

Aus dem Walter-Brendl-Zentrum für Experimentelle Medizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl

**Shedding der endothelialen Glykokalyx durch Serin- und
Cysteinproteasen**

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

vorgelegt von

Stephanie Leipert

aus

Hannover

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

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

Mitberichterstatter:
Prof. Dr. Michael Weis
Prof. Dr. Volker Spindler

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

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

Tag der mündlichen Prüfung: 22.05.2014

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	11
1.1 Glykokalyx.....	11
1.1.1 Aufbau.....	11
1.1.2 Funktion.....	12
1.1.3 Shedding.....	13
1.1.4 Klinische Relevanz.....	14
1.2 Glykokalyx abbauende Enzyme (Sheddasen).....	15
1.2.1 Serinproteasen.....	17
1.2.1.1 Elastase, Proteinase 3.....	17
1.2.1.2 Plasmin.....	18
1.2.1.3 Thrombin.....	18
1.2.1.4 tPA.....	18
1.2.1.5 Tryptase.....	18
1.2.2 Cathepsin B.....	19
1.2.3 Hyaluronidase.....	19
1.3 Fragestellung.....	19
2. Material und Methoden.....	21
2.1 Material.....	21
2.1.1 Substanzen.....	21
2.1.1.1 Enzyme.....	21
2.1.1.2 Gase	21
2.1.1.3 Perfusatbestandteile.....	21
2.1.1.4 Enzymlösungen.....	22
2.1.1.5 ELISA - Kits.....	23
2.2 Methoden.....	24
2.2.1 Isoliert perfundiertes Herz (Langendorff-Modell).....	24
2.2.2 Herzpräparation.....	25
2.2.3 Versuchsaufbau.....	26
2.2.4 Versuchsprotokoll.....	27
2.2.4.1 Versuchsablauf.....	27
2.2.4.2 Zeitverlauf.....	28
2.2.4.3 Probengewinnung und Messparameter.....	28

2.2.4.4 Probenkonzentrierung.....	29
2.2.5 ELISA-Test-Systeme.....	29
2.2.5.1 Sandwich-type ELISA.....	29
2.2.5.2 Kompetitiver ELISA.....	31
2.2.6 Eichkurven und Messdatenberechnung.....	31
2.2.6.1 Syndekanfreisetzung.....	32
2.2.6.2 Hyaluronsäurefreisetzung.....	33
2.2.6.3 Heparansulfatfreisetzung.....	34
2.2.7 Statistik.....	35
3. Ergebnisse	37
3.1 Funktionelle Daten.....	37
3.1.1 Koronarfluss.....	37
3.1.2 Koronarleck	38
3.2 Glycocalyxbestandteile im Koronareffluat.....	40
3.2.1 Normierung von Messserien.....	40
3.2.1.1 Normierung für Hyaluronsäure und Syndekan.....	42
3.2.1.2 Normierung für Heparansulfat.....	43
3.2.2 Statistische Auswertung.....	43
3.2.2.1 Einleitung.....	43
3.2.2.2 Auswaschverhalten bei Kontrollherzen.....	43
3.2.2.2.a Syndekan.....	43
3.2.2.2.b Hyaluronsäure.....	44
3.2.2.2.c Heparansulfat.....	44
3.2.2.3 Basalwert verglichen mit Messzeitpunkt 5.3.....	45
3.2.2.3.a Syndekan.....	45
3.2.2.3.b Hyaluronsäure.....	46
3.2.2.3.c Heparansulfat.....	47
3.2.2.4 Vergleich der Zeitverlaufswerte der Kontrollgruppe mit den Enzymgruppen	47
3.2.2.4.a Syndekan.....	47
3.2.2.4.b Hyaluronsäure.....	48
3.2.2.4.c Heparansulfat.....	49
4. Diskussion.....	51
4.1 Auswahl der Enzyme.....	51
4.2 Auswertung der ELISA-Messergebnisse.....	52

4.3 Zeitliches Auswaschverhalten.....	53
4.3.1 Syndekan.....	53
4.3.2 Hyaluronsäure.....	53
4.3.3 Heparansulfat.....	54
4.4 Shedding	54
4.4.1 Syndekan.....	54
4.4.2 Hyaluronsäure.....	55
4.4.3 Heparansulfat.....	56
4.5 Transsudat und Koronarfluss.....	57
4.6 ELISA-Tests.....	57
4.7 Schlussfolgerungen.....	58
4.8 Ausblick.....	59
5. Zusammenfassung.....	61

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Glykokalyx [Weinbaum et al., 2007].....	12
Abb. 2: Proportionen der EG und Adhäsionsmoleküle bei einem Kontrollherz: grüne Pfeile ICAM ,VCAM, Integrine etc. (max. 10 nm), Glykokalyx 200 – 2000 nm: Es ist offensichtlich, dass die Adhäsionsmoleküle von der EG überragt werden (Ausschnitt aus [Becker et al., 2010a]).....	13
Abb. 3: Proportionen EG und Adhäsionsmoleküle bei einem postischämischen Herzen (EG-Shedding): grüne Pfeile ICAM ,VCAM, Integrine etc. (max. 10 nm): Man kann deutlich erkennen, dass Adhäsionsmoleküle nicht mehr von der EG verdeckt werden (Ausschnitt aus [Becker et al., 2010a]). Eine Adhäsion von weißen Blutzellen und Thrombozyten ist möglich.	14
Abb. 4: Serinproteasen [Heutinck et al., 2010]: Serinproteasen sind in vielen wichtigen physiologischen Vorgängen im Körper beteiligt: Entzündung, Gerinnung, Tumormetastasierung.....	17
Abb. 5: Retrograde Perfusion nach Langendorff im schematischen Versuchsaufbau.....	25
Abb. 6: Versuchsaufbau nach Langendorff, druckkonstante Perfusion.....	26
Abb. 7: Versuchsaufbau schematisch dargestellt	27
Abb. 8: Zeitverlauf und Messzeitpunkte (Mzp).....	28
Abb. 9: Sandwich-type ELISA (Quelle: Enzo Life Sciences, http://kb.enzolifesciences.com/article/immunometric-assays-127.html).....	30
Abb. 10: kompetitive ELISA (Quelle: Enzo Life Sciences, http://kb.enzolifesciences.com/article/immunometric-assays-127.html).....	31
Abb. 11: Eichkurve Syndekan Serie 1 zum Ablesen der Mengen aus den gemessenen Extinktionswerten.....	33
Abb. 12: Eichkurven HA Serie 2, Platten 1 und 2	34

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: modifizierte Krebs-Henseleit-Pufferlösung.....	22
Tabelle 2: Enzymlösungen: Aktivität pro Herz in den Versuchsgruppen.....	23
Tabelle 3: ELISA: sandwich-type für HS: Messprotokoll und Ablaufschritte.....	30
Tabelle 4: Syndekan: Eichdaten für Photometer der Serie 1 [Diacclone (Hrsg)]......	32
Tabelle 5: Nomenklatur.....	37
Tabelle 6: Koronarfluss [ml/min/g Trockengewicht]: Vergleich der Koronarflussrate Basal mit Mzp 5.3 (Mittelwerte +/- SD, gepaarter t-Teste, * p<0,05).....	38
Tabelle 7: Transsudatfluss [ml/min/g Trockengewicht]: Vergleich der Transsudatflussrate Basal vs. Mzp 5.3. Nur Hyaluronidase zeigt einen signifikanten Anstieg. Vergleich der Differenzwerte (Mzp 5.3 – Basal) von enzymbehandelten Herzen und Kontrollgruppe: auch hier findet sich nur bei Hyaluronidase ein signifikanter Anstieg der Transsudatmenge (Mittelwerte +/- SD, gepaarter t-Test, * p<0,05, # p<0,05).....	39
Tabelle 8: Messserie 1: Syndekan-1, HS und HA.....	40
Tabelle 9: Messserie 2: Syndecan-1, HS und HA.....	41
Tabelle 10: Messserie 3: nur Syndekan- und Hyaluronsäurebestimmung.....	41
Tabelle 11: Hyaluronsäureauswasch [ng/min/g]: Faktorenberechnung für Normierung von Messserie 1 und Messserie 2 mit Hilfe von Messserie 3; Faktor F1 ist 0,23, Faktor F2 ist 1,77 (Mittelwert +/- SD).....	42
Tabelle 12: Syndekanauswasch [ng/min/g]: Faktorenberechnung für Normierung von Messserie 1 und Messserie 2 mit Hilfe von Messserie 3; Faktor F1 ist 34,65, Faktor für F2 ist 0,95 (Mittelwert +/- SD).....	42
Tabelle 13: Syndekan: Auswaschverhalten [ng/min/g] der Kontrollgruppe der Messserie 3 (n=5, Mittelwert +/- SD, keine signifikanten Unterschiede).....	44
Tabelle 14: Hyaluronsäure: Auswaschverhalten [ng/min/g] in der Kontrollgruppe der Serie 3 (n=5, Mittelwert +/- SD, keine signifikanten Unterschiede).....	44
Tabelle 15: Heparansulfat [ng/min/g]: Auswaschverhalten der Kontrollgruppe in Messserie 1: es kann eine signifikante Abnahme der Auswaschraten von Mzp 5.1 auf Mzp 5.3 erkannt werden (n=8, Mittelwerte +/- SD, * p<0,05).....	45
Tabelle 16: Syndekan [ng/min/g]: Vergleich der Basalwerte mit Mzp 5.3 jeweils innerhalb einer Versuchsgruppe. Es sind keine signifikanten Veränderungen nachweisbar (normierte Werte aus S1, S2 und S3, Mittelwert +/- SD, gepaarter t-Test)	45

Tabelle 17: Hyaluronsäure [ng/min/g]: Vergleich der Basalwerte mit Mzp 5.3 jeweils innerhalb einer Versuchsgruppe. Nur bei dem Enzym Hyaluronidase kann ein signifikanter Anstieg der HA-Menge im Effluat gezeigt werden. Bei den anderen signifikanten Werten handelt es sich um eine Reduzierung der HA-Menge im Effluat (Mittelwerte +/- SD, gepaarter t-Test, * p<0,05,).	46
Tabelle 18: Heparansulfat [ng/min/g]: Vergleich B mit Mzp 5.3 innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen in Messserie 2; es konnte keine signifikante Veränderung gezeigt werden (Mittelwerte +/- SD, gepaarter t-Test).....	47
Tabelle 19: Syndekanauswasch [ng/min/g]: Vergleich Zeitverlauf Kontrollen vs. Enzymmittelwerte (Mittelwerte +/- SD, ungepaarter t-Test, * p<0,05). Beim signifikanten Unterschied der Enzyme handelt es sich stets um eine Reduzierung der Syndekanmenge im Effluat.....	48
Tabelle 20: Hyaluronsäureauswasch [ng/min/g]: Vergleich Zeitverlauf Kontrollen vs. Enzymmittelwerte (Mittelwerte +/- SD, ungepaarter t-Test, *p<0,05). Bei fast allen Enzymen ist eine Erhöhung der HA-Menge im Effluat zu sehen, allerdings beträgt die Erhöhung bei Hyaluronidase 160-fach während bei den anderen Enzymen die maximale Erhöhung 7-fach ist.....	49
Tabelle 21: Heparansulfatauswasch [ng/min/g]: Vergleich Zeitverlaufsmittelwerte Kontrollen vs. Enzymmittelwerte in S1 (Mittelwerte +/- SD, ungepaarter t-Test, * p<0,05).....	49

Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
AK	Antikörper
B	Basalwert
CF	Koronarfluss
CS	Chondroitinsulfat
ECM	Extracellular matrix
EG	endotheliale Glykokalyx
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ESL	Endothelial Surface Layer
GAG	Glukosaminoglykane
HA	Hyaluronsäure, Hyaluronan
HRP	Horseradish Peroxidase
HS	Heparansulfat
I/R	Ischämie/Reperfusion
Ko	Kontrollen
MI	Myokardinfarkt
M _{ML}	Menge pro Messloch
MP	Metalloproteinase
Mw	Mittelwert
Mzp	Messzeitpunkt
n	Zahl der Herzen
PG	Proteoglykane
PMN	Neutrophile Granulozyten (polymorphnuclear cell)
PR3	Proteinase 3
SD	Standardabweichung
T	Transsudat
tPA	Tissue-type Plasminogen Activator
uPA	Urokinase Plasminogen Activator
V _{ML}	Volumen pro Messloch
V _{post}	Volumen nach Konzentration des Effluats
V _{prä}	Volumen vor Konzentration
vs	versus
Zv	Zeitverlauf

1. Einleitung

1.1 Glykokalyx

Alle gesunden Gefäßendothelzellen im Körper sind mit einer Schicht überzogen, die als endotheliale Glykokalyx (EG) bezeichnet wird. Sie besteht aus verschiedenen transmembranösen und membrangebundenen Molekülen [Chappell et al., 2007] deren Hauptvertreter die Syndekane und Glypikane sind, sowie aus Rezeptormolekülen, Adhäsionsmolekülen und langkettigen Hyaluronsäuremolekülen [Bernfield et al., 1999, Reitsma et al., 2007].

Eine schematische Darstellung der Glykokalyx ist in Abb. 1 gezeigt [Weinbaum et al., 2007]. Dort ist auch zu erkennen, dass *in vivo* verschiedene Plasmabestandteile miteingebunden werden.

1.1.1 Aufbau

Die Glykokalyx im strengerem Sinn ist eine poröse Schicht mit regelmäßiger Molekülordnung [Gao et al., 2010, Lipowsky, 2011]. An den Transmembranproteinen (vor allem Syndekan-1) und membrangebundenen Glypikanen finden sich als Seitenketten Glukosaminoglykane (GAGs) wie Heparansulfat (HS) und Chondroitinsulfat (CS) etwa im Verhältnis HS:CS 4:1. Unterschiedlich viele der GAG-Ketten aus negativ geladenen HS und CS sind kovalent an ein Proteoglykan (PG) wie Syndekan gebunden mit unterschiedlicher Länge der Seitenketten.

Hyaluronsäure (HA) hat keine negative Ladung und ist nicht über eine kovalente Bindung an Proteine gebunden, sondern zumeist über den Rezeptor CD44 in die Glykokalyx integriert. HA-Moleküle können sich außerdem zu räumlichen Verbunden zusammenschließen und ungeordnete Netzwerke bilden [Gao et al., 2010, Lipowsky, 2011]. Zusammen mit gebundenen Plasmabestandteilen bildet sich so ein negativ geladenes Netzwerk auf den Endothelzellen der Gefäße mit einer Dicke von bis zu 1 μm [Pries et al., 2000, Pries et al., 2006]. Man kann sie bei entsprechender Gewebefixierung elektronenmikroskopisch visualisieren (siehe Abb. 2) oder indirekt als Lücke zwischen Erythrozyten und Gefäßwand („exclusion zone“) im durchströmten Blutgefäß wahrnehmen [Becker et al., 2010a, Chappell et al., 2007, Lipowsky et al., 2011].

Das aus der Glykokalyx und den Plasmabestandteilen gebildete Grundgerüst wird als endotheliale Oberflächenschicht (ESL: Endothelial Surface Layer) bezeichnet. Sie trennt unter physiologischen Bedingungen Zellen wie Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten von Endothel und Rezeptoren (siehe Abb. 2).

Unter physiologischen Bedingungen ist die Struktur der Glykokalyx stabil, sie unterliegt aber einem dynamischen Gleichgewicht von Abbau und Synthese neuer Bestandteile [Gao et al., 2010, Lipowsky, 2011].

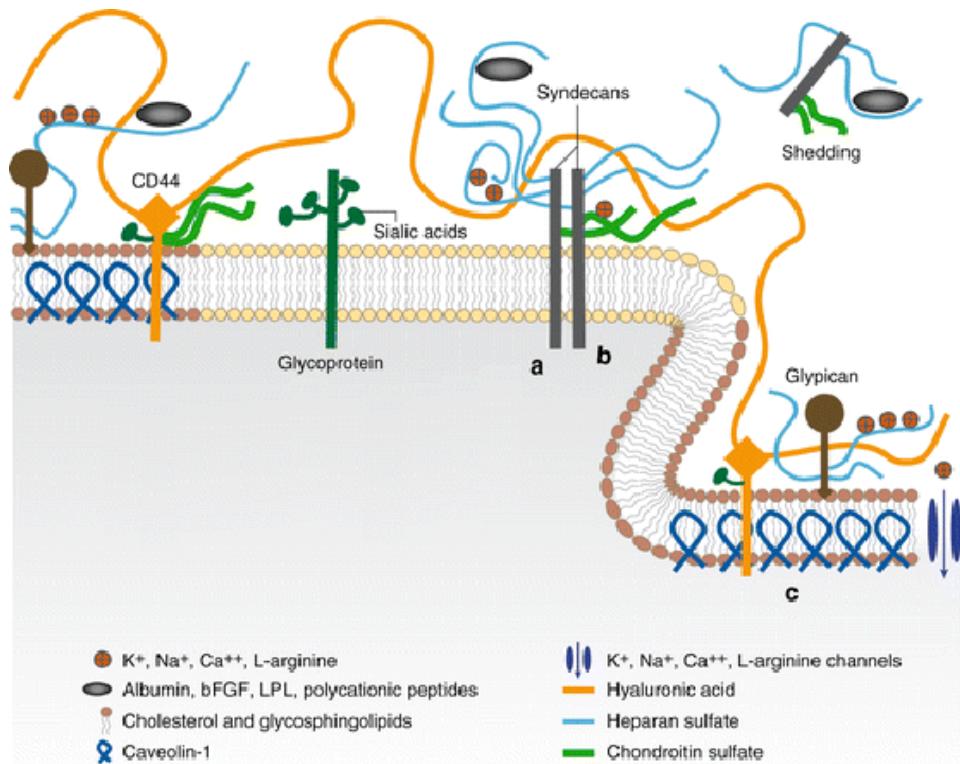


Abb. 1: Schematische Darstellung der Glykokalyx [Weinbaum et al., 2007]

1.1.2 Funktion

Die Hauptfunktion der EG ist ihre Eigenschaft als Barriere für Wasser und Blutbestandteile zwischen Gefäßlumen und Interstitium [Gao et al., 2010, Stevens et al., 2007]. Bei Beschädigungen der EG kommt es zu einem vermehrten Austreten von Flüssigkeit aus dem Lumen in das umliegende Gewebe [Chappell et al., 2011, Jacob et al., 2007]. Durch den maschenförmigen Aufbau und die negative Ladung werden Blutbestandteile wie Blutzellen oder andere negativ geladene Makromoleküle an der Glykokalyx gefiltert und verbleiben im Gefäßlumen [Gao et al., 2010]. Der Aufbau eines onkotischen Gradienten über die

Glykokalyx hinweg wirkt der druckbedingten Extravasation von Wasser entgegen. Auch bei der Adhäsion von Leukozyten an die Gefäßwand spielt die Glykokalyx eine wichtige Rolle, da sie ein Hindernis für den Kontakt der Blutzellen an die Endothelzellen darstellt [Gao et al., 2010, Rehm et al., 2004, Reitsma et al., 2007]. Die Rezeptoren für die Leukozyten (ca. 10 nm) sind deutlich kleiner als die Glykokalyxdicke (200 – 500 nm) (siehe Abb. 3), was die Adhäsion bei intakter Glykokalyx verhindert [Chappell et al., 2011, Lipowsky, 2011, Rehm et al., 2007,]. Bei defekter oder fehlender Glykokalyx kommt es zu einer verstärkten Adhäsion von Blutzellen an das Endothel [Annecke et al., 2011, Chappell et al., 2011, Silbernagel et al., 2003]. Des Weiteren stellt die EG eine wichtige physiologische Bindungsstelle für Antithrombin III, Lipoproteinlipase, Gefäßwachstumsfaktoren und Gerinnungsfaktoren wie Thrombin oder Plasmin dar [Becker et al., 2010a, Gao et al., 2010]. Die Interaktion mit Plasmaproteinen, insbesondere mit Albumin, verstärkt zudem die schubspannungsabhängige Vasodilatation [Jacob et al., 2007].

