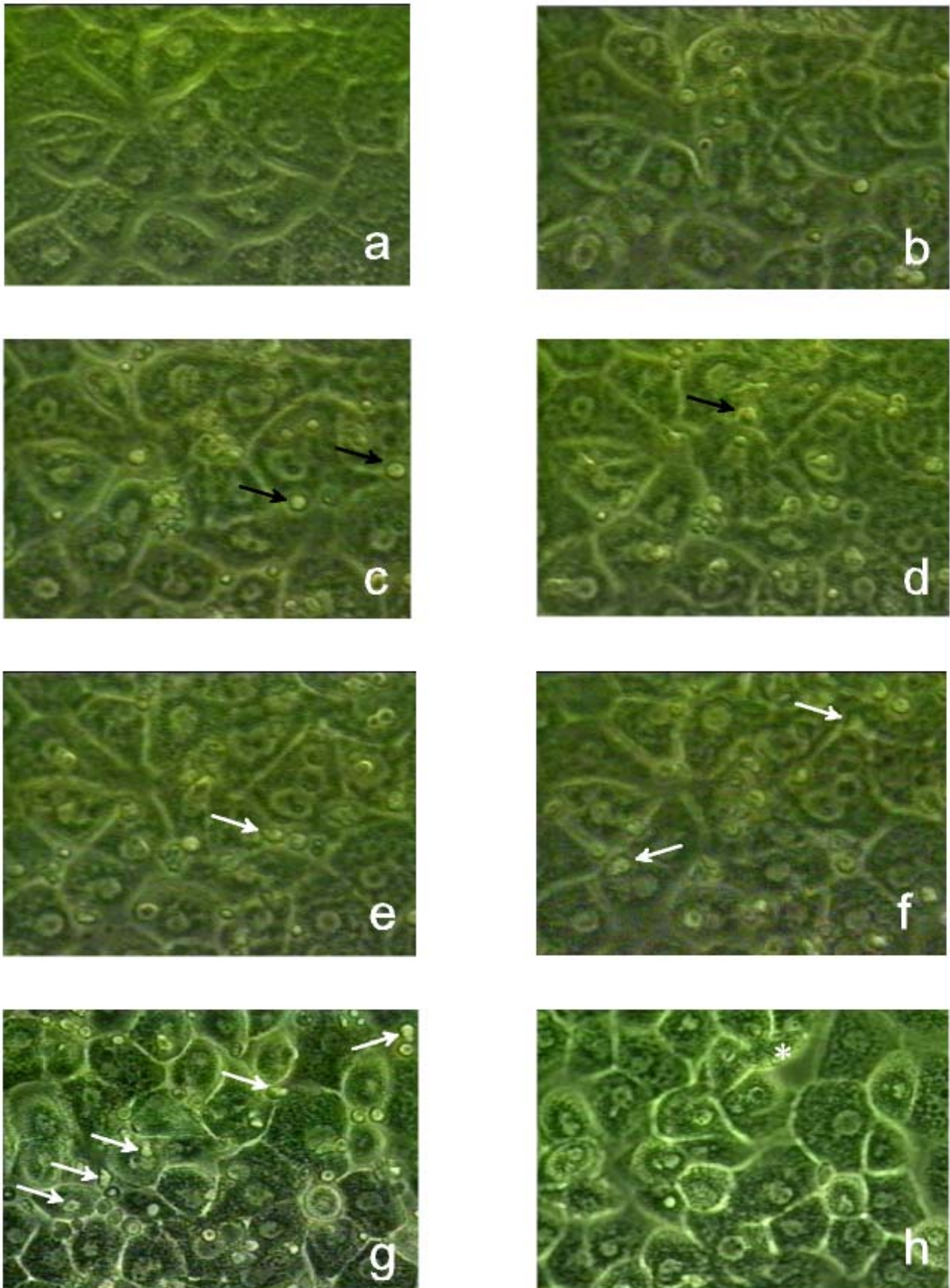


Abb. 38: Einfluß von neutrophilen Granulozyten aus Meerschweinchenblut (ca.100.000/35 mm Standardschale) auf venuläres Endothel. a-f) 450-fache Vergrößerung, g-h) 320-fache Vergrößerung, im Phasenkontrast. a) Ausgangssituation, b) sofort, c) 15, d) 30 und e) 45 Minuten nach Zugabe zunächst unstimulierter Granulozyten (sphärische Form, schwarze Pfeile), e) dann nach Zugabe von FMLP (1 μ M) Aktivierung der Granulozyten (weiße Pfeile, beachte die amöboiden Formänderungen), f) 10 Minuten nach Zugabe von FMLP, g) nach sofortigem Objektivwechsel, h) nach Spülung der Kultur (* zeigt eine durch den Spülstrahl wegbewegte Endothelzelle mit dadurch entstandener Endothellücke) lassen sich kaum fest adhärenente Leukozyten nachweisen. Die Integrität der Zellarchitektur erscheint weitgehend erhalten bis auf wenige Ausnahmen.

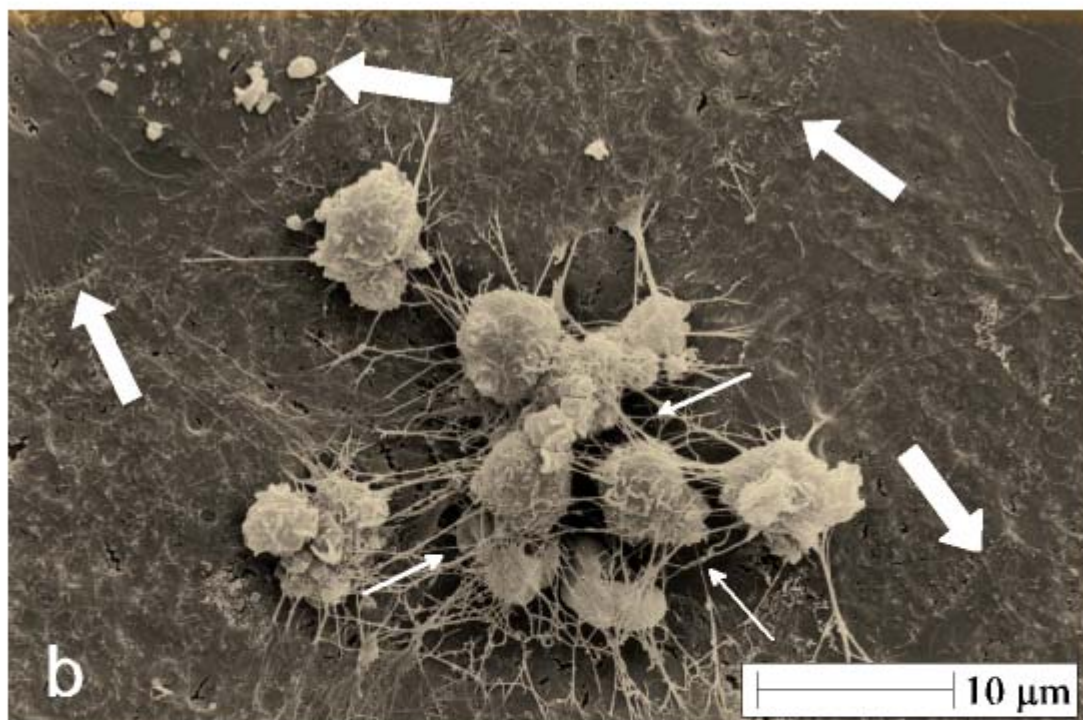
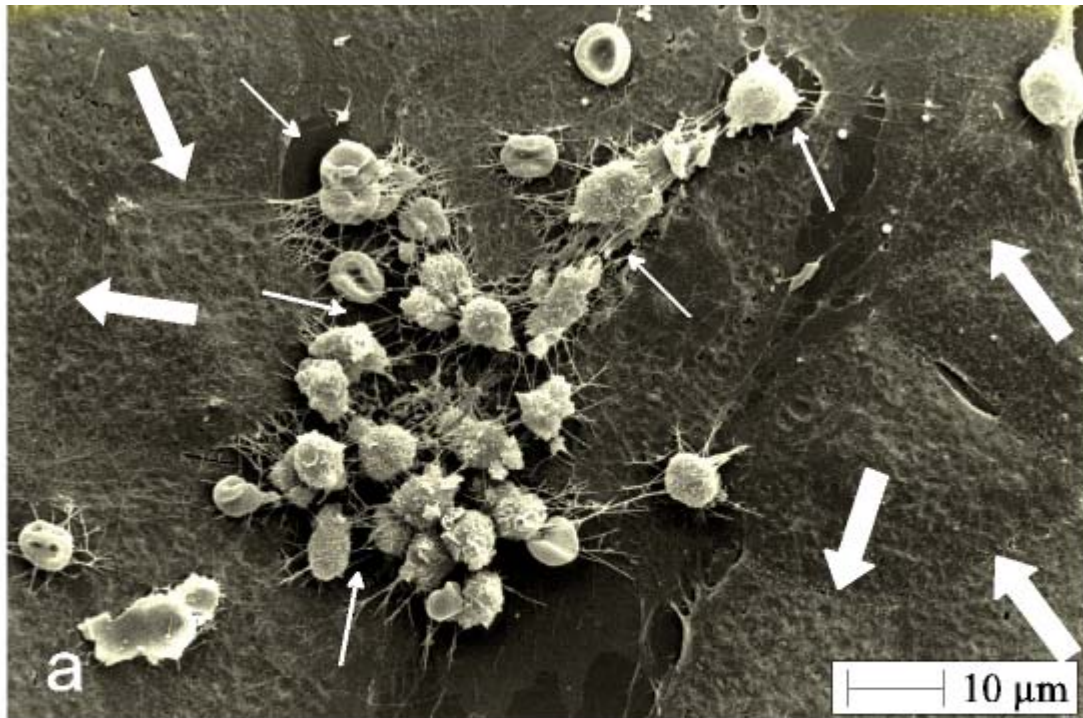


Abb. 39: Einfluß aktivierter neutrophiler Granulozyten auf gezüchtete Endothelschichten venulären Ursprungs in rasterelektronenmikroskopischer Darstellung.

a) Übersicht, b) Vergrößerung. Deutlich sind lytische Bereiche unterhalb adhärenter Leukozyten zu erkennen (→). Interzellularspalten sind dagegen noch weitgehend geschlossen (⇨).

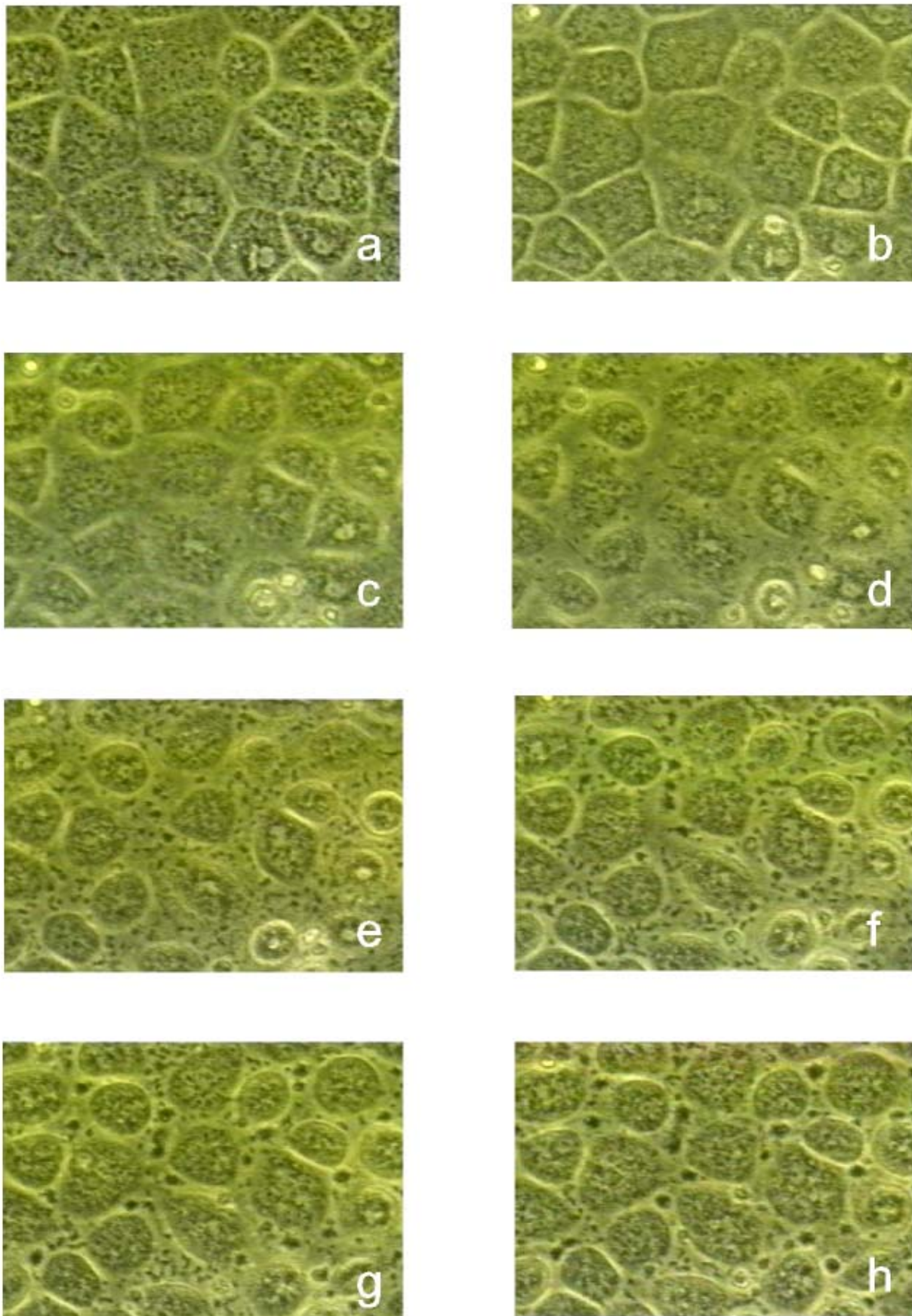


Abb. 40: Einfluß gleichzeitig mit $1 \mu\text{M}$ FMLP aktivierter Granulozyten (ca. 100.000/Schale) und mit 1 IU/ml aktivierter, gewaschener Plättchen (ca. 1 Mio./Schale) auf venuläres Endothel in Abwesenheit und Anwesenheit von Flavonoiden. a) Ausgangssituation b) 8, c) 11 und d) 17 min nach Zugabe der aktivierten Zellen d) Zugabe von Flavonoiden e) 15 min nach Zugabe der Flavonoide, erneute Flavonoidzugabe ($100 \mu\text{M}$) f) 18, g) 40 und h) 60 min nach erneuter Flavonoidzugabe. Deutlich ist zu erkennen, wie die bis Bild e zunehmend kontrahierten Endothelzellen etwa 30 min nach Zugabe der Flavonoide allmählich wieder flacher und damit die Endothellücken wieder enger werden, obwohl die in besonders großer Konzentration vorliegenden aktivierten Blutzellen noch anwesend sind. Phasenkontrastdarstellungen in 450-facher Vergrößerung.

Freisetzungsprodukte der aktivierten Blutzellen bewirkt worden sein. Interessanterweise verhindert eine Vorinkubation der Plättchen, nicht aber der PMN, mit 10^{-4} M Aspirin diesen Effekt vollständig (nicht dargestellt in Abb. 40). Im Verlauf der weiteren Inkubation kommt es dann aber sehr schnell auch zu einer massiven und uniformen Öffnung aller Zellfugen – und bei prolongiertem Einwirken der aktivierten Blutzellen über mehrere Stunden – sogar zum Absterben der Endothelzellen (nicht gezeigt in Abb. 40). Akut zugesetzte Flavonoide im Konzentrationsbereich 10-100 μ M führen dagegen rasch wieder zum Schluß der endothelialen Zellfugen und zum Überleben der Endothelzellen, unbeeinflusst durch die immer noch gegenwärtigen aktivierten Blutzellen.

Eine analoge Öffnung der Endothelbarriere läßt sich auch erreichen mit der Zugabe des zellfreien Überstandes der ansonsten analog aktivierten und anschließend abzentrifugierten Blutzellen. Die zeitraffervideomikroskopischen Serienbilder der Abb. 41 zeigen das charakteristische Kontraktionsverhalten solcher Zellrasen im Zeitverlauf und deren weit geöffnete Zellfugen viel besser als in Abb. 40, weil hier keine Streulichteffekte an einzelnen Blutzellen die Bildkonturen verschlechtern. Noch eindrucksvoller geben rasterelektronenmikroskopische Bilder Einblick in das reparative Geschehen im Bereich der venulären Endothelspalten unter dem Einfluß der Flavonoide (Abb. 42 a-c). In Gegenwart von 100 μ M Flavonoiden kommt es zu einer charakteristischen Änderung der Morphologie der Zellen. Diese bilden zirkumferent in ihrer Peripherie Dutzende von langen Plasmamembranausläufern aus, die ständig ausgestreckt und wieder eingeholt werden. Dabei gewinnen die kugelförmig unter dem Einfluß von Freisetzungsprodukten der Blutzellen zusammengezogenen Endothelzellen innerhalb einer Stunde zunehmenden Bodenkontakt und breiten sich wieder flach aus. Nach ca. 2 Stunden liegt eine nahezu reparierte Endothelschicht vor.

