

Aus dem Institut für chirurgische Forschung im Walter-Brendel-Zentrum für  
experimentelle Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Ulrich Pohl

**Die Bedeutung der endothelialen Glykokalyx für die  
Adhäsion von polymorphnukleären neutrophilen Granulozyten.  
Ein Vergleich zwischen *in vitro* und *in situ* Modellen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Jörn Oliver Paul

aus München

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Bernhard F. Becker

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Markus Rehm

Prof. Dr. Fritz Krombach

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. Matthias Jacob

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Oktober 2012

Meinen Eltern

für die Geduld

Wesentliche Teile dieser Dissertationsarbeit wurden veröffentlicht bzw. als Kongressbeiträge präsentiert:

- I. Jacob M, Paul O, Mehringer L, Chappell D, Rehm M, Welsch U, Kaczmarek I, Conzen P, Becker BF: **Albumin augmentation improves condition of guinea pig hearts after 4 hr of cold ischemia.** Transplantation 2009, 87(7):956-965.
- II. Chappell D, Jacob M, Paul O, Rehm M, Welsch U, Stoeckelhuber M, Conzen P, Becker BF: **The Glycocalyx of the Human Umbilical Vein Endothelial Cell. An Impressive Structure Ex Vivo but Not in Culture.** Circ Res 2009, 104:1313-7.
- III. Chappell D, Jacob M, Paul O, Mehringer L, Newman W, Becker BF: **Impaired glycocalyx barrier properties and increased capillary tube haematocrit.** J Physiol 2008, 586(Pt 19):4585-4586.
- IV. Jacob M, Rehm M, Loetsch M, Paul JO, Bruegger D, Welsch U, Conzen P, Becker BF: **The endothelial glycocalyx prefers albumin for evoking shear stress-induced, nitric oxide-mediated coronary dilatation.** J Vasc Res 2007, 44(6):435-443.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Problemstellung</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>4</b>
2.1	Isolation von polymorphnukleären neutrophilen Granulozyten (PMN)	4
2.2	<i>In vitro</i> Versuche mit kultivierten humanen Umbilikalvenen- endothelzellen (HUVEC)	7
2.3	<i>Ex vivo</i> Versuche am isoliert perfundierten Meerschweinchenherzkapillarbett	12
2.4	Perfusions- und Standard-Lösungen	19
2.5	Zellzahlbestimmung mittels Durchflusszytometrie	20
2.6	Elektronenmikroskopische Darstellung der endothelialen Glykokalyx	24
2.7	Immunhistochemische Analyse der endothelialen Glykokalyx	26
2.8	Statistische Auswertung	27
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>28</b>
3.1	PMN-Adhäsion im <i>in vitro</i> Modell	28
3.2	PMN-Adhäsion im <i>ex vivo</i> Modell	28
3.3	Elektronenmikroskopische Darstellung der	

	endothelialen Glykokalyx	30
3.4	Immunhistochemische Darstellung der endothelialen Glykokalyx	35
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>38</b>
4.1	Visuelle Unterschiede in der Ausprägung der endothelialen Glykokalyx beim <i>in vitro</i> und <i>ex vivo</i> Modell	38
4.2	Enzymatisches Shedding der endothelialen Glykokalyx im <i>in vitro</i> und im <i>ex vivo</i> Modell	42
4.3	PMN-Adhäsionsverhalten nach 4 Stunden kalter Ischämie	45
4.4	Schlussfolgerungen und Ausblick	48
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>49</b>
<b>6.</b>	<b>Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme</b>	<b>52</b>
<b>7.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>54</b>
<b>8.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>55</b>
<b>9.</b>	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>57</b>
<b>10.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>59</b>

## 1. Problemstellung

Eine bisher in der Forschung unterschätzte biologische Struktur stellt die endotheliale Glykokalyx dar, ein Gebilde, das physiologischerweise in jedem Gefäßbett zu finden ist.

Bereits vor 70 Jahren wurde von J.F. Danielli eine den Endothelzellen anhaftende Schicht vermutet, die die Gefäßpermeabilität entscheidend beeinflusst [1]. Heute ist bekannt, dass diese aus Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen und Glykoproteinen besteht [1]. Aufgrund von inadäquaten Darstellungstechniken, galt diese als „Glykokalyx“ benannte Struktur mit einer scheinbaren Ausdehnung von lediglich wenigen Nanometern als physiologisch nicht bedeutsam [2].

Erst in jüngerer Zeit konnte - neben anderen Fixierungstechniken - durch eine Stabilisierung mittels Lanthan-(III)-Salzen elektronenmikroskopisch gezeigt werden, dass die Dicke der Glykokalyx bis zu 500 nm beträgt und nicht nur für die vaskuläre Barriere von besonderer Bedeutung ist, sondern auch weitere physiologische Funktionen wahrnimmt [3-8].

Die Glykokalyx besteht aus einem Netz von membrangebundenen Proteoglykanen und Glykoproteinen, die ein Grundgerüst bilden, welches durch lösliche Bestandteile wie Glykosaminoglykanen und Plasmaproteinen zum *endothelial surface layer* (ESL) ergänzt wird [9-13]. Plasma-Albumin scheint ein bevorzugter Interaktionspartner bei der Bildung des ESL und bei der Vermittlung von flussabhängigen Gefäßdilataationen zu sein [14]. Die Bestandteile des ESL vom Endothel und aus dem Plasma stehen vermutlich in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen Synthese und enzymatischen und/oder Schubspanungs-vermitteltem Abscheren ("Shedding") [12, 15]. Den Großteil der Glykosaminoglykane machen Heparansulfate aus, die von den

Proteoglykanen, hierbei vornehmlich den transmembranösen Syndecanen getragen werden [10, 16, 17]. Enzymatisches Shedding durch Heparinase oder Pronase kann neben entzündlichen Reizen wie TNF- $\alpha$  und Ischämie die Ausdehnung der endothelialen Glykokalyx verringern [5, 8, 18].

Mit einer Ausdehnung von bis zu 0,5  $\mu\text{m}$  [19, 20] überragt die endotheliale Glykokalyx die für die Leukozytenadhäsion verantwortlichen Moleküle (z.B. ICAM/VCAM, P- und L-Selektine, Integrine). Folglich sollten unter physiologischen Bedingungen diese Adhäsionsmoleküle (Länge max. 20 nm) unter der endothelialen Glykokalyx verborgen sein und auf diese Weise eine Interaktion zwischen zirkulierenden Leukozyten und Endothel verhindert sein [13, 21].

Ein Shedding, also lokale oder generalisierte Zerstörung der Glykokalyx durch Entzündungsmediatoren oder als Reaktion auf ischämische Ereignisse scheint daher eine wichtige Komponente der vaskulären Entzündungsreaktion zu sein [22].

Eine Ischämie mit nachfolgender Reperfusion kann Schäden des entsprechenden Gewebes hervorrufen, die in Summe größer sein können als der Schaden durch die Ischämie selbst [23-26]. Daneben kommt es zu mikrovaskulärer Dysfunktion, Ablösung der Endothelzellen von der Basalmembran und Erhöhung der vaskulären Permeabilität (Ödembildung) [5, 27-29]. Die Schädigung der Glykokalyx dürfte in diesem Zusammenhang von mitentscheidender Bedeutung sein.

Polymorphnukleäre neutrophile Granulozyten (PMN) sind an diesem Ischämie-Reperfusionsschaden durch eine Reihe von Mechanismen beteiligt [30-35]. Wichtig erscheint dabei, dass PMN adhären werden im reperfundierten Gefäßbett. Eine intakte endotheliale Glykokalyx dürfte essentiell zur Verhinderung dieser Inflammationsreaktion sein. Aus diesem Grund ist eine valide Untersuchung von Endotheleigenschaften nur an einem Modell zu erreichen, bei dem eine anatomisch

und funktionell erhaltene endotheliale Glykokalyx nachweisbar ist. Bisherige Untersuchungen der endothelialen Eigenschaften bei Steuerung der Interaktion mit PMN waren stark dominiert durch Studien an Endothelzellkulturen, insbesondere solche von makrovaskulären humanen Endothelzellen aus der Umbilikalvene (HUVEC).

Es stellte sich daher die Frage, ob HUVEC in Zellkulturen in ihrer endothelialen Oberfläche der heterogenen mikro- und makrovaskulären Situation *in vivo* entsprechen oder ob die mit Hilfe solcher Kulturen erhobenen Befunde kritisch gesehen werden müssen. Hierzu wurde untersucht, ob die endotheliale Glykokalyx in ihrer geometrischen Ausprägung in einem *in vitro* Modell zur Situation in einem *in situ/ex vivo* Modell Unterschiede zeigt und die Adhäsionsrate von neutrophilen Granulozyten in einem *in vitro* Modell (HUVEC-Kulturen) nach enzymatischem Shedding (Heparinase) vergleichbar erhöht ist wie in einem *in situ* Modell (intaktes Koronarsystem des isolierten Meerschweinchenherzen).

Speziell herausgegriffen wurde die Leukozytenadhäsion am Endothel, wie sie im Rahmen einer Ischämie-Reperfusion eine große Rolle spielt. Hierbei wurde der Frage nachgegangen, ob die endotheliale Oberfläche in einer Ischämie-Reperfusion-Situation durch den Zusatz von Albumin

a) stabilisiert werden kann, und

b) ob dies zu einer Verringerung der post-ischämischen Adhäsion von PMN führt.

Verwendet wurde hierzu das spontanschlagende, salin-perfundierte isolierte Herzmodell (Meerschweinchen), welches frisch gewonnene humane PMN erhielt.

## **2. Material und Methoden**

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden im Zeitraum September 2004 bis Juni 2007 am Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin München, ehemals Physiologisches Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München, Vorstand Prof. Dr. U. Pohl, durchgeführt.

Zum Vergleich der endothelialen Eigenschaften einer Zellkultur von endothelialen Zellen (HUVEC) und von nativen Endothelzellen in einem intakten Kapillarbett beim isoliert perfundierten Meerschweinchenherzen wurden nach einem standardisierten Verfahren humane polymorphnukleäre neutrophile Granulozyten (PMN) gewonnen und in das jeweilige Modell eingebracht. Die unter verschiedenen Bedingungen ermittelte Adhäsionsrate im Kapillarbett bzw. der Zellkultur wurde als Maß für den entstandenen Schaden an der endothelialen Glykokalyx gewertet.

Um die Dicke der endothelialen Glykokalyx beurteilen zu können wurden immunhistochemische Färbungen und elektronenmikroskopische Darstellungen verwendet.

### **2.1 Isolation von polymorphnukleären neutrophilen Granulozyten (PMN)**

Als eine schnelle und ergiebige Methode zur Isolierung von polymorphnukleären neutrophilen Granulozyten wurde für die Versuche das Magnetic Cell Sorting (MACS<sup>®</sup>) - System der Firma Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach verwendet. Dieses System erlaubte eine jeweilig zeitnahe Präparation der PMN vor der Applikation in das jeweilige Versuchsmodell. Ein in der Arbeitsgruppe früher bereits durchgeführter

Vergleich zwischen humanen PMN und PMN vom Meerschweinchen zeigte keine signifikanten quantitativen Unterschiede hinsichtlich Adhäsionsverhalten sowohl in Kontrollexperimenten als auch bei Experimenten nach Ischämie mit in beiden Gruppen erhöhter Adhäsionsrate [36].

Ein ebenfalls von dieser Arbeitsgruppe durchgeführter Vergleich zwischen den Isolationsverfahren mittels Percoll-Gradient und MACS<sup>®</sup> zeigte ebenfalls keine nennenswerten Unterschiede in Reinheits- und Aktivierungsgrad der isolierten Granulozyten [37].

Eine Präparation mittels MACS<sup>®</sup> konnte innerhalb von 45 Minuten durchgeführt werden, so dass für die jeweiligen Versuche jeweils frisch präparierte PMN verwendet werden konnten, um z.B. etwaige Unterschiede im Aktivierungsgrad vermeiden zu können.

Bei der Präparation mittels MACS<sup>®</sup> wurden ca. 1,5 Stunden vor Versuchsbeginn einem menschlichen Probanden 15 ml venöses Vollblut in 2 Kalium-EDTA-haltige Blutabnahmeröhrchen (SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht) entnommen (Endkonzentration 1,2 – 2 mg EDTA / ml Blut). Nach Zentrifugation mit 400 G für 15 min wurde der PMN-haltige „Buffy Coat“ abpipettiert (ca. 1 ml) und für 15 min bei 4 °C mit magnetischen CD 15 Antikörpern (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) inkubiert. Anschließend kam der Buffy Coat in eine mit PBS vorgespülte Säule, die an einem starken Dauermagneten angebracht war (Abb. 2.1).

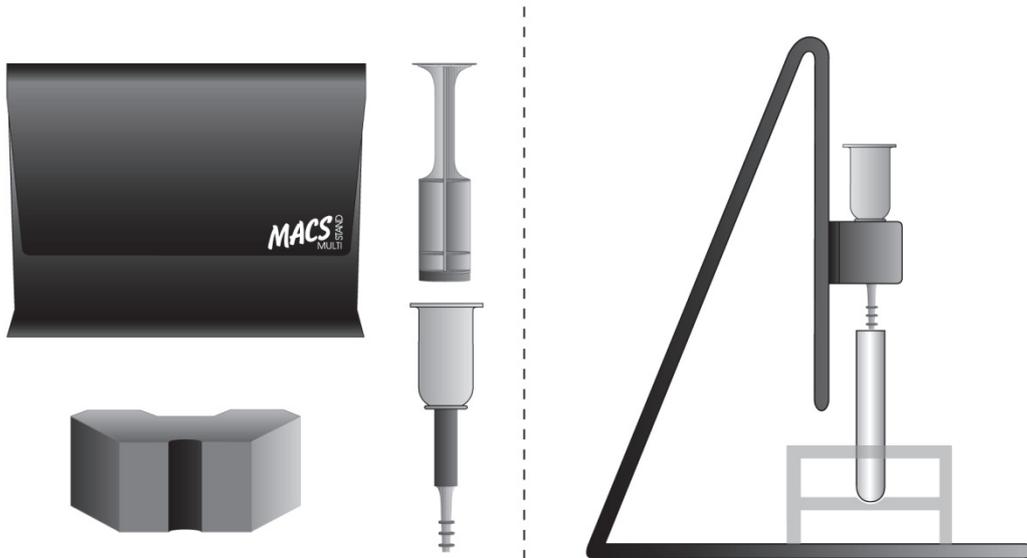


Abbildung 2.1

Schematische Darstellung des Magnetic Cell Sorting (MACS<sup>®</sup>) Systems der Firma Miltenyi Biotec.

Bildrechte liegen bei Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach.

Nach Durchlaufen des Buffy Coat wurden die nicht magnetisch-markierten Zellen durch mehrmaliges Waschen mit PBS ausgeschwemmt, so dass nach Entfernen der Säule vom Magneten die magnetisch markierten PMN separat ausgewaschen (1 ml PBS) werden konnten. Die damit erhaltene PMN-haltige Lösung wurde mit 9 ml PBS gewaschen und für 10 min bei 350 G zentrifugiert. Nach Dekantieren wurde das gewonnene Zell-Pellet in Tyrode-Lösung dispergiert und bis zur Applikation bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Für die *in vitro* Versuche wurden die so gewonnenen PMN mit Calcein (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA) in einer Konzentration von 5 µg/ml bei einer Inkubationszeit von 20 Minuten angefärbt. Vorversuche zeigten eine 99%ige Anfärbungsquote nach diesem Vorgehen.

## 2.2 *In vitro* Versuche mit kultivierten humanen Umbilikalvenen-endothelzellen (HUVEC)

Für die zellkulturellen Experimente wurden humane Umbilikal-Venen-Endothelzellen (HUVEC) aus frischen humanen Nabelschnurvenen isoliert und kultiviert. Nach Kanülierung der Nabelschnurvene (max. 6 h alt) und Durchspülen mit PBS, wurde die Nabelschnurvene zur Loslösung der Endothelzellen mittels Collagenase Type I (17 IU/ml) (Genaxxon Bioscience GmbH, Biberach, Deutschland) in auf 37 °C temperierter isotoner Kochsalzlösung für 10 Minuten gebadet. Im Anschluss wurden die Endothelzellen mit DMEM (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA) herausgespült und bei 280 G für 6 Minuten zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden 5 ml Endothelial Cell Growth Medium (PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland) zugegeben und anschließend in Zellkulturflaschen kultiviert (37 °C, 5% PCO<sub>2</sub>, 100% relative Luftfeuchtigkeit). Nach Erreichen von Konfluenz der Primärkultur wurde diese geteilt und in Kulturschalen mit einer Mischung aus Endothelial Cell Growth Medium und DMEM im Verhältnis 50 zu 50 erneut bis zur Konfluenz kultiviert (Zellen der zweiten Passage). Die Konfluenz wurde mittels Lichtmikroskopie (Axiovert S 100, Zeiss, Göttingen) verifiziert.