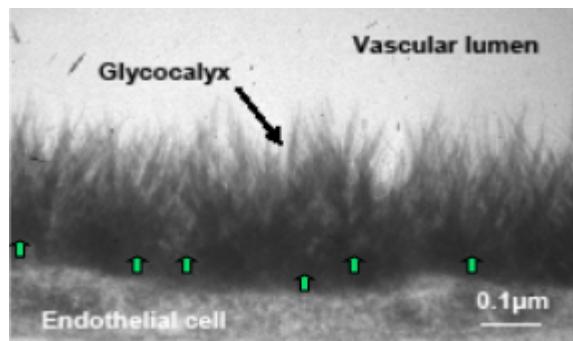


Abb. 2: Proportionen der EG und Adhäsionsmoleküle bei einem Kontrollherz: grüne Pfeile ICAM, VCAM, Integrine etc. (max. 10 nm), Glykokalyx 200 – 2000 nm: Es ist offensichtlich, dass die Adhäsionsmoleküle von der EG überragt werden (Ausschnitt aus [Becker et al., 2010a]).

1.1.3 Sheding

Einen Abbau der Glykokalyx bezeichnet man als „Sheding“. In Experimenten an isolierten Herzen konnte gezeigt werden, dass bei Ischämie mit anschließender Reperfusion der Abbau von Heparansulfat um ein 30-faches erhöht war, bei Hyaluronan allerdings nur um ein 3-faches über dem gemessenen Basalwert. Die Auswaschrate von Syndekan stieg bei postischämischer Reperfusion um das ca. 100-fache an [Chappell et al., 2007]. Auch chirurgische Eingriffe schädigen je nach Größe des Traumas die Glykokalyx in unterschiedlichem Ausmaß [Chappell et al., 2008a]. In verschiedenen Studien [Chappell et al., 2007, Rehm et al., 2004] wurde nachgewiesen, dass es bei einer Ischämiedauer länger als

20 Minuten mit anschließender Reperfusion zu einem Abbau der Glykokalyx kommt und damit verbunden intravasale Flüssigkeit verstärkt in das umliegende Gewebe austritt [Annecke et al., 2010, Chappell et al., 2007, Rehm et al., 2004].

Shedding ereignet sich nicht nur bei Ischämie/Reperfusions (I/R) von Gewebe, sondern auch bei Hypoxie/Reoxygenierung, Sepsis, Diabetes mellitus und Entzündungen [Becker et al., 2010b, Chappell et al., 2011, Reitsma et al., 2007]. Es ist noch unbekannt, welche Proteasen für das Shedding verantwortlich sind, man vermutet aber, dass membrangebundene Proteasen über G-Proteine aktiviert werden. Des Weiteren wird vermutet, dass aktivierte Immunzellen oder Makrophagen Proteasen ausschütten, die zumindest Teile aus der Glykokalyx lösen können [Annecke et al., 2010, Annecke et al., 2011].

Enzyme wie Heparinase, Pronase und Hyaluronidase sind dafür bekannt Glykokalyxbestandteile abzulösen [Chappell et al., 2008a, Jacob et al., 2007, Rehm et al., 2004, Stevens et al., 2007]. Heparinase ist ein bakterielles Analogon zu Heparanase und entfernt selektiv Heparansulfat aus der EG [Chappell et al., 2008a].

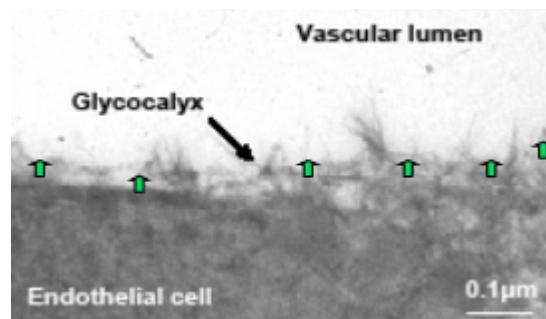


Abb. 3: Proportionen EG und Adhäsionsmoleküle bei einem postischämischen Herzen (EG-Shedding): grüne Pfeile ICAM, VCAM, Integrine etc. (max. 10 nm): Man kann deutlich erkennen, dass Adhäsionsmoleküle nicht mehr von der EG verdeckt werden (Ausschnitt aus [Becker et al., 2010a]). Eine Adhäsion von weißen Blutzellen und Thrombozyten ist möglich.

1.1.4 Klinische Relevanz

Vor etwa 70 Jahren wurde eine noch unbekannte Schicht auf den Endothelzellen vermutet [Danielli, 1940], aber für viele Jahre wurde ihr keine entscheidende physiologische Funktion zugeschrieben. Dies lag einerseits daran, dass diese Schicht nur als Lücke der Erythrozyten zur Gefäßwand wahrgenommen werden konnte. Andererseits an der fast kompletten Zerstörung dieser Schicht bei den damals verwendeten Fixierungstechniken [Becker et al., 2010a, Vogel et al., 2000].

Es hat sich jedoch mit modernen Elektronenmikroskopen und Fixierungstechniken gezeigt, dass diese Schicht weitaus dicker ist als damals angenommen und sogar die Adhäsionsrezeptoren der Endothelzellmembran weit überragt [Becker et al., 2010a, Chappell et al., 2011, Reitsma et al., 2007].

Im Laufe der letzten Jahre stellte sich heraus, dass diese Schicht eine wichtige Rolle in vielen physiologischen Vorgängen im Körper wie der Entwicklung von Gewebsödemen spielt, indem sie eine Barriere für Wasser und Makromoleküle zusammen mit der darunterliegenden Endothellschicht bildet [Broekhuizen et al., 2009, Bruegger et al., 2009, Rehm et al., 2004]. Die endotheliale Glykokalyx bildet auch die Schicht mit der die Blutzellen den ersten Kontakt zur Gefäßwand haben. Sie spielt also eine entscheidende Rolle bei Vorgängen wie der Blutgerinnung, Entzündungen und Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten [Chappell et al., 2008a, Götte, 2003, Marshall et al., 2003]. Erst die Adhäsion schafft die Möglichkeit für Leukozyten, in das Gewebe zu emigrieren.

Gesteigerte Gefäßpermeabilität und Gewebsödeme als Folge intraoperativer Ischämie sind bekannte Komplikationen und könnten durch Veränderung der Glykokalyxstruktur bedingt sein, da es sich in verschiedenen Studien gezeigt hat, dass es zu einer Reduzierung der Glykokalyx nach längerer Ischämie mit Reperfusions, Redoxstress, bei enzymatischen Prozessen und nach Entzündungen kommt [Becker et al., 2010a, Becker et al., 2010b, Chappell et al., 2011, Jacob et al., 2007, Reitsma et al., 2007]. Eine erhöhte Konzentration von Heparansulfat und Syndekan konnte im Blutplasma von Patienten nachgewiesen werden, die sich Operationen mit intraoperativem Verschluss der Aorta oder kardiopulmonalem Bypass unterzogen. Die erhöhte Konzentration ließ darauf schließen, dass es aufgrund der zeitweisen Ischämie mit anschließender Reperfusions zu Schäden der Glykokalyx während der Operation gekommen sein könnte [Rehm et al., 2007].

1.2 Glykokalyx abbauende Enzyme (Sheddasen)

Es konnte nachgewiesen werden, dass es Enzyme gibt, z.B. Heparinase, Pronase und Hyaluronidase, die die Glykokalyx abbauen können [Chappell et al., 2008a, Henry et al., 1999, Ihrcke et al., 1996, Jacob et al., 2007, Rehm et al., 2004]. Chappell et al. konnten zeigen, dass Heparinase selektiv Heparansulfat aus der Glykokalyx entfernt, aber nicht Syndekan [Chappell et al., 2008a].

In der Literatur finden sich Hinweise, dass Metalloproteasen am Shedding der Glykokalyx beteiligt sind, vor allem bei entzündlichen Vorgängen im Körper. Es wurde ein indirekter

Nachweis erbracht, indem Inhibitoren von Metalloproteasen in Versuchen am kardiopulmonalen System verwendet wurden und es zu einer geringeren Konzentration von Glykokalyxanteilen im Koronarfluss kam [Fitzgerald et al., 2000, Lipowsky, 2011]. Auch bei Gabe inflammatorischer Mediatoren im Mesenterialbereich konnte durch Inhibitoren von Metalloproteasen ein Shedding der Glykokalyx vermindert werden. Eine direkte Rolle von Metalloproteasen als „Sheddasen“ wurde in den vorliegenden Studien aber nicht bewiesen [Gao et al., 2010].

Chappell et al. konnten weiter zeigen, dass Antithrombin III ein Shedding der Glycokalyx nach Ischämie und Reperfusion sowie nach Gabe von TNF α am Herzen weitgehend verhinderte (Abb.2) [Chappell et al., 2009]. Bei Antithrombin III handelt es sich um einen natürlichen Inhibitor einiger (patho)physiologisch bedeutsamer Serinproteasen wie z.B. Thrombin, dessen Wirkung durch Bindung an die EG verstärkt wird. Andere Gründe sprachen ebenfalls dafür, Serinproteasen als mögliche Sheddasen der Glykokalyx in Betracht zu ziehen [Ihrcke et al., 1996]. So kommt es unter anderem bei Entzündungen zu einem Shedding [Chappell et al., 2009]. Serinproteasen sind vor allem in Entzündungszellen wie Leukozyten und Mastzellen zu finden und können am Ort des Geschehens freigesetzt werden. Dort dünnen sie die EG aus, um eine Adhäsion von Blutbestandteilen zu ermöglichen [Ihrcke et al., 1996].

Bei Annecke et al. fand sich eine erhöhte Freisetzung des Enzyms Cathepsin B im koronarvenösen Effluat reperfunderter Herzen. Cathepsin B gehört zu den sogenannten Cysteinproteasen [Annecke et al., 2010]. Man konnte eine Erhöhung dieser Protease nach postischämischer Reperfusion im Myokard und in Endothelzellen nachweisen [Chappell et al., 2007].

Unter Berücksichtigung der oben genannten Punkte (Beteiligung bei Entzündungsvorgängen, Adhäsion, Gerinnung) haben wir uns für eine Untersuchung von insgesamt 8 Proteasen und Glykosidasen entschieden. Die relevanten Proteasen werden im weiteren Text genauer beschrieben.

1.2.1 Serinproteasen

Serinproteasen stellen eine große Gruppe von Enzymen dar, die Proteine zerteilen können und eine wichtige Rolle in Prozessen wie Koagulation, Apoptose und bei Entzündungsreaktionen übernehmen (siehe Abb. 4) [Heutinck et al., 2010].

Namensgebend für die Proteasen ist die Anwesenheit der Aminosäure Serin im aktiven Zentrum des Enzyms. Eine entscheidende Quelle stellen Immunzellen (z.B. Leukozyten, Mastzellen) dar. Diese bilden die Serinproteasen und speichern sie. Als Beispiele sind insbesondere Thrombin und Tissue-type Plasminogen Activator (tPA) zu nennen, welche für die Gerinnungsvorgänge im Körper entscheidend sind [Reitsma et al., 2007].

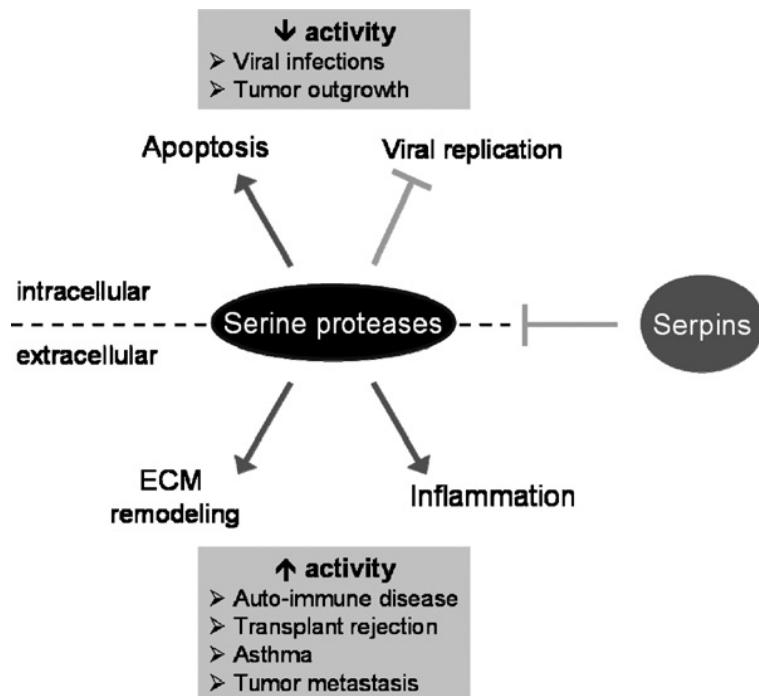


Abb. 4: Serinproteasen [Heutinck et al., 2010]: Serinproteasen sind in vielen wichtigen physiologischen Vorgängen im Körper beteiligt: Entzündung, Gerinnung, Tumormetastasierung

1.2.1.1 Elastase, Proteinase 3

Neutrophile Granulozyten (PMN) enthalten Elastase und Proteinase 3 als Proenzyme. PMN sind die ersten Abwehrzellen am Ort der Entzündung und setzen dort die genannten Proteasen frei. Die Degranulation der Neutrophilen wird durch Entzündungsmediatoren wie TNF α (am Shedding beteiligt [Chappell et al., 2009]) und C5a getriggert. Die erwähnten Proteasen können Bakterien zerstören und rufen Gewebeschäden hervor [Heutinck et al., 2010].

1.2.1.2 Plasmin

Plasmin, eine Serinprotease, kann viele Proteine im Blutplasma spalten und abbauen. Vor allem in der Hämostase spielt dieses Enzym eine wichtige Rolle, da es Fibrin über den Vorgang der Fibrinolyse deaktiviert.

Plasmin kommt im Körper vor allem als Proenzym Plasminogen vor und wird bei Bedarf durch tPA oder uPA aktiviert [Silbernagel et al., 2003, Waisman, 2003].

1.2.1.3 Thrombin

Thrombin wird vor allem im Rahmen der Blutgerinnung mit hoher lokaler Aktivität gebildet. Es aktiviert Fibrinogen zu aktivem Fibrin durch enzymatische Spaltung [Silbernagel et al., 2003]. Es konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass es Syndekan aus der Glykalyx lösen kann [Bruegger et al., 2005, Subramanian et al., 1997].

1.2.1.4 tPA

Tissue-type Plasminogen Activator (tPA) ist eine Serinprotease und wird in Gefäßendothelzellen gebildet. Fibrin bewirkt eine Aktivierung von tPA, wodurch es zu einer enzymatischen Spaltung und damit Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin kommt (Fibrinolyse) [Waisman, 2003].

1.2.1.5 Tryptase

Tryptase ist in den Granula der Mastzellen als aktives Enzym zu finden [Chappell et al., 2007, Samoszuk et al., 2003]. Die Protease beeinflusst die Vasokonstriktion, Koagulation und Entzündungsreaktion [Chappell et al., 2009]. Tryptase moduliert die Extrazellulärmatrix, die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren und die Immunzellmigration und Aktivierung [Heutinck et al., 2010].

Man findet Tryptase in myokardialen Mastzellen, aus denen es bei Ischämie mit anschließender Reperfusion freigesetzt wird [Annecke et al., 2010]. In einer Studie mit Antithrombin III (AT III) hat sich gezeigt, dass AT III die koronare EG vor Shedding schützt [Chappell et al., 2008b, Chappell et al., 2009]. Bedeutung hat dies, da AT III ein Inhibitor für Serinproteasen darstellt [Roemisch et al., 2002].

1.2.2 Cathepsin B

Cathepsin B ist eine ubiquitär vorkommende Cysteinprotease, die man zwar in allen Zelltypen vorfindet, aber primär in Endothelzellen von Bedeutung sind [Frlan et al., 2006, Seyfried et al., 2001]. Sie ist in Lysosomen gespeichert und kann in Stresssituationen leicht freigesetzt werden [Annecke et al., 2010, Seyfried et al., 2001]. Cathepsin B ist an vielen physiologischen Vorgängen wie Wundheilung oder Apoptose und pathologischen Prozessen wie Entzündung und Malignomwachstum beteiligt. Dabei kann eine erhöhte Konzentration dieses Enzyms nachgewiesen werden [Frlan et al., 2006].

1.2.3 Hyaluronidase

Hyaluronidasen sind tierischen und bakteriellen Ursprungs und bewirken eine hydrolytische Spaltung des Makroglykosids Hyaluronsäure. Bei dieser Glykosidase war ein Shedding von Hyaluronsäure aus der Glykokalyx bereits von Gao et al. nachgewiesen [Gao et al., 2010]. Hyaluronidase wurde in dieser Dissertationsarbeit als „Positivkontrolle“ verwendet, d.h. als Enzym, bei dem ein Shedding garantiert stattfindet.

1.3 Fragestellung

Es war vor Entstehung dieser Arbeit nicht bekannt, welche Proteasen und Glykosidasen für das Shedding der Glykokalyx verantwortlich sind. Dies gilt sowohl für den physiologischen Umbau (latentes Shedding) als auch für den pathophysiologischen gesteigerten Abbau.

In meiner Arbeit stellt sich die Frage, ob Enzyme, die bei Entzündungsvorgängen oder bei der Gerinnung aktiv sind, Bestandteile wie Heparansulfat, Hyaluronsäure und Syndekan aus der Glykokalyx spalten. Wir entschieden uns der Fragestellung mit den Serinproteasen Thrombin, Elastase, Proteinase 3 (PR3), Tryptase, Plasmin und tPA, sowie der Cysteinprotease Cathepsin B und, als Positivkontrolle, der Hyaluronidase nachzugehen.

2. Material und Methoden

Die Material- und Probensammlung für diese Arbeit erfolgten zwischen April 2008 und Juni 2009 in den Räumlichkeiten des Walter-Brendl-Zentrums für Experimentelle Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. B.F. Becker.

2.1 Material

2.1.1 Substanzen

2.1.1.1 Enzyme

1. Thrombin, aus menschlichem Plasma, Sigma, USA
2. Tryptase, aus menschlicher Lunge, gereinigt, Sigma USA
3. Cathepsin B, aus Rindermilz, Sigma, USA
4. Elastase, aus menschlichen Leukozyten, Sigma, USA
5. Plasmin, aus menschlichem Plasma, Sigma, USA
6. Hyaluronidase, aus Rinderhoden, Sigma, USA
7. Tissue-type Plasminogen Activator, menschlich rekombinant, Expression in CHO Zellen, Sigma, USA
8. Proteinase 3, aus menschlichen Neutrophilen, Biomol international, Hamburg

2.1.1.2 Gase

9. Sauerstoff (O_2), Fa. Linde, Höllriegelskreuth, Deutschland
10. Kohlendioxid (CO_2), Fa. Linde, Höllriegelskreuth, Deutschland

2.1.1.3 Perfusatbestandteile

Die Krebs-Henseleit-Pufferlösung [Buenger et al., 1975] wurde jeden einzelnen Versuchstag aus den in Tabelle 1 genannten Bestandteilen frisch angesetzt. Diese wurden bei 8 °C kühl gelagert. Glucose, Pyruvat und Insulin wurden kurz vor dem Versuchsbeginn der Lösung zugesetzt. Das Gemisch wurde eine halbe Stunde mit 94,4% O_2 und 5,6% CO_2 begast, damit der pH-Wert der Lösung 7,35 – 7,45 betrug.

