

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

*Einfluss der endothelialen Glykokalyx auf die
intrakoronare Adhäsion von Leukozyten und
Thrombozyten*

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

vorgelegt von
Nina C. Dörfler
aus
München

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. habil. Dr. rer. nat. Bernhard F. Becker

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ulrich Welsch

Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. med. Daniel Chappell

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

Tag der mündlichen

Prüfung: 08.11.2012

Meinen Eltern

und Pepe

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
I.1 Ischämie/Reperfusion (I/R)	1
I.1.1 Ischämie/Reperfusion und Inflammation	1
I.1.2 Adhäsion	2
I.2 Die endotheliale Glykokalyx	3
I.2.1 Bestandteile und Aufbau	3
I.2.2 Rolle der endothelialen Glykokalyx	4
I.2.3 Shedding der Glykokalyx	4
I.3 Substanzen von Interesse für die Glykokalyxprotektion	4
I.3.1 Hydrocortison	4
I.3.2 Antithrombin III	5
I.4 Ansatz der Studie	6
I.5 Fragestellung der Studie	6
II. Material und Methoden	7
II.1 Verwendete Substanzen und Lösungen	7
II.1.1 Substanzen und Bezugsquellen	7
II.1.2 Lösungen	7
II.1.2.1 PBS (Phosphate buffered saline)	7
II.1.2.2 Krebs-Henseleit-Puffer (Perfusat)	7
II.1.2.3 Tyrode-Lösung	8
II.2 Isolierung humaner Blutzellen	8
II.2.1 PMN-Präparation	8
II.2.2 Thrombozyten-Präparation	9
II.3 Tierexperimenteller Teil	10
II.3.1 Versuchstiere	10
II.3.2 Langendorff-Modell	10
II.3.3 Herzpräparation und Perfusion	10
II.3.4 Versuchsaufbau	11
II.3.5 Versuchsprotokoll	13
II.4 Durchflusszytometrie	15
II.4.1 Antikörpermarkierung der Proben	16

II.4.1.1 Antikörperanfärbung bei PMN	16
II.4.1.2 Antikörperanfärbung bei Thrombozyten	16
II.4.2 FACS Messung	17
II.5 Messung der Glykokalyxbestandteile	19
II.6 Elektronenmikroskopie und Immunhistochemie	19
II.7 Statistische Auswertung	20
III. Ergebnisse	21
III.1 Messung der Glykokalyxbestandteile	21
III.1.1 Syndecan-1	21
III.1.2 Heparansulfat	22
III.2 Intrakoronare Zell-Adhäsion	23
III.2.1 Leukozytenadhäsion	23
III.2.2 Thrombozytenadhäsion	24
III.3 Durchflusszytometrie	25
III.3.1 Leukozyten	25
III.3.2 Thrombozyten	26
III.4 Perfusionsdruck	27
III.5 Messung der Gewebeödeme	28
III.6 Elektronenmikroskopie	28
IV. Diskussion	30
IV.1 Methoden-Kritik	30
IV.1.1 Verwendung von menschlichem Spenderblut	30
IV.1.2 PMN-Präparation	30
IV.1.3 Langendorff-Modell	31
IV.1.4 Herzpräparation	31
IV.1.5 Versuchsprotokoll	32
IV.1.6 Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)	33
IV.2 Analyse der Ergebnisse	34
IV. 2.1 Shedding von Glykokalyxbestandteilen	34
IV.2.2 Verhalten von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten	34
IV.2.2.1 PMN-Adhäsion	34
IV.2.2.2 PMN-Aktivität	35

IV.2.3 Verhalten von Thrombozyten	36
IV.2.3.1 Adhäsion	36
IV.2.3.2 Aktivität	36
IV.2.4 Elektronenmikroskopie	37
IV.2.5 Perfusionsdruck	37
IV.3 Glykokalyx-Protektion durch Hydrocortison	38
IV.4 Glykokalyx-Protektion durch Antithrombin III	38
IV.5 Bedeutung der Resultate und Perspektiven	39
V. Zusammenfassung	42
VI. Abkürzungsverzeichnis	44
VII. Literaturverzeichnis	46
VII.1 Aus der Arbeit hervorgegangene Publikation	55
VIII. Danksagung	56

I. Einleitung

Gesundes vasculäres Endothel wird von einer bis zu 0,5 µm dicken endothelialen Glykokalyx bedeckt [18]. Lange Zeit wurde die Bedeutung der Glykokalyx unterschätzt, aufgrund der fälschlichen Annahme sie sei nur wenige Nanometer dick [59]. Heute weiß man, dass sie zahlreiche physiologische Funktionen ausübt und einen wichtigen Faktor für die vasculäre Barrierefunktion darstellt [8]. Nach dem „Double-Barrier-Konzept“ von Rehm et al. hat die endotheliale Glykokalyx, neben der Endothelzelle selbst, eine eigene Schrankenfunktion [87]. Solange nur eine dieser Komponenten geschädigt ist, hält sich die Beeinträchtigung in Grenzen und die Barrierefunktion kann größtenteils aufrecht gehalten werden [87]. Gewebischämie stellt deshalb eine große Gefahr dar, da sie sowohl die Endothelzelle, als auch die endotheliale Glykokalyx schädigt [77], [55], [20].

I.1 Ischämie/Reperfusion (I/R)

I.1.1 Ischämie/Reperfusion und Inflammation

Im klinischen Alltag spielt besonders die Schädigung der endothelialen Glykokalyx durch Ischämie/Reperfusion eine große Rolle. Eine Minderversorgung durch Sauerstoff kann durch mehrere Pathomechanismen bedingt sein, am häufigsten liegt dem Ereignis jedoch eine Unterbrechung des Blutflusses zugrunde. Hierzu kommt es nicht nur durch den akuten Verschluss eines Gefäßes bei Infarkt, Thrombose oder Embolie, sondern auch bedingt durch operative Eingriffe wie z.B. Transplantationen und Bypass-Operationen.

Immense Probleme bereiten besonders nach großen chirurgischen Interventionen auftretende inflammatorische Ereignisse wie Sepsis und das systemisch inflammatorische response Syndrom (SIRS), bedingt z.B. nach Herzoperationen durch Ischämiezeit und Stress (v. a. durch Anschluss an die Herz-Lungen-Maschine). In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass die Zerstörung der endothelialen Glykokalyx eine frühe Manifestation endothelialer Schädigung nach Ischämie darstellt [67], [40].

Unsere Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass eine intraoperative Zerstörung der Glykokalyx proportional zum Ausmaß und der Dauer der Ischämie ist [86].

Ischämie setzt eine Kaskade von Ereignissen in Gang, welche, verstärkt durch die Reperfusion und Reoxygenierung (Ischämie/Reperfusionsschaden) [63], letztlich durch Adhäsion inflammatorischer Zellen zu einer entzündlichen Reaktion und Dysfunktion des Endothels führt. Eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie des I/R-Schadens spielen Zytokine (z.B. TNF- α) und Adhäsionsmoleküle. Bei der Wiederversorgung ischämischen Gewebes mit Sauerstoff kommt es zur Aktivierung des Endothels mit Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren und zu einer gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen [30], [36], [49].

I.1.2 Adhäsion

Teil des I/R-Schadens ist die Retention von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) [28]. Dabei spielen zwei Pathomechanismen eine Rolle: die kapilläre Lumeneinengung durch Ödembildung mit nachfolgender kapillärer Verstopfung [47] und die Interaktion von spezifischen Oberflächenantigenen (CD11b/CD18) mit interzellulären Adhäsionsmolekülen [13], [65]. Durch die ischämisch getriggerte Inflammation werden auf der endothelialen Seite vermehrt interzelluläre Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und ICAM-2 exprimiert. ICAM-1 wird auf Fibroblasten, Epithel und Leukozyten, aber hauptsächlich auf Endothelzellen dargeboten [32] und ist somit von besonderer Bedeutung. Als Liganden dienen β_2 -Integrine wie CD11b/CD18 (MAC-1) [52], welche als spezifische Oberflächenantigene auf aktivierten Leukozyten exprimiert werden [54].

Neueren Erkenntnissen zufolge spielen auch Blutplättchen eine Rolle in diesem Adhäsionsprozess. Über die Fähigkeit von ICAM-1 Fibrinogen zu binden [3], kommt es zur Adhäsion von Thrombozyten [61]. Die Thrombozyten führen zu einer zusätzlichen Aktivierung des Endothels [31] sowie der Leukozyten [70].

Aktivierte und adhärierte Leukozyten führen ihrerseits zu einer weiteren Schädigung des Endothels. Dieser *circulus vitiosus* wird unterhalten durch die zusätzliche Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren, Zytokinen und Proteasen aktivierter Leukozyten selbst [101], [46] und ihrer Fähigkeit reaktive Sauerstoffradikale zu bilden [62].

Diese immer fortschreitende Zerstörung des Endothels bedeutet auch die Degradierung der endothelialen Glykokalyx.

I.2 Die endotheliale Glykokalyx

Die endotheliale Glykokalyx ist eine aus Glykoproteinen, Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen bestehende Schicht [72], die sich an den Endothelzellen ausbildet und alle gesunden Gefäße zum Lumen hin auskleidet. Ihre Existenz wurde bereits vor 70 Jahren zum ersten Mal vermutet [23]. Da die damaligen Darstellungstechniken nicht sehr genau waren, hielt man die endotheliale Glykokalyx für eine nur wenige Nanometer dicke Struktur [59] und schrieb ihr keine relevante physiologische Bedeutung zu. Neuere Fixierungs- und Färbetechniken haben in den letzten Jahren jedoch gezeigt, dass die Dicke der Glykokalyx bis zu 0,5 µm beträgt [18]. Zusammen mit gebundenen Plasmaproteinen bildet sie eine Oberflächenschicht, den sogenannten „Endothelial Surface Layer“ (ESL), aus [83]. Der ESL ist mit einer Dicke von ca. 1 µm ungefähr so groß wie die Endothelzelle selbst [18], [82].

I.2.1 Bestandteile und Aufbau

Die endotheliale Glykokalyx, eine kohlenhydratreiche Schicht, besteht aus einem membrangebundenen Fundament, dessen Hauptbestandteil, das Proteoglykan Syndecan-1, transmembranär verankert ist [12]. Zusammen mit daran gebundenen Seitenketten, bestehend aus Glykosaminoglykanen wie Heparansulfat, entsteht das Grundgerüst [72]. Zusätzlich zu diesem Grundgerüst besteht die endotheliale Glykokalyx aus einer dynamischen Komponente. Lösliche Moleküle plasmatischer oder endothelialer Herkunft werden aus dem Blutfluss rekrutiert und an das Basisnetzwerk angelagert, vernetzt und wieder gelöst [72].

Die Dicke und genaue Zusammensetzung der Glykokalyx variiert somit, bedingt durch ein dynamisches Gleichgewicht zwischen diesem Geflecht und dem vorbeifließendem Plasma mit seinen Bestandteilen. Die genauen Grundlagen und Hintergründe dieser Dynamik sind jedoch noch nicht vollständig untersucht [58]. Die sich kontinuierlich auf- und abbauende Schicht, durch ständigen Austausch zwischen Plasmaproteinen und membrangebundenen Molekülen, bildet den oben genannten „Endothelial Surface Layer“, welcher die eigentlich physiologische Wirkform der Glykokalyx darstellt [41], [83], [88].

I.2.2 Rolle der endothelialen Glykokalyx

Mittlerweile wurde der endothelialen Glykokalyx nicht nur eine zentrale Rolle für die Gefäßbarriere [83] zugeschrieben, sondern eine wichtige Bedeutung für zahlreiche weitere physiologische Funktionen, wie z.B. Zellinteraktionen [19], [87], [99].

Bei Krankheitsbildern wie Arteriosklerose, Diabetes und Sepsis, welche pathophysiologisch mit einer vaskulären Dysfunktion einhergehen, scheint Schädigung der endothelialen Glykokalyx eine große Rolle zu spielen [18].

I.2.3 Shedding der Glykokalyx

„Shedding“ bezeichnet das Abspalten der einzelnen Bestandteile der Glykokalyx, welche mittels ELISA z.B. im koronarvenösen Effluat nachgewiesen werden können. Es bedeutet somit die Degradierung dieser Struktur. Durch den Integritäts-Verlust ist sie in ihrer physiologischen Funktion eingeschränkt und es kommt zur endothelialen Dysfunktion mit zahlreichen nachfolgenden Komplikationen (z.B. Ödembildung, Leukozytenadhäsion).

Shedding wird erwiesenermaßen durch eine Vielzahl von Ereignissen und Faktoren ausgelöst: z.B. durch ANP [11], Entzündungsmediatoren wie TNF- α [40], [17], Lipopolysaccharid-induzierter Inflammation [60] und Ischämie/Reperfusion [19].

In klinischen Studien wurde gezeigt, dass es zu Shedding und zur Alterierung der endothelialen Glykokalyx durch erhöhte „low-density-lipoprotein (LDL)-Konzentrationen [98], Diabetes [73], Sepsis [69] und Ischämie [86] kommt.

Unsere Arbeitsgruppe konnte in experimentellen Studien zeigen, dass die Applikation von Hydrocortison [17], [19] und Antithrombin III [21] protektive Wirkung hat und zu einer Abnahme des Sheddings der endothelialen Glykokalyx führt.

I.3 Substanzen von Interesse für die Glykokalyxprotektion

I.3.1 Hydrocortison

Glukokortikoide gehören zu den Steroidhormonen und werden in der Nebennierenrinde unter Einfluss des ACTH gebildet. Das wichtigste physiologische Glukokortikoid ist das Cortisol. Physiologischerweise wird es in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde gebildet. Neben seinen zahlreichen Wirkungen auf den Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel, sowie auf den Elektrolyt- und Wasserhaushalt,

ist besonders seine antiinflammatorische und immunsuppressive Wirkung von Bedeutung. Aufgrund dessen werden Glukokortikoide zur adjuvanten Therapie einer Sepsis seit Beginn der 50er Jahre eingesetzt [5].

Hydrocortison ist die synthetische Form des körpereigenen Cortisol. Es bewirkt einen Anstieg des peripher-vaskulären Widerstandes und eine verbesserte Ansprechbarkeit der Rezeptoren auf α -adrenerge Katecholamine, vermutlich weil Hydrocortison die Expression der induzierbaren NO-Synthase im Endothel vermindert [84]. Hydrocortison hat einen hohen Stellenwert in der Therapie von schwerer Sepsis und septischen Schock und wird routinemäßig eingesetzt zur Prävention von interstitiellen Ödemen und Schwellungen [4].

Kilger und Mitarbeiter zeigten in einer klinischen Studie, dass eine prophylaktische Gabe von Hydrocortison vor Herzbybassoperationen zu einer signifikant niedrigeren Inzidenz der Sepsis, zu einem signifikant erniedrigten Katecholaminbedarf und zu signifikant verkürzten Aufenthalten auf Intensiv- und Normalstationen führt [51]. Der genaue Wirkmechanismus blieb unklar, ein Schutz der endothelialen Glykokalyx vor proteolytischem Abbau wäre eine mögliche Komponente.

I.3.2 Antithrombin III

Die Applikation von Proteaseinhibitoren wie zum Beispiel dem glykokalyxpenetrierenden Antithrombin III [89], scheint auch ein vielversprechender Ansatz für die Glykokalyxprotektion zu sein.

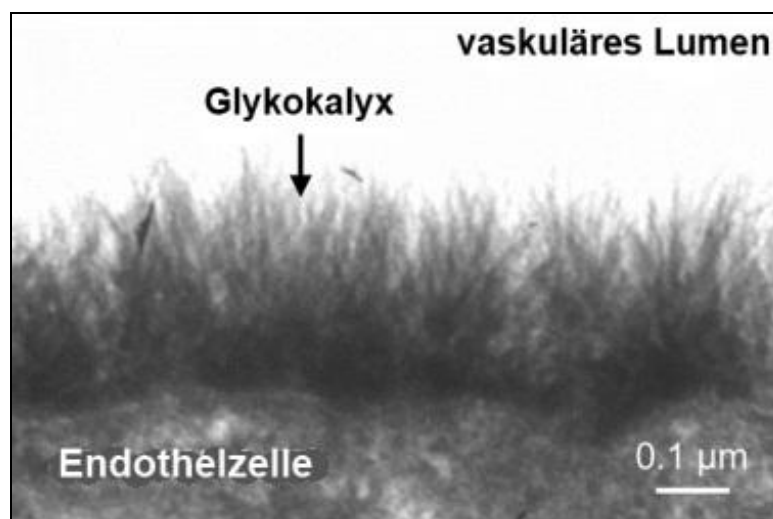
Antithrombin III wird in der Leber synthetisiert, ist ein einkettiges Glykoprotein und ein physiologischer Serinproteaseninhibitor. Es besitzt eine Vielzahl an wichtigen Eigenschaften, wie z.B. seine antikoagulatorische Wirkung und seine antiinflammatorischen Effekte [89]. Die protektive Wirkung des Antithrombins beruht u. a. auf der Tatsache, dass die durch Ischämie/Reperfusion ausgelöste, akute inflammatorische Reaktion mit einer verstärkten Entstehung von Thrombin assoziiert ist, welches sowohl das Endothel, als auch die PMN aktiviert [29] und so zu einer vermehrten Adhäsion führt. Obwohl einige entzündungshemmende Effekte auf die Einflüsse von Antithrombin auf die Koagulations-Kaskaden zurückgehen, scheint es auch davon unabhängige, direkte Interaktionen mit dem Endothel und inflammatorischen Zellen zu geben [71], [89].