Um die gewonnen HUVEC *in vitro* unter Fluss-Bedingungen zu untersuchen, wurden mit Kollagen IV beschichtete sterile  $\mu$ -Slides I der Firma ibidi GmbH, München als Flusskammer-Modell verwendet (Abb. 2.2).

Diese Slides bestehen aus biokompatiblen, bruchfestem Kunststoff (L x B x H: 75,5 mm x 25,5 mm x 1,7 mm), sind unterteilt in zwei ca. 800  $\mu$ l fassende Reservoirs und

ein diese verbindendes Beobachtungsvolumen von  $100\mu\text{l}$ . Dieses Beobachtungsvolumen hat die Maße: Länge: 50 mm, Breite 5,0 mm, Höhe 0,4 mm.

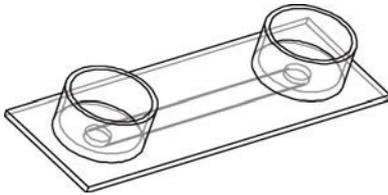


Abbildung 2.2

Schematische Darstellung eines ibidi  $\mu$ -slides (Bildrechte liegen bei ibidi GmbH, München)

Laut Herstellerangaben wirken bei einem angelegten Fluss von 1 ml/min Scherkräfte in Höhe von  $1,25 \text{ [dyn/cm}^2\text{]}$ . Die Kammern sind bereits von Seiten des Herstellers mit Kollagen IV beschichtet und werden in steriler Verpackung geliefert. Die  $\mu$ -Slides ermöglichen lineare Perfusion, mikroskopische Untersuchungen und durch den flexiblen Boden Fixierung und Zuschneiden der adhärennten Zellen für Färbungen und sowohl licht- als auch elektronenmikroskopische Untersuchungen.

Konfluente HUVEC-Kulturen der dritten Passage wurden nach vorsichtigem Absaugen der überständigen Nährflüssigkeit in den Kulturschalen mit Trypsin (0,25%) (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA) enzymatisch abgelöst und in einem Volumen von  $100 \mu\text{l}$  in die Flusskammer der ibidi  $\mu$ -Slides eingebracht. Die jeweiligen beiden Reservoirs wurden mit je  $600 \mu\text{l}$  Endothel-spezifischer Nährflüssigkeit (PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland) aufgefüllt. Die Slides wurden danach bei  $37,5 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ -Luft Begasung und 100% relativer Luftfeuchtigkeit weiter inkubiert (Cytoperm, Heraeus, Hanau) bis nach 9 bis 10 Tagen lichtmikroskopisch (Axiovert S 100, Zeiss, Göttingen) ein konfluierender Zellrasen zu verifizieren war.

Versuche wurden sowohl mit nicht-konfluenten Zellen, nach 6 Tagen Inkubationszeit, als auch mit konfluenten Zellen nach 12 Tagen Inkubationszeit durchgeführt (Abb. 2.3).

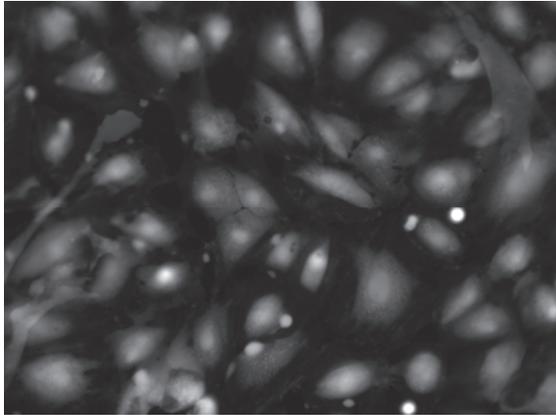


Abbildung 2.3

Konfluenter HUVEC-Zellrasen in der lichtmikroskopischen Darstellung (Vergrößerung 40x)

Für die *in vitro* Modell-Versuche unter Flussbedingungen wurde eine Versuchapparatur konstruiert, die es ermöglichte, Studiengruppen- und Kontrollgruppen-Versuche zeitnah parallel durchzuführen, um eine Alteration der präparierten PMN infolge einer verlängerten Warteperiode zu verhindern. Mittels eines Schlauchsystems wurde durch eine doppelläufige Rollerpumpe (ISM 830, ISMATEC Sa. Labortechnik-Analytik, Glattbrugg-Zürich, Schweiz) ein konstanter Fluss von 1 ml/min eingestellt. Als Perfusat wurde Tyrode-Lösung gewählt. Zur Applikation von Heparinase I (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) wurde ein Dreiweghahn zwischengeschaltet über den auch zur Fixierung der Zellen nach Versuchsende 3%iges Formalin (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA) appliziert werden konnte. Die Zugabe der PMN erfolgte über eine Spritzenpumpe (Precidor, Infors AG, Basel, Schweiz) mit der die in einer eingespannten 5 ml Spritze (BD Discardit II) befindlichen PMN über eine 18G Venenverweilkanüle (Optiva 2, Medex Medical Ltd., Rossendale, Großbritannien) direkt vor die Beobachtungskammer des

$\mu$ -Slides appliziert werden konnten (siehe Abb.2.4). Vorversuche mit dem Farbstoff Eosinrot (Chroma-Gesellschaft, Schmid GmbH & CO., Stuttgart) zeigten eine homogene Verteilung der zugegebenen Flüssigkeit in der Beobachtungskammer (Abb. 2.5).

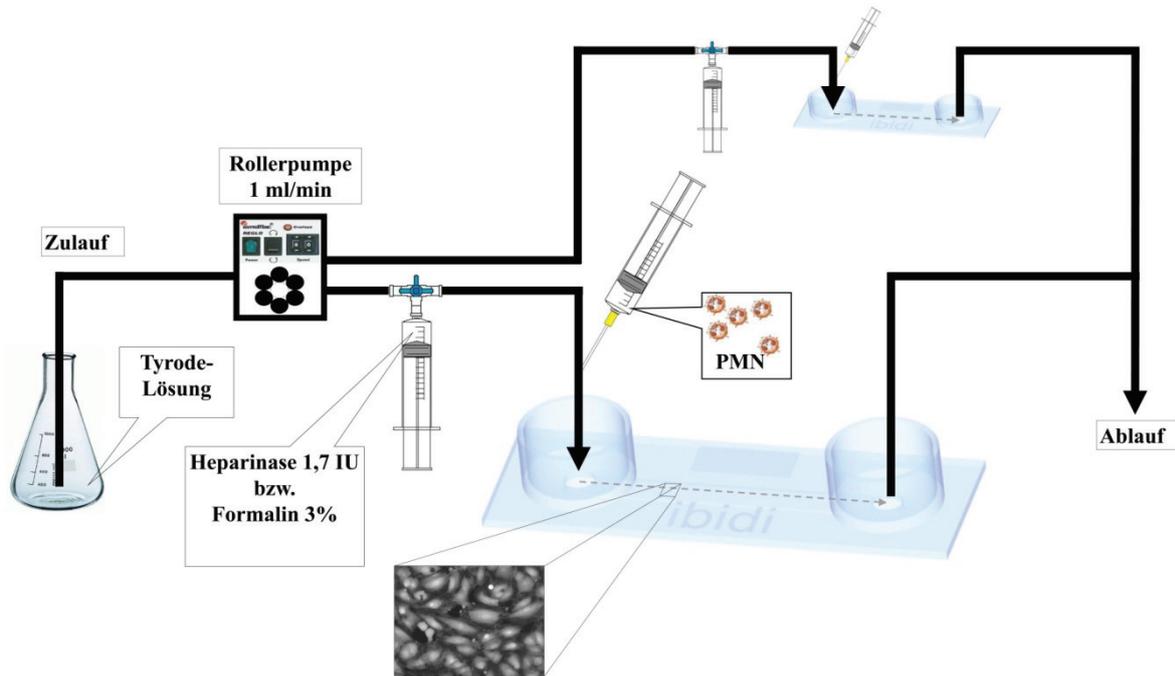


Abbildung 2.4

Versuchsaufbau des in-vitro-Modells mit zwei parallelgeschalteten Beobachtungskammern

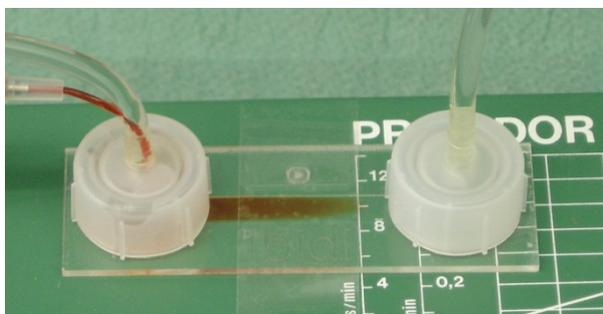


Abbildung 2.5

Darstellung der homogenen Verteilung von Eosinrot in der Beobachtungskammer

Sowohl die Kontrollgruppen-, als auch die Studiengruppen-Versuche wurden nahezu parallel mit nur einer Zeitdifferenz von 3 Minuten durchgeführt, um eine Alteration der isolierten PMN zu minimieren. Nach 5 Minuten Äquilibrierungsphase wurde in der Studiengruppe über 15 Minuten eine Gesamtmenge von 1,7 IU Heparinase (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA) appliziert. Nach weiteren 5 Minuten Äquilibrierung, wurden über 5 Minuten insgesamt  $10^6$  PMN zugegeben. Vor der endgültigen Fixierung mit 3% Formalin (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA) wurde 3 Minuten lang ausgewaschen. Bei der Kontrollgruppe fand in den ersten 25 Minuten keine Intervention statt. Für all diese Versuche wurden konfluente HUVEC-Kulturen nach 12 Tagen Inkubationsdauer verwendet. Der zeitliche Ablauf der Versuche ist in Abb. 2.6 wiedergegeben.

Die mittels Formalin fixierten Slides wurden per Fluoreszenzmikroskop (Axiovert S100, Zeiss, Göttingen) betrachtet und die adhärennten Calcein-markierten PMN manuell ausgezählt. Hierzu wurden bei einer 20-fachen Vergrößerung 40 zufällig gewählte Gesichtsfelder betrachtet und die Anzahl der fluoreszierenden PMN im jeweiligen Vergleich zwischen Kontroll- und Studiengruppe bestimmt.

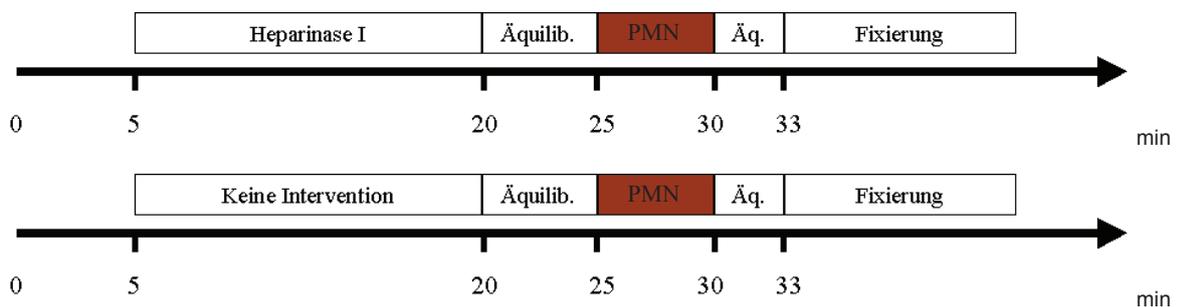


Abbildung 2.6

Versuchsablauf unter Verwendung von ibidi  $\mu$ -Slides (Äquilib. und Äq. = Äquilibrierung)

### 2.3 *Ex vivo* Versuche am isoliert perfundierten Meerschweinchenherzkapillarbett

Als Versuchstiere wurden männliche Albino Kurzhaar Meerschweinchen mit Gewichten zwischen 250g und 1050g verwendet. Innerhalb der einzelnen Versuchsreihen wurden nur Tiere vergleichbaren Gewichtes verwendet. Bis zu den jeweiligen Versuchen wurden die Tiere gemäß den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes (BGB vom 18.01.1986, Teil 1) bei freiem Zugang zu Wasser und Trockenfutter unter konstanten Bedingungen bei 24° C, 50% relativer Luftfeuchtigkeit und einem 12-stündigen Tag-/Nachtrhythmus gehalten. Die Versuche waren durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (AZ 209.1/211-2531.3-3/99).

Die Experimente am *in situ* Modell erfolgten in insgesamt 7 Gruppen. Die einzelnen Tiere wurden zufällig den einzelnen Gruppen zugeteilt bis jeweils eine ausreichende Anzahl (n=6) an eingeschlossenen Versuchen erreicht werden konnte.

Die Meerschweinchenherzen, die 3 Minuten nach Beendigung der Lagerung in kalter Kardioplegielösung keinen koordinierten Herzrhythmus (HF > 200 Schläge/min) zeigten, wurden ausgeschlossen. Ebenso wurden Herzen, die nach erfolgter Präparation wie unten beschrieben als nicht „dicht“ anzusehen waren, ausgeschlossen. Die verwendeten Perfusionslösungen werden in Kapitel 2.4 beschrieben.

Es folgt eine Auflistung der verschiedenen Versuchsgruppen:

**PMN-Kontrolle 1** (n=6): Sechs Versuche wurden ohne isoliert perfundiertes Herz durchgeführt, um zu ermitteln welche Basaladhäsion die Versuchsapparatur selbst

verursacht. Als Perfusat wurde der mit Albumin modifizierte Krebs-Henseleit-Puffer (siehe Kapitel 2.4) verwendet (flusskonstante Perfusion mit 6 ml/min).

**PMN-Kontrolle 2** (n=6): Die Herzen wurde ohne Intervention präpariert (s.u.) und es wurde entsprechend des Versuchsprotokolls (s.u.) die PMN-Adhäsion bestimmt. Das verwendete Perfusat war hierbei ebenfalls albuminhaltiger Krebs-Henseleit-Puffer.

**PMN-Kontrolle 3** (n=6): Analoges Ablauf zu PMN-Kontrolle 2. Als Perfusat diente albuminfreier Krebs-Henseleit-Puffer.

**PMN-Heparinase** (n=6): Nach entsprechender Präparation wurden die Herzen mit 10 IU Heparinase (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) über 10 Minuten behandelt und anschließend die PMN-Adhäsion bestimmt. Als Perfusat diente albuminfreier Krebs-Henseleit-Puffer.

**PMN-UW** (n=6): Als Kardioplegielösung wurde sowohl für Perfusion als auch zur Lagerung während der Ischämie University of Wisconsin (UW) – Lösung verwendet. Zur Reperfusion wurde albuminhaltiger modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer verwendet.

**PMN-HTK** (n=6): Anstatt UW- wurde HTK (Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat)-Lösung verwendet. Ansonsten analoger Ablauf zu PMN-UW.

**PMN-HTK-Albumin** (n=6): Anstatt von UW- bzw. HTK-Lösung wurde eine mit Albumin modifizierte HTK-Lösung verwendet. Die Gesamtkonzentration des Albumins in der Kardioplegielösung betrug 1 g%. Die Reperfusion erfolgte mit albuminhaltigem Krebs-Henseleit-Puffer.

Die Versuchstiere wurden mittels eines eigens für die Arbeitsgruppe hergestellten Geräts durch zervikale Dislokation betäubt und unmittelbar danach durch beidseitige Eröffnung der Aa. carotides getötet.