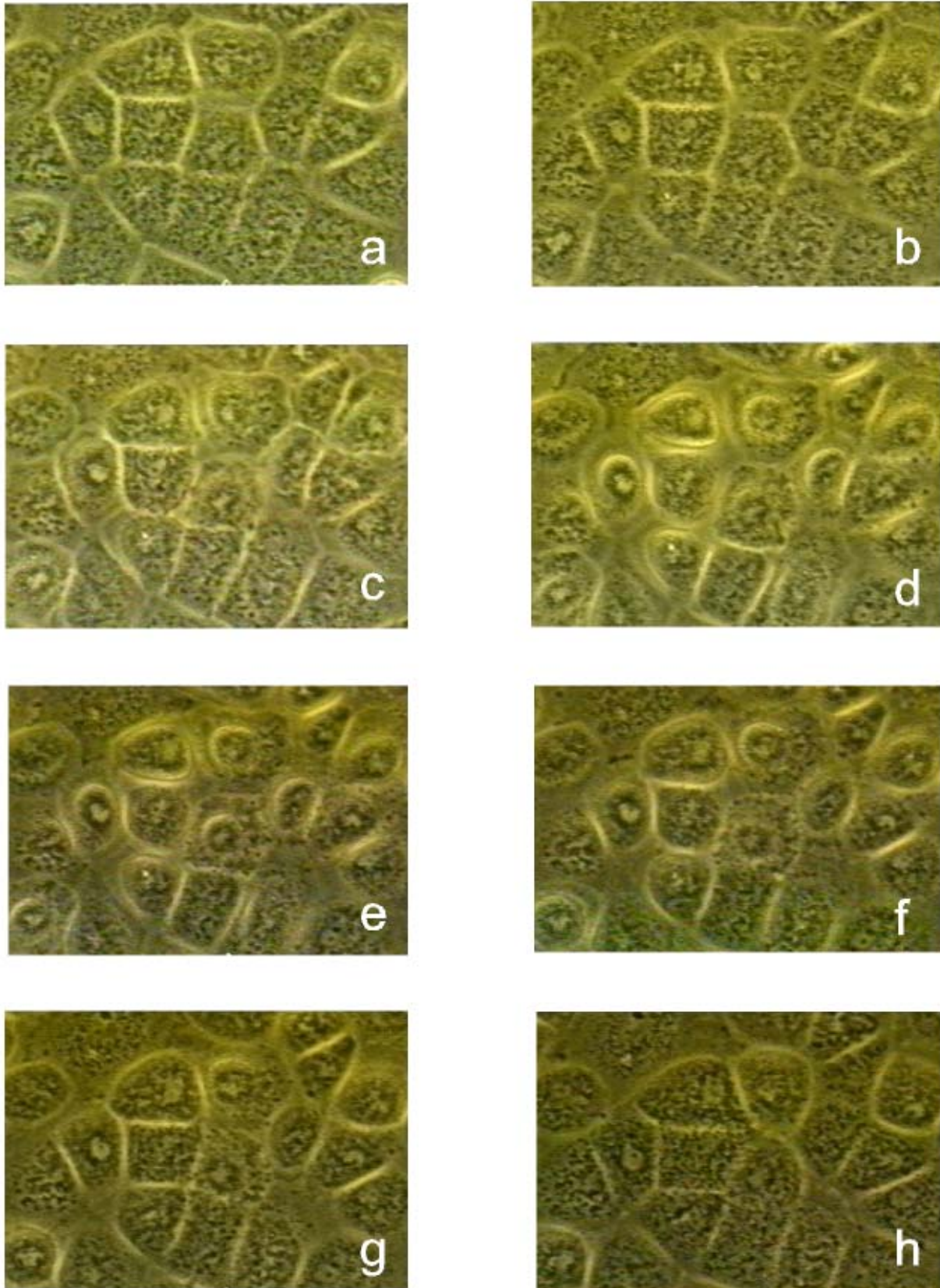


Abb. 41: Deletärer Einfluß aus aktivierten neutrophilen Granulozyten und Plättchen freigesetzter Wirkstoffe auf eine gezüchtete Endothelschicht venulären Ursprungs und Kompensation dieser Wirkung durch zugesetzte Flavonoide. Ca. 1.000.000 gewaschene Plättchen und 100.000 neutrophile Granulozyten wurden in 2 ml 37°C warmem Inkubationsmedium mit Thrombin beziehungsweise FMLP (1 IU/ml beziehungsweise 1 μ M) aktiviert und abzentrifugiert. Ihr Überstand wurde sogleich auf die Endothelzellen gegeben. a) Ausgangssituation b) 15 min nach Zugabe von 50 μ l des gewonnenen Überstandes c) 3 und d) 6 min nach erneuter Zugabe, dieses Mal von 200 μ l Überstand. Deutlich ist eine zunächst zunehmende Kontraktion der einzelnen Endothelzellen zu erkennen. d) Zustand der Kultur unmittelbar bei Zugabe von Flavonoiden und sukzessive Reparationszustände e) 9, f) 15, g) 27 und h) 75 min danach. Phasenkontrastdarstellungen in 450-facher Vergrößerung.

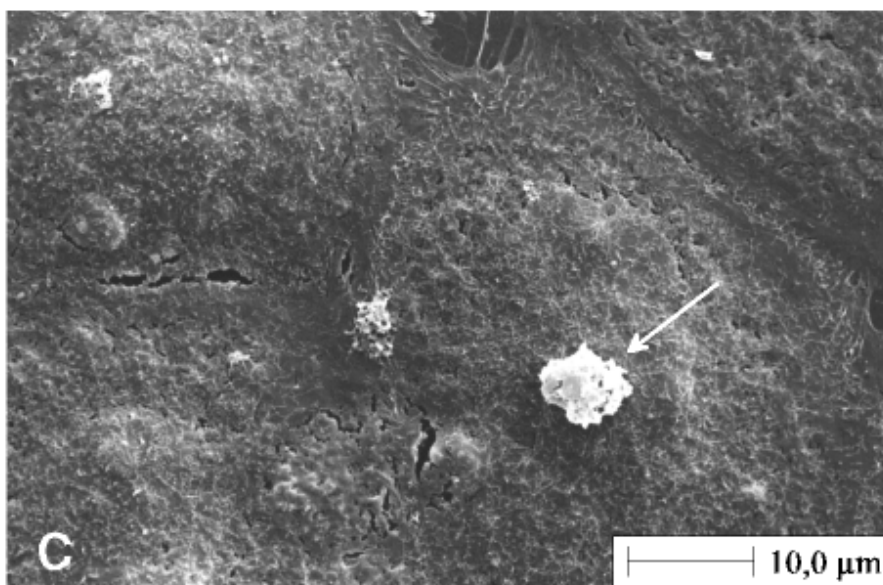
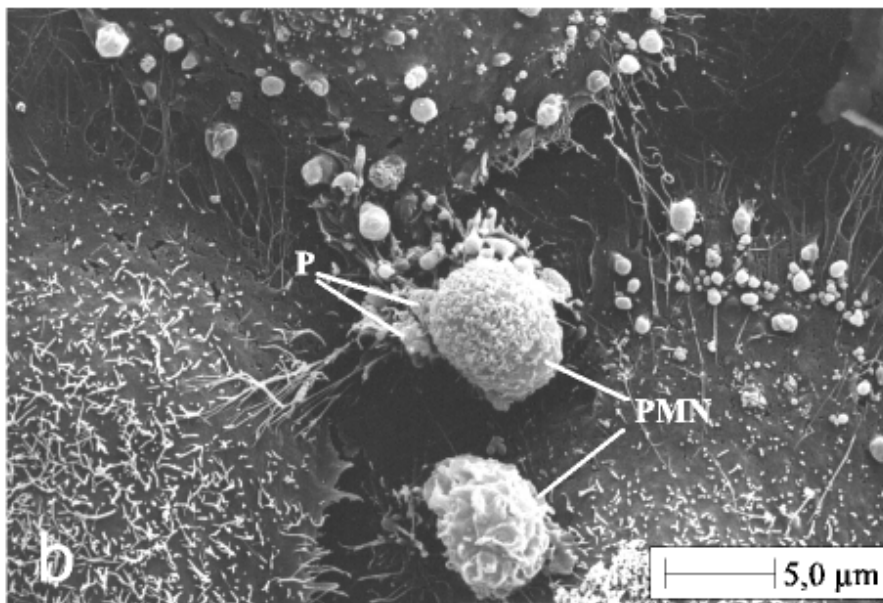
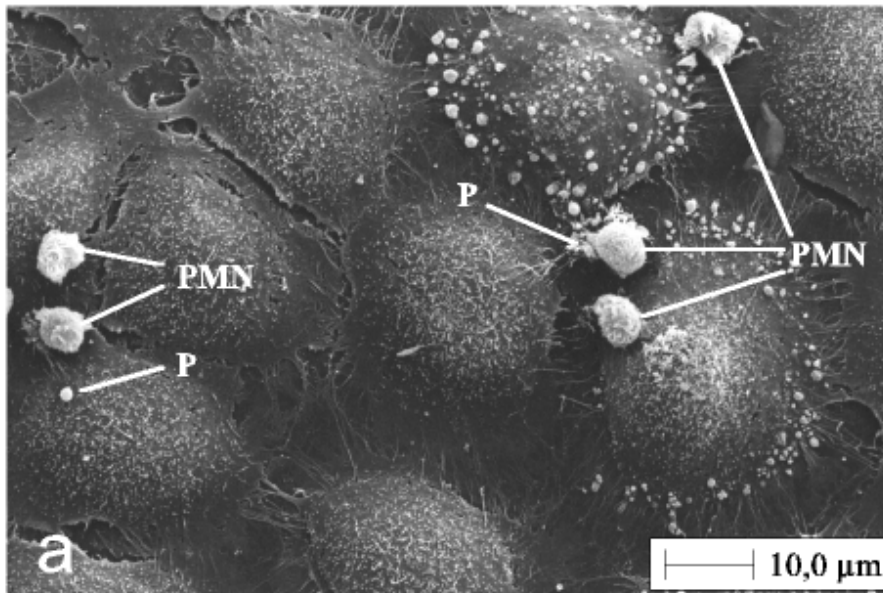


Abb. 42: Reparativer Effekt 100 µM zugesetzter Hydroxyethylrutoside auf eine unter dem Einfluß standartmäßig aktivierter Plättchen (P) und neutrophiler Granulozyten (PMN) undicht gewordene Endothelschicht.

a) Übersicht, Zustand einer noch erheblich irritierten Kultur etwa 20 min nach Zusatz der Flavonoide. Adhärenente PMN und Plättchen beginnen sich abzukugeln.

b) Vergrößerung: deutlich sind zwei aktivierte PMN, an einem der PMN angelagerte Plättchen und die typischen Filamente der Endothelzellen im Spaltenbereich zu erkennen.

c) Fast komplette Reparatur nach ca. 2 Stunden Einwirkzeit der Flavonoide trotz weiterer Anwesenheit der Blutzellen und deren Aktivatoren. Die Blutzellen runden sich ab und verklumpen (Pfeil).

4. Diskussion

4.1. Histologische Untersuchungen zur Identifizierung von koronaren Venulen und daraus isolierten Endothelzellen

Auf die erhebliche funktionelle Spezialisierung des Endothelgewebes in seinen verschiedenen mikrovaskulären Strohmbahnen wurde in der Einleitung bereits ausführlich hingewiesen. Aufgrund seiner besonderen Interaktionsfähigkeit mit Leukozyten aller Art wurden mittlerweile mehrere typische Membrankonstituenten speziell des venulären Endothels beschrieben, die sich grundsätzlich auch zur Identifikation der Venulen in situ, aber auch zur Reinheitskontrolle aus diesen kleinsten Venen isolierter Endothelzellen verwenden lassen^{57,106,149,150,157}.

Im Falle der Charakterisierung von venulären Endothelzellen aus Meerschweinchenherzen ergibt sich allerdings auch heute noch das Problem, daß entsprechende Antikörper gegen diese endothelialen Leukozyten-Adhäsionsproteine fast durchweg gegen entsprechende Antigene menschlichen Ursprungs gerichtet sind, die geringe Kreuzreaktivität mit ihren Analoga im Meerschweinchen haben. Insofern ist die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Identifizierungsbasis des venulären Endothels in der koronaren Mikrozirkulation des Meerschweinchens mit Hilfe klassischer Enzymhistologie auch heute noch aktuell.

Eine Anregung zur Lösung des Problems bot die Veröffentlichung von Lojda⁹⁴ aus dem Jahre 1979. Hier wurde berichtet, daß das Enzym Dipeptidylaminopeptidase IV (Glycyl-Proline Naphthylamidase) bei verschiedenen Spezies in unterschiedlichen Organen wie Myokard und Lunge von Ratten, Duodenum und Jejunum von Meerschweinchen und Darmbiopsien von Menschen in Endothelzellen des venösen Abschnitts der Kapillaren und in

kleinen Venulen nachgewiesen werden konnte, während das Enzym in größeren Gefäßen und auf der arteriellen Seite der Mikrozirkulation nicht nachweisbar war. Darauf aufbauend berichtete Lipenska⁹³ 1984 von einer Doppelfärbung der Mikrozirkulation auf Dipeptidylpeptidase und gleichzeitig alkalische Phosphatase in der Skelettmuskulatur der Ratte. Als Ergebnis zeigte sich, daß die arteriellen Segmente der Mikrozirkulation positiv für alkalische Phosphatase waren, während die venösen Abschnitte Dipeptidylpeptidase ausprägten.

Als besonders wertvoll hat sich in unserer Hand der enzymhistochemische Nachweis der Dipeptidylaminopeptidase IV (DAP IV) [EC 3.4.14.5] erwiesen, die in extremer Konzentration an den bizarren postkapillären Venulenkonglomeraten des Meerschweinchenherzens lokalisiert ist. Dieses Ektoenzym^{29,102} wird auch nach Anwendung des in der vorliegenden Arbeit beschriebenen proteolytischen Dissoziationsverfahrens für Myokardgewebe noch hochspezifisch von den venulären Endothelzellen exprimiert, so daß es auch als zuverlässiges und leicht nachweisbares Identifizierungsmerkmal für die Überwachung der Reinigung dieser Zellen zur Verfügung steht. Alkalische Phosphatase erwies sich im Rahmen der eigenen histochemischen Untersuchungen zur Unterscheidung von koronaren Mikrogefäßen in Schnittpräparaten im Gegensatz zur Peptidase als Markerenzym aller Kapillaren und Endarteriolen. Diese Befunde liegen in guter Übereinstimmung mit frühen Studien von Rakusan an Rattenherzen¹³, die – allerdings ohne Stellungnahme zur spezifischen zellulären Verteilung der beiden Markerenzyme – darlegten, daß die DAP IV im venösen Schenkel, die Alkalische Phosphatase dagegen nur im arteriellen Schenkel der terminalen koronaren Strohmbahn vorkommt. Wie ausführliche Studien meiner Kollegen E. Reichenbach (Dissertationsschrift in Vorbereitung) und D. R. Weiss (Dissertationsschrift eingereicht im März 2004) zeigen, stellen beide Enzyme auch hochspezifische Marker der Mikrogefäße des menschlichen Ventrikelmyokards dar. Ganz analog zum Meerschweinchenherzen bildet die Dipeptidase auch hier die Basis einer einfachen

enzymhistochemischen Abgrenzung der koronaren Venulen, die auch im Menschenherzen bizarre Konglomerate formen, die aufgrund ihres knollenartigen, wurzelähnlichen Aussehens mit mikroskopischen Ingwerwurzeln verglichen worden sind^{24,86}. Allerdings benutzten diese frühen Identifizierungsstudien Tusche- beziehungsweise Silikoninjektionen zur Darstellung der Gefäße. Alkalische Phosphatase stellt im menschlichen Herzen ein selektives Markerenzym aller aus den Radialarterien des Koronarsystems abzweigenden Arteriolen erster Ordnung, der sich anschließenden Arteriolen zweiter bis vierter Ordnung, und der Kapillaren bis hin etwa zum Beginn der zweiten Hälfte ihrer Gesamtlänge dar. Es schließen sich dann Kapillarstrecken ohne alkalische Phosphatase- und DAP IV-Aktivität an, bis schließlich das letztgenannte Enzym zum Marker der prävenulären Kapillarstrecken und der postkapillären Venulen wird.

In der vorliegenden Arbeit wurden die geschilderten histochemischen Untersuchungen an Myokardschnitten durch entsprechende Studien an isolierten Mikrogefäßen ergänzt, die mit Hilfe einer neuentwickelten Isolierungstechnik in Zukunft auch aus Herzen anderer Tierspezies erhalten werden können. Derartige Präparate erleichtern die Aussage zur Präsenz bestimmter Antigene in den verschiedenen Segmenten der koronaren Mikrozirkulation erheblich und lassen sich leicht in den Dienst noch vieler anderer Anwendungen stellen.

Durch Einbringen steril gewonnener Mikrogefäßnetze in Gewebekulturen ließ sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit die bereits diskutierte Aussage, daß DAP IV ein hochspezifisches Markerenzym der postkapillären Venulen ist, erstmalig auch auf zellulärer Ebene differenzieren: es handelt sich um ein selektives Antigen der Endothelzellen venulären Ursprungs. Vergleichende Untersuchungen in Zellkulturen kapillären und arteriolären Ursprungs haben in der Arbeitsgruppe von Professor Nees mittlerweile gezeigt, daß die Endothelzellen dieser koronaren Mikrogefäße keine nachweisbare DAP-Aktivität besitzen. In weiterführenden Untersuchungen konnte auch geklärt

werden, daß Alkalische Phosphatase ein Markerenzym der arteriolären Perizyten und der sich arteriolär anschließenden kapillären Perizyten ist (entsprechende Publikationen sind gegenwärtig in Vorbereitung).

4.2. Isolierung reiner Granulozyten und gewaschener Plättchen aus Meerschweinchenblut

Um die geplanten mikroskopischen Studien zur Interaktion von Plättchen, PMN und venulären Endothelzellen im homologen System ohne immunologische Komplikationen durchführen zu können, war es nötig, auch die Blutzellen aus Meerschweinchen zu isolieren.

Für das Waschen von Plättchen wurde das im Methodenteil beschriebene Verfahren speziell entwickelt. Durch die Zugabe des Hemmstoffs Adenosin konnte erreicht werden, daß diese hochempfindlichen Zellen während der Abtrennung vom Ausgangsplasma durch Zentrifugation nicht erkennbar aktiviert wurden. Adenosin ließ sich anschließend auf sehr einfache Weise durch zugesetzte Adenosindesaminase wieder entfernen.

Bewährte Verfahren, hochgereinigte polymorphonukleäre Granulozyten zu erhalten, standen routinemäßig aber lediglich für das humane Zellsystem zur Verfügung. So lassen sich mit einem kommerziell erhältlichen, hyperton eingestellten Dichtegradientenmedium („PolymorphprepTM“) aus menschlichem Blut routinemäßig innerhalb einer Stunde sehr reine PMN durch einfache Zentrifugation isolieren, zur analogen Reinigung derselben Zellen aus Meerschweinchenblut bedurfte es aber aufgrund ganz anderer spezifischer Dichten und Größen der Plättchen und Granulozyten einiger zusätzlicher Schritte. Letztere wurden speziell im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelt und schon im Methodenteil beschrieben. In der Literatur wurde unseres Wissens bisher keine Methode beschrieben, mit deren Hilfe derart hochgereinigte und nicht aktivierte PMN aus Meerschweinchenblut auf

einfachere Weise isoliert werden können. Der einzige bisher in diese Richtung gehende Ansatz von Berton et al¹⁷ gewann neutrophile Granulozyten aus Meerschweinchen durch Peritoneallavage 20 Stunden nach intraperitonealer Injektion einer 1 %-igen Caseinlösung. Bei diesem Verfahren ist jedoch von einer deutlichen Vorstimulation der PMN auszugehen, da sie ja schon pathophysiologischerweise im Tier bereits in die Bauchhöhle mobilisiert wurden. Außerdem sind die benötigten Caseinlösungen nicht in der benötigten Reinheit zu erhalten (chemotaktische Peptidbeimengungen, Endotoxine etc. als Verunreinigungen vorhanden). Für die beschriebenen Interaktionsversuche war aber die Verwendung nicht vorstimulierter PMN nötig, um deren Einfluß auf venuläres Endothel in aktivierter und nicht aktivierter Form untersuchen zu können.