I.4 Ansatz der Studie

Unsere Arbeitsgruppe hat bereits gezeigt, dass die Gabe von Hydrocortison und Antithrombin III eine protektive Wirkung auf die endotheliale Glykokalyx hat [19], [21], [17].

Wir glauben, dass die Intaktheit der endothelialen Glykokalyx in engem Zusammenhang mit dem Erhalt der Gefäßintegrität, sowie dem Vermeiden von Adhäsion inflammatorischer Zellen steht. Der Hauptgrund hierfür liegt in der Dicke der endothelialen Glykokalyx (Abbildung 1). Physiologischerweise liegt die Endothelzelle samt ihrer Adhäsionsmoleküle (Reichweite < 20nm) unter einer intakten Schicht der Glykokalyx im Verborgenen und hat keinerlei Kontakt zum vorbeifließenden Blut und den darin zirkulierenden Zellen [102]. Erst nach Degradierung dieser schützenden Struktur dürften die Adhäsionsmoleküle freigelegt werden.

Abbildung 1



D. Chappell, N. Doerfler, et al. (2010).

I.5 Fragestellung der Studie

Es galt in dieser Studie experimentell zu klären wie sich die Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten am vaskulären Endothel durch die Zerstörung der endothelialen Glykokalyx nach Ischämie/Reperfusion verändert. Im Weiteren galt es zu ermitteln in welchem Ausmaß eine Protektion der endothelialen Glykokalyx durch Gabe von Hydrocortison sowie Antithrombin III diese Adhäsion beeinflussen kann.

II. Material und Methoden

II.1 Verwendete Substanzen und Lösungen

II.1.1 Substanzen und Bezugsquellen

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

II.1.2 Lösungen

II.1.2.1 PBS (Phosphate buffered saline)

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

II.1.2.2 Krebs-Henseleit-Puffer (Perfusat)

NaCl	116 mM
------	--------

KCl	3,6 mM
NaHCO ₃	23 mM
CaCl ₂	1,2 mM
MgSO ₄	0,58 mM
KH ₂ PO ₄	1,16 mM
Glucose	5,4 mM
Natriumpyruvat	0,3 mM
Insulin	2,8 U/l

Der Krebs-Henseleit-Puffer wurde unter konstanter Erwärmung (37°C) mit 94,6% O₂ und 5,4% CO₂ begast. Der pH-Wert betrug 7,40 ± 0,05.

II.1.2.3 Tyrode-Lösung

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

Der pH-Wert betrug 7,40 ± 0,02.

II.2 Isolierung humaner Blutzellen

II.2.1 PMN-Präparation

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) wurden mithilfe magnetisch markierter Antikörper und einem magnetic cell separation (MACS) System (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland) isoliert. Im Genauen wurde wie folgt vorgegangen: Es wurden ca. 10-20 ml Blut aus einer Cubitalvene von gesunden, erwachsenen Spendern entnommen und mittels 0,1% EDTA antikoaguliert. Anschließend wurde das Blut bei 400 x g für 15 min zentrifugiert. Zwischen dem plättchenreichen Plasma und den Erythrozyten sammelte sich eine dünne Schicht von Leukozyten, der sogenannte Buffy Coat. Durch vorsichtiges abpipettieren wurden aus 2 Versuchsansätzen ca. 1000 µl von diesem gewonnen und bei 4°C für 15 min mit 30 µl an paramagnetische Kügelchen gebundenem monoklonalem Antikörper gegen CD 15 (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland), epitopspezifisch für Neutrophile,

inkubiert. Vor dem Einfüllen des inkubierten Buffy Coats wurde die Separationssäule mit 500 µl PBS, welches 0,5% BSA enthielt, gespült und in das MACS System eingesetzt. Die markierungsbedingt magnetischen PMN wurden beim Durchlaufen der magnetischen Separationseinheit in der Säule fixiert, während der Rest des Buffy Coat die Säule ungehindert passieren konnte und unten aufgefangen wurde. Um nichtmarkierte Zellen, Erythrozyten, Plättchen, Monozyten und Lymphozyten aus dem System zu entfernen, wurde die Säule 4 mal mit je 500 µl PBS gespült und anschließend vom Magneten getrennt. Der fixierte Inhalt wurde mit 1 ml PBS und mithilfe eines Stempels herausgespült, als Effluat in einem leeren Röhrchen aufgefangen und mit 9 ml PBS verdünnt. Es folgten 10 min Zentrifugation bei 380 x g und, nach Verwerfen des Überstandes, das Suspendieren des gebildeten Pellets in 4 ml Tyrode [103].

Auf diese Weise wurde eine PMN-Suspension mit einer Zell-Dichte von $2-3 \times 10^6$ PMN/ml hergestellt.

Der gesamte Vorgang bis zur fertigen Herstellung der PMN-Suspension dauerte maximal 1 Stunde.

II.2.2 Thrombozyten-Präparation

Zu EDTA 0,1% Röhrchen wurden 0,375 µg Iloprost hinzugegeben, was nach Abnahme von 7,5 ml Blut von gesunden, erwachsenen Spendern einer Iloprost-Konzentration von 50 ng/ml entsprach, und zur Stabilisierung der Thrombozyten diente. Nach dem Zentrifugieren bei 200 x g für 15 min wurde das plättchenreiche Plasma abpipettiert und bei 1750 x g erneut für 12 min zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Plättchen-Pellet in PBS resuspendiert und für 2 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Um Plasmabestandteile und Reste von Iloprost vollständiger zu entfernen, wurde dieser Reinigungsschritt wiederholt. Das erneut entstandene Pellet wurde in Tyrode resuspendiert, sodass am Ende ein Gesamtvolumen von ca. 4 ml Plättchen-Suspension vorlag mit einer Teilchendichte von ca. 10^8 /ml [37].

Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und dauerten ca. 45 min.

II.3 Tierexperimenteller Teil

Diese Studie wurde nach den Vorgaben des Tierschutzgesetzes und mit Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern durchgeführt (Aktenzeichen 209.1/211-2531.3-3/99).

II.3.1 Versuchstiere

Bei den Spendertieren für die Herzpräparation handelte es sich ausschließlich um männliche Meerschweinchen (Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln, Deutschland) mit einem Lebendgewicht zwischen 250-300g.

Gemäß den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes erhielten die Tiere eine Standarddiät mit Trockenfutter und hatten jederzeit freien Zugang zu Wasser. Die Meerschweinchen wurden in entsprechend ausgestatteten Tierställen bei einem 12 stündlichen Tag- und Nachtrhythmus gehalten, und vor Versuchsbeginn ca. 2 Wochen lang adaptiert.

II.3.2 Langendorff-Modell

Das Prinzip des von uns für die Versuche angewendeten Präparationsmodells beruht auf der retrograden Perfusion des isolierten Herzens und wurde erstmals 1895 von Oskar Langendorff beschrieben [56] und später von Döring modifiziert [27]. Abbildung 2 zeigt schematisch die Versuchsanordnung (siehe unten).

Die retrograde Perfusion des Organs erfolgt über die zuvor eingeführte Aortenkanüle. Durch den hydrostatischen Druck schließt sich die Aortenklappe und das Perfusat gelangt orthograd in die Koronararterien und versorgt somit den Herzmuskel passiv mit Sauerstoff und Nährstoffen, bevor es über den Sinus coronarius ins rechte Herz gelangt und von dort über die Pulmonalarterie ausgeworfen wird [26].

Das Langendorff-Modell bietet somit die Möglichkeit Untersuchungen an einem isolierten Herzen mit intaktem Koronarsystem durchzuführen, das keine Druck-Volumen-Arbeit leisten muss.

II.3.3 Herzpräparation und Perfusion

Für die Isolation der Meerschweinchenherzen wurden die Tiere mit einer speziellen Apparatur durch zervikale Dislokation getötet und auf einem Kleintierpräparationstisch fixiert. Die anschließende Inzision beider Halsschlagadern diente der raschen Entblutung. Nachdem das Fell auf der Bauchseite des Tieres mit

einer Schere entfernt wurde, konnte der Thorax am kaudalen Sternumende eröffnet werden. Das noch schlagende Herz wurde unverzüglich mit 4°C kalter isotoner Natriumchloridlösung heruntergekühlt. Gleichzeitig zum Umspülen des Herzens mit kalter Natriumchloridlösung, was über die gesamte Dauer der Versorgungsunterbrechung bis zum Zeitpunkt der Reperfusion fortgesetzt wurde, erfolgte die großzügige Resektion der skelettalen Anteile (Rippen, Sternum) und die Abtragung der Lungen am Hilus. Das Perikard wurde von der Herzspitze aus vom Herzmuskel abgezogen, die Aorta ascendens vom umliegenden Fett- und Bindegewebe frei präpariert und mit einem Faden angeschlungen. Nach ventraler Querinzision der Aorta konnte eine an die Perfusionsapparatur angeschlossene Aortenkanüle in diese eingeführt und eingebunden werden. Durch die retrograde Perfusion mit 37°C warmem modifizierten Krebs-Henseleit-Puffer wurde das Herz nun wieder mit Sauerstoff und anderen Nährstoffen versorgt und begann wieder zu schlagen. Die präparationsbedingte hypotherme Ischämiezeit betrug in allen Versuchen unter 3 min.

Zur vollständigen Mobilisation des Herzens wurde die Aorta distal der Aortenkanüle komplett durchtrennt und nacheinander die A. pulmonalis, die Vv. pulmonales sowie die Vv. cavae superior und inferior und die V. azygos aufgesucht und durchtrennt. Das isolierte Organ wurde dem Thorax entnommen und an die Perfusionsapparatur angebracht.

Nach dem Entfernen von Geweberesten folgte die Darstellung und Ligatur der physiologischen Zuflusswege: Vv. cavae superior und inferior, V. azygos und Vv. pulmonales. Zuletzt wurde in den Stumpf des Truncus pulmonalis eine Kanüle eingebunden, die dem verlustfreien Auffangen des koronaren Effluats und durch einen angebrachten Flussmesser (Transsonic T206, Ithaca, NY, USA) der Messung des Koronarflusses diente.

II.3.4 Versuchsaufbau

Zum Versuchsaufbau siehe auch Abbildung 2.

Zur Bereitstellung von erwärmtem und begastem Perfusat über die gesamte Dauer der Versuche, diente ein großes Glasgefäß (ca. 2,5 l) als Reservoir. Die Erwärmung dieses Gefäßes sowie der Wärmespirale, welche das Perfusat kurz vor dem präparierten Herzen durchlief, erfolgte mittels eines Flüssigkeitskreislaufes, der durch

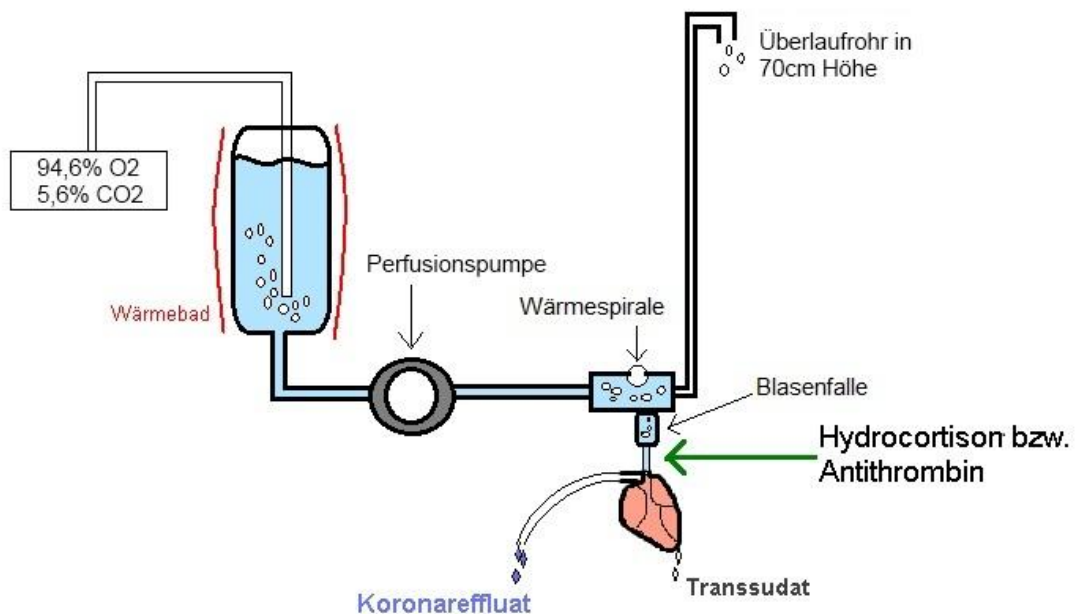
eine Thermostat-Wärmepumpenanlage (Colora Messtechnik GmbH, Lorch/Württemberg, Deutschland) konstant auf 37°C gehalten wurde.

Zur Begasung mit 94,6% Sauerstoff und 5,4% Kohlendioxid (beide Linde AG, Höllriegelskreuth, Deutschland) wurde eine Brause, welche mit der Gasmischpumpe (K. Wösthoff OHG, Bochum, Deutschland) verbunden war, in den Perfusat-Vorratsbehälter getaucht.

Am unteren Pol des Glasbehälters wurde das Perfusat über ein Schlauchsystem weitergeleitet. Eine nachgeschaltete Peristaltikpumpe (MS-1 Regio/8-160, Ismatex Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld, Deutschland) regulierte die Perfusionsrate womit ein konstanter Perfusionsdruck von 70 cm H₂O während der Äquilibrationsphase (siehe unten) erreicht werden konnte (Überlaufrohr in 70cm Höhe über der Aortenklappe).

Die Testsubstanzen Hydrocortison bzw. Antithrombin III konnten problemlos nach dem Druckabnehmer in den aortalen Anteil des Schlauchsystems appliziert werden. Eine Blasenfalle vor Abgang der Aortenkanüle diente dem Abfangen von freier Luft. Dadurch konnten Luftembolien und konsekutive ischämische Ereignissen vermieden werden.

Abbildung 2



II.3.5 Versuchsprotokoll

Direkt nach der Präparation der Meerschweinchenherzen folgte eine 15 minütige Äquilibrationsphase, in welcher sich die Herzen von der Präparation erholen und sich stabile Konditionen (Herzfrequenz, Koronarfluss) der Herzen einstellen konnten. Anschließend wurde für 20 min die Perfusion komplett unterbrochen (no-flow) und somit eine globale Ischämie des Herzens induziert. Das isolierte Herz wurde während dieser Phase auf 37°C warm gehalten (siehe Abbildung 3).