Tabelle 1: modifizierte Krebs-Henseleit-Pufferlösung

Verbindung	Summenformel	C [mmol/l]	Hersteller
Glukose	C ₆ H ₁₂ O ₆	5,4	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	1,2	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,27	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,6	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	NaCl	119	Applichem GmbH, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃	21,5	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	C ₃ H ₃ NaO ₃	0,3	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Insulin (Rinderpankreas)	C ₂₅₄ H ₃₇₇ N ₆₅ O ₇₅ S ₆	5 [I.E/l]	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.1.1.4 Enzymlösungen

Ein sinnvolles Aktivitätsniveau der Enzyme wurde aus Arbeiten anderer Arbeitsgruppen sowie aus Vermutungen abgeleitet, die auf eigenen Erfahrungen basieren [Bruegger et al., 2005, Chappell et al., 2008a, Subramanian et al., 1997].

Für Thrombin, Tryptase, Elastase und Cathepsin wurden je zwei Versuchsserien mit unterschiedlichen Aktivitäten untersucht, wobei die Aktivität der zweiten Messserie um ein Vielfaches höher war als in der ersten Messserie, um sicher im Wirkungsbereich zu sein.

Die handelsüblichen Darreichungsmengen wurden auf ein sinnvolles Aktivitätsniveau verdünnt. Die Aktivität des Enzyms, das Volumen der Stammlösung (in isotoner Kochsalzlösung) sowie die pro Herz intrakoronar infundierten Mengen sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die applizierte Volumenmenge der Enzymverdünnungen variierte zwischen 1,0 und 1,5 ml pro Versuch und wurde über einen Zeitraum von 10 Minuten (Mzp 5.1) kontinuierlich infundiert.

Die Aktivität eines Enzyms sagt aus, wie viel Eichsubstrat in einer Minute von einem Enzym umgesetzt wird. Dabei spielt die Konzentration des Enzyms keine direkte Rolle. Die Einheit wird in Unit (U) angegeben wobei 1 Unit = 1 µmol Substrat/min entspricht.

Tabelle 2: Enzymlösungen: Aktivität pro Herz in den Versuchsgruppen

Versuchsgruppe	Nr.	n	Ampulleninhalt	Verdünnung	Aktivität/Herz
Thrombin	3	3	100 µl (100 U/ml) = 10 U	3,30 ml	3,3 U
Thrombin	10	5	250 U	5,5 ml	50 U
Tryptase	4	6	1,05 µg Protein (13,7 U/mg) = 0,014 U	7 ml	0,002 U
Tryptase	11	5	5 µg (11 U/mg) = 0,055 U	5,5 ml	0,01 U
Cathepsin	2	7	1 mg (11,7 U/mg) = 11,7 U	11,7 ml	1,1 U
Cathepsin	12	5	2,3 mg (11,7 U/mg) = 27 U	6 ml	5,4 U
Elastase	6	3	1 U	3,30 ml	0,33 U
Elastase	12	3	2 U	3,30 ml	0,67 U
Plasmin	1	1	0,5 mg (3 U/mg) = 1,5 U	1,1 ml	1,5 U
Plasmin	5	3	1,5 mg (3 U/mg) = 4,5 U	3,30 ml	1,5 U
Hyaluronidase	9	4	27 mg (1000 U/mg) = 27000 U	4,8 ml	5400 U
tPA	7	3	10 µg (500000 U/mg) = 5000 U	3,30 ml	1667 U
Proteinase 3	8	3	0,025 mg (95 U/mg) = 2,375 U	5,625 ml	0,47 U

2.1.1.5 ELISA - Kits

Es kamen drei verschiedene ELISA-Tests zum Einsatz (siehe Kapitel 2.2.5). Für Syndekan verwendeten wir den ELISA-Kit sCD138 der Firma Diaclone, Besanon, Frankreich und für Heparansulfat setzten wir den ELISA-Kit der Firma Seikagaku Corporation, Tokio, Japan ein. Es handelte sich in beiden Fällen um einen sandwich-type ELISA. Für die Bestimmung der Hyaluronsäurekonzentration verwendeten wir einen kompetitiven ELISA K-1200 der Firma Echelon Biosciences Inc., Salt Lake City, USA.

2.2 Methoden

2.2.1 Isoliert perfundiertes Herz (Langendorff-Modell)

Oskar Langendorff entwickelte 1895 eine Methode zur isolierten Perfusion von Herzen außerhalb des Körpers, das sogenannte Langendorff-Modell. Dabei wird das Herz retrograd durch eine Kanüle in der Aorta mit der Krebs-Henseleit-Puffer-Lösung perfundiert. Das Perfusat wird mit Sauerstoff und CO₂ begast, damit das Herz mit physikalisch gelöstem Sauerstoff versorgt wird und der pH-Wert der Lösung möglichst dem physiologischen Niveau entspricht. So kann das Herz ca. 2 – 3 h außerhalb des Körpers arbeiten. Dies war 1895 ein entscheidender Schritt für die Forschung am kardiovaskulären System.

Grundsätzlich werden zwei Methoden der Perfusion unterschieden: die druckkonstante Methode, bei der das Herz mit einem konstanten Druck, z.B. 80 mmHg, mit Perfusat versorgt wird, oder die flusskonstante Methode, bei der das Perfusat mit einem konstanten Fluss durch das Koronarsystem fließt.

Das Prinzip des Langendorff-Models, schematisch in Abb. 5 dargestellt, erklärt sich insoweit, als dass die retrograde Perfusion der Aorta beim Verschluss der Aortenklappe in der Diastole die Füllung der Koronargefäße bedingt. Das Herz wird weiterhin mit Sauerstoff versorgt und schlägt spontan weiter. Dabei ist es wichtig zu beachten, dass der Druck des Perfusats nicht den physiologischen Druck im Herzen während der Systole übersteigt. Dadurch kommt es zu einer geringeren Perfusion der Herzkranzgefäße während der Systole, was der Entstehung eines Gewebedems entgegenwirkt.

Das Perfusat läuft von den Koronarvenen in den rechten Vorhof (sinus coronarius) und von dort durch den rechten Ventrikel in die Pulmonalarterie, wo die Flüssigkeit über eine Kanüle nach außen geleitet wird (Effluat).

Da das Herz frei an der Aortenkanüle hängt, kann auch das Transsudat an der Herzspitze gesammelt werden [Dhein et al., 2004]. Das Transsudat stellt die Nettofiltration im gesamten Koronarsystem dar. Als Gemisch von lymphatischer und interstitieller Flüssigkeit tritt es an der epikardialen Herzoberfläche aus und tropft von der Herzspitze ab. Die Quantifizierung erlaubt eine direkte Beurteilung des vaskulären Flüssigkeitslecks der Koronargefäße.

Bei den Versuchen in dieser Arbeit wurde der Modus der druckkonstanten Perfusion gewählt. Dabei ist zu beachten, dass der Transsudatfluss (siehe Abb. 5) sehr empfindlich auf

Änderungen der hydraulischen Leitfähigkeit der Koronargefäße reagiert [Jacob et al., 2006]. Dies sollte nur als Folge einer Zerstörung der Glykokalyx eintreten und wurde als Parameter für funktionelle Zerstörung der Glykokalyx gewertet.

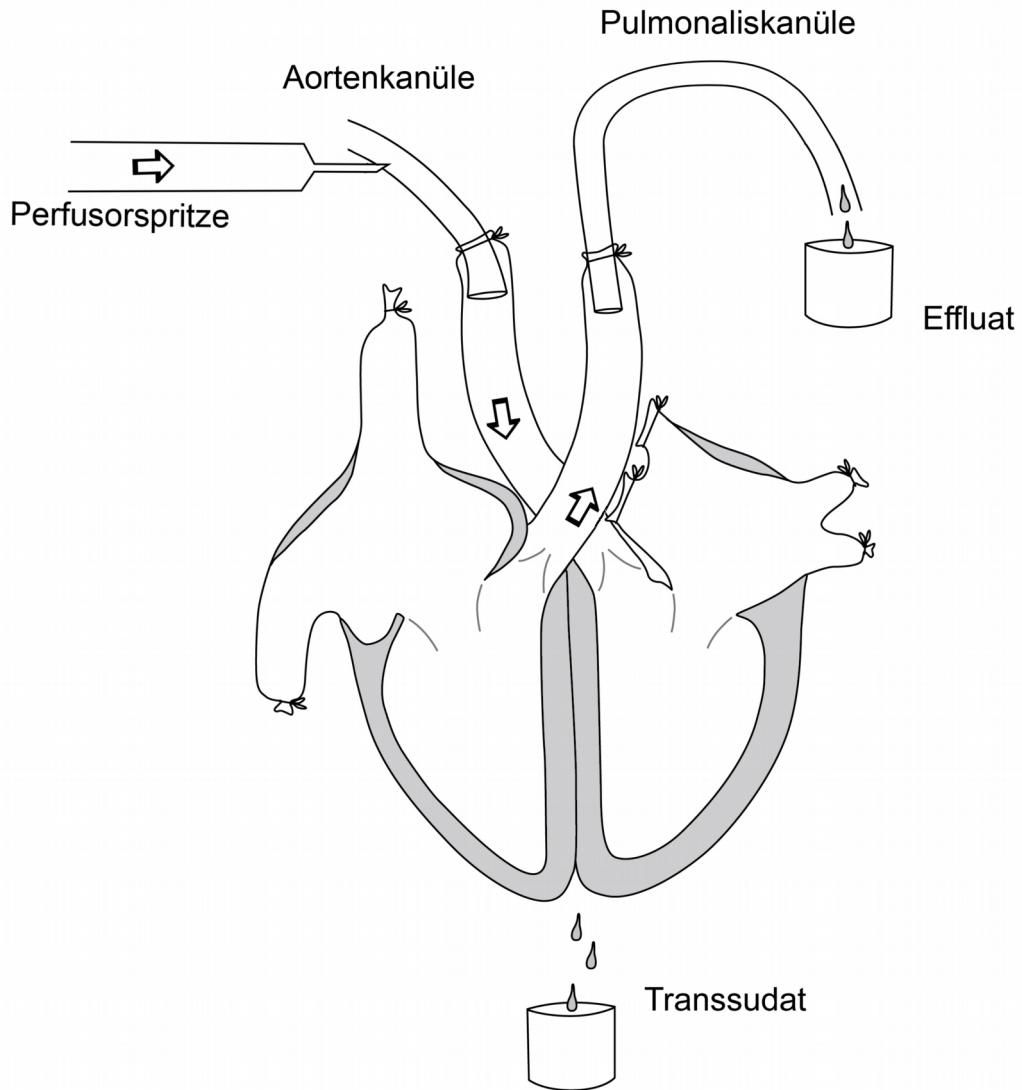


Abb. 5: Retrograde Perfusion nach Langendorff im schematischen Versuchsaufbau

2.2.2 Herzpräparation

Die Versuche inklusive Tiertötung und anschließender Organentnahme waren von der Regierung von Oberbayern genehmigt worden (AZ209.1/211-2531.3-3/99).

Es wurden Meerschweinchenherzen von männlichen Tieren (Gewicht 250 – 910 g) verwendet.

Die Tiere wurden mit einem dafür speziell konstruierten Werkzeug durch einen Schlag in den Nacken getötet. Die beiden Halsschlagadern wurden durchtrennt, der Thorax eröffnet und das

Herz mit einer eiskalten, isotonischen Kochsalzlösung zum Stillstand gebracht. Dann wurde die Aorta kanuliert, distal durchtrennt und der Krebs-Henseleit-Puffer [Buenger et al., 1975] in das Herz mit einem konstanten Druck von 80 cm Wassersäule infundiert. Danach wurden die Pulmonalgefäße (Venen und Arterie) und die obere und untere Hohlvene durchtrennt. In die Pulmonalarterie wurde ebenfalls eine Kanüle eingesetzt. Die Venae cava inferior und superior, pulmonales und azygos wurden ligiert.

2.2.3 Versuchsaufbau

Isolierte Meerschweinchenherzen wurden nach Langendorff perfundiert. Der Apparaturaufbau wird in Abb. 6 gezeigt.

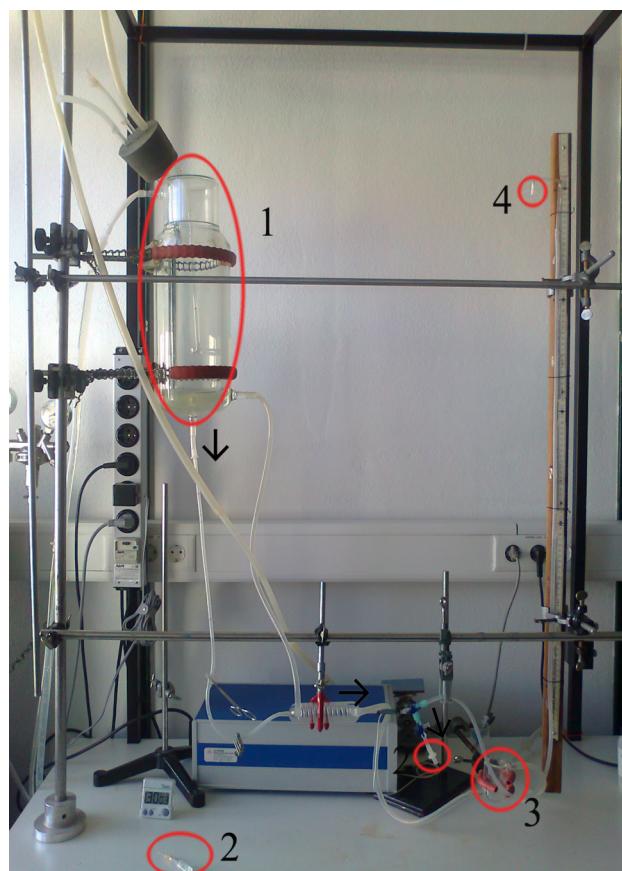


Abb. 6: Versuchsaufbau nach Langendorff, druckkonstante Perfusion

1: Perfusatreservoir (80 cm H_2O)

2: Aortenkanüle

3: Herzwärmer (36 °C)

4: Überlauf (80 cm H_2O)

Pfeil: Flussrichtung Perfusat

2.2.4 Versuchsprotokoll

2.2.4.1 Versuchsablauf

Es wurde eine feine Kanüle in den zuführenden Schlauch mit dem Perfusat kurz vor der Aorta eingebbracht (siehe Abb. 7). Mit Hilfe eines Perfusors (Precidor, Infors AG Basel, Bottingen, Schweiz) wurde über einen Zeitraum von 10 Minuten eine vorgegebene Menge Enzymlösung pro Minute in das Herz infundiert.

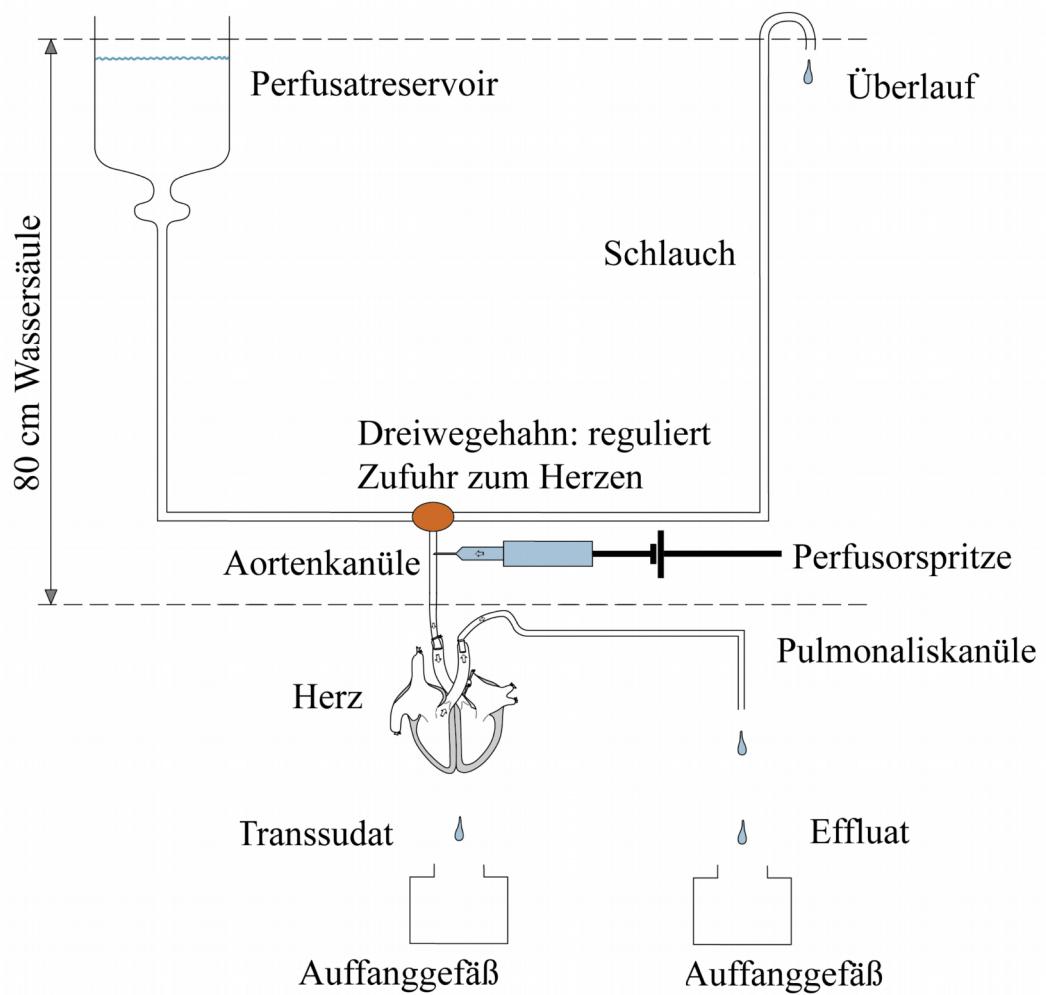


Abb. 7: Versuchsaufbau schematisch dargestellt

Insgesamt wurden acht verschiedene Enzyme (Thrombin, Tryptase, Cathepsin B, Elastase, Plasmin, Hyaluronidase, Proteinase 3, tPA) infundiert. Zusätzlich lief eine Kontrollgruppe mit dem gleichen Versuchsablauf ohne Applikation eines Enzyms (Zeitkontrolle).

2.2.4.2 Zeitverlauf

Abb. 8 zeigt den Zeitverlauf der Versuche und die Messzeitpunkte (Mzp) der Probensammlung.

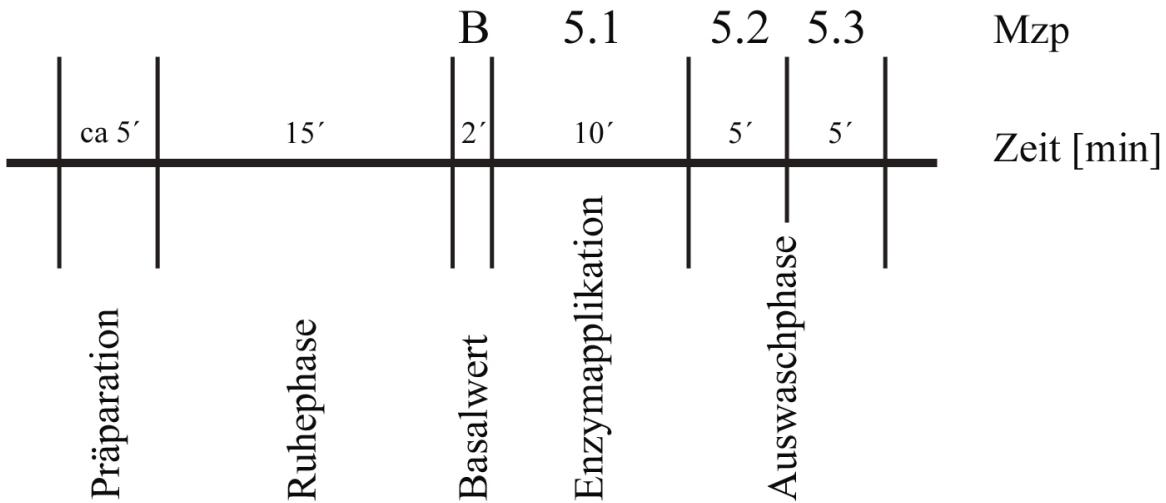


Abb. 8: Zeitverlauf und Messzeitpunkte (Mzp)

Nach der Präparation und einer Ruhephase von 15 Minuten wurden die Basalwerte (B) für Transsudat (2 Minuten) und Effluat (1 Minute) gesammelt. Dann wurde über die Aortenkanüle mit einem Infusor das Enzym für 10 Minuten appliziert. In dieser gesamten Zeit wurde die Probe 5.1 (jeweils Effluat und Trassudat) gesammelt und in mehreren Portionen asserviert. Darauf folgte eine insgesamt 10 minütige Auswaschphase, in der für je 5 Minuten eine Probe (5.2 und 5.3) gesammelt wurde. Auch hier erfolgte die Asservierung mehrerer Portionen (Lagerung bei -18 °C).