Nach Eröffnen des Thorax wurde das noch schlagende Herz durch Umspülen mit 4° C kalter isotoner Kochsalzlösung zum Stillstand gebracht und unter weiterer konstanter externer Kühlung aus dem Thorax herauspräpariert. Hierzu wurde der Perikardbeutel mit Pinzetten gefasst und abgezogen. Die Aorta wurde im Aortenbogen eröffnet und kanüliert. Ab diesem Zeitpunkt wurde bei den Versuchsgruppen ohne Ischämie das Koronarsystem mit auf 37° C temperiertem Puffer perfundiert. Bei den Versuchsgruppen mit Ischämie wurde das Herz mit der entsprechenden eisgekühlten Kardioplegielösung perfundiert.

Anschließend wurden A. pulmonalis, Vv. pulmonales und Vv. cavae inferior und superior durchtrennt.

Bei den Versuchsgruppen ohne Ischämie wurden nun unter konstanter Perfusion (6 ml/min) mit Perfusat beide Venae cavae und die Vv. pulmonales ligiert. In die A. pulmonalis wurde eine weitere Kanüle eingebracht über die das Herz ohne Widerstand „venöses“ Effluat auswerfen konnte. Vor der aortalen und nach der pulmonalen Kanüle wurden Flussmesser eingebracht (T 106; Transonic Systems Inc., Ithaca, NY), um die Dichtigkeit des präparierten Herzens beurteilen zu können. Nur wenn beide Messungen annähernd den gleichen Wert (Differenz <0,2 ml/min)

ergaben, wurde das Herz als „dicht“ beurteilt und in die Studiengruppe eingeschlossen. Der Zeitrahmen für die Präparation betrug ca. 10-15 Minuten.

Bei den Versuchsgruppen mit Ischämie (PMN-UW, PMN-HTK, PMN-HTK-Albumin) wurden die Herzen ebenfalls aortal kanüliert. Über den Zeitraum von 3-5 Minuten wurden sie dann mit der entsprechenden Kardioplegielösung (0° C) unter weiterer konstanter externer Kühlung mit Kochsalzlösung (4° C) retrograd druckkonstant (100 cm Wassersäule) perfundiert bis zu einer Menge von 8ml/100g Tiergewicht und anschließend in entsprechender Kardioplegielösung für 4 Stunden bei 0° C gelagert. Nach dem Ischämieintervall wurden sie analog zu den Versuchsgruppen ohne Ischämie mit modifiziertem Krebs-Henseleit-Puffer perfundiert und präpariert.

Für all diese *ex vivo* Versuche wurden die Koronarsysteme der Herzen nach einer modifizierten Langendorff-Methode perfundiert. Da die Aortenkanüle oberhalb der Aortenklappe unter Schonung derselben eingebracht wurde, schließt diese sich aufgrund des retrograd gerichteten Flusses und das Perfusat erreicht über Koronararterien, Kapillarbett und Koronarvenen schließlich den rechten Vorhof. Über den rechten Ventrikel schließlich wird das koronarvenöse Effluat über die Pulmonalkanüle ausgeworfen. Dieser Auswurf wurde entsprechend der Versuchsprotokolle aufgefangen und auf die Anzahl der darin befindlichen PMN getestet. Die Perfusionseinrichtung wird schematisch in Abb. 2.7 dargestellt.

Die Perfusion erfolgte bei den Versuchsgruppen PMN-Kontrolle 1, 3 und PMN-Heparinase flusskonstant mit 6 ml/min, bei den Versuchsgruppen PMN-Kontrolle 2, PMN-UW, PMN-HTK und PMN-HTK-Albumin druckkonstant mit 80 cm Wassersäule. Druckkonstante Perfusion in der akuten postischämischen Reperfusionphase entspricht der physiologischen Situation und vermeidet einen Druck-bedingten

Austritt von Perfusat in das Gewebe (Ödem). Die druckkonstante Perfusion wurde bei letzteren Gruppen allerdings zur Applikation der PMN ebenfalls auf flusskonstant umgestellt.

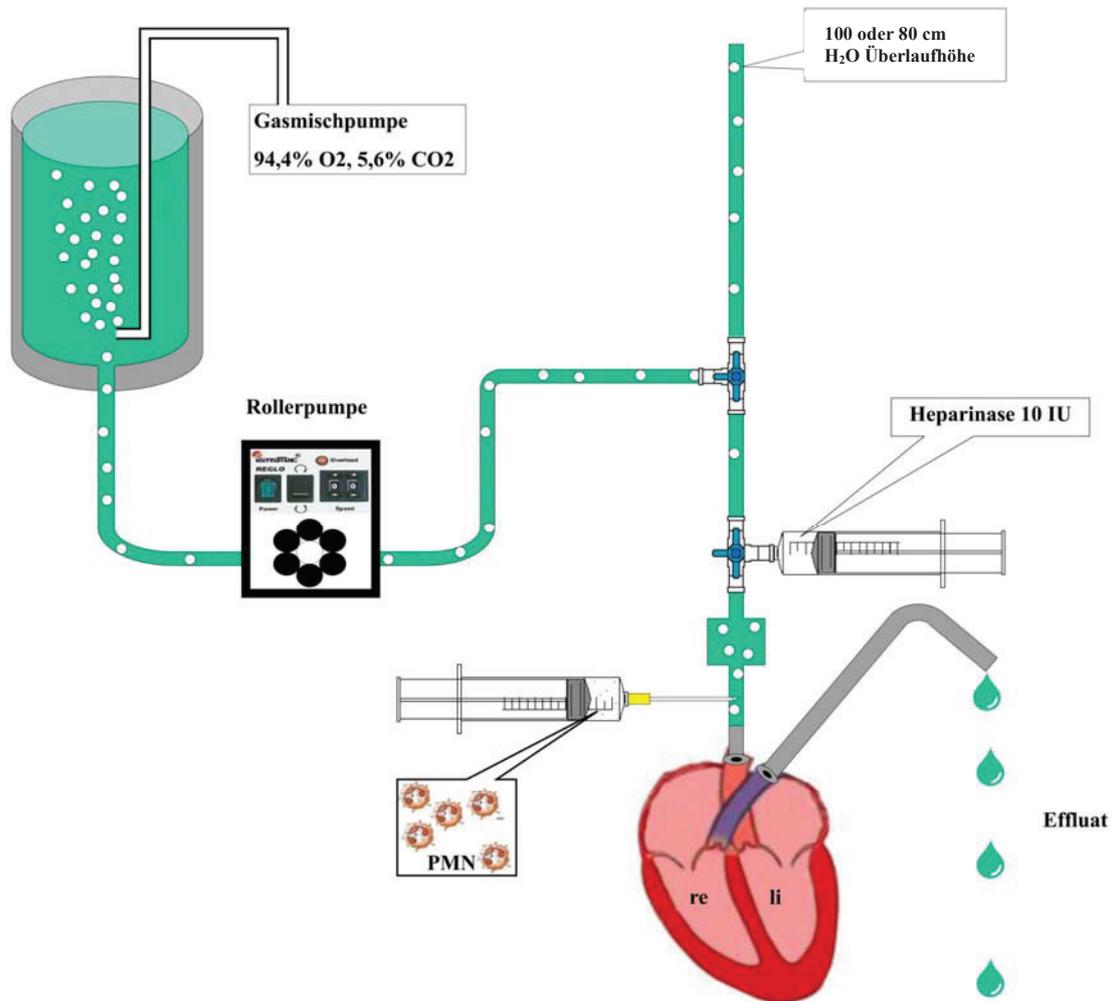


Abbildung 2.7

Schematische Darstellung des Modells des isoliert perfundierten Meerschweinchenherzens

Die mittels MACS<sup>®</sup> präparierten PMN wurden bei den *in situ* Versuchen unmittelbar vor der Aortenkanüle injiziert. Zum Applikationszeitpunkt wurde bei allen Gruppen die Perfusion auf flusskonstant (6 ml/min) umgestellt. Über den Zeitraum von 1 Minute wurde mit einer zuvor auf den Versuchsaufbau geeichten Spritzenpumpe 1 ml der PMN-Suspension appliziert. Zuvor wurde aus der bereits laufenden Spritze ein

Eichbolus über den Zeitraum von 1 Minute entnommen, um die applizierte Menge an PMN bestimmen zu können ( $PMN_{input}$ ). Mit Beginn der koronararteriellen PMN-Zugabe (Zeitpunkt 0) wurde das koronarvenöse Effluat für insgesamt 3 Minuten in 6%iger Formaldehydlösung minütlich gesammelt ( $PMN_{output}$ ). Anschließend erfolgte die Messung der PMN-Anzahl pro Probe mittels Fluß-Zytometrie (siehe unten).

Die Versuchsprotokolle in den einzelnen Gruppen waren wie folgt:

### **PMN-Kontrolle 1**

Zur Bestimmung der Adhäsionsrate in der „leeren“ Versuchapparatur wurden Aorten- und Pulmonaliskanüle kurzgeschlossen und die PMN-Applikation wie beschrieben durchgeführt.

### **PMN-Kontrolle 2**

Nach Präparation (10-15 Minuten) und Äquilibration wurde ab Minute 30 mit der PMN-Applikation begonnen. Diese Gruppe stellte die Kontrolle zu den Gruppen PMN-UW, PMN-HTK und PMN-HTK-Albumin dar, um die basale Adhäsionsrate im Koronarbett bei albuminhaltigem Perfusat bestimmen zu können.

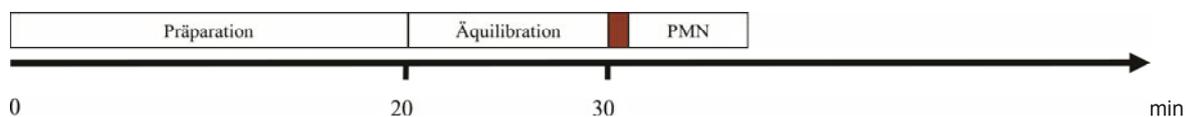


Abbildung 2.8

Zeitachse der Gruppe PMN-Kontrolle 2

### PMN-Kontrolle 3

Als entsprechende Kontrollgruppe zur Studiengruppe PMN-Heparinase wurde ab Minute 40 mit der PMN-Applikation begonnen.

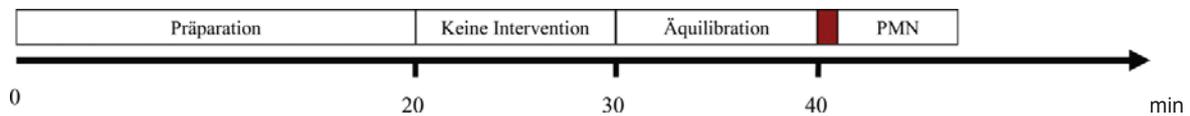


Abbildung 2.9

Zeitachse der Gruppe PMN-Kontrolle 3

### PMN-Heparinase

Nach entsprechender Präparation (10-15 Minuten) und Einschlagphase der Herzen (mindestens 5 Minuten) wurde ab Minute 20 für den Zeitraum von 10 Minuten Heparinase I (insgesamt 10 IU) dem Perfusat zugemischt. Dieses Vorgehen war analog zu früheren Versuchen in der Arbeitsgruppe [5].

Nach einer weiteren Äquilibrationsphase von 10 Minuten, um ein Auswaschen der enzymatisch abgespaltenen Glykokalyxbestandteile zu ermöglichen wurde mit der PMN-Applikation begonnen.

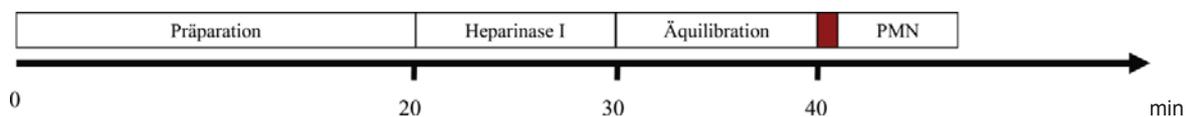


Abbildung 2.10

Zeitachse der Gruppe PMN-Heparinase

## PMN-UW, PMN-HTK und PMN-HTK-Albumin

Die Herzen dieser Versuchsgruppen wurden wie oben beschrieben präpariert und für 4 Stunden in der entsprechenden Kardioplegielösung bei 0°C gelagert. Danach wurden sie wie beschrieben präpariert und nach 10 minütiger Äquilibrationsphase mit der PMN-Applikation begonnen. Die Reperfusion (Zeiten 240 min bis Ende) erfolgte stets mit Albumin (4g %) -supplementiertem Krebs-Henseleit-Puffer.

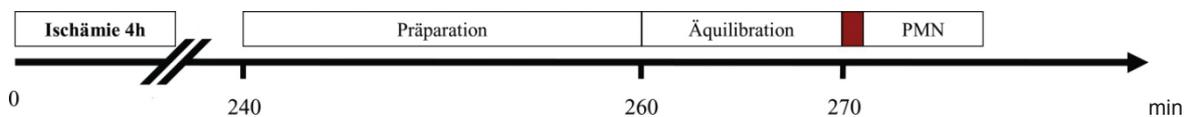


Abbildung 2.11

Zeitachse der Gruppen PMN-UW, PMN-HTK, PMN-HTK-Albumin

## 2.4 Perfusions- und Standard-Lösungen

Für die Versuche am isolierten Meerschweinchen-Herzen wurden sowohl klassischer Krebs-Henseleit-Puffer als auch von uns um eine physiologische Konzentration von Albumin (4 g%) (CSL Behring GmbH, Marburg, Deutschland) erweiterter Puffer verwendet. Krebs-Henseleit-Puffer ist ein kolloidfreies Perfusat, welches Elektrolytkomponenten in physiologischer Konzentration enthält (116 mmol/l NaCl, 23 mmol/l NaHCO<sub>3</sub>, 3,6 mmol/l KCl, 1,16 mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,25 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, 0,58 mmol/l MgSO<sub>4</sub>, 5,4 mmol/l Glucose, 0,3 mmol/l Pyruvat und 2,8 IU/l Insulin). Mit 94,5 % O<sub>2</sub> und 5,5 % CO<sub>2</sub> begast (Gasmischpumpe, Fa. Wösthoff, Bochum, Deutschland) und auf 37 °C angewärmt erreicht die Lösung einen pH von 7,40 ± 0,5 [4-6, 8, 38-

40]. Blutgasanalysen (Rapidpoint ®, Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, Deutschland) des mit Albumin (4g%) modifizierten Puffers ergaben die folgenden Werte:  $\text{Na}^+$   $138 \pm 2$  mmol/l,  $\text{K}^+$   $4,6 \pm 0,3$  mmol/l, freies  $\text{Ca}^{2+}$   $1,31 \pm 0,05$  mmol/l, pH  $7,37 \pm 0,02$ ,  $\text{PO}_2$   $389 \pm 21$  mmHg,  $\text{PCO}_2$   $41 \pm 3$  mmHg, Glucose  $99 \pm 11$  g/dl [40].

Für verschiedene Schritte bei den Experimenten wurde Tyrode-Lösung verwendet. Diese Lösung setzt sich zusammen aus: NaCl 8,00g/l, KCl 0,20 g/l,  $\text{CaCl}_2$  0,20 g/l,  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  0,10 g/l,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  0,05 g/l,  $\text{NaHCO}_3$  1,00 g/l, Glukose 1,00 g/l; pH 6,6.

Ebenfalls wurde phosphate buffered saline (PBS) verwendet. PBS ist zusammengesetzt aus 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl und 12 mM Gesamt-Phosphat (in Form von  $\text{PO}_4^{3-}$  und  $\text{HPO}_4^{2-}$ ); pH 7,4.

Als Präservationslösungen für die Versuche mit kalter Ischämie wurden HTK-Bretschneider-Lösung (Custodiol©, Köhler Chemie GmbH, Alsbach-Hähnlein, Deutschland) und University-of-Wisconsin-Lösung (Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Bensheim, Deutschland) verwendet. Bei einer dieser Versuchsgruppen wurde die Bretschneider-Lösung mit 1g% Humanalbumin (CSL Behring GmbH, Marburg, Deutschland) versetzt.