Die Versuchsgruppen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Versuchsgruppen

Nachbehandlung / Vorbehandlung	I/R	I/R + PMN	I/R + Thromb.	Zeit-Kontrolle	Basal PMN	Basal Thromb.
Keine	A	D	G	J	M	N
Hydrocortison	B	E	H	K		
Antithrombin III	C	F	I	L		

A, B, C, E, F, H, J: n=8; **D, I:** n=9; **G, M, N:** n=7; **K, L:** n=6

I/R: Basalwerte nach 37°C no-flow Ischämie ohne Applikation von Zellen

Nach Äquilibrationsphase (15 min) wurde die Perfusion für 20 min komplett unterbrochen und die Herzen anschließend für 10 min reperfundiert

I/R + PMN: Applikation von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (3×10^6) über 1 min nach Ischämie und 10 minütiger Reperfusion

I/R + Thromb.: Applikation von Thrombozyten (10^8) über 1 min nach Ischämie und 10 minütiger Reperfusion

Zeitkontrolle: Äquilibrationsphase (15 min) mit anschließender Perfusion (10 min) ohne Ischämie

Basal PMN, Basal Thromb.: Zeitkontrolle ohne Ischämie mit Applikation von PMN bzw. Thrombozyten

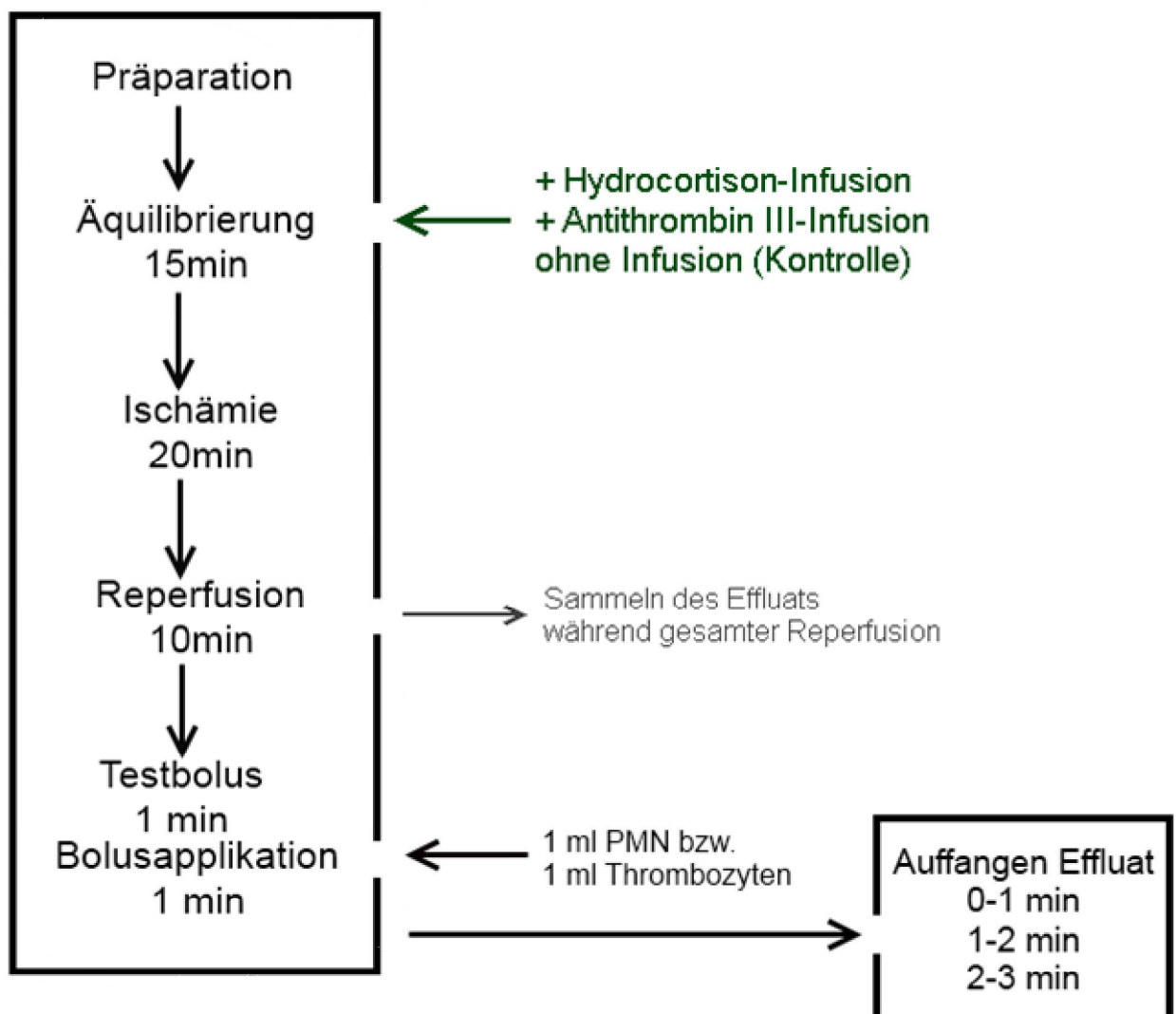
Gruppen M und N entsprachen der Kontrollbedingung ohne protektive Intervention, bei Gruppen J, K, L, M und N erfolgte keine Ischämie/Reperfusion.

Bei den Versuchsgruppen mit Vorbehandlung wurde während der gesamten Äquilibrationsphase entweder Hydrocortison (Gruppen B, E, H, K) oder Antithrombin III (Gruppen C, F, I, L) appliziert. Hydrocortison (Hydrocortison, Pharmacia GmbH, Karlsruhe, Deutschland) wurde gleichmäßig in einer Stress-

Dosierung [51] von 10 µg/ml Perfusat, Antithrombin III (Kybernin, ZLB Behring, Marburg, Deutschland) mit 1 U/ml Perfusat [15], entsprechend einer Aktivität von 100% in humanem Blut gegeben. Die protektive Wirkung von Hydrocortison und Antithrombin III auf die endotheliale Glykokalyx in Meerschweinchenherzen konnte bereits von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden [17].

Nach der Ischämie wurde das Herz für 10 min reperfundiert. Anschließend wurde je nach entsprechender Versuchsgruppe ein Bolus von 1 ml PMN-Suspension ($2-3 \times 10^6$ PMN) (Gruppen D-F, M) bzw. 1 ml Thrombozyten-Suspension (10^8 Thrombozyten) (Gruppen G-I, N) mittels einer Infusionspumpe über 1 min in die Aortenkanüle appliziert.

Abbildung 3



Die Adhäsion der Zellen im koronaren System wurde anhand der arteriovenösen Differenz der absoluten Zellzahlen bestimmt. Dafür wurde in jedem Versuch, direkt vor der intrakoronaren Injektion der Zellsuspension, ein Testbolus von gleichem Volumen (1 ml) über dieselbe Zeit (1 min) in 3% Formalinlösung aufgefangen. Dieser Testbolus entsprach dem „input“, also der Zahl an Zellen, die tatsächlich die Applikations-Spritze in der definierten Flussrate und Zeit verlassen haben. Um den „output“ zu quantifizieren, wurde das koronare Effluat sowohl während der Bolusapplikation, als auch während der ersten 3 min danach jede Minute aufgefangen, und zwar in einer vorbereiteten Formalinlösung (Endkonzentration 3%). Diese fixierte alle Zellen und die Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung im Kühlschrank aufbewahrt.

Nach Zählung der Zellzahl (siehe unten) wurde der Prozentsatz an adhärenen Zellen nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Adhäsion [\%]} = (1 - (\text{Output an Zellen} / \text{Input an Zellen})) \times 100$$

[Formel 1]

In den Gruppen A-C erhielten die Herzen nach Ischämie/Reperfusion keine Zellapplikation.

Bei den Versuchsgruppen mit Zellapplikation wurden des Weiteren Zeit-kontrollierte Versuche ohne Ischämie durchgeführt (Gruppen M und N).

Nach Abschluss eines jeden Versuchs wurden vom Herzen die großen Gefäße und beide Vorhöfe entfernt. Es wurde dann das Nass-Gewicht, und nach 24 Stunden im Wärmeschrank bei 60°C, das Trockengewicht gemessen. Der dadurch errechnete Nass/Trocken-Quotient diente der quantitativen Aussage über die Bildung von Ödemen.

II.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren zur Differenzierung unterschiedlicher Zellpopulationen und kann darüber hinaus eine Aussage über den funktionellen Status dieser wiedergeben. Diese Charakterisierung findet anhand der Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften der zu untersuchenden Zellen statt.

Das FACScan-Gerät, fluorescence activated cell sorting, (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) misst mittels einer Optik-Elektronik die Zellantwort auf eine fokussierte Lichtquelle: zum einen die Vorwärtslichtstreuung (FSC, forward scatter) im flachen Winkel, die als Maß für das Volumen der Zelle dient, und zum anderen die Seitwärtslichtstreuung (SSC, sideward scatter) im rechten Winkel, welche als Maß der Granularität der Zelle dient [90]. Des Weiteren können Fluoreszenzfarben, die z.B. an monoklonale Antikörper gekoppelt wurden, anhand von spezifischen Wellenlängen gemessen werden [78], [85]. Je aktiver die Zelle ist, desto intensiver exprimiert sie bestimmte Moleküle (bei PMN z.B. neutrophile Adhäsionsmoleküle) an ihrer Oberfläche. Die monoklonalen, mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugierten Antikörper binden somit je nach Expression der charakteristischen Epitope stärker oder schwächer an die zu untersuchenden Zellen, und liefern dadurch höhere bzw. niedrigere Fluoreszenz-Werte, was Auskunft über den Grad der Zellaktivierung geben kann.

II.4.1 Antikörpermarkierung der Proben

II.4.1.1 Antikörperanfärbung bei PMN

Für die Anfärbung der PMN wurden sowohl 250 µl des jeweiligen Testbolus, als auch der aufgefangenen Effluatproben nach Passage durch die Herzgefäße mit je 5 µl des monoklonalen Fluoresceinisothiocyanat (FITC-) markierten CD11b Maus-Anti-Human Antikörper (AbD Serotec, Oxford, UK) auf Eis gestellt und für 20 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit FACS-Lysing Solution (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) aufgeschüttet und für 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Auf diese Weise konnten eventuell noch in der Lösung vorhandene Erythrozyten aufgelöst werden, ohne die Leukozyten zu beschädigen. Um überschüssige Antikörper und andere Verunreinigungen zu beseitigen, schlossen sich zwei Waschvorgänge mit PBS an. Die Proben wurden dafür bei 1500 U/min für je 3 min zentrifugiert, und der Überstand jeweils verworfen.

Die somit entstandenen fertigen Proben wurden kühl gelagert und innerhalb von 12 Stunden gemessen.

II.4.1.2 Antikörperanfärbung bei Thrombozyten

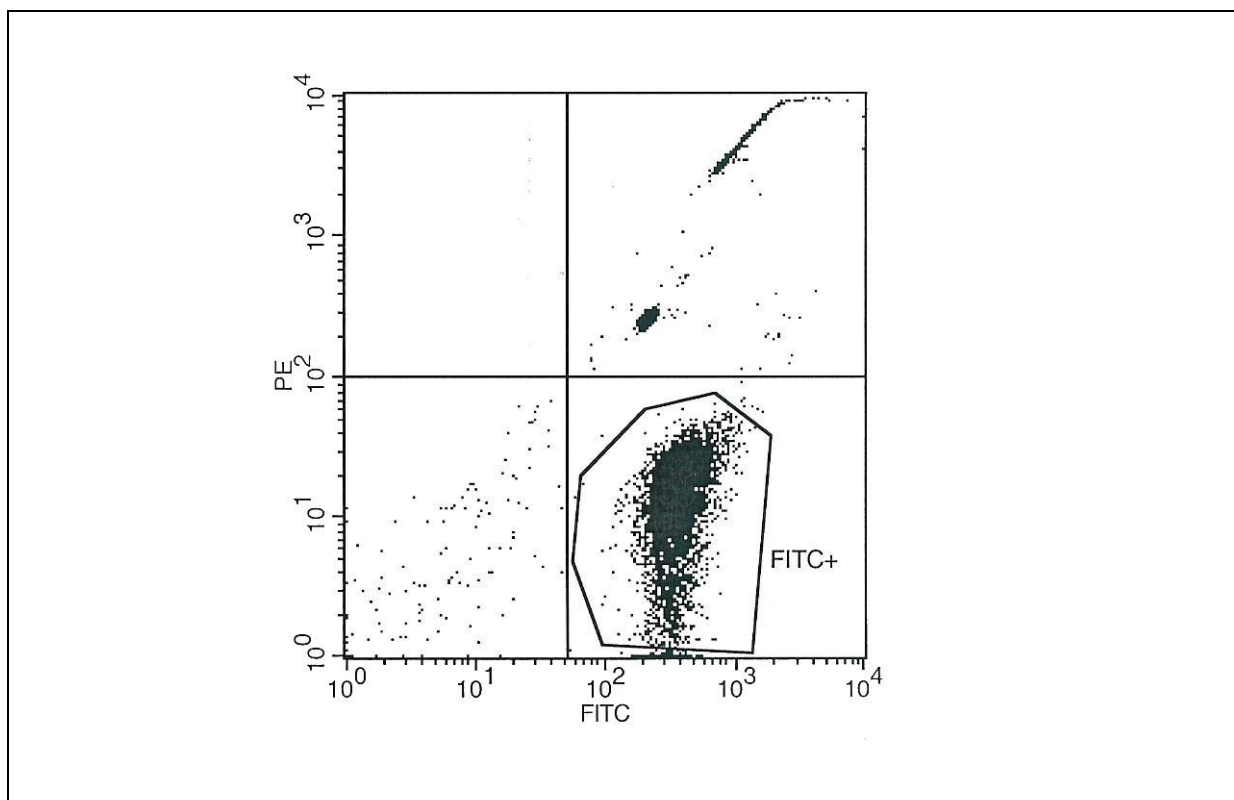
Für die Anfärbung der Thrombozyten wurde der monoklonale Antikörper Maus-Anti-Human CD41 (AbD Serotec, Oxford, UK), konjugiert mit Fluoresceinisothiocyanat

(FITC), verwendet. Es wurden jeweils 100 µl des Testbolus, als auch des nach Bolusapplikation ausgewaschenen Effluats mit je 5 µl des monoklonalen Antikörpers gemischt und in der Kühlkammer (4°-7°C) für ca. 20 min inkubiert. Es folgte die Reinigung der Proben durch Zugabe von Cellwash (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) und Zentrifugation bei 2000 x g für 3 min. Der Überstand wurde verworfen und der Waschvorgang wiederholt. Das entstandene Thrombozytenpellet wurde in 500 µl Cellwash resuspendiert und die fertigen Proben bis zum Messen noch am selben Tag im Kühlschrank aufbewahrt.

II.4.2 FACS Messung

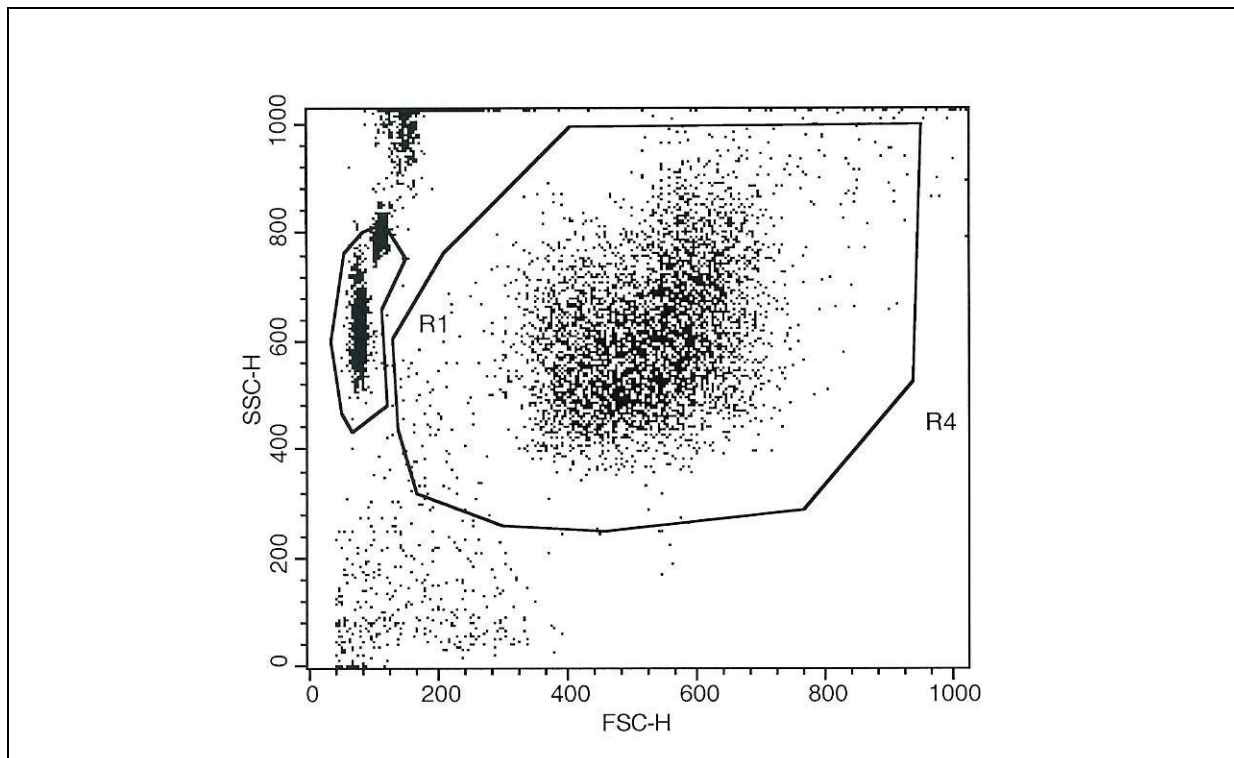
Die Messungen der angefärbten Zellsuspensionen wurden mit Hilfe der CellQuest Software (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) am angeschlossenen Computer als Dot Plots und Histogramme erfasst (siehe Abbildung 4a, 4b).

Abbildung 4a



PE: R-Phycoerythrin, Fluoreszenzfarbstoff
FITC: Fluoresceinisothiocyanat, Fluoreszenzfarbstoff
FITC+: Zellen von Interesse (Fluoresceinisothiocyanat positiv)

Abbildung 4b



FSC-H: forward scatter–height (maximale Fluoreszenzintensitätsmessung), Maß für Größe (Volumen) der Zelle

SSC-H: sideward scatter–height (maximale Fluoreszenzintensitätsmessung), Maß für Granularität der Zelle

R: region of interest, R1: counting beads, R4: PMN

Beim Dot Plot wurden die Werte des FSC gegen die des SSC aufgetragen. Die somit entstandenen Punktwolken im Punktediagramm spiegelten die einzelnen Zellpopulationen wieder. Das Histogramm diente der simultanen Erstellung der Fluoreszenzintensität 1 (FL1) für FITC konjugierte Antikörper, und gab Auskunft über das Maß der Aktivierung der damit angefärbten Zellen.

Für die Messung der Anzahl an PMN bzw. Thrombozyten in den einzelnen Proben wurden FACS-Röhrchen mit je 850 µl Cellwash vorbereitet. Vor jeder Messung wurden dann 100 µl der zu untersuchenden Probe und 50 µl CALTAG Counting Beads (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) dazu pipettiert und gut gemischt. Die Counting Beads, welche aus Partikeln drei verschiedener Größen bestehen, dienten der Vergleichbarkeit zwischen den Proben, da immer eine festgelegte Menge an Beads (10.000 Ereignisse) gemessen wurde. Für die Auswertung wurde dann die Zellpopulation von Interesse (PMN bzw. Thrombozyten) ins Verhältnis zur genauen Anzahl aufgezeichneter Counting Beads gesetzt und nach Angaben des Herstellers zur Partikel-Beladung die Menge der Zellen in der Probe ausgerechnet.