2.2.4.3 Probengewinnung und Messparameter

Als Messproben wurden das Effluat und Transsudat herznah gesammelt. Das Transsudat sammelte sich auf der Herzoberfläche und wurde an der Herzspitze mit einem Eppendorf-Gefäß aufgefangen. Mit einem weiteren Gefäß wurde ebenfalls die Flüssigkeit aus der Pulmonalarterienkanüle (Effluat) gesammelt. Die gewonnenen Proben wurden bei -18 °C eingefroren gelagert und zur Messung aufgetaut. Im Effluat wurden die Hauptbestandteile der Glykokalyx, Syndekan als transmembranöser Anteil der Glykokalyx, Heparansulfat als Seitenkette der Glykokalyx und Hyaluronan als früher Messparameter für Glykokalyx-

Shedding [Chappell et al., 2007] mittels ELISAs bestimmt. Das Transsudat diente als Parameter für die Permeabilität der Gefäße und wurde gewogen.

Nach dem Ende des Versuchsablaufs wurden die Aorta und A. pulmonalis, sowie die Vorhöfe entfernt und das Herz gewogen (Feuchtgewicht). Die Herzen wurden getrocknet (24 h, 60 °C) und dann nochmals gewogen, um das Trockengewicht zu erhalten [Chappell et al., 2007].

2.2.4.4 Probenkonzentrierung

Die gewonnenen Effluatproben wurden aufgetaut und als 4ml Portionen ($V_{\text{prä}}$) über sogenannte Molekularsieb-Filter auf ca. 250 µl konzentriert. Verwendet wurden Molekularsiebe mit Ausschlussgrenzen von 5 kDa und 10 kDa (Fa. Millipore, Eschborn, Germany) [Bruegger et al., 2008, Rehm et al., 2004]. Die gewonnenen Konzentrate wurden genau gewogen (V_{post}) und bis zur Messung mittels ELISA (siehe Kapitel 2.2.5) bei -18 °C aufbewahrt.

2.2.5 ELISA-Test-Systeme

Diese Testverfahren basieren letztlich auf einer enzymatischen Farbreaktion für den Nachweis von Antigenen (Ag). Nach Bindung von spezifischen Antikörpern (AK) kommt es zu einer Farbreaktion proportional zur Konzentration der gesuchten Substanz (Ag). Wir verwendeten zwei verschiedene Formen: Einmal den sandwich-type ELISA und einmal den kompetitiven ELISA. Beide Systeme werden im folgenden beschrieben.

2.2.5.1 Sandwich-type ELISA

Eine Platte wird mit spezifischen Antikörpern gegen die gesuchte Substanz (hier Heparansulfat und Syndekan) beschichtet, die Proben mit dem Antigen werden dann in die einzelnen Probenlöcher auf der Platte verteilt.

Diese Lösung wird über einen definierten Zeitraum (HS 18-24 h, Syndekan 1 h) inkubiert. Nach der Inkubation wird die Platte gespült und ein weiterer Antikörper hinzugefügt an den eine Peroxidase (Horseradish peroxidase, HRP) für die Farbentwicklung mit Tetramethylbenzidin gebunden wird. Nach einer definierten Zeitspanne wird die Farbreaktion gestoppt. Die Farbintensität ist direkt proportional zur Substanzkonzentration [Diacalone (Hrsg)].

Anhand des Heparansulfat-ELISA-Kit wird der genaue Ablauf beispielhaft erklärt:

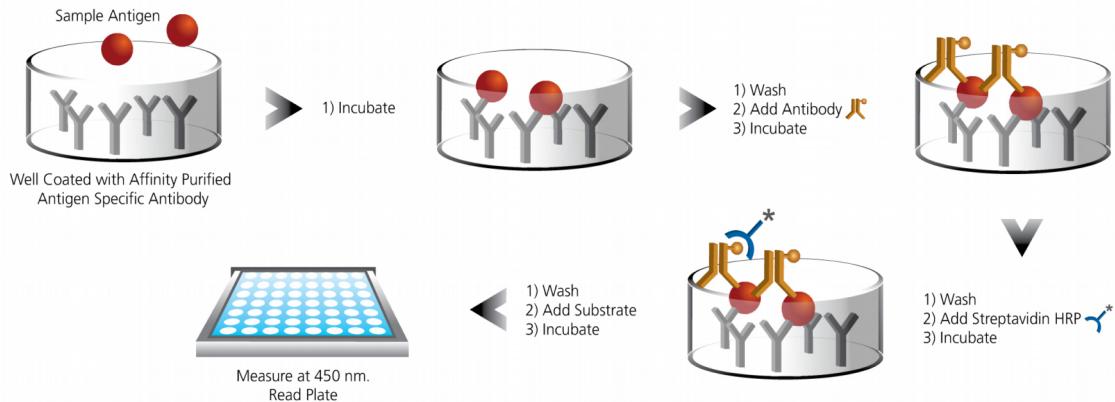


Abb. 9: Sandwich-type ELISA (Quelle: Enzo Life Sciences, <http://kb.enzolifesciences.com/article/immunometric-assays-127.html>)

Der sandwich-type ELISA der Firma Seikagaku Corporation ist ein Enzym-linked Immunoabsorption Assay und verwendet zwei spezifische monoklonale Antikörper.

Die einzelnen Schritte des Messprotokols sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: ELISA: sandwich-type für HS: Messprotokoll und Ablaufschritte

Vorbereitung	Waschlösung, Standardlösung und Reaktionspuffer 5-fach verdünnen, Auswaschen der Substratlöcher auf der Platte mit 5*300 µl Waschlösung
1. Schritt	Reaktionspuffer mit Standardlösung oder Substrat mischen, die primäre Reaktion erfolgt bei 2 – 8 °C für 18 – 24 h, Auswaschen der Löcher mit 5*300 µl Waschlösung
2. Schritt	HRP-konjugiertes Streptavidin mit biotinyliertem Antikörper vermischen, sekundäre Reaktion bei Raumtemperatur für 60 Minuten
3. Schritt	100 µl aus Substrat des 2. Schritts entnehmen und die Farbreaktion 30 Minuten abwarten
4. Schritt	Lösung hinzugeben, die die Farbreaktion anhält (Stopperlösung, H ₂ SO ₄)
5. Schritt	Messung der Absorptionsstärke und Abschätzung der HS-Konzentration bei 450nm/630nm, die Proteinkonzentration anhand einer Eichkurve ablesen

2.2.5.2 Kompetitiver ELISA

Bei einem kompetitiven ELISA-Test verdrängt die gesuchte Substanz (Ag) das Substrat für die Farbentwicklung von seiner Bindungsstelle am Antikörper (AK), wodurch es bei steigender Antigenkonzentration zu einer verminderten Farbentwicklung kommt.

In dieser Versuchsanordnung werden die zu messenden Proben mit dem Hyaluronan (HA) - Detektor vermischt und dann auf die ELISA-Platte aufgebracht. Dabei entsteht eine kompetitive Bindung an die auf der Platte bereits aufgebrachten AK und gesuchter Substanz (konjugiertes Antigen). Es ergibt sich daraus eine indirekte Proportionalität von Farbintensität und gesuchtem Antigen.

Aus den Standardwerten wird eine Eichkurve gebildet (bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen), an der die Konzentrationen von HA in den analysierten Proben abgelesen werden [Diacclone (Hrsg)].

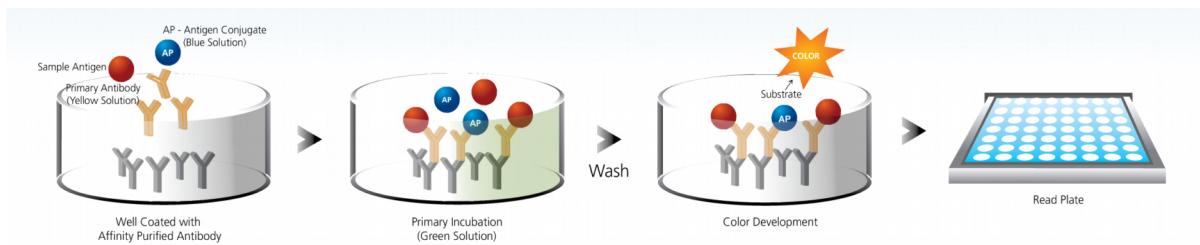


Abb. 10: kompetitive ELISA (Quelle: Enzo Life Sciences, <http://kb.enzolifesciences.com/article/immunometric-assays-127.html>)

2.2.6 Eichkurven und Messdatenberechnung

Mit den Extinktionsergebnissen der einzelnen ELISA-Messserien zeichneten wir jeweils eine Eichkurve, anhand derer wir die Syndekan-, Heparansulfat- und Hyaluronsäuremengen in 100 µl bzw. 20 µl (V_{ML}) Konzentrat ablesen, die aus 4 ml ($V_{prä}$) der einzelnen Proben gewonnen wurden. Da die vom Photometer-Programm berechnete Eichkurve nicht exakt genug in dem Bereich unserer Messergebnisse (niedriges Werteneveau) war, wurde für Messserie 1, Messserie 2 und Messserie 3 jeweils eine eigene Eichkurve pro ELISA-Platte erstellt.

Die von der Eichgerade abgelesenen Werte wurden dann mit der folgenden Formel (Formel 1) verrechnet, um die koronarvenös abgegebene Menge an Syndekan, HS und HA pro Minute und pro Herzgewicht zu ermitteln.

$$\frac{M_{ML}[\text{ng}] * V_{post}[\mu\text{l}] * CF[\text{ml/min}]}{V_{ML}[\mu\text{l}] * V_{prä}[\text{ml}] * \text{Herzgewicht}[\text{g}]} = \text{Auswaschrate}$$

Formel 1: Berechnung der Mengen von Syndekan, Heparansulfat und Hyaluronsäure im Effluat nach Ablesen der Mengen pro Messloch (M_{ML}) von der Eichgeraden

V_{post} : Volumen nach Konzentration des Effluats

$V_{prä}$: Volumen vor Konzentration = 4 ml

CF : Koronarfluss

M_{ML} : Abgelesene Menge von Eichgerade = Menge pro Messloch

V_{ML} : Volumen pro Messloch (HS: 20 µl, Syndekan: 100 µl, HA: 100 µl)

Die so erhaltenen Werte für alle Messzeitpunkte (Mzp) (B, 5.1, 5.2, 5.3) pro Herz pro Versuchsgruppe wurden für die statistische Auswertung miteinander verglichen. Der Mittelwert der Zeitverläufe (Formel 2) aus den Versuchsgruppen war entscheidend, um einen globalen Vergleich zu bekommen.

$$\frac{\text{Wert5.1}[\text{ng}/\text{min}/\text{g}] * 10[\text{min}] + \text{Wert5.2}[\text{ng}/\text{min}/\text{g}] * 5[\text{min}] + \text{Wert5.3}[\text{ng}/\text{min}/\text{g}] * 5[\text{min}]}{20[\text{min}]} = \text{Mittelwerte}$$

Formel 2: Mittlere Auswaschrate [ng/min/g] der Zeitverläufe (Raten der Messzeitpunkte 5.1, 5.2 und 5.3 zeitlich gewichtet)

2.2.6.1 Syndekanfreisetzung

Um die Eichkurve zu erstellen, wurden exemplarische Daten (Standardlösungen humanen Syndekans und die dazugehörigen Extinktionswerte aus Duplikaten, Tabelle 4) verwendet. Abb. 11 zeigt die daraus erstellte „manuelle“ Eichgerade, die für die Bestimmung der Syndekanmenge in 100 µl bzw. 20 µl Konzentrat (Volumen pro Messloch, V_{ML}) der Proben einer Messserie verwendet wurde.

Tabelle 4: Syndekan: Eichdaten für Photometer der Serie 1 [Diacclone (Hrsg)]

Standardlösungen Photometer	Menge in Standardlösung [ng]	Extinktionswerte gemessen bei Eichung
St 32	3,2 ng	0,145
St 16	1,6 ng	0,084
St 16		0,080
St 8	0,8 ng	0,053
St 8		0,056

Es wurde die Menge in der Standardlösung (x-Achse) und die gemessenen Extinktionswerte (y-Achse) in ein Diagramm gezeichnet und eine Gerade durch diese Punkte gelegt.

Mit den gemessenen Extinktionswerten konnten dann für jede Probe die entsprechenden Mengen pro Messloch (M_{ML}) an der x-Achse abgelesen werden.

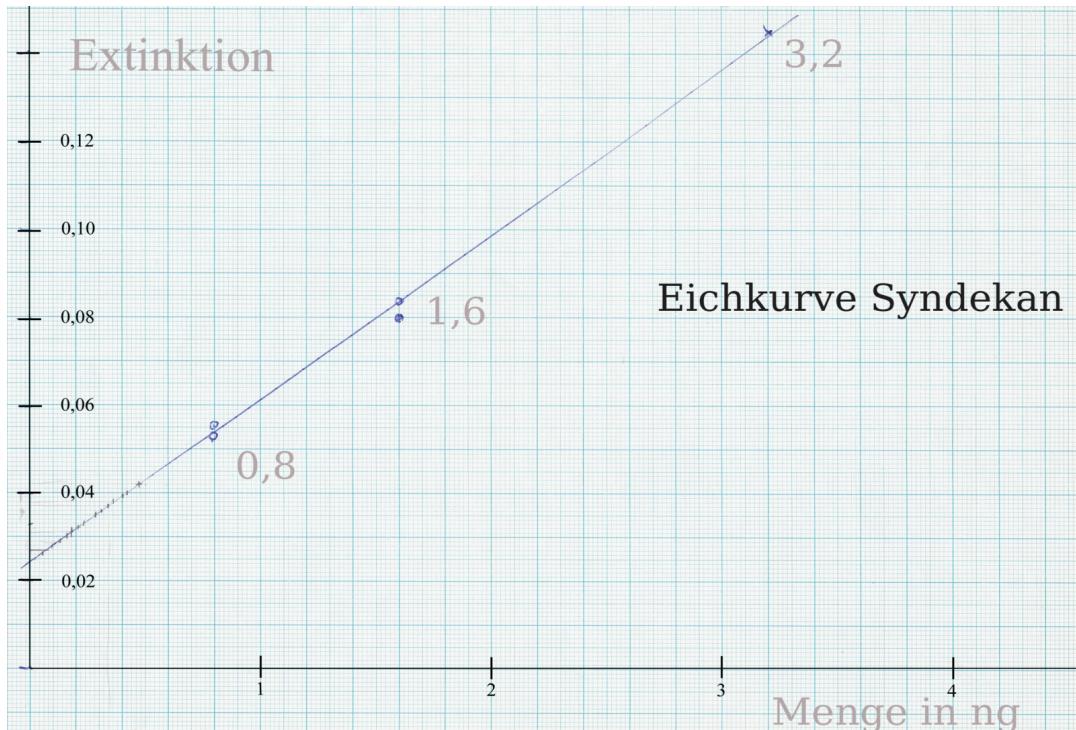


Abb. 11: Eichkurve Syndekan Serie 1 zum Ablesen der Mengen aus den gemessenen Extinktionswerten

Über die so erhaltene Menge pro Messloch (M_{ML}) wurde die vom Herzen ausgewaschene Menge des Syndekans (ng) pro Minute pro Herzgewicht (g) errechnet (Formel 1 und Abb. 11).

Die berechneten Basalwerte und Zeitverlaufswerte mussten anschließend aufgrund der in Kapitel 3.2.1 näher erläuterten Normierung nochmals mit den für jede Messserie geltenden Normierungsfaktoren verrechnet werden.

2.2.6.2 Hyaluronsäurefreisetzung

Bei Hyaluronsäure konnten wir aufgrund der höheren Substanzmengen die vom Photometerprogramm erstellte Eichkurve für Serie 1 verwenden. Für Serie 2 erstellten wir, wie bei Syndekan beschrieben (siehe Kapitel 2.2.6.1), eine Eichkurve für jede ELISA-Platte (siehe Abb. 12).

Für Serie 1 nahmen wir daher die vom Photometerprogramm ermittelten Konzentrationen im Konzentrat und errechneten in einfacher Weise direkt die Menge HA in 4 ml Effluat (Elisakonzentration [ng/ml] * Vpost [ml]).

Die Mengen für Hyaluronsäure in Serie 2 wurden aus den gezeichneten Eichkurven abgelesen.

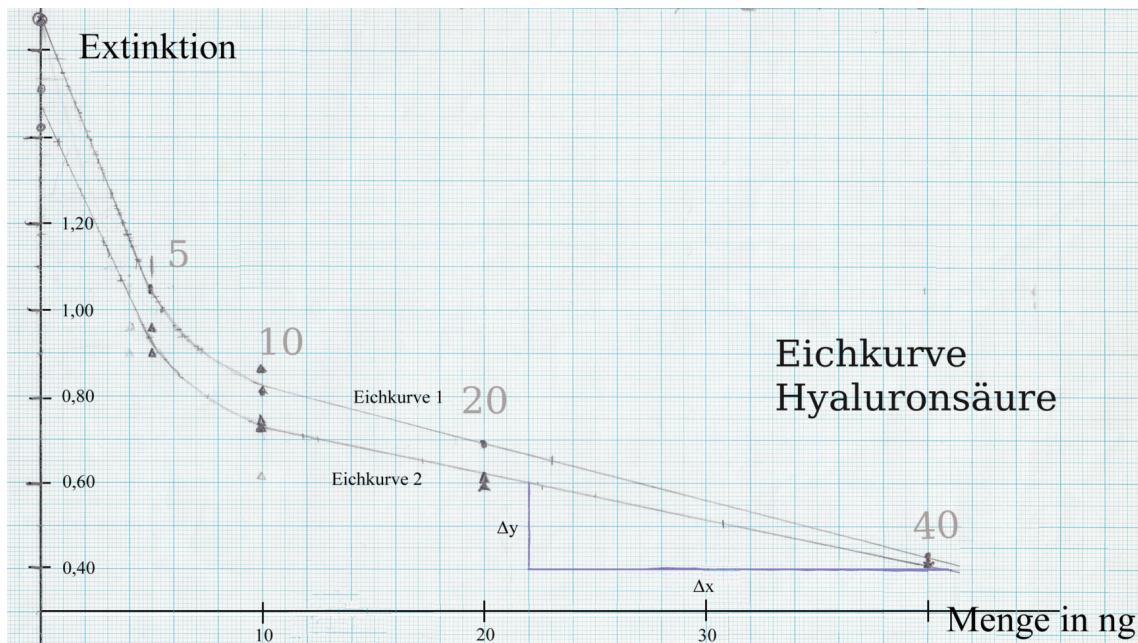


Abb. 12: Eichkurven HA Serie 2, Platten 1 und 2

Anhand dieser Werte konnte im Anschluss die Auswaschrate des HA (ng) pro Minute pro Herzgewicht (g) errechnet (Formel 1 und Abb. 12).