## 2.5 Zellzahlbestimmung mittels Durchflusszytometrie

Zur Zellzahlbestimmung wurde eine Durchflusszytometrie mittels eines Fluorescence activated cell sorters (FACS) durchgeführt. Die Zellen in der PMN-Suspension wurden in einem Flüssigkeitsstrom hintereinander einzeln durch einen Laserstrahl

(Argon-Laser mit Emissionsmaximum bei 488 nm) geführt, wobei Abschwächung und Streuung des Lichtes durch Zellgröße, -form, -oberfläche und intrazelluläre granuläre Bestandteile photometrisch detektiert werden. Streulicht im Längsverlauf des Lasers wird als Forward-Scatter (FSC) bezeichnet und lässt auf die Zellgröße rückschließen. Streulicht rechtwinklig zum Laserstrahlverlauf gibt als Sideward-Scatter (SSC) die intrazelluläre Granularität wieder. Weiter können Fluoreszenzintensitäten verschiedener Wellenlänge bestimmt werden:

- FL 1: Fluoreszenzintensität von Fluorescein-isothiocyanat (FITC) mit einem Emissionsmaximum um 520 nm,
- FL 2: Fluoreszenzintensität von Phycoerythrin (PE) mit einem Emissionsmaximum um 575 nm.

Zur Bestimmung des bei den FACS-Messungen verwendeten Volumens wurde zu der zu untersuchenden Zellsuspension ein definiertes Volumen Counting Beads (Caltag Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) zugegeben. Die Counting Beads Stammlösung enthält zwei unterschiedlich große Sorten von inerten, fluoreszierenden „Kügelchen“. Beads A sind 6,4 µm groß mit einem niedrigen FSC- und SSC-Signal. Beads B sind 6,36 µm groß und präsentieren sich mit einem ähnlich niedrigem FSC-Signal bei leicht erhöhtem SSC-Signal. Beide Beads zeigen Fluoreszenz (FL 2) bei Anregung mit einem Argon Laser, wobei Bead B ein stärkeres Signal liefert. Ein typisches Verteilungsmuster (SSC gegen FL 2-Intensität) zeigt Abb. 2.12.

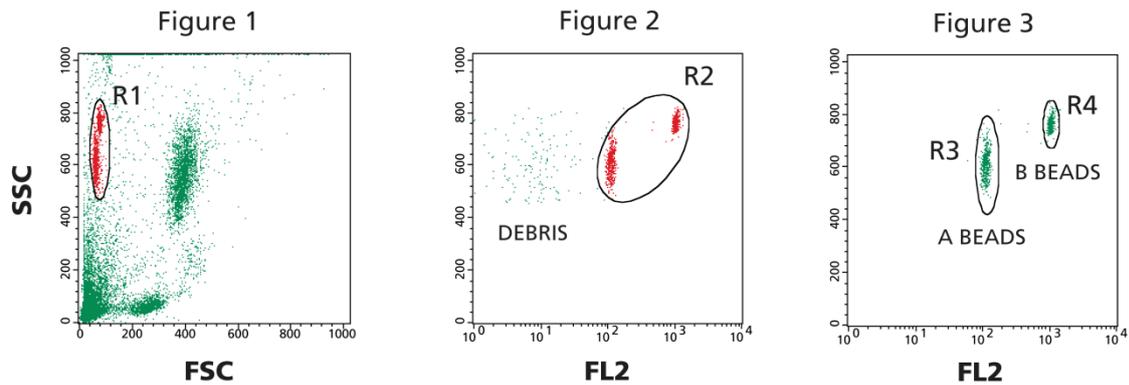


Abbildung 2.12

Darstellung der Counting Beads in der FACS-Messung.

R1 = Region 1 aller Counting Beads

R2 = Region 2 aller Counting Beads zum Ausschluss von Debris (Schmutz und Bruchstücke)

R3 und R4 = Region 3 und 4 der jeweiligen Counting Beads Typ A und B

[Bildrechte liegen bei Caltag-Medsystems Ltd, Buckingham, UK]

Durch die bekannten zugemischten Volumina und der daraus resultierenden Konzentration der Counting Beads konnte das Proben-Volumen berechnet werden in dem die zu bestimmenden Zellen (PMN) gezählt wurden.

Zur Zellzahlbestimmung der in den abgenommenen Proben enthaltenen PMN wurden jeweils 850 µl FACSsolution (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) in passenden Test-Röhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) vorgelegt. Jeweils 100 µl der Test-Suspensionen wurden hinzu pipettiert. Unmittelbar vor der Messung wurden 50 µl der Counting Bead - Lösung zugegeben, durchmischt, und im FACS (FACSscan, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) gemessen. Die Counting Beads werden herstellerseitig mit der Angabe der chargenabhängigen Konzentration versehen ( $C_{CB}$ ). So konnte die Konzentration an Counting Beads in der jeweiligen Probe errechnet werden ( $C_{CB\text{-Messung}}$ ) mit der Formel:

$$C_{CB\text{-Messung}} = (C_{CB} \times 50 \mu\text{l}) \times (1000 \mu\text{l})^{-1}$$

Eine Messung wurde jeweils gestoppt wenn 2000 Counting Bead – Ereignisse ( $CB_{\text{Gesamt}}$ ) erreicht waren. Dies entsprach in etwa einem Volumen des Gemisches von 40  $\mu\text{l}$ . Pro Probe wurden 3 konsekutive Messungen vorgenommen und der jeweilige Mittelwert aus diesen 3 Messungen zur weiteren Berechnung herangezogen.

Die Sammlung und Auswertung der Daten wurde mithilfe der Software CellQuest (BD, Franklin Lakes, NJ USA) durchgeführt.

Durch das mithilfe der Counting Beads ermittelte Probenvolumen ( $V_{\text{Probe}}$ ), das im FACS gemessen wurde, und die Anzahl der gezählten PMN ( $PMN_{\text{FACS}}$ ) im jeweiligen Fenster (siehe Abb. 2.13), ließ sich die PMN-Konzentration der jeweiligen Effluatprobe ( $C_{\text{PMN}}$ ) ermitteln. Multiplikation mit dem zuvor gemessenen Gesamtvolumen der jeweiligen Effluatprobe ( $V_{\text{Effluat}}$ ) ergab die Gesamtanzahl der darin befindlichen PMN ( $PMN_{\text{Gesamt}}$ ):

$$V_{\text{Probe}} = CB_{\text{Gesamt}} \times (C_{\text{CB-Messung}})^{-1}$$

$$C_{\text{PMN}} = PMN_{\text{FACS}} \times V_{\text{Probe}}^{-1}$$

$$PMN_{\text{Gesamt}} = C_{\text{PMN}} \times V_{\text{Effluat}} \quad (\triangleq PMN_{\text{input}} \text{ bzw. } PMN_{\text{output}})$$

Mit dem jeweiligen Eichbolus der PMN-Suspension ( $PMN_{\text{input}}$ , vgl. Abb.2.7) wurde entsprechend verfahren. Auf diese Weise konnte die Fraktion der adhärenen Granulozyten ( $PMN_{\text{AD}}$ ) nach folgender Formel berechnet werden:

$$PMN_{\text{AD}} = (PMN_{\text{input}} - PMN_{\text{output}}) \times PMN_{\text{input}}^{-1}$$

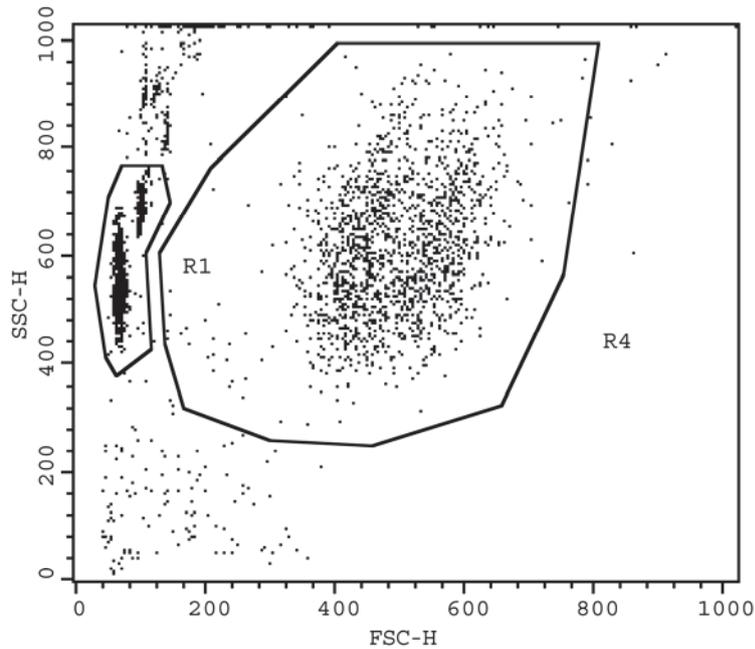


Abbildung 2.13

Darstellung der Counting Beads (R1) und der PMN (R4) in der FACS-Messung.

## 2.6 Elektronenmikroskopische Quantifizierung der endothelialen Glykokalyx

Eine Fixierung zur elektronenmikroskopischen Darstellung der endothelialen Glykokalyx wurde sowohl bei HUVEC-Zellkulturen und am isolierten Meerschweinchenherzen, als auch an der frischen humanen Nabelschnur durchgeführt. Hierbei wurde eine Lanthan-Salze enthaltende Lösung verwendet. Lanthan ist ein trivalentes Kation, das an die negativ geladenen Heparansulfat- und Chondroitinsulfat-Seitenketten der Glykokalyx bindet und diese stabilisiert [41]. Die Fixierlösung besteht aus 2% Glutaraldehyd, 2% Saccharose, 0,1 M Natriumcacodylat-Puffer und 2% Lanthannitrat (pH 7,4 mit NaOH eingestellt). Diese Lösung wurde bei den HUVEC-beschichteten ibidi-slides über einen Zeitraum von 4

Minuten mit einem konstanten Fluss von 1 ml/min appliziert und für weitere 2 Stunden ruhen gelassen. Am wie o.a. präparierten isolierten Meerschweinchenherzen wurde die Fixierlösung bei noch schlagendem Herzen über 1 Minute mit einem Fluss von 6 ml/min appliziert. Proben der linken Ventrikelwand mit einem Volumen von ca. 1 mm<sup>3</sup> wurden entnommen und für weitere 2 Stunden in der Fixierlösung gebadet.

Vor Durchführung der Anfärbungen bei Nabelschnüren wurde das Einverständnis von schwangeren Probandinnen, bei denen eine Entbindung durch Sectio caesarea geplant wurde eingeholt, direkt post partum ca. 10 cm der frischen Nabelschnur zu spenden. Dieser Teil der Nabelschnur wurde unmittelbar nach Entbindung vom placentaren Anteil abgetrennt (< 1 Minute post partum), die Nabelschnurvene kanüliert und sofort mit 20 ml der frisch präparierten Fixierlösung über den Zeitraum von 1 Minute gespült. Die Venen wurden freipräpariert und Proben mit einem Volumen von 1 mm<sup>3</sup> für weitere 2 Stunden in der Fixierlösung gebadet. Das Verbleiben in der Fixierlösung bei allen 3 Versuchsreihen fand bei Raumtemperatur statt.

Im Anschluss an die 2 Stunden Immersion wurden die jeweiligen Proben für 12 Stunden bei 4°C in einer Lösung bestehend aus 2% Wasserstoffperoxid, 2% Saccharose, 0,1 M Natriumcacodylat-Puffer und 2% Lanthannitrat gelagert und anschließend mit einer Lösung aus 0,03 M NaOH und 2% Saccharose gespült. Nach Kontrastverstärkung mittels einer Lösung aus 2% Osmiumtetroxid und 2% Lanthannitrat wurden die Proben in Araldit eingebettet und mit dem Mikrotom geschnitten. Die so behandelten Proben konnten im Elektronenmikroskop (Philips CM 10, Aachen, Deutschland) untersucht werden.

Auf diese Weise konnte bei 10 HUVEC-Präparaten, 6 nativen Nabelschnurpräparaten und jeweils mehreren Meerschweinchenherzen aus den verschiedenen Studien- und Kontrollgruppen der Zustand und Ausmaß der endothelialen Glykokalyx elektronenmikroskopisch untersucht werden. Hierbei wurden zufällig ausgewählte Gesichtsfelder ausgewertet.

## 2.7 Immunhistochemische Analyse der endothelialen Glykokalyx

Mithilfe der lichtmikroskopischen Immunhistochemie konnte die Verteilung von Albumin, als Bestandteil des *endothelial surface layer*, sowie von Syndecan-1 und Heparansulfat durch an sekundäre Antikörper gekoppelte Farbreaktion sichtbar gemacht werden. Hierzu wurden 4 HUVEC-Kulturen und 4 frische Nabelschnurvenenpräparate mit 4%iger Formaldehydlösung immersionsfixiert und Gewebeproben entnommen. Diese Proben wurden für 24 h in 1%iger Formaldehydlösung gebadet, in Paraffin gebettet und auf 5 µm geschnitten und anschließend mit Antikörpern gegen Syndecan-1 (Abcam, Cambridge, United Kingdom) oder Heparansulfat (Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan) behandelt. Sekundäre Antikörper mit gekoppelten Farbreaktionen erlaubten den Nachweis und das lichtmikroskopische Abfotografieren [7, 42].

## 2.8 Statistische Auswertung

Die Daten werden jeweils als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung in den Abbildungen dargestellt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte zuerst durch die Varianzanalyse (ANOVA). Zeigten sich signifikante Effekte wurden post hoc Tests unter Gebrauch der Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden als signifikant angesehen für  $p < 0,05$ . Die statistischen Auswertungen wurden mit SPSS 17 (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 PMN-Adhäsion beim HUVEC *in vitro* Modell

Nach Applikation von frisch isolierten PMN zu konfluenten Kulturen von HUVEC zeigte sich stets eine gewisse Adhäsion bei allen Versuchen. Zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit Heparinase-Applikation ergaben sich bei der PMN-Adhäsionsrate keine signifikanten Unterschiede.

So betrug die Adhäsionsrate  $20,87 \pm 3,37$  PMN pro ausgezähltem Gesichtsfeld in der Kontrollgruppe und  $20,6 \pm 3,33$  PMN pro ausgezähltem Gesichtsfeld nach Heparinaseapplikation.

#### 3.2 PMN-Adhäsion im *ex vivo* Modell

Nur ein geringer Anteil von injizierten PMN verblieb im Schlauchsystem der Versuchsanordnung ( $9,2\% \pm 1,3\%$ , PMN-Kontrolle 1). Im intakten Koronarsystem des Meerschweinchenherzens war die Adhäsion stets um das 2- bis 4-fache höher (Abb. 3.1).

Interessanterweise führte die Applikation von Heparinase (PMN-Heparinase) und das bekanntlich damit verbundene Shedding der Glykokalyx zu einer erhöhten PMN-Adhäsionsrate von  $37,32\% \pm 1,95\%$  gegenüber der basalen Adhäsionsrate (PMN-Kontrolle 3) von  $22,25\% \pm 1,57\%$  bei unbehandelten Herzen. Die Ischämiedauer von 4 Stunden führte bei Verwendung von UW-Lösung als Kardioplegikum (PMN-UW) zu einer Adhäsionsrate von  $35,27\% \pm 2,34\%$  und bei Verwendung von HTK-Lösung

(PMN-HTK) zu einem Wert von  $36,38\% \pm 6,55\%$  adhärenter Leukozyten. Der Einsatz der mit Albumin modifizierten HTK-Lösung (PMN-HTK-Albumin) senkte die Adhäsion signifikant auf  $23,49\% \pm 2,36\%$ , ein Wert der im Bereich der Basaladhäsion bei albuminhaltigem Perfusat (PMN-Kontrolle 2) mit  $21,60\% \pm 2,10\%$  lag.

Die Adhäsionsraten in Herzen der Gruppen PMN-HTK und PMN-UW lagen im Bereich der Adhäsionsrate der Gruppe PMN-Heparinase (Abb. 3.1).