II.5 Messung der Glykokalyxbestandteile

Zum Abschätzen des Shedding von Syndecan-1 und Heparansulfat wurden Proben des koronarvenösen Effluats verwendet. Dieses wurde während der 10 minütigen Reperfusion aufgefangen und gesammelt. Somit stand ein quantitatives Maß für einen möglichen Glykokalyxschaden zur Verfügung [86].

Zur Bestimmung der Syndecan-1 Konzentration wurde der sCD138 Kit (Diacclone Research, Besancon, Frankreich) verwendet. Es handelt sich dabei um einen enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA), welcher einen festphasen monoklonalen Antikörper gegen das Epitop B-B4 und einen biotinylierten monoklonalen Antikörper gegen B-D30, die also beide gegen Syndecan-1 gerichtet sind, verwendet. In beiden Fällen fungierte Meerrettich-Peroxidase als Oxidase und Tetramethylbenzidin als Chromogen.

Die Bestimmung von Heparansulfat in den Effluatproben wurde mithilfe eines weiteren ELISA (Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan) durchgeführt. Dieser Test beruht auf zwei Antikörpern gegen für Heparansulfat spezifische Epitope [15].

II.6 Elektronenmikroskopie und Immunhistochemie

Zur elektronenmikroskopischen Darstellung der Glykokalyx wurde eine modifizierte Methode nach Vogel et al. angewandt [100]. Die isolierten Meerschweinchenherzen wurden mit einer Lanthan(III)-Nitrat-Glutaraldehyd-Lösung fixiert. Als trivalentes Kation bindet Lanthan an negativ geladene Glykoproteine und führt somit zu einer Stabilisierung der Glykokalyx. Glutaraldehyd fixiert dann die Proteinstrukturen. Die weitere Probenverarbeitung für die Elektronenmikroskopie erfolgte wie von Rehm et al. [87] beschrieben.

Für die Immunhistochemie wurden die Herzen mit 4% Formalin fixiert und in 1%iger Formaldehyd-Lösung bis zur Präparation aufbewahrt. Anschließend wurden 5 µm feine Paraffin-Schnitte angefertigt und mit monoklonalen Antikörpern gegen Heparansulfat (Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan) bzw. Syndecan-1 (Abcam, Cambridge, UK) angefärbt [15].

Diese Arbeitsschritte wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Ulrich Welsch von der Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

II.7 Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen wurden mit der Software SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc., San Jose, California, USA) ausgeführt.

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie sind als Medianwerte angegeben. Alle anderen Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

Vergleiche von zwei Gruppen wurden für unabhängige Werte durch den Mann-Whitney-U-Test, für abhängige Werte mithilfe des Wilcoxon-Tests durchgeführt. Bei Vergleichen von mehr als zwei Gruppen wurde ANOVA on ranks analysis angewendet. Post hoc Tests wurden mittels der Student-Newman-Keuls-Methode und einer Bonferroni Korrektur durchgeführt.

Ein $p < 0,05$ wurde als signifikant gewertet.

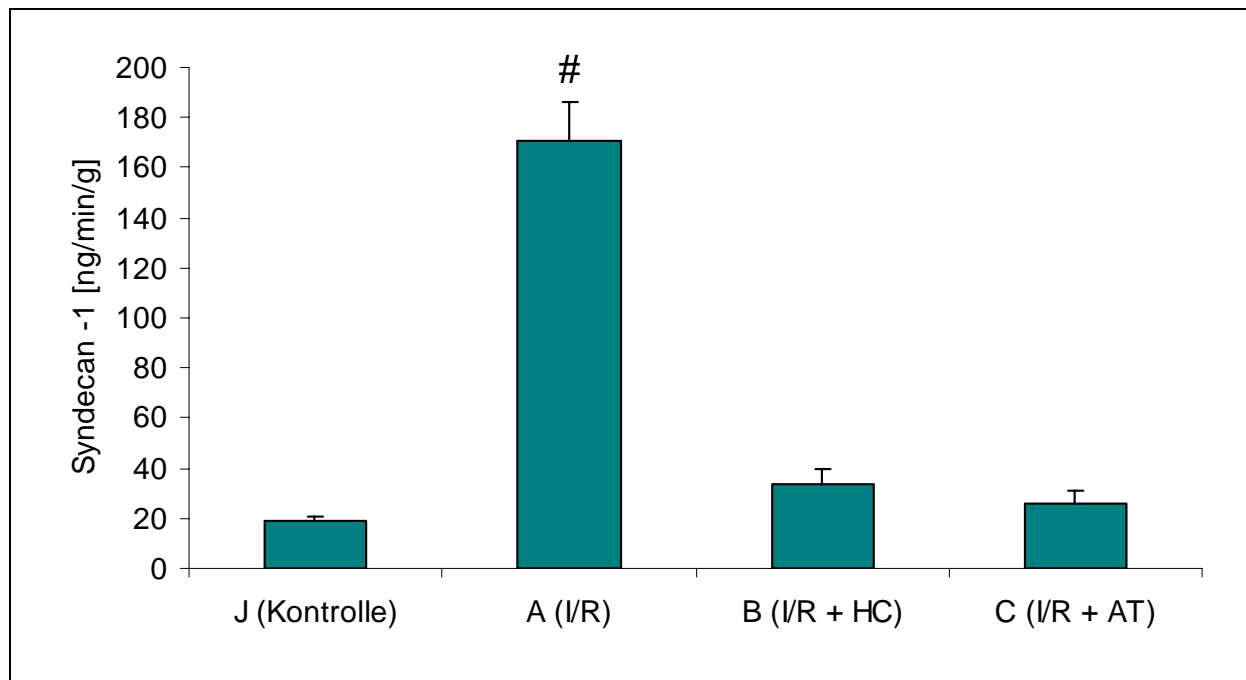
III. Ergebnisse

III.1 Messung der Glykokalyxbestandteile

III.1.1 Syndecan-1

Abbildung 5a zeigt die Abgabe von Syndecan-1 aus Herzen ohne Applikation von PMN oder Thrombozyten. Die Proben wurden während der 10 minütigen Reperfusion gesammelt.

Abbildung 5a



Freisetzung des Glykokalyxbestandteils Syndecan-1 im koronarvenösen Effluat während der 10 min Reperfusion aus Herzen ohne Ischämie (J), nach Ischämie (A) und nach Ischämie mit Applikation von Hydrocortison (B) bzw. Antithrombin (C), jeweils ohne Applikation von Zellen.

A signifikant erhöht zu B, C und J ($p < 0,01$)

Die vorbehandelten Gruppen B und C zeigen keinen signifikanten Unterschied zur Zeitkontrollgruppe J.

Geringe Mengen von CD-138 (Syndecan-1) positiver Substanzen wurden im Effluat aller perfundierten Herzen gefunden: 19 ± 2 ng/min/g (Basalwert, Gruppe J). Ischämie/Reperfusion erhöhte das Auswaschen von Syndecan-1 auf 171 ± 15 ng/min/g ($p < 0,01$ vs. Gruppe J). Die Gabe von sowohl Hydrocortison als auch Antithrombin konnte das Shedding während der Reperfusion deutlich senken: der Wert nach Hydrocortisongabe betrug 34 ± 6 ng/min/g, der Wert nach

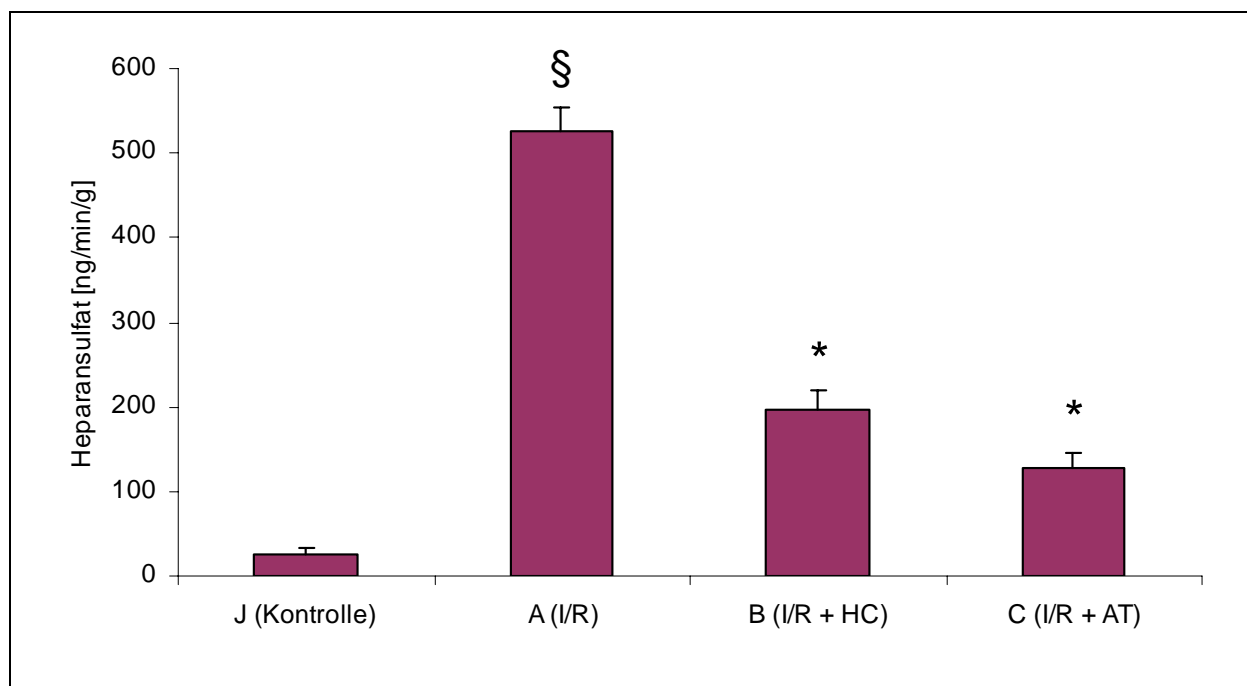
Antithrombinapplikation belief sich auf 26 ± 5 ng/min/g (Gruppe A vs. B und C $p < 0,01$). Die Werte der Hydrocortison- bzw. Antithrombingruppe zeigten somit keinen signifikanten Unterschied zum Basalwert (siehe Abbildung 5a).

Bei Kontrollen an Herzen ohne Ischämie zeigte sich keine Auswirkung auf die Ergebnisse des Glykokalyxsheddings nach Gabe von Hydrocortison bzw. Antithrombin.

III.1.2 Heparansulfat

Abbildung 5b zeigt die Abgabe von Heparansulfat aus Herzen ohne Applikation von PMN oder Thrombozyten. Die Effluatproben waren zu den gleichen Zeitpunkten gesammelt, wie die für die Syndecan-1-Messung.

Abbildung 5b



Freisetzung des Glykokalyxbestandteils Heparansulfat im koronarvenösen Effluat während der 10 min Reperfusion aus Herzen ohne Ischämie (J), nach Ischämie (A) und nach Ischämie mit Applikation von Hydrocortison (B) bzw. Antithrombin (C), jeweils ohne Applikation von Zellen.

§ A signifikant erhöht zu B und C ($p < 0,05$) und J ($p < 0,01$)

* B und C signifikant erhöht zu J ($p < 0,05$)

Heparansulfat konnte ebenfalls im Effluat aller perfundierten Herzen nachgewiesen werden (Basalwert Gruppe J: 26 ± 6 ng/min/g). Ischämie/Reperfusion (Gruppe A) führte zu einem massiven Anstieg des Sheddings von Heparansulfat: 527 ± 28 ng/min/g ($p < 0,01$ vs. Gruppe J). Während der Reperfusion zeigte sich ein

gesteigertes Ablösen von Heparansulfat von der Glykokalyx auch in Gruppen B und C verglichen zum Basalwert ($p < 0,05$). Trotzdem konnte die Applikation von Hydrocortison und Antithrombin das Shedding bei Ischämie/Reperfusion signifikant senken (Gruppe B: 196 ± 24 ng/min/g, Gruppe C: 128 ± 18 ng/min/g, Gruppe A vs. B und C $p < 0,05$).

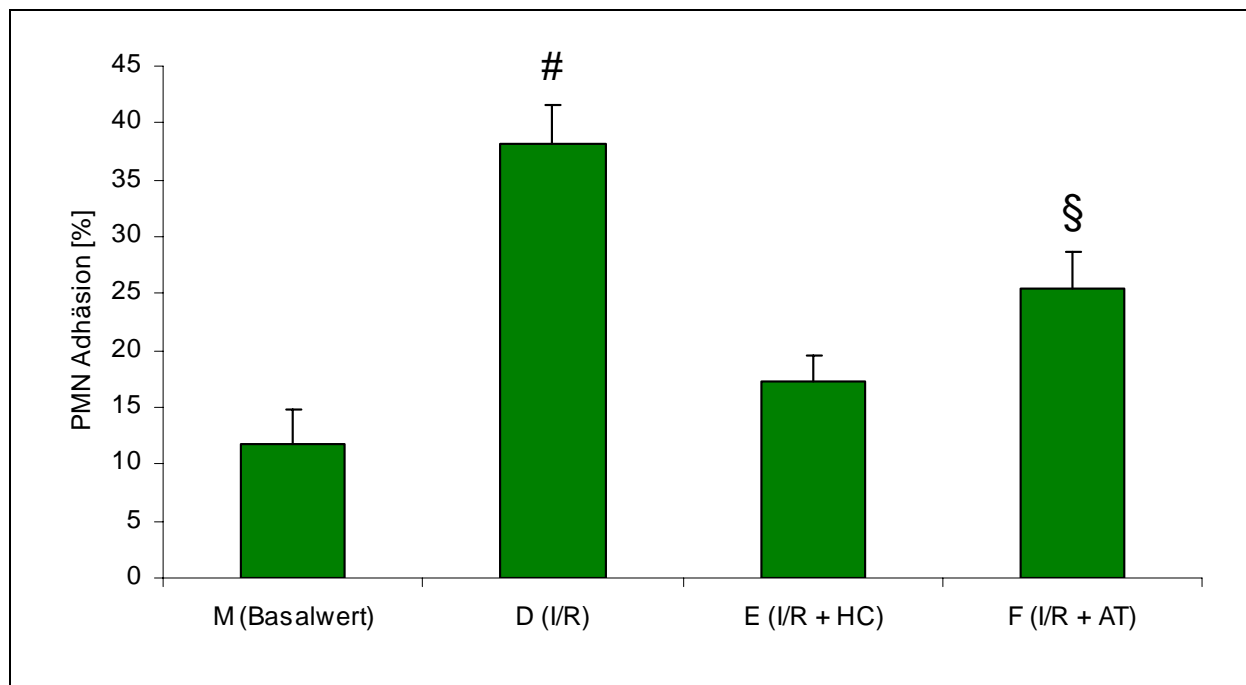
Die Gabe von Hydrocortison bzw. Antithrombin bei Versuchen an Herzen ohne Ischämie hatte keinerlei Effekt auf die Werte des Glykokalyxsheddings.

III.2 Intrakoronare Zell-Adhäsion

III.2.1 Leukozytenadhäsion

Der Basalwert der intrakoronaren Adhäsion von PMN ohne vorherige Ischämie der Herzen (Gruppe M) betrug $11,7 \pm 3,1\%$ der applizierten PMN-Menge (siehe Abbildung 6). Bei Versuchen mit vorangegangener Ischämie (Gruppe D) stieg der Anteil der adhärenenten PMN signifikant auf $38,1 \pm 3,5\%$ an ($p < 0,01$).