2.2.6.3 Heparansulfatfreisetzung

Bei Heparansulfat konnten wir für Serie 1 die vom Photometerprogramm vorgegebene Eichkurve verwenden, für Serie 2 konstruierten wir eine eigene Eichgerade.

Bei der Serie 1 nahmen wir die vom Photometerprogramm errechneten Konzentrationen im Konzentrat, errechneten die Menge (M_{ML}) HS pro 4 ml Effluat (Elisakonzentration [ng/ml] * Vpost [ml]) und daraus dann die Abgabe pro Minute pro Herzgewicht.

Für die Serie 2 lasen wir die Menge (M_{ML}) direkt aus der Eichkurve ab, ähnlich wie für Syndekan beschrieben (siehe Kapitel 2.2.6.1).

Mit Hilfe dieser Werte wurde dann die Freisetzungsrate des Heparansulfat pro Minute pro Herzgewicht errechnet (in Formel 1). Diese Berechnungen wurden für jedes Herz pro Enzym

getätigt und für die weitere statistische Auswertung (in Kapitel 2.2.7) verwendet. Zusätzlich wurde der mittlere Abgabewert der Zeitverläufe berechnet (siehe Formel 2) und ebenfalls für statistische Vergleiche herangezogen.

2.2.7 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde das Statistikprogramm SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) verwendet.

Obwohl die n-Zahlen (3-12) zu gering waren um sicher zu sagen, ob es sich um eine Normalverteilung der Daten handelt, wird von einem natürlichen Vorgang ausgegangen, sodass eine Gaußverteilung (Normalverteilung) vorliegt. Damit konnten die gängigen statistischen Testverfahren wie „t-Test“ und „paired t-Test“ angewendet werden.

Den „paired t-Test“ verwendeten wir bei Vergleichen innerhalb einer Versuchsreihe mit zwei Gruppen z.B Basalwerte vs. Zeitverlaufswerte, den „t-Test“ bei Vergleichen zwischen zwei Versuchsgruppen z.B. Zeitverlauf Kontrolle (Ko) verglichen mit Zeitverlauf Thrombin. Mit „Anova on Ranks“ wurden statistisch mehrere Gruppen untereinander verglichen z.B. Ko-Zeitverlauf mit Thrombin-Zeitverlauf im Vergleich mit Elastase-Zeitverlauf etc. Bei dem Testverfahren „Anova on Ranks“ ist die Normalverteilung keine Voraussetzung.

Wir betrachteten erst die funktionellen Daten wie den Koronarfluss (CF) und die Transsudatbildung (T), um mit diesen Daten schon Aufschlüsse über ein eventuelles Shedding zu erhalten. Dann wurden die Messdaten hinsichtlich Abgabe von Syndekan, HS und HA betrachtet, um Veränderungen im Effluat festzustellen.

Wir verglichen innerhalb einer Versuchsgruppe die zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessenen Abgaberaten an GAG, z.B. Basalwerte im Vergleich zu dem Mittelwert des Zeitverlaufs. Es wurde außerdem der Zeitverlaufsmittelwert der Kontrollgruppe mit den Zeitverlaufsmittelwerten verschiedener Versuchsgruppen verglichen: Einmal mit „Anova on Ranks“ und zusätzlich mit einen „t-Test“ paarweise (Zeitverlaufsmittelwert der Kontrollgruppe im Vergleich zu einer Versuchsgruppe).

Um eine höhere n-Zahl zu erhalten, wurden in einem weiteren Schritt die Versuchsgruppen mit gleichem Enzym trotz unterschiedlicher Konzentration zusammengefasst.

Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ gewählt.

3. Ergebnisse

Um der Fragestellung, ob und welche der ausgewählten Enzyme zu einem Shedding der Glykokalyx befähigt sind nachzugehen, wurde die oben beschriebene Versuchsanordnung gewählt (siehe Kapitel 2.2.3). Die Enzyme wurden in Versuchsgruppen eingeteilt, wobei jedes Enzym eine Versuchsgruppe bildet. Einige der Enzyme wurden in zwei unterschiedlichen Aktivitäten appliziert. Um die verschiedenen Enzyme und ihre Aktivitäten zu unterscheiden, wurden die Versuchsgruppen zusätzlich in Versuchsserien unterteilt. Pro Versuchsserie wurde mit mehreren Herzen gearbeitet. Diese wurden mit H und der Herzanzahl nummeriert, z.B. erstes Herz, Versuchsgruppe Thrombin Versuchsserie 3: H1-3. Im Verlauf des einzelnen Versuchs wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Messproben entnommen und mit B für Basalwert, 5.1 für die Zeit der Enzymapplikation, 5.2 und 5.3 für die Zeit nach der Enzymapplikation (Auswaschzeit) bezeichnet, z.B. H1-3-5.1 (Herz 1 - Versuchsserie 3 - Messzeitpunkt 5.1). Die Messproben für ein Herz von B bis 5.3 sind eine Herzreihe, die Messproben von 5.1 bis 5.3 werden als Zeitverlauf bezeichnet.

Als Beispiel: Das Enzym Thrombin wurde mit den Aktivitäten 10 U pro Herz und 50 U pro Herz appliziert. Die Versuchsgruppe ist Thrombin, die Versuchsserien sind „3“ für 10 U/Herz und „10“ für 50 U/Herz. Die Versuchsserie 3 wurden an drei Herzen durchgeführt (H1, H2, H3) mit den jeweiligen Messpunkten Basal, 5.1, 5.2 und 5.3 (H1-3-B, H1-3-5.1, H1-3-5.2, H1-3-5.3 → Herzserie). Diese Nomenklatur wird in Tabelle 5 verdeutlicht.

Tabelle 5: Nomenklatur

Versuchsgruppe	Versuchsserie	Herzen	Basalwert	Zeitverlauf
Thrombin	3	H1	B	5.1 5.2 5.3
				Herzreihe

3.1 Funktionelle Daten

3.1.1 Koronarfluss

Betrachtet wurden die Effluatmengen in den Versuchsgruppen, um eine evtl. Auswirkung des Sheddings als Erhöhung des CF (Vasodilatation, Lumendurchmesservergrößerung) im Zeitverlauf zu erkennen, wobei der Basalwert mit dem Messzeitpunkt 5.3 verglichen wurde.

Wir errechneten aus den gesammelten Effluatmengen einen CF in ml/min/g Trockenherzgewicht (Tabelle 6).

*Tabelle 6: Koronarfluss [ml/min/g Trockengewicht]: Vergleich der Koronarflussrate Basal mit Mzp 5.3 (Mittelwerte +/- SD, gepaarter t-Teste, * p<0,05)*

Versuchsgruppe	n	Basal		5.3	
Kontrollen	9	38,95	+/- 17,27	36,51	+/- 19,98
Thrombin *	8	47,86	+/- 11,55	38,75	+/- 8,77
Tryptase *	11	36,83	+/- 8,05	34,38	+/- 7,45
Cathepsin B	12	46,82	+/- 8,06	46,46	+/- 11,57
Elastase	6	40,56	+/- 12,16	36,67	+/- 10,88
Plasmin	4	30,61	+/- 3,51	31,32	+/- 4,02
Hyaluronidase	4	58,26	+/- 17,66	55,03	+/- 17,68
tPA	3	42,67	+/- 26,43	51,68	+/- 14,01
Proteinase 3	3	48,78	+/- 10,11	52,89	+/- 10,34

Es konnte kein signifikanter Unterschied innerhalb der Kontrollversuchsgruppe zwischen Basal und Messzeitpunkt 5.3 festgestellt werden. Man kann daher davon ausgehen, dass es keine Änderung des Koronarflusses am Herzen ohne Enzymapplikation gibt. Ein signifikanter Unterschied des CF über die Zeit zeigte sich bei der Applikation von Thrombin und Tryptase (Basal zu 5.3). Dabei handelte es sich jedoch um eine Verringerung der Flussrate. Eine Erhöhung des CF kam bei keinem der getesteten Enzyme vor (Tabelle 6).

3.1.2 Koronarleck

Ein Transsudatanstieg im Laufe des Versuchs wäre ein Hinweis auf einen vermehrten Austritt von intravasaler Flüssigkeit ins Gewebe. Dies könnte ein Zeichen von Schäden an der Glykokalyx sein, da diese als Barriere für Wasser dient [Gao et al., 2010]. Deshalb wurde das Transsudat im Versuchsablauf ebenso gesammelt, wie die Koronarflüssigkeit.

Wir errechneten aus den gesammelten Proben einen Transsudatfluss (TF) in ml/min/g Trockenherzgewicht und verglichen die Basalwerte mit denen der Probe 5.3 innerhalb einer Versuchsgruppe (Tabelle 7).

*Tabelle 7: Transsudatfluss [ml/min/g Trockengewicht]: Vergleich der Transsudatflussrate Basal vs. Mzp 5.3. Nur Hyaluronidase zeigt einen signifikanten Anstieg. Vergleich der Differenzwerte (Mzp 5.3 – Basal) von enzymbehandelten Herzen und Kontrollgruppe: auch hier findet sich nur bei Hyaluronidase ein signifikanter Anstieg der Transsudatmenge (Mittelwerte +/- SD, gepaarter t-Test, * p<0,05, # p<0,05).*

Versuchsgruppe	n	Basal	Mzp 5.3	Differenz
Kontrolle	9	3,11 +/- 1,45	3,95 +/- 2,29	0,84 +/- 1,04
Thrombin	8	3,20 +/- 1,80	4,89 +/- 2,89	1,69 +/- 3,04
Tryptase	11	2,20 +/- 1,10	2,5 +/- 0,86	0,31 +/- 0,83
Cathepsin B	12	2,98 +/- 3,08	3,64 +/- 1,85	0,10 +/- 2,90
Elastase	6	1,90 +/- 1,32	3,19 +/- 2,52	1,28 +/- 1,63
Plasmin	4	1,45 +/- 0,67	2,12 +/- 1,19	0,67 +/- 0,77
Hyaluronidase	4	2,34 +/- 1,01	5,22* +/- 1,48	2,88# +/- 1,11
tPA	3	2,00 +/- 1,32	2,45 +/- 1,27	0,44 +/- 0,19
Proteinase 3	3	2,86 +/- 1,01	6,3 +/- 4,31	3,44 +/- 3,99

Dabei konnten wir nur für die Versuchgruppe Hyaluronidase einen signifikanten Anstieg der Transsudatmenge über die Zeit (Basal zu 5.3) nachweisen. Bei den anderen Versuchsgruppen ergab sich keine statistisch signifikante Veränderung über die Zeit.

Aus den Daten der Tabelle 7 ist allerdings zu erkennen, dass der Transsudatfluss bei allen Versuchsgruppen dazu neigte mit der Zeit anzuwachsen. Möglicherweise könnte eine Enzymbehandlung dieses „natürliche“ Anwachsen verstärken.

Wir ermittelten daher aus den Transsudatwerten eine Differenz von Basal zu 5.3 und verglichen die Differenzwerte der Versuchgruppen untereinander, d.h. die errechnete Differenz zwischen Basalmenge und 5.3-Menge der Kontrollen wurde mit den Differenzwerten der enzymbehandelten Herzen verglichen (Tabelle 7). Auch bei dieser Betrachtung kam es nur bei Hyaluronidase zu einem signifikant gesteigerten Transsudatfluss. Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass kein Enzym außer Hyaluronidase zu einem Koronarleck geführt hat. Wir werteten dies als Hinweis für ein funktionelles Shedding der Glykokalyx.

3.2 Glycocalyxbestandteile im Koronareffluat

3.2.1 Normierung von Messserien

Aus logistischen Gründen war es unmöglich, alle Proben gleichzeitig zu messen. Die ELISA-Tests wurden z. T. innerhalb einer Versuchsgruppe als auch innerhalb einzelner Herzreihen pro Enzym zu unterschiedlichen Terminen mit unterschiedlichen Chargen von Kits gemessen. Somit ergaben sich 3 Messserien (Serie 1, 2 und 3). Wir mussten feststellen, dass es zu erheblichen Unterschieden bei den Werten der Konzentrationen von Kit zu Kit kam. Bereits innerhalb der Versuchsgruppen traten Inhomogenitäten zwischen einzelnen Messserien auf und zwar sowohl für Syndekan, Heparansulfat als auch für Hyaluronsäure.

Tabelle 8: Messserie 1: Syndekan-1, HS und HA

Versuchsgruppe	Versuchsserie	Herzen	Gemessene Proben
Kontrollen	0	H2,H4-10	5.1-5.3
Thrombin	10	H1-5	5.1-5.3
Tryptase	11	H1-5	5.1-5.3
Cathepsin B	12	H1-5	5.1-5.3
Elastase	13	H1-3	5.1-5.3

Die Proben der Serie 1 (Tabelle 8) wurden als erste gemessen, um einen ersten Überblick zu erhalten, ob in den Proben erhöhte Mengen von Syndekan, Heparansulfat oder Hyaluronsäure enthalten waren.

Tabelle 9: Messserie 2: Syndecan-1, HS und HA

Versuchsgruppe	Versuchsserie	Herzen	gemessene Proben
Kontrollen	0	H2-10	B
Thrombin	10	H1-5	B
Tryptase	11	H1-5	B
Cathepsin B	12	H1-5	B
Elastase	13	H1-3	B

Versuchsgruppe	Versuchsserie	Herzen	gemessene Proben
Thrombin	3	H1-3	B, 5.1-5.3
Tryptase	4	H1-6	B, 5.1-5.3
Cathepsin B	2	H1-7	B, 5.1-5.3
Elastase	6	H1-3	B, 5.1-5.3
Plasmin	1 & 5	H1, H1-3	B, 5.1-5.3
Hyaluronidase	9	H1-4	B, 5.1-5.3
tPA	7	H1-3	B, 5.1-5.3
Proteinase 3	8	H1-3	B, 5.1-5.3

Serie 2 (Tabelle 9) wurde im Anschluss an Serie 1 gemessen, um die Basalwerte (B) mit den Zeitverlaufswerten (5.1-5.3) vergleichen zu können, da sich bei Serie 1 keine klaren Niveauunterschiede abzeichneten.

Ergänzend wurden noch Proben von weiteren Versuchsgruppen gemessen, die zu dem Zeitpunkt zusätzlich vorlagen. Bei diesen Versuchsgruppen wurden alle Werte, Basal und Zeitverlauf anhand einer Kit-Charge gemessen.

Tabelle 10: Messserie 3: nur Syndekan- und Hyaluronsäurebestimmung

Versuchsgruppe	Versuchsserie	Herzen	gemessene Proben
Kontrollen	0	H2-6	B, 5.1-5.3
Elastase	13	H1-3	B, 5.1-5.3

Wir wiederholten die Messungen einiger Kontrollgruppenherzen und Elastasegruppenherzen in Serie 3 (Tabelle 10), da sich zwischen Serie 1 und Serie 2 ein deutlicher Unterschied des Werteneiveaus abzeichnete. Daraus ergab sich die Notwendigkeit und Möglichkeit einer Normierung von den unterschiedlichen Messserien.

3.2.1.1 Normierung für Hyaluronsäure und Syndekan

Bei Syndekan und Hyaluronsäure konnten wir die Serien 1 und 2 auf Serie 3 normieren, da wir aus der Versuchsgruppe Kontrollen (0, H2-H6) und Elastase (13, H1-H3) die Werte für Syndekan und Hyaluronsäure doppelt gemessen hatten. Somit ergab sich aus dem direkten Vergleich jeweils ein Multiplikationsfaktor für Serie 1 und Serie 2 bei Hyaluronsäure (Tabelle 11) und Syndekan (Tabelle 12). Die Werte der Versuchsgruppen in den verschiedenen Messserien (siehe Tabelle 8 und Tabelle 9) wurden dann mit den entsprechenden Faktoren (F) multipliziert (Formel 3, Formel 4), um das gleiche „Niveau“ zu bekommen.

Formel 3: Normierung S1 auf S3

Wert S1 x F1

Formel 4: Normierung S2 auf S3

Wert S2 x F2

Tabelle 11: Hyaluronsäureauswasch [ng/min/g]: Faktorenberechnung für Normierung von Messserie 1 und Messserie 2 mit Hilfe von Messserie 3; Faktor F1 ist 0,23, Faktor F2 ist 1,77 (Mittelwert +/- SD)

Versuchsgruppe	Faktor F1 (Zv)		Faktor F2 (B)	
	S3/S1		S3/S2	
Kontrolle	0,25	+/- 0,13	1,37	+/- 0,54
Elastase 13	0,19	+/- 0,08	2,42	+/- 2,39
	0,23	+/- 0,11	1,77	+/- 1,61

Tabelle 12: Syndekanauswasch [ng/min/g]: Faktorenberechnung für Normierung von Messserie 1 und Messserie 2 mit Hilfe von Messserie 3; Faktor F1 ist 34,65, Faktor für F2 ist 0,95 (Mittelwert +/- SD).

Versuchsgruppe	Faktor F1 (Zv)		Faktor F2 (B)	
	S3/S1		S3/S2	
Kontrolle	14,39	+/- 5,37	0,9	+/- 0,17
Elastase 13	61,66	+/- 49,4	1,03	+/- 0,3
	34,65	+/- 40,12	0,95	+/- 0,24

3.2.1.2 Normierung für Heparansulfat

Bei HS lagen keine Daten aus Serie 3 vor. Somit war keine Normierung der Messserien durchführbar, zudem wies HS ein zeitabhängiges Auswaschverhalten auf (siehe 3.2.2.2.c). Wir beschränkten uns daher auf den Vergleich von Enzymeffekten innerhalb jeweils einer Messserie (siehe 3.2.2.3.c)

3.2.2 Statistische Auswertung

3.2.2.1 Einleitung

Um die Ergebnisse bei Enzymapplikation auszuwerten, haben wir, getrennt für Syndekan, HA und HS, verschiedene Vergleiche erstellt und statistisch bewertet.

Zunächst wurde das Auswaschverhalten der GAG über die Zeit betrachtet (siehe 3.2.2.2). Als nächstes wurden innerhalb einer Versuchsgruppe der Basalwert mit dem Messzeitpunkt (Mzp) 5.3 (längste Enzymeinwirkungszeit auf die Glykokalyx) verglichen (siehe 3.2.2.3). Im dritten und letzten Schritt betrachteten wir die Mittelwerte der Zeitverläufe (siehe Abb. 11). Wir verglichen dabei die Enzymgruppen mit der Kontrollgruppe, um zu sehen, ob sich eine Erhöhung der GAG-Werte im Effluat mit Enzymapplikation ergibt. Wir verglichen auch die Enzymwerte untereinander, um mögliche Unterschiede in den abgegebenen Mengen zu erkennen.

Mit Hilfe dieser Vergleiche sollte gezeigt werden, ob ein oder mehrere verwendete Enzyme prinzipiell ein Shedding der EG herbeiführen können.

3.2.2.2 Auswaschverhalten bei Kontrollherzen

3.2.2.2.a Syndekan

Für Syndekan zeigt sich keine signifikante Änderung des Auswasch über die Zeit bei unbehandelten Kontrollherzen (siehe Tabelle 13).

Eine Normierung der Serien war somit möglich geworden, da die Zeitverlaufswerte und Basalwerte eines Herzens auf dem gleichen Niveau verharren.

Tabelle 13: Syndekan: Auswaschverhalten [ng/min/g] der Kontrollgruppe der Messserie 3 (n=5, Mittelwert +/- SD, keine signifikanten Unterschiede)

Mzp	B	5.1	5.2	5.3
	2,89 +/- 0,79	2,92 +/- 0,58	3,58 +/- 1,1	3,33 +/- 1,38

3.2.2.2.b Hyaluronsäure

Bei HA kann ebenfalls keine statistisch signifikante Änderung des Auswasch über die Zeit bei unbehandelten Kontrollherzen festgestellt werden (siehe Tabelle 14).

Auch hier gilt, dass durch die Konstanz des Auswasches eine Normierung der Serien möglich ist. Allerdings zeigt der Auswaschverlauf eine Tendenz zur Abnahme mit der Zeit der Perfusion, anders als im Fall von Syndekan.