So homogen, wie die nach dem beschriebenen Verfahren gereinigten PMN-Suspensionen zusammengesetzt waren, so aufwendig war allerdings der präparative Aufwand und die geringe Ausbeute an Leukozyten. Die erhaltenen Zellsuspensionen reichten jeweils gerade aus für eine einzige Filmserie im Rahmen der geplanten mikroskopischen Untersuchungen. Für weitergehende, zum Beispiel auch biochemische oder molekularbiologische Untersuchungen im Meerschweinchensystem wären analoge Reinigungsanstrengungen sicherlich zu aufwendig. Allerdings gelingt es aufbauend auf den hier beschriebenen Methoden der Arbeitsgruppe um Professor Nees mittlerweile, venuläre Endothelzellen aus menschlichen Explantatherzen zu isolieren und zu züchten. Deren Interaktionen mit den wesentlich einfacher zu isolierenden menschlichen Plättchen und PMN lassen sich nun in jeder beliebigen Richtung nahezu unbeschränkt erforschen.

4.3. Isolierung von Primärkulturen venulärer Endothelzellen

Die Isolierung venulärer Endothelzellen aus dem Koronarsystem stellte eine besonders komplexe experimentelle Herausforderung im Rahmen der vorliegenden Arbeit dar. Die bisher in der Literatur reklamierten Isolationsmethoden für venuläre Endothelzellen beschränkten sich fast ausschließlich auf lymphatische Organe wie Lymphknoten oder Tonsillen^{1,2,10,28}. Dabei wurde allerdings zum Teil keine spezifische Abtrennung der venulären Endothelzellen von Endothelzellen anderer Gefäßabschnitte überzeugend dargelegt. Meist wurden immunologische Trennmethode eingesetzt, die wie zum Beispiel die Fluoreszenz-aktivierte Zellseparation FACS²⁰ auf immunologischen Markierungen (zum Beispiel von Willebrand Faktor und Ac-LDL-Rezeptor) fußte, die angeblich allen Endothelzellen zu Eigen sein sollen. Es liegt aber auf der Hand, daß der typische Antigenbesatz einer Zellart in situ sich unter der Einwirkung von Proteasen, wie sie für die Dissoziation der Zellen unabdingbar sind, entscheidend verändern kann. So könnten venuläre Endothelzellen physiologische Oberflächenantigene unter Umständen verlieren, oder sie könnten unter der proteolytischen Reizwirkung auf ihrer Zellmembran vorher nicht vorhandene, untypische Antigene exprimieren⁷⁵.

In einem nicht lymphatischen, besonders fest gefügten Organ wie dem Herzen ergeben sich nicht nur die zwei gravierenden Probleme, die Gewebetypen bis zur kompletten Dissoziation der Einzelzellen aufzugliedern und dabei die volle Vitalität der interessierenden Zellen zu erhalten, sondern außerdem die Schwierigkeit, auch die vielen anderen Zellarten (Endothelzellen anderen Gefäßursprungs oder aus Lymphgefäßen, glatte Muskelzellen, Perizyten, Kardiomyozyten, Bindegewebszellen etc.) von den erwünschten venulären Endothelzellen abzutrennen. Versuche, die Venulen eines Organs in vivo farblich zu markieren und nach Exzision des Organs die Venulen nach spezifischer Vormarkierung von Hand zu isolieren – ein Vorgehen, wie es schon im Cremastermuskel der Ratte praktiziert worden ist¹¹⁰ – würde schon vom

Ansatz her keine hinreichende Abtrennung von Fremdzellen ermöglichen und wäre außerdem im Herzgewebe viel zu aufwendig. Eine andere in der Literatur beschriebene Methode, um venuläre Endothelzellen aus Rinderherzen zu isolieren, verwendete sogenannte Mikrokügelchen („mikrobeads“), deren Größe speziell nach dem Durchmesser der Venulen gewählt wurde¹¹⁴. Es wurde behauptet, daß solche Kügelchen nach retrograder Perfusion des Koronarsystems selektiv in den Venulen stecken bleiben, von venulären Endothelzellen überzogen und anschließend antegrad wieder aus dem sinus coronarius gespült werden können. Angesichts der hohen Schwankungsbreite des Durchmessers der Venulen^{135,157} und der ausgeprägten Empfindlichkeit der venulären Endothelzellen im Gewebeverband auf mechanische Reize, verwundert die reklamierte Spezifität der Methode, nicht aber ihre geringe Ausbeute. Es erscheint außerdem nicht ausgeschlossen, daß Mikroperlen in größeren venösen Gefäßen zu liegen kommen, so daß bei Anwendung dieses Verfahrens wohl oft statt der venulären Endothelzellen solche venösen Ursprungs isoliert werden.

Realistisch betrachtet konnten alle genannten Autoren mithin keinen heutigen Ansprüchen an die Selektivität genügenden Beweis erbringen, daß die von ihnen isolierten Endothelzellen tatsächlich venulären Ursprungs waren.

Es galt deshalb, eine spezifische Trennmethode verfügbar zu machen, die mindestens eine Eigenschaft der venulären Endothelzellen nutzt, die sich bei ihrer Isolierung kaum ändert. Wie schon die in der Literatur beobachteten und auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit beschriebenen elektronendichten Granula im Zytoplasma der venulären Endothelzellen¹³⁵ vermuten ließen, könnten sich Endothelzellen dieses vaskulären Ursprungs durch ein deutlich höheres spezifisches Gewicht als die mikrovaskulären Endothelzellen anderer Gefäßabschnitte auszeichnen. Außerdem besitzen solchen Endothelzellen eine beachtliche Größe.

Vor diesem Hintergrund verwendeten wir die Dichtegradientenzentrifugation mit osmotisch zu vernachlässigenden, imprägnierten Siliziumdioxid-mikropartikeln („Percoll“) als Dichtegradientenmaterial¹²⁶ zur Auftrennung myokardialer Zellgemische. In der Arbeitsgruppe von Professor Nees stand am Physiologischen Institut eine speziell entwickelte sehr zweckmäßige Zentrifuge zur Verfügung, die während des Laufes ohne störende Verwirbelung die Einschichtung des Dichtegradienten und nach Auftrennung des Zellgemisches dessen besonders scharfe Fraktionierung ermöglichte. Tatsächlich ergab sich dabei, daß venuläre Endothelzellen ein besonders hohes spezifisches Gewicht (größer 1,06 Gramm pro ml) besitzen und so in selektiver Weise in tiefe Schichten des Gradienten eindringen.

Allerdings war es eine unabdingbare Voraussetzung für den erzielbaren Trennerfolg, zuvor eine möglichst vollständige und schonende Dissoziation des gesamten Myokardgewebes und den Erhalt einer homogenen Zellsuspension als Ausgang des Trennverfahrens zu erzielen. Dies gelang mit Hilfe des im Methodenteil beschriebenen, speziell für diesen Zweck entwickelten Versuchsaufbaus. Bei der Perfusion des Koronarsystems mit der Proteaselösung war es von großem Nutzen, ein Abknicken der Herzkranzgefäße oder eine sonstige Deformierung des Gefäßsystems zu verhindern, indem das Herz in einer isodensen (30 %-igen) Percolllösung schwebte. Durch Perfusion der Koronarien mit gleichbleibendem Druck von 160 mbar und konstantem Fluß von 1 ml/min konnte zudem eine vollkommen homogene Perfusion des Myokards in allen seinen Kapillarstrecken erreicht und ein Kollabieren der zuführenden Koronararterien auch nach längerer Einwirkzeit der Proteaselösung verhindert werden.

Günstig für die Vitalität der isolierten Zellen wirkte sich auch die im Methodenteil beschriebene säulenchromatographische Vorreinigung der käuflichen Kollagenase aus, wobei offenbar toxische Peptide abgetrennt wurden.

Zweckmäßigerweise wurde die Apparatur so aufgebaut, daß sämtliche Arbeitsschritte bei 37°C und unter sterilen Bedingungen erfolgen konnten.

Um eine Verunreinigung mit Mesothel weitgehend auszuschließen wurde vor dem Perfusionsvorgang das Perikard möglichst sorgfältig entfernt. Denn später in der Zellkultur war es schwierig, Endothelzellen von Mesothelzellen, welche denselben embryonalen Ursprung haben, zu unterscheiden. Letztere können nicht nur in Aussehen und Wachstumsverhalten, sondern auch in der Reaktion auf gängige Endothelzellmarker den Endothelzellen ähneln^{89,153}.

Die von uns zur Charakterisierung der Endothelzellen eingesetzten Nachweismethoden (von Willebrand Antigen, DAP IV, typische Morphologie der gezüchteten Zellen sowie ihre sich auch in Gewebekulturen entwickelnde, besonders prägnante Koloniearchitektur in Form von Pflastersteinbelägen) erlaubten ihre zweifelsfreie Identifizierung auch deshalb ganz besonders, weil zuvor ausführliche histochemische Studien an intaktem Ventrikelmyokard durchgeführt worden waren und es gelungen war, intakte venuläre Gefäßsegmente mit analogen Methoden zu identifizieren und in ihrem Wachstum in Gewebekulturen zu verfolgen.

Die aus allen methodischen Anstrengungen resultierende Tatsache, daß es nun gelungen ist, homogen zusammengesetzte Kulturen venulärer Endothelzellen in vitro zu gewinnen, eröffnet erstmalig die Möglichkeit, unter definierten in vitro Bedingungen die auch in medizinischer Hinsicht interessanten Interaktionen des venulären Endothels mit Bestandteilen des Blutes unter kontrollierten Versuchsbedingungen zu studieren. Viele weiterführende Experimente im Arbeitskreis um Professor Nees zeigen außerdem schon heute, daß die im Rahmen der vorliegenden Arbeit am Meerschweinchenherzen erprobte Methodik auch auf Herzen anderer Tierspezies und am Menschenherzen mit Erfolg angewendet werden kann.

4.4. Interaktion mit Plättchen und Leukozyten und deren Überständen

Die Entstehung entzündlich bedingter Ödeme stellt im Körper des Menschen und natürlich auch vieler anderer Lebewesen zunächst einmal ein physiologisches, der Abwehr von Krankheitserregern dienendes Ereignis dar, das sich aber auch zu einem schwerwiegenden pathophysiologischen Geschehen entwickeln kann. In der Folge solcher Ödembildung kann es zu Ischämie, Thrombosierung, Blutdruckabfall und Hypovolämie kommen, also zu – innerhalb des betroffenen Organes, aber auch generalisiert im gesamten Körper – lebensbedrohlichen Folgen.

Welche Mechanismen führen dazu, daß die Permeabilität des vaskulären Endothels über das Normalmaß erhöht wird? Viele Wissenschaftler haben inzwischen an dieser Frage gearbeitet, sind dabei jedoch zu recht unterschiedlichen Ergebnissen gekommen.

Bekannt ist, daß ein Stimulus, wie zum Beispiel ein Gefäßverschluß, Hypoxämie, eine mechanische Gefäßverletzung oder eine bakterielle oder virale Infektion, letztendlich zur Ausschüttung einer großen Anzahl entzündlicher Mediatoren führt, unter deren Einfluß sich die Endothelbarriere öffnet. Doch woher stammen diese Mediatoren, um welche Verbindungen handelt es sich und in welchen mikrovaskulären Strombahnen entfalten sie ihre permeabilitätserhöhende Wirkung?

Die letzte Frage läßt sich inzwischen recht eindeutig beantworten, denn es hat sich nicht zuletzt in verschiedenen in vivo Studien gezeigt, daß die Prädilektionsstelle für die Entstehung von Ödemen durch Hyperpermeabilität und das Auswandern von Entzündungszellen aus dem Blut eindeutig das Endothel der postkapillären Venulen darstellt^{3,7,18,62,73,79,80,91,92,100,107,119,120,121,122,}

^{125,133,138,148,154}.

Um nun auch vertieft der Beantwortung der Fragen nach dem Ursprung und der Natur der Entzündungsmediatoren nachgehen zu können, erschien nicht nur die Isolierung und verbesserte Zugänglichkeit der hochspezialisierten Endothelzellen venulären Ursprungs, sondern auch die bestimmten Blutzellen derselben Tierspezies unter genau definierten Bedingungen unerlässlich.

Die Frage, welchen zellulären Ursprungs in Frage kommende Mediatoren haben, läßt sich aus der Literatur bis zum heutigen Zeitpunkt nicht eindeutig beantworten. Auf jeden Fall könnten Entzündungsmediatoren auch aus dem Blut stammen. Als zelluläre Ursprungsorte kämen in diesem Fall in erster Linie die Blutzellen in Frage, die an einem Entzündungsfokus rasch akkumulieren und dort auch schnell aktiviert werden können. Neutrophile Granulozyten („PMN“) bilden die Hauptgruppe der an der akuten Immunabwehr beteiligten Blutzellen. Neben der Fähigkeit zur Phagozytose enthalten sie verschieden Granula zur Speicherung insbesondere zahlreicher hydrolytischer Enzyme¹³⁶, die im Bedarfsfall deshalb rasch und in hoher Konzentration freigesetzt werden können. Mit Hilfe einer NADPH-abhängigen, membranständigen Oxidase sind PMN auch zur Bildung von H_2O_2 befähigt^{9,18,77,101,136}, das in Gegenwart zweiwertiger Metallionen rasch zu einer Reihe von Sauerstoffradikalen zerfallen kann, die ein noch höheres Oxidationspotential als das Wasserstoffperoxid besitzen. PMN können mit Hilfe des Enzyms Myeloperoxidase auch hypochlorige Säure bilden^{18,77,136}, ebenfalls ein scharfes Oxidationsmittel. Darüber hinaus verfügen die PMN über einen komplexen Eikosanoidstoffwechsel mit der Möglichkeit zur Synthese von Leukotrienen¹³⁶, die bekanntlich wichtige Entzündungsmediatoren darstellen.

Blutplättchen sind nach neuesten Literaturbefunden äußerst wichtige Kooperationspartner der Granulozyten^{9,38,44,63,82,83,85,115,127,142,161}. Sie stellen nicht nur die besonders akut reagierende, zelluläre Komponente des Hämostasesystems dar, indem sie – nach Aktivierung entsprechender

Rezeptoren und durch Verklebung mit Fibrinmolekülen – massenhaft aggregieren und dabei den „weißen Thrombus“, also einen sofort wirkenden, provisorischen Wundverschluß formen¹³⁶. Vielmehr können diese relativ kleinen korpuskulären Bestandteile des Blutes auch eine ganze Reihe pharmakologisch aktiver Substanzen, wie z. B. Prostanoiden und Kinine¹³⁶, bilden und freisetzen und mit Hilfe insbesondere von P-Selectin in spezifischer Weise mit den neutrophilen Granulozyten Aggregate bilden, innerhalb derer sie möglicherweise metabolisch eng kooperieren. Bis vor kurzem wurden die Thrombozyten im Rahmen eines Entzündungsprozesses in der Literatur allerdings weitgehend vernachlässigt.

Wenn es im Bereich eines Entzündungsherdes zur Endothelverletzung durch einen der oben genannten Stimuli kommt, verursachen die nun freiliegenden subendothelialen Bindegewebsfasern (z. B. Kollagene, von Willebrand Faktor) die Adhäsion und Aktivierung einer zunehmenden Anzahl von Thrombozyten^{55,167}. In der Folge kommt es rasch zu Interaktionen zwischen auf aktivierten Thrombozyten aktiviertem P-Selektin und PSGL-1 auf den vorbeiströmenden PMN¹⁴⁰, so daß an der Gefäßwand adhärente Blutplättchen Leukozyten regelrecht aus dem Blutstrom rekrutieren können^{63,85}. Auch andere Untersucher haben unterstrichen, daß Plättchen eine entscheidende Rolle dabei spielen, den Leukozyten den Weg zum Endothel zu weisen^{38,40} und daß an subendothelialer Matrix adhärente Blutplättchen sowohl das Rollen, als auch die Adhäsion und die Transmigration von Leukozyten unterstützen^{39,82,83}. Dieser Erstkontakt der beiden Zellarten führt zu einer vermehrten Expression des Integrins Mac-1 auf den PMN¹¹⁵, Mac-1 wiederum ist ein Ligand für das auf Plättchen exprimierte JAM-C¹⁴², somit werden weitere Interaktionen zwischen PMN und Thrombozyten ermöglicht und eine gegenseitige Aktivierung eingeleitet. Von hoher Bedeutung bei diesen Prozessen erwiesen sich auch die Expression von PECAM-1^{117,151} und JAM-A^{97,104} auf der Thrombozytenoberfläche, wobei noch etliche Details des Vorganges der

gegenseitigen Aktivierung, insbesondere die Freisetzung bestimmter Entzündungsmediatoren, ungeklärt sind. Als Folge kommt es aber offensichtlich zu einer Aktivierung des Enzyms Myosinleichtkettenkinase (MLCK) in der venulären Endothelzelle⁷⁰, das Myosin-Leichtketten phosphoryliert, wodurch eine Polymerisation des endothelialen Aktins und damit eine Kontraktion der Endothelzellen induziert wird^{61,108,109,146}. Dieser Prozeß leitet Ödeme ein, deren physiologischer Zweck sicherlich ganz wesentlich darin besteht, humorale Komponenten (wie z. B. Komplementfaktoren) der akuten Immunabwehr an einen extravasal gelegenen Entzündungsherd heranzubringen.

Angesichts der beeindruckenden Möglichkeiten zur Interaktion und gegenseitigen Aktivierung von Thrombozyten und PMN, erschien es besonders vielversprechend, unter definierten in vitro Bedingungen Methoden zu erarbeiten, mit denen die Interaktionen dieser beiden Blutzellarten mit dem venulären Endothel direkt beobachtet werden können. Das Hauptaugenmerk wurde auf einen Versuchsaufbau gelegt, der es gestattete die Interaktionen im zeitlichen Verlauf über bis zu 24 Stunden bei hoher Vergrößerung zu beobachten. Natürlich sollten für die Zellen weitgehend physiologische Umgebungsbedingungen geschaffen werden, um relevante Ergebnisse zu erzielen. Die insgesamt komplexen logistischen Vorbereitungen kulminierten in dem in Abb. 11 (Seite 32) gezeigten Versuchsaufbau. Mit Hilfe des Spezialinkubators konnten die jeweiligen Petrischalen bei 37° Celsius und einem definierten pCO₂ gehalten und zugleich mit einer alle Abläufe dokumentierenden Videokamera beobachtet werden. Als besonders zweckmäßig erwies sich die Abführung des erwärmten Luftstromes über das der Anschmiegung des Objektivs dienende Loch im Boden des Inkubators. Auf diese Weise konnten auch die beobachteten Zellen exakt über längere Zeiträume unter den eingestellten Bedingungen (Temperatur!) gehalten werden. Diese Studien werden ergänzt durch rasterelektronenmikroskopische und

histochemische Untersuchungen an den nach definierten Interaktionsphasen fixierten Zellkulturen.