Abbildung 6



I/R hat die Adhäsion von PMN signifikant zum Basalwert (keine Ischämie, keine Vorbehandlung) erhöht. Die Applikation von HC bzw. AT hat die Adhäsion von PMN signifikant gesenkt, im Falle von HC sogar nahezu auf die Basalwerte ohne Ischämie

D vs. M ($p < 0,01$), E und F ($p < 0,05$)

§ F vs. M ($p < 0,05$)

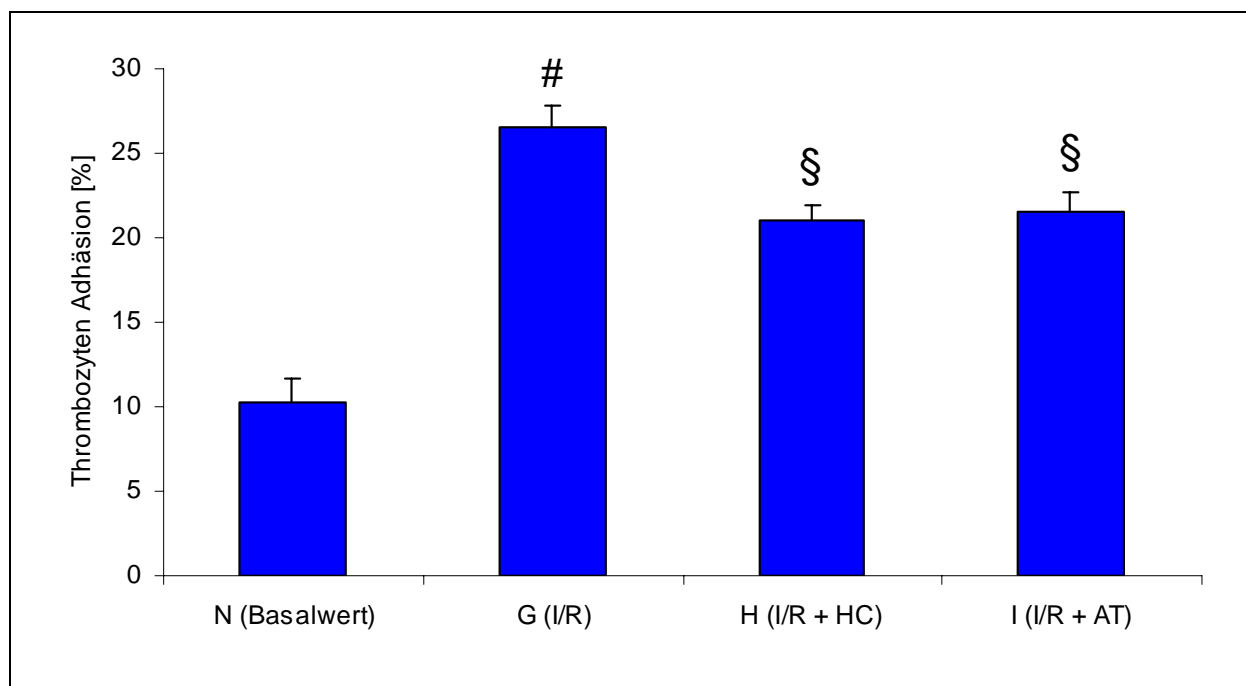
Die Vorbehandlung mit Hydrocortison senkte die postischämische intrakoronare Adhäsion signifikant in Gruppe E auf $17,3 \pm 2,2\%$ ($p < 0,05$ vs. Gruppe D) und näherte die Werte den Basalwerten ohne Ischämie nahezu an (Abbildung 6).

Die Applikation von Antithrombin (Gruppe F) senkte ebenfalls signifikant die Adhäsion im Vergleich zur Ischämie-Gruppe ohne Vorbehandlung auf einen Anteil von $25,4 \pm 3,3\%$ ($p < 0,05$ vs. Gruppe D), jedoch war die Adhäsionsrate signifikant höher im Vergleich zu den nicht ischämischen Basalwerten (Gruppe F vs. M $p < 0,05$, Abbildung 6).

III.2.2 Thrombozytenadhäsion

Die Thrombozytenadhäsion im Koronarsystem wird in Abbildung 7 wiedergegeben.

Abbildung 7



I/R hat die Adhäsion von Thrombozyten signifikant zum Basalwert (keine Ischämie, keine Vorbehandlung) erhöht. Die Applikation von Hydrocortison und Antithrombin können die Thrombozyten-Adhäsion signifikant senken, die Werte ohne Ischämie jedoch nicht annähernd erreichen.

G vs. N, H und I ($p < 0,05$)

§ H und I vs. N ($p < 0,05$)

Bei den Versuchen ohne Ischämie (Gruppe N) betrug der Anteil von adhärenenten Thrombozyten $10,3 \pm 1,4\%$ der applizierten Zahl.

Bei den Kontrollversuchen mit 20 minütiger Ischämie ohne Vorbehandlung (Gruppe G) stieg die Adhäsionsrate auf $26,6 \pm 1,2\%$ an, und war somit signifikant höher als bei den nichtischämischen Versuchen (Gruppe G vs. N, $p < 0,05$).

Die präischämische Applikation von Hydrocortison (Gruppe H) reduzierte die Adhäsionsrate der Thrombozyten auf $21,0 \pm 0,9\%$, die Gabe von Antithrombin (Gruppe I) auf $21,6 \pm 1,1\%$. Sowohl Hydrocortison als auch Antithrombin führten somit zu einer signifikanten Senkung (Gruppe H und I vs. G, $p < 0,05$) der intrakoronaren Thrombozytenadhäsion, ohne jedoch den Basalwert ohne vorherige Ischämie auch nur annähernd zu erreichen (Gruppe H und I vs. N, $p < 0,05$).

III.3 Durchflusszytometrie

III.3.1 Leukozyten

Als Maß für die Aktivierung der PMN wurde die Fluoreszenzintensität des Markers CD11b gemessen, nachdem die Zellen zuvor mit dem Antikörper gegen diese Untereinheit des Adhäsionsmoleküls MAC-1 markiert wurden.

Tabelle 2

Gruppe \ Probe	Testbolus [RU]	Nach koronarer Passage [RU]
Kontrolle (M)	$6,61 \pm 0,86$	$9,02 \pm 0,66$ #
keine Behandlung (D)	$6,59 \pm 0,61$	$8,31 \pm 0,86$ #
Hydrocortison (E)	$7,13 \pm 1,04$	$8,20 \pm 0,79$ #
Antithrombin (F)	$6,92 \pm 1,24$	$7,91 \pm 0,71$ #

Aktivierung der PMN mittels CD11b-Fluoreszenzintensität als Mittelwert \pm SEM

M: n=7; D: n=9; E, F: n=8

RU: relative units

Testbolus: Expression von CD11b auf PMN vor Applikation ins koronare System

Nach koronarer Passage: Expression von CD11b auf PMN der Effluatproben nach koronarer Passage

$p > 0,05$ vs. Testbolus, gepaarter t-Test

Die Fluoreszenzintensität bei Zellen vor koronarer Applikation (Testbolus) bewegte sich zwischen 4 und 9 relativer Einheiten (RU), wobei sich die Mediane nicht signifikant zwischen den PMN Präparationen der verschiedenen Gruppen (D, E, F und M) unterschieden.

Nach koronarer Passage war die Aktivität der PMN mit Werten zwischen 5 und 13 RU durchweg erhöht, jedoch ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

Die Mittelwerte sind in Tabelle 2 abgebildet.

III.3.2 Thrombozyten

Die Fluoreszenzintensität der Thrombozyten (mit Antikörper gegen den Aktivierungsmarker GPIIb/IIIa vorinkubiert) war bei allen Gruppen (G, H, I und N) nach koronarer Passage niedriger als zuvor (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3

Probe Gruppe	Testbolus [RU]	Nach koronarer Passage [RU]
Kontrolle (N)	375,62 ± 4,89	254,16 ± 3,62 #
keine Behandlung (G)	340,65 ± 12,38	250,25 ± 9,91 #
Hydrocortison (H)	363,59 ± 8,68	264,45 ± 6,94 #
Antithrombin (I)	373,58 ± 11,49	271,26 ± 8,96 #

Aktivierung der Thrombozyten mittels CD41-Fluoreszenzintensität als Mittelwert ± SEM

N, G: n=7; H: n=8; I: n=9

RU: relative units

Testbolus: Expression von CD41 auf Thrombozyten vor Applikation ins koronare System

Nach koronarer Passage: Expression von CD41 auf Thrombozyten der Effluatproben nach koronarer Passage

p>0,05 vs. Testbolus, gepaarter t-Test

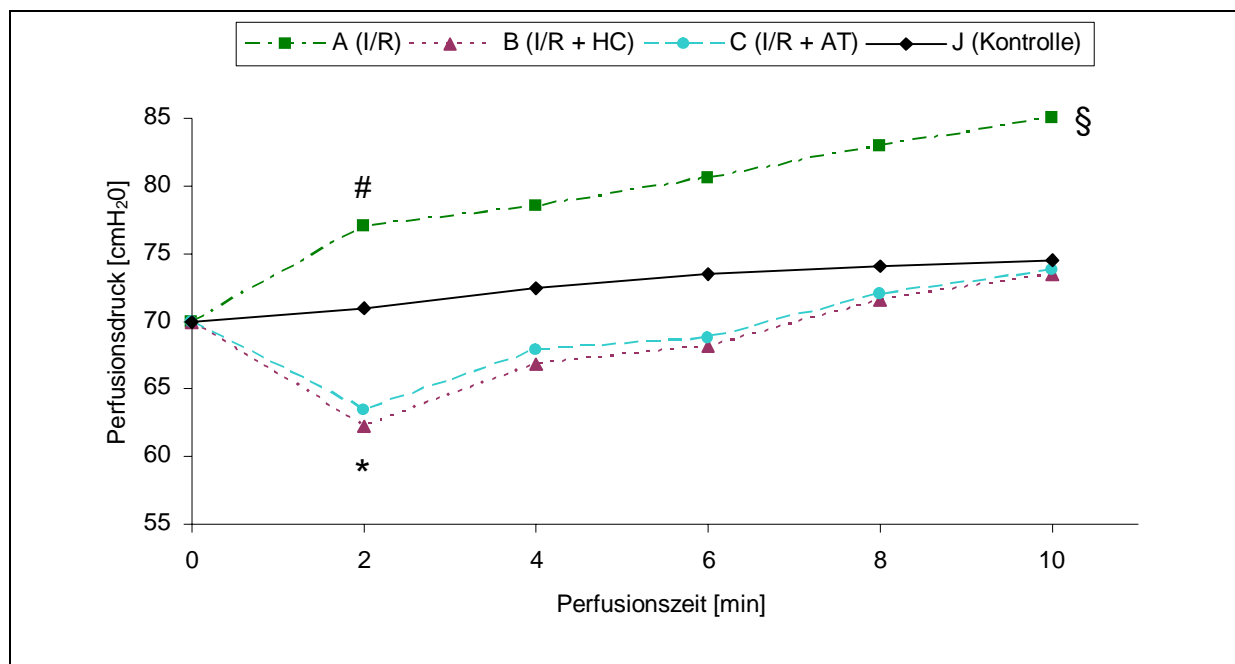
Die Werte der Testboli vor koronarer Applikation bewegten sich zwischen 289 und 421 RU, wobei sich die Mediane nicht signifikant zwischen den einzelnen Thrombozyten-Präparationen unterscheiden. Die Fluoreszenzintensität nach koronarer Passage bewegte sich zwischen 216 und 324 RU. Auch hier ergaben sich

keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen, allerdings waren die Werte innerhalb der Gruppen signifikant erniedrigt.

III.4 Perfusionsdruck

Der Koronar-Fluss wurde während der Äquilibrationsphase so angepasst, dass der Perfusionsdruck zu Versuchsbeginn konstant 70 cm H₂O betrug. Der auf diese Weise individuell eingestellte Fluss wurde dann während dem weiteren Verlauf des jeweiligen Versuches beibehalten, und Änderungen des Perfusionsdruckes gemessen.

Abbildung 8



Während der Äquilibrationsphase wurde der Koronar-Fluss so angepasst, dass präischämisch ein konstanter Perfusionsdruck von 70 cmH₂O vorlag. Nach I/R stieg der Perfusionsdruck schon in den ersten beiden Minuten an, wohingegen sich in den vorbehandelten Gruppen nach 2 min zunächst ein Druckabfall zeigte. Der Anstieg des Perfusionsdruckes nach I/R in der nicht vorbehandelten Gruppe (A) impliziert einen erhöhten koronaren Widerstand.

A vs. B und C ($p < 0,05$)

* B und C vs. J ($p < 0,05$)

§ A vs. B, C und J ($p < 0,05$)

Wie in Abbildung 8 dargestellt, lag der Perfusionsdruck in Gruppe A bereits ab den ersten beiden Minuten der Reperfusion bei $77,0 \pm 2,2$ cm H₂O ($p < 0,05$).

Im Gegensatz dazu konnten wir sowohl in der mit Hydrocortison, als auch in der mit Antithrombin vorbehandelten Gruppe einen initialen Perfusionsdruck-Abfall

beobachten (Gruppe B: $62,3 \pm 1,5$ cm H₂O; Gruppe C: $63,4 \pm 1,9$ cm H₂O; jeweils $p < 0,05$ vs. basal für die Minuten 0-2).

Mit der Dauer der Reperfusion stieg der Perfusionsdruck in allen Gruppen stetig an. Allerdings war der koronare Perfusionsdruck, und somit der Koronarwiderstand, nach 10 min in Gruppe A signifikant höher als bei den beiden vorbehandelten Gruppen B und C ($p < 0,05$).

Kontrollmessungen ohne Ischämie (Gruppen J, K, L) zeigten zwar auch die Tendenz zum Perfusionsdruckanstieg mit der Zeit (Abb. 8), jedoch gab es keine Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den vorbehandelten Gruppen (Minute 10: Gruppe J: $74,5 \pm 2,0$ cm H₂O; Gruppe K: $76,3 \pm 3,0$ cm H₂O; Gruppe L: $75,5 \pm 2,4$ cm H₂O; jeweils $p > 0,05$).

III.5 Messung der Gewebeödeme

Das Verhältnis des Gewichtes des feuchten Herzen, unmittelbar nach Beendigung des Versuches, zu dem Gewicht des trockenen Herzen, nach 24 Stunden Lagerung bei 60°C, diente der quantitativen Messung der Entstehung von Ödemen.

Der Mittelwert dieses feucht/trocken-Verhältnisses betrug bei den isolierten Herzen nach Präparation und 45 minütiger Perfusion ohne Ischämie $7,0 \pm 0,5$ ohne Vorbehandlung (Gruppe J), $7,4 \pm 0,9$ nach Hydrocortisongabe (Gruppe K) und $7,2 \pm 0,6$ nach Antithrombingabe (Gruppe L; alle $p > 0,05$).

Dieser Quotient stieg in Gruppe A nach Ischämie/Reperfusion an, was für eine signifikante Zunahme des Gewebsödems spricht (Gruppe A: $9,3 \pm 0,7$, $p < 0,05$ vs. Gruppen J, K und L).

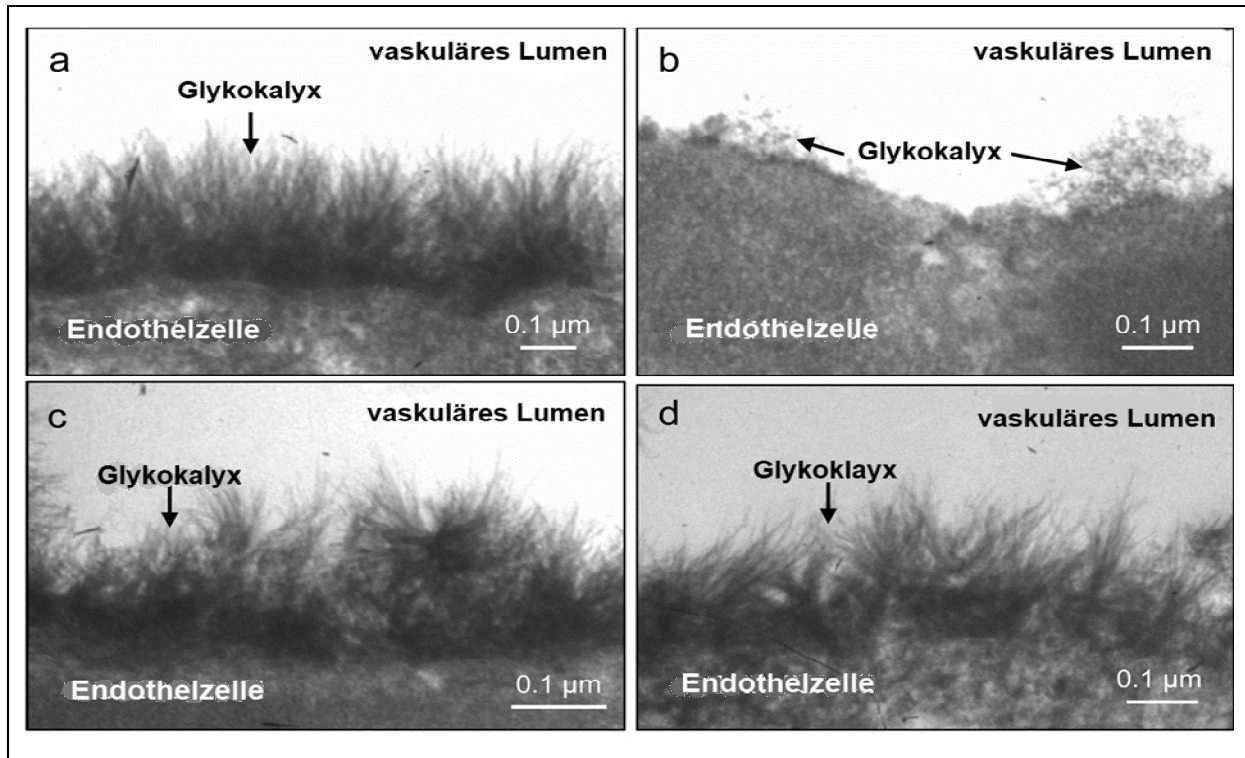
Die Gabe von Hydrocortison bzw. Antithrombin vor Induktion einer Ischämie führte zu signifikant niedrigeren Quotienten (Gruppe B: $7,9 \pm 0,3$, Gruppe C: $7,8 \pm 0,5$, beide $p < 0,05$ vs. Gruppe A), welche sich nicht signifikant von denen der Gruppen ohne Ischämie (Gruppen J-L) unterschieden.

III.6 Elektronenmikroskopie

In Abbildung 9 sind exemplarische elektronenmikroskopische Bilder der endothelialen Glykokalyx der Koronargefäße im Meerschweinchenherzen dargestellt. In den Kontrollgruppen ohne Ischämie zeigte sich eine praktisch vollständig intakte Glykokalyx (Bild 9a). In Gruppe A war postischämisch nur eine unvollständige

Restglykokalyx visualisierbar (Bild 9b). In den vorbehandelten Gruppen mit Hydrocortison (Bild 9c) und Antithrombin III (Bild 9d) war die Glykokalyx weitgehend intakt, eventuell jedoch mit reduzierter Dicke.

Abbildung 9



Elektronenmikroskopische Bilder von Meerschweinchenherzen mit fixierter endothelialer Glykokalyx, entnommen der Publikation von D. Chappell, N. Doerfler, et al. (2010).

a: Intakte Glykokalyx nach 25 minütiger Perfusion ohne Ischämie (Gruppe J).

b: Degradierete, unvollständige Restglykokalyx nach 20 minütiger Ischämie und 10 minütiger Reperfusion (Gruppe A).

c+d: Weitgehend intakte EG nach Vorbehandlung mit Hydrocortison bzw. Antithrombin während der 15 minütigen Äquilibrationsphase, 20 minütiger Ischämie und 10 minütiger Reperfusion (Gruppe B bzw. C). Die EG wirkt hier jedoch geringfügig inhomogener als in der Kontrollgruppe ohne Ischämie.

IV. Diskussion

Ischämie/Reperfusion führt nicht nur zum Shedding der endothelialen Glykokalyx, sondern auch zu einer deutlich erhöhten Adhäsion von PMN und Thrombozyten am Gefäßendothel. Diese Studie konnte belegen, dass die präischämische Applikation von sowohl Hydrocortison, als auch Antithrombin III, einen protektiven Effekt auf die Integrität der endothelialen Glykokalyx ausübt und die Adhäsion von PMN und Thrombozyten signifikant senkt.

IV.1 Methoden-Kritik

IV.1.1 Verwendung von menschlichem Spenderblut

Für alle Versuche wurden Zellen aus dem Spenderblut von freiwilligen, erwachsenen und gesunden Spendern gewonnen. Der Gebrauch von menschlichen Zellen anstatt Meerschweinchenzellen bringt mehrere Vorteile.

Erstens, durch die Verwendung nicht homologen Blutes wurden keine extra Blutspendertiere benötigt und die Zahl der in dieser Studie verwendeten Meerschweinchen war dadurch deutlich niedriger. Zweitens, monoklonale Antikörper gegen Integrinuntereinheiten CD11b und CD41 sind für menschliche Zellen erhältlich, nicht jedoch für PMN und Thrombozyten von Meerschweinchen.

Unsere Arbeitsgruppe hat bereits in früheren Experimenten zeigen können, dass PMN von Meerschweinchen und Menschen sowohl prä- als auch postischämisch mengenmäßig einen jeweils ähnlichen Grad an Adhäsion im Koronarsystem des Meerschweinchens zeigen [104].

IV.1.2 PMN-Präparation

Für die Ergebnisse der Versuche war es wichtig, dass die applizierten PMN in einem möglichst physiologischen Zustand waren. Das bedeutet, dass sie im Rahmen ihrer Präparation und Aufarbeitung so wenig wie möglich geschädigt oder aktiviert werden durften. Die von uns angewandte Methode, die PMN mithilfe magnetischer Antikörper gegen das Oberflächenantigen CD 15 zu isolieren, ist bereits seit Jahren etabliert. Zahler et al. haben gezeigt, dass diese Technik der magnetischen Separation (MACS), im Gegensatz zu älteren Methoden wie z.B. der Dichte-Gradient-Zentrifugation, nicht nur zu einer wesentlich reineren Zellpopulation, sondern auch zu

deutlich weniger präaktivierten Neutrophilen führt [103]. Zudem erfolgt die Präparation wesentlich schneller.

IV.1.3 Langendorff-Modell

Das hier verwendete Modell des isoliert perfundierten Herzen in der Anordnung nach Langendorff wird von unserer Arbeitsgruppe mit großem Erfolg zur Untersuchung der Integrität der endothelialen Glykokalyx verwendet [19], [42], [22], [87], [15], [16].

Lange Zeit wurde ausschließlich den Zellkörpern des vaskulären Endothels eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie vaskulärer Dysfunktionen zugeschrieben. Heute ist bekannt, dass die endotheliale Glykokalyx eine bedeutende Rolle bei mehreren physiologischen und pathophysiologischen Prozessen spielt [9]. Neueste Studien deuten zudem an, dass durch die Vernachlässigung der endothelialen Glykokalyx möglicherweise zahlreiche frühere Untersuchungen an glykokalyxarmen Modellen, wie z.B. Endothelzellkulturen oder isolierte, postischämische Gefäßpräparate, durchgeführt wurden [81]. Das Langendorff-Modell bietet nun die Möglichkeit, die koronaren Gefäße in ihrer physiologischen Umgebung und Einbettung unter Erhalt der fragilen endothelialen Glykokalyx zu untersuchen. Besonders für die Untersuchung der Wirkung von Medikamenten auf die endotheliale Glykokalyx stellt das isoliert perfundierte Herz ein ideales Modell dar.

Allerdings gibt es auch Nachteile. So entspricht das Modell durch Ausschaltung zahlreicher, komplexer Regelkreise im Gesamtorganismus nicht den Verhältnissen in vivo. Die Meerschweinchenherzen werden außerdem nicht mit Blut samt all seinen Bestandteilen wie z.B. Plasmaproteinen, Gerinnungsfaktoren, Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten perfundiert. Das Plasma sowie die zellulären Bestandteile könnten weitere Einflüsse auf die vorliegenden Mechanismen haben. Schließlich sind nicht alle Gefäßsysteme des Organismus identisch mit dem der Koronarien. Die gewonnenen Ergebnisse können somit nicht ohne Vorbehalt auf den menschlichen Gesamtorganismus übertragen werden [94].

IV.1.4 Herzpräparation

Bei der Präparation der Meerschweinchenherzen kommt es unvermeidlich zu einer Versorgungsunterbrechung des Myokards. Vom Zeitpunkt der Inzision beider Halsschlagadern bis zur Reperfusion mittels Krebs–Henseleit–Puffer wird das Spenderherz nicht perfundiert und demzufolge auch nicht mit Sauerstoff versorgt. Um hierbei ischämiebedingte Myokardschäden zu vermeiden wurde das Herz durch

kalte isotone Natriumchloridlösung (4°C) heruntergekühlt und somit der Energieverbrauch stark gesenkt. Die Zeitspanne des dadurch induzierten Herzstillstandes bis zur artifiziellen Perfusion wurde so kurz wie möglich gehalten, im Mittelwert waren es ca. 3 min. Somit sollte kein nennenswerter Ischämie/Reperfusionsschaden hervorgerufen worden sein.

Um stabile Konditionen zu erreichen folgte der Präparation eine 15 minütige Äquilibrierungsphase, in welcher sich die Herzen vom Präparationsstress erholen und „einschlagen“ konnten. Erst nach Einstellung dieses Steady States wurde mit dem eigentlichen Versuchsprotokoll begonnen. Dennoch war es wichtig „Zeitkontrollen“ mit durchzuführen, da das Präparat nur mit der rein salinen Pufferlösung und nur mit physikalisch gelöstem Sauerstoff versorgt wurde.

IV.1.5 Versuchsprotokoll

Die Dauer der Ischämiephase wurde auf 20 Minuten festgelegt. Dies entspricht neueren Erkenntnissen von Chappell et al. [19], die zeigten, dass eine 37°C warme no-flow Ischämie dieser Dauer ausreicht, um bei isolierten Meerschweinchenherzen eine nahezu vollständige Zerstörung der endothelialen Glykokalyx zu induzieren.

Für die Quantifizierung der tatsächlich injizierten Zellen (Input) wurde ein Testbolus jeder der vorbereiteten Zellsuspensionen gewonnen. Um möglichst gleiche Bedingungen zu gewährleisten, wurde dieser unmittelbar vor der koronaren Applikation über dieselbe Infusionspumpe und Kanüle mit gleicher Flussrate über die gleiche Zeit (1 min) in ein Falcon-Röhrchen injiziert. Um einen möglichen Zellverlust, bedingt durch das Einstechen der Injektionsnadel in die Aortenkanüle im Versuch, auszugleichen, wurde ein vergleichbarer Einstichwiderstand der Testbolusinjektion vorangeschaltet. Hierfür wurden zwei Schichten Paraffinfolie über das Testbolus-Röhrchen gespannt.

Um die genaue Anzahl der PMN und Thrombozyten die die Koronarien verlassen (Output) zu bestimmen, wurde das koronare Effluat während der Bolusapplikation und in den darauffolgenden 3 Minuten kontinuierlich aufgefangen. Frühere Versuche hatten gezeigt, dass nach dieser Zeitspanne nur noch eine vernachlässigbar kleine Zahl der applizierten Zellen ausgewaschen wird [104].

IV.1.6 Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

Die Durchflusszytometrie ist eine schnelle Methode zur standardmäßigen Analyse, Sortierung und Zählung von Zellpopulationen bzw. Partikeln, indem sie simultan morphologische Eigenschaften, aber auch spezielle Fluoreszenzen misst [90].

Das FACS kann bis zu mehrere Tausend Zellen pro Sekunde messen, was einen Vorteil gegenüber der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie darstellt. Allerdings liegt hier auch ein Nachteil des Durchflusszytometers. Wird die Durchflussrate zu groß, kann es sein, dass einzelne Zellen nicht erfasst oder zwei Zellen so dicht nacheinander durchgeschleust werden, dass sie nicht unterschieden werden können und somit beide nicht erfasst werden. Um diese Ungenauigkeit möglichst gering zu halten, wurde die Messrate auf maximal 5000 Ereignisse pro Sekunde beschränkt.

Außerdem kann das FACS nicht zwischen den Zellen von Interesse und Partikeln (z.B. Zellreste oder Verunreinigungen), die eventuell die gleichen Lichteigenschaften aufweisen, differenzieren [24]. Thrombozyten sind sehr kleine „Zellen“, daher besteht die Gefahr, dass kleine Fremdpartikel oder Zellreste in derselben Population aufgezeichnet werden. Um dem vorzubeugen wurden die Thrombozyten mit einem für sie spezifischen Marker (CD41) angefärbt und nur CD41 positive Ereignisse gemessen.

Die Aktivitäts-Messung anhand immunologischer Marker zeichnet sich besonders durch ihre hohe Sensitivität, selbst bei niedrigem Aktivierungs-Level aus. Auf der Oberfläche exprimierte Antigene können nach Stimulation quantitativ vermehrt, wie z.B. CD41 (GpIIb/IIIa) und CD11b präsentiert und zum Aktivierungsnachweis herangezogen werden [33], [74], [75], [54].

Um möglichst repräsentative Ergebnisse zu bekommen war es nötig, einen standardisierten Vorgang einzuhalten sowie die Proben zügig zu verarbeiten und zu messen. Die in Vorversuchen etablierten Voreinstellungen des FACS-Gerätes wurden gespeichert und bei jedem Versuch verwendet.

IV.2 Analyse der Ergebnisse

IV. 2.1 Shedding von Glykokalyxbestandteilen

Mittels ELISA konnten im koronarvenösen Effluat Syndecan-1 und Heparansulfat, zwei Hauptbestandteile der Glykokalyx, nachgewiesen werden.

Ein Blick auf die Ergebnisse zeigt deutlich, dass Ischämie/Reperfusion zu einer erhöhten Abspaltung dieser Bausteine, dem sogenannten Shedding, geführt hat. So war der Syndecan-1 – Wert postischämisch auf das ca. 9-fache, der Heparansulfat-Wert auf das ca. 20-fache erhöht. Die durch Ischämie induzierte Zerstörung und Ablösung der endothelialen Glykokalyx führt zu deren Funktionsverlust, was eine Vielzahl von Störungen und Komplikationen nach sich zieht [18].

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass sowohl die frühzeitige Gabe von Hydrocortison, als auch Antithrombin eine protektive Wirkung auf die endotheliale Glykokalyx haben. Die gemessenen Syndecan-1 – Werte in den entsprechenden Gruppen zeigten keinen signifikanten Unterschied zu der Gruppe ohne Ischämie. Die Heparansulfatkonzentrationen waren hingegen signifikant höher zum Basalwert, konnten aber dank Hydrocortison und Antithrombin zur Kontrollgruppe mit Ischämie signifikant gesenkt werden.

Die Abspaltung von Heparansulfat hat großen Einfluss auf die dreidimensionale Struktur und Ausdehnung der Glykokalyx: Verlust der stark elektrisch-negativ geladenen Seitenketten der Glykokalyx führt zu einem Kollaps der Struktur [41].

IV.2.2 Verhalten von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten

IV.2.2.1 PMN-Adhäsion

Der Anstieg an adhärenenten PMN bei Passage des Koronarsystems postischämisch um das 3-fache zum Basalwert zeugt von einem deutlichen Ischämie/Reperfusionsschaden. Ähnlich wie auch bei entzündlichen Ereignissen wird während einer Ischämie die endotheliale Glykokalyx strukturell vermindert [86], was dazu führt, dass Adhäsionsmoleküle exponiert und aktiviert werden. PMN und andere Zellen binden an diese und wandern ins Gewebe ein.

Sowohl die Vorbehandlung mit Hydrocortison als auch Antithrombin führte zu einer signifikanten Abnahme des Anteils an adhärenenten PMN. Die Gabe von Hydrocortison

konnte dabei den besten Effekt erzielen und senkte die Adhäsionsrate auf Werte die keinen signifikanten Unterschied zu den Basalwerten zeigten. Dies unterstützt die Untersuchungsergebnisse von Chappell et al. welche zeigten, dass Hydrocortison die endotheliale Glykokalyx schützen kann [19]. Da aber keine Konzentrations-Wirkungsbeziehung für Antithrombin untersucht wurde, ist es möglich, dass andere – vor allem höhere Gaben – so wirken wie Hydrocortison.

IV.2.2.2 PMN-Aktivität

Die Höhe der Aktivierung der PMN wurde anhand der Signalstärke von fluoreszierenden monoklonalen Antikörpern, gebunden an CD11b, mithilfe eines FACScan-Gerätes gemessen. Es konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass das Ausmaß der Expression neutrophiler Adhäsionsmoleküle, besonders der Integrin-Untereinheit CD11b, als Marker für den Grad der zellulären Aktivierung bei PMN bestens geeignet ist [6], [54].

Obwohl sich die mediane Fluoreszenzintensität zwischen den PMN-Präparationen der verschiedenen Gruppen basal nicht signifikant unterschied, wurden die individuellen Prozent-Differenzen der CD11b Expression nach koronarer Passage dennoch einzeln für jedes Experiment berechnet. Es wurde erhofft, damit auch noch kleinste Änderungen der PMN-Aktivität wahrzunehmen.

Wenn man davon ausgeht, dass aktivierte PMN vermehrt am koronaren Endothel haften bleiben sollten, verwundert es, dass in allen Gruppen nach koronarer Passage die Expressionswerte von CD11b leicht gestiegen sind. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass primär adhärierte PMN sich wieder gelöst haben und ausgewaschen wurden. Alternativ kann vermutet werden, dass tatsächlich alle PMN eine gewisse, verstärkte Aktivierung erfahren haben, wobei die besonders reaktiven tatsächlich hängen geblieben sind. Da in den mit Hydrocortison und Antithrombin vorbehandelten Herzen absolut weniger PMN adhärent wurden bedeutet dies, dass mit intakter Glykokalyx die intravaskuläre Stimulation von Leukozyten geringer ausfällt.

IV.2.3 Verhalten von Thrombozyten

IV.2.3.1 Adhäsion

Die Ergebnisse der Thrombozytenadhäsion zeigen mit einer um 150% zum Basalwert gesteigerten Adhäsionsrate deutlich, dass es durch Ischämie/Reperfusion zu einer endothelialen Dysfunktion kommt. Die postischämische Reperfusion ist bekannt dafür eine inflammatorische Reaktion mit Pathomechanismen der Aktivierung und Rekrutierung von Leukozyten, genauso wie der Akkumulierung von Plättchen, zu provozieren [64].

Wie bei den Versuchen mit den PMN konnte sowohl die präischämische Gabe von Hydrocortison, als auch Antithrombin, den Anteil an adhärenenten Thrombozyten signifikant senken. Im Gegensatz zu den PMN gab es jedoch keinen Unterschied zwischen den beiden Substanzen und die Adhäsionsrate blieb signifikant höher als in der Basalwertgruppe ohne Ischämie. Daraus kann gefolgert werden, dass auch bei teilweisem Erhalt der Glykokalyx in postischämischen Herzen die Thrombozyten eine erleichterte Adhäsion bzw. Zugang zu Adhäsionsstellen an der Gefäßwand finden.

IV.2.3.2 Aktivität

Um die Aktivität der Thrombozyten zu messen wurde die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche mittels FITC-konjugierter Antikörper beurteilt. Als Marker eignete sich das Glykoprotein GpIIb/IIIa (CD41), da dieses Molekül nur auf Plättchen vorkommt und dort in den α -Granula gespeichert vorliegt. Bei Aktivierung wird es sehr rasch an die Plättchenoberfläche externalisiert.