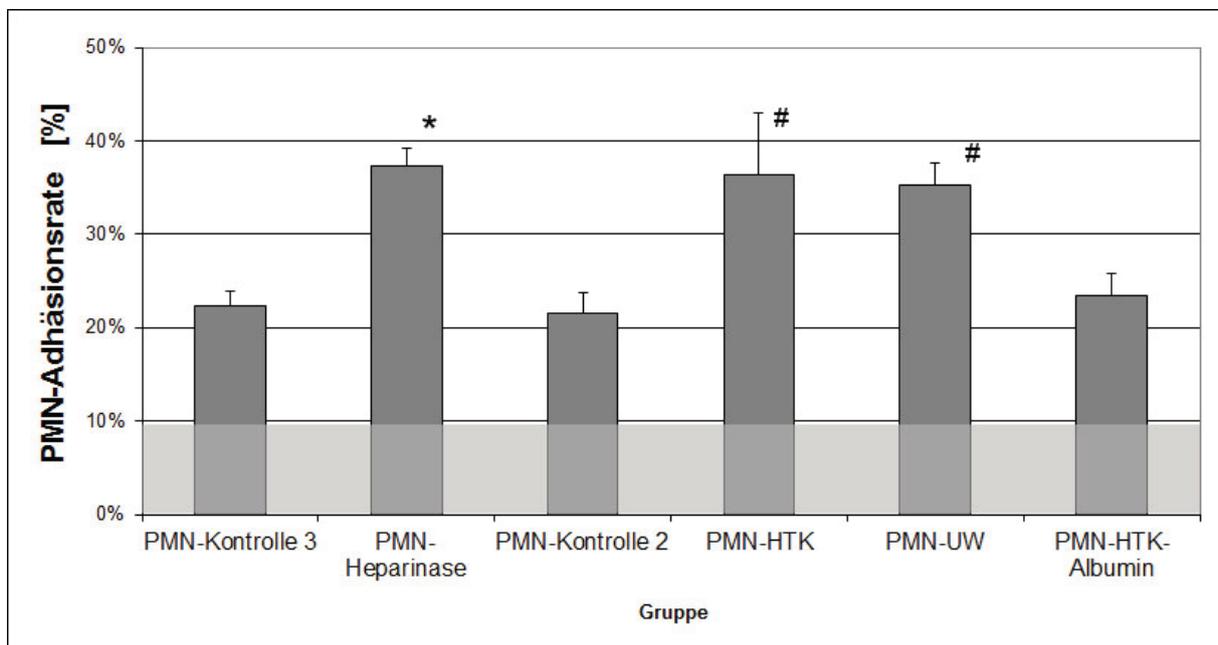


Abbildung 3.1

PMN-Adhäsionsraten im Koronarbett des isoliert perfundierten Meerschweinchenherzens bei albuminfreiem Perfusat ohne (PMN-Kontrolle 3) und mit (PMN-Heparinase) Applikation von Heparinase, nach 4 h kalter Ischämie in HTK-Lösung (PMN-HTK), UW-Lösung (PMN-UW) oder in Albumin modifizierter HTK-Lösung (PMN-HTK-Albumin), sowie ohne Ischämie (PMN-Kontrolle 2) bei albuminhaltigem Perfusat. Die grau-melierte Zone zeigt die Anlagen-inhärente Basaladhäsionsrate an.

\*  $p < 0,05$  zwischen PMN-Heparinase und PMN-Kontrolle 3

#  $p < 0,05$  zwischen PMN-HTK und PMN-Kontrolle 2 und zwischen PMN-UW und PMN-Kontrolle 2

### 3.3 Elektronenmikroskopische Darstellung der endothelialen Glykokalyx

Die Darstellung der endothelialen Glykokalyx erfolgte *ex vivo* an frischen Nabelschnurvenen, *in vitro* an HUVEC-Zellpräparaten und *in situ* am isoliert perfundierten Meerschweinchenherzen. Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede in der Ausprägung der endothelialen Glykokalyx, sowohl in Bezug auf Größe und Dichte.

Die endotheliale Glykokalyx der Nabelschnurvenen erschien sehr homogen verteilt auf eine Dicke von  $878 \pm 612$  nm im Mittel der 6 untersuchten Präparate. Die einzelne Ausprägung reichte von  $355 \pm 133$ nm über  $623 \pm 254$ nm,  $792 \pm 177$ nm,  $910 \pm 530$ nm und  $1079 \pm 437$ nm auf  $1210 \pm 616$ nm gemessen an jeweils 5-6 Messpunkten pro Einzelbild. Abb.3.2 zeigt exemplarische Einzelbilder unterschiedlicher Präparate.

Bei Präparaten die nur immersionsfixiert und nicht perfusionsfixiert wurden, konnte elektronenmikroskopisch keine endotheliale Glykokalyx erkannt werden (Abb. 3.2 D).

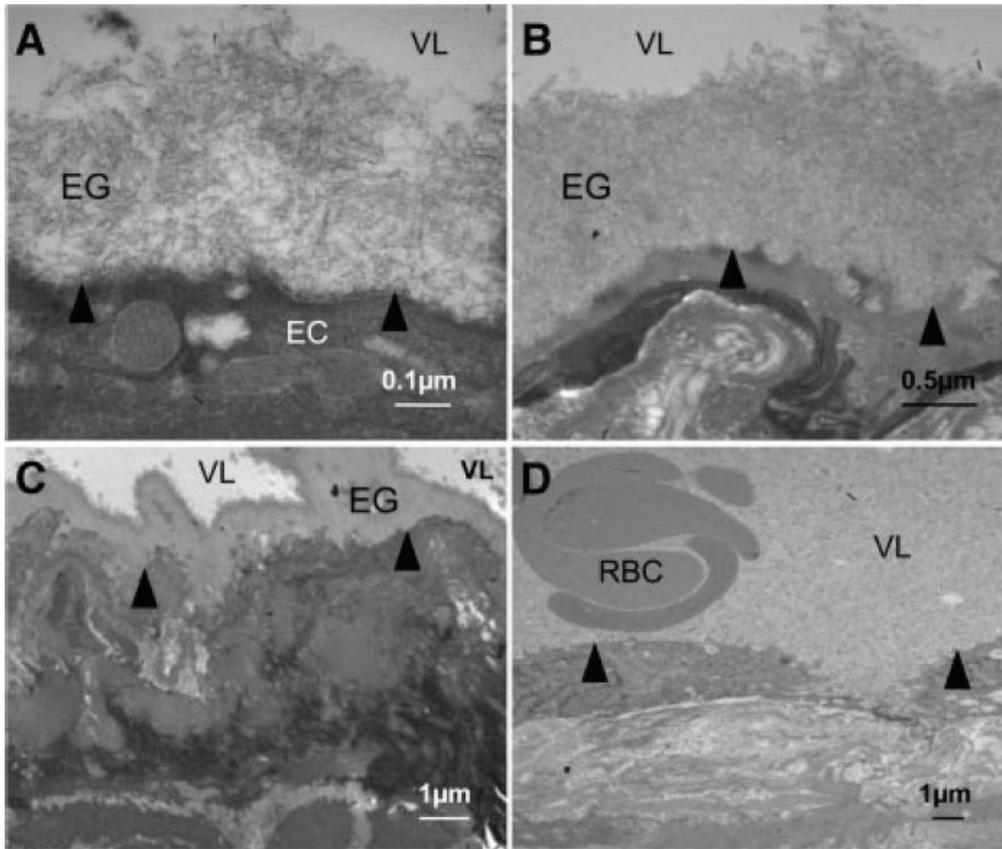


Abbildung 3.2

(A) – (C): Elektronenmikroskopische Darstellung der endothelialen Glykokalyx auf Nabelschnurvenenendothelzellen *in situ* nach Perfusionsfixierung mit Lanthan/Glutaraldehyd-Lösung.

(D) Elektronenmikroskopische Darstellung der Nabelschnurvene nach Immersionsfixierung. Heparansulfat erscheint im gesamten Lumen homogen verteilt.

VL: vaskuläres Lumen; EG: endotheliale Glykokalyx; RBC: Erythrozyt; Die Pfeile markieren das endotheliale Plasmalemm.

Bild entnommen aus [7]

Die elektronenmikroskopisch darstellbare Glykokalyxstruktur der HUVEC zeigte sich nur rudimentär ausgebildet, Die Ausdehnung betrug hierbei durchschnittlich  $29,4 \pm 5,8$  nm in der dichteren Zone und  $117,9 \pm 39,1$  nm bei den Ausläufern einzelner Filamente (Abb. 3.3). Bei den nicht-konfluenten, 6 Tage inkubierten Kulturen zeigte sich eine Ausdehnung der dichten Zone von  $26,8 \pm 5,5$ nm und von  $119 \pm 33$ nm bei den äußeren Filamenten. Ohne signifikanten Unterschied wiesen die konfluenten, 12 Tage gewachsenen, Kulturen eine Ausdehnung der dichten Zone von  $32,0 \pm 4,9$ nm und  $126 \pm 42$ nm bei den äußeren Filamenten auf.

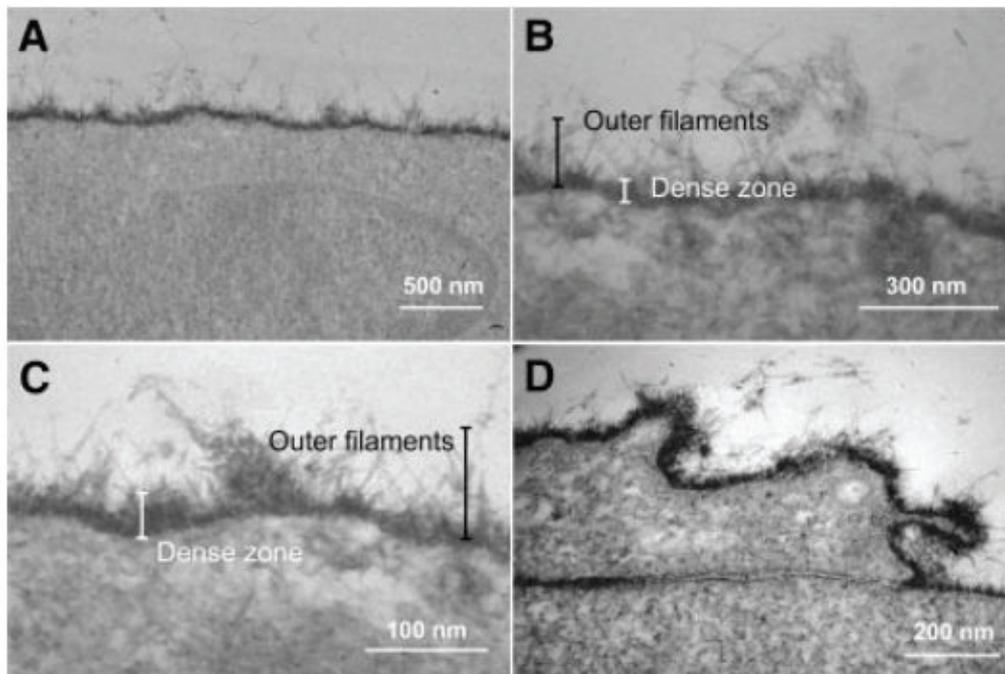


Abbildung 3.3

Elektronenmikroskopische Darstellung der endothelialen Glykokalyx auf HUVEC-Kulturen nach Fixierung unter Perfusion mit Lanthan-/Glutaraldehyd-Lösung. (A) Überblick; (B) und (C) Nahaufnahmen; (D) übereinanderliegende Zellen bei konfluenten Kulturen

Bild entnommen aus [7]

Beim isoliert perfundierten Meerschweinchenherzen zeigte sich elektronenmikroskopisch bei Herzen die weder Heparinase-Applikation noch Ischämie erfahren hatten eine weitgehend vollständig erhaltene endotheliale Glykokalyx. Ebenso war dies bei den Herzen zu beobachten, die mit modifizierter albuminhaltiger HTK-Lösung behandelt worden waren (PMN-HTK-Albumin). Die mittlere Dicke betrug ca. 200 nm (Abb. 3.4).

Sowohl die Herzen der Gruppen die mit konventioneller Kardioplegielösung behandelt wurden (PMN-HTK und PMN-UW), als auch die Herzen die mit Heparinase behandelt wurden zeigten eine nur residuell vorhandene endotheliale Glykokalyx von geringer Höhe (Abb. 3.4 und 3.5).

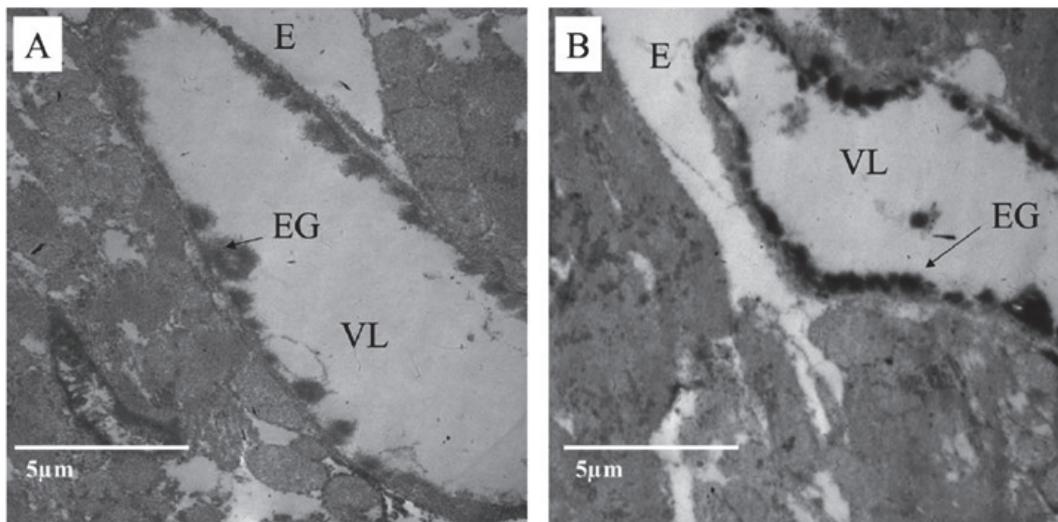


Abbildung 3.4

Elektronenmikroskopische Darstellung der endothelialen Glykokalyx von Herzen nach 4 Stunden kalter Ischämie (Perfusionsfixierung mit Lanthan-/Glutaraldehyd-Lösung). (A) Präservierung mit reiner HTK-Lösung (PMN-HTK). (B) Präservierung mit durch 1g/dl Humanalbumin modifizierter HTK-Lösung (PMN-HTK-Albumin). VL: vaskuläres Lumen; E: Ödembildung; EG: endotheliale Glykokalyx

Bild entnommen aus [43]

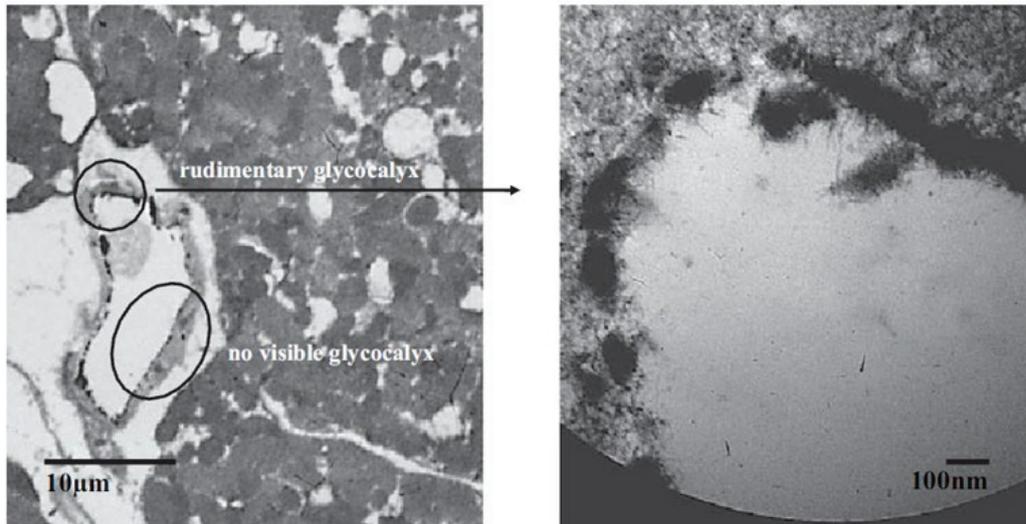


Abbildung 3.5

Elektronenmikroskopische Darstellung der endothelialen Glykokalyx von Herzen nach enzymatischem Shedding durch 10 IU Heparinase über den Zeitraum von 10 min.

Bild entnommen aus [14]

### 3.4. Immunhistochemische Darstellung der endothelialen Glykokalyx

Die immunhistochemische Färbung von Syndecan-1 und Heparansulfat wurde sowohl an frischen Nabelschnurvenen, als auch an HUVEC-Zellkulturen durchgeführt. Im Gegensatz zu den elektronenmikroskopischen Untersuchungen kam es hier zu einer Immersionsfixierung der Gewebe in Formalin-Lösung.

Es zeigte sich, dass Syndecan-1 und Heparansulfat sowohl auf HUVEC-Oberflächen, als auch Nabelschnurendothelzellen präsent waren (Abb. 3.6 und 3.7). In beiden Modellen fand sich aber jeweils nur eine dünne Schicht ohne nennenswerte Ausprägung in Richtung Lumen. Bei den HUVEC-Kulturen konnten stellenweise Unterschiede in der Färbungsintensität der Syndecan-1 Anfärbung zwischen einzelnen Zellen derselben Kultur gesehen werden.

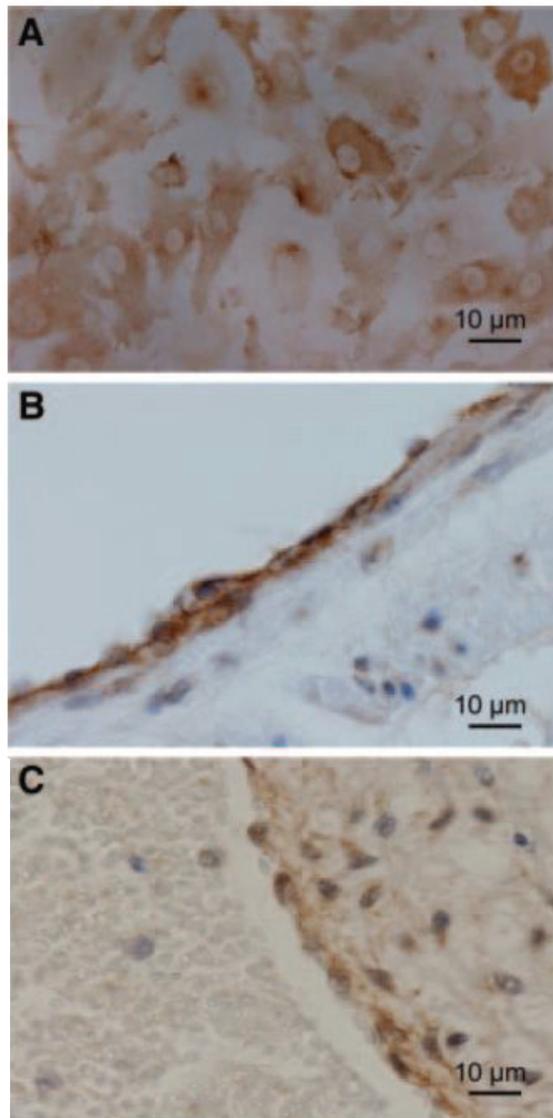


Abbildung 3.6.

Immunhistochemische Darstellung von Syndecan-1 auf der Oberfläche von HUVEC (A), Nabelschnurvenenendothelzellen (B) und Nabelschnurarterienendothelzellen (C). Braune Färbung durch DAB-Reaktion

Bild entnommen aus [7]

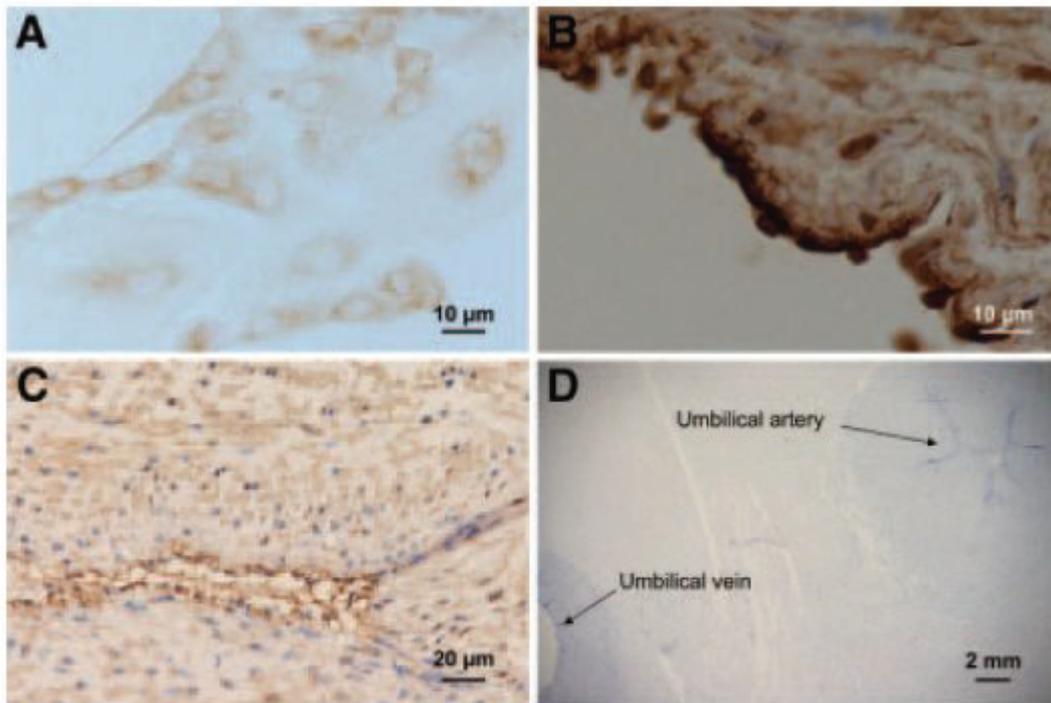


Abbildung 3.7

Immunhistochemische Darstellung von Heparansulfat auf der Oberfläche von HUVEC (A), Nabelschnurvenenendothelzellen (B) und Nabelschnurarterienendothelzellen (C). D zeigt eine Negativfärbung eines Nabelschnursegmentes ohne spezifischen Antikörper gegen Heparansulfat

Bild entnommen aus [7]

## 4. Diskussion

### 4.1. Visuelle Unterschiede in der Ausprägung der endothelialen Glykokalyx beim *in vitro* und *ex vivo* Modell

Über die Ausprägung der endothelialen Glykokalyx *in vivo* herrscht in der Literatur weiter Uneinigkeit [44]. So gibt es eine Reihe von verschiedenen Techniken der Darstellung der Glykokalyx wie indirekte Messungen von Zonen die von Blutzellen ausgespart, jedoch von fluoreszierenden molekularen Markern angefärbt werden, oder Berechnungen basierend auf Fluss-Widerstandsmessungen und visuell bestimmter Gefäßdurchmesser, oder verschiedenste Fixationstechniken von *ex vivo* Präparaten [4-6, 39, 41, 45-51]. Die von uns gemessene Ausprägung der endothelialen Glykokalyx von frischen Nabelschnurvenenzellen ( $0,3 - 1 \mu\text{m}$ ) stehen im Einklang mit Messungen einer Gruppe um H. Vink, die mittels Intravitalmikroskopie die Dicke der Glykokalyx in der humanen sublingualen Gefäßstruktur mit  $0,58 \pm 0,16 \mu\text{m}$  angeben [52].

Die Ausprägung der Glykokalyx bei Endothelzellkulturen zeigt sich noch kontroverser diskutiert. So werden Ausmaße von 40 nm bis hin zu 2000 nm beschrieben [45, 47, 48]. Die Isolierung und Präparation von HUVEC-Kulturen [53] scheint die fragile Struktur der Glykokalyx zu zerstören. Ob überhaupt und wenn ja, nach welchem Zeitraum die Glykokalyx sich *in vitro* selbst regeneriert und welche Voraussetzungen und Reize dafür notwendig sind ist nicht bekannt. Allerdings zeigten die 12 Tage gewachsenen Kulturen keinen signifikanten Unterschied in der Ausprägung der endothelialen Glykokalyx im Vergleich zu 6 Tage lang inkubierten Kulturen. Die immunhistochemischen Färbungen belegten, dass Heparansulfate als wichtiger Bestandteil der endothelialen Glykokalyx auf den HUVEC vorhanden sind, zumindest

nicht in minderer Ausprägung als auf frischen Nabelschnurvenenpräparaten. Die trotz Fixierung mit  $\text{La}^{3+}$ -Salzen elektronenmikroskopisch nur als sehr dünne Schicht nachweisbare Glykokalyx kann also nicht auf ein mangelndes Binden der Lanthanionen an das negativ geladene Heparansulfat zurückgeführt werden, sondern auf die mangelnde räumliche Ausprägung der Glykokalyx.

Neben der mangelnden Reorganisation der Glykokalyxbestandteile im *in vitro* Zustand, kann auch proteolytisches Shedding im unphysiologischen, promitotischen Milieu der Inkubation für die gering ausgeprägte Glykokalyx verantwortlich gemacht werden [54]. Die gesehenen Unterschiede im Anfärbungsgrad von Syndecan-1 bei einzelnen Zellen derselben Kultur, lassen vermuten, dass ebenso Unterschiede bei der Bildung von Glykokalyxbestandteilen zwischen einzelnen Zellen bestehen könnten.

Unsere Ergebnisse stehen in Einklang mit denjenigen einer Gruppe um Potter und Damiano, die mittels fluoreszierender Mikropartikel und Flussmessung die Ausprägung der endothelialen Glykokalyx bei HUVEC-Kulturen auf  $0,03 \pm 0,04 \mu\text{m}$  beziffert [47]. In einer anderen Arbeit wird die Glykokalyx bei HUVEC mit einer Dicke von bis zu  $2,5 \mu\text{m}$  angegeben [45]. Jedoch wurde in dieser Studie fluoreszierendes Lectin, welches an die Sialylsäure-Gruppen von Hyaluronsäure und Heparansulfat bindet, über einen verlängerten Zeitraum in Kultur bei ruhendem Medium einwirken gelassen. Es kann vermutet werden, dass einzelne fibrilläre Strukturen, die bei unserem perfusionsfixierten Setting bis zu  $200 \text{ nm}$  herausragen, in ruhender Kultur noch weiter hinausragen und Lectin binden können. Eine weitere Gruppe, die fluoreszierendes Lectin verwendete, zeigte an isolierten Arterien-Präparaten der Maus eine extrem ausgeprägte Glykokalyx mit bis zu  $4,5 \mu\text{m}$  hinaus reichenden Strukturen [46]. Auch hier kann man vermuten, dass lange Stränge von Hyaluronsäure weit über die dichte Zone der Glykokalyx hinausreichen können und

mittels Lectin anfärbbar sind. Neben der Stabilisierung mit Lanthannitrat lässt sich die Glykokalyx mit Alcianblau für die elektronenmikroskopische Beurteilung anfärben [49]. So sind auch hier Ausmaße der Glykokalyx von bis zu 500 nm dargestellt worden, die in ähnlicher Größenordnung sich bewegen wie bei in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Untersuchungen [4-6].

HUVEC-Kulturen stellen ein vielgenutztes Modell dar, welches weltweit für Forschung an endothelialer Zellphysiologie und -pathologie verwendet wird, wie Adhäsionsstudien von Leukozyten und Thrombozyten oder Permeabilitätsuntersuchungen [55-63]. In Anbetracht der hier gefundenen und von anderen bestätigten nur rudimentär ausgebildeten Glykokalyx muss man sich fragen, ob HUVEC-Kulturen als ein direkt nach *in vivo* übertragbares Modell der innersten Gefäßwand dienen können. Zumindest als physiologisches Modell scheidet die HUVEC-Kultur aus. So konnte bereits gezeigt werden, dass Heparansulfate eine wichtige Rolle bei dem Mechanismus der Mechanotransduktion *in situ* spielen und ein Shedding durch Heparinase dies stört [57]. Der immunhistochemische Nachweis der Glykokalyxbestandteile Heparansulfat und Syndecan-1 auch auf HUVEC in Kultur lässt vermuten, dass der Effekt der Mechanotransduktion auf der Struktur der Glykokalyx beruhen könnte, und nicht allein vom Vorhandensein von Heparansulfaten abhängt [42].

Die große Ausprägung der endothelialen Glykokalyx bzw. des *endothelial surface layer in situ* und *in vivo* lassen den Schluss zu, dass diese Struktur von erheblicher Bedeutung für verschiedene zirkulatorische und vaskuläre Pathologien ist. Eine Schädigung der endothelialen Glykokalyx kann ein Mitverursacher von Mikro- und Makroangiopathie bei z.B. Diabetes mellitus und Atherosklerose sein oder eine Rolle

spielen bei Sepsis, disseminierter intravasaler Gerinnung und Ischämie-Reperfusionsschäden [44]. Für solche pathologischen Situationen, bei denen die endotheliale Glykokalyx bereits Schaden genommen hat und es zu direkten Zell-Endothel-Interaktionen kommen kann, können HUVEC-Kulturen ein valides Forschungsmodell darstellen. Wie von Potter und Damiano [47] dargelegt, kann man sich der These anschließen, dass diese Unterschiede zwischen *in vitro* Zellkulturen und *in vivo* nicht nur auf Nabelschnurvenenzellen beschränkt sind, sondern das Endothel aller Organsysteme betreffen. Daher werden eine Reihe von weiteren Studien notwendig sein, um auszuloten inwieweit *in vitro* Modelle geeignet sind, um (patho)physiologische Situationen korrekt abzubilden.

Eine solche (artifiziiell erzeugte) pathophysiologische Situation wurde im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit anhand der Applikation von Heparinase sowohl im *in vitro* (HUVEC) als auch im *ex vivo* Modell des isoliert perfundierten Meerschweinchenherzens untersucht. Anhand von PMN-Adhäsion sollte die Funktionalität der Glykokalyx zwischen *in vitro* und *in situ* Modell verglichen werden.

#### 4.2. Enzymatisches Shedding der endothelialen Glykokalyx im *in vitro* und im *ex vivo* Modell

Das Adhäsionsverhalten von polymorphonukleären neutrophilen Granulozyten kann als ein Maß für die Integrität der endothelialen Glykokalyx gesehen werden.

Ein Adhären von Leukozyten im Zuge einer entzündlichen Reaktion bedarf einer gut definierten Abfolge von Ereignissen. So zeigen Leukozyten zuerst eine Marginalisation aus dem axialen Blutstrom an den Rand des Gefäßes, ein v.a. Selectin-vermitteltes Einfangen und Rollen von Granulozyten am Endothel, Aktivierung und schließlich festes u.a. ICAM-vermitteltes Anhaften mit darauffolgender Transmigration [64]. Ein Interagieren zwischen P-Selectin, dem vorherrschenden Selectin, und dem P-Selectin-Glykoprotein-Liganden-1 (PSGL-1) auf den Mikrovilli der Granulozyten stellt die erste lose Verbindung dar, die ein weiteres Rollen, festes Adhären und schließlich Transmigrieren der Granulozyten ermöglicht [65-67]. Ein festes Anhaften der Granulozyten wird vorwiegend durch Interagieren von endothelseitigen Immunoglobulin-ähnlichen intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) und dem CD-18 Komplex auf Seiten der Granulozyten vermittelt [32]. Das P-Selectin-Molekül wurde in seinem Ausmaß als mit 38 nm über die endotheliale Oberfläche herausragend beschrieben [68]. Die ICAM-1 Moleküle weisen mit einem Ausmaß von nur 18,7 nm eine ähnlich kleine Reichweite aus [69]. Mit einer Ausprägung von 200 bis über 400 nm stellt die endotheliale Glykokalyx also ein sterisches Hindernis dar, welches diese Adhäsionsmoleküle überragt und einen Kontakt zwischen Endothel und zirkulierenden Blutzellen einschränkt [21, 44]. Ein Shedding der Glykokalyx sollte zwingenderweise zur Freilegung dieser Adhäsionsmoleküle und einer daraus folgenden höheren Adhäsionsrate von PMN

führen. Dies wäre ein Hinweis für die erhaltene Funktionalität der endothelialen Glykokalyx.

Die Versuche an HUVEC-Kulturen mit Heparinaseapplikation zeigten jedoch eindrücklich, dass es zu keiner erhöhten Adhäsionsrate der PMN nach Shedding der Glykokalyx kam. Dies erscheint einleuchtend, da die Ausprägung der endothelialen Glykokalyx, wie elektronenmikroskopisch gezeigt, nur rudimentär war, ein Shedding nicht in dem Ausmaße stattfinden konnte wie man es *in vivo* erwarten würde. Das Adhäsionsverhalten konnte also nicht durch die zusätzliche Freilegung von Adhäsionsmolekülen des Endothels gesteigert werden.

Im *in situ* Modell des isoliert perfundierten Meerschweinchenherzens hingegen zeigte sich nach Applikation von Heparinase und ein damit verbundenes enzymatisches Shedding der Glykokalyx, eine signifikant erhöhte Adhäsionsrate von PMN.

Heparinase wirkt spezifisch auf die Heparansulfate der endothelialen Glykokalyx und spaltet diese ab. Damit verliert die Glykokalyx negative Ladungsträger. Die verminderte elektrostatische Abstoßung scheint zum Zusammenbrechen der Glykokalyx-Struktur zu führen und hinterlässt nur eine dünne Restschicht auf den Endothelzellen, die im Bereich von 20 nm liegt [8]. So konnte in mehreren Arbeiten der Arbeitsgruppe Becker et al. die Reste der endothelialen Glykokalyx nach Shedding mittels Heparinase sowohl funktionell, als auch elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden [5, 40].

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche konnten mit zeigen, dass HUVEC-Kulturen für ein Szenario, welches von einer intakten Glykokalyx ausgehen soll, nicht verwendbar sind. Das *ex vivo* und *in situ* Modell des isoliert perfundierten Meerschweinchenherzens jedoch stellt ein valides Modell dar, um Studien durchzuführen die einen Einfluss auf eine zuvor intakte Glykokalyx haben. In diesem

Zusammenhang wurden die Versuche durchgeführt, die das PMN-Adhäsionsverhalten bei der Verwendung von verschiedenen kardioplegischen Lösungen, wie sie bei Herztransplantationen am Menschen zur Anwendung kommen, untersucht haben.

#### 4.3. PMN-Adhäsionsverhalten nach 4 Stunden kalter Ischämie

Im Zuge von Herztransplantationen wird das Spenderherz durch Infusion von kardioplegischer Lösung und Kühlung stillgelegt, um durch eine weitestgehende Reduktion des Kardiomyozytenstoffwechsels den durch die Ischämie hervorgerufenen Schaden am Herzmuskelgewebe möglichst gering zu halten. Der Schonung des kardialen Gefäßsystems hingegen wird nur wenig Aufmerksamkeit geschenkt, auch wenn das längerfristige Ergebnis einer Herztransplantation oftmals von eben jenem Gefäßsystem abhängt [70, 71]. Es ist zu befürchten, dass eine endotheliale Dysfunktion durch einen Schaden an der endothelialen Glykokalyx während der Lagerung in kardioplegischer Lösung hervorgerufen wird. Diese Dysfunktion kann als Vorläufer der sogenannten „cardiac allograft vasculopathy“ (CAV) gelten [72], die das Langzeitüberleben nach Herztransplantation entscheidend beeinflusst [73].

Ein frühes Verhindern der vaskulären Entzündungsreaktion könnte daher einen wichtigen Schritt darstellen, das „Outcome“ von Herztransplantationen weiter zu verbessern.

Wie bereits dargestellt kann es im Zuge der Reperfusion von vorher ischämischem Gewebe zu ausgedehnten Ischämie-Reperfusionsschäden kommen [23-26]. Die Interaktion von neutrophilen Granulozyten mit Endothelzellen und, nach Migration, mit Myozyten stellt einen wichtigen Schritt bei der Pathogenese des Ischämie-Reperfusionsschadens dar [74-77]. So können neutrophile Granulozyten auf vielfache Weise dem Gewebe Schaden zufügen. Dazu tragen insbesondere bei Sauerstoffradikalbildung, Freisetzung von Elastasen und Kollagenasen, Embolisation von Gefäßen mit nachfolgender ausgedehnter sekundärer Ischämie und

Heraufregulation weiterer Adhäsionsmoleküle mit folglich erhöhter Adhäsion von Thrombo- und Leukozyten [32].

Daher erschien die Messung der PMN-Adhäsionsrate ein probates Mittel zu sein, das Maß der Schädigung der endothelialen Glykokalyx und damit das Risiko für Schädigung des Transplantats bei klinisch verwendeten Kardioplegielösungen zu beurteilen. Mittels Modifikation der Lösungen sollte zudem versucht werden, gezielt die Glykokalyx zu schützen und dies funktionell zu prüfen. Hierzu wurde Humanalbumin in der Konzentration von 1g% einer HTK-Lösung zugemischt, um die Integrität des *endothelial surface layer* zu bewahren. Bereits in früheren Studien konnte die starke Interaktion von Albumin mit der Glykokalyx belegt werden [42]. Zudem fehlt der HTK-Lösung nach Bretschneider ein kolloidaler Zusatz.

Die endotheliale Glykokalyx *in vivo* formt gemeinsam mit Plasmaproteinen den *endothelial surface layer* [12, 78]. Diese Schicht hat in verschiedenen Studien ihre Bedeutung gezeigt als Teil der vaskulären Barriere, als Schutz der Endotheloberfläche vor entzündungsvermitteltem Adhären von Leukozyten und Thrombozyten und als Faktor bei der schubspannungsassoziierten Regulierung des lokalen Blutflusses [5, 12, 14]. Ein Zusammenkommen von Ischämie und Analbuminämie, wie es bei explantierten Herzen auf dem Transport auftritt, dürfte gemeinsam mit der darauffolgenden Reperfusion die Integrität des *endothelial surface layers* gefährden.

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit konnte gezeigt werden, dass eine 4-stündige Ischämie trotz Kardioplegie in etwa die gleiche 3-fache Steigerung der Adhäsionsrate der polymorphkernigen Neutrophilen Granulozyten bewirkt wie ein enzymatisches Shedding der Glykokalyx. Ein elektronenmikroskopisch wahrnehmbarer Erhalt der Glykokalyx konnte durch das Zumischen von Albumin erreicht werden. Die

postischämischen Adhäsionswerte der PMN in den auf diese Weise geschützten Herzen sanken auf das zuvor gemessene basale Niveau. Ein Minimieren der lokalen Entzündung in Form von PMN-Adhäsion sollte daher das Entstehen von sogenannter „graft-vasculopathy“ vermindern [70].

#### 4.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Isolation und Präparation von Endothelzellen aus Nabelschnurvenen zur Herstellung von Kulturen zerstört die endotheliale Glykokalyx. Weiterhin ist unbekannt, wie lange die endotheliale Glykokalyx braucht sich vollständig zu regenerieren bzw. aufzubauen. Wir konnten sowohl mikroskopisch, wie auch funktionell nur eine verschwindend gering ausgebildete Glykokalyx auf HUVEC-Kulturen verschiedener Inkubationsdauer nachweisen. Es ist anzunehmen, dass dies auch auf andere Zellkulturen zutrifft. Untersuchungen die eine experimentelle Umgebung mit einer intakten und funktionierenden endothelialen Glykokalyx bedürfen, scheinen folglich wenig sinnvoll an Zellkulturen.

Die daher in dieser Arbeit durchgeführten Studien am isoliert perfundierten Meerschweinchenherzen konnten deutlich zeigen, dass ein Schutz der endothelialen Glykokalyx durch Albumin zu einer Verringerung des inflammatorischen Anteils des Ischämie-Reperfusionsschadens führt. So ist es möglich, dass die verbesserte Abschirmung des Endothels gegenüber inflammationsinduzierenden Leukozyten die Prognose eines Organtransplantats merklich verbessert. Der Schutz der Glykokalyx erscheint daher ebenso relevant wie der Schutz der Kardiomyozyten vor Ischämie mittels kalter kardioplegischer Lösung.

Eine Verwendung von albuminhaltigen Präservationslösungen stellt folglich eine Möglichkeit dar, das Outcome von Organtransplantationen zu verbessern und ihr sollte daher entsprechende Beachtung geschenkt werden.

## 5. Zusammenfassung

Die endotheliale Glykokalyx, bestehend aus Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen und Glykoproteinen zeigt sich als eindruckliche Struktur mit wichtiger physiologischer Bedeutung. Als gefäß-innerste Schicht des Endothels ist sie an zahlreichen physiologischen Funktionen beteiligt. Eine Untersuchung des funktionell intakten Endothels hängt also von dem Vorhandensein einer intakten und funktionellen endothelialen Glykokalyx ab.

Die vorliegende Arbeit sollte klären inwieweit sich Kulturen von humanen Umbilikal-Venen-Endothelzellen (HUVEC) als Modell zur Untersuchung von Interaktionen des Endothels mit Zellen des Blutes eignen. Als Maß für die Integrität der Glykokalyx kann das Adhäsionsverhalten von neutrophilen Granulozyten gesehen werden. Hierbei wurde neben Untersuchungen an HUVEC-Kulturen die Interaktion von Leukozyten und Endothel *ex vivo* im isoliert perfundierten Herzen des Meerschweinchens studiert. In diesem *in situ* Modell wurden Herzen mit Heparinase zum enzymatischen Shedding der Glykokalyx behandelt und die Adhäsionsrate von eingebrachten humanen neutrophilen Granulozyten bestimmt. Ähnliches geschah auch mit HUVEC-Kulturen. Da Schädigung der Glykokalyx im Rahmen eines Ischämie-Reperfusionsschadens eine große Rolle spielen dürfte, wurde am Modell des isoliert perfundierten Meerschweinchenherzens die Adhäsionsrate nach 4-stündiger kalter Ischämie in Kardioplegie-Lösung und folgender Reperfusion bestimmt. Insbesondere wurde untersucht, ob die endotheliale Oberfläche durch die Zugabe von Humanalbumin geschützt werden kann und dies zu einer verminderten Adhäsionsrate von Leukozyten führt.

Neben den funktionellen Untersuchungen wurde die Ausprägung der endothelialen Glykokalyx in der humanen Nabelschnurvene, an HUVEC und im Herzen durch elektronenmikroskopische und immunhistochemische Darstellung beurteilt. Zur Fixierung der Glykokalyx für die Elektronenmikroskopie wurde ein Gemisch aus Lanthan(III)-Salzen und Glutaraldehyd rasch an die Endothelzellen per perfusionem herangeführt.

So konnte funktionell und mikroskopisch gezeigt werden, dass die Glykokalyx in der Umbilikalvene ca. 1000 nm Dicke besitzt, während sie an Zellkulturen nur rudimentär ausgebildet ist. Dazu passte, dass die Adhäsion von PMN durch eine Vorbehandlung der HUVEC-Kulturen mit Heparinase nicht gesteigert werden konnte. Daher muss gesagt werden, dass HUVEC-Kulturen als physiologisches Modell zur Erforschung von Leukozytenadhäsion am Endothel ungeeignet sind.

Das isoliert perfundierte Meerschweinchenherz zeigte eine Glykokalyx von etwa 200 nm Dicke am Koronarendothel. Auch erwies es sich u.a. durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche als valides Modell für Studien mit Einfluss auf eine zuvor intakte Glykokalyx. Insbesondere zeigte sich, dass eine 4-stündige Ischämie trotz Verwendung handelsüblicher Kardioplegielösungen hinsichtlich der Leukozytenadhäsionsrate einen vergleichbaren Effekt wie ein enzymatisches Shedding der Glykokalyxstrukturen und eine bis zu 3-fache Steigerung der Adhäsionsrate nach sich zog.

Der Zusatz von Humanalbumin zu der verwendeten HTK-Kardioplegielösung bewirkte einen elektronenmikroskopisch wahrnehmbaren Erhalt der Glykokalyx und einen signifikanten Rückgang der Leukozyten-Adhäsionsrate im Vergleich zu albuminfreier Kardioplegielösung.

Ein Schutz der endothelialen Glykokalyx und des damit verbundenen endothelial surface layers stellt einen vielversprechenden Ansatz dar, Schäden am Endothel und tieferen Gewebe durch Ischämie und Reperfusion gering zu halten. Weitere Experimente zur Minderung des Ischämie-Reperfusionsschadens können helfen, die damit verbundenen Folgen für beispielsweise eingepflanzte Transplantatorgane zu minimieren.

## 6. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

ANOVA	-	Analysis of variance
BGB	-	Bürgerliches Gesetzbuch
CAV	-	Cardiac allograft vasculopathy
CD 15	-	Cluster of differentiation Antigen 15
DAB	-	Diaminobenzidin
DMEM	-	Dulbecco's Modified Eagle Medium
E	-	Ödembildung
EDTA	-	Ethylendiamintetraessigsäure
EG	-	Endotheliale Glykokalyx
ESL	-	endothelial surface layer
FACS	-	Fluorescence activated cell sorting
FITC	-	Fluorescein-isothiocyanat
FSC	-	Forward-Scatter
HF	-	Herzfrequenz
HUVEC	-	humane
HTK	-	Histidin Tryptophan Ketoglutarat
ICAM	-	Intercellular adhesion molecule
IU	-	International units
PBS	-	Phosphate buffered saline
PCO <sub>2</sub>	-	CO <sub>2</sub> -Partialdruck
PE	-	Phycoerythin

PMN	-	Polymorphonuclear Neutrophils
PO2	-	O2-Partialdruck
PSGL-1	-	P-Selectin-Glykoprotein-Liganden-1
RBC	-	Erythrozyt
SSC	-	Sideward-Scatter
TNF- $\alpha$	-	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
UW	-	University of Wisconsin
VCAM	-	Vascular cell adhesion protein
VL	-	Vaskuläres Lumen

## 7. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. med. U. Pohl in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. habil. Dr. rer. nat. B. F. Becker durchgeführt.

Herrn Professor Pohl danke ich für die freundliche Aufnahme im Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin, für die Überlassung des Themas und die Unterstützung, die ich im Verlauf der Bearbeitung erfuhr,

Herrn Professor Becker danke ich sehr für die herzliche Aufnahme in sein Team und die hervorragende Betreuung und Geduld während dieser Dissertationsarbeit. Seine enorme fachliche Kompetenz, Erfahrung und Diskussionsbereitschaft haben entscheidend zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Herrn PD Dr. med. Jacob möchte ich für die sehr gute Betreuung und Zusammenarbeit bei den Versuchen, der Auswertung und Diskussion der gewonnenen Daten danken. Ohne ihn wäre die erfolgreiche Beendigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Herr Prof. Dr. med. Dr. rer. Nat. U. Welsch von der Anatomischen Anstalt der LMU ermöglichte durch Rat und Tat die Anfertigung der mikroskopischen Bilder. Ohne diesen äußerst wertvollen Beitrag würde die Interpretation der Daten wesentlich schwerer fallen.

Ferner schulde ich den Assistentinnen der Forschungslabore des Walter-Brendel-Zentrums, der Klinik für Anaesthesiologie des Klinikums der Universität München und der Anatomischen Anstalt der LMU München besonderen Dank für ihre stets freundliche und kompetente Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

## 8. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Jörn Oliver **Paul**  
Geburtsdatum: 18. August 1980  
Geburtsort: München  
Familie: Immo Paul (\*1945)  
Irene Paul (\*1949)

### Schulbildung

08/1986-07/1987 Grundschule Carl Orff, Berlin  
09/1987-07/1990 Grundschule Königswieserstraße, München  
09/1990-07/1999 Gymnasium Fürstenried West, München  
07/1999 Allgemeine Hochschulreife

### Ersatzdienst

09/1999-07/2000 Zivildienst im OP-Bereich Krankenhaus Martha Maria München

### Studium

10/2000-09/2001 Studium der Zahnmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

- 10/2001-09/2003 Vorklinischer Abschnitt des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
- 10/2003-08/2006 Klinischer Abschnitt des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
- 08/2006-07/2007 Praktisches Jahr an der Ludwig-Maximilians-Universität München
- 06.11.2007 Abschluss des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München mit der Gesamtnote Sehr Gut
- 19.11.2007 Erteilung der Approbation als Arzt

#### Berufliche Tätigkeit

Seit Januar 2008 Arzt in Weiterbildung, Klinik für Anaesthesiologie des Klinikums der Universität München (Prof. Dr. med. B. Zwißler)

## 9. Veröffentlichungen

Originalarbeiten:

Jacob M, Rehm M, Loetsch M, Paul JO, Bruegger D, Welsch U, Conzen P, Becker BF: **The endothelial glycocalyx prefers albumin for evoking shear stress-induced, nitric oxide-mediated coronary dilatation.** J Vasc Res 2007, 44(6):435-443.

Chappell D, Jacob M, Paul O, Mehringer L, Newman W, Becker BF: **Impaired glycocalyx barrier properties and increased capillary tube haematocrit.** J Physiol 2008, 586(Pt 19):4585-4586.

Chappell D, Jacob M, Paul O, Rehm M, Welsch U, Stoeckelhuber M, Conzen P, Becker BF: **The Glycocalyx of the Human Umbilical Vein Endothelial Cell. An Impressive Structure Ex Vivo but Not in Culture.** Circ Res 2009, 104:1313-7.

Jacob M, Paul O, Mehringer L, Chappell D, Rehm M, Welsch U, Kaczmarek I, Conzen P, Becker BF: **Albumin augmentation improves condition of guinea pig hearts after 4 hr of cold ischemia.** Transplantation 2009, 87(7):956-965.

Vorträge und Poster:

Jacob M, Bruegger D, Rehm M, Loetsch M, Paul JO, Conzen P, Becker BF: **The endothelial glycocalyx prefers albumin for evoking shear-stress induced, NO mediated coronary dilatation.** Acta Physiologica 2006; 186:92.

Bruegger D, Jacob M, Rehm M, Abicht J, Stoeckelhuber M, Paul JO, Christ F, Becker BF: **Shedding of the endothelial glycocalyx in patients undergoing coronary artery surgery.** Acta Physiologica 2006; 186:201.

Paul JO, Jacob M, Bruegger D, Rehm M, Becker BF: **Significance of the endothelial glycocalyx for adhesion of PMN – comparison of in situ and in vitro models.** Acta Physiologica 2006; 186:204.

Becker BF, Bruegger D, Chappell D, Gloe T, Jacob M, Paul JO, Stoeckelhuber M, Welsch U, Rehm M: **Shedding of the endothelial glycocalyx: a key to reperfusion injury.** Acta Physiologica 2007; 189 (Suppl. 653):25 (S06-5).

Chappell D, Jacob M, Paul J, Stoeckelhuber M, Welsch U, Rehm M, Conzen P, Becker BF: **The endothelial glycocalyx – an impressive structure in situ.** World Congress of Anesthesia 2008, Cape Town, South Africa.

Jacob M, Paul O, Rehm M, Bruegger D, Welsch U, Becker BF: **Preservation of the endothelial glycocalyx by cardioplegic albumin at physiological level prevents the postischemic rise in granulocyte adhesion.** Clin Res Cardiol 2007; 96: Suppl 1, P161.

## 10. Literaturverzeichnis

1. Danielli, J.F., *Capillary permeability and oedema in the perfused frog*. The Journal of Physiology, 1940. **98**(1): p. 109-129.
2. Luft, J.H., *Fine structures of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red*. Fed Proc, 1966. **25**(6): p. 1773-83.
3. Vink, H. and B.R. Duling, *Capillary endothelial surface layer selectively reduces plasma solute distribution volume*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **278**(1): p. H285-9.
4. Chappell, D., et al., *Hydrocortisone preserves the vascular barrier by protecting the endothelial glycocalyx*. Anesthesiology, 2007. **107**(5): p. 776-84.
5. Rehm, M., et al., *Endothelial glycocalyx as an additional barrier determining extravasation of 6% hydroxyethyl starch or 5% albumin solutions in the coronary vascular bed*. Anesthesiology, 2004. **100**(5): p. 1211-23.
6. Chappell, D., et al., *TNF-alpha induced shedding of the endothelial glycocalyx is prevented by hydrocortisone and antithrombin*. Basic Res Cardiol, 2009. **104**(1): p. 78-89.
7. Chappell, D., et al., *The Glycocalyx of the Human Umbilical Vein Endothelial Cell. An Impressive Structure Ex Vivo but Not in Culture*. Circ Res, 2009, 104:1313-7.
8. Chappell, D., et al., *Heparinase selectively sheds heparan sulphate from the endothelial glycocalyx*. Biol Chem, 2008. **389**(1): p. 79-82.
9. Tarbell, J.M. and M.Y. Pahakis, *Mechanotransduction and the glycocalyx*. J Intern Med, 2006. **259**(4): p. 339-50.
10. Pries, A.R., T.W. Secomb, and P. Gaehtgens, *The endothelial surface layer*. Pflugers Arch, 2000. **440**(5): p. 653-66.

11. Nieuwdorp, M., et al., *The endothelial glycocalyx: a potential barrier between health and vascular disease*. *Curr Opin Lipidol*, 2005. **16**(5): p. 507-11.
12. Pries, A.R. and W.M. Kuebler, *Normal endothelium*. *Handb Exp Pharmacol*, 2006(176 Pt 1): p. 1-40.
13. Weinbaum, S., J.M. Tarbell, and E.R. Damiano, *The structure and function of the endothelial glycocalyx layer*. *Annu Rev Biomed Eng*, 2007. **9**: p. 121-67.
14. Jacob, M., et al., *The endothelial glycocalyx prefers albumin for evoking shear stress-induced, nitric oxide-mediated coronary dilatation*. *J Vasc Res*, 2007. **44**(6): p. 435-43.
15. Lipowsky, H.H., *Microvascular rheology and hemodynamics*. *Microcirculation*, 2005. **12**(1): p. 5-15.
16. Oohira, A., T.N. Wight, and P. Bornstein, *Sulfated proteoglycans synthesized by vascular endothelial cells in culture*. *J Biol Chem*, 1983. **258**(3): p. 2014-21.
17. Bernfield, M., et al., *Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans*. *Annu Rev Biochem*, 1999. **68**: p. 729-77.
18. Henry, C.B. and B.R. Duling, *TNF-alpha increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000. **279**(6): p. H2815-23.
19. Rehm, M., et al., *Changes in blood volume and hematocrit during acute preoperative volume loading with 5% albumin or 6% hetastarch solutions in patients before radical hysterectomy*. *Anesthesiology*, 2001. **95**(4): p. 849-56.
20. Rehm, M., et al., *Changes in intravascular volume during acute normovolemic hemodilution and intraoperative retransfusion in patients with radical hysterectomy*. *Anesthesiology*, 2000. **92**(3): p. 657-64.
21. Mulivor, A.W. and H.H. Lipowsky, *Role of glycocalyx in leukocyte-endothelial cell adhesion*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002. **283**(4): p. H1282-91.

22. Mulivor, A.W. and H.H. Lipowsky, *Inflammation- and ischemia-induced shedding of venular glycocalyx*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **286**(5): p. H1672-80.
23. Engler, R.L., G.W. Schmid-Schonbein, and R.S. Pavelec, *Leukocyte capillary plugging in myocardial ischemia and reperfusion in the dog*. Am J Pathol, 1983. **111**(1): p. 98-111.
24. Formigli, L., et al., *Neutrophils as mediators of human skeletal muscle ischemia-reperfusion syndrome*. Hum Pathol, 1992. **23**(6): p. 627-34.
25. Granger, D.N., et al., *Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia-reperfusion*. Am J Physiol, 1989. **257**(5 Pt 1): p. G683-8.
26. Schneeberger, H., et al., *First clinical experiences with superoxide dismutase in kidney transplantation--results of a double-blind randomized study*. Transplant Proc, 1989. **21**(1 Pt 2): p. 1245-6.
27. Granger, D.N., *Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease*. Microcirculation, 1999. **6**(3): p. 167-78.
28. Seal, J.B. and B.L. Gewertz, *Vascular dysfunction in ischemia-reperfusion injury*. Ann Vasc Surg, 2005. **19**(4): p. 572-84.
29. Oliver, M.G., et al., *Morphologic assessment of leukocyte-endothelial cell interactions in mesenteric venules subjected to ischemia and reperfusion*. Inflammation, 1991. **15**(5): p. 331-46.
30. Raschke, P., et al., *Postischemic dysfunction of the heart induced by small numbers of neutrophils via formation of hypochlorous acid*. Basic Res Cardiol, 1993. **88**(4): p. 321-39.
31. Kupatt, C., et al., *Nitric oxide mitigates leukocyte adhesion and vascular leak after myocardial ischemia*. J Mol Cell Cardiol, 1996. **28**(3): p. 643-54.

32. Vinten-Johansen, J., *Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 481-97.
33. Jordan, J.E., Z.Q. Zhao, and J. Vinten-Johansen, *The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 1999. **43**(4): p. 860-78.
34. Kurose, I., et al., *Ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction: role of oxidants and lipid mediators*. Am J Physiol, 1997. **272**(6 Pt 2): p. H2976-82.
35. Vollmar, B., et al., *Leukocytes contribute to hepatic ischemia/reperfusion injury via intercellular adhesion molecule-1-mediated venular adherence*. Surgery, 1995. **117**(2): p. 195-200.
36. Zahler, S., et al., *Retention of leucocytes in reperfused, isolated hearts does not cause haemodynamically relevant permanent capillary plugging*. Pflugers Arch, 1997. **433**(6): p. 713-20.
37. Zahler, S., et al., *The function of neutrophils isolated by a magnetic antibody cell separation technique is not altered in comparison to a density gradient centrifugation method*. J Immunol Methods, 1997. **200**(1-2): p. 173-9.
38. Bruegger, D., et al., *Atrial natriuretic peptide induces shedding of endothelial glycocalyx in coronary vascular bed of guinea pig hearts*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **289**(5): p. H1993-9.
39. Jacob, M., et al., *Contrasting effects of colloid and crystalloid resuscitation fluids on cardiac vascular permeability*. Anesthesiology, 2006. **104**(6): p. 1223-31.
40. Jacob, M., et al., *The endothelial glycocalyx affords compatibility of Starling's principle and high cardiac interstitial albumin levels*. Cardiovasc Res, 2007. **73**(3): p. 575-86.

41. Vogel, J., et al., *Influence of the endothelial glycocalyx on cerebral blood flow in mice*. J Cereb Blood Flow Metab, 2000. **20**(11): p. 1571-8.
42. Rehm, M., et al., *Shedding of the endothelial glycocalyx in patients undergoing major vascular surgery with global and regional ischemia*. Circulation, 2007. **116**(17): p. 1896-906.
43. Jacob, M., et al., *Albumin augmentation improves condition of guinea pig hearts after 4 hr of cold ischemia*. Transplantation, 2009. **87**(7): p. 956-65.
44. Reitsma, S., et al., *The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization*. Pflugers Arch, 2007. **454**(3): p. 345-59.
45. Barker, A.L. and O.K. Anna L. Barker, Christopher R. Neal, Julie V. Macpherson, Jacqueline L. Whatmore, C. Peter Winlove, Patrick R. Unwin and Angela C. Shore, *Observation and characterisation of the glycocalyx of viable human endothelial cells using confocal laser scanning microscopy*. Phys. Chem. Chem. Phys., 2004. **6**: p. 1006-1011.
46. Megens, R.T., et al., *Two-photon microscopy of vital murine elastic and muscular arteries. Combined structural and functional imaging with subcellular resolution*. J Vasc Res, 2007. **44**(2): p. 87-98.
47. Potter, D.R. and E.R. Damiano, *The hydrodynamically relevant endothelial cell glycocalyx observed in vivo is absent in vitro*. Circ Res, 2008. **102**(7): p. 770-6.
48. Ueda, A., et al., *Effect of glycocalyx on shear-dependent albumin uptake in endothelial cells*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(5): p. H2287-94.
49. van den Berg, B.M., H. Vink, and J.A. Spaan, *The endothelial glycocalyx protects against myocardial edema*. Circ Res, 2003. **92**(6): p. 592-4.
50. Vink, H., A.A. Constantinescu, and J.A. Spaan, *Oxidized lipoproteins degrade the endothelial surface layer : implications for platelet-endothelial cell adhesion*. Circulation, 2000. **101**(13): p. 1500-2.

51. Vink, H. and B.R. Duling, *Identification of distinct luminal domains for macromolecules, erythrocytes, and leukocytes within mammalian capillaries*. Circ Res, 1996. **79**(3): p. 581-9.
52. Nieuwdorp, M., et al., *Measuring endothelial glycocalyx dimensions in humans: a potential novel tool to monitor vascular vulnerability*. J Appl Physiol, 2008. **104**(3): p. 845-52.
53. Baudin, B., et al., *A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells*. Nat Protoc, 2007. **2**(3): p. 481-5.
54. Schmidt, A., et al., *Plasmin- and thrombin-accelerated shedding of syndecan-4 ectodomain generates cleavage sites at Lys(114)-Arg(115) and Lys(129)-Val(130) bonds*. J Biol Chem, 2005. **280**(41): p. 34441-6.
55. Theriault, A., J.T. Chao, and A. Gapor, *Tocotrienol is the most effective vitamin E for reducing endothelial expression of adhesion molecules and adhesion to monocytes*. Atherosclerosis, 2002. **160**(1): p. 21-30.
56. Thi, M.M., et al., *The role of the glycocalyx in reorganization of the actin cytoskeleton under fluid shear stress: a "bumper-car" model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(47): p. 16483-8.
57. Florian, J.A., et al., *Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells*. Circ Res, 2003. **93**(10): p. e136-42.
58. McCormick, S.M., et al., *DNA microarray reveals changes in gene expression of shear stressed human umbilical vein endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(16): p. 8955-60.
59. Topper, J.N., et al., *Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively*

- up-regulated by steady laminar shear stress*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(19): p. 10417-22.
60. Tzima, E., et al., *A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress*. Nature, 2005. **437**(7057): p. 426-31.
61. Gautam, N., et al., *Heparin-binding protein (HBP/CAP37): a missing link in neutrophil-evoked alteration of vascular permeability*. Nat Med, 2001. **7**(10): p. 1123-7.
62. Surapisitchat, J., et al., *Fluid shear stress inhibits TNF-alpha activation of JNK but not ERK1/2 or p38 in human umbilical vein endothelial cells: Inhibitory crosstalk among MAPK family members*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(11): p. 6476-81.
63. Yang, L., et al., *ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow*. Blood, 2005. **106**(2): p. 584-92.
64. Ley, K., *Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process*. Cardiovasc Res, 1996. **32**(4): p. 733-42.
65. Bienvenu, K. and D.N. Granger, *Molecular determinants of shear rate-dependent leukocyte adhesion in postcapillary venules*. Am J Physiol, 1993. **264**(5 Pt 2): p. H1504-8.
66. McEver, R.P. and R.D. Cummings, *Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment*. J Clin Invest, 1997. **100**(11 Suppl): p. S97-103.
67. Moore, K.L., et al., *P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin*. J Cell Biol, 1995. **128**(4): p. 661-71.
68. Springer, T.A., *Adhesion receptors of the immune system*. Nature, 1990. **346**(6283): p. 425-34.

69. Tamatani, T. and M. Miyasaka, *Identification of monoclonal antibodies reactive with the rat homolog of ICAM-1, and evidence for a differential involvement of ICAM-1 in the adherence of resting versus activated lymphocytes to high endothelial cells.* Int Immunol, 1990. **2**(2): p. 165-71.
70. Miniati, D.N., et al., *Oxidative stress of cardiac transplantation is associated with decreased BCL-2 expression and increased NFkB activity.* J Heart Lung Transplant, 2001. **20**(2): p. 158-159.
71. Taylor, D.O., et al., *Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fourth official adult heart transplant report--2007.* J Heart Lung Transplant, 2007. **26**(8): p. 769-81.
72. Rickenbacher, P.R., et al., *Prognostic importance of intimal thickness as measured by intracoronary ultrasound after cardiac transplantation.* Circulation, 1995. **92**(12): p. 3445-52.
73. Miller, L.W., *Long-term complications of cardiac transplantation.* Prog Cardiovasc Dis, 1991. **33**(4): p. 229-82.
74. Lefer, A.M., *Role of selectins in myocardial ischemia-reperfusion injury.* Ann Thorac Surg, 1995. **60**(3): p. 773-7.
75. Lefer, A.M., et al., *Endothelial dysfunction and neutrophil adherence as critical events in the development of reperfusion injury.* Agents Actions Suppl, 1993. **41**: p. 127-35.
76. Lefer, A.M., A.S. Weyrich, and M. Buerke, *Role of selectins, a new family of adhesion molecules, in ischaemia-reperfusion injury.* Cardiovasc Res, 1994. **28**(3): p. 289-94.
77. Smith, C.W., et al., *Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro.* J Clin Invest, 1989. **83**(6): p. 2008-17.

78. Nieuwdorp, M., et al., *Loss of endothelial glycocalyx during acute hyperglycemia coincides with endothelial dysfunction and coagulation activation in vivo*. *Diabetes*, 2006. **55**(2): p. 480-6.