In der Literatur wird vielfach berichtet, Thrombin erhöhe die Permeabilität gezüchteter Endothelzellrasen in markanter Weise^{5,6,12,35,42,95,96,98,99,118,128,132}. Unsere Experimente belegten aber, daß homogen zusammengesetzte Schichten venulärer Endothelzellen ihre Interzellularfugen unter dem Einfluß der Gerinnungsprotease selbst dann nicht öffnen, wenn diese in sehr hoher Konzentration (1 IU/ml) angeboten wird. Handelt es sich dagegen nicht um eine homogene Endothelschicht, sondern einen Zellrasen, in den subendotheliale Begleitzellen der Venulen (Perizyten?) eingestreut sind, läßt sich mit videokinematographischer Technik eine spezifische, Thrombin-vermittelte Kontraktion dieser Zellen nachweisen (vgl. Bilderserie in Abb. 36, Seite 66). Im Bereich solcher Zellen wird also die Permeabilität der Zellschicht enorm erhöht. In quantitativer Hinsicht lassen sich solche Prozesse durch Erfassung der hydraulischen Konduktivität auf porösen Filtern gezüchteter Endothelrasen darstellen. In der Arbeitsgruppe von Professor Nees ließ sich auf diese Weise zeigen, daß absolut homogene Endothelrasen tatsächlich keinerlei Erhöhung der hydraulischen Konduktivität unter dem Einfluß von Thrombin entwickeln. Einstreuung subendothelialer Zellen in derartige Zellrasen führt allerdings dann schon zu meßbaren, Thrombin-induzierten Erhöhungen der hydraulischen Konduktivität, wenn der Fremdzellanteil nur wenig größer als 2 Prozent ist. Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse erscheint die Diskrepanz unserer Befunde mit denen der Literatur als geklärt: derartige Versuche sind nur unter strikter Berücksichtigung der Reinheit der gezüchteten Zellrasen aussagekräftig. Dafür gibt es in allen recherchierten Bezugsarbeiten allerdings nie befriedigende Belege. Neuerdings wird auch die Thrombin-induzierte Permeabilitätserhöhung durch in situ-Experimente an Blut-perfundierten Venulen stark in Zweifel gestellt³².

Die Beobachtung, daß isolierte, mit Thrombin aktivierte Blutplättchen eher zu einer Abdichtung eines Endothelzellrasens führen, deckt sich mit mehreren Literaturbefunden^{4,124}. Alexander führte die Stärkung der endothelialen Barrierefunktion auf die von den Plättchen sezernierte Lysophosphatidylsäure zurück.

Nachdem in der Literatur sehr unterschiedliche Meinungen zu einer möglichen oxidativen oder hydrolytischen Schädigung des Endothels durch aktivierte PMN vertreten werden, war die Beobachtung der Interaktionen dieser Zellen mit den Endothelkulturen besonders interessant. Weder in meinen Zeitraffervideomikrokinematographischen Untersuchungen (Abb. 38, Seite 69), noch in weiterführenden Filtrationsstudien im Labor von Professor Nees konnte aber unter dem Einfluß aktivierter PMN eine Öffnung der Interzellularspalten nachgewiesen werden. Am venulären Endothel adhärente PMN können zwar, wie einige rasterelektronenmikroskopische Bilder belegen – wahrscheinlich durch freigesetzte Autoxidantien wie zum Beispiel H_2O_2 bedingt – eine lokal sehr stark begrenzte Endothellyse verursachen, die interendothelialen Junctions bleiben aber geschlossen.

Mehrere Autoren schreiben jedoch, daß aktivierte Leukozyten alleine, auch ohne das Mitwirken anderer Zellen eine Permeabilitätssteigerung durch Freisetzung aggressiver Sauerstoffverbindungen verursachen^{46,60,152,166}. Durchweg wird in derartigen Artikeln aber nicht dem Gedanken Rechnung getragen, daß in situ immer auch Blutplättchen zugegen sind, die an einer Endothelschädigung beteiligt sein könnten. Auch wird immer wieder behauptet, die Transmigration von PMN durch eine Endothelschicht ziehe eine Erhöhung der Endothelpermeabilität nach sich^{34,46}.

Immer mehr Wissenschaftler erkennen jedoch inzwischen die pathophysiologische Gewichtigkeit einer möglichen engen Kooperation der

PMN mit den in situ immer in hoher Konzentration präsenten Plättchen^{9,16,44,65,71,76,82,83,127}. Unsere Befunde, daß gleichzeitig aktivierte PMN und Plättchen, wahrscheinlich aufgrund freigesetzter Eikosanoidverbindungen, zu einer enormen Permeabilitätserhöhung des venulären Endothels führen, könnten dadurch eine wachsende Unterstützung erfahren.

Nachdem die Ergebnisse meiner Untersuchungen ergeben hatten, daß für die Öffnung der Endothelbarriere die gleichzeitige und sehr wahrscheinlich gegenseitige Aktivierung von PMN und Blutplättchen nötig ist, sollte weiterhin geklärt werden, ob die Anwesenheit der Blutzellen selbst – und somit die Möglichkeit direkter Interaktionen zwischen ihnen und dem Endothel – für die beobachteten Endothelschäden erforderlich ist. So wurden gewaschene Thrombozyten und PMN im Verhältnis 10:1 in einem Eppendorfgefäß mit Thrombin und FMLP voraktiviert und abzentrifugiert. Der Überstand, der eventuell freigesetzte Mediatoren enthalten mußte, wurde nun ohne zelluläre Blutbestandteile auf die Endothelzellen gegeben. Es zeigte sich in der Folge die gleiche für die Gefäßdichtigkeit deletäre Reaktion der Endothelzellen: die venulären Endothelzellen kontrahierten sich und kugelten sich ab. Wurde ein solches Experiment über 8 Stunden durchgeführt, waren die Endothelzellkulturen trotz eines anschließenden Mediumwechsels nicht mehr lebensfähig.

Somit läßt sich erahnen, welche schwere Folgen vergleichbare Vorgänge im menschlichen Körper hinterlassen können. Von großem, auch medizinischem Interesse ist daher die Suche nach Medikamenten, die das venuläre Endothel vor solchen Schäden bewahren und vielleicht sogar die Reparatur eines durch Plättchen/PMN-Freisetzungserzeugnisse angegriffenen Endothels bewirken.

Im Rahmen mehrerer Versuchsreihen wurde deutlich, daß nach vorheriger Inaktivierung der COX I der Plättchen durch 100 µM Acetylsalicylsäure (ASS) im Gemisch mit aktivierten PMN die deletären Freisetzungserzeugnisse der

metabolisch kooperierenden Blutzellen offenbar ausbleiben. Hingegen hatte die Zugabe von ASS in die Endothelkultur vor Zugabe der voraktivierten Blutzellen keinen schützenden oder reparativen Effekt auf das Endothel. Daraus können zwei Schlüsse gezogen werden: Zum einen handelt es sich bei den Endothelschädigenden Freisetzungprodukten wahrscheinlich um Eikosanoide, für deren Synthese eine metabolische Kooperation von Plättchen und PMN wichtig ist. Zum anderen wirkt ASS nicht als direkter Antagonist der Freisetzungprodukte der aktivierten Blutzellen am Endothel.

Als weiterer sehr erfolgversprechender pharmakologischer Ansatz für die zielgerichtete Endothelprotektion erwies sich im Rahmen dieser Arbeit der Einsatz bestimmter Flavonoide (Hydroxyethyl-Rutoside = HR). Sie können konzentrationsabhängig nicht nur – vor einer Aktivierung der Blutzellen zugegeben – eine Schädigung des Endothels durch aktivierte Plättchen und PMN verhindern, sondern sogar noch nach bereits erfolgter Öffnung der endothelialen Zellfugen eine sofort beginnende Umkehr des Prozesses und im Verlauf weniger Stunden die Wiederabdichtung des venulären Endothelzellverbandes bewirken. Auch in der Fachliteratur ist die Fähigkeit verschiedener Flavonoidverbindungen zur Endothelabdichtung schon beschrieben worden^{22,33,51,52,58,113,129}. Ein vertieftes Studium der Literatur läßt mehrere Ansatzpunkte für den Wirkmechanismus erkennen. Übereinstimmung herrscht über den antioxidativen Effekt der Flavonoide^{23,26,40,41,67,88,90,131,165}. Diese Wirkung ist sicherlich auch dafür verantwortlich, daß durch Einsatz von Flavonoiden in unseren Experimenten die (insgesamt recht schwache) Schädigung des Endothels durch alleine einwirkenden, FMLP-aktivierte adhärenzte PMN verhindert werden konnte.

Eine andere Wirkschiene der Flavonoide könnte auch ihre hemmende Wirkung auf Thrombozyten darstellen^{25,49,111}, analog auch auf die Adhäsion von Leukozyten⁵¹. Derartige Effekte können wohl auch zum Teil den präventiven Effekt der Flavonoide in unseren Experimenten erklären.

Ganz offensichtlich erniedrigen Flavonoide aber auch die Fähigkeit der Endothelzellen zur Kontraktilität, was nicht zuletzt auf ihre Fähigkeit zurückzuführen sein dürfte, eine vermehrte Stickstoffmonoxid- (NO-) Synthese in diesem, auf diesen Stoffwechselweg besonders spezialisierten, Endothel¹⁶⁰ zu induzieren⁴⁹. Interessanterweise – wenn auch nicht in direkt erkennbarem Zusammenhang mit unseren Befunden stehend – konnte Flavonoiden auch eine Einflußnahme auf die Produktion von γ -Interferon (Th-1 Antwort) und Interleukin 4 (Th-2 Antwort) im Endothel, sowie eine antiapoptotische Wirkung auf Endothelzellen²⁷ zugeschrieben werden. Förderlich für solche möglichen therapeutischen Effekte oral verabreichter Flavonoide am Endothel wäre in jedem Fall ihre selektive Akkumulation in diesem Gewebe, wie schon vor einer Reihe von Jahren durch konfokale Mikroskopie berichtet wurde¹¹⁶.

Leider gibt es in der Literatur bisher noch keine überzeugenden klinischen Daten zur Vorbeugung bestimmter vaskulärer Erkrankungen (Arteriosklerose, chronisch venöse Insuffizienz, etc.) mit Flavonoiden. Aufgrund ihrer ausgeprägten Endothel-abdichtenden Wirkung wäre es auch denkbar, daß durch Anwendung von Flavonoiden ein vielversprechender therapeutischer Ansatz zur Prävention von hämatogenen Metastasierungen bei malignen Tumoren zu begründen wäre.

Unabhängig von allen diesen möglichen klinischen und anwendungsorientierten Aspekten ergab sich für uns jedenfalls auch schon ein konkreter Nutzeffekt im Rahmen der Anwendung der Flavonoide. Diese wurden nämlich mit großem Erfolg bei der Reinigung unserer Primärkulturen venulären Ursprungs eingesetzt (vgl. Abb. 26). Dabei wurde erreicht, daß die Endothelzellen dem Schalenboden besser anhafteten und eine größere Scherkraftresistenz während des im Verlauf der hochspezifischen Reinigungsprozedur notwendigen Spülverfahrens entwickelten. Kontaminierende Begleitzellen konnten so nach der Vorbehandlung mit ECPS selektiv weggespült werden.

4.5. Ausblick

Zum Abschluß der vorliegenden Dissertationsarbeit soll nun noch versucht werden, die in den vorausgegangenen Kapiteln geschilderten und diskutierten humoralen und zellulären Interaktionen im Bereich entzündlich aktivierter Venulen durch eine schematische Serie von Computergraphiken in einen etwas breiteren pathogenetischen Rahmen zu stellen und dabei vor allem ihren phasenhaften Ablauf hervorzuheben (Abb. 43 a-1).

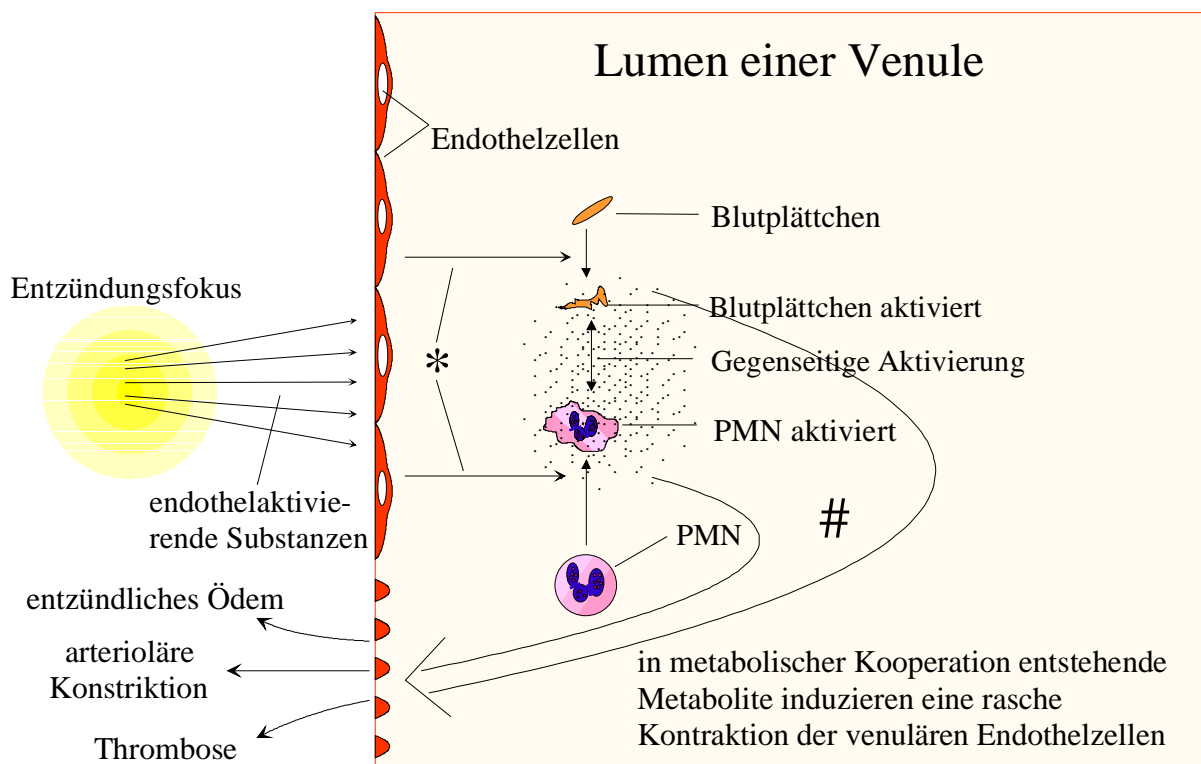


Abb. 43 a: Schrittweise Darstellung von Einzelprozessen im Verlauf eines akuten Entzündungsprozesses.

a) Aktivierung von Plättchen und neutrophilen Granulozyten, wahrscheinlich durch entzündlich stimulierte Freisetzungserzeugnisse (*) des lokal aktivierten Gefäßendothels. In metabolischer Kooperation zwischen den aktivierten Plättchen und Granulozyten gebildete, sehr wahrscheinlich dem Arachidonsäuremetabolismus entstammende Wirkstoffe (#) führen zur Kontraktion des venulären Endothels mit einhergehender Öffnung seiner Zellspalten (siehe nächste Teilabbildung).

Es resultieren entzündliche Ödeme, thrombotische Prozesse und Gefäßspasmen, siehe hierzu die folgenden Detaildarstellungen b-1.

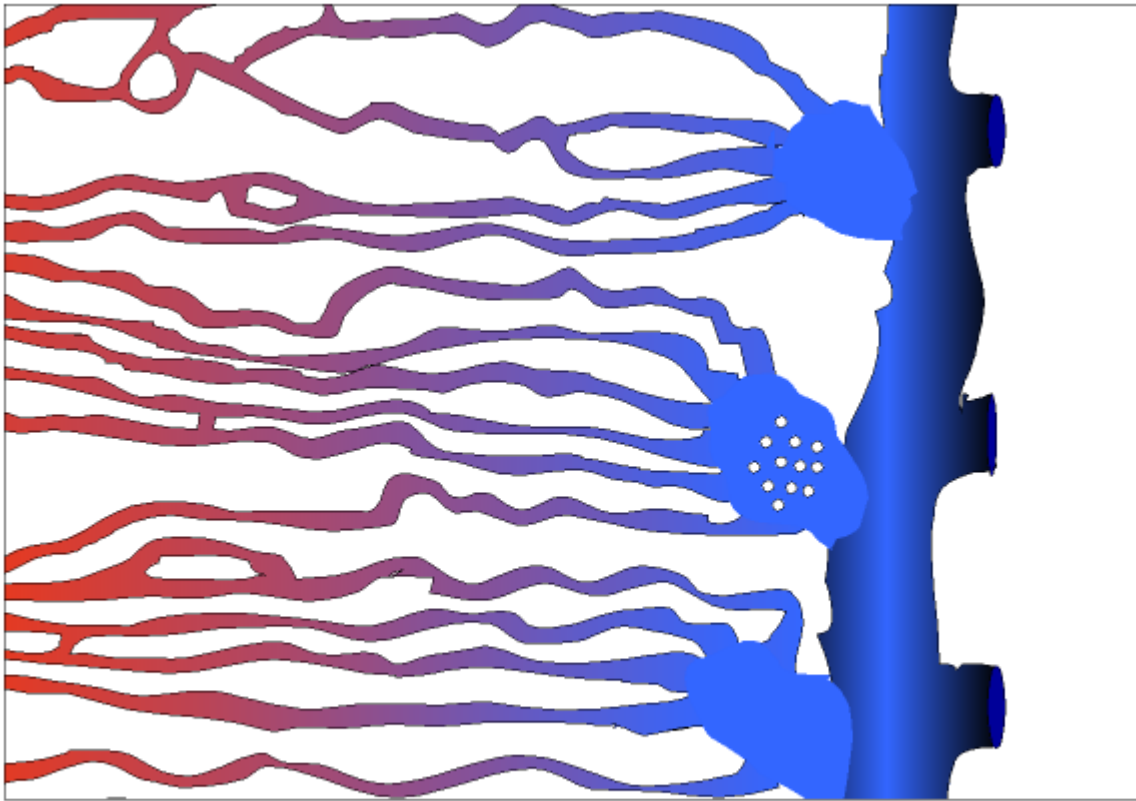


Abb. 43 b: Öffnung der endothelialen Zellverbindungen in einem postkapillären Venulenkplex.

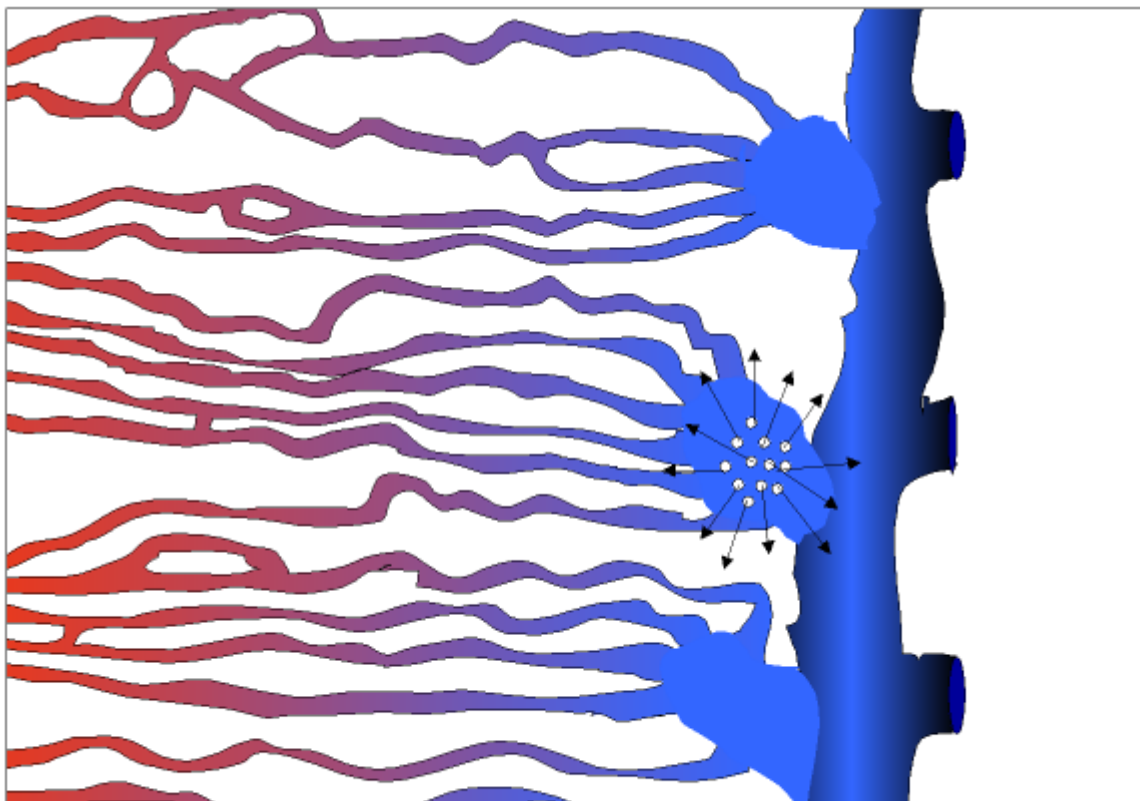


Abb. 43 c: Extravasation flüssiger Blutbestandteile.

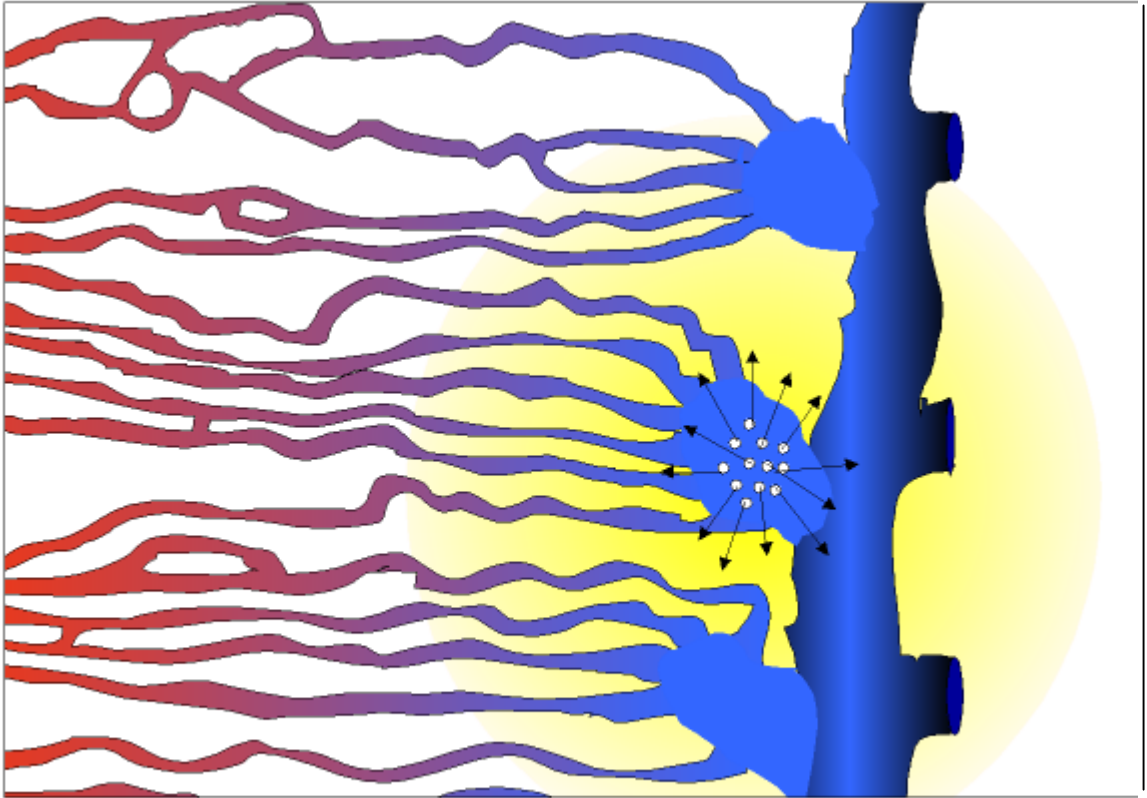


Abb. 43 d: Zunehmende Extravasation und Druckerhöhung im Interstitium.

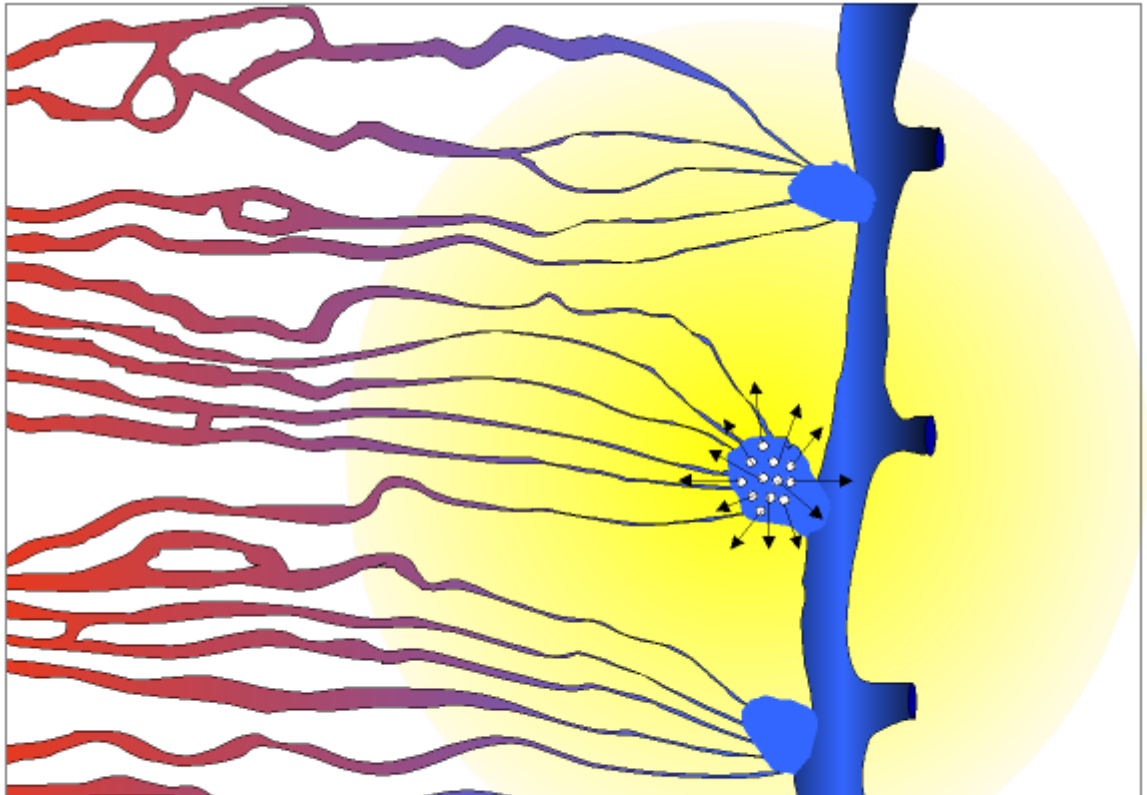


Abb. 43 e: Kompression der umliegenden Mikrogefäße und der Ausgangsvenule durch den steigenden Gewebedruck.

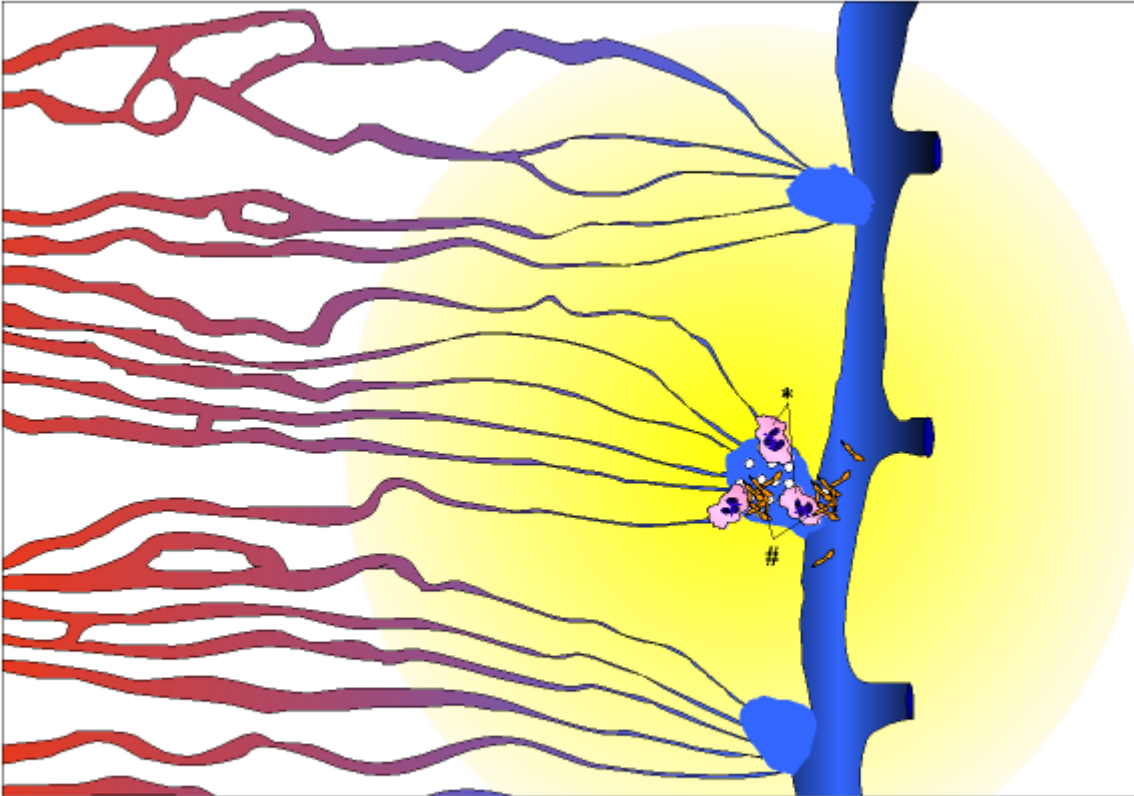


Abb. 43 f: Beginnende Emigration von PMN (*), das Schema zeigt auch einige Plättchenaggregate (#).

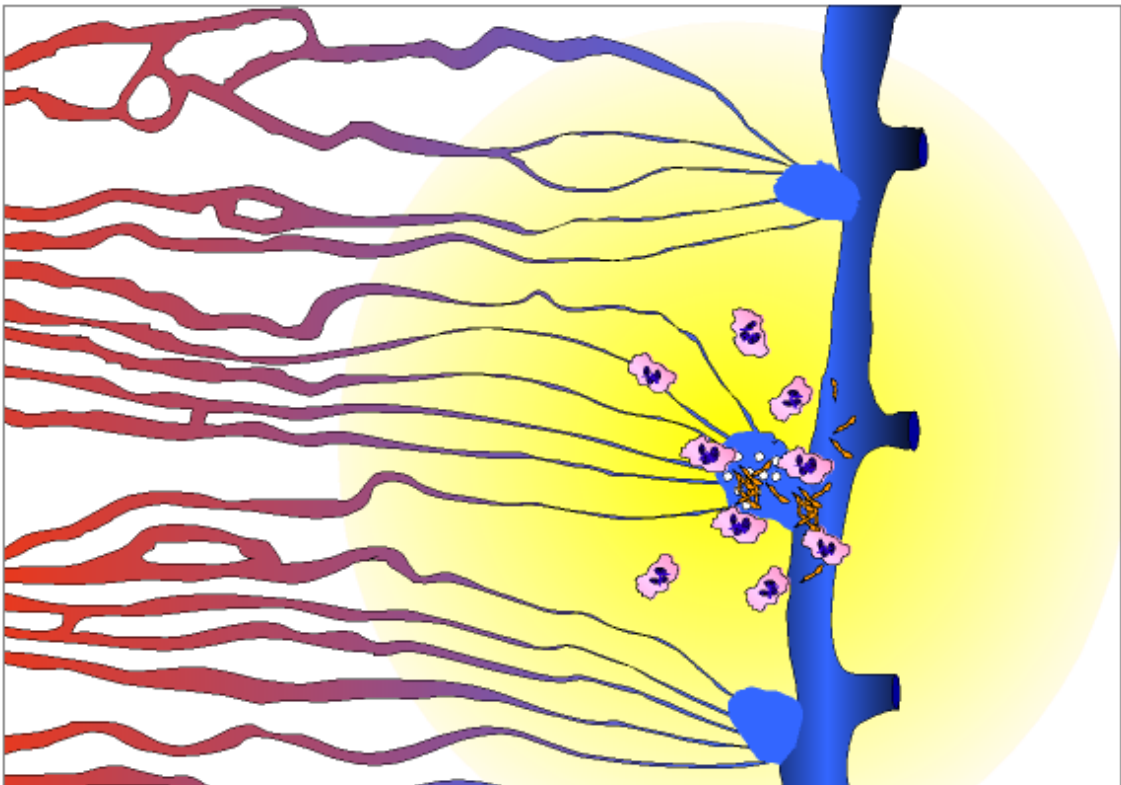


Abb. 43 g: Weitere PMN-Emigration aus der verletzten Venule.

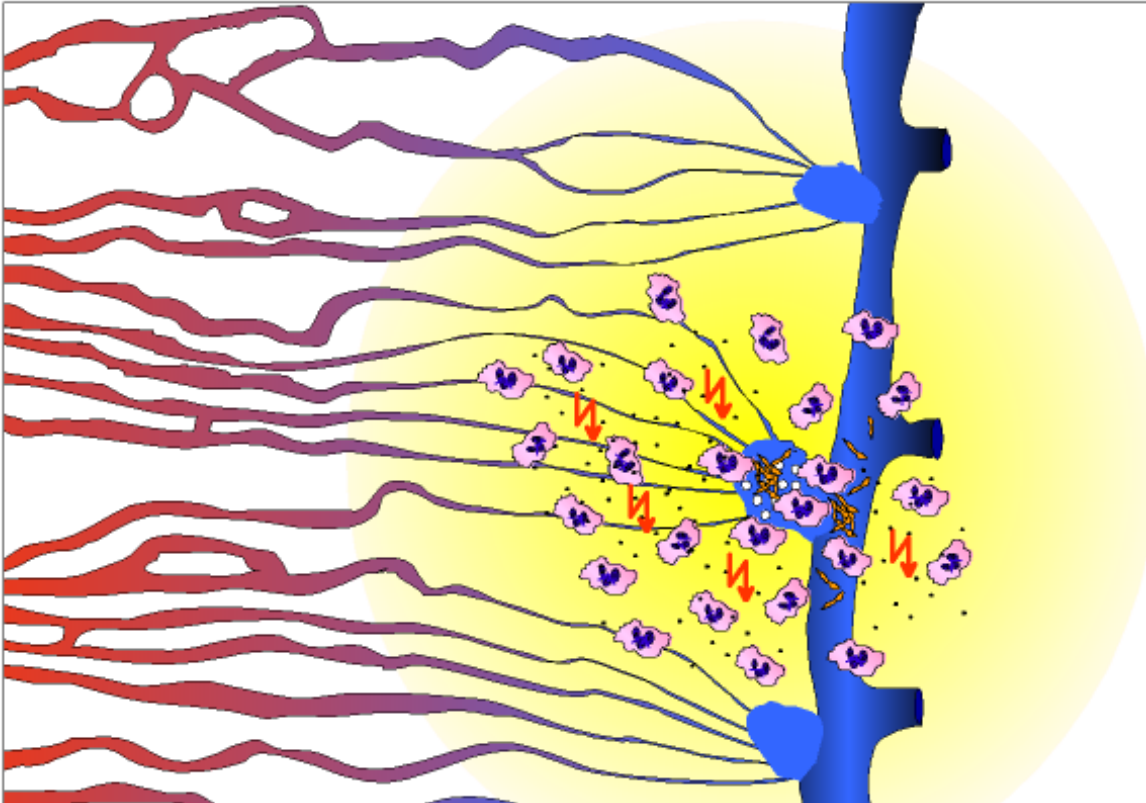


Abb. 43 h: Durch Freisetzung reaktiver Sauerstoffmetabolite und hydrolytischer Enzyme (H) aus den Leukozyten kommt es zur Zerstörung eingedrungener Krankheitserreger und körpereigenen Gewebes.