Es zeigte sich homogen in allen Gruppen nach koronarer Passage eine verminderte Oberflächenexpression im Vergleich zu den Ausgangswerten. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass aktivierte Thrombozyten mit hoher Expression an CD41 am Endothel haften bleiben und nicht, oder erst zu einem späteren Zeitpunkt, ausgewaschen werden. Der Umstand, dass es in der Basalwertgruppe ohne Ischämie ebenfalls zu einer Abnahme der Aktivität gekommen ist, entspricht der Tatsache dass es auch hier eine Adhäsionsrate von ca. 10% gab. Sollte ein „Rollen“ von Plättchen auf der Glykokalyx möglich sein, dürfte die Bindung von GpIIb/IIIa an geeignete Partnerliganden, wie z.B. dem endothelialen von Willebrand – Faktor, möglich sein und das Ausmaß der Plättchenadhäsion eher vom Aktivierungsgrad der Endothelzelle unmittelbar abhängen.

IV.2.4 Elektronenmikroskopie

Insgesamt wurde nur jeweils ein exemplarisches Herz aus den Gruppen A, B und C der Elektronenmikroskopie zugeführt. Dennoch bestätigen die elektronenmikroskopischen Bilder der endothelialen Glykokalyx den Eindruck der protektiven Wirkung von Hydrocortison und Antithrombin. Ischämie/Reperfusion führte zu einem nahezu kompletten Abbau dieser das Endothel bedeckenden Schicht. Auf den Aufnahmen der Herzen nach Hydrocortison- bzw. Antithrombin-Applikation hingegen zeigt sich deutlich, dass trotz induzierter Ischämie die Dicke der endothelialen Glykokalyx zwar reduziert wurde, ihre Struktur jedoch erhalten ist.

IV.2.5 Perfusionsdruck

Da der koronare Fluss, der für jeden Versuch individuell eingestellt wurde, während der gesamten Versuchsdauer beibehalten wurde, handelte es sich um eine flusskonstante Versuchsanordnung. Veränderungen des koronaren Widerstandes spiegeln sich demzufolge in Änderungen des Perfusionsdruckes wieder, und konnten so leicht gemessen werden.

Der signifikante Anstieg des Perfusionsdruckes nach Ischämie/Reperfusion widerspricht deutlich dem, was einer reaktiven Hyperämie entsprechen würde. Dieser Druckanstieg bedeutet einen erhöhten koronaren Widerstand. Zwei Gründe dafür liegen auf der Hand: Durch die ischämisch bedingte Zerstörung der Glykokalyx kommt es zu einem erheblichen Gewebeödem [19], was wiederum einen erhöhten Perfusionsdruck hervorruft. Eine weitere Erklärung für die Zunahme des Perfusionsdruckes stellt die Tatsache dar, dass die schubspannungsbedingte NO-Produktion bei zerstörter endothelialer Glykokalyx reduziert ist [45], und somit ein wichtiger vasodilatatorischer Botenstoff wegfällt.

Die Ergebnisse in den Gruppen mit Ischämie und Hydrocortison- bzw. Antithrombin-Behandlung legen auch hier eine protektive Wirkung dieser Substanzen auf die endotheliale Glykokalyx nahe. Die weitgehend unversehrte endotheliale Glykokalyx behält ihre schützenden Funktionen und das Gefäß ist in der Lage mit einer reaktiven Vasodilatation zu antworten, was zu dem initialen Abfall des Perfusionsdruckes führt. Auch am Ende der Versuchsphase (10 min) blieben die koronaren Widerstandswerte in den Gruppen mit Vorbehandlung (Gruppen B und C) deutlich unter denen der Kontrollischämie-Gruppe (A).

IV.3 Glykokalyx-Protektion durch Hydrocortison

Steroide, wie z.B. Hydrocortison, werden seit Jahrzehnten zur Unterdrückung von entzündlichen Prozessen benutzt, und es gibt mittlerweile reichlich Hinweise darauf, dass sie einige Mechanismen, die zum Ischämie/Reperfusionsschaden beitragen, reduzieren können. So wurde die Leukozyten-Adhäsion, induziert durch Adrenalektomie, mittels einer Hydrocortison-Therapie reduziert, was nahe legt, dass es eine Verbindung zwischen dem Steroid-Spiegel und der Leukozyten-Adhäsion gibt [57]. Auch Suzuki et al. haben gezeigt, dass Hydrocortison das Ausmaß der Histamin-induzierten Leukozyten-Adhärenz senkt [95].

Durch eine Ischämie am Herzen kommt es zur Degranulation von Mastzellen, was wiederum zu einer Freisetzung von Entzündungsmediatoren, Histamin und Enzymen führt [34], [7], welche unter anderem Glykokalyx spaltend wirken können. Durch seine antiinflammatorische Wirkung verhindert Hydrocortison vermutlich die Degranulation von Mastzellen und inhibiert somit auch die Histamin- und Heparanase-Ausschüttung, was eine Komponente der protektiven Wirkung dieser Substanz auf die endotheliale Glykokalyx darstellen könnte [19].

In Mastzellen kommen nicht nur große Mengen an Histamin vor, sondern sie speichern auch etliche Proteasen und Lyasen wie z.B. Chymase, Heparanase und Tryptase [14], [7]. Es ist also davon auszugehen, dass die Stabilisation der Mastzellen und die Prävention der Degranulation und Blockade der Synthese zahlreicher Chemokine und Zytokine [66], auch proteolytischen Schaden am Gewebe und der endothelialen Glykokalyx verhindern kann. Die protektive Wirkung von Hydrocortison auf die postischämische endotheliale Glykokalyx scheint somit mechanistisch sehr gut begründet.

IV.4 Glykokalyx-Protektion durch Antithrombin III

Serinproteasen nehmen an einer großen Vielzahl von Funktionen im Körper teil, wie z.B. Blutgerinnung, Immunität und Inflammation. Als physiologischer Serinproteaseninhibitor hat Antithrombin III somit ein breites Spektrum an Angriffspunkten und hemmt u. a. Plasmin, Thrombin, Proteinase-3, Elastase und eventuell Tryptase.

Ein vermuteter Wirkmechanismus von Antithrombin III besteht in einer Stimulation der endothelialen Prostazyklinproduktion. Prostazyklin unterbindet die Leukozyten–

und Thrombozytenaktivierung und führt zu einer Minderung von Gefäßschäden [89]. In der Literatur ist beschrieben, dass die Zufuhr von Antithrombin III in Niere [79], Lunge [92] und Darm [80] Schäden, bedingt durch Ischämie/Reperfusion, mildert. Dieser Schutz wurde größtenteils auf die Freisetzung von Prostazyklin, vermittelt durch Antithrombin III-Interaktionen mit Heparin-ähnlichen Glykosaminoglykanen [76], die einen wichtigen Bestandteil der vitalen endothelialen Glykokalyx darstellen, bezogen und den antiinflammatorischen Effekten zugeschrieben. Da in unserem verwendeten Modell weder Plasma noch inflammatorische Zellen vorhanden waren, muss Antithrombin III hier über andere Mechanismen gewirkt haben. Wir wissen nicht genau welche Protease für das postischämische Shedding der endothelialen Glykokalyx verantwortlich ist. Allerdings haben vorausgehende Studien gezeigt, dass es im Myokard zu Anstiegen der Trypsin- und Cathepsin B-Aktivität kommt [19]. Jochum et al. haben gezeigt, dass sich bei septischen Patienten unter Antithrombin III-Therapie deutlich niedrigere Plasmakonzentrationen von inflammatorischen Mediatoren finden, was dafür spricht, dass Antithrombin III die Aktivierung von Leukozyten und somit die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine inhibiert [48]. Bei kritisch kranken Patienten mit schwerer Sepsis fällt die Blutkonzentration von Antithrombin III auf 30-40% des Normalwertes. Dabei korreliert die Menge an AT III negativ mit der Schwere der Krankheit [91]. Interessanterweise haben immunhistologische Aufnahmen gezeigt, dass infundiertes Antithrombin III an den Wänden von Gefäßen jeden Kalibers mit intakter Glykokalyx lokalisiert ist, bedingt durch die Tatsache, dass Antithrombin III an Heparansulfat, einem der Hauptbestandteile der endothelialen Glykokalyx, bindet [89]. Im Gegensatz dazu wird bei abgetragener Glykokalyx Antithrombin III hauptsächlich im interstitiellen Gewebe gefunden.

IV.5 Bedeutung der Resultate und Perspektiven

So wenig Bedeutung man der Glykokalyx nach ihrer Entdeckung beigemessen hatte, so deutlich wurde ihre Relevanz für den komplikationslosen Ablauf einer Vielzahl von physiologischen Funktionen in den letzten Jahren. Allerdings steht die Wissenschaft noch am Anfang ihrer Erkenntnisse [8].

Eine zentrale Rolle spielt die endotheliale Glykokalyx für die vaskuläre Barrierefunktion. Ihre Lage zwischen dem fließenden Blut und dem Endothel

prädestiniert dafür, die vaskuläre Permeabilität zu beeinflussen [39], [99]. Laut dem „Double-Barrier-Konzept“ von Rehm et al. dient die endotheliale Glykokalyx neben der Endothelzelle selbst als zweite funktionelle Schranke [87]. Bereits für Proteine mit einem Molekulargewicht von > 50 kDa stellt sie eine nahezu unpassierbare Barriere dar [97]. So sorgt sie durch selektive Proteinfiltration für das Entstehen und Aufrechterhalten eines kolloidosmotischen Konzentrationsgradienten zwischen Gefäßlumen und Glykokalyx-Unterseite [2] und wirkt dem Ausstrom von Wasser und Proteinen in den extravasalen Raum entgegen [99], [18]. Verantwortlich dafür ist ihre stetige Interaktion mit Plasmaproteinen [1], [42], [93] und ihre stark negative Ladung, bedingt durch ihren hohen Anteil an Glykosaminoglykanen.

Klinisch relevant sind Veränderungen der endothelialen Glykokalyx, da durch die Abnahme ihrer Dichte eine erhöhte Permeabilität der Gefäßwand für Makromoleküle resultiert [9] und bei Abbau die Endothelzellmembran samt ihrer Rezeptoren wie Adhäsionsmoleküle freigelegt wird [88], [102]. Physiologischerweise liegt die Endothelzellmembran samt ihrer Adhäsionsmoleküle (maximale Extension ca. 20 nm) unter einer intakten Schicht der endothelialen Glykokalyx (200 – 2000 nm) im Verborgenen und hat keinerlei Kontakt zu dem vorbei fließenden Blut [102]. Eine direkte Interaktion zwischen den in die endotheliale Glykokalyx gebetteten Adhäsionsmolekülen und den zellulären Bestandteilen des Blutes wird erst bei einer Degradation der schützenden Schicht möglich, d.h. erst dann kommt es zur Adhäsion inflammatorischer Zellen [35], [40], [19], [42]. Die Adhäsion wird durch abgespaltene Heparansulfate über verstärkte Chemotaxis und einen positiven Feedback-Mechanismus noch verstärkt [10]. Mit der endothelialen Dysfunktion gehen außerdem eine Verschiebung von Flüssigkeit in den interstitiellen Raum, bis hin zur Bildung generalisierter Ödeme [18], [20], [43], [44] und konsekutive Entzündungsreaktionen einher.

Eine wichtige Ursache für die Zerstörung der endothelialen Glykokalyx stellt die Ischämie/Reperfusion mit all ihren begleitenden Komplikationen, wie z.B. Inflammation, dar. Da eine Ischämie nicht immer vermieden werden kann, wären Mechanismen, welche das Ausmaß des Folgeschadens begrenzen, sehr wertvoll.

Bereits 1986 haben Murry und Kollegen erstmals gezeigt, dass kurze Episoden koronarer Ischämie die Infarktgröße einer anschließenden prolongierten Myokardischämie signifikant reduzieren können [68]. Dieser Mechanismus der sogenannten Präkonditionierung wurde in den letzten Jahren ausführlich untersucht,

und es konnte festgestellt werden, dass auch andere Reize als Ischämie dazu in der Lage sind. Zu wirksamen Präkonditionierern gehören u. a. Acetylcholin, Bradykinin [53] oder auch volatile Anästhetika wie Sevofluran [25], [38], [25], [50], [96]. Aufgrund der hier dargestellten Befunde dürften nun auch Glukokortikoide oder Serinproteaseninhibitoren vor Ischämie/Reperfusionsschäden im Sinne einer Präkonditionierung schützen können.

Diese Studie hat gezeigt, dass sowohl Hydrocortison als auch Antithrombin eine protektive Wirkung auf die endotheliale Glykokalyx ausüben. Interessanterweise haben Hydrocortison und Antithrombin in Kontrollversuchen ohne Ischämie keinen Einfluss auf das spontane Glykokalyx-Shedding oder die Basaladhäsion von PMN gehabt. Dies spricht dafür, dass die Unversehrtheit der endothelialen Glykokalyx einen signifikanten Einfluss auf die Pathophysiologie der Zelladhäsion hat.

Der Erhalt und Schutz der endothelialen Glykokalyx könnte somit eine entscheidende Maßnahme für die Vermeidung von Ischämie/Reperfusionsschäden, vermittelt durch inflammatorische Leukozyten und Plättchenaggregation, darstellen.

In klinischen Studien wird man das Potenzial und die Auswirkungen unserer Ergebnisse untersuchen müssen.

V. Zusammenfassung

Die Adhäsion von Leukozyten und Plättchen an die koronare Gefäßwand besitzt eine zentrale Bedeutung bei der Entstehung von Ischämie/Reperfusionsschäden beim Infarkt. Dem zugrunde liegt eine endotheliale Dysfunktion. In den letzten Jahren immer wichtiger geworden ist dabei eine Berücksichtigung der endothelialen Glykokalyx, eine alle gesunde Gefäße auskleidende Schicht mit zahlreichen Funktionen und Aufgaben. Durch Ischämie/Reperfusion [86], TNF- α [17] oder Lipopolysaccharide [60] kommt es zu einer entzündlichen Reaktion und Schädigung bzw. Abtragung der endothelialen Glykokalyx. Als Folge davon kommt es zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität mit Gewebsödemen [18] und vielen weiteren Komplikationen. Der Schutz der endothelialen Glykokalyx ist somit von großem Interesse.

Unsere Studie hat untersucht, ob der Schutz der Glykokalyx durch Hydrocortison bzw. Antithrombin III die postischämische Leukozyten- und Thrombozyten-Adhäsion reduzieren kann. Dafür wurden Versuche an isoliert perfundierten Meerschweinchenherzen durchgeführt. Das verwendete modifizierte Langendorff-Modell ist dafür eine etablierte und ideale Methode, besonders für die Untersuchung der Wirkung von Medikamenten auf die endotheliale Glykokalyx.

Ischämie/Reperfusion führte zu einem massiven Shedding der koronaren endothelialen Glykokalyx und zu einem signifikanten Anstieg der Adhäsionsrate von injizierten Leukozyten und Thrombozyten (von 12% auf 38% bzw. von 10% auf 26%). Durch die Gabe von Hydrocortison und Antithrombin konnte eine signifikante Reduktion der Schädigung der endothelialen Glykokalyx und ein signifikant niedrigerer Anteil an adhärenenten Zellen erreicht werden. Nach Applikation von Hydrocortison konnten in der PMN-Gruppe sogar vergleichbare Werte zur Kontrollgruppe ohne Ischämie gemessen werden.

Die Studie hat zudem gezeigt, dass Hydrocortison und Antithrombin III ihre protektive Wirkung über den Schutz der endothelialen Glykokalyx ausüben, da ihre Verwendung in Versuchen ohne Ischämie keinen Einfluss auf die Adhäsions-Ergebnisse hatte. Überraschenderweise war der Erfolg der Glykokalyxprotektion durch Hydrocortison und Antithrombin auf die Plättchenadhäsion deutlich geringer als bei den neutrophilen Granulozyten. Diese Beobachtung kann derzeit noch nicht experimentell erklärt werden.

Die Erhaltung der endothelialen Glykokalyx, die damit verbundene Inhibition von Leukozyten- und Thrombozyten-Adhäsion und die Erhaltung der vaskulären Barriere mit Prävention von interstitiellen Ödemen, deuten ein beträchtliches Potenzial in der Prophylaxe von Ischämie/Reperfusionsschäden an.