Tabelle 14: Hyaluronsäure: Auswaschverhalten [ng/min/g] in der Kontrollgruppe der Serie 3 (n=5, Mittelwert +/- SD, keine signifikanten Unterschiede)

Mzp	B	5.1	5.2	5.3
	21,75 +/- 18,25	12,19 +/- 6,22	8,36 +/- 4,24	8,09 +/- 6,2

3.2.2.2.c Heparansulfat

Bei HS kann man eine signifikante Veränderung der Mengen im Efflут von unbehandelten Kontrollherzen selbst von Mzp 5.1 zu Mzp 5.3 erkennen (siehe Tabelle 15). Allerdings handelt es sich dabei um eine deutliche Reduzierung der Auswaschrate.

Aus diesen Daten lässt sich sehen, dass HS in den ersten Phasen des Versuchsablaufes – also auch in 5.1 – spontan stark aus der EG gelöst wird, ein Prozess der in den späteren Auswaschphasen (5.2 und 5.3) rasch an Bedeutung verliert.

*Tabelle 15: Heparansulfat [ng/min/g]: Auswaschverhalten der Kontrollgruppe in Messserie 1: es kann eine signifikante Abnahme der Auswaschrate von Mzp 5.1 auf Mzp 5.3 erkannt werden (n=8, Mittelwerte +/- SD, * p<0,05).*

Mzp	5.1	5.2	5.3 *
	1057,77 +/- 409,63	420,69 +/- 494,58	81,44 +/- 43,29

Zusammenfassend kann man sagen, dass HS als einziger gemessener EG-Bestandteil zu einem spontan abnehmenden Auswaschverhalten neigt, obwohl HA mit seiner eigentlich lockeren Bindung zur EG der wahrscheinlichere Kandidat gewesen wäre. Bei Syndekan kann man anhand seiner transmembranösen Verankerung in der Endothelzellmembran gut verstehen, warum es keine spontane Änderung der Auswaschrate zeigt.

3.2.2.3 Basalwert verglichen mit Messzeitpunkt 5.3

3.2.2.3.a Syndekan

In keiner Versuchsgruppe wird eine signifikante Veränderung der Syndekanmenge im Effluat bei dem Vergleich von Basalwert mit dem Mzp 5.3 sichtbar (siehe Tabelle 16).

Dieses Resultat deckt sich mit dem Mangel an Veränderung beim spontanen Auswaschverhalten (siehe Kapitel 3.2.2.2.a), bedeutet aber, dass keines der getesteten Enzyme in der Lage war, ein signifikantes Shedding von Syndecan-1 hervorzurufen.

Tabelle 16: Syndekan [ng/min/g]: Vergleich der Basalwerte mit Mzp 5.3 jeweils innerhalb einer Versuchsgruppe. Es sind keine signifikanten Veränderungen nachweisbar (normierte Werte aus S1, S2 und S3, Mittelwert +/- SD, gepaarter t-Test) .

Versuchsgruppe	n	B		5.3	
Kontrollen	9	4,00	+/-.2,01	6,47	+/-.6,33
Thrombin	8	4,29	+/-.1,33	8,98	+/-.8,85
Tryptase	11	2,75	+/-.1,53	3,25	+/-.3,85
Cathepsin B	12	3,45	+/-.1,43	3,03	+/-.2,11
Elastase	6	2,75	+/-.1,52	3,48	+/-.7,13
Plasmin	4	2,64	+/-.1,39	1,77	+/-.1,45
Hyaluronidase	4	2,77	+/-.1,47	2,71	+/-.1,89
tPA	3	1,27	+/-.0,69	1,43	+/-.0,95
PR3	3	1,98	+/-.1,37	2,19	+/-.1,28

3.2.2.3.b Hyaluronsäure

Eine signifikante Änderung der Hyaluronsäureauswaschrate zwischen Proben B und 5.3 konnte bei den Versuchsgruppen Cathepsin B, Tryptase, Thrombin, Hyaluronidase und der Kontrollgruppe aufgezeigt werden (siehe Tabelle 17). Bei der Veränderung handelt es sich bei allen Gruppen außer Hyaluronidase um eine Reduzierung der Menge im Effluat. Nur bei Hyaluronidase konnte eine signifikante Erhöhung verzeichnet werden, sogar um ein 10 faches der Norm.

*Tabelle 17: Hyaluronsäure [ng/min/g]: Vergleich der Basalwerte mit Mzp 5.3 jeweils innerhalb einer Versuchsgruppe. Nur bei dem Enzym Hyaluronidase kann ein signifikanter Anstieg der HA-Menge im Effluat gezeigt werden. Bei den anderen signifikanten Werten handelt es sich um eine Reduzierung der HA-Menge im Effluat (Mittelwerte +/- SD, gepaarter t-Test, * p<0,05,).*

Versuchsgruppe	n	B	5.3
Kontrollen *	9	27,71 +/- 22,68	5,36 +/- 6,30
Thrombin *	8	48,00 +/- 30,35	11,31 +/- 7,05
Tryptase *	11	33,73 +/- 9,51	20,44 +/- 14,94
Cathepsin B *	12	57,54 +/- 45,52	19,92 +/- 16,79
Elastase	6	72,67 +/- 7,13	37,64 +/- 34,57
Plasmin	4	24,45 +/- 5,83	22,21 +/- 6,29
Hyaluronidase *	4	37,57 +/- 21,47	457,13 +/- 207,51
tPA	3	13,70 +/- 9,15	12,46 +/- 8,59
Proteinase 3	3	23,44 +/- 17,15	26,51 +/- 16,01

Die Reduzierung der Auswaschrate von HA bei Cathepsin B, Tryptase, Thrombin und bei der Kontrollgruppe spiegelt wohl ein spontanes Auswaschverhalten (siehe Tabelle 14) von nur locker gebundenen Molekülen wider. Dafür spricht, dass sich die Kontrollgruppe ebenso verhält wie die drei oben genannten Enzyme. Da sich Elastase nicht wie Cathepsin B, Thrombin und Tryptase verhält (alle Daten stammen aus Messserie 1), kann man davon ausgehen, dass nicht die Normierung der Messserien 1, 2 und 3 dieses Phänomen per se bedingt.

Sicher kann man sagen, dass kein Enzym außer Hyaluronidase ein Shedding bewirkt, das über die akute Applikationsphase 5.1 bis in die Auswaschphase 5.3 hinein wirkt.

3.2.2.3.c Heparansulfat

Der Vergleich zwischen Basalwert und Mzp 5.3 kann nur eingeschränkt bei Heparansulfat angewandt werden, da eine Normierung von Serie 1 und Serie 2 auf Grund des Auswaschverhaltens nicht möglich ist (siehe Tabelle 15).

Da die meisten Messwerte aus Serie 2 stammen, kann mit diesen Werten eine Nebeneinanderstellung der Enzymgruppen durchgeführt werden, wobei die Versuchsserien Cathepsin B 12, Thrombin 10, Tryptase 11, Elastase 13 und die Kontrollgruppe nicht miteinbezogen werden können (Werte aus Serie 1).

Tabelle 18: Heparansulfat [ng/min/g]: Vergleich B mit Mzp 5.3 innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen in Messserie 2; es konnte keine signifikante Veränderung gezeigt werden (Mittelwerte +/- SD, gepaarter t-Test).

Versuchsgruppe	n	B	5.3
Thrombin	3	101,45 +/- 98,14	25,14 +/- 16,27
Tryptase	6	35,28 +/- 16,52	28,52 +/- 25,01
Cathepsin B	7	128,95 +/- 67,2	53,77 +/- 30,19
Elastase	3	96,72 +/- 63,39	23,07 +/- 15,31
Plasmin	4	51,53 +/- 35,92	87,42 +/- 66,25
Hyaluronidase	4	41,67 +/- 40,06	16,99 +/- 16,70
tPA	3	17,39 +/- 8,51	12,12 +/- 9,60
Proteinase 3	3	25,28 +/- 7,09	39,02 +/- 12,92

In keiner der Versuchsgruppen und Versuchsserien kann man eine signifikante Zunahme der HS-Menge im Effluat erkennen. Dieser Befund entspricht der Erwartung, denn Proteasen können keine Abspaltung von HS-Ketten direkt bewirken, da diese über glykosidische Verknüpfungen von Zuckermolekülen an Syndekan gebunden sind. Eine Tendenz zur Absenkung der HS-Menge im Effluat ist jedoch bei fast allen Enzymgruppen zu beobachten, was durch das bei den Kontrollen festgestellte Auswaschphänomen erklärt werden kann (3.2.2.2.c).

3.2.2.4 Vergleich der Zeitverlaufswerte der Kontrollgruppe mit den Enzymgruppen

3.2.2.4.a Syndekan

Im Vergleich zwischen dem Mittelwert (Mw) der Zeitverläufe (Zv=5.1, 5.2, 5.3) der Enzymgruppen mit der Kontrollgruppe kann bei vielen Enzymgruppen eine signifikante

Veränderung aufgezeigt werden (Tabelle 19). Allerdings handelt es sich bei allen Gruppen um eine Verminderung der Syndekanmenge im Effluat.

*Tabelle 19: Syndekanauswasch [ng/min/g]: Vergleich Zeitverlauf Kontrollen vs. Enzymmittelwerte (Mittelwerte +/- SD, ungepaarter t-Test, * p<0,05). Beim signifikanten Unterschied der Enzyme handelt es sich stets um eine Reduzierung der Syndekanmenge im Effluat.*

Versuchsgruppe	n	Zeitverlauf	
Kontrollen	9	11,66	+/- 7,10
Thrombin	8	5,21	+/- 4,33
Tryptase*	11	4,15	+/- 3,25
Cathepsin B*	12	4,27	+/- 2,59
Elastase*	6	2,61	+/- 2,81
Plasmin*	4	2,53	+/- 1,26
Hyaluronidase	4	2,44	+/- 1,54
tPA	3	1,73	+/- 0,93
PR3	3	2,79	+/- 2,20

Man kann also davon ausgehen, dass es in Gegenwart der hier untersuchten Enzyme zu keinem Syndekanshedding kommt. Dieses Resultat deckt sich mit dem anderen oben beschriebenen Vergleich von B vs. Mzp 5.3 (3.2.2.2.a).

Syndekan lässt sich folglich durch keines der verwendeten Enzyme aus der EG entfernen. Diese Ergebnisse widersprechen anderen Studien, die ein Shedding von Syndekan-1 durch Thrombin, Elastase und Plasmin beobachten konnten [Fitzgerald et al., 2000].

3.2.2.4.b Hyaluronsäure

Eine signifikante Zunahme der HA-Menge im Effluat lässt sich durch Cathepsin B, Elastase, Thrombin, Proteinase 3 und Hyaluronidase hervorrufen, wobei die Erhöhung durch Hyaluronidase am deutlichsten ist (ca. 160 fach). Bei den anderen Enzymen kann man eine Erhöhung um das 2 – 7-fache erkennen (Tabelle 20).

Dieses Resultat deutet an, dass sich HA leicht aus der EG lösen lässt. Das unspezifische Enzymmuster entspricht der eher lockeren Einbindung von HA in die EG.

*Tabelle 20: Hyaluronsäureauswasch [ng/min/g]: Vergleich Zeitverlauf Kontrollen vs. Enzymmittelwerte (Mittelwerte +/- SD, ungepaarter t-Test, *p<0,05). Bei fast allen Enzymen ist eine Erhöhung der HA-Menge im Effluat zu sehen, allerdings beträgt die Erhöhung bei Hyaluronidase 160-fach während bei den anderen Enzymen die maximale Erhöhung 7-fach ist.*

Versuchsgruppe	n	Zeitverlauf
Kontrollen	9	7,4 +/- 6,7
Thrombin*	8	27,92 +/- 32,02
Tryptase	11	19,04 +/- 13,87
Cathepsin B*	12	30,43 +/- 19,27
Elastase*	6	55,62 +/- 39,28
Plasmin*	4	40,07 +/- 16,48
Hyaluronidase*	4	1197 +/- 524,72
tPA	3	14,96 +/- 10,33
PR3*	3	27,1 +/- 17,08

3.2.2.4.c Heparansulfat

Die Normierung von S1 und S2 ist bei HS nicht möglich, da ein zeitabhängiges Auswaschverhalten von HS aus der Glykokalyx zu erkennen ist (siehe Kapitel 3.2.2.2.c). Allerdings konnte mit Werten der Serie 1 ein Vergleich einiger Zeitverlaufsmittelwerte durchgeführt werden. Dabei handelt es sich um die Versuchsserien Thrombin 10, Tryptase 11, Cathepsin B 12, Elastase 13 und die Kontrollgruppe. In den genannten Versuchsserien mit Enzymen handelt es sich jeweils um die Serie mit der höheren Aktivität (siehe Tabelle 2).

*Tabelle 21: Heparansulfatauswasch [ng/min/g]: Vergleich Zeitverlaufsmittelwerte Kontrollen vs. Enzymmittelwerte in S1 (Mittelwerte +/- SD, ungepaarter t-Test, * p<0,05)*

Versuchsgruppe	n	Zeitverlauf
Kontrollen 0	8	654 +/- 254
Thrombin 10	5	1022 +/- 627
Tryptase 11	5	804 +/- 327
Cathepsin B 12 *	5	1556 +/- 666
Elastase 13 *	3	1413 +/- 70

Die Daten in Tabelle 21 lassen erkennen, dass sich bei Cathepsin und Elastase eine deutliche Zunahme (etwa 2-fach) von HS im Effluat gegenüber der Kontrolle ergibt. Bei Thrombin und

Tryptase zeigt sich dieser Effekt nicht. Somit kann man davon ausgehen, dass Cathepsin B und Elastase HS aus der Glykokalyx lösen.

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Suche nach einer Sheddase aus dem Kreis der Serin- und Cysteinproteasen, da viele Enzyme aus diesen beiden Gruppen an entzündlichen Vorgängen im Körper und an der Hämostase beteiligt sind. Diese Vorgänge erfordern einen Zugang von Zellen des Blutes an die Gefäßwand bzw. eine Rezeptorenbindung an der endothelialen Oberfläche. Daher ist ein Shedding der Glykokalyx Voraussetzung, damit Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten Kontakt zur Gefäßwand bekommen [Chappell et al., 2008b] (siehe Abb. 2).

4.1 Auswahl der Enzyme

Ein Shedding der EG als Antwort auf einen entzündlichen Prozess, bei Hyperglykämie, septischen Schock und bei Ischämie mit Reperfusion ist bereits bekannt [Becker et al., 2010a, Becker et al., 2010b, Chappell et al., 2008b]. Bei diesen Vorgängen im Körper kann es zu einer Aktivierung von Immunzellen kommen, die als Reaktion Proteasen aktivieren, die für das Shedding verantwortlich sein könnten. Wir untersuchten 7 verschiedene Proteasen und eine Glykosidase (Hyaluronidase).

Folgende Forschungsergebnisse wurden der Auswahl zugrunde gelegt:

- Chappell et al. [Chappell et al., 2009] konnten zeigen, dass sowohl Antithrombin III als auch Hydrokortison ein Shedding der EG reduzieren kann. Antithrombin III ist ein Inhibitor von Serinproteasen wie Thrombin, Elastase, Plasmin und Proteinase 3. Hydrokortison verhindert u.a. die Degranulation von Mastzellen. Mastzellen werden wiederum durch TNF α und Ischämie aktiviert, wobei die Serinprotease Tryptase freigesetzt wird [Annecke et al., 2010].
- Aus Entzündungszellen wie neutrophilen Granulozyten werden Elastase und Proteinase 3 am Ort der Entzündung freigesetzt [Chappell et al., 2009, Heutinck et al., 2010].
- Cathepsin B findet man in Endothelzellen im ganzen Körper, also auch in den Koronargefäßen. Annecke et al. [Annecke et al., 2010] und Chappell et al. [Chappell et al., 2008b] konnten zeigen, dass die Aktivität von Cathepsin B im Koronareffluat nach längerer Ischämie am Herzen erhöht war, weshalb wir diese Cysteinprotease mit in die Enzymliste aufnahmen.

- Fitzgerald et al. [Fitzgerald et al., 2000] und Subramanian et al. [Subramanian et al., 1997] konnten bereits ein Shedding von Syndekan-1 durch Thrombin und Plasmin in vivo zeigen. Das Enzym spielt vor allem in der Gerinnung eine wichtige Rolle. Ein weiteres Enzym aus dem Bereich der Hämostase ist tPA. Es wirkt einer Gerinnung durch indirekte Aktivierung der Fibrinolyse entgegen.
- Gao et al. wiesen eine Ausdünnung der Glykokalyx in vivo durch Hyaluronidase nach [Gao et al., 2010].
- Hyaluronidase macht bekannterweise ein Shedding von HA [Henry et al., 1999, Stevens et al., 2007], weshalb wir es als Positivkontrolle verwendeten. Anhand der mit Hyaluronidase gewonnenen Daten wurde deutlich, dass bei einem Shedding eines der drei Hauptbestandteile der EG tatsächlich ein enormer Anstieg der Werte zu erkennen ist (siehe Tabelle 17). Somit bestätigte Hyaluronidase sowohl unseren Versuchsansatz als auch die durchgeführte Normierung der Messwerte.

4.2 Auswertung der ELISA-Messergebnisse

Es ergaben sich grundsätzliche Einsichten, wie mit den Rohdaten aus den ELISA-Messungen zu verfahren war. Beabsichtigt war ein Vergleich der Auswaschraten von Syndekan, Heparansulfat und Hyaluronsäure unter dem Einfluss der verschiedenen Enzyme jeweils mit den Auswaschraten von Kontrollherzen. Die Messungen erfolgten in 3 Messserien. Da es Probleme bei dem Vergleich der Messserien gab, mussten wir Messserie 1 und Messserie 2 mit Hilfe von Messserie 3 normieren (siehe Kapitel 3.2.1). Dies wurde dadurch ermöglicht, dass wir einige Proben sowohl aus Messserie 1 und aus Messserie 2 in Messserie 3 quasi doppelt gemessen hatten (siehe Tabellen 8, 9 und 10) und es über die Zeit zu keinem signifikanten Auswasch bei HA und Syndekan kam (siehe Tabellen 13 und 14).

Bei HS zeigte sich ein Auswaschverhalten über die Zeit (Tabelle 15), es gab allerdings keine Daten aus der Messserie 3, um einen Normierungsfaktor zu berechnen. Hier wurden daher nur die Daten innerhalb einer Messserien verglichen ohne vorherige Normierung. Bei Messserie 1 (HS) hatten wir Daten aus der Kontrollgruppe und den Enzymgruppen Thrombin, Tryptase, Cathepsin B und Elastase. In Messserie 2 (HS) wurden keine Kontrollwerte gemessen, so dass ein Vergleich zwischen den Enzymgruppen gewählt wurde.

Einige der Enzyme wurden von uns in einer niedrigeren und einer höheren Aktivität appliziert, woraus zwei Versuchsserien mit ein und dem selben Enzym (Versuchsgruppe) resultierten. Für die statistische Evaluierung wurden die zwei Versuchsserien in der Regel zusammengelegt. Durch die höhere n-Zahl bei Zusammenlegung hofften wir, eine höhere Aussagekraft zu erhalten.

4.3 Zeitliches Auswaschverhalten

Die Bestandteile der EG sind über die Dicke der EG unterschiedlich verteilt. An der Oberfläche der Endothelzellen ist die EG besonders dicht, da dort die Synthese hoch ist. HS ist am stärksten an der luminalen Seite der EG vertreten, wodurch sich das Auswaschen im koronaren Effluat gut erklären lässt [Gao et al., 2010]. Syndekan ist als transmembranöses Molekül an der apikalen Endotheloberfläche gut verankert. HA ist nur über die Adhäsionsmoleküle/Rezeptoren CD 44 an die Zelloberfläche gebunden. In Richtung Lumen kommt es durch den ständigen Blutfluss zu einem Herauslösen von HA aus der EG.