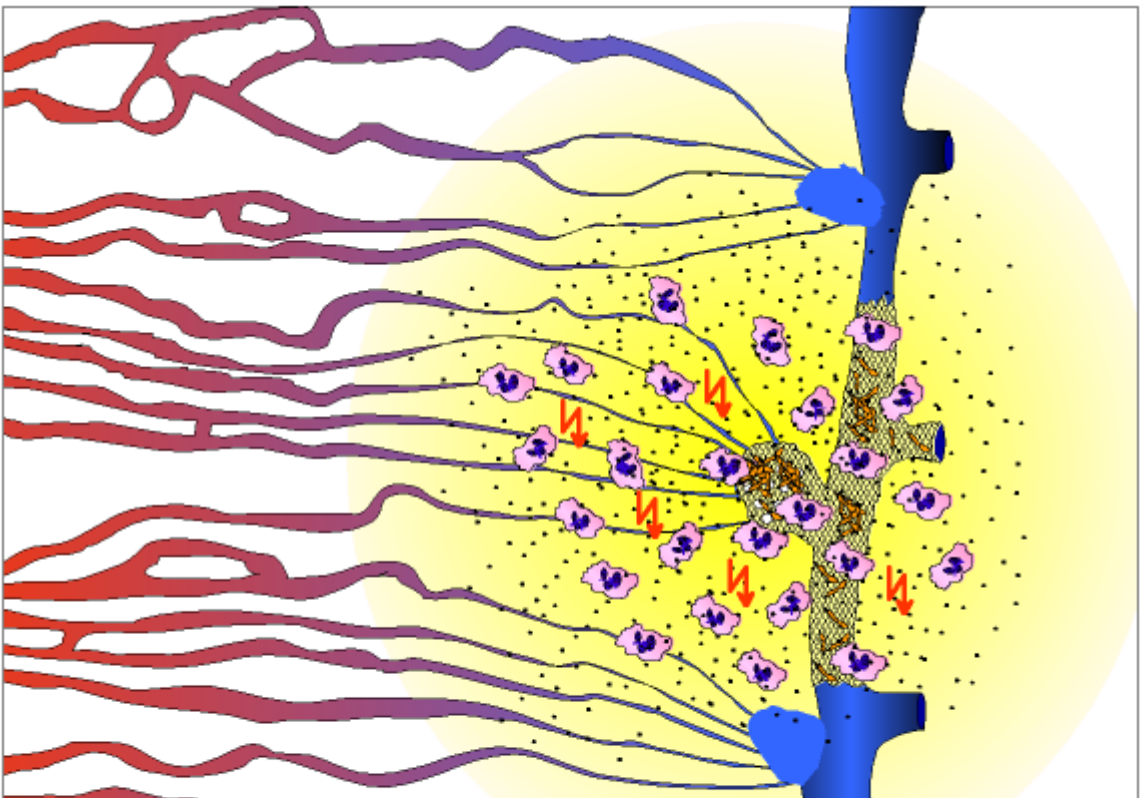


Abb. 43 i: Induziert durch Kontakt von Gerinnungsfaktoren mit dem extravasalen Gewebefaktor kommt es zusätzlich zu Gerinnungsprozessen schon im Interstitium, die auf die Venule übergreifen und diese thrombotisch vom übrigen Kreislauf abkoppeln.

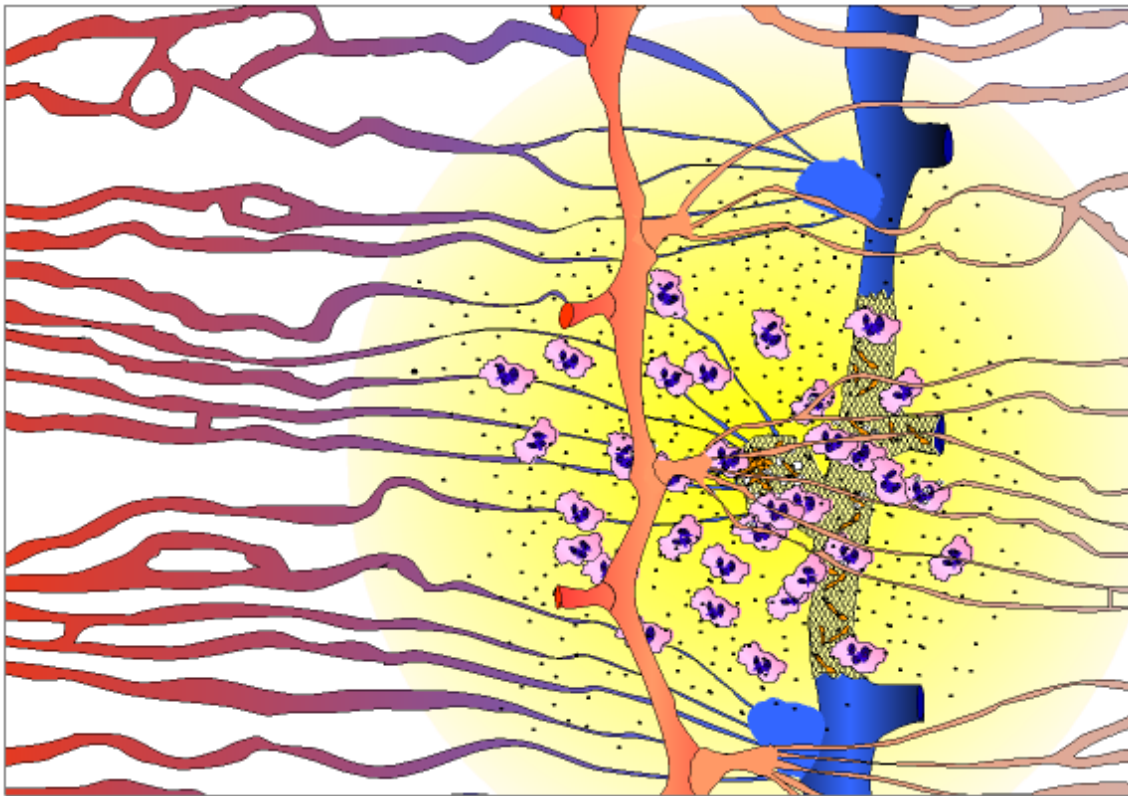


Abb. 43 j: Auswirkungen der entzündlichen Extravasation auf eine in einer vorgelagerten Ebene benachbarte Arteriole: starke Perfusionsminderung durch passive kapilläre Kompression und aktiv erzielte arterioläre Konstriktion auch in diesem Stromgebiet.

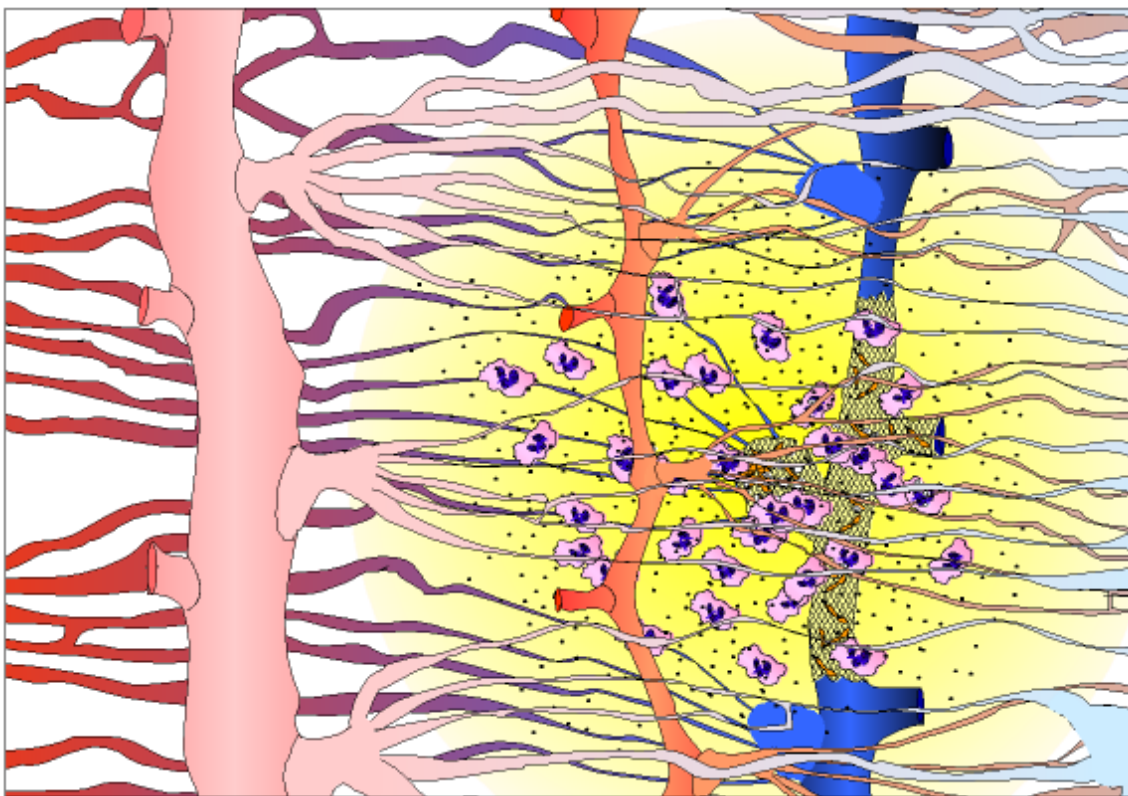


Abb. 43 k: Analoge Auswirkungen ergeben sich je nach Stärke der entzündlichen Reaktion auf sehr vielen weiteren Organisationsebenen des mikrovaskulären Netzes, in diesem Übersichtsbild zusätzlich für eine dritte dargestellt.

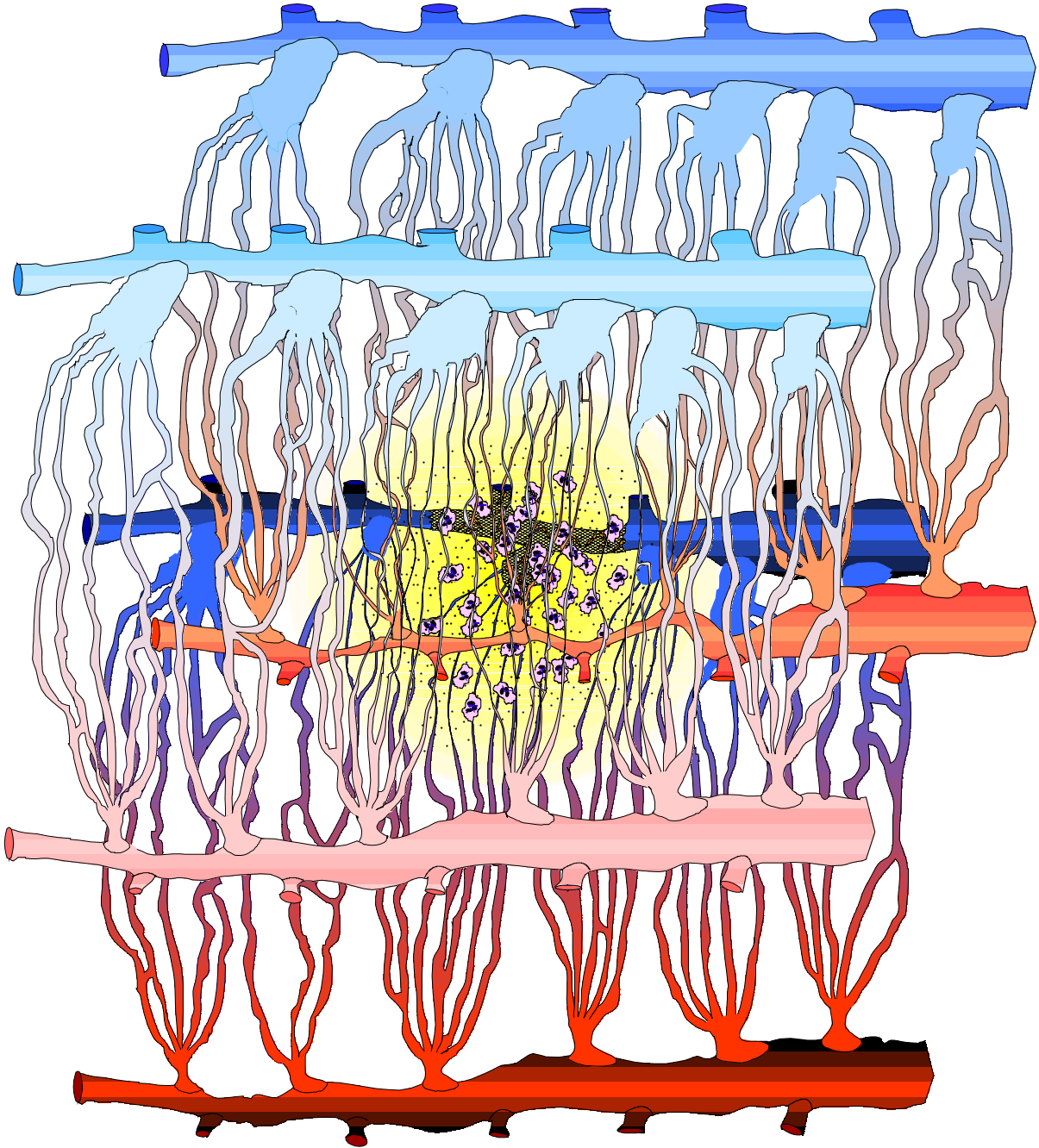


Abb. 43 I: Gesamtsituation in der Übersicht.

5. Zusammenfassung

1. In systematischen histologischen Studien gelang es, das Enzym Dipeptidylaminopeptidase IV in Kryoschnitten des Meerschweinchenmyokards und proteolytisch isolierten Mikrogefäßnetzen als selektives Markerenzym der Venulen zu etablieren. Nach Einbringen proteolytisch aus Ventrikelmyokard isolierter Venulen in Gewebekulturschälchen konnte der Nachweis geführt werden, daß diese spezielle Peptidase nur auf den venulären Endothelzellen vorkommt.

2. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es außerdem erstmals gelungen, diese identifizierbaren Endothelzellen routinemäßig und selektiv aus Venulen des Meerschweinchenherzens in hoher Ausbeute zu isolieren. Damit können nun erstmals Endothelzellen aus dem kleinsten Venen der koronaren Mikrozirkulation unter kontrollierten in vitro Bedingungen in ihrem Verhalten und in ihrer Interaktion mit verschiedenen Blutbestandteilen untersucht werden.

3. Die mit Erfolg in speziell ausgesuchten Nährmedien gezüchteten Endothelzellen venulärer Herkunft konnten mit Hilfe des enzymhisto-chemischen Nachweises von Dipeptidylaminopeptidase IV (CD26) und der immunologischen Nachweise von von Willebrand Protein, Ac-LDL-Rezeptor und von glattmukulärem α -Aktin auch noch nach wochenlanger Kultivation und mehrfacher Passagierung als venuläre Endothelzellen charakterisiert werden. Sie entwickelten auch in Gewebekultur die für Endothelzellen der kleinsten Körpervenen besonders typische, pflastersteinartige Gewebearchitektur mit prominenten perinukleären Zellregionen mit einer für Endothelgewebe erstaunlichen Dicke.

4. Nach Ausarbeitung spezieller Methoden gelang es, hochreine, unstimulierte PMN und gewaschene Plättchen aus Meerschweinchenblut zu isolieren, für deren Reinigung bisher kein publiziertes Verfahren zur Verfügung stand. Die für die Isolierung der entsprechenden Zellen aus Humanblut routinemäßig anwendbaren Verfahren versagten für die Gewinnung homogener Suspensionen dieser Zellen aus Meerschweinchenblut.

5. Ein im Rahmen der vorliegenden Arbeit optimiertes mikroskopisches Beobachtungssystem (bestehend aus einem Invertmikroskop, einem temperierbaren Miniinkubator mit darin eingeschlossener Petrischale, einer Videokamera, einer Zeitraffersteuereinheit und einem Videorekorder) ermöglichte die kontinuierliche Beobachtung und Dokumentation diverser zellulärer und humoraler Interaktionen an der Oberfläche der gezüchteten Endothelschichten venulären Ursprungs.

6. Im Rahmen solcher Beobachtungen stellte sich heraus, daß – anders als immer wieder in der Literatur beschrieben – selbst in hoher Konzentration (z. B. 1 IU/ml) angebotenes Thrombin nicht zu einer Öffnung der venulären Zellspalten führt. Thrombin induziert allerdings eine meßbare Undichtigkeit eines Endothelrasens, wenn dieser mit mehr als 2 % an perivenulären Fremdzellen („Perizyten“) verunreinigt ist.

Auch selektiv mit FMLP aktivierte, homogene PMN oder mit Thrombin aktivierte, vorher gewaschene Plättchen können für sich alleine keine maßgebliche Öffnung der venulären Endothelbarriere bewirken (aktivierte Plättchen führen sogar eher zu einer erhöhten Dichtigkeit der untersuchten konfluenten Schichten). Setzt man eine Kultur venulärer Endothelzellen jedoch dem Angriff gleichzeitig aktivierter PMN und Plättchen aus, so kommt es zu einer massiven Kontraktionsreaktion und Abkuglung der Endothelzellen mit konsekutiver Öffnung ihrer interzellulären Spalten. Doch nicht nur die

gleichzeitig aktivierten Zellen selbst, sondern auch ihr zellfreier Überstand zeigen diesen deletären Einfluß auf die Dichtigkeit von venulären Endothelrasen. Die Tatsache, daß eine Vorinkubation der Plättchen mit dem COX I-Hemmer Acetylsalicylsäure (100 μM) den deletären Einfluß von PMN und Plättchen in Gegenwart von FMLP und Thrombin verhindert, legt den Schluß nahe, daß aus den aktivierten Blutzellen freigesetzte und in metabolischer Kooperation modifizierte Eikosanoidverbindungen (Leukotriene, Thromboxane) die Kontraktion der Endothelschichten verursachen.

7. Weiterführende Untersuchungen machten deutlich, daß neben Acetylsalicylsäure auch bestimmte Flavonoid-Verbindungen (Hydroxyethyl-rutoside des im Venentherapeutikum „Venoruton®“ enthaltenen Gemenges) die durch gemeinsam aktivierte Plättchen und PMN hervorgerufene Öffnung der venulären Endothelspalten konzentrationsabhängig bis zur Vollständigkeit verhindern (ab einer Konzentration von etwa 50 μM) können. Diese Substanzen leiten überdies auch eine sofort beginnende Reparatur auf die beschriebene Weise entzündlich geöffneter Endothelfugen ein, was Acetylsalicylsäure nicht bewirken kann. 100 μM angebotene Flavonoide führten innerhalb von 5 Stunden zur einer kompletten Reparatur der Endothelbarriere.

8. Aus den im Rahmen der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnissen läßt sich ableiten, daß speziell dem Endothel der Venulen auch großes klinisches Interesse zukommt. Seine Barrierefunktion könnte durch diverse entzündliche Prozesse, z. B. von der Blutseite her durch aus PMN und Plättchen freigesetzte Mediatoren, empfindlich gestört werden und dann Anlaß zur Entstehung von Ödemen und Thrombosen geben. Es stellt sich die Frage, ob Kombinationen von Acetylsalicylsäure und bestimmten Flavonoiden solche Reaktionen auch in entsprechenden Patientengruppen wirksam verhindern könnten.