VI. Abkürzungsverzeichnis

A.:	Arteria
Abb.:	Abbildung
ACTH:	Adrenocorticotropes Hormon
ANP:	atriales natriuretisches Peptid
AT:	Antithrombin III
BSA:	bovines Serumalbumin
C:	Celsius
CaCl ₂ :	Calciumchlorid
CO ₂ :	Kohlendioxid
d.h.:	das heißt
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
EG:	endotheliale Glykokalyx
ELISA:	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESL:	Endothelial Surface Layer
FACS:	fluorescence activated cell sorting
FITC:	Fluoresceinisothiocyanat
FSC:	forward scatter
HC:	Hydrocortison
H ₂ O:	Wasser
I:	Ischämie
ICAM:	interzelluläres Adhäsionsmolekül
KCl:	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄ :	Kaliumdihydrogenphosphat
l:	Liter
LDL:	Low Density Lipoprotein
MACS:	magnetic cell separation System
MgCl ₂ :	Magnesiumchlorid
MgSO ₄ :	Magnesiumsulfat
min:	Minute
ml:	Milliliter
n:	Anzahl der Versuche
NaCl:	Natriumchlorid
NaHCO ₃ :	Natriumhydrogencarbonat

Na ₂ HPO ₄ :	Natriumdihydrogenphosphat
nm:	Nanometer
O ₂ :	Sauerstoff
PBS:	phosphatgepufferte Salzlösung
PMN:	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
R:	Reperfusion
RU:	relative units
SEM:	Standardfehler
SIRS:	systemisch inflammatorisches Response-Syndrom
SSC:	sideward scatter
Tab.:	Tabelle
TNF- α :	Tumornekrosefaktor alpha
TRIS:	Trishydroxymethyl-aminomethan
μ g:	Mikrogramm
μ m:	Mikrometer
μ l:	Mikroliter
V.:	Vena
vs.:	versus
Vv.:	Venae

VII. Literaturverzeichnis

1. Adamson, R.H. and G. Clough, *Plasma proteins modify the endothelial cell glycocalyx of frog mesenteric microvessels*. J Physiol, 1992. 445: p. 473-86.
2. Adamson, R.H., et al., *Oncotic pressures opposing filtration across non-fenestrated rat microvessels*. J Physiol, 2004. 557(Pt 3): p. 889-907.
3. Altieri, D.C., *Coagulation assembly on leukocytes in transmembrane signaling and cell adhesion*. Blood, 1993. 81(3): p. 569-79.
4. Annane, D., *Glucocorticoids in the treatment of severe sepsis and septic shock*. Curr Opin Crit Care, 2005. 11(5): p. 449-53.
5. Annane, D., et al., *Corticosteroids in the treatment of severe sepsis and septic shock in adults: a systematic review*. JAMA, 2009. 301(22): p. 2362-75.
6. Bateman, J., S.K. Parida, and G.B. Nash, *Neutrophil integrin assay for clinical studies*. Cell Biochem Funct, 1993. 11(2): p. 87-91.
7. Becker, B.F., *All because of the mast cell: blocking the angiotensin receptor-1 should be better than inhibiting ACE (theoretically)*. Cardiovasc Res, 2011. 92(1): p. 7-9.
8. Becker, B.F., et al., *Therapeutic strategies targeting the endothelial glycocalyx: acute deficits, but great potential*. Cardiovasc Res, 2010. 87(2): p. 300-10.
9. Becker, B.F., D. Chappell, and M. Jacob, *Endothelial glycocalyx and coronary vascular permeability: the fringe benefit*. Basic Res Cardiol, 2010. 105(6): p. 687-701.
10. Bernfield, M., et al., *Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans*. Annu Rev Biochem, 1999. 68: p. 729-77.
11. 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.

12. Carey, D.J., *Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors*. Biochem J, 1997. 327 (Pt 1): p. 1-16.
13. Carlos, T.M. and J.M. Harlan, *Leukocyte-endothelial adhesion molecules*. Blood, 1994. 84(7): p. 2068-101.
14. Caughey, G.H., *New developments in the genetics and activation of mast cell proteases*. Mol Immunol, 2002. 38(16-18): p. 1353-7.
15. Chappell, D., et al., *Glycocalyx protection reduces leukocyte adhesion after ischemia/reperfusion*. Shock, 2010. 34(2): p. 133-9.
16. Chappell, D., et al., *Sevoflurane reduces leukocyte and platelet adhesion after ischemia-reperfusion by protecting the endothelial glycocalyx*. Anesthesiology, 2011. 115(3): p. 483-91.
17. 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.
18. Chappell, D., et al., *[Expedition glycocalyx. A newly discovered "Great Barrier Reef"]*. Anaesthetist, 2008. 57(10): p. 959-69.
19. Chappell, D., et al., *Hydrocortisone preserves the vascular barrier by protecting the endothelial glycocalyx*. Anesthesiology, 2007. 107(5): p. 776-84.
20. Chappell, D., et al., *A rational approach to perioperative fluid management*. Anesthesiology, 2008. 109(4): p. 723-40.
21. Chappell, D., et al., *Antithrombin reduces shedding of the endothelial glycocalyx following ischaemia/reperfusion*. Cardiovasc Res, 2009. 83(2): p. 388-96.
22. Chappell, D., et al., *Heparinase selectively sheds heparan sulphate from the endothelial glycocalyx*. Biol Chem, 2008. 389(1): p. 79-82.
23. Danielli, J.F., *Capillary permeability and oedema in the perfused frog*. J Physiol, 1940. 98(1): p. 109-29.

24. Davey, H.M. and D.B. Kell, *Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses*. Microbiol Rev, 1996. 60(4): p. 641-96.
25. De Hert, S.G., et al., *Cardioprotective properties of sevoflurane in patients undergoing coronary surgery with cardiopulmonary bypass are related to the modalities of its administration*. Anesthesiology, 2004. 101(2): p. 299-310.
26. Dhein, M., Delmar, ed. *Practical Methods in Cardiovascular Research*. 2005. 1010.
27. Doring, H.J., *The isolated perfused heart according to Langendorff technique--function--application*. Physiol Bohemoslov, 1990. 39(6): p. 481-504.
28. Dreyer, W.J., et al., *Canine neutrophil activation by cardiac lymph obtained during reperfusion of ischemic myocardium*. Circ Res, 1989. 65(6): p. 1751-62.
29. Esmon, C.T., *Introduction: are natural anticoagulants candidates for modulating the inflammatory response to endotoxin?* Blood, 2000. 95(4): p. 1113-6.
30. Frangogiannis, N.G., C.W. Smith, and M.L. Entman, *The inflammatory response in myocardial infarction*. Cardiovasc Res, 2002. 53(1): p. 31-47.
31. Gawaz, M., et al., *Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells*. Circulation, 1998. 98(12): p. 1164-71.
32. Gearing, A.J. and W. Newman, *Circulating adhesion molecules in disease*. Immunol Today, 1993. 14(10): p. 506-12.
33. Giles, H., R.E. Smith, and J.F. Martin, *Platelet glycoprotein IIb-IIIa and size are increased in acute myocardial infarction*. Eur J Clin Invest, 1994. 24(1): p. 69-72.
34. Gilles, S., et al., *Release of TNF-alpha during myocardial reperfusion depends on oxidative stress and is prevented by mast cell stabilizers*. Cardiovasc Res, 2003. 60(3): p. 608-16.

35. Granger, D.N. and P. Kubes, *The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion*. J Leukoc Biol, 1994. 55(5): p. 662-75.
36. Hawkins, H.K., et al., *Acute inflammatory reaction after myocardial ischemic injury and reperfusion. Development and use of a neutrophil-specific antibody*. Am J Pathol, 1996. 148(6): p. 1957-69.
37. Heindl, B., et al., *Volatile anaesthetics reduce adhesion of blood platelets under low-flow conditions in the coronary system of isolated guinea pig hearts*. Acta Anaesthesiol Scand, 1998. 42(8): p. 995-1003.
38. Heindl, B., et al., *Sevoflurane and isoflurane protect the reperfused guinea pig heart by reducing postischemic adhesion of polymorphonuclear neutrophils*. Anesthesiology, 1999. 91(2): p. 521-30.
39. Henry, C.B. and B.R. Duling, *Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan*. Am J Physiol, 1999. 277(2 Pt 2): p. H508-14.
40. 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.
41. 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.
42. Jacob, M., et al., *Contrasting effects of colloid and crystalloid resuscitation fluids on cardiac vascular permeability*. Anesthesiology, 2006. 104(6): p. 1223-31.
43. Jacob, M., et al., *[Determinants of insensible fluid loss. Perspiration, protein shift and endothelial glycocalyx]*. Anaesthesist, 2007. 56(8): p. 747-58, 760-4.
44. Jacob, M., D. Chappell, and M. Rehm, *Clinical update: perioperative fluid management*. Lancet, 2007. 369(9578): p. 1984-6.

45. 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.
46. Jaeschke, H. and T. Hasegawa, *Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury*. Liver Int, 2006. 26(8): p. 912-9.
47. Jerome, S.N., T. Akimitsu, and R.J. Korthuis, *Leukocyte adhesion, edema, and development of postischemic capillary no-reflow*. Am J Physiol, 1994. 267(4 Pt 2): p. H1329-36.
48. Jochum, M., *Influence of high-dose antithrombin concentrate therapy on the release of cellular proteinases, cytokines, and soluble adhesion molecules in acute inflammation*. Semin Hematol, 1995. 32(4 Suppl 2): p. 19-32.
49. 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.
50. Kersten, J.R., et al., *Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase*. Anesthesiology, 1997. 87(2): p. 361-70.
51. Kilger, E., et al., *Stress doses of hydrocortisone reduce severe systemic inflammatory response syndrome and improve early outcome in a risk group of patients after cardiac surgery*. Crit Care Med, 2003. 31(4): p. 1068-74.
52. Kishimoto, T.K., et al., *Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors*. Science, 1989. 245(4923): p. 1238-41.
53. Krieg, T., et al., *Acetylcholine and bradykinin trigger preconditioning in the heart through a pathway that includes Akt and NOS*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. 287(6): p. H2606-11.
54. Kuijpers, T.W., et al., *Membrane surface antigen expression on neutrophils: a reappraisal of the use of surface markers for neutrophil activation*. Blood, 1991. 78(4): p. 1105-11.

55. 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.
56. Langendorff, O., *Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen*. Pflügers Arch. ges. Physiol., 1895. 61: 291-332.
57. Lefer, A.M., et al., *Role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of reperfusion injury after myocardial ischemia*. FASEB J, 1991. 5(7): p. 2029-34.
58. Lipowsky, H.H., *Microvascular rheology and hemodynamics*. Microcirculation, 2005. 12(1): p. 5-15.
59. Luft, J.H., *Fine structures of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red*. Fed Proc, 1966. 25(6): p. 1773-83.
60. Marechal, X., et al., *Endothelial glycocalyx damage during endotoxemia coincides with microcirculatory dysfunction and vascular oxidative stress*. Shock, 2008. 29(5): p. 572-6.
61. Massberg, S., et al., *Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin*. Blood, 1998. 92(2): p. 507-15.
62. Menger, M.D., H.A. Lehr, and K. Messmer, *Role of oxygen radicals in the microcirculatory manifestations of postischemic injury*. Klin Wochenschr, 1991. 69(21-23): p. 1050-5.
63. Menger, M.D., et al., *Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox"*. Am J Physiol, 1992. 263(6 Pt 2): p. H1901-6.
64. Menger, M.D. and B. Vollmar, *Pathomechanisms of ischemia-reperfusion injury as the basis for novel preventive strategies: is it time for the introduction of pleiotropic compounds?* Transplant Proc, 2007. 39(2): p. 485-8.
65. Menger, M.D. and B. Vollmar, *Role of microcirculation in transplantation*. Microcirculation, 2000. 7(5): p. 291-306.

66. Mukaida, N., et al., *Dexamethasone inhibits the induction of monocyte chemotactic-activating factor production by IL-1 or tumor necrosis factor*. J Immunol, 1991. 146(4): p. 1212-5.
67. 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.
68. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium*. Circulation, 1986. 74(5): p. 1124-36.
69. Nelson, A., et al., *Increased levels of glycosaminoglycans during septic shock: relation to mortality and the antibacterial actions of plasma*. Shock, 2008. 30(6): p. 623-7.
70. Neumann, F.J., et al., *Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets*. Circulation, 1997. 95(10): p. 2387-94.
71. Nevieri, R., et al., *Antithrombin reduces mesenteric venular leukocyte interactions and small intestine injury in endotoxemic rats*. Shock, 2001. 15(3): p. 220-5.
72. Nieuwdorp, M., et al., *The endothelial glycocalyx: a potential barrier between health and vascular disease*. Curr Opin Lipidol, 2005. 16(5): p. 507-11.
73. 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.
74. Niiya, K., et al., *Increased surface expression of the membrane glycoprotein IIb/IIIa complex induced by platelet activation. Relationship to the binding of fibrinogen and platelet aggregation*. Blood, 1987. 70(2): p. 475-83.
75. Nurden, P., et al., *Glycoprotein Ia-IIa (VLA-2) and glycoprotein Ib-IX complexes are processed independently during thrombin-induced platelet activation*. J Lab Clin Med, 1994. 124(4): p. 579-88.

76. Okajima, K. and M. Uchiba, *The anti-inflammatory properties of antithrombin III: new therapeutic implications*. Semin Thromb Hemost, 1998. 24(1): p. 27-32.
77. 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.
78. Ormerod, M.G. and P.R. Imrie, *Flow cytometry*. Methods Mol Biol, 1990. 5: p. 543-58.
79. Ozden, A., et al., *Antithrombin III reduces renal ischemia-reperfusion injury in rats*. Res Exp Med (Berl), 2001. 200(3): p. 195-203.
80. Ozden, A., et al., *Antithrombin III prevents 60 min warm intestinal ischemia reperfusion injury in rats*. Res Exp Med (Berl), 1999. 198(5): p. 237-46.
81. 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.
82. Pries, A.R. and W.M. Kuebler, *Normal endothelium*. Handb Exp Pharmacol, 2006(176 Pt 1): p. 1-40.
83. Pries, A.R., T.W. Secomb, and P. Gaehtgens, *The endothelial surface layer*. Pflugers Arch, 2000. 440(5): p. 653-66.
84. Radomski, M.W., R.M. Palmer, and S. Moncada, *Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. 87(24): p. 10043-7.
85. Raffael A, N.T., Valet G and S. Schattauer, *Grundlagen der Durchflußzytometrie*. , in *Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*., R.G. Schmitz G, Editor. 1994, Schattauer: Stuttgart.
86. 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.

87. 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.
88. Reitsma, S., et al., *The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization*. *Pflugers Arch*, 2007. 454(3): p. 345-59.
89. Roemisch, J., et al., *Antithrombin: a new look at the actions of a serine protease inhibitor*. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2002. 13(8): p. 657-70.
90. Rothe, G., *Technische und methodische Grundlagen der Durchflussszytometrie*, in *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflussszytometrie*, U. Sack, Tarnok, A., Rothe, G., Editor. 2007, Karger: Basel. p. 27-70.
91. Rublee, D., et al., *Quality of life effects of antithrombin III in sepsis survivors: results from the KyberSept trial [ISRCTN22931023]*. *Crit Care*, 2002. 6(4): p. 349-56.
92. Salvatierra, A., et al., *Antithrombin III prevents early pulmonary dysfunction after lung transplantation in the dog*. *Circulation*, 2001. 104(24): p. 2975-80.
93. Schneeberger, E.E. and M. Hamelin, *Interaction of serum proteins with lung endothelial glycocalyx: its effect on endothelial permeability*. *Am J Physiol*, 1984. 247(2 Pt 2): p. H206-17.
94. Sutherland, F.J. and D.J. Hearse, *The isolated blood and perfusion fluid perfused heart*. *Pharmacol Res*, 2000. 41(6): p. 613-27.
95. Suzuki, H., et al., *Modification of leukocyte adhesion in spontaneously hypertensive rats by adrenal corticosteroids*. *J Leukoc Biol*, 1995. 57(1): p. 20-6.
96. Toller, W.G., et al., *Sevoflurane reduces myocardial infarct size and decreases the time threshold for ischemic preconditioning in dogs*. *Anesthesiology*, 1999. 91(5): p. 1437-46.

97. van Haaren, P.M., et al., *Localization of the permeability barrier to solutes in isolated arteries by confocal microscopy*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. 285(6): p. H2848-56.
98. 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.
99. 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.
100. 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.
101. Wanner, G.A., et al., *Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through Kupffer cell activation*. Shock, 1996. 5(1): p. 34-40.
102. 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.
103. 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.
104. 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.

VII.1 Aus der Arbeit hervorgegangene Publikation

Chappell, D., N. Doerfler, et al. (2010). "Glycocalyx protection reduces leukocyte adhesion after ischemia/reperfusion." Shock 34(2): 133-139.

VIII. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. habil. Dr. rer. nat. Bernhard F. Becker für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die fachliche Unterstützung und konstruktiven Verbesserungsvorschläge während der experimentellen Phase, bis hin zur Fertigstellung der Arbeit, bedanken.

Für die stete Unterstützung und große Hilfsbereitschaft im Labor gebührt ein großer Dank allen Mitarbeitern, ganz besonders Frau G. Gröger und Frau D. Kiesl.

Mein größter Dank gilt meinem Betreuer Herrn PD Dr. med. Daniel Chappell: für seinen unbändigen Enthusiasmus und seine absolut außergewöhnlich konsequente Betreuung. Seine unzähligen Ratschläge, Tipps und Ideen haben mich nicht nur fachlich weitergebracht, sondern auch menschlich geprägt. Vielen Dank in diesem Zusammenhang auch an Herrn PD Dr. med. M. Jacob.

Meinen Eltern danke ich für Ihre uneingeschränkte Unterstützung, ohne die all dies nicht möglich gewesen wäre. Meinem Bruder Felix, der immer ein Vorbild für mich war, danke ich auch von ganzem Herzen.

Schließlich möchte ich mich ganz besonders bei meinem Freund Alexander Oehme für die unermüdliche Hilfe in computer-technischen Fragen, seine unendliche Geduld, für alles, bedanken!