Das Auswaschverhalten von Syndekan und HA über die Zeit bei Kontrollherzen wurde mit der Messserie 3 ausgewertet, da hier die Daten mit jeweils einem Kit derselben Charge bestimmt waren und keine Normierung innerhalb der Herzreihe notwendig war.

4.3.1 Syndekan

Syndekan zeigte ein zeitlich konstantes „basales“ Auswaschverhalten auf niedrigem Niveau, was sich durch die feste Bindung mit dem transmembranen Teil von Syndekan erklären lässt. Syndekan ist somit von der Endothellmembran nur schwer lösbar. Bei normotoner und normoxischer Perfusion der Herzen erfolgte offensichtlich keine nennenswerte Aktivierung endogener Sheddasen. Diese Aussage wird auch durch den Vergleich der Basalwerte vs. Messzeitpunkt 5.3 bestätigt, bei dem keine signifikante Änderung vor und nach dem Auswasch der getesteten Enzyme zu sehen war (siehe Tabelle 16). Dieses Ergebnis wird durch die Studie von Chappell et al. [Chappell et al., 2008a] gestützt, die keinen zeitlich veränderten Auswasch von Syndekan selbst bei Behandlung der Herzen mit Heparinase fanden.

4.3.2 Hyaluronsäure

Bei unseren Daten zeigte sich kein statistisch signifikanter Auswasch über die Zeit, was durchaus verwunderlich ist, da HA nicht über PG an die Zellmembran gebunden ist, sondern

zum Teil nur locker in die EG eingewebt ist (Abb. 1). Daraus kann man schließen, dass es auch bei HA zu einem pathologischen Vorgang im Körper wie z.B. Entzündung kommen muss, bevor HA aus der EG gelöst wird. Allerdings lässt sich die HA verhältnismäßig leicht aus der EG lösen, da wir bei Gabe mehrerer Enzyme eine erhöhte Menge im Effluat zeigen konnten (Cathepsin B, Elastase, Thrombin, Proteinase 3 und Hyaluronidase). Der mit Abstand deutlichste Anstieg ließ sich mit Hyaluronidase hervorrufen. Hier konnten Werte bis zum 160-fachen des Basalwertes gemessen werden, während bei den anderen Enzymen eine maximale Erhöhung um das 7-fache zu sehen war (siehe Tabelle 20).

4.3.3 Heparansulfat

Bei HS war ein Vorgehen wie bei Syndekan und HA nicht möglich. Stattdessen zogen wir die Zeitverlaufswerte (5.1-5.3) aus Messserie 1 heran und konnten aus diesen ein Auswaschverhalten ableiten (siehe Tabelle 15).

Heparansulfat ist als Seitenkette an Syndekan und andere Oberflächenmoleküle gebunden [Pahakis et al., 2007, Reitsma et al., 2007]. Der Vorgang der Isolierung der Versuchsherzen kann zu einem partiellen transienten Shedding führen. Die Organentnahme und die Präparation ist mit einer kurzen Ischämie und Stase des koronaren Blutflusses verbunden. Beides kann zur Aktivierung von Mastzellen führen [Fitzgerald et al., 2000, Gilles et al., 2003]. Diese enthalten nachweislich die Lyase Heparanase, die imstande ist, HS spezifisch abzulösen [Becker et al., 2010b].

4.4 *Shedding*

4.4.1 Syndekan

Für Syndekan konnte weder ein Auswasch noch ein signifikantes Shedding mit den verwendeten Enzymen gezeigt werden. Es kam zwar zu geringfügig unterschiedlichen Syndekanmengen, aber nicht zu einem eindeutigen Anstieg wie bei HA unter dem Einfluss von Hyaluronidase. Für die Enzyme Thrombin, Plasmin und Elastase berichteten Fitzgerald et al. über ein Shedding von Syndekan [Fitzgerald et al., 2000]. Dieses Ergebnis ließ sich in unserer Studie nicht verifizieren, jedenfalls nicht bei den verwendeten Enzymaktivitäten. Sollte ein Shedding von Syndekan durch Thrombin, Plasmin und Elastase passieren, dürfte

dieses Shedding nur eine untergeordnete Rolle spielen und diese Enzyme keine Hauptsheddasesen für Syndekan darstellen.

Ein dynamisches Gleichgewicht aus Abbau und Synthese von EG Bestandteilen führt zu einem basalen Syndekanspiegel im Blut unter physiologischen Bedingungen [Annecke et al., 2010, Chappell et al., 2008b, Reitsma et al., 2007]. Dies bewirkt physiologische Schwankungen der Syndekanmengen im Effluat und erklärt auch die Ergebnisse unserer Studie.

4.4.2 Hyaluronsäure

Im Vergleich zwischen Basalwert und Messzeitpunkt 5.3 konnte man bei der Hyaluronidaseinfusion einen eindeutigen Anstieg von HA im Effluat erkennen (siehe Tabelle 17), wohingegen bei der Kontrollgruppe die Veränderung insignifikant blieb.

Hyaluronidase wurde in dieser Arbeit als Positivkontrolle verwendet, da ein Shedding von HA durch Hyaluronidase bereits nachgewiesen wurde [Gao et al., 2010, Henry et al., 1999]. Außerdem konnte durch das signifikante Ergebnis gezeigt werden, dass der Versuchsansatz und die Datenauswertung mit Konzentrierung der Proben und Normierung der Messserien eindeutige Veränderungen durch Shedding sehr wohl erfasst.

Ein direkter Angriff von Proteasen auf das polyglykosidische Molekül HA ist ausgeschlossen. HA ist jedoch nicht wie Syndekan und HS direkt bzw. indirekt durch einen transmembranen Anker mit der Zelloberfläche verbunden, sondern an ein endotheliales Rezeptorprotein CD44 gebunden (Abb. 1). Theoretisch könnten Proteasen durch Zerstörung von CD44 eine Ablösung von HA bewirken. Tatsächlich wird HA durch mehrere der hier getesteten Enzyme (Cathepsin B, Elastase, Thrombin, Proteinase 3 und Hyaluronidase) verstärkt aus der EG gelöst (Tabelle 20). Damit wird das lumrale Netz der EG ausgedünnt und Makromoleküle können tiefer in die EG eindringen [Henry et al., 1999]. Eine Adhäsion von Blutzellen (Thrombozyten, Leukozyten, Erythrozyten) ist leichter möglich. Da die Adhäsion von Zellen eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen und Koagulation spielt, macht es Sinn, diese physiologischen Vorgänge im Körper so zu ermöglichen, ohne dabei die komplette EG zu entfernen. Dies könnte auch eine Art der Reaktionsmodulation sein, bei der nur eine kleine Anzahl an Rezeptoren für die Adhäsion freigelegt werden.

4.4.3 Heparansulfat

Die über glykosidische Bindung an Syndekan gekoppelten Heparansulfatketten können nicht direkt von Proteasen abgespalten werden. Denkbar wäre ein „piecemeal“ Abbau von Syndekanprotein oder eine indirekte Aktivierung von endogenen Heparanasen im Myokard.

Im Fall von Heparansulfat waren die Vergleiche Basalwert mit Mzp 5.3 innerhalb einer Versuchsgruppe in Messserie 2 ausführbar, obwohl ein Vergleich mit der Kontrollgruppe nicht möglich war. Interessanterweise zeigten die meisten Versuchsgruppen in Messserie 2 (Thrombin, Tryptase, Cathepsin B, Hyaluronidase, tPA, Elastase) eine ähnliche Tendenz zur Absenkung der HS-Menge im Effluat. Man muss also davon ausgehen, dass es keine potenten Sheddasen für HS bei den Proteasen gibt mit einer Wirkung, die 5 – 10 Minuten nach Ende der Applikation anhält (siehe Tabelle 18). Da die Werte im Effluat nach Applikation bei sechs von acht Enzymen eher absanken, spricht dies auch für einen spontanen Auswasch von HS über die Zeit, dessen Geschwindigkeit gleich nach der Herzpräparation wohl am höchsten sein dürfte. Die Werte aus der Messserie 1 erlaubten den Vergleich zwischen einigen Versuchsgruppen mit der Kontrollgruppe hinsichtlich der Zeitverlaufsmittelwerte (siehe Tabelle 21). Es zeigten sich für Cathepsin B und Elastase signifikant erhöhte Werte für HS im Effluat. Elastase als Serinprotease aus neutrophilen Granulozyten und Cathepsin B als Cysteinprotease ubiquitär vorkommend in allen Körperzellen, spielen beide bei entzündlichen Vorgängen im Körper eine Rolle. Ein Shedding führt zur Adhäsion von Entzündungszellen, wodurch eine Migration dieser in das Gewebe ermöglicht wird und die Entzündungsreaktion ihren Lauf nimmt [Becker et al., 2010a, Chappell et al., 2010, Jacob et al., 2009]. Auch wirken abgetrennte HS-Teile chemotaktisch für weitere Entzündungsmediatoren, die dann den Entzündungsprozess verstärken [Chappell et al., 2008b, Götte, 2003, Parish, 2006]. So macht es durchaus Sinn, bei Elastase und Cathepsin B ein Shedding zu beobachten. Festzuhalten ist allerdings, dass das Ausmaß des induzierten Shedding gering war im Vergleich zur Wirkung des Enzyms Heparinase [Chappell et al., 2008a]. Ungeklärt bleibt, genau wie Elastase und Cathepsin B eine Abspaltung von Heparansulfat aus der Glykokalyx bewerkstelligen. Möglich wäre eine Zerstückelung der Syndekan-Proteinkette (piecemeal degradation), die als Träger der Heparansulfate fungiert oder die Aktivierung/Degranulation von Mastzellen, die im Herzen der natürliche Speicher von Heparanase sind [Wang et al., 2011]. Diesbezügliche Untersuchungen stehen noch aus.

4.5 Transsudat und Koronarfluss

Transsudatveränderungen sind ein Hinweis für die Veränderung der hydraulischen Leitfähigkeit und Permeabilität der EG. Ist die EG intakt, dann tritt wenig Flüssigkeit aus dem Lumen in das Gewebe, in unserem Fall an die Herzoberfläche. Ist die EG in ihrer Integrität gestört, dann kommt es zu einem verstärkten Austritt der intraluminalen Flüssigkeit an die Herzoberfläche. Wir konnten zeigen, dass es bei allen Versuchsgruppen im Laufe der Zeit zu einem Transsudatanstieg kam. Zu einem signifikanten Anstieg kam es allerdings nur bei der Positivkontrolle Hyaluronidase (siehe Tabelle 7). Dieses Ergebnis passt zu den Auswaschbefunden, da wir keine wirkliche Sheddase (außer Hyaluronidase) unter den verwendeten Enzymen fanden (siehe Kapitel 3.2.2).

Die EG bildete mit Plasmabestandteilen, v.a. mit Albumin die ESL, welche eine wichtige Rolle bei der Barrierefunktion der EG spielt [Jacob et al., 2007, Reitsma et al., 2007]. Die verwendete Krebs-Henseleit-Pufferlösung beinhaltet aber keine Plasmabestandteile und auch kein Albumin (Tabelle 1). Die Barriere ist also in unseren Versuchen nur durch die EG, restliche Plasmaproteine und Endothelzellen bedingt. Ein steter Verlust an Plasmabestandteilen und der geringfügige aber messbare Auswasch von EG-Komponenten kann zum Anstieg der Transsudatmenge mit der Zeit führen und stellt eine mögliche Erklärung für unsere diesbezüglichen Ergebnisse dar.

Die Hyaluronsäure vernetzt die GAG-PG Elemente der EG miteinander und bildet so ein stabiles Netz an der luminalen Seite [Reitsma et al., 2007], das für Makromoleküle undurchlässig ist. Wird HA entfernt, kommt es zu einem tieferen Eindringen von Makromolekülen in die EG, da sich das Netzwerk an GAG-PG auflockert [Henry et al., 1999]. Zusätzlich steigt die hydraulische Leitfähigkeit.

Betrachtete man den CF, konnte man sehen, dass keines der Enzyme den CF beeinflusste. Dies ist kein trivialer Befund, denn Konstanz des Flusses und des Perfusionsdrucks in den Herzpräparaten bedeutet, dass Transsudatbildung ausschließlich von den Eigenschaften der vaskulären Wandbarriere abhängt.

4.6 ELISA-Tests

Eine der Hauptherausforderungen der Arbeit stellten die divergierenden Ergebnisse der Messserien dar. Obwohl alle Proben mit dem gleichen Verfahren konzentriert und dann mit den gleichen Kits gemessen wurden, waren die Abweichungen der unterschiedlichen Chargen

so bedeutend, dass eine Normierung der Werteneiveaus notwendig wurde, ohne die qualitative Aussage der Messungen zu verändern.

Andere Arbeitsgruppen [Chappell et al., 2008a, Chappell et al., 2009, Chappell et al., 2011] verwendeten die ELISA-Kits der gleichen Hersteller, ohne diese Probleme anzugeben. Eine Erklärung dafür könnte das mehrmalige Einfrieren und Auftauen der Proben sein, zu dem wir aufgrund des Arbeitsablaufes genötigt waren. Eine damit verbundene Veränderung der Proteinstruktur (Denaturierung) könnte zu den verschiedenen Ergebnisniveaus in den ELISA-Tests führen.

Ein wesentlicher Grund für die hier beobachteten Chargenunterschiede dürfte aber darin zu suchen sein, dass wir stets gezwungen waren, am untersten Ende der ELISA-Empfindlichkeit zu messen. Bei hohen Substratkonzentrationen würden diese Abweichungen gar nicht auffallen. Zu bedenken ist auch, dass die ELISA-Antikörper der Kits alle gegen humanes Antigen entwickelt sind und nicht gegen Antigene des Meerschweins.

4.7 Schlussfolgerungen

Es zeigte sich letztendlich, dass ein eindeutiges Ergebnis mit deutlichem Shedding von Glykokalyx nur bei der Positivkontrolle Hyaluronidase für HA zu sehen war. Bei den anderen Enzymen bewirkt die Applikation keine wesentlich messbare Veränderung der Konzentration von EG-Bestandteilen im Effluat. Dennoch waren geringe Spiegel stets vorhanden. Es handelt sich vermutlich dabei um eine physiologische Ab- und Aufbaudynamik der EG, weshalb die Ergebnisse teilweise unterschiedlich waren. Das Ausmaß der Schwankung war aber um Größenordnungen kleiner als das durch das Enzym Hyaluronidase verursachte Shedding von HA.

Dass das Shedding der EG ein multifaktorielles Geschehen *in vivo* ist, wird auch in der Literatur schon erwähnt und durch diese Arbeit bestätigt [Fitzgerald et al., 2000, Subramanian et al., 1997]. Allein die Tatsache, dass es sowohl bei I/R, Diabetes und Arteriosklerose, die alle sehr unterschiedliche Pathologien aufweisen, wohl durch eine strukturelle quantitative Veränderung der EG-Struktur zu den bekannten Krankheitsverläufen kommt, zeigt, dass es mehrere Möglichkeiten für den Abbau der EG geben muss [Grundmann et al., 2009].

Von den Serinproteasen und Cathepsin B versprachen wir uns viel als Sheddasen, haben aber nicht die eindeutigen Ergebnisse geliefert, die wir erwartet hatten. Es stellt sich also nach wie

vor die Frage, welche Proteasen das Shedding von Glykokalyxbestandteilen wie Syndekane bewirken. Dabei kann an Metalloproteinasen (MP) aus der Familie der zinkabhängigen Endopeptidasen gedacht werden [Fitzgerald et al., 2000, Hayashida et al., 2009, Lipowsky et al., 2011]. Manche Typen von MP sind in Vesikeln in Endothelzellen gespeichert und können dadurch lokal schnell freigesetzt werden [Fitzgerald et al., 2000, Lipowsky, 2011, Lipowsky et al., 2011]. Eine verminderte Leukozytenadhäsion bei Gabe von Metalloproteinaseinhibitoren könnte als ein indirekter Hinweis für die Beteiligung von Metalloproteinasen am Shedding erachtet werden [Lipowsky et al., 2011], da bei intakter EG keine Adhäsion möglich wäre [Jacob et al., 2009]. Die genaue zelluläre Signalkaskade, die zur Aktivierung der MP führt, ist noch nicht bekannt [Lipowsky et al., 2011].

Endo et al. [Endo et al., 2003] konnten zeigen, dass Matrix-Metalloproteinase-1 am Shedding von Syndekan-1 beteiligt ist und das ein Shedding von Syndekan-1 zu einer erhöhten Zellmigration führt (z.B. bei Tumorprogression).

Syndekan lässt sich nicht einfach aus der Glykokalyx lösen, sondern es bedarf eines spezifischen Reizes, z.B. Entzündungsvorgängen, um diesen Teil der EG zu entfernen. In der Literatur gibt es Hinweise, dass Syndekan am Core-Protein auf der luminalen Seite der Zellmembran abgespalten werden kann, vor allem durch Metalloproteinasen [Bernfield et al., 1999, Endo et al., 2003, Fitzgerald et al., 2000, Park et al., 1999]. Auch konnte durch Bell et al. [Bell et al., 2013] gezeigt werden, dass MP-Inhibitoren wie Doxycyclin oder Tetracyclin eine kardioprotektive Wirkung haben. Nach einer Ischämiezeit, z.B. nach einem Herzinfarkt mit anschließender Reperfusion, war das Infarktareal nach Gabe von MP-Inhibitoren deutlich kleiner. Die Aktivität von MP war vor allem in den ersten Minuten der Reperfusion erhöht und eine Inhibition von MP durch Doxycyclin führte zu einem reduzierten Infarktareal und damit zu einer besseren Prognose für den Patienten [Bell et al., 2013]. Diese benifiziellen Effekte könnten sehr wohl auf einem Erhalt der EG beruhen.

4.8 Ausblick

Gerade in Bereichen der Herzchirurgie oder nach Myokardinfarkt (MI) mit längeren Ischämiezeiten und Reperfusion könnte der Erhalt der Glykokalyx bei der Therapie und Prävention eine wichtige Rolle einnehmen und den postoperativen Erfolg der Patienten verbessern. Bei Gabe von Doxycyclin nach MI zeigte sich eine verbesserte Prognose infolge verringriger Infarktareale. Doxycyclin ist ein Tetracyclinantibiotikum, das eine hemmende Wirkung auf MP hat. Außerdem ist es im klinischen Alltag leicht verfügbar und könnte durch

seine nachgewiesene Wirkung als Inhibitor von aktiven Sheddasen der EG [Lipowsky et al., 2011] eine wichtige Rolle in der zukünftigen Therapie von I/R-Verletzungen spielen.

Der Schutz der EG durch Gabe von z.B. Proteinaseinhibitoren könnte das Risiko für postoperative Komplikationen reduzieren. Auch bei Erkrankungen wie Diabetis mellitus und Arteriosklerose, bei denen die Zerstörung der EG als Pathogenese diskutiert wird, könnte ein Erhalt dieser Schicht durch Proteinaseinhibitoren ein wichtiger therapeutischer Ansatz werden. Dennoch braucht es noch weitere Arbeiten um den Vorgang des Shedding verstehen zu können, damit weiterführende therapeutische Ansätze entwickelt werden können.

5. Zusammenfassung

Die endotheliale Glykokalyx findet man auf allen Gefäßendothelzellen, so auch im Koronarsystem des Herzens. Ihre Hauptbestandteile sind Syndekan, Heparansulfat und Hyaluronsäure. Aufgrund ihrer scheinbar nur geringen Dicke wurde ihr lange Zeit keine Bedeutung zugeteilt, aber seit ca. 30 Jahren ist sie in den Fokus der Wissenschaft gerückt.