6. Literaturverzeichnis

1. Abernethy NJ, Hay JB. Isolation, culture, and characterization of endothelial cells derived from the post-capillary venules of sheep mesenteric lymph nodes, Peyer's patches, and associated small bowel. *Int Immunol.* 1989;1:378-87.
2. Ager A. Regulation of lymphocyte migration into lymph nodes by high endothelial venules. *Biochem Soc Trans.* 1996;25:421-8.
3. Albelda SM, Smith CW, Ward PA. Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J.* 1994;8:504-12.
4. Alexander JS, Patton WF, Christman BW, Cuiper LL, Haselton FR. Platelet-derived lysophosphatidic acid decreases endothelial permeability in vitro. *Am J Physiol.* 1998;274:H115-22.
5. Aschner JL, Lennon JM, Fenton JW, Aschner M, Malik AB. Enzymatic activity is necessary for thrombin-mediated increase in endothelial permeability. *Am J Physiol.* 1990;259:L270-5.
6. Aschner JL, Lum H, Fletcher PW, Malik AB. Bradykinin- and thrombin-induced increases in endothelial permeability occur independently of phospholipase C but require protein kinase C activation. *J Cell Physiol.* 1997;173:387-96.
7. Aucoin MM, Barhoumi R, Kochevar DT, Granger HJ, Brughardt RC. Oxidative injury of coronary venular endothelial cells depletes intracellular glutathione and induces HSP 70 mRNA. *Am J Physiol.* 1995;268:H1651-8.
8. Aviram R, Raz N, Kukulansky T, Hollander N. Expression of L-selectin and efficient binding to high endothelial venules do not modulate the dissemination potential of murine B-cell lymphoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2001;50:61-8.
9. Aziz KA, Cawley JC, Zuzel M. Platelets prime PMN via released PF4: mechanism of priming and synergy with GM-CSF. *Br J Haematol.* 1995;91:846-53.
10. Baekkevold ES, Jahnsen FL, Johansen FE, Bakke O, Gaudernack G, Brandtzaeg P, Haraldsen G. Culture characterization of differentiated high endothelial venule cells from human tonsils. *Lab Invest.* 1999;79:327-36.
11. Baril P, Nejari M, Scoazek JY, Boukerche H. Blocking a novel 55 kDa melanoma-associated cell surface antigen inhibits the development of spontaneous metastases and interactions with frozen lung section. *Int J Cancer.* 2002;99:315-22.
12. Baron DA, Lofton CE, Newman WH, Currie MG. Atriopeptin inhibition of thrombin-mediated changes in the morphology and permeability of endothelial monolayers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:3394-8.

13. Batra S, Kuo C, Rakusan K. Spatial distribution of coronary capillaries: A-V Segment Staggering. *Adv Exp Med Biol*. 1989;248:241-7.
14. Beach JM, McGahren ED, Duling BR. Capillaries and arterioles are electrically coupled in hamster cheek pouch. *Am J Physiol*. 1998;275:H1489-96.
15. Bennet AS, Luft JH, Hampton JC. Morphological classification of vertebrate blood capillaries. *Am J Physiol*. 1959;58:783-97.
16. Berman ME, Muller WA. Ligation of platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1/CD31) on monocytes and neutrophils increases binding capacity of leukocyte CR3 (CD11b/CD18). *J Immunol*. 1995;154:299-307.
17. Berton G, Rosen H, Ezekowitz RA, Bellavite P, Serra MC, Rossi F, Gordon S. Monoclonal antibodies to a particulate superoxide-forming system stimulate a respiratory burst in intact guinea pig neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83:4002-6.
18. Bienvenu K, Granger DN. Leukocyte adhesion in ischemia/reperfusion. *Blood Cells*. 1993;19:279-89.
19. Boado RJ. Amplification of blood-brain barrier GLUT1 glucose transporter gene expression by brain-derived peptides. *Neurosci Res*. 2001;40:337-42.
20. Bonner WA, Hulett HR, Sweet RG, Herzenberg LA. Fluorescence activated cell sorting. *Rev Sci Instrum*. 1972;43:404-9.
21. Bouchard BA, Shatos MA, Tracy PB. Human brain pericytes differentially regulate expression of procoagulant enzyme complexes comprising the extrinsic pathway of blood coagulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:1-9.
22. Bouskela E, Donyo KA. Effects of oral administration of purified micronized flavonoid fraction on increased microvascular permeability induced by various agents and on ischemia/reperfusion in the hamster cheek pouch. *Angiology*. 1997;48:391-9.
23. Breinholt V, Lauridsen ST, Dragsted LO. Differential effects of dietary flavonoids on drug metabolizing and antioxidant enzymes in female rat. *Xenobiotica*. 1999;29:1227-40.
24. Brown RE. The pattern of the microcirculatory bed in the ventricular myocardium of domestic mammals. *Am J Anat*. 1965;116:355-74.
25. Bucki R, Pastore JJ, Giraud F, Sulpice JC, Janmey PA. Flavonoid inhibition of platelet procoagulant activity and phosphoinositide synthesis. *J Thromb Haemost*. 2003;1:1820-8.
26. Chen G, Lu H, Wang C, Yamashita K, Manabe M, Meng Z, Xu S, Kodama H. Effect of five flavonoid compounds isolated from leaves of *Diospyros kaki* on stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation of proteins in human neutrophils. *Clin Chim Acta*. 2002;326:169-75.

27. Choi YJ, Kang JS, Park JH, Lee YJ, Choi JS, Kang YH. Polyphenolic flavonoids differ in their antiapoptotic efficacy in hydrogen peroxide-treated human vascular endothelial cells. *J Nutr.* 2003;133:985-91.
28. Cook-Mills JM, Gallagher JS, Feldbush TL. Isolation and characterization of high endothelial cell lines derived from mouse lymph nodes. *J Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1996;32:167-77.
29. Cozzi M, Gloghini A, Volpe R, Carbone A. Immunohistochemical correlation of DAP IV-CD 26 reactivity with immunologic markers if lymphocyte activation in human lymphoid tissues. *Br J Haematol.* 1990;75:325-32.
30. Craig LE, Spelman JP, Strandberg JD, Zink MC. Endothelial cells from diverse tissues exhibit differences in growth and morphology. *Microvasc Res.* 1998;55:65-76.
31. Culic O, Gruwel ML, Schrader J. Energy turnover of vascular endothelial cells. *Am J Physiol.* 1997;273:C205-13.
32. Curry FE, Zeng M, Adamson RH. Thrombin increases permeability only in venules exposed to inflammatory conditions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285:H2446-53.
33. Damon M, Flandre O, Michel F, Perdrix L, Labrid C, Crastes de Paulet A. Effect of chronic treatment with a purified flavonoid fraction on inflammatory granuloma in the rat. *Arzneimittelforschung.* 1987;37:1149-53.
34. Del Maschio A, Zanetti A, Corada M, Rival Y, Ruco L, Lampugnani MG, Dejana E. Polymorphonuclear leukocyte adhesion triggers the disorganization of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *J Cell Biol.* 1996;135:497-510.
35. DeMichele MA, Moon DG, Fenton JW, Minnear FL. Thrombin's enzymatic activity increases permeability of endothelial cell monolayers. *J Appl Physiol.* 1990;69:1599-606.
36. Denis CV. Molecular and cellular biology of von Willebrand factor. *Int J Hematol.* 2002;75:3-8.
37. Diacovo TG, Puri KD, Warnock RA, Springer TA, Andrian UH von. Platelet-mediated lymphocyte delivery to high endothelial venules. *Science.* 1996;273:252-5.
38. Diacovo TG, Roth SJ, Buccola JM, Bainton DF, Springer TA. Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18. *Blood.* 1996;88:146-57.
39. Diacovo TG, Catalina MD, Siegelman MH, Andrian UH von. Circulating activated platelets reconstitute lymphocyte homing and immunity in L-selectin-deficient mice. *J Exp Med.* 1998;187:197-204.
40. Duthie G, Crozier A. Plant-derived phenolic antioxidants. *Curr Opin Lipidol.* 2000;11:43-7.

41. Eastwood MA. Interaction of dietary antioxidants in vivo: how fruit and vegetables prevent disease? *QJM*. 1999;92:527-30.
42. Ehringer WD, Edwards MJ, Miller FN. Mechanisms of alpha-thrombin, histamine, and bradykinin induced endothelial permeability. *J Cell Physiol*. 1996;167:562-9.
43. Emerson GG, Segal SS. Electrical coupling between endothelial cells and smooth muscle cells in hamster feed arteries. *Circ Res*. 2000;87:474-9.
44. Evangelista V, Manarini S, Rotondo S, Martelli N, Polischuk R, McGregor JL, de Gaetano G, Cerletti C. Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction in dynamic conditions: evidence of adhesion cascade and cross talk between P-selectin and the β 2 integrin CD11b/CD18. *Blood*. 1996;88:4183-94.
45. Fauvel-Lafeve F. Microfibrils from the arterial subendothelium. *Int Rev Cytol*. 1999;188:1-40.
46. Feng D, Nagy JA, Pyne K, Dvorak HF, Dvorak AM. Neutrophil emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. *J Exp Med*. 1998;187:903-15.
47. Folkman J, Haudenschild CC, Zetter BR. Long-term culture of capillary endothelial cells. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1979;76:5217-21.
48. Folkman J, Haudenschild CC. Angiogenesis in vitro: implications for tumor biology. In: *Pathology of the endothelial cell*. Nossel HL, Vogel HJ (eds). Academic Press, New York. 1982:79-93.
49. Freedman JE, Parker C 3rd, Li L, Perlman JA, Frei B, Ivanov V, Deak LR, Iafratie MD, Folts JD. Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation*. 2001;103:2792-8.
50. Frey H. Histologie und Histochemie des Menschen. Lehre von den Formen und Mischungsbestandteilen des Körpers. Engelmann W., Leipzig. 1859.
51. Friesenecker B, Tsai AG, Allegra C, Intaglietta M. Oral administration of purified micronized flavonoid fraction suppresses leukocyte adhesion in ischemia-reperfusion injury: in vivo observations in the hamster skin fold. *Int J Microcirc Clin Exp*. 1994;14:50-5.
52. Friesenecker B, Tsai AG, Intaglietta M. Cellular basis of inflammation, edema and the activity of Daflon 500 mg. *Int J Microcirc Clin Exp*. 1995;15Suppl1:17-21.
53. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J*. 1989;3:2007-18.
54. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288:373-6.
55. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 1992;326:242-50.

56. Gaehtgens P. Das Kreislaufsystem. In: *Lehrbuch der Physiologie*. 3. Auflage. Klinke R, Silbernagl S (eds). Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York. 2001:145-188.
57. Garlanda C, Dejana E. Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:1193-202.
58. Gerdin B, Svensjö E. Inhibitory effect of the flavonoid O-(β -hydroxyethyl)-rutoside on increased microvascular permeability induced by various agents in rat skin. *Int J Microcirc Clin Exp*. 1983;2:39-46.
59. Gerlach E, Becker BF. The vascular endothelium: interactions with hemostatic mechanisms (platelets, coagulation, fibrinolysis). In: *Unstable Angina*. Bleifeld W. et al (eds). Springer Verlag Berlin, Heidelberg. 1990:3-15.
60. Gibbs LS, Lai L, Malik AB. Tumor necrosis factor enhances the neutrophil-dependent increase in endothelial permeability. *J Cell Physiol*. 1990;145:496-500.
61. Goeckeler ZM, Wysolmerski RB. Myosin light chain kinase-regulated endothelial cell contraction: the relationship between isometric tension, actin polymerisation, and myosin phosphorylation. *J Cell Biol*. 1995;130:613-27.
62. Grega GJ, Adamski SW. The role of venular endothelial cells in the regulation of macromolecular permeability. *Microcirc Endothel Lymph*. 1988;4:143-67.
63. Hagberg IA, Roald HE, Lyberg T. Adhesion of leukocytes to growing arterial thrombi. *Thromb Haemost*. 1998;80:852-8.
64. Hammersen F. Bau und Funktion der Blutkapillaren. In: *Handbuch der allgemeinen Pathologie*. Band III/7. Altmann HW, Büchner F, Cottier H, Grundmann E, Holle G, Letterer E, Masshoff W, Meessen H, Roulet F, Seifert G (eds). Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York. 1977:135-229.
65. Haselton FR, Woodall JH, Alexander JS. Neutrophil-endothelial interactions in a cell-column model of the microvasculature: effects of fMLP. *Microcirculation*. 1996;3:329-42.
66. Henle J. Allgemeine Anatomie. Lehre von den Mischungs- und Formbestandteilen des menschlichen Körpers. Voss L., Leipzig. 1841.
67. Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet*. 1993;342:1007-11.
68. Hill C, Rummery N, Hickey H, Sandow S. Heterogeneity in the distribution of vascular gap junctions and connexins: implications for function. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002;29:620-5.
69. His W. Die Häute und Höhlen des Körpers. Schweighauserische Universitätsbuchdruckerei Basel. 1865.
70. Hixenbaugh EA, Goeckeler ZM, Papaiya NN, Wysolmerski RB, Silverstein SC, Huang AJ. Stimulated neutrophils induce light chain

- phosphorylation and isometric tension in endothelial cells. *Am J Physiol.* 1997;273:H981-8.
71. Huang AJ, Furie MB, nicholson SC, Fischbarg J, Liebovitch LS, Silverstein SC. Effects of human neutrophil chemotaxis across human endothelial cell monolayers on the permeability of these monolayers to ions and macromolecules. *J Cell Physiol.* 1988;135:355-66.
 72. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest.* 1973;52:2745-56.
 73. Johnson-Leger C, Imhof BA. Forging the endothelium during inflammation: pushing at a half-open door? *Cell Tissue Res.* 2003;314:93-105.
 74. Joó F. Endothelial cells of the brain and other organ systems: some similitaryties and differences. *Prog Neurobiol.* 1996;48:255-73.
 75. Juchem GM. Etablierung und Charakterisierung mikrovaskulärer Endothelzellen und Perizyten aus dem bovinen Koronarsystem in Gewebekultur. Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin, Ludwig-Maximilians-Universität, München. 1999.
 76. Kaslovski RA, Lai L, Parker K, Malik AB. Mediation of endothelial injury following neurophil adherence to extracellular matrix. *Am J Physiol.* 1993;264:L401-5.
 77. Koike K, Moore FA, Moore EE, Read RA, Carl VS, Banerjee A. Gut ischemia mediates lung injury by a xanthine oxidase-dependent neutrophil mechanism. *J Surg Res.* 1993;54:469-73.
 78. Kölliker A. Handbuch der Gewebelehre des Menschen. Engelmann W., Leipzig. 1855.
 79. Kubes P, Granger DN. Nitric oxide modulates microvascular permeability. *Am J Physiol.* 1992;262:H611-5.
 80. Kubes P, Kurose I, Granger DN. NO donors prevent integrin-induced leukocyte adhesion but not P-selectin-dependent rolling in postischemic venules. *Am J Physiol.* 1994;267:H931-7.
 81. Kuharsky AL, Fogelson AL. Surface-mediated control of blood coagulation: the role of binding site densities and platelet deposition. *Biophys J.* 2001;80:1050-74.
 82. Kuijper PH, Gallardo-Torres HI, Linden JA van der, Lammers JW, Sixma JJ, Koenderman L, Zwaginga JJ. Platelet-dependent primary hemostasis promotes selectin- and integrin-mediated neutrophil adhesion to damaged endothelium under flow conditions. *Blood.* 1996;87:3271-81.
 83. Kuijper PH, Gallardo-Torres HI, Lammers JW, Sixma JJ, Koenderman L, Zwaginga JJ. Platelet and fibrin deposition at the damaged vessel wall: cooperative substrates for neutrophil adhesion under flow conditions. *Blood.* 1997;89:166-75.
 84. Kumar S, West DC, Ager A. Heterogenity in endothelial cells from large vessels and microvessels. *Differentiation.* 1987;36:57-70.

85. Lalor P, Nash GB. Adhesion of flowing leucocytes to immobilized platelets. *Br J Haematol.* 1995;89:725-32.
86. Lametschwandtner A, Mohl W. The microcirculatory vascular bed of the dog's heart. A scanning electron microscopy study of vascular corrosion casts. *In: The coronary sinus. Mohl W, Wolner E, Glogar D (eds). Steinkopff Verlag Darmstadt, Springer Verlag New York.* 1984:26-32.
87. Langer C. *Lehrbuch der Anatomie des Menschen. Braumüller W., Wien.* 1865.
88. Langley-Evans SC. Consumption of black tea elicits an increase in plasma antioxidant potential in humans. *Int J Food Sci Nutr.* 2000;51:309-15.
89. Latron Y, Alessi MC, George F, Anfosso F, Poncelet P, Juhan-Vague I. Characterisation of epitheloid cells from human omentum: comparison with endothelial cells from umbilical veins. *Thromb Haemost.* 1991;66(3):361-7.
90. Lean ME, Noroozi M, Kelly I, Burns J, Talwar D, Sattar N, Crozier A. Dietary flavonols protect diabetic human lymphocytes against oxidative damage to DNA. *Diabetes.* 1999;48:176-81.
91. Ley K, Gaetgens P, Fennie C, Singer MS, Lasky LA, Rosen SD. Lectin-like cell adhesion molecule 1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules in vivo. *Blood.* 1991;77:2553-5.
92. Ley K, Tedder TF. Leukocyte interactions with vascular endothelium: New insights into selectin-mediated attachment and rolling. *J Immunol.* 1995;155:525-8.
93. Lipenska M, Horsky J. Distribution of capillary bed segments with endothelial alkaline phosphatase and dipeptidylaminopeptidase IV activity in skeletal muscles of the rat. *Folia Morphol Praha.* 1984;32:69-76.
94. Lojda Z. Studies on dipeptidyl(amino)peptidase IV (glycyl-proline naphthylamidase). *Histochem.* 1979;59:153-66.
95. Lum H, DelVecchio PJ, Schneider AS, Goligorsky MS, Malik AB. Calcium dependence of the thrombin-induced increases in endothelial albumin permeability. *J Appl Physiol.* 1989;66:1471-6.
96. Lum H, Malik A. Mechanisms of increased endothelial permeability. *Can J Physiol Pharmacol.* 1996;74:787-800.
97. Malergue F, Galland F, Martin F, Mansuelle P, Aurrand-Lions M, Naquet P. A novel immunoglobulin superfamily junctional molecule expressed by antigen presenting cells, endothelial cells and platelets. *Mol Immunol.* 1998;35:1111-9.
98. Malik AB, Horgan MJ. Mechanisms of thrombin-induced lung vascular injury and edema. *Am Rev Respir Dis.* 1987;136:467-70.
99. Malik AB, Lo SK, Bizios R. Thrombin-induced alterations in endothelial permeability. *Ann N Acad Sci.* 1986;485:293-309.
100. Mancuso F, Flower RJ, Perretti M. Leukocyte transmigration, but not rolling or adhesion, is selectively inhibited by dexamethasone in the

- hamster post-capillary venule. Involvement of endogenous lipocortin 1. *J Immunol.* 1995;155:377-86.
101. Marcus BC, Hynes KL, Gewertz BL. Loss of endothelial barrier function requires neutrophil adhesion. *Surgery.* 1997;122:420-6.
 102. Marguet D, David F, Vivier I, Bernard A-M, Naquet P, Pierres M. Dipeptidyl peptidase IV (CD26): expression, structure and functions in lymphocytes. *Adv Neuroimmunol.* 1993;3:209-15.
 103. Martin GM, Ogburn CE. Cell, tissue, and organoid cultures of blood vessels. *In: Growth, nutrition, and metabolism of cells in culture. Volume III. Rothblat GH, Cristofalo VJ (eds). Academic Press, New York.* 1977:1-56.
 104. Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Ormano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol.* 1998;142:117-27.
 105. McEver RP, Cummings RD. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest.* 1997;100:485-92.
 106. McIntyre TM, Prescott SM, Weyrich AS, Zimmerman GA. Cell-cell interactions: leukocyte-endothelial interactions. *Curr Opin Hematol.* 2003;10:150-8.
 107. Morita Y, Clemens MG, Miler LS, Rangan U, Kondo S, Miyasaka M, Yoshikawa T, Bulkley GB. Reactive oxidants mediate TNF- α -induced leukocyte adhesion to rat mesenteric venular endothelium. *Am J Physiol.* 1995;269:H1833-42.
 108. Moy AB, Engelenhoven J van, Bodmer J, Kamath J, Keese C, Giaever I, Shasby SS, Shasby DM. Histamine and thrombin modulate endothelial focal adhesion through centripetal and centrifugal forces. *J Clin Invest.* 1996;97:1020-7.
 109. Moy AB, Shasby SS, Scot BD, Shasby DM. The effect of histamine and cyclic adenosine monophosphate on myosin light chain phosphorylation in human umbilical vein endothelial cells. *J Clin Invest.* 1993;92:1198-206.
 110. Moyer CF, Cennis PA, Majno G, Joris I. Venular endothelium in vitro: isolation and characterization. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1988;24:359-68.
 111. Murphy KJ, Chronopoulos AK, Singh I, Francis MA, Moriarty H, Pike MJ, Turner AH, Mann NJ, Sinclair AJ. Dietary flavonols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function. *Am J Clin Nutr.* 2003;77:1466-73.
 112. Nees S, Gerbes AL, Gerlach E. Isolation, identification and continuous culture of coronary endothelial cells from guinea pig hearts. *Eur J Cell Biol.* 1981;24:287-97.
 113. Nees S, Weiss DR, Reichenbach-Klinke E, Rampp F, Heilmeyer B, Kanbach J, Esperester A. Protective effects of flavonoids contained in the

- red vine leaf on venular endothelium against the attack of activated blood components in vitro. *Drug Res.* 2003;53:330-41.
114. Nees S, Weiss D, Thallmair M, Lamm P, Juchem G. Neue Aspekte zur Pathogenese und Therapie chronischer peripherer Venenleiden. *In: Sonderdruck aus Fortschritt und Fortbildung in der Medizin. Band 24. Bundesärztekammer (ed).* 2000/2001.
 115. Neumann FJ, Zohlhofer D, Fakhoury L, Ott I, Gawaz M, Schomig A. Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade on platelet-leukocyte interaction and surface expression of the leukocyte integrin Mac-1 in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 1999;34:1420-6.
 116. Neumann HAM, Carlsson K, Brom GHM. Uptake and localisation of O-(beta-hydroxyethyl)-rutosides in the venous wall, measured by laser scanning microscopy. *Eur J Clin Pharmacol.* 1992;43:423-6.
 117. Newman PJ, Berndt MC, Gorski J, White GD, Lyman S, Paddock C, Muller WA. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science.* 1990;247:1219-22.
 118. Nguyen LT, Lum H, Tiruppathi C, Malik AB. Site-specific thrombin receptor antibodies inhibit Ca²⁺ signaling and increased endothelial permeability. *Am J Physiol.* 1997;273:C1756-63.
 119. Nolte D, Lehr HA, Messmer K. Adenosine inhibits postischemic leukocyte-endothelium interaction in postcapillary venules of the hamster. *Am J Physiol.* 1991;261:H651-5.
 120. Nolte D, Schmid P, Jager U, Botzlar A, Roesken F, Hecht R, Uhl E, Messmer K, Vestweber D. Leukocyte rolling in venules of striated muscle and skin is mediated by P-selectin, not by L-selectin. *Am J Physiol.* 1994;267:H1637-42.
 121. Norman KE, Moore KL, McEver RP, Ley K. Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood.* 1995;86:4417-21.
 122. Osborn L. Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. *Cell.* 1990;62:3-6.
 123. Osterud B, Bjorklid E. The tissue factor pathway in disseminated intravascular coagulation. *Semin Thromb Hemost.* 2001;27:605-17.
 124. Patil S, Kaplan JE, Minnear FL. Protein, not adenosine or adenine nucleotides, mediates platelet decrease in endothelial permeability. *Am J Physiol.* 1997;273:H2304-11.
 125. Pearson JD. Endothelial Cell Biology. *Radiology.* 1991;179:9-14.
 126. Pertoft H, Laurent TC. The use of gradients of colloidal silica for the separation of cells and subcellular particles. *In: Modern Separation Methods of Macromolecules and Particles. Volume 2. Gerritsen T (ed).* Wiley Interscience, A division of John Wiley and Sons N.Y. and London. 1968:pp 71-90.
 127. Piccardoni P, Evangelista V, Piccoli A, de Gaetano G, Walz A, Cerletti C. Thrombin-activated human platelets release two NAP-2 variations that

- stimulate polymorphonuclear leukocytes. *Thromb Haemost.* 1996;76:780-5.
128. Phillips PG, Lum H, Malik AB, Tsan MF. Phalloidin prevents thrombin-induced increases in endothelial permeability to albumin. *Am J Physiol.* 1989;257:C562-7.
 129. Piller NB, Morgan RG, Gasley-Smith JR. A double blind, crossover trial of O-(β -hydroxyethyl)-rutosides (benzo-pyrones) in the treatment of lymphedema of the arms and legs. *Br J Plast Surg.* 1988;41:20-27.
 130. Plendl J, Sinowatz F, Auerbach R. [The heterogeneity of vascular endothelium]. *Anat Histol Embryol.* 1992;21:256-62.
 131. Puddey IB, Croft KD. Alcohol, stroke and coronary heart disease. Are there anti-oxidants and pro-oxidants in alcoholic beverages that might influence the development of atherosclerotic cardiovascular disease? *Neuroepidemiology.* 1999;18:292-302.
 132. Rabiet MJ, Plantier JL, Rival Y, Genoux Y, Lampugnani MG, Dejana E. Thrombin-induced increase in endothelial permeability is associated with changes in cell-to-cell junction organization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:488-96.
 133. Rhodin JA. Anatomy of the microcirculation. In: *Blood vessels and lymphatics in organ systems.* Abramson DI, Philip BD (eds). Academic Press, Orlando et al. 1984:97-106.
 134. Rhodin JA. Architecture of the vessel wall. In: *Handbook of Physiology. Section 2, Volume II.* Bohr DF, Somlyo AP, Sparks HV Jr, Geiger SR (eds). American Physiological Society, Bethesda, Maryland. 1980:1-31.
 135. Rhodin JA. Ultrastructure of mammalian venous capillaries, venules and small collecting veins. *J Ultrastruct Res.* 1968;25:452-500.
 136. Riede UN, Schäfer HE. Störungen der Individualitätswahrung. In: *Allgemeine und spezielle Pathologie. Kapitel 5.* Riede UN, Schäfer HE (eds). 1993:169-282.
 137. Riede UN, Wiestler OD, Müller HJ. Autonomes Zellwachstum (Tumorpathologie). In: *Allgemeine und spezielle Pathologie. 3. Auflage.* Riede UN, Schaefer HE (eds). Thieme Verlag Stuttgart, New York. 1993.
 138. Rosen SD, Hwang ST, Giblin PA, Singer MS. High-endothelial-venule ligands for L-selectin: identification and functions. *Biochem Soc Trans.* 1997;25:428-33.
 139. Ryan US, Mortara M, Whitaker C. Methods for microcarrier culture of bovine pulmonary artery endothelial cells avoiding the use of enzymes. *Tissue Cell.* 1980;12:619-35.
 140. Sako D, Chang XJ, Barone KM, Vachino G, White HM, Shaw G, Veldman GM, Bean KM, Ahern TJ, Furie B. Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell.* 1993;75:1179-86.
 141. Sandow SL, Tare M, Coleman HA, Hill CE, Parkington HC. Involvement of myoendothelial gap junctions in the actions of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Circ Res.* 2002;90:1108-13.

142. Santoso S, Sachs UJ, Kroll H, Linder M, Ruf A, Preissner KT, Chavakis T. The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1. *J Exp Med.* 2002;196:679-91.
143. Sato S, Ouellet N, Pelletier I, Simard M, Rancourt A, Bergeron MG. Role of galectin-3 as an adhesion molecule for neutrophil extravasation during streptococcal pneumonia. *J Immunol.* 2002;168:1813-22.
144. Schelling ME, Meininger CJ, Hawker JR Jr, Granger HJ. Venular endothelial cells from bovine heart. *Am J Physiol.* 1988;254:H1211-7.
145. Segal SS, Duling BR. Flow control among microvessels coordinated by intercellular conduction. *Science.* 1986;234:868-70.
146. Sheldon R, Moy A, Lindsley K, Shasby SS, Shasby DM. Role of myosin light-chain phosphorylation in endothelial cell retraction. *Am J Physiol.* 1993;265:L606-12.
147. Simionescu M, Simionescu N, Palade GE. Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium. The microvasculature. *J Cell Biol.* 1975;67:863-85.
148. Smith CW. Endothelial adhesion molecules and their role in inflammation. *Can J Physiol Pharmacol.* 1993;71:76-87.
149. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature.* 1990;346:425-34.
150. Springer TA, Lasky LA. Sticky sugars for selectins. *Nature.* 1991;349:196-7.
151. Stockinger H, Gadd SJ, Eher R, Majdic O, Schreiber W, Kasinrek W, Strass B, Schnabl E, Knapp W. Molecular characterization and functional analysis of the leucocyte surface protein CD31. *J Immunol.* 1990;145:3889-97.
152. Suttrop N, Nolte A, Wilke A, Drenckhahn D. Human neutrophil elastase increases permeability of cultured pulmonary endothelial cell monolayers. *Int J Microcirc Clin Exp.* 1993;13:187-203.
153. Takahashi K, Hata J-I, Mukai K, Sawasaki Y. Close similarity between cultured human omental mesothelial cells and endothelial cells in cytochemical markers and plasminogen activator production. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1991;27A:542-8.
154. Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J.* 1995;9:866-73.
155. Thallmair M. Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung von Endothelzellen aus subkutanem Bauchfett des Menschen und des Pavians zum Zwecke der Endothelialisierung vaskulärer Prothesen. Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin, Ludwig-Maximilians-Universität, München. 2000.
156. Thorlacius H, Prieto J, Raud J, Gautam N, Patarroyo M, Hedqvist P, Lindbom L. Tumor cell arrest in the microcirculation: lack of evidence for

- a leukocyte-like rolling adhesive interaction with vascular endothelium in vivo. *Clin Immunol Immunopathol.* 1997;83:68-76.
157. Thurston G, Baluk P, McDonald DM. Determinants of endothelial cell phenotype in venules. *Microcirculation.* 2000;7:67-80.
 158. Thurston G, Baluk P, Hirata A, McDonald DM. Permeability-related changes revealed at endothelial cell borders in inflamed venules by lectin binding. *Am J Physiol.* 1996;271:H2547-62.
 159. Tozeren A, Kleinam HK, Grant DS, Morales D, Mercurio AM, Byers SW. E-selectin-mediated dynamic interactions of breast- and colon-cancer cells with endothelial-cell monolayers. *Int J Cancer.* 1995;60:426-31.
 160. Wagner L, Hoey JG, Erdely A, Boegehold MA, Baylis C. The nitric oxide pathway is amplified in venular vs arteriolar rat mesenteric endothelial cells. *Microvasc Res.* 2001;62:401-9.
 161. Wang JP, Teng CM. Roles of PMN leucocytes, platelets and some mediators in rat hind-paw edema induced by two phospholipase A2 enzymes from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. *J Pharm Pharmacol.* 1992;44:300-5.
 162. Witzleb E. Funktionen des Gefäßsystems. In: *Physiologie des Menschen.* Schmidt RF, Thews G (eds). 24. Auflage. Springer Verlag Berlin. 1990:505-72.
 163. Wu KK, Thiagarajan P. Role of Endothelium in Thrombosis and Hemostasis. *Annu Rev Med.* 1996;47:315-31.
 164. Yashiro Y, Duling BR. Integrated Ca²⁺ signaling between smooth muscle and endothelium of resistance vessels. *Circ Res.* 2000;87:1048-54.
 165. Yoshida H, Ishikawa T, Hosoai H, Suzukawa M, Ayaore M, Hisada T, Sawada S, Yonemura A, Higashi K, Ito T, Nakajima K, Yamashita T, Tomiyasu K, Nishiwaki M, Ohsuzu F, Nakamura H. Inhibitory effect of tea flavonoids on the ability of cells to oxidize low density lipoprotein. *Biochem Pharmacol.* 1999;58:1695-703.
 166. Yoshida N, Yoshikawa T, Nakamura Y, Sakamoto K, Takenaka S, Boku Y, Kassai K, Kondo M. Interactions of neutrophils and endothelial cells under low flow conditions in vitro. *Shock.* 1997;8:125-30.
 167. Zanten GH van, Graaf S de, Sloatweg PJ, Heijnen HF, Conolly TM, Groot PG de, Sixma JJ. Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries. *J Clin Invest.* 1994;93:615-32.
 168. Zetter BR. The endothelial cells of large and small blood vessels. *Diabetes.* 1981;30(Suppl2):24-8.

Danksagung

Herzlicher Dank gebührt Herrn **Prof. Dr. E. Gerlach** (damaliger Vorstand des Physiologischen Instituts der LMU München), der mir einen Arbeitsplatz in seinem Institut zur Verfügung gestellt und großen Freiraum für meine Tätigkeiten eingeräumt hat.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn **Prof. Dr. Dr. S. Nees**, der mich in seine Arbeitsgruppe aufnahm und das Thema meiner Arbeit stellte, mir bei der Planung und Durchführung der Versuche stets hilfreich zur Seite stand, mich durch seine Begeisterung und Energie immer wieder neu zu dieser Forschungsarbeit motivierte, und der mich auch bei der Abfassung der vorliegenden Dissertation tatkräftig unterstützt hat.

Herrn **Prof. Dr. Welsch** (Anatomisches Institut der LMU München) gebührt großer Dank für die Anfertigung der transmissionselektronenmikroskopischen Bilder. Großer Dank sei auch Herrn **Prof. Dr. Lange** und seiner Assistentin Frau **Kerwin** (beide am selben Institut) für die Anfertigung der Gefrierschnitte aus Meerschweinchenherzen ausgedrückt.

Herrn **PD Dr. R. Zahler** danke ich sehr dafür, daß er mir die Blutabnahmetechnik am Meerschweinchen mit allen Details demonstriert hat und mir bei meinen ersten Blutabnahmen mit vielen praktischen Ratschlägen behilflich war.

Den Feinmechaniker-Meistern **J. Feuerstein** und **F. Singer** sowie dem Feinmechaniker-Gesellen **M. Buchner** danke ich vielmals für ihre technische und handwerkliche Unterstützung bei der Realisierung neuer experimenteller Ansätze.

Meinen Kollegen **M. Thalmair, J. Gasnier, G. Juchem und P. Weyrich** sage ich großen Dank für die fruchtbare und angenehm kollegiale Zusammenarbeit.

Großen Dank möchte ich auch Herrn **Dr. M. Unkauf** (Novartis Consumer Health München/Nyon) ausdrücken, der mit uns über lange Strecken wissenschaftlich kooperiert hat und hilfreiche Anregungen gegeben hat.

Nicht zuletzt möchte ich **meinen Eltern** ganz herzlich danken, ohne deren Unterstützung mein Studium und die wissenschaftlichen Untersuchungen im Rahmen meiner Dissertationsarbeit nicht möglich gewesen wären.

Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name: Bernhard Heilmeyer
 Eltern: Irene Heilmeyer und Hans-Joachim Wronn-Heilmeyer
 Wohnort: Daiserstraße 46, 80371 München
 Geburtstag: 29.04.1971 Geburtsort: Landshut
 Familienstand: ledig Nationalität: deutsch

Schulbildung:

1977–1981 Grundschule (Mettenbach)
 1981–1991 Gymnasium (Hans-Carossa-Gymnasium, Landshut)
 Abschluß: Abitur (Allgemeine Hochschulreife)

Berufsausbildung:

10.1992 Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der LMU –
 München
 03.1995 Ärztliche Vorprüfung
 Famulaturen in den Fächern Chirurgie (Auguste-Viktoria-
 Krankenhaus, Berlin), Anästhesiologie (Klinikum der LMU,
 München), Innere Medizin (Medical Center, Loma Linda,
 Kalifornien, USA), Innere Medizin (Medizinische Klinik
 Innenstadt der LMU, München), Innere Medizin (Praxis Dr.
 Penkert, Vilsbiburg)
 08.1996 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 08.1998 Erster Abschnitt des Amerikanischen Staatsexamens
 03.1999 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 Praktische Ausbildung in den Fächern Herzchirurgie (Groote
 Schuur Krankenhaus, Kapstadt, Südafrika), Chirurgie
 (Klinikum Innenstadt der LMU, München), Innere Medizin
 (Medizinische Poliklinik der LMU, München), Anästhesio-
 logie und Intensivmedizin (Klinikum der LMU, München)
 05.1999 Beginn der Forschungsarbeit am Physiologischen Institut der
 LMU in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. S. Nees
 05.2000 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 07.2000–12.2001 Arzt im Praktikum, Medizinische Poliklinik, Klinikum
 Innenstadt der LMU, München
 01.2002 Approbation
 01.2002 Fachkundenachweis Rettungsdienst
 04.2002 Zweiter Abschnitt des Amerikanischen Staatsexamens
 seit 08.2002 Assistenzarzt, Medizinische Klinik III, Klinikum Großhadern
 der LMU, München