Die EG spielt in vielen physiologischen und pathophysiologischen Abläufen im Körper eine modulierende Rolle. Sie verhindert die Extravasion von Wasser (Ödembildung), reguliert die Permeabilität von Makromolekülen und beteiligt sich an den Prozessen der Hämostase und Inflammation. Bei Krankheiten wie Diabetes mellitus und Arteriosklerose scheint die EG ebenfalls eine Rolle in der Pathogenese zu spielen.

Störungen der Glykokalyxfunktion gehen stets mit einem enzymatischen Abbau der Bestandteile einher, ein Vorgang der als Shedding bezeichnet wird.

Um mögliche „Sheddasen“ zu identifizieren verwendeten wir Meerschweinchenherzen in einem Langendorff-Versuchsaufbau und kontrollierter Perfusion mit Krebs-Henseleit-Puffer.

Dabei infundierten wir acht unterschiedliche Enzyme (Cathepsin B, Elastase, Tryptase, Thrombin, tPA, PR3, Hyaluronidase und Plamin) über 10 Minuten direkt in die Aorta. Sowohl das koronarvenöse Effluat als auch das Transsudat wurden zu bestimmten Zeitpunkten gesammelt (Basalwert vor Enzymapplikation, 10 min während Enzymapplikation, 5 min nach Applikationsende und 10 min nach Applikationsende). Transsudat bildet sich an der epikardialen Herzoberfläche und stellt ein direktes Maß für die Nettoflüssigkeitsfiltration im Koronarsystem dar. Das Transsudat wurde gewogen und auf ml/min/Herzgewicht berechnet. Das Effluat wurde bis zur Bestimmung der Auswaschraten von Syndekan, Heparansulfat und Hyaluronsäure mit Hilfe von ELISA-Tests zu einem späteren Zeitpunkt eingefroren. Die Auswaschraten (ng/min/Herzgewicht) bei Enzymgabe wurden dann zu Zeitkontrollen oder untereinander in Verhältnis gesetzt, um eventuelle Veränderungen der Auswaschraten bestimmen zu können.

Koronarfluss und Transsudatbildung wurden als funktionelle Parameter betrachtet. Der Koronarfluss wurde beobachtet, um Auswirkungen (Vasodilatation, Lumendurchmesservergrößerung) eines eventuellen Sheddings durch die Enzyme in Form von Erhöhung des Koronarflusses zu sehen. Dabei wurde der Basalwert mit dem Messzeitpunkt 5.3 verglichen.

Es konnte gezeigt werden, dass in der Kontrollgruppe und bei sechs von acht Enzymen kein signifikanter Koronarflussanstieg passierte. Bei Tryptase und Thrombin kam es sogar zu einer signifikanten Senkung der Koronarflussmenge pro Minute pro Herzgewicht um ca. 7% bzw. 20%.

Ein Anstieg der Transsudatmenge im Laufe des Versuchs hätte ein Hinweis für ein Koronarleck darstellen können (Barrierefunktion der Gefäßwand). Auch hier wurde der Basalwert mit dem Messzeitpunkt 5.3 verglichen. Wir konnten beobachten, dass nur Hyaluronidase (Positivkontrolle) zu einem Anstieg des Koronarlecks führte.

Das zeitabhängige Auswaschverhalten der Glykokalyxhauptbestandteile Syndekan, Hyaluronsäure und Heparansulfat wurde in der Kontrollgruppe untersucht. Es fand sich eine basale Abgabe aller drei Komponenten im Koronareffluat (Syndekan 2,89 ng/min/g, Hyaluronsäure 21,75 ng/min/g, Heparansulfat 1057 ng/min/g). Syndekan und Hyaluronsäure zeigten kein Auswaschverhalten zusätzlich zum physiologischen Auswasch über die Zeit. Bei Heparansulfat war der Auswasch nach Präparation der Herzen hoch und nahm mit der Zeit deutlich ab.

Der Vergleich Basalwert mit den Messzeitpunkten 5 – 10 Minuten nach Enzymgabe wurde für die drei Glykokalyxbestandteile durchgeführt. Syndekan und Heparansulfat zeigten weder für die Kontrollherzen noch für die enzymbehandelten Herzen eine signifikante Auswaschratenveränderung über die Zeit des Versuchablaufs. Bei Hyaluronsäure führte nur die Hyaluronidase zu einer signifikanten 12-fachen Erhöhung. Daraus schlossen wir zum einen, dass Hyaluronidase als „Positivkontrolle“ die Eignung unseres Versuchsansatzes bestätigte und zum anderen, dass unter den sonstigen getesteten Enzymen keine potenten Sheddasen waren.

Um dies genauer zu untersuchen, erfolgte ein Vergleich der Zeitverlaufsmittelwerte mit den Kontrollen und Enzymgruppen, wobei die Kontrollgruppe als Referenz galt. Für Syndekan konnte keines der verwendeten Enzyme ein Shedding bewirken, bei Hyaluronsäure war die Hyaluronidase die deutlichste Sheddase (160-fache Steigerung), wobei auch Cathepsin B, Elastase, Thrombin und Proteinase 3 zu einem weniger deutlichen Shedding (ca. 4 – 7-fach) führten. Bei HS führten Cathepsin B und Elastase überraschenderweise zu einem signifikanten (2-fach) Anstieg der Auswaschrate.

Als Fazit gilt, dass keines der getesteten Enzyme außer der Positivkontrolle Hyaluronidase sich als effektive Sheddase für die Bestandteile der EG herausgestellt hat. Möglicherweise sind aber die Serinproteasen und die Cysteinprotease Cathepsin B in der Lage, bei konzentrierter Aktion und in höheren Aktivitäten als von uns getestet als unspezifische Sheddasen zu wirken. Die Ergebnisse dieser Studie unterstützen indirekt die in der Literatur vermutete Beteiligung von Metalloproteininasen an der Zerstörung der Glykokalyx unter pathologischen Bedingungen.

Literaturverzeichnis

- Annecke, T., Chappell, D., Chen, C., Jacob, M., Welsch, U., Sommerhoff, C.P., Rehm, M., Conzen, P., Becker, B.F. (2010): Sevoflurane preserves the endothelial glycocalyx against ischaemia–reperfusion injury. *British Journal of Anaesthesia* **104**, 414-421.
- Annecke, T., Fischer, J., Hartmann, H., Tschoep, J., Rehm, M., Conzen, P., Sommerhoff, C.P., Becker, B.F. (2011): Shedding of the coronary endothelial glycocalyx: effects of hypoxia/reoxygenation vs ischaemia/reperfusion. *British Journal of Anaesthesia* **107**, 679-686.
- Becker, B.F., Chappell, D., Bruegger, D., Annecke, T., Jacob, M. (2010): Therapeutic strategies targeting the endothelial glycocalyx: acute deficits, but great potential. *Cardiovascular Research* **87**, 300-310.
- Becker, B.F., Chappell, D., Jacob, M. (2010): Endothelial glycocalyx and coronary vascular permeability:the fringe benefit. *Basic Research in Cardiology* **105**, 687-701.
- Bell, R., Kunuthur, S., Hendry, C., Bruce-Hickman, D., Davidson, S., Yellon, D. (2013): Matrix metalloproteinase inhibition protects CyPD knockout mice independently of RISK/mPTP signalling: a parallel pathway to protection. *Basic Research in Cardiology* **108**, .
- Bernfield, M., Götte, M., Park, P., Reizes, O., Fitzgerald, M., Lincecum, J., Zako, M. (1999): Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annual Review of Biochemistry* **68**, 729-777.
- Broekhuizen, L., Mooij, H., Kastelein, J., Stroes, E., Vink, H., Nieuwdorp, M. (2009): Endothelial glycocalyx as potential diagnostic and therapeutic target in cardiovascular disease. *Current Opinion in Lipidology* **20**, 57-62.
- Bruegger, D., Jacob, M., Rehm, M., Lötsch, M., Welsch, U., Conzen, P., Becker, B.F. (2005): Atrial natriuretic peptide induces shedding of endothelial glycocalyx in coronary vascular bed of guinea pig hearts. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology* **289**, 1993-1999.
- Bruegger, D., Rehm, M., Jacob, M., Chappell, D., Stoeckelhuber, M., Welsch, U., Conzen, P., Becker, B.F. (2008): Exogenous nitric oxide requires an endothelial glycocalyx to prevent postischemic coronary vascular leak in guinea pig hearts. *Critical Care* **12**, R73.
- Bruegger, D., Rehm, M., Abicht, J., Paul, J., Stoeckelhuber, M., Pfirrmann, M., Reichart, B., Becker, B.F., Christ, F. (2009): Shedding of the endothelial glycocalyx during cardiac surgery: On-pump versus off-pump coronary artery bypass graft surgery. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* **138**, 1445-1447.
- Buenger, R., Haddy, F.J., Querengässer, A., Gerlach, E. (1975): An Isolated Guinea Pig Heart Preparation with in vivo like Features. *Pflügers Archiv* **353**, 317-326.

Chappell, D., Jacob, M., Hofmann-Kiefer, K., Bruegger, D., Rehm, M., Conzen, P., Welsch, U., Becker, B.F. (2007): Hydrocortisone Preserves the Vascular Barrier by Protecting the Endothelial Glycocalyx. *Anesthesiology* **107**, 776-784.

Chappell, D., Jacob, M., Rehm, M., Stoeckelhuber, M., Welsch, U., Conzen, P., Becker, B.F., (2008): Heparinase selectively sheds heparan sulphate from the endothelial glycocalyx. *The Journal of Biological Chemistry* **389**, 79-82.

Chappell, D., Jacob, M., Becker, B.F., Hofmann-Kiefer, K., Conzen, P., Rehm, M. (2008): Expedition Glykokalyx- Ein neu entdecktes "Great Barrier Reef". *Anaesthesia* **57**, 959-969.

Chappell, D., Hofmann-Kiefer, K., Jacob, M., Rehm, M., Briegel, J., Welsch, U., Conzen, P., Becker, B.F. (2009): TNF alpha induced shedding of the endothelial glycocalyx is prevented by hydrocortisone and antithrombin. *Basic Research in Cardiology* **104**, 78-89.

Chappell, D., Dörfler, N., Jacob, M., Rehm, M., Welsch, U., Conzen, P., Becker, B.F. (2010): Glycocalyx protection reduces leukocyte adhesion after ischemia/reperfusion. *Shock* **34**, 133-139.

Chappell, D., Heindl, B., Jacob, M., Annecke, T., Chen, C., Rehm, M., Conzen, P., Becker, B.F. (2011): Sevoflurane reduces leukocyte and platelet adhesion after ischemia-reperfusion by protecting the endothelial glycocalyx. *Anesthesiology* **115**, 483-491.

Danielli, J. (1940): Capillary permeability and oedema in the perfused frog. *The Journal of Physiology* **98**, 109-129..

Dhein, S., Mohr, F., Delmar, M. (2004): Practical Methods in Cardiovascular Research. ISBN 978-3540407638, S. 155 ff.

Diaclone: sCD138 (Syndekan-1) Elisa Datenblatt,

Endo, K., Takino, T., Miyamori, H., Kinsen, H., Yoshizaki, T., Furukawa, M., Sato, H. (2003): Cleavage of Syndecan-1 by Membrane Type Matrix Metalloproteinase-1 Stimulates Cell Migration. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 40764-40770.

Fitzgerald, M., Wang, Z., Park, P. W., Murphy, G., Bernfield, M. (2000): Shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains is regulated by multiple signaling pathways and mediated by a TIMP-3-sensitive metalloproteinase. *The Journal of Cell Biology* **148**, 811-824.

Frlan, R., Gobec, S. (2006): Inhibitors of Cathepsin B. *Current Medicinal Chemistry* **13**, 2309-2327.

Gao, L., Lipowsky, H. (2010): Composition of the endothelial glycocalyx and its relation to its thickness and diffusion of small solutes. *Microvascular Research* **80**, 394-401.

Gilles, S., Zahler, S., Welsch, U., Sommerhoff, C., Becker, B.F. (2003): Release of TNF-alpha during myocardial reperfusion depends on oxidative stress and is prevented by mast cell stabilizers. *Cardiovascular Research* **60**, 608-616.

Götte, M. (2003): Syndecans in inflammation. *The FASEB Journal* **17**, 575-591.

Grundmann S, Schirmer SH, Hekking LH, Post JA, Ionita MG, de Groot D, van Royen N, van den Berg B, Vink H, Moser M, Bode C, de Kleijn D, Pasterkamp G, Piek JJ, Hoefer IE (2009): Endothelial glycocalyx dimensions are reduced in growing collateral arteries and modulate leucocyte adhesion in arteriogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **13**, 3463-3474.

Hayashida, K., Parks, W., Park, P. (2009): Syndecan-1 shedding facilitates the resolution of neutrophilic inflammation by removing sequestered CXC chemokines. *Blood* **114**, 3033-3043.

Henry, C.B., Duling, B.R (1999): Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan.. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology* **277**, H508-H514.

Heutinck, K., Ten Berge, I., Hack, C.E., Hamann, J., Rowshani, A.T. (2010): Serine proteases of the human immune system in health and disease. *Molecular Immunology* **47**, 1943-1955.

Ihrcke, N., Platt, J. (1996): Shedding of Heparan Sulfate Proteoglycan by Stimulated Endothelial Cells: Evidence for Proteolysis of Cell-Surface Molecules. *Journal of Cellular Physiology* **168**, 625-637.

Jacob, M., Bruegger, D., Rehm, M., Welsch, U., Conzen, P., Becker, B.F. (2006): Contrasting Effects of Colloid and Crystalloid Resuscitation Fluids on Cardiac Vascular Permeability. *Anesthesiology* **104**, 1223-1231.

Jacob, M., Rehm, M., Loetsch, M., Paul, J., Bruegger, D., Welsch, U., Conzen, P., Becker, B.F. (2007): The Endothelial Glycocalyx Prefers Albumin for Evoking Shear Stress-Induced, Nitric Oxide-Mediated Coronary Dilatation. *Journal of Vascular Research* **44**, 435-443.

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

Lipowsky, H., Sah, R., Lescanic, A. (2011): Relative roles of doxycycline and cation chelation in endothelial glycan shedding and adhesion of leukocytes. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology* **300**, 415-422.

Lipowsky, H. (2011): Protease activity and the role of the endothelial glycocalyx in inflammation. *Drug Discovery Today:Disease Models* **8**, 57-62.

Marshall, L., Ramdin, L., Brooks, T., DPhil, P., Shute, J. (2003): Plasminogen activator inhibitor-1 supports IL-8-mediated neutrophil transendothelial migration by inhibition of the constitutive shedding of endothelial IL-8/heparan sulfate/syndecan-1 complexes. *The Journal of Immunology* **171**, 2057-2065.

Pahakis, M., Kosky, J., Dull, R., Tarbell, J. (2007): The role of endothelial glycocalyx components in mechanotransduction of fluid shear stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **355**, 228-233.

Parish, C. (2006): The role of heparan sulphate in inflammation. *Nature Reviews Immunology* **6**, 633-643.

Park, P., Reizes, O., Bernfield, M. (1999): Cell surface heparan sulfate proteoglycans: selective regulators of ligand-receptor encounters. *Annual Review of Biochemistry* **68**, 729-777.

Pries, A., Secomb, T., Gaehtgens, P. (2000): The endothelial surface layer. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **440**, 653-666.

Pries, A., Kuebler, W. (2006): Normal endothelium. *Handbook of Experimental Pharmacology* , 1-40..

Rehm, M., Zahler, S., Lötsch, M., Welsch, U., Conzen, P., Jacob, M., Becker, B.F. (2004): Endothelial Glycocalyx as an Additional Barrier Determining Extravasation of 6% Hydroxyethyl Starch of 5% Albumin Solutions in the Coronary Vascular Bed. *Anesthesiology* **100**, 1211-1223.

Rehm, M., Bruegger, D., Christ, F., Conzen, P., Thiel, M., Jacob, M., Chappell, D., Stoeckelhuber, M., Welsch, U., Reichart, B., Peter, K., Becker, B.F. (2007): Shedding of the Endothelial Glycocalyx in Patients Undergoing Major Vascular Surgery With Global and Regional Ischemia. *Circulation* **116**, 1896-1906.

Reitsma, S., Slaaf, D.W., Vink, H., van Zandvoort, M.A., oude Egbrink, M.G. (2007): The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflügers Archiv* **454**, 345-359.

Roemisch, J., Gray, E., Hoffmann , J., Wiedermann C. (2002): Antithrombin: a new look at the actions of a serine protease inhibitor. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* **13**, 657–670.

Samoszuk, M., Corwin, M., Hazen, S. (2003): Effects of Human Mast Cell Tryptase and Eosinophil Granule Proteins on the Kinetics of Blood Clotting. *American Journal of Hematology* **73**, 18–25.

Seyfried, D., Veyna, R., Han, Y., Li, K., Tang, N., Betts, R., Weinsheimer, S., Chopp, M., Anagli, J. (2001): A selektive cysteine protease inhibitor is non-toxic and cerebroprotective in rats undergoing transient middle cerebral artery ischemia. *Brain Research* **901**, 94-101.

Silbernagel, S., Despopoulos, A. (2003): Taschenatlas der Physiologie. **ISBN** 3-13-567706-0, S. 102 ff.

Stevens, A., Hlady, V., Dull, R. (2007): Fluorescence correlation spectroscopy can probe albumin dynamics inside lung endothelial glycocalyx. *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology* **293**, L328–L335.

Subramanian, S.V., Fitzgerald, M.L., Bernfield, M., (1997): Regulated Shedding of Syndecan-1 and -4 Ectodomains by Thrombin and Growth Factor Receptor Activation. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 14713-14720.

Vogel, J., Sperandio, M., Pries, A., Linderkamp, O., Gaehtgens, P., Kuschinsky, W. (2000): Influence of the Endothelial Glycocalyx on Cerebral Blood Flow in Mice. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **20**, 1571-1578.

Waisman, D. M. (2003): Plasminogen: Structure, Activation and Regulation. **ISBN** 978-0306476990, S. 8.

Wang, B., Jia, J., Zhang, X., Zcharia, E., Vlodavsky, I., Pejler, G., Li, J. (2011): Heparanase affects secretory granule homeostasis of murine mast cells through degrading heparin. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **128**, 1310-1317.

Weinbaum S, Tarbell JM, Damiano E (2007): The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annual Review of Biomedical Engineering* **9**, 121-167.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Pohl (Walter-Brendl-Zentrum für experimentelle Medizin) danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. B.F. Becker möchte ich besonders für die Überlassung des Themas, seine unermüdliche Unterstützung, Geduld und Ausdauer in der experimentellen Phase und für immer ausführliche, wegweisende Gespräche und Gedanken in der Auswertungsphase danken.

Prof. Becker hatte jederzeit großes Interesse an dem Fortschritt der Arbeiten und immer ein offenes Ohr für alle Belange zum Thema.

Danken möchte ich auch Herrn PD Dr. med. Daniel Chappell und Frau CongCong Chen für die Unterstützung bei den Herzpräparationen in der experimentellen Phase.

Ebenso danke ich Frau Gaby Gröger für die Durchführung zur Bestimmung der Glykokalyxbestandteile im Forschungslabor der Klinik für Anästhesiologie in Großhadern.

Frau Dora Kiesl verdanke ich die Unterstützung für Experimente im Labor, die sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Ich möchte ebenso allen Danken, die zwar nicht direkt an der Entstehung der Arbeit beteiligt waren, doch mit guten Hinweisen, Ideen und so mancher Ermutigung doch zum Gelingen beigetragen haben. Dabei gilt mein besonderer Dank Martin Riethmayer, der mir vor allem bei technischen Fragen in der Auswertungsphase jederzeit zur Seite stand und Melanie Barz, die mir als Gesprächspartner immer ermutigend Rat geben konnte.

Besonderen Dank möchte ich auch meinen Eltern und Schwestern zukommen lassen, denn ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Eidesstattliche Versicherung

Leipert, Stephanie

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

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

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

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand